

# Phytohemagglutinin(PHA)刺激リンパ球培養上清のアトピー患者末梢白血球ヒスタミン遊離試験に対する影響について

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8860">http://hdl.handle.net/2297/8860</a>

# Phytohemagglutinin (PHA) 刺激リンパ球培養上清の アトピー患者末梢白血球ヒスタミン遊離試験に 対する影響について

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

武 藤 一 彦

(昭和55年9月30日受付)

最近, Bamzai ら<sup>1)</sup>は, ブタクサ過敏症患者の感作抗原添加による末梢白血球ヒスタミン遊離試験において, phytohemagglutinin (以下 PHA) 刺激リンパ球培養上清を加えると, ヒスタミンの遊離が増強したと報告している. この現象は, これまで報告されてきた I 型アレルギー反応と細胞性免疫能の関連性や, Dvorak ら<sup>2)</sup>の述べるある種の遅延型皮膚反応におけるリンパ球と好塩基球の動態に関し, 興味ある問題を提供しているものと考ええる.

そこで著者は, ダニ (*Dermatophagoides farinae*: 以下 *D. farinae*) 過敏症患者の PHA 刺激リンパ球培養上清が, *D. farinae* 添加末梢白血球ヒスタミン遊離試験におよぼす影響について検討を加え, さらにその培養上清の特異性を検索する目的から抗ヒト IgE 抗体による末梢白血球ヒスタミン遊離試験に対する影

響についても検索した. また, 培養上清の作用とそれぞれの *D. farinae* に対する radio-allergosorbent test (RAST) 値との相関, アトピー者白血球および非アトピー者白血球に対する培養上清の効果の相違についても検討を加えたので報告する.

### 対象および方法

#### I. 対象 (Table)

対象は, アトピー患者 32 名で, 疾患別では気管支喘息がほとんどを占め, それらの多くがアレルギー性鼻炎や湿疹を合併していた. 年齢は 2 才から 30 才で平均 10 才であり, 総 IgE 値は 2292 U/ml で, *D. farinae* に対する RAST 値 (% of total activity) の平均は 28 % であった. また, 彼らの *D. farinae* に対する皮膚反応 (Prick 法) は全例陽性を示した. 健常者としては,

Table Characteristics of subjects.

	Atopic patients	Non-atopic controls
Number	32	21
Age (year)	10 (2-30) *	14 (0.5-32)
IgE level (U/ml)	2292 (108-19480)	192 (28-466)
RAST values to <i>D. farinae</i> (% of total activity) **	28 (5.9-44)	(3.5-5.2)

\* Mean (range)

\*\* Expressed as percentage =  $\frac{\text{CPM antigen disc bound}}{\text{CPM total added}} \times 100$

Effect of Culture Supernatants of Phytohemagglutinin-Stimulated Mononuclear Cells upon Leukocyte Histamine Release in Atopic Patients. **Kazuhiko Mutou**, Department of Pediatrics (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan.

家族歴,既往歴より非アトピーと判断された21名を選んだ。年齢は6カ月から32才までで,平均14才であった。

*D. farinae* 添加末梢白血球ヒスタミン遊離試験に用いた白血球は,*D. farinae* 過敏症のある他のアトピー患者15名,および若干の健康人より得た。

## II. 方法

### 1. リンパ球培養上清の作製

リンパ球培養上清は,非アトピー者21名,およびア

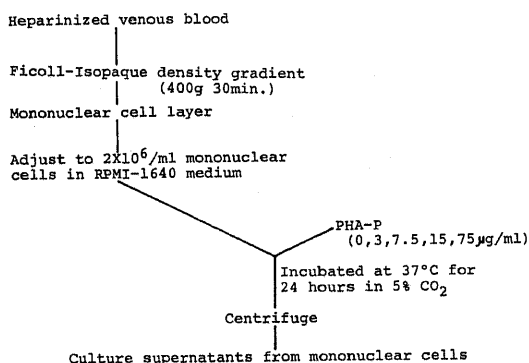


Fig. 1. Preparation for culture supernatants from stimulated mononuclear cells.

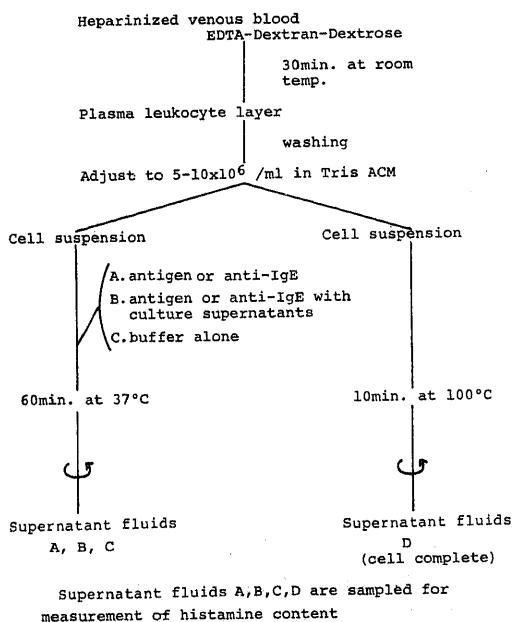


Fig. 2. Method for leukocyte histamine release.

