

---

 論 説
 

---

## 好酸球性副鼻腔炎の疫学と診断

藤枝 重治・坂下 雅文・意元 義政

## Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis

Shigeharu Fujieda, Masafumi Sakashita and Yoshimasa Imoto

(University of Fukui)

Chronic rhinosinusitis (CRS) is an extremely common disease in Japan. The standard therapeutic strategies for CRS have been low-grade macrolide therapy and endonasal endoscopic sinus surgery (ESS). Recently a new subtype of CRS has been increasing in Japan. CRS of this subtype which is classified by as eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS), shows less response to standard therapy and a higher tendency for recurrence. Strong eosinophil infiltration can be found in nasal polyps of ECRS patients.

We conducted a retrospective study in 12 universities to ascertain the diagnostic characteristics of ECRS and to establish clinical diagnostic criteria to distinguish ECRS from CRS. In all, 3,014 patients with CRS who underwent an ESS procedure during the 3 years from 2007 to 2010 were enrolled in this study. Patients were clinically diagnosed as having CRS by their respective ENT medical doctors. We collected clinical data and analyzed the data using statistical methods. Eight hundred and thirty two patients (28%) were diagnosed as having ECRS. We found a significantly high rate of bilateral lesions, nasal polyps, viscous rhinorrhea, olfactory disturbance, and olfactory cleft closure in ECRS. In CT findings, the ethmoid sinus shadow was significantly strong in ECRS patients. As for comorbidity, several diseases (bronchial asthma, allergic rhinitis, aspirin-induced asthma and drug allergy) showed a significantly high rate together with ECRS. We calculated the odds ratio and clinical score for ECRS using a multiple classification analysis. Seven items (age of onset, bilateral region, ethmoid shadow, nasal polyps, olfactory cleft closure, drug allergy and percentage of eosinophils in blood) were chosen, because ENT doctors are able to check these easily. We can total up the individual score for every patient to make a diagnosis. Based on these criteria, we can diagnose ECRS if the total score is greater than 5. Now we are revising these criteria.

**Keywords :** eosinophilic chronic rhinosinusitis, nasal polyp, criteria, chronic sinusitis, epidemiology

副鼻腔炎とは<sup>1)</sup>

上顎洞, 篩骨洞, 蝶形洞, 前頭洞からなる副鼻腔は, 狭い自然口によって固有鼻腔と連続している。副鼻腔の役割は, 肺に入る空気の加温と加湿であり, 洞内は薄い粘膜で覆われている。このような副鼻腔にウイルスの感染やそれに引き続く細菌感染が起こると, 粘膜に炎症反応が惹起される。炎症によって浮腫が生じるとともに自然口は閉鎖する。洞内では粘液分泌が亢進するとともに,

排出障害によって分泌物の貯留が起こる。治癒の遷延化や新たな感染が加わり, いったん生じた炎症はさらなる炎症の増悪を繰り返し, 慢性的な経過をたどる。これが副鼻腔炎である。

副鼻腔炎には, 症状を発現している期間によって急性と慢性に分けられている。4 週間以内のものを急性副鼻腔炎, 8 週間以上症状が持続しているものを慢性副鼻腔炎としている。現在では, 慢性に関し一般的な慢性副鼻

腔炎, 好酸球性副鼻腔炎, アレルギー性真菌性副鼻腔炎, 副鼻腔真菌症, 破壊型真菌症が存在する。慢性副鼻腔炎は, 粘性や膿性鼻汁, 鼻閉, 頬部痛, 歯痛, 頭重感, 嗅覚障害, 後鼻漏などの症状を呈する。鼻副鼻腔内視鏡検査にて, 鼻腔における鼻茸 (ポリープ) の有無, 鼻汁の性状, 鼻汁流出経路を把握する。副鼻腔 X 線単純撮影は診断のスクリーニングに適しているが, 病状の詳細把握は, 副鼻腔単純 CT や磁気共鳴画像 (MRI) が優れている。各洞内の貯留液や粘膜の肥厚の状態, 貯留液の性状の確認, 腫瘍との鑑別, 骨の状態, 石灰化の有無などを容易に判別できる。

#### これまでの慢性副鼻腔炎

慢性副鼻腔炎の治療成績は, 14 員環マクロライド系抗菌薬の少量長期療法の開発と鼻副鼻腔内視鏡手術の進歩で改善した。これまでの副鼻腔炎に対するマクロライド少量長期療法の有効性をまとめると, 1) 3ヵ月程度の投与で有効率は 70%程度である, 2) 粘稠な鼻汁を改善する, 3) 後鼻漏を含め, 鼻汁の量を減少させる, 4) 副鼻腔炎手術後に用いると術後成績が向上する<sup>2)~6)</sup>となる。しかしこれらのマクロライドが有効な慢性副鼻腔炎の特徴は, 副鼻腔粘膜に好中球の浸潤が著しいタイプであった。In vitro の研究においても 14 員環マクロライド系抗菌薬は, 好中球のさまざまな機能に影響を及ぼし, 総合的には臨床結果とつじつまが合う<sup>14)</sup>。しかし慢性副鼻腔炎が減少し, アレルギー性鼻炎が増加してきた現在の日本社会において, 鼻副鼻腔内視鏡手術施行後マクロライドを投与しても, すぐに鼻茸を再発し, 再度手術を必要とする難治性の副鼻腔炎が出現し増加してきた。

#### 好酸球性副鼻腔炎の提唱

このようなマクロライドが無効で, 何度も手術を要する難治性副鼻腔炎は, 鼻茸や粘膜固有層に多数の好酸球浸潤を認めていた。そのため森山・春名<sup>7)</sup>は, この副鼻腔炎を好酸球性副鼻腔炎と命名した。この副鼻腔炎は篩骨洞主体の病変であり, 嗅覚障害を主訴とし, 難治性の鼻茸が存在し, 鼻粘膜・血中好酸球増加を伴うといった特徴を有していた。

その後, 好酸球性副鼻腔炎に関する手術治療成績が通常の慢性副鼻腔炎よりも劣ることを慈恵会医科大学グループが続けて報告した<sup>8)~10)</sup>。しかし一方で好酸球性副鼻腔炎といえどもある程度治療できる症例があること

も判明した。好酸球性副鼻腔炎は, ①気管支喘息を合併していない群, ②通常の気管支喘息合併群, ③アスピリン喘息合併群の 3 つの群に分類できる。この中で①気管支喘息を合併していない群は, 術後成績が一般的慢性副鼻腔炎とほぼ同等かやや劣っていた。②通常の気管支喘息合併群では, 成績は明らかに低下し, ③アスピリン喘息合併群はもっとも不良であった。

出島<sup>11)</sup>は, 好酸球性副鼻腔炎を単純型と複合型の 2 つに分類し, 複合型をさらに難治性タイプに分けた。好酸球炎症が鼻副鼻腔に局限しているものを単純型に, すなわち①気管支喘息を合併していない群がこれに該当する。気管支喘息あるいは好酸球性中耳炎の合併を認めるか血中好酸球分画が 10%以上のものを複合型とした。すなわち②通常の気管支喘息合併群である。もっとも難治性なのがアスピリン喘息, Churg-Strauss 症候群の合併であり, ③アスピリン喘息合併群である。筆者らもほぼこの分類に賛成である。

#### 好酸球性副鼻腔炎の診断

現在のところ好酸球性副鼻腔炎の診断は, 各施設によってさまざまであるといえる。手術標本や生検材料の病理組織診断において, 多数の好酸球浸潤を認めると好酸球性副鼻腔炎の診断をつけているのが実情であると思われる。これまで報告されている好酸球性副鼻腔炎の診断基準は, 表 1 に示す森山・春名<sup>7)</sup>の診断が主である。多くの施設がこれを参考にしていると思われる。成人発症, 両側病変, 篩骨洞の陰影が優位, 嗅覚障害が主訴,

表 1 春名らによる好酸球性副鼻腔炎の診断基準<sup>7)</sup>

##### 絶対条件

- 1) 成人発症
- 2) 両側性副鼻腔病変
- 3) CT 所見で上顎洞よりも篩骨洞の陰影が優位
- 4) 主訴のなかに嗅覚障害がある
- 5) 内視鏡所見で鼻茸を認める
- 6) 血中好酸球 6% (300 個/mL) 以上もしくは副鼻腔組織中好酸球 100 個以上で好酸球優位

##### 付帯条件

- 1) ステロイド薬, とくに経口ステロイド薬が臨床所見の改善に有効
- 2) 気管支喘息, アスピリン喘息を合併する
- 3) 内視鏡下鼻内副鼻腔手術後に経過不良を呈する
- 4) マクロライド療法の効果は不明
- 5) 粘稠性分泌物が認められる

表2 石戸谷らによる好酸球性副鼻腔炎の診断基準<sup>13)</sup>

- 1) 血中好酸球 6%以上
- 2) CT 所見 (嗅裂陰影スコア 1 以上, 後部篩骨洞陰影スコア 1 以上)
- 3) 気管支喘息合併の有無

鼻茸, 血中好酸球 6% (300 個/mL) 以上もしくは副鼻腔組織中好酸球 100 個以上である. 一方, 横浜市立大学グループにおいても多くの症例において検討し, これらの所見に異論はないが<sup>12)</sup>, 血中好酸球の割合, CT での後部篩骨洞陰影スコア, 嗅裂の陰影スコアがとも好酸球浸潤程度と相関し, これら 3 項目を用いると高い特異度で好酸球性副鼻腔炎が診断できると報告した<sup>13)</sup> (表 2).

#### 好酸球性副鼻腔炎の疫学調査と

##### スクリーニング的診断基準の作成<sup>14)15)</sup>

これまで全国規模の好酸球性副鼻腔炎に関する疫学調査がまったく行われていないこと, 症状や診断基準などがまだ明確に決まっていなかったことなどから, ガイドライン作成を念頭に置いて, 平成 22 年度厚生労働省難治疾患克服事業「好酸球性副鼻腔炎の疫学, 診断基準作成等に関する研究」(研究代表者: 藤枝重治) を立ち上げた. 参加施設は, 札幌医大, 獨協医大, 自治医大附属さいたま医療センター, 慈恵会医大, 順天堂大, 横浜市大, 大阪医大, 岡山大, 和歌山日赤, 広島大, 島根大, 福井大の 12 施設およびそれらの関連病院とした. 表 3 にご協力いただいた各施設の先生を記載した. まず平成 19 年 1 月 1 日~平成 21 年 12 月 31 日の 3 年間にを行った病理組織が確実にある慢性副鼻腔炎手術症例を抽出し, 臨床データを解析した. 臨床データとして, 発症年齢, 病変側, 術前状態 (ステロイドの反応性, 抗菌薬の反応性), 鼻茸, 粘稠な鼻汁, 後鼻漏, 顔面痛, 嗅覚障害, 嗅裂閉塞, 耳症状, 骨導閾値上昇 (1 周波数でも 30 dB 以上), 喫煙, 採血データ, 抗原特異的 IgE (8 項目), X 線 (CT) の陰影, 合併症について調べた.

