Studies on Basophil Releasability of Histamine in Pediatric Allergological conditions Ⅰ. Increased Histamine Release from Basophils in a Heavy-water-based Buffer in Patients with Bronchial Asthma and Atopic Dermatitis

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/2297/8302

金沢大学十全医学会雑誌　第101巻　第1号　124－131（1992）

小児アレルギー疾患における好塩基球ヒスタミン遊離能 (Histamine Releasability) に関する研究

Ⅰ．気管支喘息およびアトピー性皮膚炎患者の重水存在下での好塩基球ヒスタミン遊離能の亢進について

金沢大学医学部小児科学講座（主任：谷口　昂教授）
上　田　智　子

（平成4年1月13日受付）

気管支喘息患者 (bronchial asthma, BA) 56名，アトピー性皮膚炎患者 (atopic dermatitis, AD) 31名および非アレルギー対照者 (non-atopic subject, NS) 19名の末梢血好塩基球からのヒスタミン遊離を，抗 IgE 抗体使用時 (anti-IgE induced histamine release, IgE-HR) と非使用時 (spontaneous histamine release, SHR) について，蒸留水を使用した緩衝液または45%重水を使用した緩衝液で比較し，以下の結果を得た．SHR は3群ともに有意な上昇はなかったが，重水存在下では BA 群の18%，AD 群の29%に2%以上の増強が見られた．IgE-HR は BA 群 (25.9±2.8%) で NS 群 (4.1±1.7%) より有意に高く ($p<0.01$)，また重水存在下では BA 群 (47.2±3.6%)，AD 群 (30.6±4.4%)，NS 群 (11.0±3.3%) と BA 群 ($p<0.01$) および AD 群 ($p<0.05$) で NS 群に比し有意に上昇が見られた．重水により BA 群の16%，AD 群の52%に15%以上の遊離増強がみられた．この抗 IgE 抗体の刺激によるヒスタミン遊離率の上昇およびその重水による増強は，血清総 IgE 値の高値群 (200IU/ml 以上) でより強くみられ，また末梢血好酸球数増多群 (500/mm^3 以上) でより強く認めた．さらに BA 群，AD 群で重水による増強効果の見られなかったものには，特異 IgE 抗体の証明されない非アトピー型の患者が多かった．以上の結果より，BA および AD 患者では末梢血好塩基球のヒスタミン遊離能が亢進しており，主としてそれは IgE 抗体が関与する現象であることが示唆された．

Key words histamine, basophil releasability, heavy water (D_2O), bronchial asthma, atopic dermatitis

1960年代，Ishizaka ら[1]によって IgE が発見されて以来，気管支喘息や鼻アレルギーなどⅠ型アレルギーの関与する疾患では，肥満細胞や好塩基球からの IgE を介した化学伝達物質の遊離機序について研究されてきた．アレルギー疾患を有する個体は吸入性抗原や食物抗原などのアレルゲンに対して抗体を作りやすい性質を持っており，その血清総 IgE 値はアレルギーを持たない個体に比べて高値を示すことが多い[2]．しかし血清総 IgE 値の高低が必ずしも重症度と一致しないことは諸家の報告にもあり[3][4]，また臨床上しばしば経験するところである．他方，アナフィラトキシン[5][6]など補体系を介する反応や細菌レクチン[7]を介する非免疫学的刺激機序によっても化学伝達物質の遊離が認められ，抗原抗体反応のみでアレルギーの病態を説明できないことも事実である．そこで Lichtenstein らにより，1970年代に好塩基球ヒスタミン遊離能 (basophil releasability) という概念が提唱された[8]．好塩基球ヒスタミン遊離能とは，一定の刺激に対して好塩基球が遊離する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．好塩基球から化学伝達物質が遊離される際には，細胞表面で抗原や抗 IgE 抗体の結合したレセプターの架橋形成に始まり，細胞外よりカルシウムイオンが流入し，ヒスタミン等の化学伝達物質が顆粒から放出されるまで多くの過程を経ている．細胞骨格構造の一つをなすマイクロチュブルスも，その集合と細胞膜への貫通によって顆粒内化学伝達物質の細胞外への放出に最終段階で重要な役割を果たしている[9]~[11]．重水 (heavy water, D_2O) はこのマイクロチュブルスを安定化し[12]，IgE を介するヒスタミン遊離を増強すると言われている[9]~[11]．今回著者は，気管支喘息およびアトピー性皮膚炎患者におけるヒスタミン遊離能を，重水を用いてヒスタミン遊離を測定することにより健康人と比較して検討した．

対象および方法

Ⅰ．対　　象（表－1）

対象はアトピー性皮膚炎患者 (atopic dermatitis, AD) 31名，気管支喘息患者 (bronchial asthma, BA) 56名，非アトピー対照

Abbreviations: AD, atopic dermatitis; BA, bronchial asthma; HNMT, histamine N-methyltransferase; HR (IgE), amount of anti-IgE induced histamine release; HR (S), amount of spontaneous histamine release; IgE-HR, anti-IgE induced histamine release; IgE-HR (D), anti-IgE induced histamine release in heavy-water (D_2O)-based buffer; IgE-HR (H), anti-IgE induced histamine release in H_2O-based buffer; IHR, amount of

者 (non-atopic subject, NS) 19名の計106名である．ここでADとは，Hanifin と Rajka の診断基準[13]と北郷の診断基準[14]を参考にし，掻痒，紅斑，小丘疹，浸潤，びらん，苔癬化などの典型的な形態および分布を示す皮疹が慢性に経過しているものとした．BA は喘鳴を伴う一過性の呼吸困難発作が，気管支拡張剤により改善し，これを繰り返すものである．NS は，気管支喘息，アトピー性皮膚炎，アレルギー性鼻炎，アレルギー性結膜炎などのアレルギー症状や寄生虫疾患，腎疾患，免疫不全症等の疾患を認めず，2親等以内にアレルギー疾患のないもので，さらに血清総 IgE 値は二重抗体法で3才以下50IU/ml 以下，4～7才100IU/ml 以下，8才以上150IU/ml 以下を満たし[15]~[17]，ラジオアレルゴソルベント試験 (radioallergosorbent test, RAST) によるアレルゲン検査で，ダニ (Dermatophagoides pteronyssinus) に対する特異 IgE 抗体を証明しないものである．表1に各群の性別，年令，血清総 IgE 値，末梢血好酸球数を示した．小児科を訪れる AD は乳幼児が多いため，BA 群や NS 群に比べ AD 群での平均年令は低くなっている．AD 群では2名に抗アレルギー剤と原因食物除去療法を行い，4名に抗アレルギー剤を使用，1名に除去療法を行なっていた．BA 群では，38名にテオフィリン，15名に抗アレルギー剤，3名にステロイド剤を内服投与していた．

