

# 好塩基球の反応性に関する研究

## 第 2 編

### 直接算定法による好塩基球の反応性の検討

岡山大学医学部第2内科学教室（主任：木村郁郎教授）

合 田 吉 徳

（昭和60年3月20日受稿）

**Key words** : 反応好塩基球

直接算定法

抗ヒト IgE

特異抗原

気管支喘息

## 緒 言

教室のこれまでの研究により、気管支喘息発作と好塩基球との密接な関連<sup>1,2)</sup>が明らかにされている。また Skin vesicle test および喀痰の検素により、末梢血好塩基球はアレルギー反応局所へと血管外遊出<sup>3,4)</sup>をおこすこと、抗原添加時の生態観察<sup>5,6,7,8)</sup>により、好塩基球が運動亢進をきたし洋梨状を呈するなどの形態的变化が観察されている。著者は第1編で抗ヒト免疫グロブリン添加による末梢血好塩基球の形態的变化を塗沫標本上で観察し、気管支喘息の分類に有用であることを報告した。一方、気管支喘息発作をおこさせる特異抗原の検索方法として、従来よりアレルギーエキス皮内反応閾値の程度、Prausnitz-Küstner (以下 PK) 反応、気管支吸入誘発試験、in vitro では radio-allergo sorbent test (RAST) による特異的 IgE 抗体を検出する方法などがある。著者は第1編で抗ヒト免疫グロブリンに対する好塩基球の反応性について塗沫標本上で観察したが、塗沫標本上での観察は手技がやや煩雑で長時間を要する欠点がある。本論文では、反応好塩基球の簡単な観察、判定方法として直接算定法を考案し、抗ヒト免疫グロブリンおよび特異抗原（ハウスダスト）に対する気管支喘息患者末梢血好塩基球の反応

性を観察した。そして、直接算定法による特異抗原検索方法の可能性について若干の検討を加えたので、その結果を報告する。

## 対象並びに方法

### 第1節 対象

対象は当科呼吸器外来へ通院中および当科へ入院中の気管支喘息62例（男性34例、女性28例、年齢分布9才～61才、平均年齢33.7才）である。また対照としては、アレルギー性疾患を有しない健康人7例（男性6例、女性1例、年齢分布21才～31才）を選んだ。

### 第2節 方法

#### 第1項 反応好塩基球の観察方法

ヘパリン加静脈血2mlをシリコン加工試験管に入れ、抗ヒト免疫グロブリン（抗ヒトIgEあるいは抗ヒトIgG ヤギ血清〔Hyland社製〕の10倍希釈液）0.1ml、あるいは凍結乾燥末（59μg/vial 鳥居薬品提供）に1mlの生理食塩水を加え作製したアレルギーエキス（10<sup>2</sup>倍希釈液）0.1mlを添加後、37℃で15分間 incubation した。incubation 後、白血球用メランジュールを用いて好塩基球好酸球同時直接算定用希釈液<sup>9)</sup>にて1:10に希釈染色し、白血球数算定と同様の操作をおこなった。Fuchs-Rosenthal 計算盤を用いて好塩基球数を算定すると同時に好塩基

球を20個観察し、抗原抗体反応により洋梨状の形態的变化を呈する反応好塩基球の出現率の検討をおこなった(図1, 写真1)。この反応好塩基球の観察は、光学顕微鏡下200倍(接眼:×10, 対物:×20)の拡大で判定可能であり、通常は1枚のFuchs-Rosenthal計算盤で20個観察可能であったが、好塩基球の少ない症例やアレルギーエキス添加により好塩基球数の減少が著明な

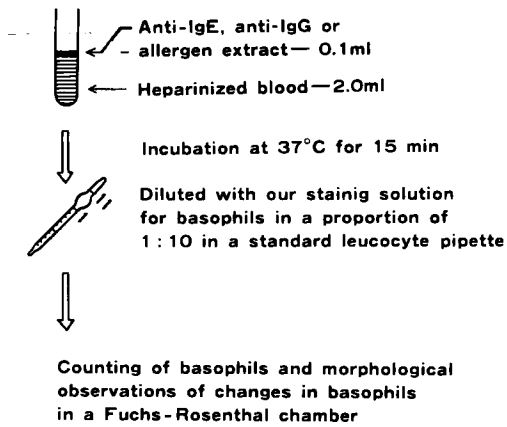


図1. Direct Count of Reactive Basophils (DCRB).

