

遅発型気道反応における IgG サブクラス抗体に関する研究

第 1 編

血清中抗原特異的 IgG サブクラス抗体と遅発型気道反応の関連について

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

小栗 栖 和 郎

(平成 4 年 4 月 23 日受稿)

Key words: 遅発型気道反応, IgG サブクラス抗体, IgE 抗体, 抗原吸入誘発試験, 難治性喘息

緒 言

近年石坂ら¹⁾²⁾により発見された IgE 抗体を介する好塩基球・肥満細胞系からの chemical mediator 遊離機序が解明³⁾され, 気管支喘息の発症機序の一端が明らかにされた。しかし, 喘息病態を詳細に検討すると重症あるいは難治性喘息においては IgE 抗体だけでは説明困難な症例が多い。かかる観点から, 木村ら⁴⁾⁵⁾は, IgE 抗体が高値で小児期に発症するいわゆるアトピー型喘息に対し, 中高年以降に初めて発症する場合は IgE 抗体は低値で非季節性・通年性発作を反復し重症難治化しやすく, かかるステロイド依存性喘息の病態を「中高年発症型難治性喘息」という概念として提唱し, IgE 抗体以外に IgG 抗体を介する反応系を有する気管支喘息群の存在を示唆した。さらに近年この重症あるいは難治性喘息の病態に, 抗原特異的 IgG 抗体並びにリンパ球の関与が想定される成績を得ている⁶⁾。

一方, 気管支喘息患者に抗原吸入誘発試験を行った際, その直後に出現する即時型気道反応 (immediate asthmatic response, IAR) の他に, 抗原吸入後約 3-10 時間後に出現する気道反応を Pepys ら⁷⁾は遅発型気道反応 (late asthmatic response, LAR) と提唱し, その発症機序として I 型あるいは III 型アレルギーの関与も想定している。かかる LAR は, 発作が強いか

つ長時間持続し治療に抵抗性で重症あるいは難治性喘息の臨床像に類似している⁸⁾。そこで本編では, LAR については重症あるいは難治性喘息の発症機序に係わるアレルギー反応様式を解明する目的で, 血清中の抗原特異的な IgE 抗体, 総 IgG 抗体, IgG サブクラス抗体と気管支喘息患者にハウスダスト及びカンジダ抗原吸入誘発試験を行い, その際に惹起された LAR を中心とした気道反応との関連について検討した。

対象と方法

1. 対象症例とその背景因子

岡山大学第 2 内科呼吸器外来を受診中あるいは入院中の気管支喘息患者の中でハウスダストまたはカンジダによる皮膚反応陽性の各々 30 例及び 28 例と, 対照として健常人 52 例 (男性 33 例, 女性 19 例, 平均年齢 32 歳 (18-63 歳)) を対象とした。ハウスダストによる皮膚反応で即時, 遅発, 遅延型反応のいずれかが陽性を示した 30 例とカンジダに即時, 遅発, 遅延型反応のいずれかが陽性の 28 例について後述のごとく血清中 IgG 及びそのサブクラスの測定を行い, 又採血後アレルギー学会の標準法⁹⁾に準じて抗原吸入試験を施行した。即ち抗原吸入時より経時的に FEV_{1.0} (forced expiratory volume in one second) を pulmonary function indicator (米国 NCG 社製) により, また peak expiratory flow rate

(PEFR) を minilight peak flow meter (英国クレメント・クラーク社製) にて測定し、FEV_{1.0} または PEFR が 20% 以上低下した場合を気道反応陽性とした。抗原吸入後 1 時間以内に陽性を示した場合を即時型気道反応 (immediate asthmatic response, IAR)、3 時間以上 10 時間以内に陽性を示した場合を遅発型気道反応 (late asthmatic response, LAR) とした。また IAR 出現後再び LAR の出現した症例は二相性気道反応 (dual asthmatic response, DAR) と分類した⁸⁾。

2. 血清中抗原特異的総 IgG 及び IgG1, IgG2, IgG3 抗体の測定

抗原特異的総 IgG 及び IgG サブクラス抗体の測定は、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾ に比べ、より高感度の avidin-biotin ELISA 法¹³⁾ を応用し以下の如く行った。