トピー患者32名より非発作時にヘパリン採血し, Figure 1に示すように Ficoll-Isopaque を用いてリンパ球を分離し, RPMI-1640 medium (Gibco, Grand Island, N. Y.) にて,  $2 \times 10^6$ /ml に調整した。これに PHA-P (Difco Lab., U. S. A.) を 0 から  $75 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように加え, 5%  $\text{CO}_2$  のもとで  $37^\circ\text{C}$ , 24 時間培養, 遠心してその上清を  $-20^\circ\text{C}$  にて保存, 用時溶解して使用した。

### 2. 末梢白血球ヒスタミン遊離試験 (Figure 2)

*D. farinae* 過敏症のあるアトピー患者および健康者よりヘパリン採血し, 血液 2 ml あたり 0.7 ml の EDTA-dextran-dextrose 溶液とよく混和し, 室温にて 30 分から 60 分間静置した。その白血球層を, 毛细管ピペットにて取り, ガラス試験管に移し, Tris A にて 2 回洗浄後, Tris ACM にて  $5 \sim 10 \times 10^6$ /ml に調整した。

白血球浮遊液  $100 \mu\text{l}$  に,  $10^{-3}$  または  $10^{-4} \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度の *D. farinae* 抗原液 (鳥居製凍結乾燥末を使用), もしくは  $21.6 \text{ IU}/\text{ml}$  の濃度の抗ヒト IgE 抗体 (Behring 社製を使用) を  $100 \mu\text{l}$  加えたものを A とした。なお, この場合の *D. farinae* 抗原液と抗ヒト IgE 抗体の量は, ヒスタミン遊離が 50% 前後 ( $50 \pm 20\%$ ) になるものである (Figure 6, 7)。また A と同じ濃度になるように抗原を加え, さらに 30% の割合にリンパ球培養上清を加えたものを B とし, Tris ACM のみを加えたものを C とした。

それぞれを  $37^\circ\text{C}$  にて 60 分間 incubate し, 遠心してその上清のヒスタミン量を測定した。細胞内全ヒスタミン量は, C と同様に作ったものを  $100^\circ\text{C}$  にて 10 分間煮沸し, その上清 D を測定した。反応はすべて duplicate にて行った。また, 白血球の分離, 洗浄および抗原との反応に使用したガラス器具は, すべてシリコン処理をほどこした。

### 3. ヒスタミン測定

Snyder ら<sup>3)</sup> は, モルモット脳より抽出した histamine-N-methyltransferase (以下 HMT) を利用してヒスタミンをメチル化し, メチルヒスタミンとしてクロロフォルム層に移行させて測定する方法を報告した。この際, メチル基の供給源として S-adenosyl-L- [ $^{14}\text{C}$ -methyl] methionine (以下 [ $^{14}\text{C}$ ]-SAM) を用いることにより, メチルヒスタミンを [ $^{14}\text{C}$ ] の radio activity で測定することになり, Shore ら<sup>4)</sup> の蛍光法に比較して特異性及び感度の面で有利である。その後, 原法の<sup>3)</sup> H-histamine を加えて回収率補正を行う double isotopic assay に対して, [ $^{14}\text{C}$ ]-SAM のみでも充分であることが指摘<sup>3)-9)</sup> され, 今回著者は, この Single isotopic assay を用いてヒスタミン測定を行

った。

HMTの作製は、モルモット脳を用いて Snyder ら<sup>3)</sup>の方法に準じて行い、 $-20^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存し、用時溶解して使用した。ヒスタミン測定手技を Figure 3 に示した。8 × 50 mm のガラス試験管に Tris ACM, ヒスタミン標準液あるいは検体を  $50\mu\text{l}$ , HMT を  $20\mu\text{l}$ , [ $^{14}\text{C}$ ]-SAM (New England Nuclear Corp.) を  $10\mu\text{l}$  ( $54\text{nCi}:1.16\text{nmol}$ ) 加え、コルク栓をして  $37^{\circ}\text{C}$ にて incubate, 90 分後に NaCl 飽和 1N NaOH  $20\mu\text{l}$  を加えて反応を止めた。これに NaCl 約 50 mg, クロロフォルム  $400\mu\text{l}$  を加え、コルク栓にて密閉し、ミキサーを用いて約 30 秒間混和した。混和後 900G, 10 分間遠心し、その上層を毛細管ピペットにて除去、再び 1N NaOH  $150\mu\text{l}$  を加えて混和、遠心して上層を除去、下層に残ったクロロフォルム層より  $50\mu\text{l}$  を得てガラスフィルターに吸着させた。乾燥後、シンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンターにて測定した。Figure 4 (A), (B) および Figure 5 にヒスタミン測定の基礎的検討データを示した。

#### 4. ヒスタミン遊離率の計算

ヒスタミン遊離率 (HR) は、抗原添加ヒスタミン遊離量 (A) と自然遊離量 (C) の差を、全ヒスタミン量 (D) と自然遊離量の差で割って算出した。

$$\text{HR} = \frac{A - C}{D - C} \times 100 (\%)$$

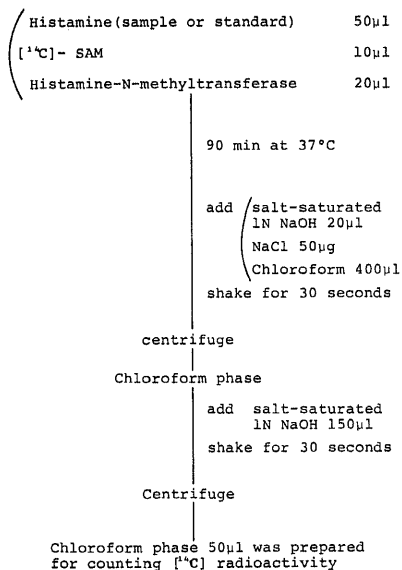


Fig. 3. Method for enzyme-isotopic assay of histamine.