症例では2枚の計算盤で観察する必要があった。また対照として各症例ごとに他のシリコン加工試験管にヘパリン加静脈血2mlをとり、生理食塩水0.1mlを添加後の反応好塩基球の出現率と比較検討した。

なお上述のごとき全血法では、添加抗原と血清との反応の好塩基球に及ぼす影響が問題となる可能性があるため、予備実験として好塩基球を分離し洗浄後、同様の操作により反応好塩基球の出現率を比較検討したが、両者間の出現率に著変を認めなかったため簡便な全血法を用いて検討をおこなった。

#### 第2項 血清IgE値

血清IgE値はradioimmunosorbent test(R-IST)(Pharmacia Fine Chemicals製)により測定した。

#### 第3項 皮内反応閾値

ハウスダストエキスの10倍希釈系列による即時型皮内反応が陽性を示す最もうすい濃度を、皮内反応閾値として表わした。

#### 第4項 気管支吸入誘発試験

ハウスダストエキス $\times 10^{-2}$ 希釈液0.5mlをネ

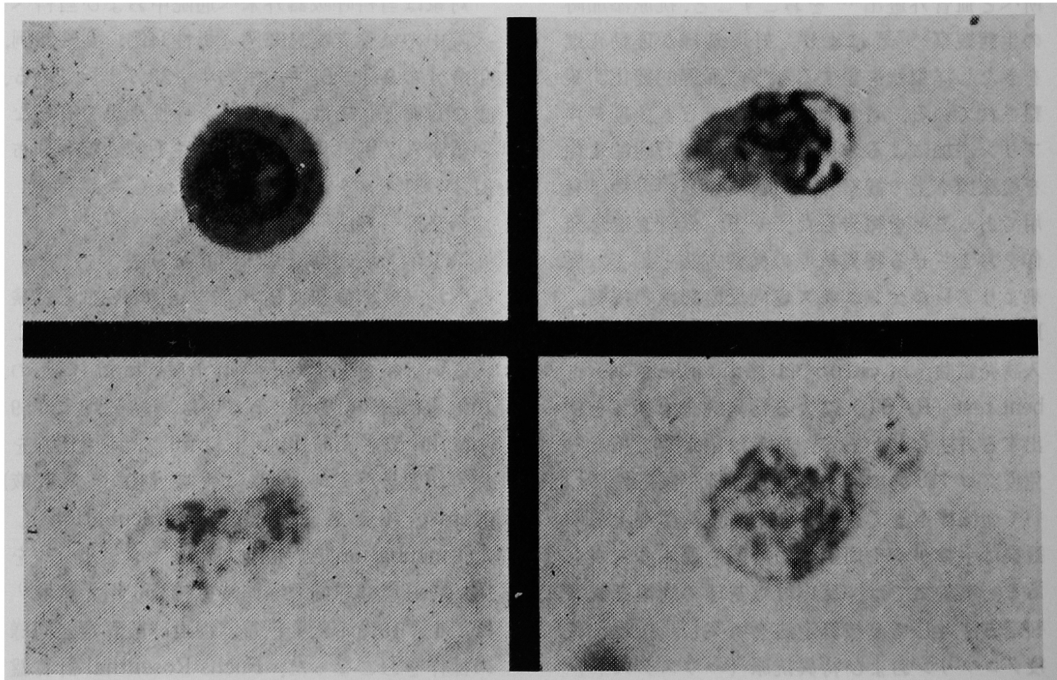


写真1. 左上:正常好塩基球, 左下, 右上, 下:反応好塩基球

ブライザーにより吸入させ、吸入前および吸入後30分に肺機能検査をおこない1秒量が20%以上低下したものを気管支吸入誘発試験陽性と判断した。

#### 第5項 ハウスダストに対する特異的IgE抗体の測定

ハウスダストに対する特異的IgE抗体は、radioallergosorbent test (RAST)(Pharmacia Fine Chemicals 製)にて測定し、結果はRAST score 0+, 1+, 2+以上の3段階に分けて検討した。