全部で 3014 例の解析データシートが集まった. 症例数は札幌医大: 185 例, 獨協医大: 200 例, 自治医大附属さいたま医療センター: 122 例, 慈恵会医大: 654 例, 順天堂大: 151 例, 横浜市大: 150 例, 大阪医大: 126 例, 岡山大: 667 例, 和歌山日赤: 217 例, 広島大: 224 例, 島根大: 32 例, 福井大: 286 例であった. 平均年齢 51.9 ± 16.0 歳, 5 歳から 93 歳まで幅広い分布であった. 主治

表3 平成 22 年度「好酸球性副鼻腔炎の疫学, 診断基準作成等に関する研究」参加施設と分担研究者

順天堂大学	池田 勝久	村田 潤子
自治医科大学附属さいたま医療センター	飯野ゆき子	吉田 尚弘
横浜市立大学附属市民総合医療センター	石戸谷淳一	佐久間康徳
大阪医科大学	河田 了	吉村 勝弘
獨協医科大学	春名 眞一	月館 利治
広島大学大学院医歯薬学総合研究科	平川 勝洋	竹野 幸夫
島根大学	川内 秀之	森倉 一朗
札幌医科大学	氷見 徹夫	関 伸彦
岡山大学大学院医歯学総合研究科	岡野 光博	檜垣 貴哉
東京慈恵会医科大学	吉川 衛	
東京慈恵会医科大学・疫学	浦島 充佳	
筑波大学人間総合科学研究科	野口恵美子	
理化学研究所ゲノム医科学研究センター	玉利真由美	
日本赤十字社和歌山医療センター	池田 浩己	
福井大学	富田かおり	徳永 貴広
	二之宮貴裕	森川 太洋

医が好酸球性副鼻腔炎の診断をした症例は 832 例 (27.6%) であった. 各施設の診断基準は, 篩骨洞病変が主体, 嗅覚障害あり, 鼻茸あり, 血中好酸球率 6%以上もしくは粘膜組織中好酸球浸潤が多い場合, 好酸球性副鼻腔炎としていることが多かった.

各項目の全症例における陽性率は以下のごとくであった. 両側 69%, 術前ステロイド使用 8.5%, 術前抗菌薬反応 8.5%, 術前鼻噴霧用ステロイド反応 30%, 術前ステロイド反応 33%, 鼻茸あり 78%, 粘稠な鼻汁 64%, 後鼻漏 54%, 顔面痛 25%, 嗅覚障害 48%, 嗅裂閉鎖 42%, 耳症状 16%, 骨導閾値上昇 22%, 喫煙率 28%, 採血時ステロイド使用 3.7%, 抗原特異的 IgE の 1 項目以上陽性 42%, X 線陰性 (上顎洞優位 32%, 篩骨洞優位 37%), 好酸球性中耳炎 1.3%, 慢性中耳炎 1.3%, アスピリン喘息 3.6%, アレルギー性鼻炎 34%, 気管支喘息 18%, アトピー性皮膚炎 1.2%, 食物アレルギー 1.7%, 薬物アレルギー 5.2% の結果であった.

今回, 症例の抽出は, 鼻茸もしくは鼻粘膜の病理組織があるものとした. それら病理組織を福井大学に集め, 同一医師により浸潤している好酸球数を 400 倍視野で計測した. 1 症例あたり 3ヵ所測定し, その平均値をとった. 病理組織を運びだせない施設には, 福井大学から同

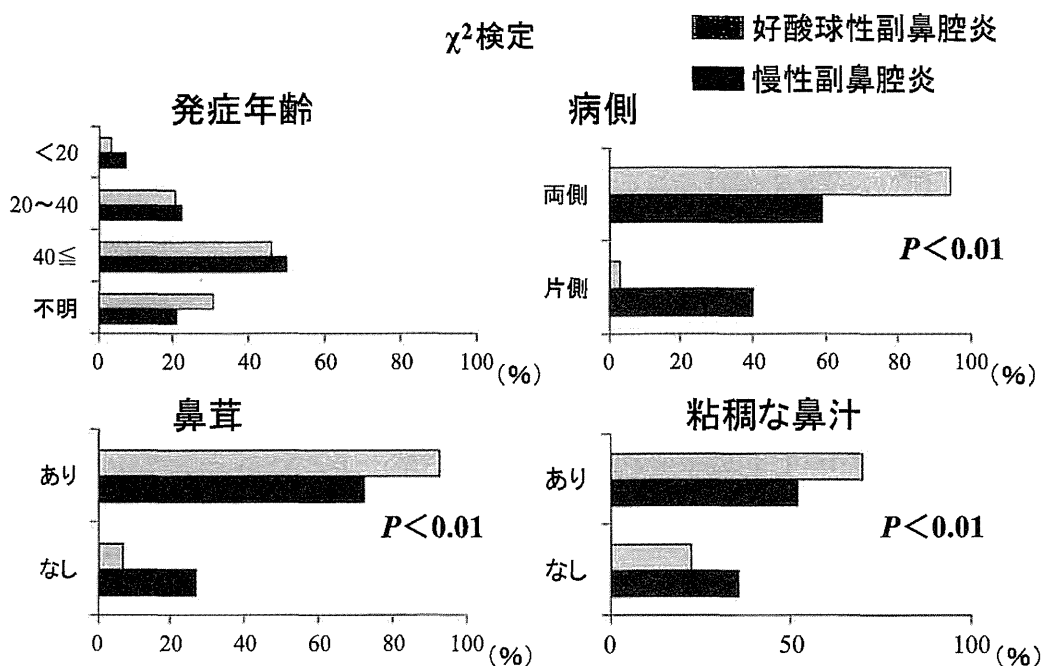


図1 好酸球性副鼻腔炎と一般的慢性副鼻腔炎の臨床データの違い (1)  
慢性副鼻腔炎は、15 歳未満の若年者と老人にも存在する。好酸球性副鼻腔炎は、両側性であり、鼻茸あり、粘稠な鼻汁ありの項目において有意に比率が高い。

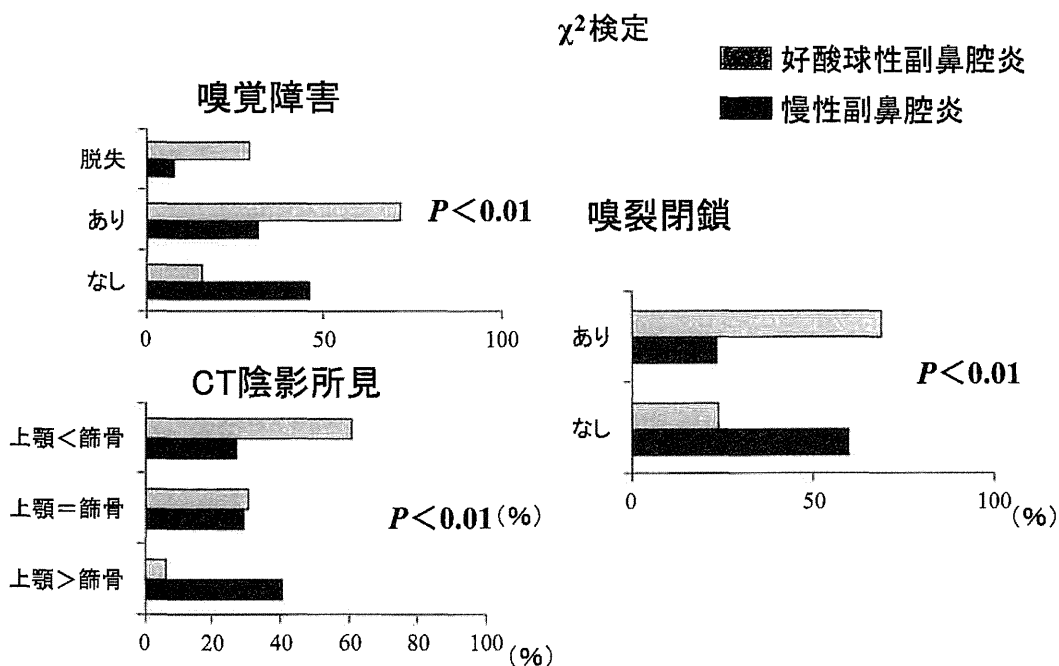


図2 好酸球性副鼻腔炎と一般的慢性副鼻腔炎の臨床データの違い (2)  
好酸球性副鼻腔炎は嗅覚障害を合併し、嗅裂が閉鎖している。また副鼻腔 CT では、篩骨洞に陰影を認める。

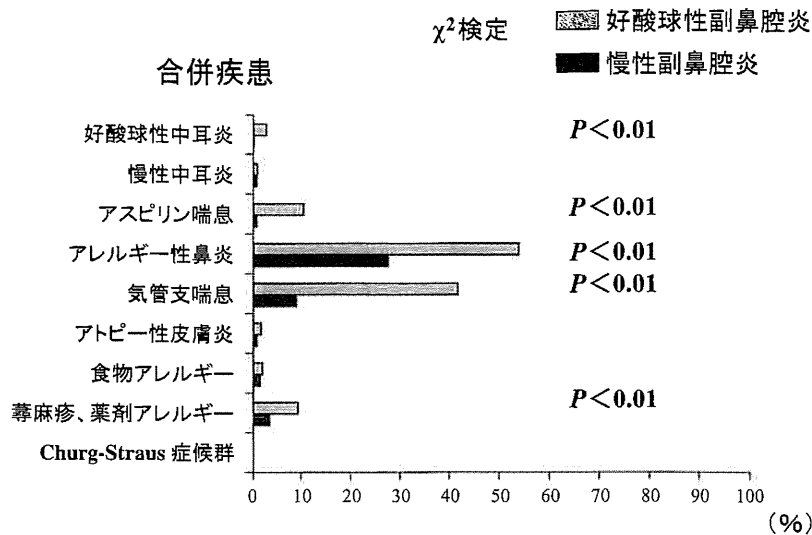


図3 好酸球性副鼻腔炎に合併している疾患

好酸球性中耳炎, アスピリン喘息, アレルギー性鼻炎, 気管支喘息, 薬剤アレルギーの合併が有意に多い。

一医師を派遣した。広島大学, 札幌大学の2施設は, 測定する医師1名に十分スライドで説明し, 自大学で測定した。3014例全例における400倍顕微鏡下1視野あたりの好酸球浸潤は, 116.3 ± 184.1個 (平均±標準偏差)であった。1視野あたり120個以上の症例数は903例 (30%), 150個以上は797例 (26%), 200個以上は606例 (20%), 300個以上は368例 (12%)であった。

これらのデータを好酸球性副鼻腔炎と一般的慢性副鼻腔炎に分類して比較検討した。その結果, 両側の病変, 鼻茸あり, 粘稠な鼻汁あり, 嗅覚障害あり, 嗅覚閉鎖, 血中好酸球率, X線陰影率 (上顎洞・篩骨洞), 病理組織中好酸球数, 合併症として好酸球性中耳炎, アスピリン喘息, アレルギー性鼻炎, 気管支喘息, 薬物アレルギーが2群間で有意な差を認めた (図1~3)。

次にこれらのデータを単ロジスティック解析し, 好酸球性副鼻腔炎であるリスクを算出した。両側病変あり5.2倍, 鼻茸あり3.4倍, 粘稠な鼻汁あり4.3倍, 嗅裂閉鎖3.5倍, 各種項目抗原特異的IgE陽性1.4~1.9倍, アスピリン喘息合併4.6倍, アレルギー性鼻炎合併1.7倍, 気管支喘息合併2.8倍, 薬物アレルギー合併2.5倍, 篩骨洞陰性優位6.1倍となった。血中好酸球率に関しては3%以上~5%未満, 5%以上~8%未満, 8%以上に分類すると危険リスクは, 0%以上~3%未満に比較してそれぞれ3.7倍, 6.9倍, 11.6倍と増加した。これらのデータを多変量解析し, step wise法により変数を絞り込むと

表4 好酸球性副鼻腔炎の疫学, 診断基準作成等に関する研究班の診断基準 (案)<sup>14)</sup>

- 1) 年齢 15歳未満: -3点, 70歳以上: -1点
- 2) 症状 両側病変あり: +1点, 鼻茸あり: +1点, 嗅裂閉鎖あり: +1点, 薬物アレルギーあり: +1点, 篩骨洞陰性優位: +1点
- 3) 末梢血好酸球率が3~5%: +2点, 5~8%: +3点, 8%以上: +4点

仮にスコア5点以上が好酸球性副鼻腔炎であると術前に判定すると, 感度76% (95%CI 73~79%), 特異度72% (95%CI 70~73%), positive predictive value 53% (95%CI 51~56%), negative predictive value 88% (95%CI 86~89%)となる。

ともにROCカーブを書き (AUC=0.8), 臨床上使用しやすいように重み付けを整数として有意な変数のみを残した。その結果, 表4のような診断基準が作成された。項目としては, 年齢, 両側病変, 鼻茸, 嗅裂閉鎖, 薬物アレルギー, 篩骨洞陰影, 末梢血好酸球率となった。