同様にリンパ球培養上清を加えた場合 (B) のヒスタミン遊離率 (HRS) を求めた。

$$\text{HRS} = \frac{B - C}{D - C} \times 100 (\%)$$

HRS と HR の差をリンパ球培養上清添加によるヒスタミン遊離増強効果とした。

#### 5. *D. farinae* に対する RAST 値の測定

Paper disc は、東洋濾紙 No. 6 を CNBr にて活性化し、*D. farinae* の凍結乾燥末を Ceska ら<sup>10)</sup>の方法によって coupling したものをを用いた。また、抗 IgE- $^{125}\text{I}$  は、Pharmacia 社製のものを使用した。

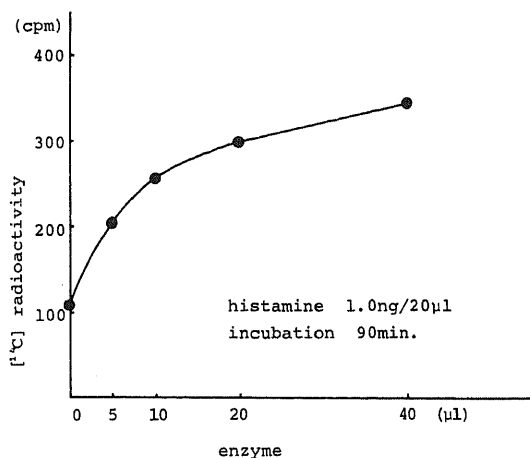


Fig. 4. (A)

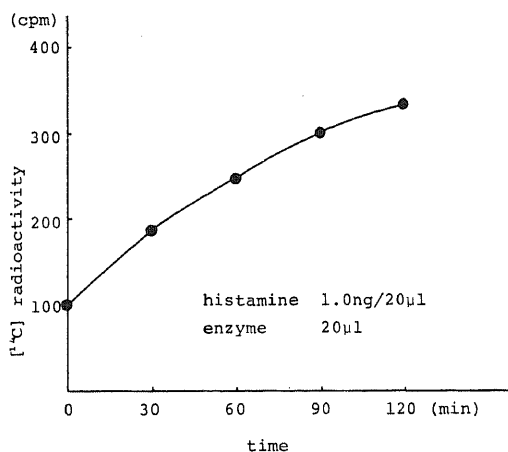


Fig. 4. (B).

Determination of the optimal conditions for enzyme-isotopic assay of histamine. The effect of variation in (A) enzyme concentration and (B) time of incubation.

## 6. 総 IgE 値の測定

総 IgE 値は、Pharmacia 社の paper radio-immunosorbent test (PRIST) キットにより測定した。

## 成績

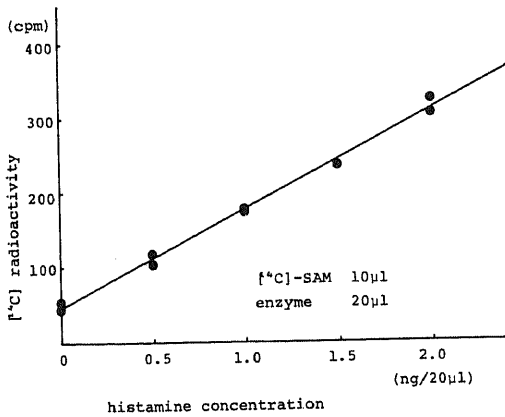
1. *D. farinae* および抗ヒト IgE 抗体による末梢白血球

Fig. 5. Standard curve with several concentrations of histamine.

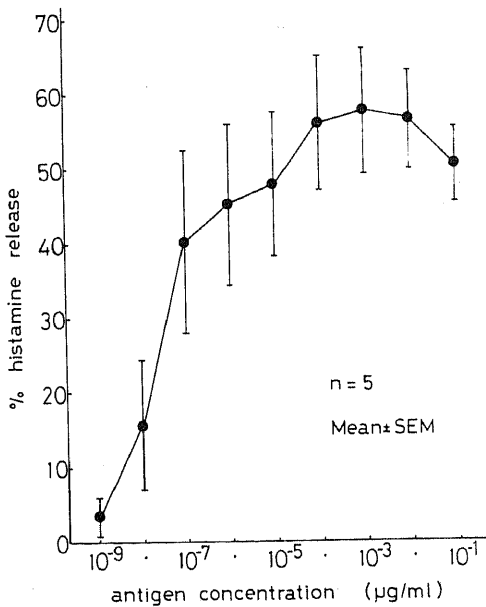


Fig. 6. Mite-induced leukocyte histamine release in atopic patients.

## 血球ヒスタミン遊離試験

Figure 6に、*D. farinae* 過敏症のあるアトピー患者 5名における *D. farinae* 添加末梢白血球ヒスタミン遊離試験の成績を示した。抗原量の増加に伴ってヒスタミン遊離率も増大するが、 $10^{-2}\mu\text{g/ml}$ 以上の高濃度ではむしろ低下傾向を示した。実験には、 $10^{-9}$ あるいは $10^{-4}\mu\text{g/ml}$ の至適濃度を用いた。Figure 7は、抗ヒト IgE 抗体添加時のアトピー患者 14名、非アトピー者 4名の末梢白血球ヒスタミン遊離試験の結果である。アトピー患者、非アトピー者にかかわらず、 $21.6\text{IU/ml}$ の濃度にて最大ヒスタミン遊離率を認めたので、実験にはこの濃度を使用した。

## 2. PHA の末梢白血球ヒスタミン遊離試験におよぼす影響についての検討

白血球浮遊液  $100\mu\text{l}$  に、*D. farinae* 抗原  $40\mu\text{l}$  ( $10^{-4}\mu\text{g/ml}$ )、さらに PHA - P 濃度が 0 から  $22.5\mu\text{g/ml}$ になるように、PHA - P 添加 RPMI - 1640medium を  $60\mu\text{l}$  (30%濃度) 加え、その末梢白血球ヒスタミン遊離試験におよぼす影響をみた。

