

アレルギー疾患にみられる好酸球活性化・好塩基球IgE結合状態のフローサイトメトリー法による臨床的評価(II) アレルギー疾患における末梢血好塩基球IgE結合状態とその臨床的意義

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9177

アレルギー疾患にみられる好酸球活性化・好塩基球 IgE 結合状態の フローサイトメトリー法による臨床的評価

Ⅱ. アレルギー疾患における末梢血好塩基球 IgE 結合状態とその臨床的意義

金沢大学医学部医学科小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

東 馬 智 子

末梢血中好塩基球, および組織の肥満細胞は高親和性 IgE 受容体 (high-affinity receptor for IgE, FcεRI) を発現しており, さらに最近, これらの細胞の活性化が I 型アレルギー反応を惹起するのみでなく, 慢性アレルギー性炎症を誘導することが明らかとなってきた。本研究では, 末梢血好塩基球に結合する IgE をフローサイトメトリーにより測定し, アレルギー疾患群と正常対照群で比較, その臨床的意義について検討した。末梢全血をフルオレッセン・イソチオシアナ酸 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識ヤギ抗ヒト IgE 抗体, ならびにフィコエリスリン (phycoerythrin, PE) 標識抗 CD3 および抗 CD20 単クローン抗体 (monoclonal antibody, mAb) で染色し, 単核球領域の細胞群のうち, PE 蛍光陰性の細胞に関してその FITC 蛍光強度を測定した。血清 IgE 濃度はサンドイッチ ELISA 法により定量した。血清 IgE 濃度ならびに好塩基球結合 IgE は, すべての年齢群において, 正常対照群に比しアレルギー疾患群で有意に高値を示した。アレルギー疾患群において, 血清 IgE 濃度は加齢と共に増加したが, 好塩基球結合 IgE は生後 6 ヶ月以下ですでに成人と同様の値を示した。正常対照群において, 血清 IgE 濃度は全年齢を通じて低値を示したが, 好塩基球結合 IgE は加齢と共に次第に増強した。血清 IgE 濃度が 100ng/ml 前後では, 好塩基球結合 IgE は血清 IgE 濃度とよく相関したが, IgE 濃度 300ng/ml 以上ではほぼ一定の値を示した。これらの事実は, 一定の血清 IgE 濃度で好塩基球表面の IgE 結合能が飽和する可能性を示していると考えられた。新生児臍帯血中には IgE を表面に結合する細胞が検出されなかったが, 臍帯血を過剰の IgE と共に一定時間反応させると, IgE 結合細胞が検出可能となった。さらに, 種々の末梢全血検体を同様に IgE と反応させると, IgE 結合の増強が観察された。これらの事実より, 末梢血好塩基球の IgE 結合能が加齢と共に, あるいは血清 IgE により増強される可能性が示唆された。このことに関連して, 本研究では喘鳴を繰り返す乳児においては, アレルギーの関与がまだ明らかでない場合でも, その多くで好塩基球結合 IgE が高値を示しており, 興味深い。このことより, アレルギー素因のある乳児においては, 抗原刺激により特異 IgE 産生が誘導され, それにより早期の好塩基球感作が成立する可能性が示唆された。このように, フローサイトメトリーによる好塩基球結合 IgE の測定は, 末梢血に微量に存在する好塩基球の性状の解析を可能とし, さらに小児, 特に乳幼児期におけるアレルギー性炎症の病態を評価する上で有用な指標となると考えられた。

Key words allergy, basophil, sensitization, IgE, wheezing infant

好塩基球は肥満細胞と同様に細胞表面に高親和性 IgE 受容体を発現しており, 結合した IgE が特異抗原 (アレルゲン) により架橋されると活性化され, I 型アレルギー発現の主要な効果細胞として機能することが知られている¹⁾。最近, 好塩基球や肥満細胞がその活性化により脱顆粒し, ヒスタミンやロイコトリエンなどの化学伝達物質を放出するのみでなく, 種々のサイトカインをも産生し, 好酸球の活性化やリンパ球の分化誘導, およびこれらの細胞の炎症局所への遊走に関わることが明らかになり, そのアレルギー性炎症の病態形成における重要性が再認識されてきている²⁾。また, 肥満細胞が通常皮膚, 粘膜などの組織中に局在し, 皮膚や粘膜を通して絶えず侵入するアレルゲンと反応すると考えられるのに対し, 末梢血中の好塩基球の

機能的意義は不明なことが多かった。しかし近年, 末梢血好塩基球が肺の肥満細胞と同様にインターロイキン 4 (interleukin-4, IL-4) の分泌を介して B 細胞による IgE 産生を誘導することが報告され³⁻⁷⁾, 好塩基球が免疫調節細胞として機能している可能性も指摘されている。このような観点から, 末梢血中好塩基球や肥満細胞を検索することは, 末梢血中の好酸球の検索と同様にアレルギー性炎症の病態評価において有用であることが予想される。しかし, 肥満細胞は皮膚や粘膜に局在することから, 非侵襲的方法で採取することは困難であり, 日常の臨床検査の対象にはなりにくい。一方, 末梢血中の好塩基球も 0.5 から 1% と極めて少なく, 従来行われている方法では大量の検体と煩雑な分離操作を要するため, 小児, 特に乳幼児における

平成 7 年 11 月 20 日受付, 平成 7 年 12 月 25 日受理

Abbreviations: FcεRI, high-affinity receptor for IgE; FCS, fetal calf serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; IL-4, interleukin-4; mAb, monoclonal antibody; PBS, phosphate-buffered saline; PE, phycoerythrin; TPBS, Tween 20-phosphate-buffered saline

検索や繰り返す検討は困難であった。

小児においては、末梢血好塩基球数、血清 IgE 値、特異アレルゲンの有無などが一般的なアレルギー感作の指標とされているが、乳幼児期においては明らかなアレルギー疾患児においてもこれらの指標が正常値を示す場合をしばしば経験する。また、喘鳴を伴う気道感染を繰り返す乳幼児においては、その予後や治療方針の決定においてアレルギーの関与を正確に評価することが重要であるが、実際その評価は困難であることが多い^{8)~10)}。Conroy ら¹⁶⁾は、末梢血好塩基球のヒスタミン遊離能を検討し、血清 IgE 値や好塩基球数よりも好塩基球遊離活性が I 型アレルギー発現に直接関与している可能性を示した。このような遊離活性が何によって規定されているかは明らかではないが、少なくともアレルゲンにより誘導される好塩基球脱顆粒には、好塩基球表面に結合した IgE が直接関与しているであろうと予想される。本研究では、末梢血好塩基球表面に結合する IgE をフローサイトメトリーを用いて測定することを試み、その臨床的意義について検討した。