#### 本診断基準の問題点

これまで好酸球性副鼻腔炎の診断には, 組織中の多数の好酸球浸潤の証明が必須のように考えられていた。しかし実際の臨床において手術前の生検は, かなり困難であるとともに, 組織での証明を必要とすることは, いろいろと不都合がある。たとえば, 鼻副鼻腔手術を行う場合, 術後の経過予測, 術後通院の必要性, 処方内容などを術前に説明する必要があり, 通常の慢性副鼻腔炎と好

酸球性副鼻腔炎ではその内容がかなり異なってくる。そんな時、生検を必要とせず臨床所見のみから判断できる項目が診断基準であるときわめて有用だと考え、表4の項目を選択した。

「48歳女性、嗅覚障害と鼻閉で来院した。両側に鼻茸があるが、嗅裂は閉鎖までしていない。CTにおいて篩骨洞の陰影が優位である。薬物アレルギーはない。末梢血好酸球は9%である。」この症例を診断基準でスコアをつけると、両側1点+鼻茸1点+篩骨洞陰影優位1点+好酸球4点となり、合計7点となる。

この診断基準によるスコアを4点で区切り、4点以上を好酸球性副鼻腔炎の可能性ありとすると感度86%・特異度59%となる。スコア5点だと感度76%・特異度72%、スコア6点だと感度61%・特異度81%、スコア7点だと感度41%・特異度90%となった。スコア5点の区切りでは感度76% (95%CI 73~79%)、特異度72% (95%CI 70~73%)であるとともに、positive predictive value 53% (95%CI 51~56%)、negative predictive value 88% (95%CI 86~89%)であった。ちなみに感度とは好酸球性副鼻腔炎がある患者がこの診断基準で陽性になる率であり、特異度は一般的慢性副鼻腔炎患者が診断基準陰性になる率である。今回の診断基準では、感度と特異度のバランスから考えるとスコア5点以上を好酸球性副鼻腔炎としたらよいのではないかと考えている。しかしこの区切りは、正確なものではなく、広く好酸球性副鼻腔炎の可能性のある症例をスクリーニングする場合に適している。今後厳格な診断基準作成においては、変数などの見直しも必要になってくる。臨床的には、スコア5点は要注意ということで、術後の経過観察が大切であると主治医と患者自身が自覚してもらえれば、この診断基準の有用性はとても高まると思う。

### 前向き研究

平成22年度の研究では、過去に手術を行った症例を対象として行った。この診断は、各施設での診断であり、それをもとに診断基準を作成するのは矛盾を生じる。そこで今回の診断基準を基に、前向き研究を平成23~24年度厚生労働省難治疾患克服事業「好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成と網羅的解析に関する研究」(研究代表者：藤枝重治)で行った<sup>16)</sup>。すなわちこの診断基準を用いて術前から診断し、術後の経過を観察していくというものである。加えて3014例の症例に関する予後調査(鼻茸再

発の有無、再発した時期など)を行い、各項目の練り直しをしている。前向き研究は、計500例が集まり、予後調査に関しては現在進行中である。

さらに好酸球性副鼻腔炎に関する分類は上述したが、同じような形式で重症好酸球性副鼻腔炎の診断基準が作成できないかと考えている。これが本来もっとも必要なものであらうと思われる。平成25年度厚生労働省難治疾患克服事業は「重症好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成と治療法確立に関する研究」(研究代表者：藤枝重治)にて申請している。

組織中好酸球数の層別解析によって、重症好酸球性副鼻腔炎がわかり、組織中好酸球数が200ないしは400個以上になると予後不良であると報告された<sup>17)</sup>。今回の3014例の症例も、組織中好酸球数が200以上の高値になればなるほど、好酸球性副鼻腔炎の臨床的特徴の項目陽性率が上昇した。3014例の予後調査および前向き研究でこの点も判明してくると思われる。

### 実際的好酸球性副鼻腔炎患者数予測

全国における好酸球性副鼻腔炎の年間手術件数を、県内すべての内視鏡下副鼻腔手術の件数が判明する3県(福井県、岡山県、広島県)において計算し、人口の比から推測した<sup>16)</sup>。岡山県に関しては岡山大学岡野光博先生、広島県に関しては広島大学竹野幸夫先生に多大な協力をいただいた。3県の年間手術件数、人口、10人あたりの慢性副鼻腔炎手術件数は、福井県：207件、806,314人、15人、岡山県：455件、1,945,276人、23人、広島県：430件、2,860,750人、15人であった。その結果3県合わせた10万人あたりの慢性副鼻腔炎手術症例は、21人であった。ここで、すべての県において好酸球性副鼻腔炎や一般的慢性副鼻腔炎の罹患率が一定だと仮定すると、好酸球性副鼻腔炎の割合が、全副鼻腔炎手術件数の27%なので、年間の好酸球性副鼻腔炎手術件数は、10万人あたり5.8人、全国で7,540人と計算された。

### 欧米における副鼻腔炎

欧米では鼻茸を伴わない慢性副鼻腔炎(CRSsNP: chronic rhinosinusitis without nasal polyposis)と鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎(CRSwNP: chronic rhinosinusitis with nasal polyposis)に分類している<sup>1)</sup>。CRSwNPにおいて細胞の組織内浸潤は、好酸球が優位であるといわれてきた。そのためCRSwNPにおいては、好酸球の寿命の延長や遊

走および IgE 産生に重要な IL-4/IL-5 などの Th2 サイトカインが優位とされている。鼻茸やムチンの中から、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンが検出され、黄色ブドウ球菌由来エンテロトキシン特異的 IgE が、全 CRSwNP 症例の少なくとも 50% の鼻茸中に証明されている。よって黄色ブドウ球菌エンテロトキシンは、スーパー抗原としてもしくはアジュバントとして鼻粘膜の好酸球性炎症に関与している可能性が高いと欧米では考えられている<sup>18)</sup>。最近では、鼻粘膜上皮から IL-33 や Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) が産生され、Th2 サイトカインを誘導すると報告されている<sup>19)20)</sup>。さらに欧米型 CRSwNP では、IL-6 受容体のシグナル STAT3 がうまく機能しないため、Th17 がほとんど誘導されない。またそれとともに、transferring growth factor (TGF)- $\beta$  が鼻茸中に少ないため制御性 T 細胞 (Treg) もうまく誘導されず、Th2 優位になって好酸球浸潤が主となっていると考えられている<sup>21)</sup>。

しかし実際に欧米で研究している日本人医師によると、欧米人の鼻茸組織や臨床所見は日本のようなひどい副鼻腔炎 (具体的には日本の好酸球性副鼻腔炎) は、ほとんどなく、かなり軽症であるとも聞く (personal communication)。この点に関しては、今後共同研究などで明らかにしていく予定である。

### 網羅的解析

多くの因子を一気に解析する網羅的解析は、大変魅惑的な実験系である。鼻茸の網羅的蛋白解析では、eosinophil lysophospholipase, RHO-GDP dissociation inhibitor 2, apolipoprotein A-1 が鼻茸に過剰に含まれ、catalase, annexin A1, keratin II-8 の蛋白が有意に減少していることが報告されている<sup>22)</sup>。アスピリン喘息の鼻茸を用いたわれわれの網羅的蛋白解析でも、eosinophil lysophospholipase と L-plastin の発現が亢進していた (現在投稿中)。L-plastin に関しては現在機能解析を行っており、新規の分子標的因子として期待される。

### 終わりに

好酸球性副鼻腔炎の治療は、現在ステロイド内服のみである。いろいろな方面から新しい治療法を探索しているが、5 年以内に代替治療薬の選択を解決し、分子標的因子を含めた新しい治療戦略を10年かけ確立したいと考えている。

### 参考文献

- 1) 藤枝重治, 坂下雅文, 鈴木 弟, 他: 疾患と病態生理 鼻茸. *JOHNS* 28: 1105-1110, 2012.
- 2) Hashiba M and Baba S: Efficacy of long-term administration of clarithromycin in the treatment of intractable chronic sinusitis. *Acta Otolaryngol Suppl* 525: 73-78, 1996.
- 3) Ichimura K, Shimazaki Y, Ishibashi T, et al.: Effect of new macrolide roxithromycin upon nasal polyps associated with chronic sinusitis. *Auris Nasus Larynx* 23: 48-56, 1996.
- 4) Yamada T, Fujieda S, Mori S, et al.: Macrolide treatment decreased the size of nasal polyps and IL-8 levels in nasal lavage. *Am J Rhinol* 14: 143-148, 2000.
- 5) 藤枝重治, 山田武千代: 鼻茸はここまでわかった 鼻茸とマクロライド. *JOHNS* 20: 1803-1806, 2004.
- 6) 藤枝重治, 鈴木 弟, 扇 和弘: 副鼻腔炎と合併する気管支喘息の病態と治療戦略を探る. 抗体治療時代の気管支喘息治療の新たなストラテジー (大田 健編). 86-93 頁, 先端医学社, 2011.
- 7) 春名眞一, 鴻 信義, 柳 清, 他: 好酸球性副鼻腔炎. *耳鼻展望* 44: 195-201, 2001.
- 8) Matsuwaki Y, Ookushi T, Asaka D, et al.: Chronic rhinosinusitis: risk factors for the recurrence of chronic rhinosinusitis based on 5-year follow-up after endoscopic sinus surgery. *Int Arch Allergy Immunol* 146 Suppl 1: 77-81, 2008.
- 9) Haruna S, Shimada C, Ozawa M, et al.: A study of poor responders for long-term, low-dose macrolide administration for chronic sinusitis. *Rhinology* 47: 66-71, 2009.
- 10) Nakayama T, Yoshikawa M, Asaka D, et al.: Mucosal eosinophilia and recurrence of nasal polyps - new classification of chronic rhinosinusitis. *Rhinology* 49: 392-396, 2011.
- 11) 出島健司: 好酸球性副鼻腔炎の治療. *JOHNS* 27: 871-874, 2011.
- 12) Ishitoya J, Sakuma Y and Tsukuda M: Eosinophilic chronic rhinosinusitis in Japan. *Allergol Int* 59: 239-245, 2010.
- 13) Sakuma Y, Ishitoya J, Komatsu M, et al.: New clinical diagnostic criteria for eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Auris Nasus Larynx* 38: 583-588, 2011.
- 14) 藤枝重治: 好酸球性副鼻腔炎の疫学, 診断基準作成等に関する研究. 平成 22 年度厚生労働省科学研究費補助金 難治疾患克服事業 総括・分担報告書, 2011.
- 15) 藤枝重治, 坂下雅文: 好酸球性副鼻腔炎とアスピリン喘息の治療とステロイドの位置づけ. *ENTONI* 139: 73-80, 2012.
- 16) 藤枝重治: 好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成と網羅的解析に関する研究. 平成 23 年度厚生労働省科学研究費補助金 難治疾患克服事業 総括・分担報告書, 2012.
- 17) Nakayama T, Asaka D, Yoshikawa M, et al.: Identification of chronic rhinosinusitis phenotypes using cluster analysis. *Am J*

- Rhinol Allergy 26: 172-176, 2012.
- 18) Bachert C, Zhang N, Holtappels G, et al. : Presence of IL-5 protein and IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins in nasal polyps is associated with comorbid asthma. J Allergy Clin Immunol 126: 962-968, 2010.
- 19) Reh DD, Wang Y, Ramanathan M Jr, et al. : Treatment-recalcitrant chronic rhinosinusitis with polyps is associated with altered epithelial cell expression of interleukin-33. Am J Rhinol Allergy 24: 105-109, 2010.
- 20) Nonaka M, Fukumoto A, Ogihara N, et al. : Synergistic induction of thymic stromal lymphopoietin by tumor necrosis factor alpha and Th2 cytokine in nasal polyp fibroblasts. Am J Rhinol Allergy 24: e14-18, 2010.
- 21) Peters AT, Kato A, Zhang N, et al. : Evidence for altered activity of the IL-6 pathway in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. J Allergy Clin Immunol 125: 397-403, 2010.
- 22) Upton DC, Welham NV, Kuo JS, et al. : Chronic rhinosinusitis with nasal polyps: a proteomic analysis. Ann Otol Rhinol Laryngol 120: 780-786, 2011.