### 成 績

#### 第1節 直接算定法の評価—塗沫標本による方法との比較

第1編で報告した塗沫標本上での反応好塩基球の観察と、本編で報告する直接算定法による反応好塩基球の観察との比較を、対象例中7症例について、抗ヒトIgE添加時の反応好塩基球の出現率により検討した。その結果、両者間の反応好塩基球の出現率はほぼ一致しており( $r=0.97$ )直接算定法による観察と塗沫標本上の観察とはほぼ同様の傾向を示すことが示された(図2)。

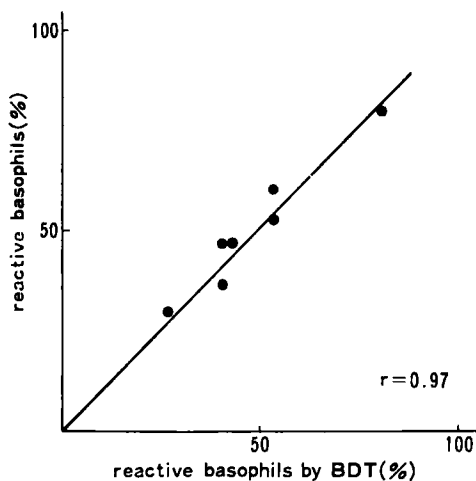


図2. Correlations between the Direct Basophil Counting Method and the Basophil Degranulation Test (BDT)

#### 第2節 抗ヒト免疫グロブリン添加時の反応好塩基球の出現率

#### 第1項 健康人における反応好塩基球の出現率

アレルギー疾患を有しない健康人7例では生理食塩水添加時の洋梨状を呈する反応好塩基球の出現率は平均7.1%であった。また抗ヒトIgE添加による反応好塩基球の出現率は平均31.4%であり、抗ヒトIgG添加では反応好塩基球の出現率は平均20.7%であった。すなわち、健康人では抗ヒト免疫グロブリンに対する好塩基球の反応性は生理食塩水添加時に比べやや反応性が認められるものの、抗ヒトIgE、抗ヒトIgG添加時共に反応好塩基球の出現率は50%以下の低率であった。

#### 第2項 気管支喘息における反応好塩基球の出現率

気管支喘息症例50例を血清IgE値別に0~100IU/ml, 101~300IU/ml, 301~700IU/ml, 701~1000IU/ml, 1001IU/ml以上の5段階に分け、各々10症例ずつについて抗ヒト免疫グロブリン添加時の反応好塩基球の出現率について検討をおこなった。

血清IgE値が0~100IU/mlの症例では、反応好塩基球の出現率は生理食塩水添加では平均4.5%、抗ヒトIgE添加では平均45%、抗ヒトIgG添加では平均27.5%であった。血清IgE値が101~300IU/mlの症例では反応好塩基球の出現率は生理食塩水添加では平均5%、抗ヒトIgE添加では平均47%、抗ヒトIgG添加では平均25%であった。同様に301~700IU/mlの症例では反応好塩基球の出現率は生理食塩水添加では平均5.5%、抗ヒトIgE添加では平均57%、抗ヒトIgG添加では平均21%であり、701~1000IU/mlの症例では反応好塩基球の出現率は生理食塩水添加では平均9.5%、抗ヒトIgE添加では平均63%、抗ヒトIgG添加では平均21%であった。また1001IU/ml以上の症例では反応好塩基球の出現率は生理食塩水添加では平均7%、抗ヒトIgE添加では平均73%、抗ヒトIgG添加では平均19%であった。