対象および方法

1. 対象

対象は金沢大学附属病院小児科外来を受診した 0 才から 17 才までの患者 182 名である。これらの患者を病歴、臨床所見から気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、食物アレルギーなどの診断のなされたアレルギー疾患児（アレルギー群）86 名（男 35 名、女 51 名、平均年齢 5 才）と、臨床症状および家族歴（2 親等以内）にアレルギー症状やアレルギー疾患を認めず、寄生虫疾患、腎疾患、免疫不全症を認めない患児（非アレルギー対照群、以下正常対照群）82 名（男 33 名、女 49 名、平均年齢 4.6 才）、受診時喘鳴を認めた乳幼児 14 名（男 7 名、女 7 名、平均年齢 0.5 才）に分けて比較検討した。これらの患者より EDTA 加静脈全血約 1 ml を採取し、遠心して得られた血漿を ELISA 法による IgE 測定に用い、残りの血球成分を好塩基球表面の IgE 測定に使用した。なお、正常対照群の 5 名ならびにアレルギー群の 40 名では、ラテックス凝集法による血清 IgE 定量を同時に施行した。また、外来通院患者のうちラテックス凝集法にて血清 IgE 濃度を定量した 74 名（正常対照 15 名、アレルギー疾患児 69 名）においては、その血清 IgE 濃度を年齢別に比較検討した。

II. 血清 IgE 濃度の測定

血清 IgE 濃度はラテックス凝集法およびサンドイッチ ELISA 法で測定した。ラテックス凝集法は当院中央検査室にて免疫グロブリン E 測定キット LX 試薬（栄研化学、東京）を用いて測定した¹⁷⁾。サンドイッチ ELISA 法は ELISA 用 96 穴平底マイクロタイタープレート（Flow Laboratories, Mclean, VA, USA）を、0.02% アジ化ナトリウム含有 pH 9.6、0.05M 炭酸緩衝液で希釈した抗 IgE 単クローン抗体（monoclonal antibody, mAb）（Andrew Saxon, UCLA School of Medicine, USA より供与）を一次抗体として 37°C で 2 時間反応させた¹⁸⁾。その後、0.05% ツイーン-20（Tween 20, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA）および 0.02% アジ化ナトリウム含有 0.1M リン酸緩衝生理食塩水（Tween 20-phosphate-buffered saline, TPBS）にて洗浄、1% 非働化ウシ胎児血清（fetal calf serum, FCS, Nipro, 大阪）加 TPBS で段階希釈した被検血漿あるいは既知濃度のヒト IgE（Chemicon International

Inc., CA, USA）を加え 37°C で 2 時間反応させた。さらに、TPBS で洗浄後、1% FCS 加 TPBS で希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒト IgE 精製抗体（Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD, USA）を二次抗体とし、室温で 2 時間反応させた。最後に pH 9.8 のジエタノールアミン緩衝液 1 mg/ml に調節した p-ニトロフェニルリン酸（p-nitrophenyl phosphate）（Sigma Chemical Co.）を添加し発色させた。呈色反応を酵素免疫測定装置、ELISA Analyser EAR 400（SLT-Lab Instruments, Salzburg, Austria）により波長 405 nm で測定し、既知濃度のヒト IgE により得られた標準曲線をもとに血漿中の IgE 値を算出し、得られた IgE 濃度を血清 IgE 濃度とした。

III. 好塩基球表面結合 IgE の測定

1. パーコール比重勾配法による好塩基球の分離

Leonard ら¹⁹⁾はパーコール不連続密度勾配法により、通常ヒト末梢血中では 0.5 から 1% しか認められない好塩基球を 10 から 20% の純度で分離できると報告している。すなわち、パーコール（ファルマシア、東京）を用いて 1.070、1.079、1.088 g/ml の各比重液を作成し、比重勾配に EDTA 血を重層し 1200 回転で 25 分間遠心すると比重 1.070 g/ml と 1.079 g/ml の界面に好塩基球とリンパ球よりなる細胞層が集積される。この方法により得られた細胞層をフローサイトメーター Cytoron Absolute（Ortho Diagnostic Systems, 東京）を用いて解析したところ、図 1 に示すように単核球細胞領域に一致してその細胞集積を認めた。またこれらの細胞をフルオレッセン・イソチオシアン酸（fluorescein isothiocyanate, FITC）標識ヤギ抗ヒト IgE 抗体（Tago Inc., Burlingame, CA, USA）で免疫蛍光染色すると、

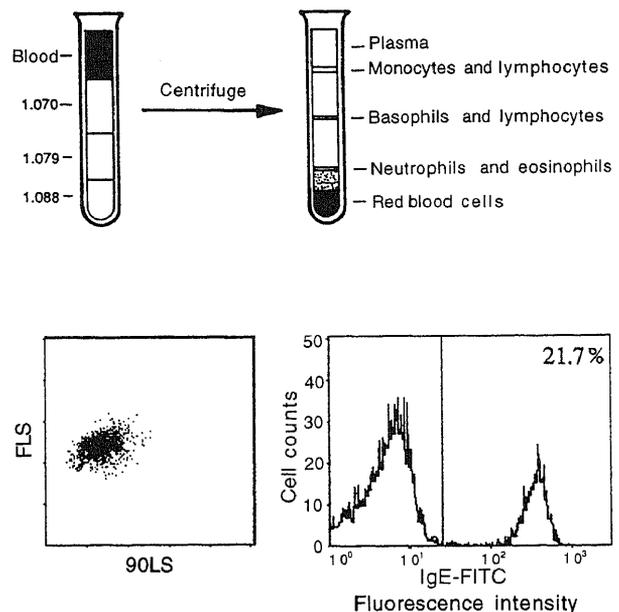


Fig. 1. Enrichment of peripheral blood basophils by Percoll discontinuous gradients. Peripheral whole blood sample was layered on discontinuous gradients of Percoll and spun down at 1,200 rpm for 25 min. Cells from interface between 1.079 and 1.070 were collected and stained with FITC-conjugated anti-human IgE antibody. The scatter patterns and the fluorescence intensity were analyzed by a flowcytometry. FLS, forward light scatter; 90LS, 90 angle light scatter.

21.7%という高率の IgE 陽性細胞を得ることができた (図 1). セルソーター Epics Elite (Coulter Electronics Inc., Hialeah, FL, USA) を用いて IgE 陽性細胞を単離し, 塗沫標本をメイギムザ染色後鏡検したところ, 90%以上の純度でこれらの細胞が好塩基球であることが確認された. 以上の予備実験に基づいて, 末梢血好塩基球表面の IgE 結合の解析を以下のように行った.

2. 免疫蛍光染色およびフローサイトメトリーを用いた好塩基球表面 IgE 発現の解析

EDTA 加静脈血を遠心して得られた血球成分を 0.1M リン酸

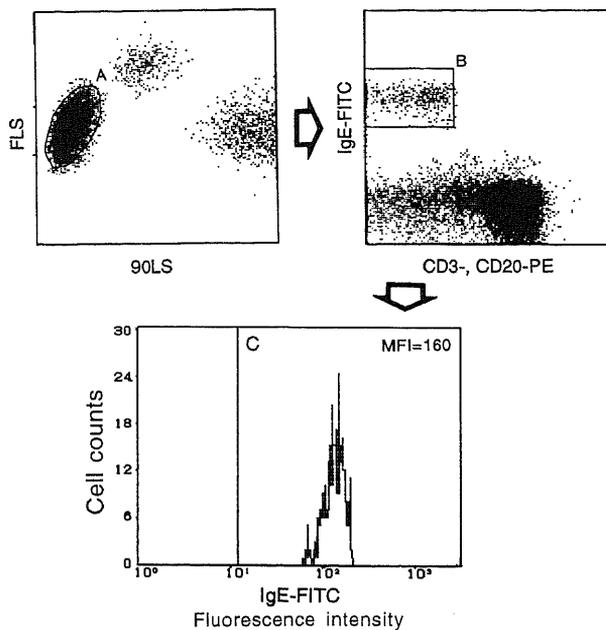


Fig. 2. Flowcytometric evaluation of basophil-bound IgE. Peripheral whole blood was washed in PBS and stained with FITC-conjugated anti-human IgE, together with PE-conjugated anti-CD3 and PE-conjugated anti-CD20 mAbs. Mononuclear cell region (region A) was gated for fluorescence analysis. Furthermore PE-negative, FITC-positive cells (region B) were selected for the measurement of FITC intensity, as shown in C. MFI, mean fluorescence intensity.