---

別刷請求先：藤枝重治

〒910-1193 福井県吉田郡永平寺町松岡下合月23  
福井大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学



<b>総 説</b>
------------

日耳鼻 117: 96-102, 2014

## 「第114回日本耳鼻咽喉科学会総会ランチョンセミナー」 好酸球性副鼻腔炎の診断と治療

藤枝 重治  
坂下 雅文  
意元 義政  
徳永 貴広  
二之宮貴裕

福井大学耳鼻咽喉科・  
頭頸部外科学

好酸球性副鼻腔炎は、鼻腔内に多発性鼻茸を有する篩骨洞主体の病変で、嗅覚障害を伴い、鼻粘膜や末梢血中で好酸球増加を伴う難治性副鼻腔炎である。経口ステロイドが有効であり、内視鏡下鼻副鼻腔手術を行っても再発が多い。現在、大学病院レベルで行われている内視鏡下鼻副鼻腔手術の約30%が好酸球性副鼻腔炎であった。好酸球性副鼻腔炎は、鼻粘膜組織中の強い好酸球浸潤で診断されていたが、研究班を組織し、臨床所見や検査データから好酸球性副鼻腔炎診断基準を検討した。現在、発症年齢、両側性、鼻茸、嗅裂閉鎖、篩骨洞陰影優位、薬物アレルギーの合併、末梢血好酸球率の7項目からスコア化している。さらに好酸球性副鼻腔炎にも重症度分類が可能であり、アスピリン喘息に合併する好酸球性副鼻腔炎が最も難治性である。

治療法は、やはり経口ステロイドと内視鏡下鼻副鼻腔手術が主体である。軽症例では内視鏡下鼻副鼻腔手術と適切な術後管理で治癒し得る。経口ステロイドは、血中コルチゾール値を適宜測定しながら、注意深く長期に処方する。好酸球性副鼻腔炎の発症機序はまだ不明のままであり、今後の発展を期待する分野である。ステロイド以外の治療としては、抗体療法に期待するがまだ本邦での使用は難しい。

キーワード：好酸球性副鼻腔炎，好酸球，難治性，ステロイド，抗体療法

### はじめに

副鼻腔に感冒などのウイルス感染やそれに引き続く細菌感染によって炎症反応が起こると粘膜に浮腫が生じ、洞の自然口は閉鎖する。洞内では、炎症反応によって粘膜からの粘液分泌が亢進するとともに、排出障害によって分泌物の貯留が起こる。治癒の遷延化や新たな感染が加わり、いったん生じた炎症反応は消失せず増悪を繰り返す。さらなる粘膜浮腫、膿の貯留などで慢性的な経過をたどる。これが慢性副鼻腔炎である。炎症反応の主体は、これまで好中球であることが本邦ならびに東アジアの特徴であった。治療は、14員環マクロライド系抗菌薬による少量長期療法の開発と内視鏡下鼻副鼻腔手術（Endoscopic sinus surgery: ESS）の進歩によって、かなり改善を認めた。しかし21世紀近くになってESS施行後、すぐに鼻茸を再発し、再度手術を必要とする難治性副鼻腔炎が現れ、その数は次第に増加してきた。このような副鼻腔炎の粘膜や鼻茸を病理学的に調べると、浸

潤細胞の主体は好中球ではなく、多数の好酸球であった。このことから難治性副鼻腔炎で好酸球浸潤が著しいものを、好酸球性副鼻腔炎と呼ぶようになった。

### 好酸球性副鼻腔炎の概念と分類

最初に好酸球性副鼻腔炎の概念を提唱し報告したのは、森山・春名らであった<sup>1)</sup>。彼らは、発症年齢、症状、病変部位、血中および組織中好酸球数、合併症に着目し、表1のような診断基準を作成した。この診断基準では、絶対条件の6項目がそろっている場合に好酸球性副鼻腔炎と診断できる。多くの施設がこの診断基準を参考にしていたが、石戸谷らは、血中好酸球、CTでの後部篩骨洞・嗅裂所見が有意に好酸球浸潤程度と相関し、これら3項目を用いると高い特異度で好酸球性副鼻腔炎が診断できると報告した（表2）<sup>2)</sup>。特異度とは、一般的慢性副鼻腔炎患者が診断陰性になる率であり、すなわちこの3項目で陽性の患者には、ほとんど一般的慢性副鼻腔

表1 春名らによる好酸球性副鼻腔炎の診断基準<sup>1)</sup>

## 絶対条件

- 1) 成人発症
- 2) 両側性副鼻腔病変
- 3) CT所見で上顎洞よりも篩骨洞の陰影が優位.
- 4) 主訴の中に嗅覚障害がある.
- 5) 内視鏡所見で鼻ポリープを認める.
- 6) 血中好酸球6% (300個/mL) 以上, もしくは副鼻腔組織中好酸球100個以上で好酸球優位.

## 付帯条件

- 1) ステロイド薬, 特に経口ステロイド薬が臨床所見の改善に有効.
- 2) 気管支喘息, アスピリン喘息を合併する.
- 3) 内視鏡下鼻内副鼻腔手術後に経過不良を呈する.
- 4) マクロライド療法の効果は不明.
- 5) 粘稠性分泌物が認められる.

炎患者が含まれないことを示す.

好酸球性副鼻腔炎を含む副鼻腔炎の手術成績は詳細に検討されている<sup>3)~6)</sup>. その結果, 好酸球浸潤程度は重要な予後因子であるが, 全身性疾患との関連も重要な因子であることが判明した. すなわち好酸球性副鼻腔炎は, ①気管支喘息を合併していない群, ②通常の気管支喘息合併群, ③アスピリン喘息合併群の3つの群に分類できた. この中で①気管支喘息を合併していない群は, 術後成績が一般的慢性副鼻腔炎とほぼ同等かやや劣っている程度だった. ②通常の気管支喘息合併群では, 成績は明らかに低下し, ③アスピリン喘息合併群は最も不良であった. 一方で, 好酸球性副鼻腔炎を単純型と複合型の2つに分け, 複合型から難治性型を切り離した分類もある<sup>7)</sup>. 好酸球炎症が, 鼻副鼻腔に局限しているものを単純型, 気管支喘息あるいは好酸球性中耳炎の合併を認めるか, 血中好酸球分画が10%以上のものを複合型とした. そして最も難治性型がアスピリン喘息, Churg-Strauss 症候群の合併とした. 重症度分類としてはこの2つの分類は類似しており, アスピリン耐性気管支喘息の一部とアスピリン不耐性気管支喘息 (アスピリン喘息), Churg-Strauss 症候群合併例が, 当初いわれていた難治性である好酸球性副鼻腔炎といえるのかもしれない.

## 好酸球性副鼻腔炎疫学研究

これまで大まかには表1が好酸球性副鼻腔炎の診断基準として使用されていたが, 全国規模での好酸球性副鼻腔炎に関する疫学調査はいまだ一度も行われていなかっ

表2 石戸谷らによる好酸球性副鼻腔炎の診断基準<sup>2)</sup>

- 1) 血中好酸球6%以上
- 2) CT所見 (嗅裂陰影スコア1以上, 後部篩骨洞陰影スコア1以上)
- 3) 気管支喘息合併の有無

た. さらに明確な診断基準も決まっていないことから, ガイドライン作成を考慮に入れ, 平成22年度厚生労働省難治疾患克服事業「好酸球性副鼻腔炎の疫学, 診断基準作成等に関する研究」(研究代表者: 藤枝重治) を立ち上げた. 参加施設は, 札幌医大, 獨協医大, 自治医科大学附属さいたま医療センター, 慈恵会医大, 順天堂大, 横浜市大, 大阪医大, 岡山大, 和歌山日赤, 広島大, 島根大, 福井大の12施設およびそれらの関連病院とした<sup>8)</sup>.

平成19年1月1日~平成21年12月31日の3年間に行った, 病理組織が確実にある慢性副鼻腔炎手術症例を抽出し, 各種臨床データを解析した. 計3,014例の解析データシートが集まった. 平均年齢51.9±16.0歳, 5歳から93歳まで幅広い分布であった. 主治医が好酸球性副鼻腔炎の診断をした症例は832例 (27.6%) であった. 各施設の診断基準は, 篩骨洞病変が主体, 嗅覚障害があり, 鼻茸があり, 血中好酸球率6%以上もしくは粘膜組織中好酸球浸潤が多いとの病理医のコメントがあった場合, 好酸球性副鼻腔炎としていた. 全症例における400倍顕微鏡下1視野当たり, 好酸球浸潤は116.3±184.1個 (平均±標準偏差) であった. 1視野当たり120個以上の症例数は903例 (30%), 150個以上は797例 (26%), 200個以上は606例 (20%), 300個以上は368例 (12%) であった.

好酸球性副鼻腔炎診断ガイドライン作成<sup>8)9)10)</sup>

ESSを行う場合, 術後の経過予測, 術後通院の必要性, 処方内容などを術前に説明する. その際, 通常の慢性副鼻腔炎と好酸球性副鼻腔炎では内容がかなり異なってくる. これまで好酸球性副鼻腔炎の診断には, 組織中における多数の好酸球浸潤を証明することが必須だと考えられていた. しかし実際の臨床において手術前の生検は, 極めて不都合である. そのような時, 生検を必要とせず臨床所見のみから判断できる診断基準があると極めて有用だと考え, 臨床所見・検査からの好酸球性副鼻腔炎診断基準作成に着手した.

まずデータを好酸球性副鼻腔炎と一般的慢性副鼻腔炎に分け, 単ロジスティック解析し, 好酸球性副鼻腔炎であるリスクを算出した. 表3に示すが, 高い倍率を示すと好酸球性副鼻腔炎の可能性が高いことを示す. このま

表3 各要因における好酸球性副鼻腔炎の危険倍率<sup>8)</sup>

病変:	両側	vs	片側	5.2倍
鼻茸:	あり	vs	なし	3.4倍
粘調な鼻汁:	あり	vs	なし	4.3倍
嗅裂閉鎖:	あり	vs	なし	3.5倍
気管支喘息合併:	あり	vs	なし	2.8倍
薬物アレルギー合併:	あり	vs	なし	2.5倍
アレルギー性鼻炎合併:	あり	vs	なし	1.7倍
CT陰影:	篩骨洞優位	vs	上顎洞優位	6.1倍
血中好酸球率:	0%以上~3%未満	vs	3%以上~5%未満	3.7倍
	0%以上~3%未満	vs	5%以上~8%未満	6.9倍
	0%以上~3%未満	vs	8%以上	11.6倍
各項目抗原特異的IgE:	陽性	vs	陰性	1.4倍~1.9倍

表4 好酸球性副鼻腔炎の疫学、診断基準作成等に関する研究班の診断基準(第一案)<sup>8)</sup>

- 1) 年齢 15歳未満: -3点, 70歳以上: -1点
- 2) 症状 両側病変あり: +1点, 鼻茸あり: +1点, 嗅裂閉鎖あり: +1点,  
薬物アレルギーあり: +1点, 篩骨洞陰性優位: +1点
- 3) 末梢血好酸球率 3~5%: +2点, 5~8%: +3点, 8%以上: +4点

までは診断基準として使用できないため、多変量解析し、step wise 法により変数を絞り込むとともにROCカーブを書き(AUC=0.8)、臨床上使いやすいように重み付けを整数化した。その結果、表4のようになった。この7項目からなる診断基準で、各症例について初診時にスコアを計算するようにした<sup>8)9)</sup>。