1) ダニ (*Dermatophagoides farinae*) 及びカンジダ (*Candida albicans*) 抗原凍乾末 (鳥居薬品製) を 0.05M phosphate buffer saline (PBS), pH7.4 にてそれぞれ 10 μ g/ml, 50 μ g/ml の濃度に溶解し、その 100 μ l を 96 穴の polystyrene microtiter plate (Data Packaging Corporation) の各 well に注入し 4 $^{\circ}$ C にて overnight 静置後、washing buffer (0.05% Tween 20 を含む 0.05M PBS) で 3 回洗浄した。その後、非特異的結合を防ぐ目的で 2% bovine serum albumin (以下 BSA) を各 well に 200 μ l 注入し、37 $^{\circ}$ C、1 時間 incubation 後、washing buffer にて 3 回洗浄した。

2) 被検血清はダニ特異的総 IgG, IgG 1 抗体測定時にはそれぞれ 500 倍に希釈し、カンジダ特異的総 IgG, IgG 1, IgG 2, IgG 3 抗体測定時にはそれぞれ 16,000 倍, 4,000 倍, 1,000 倍, 250 倍に希釈した。それぞれ各 well に 100 μ l ずつ注入し 4 $^{\circ}$ C にて overnight 静置後、washing buffer にて 3 回洗浄した。

3) 洗浄後、一次抗体としてマウス抗ヒト IgG 抗体 (Immunotech: 8 a 4), マウス抗ヒト IgG 1 抗体 (Yamasa: AGB52-3), マウス抗ヒト IgG 2 抗体 (Immunotech: GOM 1), マウス抗ヒト IgG 3 抗体 (Immunotech: ZG 4) を dilution

buffer (0.02% NaN₃ を含む 2% BSA) にて希釈し、50 μ l ずつ各 well に注入し 37 $^{\circ}$ C、1 時間 incubate した。

4) washing buffer にて 3 回洗浄後、二次抗体としてビオチン化抗マウス IgG1 抗体 (Immunotech: 4 M 2-274.20) を、一次抗体がマウス抗ヒト IgG 3 抗体の場合には 400 倍に、その他の場合には 200 倍に希釈して各 well に 50 μ l ずつ注入し 37 $^{\circ}$ C、1 時間 incubate した。

5) washing buffer にて 3 回洗浄後ビオチン化ペルオキシダーゼアビジン複合体 (Vector 社: Vectastain) を PBS にて 100 倍希釈したものを 50 μ l ずつ各 well に注入し室温にて 10 分間静置した。

6) washing buffer にて 3 回洗浄後、substrate (0.1M citrate phosphate buffer pH5.0 100ml, orthophenylenediamine 40mg, 31% H₂O₂ 40 μ l) を 100 μ l ずつ各 well に注入した。

7) 室温にて 15 分間静置後、2 N H₂SO₄ を 100 μ l ずつ各 well に追加注入して反応停止後、EIA reader (BIO-RAD) にて 492nm の吸光度を測定した。

3. 抗原特異的 IgG 4 抗体の測定

基本的には前項と同様の操作であるが、ダニ及びカンジダ抗原液は共に 50 μ g/ml の濃度とし、被検血清は 4 倍に希釈し、一次抗体のマウス抗ヒト IgG 4 抗体 (Yamasa: DG-01) は 100 倍に希釈して二次抗体のビオチン化抗マウス IgG 1 抗体 (Immunotech: 4 M 2-274.20) を 100 倍に希釈した。

4. 判 定

各 IgG サブクラス値はすべて duplicate で測定し、被検血清の希釈に用いた PBS を back ground として差し引いた O.D. 値で表した。

5. IgE 抗体の測定

血清中総 IgE 抗体は RIST 法 (Pharmacia Fine Chemicals 製) で、ダニ及びカンジダ特異的 IgE 抗体は RAST 法 (Pharmacia Fine Chemicals 製) で測定した。

