

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 303628

(P2002 - 303628A)

(43)公開日 平成14年10月18日(2002.10.18)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53			G 0 1 N 33/53	Q N

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 6 数)

(21)出願番号 特願2001 - 106960(P2001 - 106960)

(22)出願日 平成13年4月5日(2001.4.5)

(71)出願人 000113470

ポ－ラ化成工業株式会社

静岡県静岡市弥生町6番48号

(72)発明者 三木 豊彦

神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560番地 ポ－

ラ化成工業株式会社戸塚研究所内

(72)発明者 北島 裕之

神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560番地 ポ－

ラ化成工業株式会社戸塚研究所内

(72)発明者 池澤 善郎

神奈川県横浜市金沢区能見台通24 - 8

(54)【発明の名称】 アレルギー病態の鑑別方法

(57)【要約】

【課題】 患者に負担、苦痛を与えない方法によりアレルギー抗原特異的な粘膜免疫状態を測定し、アレルギーに直接関与していると考えられる抗原を予測でき、アレルギー治療にとって重要な情報を提供すること。

【解決手段】 アレルギー患者のアレルギー抗原に対する特異的分泌型 I g A と血中 I g E を測定し、その数値間の相対関係を指標としてアレルギーの重篤度を鑑別する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 患者より採取した検体中のアレルギーの原因抗原に対する分泌型 I g A 抗体の量と血中 I g E 抗体の量を測定し、その数値間の相対関係を指標とすることを特徴とする、その抗原に起因するアレルギー病態の鑑別方法。

【請求項2】 アレルギーの原因抗原に対する分泌型 I g A 抗体の量が少なく、血中 I g E 抗体の量が多い患者のアレルギー病態が重篤であると鑑別することを特徴とする、請求項1に記載のその抗原に対するアレルギー病態の鑑別方法。

【請求項3】 アレルギーの原因抗原が、カンジダ抗原、ダニ抗原、食物抗原、花粉抗原である請求項1又は2に記載の測定法。

【請求項4】 分泌型 I g A 抗体を測定する検体が、患者の唾液、便、涙及び汗から選ばれる1種乃至は2種以上である請求項1～3何れか1項に記載の測定法。

【請求項5】 抗原特異的分泌型 I g A を非特異的分泌型 I g A により補正した値を使用する請求項1～4何れか1項に記載の測定方法。

【請求項6】 請求項1～5何れか1項に記載の免疫グロブリンの測定を E L I S A 法にて行うことを特徴とした測定キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、アトピー性皮膚炎、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎等のアレルギー性疾患の治療に有用な情報を提供するためのアレルギー診断法及び、そのためのシステムに関するものである。

【0002】

【従来の技術】アレルギーの原因となる抗原を把握することは、アレルギーの治療において非常に重要なことである。一般にアレルギー疾患は、その原因抗原に感作されることにより、血清及び、組織において抗原特異的な I g E 抗体が産生され、その I g E 抗体が、肥満細胞及び、好塩基球の I g E レセプターに結合し、再びその抗原に暴露されることにより、細胞の活性化が起こり、ケミカルメディエーターであるヒスタミン、セロトニン、ロイコトリエンを始めとした脂質代謝物、サイトカイン類等を放出し、生理的反応が現れると言われている。従来、アレルギーの診断には、この血液中の抗原特異的な I g E 抗体量やそれによる生理的反応を確認する皮膚反応テストにより原因抗原を特定することが一般的である。しかしながら、これら方法で測定した結果と臨床症状が一致しないのは臨床家が良く経験する事実であり、実際に病態に関与している原因抗原とこれら診断法の結果が必ずしも一致するものではない。