たとえば「57歳男性、嗅覚障害と鼻閉で来院した。両側に鼻茸がある。嗅裂には鼻茸があるが閉鎖までしていない。CTでは篩骨洞の陰影が優位である。薬物アレルギーがある。気管支喘息の既往もない。末梢血好酸球は7%である。」この症例を診断基準に照らし合わせると、両側1点+鼻茸1点+篩骨洞陰性優位1点+薬物アレルギー1点+好酸球3点となり、合計7点、好酸球性副鼻腔炎であろうとなる。このスコアを基盤にして、好酸球性副鼻腔炎の感度と特異度を計算すると表5のようになる。感度とは好酸球性副鼻腔炎患者がこの診断基準で陽性になる率であり、特異度は一般的慢性副鼻腔炎を除外できる率であり、当然ともに高い数値が優れている。感度と特異度のバランスから考えるとスコア5点以上を好酸球性副鼻腔炎としたらよいのではないかと考えた。5点の区切りではPositive predictive value: 53%, Negative predictive value: 88%であった。この区切りは、正確なものではなく、広く好酸球性副鼻腔炎の可能性がある症例をスクリーニングできるように設定した。今後厳格な診断基準作成においては、変数などの見直しも必要

表5 診断基準案によるスコア化を基盤にした好酸球性副鼻腔炎の診断<sup>8)</sup>

	感度	特異度
4点以上	86%	59%
5点以上	76%	72%
6点以上	61%	81%
7点以上	41%	90%

になってくる。臨床的には、スコア5点以上は要注意ということで、術後の経過観察が大切であると主治医と患者双方が自覚すれば、この診断基準の有用性はとても高まる。

#### 好酸球性副鼻腔炎の治療経過 (I)

治療経過としてはいくつかのパターンがある。一般に初診の場合、鼻閉と嗅覚障害を主訴に来院することが多い。鼻腔には膿性鼻汁と多発性鼻茸を認めるので、まずは抗菌薬を処方する。アモキシリンを内服させると膿性は軽快するが、粘調な鼻汁は変化がない。感受性試験結果を参考にしながら、ニューキノロンに変更してみる。膿性はほとんどなくなるものの、やはり粘調ないわゆるmucous dischargeは残存する。鼻茸の大きさは変化ない。嗅覚障害も改善しない。そこでセレスタミン<sup>®</sup> 2錠(分2)を処方する。すると粘調な鼻汁は軽減し、鼻茸も縮小する。嗅覚障害も改善してくる<sup>11)</sup>。これが典型的

な好酸球性副鼻腔炎の経過である。セレスタミンにて眠気の副反応がある場合には、プレドニン® (5mg) 4錠 (朝) に変更する。まず2週間投与し、鼻腔内の所見を観察後、軽快しない場合にはプレドニン6錠に増量する。これでほとんどの症例が反応する。症状の改善を認めてきたならば、セレスタミン1錠もしくはプレドニン2錠 (朝のみ) に減量していく。その後数カ月間、セレスタミン・プレドニンの服用を隔日に、もしくは2日置き、3日置きと延長しながら継続し、その途中でESSを勧めている。経口ステロイド内服の期間が2カ月を超えた頃から、朝開院後すぐに来院してもらい、血中コルチゾールを測定する。異常がなければ治療を継続する。その後、臨床症状をみて可能であればステロイドを中止して経過を観察する。風邪症状や細菌感染が起こると再度増悪することが多いので、そのような際には必ず受診するように指導するとともに、増悪した場合には、最初から治療をやり直す。

#### 好酸球性副鼻腔炎の治療経過 (I)

通常の場合、術前には好酸球性副鼻腔炎の診断をつけにくい。開業している先生の所で一般的慢性副鼻腔炎の治療を行っていたが、鼻茸のため、ESSの紹介をいただく場合がある。かなり治療を受けていたこともあり、粘調な鼻汁と多発性の鼻茸を認めるが、極めてひどい状態ではない。副鼻腔CTにて篩骨洞優位の陰影を認める。気管支喘息や薬物アレルギーの既往はなく、予定通りESSを行う。手術は問題なく終了し、提出した病理標本には、かなりの好酸球浸潤が認められる。1視野当たり100個を超えていた。術前の末梢血中好酸球率は6%であった。術前から予想はされていたが、以上から好酸球性副鼻腔炎の診断が術後に正式に決まる。術後マクロライドとセレスタミンを約1カ月処方するが、順調に鼻腔は正常化し、その後再発なく経過していく。このような症例もある。気管支喘息を合併していない、副鼻腔限局型であり、好酸球性副鼻腔炎の中で予後が良い症例の経過である。

#### 好酸球性副鼻腔炎治療経過 (II)

これまで3回鼻の手術を受けたが、再度鼻閉が生じ来院した。嗅覚は数年前から分からない。咳が出て、胸がぜいぜい鳴っていることもあるが、耐えられないこともないので呼吸器内科の診察を受けたことはない。薬はほとんど飲まないが、一度風邪薬を飲んだら、唇がはれ、息も少しづらくなったことがある。しかし何とか治った。鼻腔内には、多発性の鼻茸が充満しており、膿性の鼻汁もある。鼻閉が強いのですぐに手術してほしいと訴

える。ESSを行うと、これまでの手術のため、術中正確な解剖が分からない。ナビゲーション下に慎重に手術を進める。鼻茸をマイクロデブリッターで順次摘出していくと、中鼻甲介はほとんどなく、下鼻甲介も薄くなっていった。術後すぐに粘膜が浮腫状になり鼻茸の再発を認める。セレスタミンを処方するといったん軽快する。生食による鼻洗浄も強く勧め、確実にしてもらう。その後の内服は、治療経過 (I) に準じて行っていく。術後マクロライドも3カ月程度継続する。さらに鼻噴霧用ステロイドも併用する。経口ステロイド内服中は調子もよく、嗅覚も改善する。しかしいったんステロイドを中止するとすぐに嗅覚は分からなくなり、洞内粘膜は浮腫状になり鼻茸を形成してくる。そこでまたステロイドを再開する。そのうち仕事が忙しいと来院間隔が空いてくる。ついに受診しなくなり、2年後再度鼻閉と嗅覚障害で再受診する。ここ数回感冒を経験したと言う。鼻腔には前回手術前と同様の多発性鼻茸が存在する。今度は手術よりも、まずはステロイドの内服を処方してほしいと希望する。このような症例が最も難渋する症例である。

#### ステロイド薬

ステロイド薬内服が、好酸球性副鼻腔炎に対して最も有効である。逆にいえば、実地臨床の場では鼻茸を縮小させたり、嗅覚障害を軽快させたりできるのは、ステロイド以外ないともいえる。筆者の投与開始量は、治療経過 (I) のごとくである。長期の内服には、朝早い時間で血中コルチゾール値測定が重要である。ただしこれが確実ではなく、適宜内分泌・代謝内科医との連携が大切である。

周術期におけるステロイド薬投与の有用性に関しては、プラセボ対照二重盲検試験などで検討した高いエビデンスはないが、術前のステロイド薬使用にて術中の出血量の減少、手術時間の短縮、手術が行いやすくなること、術後の使用では、鼻副鼻腔粘膜の正常化が早く得られることなどが報告されている<sup>7)12)13)</sup>。しかしアスピリン喘息患者のESSでは、再発率も高く、周術期でのステロイド使用の有用性は認められなかったとの報告もある<sup>7)</sup>。

内服による全身投与ではなく、点鼻による局所投与も試みられている。この場合 bioavailability の観点から、全身に対する副反応はほとんどないとされている。しかし残念ながら、全身投与ほどの効果は、期待できない。これまでプロピオン酸フルチカゾンの6カ月投与によって、鼻茸中の好酸球浸潤が減少するとともに、鼻茸の縮小が報告されている<sup>14)</sup>。最近はさらに強い効果を持った1日1回投与型の鼻噴霧用ステロイド薬が登場し、もう

表6 平成22年度「好酸球性副鼻腔炎の疫学, 診断基準作成等に関する研究」  
参加施設と分担研究者<sup>8)</sup>

札幌医科大学	氷見 徹夫	関 伸彦
獨協医科大学	春名 眞一	月舘 利治
自治医科大学附属さいたま医療センター	飯野ゆき子	吉田 尚弘
東京慈恵会医科大学	鴻 信義	
東邦大学	吉川 衛	
順天堂大学	池田 勝久	村田 潤子
横浜国立大学附属市民総合医療センター	石戸谷淳一	佐久間康徳
大阪医科大学	河田 了	吉村 勝弘
日本赤十字社和歌山医療センター	池田 浩己	
岡山大学大学院医歯学総合研究科	岡野 光博	檜垣 貴哉
島根大学	川内 秀之	森倉 一朗
広島大学大学院医歯薬学総合研究科	平川 勝洋	竹野 幸夫
筑波大学人間総合科学研究科	野口恵美子	
理化学研究所ゲノム医科学研究センター	玉利真由美	
東京慈恵会医科大学・疫学	浦島 充佳	
福井大学	富田かおり	森川 太洋

少しで内服に迫る効果が得られるのではないかと期待されている。ドライパウダー製剤であるリノコート<sup>®</sup>を好酸球性副鼻腔炎の術後に使用した場合、組織吸着性、被覆保護作用、drug delivery systemの観点から有用との報告もある<sup>15)</sup>。しかしこれらは、ESS術後の補助療法として用いられるのが一般的である。

ではどうしてステロイドは好酸球性副鼻腔炎に有効なのであるのか。好酸球をはじめとして浸潤細胞や鼻粘膜は、グルココルチコイド受容体を持っている。ステロイドは、この受容体を介して、強力な抗炎症作用を発揮する。好酸球自身に対しても直接的にアポトーシスの誘導や増殖抑制作用を有する。さらに鼻粘膜上皮や線維芽細胞からの好酸球遊走因子 (Eotaxin) の誘導も抑制する。好酸球性副鼻腔炎の組織内では、有意に多くのEotaxin-1, 2, 3が産生されている<sup>16)</sup>。Eotaxinは、IL-4の刺激によって上皮・線維芽細胞から産生されるが<sup>17)</sup>、ステロイド投与によってSOCS-1発現が変動し、最初の投与では確実にIL-4刺激で誘導されるシグナルを抑制し、Eotaxin産生が抑制される<sup>18)</sup>。それによって好酸球浸潤が減少するとされる。さらにステロイドは、血管内皮細胞にも働き接着因子の発現を低下させ、好酸球を含めた多種の細胞浸潤を抑制するとされる。

#### 他の内服薬

鼻粘膜に浸潤した好酸球からLTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>などのCysLTが放出される。好酸球にはCysLTの受容体が存在し、好酸球から産生・放出されるCysLTによっ

て、好酸球表面上のCysLT受容体発現・活性化がさらに誘導され、相乗的効果でさらにCysLTが産生・放出されるという好酸球炎症の循環的悪化、autocrine的機構が存在する<sup>19)</sup>。アスピリン喘息に伴う鼻茸および好酸球性副鼻腔炎の粘膜では、大量のCysLTが産生されていると推測される。そのためアスピリン患者の尿中には有意に多くのLTE<sub>4</sub>が含まれ、鼻茸を摘出するとLTE<sub>4</sub>が低下する<sup>20)</sup>。抗ロイコトリエン薬投与は、有意な好酸球浸潤抑制を示しアレルギー炎症鎮火に貢献し得るので、好酸球性副鼻腔炎の治療薬になり得る可能性がある。実際に好酸球性副鼻腔炎に抗LT薬を6カ月間投与すると、鼻茸における好酸球浸潤が減少し、鼻茸が縮小したと報告された<sup>14)</sup>。さらにモンテルカストに鼻噴霧用ステロイド薬を併用すると、好酸球浸潤の減少と鼻茸の縮小に相乗効果を認めた。しかしその後、抗LT薬が有効であるという報告や高いエビデンスレベルの論文はない。

好酸球遊走には、IL-4をはじめとするTh2サイトカインが関与する。またTh2細胞や好酸球にはPGD<sub>2</sub>受容体とCRTH2受容体が存在し、好酸球浸潤、粘液分泌促進にPGD<sub>2</sub>やCRTH2も重要な役割を担っている。そのためTh2サイトカイン阻害薬やこれら受容体に結合してその活性を阻害する抗PGD<sub>2</sub>/CRTH2受容体拮抗薬は、好酸球性副鼻腔炎に有効であることが期待されるが、治療効果に関する論文はない。

