

Dermatophagoides farinaeに対するリンパ球のin Vitroにおける反応：
特異IgE抗体価との相関および減感作療法による影響
について

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/2297/8851

Dermatophagoides farinae に対するリンパ球の in vitro における反応

—特異 IgE 抗体価との相関および減感作療法による影響について—

金沢大学医学部小児科学教室 (主任: 谷口昂教授)

平 谷 美 智 夫

(昭和55年7月26日受付)

ヒトのアトピー性疾患, 特に通年性のアトピー型気管支喘息の重要な原因抗原は house dust (以下 HD と略) であり, その主要な成分は, *Dermatophagoides species* に属する *Dematophagoides pteronyssinus* (以下 *D. pteronyssinus* と略) および *Dermatophagoides farinae* (以下 *D. farinae* と略) であると言われている¹⁾⁻³⁾. 事実アトピー患者の多くが HD や *D. farinae* に対し皮膚反応や, radioallergosorbent test (以下 RAST と略) が陽性であり¹⁾⁻³⁾, 患者の末梢血の好塩基球は in vitro で抗原添加によりヒスタミンを遊離することが知られ⁴⁾⁻⁶⁾, これらの患者は抗原特異 IgE 抗体を保有し, 抗原暴露によりいわゆる I 型アレルギー反応をひきおこすと考えられている.

このようにアトピー疾患は, I 型アレルギーの代表的な疾患と考えられているが, 一方患者のリンパ球を抗原添加で培養すると, 増殖性反応 (以下 lymphocyte proliferative response)^{7)-9), 11), 12)} および lymphokine^{10), 13), 14)} の産生が見られることが知られている. ところが HD や mite は ragweed などの花粉とならび臨床アレルギー学上重要な吸入性抗原でありながら, 抗原の精製が困難であることも関係して, アトピー疾患の液性抗体や細胞性免疫反応などの臨床免疫学的研究はもっぱら ragweed においてなされてきた.

われわれのアレルギー外来を受診するのはおもにアトピー型の気管支喘息児であり, 彼らの圧倒的多数は, HD および *D. farinae* の皮膚反応が陽性であり, RAST score も強陽性を示すことが多く, 種々の対症療法と平行して, *D. farinae* を含む HD エキスによ

り減感作療法を受けている者が多い.

このようにわれわれの外来では花粉症よりもダニアレルギーの患者を扱うことが多いが, ダニ抗原添加に対するリンパ球の反応についての研究は少ない. われわれは今回 mite sensitive patients (以下 atopy と略) および非アトピー者 (以下 non-atopy と略) の *D. farinae* に対する lymphocyte proliferative response および血清特異 IgE 抗体を測定し, さらに減感作療法による影響について検討を加え, その結果をおもに ragweed allergy のそれと比較しながら検討を加えてみた.

対象と方法

1) 対象

1979年1月から5月に金沢大学医学部付属病院小児科外来を受診した小児および若干の成人を atopy 群と non-atopy 群に分け, さらに atopy 群は減感作療法の実施の有無と期間により4群に分類した. すなわち atopy 群を A, B, C, D の4群に, non-atopy 群を E 群とした. (表1). A 群は未治療群, B, C, D 各群の減感作療法の期間はそれぞれ6カ月未満, 12カ月から24カ月, 24カ月以上である.

使用抗原はすべて鳥居薬品の HD 治療用エキスで, 各群の抗原の総投与量は, B 群: 0.004 mg - 2.72 mg (平均 1.22 mg), C 群: 1.21 mg - 11.33 mg (平均 8.16 mg), D 群: 7.90 mg - 21.68 mg (平均 14.4 mg) であった. 各群の年齢構成は, 表1に示したように, ほぼ同じである.

In vitro lymphocyte response to mite (*Dermatophagoides farinae*) extracts. A correlation with Radioallergosorbent test and effect of immunotherapy. Michio Hiratani, Department of Pediatrics, (Director: Prof. N. Taniguchi) School of Medicine, Kanazawa University.

Table 1. Grouping of the tested populations.

Subjects	No.	Duration of immunotherapy	Age (years)
Atopics A	25 (16)*	untreated	12.2 (2-32)
B	9 (9)	less than 12 months	9.6 (5-20)
C	11 (7)	12-24 months	8.7 (4-13)
D	19 (10)	more than 24 months	9.5 (7-32)
(Total)	64 (42)		10.7 (2-32)
Controls E	46 (20)		9.0 (0.3-32)

*Subject numbers tested for lymphocyte proliferative response.

なお atopy 群とは気管支喘息あるいは鼻アレルギーを有し、HD あるいは *D. farinae* の皮膚反応が陽性である者とし、non-atopy 群とは本人および2親等以内にアレルギー歴のない者を選んだ。また気管支拡張剤については、採血前24時間以内、副腎皮質ホルモン剤については48時間以内に投与されている者、さらに喘息発作や発熱のある者は含まれていない。

2) 皮膚反応および減感作療法

皮膚反応は鳥居薬品社製のスクラッチエキスをを用い、プリック法で行った。減感作は皮内テストの閾値よりさらに10倍希釈したHD抗原液より開始し、維持量は原則として1000倍液0.3mlとした。

3) 血清 total IgE 値の測定

Pharmacia 社製の paper radio immunosorbent test (PRIST) KIT を使用した。

4) 血清特異 IgE 抗体価の測定

RAST 法で行なった。paper disc は東洋濾紙No.6 を使用、抗原との coupling は Ceska ら¹⁵⁾の方法によった。RAST 値は allergen disc に吸着した放射活性の全放射活性に対する%で表した。対照として Pharmacia 社の対照血清 A, B, C, D を使用し、抗 IgE-¹²⁵I は Pharmacia 社製のものを使用した。

5) リンパ球の培養法

予備実験として、細胞数、添加する血清濃度、抗原濃度および培養日数について至適条件の検討を行なった結果次の実験条件で行なった。

ヘパリン加末梢血を燐酸緩衝生食水にて2倍希釈後 Lymphorep 比重遠心法にて分離し、RPMI-1640 培養液 (Gibco, New York) にて 2×10^6 / ml に調整した mononuclear cell を得た。 2×10^5 の cell を 56℃ 30分間不活化した pooled human serum を 10% 加えた RPMI - 1640 培養液 0.2 ml に浮遊させ、*D. farinae* を添加し、microplate 法にて triplicate で