なお推計学的検討には、平均値は student-t 検定を、百分率の比較には χ^2 検定を用いた。

結 果

1. avidin-biotin ELISA 法による IgG サブクラス抗体測定法の検討

1) 至適抗原濃度と至適血清希釈度

ダニあるいはカンジダ抗原を5から100 μ g/mlの希釈濃度系列として microplate に coat し、1倍から32,000倍までの各抗体測定用標準血清の希釈濃度系列を作成し、特異的総 IgG, IgG サブクラス抗体測定時の至適抗原濃度と至適血清希釈度を検討した。その結果、至適抗原濃度はダニ特異的総 IgG, IgG 1 抗体測定時は10 μ g/ml, IgG 4 抗体の場合は50 μ g/mlで、カンジダ特異的総 IgG, IgG 1, IgG 2, IgG 3 抗体測定時は50 μ g/ml, IgG 4 抗体の場合は100 μ g/mlであった。至適血清希釈度は、ダニ特異的総 IgG, IgG 1, IgG 4 抗体測定時はそれぞれ500倍, 500倍, 4倍で、カンジダ特異的総 IgG, IgG 1, IgG 2, IgG 3, IgG 4 抗体測定時は、それぞれ16,000倍, 4,000倍, 1,000倍, 250倍, 4倍であった。

2) 至適抗ヒト IgG サブクラス抗体濃度

抗ヒト IgG, IgG 1, IgG 4 抗体を上記の条件で検討したところ、ダニについては抗ヒト IgG, IgG 1, IgG 4 抗体は、それぞれ200倍, 200倍, 100倍で、またカンジダについては、抗ヒト IgG, IgG 1, IgG 2, IgG 3, IgG 4 抗体はそれぞれ200倍, 200倍, 200倍, 200倍, 100倍で O.D._{492nm} が 1.0前後でありこれを至適濃度とした。

3) ダニ、カンジダ抗原による抑制試験

この測定系がダニ、カンジダに対する特異的総 IgG, IgG サブクラス抗体を正確に検出しているか否かを検討するために抑制試験を行った。すなわちダニ、カンジダ抗原を、各々1,000から0.01 μ g/mlの各濃度に調整しダニ特異的総 IgG, IgG 1, IgG 4 抗体についてはそれぞれ250倍, 250倍, 2倍, カンジダ特異的 IgG, IgG 1, IgG 2, IgG 3, IgG 4 抗体については8,000倍, 2,000倍, 500倍, 125倍, 2倍に希釈した標準血清に等量混和し、37 $^{\circ}$ C, 2時間 incubate した後、その100 μ l を上述の至適抗原濃度で coat しておいた microplate の各 well に注入した。その後 ELISA にて各抗原の総 IgG, IgG サブクラス抗体を測定したところ、添加した抗原量に dose-dependent

に抑制された。吸光度より算出した各々の総 IgG, IgG サブクラス抗体の50% inhibition に要した抗原量はダニの場合はすべて0.5ng, カンジダの場合 IgG, IgG 1 が0.5ng, IgG 2, IgG 3, IgG 4 が5ngであった。

2. 健常人及び気管支喘息患者群における血清中抗原特異的 IgG サブクラス抗体の検討

1) 血清中ダニ及びカンジダ特異的 IgG サブクラス抗体

ハウスダスト抗原吸入症例のダニ特異的総 IgG, IgG 1 抗体は健常人に比して有意に高値を示した ($p < 0.01$) (Table 1)。カンジダ特異的 IgG 抗体も、Table 2 に示すごとくカンジダ特異的総 IgG, IgG 1 抗体が健常人に比してカンジダ抗原吸入症例において有意に高値を示した ($p < 0.01$)。

2) 血清中ダニ及びカンジダ特異的 IgG 1 抗体価別による気道反応の検討

抗原吸入予定の気管支喘息群を健常人の抗原特異的 IgG 1 抗体価の平均値 (M) 及び標準偏差 (SD) により A 群 (M + 2 SD 以上) と B 群 (M + 2 SD 未満) 2 群に分類し A 群と B 群における気道反応の比率について比較検討した。ハウスダスト抗原吸入誘発症例では Fig. 1 のごとく A 群 (n=14) に DAR 57.1% (8/14), LAR 42.9% (6/14), 一方 B 群 (n=16) に、DAR 25.0% (4/16), LAR 18.1% (3/16) 認められ、A 群では何れにしても LAR は DAR を含め100%を占め、これは B 群に比して有意に高率であった ($p < 0.01$)。また IAR 及び NR 症例はすべて B 群に属していた。カンジダ抗原吸入誘発症例では Fig. 2 のごとく A 群 (n=16) に DAR 25.0% (4/16), LAR 62.5% (10/16), 一方 B 群 (n=12) に DAR 25.0% (3/12), LAR 0% (0/12) であり、A 群の LAR 62.5%及び DAR を含めた LAR 87.5%は、B 群に比して共に有意に高率であった (共に $p < 0.01$)。

3. 気道反応別にみた血清免疫グロブリンの検討

次に抗原吸入試験の結果からみた気道反応様式と血清免疫グロブリンの関係について検討した。先ず誘発された反応型をまとめて検討を行

Table 1 Serum IgG subclass antibodies to mite in bronchial asthmatics who were tested with inhalation of house dust antigen and healthy subjects.