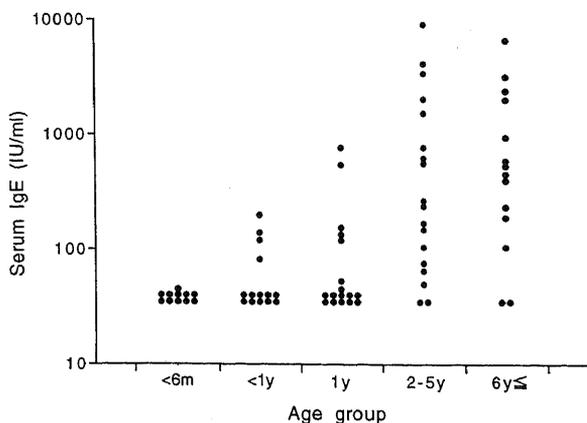


Fig. 3. Serum IgE measurement by latex agglutination. Serum IgE levels in different age groups were measured by latex agglutination. m, months; y, year or years.

緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) で 2 回洗浄後, フィコエリスリン (phycoerythrin, PE) 標識抗 Leu-4 (CD3) および抗 Leu-16 (CD20) mAb (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, USA), FITC 標識ヤギ抗ヒト IgE 抗体を添加後 4℃ で 20 分間染色した. 0.83% 塩化アンモニウム溶液にて溶血後, 細胞を PBS に再浮遊しフローサイトメーターを用いて解析した. すなわち, 単核球領域より CD3 陽性 T 細胞および CD20 陽性 B 細胞を除外する目的で PE 蛍光陰性細胞群を区画し, これらのうち FITC 強陽性で得られる細胞群を好塩基球としてその細胞表面 IgE 結合を FITC 平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity) で表した (図 2).

IV. 過剰 IgE との混合培養

1. 新生児臍帯血を用いた培養

ヘパリン加新生児臍帯血 200 μ l に 1, 10, 100, 1000, 10000ng/ml とそれぞれ濃度の異なるヒト IgE (Chemicon International Inc.) を添加し, 37℃ で 2 時間培養を行った. また, 6 名の新生児より得たヘパリン加臍帯血に 1000ng/ml のヒト IgE を添加し, 37℃ で 2 時間培養を行った. 培養後, PBS で 3 回洗浄し, 上記と同様に PE 標識抗 CD3 および抗 CD20 mAb, FITC 標識ヤギ抗ヒト IgE 抗体で免疫蛍光染色を行い, フローサイトメトリーを用いて培養前後の FITC 平均蛍光強度の変化を検討した.

2. 患者末梢血を用いた培養

種々の年齢の患者より得た EDTA 加全血に 1000ng/ml の IgE を添加し, 37℃ で 2 時間培養を行った. 培養後, 臍帯血と同様の方法で免疫蛍光染色を行い, フローサイトメトリーを用いて培養前後の FITC 平均蛍光強度の変化を検討した.

V. 統計学的検討

測定値はいずれも平均 \pm 標準偏差 ($\bar{x} \pm S.D.$) で表し, 各測定値の比較検定には t 検定を用い, 危険率 5% 未満をもって有意差ありと判定した. また, 2 つの変数間の相関については Pearson の相関係数で表し, 危険率 5% 未満をもって有意差ありと判定した.

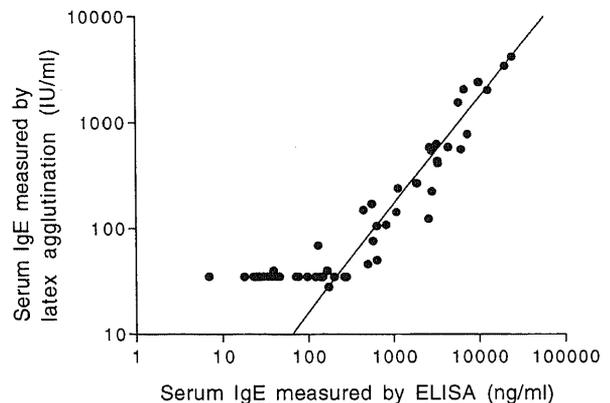


Fig. 4. Comparison of latex agglutination and sandwich ELISA assay. Measurements of serum IgE by latex agglutination and sandwich ELISA were compared. Strong association ($r=0.954$, $p<0.001$) was observed between two methods, when only the samples with IgE values higher than 100 ng/ml were selected for the comparison.

成 績

I. 末梢血中の総 IgE 値測定

1. ラテックス凝集法による測定

ラテックス凝集法による血清 IgE 値の測定感度は 40IU/ml 以上である。アレルギー群および正常対照群の各年齢群における IgE 値の推移をみると、年齢が高くなるにつれ IgE も高値を示す傾向がみられた。しかし、1才以下ではアレルギーの有無にかかわらず感度以下の症例が多く、特に6か月未満では全例が測定感度以下の値であった(図3)。

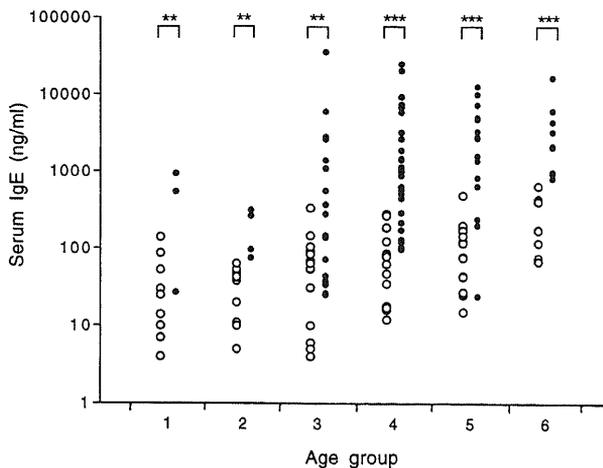


Fig. 5. Comparison of serum IgE levels between normal controls and allergics in different age groups. Serum IgE levels of normal controls (○) and allergics (●) were measured by sandwich ELISA assay and compared in different age groups. Age group 1, <6 months; 2, <1 year; 3, 1 year; 4, 2-5 years; 5, 6-12 years; 6, 13 years \leq ; ** p <0.01, *** p <0.001.