37℃、5% CO₂ 濃度で5日間培養した。培養終了24時間前に tritiated thymidine (New England Nuclear 以下³H-TdR と略) を 0.2μCi 添加し、cell harvester で harvest した後、液体シンチレーションカウンターで DNA 合成を測定し、抗原非添加 (base) に対する割合、stimulation index (以下 S.I と略) で表わした。添加する *D. farinae* の最終濃度は、28, 280, 560 protein nitrogen unit/ml (以下 PNU/ml と略) とした。

なお RAST 法およびリンパ球培養に使用したダニ抗原はすべて鳥居薬品提供の *D. farinae* の凍結乾燥末である。

成 績

1) total IgE 値 (図1)

non-atopy 群の算術平均 120.3U/ml に対し、atopy 群は全体で 2126.7U/ml と高値を示すが、治療群と未治療群のあいだに有意差は見られない。

2) 抗ダニ特異 IgE 抗体価 (図2)

non-atopy 群の算術平均 2.3% に対し、atopy 群は全体で 27.5% と高値を示すが、治療群と未治療群のあいだに有意差は見られない。なお図の RAST score は Pharmacia 社の対照血清によるものであり、score 1 は 2.7%、score 2 は 3.8%、score 3 は 10.5%、score 4 は 40.5% 以上であった。

3) total IgE 値と抗ダニ特異 IgE 抗体価との関係 (図3)

両者ともに減感作療法により特に一定の傾向は見られなかったため、atopy 群は治療群と未治療群とを区別せず non-atopy 群とともに示した。atopy 群では total IgE 値が高くなるほど特異 IgE 抗体が高くなる傾向がみられるが、non-atopy 群では total IgE 値が比較的高い者でも、特異 IgE 抗体は常に低値をとって

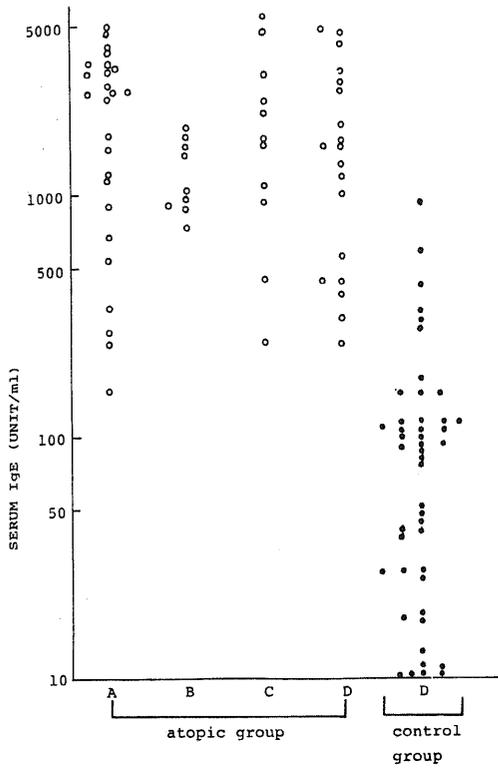


Fig 1. Serum IgE levels in atopic patients (group A. B. C. D) and non-atopic subjects (group E).

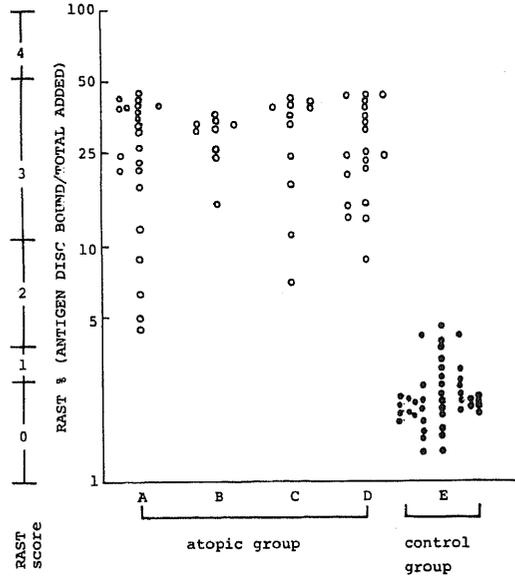


Fig 2. RAST values to *D. farinae* in atopic patients (group A. B. C. D) and non-atopic subjects (group E).

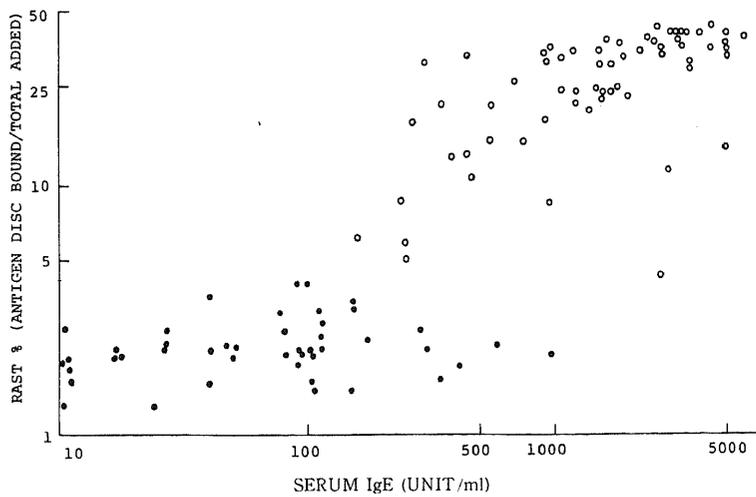


Fig 3. Comparison of IgE levels and RAST values to *D. farinae* in atopic and non-atopic subjects. Open circles indicate atopic patients and solid circles non-atopic subjects.