Ⅱ．ヒスタミン遊離方法

1．緩衝液の作成

緩衝液は0.025M Tris hydroxymethyl aminomethane, 0.12M NaCl, 0.005M KCl, 0.3mg/ml ヒトアルブミンからなるトリスA緩衝液，およびトリスA緩衝液に 0.6mM $CaCl_2$, 1mM $MgCl_2$ を含むトリス ACM 緩衝液を使用した．ともに25℃でpH7.6に調整した．

2．抗 IgE 抗体の調整

抗ヒト IgE 抗体 (ヒツジ) (フナコシ，東京) を用いて最終濃度が0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0μg/ml となるように調整した．

3．重水 (D_2O) の調整

トリス緩衝液に含まれる重水 (和光，大阪) の最終濃度を0，22.5，45，60，80%になるように調整した．

4．白血球分離方法

Lichtenstein らの方法[18]に準じ，末梢よりヘパリン加静脈血20ml を採血し，デキストラン－デキストロース液 5ml を加えて室温にて60分静置後，白血球を含む上清を採取した．これを4℃にて 110G 8分間遠心分離し，沈渣をトリスA緩衝液で2回洗浄 (ともに 250G 8分間遠心) した後，細胞をトリスA緩衝液に再浮遊させ，木村氏液にて染色した好塩基球を算定して調整した．

5．ヒスタミン遊離方法

蒸留水を使用したトリス ACM 緩衝液 (H_2O 緩衝液) と，重水を使用したトリス ACM 緩衝液 (D_2O 緩衝液) に，最終好塩基球数が 10^5/ml となるよう調整した細胞浮遊液を加えてヒスタミン遊離反応を行なった．抗 IgE 抗体非添加にてみられるヒスタミン遊離をヒスタミン自然遊離 (spontaneous histamine release, SHR)，抗 IgE 抗体添加によるヒスタミン遊離を抗 IgE 抗体誘導ヒスタミン遊離 (anti-IgE induced histamine release, IgE-HR) とした．検体に緩衝液や抗 IgE 抗体を添加するまでの操作はすべて4℃で行ない，遊離反応は37℃で行なった後4℃にて冷却遠心し，上清を200μl 採取して直ちに－20℃に冷凍保存した．総ヒスタミン含量は，細胞浮遊液を3分間煮沸後，同様に冷却遠心にて上清をとり－20℃に冷凍保存した．

6．ヒスタミン測定方法

ヒスタミンは同位元素二重標識酵素法 (double isotopic enzymatic assay)[19]により測定した．ヒスタミン標準液は histamine dihydrocloride (Sigma，セントルイス，米国) の2倍希釈による希釈系列 (200～0.78ng/ml) を作成して用いた．ヒスタミン－N－メチルトランスフェラーゼ (histamine-N-methyltransferase, HNMT) は Shaff らの方法によりラットの腎臓より抽出し[20]，－20℃に保存したものを用いた．^3H 標識ヒスタミン，^{14}C 標識S－アデノシルメチオニン (S-adenosylmethionine-^{14}C, SAM-^{14}C) は NEN Reserch Product (ボストン，米国) より購入した．検体に SAM-^{14}C, HNMT およびトレーサーとして極少量の ^3H-ヒスタミンを加えて37℃で反応させると，検体中のヒスタミンは HMNT により SAM-^{14}C からメチル基を受け取って ^{14}C-メチルヒスタミンになり，トレーサーの ^3H-ヒスタミンは ^3H-^{14}C-メチルヒスタミンになる．ヒスタミン濃度は $^{14}C/^3H$ と正の相関を示すことにより知ることができる．ヒスタ

Table 1. Characteristics of the subjects

	Non-atopic subject	Atopic dermatitis	Bronchial asthma
Number of subject	19	31	56
Male/Femmale	10/9	11/20	34/22
Mean age (yr)	13.2	3.3	16.9
(range)	(1～36)	(0.2～10)	(2～58)
Serum IgE level (IU/ml)	55±10	858±373	1280±290*
Peripheral eosinophils (/mm³)	94±24	662±130*	762±84*

Values are mean±S.E.M.
*$p<0.05$ against non-atopic subject

initial histamine release; NS, non-atopic subjects; RAST, radioallergosorbent test; SAM-^{14}C, S-adenosylmethionine-^{14}C; SHR, spontaneous histamine release; SHR (D), spontaneous histamine release in D_2O-based buffer; SHR (H), spontaneous histamine release in H_2O-based buffer; TH, total histamine

ミン遊離量は総ヒスタミン含量 (total histamine, TH) に対する割合 (%ヒスタミン遊離) で表した.