	IgG	IgG 1	IgG 4
Bronchial asthmatics (n=30)	0.61±0.49	0.36±0.46	0.09±0.14
Healthy subjects (n=52)	0.14±0.07	0.08±0.04	0.05±0.04

* p<0.01

Table 2 Serum IgG subclass antibodies to Candida antigen in bronchial asthmatics who were tested with inhalation of Candida antigen and healthy subjects.

	IgG	IgG 1	IgG 2	IgG 3	IgG 4
Bronchial asthmatics (n=28)	0.69±0.53	0.68±0.51	0.08±0.12	0.20±0.35	0.40±0.46
Healthy subjects (n=52)	0.19±0.10	0.29±0.14	0.02±0.10	0.10±0.10	0.25±0.10

* p<0.01

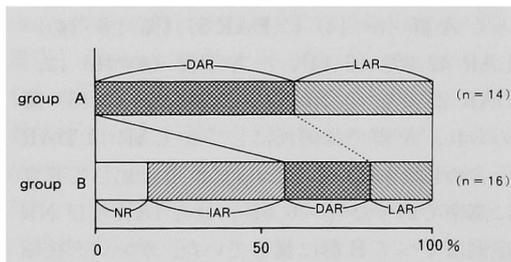


Fig. 1 Percentages of bronchial responses after inhalation of house dust antigen in group A and group B.

NR : non-responder, IAR : immediate asthmatic response, DAR : dual asthmatic response, LAR : late asthmatic response

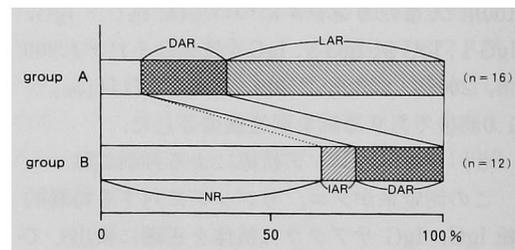


Fig. 2 Percentages of bronchial responses after inhalation of Candida antigen in group A and group B.

NR : non-responder, IAR : immediate asthmatic response, DAR : dual asthmatic response, LAR : late asthmatic response

った。

即ちその反応様式により、ハウスダスト抗原吸入症例は無反応 (non-responder, NR) 群 3 例, 即時型気道反応 (IAR) 群 6 例, 遅発型気道反応 (LAR) 群 9 例, 二相性気道反応 (DAR)

群 12 例に分類され, 又各群の背景因子として現年齢, 発症年齢, 罹病期間を検討したところ, 現年齢については LAR, DAR 群に比して IAR 群でやや低い傾向が認められた。また発症年齢については, IAR 群では全例若年発症型 (40歳

未満の発症)であったが, LAR 群では 3 例, DAR 群で 2 例に 40 歳以降の発症が認められた (Table 3).

カンジダ抗原吸入試験では, 気道反応を示さない NR 症例は 10 例で, IAR を呈する症例は 1 例に認められ, LAR は 10 例, DAR は 7 例であり, 又 NR, IAR, LAR, DAR 各群の現年齢, 発症年齢, 罹病期間を検討したがいずれも各群間で有意差は認められなかった (Table 4).

1) 気道反応と血清中抗原特異的総 IgG, IgG サブクラス抗体

ハウスダスト抗原吸入症例の各気道反応別の血清ダニ特異的総 IgG 抗体, IgG 1 抗体, IgG 4 抗体を検討したところ, Fig. 3 のごとく LAR 群 9 例では, IAR 群 6 例及び NR 群 3 例に比べ血清ダニ特異的総 IgG, IgG 1 抗体が有意に高値を示した (各々 $p < 0.05$, $p < 0.01$). また,

DAR 群 12 例でも同様に血清ダニ特異的 IgG 1 抗体が IAR 群に比べ有意に高値を示した ($p < 0.05$).