4名のアトピー患者(a,b,c,d)および2名の非アトピー者(e,f)におけるヒスタミン遊離率の変化は、Figure 8に示すごとくであり、高濃度の PHA 添加mediumにてアトピー患者(d)に、12%と低値ながらヒスタミン遊離を増強する傾向がみられたが、全

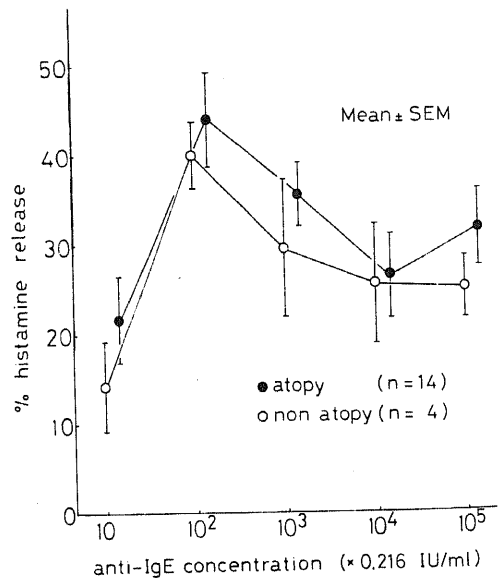


Fig. 7. Anti-IgE-induced leukocyte histamine release in atopic patients.

般的に見て影響は無いと考えられた。また非アトピー者(e,f)でも、PHAによる明らかな増強効果は認められなかった。

### 3. リンパ球培養上清による末梢白血球ヒスタミン遊離効果の検討

Figure 9に示すように、*D. farinae* 抗原を加えていない反応系においては、リンパ球培養上清添加によるヒスタミン遊離効果は観察されなかった。しかし、同一の白血球に *D. farinae* 抗原 ( $10^{-4}\mu\text{g/ml}$ ) を加え、さらにリンパ球培養上清を加えた場合にはヒスタミン遊離増強効果が認められた。

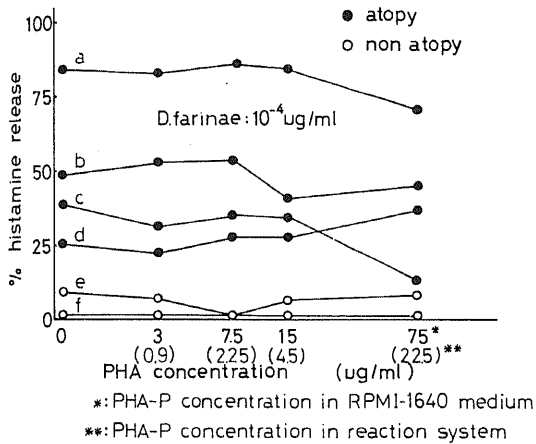


Fig. 8. Effect of different concentrations of PHA on antigen-induced leukocyte histamine release.

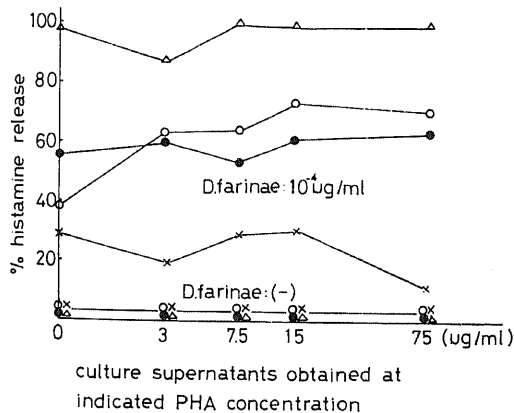


Fig. 9. Effect of culture supernatants on leukocyte histamine release with or without antigen.

### 4. リンパ球培養上清中に出現する *D. farinae* 添加末梢白血球ヒスタミン遊離増強活性の時間的経過についての検討 (Figure 10)

この実験は、アトピー患者1名、非アトピー者2名のリンパ球培養上清について行った。ヒスタミン遊離増強活性は、リンパ球培養3時間目位から出現しはじめ、PHAを加えた場合には、24時間にて著明な活性増強が観察された。PHA非添加では、24時間目にも低値を示している。

### 5. リンパ球培養上清による *D. farinae* 添加時末梢白血球ヒスタミン遊離増強効果

アトピー、非アトピー両者のリンパ球培養上清による *D. farinae* 抗原添加末梢白血球ヒスタミン遊離増強効果を Figure 11に示した。

アトピー患者のみならず、非アトピー者のリンパ球培養上清にもヒスタミン遊離増強効果が認められた。また、両者ともに PHA 非刺激培養上清にも増強効果が見られた。

PHA-P  $3\mu\text{g/ml}$  の低濃度で刺激した場合、その増強効果は、非アトピー患者の値は 30.3% と有意 ( $P < 0.05$ ) に高値であった。しかし、PHA 非刺激および高濃度刺激では、両者間に差を認めなかった。さらに、アトピー患者において、PHA 非刺激に比較して  $3\mu\text{g/ml}$  で刺激したリンパ球培養上清による増強効果は有意に上昇していた ( $P < 0.05$ )。

アトピー、非アトピー両者ともに少数ではあるが、ヒスタミン遊離を抑制する例も見られた (PHA 非添加における3例)。

### 6. リンパ球培養上清のヒスタミン遊離増強効果と *D. farinae* に対する RAST 値との関係

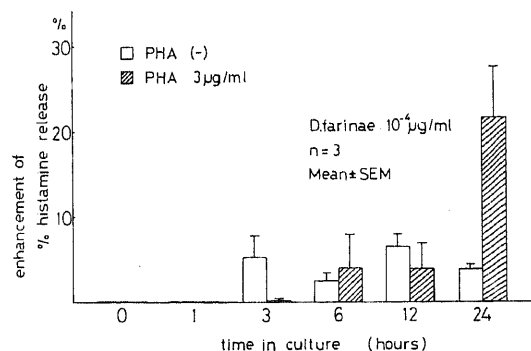


Fig. 10. Time course of enhancing activity in culture supernatants for mite-induced leukocyte histamine release.