1)
$$SHR(\%)=\frac{HR(S)-IHR}{TH}\times 100$$

2)
$$IgE\text{-}HR(\%)=\frac{HR(IgE)-HR(S)}{TH}\times 100$$

SHR; 無刺激的に自然遊離したヒスタミン遊離率

IgE-HR; 抗 IgE 抗体で刺激した場合のヒスタミン遊離率

初期ヒスタミン遊離量 (amount of initial histamine release, IHR); 0分におけるヒスタミン遊離量

ヒスタミン自然遊離量 (amount of spontaneous histamine release, HR(S)); 抗原非添加にて反応させた時の自然ヒスタミン遊離量

抗 IgE 抗体誘導ヒスタミン遊離量 (amount of anti-IgE induced histamine release, HR(IgE)); 抗 IgE 抗体を加えて反応させた時のヒスタミン遊離量

TH; 総ヒスタミン含量

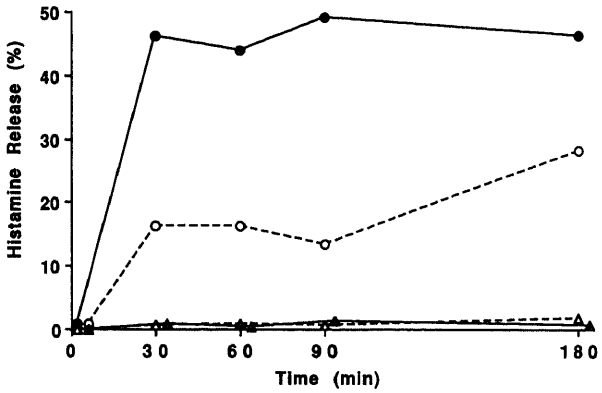


Fig. 1. Time course of the histamine release from basophils. Leukocytes from two patients with bronchial asthma were incubated for the indicated time in H_2O-based (···) or D_2O-based buffer (—) with (○, ●) or without (△, ▲) anti-IgE. The amount of histamine release was represented as a percentage of the total histamine (See Methods).

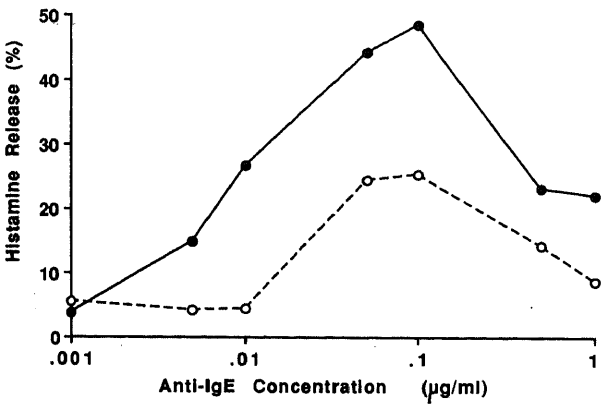


Fig. 2. Histamine release induced by a various concentration of anti-IgE. Leukocytes from a patient with bronchial asthma were incubated with an indicated concentration of anti-IgE in H_2O-based (○) or D_2O-based (●) buffers.

7. 統計学的処理

得られた数値はすべて平均値±標準誤差 (mean±S.E.M.) で示した. 多群間の平均値の差の検定には一元配置分散分析後, Scheffe または Dunnet の多重比較法を用いた. $p<0.05$の場合を有意差ありと判定した.

成　　績

I. ヒスタミン遊離条件に関する基礎的検討

1. 重水の至適濃度について

重水の濃度を22.5, 45, 60, 80%の条件下で遊離反応を行なうと, SHR および IgE-HR は濃度依存的に増加した. 細胞障害を認めずにヒスタミン遊離を増強し, それ自体によっては遊離を引き起こさない濃度として, 重水の濃度を45%[7~9] とした.

2. 反応時間について (図1)

反応時間を検討するため, SHR および0.05μg/ml 抗 IgE 抗体存在下での IgE-HR を30, 60, 90, 180分で比較した. 以後 H_2O 緩衝液における SHR, IgE-HR をそれぞれ SHR(H), IgE-HR(H), D_2O 緩衝液における SHR, IgE-HR をそれぞれ SHR(D), IgE-HR(D) とする. SHR(H), SHR(D) は時間の経過とともにわずかに上昇がみられたが, 180分でも2%をこえなかった. IgE-HR(H), IgE-HR(D) は30分までにヒスタミン遊離を認め, 以後は漸増していたがその上昇はゆるやかであった. これより, ヒスタミン遊離反応における反応時間は60分とした.

3. 抗 IgE 抗体の至適濃度について (図2)

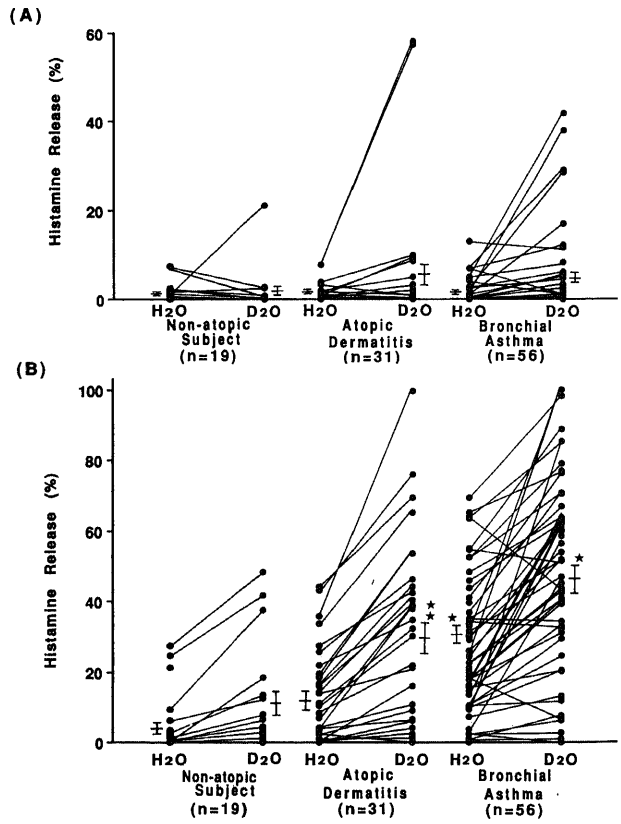


Fig. 3. Spontaneous histamine release (A) and anti-IgE-induced histamine release (B) from leukocytes of non-atopic subjects, patients with atopic dermatitis or bronchial asthma. Vertical bars represent mean±S.E.M.; ★, $p<0.01$; ★★, $p<0.05$