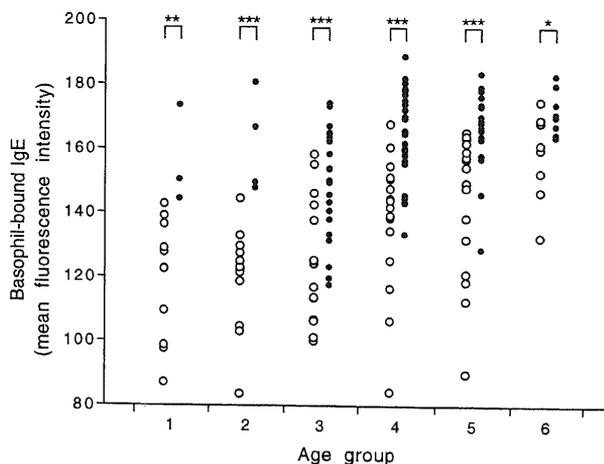


Fig. 6. Comparison of basophil-bound IgE levels between normal controls and allergics in different age groups. Basophil-bound IgE levels of normal controls (○) and allergics (●) in different age groups were determined by a flowcytometry. Age group 1, <6 months; 2, <1 year; 3, 1 year; 4, 2-5 years; 5, 6-12 years; 6, 13 years \leq ; * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

2. ELISA 法による測定

ELISA 法による IgE 値の測定感度は 5ng/ml 以上であり、ラテックス凝集法の測定感度可能域においては ELISA 法による IgE 値はラテックス凝集法によるものと非常に高い相関を認めた($r=0.954$, $p<0.001$)。しかも、ラテックス凝集法では測定感度以下の症例に関しても ELISA 法では測定可能であった(図4)。

II. 正常対照群ならびにアレルギー群における血清 IgE 値の年齢的推移(図5)

ELISA 法により測定した血清 IgE 値は、年齢にかかわらず、アレルギー群では正常対照群に比べ有意に高値を示した。1才未満の乳児ではアレルギー群においても IgE 値は比較的低値を示すものが多く、年齢依存性に高値となる傾向を示した。一方正常対照群においては、IgE 濃度が年齢依存性に上昇する傾向を若干認めたが、100ng/ml 前後にとどまり、アレルギー群と正常対照群との有意差は年齢が高くなるほど顕著となった。

III. 正常対照群ならびにアレルギー群における末梢血好塩基球表面結合 IgE の年齢的推移(図6)

正常対照群における好塩基球表面結合 IgE は、1才未満の乳児においては低値を示したが、以後年齢依存性に上昇する傾向がみられた。一方アレルギー群においては、乳児期から好塩基球結合 IgE は高値を示し、年齢が高くなっても FITC 平均蛍光強度が180以上の高値をとることはほとんどなく、成人でもほぼ一定の値を示した。このように、血清 IgE 値は年齢が高くなるにつれアレルギー群と対照群の差ははっきりする傾向がみられたのに対し、好塩基球表面結合 IgE ではアレルギー群と対照群の差はむしろ低年齢群において顕著であった。

IV. 血清 IgE 値と好塩基球表面結合 IgE の相関(図7)

血清 IgE 濃度と好塩基球表面結合 IgE 値には非常に高い相関がみられた($r=0.754$, $p<0.001$)。特に血清 IgE 濃度が約 100ng/ml 以下の領域では、血清 IgE 値が上昇するにつれ好塩基球表面結合 IgE 値も上昇がみられたが、100ng/ml 前後で急

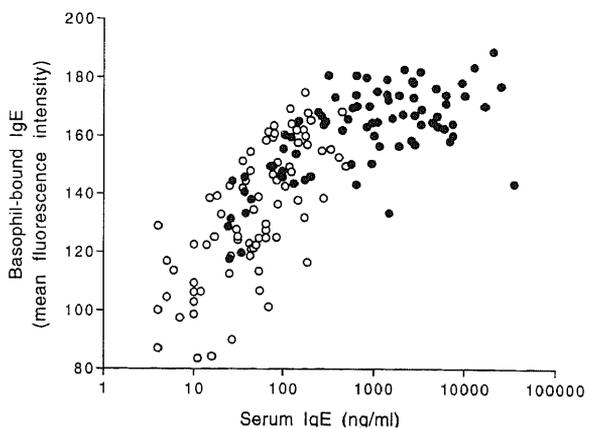


Fig. 7. Correlation between serum IgE and basophil-bound IgE. Serum IgE levels were determined by a sandwich ELISA assay and basophil-bound IgE levels were measured by a flowcytometry. These values were compared among normal controls (○) and allergics (●). Close association ($r=0.754$, $p<0.001$) was observed between both measurements.

速に好塩基球結合 IgE の増加を認め、血清 IgE 濃度が 300ng/ml 以上の領域では好塩基球表面結合 IgE は160から180のレベルで一定となる傾向がみられた。

V. 過剰 IgE との混合培養による好塩基球表面結合 IgE の誘導

1. 新生児臍帯血を用いた好塩基球表面結合 IgE の誘導

へパリン加新生児臍帯血に、種々の濃度のヒト IgE を添加し 37℃で2時間培養を行い培養前と比較した。臍帯血血清 IgE 濃度はいずれも 10ng/ml 以下であり、培養前の新生児好塩基球表面には IgE の発現はほとんど認められなかった (平均蛍光強度 90以下) が、培養後、IgE 添加濃度依存性に好塩基球表面に

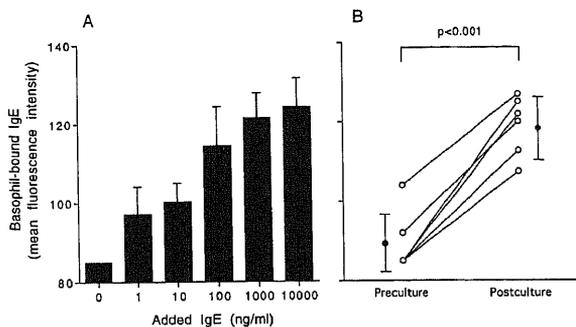


Fig. 8. Induction of IgE-binding cells within neonatal cord blood. Neonatal cord blood was incubated for 2 hours at 37 °C, in the presence of varying concentration of human IgE (A). The data indicate the means \pm S.D. of 5 separate experiments. Upregulation of basophil-bound IgE levels were evaluated in individual cases before and after incubation with 1,000 ng/ml of human IgE (B). The closed circles and the bars indicate the means \pm S.D. of 6 separate individuals.

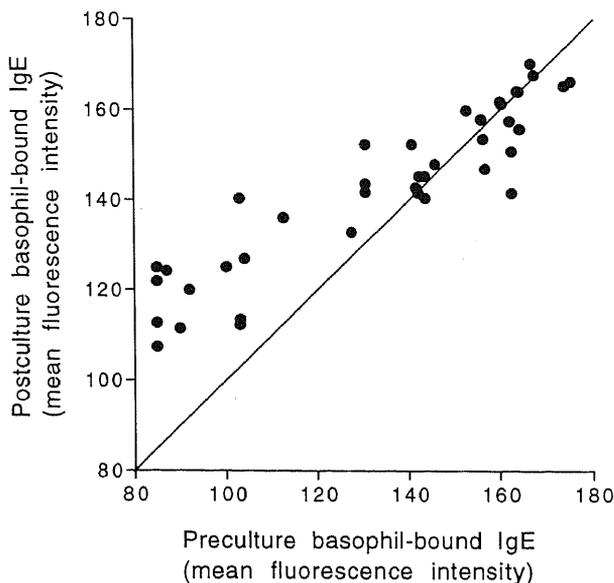


Fig. 9. Upregulation of basophil-bound IgE level after incubation with excess IgE. Whole blood samples from various age groups were incubated with 1,000 ng/ml of IgE for 2 hours, and pre- and postculture basophil-bound IgE levels were compared.