すなわち、抗ヒトIgE添加では血清IgE値が高値である症例ほど反応好塩基球の出現率が高度となる傾向にあり、血清IgE値が1001IU/ml以上の高値の症例は血清IgE値が100IU/ml以



するため、ハウスダストエキスの凍結乾燥末に生理食塩水を加えることにより $10^1 \sim 10^4$ 倍までの10倍希釈液を作製し、反応好塩基球の出現率および好塩基球の減少率を検討した。

ハウスダストが特異抗原である気管支喘息患者4例を対象に、ハウスダストエキスの濃度別添加による末梢血好塩基球の反応性について検討した。高濃度のハウスダストエキス(10倍希釈液)添加では好塩基球は著明に減少し、反応好塩基球の出現率も高度であった。しかし、10倍希釈液の添加では、1 cmm 中の好塩基球は3, 7, 0, 0個であり、平均2.5/cmm と高度に減少し、好塩基球を20個算定することが困難であった。一方、 $10^2$ 倍希釈液添加では1 cmm 中の好塩基球は13, 17, 10, 10個と平均12.5/cmm であったため好塩基球を20個算定することは容易であり、また反応好塩基球の出現率も10倍希釈液添加時は平均73.3%、 $10^2$ 倍希釈液添加の平均は73.8%とほとんど差異を認めず、また $10^3$

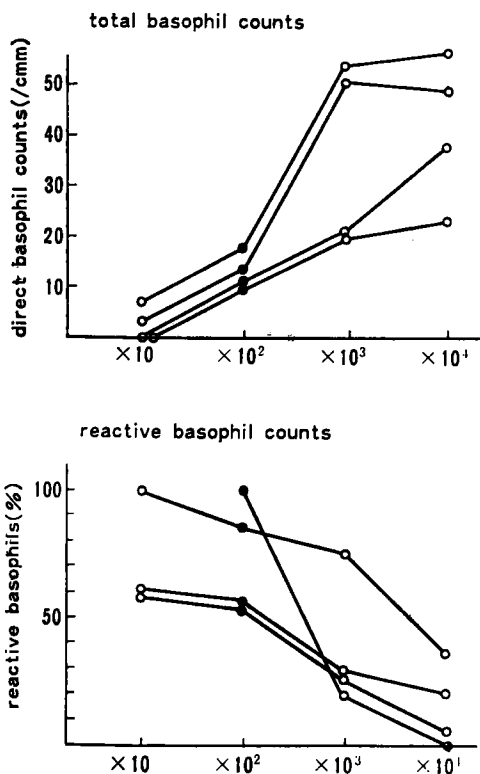


図5. Reactive Basophil Counts in Different Concentration of House Dust Allergen.

倍希釈液添加の平均は36.3%と低値を示した。すなわち、ハウスダストエキスに関しては $10^2$ 倍希釈液が至適添加濃度と考えられた(図5)。したがって以下の実験はハウスダストエキス $10^2$ 倍希釈液を使用して行った。

#### 第4節 気管支喘息における抗原添加時の反応好塩基球の出現率

##### 第1項 皮内反応閾値との関連

気管支喘息患者20例を対象に、ハウスダストの皮内反応閾値の程度とハウスダストエキス添加時の反応好塩基球の出現率について比較検討した。皮内反応閾値は $\times 10^3$ は5症例、 $\times 10^4$ は6症例、 $\times 10^5$ は6症例、 $\times 10^6$ は2症例、 $\times 10^7$ は1症例であった。その結果、皮内反応閾値が低い程反応好塩基球の出現率が高い傾向にあり、皮内反応閾値の程度と反応好塩基球の出現率との間に正の相関が認められた( $r=0.62$ ,  $p < 0.01$ )(図6)。

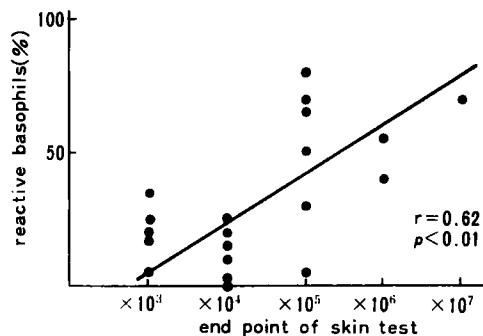


図6. Correlation between the Direct Reactive Basophil Counts and the End Point of the Skin Test for House Dust.