抗 IgE 抗体の濃度を0.001μg/ml から 1 μg/ml までで比較すると，H_2O 緩衝液，D_2O 緩衝液ともに0.05～0.1μg/ml の条件下で最も高いヒスタミン遊離が得られた．以下の遊離反応においては0.05μg/ml 抗 IgE 抗体を使用した．

Ⅱ．非アトピー対照者 (NS) 群，アトピー性皮膚炎患者 (AD) 群，気管支喘息患者 (BA) 群におけるヒスタミン遊離 (図3)

1．非アトピー対照者におけるヒスタミン遊離 (図3－A．B)

SHR(H), SHR(D) はそれぞれ1.0±0.3%，1.6±1.1%で，重水による遊離増強は0.7±1.1%であった．SHR(H) は2名を除いて2%以下であり，また1名を除く他の18名では重水によるヒスタミン遊離の上昇は認めなかった．IgE-HR(H) は4.1±1.7%，IgE-HR(D) は11.0±3.3%で，重水による増強は6.9±2.0%であった．これらの結果より，SHR(H) は2%以上，IgE-HR(H) は10%以上を高値とし，重水による増強効果は SHR で2%以上，IgE-HR では15%以上で増強ありとした．

2．ヒスタミン自然遊離の3群間での比較 (図3－A)

SHR(H) は非アトピー対照者群 (NS 群) (1.0±0.3%)，アトピー皮膚炎群 (AD 群) (1.2±0.4%)，気管支喘息群 (BA 群) (1.3±0.3%) の間に有意差を認めず，2%以上を示す割合も NS 群3/19名 (16%)，AD 群4/31名 (13%)，BA 群9/56名 (16%) とほぼ同様であった．SHR(D) は NS 群 (1.6±1.1%)，AD 群 (5.5±2.5%)，BA 群 (4.3±1.2%) と AD 群，BA 群にやや高い傾向はあったがその差は有意ではなかった．また重水により2%以上遊離率の上昇した割合は，NS 群1/19名 (5%)，AD 群9/31名 (29%)，BA 群10/56名 (18%) と，AD 群は NS 群に比し有意に高く ($p<0.05$)，特に AD 群の2名では50%以上の強い増強を認めた．

3．抗 IgE 抗体誘導ヒスタミン遊離の3群間での比較 (図3－B)

IgE-HR(H) は BA 群 (25.9±2.6%) が AD 群 (13.2±2.3%)，NS 群 (4.1±1.7%) に比し有意に高く (ともに $p<0.01$)，また AD 群も NS 群より高い傾向がみられた．IgE-HR(H) が10%以上を示すものの割合は，NS 群3/19名 (16%)，AD 群16/31名 (52%)，BA 群42/56名 (75%) と BA 群，AD 群は NS 群より有意に多かった (それぞれ $p<0.01$，$p<0.05$)．さらに BA 群は AD 群よりも多かった ($p<0.05$)．IgE-HR(D) は BA 群 (47.2±3.6%) が AD 群 (30.6±4.4%)，NS 群 (11.0±3.3%) に比して有意に高く (それぞれ $p<0.05$，$p<0.01$)，AD 群も NS 群より有意に高かった ($p<0.05$)．重水により15%以上遊離率の上昇した割合は，NS 群4/19名 (21%)，AD 群16/31名

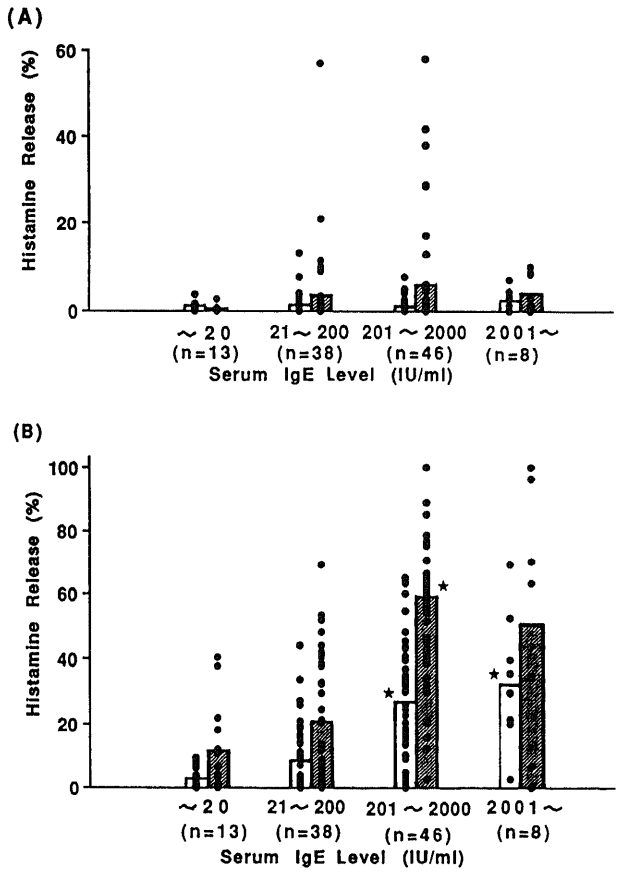


Fig. 4. Relation between the serum IgE level and the spontaneous histamine release (A), and the anti-IgE-induced histamine release (B). All subjects were devided into four groups accrding to the serum IgE level. Open columns and columns with oblique lines represent mean histamine release in H_2O-baseed buffer and D_2O-based buffer, respectively. ★, $p<0.01$ against two groups with the lowest (<200IU/ml) serum IgE level