同様にカンジダ抗原吸入症例の各気道反応別の血清カンジダ特異的総 IgG 抗体とそのサブクラス抗体については, LAR を呈した群 10 例では, NR 群 10 例に比べて血清カンジダ特異的総 IgG, IgG 1 抗体が有意に高値を示した (共に, $p < 0.01$). また, DAR 群 7 例でも NR 群に比べて血清カンジダ特異的 IgG 1 抗体が有意に高値を示した ($p < 0.05$) (Fig. 4).

2) 気道反応と血清 IgE 抗体

ハウスダスト抗原吸入症例の血清 IgE (RIST) 値は, Fig. 5 のごとく気道反応陽性の各群に比し NR 群で低い傾向が認められた. 一方ハウスダストおよびダニの IgE RAST score においては, 各群間で有意差はないものの LAR 群で

Table 3 Characteristics of bronchial asthmatics who were tested with inhalation of house dust antigen.

	NR	IAR	DAR	LAR
No. of cases	3	6	12	9
Male/female	1/2	4/2	4/8	3/6
Age (yr)	29 (28~29)	24 (13~51)	35 (18~53)	42 (19~60)
Age at onset (yr)	18 (10~28)	10 (1~18)	23 (3~44)	27 (2~49)
Duration of morbidity (yr)	11 (3~18)	14 (0~41)	12 (1~21)	15 (6~33)

NR : non-responder, IAR : immediate asthmatic response,
DAR : dual asthmatic response, LAR : late asthmatic response

Table 4 Characteristics of bronchial asthmatics who were tested with inhalation of Candida antigen.

	NR	IAR	DAR	LAR
No. of cases	10	1	7	10
Male/female	7/3	1/0	4/3	9/1
Age (yr)	39 (9~77)	46	38 (32~51)	40 (25~55)
Age at onset (yr)	34 (6~74)	36	26 (6~48)	34 (18~49)
Duration of morbidity (yr)	5 (1~12)	10	12 (3~33)	7 (3~15)

NR : non-responder, IAR : immediate asthmatic response,
DAR : dual asthmatic response, LAR : late asthmatic response

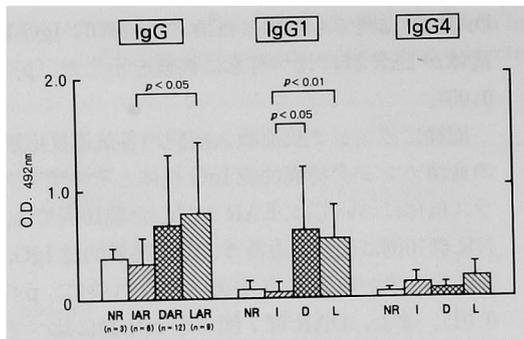


Fig. 3 Relation between asthmatic responses after inhalation of house dust antigen and serum specific IgG and IgG subclass antibodies to house dust mite. In asthmatics with LAR, serum levels of antigen-specific IgG and IgG1 antibodies were significantly higher than those in asthmatics with IAR ($p < 0.01$).
NR : non-responder, IAR : immediate asthmatic response, DAR : dual asthmatic response, LAR : late asthmatic response

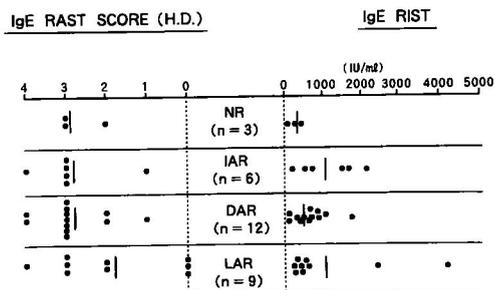


Fig. 5 IgE RAST to house dust (left) and IgE RIST (right) in bronchial asthmatics who were tested with inhalation of house dust antigen. In asthmatics with LAR, serum levels of IgE antibody to house dust antigen were slightly lower than those in asthmatics with IAR and non-responders (not significant).
NR : non-responder, IAR : immediate asthmatic response, DAR : dual asthmatic response, LAR : late asthmatic response