IgE 発現が誘導された。しかし、その平均蛍光強度は120程度と低値であり、1000ng/ml 以上の高濃度の IgE と反応させてもそれ以上高値とはならなかった (図 8-A)。

6名の新生児より得たへパリン加臍帯血に 1000ng/ml のヒト IgE を添加し37℃で2時間培養し培養前後の平均蛍光強度を比較した。培養前では1例にわずかに IgE 発現を認めた (平均蛍光強度100) 以外 IgE 陽性細胞は検出できなかった。しかし培養後すべての例において、その平均蛍光強度は120前後と低値ながら有意に上昇し、IgE 添加により好塩基球表面に IgE 発現誘導が認められた (図 8-B)。

2. 患者末梢血を用いた好塩基球表面結合 IgE の誘導

種々の年齢の患者より得た EDTA 加全血に 1000ng/ml の IgE を添加し、37℃で2時間培養した。IgE 陽性細胞の平均蛍光強度を培養前後で比較すると、培養前の平均蛍光強度が120程度の患児においては、ある一定レベルの IgE 結合の増加を認めたが、成人の平均蛍光強度までは至らなかった。しかし培養前にすでに平均蛍光強度140以上の強い IgE 結合を認めた患児においては、培養後もその平均蛍光強度に変化を認めなかった (図 9)。また、いずれの場合においても、IgE 陽性細胞の比率に変化は認められなかった。

VI. 喘鳴を認める乳幼児と好塩基球表面結合 IgE

2才以下の乳幼児における血清 IgE 値と好塩基球表面結合 IgE の相関をみると非常に高い相関がみられた ($r=0.775$, $p<0.001$)。アレルギー群と対照群で比較すると、アレルギー群では血清 IgE 値は対照群に比べて明らかに高値であり好塩基球表面結合 IgE も相関して上昇を示した。しかし、血清 IgE 値が 300ng/ml 以上になると好塩基球表面結合 IgE は160から180レベルで一定となった。正常対照群においてはほとんどの症例で血清 IgE 濃度、好塩基球 IgE 結合ともに低値を示した。アレルギーの関与は不明であるが、乳児期に喘鳴を繰り返している患児 (wheezing infants) では、1才以下の乳児でも好塩基

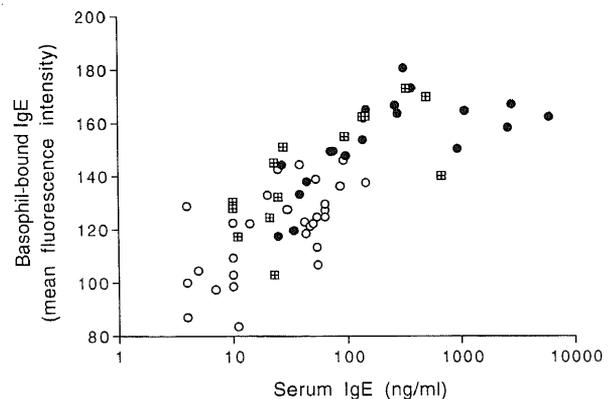


Fig. 10. Basophil-bound IgE levels in infants with repeated episodes of wheezing. Serum IgE levels and basophil-bound IgE levels were compared among normal control infants (○), infants with symptomatic allergy (●) and infants with repeated episodes of wheezing but no proved evidence of allergy (◐). All infants were under 2 years of age. Close association ($r=0.775$, $p<0.001$) was observed between serum IgE levels and basophil-bound IgE levels when three groups were combined together for the analysis.

球表面結合 IgE は正常対照群に比べ高値を示す例が多く、7例においては血清 IgE 濃度が 100ng/ml 以上あるいは好塩基球結合 IgE が 150 以上を示した (図 10)。

考 察

好塩基球は肥満細胞と同様に高親和性 IgE 受容体 (high-affinity receptor for IgE, FcεRI) を介して IgE 抗体を結合しており、抗原刺激により IgE が架橋されると脱顆粒により化学伝達物質を放出し、I 型アレルギーを惹起することは従来よりよく知られている¹⁾。一方、アレルゲンが生体内にとりこまれると T 細胞が活性化され、種々のサイトカインが遊離する^{20)~22)}。これらのサイトカインにより好酸球、好塩基球、好中球の分化増殖のみならず、遊走能の亢進、生存延長、化学伝達物質の遊離機能亢進が誘導される^{23)~29)}。最近、マウスの肥満細胞自身がこのようなサイトカインを産生することが明らかにされており^{30)~33)}、ヒトにおいても肥満細胞および好塩基球が IL-4 を産生することが報告されている^{34)~36)}。さらに、IL-4 は T 細胞活性の増強および B 細胞の IgE 産生細胞へのクラススイッチを誘導することが指摘されてきており^{4)~6) 9) 13) 38)}、好塩基球や肥満細胞の活性化は単なる即時型アレルギー反応のみでなく、サイトカインの分泌を介して慢性アレルギー性炎症の発症に密接に関与することが明らかとなってきた。したがって、気管支喘息やアトピー性皮膚炎など局所における強いアレルギー性炎症が示唆されている場合においては、その病態形成に好塩基球や肥満細胞が重要な役割を果たしていると考えられる。

血清 IgE 濃度は従来よりアレルギー感作の指標とされ、特に特異 IgE 抗体は特定のアレルゲン感作のよい指標となっている³⁹⁾。しかし、小児、特に乳幼児においては明らかにアレルギーの関与が示唆される場合であっても、血清総 IgE 値が測定感度以下であることをしばしば経験する。本研究でもサンドイッチ ELISA 法に比し、通常のラテック凝集法による測定では、乳幼児期の血清 IgE はほとんどが感度以下であることが示された。

一方、I 型アレルギーの指標として好塩基球ヒスタミン遊離能がより有用であるという報告がなされている^{40) 41)}。ヒスタミン遊離能は、好塩基球表面に結合した IgE 抗体とアレルゲンとの抗原抗体反応ならびにそれに伴う化学伝達物質の量によって表される好塩基球の反応性全体を評価するものであるが、必ずしも血清 IgE 値と相関しないとの報告が以前よりなされている⁴²⁾。また最近、IgE を欠損するマウスにおいても肥満細胞の脱顆粒が起こることが報告されており⁴³⁾、脱顆粒が IgE の関与しない機構によっても誘導される可能性は否定できない。しかし、少なくともアレルゲンを介した刺激による一連の反応においては細胞表面の IgE が重要な役割を果たすと考えられる。

好塩基球表面の FcεRI により、血清中 IgE 濃度が低い場合でも好塩基球表面には検出可能な IgE 結合が存在する可能性がある。また、好塩基球表面に結合する IgE 量は血清中 IgE 濃度よりも直接、好塩基球のアレルゲンを介した遊離能を反映する可能性が高いと考えられる。好塩基球表面の IgE の定量に関しては Malveaux ら⁴⁴⁾の報告があり、好塩基球表面の IgE が血清 IgE 濃度と極めて強く相関することが示されている。しかし、彼らの方法では大量の検体が必要で、また煩雑な操作を必要とするため、多くの臨床検体で検討することは困難である。