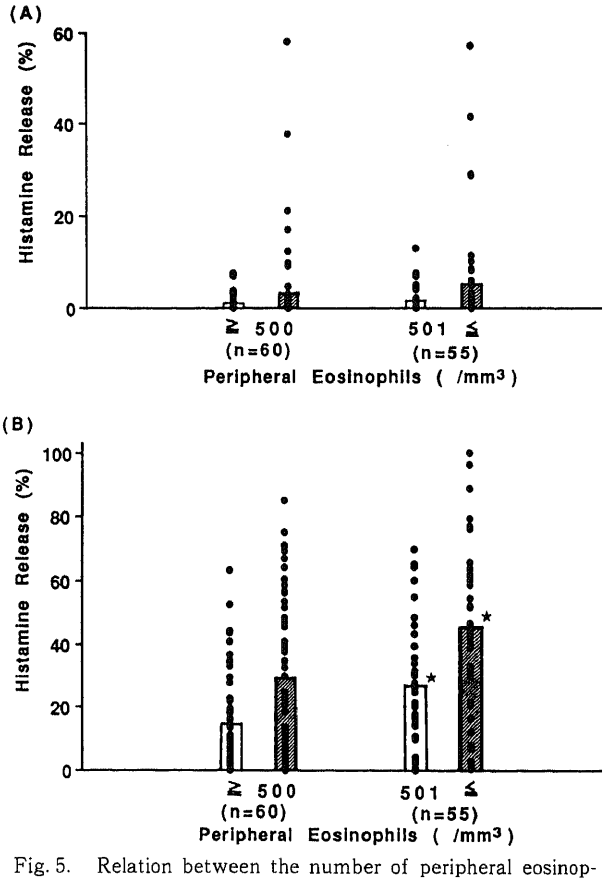


Fig. 5. Relation between the number of peripheral eosinophils and the spontaneous histamine release (A), and that number and anti-IgE-induced histamine release (B). All subjects were devided into two groups according to the number of peripheral eosinophils. Open columns and columns with oblique lines represent mean histamine release in H_2O-baseed buffer and D_2O-based buffer, respectively. ★, $p<0.01$ against lower (<500/mm³) peripheral eosinophil count

(52%), BA 群37/56名 (66%) と BA 群, AD 群が NS 群に比し有意に高かった (ともに $p<0.01$). しかし AD 群, BA 群の中に IgE-HR(H) は低く, 重水による遊離増強も認めない一群も存在した.

Ⅲ. ヒスタミン遊離と他の因子について

1. 血清総 IgE 値とヒスタミン遊離について (図－4)

血清総 IgE 値は NS 群 55±10IU/ml に比し, AD 群 858±373IU/ml, BA 群 1280±290IU/ml とアレルギー疾患群で高かった (表－1). SHR(H) は血清総 IgE 値の高低による差を認めなかった. SHR(D) も平均値においては有意の差を認めなかったが, 血清総 IgE 値が 201IU/ml 以上の7名および 200 IU/ml 以下の2名で高値を示した. IgE-HR(H) は血清総 IgE 値 20IU/ml 以下3.4±0.9%, 21～200IU/ml 9.0±1.8%, 201～2000IU/ml 28.0±2.7%, 2001IU/ml 以上32.8±7.5%と, 201 IU/ml 以上では 200IU/ml 以下に比べて有意に高いヒスタミン遊離を示した ($p<0.01$). しかし 2001IU/ml 以上と 201～2000 IU/ml との間には有意差を認めなかった. 21～200IU/ml で高いヒスタミン遊離を示すものをみると12名中8名が AD, 4名が BA とすべてアレルギー疾患患者であった. IgE-HR(D) は 201～2000IU/ml (61.7±8.2%) では, 21～200IU/ml (20.7±3.2%) および20IU/ml 以下 (12.4±3.8%) に比し有意に高値を示した ($p<0.01$). しかし 2001IU/ml 以上 (51.9±13.2%) では 201～2000IU/ml より高くはなかった.

2. 末梢血好酸球数とヒスタミン遊離について (図－5)

末梢血好酸球数は NS 群 94±24/mm^3 に対し, AD 群 662±130/mm^3, BA 群 762±84/mm^3 と BA, AD 群で高かった (表1). 末梢血好酸球数を 500/mm^3 以下の群と 501/mm^3 以上の群とに分けると, SHR(H) および SHR(D) は好酸球数の多少と一定の関係を認めなかった. IgE-HR(H) は好酸球 500/mm^3 以下 14.3±2.4%, 501/mm^3 以上 26.4±2.9%であり, また IgE-HR(D) は 500/mm^3 以下29.6±3.3%, 501/mm^3 以上45.8±4.3%と 501/mm^3 以上の好酸球増多群で有意に高値を示した (ともに $p<0.01$).

考　　察

重水は5%の低濃度でも抗原刺激を受けた好塩基球よりのヒスタミン遊離を増強するが, 抗原刺激を受けない好塩基球に対しては80%の高濃度においてもヒスタミン遊離を増強しないと, Gillespie らは述べている[10]. また Kazimierczak ら[21]は重水による好塩基球からのヒスタミン遊離は全血中ではおこらないが, 白血球洗浄後にすみやかにヒスタミン遊離が開始することを示している. 今回の実験の結果では, 抗 IgE 抗体などのヒスタミン遊離刺激を加えない状態で AD 群, BA 群, NS 群のそれぞれ29%, 18%, 5%に, 重水によるヒスタミン遊離の増強がみられた. Tung ら[22]も同様の実験をアレルギー性鼻炎患者, 気管支喘息患者および非アトピー性対照者で行ない, それぞれ 32%, 70%, 5%で2%以上のヒスタミン遊離増強を認めたと述べている. このように AD, BA 患者においてみられた SHR の重水による増強は, これらの患者の好塩基球が, 血液中ですでに何らかの原因によりヒスタミンを遊離しやすい状態になっていることを示唆するものである. これらの患者では, AD 群で SHR(H) 2%以上の4名全員に, また重水による SHR の増強2%以上を示した9名中7名に, 一種以上の食物抗原に対する特異 IgE 抗体を証明した. 食物中の蛋白質は健常人においても約10万分の1が非特異的に吸収されると言われている[23]. 体重10kg の子供で換算すると, 牛乳200ml を飲んだ場合に吸収されるβラクトグロブリンは血液中で 5.6ng/ml となり, また鶏卵1個を食べた場合に吸収される卵白中のオバルブミンは 22.8ng/ml にも達する. アレルギー反応, 感染などの存在下ではさらに10倍から100倍も吸収されるといわれ[21][24][25], これは細胞を刺激するに十分な抗原量と思われる. 従って血液中で抗原刺激を受けた好塩基球は試験管内で刺激を受けなくても, 高いヒスタミン遊離を示したり, 重水により遊離増強を認めることが推定される. May ら[26]は食物アレルギー患者38名中20名に25%以上の SHR を認めたと報告している. 吸入性抗原では血液中の抗原量については現在のところ明らかではないが, 吸入性抗原の一つであるダニに対する特異 IgE 抗体が陽性で卵白, 牛乳, 大豆などの食物抗原に対する特異 IgE 抗体が陰性の BA でも, 重水による SHR の上昇を認めるものが多いことより, 血液中ですでに抗原刺激を受けていることも考えられる.