##### 第2項 気管支吸入誘発試験との関連

ハウスダストの気管支吸入誘発試験とハウスダストエキス添加時の反応好塩基球の出現率について比較検討をした。吸入誘発試験陰性14症例の反応好塩基球の出現率は0~40% (平均17.9%) と低率であった。一方吸入誘発試験陽性6症例の反応好塩基球の出現率は50~80% (平均65%) と高率であった。すなわち吸入誘発試験陽性例と陰性例の間には反応好塩基球の出現率に明らかな有意の差が存在し( $p < 0.001$ )、出現率50%以上はすべて陽性であり、ハウスダ

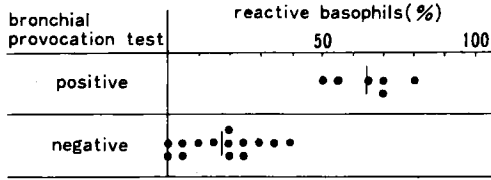


図7. Correlation between the Reactive Basophil Counts and Bronchial Provocation Test to House Dust.

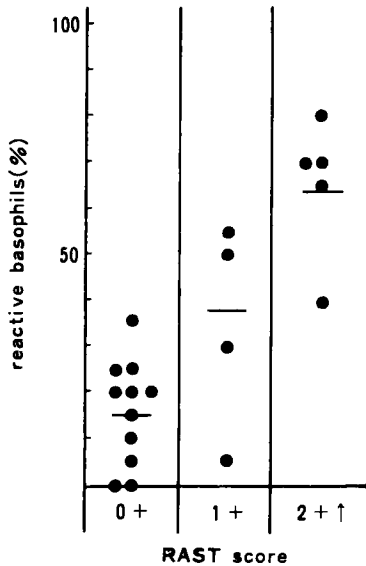


図8. Correlation between the Reactive Basophil Counts and the RAST Score to House Dust.

ストによる気管支吸入誘発試験と反応好塩基球の出現率の間には密接な関連が認められた(図7)。

### 第3項 RAST score との関連

ハウスダストの RAST score とハウスダストエキス添加時の反応好塩基球の出現率について検討した。RAST score 0+の気管支喘息患者11症例の反応好塩基球の出現率は平均15.9%であり、RAST score 1+の4症例の反応好塩基球の出現率は平均35%であった。さらに RAST score 2+以上の5症例については反応好塩基球の出現率は平均65%と高度であった。すなわち、ハウスダストエキス添加時の反応好塩基球の出現率と RAST score との間に密接な関連が認められ、特に RAST score 0+の症例と2

+以上の症例の反応好塩基球の出現率には明らかに有意の差が認められた ( $p < 0.001$ )(図8)。

### 総括並びに考案

著者は第1編で抗原抗体反応による好塩基球の形態的变化を数量的に観察する目的で、独自の方法で好塩基球を分離し、抗ヒト免疫グロブリン(抗ヒト IgE, 抗ヒト IgG)添加による好塩基球の反応性を塗沫標本上で光学顕微鏡下に観察し報告した。すなわちアトピー型気管支喘息や血清 IgE 値が高値を示す気管支喘息の末梢血好塩基球は抗ヒト IgG よりも抗ヒト IgE に対して高度な反応性を示し、またヒスタミン遊離も高度であった。かかる好塩基球の反応性の検討は気管支喘息の病型の把握に有用であると考えられるが、塗沫標本上での好塩基球の観察は手技がやや煩雑で長時間を必要とする。したがって著者は好塩基球の直接算定法による観察方法を考案し、好塩基球の反応性について検討を加えた。