【0003】一方、アレルギーの病態について、患者より採取した検体中のアレルギーの原因抗原に対する分泌

型 I g A 抗体の量と血中 I g E 抗体の量を測定し、その数値間の相対関係を指標とするものは、全く知られていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】上記のようにアレルギーの病態に直接関与する原因抗原を特定することは、アレルギーの治療にとって非常に有用なことであり、その方法が臨床において望まれている。また、従来の診断法は、採血、皮内注射等の人体にとって苦痛を伴う処置を行わなければならない。患者の Q O L を考えた場合、苦痛を与えずに正確にアレルギー治療に有効な情報を得ることは非常に有用なことである。本発明の目的は、従来の全身系免疫の活性化にともなう原因抗原に特異的な I g E 産生による一連のアレルギー診断法以外の方法を加味することにより、より病態に直接且つ密接に関与している原因抗原が特定でき、しかも生体の分泌液を測定することにより、検査による苦痛を伴わないアレルギーの診断方法を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】粘膜免疫は、局所での生体防御機能に加えて、生体が自ら持ち合わせているアレルギー抑制のためのシステムであるといえる。生体は、抗原を粘膜免疫の誘導組織である鼻咽頭関連リンパ組織 (N A L T)、気管支関連リンパ組織 (B A L T)、腸管関連リンパ組織 (G A L T) などで感作誘導させ、粘膜免疫機構の液性免疫の中心をなす分泌型 I g A を産生するため、循環帰巢経路 (C M I S) を通じて全身の実効組織へと抗原特異的な免疫細胞を送り込む。この実効組織としては、腸管、鼻腔、咽頭、泌尿生殖器などの粘膜固有層、そして涙腺、唾液腺、乳腺、汗腺などの腺組織があげられる。これら実効組織から体表面へ分泌される分泌型 I g A の量は、1日に3000mgにもおよび、体内に侵入する抗原や異物に対する最前線の感染防御機能を形成している。さらに粘膜免疫機構は、全身免疫系に作用し、抗原特異的な免疫寛容を誘導する。代表的な現象として経口免疫寛容があげられ、消化管粘膜のパイエル板等の誘導組織に認識されることでその抗原に対する抗原特異的な免疫反応の消失 (不応答) が得られる。このことは、毎日大量に摂取される食物抗原に対して生体が、アレルギーを起こさないための重要なメカニズムである。この現象を利用したアレルギーの治療法も臨床的に試みられているが、現在のところ実用化レベルには至っていない。従来、乳幼児の食物アレルギーの発症に関してその原因の一つに粘膜免疫の未発達によることが指摘されている。(寺井ら、医学のあゆみ(別冊)57-62,1999)そこでは、粘膜免疫の未発達からくる分泌型 I g A の低下による抗原の暴露が I g E 産生へとつながっている可能性が述べられている。また、この報告では、血清中の大豆、牛乳に特異的な I g A 抗体と I g E 抗体 (R A S T 値) の間に負の相関が認められる

が、卵白では相関がないことも指摘している。また、こういった粘膜免疫の破綻とアレルギー発症の関係については、注目されているにも係わらず、実際に乳幼児の食物アレルギー以外の幅広い年齢層、抗原でアレルギー状態にある患者の粘膜免疫状態と病態の関係を抗原レベルで解明した報告はない。本発明者らは、アレルギー状態の幅広い年齢層の患者における従来の方法で診断した原因抗原に特異的な粘膜免疫の活性化を生体の分泌液中の粘膜免疫の指標となる分泌型IgAを測定することで探索した結果、両者の間にこれまで知られていなかった新たな関係が存在することを見出した。すなわちアレルギー患者におけるIgEと分泌型IgAの関係は、従来報告されていた負の相関ではなく、抗原の暴露によりIgEを産生する群と分泌型IgAを産生する群に2分され、ほとんどの患者が、そのどちらかに属することが判明した。さらにこのときIgEを産生する群は、重症患者が多く、分泌型IgAを産生する群は、健康人、軽症患者が多いことも判ってきた。また、中等症患者については、この方法により重症タイプと軽症タイプに2分され、同じ重症度をもつ中等症患者のなかに重症化の危険性がある群が識別できた。また、検体中の分泌型IgAの測定において非特異的IgAによる補正をすることで安定した抗原特異的な粘膜免疫状態を表す値が得られており、従来の分泌型IgAのみを測定する方法や血中のIgAを測定する方法に比べて抗原特異的な粘膜免疫状態を良好に検出できることも判明した。したがって、我々は、従来のIgE測定に加えて唾液採取等の患者に苦痛を与えることなく簡易的な方法で分泌型IgAを測定することでその抗原に対する病態への関与並びに重症化の危険性を判断するという新しいアレルギーの識別方法を見出し、発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、以下に示す技術に関するものである。

(1) アレルギー患者のアレルギー抗原に対する特異的分泌型IgAと血中IgEを測定し、その数値間の相対関係を指標とすることを特徴とする、その抗原に起因するアレルギー病態の鑑別方法。

(2) 抗原特異的分泌型IgA抗体の量が少なく、血中IgE抗体の量が多い患者のアレルギー病態が重篤であると鑑別することを特徴とする、(1)に記載のその抗原に対するアレルギー病態の鑑別方法。