従来、末梢血好塩基球の解析のためには、パーコール不連続

密度勾配法などにより、特定の比重分画をある程度濃縮する方法が用いられており^{19) 40)~46)}、予備の実験でもパーコール法により、IgE 陽性細胞が 0.1% 程度から約 20% にまで濃縮された。しかし、このような方法は大量の検体と煩雑な操作を必要とするわりに、せいぜい 10 から 20% までしか好塩基球を濃縮できないことから、小児の臨床検体の処理としては不適当である。本研究ではパーコール法で濃縮された好塩基球を多く含む分画がフローサイトメトリーでは単核球分画と一致することと、IgE 陽性細胞以外は CD3 陽性 T 細胞、CD20 陽性 B 細胞、あるいは CD16 陽性ナチュラルキラー細胞であることが明らかとなった。また、セルソーターによる検討により IgE 陽性細胞がすべて好塩基球の形態を示すことが確認され、さらに、CD3、CD20、CD16 陰性細胞のうち IgE を発現しない細胞分画には好塩基球の形態を示す細胞は存在しなかった。実際には単核球の大部分を占める T 細胞のみを除外すれば IgE 陽性細胞の検討は可能であるが、最近、末梢血中に IgE 結合 B 細胞が存在することを示した報告もあり⁴⁷⁾、今回の検討では PE 染色により T 細胞と B 細胞を解析対象から除外するようにした。

好塩基球結合 IgE および血清 IgE について加齢に伴う変化をアレルギー群と正常対照群で比較した検討では、アレルギー群においては、好塩基球結合 IgE および ELISA 法で測定した血清 IgE 値は、正常対照群に比し明らかに高値を示していた。特に好塩基球結合 IgE は乳幼児期から成人のアレルギー患者と同程度の高値を示した。これに対し、乳児期における血清 IgE はアレルギー群においても比較的 low 値であり、乳児期のアレルギー感作の指標としては好塩基球結合 IgE の方がより鋭敏である可能性が示唆された。一方、正常対照群においては、血清 IgE 値は加齢により若干の増加傾向を認めるもののほぼ 100ng/ml 以下の低値を示したのに対し、好塩基球結合 IgE は加齢とともに明らかな増強傾向を認めた。以上より、好塩基球結合 IgE が単純に血清 IgE 濃度を反映するのではなく、IgE 結合が比較的 low 血清 IgE 濃度で飽和する可能性と、正常対照群においては年齢により好塩基球表面の IgE 結合能が異なる可能性が示唆された。実際、好塩基球結合 IgE と血清 IgE の相関を検討した図 7 では、血清 IgE 濃度が 100ng/ml 前後で急速に好塩基球結合 IgE が増加する所見が認められ、これ以上血清 IgE が高値、特に 300ng/ml 以上の症例ではほぼ好塩基球結合 IgE は一定の値となり、FcεRI が飽和することを示すと考えられた。Malveaux ら⁴⁴⁾の検討でも同程度の血清 IgE 濃度域で同様の好塩基球結合 IgE の増加が観察されている。これらの事実は、比較的 low 濃度の血清 IgE で好塩基球表面の FcεRI が飽和することを示すと同時に、高濃度の非特異的 IgE 濃度により特異 IgE の結合が阻害される可能性を示唆しており、特異アレルゲンに対する感作をブロックすることによる治療の可能性を示しているかもしれない。

年齢により好塩基球表面の IgE 結合能が異なる可能性について、新生児臍帯血を用いて検討した。新生児血清中には IgE はほとんど存在せず、IgE 結合細胞もほとんど検出されなかった。一方、臍帯血を過剰の IgE とともに培養すると、一定レベルの IgE 結合細胞が検出可能となるが、添加する IgE を増加しても好塩基球 IgE 結合は平均蛍光強度 120 前後で一定となり、決して成人の飽和状態には至らなかった。このことは、臍帯血中には IgE を結合する細胞、すなわち好塩基球が存在するが、その IgE 結合能、おそらく FcεRI の分布濃度が成人に比し

極めて低いと考えられた。さらに種々の程度の好塩基球結合 IgE を示す検体を過剰の IgE と共に培養した実験では、培養前の IgE 結合が一定以上の蛍光強度を示した検体では培養前後で IgE 結合にほとんど変化は認められないが、IgE 結合の低い検体は一定レベルの結合増加を示した。しかし、いずれも成人の飽和レベルには達しなかった。以上の成績からも、年齢により IgE 結合能が異なる可能性と、血清 IgE により IgE 結合能が誘導される可能性が示唆された。しかし、培養前後での IgE 結合細胞の比率に変化はなく、少なくとも短時間の培養で好塩基球数が増加したとは考えられない。したがって、新生児臍帯血中には、すでに存在する好塩基球が一定レベルの FcεRI を発現しており、これに添加した IgE が結合した結果、検出可能となったと考えられる。しかし、これらの可能性に関しては FcεRI に対する抗体を用いて、さらに定量的に検討される必要がある。

乳児期においては喘鳴を繰り返し、アレルギーの関与が強く示唆される症例をしばしば経験する。しかし、この時期においては解剖学的に気道が狭いこと、気道感染の機会が多く、必ずしもアレルギー性素因を有さなくても喘鳴や遷延する咳嗽など喘息様の症状を示す場合があり、臨床の場合においては、予後判定や治療方針の決定に苦慮することがしばしばある⁹⁻¹⁰。アレルギー素因を有する症例においては種々の気道感作により気道粘膜上の肥満細胞が活性化され、アレルギー性炎症への引き金が早期に引かれている可能性がある。これらの症例に関してはアレルギー性炎症の悪循環を断つという意味で、予防的治療戦略を選択することが必要と考えられる。

乳幼児期における血清 IgE 濃度と好塩基球結合 IgE の相関を検討した成績では、興味深い事実が明らかとなった。すなわち、血清 IgE 濃度 100ng/ml と好塩基球結合 IgE 値150を境界として検討すると、明らかなアレルギー群の大部分 (12/20) が右上分画に含まれ、正常群はそのほとんど (28/29) が左下分画に含まれた。一方、アレルギーの関与が判然としないが喘鳴を繰り返す乳児においては、正常分画に含まれる症例は7例で、残り7例は血清 IgE 濃度が 100ng/ml 以上か、好塩基球結合 IgE が150以上の群に含まれていた。正常分画に含まれた7例に関してもそのほとんどの症例の好塩基球結合 IgE は正常対照群に比べ高値を示した。乳児期はアレルギー群であっても血清 IgE 濃度が 100ng/ml 前後にとどまる症例が多く、血清 IgE 濃度のみでアレルギーの判定をすることは困難である。好塩基球結合 IgE の測定を同時に施行することにより、より信頼性のある指標とすることができると考えられた。今後、個々の症例における変動や好塩基球表面における FcεRI 発現などを同時に検討することにより、その臨床的意義をさらに明らかにすることが可能であると考えられた。

フローサイトメトリー法による好塩基球表面 IgE の解析は、簡便で鋭敏に末梢血好塩基球の IgE 結合を測定できる方法と考えられた。少量の検体で繰り返し検出が可能であることから、特に小児の臨床検体での測定に有用であり、血清 IgE 濃度や他のアレルギー感作の指標と合わせて患者の病態評価、治療方針決定などに重要な情報を与えてくれる可能性が示唆された。また、この方法は FcεRI などの受容体発現の解析にも応用可能であり、加齢に伴う好塩基球機能の成熟など、種々の試験管内レベルの検討により今後さらに好塩基球のアレルギー性炎症への関与を探る一助となる可能性が示された。