は後述のカンジダの場合より一般に高値であるが9例中3例が陰性で他群に比べて低い傾向があった。

カンジダ抗原吸入症例の NR, IAR, LAR,

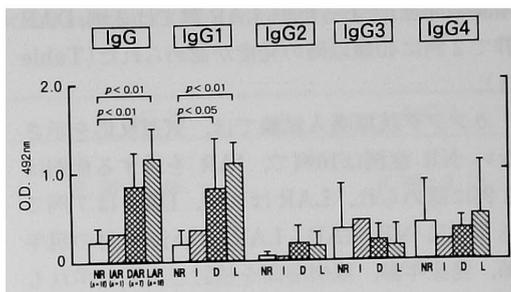


Fig. 4 Relation between asthmatic responses after inhalation of *Candida* antigen and serum specific IgG and IgG subclass antibodies to *Candida* antigen. In asthmatics with LAR, serum levels of antigen-specific IgG and IgG1 antibodies were significantly higher than those in non-responders ($p < 0.01$).
NR : non-responder, IAR : immediate asthmatic response, DAR : dual asthmatic response, LAR : late asthmatic response

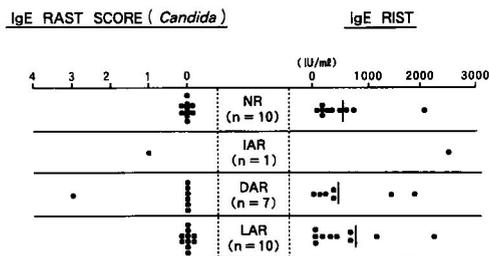


Fig. 6 IgE RAST to *Candida* antigen (left) and IgE RIST (right) in bronchial asthmatics who were tested with inhalation of *Candida* antigen. In asthmatics with LAR, serum levels of IgE antibody to *Candida* antigen were slightly lower than those in asthmatics without LAR.
NR : non-responder, IAR : immediate asthmatic response, DAR : dual asthmatic response, LAR : late asthmatic response

DAR 群の血清 IgE 抗体を検討すると、血清 IgE (RIST) 値については各群とも高い症例が含まれ、差は認められなかった。またカンジダ特異的 IgE RAST score は DAR 症例の 1 例が陽性、IAR 症例が弱陽性で他はすべて陰性であった (Fig. 6)。

考 察

難治性喘息の病態解明の一環として血清中抗原特異的免疫グロブリンと難治性喘息のモデルと考えられる抗原吸入誘発試験⁹⁾により惹起される遅発型気道反応⁸⁾¹⁴⁾¹⁵⁾との関連性を検討する目的で、抗原特異的 IgG サブクラス抗体測定用の avidin-biotin ELISA 法を確立し、健康人及び気管支喘息群のダニ及びカンジダ特異的 IgG サブクラス抗体を測定検討した。その結果、健康人に比し、気管支喘息群ではダニ及びカンジダ特異的総 IgG, IgG 1 抗体が有意に高値であった。さらに健康人の IgG 1 抗体価により気管支喘息群を A 群 (IgG 1 抗体高値群)、B 群 (IgG 1 抗体非高値群) に分類したところ、ハウスダストで抗原吸入誘発を行った場合 A 群では DAR を含めた LAR が100%を占め、B 群より有意に高率であった ($p < 0.01$)。また、カンジダ抗原吸入誘発を行った場合 A 群では LAR 62.5% 及び DAR を含めた LAR 87.5%は、B 群に比して共に有意に高率であった ($p < 0.01$)。一方、各気道反応別に血清中免疫グロブリンを検討した場合でもダニ及びカンジダ共に LAR 群では IAR または NR 群に比して血清中抗原特異的総 IgG, IgG 1 抗体が有意に高値を示した ($p < 0.01$)。さらに IgE 抗体は、ハウスダスト抗原吸入にて LAR を呈した9例のうち3例がハウスダストの IgE RAST score 0 で、有意ではないものの IAR, DAR 症例に比し低値を示す傾向があった。カンジダ抗原吸入誘発にて気道反応を呈した18症例については DAR の1例のみが IgE RAST score 陽性、IAR の1例が弱陽性で他のすべては陰性であった。

今回の成績では、ハウスダスト及びカンジダ喘息において、その LAR 群の血清中の抗原特異的 IgG 抗体特に IgG 1 抗体が IAR または NR 群に比して有意に高値を示したが、他のサブクラスである IgG 2, IgG 3, IgG 4 抗体には差のないことが判明した。さらに IgE 抗体については LAR 症例、特にハウスダスト・ダニよりもカンジダ喘息に低値であったことより、ハウスダスト・ダニ喘息では、その発症にダニ IgE 抗体が密接に関連するが、カンジダ喘息では関与