アトピー、非アトピー両者のリンパ球培養上清が示した最大の *D. farinae* 添加末梢白血球ヒスタミン遊離増強効果と、その患者の *D. farinae* に対する RAST 値との関係を Figure 12 に示した。アトピー、非アトピー両者を含めて相関関係は  $r = 0.42$  ( $P > 0.05$ ) と有意ではないが、RAST 値が高いと、増強効果が大きいという傾向が認められた。

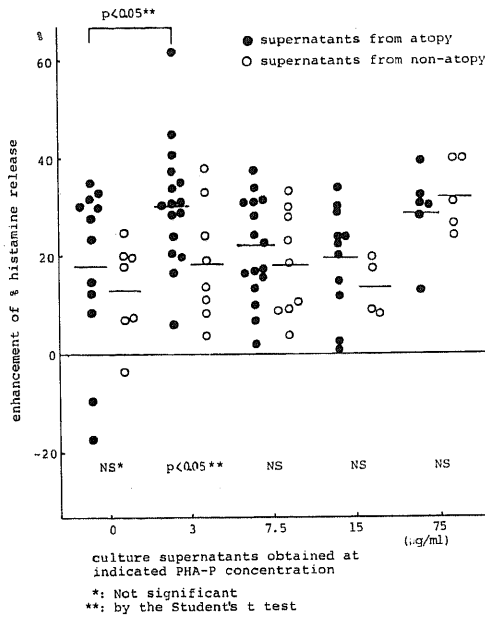


Fig. 11. Effect of culture supernatants on mite-induced leukocyte histamine release.

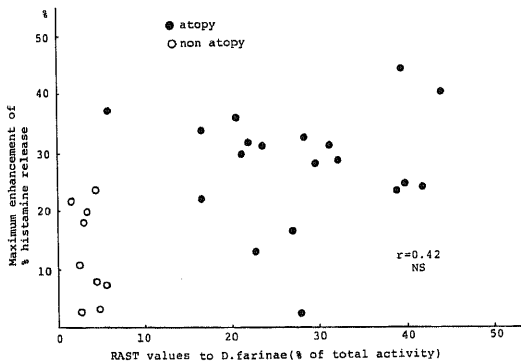


Fig. 12. Correlation between maximum enhancing effect of culture supernatants and RAST values to *D. farinae*.

7. リンパ球培養上清による抗ヒト IgE 抗体添加末梢白血球ヒスタミン遊離増強効果

アトピー、非アトピー両者のリンパ球培養上清による抗ヒト IgE 抗体添加末梢白血球ヒスタミン遊離増強効果を Figure 13 に示した。培養上清は、PHA-P 濃度 0.3, 7.5 μg/ml のみについて検討した。

アトピー患者培養上清が、非アトピー者のものより

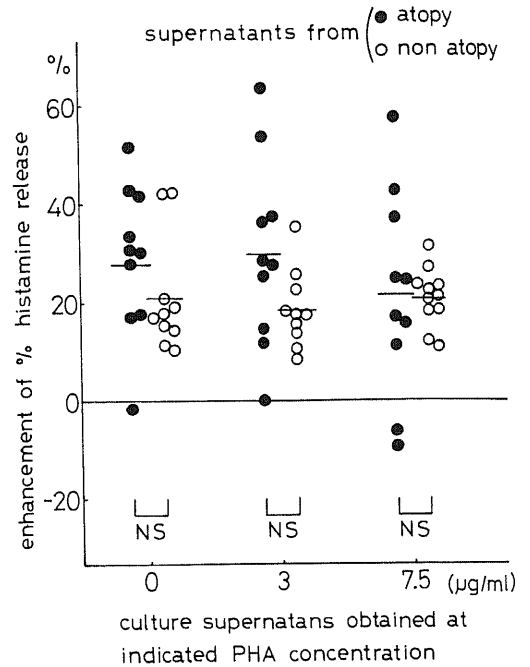


Fig. 13. Effect of culture supernatants on anti-IgE-induced leukocyte histamine release.

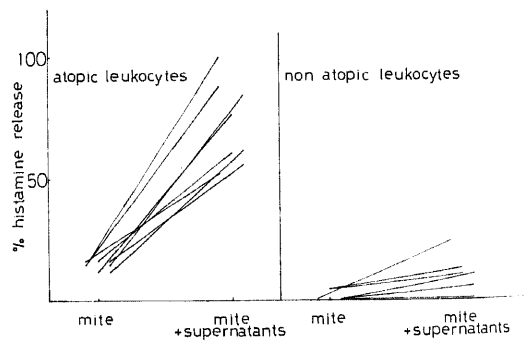


Fig. 14. Enhancing effect of culture supernatants on antigen-induced histamine release from atopic leukocytes and non-atopic ones.