いた。特徴的なことは、total IgE 値では両群のあいだにある程度の重なりが見られるのに、特異 IgE 抗体に関しては重なりは全く見られない点にある。

4) *D. farinae* 添加に対するリンパ球の反応性細胞数の検討 (表 2)

0.5×10^5 , 1.0×10^5 , 2.0×10^5 , 4.0×10^5 の各細胞数について、*D. farinae* 0, 28, 280 PNU/ml の各濃度の場合の cpm と S.I を示した。 4×10^5 が cpm, S.I とも最適の濃度であったが、 2×10^5 でも S.I において 4×10^5 の場合に近い値が得られたので、小児からの採血量を考慮して細胞数は 1 well あたり、

2×10^5 とした。

添加血清濃度の検討 (表 3)

5%, 10%, 20% の各血清濃度について *D. farinae* 0, 28 PNU/ml の濃度の場合の cpm, S.I を示した。S.I では 20% で最も高い値を示したが cpm では 10% の場合の方が高く、S.I もかなり高値であったので、以後の実験では 10% の血清濃度で行なった。

培養日数の検討 (表 4)

3 人のアトピー患者で *D. farinae* 非添加および 280 PNU/ml における 3, 4, 5, 6, 7 日間の培養日数での cpm と S.I を示した。5 日間ないし 6 日間培養で

Table 2. Relationship between proliferation and cell number in *D. farinae*-stimulated lymphocyte culture.

<i>D. farinae</i> (PNU/ml)	Cell number							
	0.5×10^5		1.0×10^5		2.0×10^5		4.0×10^5	
	CPM	S.I	CPM	S.I	CPM	S.I	CPM	S.I
Base	75 ± 7		108 ± 6		147 ± 7		262 ± 14	
28	136 ± 12	1.9 ± 1.0	418 ± 21	3.6 ± 1.6	2771 ± 56	14.6 ± 3.8	7198 ± 95	17.4 ± 4.3
280	268 ± 18	3.7 ± 1.9	1393 ± 41	12.5 ± 4.0	4872 ± 74	25.7 ± 5.0	11097 ± 111	30.7 ± 4.8

Mean cpm and stimulation index of five atopic patients are presented.

$$\text{*Stimulation index} = \frac{\text{CPM Antigen-stimulated}}{\text{CPM Non-stimulated}}$$

**Each results expressed as Mean ± 1 standard error of the mean.

Table 3. Effect of serum concentration on cellular proliferation in *D. farinae*-stimulated lymphocyte culture.

<i>D. farinae</i> (PNU/ml)	Serum concentrations					
	5%		10%		20%	
	CPM	S.I	CPM	S.I	CPM	S.I
Base	153 ± 9		207 ± 9		136 ± 10	
28	818 ± 35	4.4 ± 2.2	963 ± 33	4.3 ± 2.0	838 ± 27	6.0 ± 1.3
280	1786 ± 43	9.5 ± 2.4	2397 ± 42	10.5 ± 2.2	1773 ± 37	12.9 ± 2.2

Mean cpm and stimulation index of five atopic patients are presented.

$$\text{*Stimulation index} = \frac{\text{CPM Antigen-stimulated}}{\text{CPM Non-stimulated}}$$

**Each results expressed as Mean ± 1 standard error of the mean.

cpm, S.Iとも最高値を示しており、以後5日間培養で行なった。

抗原濃度の検討 (図4)

*D. farinae*濃度を0.28, 2.8, 28, 280, 560, 1400 PNU/mlとしてdose response curveを描いてみた。560 PNU/ml付近がpeakと考えられ1400 PNU/ml付近ではむしろ低下する傾向が見られたので、以後の実験では*D. farinae*の最終濃度を28, 280, 560 PNU/mlとした。

表5には*D. farinae*非添加時と各濃度における³H-TdRのuptakeとS.Iおよびpeakの値について、各グループの平均値を、さらに図5には各個人(62名)のpeakのS.Iを示した。結果は、(1)抗原非添加(base)のcpmに各グループ間の有意差は見られなかった。(2)抗原の濃度が上昇するにつれてcpm, S.Iも上昇していく傾向が見られた。(3)未治療のatopy群(A)のcpm, S.Iはnon-atopy群(E)より有意に高値を示した。(4)短期間の減感作療法群(B)

Table 4. Time course studies of *D. farinae*-stimulated lymphocyte culture.

	Days of cultures				
	3	4	5	6	7
Exp 1. (S.I) (CPM)	9.2 (414)	16.0 (674)	26.3 (949)	25.6 (1041)	23.6 (709)
Exp 2. (S.I) (CPM)	3.5 (223)	7.3 (297)	22.3 (263)	16.5 (510)	14.2 (305)
Exp 3. (S.I) (CPM)	3.3 (814)	2.3 (1340)	10.6 (1450)	9.9 (2500)	7.8 (1220)

Stimulation index at 280 PNU/ml of *D. farinae* concentration of indicated days of three atopic patients are presented. Cpm in unstimulated culture are shown in parenthesis.

*Stimulation index = CPM Antigen stimulated / CPM Non-stimulated.

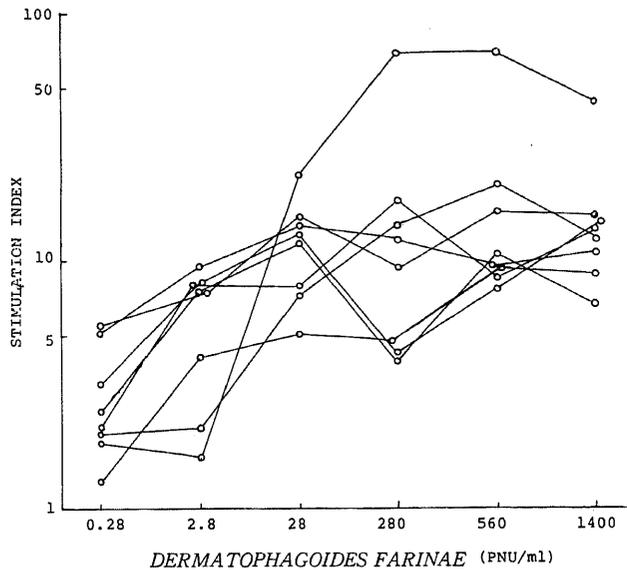


Fig 4. Dose response curve of lymphocyte proliferative response to *D. farinae* of 8 subjects.