### 抗体治療

黄色ブドウ球菌エンテロトキシンが、スーパー抗原としてもしくはアジュバントとして、鼻粘膜の好酸球性炎症に関与している可能性が高いと欧米では考えられている<sup>20)</sup>。その根拠として鼻茸やムチンの中に黄色ブドウ球菌エンテロトキシンが検出され、黄色ブドウ球菌エンテロトキシン特異的IgEが検出されたからである。さらに鼻茸内での非特異的なIgEのポリクローナルな増加が、鼻茸形成に重要とされている<sup>22)</sup>。ヒト化抗IgE抗体が作製され、現在では重症難治性喘息に対して適応がある。この抗IgE抗体は鼻茸を伴う好酸球性副鼻腔炎にも有効であるとの報告がなされている<sup>23)24)</sup>。本邦においても、36例の副鼻腔炎を伴う重症難治性喘息患者に抗IgE抗体を投与し、副鼻腔炎の改善が認められたとの報告もあった<sup>25)</sup>。好酸球性副鼻腔炎に対してステロイドの効果に匹敵する治療薬である可能性もあるが、高額であることが最大の問題点である。

また抗IL-5抗体も候補として挙げられる。IL-5は好酸球の遊走、活性化に重要なサイトカインである。また前駆細胞から好酸球へと分化誘導も引き起こし、増殖にも関与する。好酸球性気道炎症を有する重症難治性気管支喘息においては、抗IL-5抗体投与によって、プラセボに対し呼吸機能や気道過敏性の有意な改善は認めなかったが、気管支喘息増悪頻度の低下、QOLスコアの改善、経口ステロイドの減量が認められた<sup>26)</sup>。さらに抗IL-5抗体は、好酸球浸潤優位の鼻茸に有効であったという報告がなされている<sup>27)</sup>。本邦ではまだ気管支喘息に対しても適応が得られていないが、将来性はあると思われる。

### 最後に

本研究は、表6に示す今回の厚生労働省研究班全員の共同研究であること強調したい。好酸球性副鼻腔炎は、現在、東アジアの鼻科学でも中心的テーマになりつつある。一方でアスピリン喘息に伴う鼻茸は、30年以上も前から研究されているが、いまだにその病因は分かっていない。何ら根拠はないが、ウイルス感染、chemical agent、NSAID、この3つが絡みあって難治性の好酸球浸潤優位鼻茸形成がなされるのではないかと筆者は考えている。いかなるブレイクスルーが生まれるのか。われわれもそれに関与できるのかどうかは、今が正念場かもしれない。

### 文献

1) 春名眞一, 鴻信義, 柳清, 他: 好酸球性副鼻腔炎. 耳展 2001; 44: 195-201.

- 2) Sakuma Y, Ishitoya J, Komatsu M, et al: New clinical diagnostic criteria for eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Auris Nasus Larynx* 2011; 38: 583-588.
- 3) Matsuwaki Y, Ookushi T, Asaka D, et al: Chronic rhinosinusitis: risk factors for the recurrence of chronic rhinosinusitis based on 5-year follow-up after endoscopic sinus surgery. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 146 Suppl 1: 77-81.
- 4) Haruna S, Shimada C, Ozawa M, et al: A study of poor responders for long-term, low-dose macrolide administration for chronic sinusitis. *Rhinology* 2009; 47: 66-71.
- 5) Nakayama T, Yoshikawa M, Asaka D, et al: Mucosal eosinophilia and recurrence of nasal polyps—new classification of chronic rhinosinusitis. *Rhinology* 2011; 49: 392-396.
- 6) Nakayama T, Asaka D, Yoshikawa M, et al: Identification of chronic rhinosinusitis phenotypes using cluster analysis. *Am J Rhinol Allergy* 2012; 26: 172-176.
- 7) 出島健司: 好酸球性副鼻腔炎. *JOHNS* 2011; 27: 871-874.
- 8) 藤枝重治: 好酸球性副鼻腔炎の疫学, 診断基準作成等に関する研究. 平成22年度厚生労働省科学研究費補助金難治疾患克服事業 総括・分担報告書; 2011.
- 9) 藤枝重治: 好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成と網羅的解析に関する研究. 平成24年度厚生労働省科学研究費補助金 難治疾患克服事業 総括・分担報告書; 2013.
- 10) 藤枝重治, 坂下雅文, 意元義政: 好酸球性副鼻腔炎の疫学と診断. *耳鼻臨床* 2013; 106: 477-484.
- 11) 藤枝重治, 坂下雅文: 好酸球性副鼻腔炎とアスピリン喘息の治療とステロイドの位置づけ. *MB ENT* 2012; 139: 73-80.
- 12) Sieskiewicz A, Olszewska E, Rogowski M, et al: Preoperative corticosteroid oral therapy and intraoperative bleeding during functional endoscopic sinus surgery in patients with severe nasal polyposis: a preliminary investigation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006; 115: 490-494.
- 13) Wright ED, Agrawal S: Impact of perioperative systemic steroids on surgical outcomes in patients with chronic rhinosinusitis with polyposis: evaluation with the novel Perioperative Sinus Endoscopy (POSE) scoring system. *Laryngoscope* 2007; 117(11 Pt 2 Suppl 115): 1-28.
- 14) 野中 学: 好酸球性副鼻腔炎の保存的治療. *JOHNS* 2007; 23: 857-861.
- 15) Takeno S, Hirakawa K, Ishino T: Pathological mechanisms and clinical features of eosinophilic chronic rhinosinusitis in the Japanese population. *Allergol Int*

- 2010; 59: 247-256.
- 16) Yao T, Kojima Y, Koyanagi A, et al: Eotaxin-1, -2, and -3 immunoreactivity and protein concentration in the nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis patients. *Laryngoscope* 2009; 119: 1053-1059.
- 17) Nonaka M, Pawankar R, Fukumoto A, et al: Induction of eotaxin production by interleukin-4, interleukin-13 and lipopolysaccharide by nasal fibroblasts. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 804-811.
- 18) Suzuki T, Arakawa H, Mizuno T, et al: Differential regulation of eotaxin expression by dexamethasone in normal human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 38: 707-714.
- 19) 藤枝重治: 花粉症 耳鼻咽喉科の立場から (アレルギー性鼻炎). *診断と治療* 2011; 99: 237-244.
- 20) Higashi N, Taniguchi M, Mita H, et al: Clinical features of asthmatic patients with increased urinary leukotriene E<sub>4</sub> excretion (hyperleukotrienuria): Involvement of chronic hyperplastic rhinosinusitis with nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 277-283.
- 21) Bachert C, Zhang N, Holtappels G, et al: Presence of IL-5 protein and IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins in nasal polyps is associated with comorbid asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 962-968.
- 22) Patou J, Gevaert P, Van Zele T, et al: Staphylococcus aureus enterotoxin B, protein A, and lipoteichoic acid stimulations in nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 110-115.
- 23) Grundmann SA, Hemfort PB, Luger TA, et al: Anti-IgE (omalizumab): a new therapeutic approach for chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 257-258.
- 24) Bobolea I, Barranco P, Fiandor A, et al: Omalizumab: a potential new therapeutic approach for aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010; 20: 448-449.
- 25) 小林良樹, 安場広高, 荻原順一: Omalizumabの有効性に対する副鼻腔炎の影響. *アレルギー* 2011; 60: 1340.
- 26) Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, et al: Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med* 2009; 360: 973-984.
- 27) Gevaert P, Van Bruaene N, Cattaert T, et al: Mepolizumab, a humanized anti-IL-5 mAb, as a treatment option for severe nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128: 989-995. e1-8.

---

連絡先 〒910-1193 吉田郡永平寺町松岡下合月23

福井大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 藤枝重治

# Genome-Wide Association Study for Levels of Total Serum IgE Identifies *HLA-C* in a Japanese Population

Yohei Yatagai<sup>1</sup>, Tohru Sakamoto<sup>1\*</sup>, Hironori Masuko<sup>1</sup>, Yoshiko Kaneko<sup>1</sup>, Hideyasu Yamada<sup>1</sup>, Hiroaki Iijima<sup>2</sup>, Takashi Naito<sup>2</sup>, Emiko Noguchi<sup>3</sup>, Tomomitsu Hirota<sup>4</sup>, Mayumi Tamari<sup>4</sup>, Yoshimasa Imoto<sup>5</sup>, Takahiro Tokunaga<sup>5</sup>, Shigeharu Fujieda<sup>5</sup>, Satoshi Konno<sup>6</sup>, Masaharu Nishimura<sup>6</sup>, Nobuyuki Hizawa<sup>1</sup>

**1** Department of Pulmonary Medicine, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan, **2** Tsukuba Medical Center, Ibaraki, Japan, **3** Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan, **4** Laboratory for Respiratory Diseases, Center for Genomic Medicine, the Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Kanagawa, Japan, **5** Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Faculty of Medicine, University of Fukui, Fukui, Japan, **6** First Department of Medicine, School of Medicine, Hokkaido University, Hokkaido, Japan

## Abstract

Most of the previously reported loci for total immunoglobulin E (IgE) levels are related to Th2 cell-dependent pathways. We undertook a genome-wide association study (GWAS) to identify genetic loci responsible for IgE regulation. A total of 479,940 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were tested for association with total serum IgE levels in 1180 Japanese adults. Fine-mapping with SNP imputation demonstrated 6 candidate regions: the *PYHIN1/IFI16*, MHC classes I and II, *LEMD2*, *GRAMD1B*, and chr13:60576338 regions. Replication of these candidate loci in each region was assessed in 2 independent Japanese cohorts ( $n = 1110$  and  $1364$ , respectively). SNP rs3130941 in the *HLA-C* region was consistently associated with total IgE levels in 3 independent populations, and the meta-analysis yielded genome-wide significance ( $P = 1.07 \times 10^{-10}$ ). Using our GWAS results, we also assessed the reproducibility of previously reported gene associations with total IgE levels. Nine of 32 candidate genes identified by a literature search were associated with total IgE levels after correction for multiple testing. Our findings demonstrate that SNPs in the *HLA-C* region are strongly associated with total serum IgE levels in the Japanese population and that some of the previously reported genetic associations are replicated across ethnic groups.

**Citation:** Yatagai Y, Sakamoto T, Masuko H, Kaneko Y, Yamada H, et al. (2013) Genome-Wide Association Study for Levels of Total Serum IgE Identifies *HLA-C* in a Japanese Population. PLoS ONE 8(12): e80941. doi:10.1371/journal.pone.0080941

**Editor:** Ludmila Prokunina-Olsson, National Cancer Institute, National Institutes of Health, United States of America

**Received:** July 16, 2013; **Accepted:** October 7, 2013; **Published:** December 4, 2013

**Copyright:** © 2013 Yatagai et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was partly supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (B), No. 24390206, from the Japan Society for the Promotion of Science. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. No additional external funding received for this study.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: t-saka@md.tsukuba.ac.jp

## Introduction

Immunoglobulin E (IgE) is a class of antibodies that has an important role in the development of Th2 cell-mediated allergic inflammatory diseases such as asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis. In atopic individuals, exposure to allergens results in Th2 cell-dependent stimulation of the immune response that causes production of IgE. Recent advances in the understanding of allergen sensitization have also revealed the sentinel role of innate immune mechanisms involved in the development of allergic diseases [1,2].

Twin and family studies have shown that genetic factors are important for total serum IgE levels [3,4] and account for about 36% to 78% heritability of its levels [3,5]. Furthermore, it has been demonstrated that total serum IgE levels are mainly determined by genetic factors that are independent of antigen-specific IgE levels or atopic status [4,6,7]. Asthma affection status is known to be related to total serum IgE levels even after adjustment for atopic status [8,9].

Thus far, a number of candidate gene association studies for total serum IgE levels have demonstrated many polymorphisms in genetic regions related to the Th2 cell-dependent pathways.