塗沫標本上での反応好塩基球の観察と、直接算定法による観察との比較を、抗ヒト IgE 添加時の反応好塩基球の出現率について検討した結果、両者の出現率はほぼ一致しており、直接算定法が塗沫標本上の観察と同様に有意な方法であると考えられた。直接算定法による健康人における抗ヒト免疫グロブリン添加時の反応好塩基球の出現率は、抗ヒト IgE 添加で平均31.4%、抗ヒト IgG 添加で平均20.7%であり、いずれも低率であり、一方気管支喘息症例においては抗ヒト IgE 添加により反応好塩基球の有意の増加がかなりの症例で観察された。また気管支喘息における抗ヒト免疫グロブリン添加時の反応好塩基球の出現率を、血清 IgE 値別に5段階に分け比較検討すると、抗ヒト IgE 添加では血清 IgE 値が0~100 IU/ml の症例の反応好塩基球の出現率は平均45%であり、血清 IgE 値が1001 IU/ml 以上の症例では反応好塩基球の出現率は平均73%と高度であり、健康人および血清 IgE 値が低い症例との間には有意差が認められた。すなわち、一般に血清 IgE 値が高値を示す症例では、好塩基球の反応性も高度である傾向がみられた。一方抗ヒト IgG 添加時の反応好塩

基球の出現率は血清 IgE 値が0~100IU/ml の症例では平均27.5%, 血清 IgE 値が1001IU/ml 以上の症例は平均19%であり, 血清 IgE 値が低い症例がやや反応好塩基球の出現率が高度の傾向が認められたが有意差は認められなかった。これは第1編で考案したごとく, IgG は IgE の約100~1000倍の量<sup>10)</sup> が同量のヒスタミン遊離をおこすためには必要であること, かかる直接算定法では抗ヒト IgG 添加に関しては血清IgG が多量に存在することなども問題となると考えられる。したがって好塩基球の反応性を検討するにあたって抗ヒト IgG 添加についての反応好塩基球の観察は今後検討の必要性が残されている。

最近気管支喘息の減感作療法<sup>11)</sup>の有効性が一部に疑問視されている。それは1つにはアレルギー検索の手段の不十分さの影響もあると考えられる。気管支喘息の特異抗原を検出する方法としては, 皮内反応閾値, PK 反応, 気管支吸入誘発試験, 好塩基球からのヒスタミン遊離<sup>12,13)</sup>などの方法が行われている。皮内反応閾値による方法は皮膚の過敏性に影響されやすいこと, PK 反応による場合はサルあるいは近親者などの協力が必要なこと, 気管支吸入誘発試験は喘息大発作が誘発される危険性があるなどの問題点がある。またヒスタミン遊離試験<sup>14,15)</sup>も優れた抗原検索法の1つであるが, ヒスタミンを正確に定量する設備が必要である。

近年 *in vitro* でのアレルギー検索方法として RAST 法が普及してきている。RAST 法による特異的 IgE 抗体を検出することにより抗原を決定する方法は, 患者に対する負担が少なく非常に優れた方法である。しかしこの方法では血清中の特異的 IgE 抗体の測定により, 当該抗原に感作されていることは知り得るものの, 原因抗原であるかどうかの判断にはやや難点がある。すなわち, この方法によっては喘息発作, すなわち気道におけるアレルギー反応に, この抗原ないし特異的 IgE 抗体が関与していることは明らかにされ得ない。

Shelley ら<sup>16,17)</sup> が *in vitro* でペニシリンその他の薬剤アレルギーの検索方法として好塩基球脱顆粒試験を考案して以来, 薬剤アレルギー以