Table 5. Summary of lymphocyte stimulation data.

		No.	<i>Dermatophagoides farinae</i> (PNU/ml)								
			Base		28		280		560		Peak
Subjects		CPM	CPM	S.I	CPM	S.I	CPM	S.I	CPM	S.I	
Atopics	A	(16)	326 ±41	2913 ±827	8.7 ±2.2	4503 ±1108	15.3 ±5.0	4772 ±1232	14.5 ±3.5	5365 ±1274	17.5 ±5.1
	B	(9)	475 ±148	3362 ±921	9.5 ±2.1	4957 ±1526	11.6 ±3.5	5641 ±1929	15.4 ±4.9	6527 ±1779	16.8 ±4.6
	C	(7)	500 ±144	2292 ±1157	3.6 ±1.2	2918 ±1292	4.5 ±1.2	3489 ±1524	5.7 ±1.4	3501 ±1519	5.8 ±1.4
	D	(10)	487 ±86	1378 ±303	3.4 ±1.0	1654 ±268	4.2 ±0.9	1771 ±447	4.6 ±1.5	2044 ±403	5.2 ±1.5
Controls	E	(20)	447 ±149	539 ±123	1.6 ±0.2	768 ±213	1.9 ±0.2	891 ±261	3.2 ±0.4	992 ±259	2.6 ±0.4

Response of atopic and non-atopic lymphocyte *in vitro* to *D. farinae* as measured by ^3H -TdR incorporation. Mean cpm and stimulation index at three *D. farinae* concentrations and peak response of each individuals are presented. In all concentrations of *D. farinae*, the significance of the difference in S.I between A and E ($p < 0.01$) and between A and C+D ($p < 0.05$) was evaluated by student's *t* test.

*Stimulation index = CPM Antigen-stimulated / CPM Non-stimulated

** Each results expressed as Mean \pm 1 Standard error of the mean

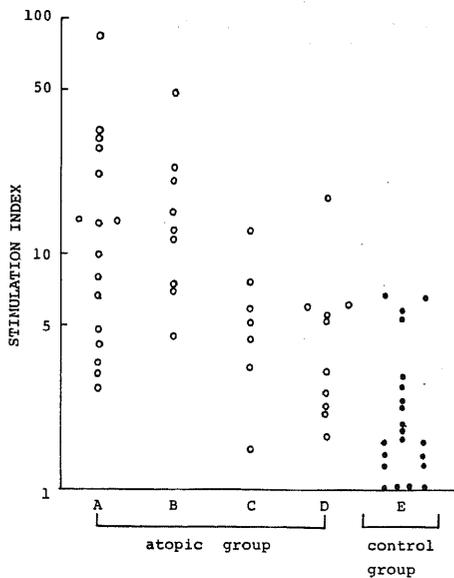


Fig 5. Lymphocyte proliferative response of each groups. Highest stimulation index of each individuals are presented. The significance of the difference between the group A (untreated patients) and group E (non-atopic subjects) ($p < 0.01$), and between group A and group C+D (long term hyposensitized patients) ($p < 0.05$) was evaluated by student's *t* test.

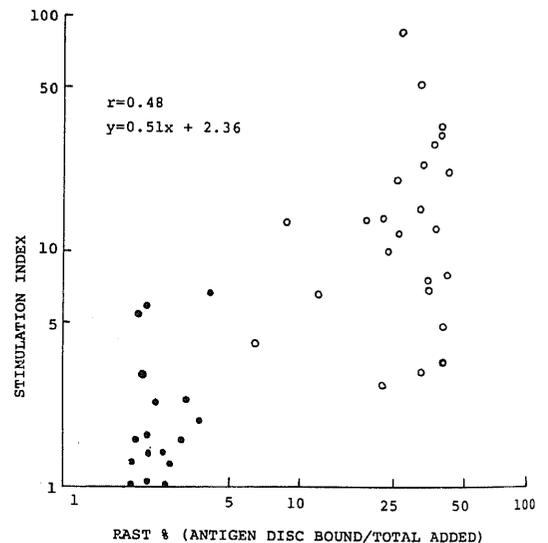


Fig 6. Correlation between lymphocyte proliferative response to *D. farinae* and RAST values in 42 subjects. Open circles indicate atopic patients and solid circles non-atopic subjects.

は未治療群(A)と差は認めないが、長期間の治療群(C + D)は低値をとる傾向が見られた。A群とC群、あるいはA群とD群のあいだでは560 PNU/mlのS.I.にのみ有意差($P < 0.05$)が見られただけであるが、A群とC + D群のあいだでは、すべての濃度のS.I.に有意差($P < 0.05$)が見られた。

5) *D. farinae* に対するリンパ球の反応性と特異 IgE 抗体価との相関。(図6)

長期間の減感作療法群にS.I.が低値をとる傾向が見られたので、未治療群および治療開始6カ月未満のatopy群(25例)とnon-atopy群(17例)についてpeakのS.I.とRAST値の相関をみた。相関係数(r) = 0.48 ($P < 0.01$), $Y = 0.51x + 2.36$ と正の相関が見られた。

考 察

今回のわれわれの結果は、mite sensitive patientsのリンパ球の*D. farinae*に対するproliferative responseがnon-atopy群にくらべ有意に高いことを示した。同じような結果はHD¹²⁾、ragweedなどの花粉症でみられ⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾さらに花粉症ではmigration inhibitory factor (MIF), mitogenic factor (MF), leucocyte migration inhibitory factorなどのlymphokineの産生がみられることも報告されている¹⁰⁾¹³⁾¹⁴⁾。