また抗 IgE 抗体で刺激した場合には IgE-HR(H), IgE-HR(D) はともに BA 群＞AD 群＞NS 群の順に高値を示し, IgE-HR(H) は BA 群が NS 群より有意に高く, AD 群も NS 群より高い傾向を示した. また IgE-HR(D) は BA, AD 群が NS 群より有意に高く, 重水による増強も BA 群, AD 群で NS 群より多く認めた. これらの結果より AD, BA 患者ではヒスタミン遊離能が亢進していることが示唆された. しかし AD, BA の一部に, IgE-HR(H) が低値で重水による増強も認めないものがあり, 同一疾患であってもその中に病態の異なる亜群の存在が考えられた.

ところで細胞表面のレセプターに結合する IgE 抗体の数は, 血清総 IgE 値とよく相関すると言われている[2][27][28]. また MacGlashan ら[29]は乳酸処理により好塩基球表面の IgE レセプターと IgE 抗体を解離させた後に, IgE 抗体を含む血清と反応させ, 再度 IgE 抗体をレセプターに結合させてヒスタミン遊離実験を行ない, 細胞あたり150～200分子の抗原が抗体と反応して, 細胞表面の IgE レセプターの0.5～0.7%と結合すればヒスタミン遊離が開始され, 反応がプラトーに達したのちにも, レセプターのわずかに5%以下が占拠されているにすぎなかったと述べている. 一方, 血清総 IgE 値または細胞表面のレセプターに結合する IgE 抗体とヒスタミン遊離との関係については諸家により報告がある. 血清総 IgE 値は抗 IgE 抗体によるヒスタミン遊離や重水によるヒスタミン遊離とは相関しないという報告[8][22][30]が多いが, 20才以下では血清総 IgE 値とヒスタミン遊離との間に正の相関を認めたとの報告[31]もある. 著者の成績では, IgE-HR(H) は血清総 IgE 値が 201IU/ml 以上では 200 IU/ml 以下に比べて高いヒスタミン遊離を示した. しかし 2001 IU/ml 以上では 201～2000IU/ml よりも必ずしも高くはなかった. これらのことより, 細胞表面に一定量の IgE 抗体が存在すれば抗原や抗 IgE 抗体との結合によりヒスタミン遊離がおこり, それ以上では IgE 抗体の多少に比例しないでヒスタミン遊離がおこりうるということが考えられる. また特異 IgE 抗体を示す RAST 値とヒスタミン遊離との関係については, BA 群の多くでダニ特異 IgE 抗体が 17.5PRU/ml 以上であり, RAST 法そのものに定量性がないこと, AD 群ではダニの他に多種食物に陽性のものが多いことより, 検討は難しかった.

好酸球については近年, 塩基性蛋白 (major basic protein,

MBP), ペルオキシダーゼ (eosinophil peroxidase, EPO), 陽イオン蛋白 (eosinophil cationic protein, ECP) などの組織障害性蛋白をその顆粒中に含み，血小板活性化因子 (platelet activating factor, PAF) やロイコトリエン C_4 などの化学伝達物質も産生するなど，アレルギー疾患における役割が重視されてきている．アトピー性皮膚炎や気管支喘息患者では，末梢血中に活性型の軽比重好酸球が増加していることが報告され[32]，また喘息発作に伴い特に遅延型反応で組織への好酸球の集積が証明されている[33]．末梢血中にある好酸球の数は全身に分布する好酸球の１％にも満たないと言われているが[34]，谷崎ら[35]は気管支組織における好酸球浸潤の程度と末梢血好酸球数との間に正の相関があると述べている．今回の検討で AD, BA 群では末梢血好酸球数は NS 群より増加していた．また好酸球が 501/mm^3 以上に増加しているものでは，抗 IgE 抗体の刺激に対して高いヒスタミン遊離を示し，さらに重水により強く遊離増強がみられた．好酸球の組織と末梢血との間の移行形態や，骨髄での好酸球の増殖過程についてはまだ明らかにされてはいない．現在のところ局所の肥満細胞や好塩基球から放出された，好酸球走化性因子 (ECF-A)，ロイコトリエン B_4 などの好酸球遊走因子によって好酸球浸潤が引き起こされ，それが骨髄における好酸球の増殖を促進して末梢血好酸球増加をもたらすと考えられている．従って好酸球の増加は，アレルギー疾患患者の肥満細胞や好塩基球に何らかの抗原刺激が加わり，それらの細胞が活性化された結果と考えられるので，好塩基球からの高いヒスタミン遊離が同時に認められると推定される．ヒスタミン遊離能という概念は，好塩基球の生化学的状態やその受容体の状態などを含めた，好塩基球の反応性を評価するものである．重水はそれ自体によるヒスタミン遊離を認めずに，抗原や抗 IgE 抗体などの刺激を受けた細胞でのみヒスタミン遊離を増強するので，ヒスタミン遊離能をみるうえで都合がよい．BA, AD 患者では抗 IgE 抗体で刺激を受けた好塩基球からのヒスタミン遊離は，重水により増強された．しかし重水は体内において微量に存在する[36]のみで，その濃度でヒスタミン遊離を増強することは考えにくい．アレルギー疾患患者の体内では，好酸球，血小板などアレルギー反応にかかわる細胞より産生される物質が，重水と同様の増強効果をもつヒスタミン遊離因子として，ヒスタミン遊離能の亢進に影響を及ぼしている可能性も考えられる．また今回の実験で AD, BA 群のヒスタミン遊離増強のみられなかったものの中に，特異 IgE 抗体の証明されない，いわゆる非アトピー型の患者の含まれる割合が高かったことは極めて興味深いことである．この点を明らかにすることが重水によるヒスタミン遊離増強のメカニズムのみでなく，気管支喘息やアトピー性皮膚炎の病態を明らかにするためにも重要であると思われる．