結 論

小児におけるアレルギー感作の有無およびアレルギー性炎症の病態評価の指標として好塩基球表面の IgE 結合状態をフローサイトメトリー法を用いて測定し、以下の結論を得た。

1. フローサイトメトリーにより、好塩基球は末梢血中の単核球分画における CD3 および CD20 抗原陰性領域の、IgE 陽性細胞群として得られた。この方法により、末梢血中に0.5から1%程度しか存在しない好塩基球の解析が少量の検体で可能となった。

2. ラテックス凝集法とサンドイッチ ELISA 法による血清 IgE 濃度測定は極めて高い相関を示した。特に、ELISA 法では、ラテックス凝集法で測定感度以下の症例でも測定可能であり、高感度な測定法であることが示された。

3. 好塩基球表面結合 IgE は年齢依存性に増加し、血清 IgE 濃度とも高い相関を示した。アレルギー群においては、乳児期前半から強い IgE 結合を示し、乳児期のアレルギー感作の指標としては、血清 IgE 濃度よりも鋭敏である可能性が示唆された。

4. 血清 IgE 濃度と好塩基球結合 IgE の相関を検討した成績より、比較的低い血清 IgE 濃度で FcεRI が飽和する可能性が示唆された。

5. 臍帯血や種々の好塩基球結合 IgE を示す検体と過剰の IgE を培養すると、好塩基球表面にある一定の IgE 結合誘導あるいは増加を認めたが、成人の飽和状態には至らなかった。また、すでに強い IgE 結合を示す例では培養前後に変化はみられなかった。このことから、年齢により好塩基球の IgE 結合能が異なる可能性と、血清 IgE により好塩基球 IgE 結合能が誘導される可能性が示唆された。

6. 乳児期に喘鳴を繰り返す症例において、血清 IgE 濃度と好塩基球 IgE 結合を同時に測定することは、アレルギーの関与の有無を判定し、治療方針を決定する際に有用な指標となると考えられた。

7. フローサイトメトリー法による好塩基球結合 IgE の解析は、少量の検体で鋭敏に末梢血好塩基球表面の IgE 結合状態を解析でき、他のアレルギー感作の指標と合わせることににより、アレルギー性炎症の病態評価の指標として有用である可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師谷口 昂教授に深く感謝の意を表します。また、終始直接の御指導と御助言を頂きました谷内江昭宏講師をはじめ、研究に御協力頂きました小児科学教室の諸先生方に心より感謝致します。

なお、本論文の要旨の一部は第45回日本アレルギー学会総会 (1995年、浦安)、第32回日本小児アレルギー学会 (1995年、神戸) において発表した。

文 献

- 1) Metzger, H., Alcaraz, G., Hohman, R., Kinet, J. P., Pribluda, V. & Quatro, R.: The receptor with high affinity for immunoglobulin E. *Ann. Rev. Immunol.*, 4, 419-470 (1986).
- 2) Gordon, J. R., Burd, P. R. & Galli, S. J.: Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunol. Today*,

- 11, 458-464 (1990).
- 3) Hamawy, M. M., Mergenhagen, S. E. & Siraganian, R. P.: Adhesion molecules as regulators of mast-cell and basophil function. *Immunol. Today*, 15, 62-66 (1994).
- 4) Romagnani, S.: Regulation and deregulation of human IgE synthesis. *Immunol. Today*, 11, 316-321 (1990).
- 5) Heusser, C. H., Bews, J., Brinkmann, V., Delespesse, G., Kilchherr, E., Ledermann, F., Le, G. G. & Wagner, K.: New concepts of IgE regulation. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 94, 87-90 (1991).
- 6) Seder, R. A., Plaut, M., Barbieri, S., Urban, J. J., Finkelman, F. D. & Paul, W. E.: Purified FcεR⁺ bone marrow and splenic non-B, non-T cells are highly enriched in the capacity to produce IL-4 in response to immobilized IgE, IgG2a, or ionomycin. *J. Immunol.*, 147, 903-909 (1991).
- 7) Gauchat, J. F., Henchoz, S., Mazzei, G., Aubry, J. P., Brunner, T., Blasey, H., Life, P., Talabot, D., Flores, R. L., Thompson, J., Kishi, K., Butterfield, J., Dahinden, C. & Bonnefoy, J. Y.: Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature*, 365, 340-343 (1993).
- 8) Martinez, F. D., Morgan, W. J., Wright, A. L., Holberg, C. J. & Taussig, L. M.: Diminished lung function as a predisposing factor for wheezing respiratory illness in infants. *N. Engl. J. Med.*, 319, 1112-1117 (1988).
- 9) Burrows, B., Martinez, F. D., Halonen, M., Barbee, R. A. & Cline, M. G.: Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N. Engl. J. Med.*, 320, 271-277 (1989).
- 10) Halonen, M., Stern, D., Taussig, L. M., Wright, A., Ray, C. G. & Martinez, F. D.: The predictive relationship between serum IgE levels at birth and subsequent incidences of lower respiratory illnesses and eczema in infants. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 146, 866-870 (1992).
- 11) Sears, M. R., Burrows, B., Flannery, E. M., Herbison, G. P., Hewitt, C. J. & Holdaway, M. D.: Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *N. Engl. J. Med.*, 325, 15, 1067-1071 (1991).
- 12) Martinez, F. D., Morgan, W. J., Wright, A. L., Holberg, C. & Taussig, L. M.: Initial airway function is a risk factor for recurrent wheezing respiratory illnesses during the first three years of life. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 143, 312-316 (1991).
- 13) Duff, A. L., Pomeranz, E. S., Gelber, L. E., Price, G. W., Farris, H., Hayden, F. G., Platts, M. T. & Heymann, P. W.: Risk factors for acute wheezing in infants and children: viruses, passive smoke, and IgE antibodies to inhalant allergens. *Pediatrics*, 92, 535-540 (1993).
- 14) Pattemore, P. K. & Holgate, S. T.: Bronchial hyperresponsiveness and its relationship to asthma in childhood. *Clin. Exp. Allergy*, 23, 886-900 (1993).
- 15) Martinez, F. D., Wright, A. L., Taussig, L. M., Holberg, C. J., Halonen, M. & Morgan, W. J.: Asthma and wheezing in the first six years of life. *N. Engl. J. Med.*, 332, 133-138 (1995).
- 16) Conroy, M. C., Adkinson, N. J. & Lichtenstein, L. M.: Measurement of IgE on human basophils: relation to serum IgE and anti-IgE-induced histamine release. *J. Immunol.*, 118, 1317-1321 (1977).
- 17) 和田守史, 伊藤喜久, 櫻林郁之介, 河合 忠: LA-System による IgE および α₁-Microglobulin の定量測定. *日本臨床検査自動化学会誌*, 12, 79-83 (1987).
- 18) Zhang, K., Clark, E. A. & Saxon, A.: CD40 stimulation provides an IFN-gamma-independent and IL-4-dependent differentiation signal directly to human B cells for IgE production. *J. Immunol.*, 146, 1836-1842 (1991).
- 19) Leonard, E. J., Roberts, R. L. & Skeel, A.: Purification of human blood basophils by single step isopycnic banding on Percoll. *J. Leukoc. Biol.*, 35, 169-177 (1984).
- 20) Rothenberg, M. E., Owen, W. J., Silberstein, D. S., Woods, J., Soberman, R. J., Austen, K. F. & Stevens, R. L.: Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3. *J. Clin. Invest.*, 81, 1986-1992 (1988).
- 21) Owen, W. F., Rothenberg, M. E., Petersen, J., Weller, P. F., Silberstein, D., Sheffer, A. L., Stevens, R. L., Soberman, R. J. & Austen, K. F.: Interleukin 5 and phenotypically altered eosinophils in the blood of patients with the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *J. Exp. Med.*, 170, 343-348 (1989).
- 22) Kay, A. B., Ying, S., Varney, V., Gaga, M., Durham, S. R., Moqbel, R., Wardlaw, A. J. & Hamid, Q.: Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin 3 (IL-3), IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J. Exp. Med.*, 173, 775-778 (1991).
- 23) Owen, W. F., Jr., Rothenberg, M. E., Silberstein, D. S., Gasson, J. C., Stevens, R. L., Austen, K. F. & Soberman, R. J.: Regulation of human eosinophil viability, density, and function by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in the presence of 3T3 fibroblasts. *J. Exp. Med.*, 166, 129-141 (1987).
- 24) Clutterbuck, E. J., Hirst, E. M. A. & Sanderson, C. J.: Human interleukin 5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GM-CSF. *Blood*, 73, 1504-1512 (1988).
- 25) Lopez, A. F., Sanderson, C. J., Gamble, J. R., Campbell, H. R., Young, I. G. & Vadas, M. A.: Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J. Exp. Med.*, 167, 219-224 (1988).
- 26) Prete, G. F., Maggi, E., Parronchi, P., Chretien, I., Jiri, A., Macchia, D., Ricci, M., Banchereau, J., Vries, J. & Romagnani, S.: IL-4 is an essential factor for

- IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J. Immunol.*, **140**, 4193-4198 (1988).
- 27) Hirai, K., Morita, Y., Misaki, Y., Ohta, K., Takaishi, T., Suzuki, S., Motoyoshi, K. & Miyamoto, T.: Modulation of human basophil histamine release by hemopoietic growth factors. *J. Immunol.*, **141**, 3958-3964 (1988).
- 28) Yamaguchi, M., Hirai, K., Shoji, S., Takaishi, T., Ohta, K., Morita, Y., Suzuki, S. & Ito, K.: Haemopoietic growth factors induce human basophil migration in vitro. *Clin. Exp. Allergy*, **22**, 379-384 (1992).
- 29) Renz, H., Bradley, K., Saloga, J., Loader, J., Larsen, G. L. & Gelfand, E. W.: T cells expressing specific V beta elements regulate immunoglobulin E production and airways responsiveness in vivo. *J. Exp. Med.*, **177**, 1175-1180 (1993).
- 30) Burd, P. R., Rogers, H. W., Gordon, J. R., Martin, C. A., Jayaraman, S., Wilson, S. D., Dvorak, A. M., Galli, S. J. & Dorf, M. E.: Interleukin 3-dependent and -independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. *J. Exp. Med.*, **170**, 245-257 (1989).
- 31) Plaut, M., Pierce, J. H., Watson, C. J., Hanley, H. J., Nordan, R. P. & Paul, W. E.: Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of FcεRI or to calcium ionophores. *Nature*, **339**, 64-67 (1989).
- 32) Wodnar, F. A., Heusser, C. H. & Moroni, C.: Production of the haemopoietic growth factors GM-CSF and interleukin-3 by mast cells in response to IgE receptor-mediated activation. *Nature*, **339**, 150-152 (1989).
- 33) Seder, R. A., Paul, W. E., Ben, S. S., LeGros, G. S., Kagey, S. A., Finkelman, F. D., Pierce, J. H. & Plaut, M.: Production of interleukin-4 and other cytokines following stimulation of mast cell lines and in vivo mast cells/basophils. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **94**, 137-140 (1991).
- 34) Bradding, P., Feather, I. H., Howarth, P. H., Mueller, R., Roberts, J. A., Britten, K., Bews, J. P. A., Hunt, T. C., Okayama, Y., Heusser, C. H., Bullock, G. R., Church, M. K. & Holgate, S. T.: Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *J. Exp. Med.*, **176**, 1381-1386 (1992).
- 35) Arock, M., Merle, B. H., Dugas, B., Ouaz, F., Le Goff, L., Vouldoukis, I., Mencia, H. J. M., Schmitt, C., Leblond, M. V., Debre, P. & Mossalayi, M. D.: IL-4 release by human leukemic and activated normal basophils. *J. Immunol.*, **151**, 1441-1447 (1993).
- 36) Brunner, T., Heusser, C. H. & Dahinden, C. A.: Human peripheral blood basophils primed by interleukin 3 (IL-3) produce IL-4 in response to immunoglobulin E receptor stimulation. *J. Exp. Med.*, **177**, 605-611 (1993).
- 37) Pene, J., Rousset, F., Briere, F., Chretien, I., Paliard, X., Banchereau, J., Spits, H. & Vries, J. E.: IgE production by normal human B cells induced by alloreactive T cell clones is mediated by IL-4 and suppressed by IFN-gamma. *J. Immunol.*, **141**, 1218-1224 (1988).
- 38) Gauchat, J. F., Lebman, D. A., Coffman, R. L., Gascan, H. & Vries, J. E.: Structure and expression of germline epsilon transcripts in human B cells induced by interleukin 4 to switch to IgE production. *J. Exp. Med.*, **172**, 463-473 (1990).
- 39) Sigurs, N., Hattevig, G., Kjellman, B., Kjellman, N. I., Nilsson, L. & Bjorksten, B.: Appearance of atopic disease in relation to serum IgE antibodies in children followed up from birth for 4 to 15 years. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **94**, 757-763 (1994).
- 40) Nguyen, K. L., Gillis, S. & MacGlashan, D. J.: A comparative study of releasing and nonreleasing human basophils: nonreleasing basophils lack an early component of the signal transduction pathway that follows IgE cross-linking. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **85**, 1020-1029 (1990).
- 41) MacGlashan, D. W. J.: Releasability of human basophils: cellular sensitivity and maximal histamine release are independent variables. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **91**, 605-615 (1993).
- 42) Assem, E. S. K. & Attallah, N. A.: Increased release of histamine by anti-IgE from leucocytes of asthmatic patients and possible heterogeneity of IgE. *Clin. Allergy*, **11**, 367-374 (1981).
- 43) Oettgen, H. C., Martin, T. R., Wynshaw, B. A., Deng, C., Drazen, J. M. & Leder, P.: Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature*, **370**, 367-370 (1994).
- 44) Malveaux, F. J., Conroy, M. C., Adkinson, N. J. & Lichtenstein, L. M.: IgE receptors on human basophils. Relationship to serum IgE concentration. *J. Clin. Invest.*, **62**, 176-181 (1978).
- 45) MacGlashan, D. J. & Lichtenstein, L. M.: The purification of human basophils. *J. Immunol.*, **124**, 2519-2521 (1980).
- 46) Pruzansky, J. J. & Patterson, R.: Enrichment of human basophils. *J. Immunol. Methods*, **44**, 183-190 (1981).
- 47) Donohoe, P. J., Hedde, R. J., Sykes, P. J., Fusco, M., Flego, L. R. & Zola, H.: IgE⁺ cells in the peripheral blood of atopic, nonatopic, and bee venom-hypersensitive individuals exhibit the phenotype of highly differentiated B cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **95**, 587-596 (1995).