しかし、われわれの結果も含めほとんどの報告においてnon-atopyにもある程度の反応は見られており、ときにはatopyとnon-atopyのあいだに全く差は認めないという報告も見られる。S. Romagnaniらは¹¹⁾、HDおよびmite (*D. pteronyssinus*)に対するlymphocyte proliferative responseはnon-atopy群にもatopy群にも同じ程度にみられたと報告した。一方Ownbyら¹⁷⁾、Buckleyら¹⁸⁾は培養期間を長くすると(8日間以上)non-atopy, newborn, agammaglobulinemiaの患者にも、atopyと同じ程度のlymphocyte proliferative responseがみられたことを観察し、(1)ragweedあるいはそれと交叉活性をもつpollenはuniversalなantigenであり細胞性免疫能の正常人なら誰でも反応するのではないか(2)ragweedあるいはragweed antigen Eにはantigenic propertiesの他に未確認のmitogenic propertiesが含まれるのではないか、という可能性を推定している。

またMathewsら¹⁹⁾もheparin-dextranで分離した白血球を用いて、ある条件下では正常人や臍帯血中のリンパ球はshort ragweed extractやmixed grass

pollen extractに反応して、atopyと同程度のproliferative responseがみられることを観察した。その条件として、(1)細胞の洗浄に血清を含む培養液を使用すること、(2)培養液に血清でなく血漿を使用すること、ただしFicollで分離されたmononuclear cellを使用する場合は血清でもよい、(3)培養日数を長くすることなどを挙げ、このようにいろいろと条件が要求されるのは、花粉抗原は、phytohemagglutinin (PHA)などのmitogenとくらべて細胞膜との結合力が弱いからであろうと推論している。また非アトピー者でも反応があるのは、Buckleyらと同様、ragweedなどの花粉がuniversalなantigenであるか、あるいはmitogenic stimulantを含むという可能性のほか、heparinやFicollが操作の過程で特異的なreceptorを持たないリンパ球の細胞膜を変化させ反応をおこしやすくするのではないかと述べている。

今回われわれが使用した*D. farinae*はきわめてcrudeなextractであり、antigenic factor以外に多様な物質を含んでいるが、atopy群はnon-atopy群にくらべ有意に高いlymphocyte proliferative responseを有することを明らかにした。

予報ではあるが*D. farinae*にmitogenic factorの含まれる可能性を検討するため5例の臍帯血について、今回の実験と同じ条件で*D. farinae*に対するlymphocyte proliferative responseを検討してみた。結果は*D. farinae*非添加のcpm (mean \pm SD)に対して、*D. farinae* 28, 280, 560 PNU/mlの場合のS.I.がそれぞれ1.3 \pm 0.3, 1.7 \pm 0.7, 1.4 \pm 0.5と有意なリンパ球の反応は見られなかった。

*D. farinae*にmitogenic stimulantが含まれる可能性は否定できないが、その差はやはりantigenic stimulantによるものであると考えられる。このことは、mite sensitive patientsは外因性アレルゲンである*D. farinae*に反応するリンパ球を保有していることを意味し、ragweedなどの花粉症における報告、すなわち、antigen添加に対してリンパ球は*in vitro*でproliferative responseの他にlymphokineの産生を行なうこと¹⁰⁾¹³⁾¹⁴⁾さらにproliferative responseを行う細胞のsubpopulationはthymus derived lymphocyte (以下T cellと略)であり、bone marrow derived lymphocyte (以下B cellと略)は単独では反応せず、T cell由来のsoluble factorとantigenの共存下で抗体産生はみられるがproliferative responseはごく軽度であったというGehaら²⁰⁾の報告を考慮すると、この反応にかかわる

細胞はおそらく T cell であり, mite sensitive patients は, *D. farinae* に対する即時型のアレルギー反応のほかに細胞性免疫反応を有していると考えられる。

mite に対する lymphocyte proliferative response に関するリンパ球の subpopulation についての報告はいまだ見られないが, ragweed の場合と同様, おそらく T cell であろうが, 同時に T cell と B cell の協同作業による *in vitro* における抗体産生も同時に生じていると考えられる。

mite は ragweed 以上に universal な antigen であり, 我が国ではどこの家の室内塵にも mite が検出され, 非アトピー者もかなりの量の抗原に暴露されると考えられる。HD 中の mite には季節変動がみられ^{20,21}, わが国では夏から秋に増殖し冬から春に減少する傾向がみられる。吸入性抗原となり得るダニ抗原の量は少し遅れてずれると考えられ, total IgE 値や特異 IgE 抗体価はほぼそれに平行しているといわれている²²。

なお加齢によるダニ抗原感作の変化を検討する目的で, 10才未満と10才以上の群について peak の S.I を比較してみた。non-atopy 群の10才未満の者の S.I の mean \pm SD は 2.5 ± 2.0 ($n = 6$), 10才以上で 2.3 ± 1.7 ($n = 11$), atopy 群 (未治療群および減感作初期の A, B 群) では, 10才未満の SI は 14.9 ± 11.9 ($n = 15$), 10才以上で 20.7 ± 24.8 ($n = 10$) であった。このことから4~5才以上の年齢構成の場合には大きな違いはないものと考えられ, またわれわれの5つのグループのあいだの年齢構成に違いはなく, グループ間の比較に特に問題はないと考えられる。

Chapman ら²³は, antigen binding assay 法によりブリックテスト陽性者の94%に *D. pteronyssinus* に対する IgG, IgA, IgE 抗体を検出した。一方ブリックテスト陰性者では IgE, IgA 抗体は検出されず, IgG 抗体のみが atopy にくらべ低濃度ではあるが, 30%に検出されたと報告した。その結果より, アトピー者は単に特異 IgE 抗体をつくるだけでなく, 幅広くダニに感作されるのだらうと述べている。

一方 Levine ら²⁴は純系マウスの *in vitro* における IgG₁, IgE 抗体産生は大量の抗原刺激では全ての系統のマウスに見られたが, 少量の抗原刺激では系統差が見られたこと, さらにその系統差は抗原特異的で H-2 genotype に関連しており, ヒトの ragweed allergy にも同じような genotype が存在することを報告した。