(3) アレルギーの原因抗原が、カンジダ抗原、ダニ抗原、食物抗原、花粉抗原である(1)又は(2)に記載の測定法。

(4) 分泌型IgA抗体を測定する検体が、患者の唾液、便、涙及び汗から選ばれる1種乃至は2種以上である(1)~(3)何れか1項に記載の測定法。

(5) 抗原特異的分泌型IgAを非特異的分泌型IgAにより補正した値を使用する(1)~(4)何れか1項に記載の測定方法

(6) (1)~(5)何れか1項に記載の免疫グロブリン

の測定をELISA法にて行うことを特徴とした測定キット。

以下、本発明について、実施の形態を中心に更に詳細に説明を加える。

【0006】

【発明の実施の形態】以下、発明を説明する。本発明に用いられるアレルギー原因抗原は、カンジダ抗原、ダニ抗原、食物抗原、花粉抗原等の粘膜常在菌、吸入環境抗原、飲食による腸管内に摂取される抗原である。

【0007】1. カンジダ抗原について

ヒトのアレルギー発症・増悪に関与していると言われていたカンジダ属真菌であるカンジダ アルビカンス(*Candida albicans*)、カンジダ トロピカリス(*Candida tropicalis*)、カンジダ グラプラタ(*Candida glabrata*)、カンジダ ボイディニイ(*Candida boidinii*)等の菌体粗抽出物または、各構成成分及び、その部分ペプチド、さらにその組み合わせが測定抗原として使用される。この中でカンジダ アルビカンスが特に重要であり、その構成成分である細胞壁マンナン、酸性プロテアーゼ、エノラーゼ、ストレス蛋白質HSP90、Mn-SODなどの他、菌体抽出物並びに膜成分などの粗精製物などが使用することができる。アレルギー患者の持っている抗体の認識するカンジダ抗原は、幅広く特定できないケースが多いことから、粗精製物による幅広い測定は、特に重要である。この場合、対象アレルギー患者としては、食物アレルギー患者、アトピー性皮膚炎患者、喘息患者などのカンジダアレルギーが病態に関与している可能性が高い患者が想定できる。

【0008】2. ダニ抗原について

ヒトのアレルギー発症・増悪に関与していると言われていたダニ類であるコナヒョウダニ(*Dermatophagoides farinae*)、ヤケヒョウダニ(*Dermatophagoides pteronyssinus*)等の虫体抽出物または、各構成成分及び、その部分ペプチド、さらにその組み合わせが測定抗原として使用される。この中で最も重要なのは、ヒョウダニ属であり、その構成成分であり主要アレルゲンとして知られるDerf1、Derf2であるが、その他のDarp1などの構成成分も使用可能である。さらに幅広くダニのアレルギーへの関与を把握するために、混合物並びに粗生成物を使うことも可能である。この場合、対象アレルギー患者としては、アトピー性皮膚炎患者、喘息患者などのダニアレルギーが病態に関与している可能性が高い患者が想定できる。

【0009】3. 食物抗原について

食物アレルギーの原因抗原とされている卵、牛乳、魚介類、小麦、豆類、肉類、そば、米などの種々の原因抗原が報告されており、それぞれの粗抽出物並びに構成成分が抗原として使用できる。幅広く食物アレルギーへの食物抗原の関与を把握するために、これら混合物並びに粗精製物を使うことが望ましい。この場合の対象アレルギー

一患者としては、食物アレルギー患者の他にアトピー性皮膚炎患者などの食物アレルギーが関与する疾患についても対象となることが予想される。

【0010】4. 花粉抗原について

ヒトの花粉アレルギー発症・増悪には、スギ、ヒノキ、ブタクサ、ヨモギ、シラカンバ、イネ科などの種々の植物の花粉抗原が原因していることが報告されている。スギ花粉症の原因抗原は、主要抗原としてCry j 1、Cry j 2などの蛋白が報告されており、これら構成成分も使用することが可能である。また、より幅広い花粉アレルギーへの花粉抗原の関与を把握するためにこれら構成成分を混合して用いたり、粗生成物を用いることが望ましい。この場合の対象アレルギー患者としては、花粉アレルギーによる花粉症患者の他、それに伴うアレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎患者なども対象になる。

【0011】これら各種抗原は、天然からの抽出、さらに精製を加えることをで製造できる。また、単一蛋白質による構成成分については、大腸菌、バチルス菌、酵母などの微生物、人もしくは動物細胞などに対象となる遺伝子を組み込むことで大量に生産することができる。