外にも食物アレルギー<sup>18)</sup>, 枯草熱, 気管支喘息などの抗原の検索方法<sup>19,20)</sup>として好塩基球の反応性を利用する方法が試みられている。今回著者は, 直接算定法を利用して新たに好塩基球の反応性を観察することにより, 特異抗原検索方法としての利用価値の可能性を検討した。直接算定法による成績は, ハウスダストの皮内反応閾値が低い症例程, ハウスダストエキスに対する好塩基球の反応性が強く, また気管支吸入誘発試験陽性6症例および RAST score 2+以上の5症例では反応好塩基球の出現率はいずれも平均65%と高度であった。すなわち, 気管支喘息患者の特異抗原に対する好塩基球の反応性と皮内反応閾値, 気管支吸入誘発試験および RAST score との間には, 密接な関連が認められ, 特に吸入誘発試験との間に関連を認めたことは気管支喘息の特異抗原の検出に好塩基球の反応性を利用した検索方法が有意義であることを物語る様に思われる。また直接算定法は操作が簡単であり短時間に多数の検体が判定でき, 好塩基球の非特異的損傷をさけることが可能であるため, 容易に日常臨床にも応用できる優れた抗原検索方法と考えられた。

## 結 語

気管支喘息患者62例, 健康人7例の末梢血好塩基球に, 抗ヒト免疫グロブリン (抗ヒト IgE および抗ヒト IgG), および抗原添加時の好塩基球の反応性を直接算定法で観察し, 以下の結果を得た。

1. 直接算定法による抗ヒト IgE 添加時の反応好塩基球の出現率は, 塗沫標本による成績とほぼ同様であった。
2. 健康人末梢血好塩基球の抗ヒト免疫グロブリンに対する反応性は低値であった。
3. 血清 IgE 値が高い症例の末梢血好塩基球は抗ヒト IgE に強く反応した。
4. アレルギー添加における好塩基球の反応性を検討する場合のハウスダストエキスの添加濃度の検討では,  $10^2$  倍希釈液が至適濃度と考えられた。
5. ハウスダストの皮内反応閾値が低い症例, 気管支吸入誘発試験陽性の症例, および RA-

ST score が高い症例程，特異抗原添加時の反応好塩基球の出現率は高度であり，皮内反応閾値，気管支吸入誘発試験，RAST score と好塩基球の反応性の間には密接な関連が認められた。

以上の結果より，直接算定法による好塩基球の反応性の検討は，操作が簡単であり，短時間で多数の検体が判定でき，特異抗原検索方法と

しても容易に日常臨床に応用できる方法と考えられた。

稿を終るにあたり，御指導御校閲を賜った恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表するとともに，終始御懇篤なる御指導を賜った三朝分院内科谷崎勝朗助教授に深謝いたします。