結　　論

１．気管支喘息及びアトピー性皮膚炎患者では，末梢血より得られた好塩基球からのヒスタミン遊離が重水により増強された．また好塩基球を抗 IgE 抗体で刺激すると，気管支喘息およびアトピー性皮膚炎患者では高いヒスタミン遊離を示し，さらに重水により遊離が増強された．これらのことは気管支喘息およびアトピー性皮膚炎患者で，好塩基球のヒスタミン遊離能が亢進していることを示唆する．

２．血清総 IgE 値が高い個体から得られた好塩基球は，高いヒスタミン遊離を示した．このことは気管支喘息およびアトピー性皮膚炎患者におけるヒスタミン遊離能の亢進が，IgE 抗体の存在と関連しておこっている可能性を示唆する．

３．末梢血好酸球数は気管支喘息およびアトピー性皮膚炎患者で増加しており，また末梢血好酸球数の増加している個体から得られた好塩基球は，高いヒスタミン遊離を示した．アレルギー疾患患者における末梢血好酸球の増加は，肥満細胞や好塩基球への何らかの抗原刺激により，それらの細胞が活性化された結果と考えられ，末梢血好酸球はヒスタミン遊離能とともにアレルギー疾患の病態を反映する．

謝　　辞

稿を終えるにあたり，御指導と御校閲を賜りました谷口昌教授に深謝致します．また終始直接御指導御鞭撻頂いた前金沢大学小児科学教室講師平谷美智夫先生（現福井県小児療育センター）をはじめ，研究にご協力頂きました小児科学教室アレルギーグループならびに教室員の皆様に感謝致します．最後に本研究のために貴重な検体を提供して頂きました金沢市城北病院清水巍先生に心から御礼申し上げます．

なお，本論文の要旨は第38回日本アレルギー学会（京都，1988），第25回日本小児アレルギー学会（名古屋，1988）において発表した．

文　　献

1） **Ishizaka, K., Ishizaka, T. & Hornbrook, M. M.:** Physicochemical properties of human reaginic antibody. J. Immunol., **97**, 75-85 (1966).

2） **Malveaux, F. J., Conroy, M. C., Adkinson, N. F. & Lichtenstein, L. M.:** IgE receptors on human basophils. J. Clin. Invest., **62**, 176-181 (1978).

3） **鳥居新平，上田雅乃，前島元信，稲垣義彰，金井　朗，平田正士，吉田道子，森啓太郎，佐々木明：** 小児気管支喘息における血清総 IgE 値．臨床免疫，**5**, 401-408 (1973).

4） **根本俊和：** 難治性喘息の臨床像に関する研究．アレルギー，**20**, 523-535 (1971).

5） **Grant, J. A., Duplee, E., Goldman, A. S., Schultz, D. R. & Jackson, A. L.:** Complement-mediated release of histamine from human leukocytes. J. Immunol., **114**, 1101-1106 (1975).

6） **Grant, J. A., Settle, L., Whorton, E. B. & Pupree, E.:** Complement-mediated release of histamine from human basophils. Ⅱ Biochemical characterization of the reaction. J. Immunol., **117**, 450-456 (1976).

7） **Martin, R. R. & White, A.:** The in vitro release of leukocyte histamine by staphylococcal antigens. J. Immunol., **102**, 437-441 (1969).

8） **Lichtenstein, L. M. & Conroy, M. C.:** The "releasability" of mediators from human basophils and granulocytes. In E. Mathov, T. Sindo & P. Naranjo (eds.), Allergy and Clinical Immunology, p109-115, Excerpta Medica, Amsterdam, 1977.

9） **Gillespie, E. & Lichtenstein, L. M.:** Heavy water enhances IgE-mediated histamine release from human leukocytes: Evidence for microtubules involvement. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **140**, 1228-1230 (1972).

10） **Gillespie, E. & Lichtenstein, L. M.:** Histamine release from leukocytes: Studies with deuterium oxide,

colchicine and cytochalasin B. J. Clin. Invest., **51**, 2941-2947 (1972).

11) **Gillespie, E.**: Microtubules, cyclic AMP, calcium and secretion. Ann. New York Acad. Sci., **253**, 771-779 (1975).

12) **Marsland, D., Tilney, L. G. & Hirshfield, M.**: Stabilizing effect of D_2O on the microtubular components and needle-like form of Heliozoan axopods: A pressure of temperature analysis. J. Cell. Physiol., **77**, 187-194 (1971).

13) **Hanifin, J. M. & Rajka, G.**: Diagnostic features of atopic dermatitis. Acta Dermatovenereol., **92 (suppl.)**, 44-47 (1980).

14) **北郷 修**：予防接種とアトピー性皮膚炎．小児科診療，**36**, 546-552 (1973).

15) **吉内光夫，松本 澄，榎本雅夫，岡田多加志，若林厚子，鳥住和民，嶽 良博，田端敏秀**：IgE 測定 kit「SD-8568」の基礎的・臨床的検討．ホルモンと臨床，**32**, 1127-1131 (1984).

16) **吉川弘二**：血清 IgE に関する研究 健康小児正常血清 IgE 値とその年令的変動について．日児誌，**83**, 247-255 (1979).

17) **近藤直実，小崎 武，河村信夫，月田邦彦，近藤富雄**：健康小児・成人の血清 IgE 値と特異 IgE 抗体．小児科，**18**, 481-483 (1977).

18) **Lichtenstein, L. M. & Osler, A. G.**: Studies on the mechanisms of hypersensitivity phenomena. J. Exp. Med., **120**, 507-528 (1964).