【0012】これら抗原の選択は、アレルギー患者の血中IgE等のバックグランド情報から選択することができる。アレルギーの原因抗原に対して分泌型IgAが十分誘導されている場合、アレルギーに対して抵抗性を示すため、その原因抗原の病態への関与は、非常に低いことが予想される。また、分泌型IgAの誘導が十分でない場合には、その原因抗原に対する抵抗力が弱いことが予想され、抗原が直接病態へ関与している可能性が高いことが予想され、また、抗原の接触により病態増悪を引き起こす危険性も考えられ注意が必要となる。これを言い換えるならば、アレルギーの原因と考えられる抗原に対する分泌型IgAの量と血中IgE量の関係を調べ、血中IgE量が高く、分泌型IgA量も高い場合には、アレルギーであってもその病態は重篤でないと鑑別し、逆に分泌型IgAの量が低い場合には、アレルギーの病態は重篤であると鑑別するのが、本発明の鑑別方法である。この様な鑑別の基礎となる分泌型IgAの量であるが、これを測定するためのサンプルとしては、患者の体液が好ましく例示でき、例えば、患者の唾液、便、涙及び汗から選ばれる1種乃至は2種以上が例示できる。これらの内、特に好ましいものは、採取に苦痛を伴わない

唾液である。これらの検体を、ELISAを用いることにより、前記免疫グロブリンの2つのサブタイプのは分けて測定することが出来る。かくして得られた免疫グロブリンの2つのサブタイプは、それぞれの量を縦軸と横軸にしてプロットする事により、一目で病態を鑑別できるので、この様なプロットを用いた鑑別が本発明においては特に好ましい。本発明の測定キットはこの様なELISAを行うためのキットであり、アレルギーの原因となる抗原でコートしたウェルを有するプレート、標識した抗ヒト分泌型IgA抗体と標識の発現剤からなり、標識としてはHRP等が好ましく例示でき、発現剤としては、その発色剤であるTMB試薬が好適に例示できる。

【0013】

【実施例】以下に、実施例を挙げて、本発明について更に詳細に説明を加えるが、本発明がこの様な実施例にのみ限定されないことは言うまでもない。

【0014】<実施例1> カンジダ特異的分泌型IgAの非特異的分泌型IgAによる補正

午前10時より2時間ごと計5回、口腔内に市販の歯科用コットンロールを左右の耳下腺にふくませて唾液を採取した。採取した唾液は、遠心管によりコットンロールから分離させて測定試料とした。カンジダ特異的分泌型IgA抗体量は、ELISA測定用プラスチック96穴プレートに市販のカンジダ抗原エキスをコートし、そこに患者から採取した試料を添加、洗浄後、HRP標識した抗ヒト分泌型IgA抗体を添加して反応、さらに洗浄後、TMB試薬にて発色させた後、10%硫酸を加えて反応を停止してからプレートリーダーにて452nm-595nmの吸光度を測定し算出した。非特異的分泌型IgA抗体量は、ELISA用プラスチックプレートに抗ヒト分泌型IgA抗体をコートしたものをを用いて同様の操作を行った。

【0015】結果)結果を表1に示す。唾液の採取時間によりカンジダ特異的分泌型IgA及び非特異的分泌型IgAの濃度が異なった。これは、唾液採取時の水分含量により濃度が異なると思われる。カンジダ特異的分泌型IgAに対する非特異的分泌型IgAの比率を算出すると、全ての時間においてほぼ同様の安定した数値を示した。

【0016】

【表1】

	A	B	B/A
サンプリング			(補正值)
10:00	22.7	0.37	8.1
12:00	54.1	0.65	6.0
14:00	31.7	0.45	7.1
16:00	50.5	0.63	6.3
18:00	35.0	0.48	6.9
平均	38.8	0.52	6.9
標準偏差	13.1	0.12	0.8
変動係数	33.9	23.3	12.2

【0017】<実施例2> カンジダ抗原に対するアトピー性皮膚炎患者の粘膜免疫状態

アトピー性皮膚炎患者の口腔内に市販の歯科用コットンロールを左右の耳下腺にふくませて唾液を採取した。採取した唾液は、遠心管によりコットンロールから分離させて測定試料とした。カンジダ特異的分泌型IgA抗体量は、ELISA測定用プラスチック96穴プレートに市販のカンジダ抗原エキスをコートし、そこに患者から採取した試料を添加、洗浄後、HRP標識した抗ヒト分泌型IgA抗体を添加して反応、さらに洗浄後、TMB試薬にて発色させた後、10%硫酸を加えて反応を停止してからプレートリーダーにて452nm-595nmの吸光度を測定し算出した。非特異的分泌型IgA抗体量は、ELISA用プラスチックプレートに抗ヒト分泌型IgA抗体をコートしたものをを用いて同様の操作を行った。唾液量による変動を補正するため、カンジダ特異的分泌型IgA量/総分泌型IgA量の比率を粘膜免疫状態を示す指標として用いた。また、患者のアレルギーのバックグランド(血清中のIgE RAST値など)は、一般診療の検査結果を参考とした。