高値を示す傾向はあるが、分散が大で有意差は認めなかった。

#### 8. リンパ球培養上清のアトピー、非アトピー両者白血球に対する作用の相違についての検討

リンパ球培養上清のアトピー、非アトピー両者白血球に対する作用の相違について、20%以下のヒスタミン遊離を示した例について検討を加えた。Figure 14に示すごとく、アトピー患者白血球は、非アトピー者のそれに比較して著明に増強されていた。

### 考 察

好塩基球は、19世紀の末に慢性骨髄性白血病の患者において Paul Ehrlich により初めて記載された。以後、その研究の技術的困難さや、生体内における役割が明らかでないことより、つい最近まで研究者の興味をひきつけることは無かった。しかし、石坂ら<sup>11)</sup>による IgE の発見以来、にわかには好塩基球の役割が注目されるようになった。好塩基球膜表面に結合した IgE と対応抗原が反応することにより、好塩基球からヒスタミンをはじめとする種々の chemical mediator を遊離する I 型アレルギー反応がその代表的なものである。最近では、種痘免疫<sup>12)</sup>、臓器移植における拒否反応<sup>13)</sup>、さらに自己免疫疾患<sup>14)</sup>などにも好塩基球の反応の場が指摘されている。つまり、好塩基球は、即時型アレルギー反応のみならず、リンパ球と関連しながら遅延型アレルギー反応にもある役割を演じていると考えられる。

1974年、Dvorak ら<sup>2)</sup>は、硬結のない発赤をともなう遅延型皮膚反応で、その組織中に多数の好塩基球の遊走、脱顆粒を認めるものを cutaneous basophil hypersensitivity として記載し、その生検皮膚組織中のリンパ球、好塩基球などの動きに注目している。彼らは、この論文で、リンパ球が適当な抗原で刺激されると好塩基球遊走因子や、ヒスタミン遊離因子を放出し、好塩基球を誘導、脱顆粒させ、従来の遅延型皮膚反応とは異なった反応を形成していると述べている。

Thueson ら<sup>15)16)</sup>は、健常人リンパ球を24時間から48時間培養すると、その上清に好塩基球ヒスタミン遊離活性 (histamine releasing activity:HRA) を認めること、その活性が Con A により増強されること、また遅延型皮膚反応を惹起する SK-SD や、Candida Albicans 抗原でリンパ球を刺激してみると、その上清の HRA は、リンパ球提供者の皮膚反応と関連することなどを報告した。

Bamzai ら<sup>1)</sup>は、ブタクサ過敏症患者の PHA 刺激リ

ンパ球培養上清が、ブタクサ抗原添加末梢白血球ヒスタミン遊離試験を増強すると述べ、この場合、健常人リンパ球培養上清に比較して有意に高値であったという。

そこで著者は、D. farinae 過敏症患者のリンパ球を PHA 刺激にて培養し、その上清のヒスタミン遊離増強効果について検討した。

Hook ら<sup>17)18)</sup>は、Con A, PHA などの mitogen がヒトやハムスターの好塩基球に作用してヒスタミン遊離を起こすことを報告し、特に Con A では、26%から70%のヒスタミン遊離率を示し、PHA では2%から44%であったという。著者も、アトピー患者4名、非アトピー患者2名について、PHA - P 濃度0から22.5 $\mu$ g/ml までの影響をみたが、高濃度にてアトピー患者の1名に12%のヒスタミン遊離増強効果が認められたのが最高であり、他のアトピー患者3名ではむしろ抑制する傾向であった。Hook らは、PHA のヒスタミン遊離至適濃度を5から10 $\mu$ g/ml と述べているが、著者の結果とは一致しなかった。

Thueson ら<sup>15)</sup>が述べている Con A, SK-SD、および Candida 抗原による健常人リンパ球刺激後、その上清中に出現してくる HRA と、著者が PHA 刺激により得られたヒスタミン遊離増強効果が同一の上清成分によるものであるのかは問題である。彼らの述べる HRA は、好塩基球に直接作用してヒスタミン遊離を促すものであり、抗原を必要としない。

しかし、著者の場合、抗原を作用させないとその増強効果は認められず、それ自体によるヒスタミン遊離活性も皆無であった。この事実は、増強因子が、白血球ヒスタミン遊離反応における stage 2 に作用して増強していると考えられるが、抗原存在下では、stage 1 にも影響を与えている可能性がある。Bamzai ら<sup>1)</sup>も、彼らの増強因子が両 stage に作用しているであろうと推測している。

アトピー、非アトピー両者のリンパ球培養上清にヒスタミン遊離増強効果を認めたことは意外であったが、健常人リンパ球のみを使用した Thueson ら<sup>15)</sup>の実験でも HRA の存在を述べており、アトピー患者リンパ球特有の培養上清成分という訳ではないのであろう。しかし著者の場合、PHA - P 3 $\mu$ g/ml の低濃度で刺激した時、その培養上清の D. farinae 添加末梢白血球ヒスタミン遊離増強効果が、アトピー患者で有意に高値であったことは興味深く思われる。PHA 低濃度刺激でのみアトピー、非アトピー両者間に差を認めた理由は明らかではないが、アトピー患者に存在する免疫学的異常がわずかであり、あまり強い刺激ではその差



が打ち消されてしまうのではないだろうか。つまり、PHA 低濃度刺激されたアトピー、非アトピー両リンパ球は、白血球ヒスタミン遊離増強因子および抑制因子を産生するが、アトピー患者では総和として増強因子活性が非アトピー者よりも高値となり、両者に差が生じたものと考えられる。抑制因子の存在は、Bamzai ら<sup>11</sup>も指摘しており、著者の実験でもその存在を示すものが数例認められた (Figure 11)。また、アトピー患者において、PHA 非添加に比較して  $3\mu\text{g/ml}$  で刺激した場合のリンパ球培養上清に有意に高い増強効果が認められ、PHA 刺激によってヒスタミン遊離を増強させる上清成分の産生が増加するものと考えられる。

Figure 10 に示したように、PHA 添加の有無にかかわらず、ヒスタミン遊離増強活性は、リンパ球培養後 3 時間目くらいから出現しはじめている。また PHA-P  $3\mu\text{g/ml}$  を加えた場合には、24 時間後に著明な活性増加が見られた。Thueson ら<sup>10</sup>は、HRA の出現を培養 4 時間後と述べており、著者の認めた増強活性と HRA が同一因子であるかは別にしてほぼ一致している。