## 文 献

1. 木村郁郎，谷崎勝朗：気管支喘息における好塩基球の変動と発作閾値について—ステロイドホルモン投与時の変動を含めて—。アレルギー，19，605—612，1970。
2. Kimura, I., Moritani, Y. and Tanizaki, Y.: Basophils in bronchial asthma with reference to reagin-type allergy. *Clin. Allergy* 3, 195—202, 1973.
3. 木村郁郎，守谷欣明，谷崎勝朗，斉藤勝剛，高橋 清，上田暢男，佐藤周一：好塩基球の血管外への出現について—アレルギー反応局所を中心に—。日本血液学会雑誌，36，93—97，1973。
4. Kimura, I., Tanizaki, Y., Takahashi, K., Saito, K., Ueda, N. and Sato, S.: Emergence of basophils at sites of local allergic reactions using a skin vesicle test. *Clin. Allergy* 4, 281—290, 1974.
5. 木村郁郎，谷崎勝朗，佐藤周一，高橋 清，上田暢男，斉藤勝剛：アトピー型気管支喘息と好塩基球一位相差顕微鏡と微分干渉顕微鏡所見—。臨床免疫，6，1039—1047，1974。
6. 木村郁郎，谷崎勝朗，佐藤周一，上田暢男，高橋 清，斉藤勝剛，平木 潔：レアギン型アレルギー反応における好塩基球の形態的变化。アレルギー，23，682—691，1974。
7. 谷崎勝朗，佐々木良英，松岡 孝，高橋 清，木村郁郎：抗原刺激によるアトピー型気管支喘息患者好塩基球の経時的形態的变化一位相差顕微鏡映画による観察—。アレルギー，33，269—274，1984。
8. Kimura, I., Tanizaki, Y. and Sasaki, Y.: In vitro antigen-induced increase in motility and degranulation of basophilic granulocytes from atopic asthmatics, studied by microscopic motion pictures. *Int. Arch Allergy Appl. Immunol.* 75, 250—254, 1984.
9. 木村郁郎，谷崎勝朗：好塩基球および好酸球の適切な同時直接算定法の考案とその臨床的評価。医学のあゆみ，69，25—28，1969。
10. Ishizaka, T., DeBernando, R., Tomioka, H., Lichtenstein, L.M. and Ishizaka, K.: Identification of basophil granulocytes as a site of allergic histamine release. *J. Immunol.* 108, 1000—1008, 1972.
11. 木村郁郎，谷崎勝朗，斉藤勝剛，高橋 清，上田暢男，佐藤周一，合田吉徳：重症難治性喘息における臨床的検討—減感作療法の限界について—。臨床成人病，6，129—135，1976。
12. Lichtenstein, L.M., Levy, D.A. and Ishizaka, K.: In vitro reversed anaphylaxis: characteristics of anti-IgE mediated histamine release. *Immunology* 19, 831—842, 1970.
13. Siraganian, R.P.: Automated histamine release. A method for in vitro allergy diagnosis. *Int. Archs Allergy Appl. Immunol.* 49, 108—110, 1975.
14. Radermecker, M.F.: Allergen-mediated histamine release from whole blood. clinical evaluation. *Int. Archs Allergy Appl. Immunol.* 63, 415—423, 1980.
15. Tanizaki, Y., Komagoe, H., Morinaga, H., Kitani, H., Goda, Y. and Kimura, I.: Allergen- and Anti-IgE-induced histamine release from whole blood. *Int. Archs Allergy Appl. Immunol.* 73, 141



- 145, 1984.
16. Shelley, W.B. and Juhlin, L.: A new test for detecting anaphylactic sensitivity: The basophil reaction. *Nature* **195**, 1056—1058, 1961.
  17. Shelley, W.B.: New serological test for allergy in man. *Nature* **195**, 1181—1183, 1962.
  18. Soifer, M.M. and Hirsh, S.R.: The direct basophil degranulation test and the intracutaneous test: A comparison using food extracts. *J. Allergy Clin. Immunol.* **56**, 127—132, 1975.
  19. Haye, K.R., Cooper, J.R. and Cruickshank, C.N.D.: Studies of the degranulation of human basophil leucocytes in vitro. *Br. J. Dermatol.* **80**, 811—820, 1968.
  20. Hirsh, S.R. and Zastrous, J.E.: Basophil degranulation: A new method of observation and its correlation with skin testing. *J. Allergy Clin. Immunol.* **50**, 338—347, 1972.

**Studies on Basophil Reactivity****Part II. Observations of reactive basophils by a direct counting method****Yoshinori GODA****Second Department of Medicine, Okayama University Medical School****(Director: Prof. Ikuro Kimura)**

Morphological changes of basophils stimulated by anti-IgE, anti-IgG and an specific antigen were observed in 62 asthmatic and 7 healthy subjects by direct counting.

The percentage of anti-IgE induced reactive basophils determined by the direct counting method was similar to that by the smear method. Basophil reactivity to both anti-IgE and anti-IgG was low in the healthy subjects. Basophils from asthmatic subjects with a high serum IgE level reacted strongly to anti-IgE. The optimal concentration of house dust for observing reactive basophils was a  $10^2$ -fold dilution of the extract. The percentage of reactive basophils induced by house dust correlated with the skin end point, the RAST score and the bronchial challenge test in asthmatic subjects sensitive to the corresponding antigen.

These results suggest that observation of morphological changes by the direct counting method is useful for in vitro detection of specific antigens.