19) **Snyder, S. H., Baldessarini, R. J. & Axelrod, D.**: A sensitive and specific enzymatic isotopic assay for tissue histamine. J. Pharmacol. Exp. Ther., **153**, 544-549 (1966).

20) **Shaff, R. E. & Beaven, M. A.**: Increased sensitivity of enzymatic isotopic assay of histamine of plasma and serum. Anal. Biochem., **94**, 425-430 (1979).

21) **Kazimerczak, W., Plaut, M., Knauer, K. A., Meier, H. L. & Lichtenstein, L. M.**: Deuterium-oxide-induced histamine release from basophils of allergic subjects I Responsiveness to deuterium oxide requires an activation step. Am. Rev. Respir. Dis., **129**, 592-596 (1984).

22) **Tung, R. & Lichtenstein, L. M.**: In vitro histamine release from basophils of asthmatic and atopic individuals in D_2O. J. Immunol., **128**, 2067-2072 (1982).

23) **Yuzuriha, T., Katayama, K. & Tutumi, J.**: Studies on biotransformation Lyzozme. Ⅳ. Radioimmunoassay of lysozyme and its evaluation. Chem. Pharm. Bull., **26**, 908-914 (1978).

24) **Pike, M. G., Heddle, R. J., Boulton, P., Turner, M. W. & Atherton, D. J.**: Increased intestinal permeability in atopic eczema. J. Invest. Dermatol., **86**, 101-104 (1986).

25) **Carini, C., Bronstoff, J. & Wraith, D. G.**: IgE complexes in food allergy. Ann. Allergy, **59**, 110-117 (1987).

26) **May, C. D.**: High spontaneous release of histamine in vitro from leukocytes of persons hypersensitive to food. J. Allergy Clin. Immunol., **58**, 3, 432-437 (1976).

27) **蒲生逸夫**：腸管外感染について．日児誌，**64**, 1506-1514 (1960).

28) **Conroy, M. C., Adkinson, N. F. & Lichtenstein, L. M.**: Measurement of IgE-induced histamine release. J. Immunol., **118**, 1317-1321 (1977).

29) **MacGlashan, M. & Lichtenstein, L. M.**: Studies of antigen binding on human basophils. 1. Antigen binding and functional consequences. J. Immunol., **130**, 2330-2336 (1983).

30) **Assem, E. S. K. & Attallah, N. A.**: Increased release of histamine by anti-IgE from leukocytes of asthmatic patients and possible heterogeneity of IgE. Clin. Allergy, **11**, 367-374 (1981).

31) **Marone, G., Poto, S., di Martino, L. & Condrelli, M.**: Human basophil releasability. I Age related changes in basophil releasability. J. Allergy Clin. Immunol., **76**, 377-383 (1986).

32) **Fukuda, T., Dunnette, S. L., Reed, C. E., Ackerman, S. J., Peters, M. S. & Gleich, G. J.**: Increased numbers of hypodense eosinophils in the blood of patients with bronchial asthma. Am. Rev. Respir. Dis., **132**, 981-985 (1985).

33) **湯川龍雄，寺師義典，福田 健，牧野荘平，細野克彦，副島和彦**：モルモット気道アレルギーにおける組織学的検討．Ⅰ同種抗体受身感作モデルにおける単回抗原暴露後の好酸球浸潤と気道形態変化．アレルギー **36**, 227-237 (1987).

34) **富岡玖夫**：気管支喘息の発症と好酸球由来のケミカルメディエーター酸素．アレルギーの臨床，**6**, 290-294 (1986).

35) **谷崎勝朗**：気管支喘息における肺の細胞反応を中心とした組織学的変化について－TBLB による検討－．アレルギー，**32**, 229-236 (1983).

36) **Fusch, C. & Moeller, H.**: Measurement of D_2O concentration at tracer level in small paediatric patients. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., **26**, 715-721 (1988).

Studies on Basophil Releasability of Histamine in Pediatric Allergological conditions I. Increased Histamine Release from Basophils in a Heavy-water-based Buffer in Patients with Bronchial Asthma and Atopic Dermatitis
Satoko Ueda, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920－J. Juzen Med Soc., **101,** 124－131 (1992)

Key words histamine, basophil releasability, heavy water (D_2O), bronchial asthma, atopic dermatitis

Abstract

Spontaneous histamine release (SHR) and anti-IgE induced histamine release (IgE-HR) following incubation of peripheral blood basophils in distilled-water-based buffer (H_2O buffer), or 45% heavy-water-based buffer (D_2O buffer), in 56 patients with bronchial asthma, 31 patients with atopic dermatitis and 19 non-atopic subjects. SHR in H_2O buffer showed no significant increase in all three groups of patients. However SHR in D_2O buffer increased more than 2% in 18% of the patients with asthma and 29% of those with atopic dermatitis, but only in 5% in non-atopic subjects. IgE-HR in H_2O buffer was significantly higher ($p<0.01$) in the patients with asthma ($25.9\pm2.6\%$) than non-atopic subjects ($4.1\pm1.7\%$) but not in patients with atopic dermatitis ($13.2\pm2.3\%$). Furtheremore, IgE-HR in D_2O buffer increased significantly more in asthmatics ($47.2\pm3.6\%$, $p<0.01$) and atopic dermatitis patients (30.6 ± 4.4, $p<0.05$) than in the non-atopic subjects ($11.0\pm3.3\%$). More than a 15% increase of IgE-HR in D_2O buffer was observed in 16% of asthmatics and 52% of atopic dermatitis patients. The increase in IgE-HR in D_2O buffer was more significant in the patients who showed high serum IgE level (>200IU/ml) or blood eosinophilia (>500/mm^3). In addition, most of the atopic dermatitis patients whose basophil histamine release was not enhanced by D_2O, belong to non-atopic subgroup of atopic dermatitis without any specific IgE antibody. These results indicate that basophil releasability increased in atopic subjects, and this phenomenon may be related to IgE mediated allergic reaction.