Chapman や Levine などの結果を考慮すると, mite や ragweed の感作は atopy と non-atopy でかならずしも all or nothing ではなく, 抗原量が十分であれば non-atopy も感作され得ること, しかし non-atopy では IgE 抗体産生につながりにくいことが推測される。われわれが採血した時期はダニ抗原量のもっとも少ない時期で non-atopy では特に感作されにくい時期であったと考えられる。また秋には non-atopy もかなり強いダニ抗原の感作を受けると考えられ, S. I が冬に低かった人で秋に上昇していることが観察され, アレルギー疾患を扱う場合季節を考慮することが重要であると考えられる。Fig 6 で, non-atopy に S. I は比較的高いのに RAST 値の低い者がいること, Fig 3 で total IgE 値では, non-atopy にも比較的高い値をとる者がいるのに, RAST 値では全例低値をとっていることが示されている。以上の事実より non-atopy は mite sensitive patients にくらべて (1) IgE を産生しにくい, (2) ダニに感作されにくい, (3) ダニに感作されても特異 IgE 抗体産生はきわめて低いということが考えられる。

ダニアレルギーに関して, lymphocyte proliferative response と特異 IgE 抗体価の関係をみた報告はまだみられない。Rocklin ら¹⁴は, 未治療の ragweed allergy の患者に相関はなかったこと, Nagaya ら¹⁰も atopy と non-atopy 81名で相関はみられなかったことを報告した。しかしわれわれの結果は明らかに両者のあいだに正の相関を認め lymphocyte proliferative response と抗体産生のあいだに何らかの関係があるように思われる。Geha らは²⁵, ragweed allergy の患者の T cell は ragweed 添加で DNA 合成を行い, その上清を抗原存在下で患者の B cell とともに培養すると, ragweed に対する IgE, IgG 抗体の産生が見られること, この際 B cell の DNA 合成は軽度であること, また B cell 単独では DNA 合成も抗体産生もみられないことを報告した。

IgE 抗体産生にも T cell と B cell の協同作用が必須であることは, Tada ら²⁶, Kishimoto, Ishizaka ら²⁷により明らかにされている。hapten-carrier 系に DNP-ascaris, DNP-ragweed を使用して, ウサギの腸管膜リンパ節細胞を用いて *in vitro* ではじめて IgE 抗体産生に成功した Kishimoto ら²⁸の実験から, ragweed は carrier として T helper cell を誘導することが明らかにされた。したがって, ragweed sensitive patients のリンパ球は, ragweed 添加により *in vitro* でいわゆる細胞性免疫反応と同時に IgE 抗体産生も行うと考えられる。細胞性免疫反応と抗体

産生の関係は不明であるが、今回 mite sensitive patients においては ragweed の場合と異なり、両者のあいだに正の相関がみられたことは興味深い。同じ吸入性抗原であっても次に述べるように減感作療法による特異 IgE 抗体価に及ぼす影響も異なり、*D. farinae* と ragweed の抗原性に何らかの相違があることが予想される。

減感作療法の特異 IgE 抗体価や特異 IgG 抗体価、さらにリンパ球の反応に与える影響については、HD および mite の場合と花粉症とは異なった結果が報告されている。特異 IgE 抗体について、花粉症では減感作療法開始初期に上昇し、以後減少すること。花粉の飛散の季節に入ると未治療者では上昇するが、治療している者では上昇しないことが RAST で確認されている^{29)-32),34)}。一方 HD による減感作療法では、*D. farinae* に対する IgE 抗体は変化しないといわれている³³⁾。特異 IgG 抗体について、花粉症では減感作療法で上昇することが報告され^{32),34)}、Evans らは³⁴⁾ IgG 抗体の上昇とリンパ球の反応のあいだに相関がみられたことを報告した。一方ダニによる減感作療法で D' Souza らは⁶⁾、上昇する例が多かったことを報告している。

今回のわれわれの結果では、total IgE 値、特異 IgE 抗体価ともに変化なく、その理由として伊藤³³⁾も述べているように HD 中の *D. farinae* の含有量が少ないことが考えられ、特にわれわれは維持量を 1000 倍液 0.3 ml とかなり低濃度としたことも考慮しなくてはならない。特異 IgG 抗体について、今回測定しなかったが、この程度の抗原量では上昇しないか、あってもごく軽度ではないかと予想される。

lymphocyte response に対する減感作療法の影響についても ragweed allergy において詳しく研究されており、non-atopy でも lymphocyte proliferative response ありとする Buckley ら⁸⁾は治療群でも未治療群と同じ程度の反応が見られることを観察している。しかし Nagaya らは¹⁰⁾治療後有意に低下したことを、また Evans ら³⁴⁾も治療後 DNA 合成に加え lymphokine の産生も有意に低下したことを報告した。そしてその機序として IgE 抗体産生や lymphocyte proliferative response, lymphokine 産生などのリンパ球の機能を抑制する suppressor T cell の誘導、あるいは抗原量が増加するにつれ免疫学的寛容が導入されるのではないかと、いう 2 つの可能性を推定している。さらに Geha²⁵⁾, Gafien³⁵⁾により減感作療法により抗原との反応性が低下するのは T cell であり、そしてそれは抗原特異的である

ことが報告されている。一方 HD allergy で Yoo ら¹²⁾は治療群の S.I は未治療群にくらべて有意に低いことを観察しており、今回のわれわれの結果とよく一致する。

以上のように ragweed などの花粉症では減感作療法は総体としてリンパ球の反応性に変化を加え、結果として細胞性免疫反応を低下させ、一方抗体産生に関しては IgE 抗体を減少させ、IgG 抗体については上昇させる方向に、それぞれ helper および suppressor T cell の機能を変化させると考えられる。

しかしダニアレルギーにおいては、減感作療法は、抗原量が十分であればおそらく、リンパ球の反応性の低下と IgE 抗体の上昇、および IgG 抗体の上昇という結果が予想され、IgE 抗体に関しては ragweed の場合と全く異なった影響がみられている。

この違いは、ダニ抗原と花粉抗原の質的な違いなのかも知れないが、ragweed の抗原は比較的純化されているのに対し、ダニ抗原はきわめて crude な extract を使用せざるを得ないところが大きい問題であろう。