Recently, 4 genome-wide association studies (GWASs) of total serum IgE levels in independent populations have revealed additional genetic loci, such as *TBX18* and *SOBP*, which seem to be unrelated to the Th2 cell-dependent pathways [10–13]. Thus, because GWASs are unbiased by investigator preconceptions, they have the potential of providing new insights into the mechanism of IgE regulation and may be able to clarify unexpected IgE-related genetic loci.

Three of the 4 GWASs of total IgE levels reported so far were conducted solely in populations of European ancestry, and the fourth of those studies also included African-American and Latino populations. In contrast, 2 GWASs recently performed in Asian populations did not identify any loci significantly associated with total serum IgE levels [14,15]. In genetic association studies, replication of the initial findings in different ethnic groups is important to clarify the relevance of the findings.

Here, we performed a GWAS of total serum IgE levels in a Japanese population and a replication analysis in 2 independent Japanese cohorts that was followed by a meta-analysis. In addition, we validated previously reported gene associations with total serum IgE levels using our GWAS data.



## Results

### Study Flow Chart

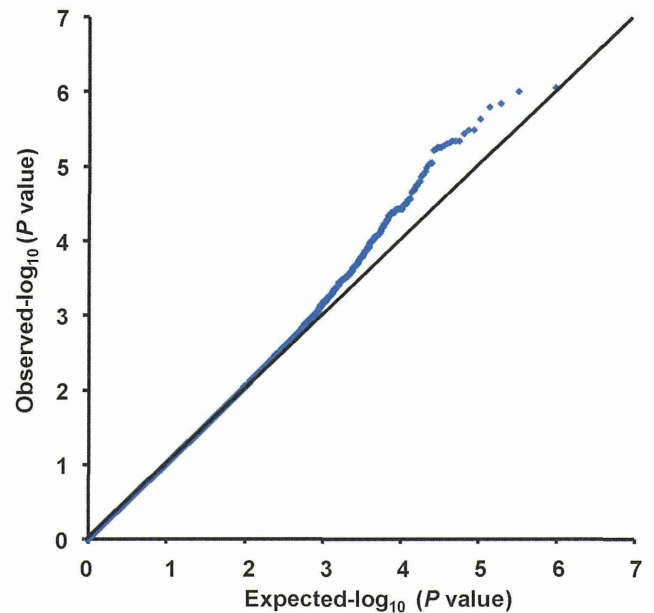
A flow chart outlining the steps of this study is shown in Figure S1.

### Characteristics of the Study Cohorts

The characteristics of the original GWAS cohort and the replication cohorts are provided in Table 1. The ratio of female participants was higher in the Fukui cohort than in the Tsukuba and Hokkaido cohorts. The Tsukuba and Hokkaido cohorts included more asthmatic patients than did the Fukui cohort. Age, sex, asthma affection status, atopic status, and IgE levels differed significantly among the cohorts.

### GWAS and Replication Analyses

A quantile-quantile plot is shown in Figure 1. The genomic inflation factor of 1.018 indicated a low possibility of false-positive associations resulting from population stratification. A Manhattan plot of the GWAS (Figure 2) showed no SNPs reaching the genome-wide significance threshold of  $5.0 \times 10^{-8}$ . We focused on 4 distinct chromosomal regions in which  $P$  values were less than  $1.0 \times 10^{-5}$ : chromosomes 1q23, 6p21, 11q24, and 13q21. Genotypes were imputed to determine the contribution of untyped SNPs to total IgE levels in these regions. Fine-mapping coupled with the imputed SNPs identified 6 candidate genomic regions (Figure 3): the *PYH1N1/IFI16* region on chromosome 1q23.1 (chr1:157229979;  $P = 3.19 \times 10^{-7}$ ), the MHC class I and II regions on chromosome 6p21.3 (rs9264567,  $P = 2.33 \times 10^{-7}$  and rs9271682,  $P = 1.55 \times 10^{-7}$ , respectively), the *LEMD2* region on 6p21.31 (rs12173787,  $P = 7.03 \times 10^{-8}$ ), the *GRAMD1B* region on chromosome 11q24.1 (rs2078158,  $P = 6.57 \times 10^{-7}$ ), and the chr13:60576338 region on chromosome 13q21.31 (rs1399315,  $P = 6.40 \times 10^{-7}$ ). For each candidate region, we conducted a replication study using validated ready-to-use TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping assays. The SNPs available for the replication studies are shown in Figure 3. Table 2 shows the association of these SNPs with total serum IgE levels in the primary Tsukuba cohort and the 2 replication cohorts. The association of rs3130941 in the MHC class I region was consistently replicated in both the Hokkaido and the Fukui cohort. Meta-analysis of the primary and the 2



**Figure 1. Quantile-quantile (Q-Q) plot of observed versus expected  $P$  values of the GWAS results.** The straight line in the Q-Q plot indicates the distribution of SNPs under the null hypothesis. doi:10.1371/journal.pone.0080941.g001

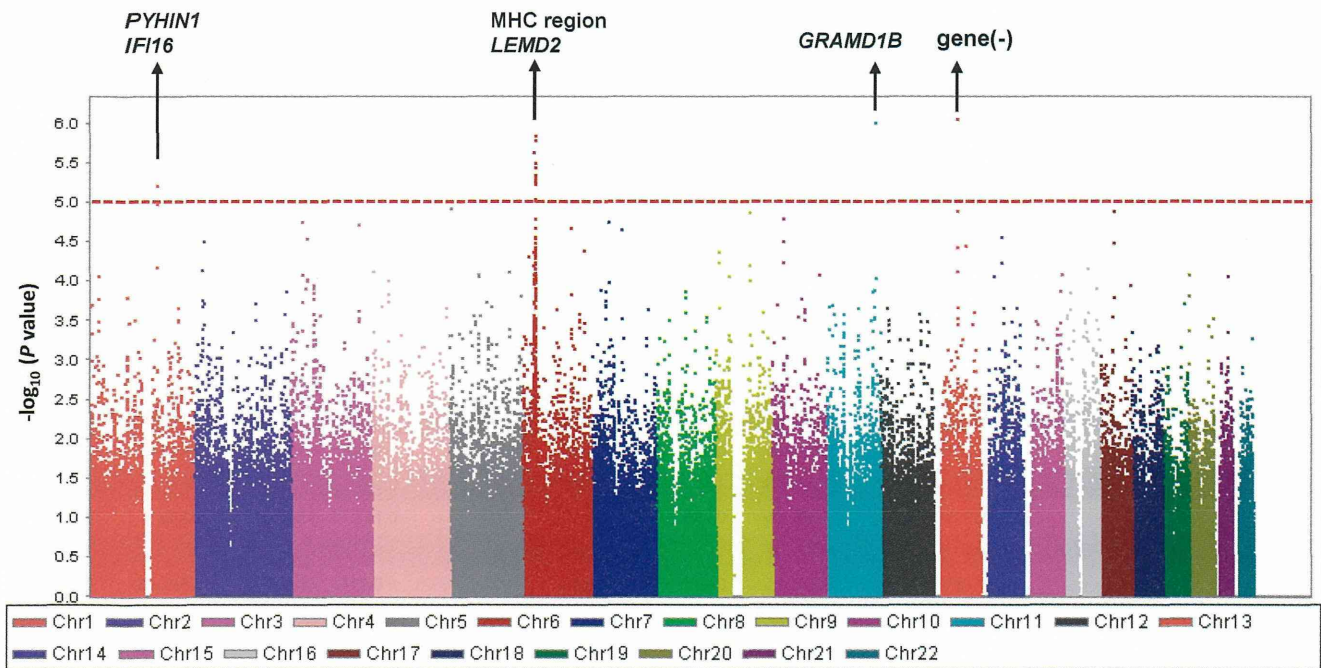
replication cohorts demonstrated that rs3130941 in the MHC class I region reached the level of genome-wide significance at  $1.07 \times 10^{-10}$ . Rs28366296 in the MHC class II region was replicated in the Hokkaido cohort only. Rs7939777 in the *GRAMD1B* region was replicated in the Fukui cohort only. As for rs7939777, a meta-analysis using the Tsukuba and Fukui cohorts yielded a  $P$  value of  $3.35 \times 10^{-10}$ .

When we repeated the meta-analyses by studying nonasthmatic healthy individuals only ( $n = 2861$ ) or by adding atopic sensitization as an additional covariate, we confirmed the association between rs3130941 in the MHC class I region and levels of total serum IgE at genome-wide significance (Table S1 and Table S2).

**Table 1. Characteristics of the study cohorts.**

	Tsukuba cohort (n = 1180)	Hokkaido cohort (n = 1110)	Fukui cohort (n = 1364)
Age, y (SD)	50.3 (10.4)	44.6 (16.0)	32.2 (9.8)
Female sex	55.3%	49.3%	67.0%
Smoking status			
Current smoker	16.2%	26.1%	NA
Ex-smoker	17.5%	16.7%	NA
Never smoker	66.2%	57.2%	NA
Asthma	18.1%	44.2%	6.5%
Atopy			
Atopic	56.6%	53.7%	67.2%
Nonatopic	40.5%	29.5%	30.5%
Unknown	2.9%	16.8%	2.3%
Log <sub>10</sub> [total serum IgE] (SD)	1.82 (0.60)	2.08 (0.69)	1.91 (0.62)

NA = not applicable; SD = standard deviation.  
doi:10.1371/journal.pone.0080941.t001

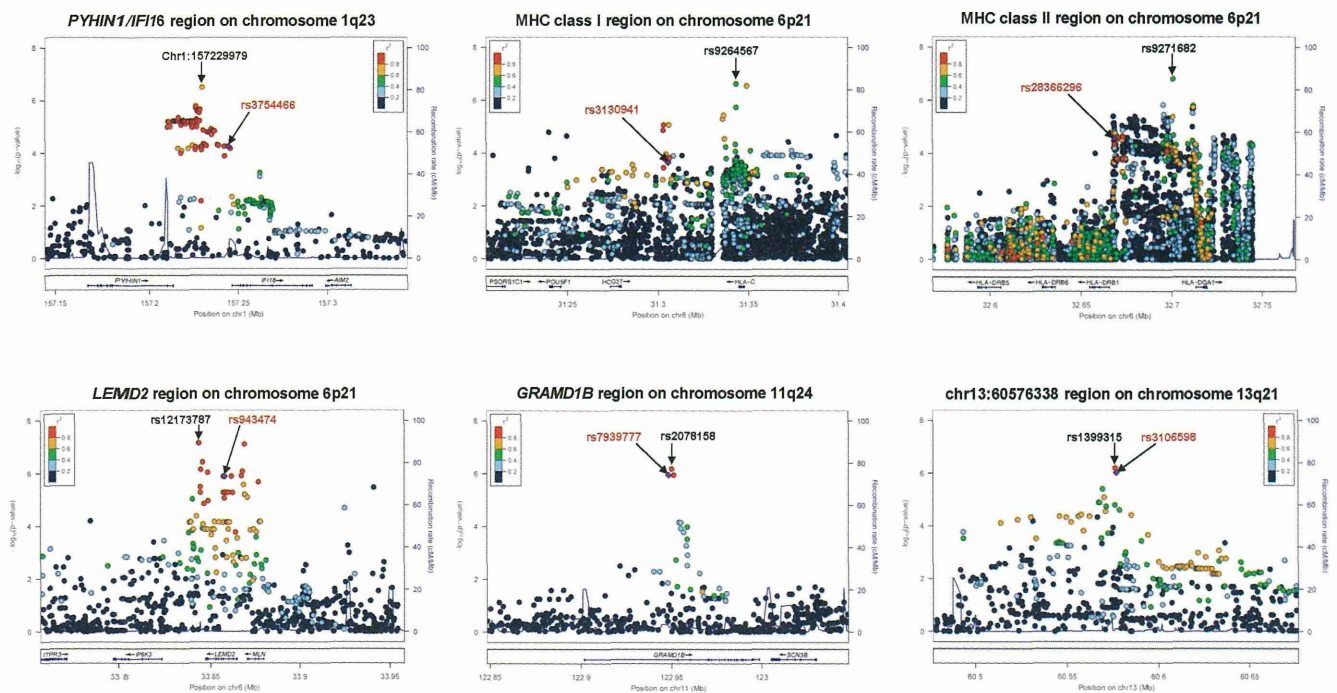


**Figure 2. Manhattan plots of  $-\log_{10}(P \text{ value})$  for association of 479,940 SNPs with total IgE levels.** Linear regression models adjusted for age, sex, smoking status (never, ex-, or current smoker), pack-year group (0, 0–10, or >10), and asthma affection status were performed. The red line shows the threshold ( $P=1 \times 10^{-5}$ ) for selection of genomic regions for further analysis including SNP imputation. doi:10.1371/journal.pone.0080941.g002