Bamzai ら<sup>11</sup>は、ブタクサ過敏症患者および健康人リンパ球を PHA  $2\mu\text{g/ml}$  の濃度で刺激し、その培養上清をブタクサ抗原添加末梢白血球ヒスタミン遊離試験に作用させ、患者培養上清が、健康人培養上清に比較して、ヒスタミン遊離を有意に増強したことを報告している。彼らは、PHA 高濃度刺激の場合における培養上清の影響については言及していないが、著者の実験では、PHA 濃度が高くなるにつれて増強効果も増す傾向であった。ただし、この現象はアトピー、非アトピー両者間に有意差を認めなかった。

PHA 非添加リンパ球培養上清中にもヒスタミン遊離増強効果が観察された。これは、リンパ球を PHA 刺激せずに 24 時間培養するだけでも、白血球ヒスタミン遊離増強因子を作り出すものと思われる。

Arvilommi ら<sup>10</sup>は、リンパ球の組織培養液中に mitogen を加えなくとも、リンフォカイン (MIF) が産生されると報告しており、Thueson ら<sup>10</sup>も、Con A で刺激しないリンパ球培養上清中に HRA を認めている。

抗ヒト IgE 抗体によるヒスタミン遊離に対しても、*D. farinae* 添加ヒスタミン遊離増強効果と同様な作用が観察された。アトピー患者培養上清が、高値をとる傾向はあるが、有意差は認められなかった。PHA が非特異的な mitogen であることを考えれば当然であるが、PHA 非添加でも両反応に対するヒスタミン遊離増強効果が認められ、好塩基球膜表面でおこる抗原抗体反応に非特異的に作用する因子を、リンパ球が産生す

ると考えられる。

今回、著者が、in vitro にて認めた PHA 刺激リンパ球培養上清中の抗原添加白血球ヒスタミン遊離増強活性がいかなる物質によるのか明らかではないが、Bamzai ら<sup>11</sup>は、彼らの増強因子が、24 時間培養にて出現し、熱に不安定で、分子量 10,000 以下の物質であると述べている。

リンパ球培養上清が、アトピーと非アトピーの白血球に対して示す作用の相違については評価がむずかしいが、上清の非アトピー白血球に対するヒスタミン遊離増強効果が、アトピー者白血球に対するより低値であったのは、非アトピー者白血球ヒスタミン遊離が抗原抗体反応によらない為かもしれない。

リンパ球培養上清は、好塩基球膜表面で起こる抗原抗体反応によるヒスタミン遊離のみを増強させるのであろう。

Dvorak ら<sup>12</sup>の述べる cutaneous basophil hypersensitivity においては、その組織所見から、リンパ球の産生する液性因子が、好塩基球を組織へ動員し、それが保有するヒスタミンを含めた種々の chemical mediator を遊離させ、皮膚反応の主要な形成していることは明らかなようである。I 型アレルギーの代表的疾患である気管支喘息において、その病因として重要な IgE 抗体が、T 細胞と B 細胞の協調によって産生されるといわれている。著者の実験では、ダニに対する RAST 値と、リンパ球培養上清によるヒスタミン遊離増強効果とは、有意な相関関係を示さなかったが、RAST 値が高いと増強効果が大きいという傾向が認められた。したがって、著者の実験で見られたヒスタミン遊離を増強する因子の産生は、RAST 値に左右されたと考えるより、アトピーの有無に影響されたと考えた方が良いのかもしれない。以上より、アトピー患者リンパ球の産生する液性因子が、ある限られた条件のもとでは、感作抗原による白血球ヒスタミン遊離反応を増強させている可能性があり、I 型アレルギー反応と細胞性免疫の関連性が深いことを示す実験結果と考えられる。

## 結 論

アトピー患者の PHA 刺激リンパ球培養上清中に存在する末梢白血球ヒスタミン遊離増強効果について検討を加えた。

ヒスタミン遊離増強活性は、リンパ球培養後 3 時間より出現しはじめ、とくに PHA-P  $3\mu\text{g/ml}$  を加えた場合には、24 時間に活性著増がみられた。

PHA 刺激リンパ球培養上清は、それ単独ではヒスタ

ミン遊離効果はなく、感作抗原存在下でのみヒスタミン遊離を増強させた。

PHA-P  $3\mu\text{g/ml}$ にて刺激した場合、アトピー患者リンパ球培養上清は、非アトピーのそれに比較して有意に高いヒスタミン遊離増強効果を示した。また、ヒスタミン遊離増強効果の最大値は、その患者の *D. farinae* に対する RAST 値と有意な相関は認めなかったが、アトピー患者リンパ球は、非アトピー者リンパ球に比較してヒスタミン遊離増強因子を作り易いと考えられ、気管支喘息あるいは他のアレルギー疾患に伴う I 型アレルギー反応にリンパ球産生因子が影響を与えている可能性が示唆された。

稿を終るに臨み、御指導と御校閲を賜りました谷口昂教授に深謝いたします。また御協力いただきました教室の諸先生方に感謝いたします。さらに、ダニ凍結乾燥末を提供していただきました鳥居薬品株式会社に御礼申し上げます。