このようにアトピー疾患の代表的な吸入性抗原である ragweed と mite はかなり異なった性質をもち、減感作療法に対する反応も異なっているが、ダニアレルギーの研究は ragweed の場合にくらべかなり遅れているのが現状である。今回われわれが使用したダニ抗原は crude な抗原であり、今後より精製した抗原によるダニアレルギーの研究が必要であると考えられる。

なお total IgE 値、特異 IgE 抗体価、リンパ球の反応性のいずれも気管支喘息の重症度との相関は見られなかった。

結 論

mite sensitive patients (atopy 群) と non-atopy 群について、*D. farinae* に対するリンパ球の反応性および血清特異 IgE 抗体価、total IgE 値を測定し、さらに減感作療法による影響についても検討を加え、次の結果を得た。

- 1) 特異 IgE 抗体価および total IgE 値は atopy 群で non-atopy 群にくらべて有意に高値であったが、その違いは特異 IgE 抗体価においてより著明であった。
- 2) 未治療の atopy 群 (16 人) の S.I は、non-atopy 群 (20 人) にくらべて有意 ($p < 0.01$) に高値を示した。
- 3) atopy, non-atopy を含む 42 人において S.I と RAST 値は正の相関を示した。 ($r = 0.48$, $p <$

0.01)

4) 長期間減感作療法を受けた者(17名)は未治療の者(16名)にくらべ、リンパ球の反応は有意に低値であったが、total IgE値、特異IgE抗体価においては両群間に差はみられなかった。

以上より、ダニアレルギー患者はダニ抗原に対するIgE抗体産生のみならずリンパ球の反応性も亢進していることが示唆され、一方non-atopy群はダニ抗原に対するリンパ球の反応が弱く、IgE抗体産生も弱いと考えられる。また減感作療法はダニアレルギーに関してはリンパ球の反応性と血清特異IgE抗体価に対して異なった影響を与えると考えられる。

稿を終えるに臨み、御指導と御高聞を賜りました谷口昂教授に深謝いたします。また多大な御協力をいただきました小児科アレルギー研究グループの諸先生に感謝いたします。

本論文の要旨は、第29回日本アレルギー学会総会において発表した。

文 献

- 1) Miyamoto, T., Oshima, S., Ishizaki, T. and Sato, S. : Allergenic identity between the common floor mite (*Dermaphagoides farinae* Hughes, 1961) and house dust as a causative antigen in bronchial asthma. *J. Allergy*. **42**, 14-28 (1968).
- 2) Maunsell, K., Wraith, D. G. and Cunninton, A. M. : Mites and house-dust allergy in bronchial asthma. *Lancet* **i**, 1267-1270 (1968).
- 3) Miyamoto, T., Oshima, S., Mizuno, K., Sasa, M. and Ishizaki, T. : Cross antigenicity among six species of dust mites and house dust antigens. *J. Allergy*. **44**, 228-238 (1969).
- 4) Assem, E. S. K. and McAllen, M. K. : Serum reagins and leucocyte response in patients with house-dust mite allergy. *Brit. Med. J.* **ii**, 504-507 (1970).
- 5) Assem, E. S. K. and McAllen, M. K. : Changes in challenge tests following hyposensitization with mite extract. *Clin. Allergy*, **3**, 161-175 (1973).
- 6) D'Souza, M. F., Pepys, J., Wells, I. D., Tai, E., Palmer, F., Overwell, B. G., MaGrath, I. T. and Megson, M. : Hyposensitization with *Dermatophagoides pteronyssinus* in house dust allergy : A controlled study of clinical and immunological effects. *Clin. Allergy*. **3**, 177-193 (1973).
- 7) Zeitz, S. J., VanArsdel, P. P., Jr and McClure D. K. : Specific response of human lymphocytes to pollen antigen in tissue culture. *J. Allergy*. **38**, 321-329 (1966).
- 8) Girard, J. P., Rose, N. R., Kunz, M. L., Kobayashi, S. and Arbesman, C. E. : *In vitro* lymphocyte transformation in atopic patients : induced by antigens. *J. Allerg.* **39**, 65-81 (1967).
- 9) Richter, M. and Naspitz C. K. : The *in vitro* blastogenic response of lymphocytes of ragweed-sensitive individuals. *J. Allergy*, **41**, 140-151 (1968).
- 10) Brostoff, J. and Roitt, I. M. : Cell-mediated (delayed) hypersensitivity in patients with summer hay-fever. *Lancet*, **2**, 1269-1271 (1969).
- 11) Nagaya, H., Lee, S. K., Reddy, P. M., Pascual, H., Jerome, D., Sadai, J., Gupta, S. and Lauridsen, A. J. : Lymphocyte response to grass pollen antigens : A correlation with radioallergosorbent test and effect of immunotherapy. *Ann. Allergy*, **39**, 246-252 (1977).
- 12) Yoo, T. J., Kuo C. Y. and Heath, C. : A study of dust-induced lymphocyte blastogenesis. *Acta. Allergologica*. **32**, 227-235 (1977).
- 13) Maini, R. N., Dumonde, D. C., Faux, J. A., Hargreave, E. F. and Pepys, J. : The production of lymphocyte mitogenic factor and migration-inhibition factor by antigen-stimulated lymphocytes of subjects with grass pollen allergy. *Clin. Exp. Immunol.* **9**, 449-465 (1971).
- 14) Rocklin, R. E., Pence, H., Kaplan, H. and Evans, R. : Cell-mediated immune response of ragweed-sensitive patients to ragweed antigen E. *In vitro* lymphocyte transformation and elaboration of lymphocyte mediators. *J. Clin. Invest.* **53**, 735-744 (1974).
- 15) Ceska, M., Eriksson, R. and Varga, J. M. : Radioimmunosorbent assay of allergens. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **49**, 1-9 (1972).
- 16) Romagnani, S., Biliotti, G., Passaleva A. and Ricci, M. : Mites and house dust allergy. III. *In vitro* lymphocyte transformation and precipitating antibody to house dust and mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) extract in

atopic and non-atopic individuals. Clin. Allergy. 3, 51-56 (1973).