が認め難くむしろ IgG 1 抗体の関与が示唆された。一方 LAR の機序における IgG 抗体の関与については、これまでにハウスダスト・ダニ喘息においてダニ抗原吸入による LAR 症例で、血清ダニ特異的総 IgG 及び IgG 1 抗体が高値¹⁶⁾であり、カンジダ喘息においても LAR 症例でカンジダ沈降抗体⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾の関与を示唆する報告がある。また、高橋らが考案した免疫走査電顕法²⁰⁾を用いた好塩基球表面免疫グロブリンの検討により、LAR 症例においては好塩基球表面に IgE 抗体よりも IgG 特に IgG 1 抗体が優位に結合しており、特にハウスダスト喘息よりもカンジダ喘息においてより顕著であることが岡田ら²¹⁾²²⁾²³⁾により明らかにされている。

一方気管支肺胞洗浄法²⁴⁾を用いて、LAR における各種細胞因子を検討した難波ら²⁵⁾の研究により、LAR の発症には好酸球²⁶⁾のみならず好中球、好塩基球・肥満細胞系の関与することが示されており、またかかる好中球からの IgG 抗体を介した leukotrienes の産生能は重症及び難治群で亢進していることが高橋ら²⁷⁾により明らかにされた。これに加えて leukotriene B₄は、好酸球及び好中球の Fcγ レセプターの expression を増加させる作用が認められており²⁸⁾、活性化好酸球である低比重好酸球に Fcγ レセプターが発現しているという報告²⁹⁾もある。また Barnes ら³⁰⁾は気管支喘息患者の気道炎症あるいは気道過敏性の亢進に axon reflex が関与しているとし、特に神経ペプチドの一つであるサブスタンス P が重要な役割を果たしていると考えているが、このサブスタンス P 自体好酸球の Fcε レセプター及び Fcγ レセプターの expression を増加させる作用があり³¹⁾、重症及び難治性喘息の発症の多用性を考える上で興味深い。さらに、Stain ら³²⁾により好塩基球にも Fcγ R II が局在することが判明している。これらの事実は重症及び難治性喘息あるいは LAR の発症に好中球、好酸球及び好塩基球・肥満細胞系が関与し、これらの細胞の活性化に IgG、特に IgG 1 抗体が作動していることを強く示唆させる。今回カンジダ抗原吸入試験により気道反応を呈した18症例中17例が DAR を含む LAR を呈し、カンジダ抗原の関与する気管支喘息は IgE 抗体よりも IgG

抗体を介する反応系を有し、より重症化しやすいことが想定された。

かかる病態に関与すると思われる血清中免疫グロブリンの産生には種々の cytokines の関与が明らかになりつつあるが、IgE 抗体産生に対し interleukin-4 (以下 IL-4) が促進的に作用することが明らかとなり、いわゆるアトピーの本質は特定の抗原に対する IL-4 の過剰産生であると考えられるようになってきた³³⁾。これに対し IgG 抗体の産生には、マウスではあるが IL-4 は抑制的に或は低濃度では促進的に作用するという報告³⁴⁾がある。また、interferon γ は、IgE 抗体産生に対し IL-4 と拮抗して抑制的に作用するという報告³⁵⁾もある。いずれにしても IgE 及び IgG 抗体産生のメカニズムは特にヒトにおいては未だ明確にされていない。しかしながら IgG 抗体の関与を認める気管支喘息群においては、ダニ、カンジダなどによって抗原に対する helper T 細胞を中心とした cytokines の産生が異なることも想定され、特定の抗原に対して IgE 抗体産生よりも IgG 抗体、特に IgG 1 抗体産生へ class switch が起こりやすくなっているということが気管支喘息の重症難治化をもたらすとも考えられ、今後抗原に対する種々の cytokines の産生態度についても検討を加える必要があろう。

最後に avidin-biotin ELISA 法は特異性及び測定感度ともに優れた方法であるが、カンジダ抗原にはマンナン及び約26種類の蛋白抗原が存在すると言われ、また全身性カンジダ症などカンジダの関与する種々の病態によって特定の抗原が関与することも想定され³⁶⁾、今後カンジダ精製抗原を用いた検討も必要になってくると思われる。