なお本論文の要旨は、第 16 回小児アレルギー研究会および第 30 回日本アレルギー学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) Bamzai, A. K. & Kretschmer, R. R. : Enhancement of antigen-induced leukocyte histamine release by mononuclear cell-derived factor. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **62**, 137 - 142(1978).
- 2) Dvorak, H. F., Mihm, M. C., Dvorak, A. M., Johnson, R. A., Manseau, E. J., Morgan, E. & Colvin, R. B. : Morphology of delayed type hypersensitivity reactions in man. I. Quantitative description of the inflammatory response. *Lab. Invest.*, **31**, 111 - 130(1974).
- 3) Snyder, S. H., Baldessarini, R. J. & Axelrod, J. : A sensitive and specific enzymatic isotopic assay for tissue histamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **153**, 544 - 549(1966).
- 4) Shore, P. A., Burkhalter, A. & Cohn, V. H. : A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **127**, 182 - 186(1959).
- 5) Beaven, M. A., Jacobsen, S. & Horáková, Z. : Modification of the enzymatic isotopic assay of histamin and its application to measurement of histamine in tissues, serum and urine. *Clin. Chim. Acta*, **37**, 91 - 103(1972).
- 6) Taylor, K. M. & Snyder, S. H. : Isotopic microassay of histamine, histidine, histidine decarboxylase and histamine methyltransferase in brain tissue. *J. Neurochem.*, **19**, 1343 - 1358(1972).
- 7) Levy, D. A. & Widra, M. : A microassay for studying allergic histamine release from human leukocytes using an enzymic-isotopic assay for histamine. *J. Lab. Clin. Med.*, **81**, 291 - 297(1973).
- 8) Kobayashi, Y. & Maudsley, D. V. : A single-isotope enzyme assay for histamine. *Anal. Biochem.*, **46**, 85 - 90(1972).
- 9) Blumenthal, M. N., Roitman, B., Carlson, G. & Fish, L. : Isotope assay of histamine release. *Biochem. Med.*, **11**, 312 - 317(1974).
- 10) Ceska, M., Eriksson, R. & Varga, J. M. : Radioimmuno-sorbent assay of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **49**, 1 - 9(1972).
- 11) Ishizaka, K. & Ishizaka, T. : Physicochemical properties of reaginic antibody. I. Association of reaginic activity with an immunoglobulin other than  $\gamma\text{A}$  or  $\gamma\text{G}$ -globulin. *J. Allergy*, **37**, 169 - 185(1966).
- 12) Dvorak, H. F., Dvorak, A. M. & Churchill, W. H. : Immunologic rejection of diethyl nitrosamine-induced hepatomas in strain 2 guinea pigs. Participation of basophilic leukocytes and macrophage aggregates. *J. Exp. Med.*, **137**, 751 - 775(1973).
- 13) Dvorak, H. F. : Role of the basophilic leukocyte in allograft rejection. *J. Immunol.*, **106**, 279 - 281(1971).
- 14) Hoenig, E. M. & Levine, S. : Three localized forms of experimental allergic encephalomyelitis : An ultra-structural comparison. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **33**, 251 - 259(1974).
- 15) Thueson, D. O., Speck, L. S., Lett-Brown, M. A. & Andrew Grant J. : Histamine-releasing activity (HRA) I. Production by mitogen- or antigen-stimulated human mononuclear cells. *J. Immunol.*, **123**, 626 - 632(1979).
- 16) Thueson, D. O., Speck, L. S., Lett-Brown, M. A. & Andrew Grant J. : Histamine-releasing activity (HRA) II. Interaction with basophils and physicochemical characterization. *J. Immunol.*, **123**, 633 - 639(1979).
- 17) Hook, W. A., Dougherty, S. F. & Oppenheim,

**J. J.** : Release of histamine from hamster mast cells by concanavalin A and phytohemagglutinin. *Infect. Immunity*, **9**, 903 - 908(1974).

**18) Hook, W. A., Brown, H. & Oppenheim, J. J.** : Histamine release from human leukocytes by

concanavalin A and other mitogens(38410). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **147**, 659 - 663(1974).

**19) Arvilommi, H. & Rasanen, L.** : Spontaneous lymphokine synthesis by human blood mononuclear cells. *Nature*, **257**, 144 - 146(1975).

**Effect of Culture Supernatants of PHA-Stimulated Mononuclear Cells upon Leukocyte Histamine Release in Atopic Patients.** Kazuhiko Muto, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920, Japan. *J. Juzen Med. Soc.*, **89**, 639-649 (1980).

**Abstract** The present work was designed to compare the effect of culture supernatants of phytohemagglutinin (PHA)-stimulated mononuclear cells obtained from mite-sensitive atopic patients with those of healthy non-atopic subjects on antigen (an extract of *Dermatophagoides farinae*)-induced histamine release from leukocytes of atopic patients. Histamine contents were estimated by the enzyme-isotopic method of Snyder and histamine release was expressed as a percentage of total histamine content in the cells.

Mononuclear cells were cultured in RPMI 1640 complete media for 24 hrs. with or without PHA and cell-free culture supernatants were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until the use. PHA itself did not affect the antigen-induced histamine release of patient's leukocytes at any concentrations examined ( $0-75\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ). In the absence of antigen, culture supernatants could not release histamine from leukocytes. Culture supernatants of PHA-stimulated mononuclear cells obtained either from atopic patients or from healthy subjects, when added to concentration of 30% in media, exerted some enhancing activity on the antigen-induced as well as anti-IgE-mediated histamine release. In general there were no significant differences in these enhancing activities between supernatants obtained in the same culture condition from atopic patients and healthy controls. And even culture supernatants of unstimulated mononuclear cells showed a measurable extent of enhancement on leukocyte histamine release. Only when mononuclear cells were stimulated with a suboptimal mitogenic concentration of  $3\ \mu\text{g}/\text{ml}$  PHA-P, the culture supernatants from the atopic group had a higher enhancing activity for the antigen-induced histamine release than did those obtained from non-atopic controls ( $p < 0.05$ ). These enhancing activities of culture supernatants seemingly tended to be higher in patients with high RAST count to *D. farinae*, but there were no significant correlations between them.

These results suggest that soluble factors released from mononuclear cells of atopic patients may exert, under certain limited conditions, a higher enhancing effect on leukocyte histamine release in response to sensitized antigens as compared with those released from non-sensitized control cells. However, clinical significance of these experimental results still remains unclear.