(17) Ownby, D. R., Rebecca, H. and Buckley, R. H. : Lymphocyte responses to ragweed antigens from different sources. J. Allergy. Clin. Immunol. 63, 65-66 (1979).

(18) Buckley, R. H., Seymour, F., Sanal, S. O., Ownby D. R. and Becker, W. G. : Lymphocyte responses to purified raweed allergens *in vitro*. I. Proliferative responses in normal, newborn, agammaglobulinemic, and atopic subjects. J. Allergy. Clin. Immunol. 59, 70-78 (1977).

(19) Mathews, K. P., Pan, P. M. and Weisberg, S. C. : Lymphocyte transformation by pollen extracts and Purified Protein Derivative (PPD) in leucocyte cultures of normal human subjects. Cell. Immunol. 32, 120-134 (1977).

(20) Murray, A. B. and Zuk, P. : The seasonal variation in a population of house dust mites in a North American city. J. Allergy. Clin. Immunol. 64, 266-269 (1979).

(21) 宮本詢子, 大内忠行 : 新築家屋, 一般家屋での室内塵ダニ類の季節変動について. 衛生動物, 27, 251-259 (1976).

(22) 中村凱次 : 気管支喘息児の血清特異 IgE 抗体の変動について 第 1 編, 抗 *Dermatophagoides farinae* 特異 IgE の変動について. アレルギー, 28, 758-773 (1979).

(23) Chapman, M. D. and Platts-Mills, T. A. E. : Measurement of IgG, IgA and IgE antibodies to *Dermatophagoides pteronyssinus* by antigen-binding assay, using a partially purified fraction of mite extract (F₄P₁). Clin. exp. Immunol. 34, 126-136 (1978).

(24) Levine, B. B. : Genetics of atopic allergy and reagin production. Clin. Allerg. 3, 539-559 (1973).

(25) Geha, R. S., Colten, H. R., Schneeberger, E. and Merler, E. : Cooperation between human thymus-derived and bone-marrow-derived lymphocytes in the antibody response to ragweed antigen E *in vitro*. J. Clin. Invest. 56, 386-390 (1975).

(26) Tada, T. : Regulation of reaginic antibody formation in animals. Progress. Allergy. 19, 122-194 (1975).

(27) Ishizaka, K. : Cellular events in the antibody response. Adv. Immunol. 23, 1-75 (1976).

(28) Kishimoto, T. and Ishizaka, K. : Regulation of antibody response *in vitro*. III. Role of hapten-specific memory cells and carrier-specific helper cells on the distribution of anti-hapten antibodies in IgG, IgM and IgE classes. J. Immunol. 64, 266-269 (1979).

(29) Irons, J. S., Pruzansky, J. J., Patterson, R. and Zeiss, R. : Studies of perennial ragweed immunotherapy. Associated changes in cellular responsiveness, total serum antigen-binding capacity, and specific IgE antibody concentrations. J. Allergy. Clin. Immunol. 59, 190-199 (1977).

(30) Ahlstedts, S. and Eriksson, N. E. : Immunotherapy in atopic allergy antibody titers and avidities during hyposensitization with Birch and Timothy pollen allergens. Int. Archs Allergy appl. Immun. 55, 400-411 (1977).

(31) Reisman, R. E., Wypych, J. I. and arbesman, C. E. : Relationship of immunotherapy, seasonal pollen exposure and clinical response to serum concentrations of total IgE and ragweed-specific IgE. Int. Archs Allergy appl. Immun. 48, 721-730 (1975).

(32) Lichtenstein, L. M., Ishizaka, K., Norman, P. S., Sobotka, A. K. and Hill, B. M. : IgE antibody measurements in ragweed hay fever. Relationship to clinical severity and the results of immunotherapy. J. Clin. Invest. 52, 472-482 (1973).

(33) 伊藤幸治, 佐野靖之, 森田寛, 宮本昭正, 堀内淑彦 : 室内塵およびダニによる減感作中の IgE, IgG 抗体, および IgE レベルの変化について. アレルギー, 25, 815-822 (1976).

(34) Evans, R., Pence, H., Kaplan, H. and Rocklin, R. E. : The effect of immunotherapy on humoral and cellular responses in ragweed hayfever. J. Clin. Invest. 57, 1378-1385 (1976).

(35) Gatien, J. G., Merler, E. and Colten, H. R. : Allergy to ragweed antigen E ; Effect of specific immunotherapy on the reactivity of human T lymphocytes *in vitro*. Clin. Immunol. Immunopathol. 4, 32-37 (1975).

In Vitro Lymphocyte Response to Mite (*Dermatophagoides farinae*) extract : A Correlation with Radioallergosorbent Test and Effect of Immunotherapy. Michio Hiratani, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. *J. Juzen Med. Soc.*, **89**, 541 – 552 (1980).

Abstract *In vitro* lymphocyte responsiveness and serum levels of specific IgE antibody to mite extract (*Dermatophagoides farinae*) and total IgE were evaluated in mite-sensitive patients and non-atopic individuals. Serum levels of both mite-specific IgE antibody and total IgE were significantly higher in mite sensitive patients than in non-atopic individuals.

The levels of specific IgE antibody well correlated with mite sensitivity. Lymphocyte from untreated mite sensitive patients (n=16) responded to mite extract with greater ³H-thymidine uptake than did those from non-atopic individuals (n=20) (p<0.01). In 42 subjects examined, including both mite-sensitive patients and non-atopic individuals, a significant correlation between lymphocyte response to mite extract and serum levels of mite-specific IgE antibody was observed (r=0.48, p<0.01). These results suggest that mite-sensitive patients respond to mite allergens with exaggerated lymphocyte proliferation as well as with enhanced specific IgE antibody production.

To study the effect of immunotherapy, these three parameters were compared in patients receiving long-term immunotherapy and those not receiving immunotherapy. The lymphocyte response to mite extract was significantly lower in the treated patients (p<0.05), but there was no significant difference in the total IgE and the specific IgE antibody levels between these two groups. These results suggest that with regard to mite-allergy, there is some difference in the effect of immunotherapy between lymphocyte proliferative response and serum levels of specific IgE antibody to mite allergen.