【0018】結果) 結果を図1に示す。この図1より、患者の血清中のIgE RAST陽性率とアトピー性皮膚炎重症度の間に関連が認められた。一方、重症患者の抗原特異的分泌型IgA陽性率は低く、軽症患者では陽性患者が多く存在する。また、この時、血清中IgEと分泌型IgA値の間に数値的な相関は認められなかった。これより、本発明の鑑別方法により、アレルギーの病態が適切に鑑別できることが判る。

【0019】<実施例> スギ花粉抗原に対するスギ花粉症患者の粘膜免疫状態

*スギ花粉症患者の口腔内に市販の歯科用コットンロールを左右の耳下腺にふくませて唾液を採取した。採取した唾液は、遠心管によりコットンロールから分離させて測定試料とした。スギ花粉特異的分泌型IgAは、ELISA測定用プラスチック96穴プレートに市販のスギ花粉エキスをコートし、そこに患者から採取した試料を添加、洗浄後、HRP標識した抗ヒト分泌型IgA抗体を添加して反応、さらに洗浄後、TMB試薬にて発色させた後、10%硫酸を加えて反応を停止してからプレートリーダーにて452nm-595nmの吸光度を測定し算出した。非特異的分泌型IgA抗体量は、ELISA用プラスチックプレートに抗ヒト分泌型IgA抗体をコートしたものをを用いて同様の操作を行った。唾液量による変動を補正するため、スギ花粉特異的分泌型IgA量/総分泌型IgA量の比率を粘膜免疫状態を示す指標として用いた。また、患者のアレルギーのバックグランド(血清中のIgE RAST値など)は、一般診療の検査結果を参考とした。

【0020】結果) スギ花粉に対する分泌型IgA陽性患者は、スギ花粉に対するIgE RAST陽性患者が極めて少ないことが判明した。

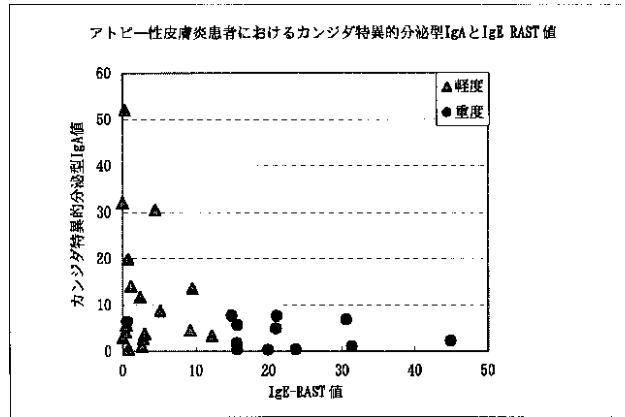
【0021】

【発明の効果】本発明により患者に負担、苦痛を与えない方法によりアレルギー抗原特異的な粘膜免疫状態を測定し、アレルギーに直接関与していると考えられる抗原を予測でき、アレルギー治療にとって重要な情報を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例2の重症度別分泌型IgAとIgE RAST値の関係を示す図である。

【図1】



专利名称(译)	过敏性疾病的鉴别方法		
公开(公告)号	JP2002303628A	公开(公告)日	2002-10-18
申请号	JP2001106960	申请日	2001-04-05
[标]申请(专利权)人(译)	宝丽化学工业有限公司		
申请(专利权)人(译)	波拉化工有限公司		
[标]发明人	三木豊彦 北島裕之 池澤善郎		
发明人	三木 豊彦 北島 裕之 池澤 善郎		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.Q G01N33/53.N		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：通过一种不加重或不加重患者负担并预测被认为直接与过敏相关的抗原的方法来测量过敏原-抗原特异性的粘膜免疫状态，从而为过敏治疗提供重要的信息。.. 解决方案：测量过敏患者过敏抗原的特异性分泌型IgA和血液IgE，并通过将值之间的相对关系作为指标来区分过敏的严重程度。

8

	A	B	B/A
サンプリング			(補正值)
10:00	22.7	0.37	8.1
12:00	54.1	0.65	6.0
14:00	31.7	0.45	7.1
16:00	50.5	0.63	6.3
18:00	35.0	0.48	6.9
平均	38.8	0.52	6.9
標準偏差	13.1	0.12	0.8
変動係数	33.9	23.3	12.2