**Validation of Previous Genetic Associations**

The PubMed search identified 448 related publications. After screening of the titles, abstracts, and text, 156 eligible publications

were selected. Screening of the references of those publications identified 33 additional relevant publications. From the 189 selected publications, we found 32 candidate genes associated with



**Figure 3. Fine-mapping identification of 6 candidate genomic regions.** Plots show the association results of both genotyped and imputed SNPs in the primary GWAS cohort. The most strongly associated SNPs (black letters) in the GWAS and the SNPs used for the replication studies (red letters) are indicated by arrows. The color of each circle reflects the LD ( $r^2$ ) between a particular SNP and the SNP used for the replication studies. doi:10.1371/journal.pone.0080941.g003

**Table 2.** Replication studies and meta-analysis.

		Tsukuba cohort						Hokkaido cohort	Fukui Cohort	Meta-analysis
		Top SNP								
Chromosome	Gene	SNP for replication study	P value	LD with top SNP (r <sup>2</sup> )	MAF	Minor allele	β	P value	P value	P value
1q23.1	PYHIN1/IFI16	chr1:157229979	3.19E-07	1	0.16	G	-0.168			
		rs3754466	5.65E-05	0.637	0.20	C	-0.119	0.244	0.222	0.378
6p21.3	MHC class I	rs9264567	2.33E-07	1	0.28	A	0.132			
		rs3130941	2.28E-04	0.549	0.25	C	0.098	5.03E-04	6.12E-05	1.07E-10
6p21.3	MHC class II	rs9271682	1.55E-07	1	0.48	A	0.127			
		rs28366296	2.67E-05	0.608	0.39	A	-0.098	4.15E-02	5.44E-02	2.17E-05
6p21.31	LEMD2	rs12173787	7.03E-08	1	0.17	G	0.161			
		rs943474	1.30E-06	0.786	0.16	G	0.157	5.56E-02	0.308	2.29E-02
11q24.1	GRAMD1B	rs2078158	6.57E-07	1	0.41	A	-0.118			
		rs7939777	1.13E-06	0.943	0.42	C	-0.114	7.63E-02*	7.58E-05	0.263
13q21.31	none	rs1399315	6.40E-07	1	0.48	C	0.114			
		rs3106598	9.51E-07	0.997	0.48	G	0.112	0.817	0.813	0.326

\*The direction of the effect was opposite to that of the Tsukuba cohort.

LD = linkage disequilibrium; MAF = minor allele frequency.

doi:10.1371/journal.pone.0080941.t002

total serum IgE levels; 25 of those genes were reported in 3 or more candidate gene association studies, and 7 (*DARC*, *HLA-A*, *HLA-DQA2*, *HLA-G*, *RAD50*, *SOBP*, and *TBX18*) were reported in at least 1 GWAS.

Table 3 shows the SNP most significantly associated with total IgE levels in our GWAS data of each candidate gene on an autosomal chromosome. Nominal *P* values were less than 0.05 for 17 of the 32 candidate genes, including *HLA-C*. After corrections for multiple testing using SNPSpD software [16], the associations of 9 genes with total IgE levels remained significant. The strongest associations were detected at the genes in the MHC class I/II regions, including *LTA* on chromosome 6p21.3, although none of the top SNPs reached genome-wide significance. Previously reported polymorphisms associated with total serum IgE levels are shown in Table S3.

## Discussion

To the best of our knowledge, ours is the first GWAS that demonstrates positive results for levels of total serum IgE in an Asian population. In our primary GWAS cohort, fine-mapping using the imputed SNPs on chromosome 6p revealed 3 independent peaks: the MHC class I, MHC class II, and *LEMD2* regions (Figure S2). In the meta-analysis, rs3130941 in the MHC class I region reached levels of genome-wide significance. This finding was not significantly influenced by the presence or absence of asthma or atopy. Rs3130941 is located between *HLA-C* and *HCG27* (HLA complex group 27) (Figure 3). In the MHC class I region, 4 genes have been previously reported to be associated with total serum IgE levels: *HLA-A* (rs2517754, rs2571391), *HLA-G* (rs2523809), *LTA* (rs909253), and *TNF* (rs1800629, rs361525, rs1800630) [12,17–22]. Linkage disequilibrium (LD) between rs3130941 and each of these SNPs estimated by *r*<sup>2</sup> in our population was very weak (Table S4, Figure S3). Furthermore, the association of rs3130941 with total IgE levels was not influenced by inclusion

of each of these SNPs in the statistical model as a covariate (Table S4). Therefore, rs3130941 in the *HLA-C* region is associated with total serum IgE levels independent of the genetic influence of *HLA-A*, *HLA-G*, *LTA*, or *TNF*. With respect to the functional consequence of rs3130941, the GENEVAR database (<http://www.sanger.ac.uk/humgen/genevar/>) [23] revealed that rs3094609 and rs3130931, both of which are in weak LD with rs3130941 (*r*<sup>2</sup> = 0.566 and 0.324, respectively), are significantly associated with expression levels of *HLA-C* mRNA (*P* = 0.0495 and 0.00521, respectively), suggesting that rs3130941 may also be related to *HLA-C* expression.

The MHC class II region is another candidate for regulation of IgE levels because MHC class II molecules are importantly involved in antigen-specific IgE synthesis [24]. Three genes in the MHC class II region have been reported to be associated with total IgE levels: *HLA-DQA2*, *HLA-DQB1*, and *HLA-DRB1*. In our primary GWAS, associations of SNPs in these genes were replicated (Table 3). Because the MHC class I and II regions are in very close proximity on chromosome 6p21.3, we examined whether the genetic impact of rs3130941 in the MHC class I region was influenced by rs28366296 in the MHC class II region. Although both rs3130941 and rs28366296 showed a strong association with total IgE levels in our study, the LD between these 2 SNPs was weak (Table S4) and a linear regression model including these 2 SNPs showed that each genetic association maintained significance after controlling for the effect of each of the remaining SNPs (Table S4). Therefore, we believe that the association of rs3130941 with total serum IgE levels is independent of the effects of MHC class II genes.

A set of specific infections that strongly promote Th1 and natural killer (NK) cells likely has the potential to inhibit atopic disorder by repression of Th2 immunity. Among Japanese schoolchildren, positive tuberculin responses predicted a lower incidence of asthma, lower serum IgE levels, and biased Th1 cytokine profiles [25]. MHC class I-restricted CD8 T cells collaborate with CD4 Th1 cells to invoke Th1-type immunity,

**Table 3.** Top SNPs with the strongest statistical evidence of association with total serum IgE levels.

Gene	Chromosome	Number of SNPs	SNP	Nominal <i>P</i> value	Corrected <i>P</i> value*
<i>ADAM33</i>	20	12	rs2853215	1.66E-02	0.150
<i>ADRB2</i>	5	17	rs17640574	7.27E-02	0.728
<i>CCL11</i>	17	7	rs6505403	0.225	0.898
<i>CD14</i>	5	8	rs3822356	0.719	1
<i>CMA1</i>	14	9	rs1956932	0.179	1
<i>CTLA4</i>	2	3	rs231726	1.21E-02	2.31E-02
<i>DARC</i>	1	3	rs863002	0.394	0.789
<i>FCER1A</i>	1	9	rs2427824	3.06E-02	0.184
<i>FLG</i>	1	3	rs3126085	0.288	0.577
<i>GSTP1</i>	11	3	rs614080	0.766	1
<i>HLA-A</i>	6	2	rs2734959	6.64E-03	1.33E-02
<i>HLA-C</i>	6	26	rs3132486	1.50E-04	1.88E-03
<i>HLA-DQA2</i>	6	24	rs17500468	7.94E-05	8.06E-04
<i>HLA-DQB1</i>	6	11	rs2647025	7.48E-05	3.74E-04
<i>HLA-DRB1</i>	6	66	rs35465556	8.51E-05	1.83E-03
<i>HLA-G</i>	6	21	rs1633053	7.58E-03	4.56E-02
<i>IFNG</i>	12	4	rs3181032	3.56E-02	0.104
<i>IL10</i>	1	8	rs1800896	0.110	0.660
<i>IL13</i>	5	4	rs1295686 <sup>‡</sup>	7.41E-02	0.216
<i>IL4</i>	5	5	rs2243288	2.08E-03	8.34E-03
<i>IL4R</i>	16	23	rs4787948	0.219	1
<i>LTA</i>	6	12	rs2857709	4.24E-05	2.97E-04
<i>MS4A2</i>	11	4	rs574700	0.201	0.602
<i>NOD2</i>	16	6	rs7194886	0.156	0.468
<i>NOS1</i>	12	45	rs4767535	8.60E-03	0.235
<i>NPSR1</i>	7	66	rs323928	3.29E-02	0.867
<i>RAD50</i>	5	7	rs17772583	1.82E-02	7.29E-02
<i>SOBP</i>	6	41	rs3734747	5.43E-03	0.135
<i>STAT6</i>	12	7	rs841718	0.171	0.854
<i>TBX18</i>	6	5	rs2015519	3.71E-02	0.146
<i>TLR2</i>	4	4	rs7656411	0.328	0.983
<i>TNF</i>	6	11	rs2844484	7.96E-02	0.478

\*The significance level was corrected for multiple testing using the SNPSpD program [16].

<sup>‡</sup>SNP previously reported for association with total serum IgE (the direction of the effect was the same).

doi:10.1371/journal.pone.0080941.t003

thereby counteracting CD4 Th2 cells, which results in inhibition of IgE production [26,27]. *HLA-C* molecules also modulate NK cell function [28]. NK cytotoxicity is negatively controlled by inhibitory receptors, such as human killer cell Ig-like receptors (KIRs) specific for *HLA-B* and *HLA-C* [29]. Accordingly, as an intrinsic abnormality, impaired *HLA-C*-mediated triggering of protective immunity to microbial exposure would predispose an individual to increased levels of total serum IgE as a principal determinant of allergy.

Although localizing the causal effects of the genes within the MHC region has been limited by the complexity and strong LD of this region, the genetic association between the MHC region and several immune and inflammatory diseases has been among the most robust. The *HLA-C* region has been associated particularly with Behçet disease, psoriasis, and sarcoidosis [30–32]. Of note, dysregulation of IgE has been reported in these diseases [33–35], which may also imply that *HLA-C* is involved

in the genetic regulation of total IgE levels. Finally, it is also interesting to note that 1 locus (rs9266772) near *HLA-C* and *MICA* has been recently identified as one of the loci of allergy-specific susceptibility [36].

The meta-analysis of rs7939777 in *GRAMD1B* using the Tsukuba and Fukui cohorts yielded a *P* value of  $3.35 \times 10^{-10}$ . Interestingly, although no studies demonstrated a relationship between *GRAMD1B* and serum IgE levels, a GWAS has identified a SNP near *GRAMD1B* on chromosome 11q24.1 associated with chronic lymphocytic leukemia (CLL) [37]. CLL is characterized by coexpression of CD19 and CD23 coupled with low levels of surface immunoglobulins [38]. CD23, also known as FCER2, is a low-affinity receptor for IgE and important for regulation of serum IgE levels. In addition, total serum IgE levels are inversely associated with risk of CLL [39]. Accordingly, polymorphisms of *GRAMD1B* could be related to regulation of total serum IgE levels.