結 論

非アトピー型喘息や中高年発症型難治性喘息の機序に IgG 抗体やリンパ球の関与が想定されているが、今回抗原特異的 IgG サブクラス及び

IgE 抗体と難治性喘息の発作モデルと考えられる遅発型気道反応との関連性を検討した。

1. ハウスダスト・ダニあるいはカンジダ喘息患者の血清中抗原特異的 IgG 抗体とそのサブクラスを測定するための avidin-biotin ELISA 法を確立した。

2. 気管支喘息群では健康人に比し血清中抗原特異的総 IgG, IgG 1 抗体が有意に高値であった (共に $p < 0.01$)。

3. 健康人の血清中抗原特異的 IgG 1 抗体価により、抗原吸入した気管支喘息群を IgG 1 抗体高値群 (A 群) と IgG 1 抗体非高値群 (B 群) に分類して検討したところ、ハウスダスト抗原吸入症例では A 群の DAR を含めた LAR 症例は 100% であり、B 群に比して有意に高率であった ($p < 0.01$)。カンジダ抗原吸入症例では、A 群の LAR 62.5% 及び DAR を含めた LAR 87.5% は、B 群に比して共に有意に高率であった (共に $p < 0.01$)。

4. ハウスダスト・ダニ及びカンジダ抗原吸入症例共に LAR を呈した群をみると血清中抗原特異的総 IgG, IgG 1 抗体が IAR または NR 群に比し有意に高値を示し、特にカンジダにおいて顕著であった ($p < 0.01$)。

5. 抗原特異的 IgE 抗体については、ハウスダスト・ダニによる LAR 症例は IAR 症例に比して低値をとる傾向があった。カンジダによる LAR 症例では IgE 抗体は全例で陰性であった。

以上、ハウスダスト・ダニまたはカンジダ抗原吸入後に惹起される LAR の機序に抗原特異的 IgG 抗体、特に IgG 1 抗体の関与が示唆された。

稿を終えるにあたり、終始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共に、直接御指導戴いた高橋 清講師に深謝いたします。

(本論文の要旨は、第29回日本胸部疾患学会総会及び第39回日本アレルギー学会総会において発表された。)

文 献

- 1) Ishizaka K and Ishizaka T: Identification of γ E antibodies as a carrier of reaginic activity. J

- Immunol (1967) **99**, 1187—1198.
- 2) Ishizaka T, Tomioka H and Ishizaka K : Degranulation of human basophil leukocytes by anti- γ E antibody. J Immunol (1970) **106**, 705—710.
 - 3) Lichtenstein LM, Levy DA and Ishizaka K : In vitro reversed anaphylaxis : Characteristics of anti-IgE mediated histamine release. Immunology (1970) **19**, 831—842.
 - 4) 木村郁郎 : 喘息の病型とその本質論 — 中高年発症型難治性喘息の独立性. 日胸疾患会誌 (1983) **21**, 181—182.
 - 5) Kimura I, Tanizaki Y, Saito S and Takahashi K : Differences in response to anti-IgE and to anti-IgG in basophils from patients with bronchial asthma. Clin Allergy (1981) **11**, 31—36.
 - 6) 木村郁郎 : 遅発アレルギーの発症機序 — 細胞反応を中心に — ; 第3回免疫薬理シンポジウム記録集, 富岡玖夫編, デー・エム・ペー・ジャパン, 東京 (1985) pp23—40.
 - 7) Pepys J, Faux JA, Longbottom JL, McCarthy DS and Hargreave FE : Candida albicans precipitins in respiratory disease. J Allergy (1968) **41**, 305—318.
 - 8) Pepys J and Hutchcroft BJ : Bronchial provocation tests in etiologic diagnosis and analysis of asthma. Am Rev Respir Dis (1975) **3**, 829—859.
 - 9) 牧野荘平, 小林節雄, 宮本昭正, 信太隆夫, 高橋昭三, 可部順三郎, 中島重徳 : 気管支喘息および過敏性肺臓炎における吸入試験の標準法. アレルギー (1982) **31**, 1074—1076.
 - 10) Engvall E and Perlmann P : Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. J Immunol (1972) **109**, 129—135.
 - 11) 阿南貞雄, 赤星吉徳, 吉村正子, 牛島信雄, 吉田彦太郎, 松山 俊, 神田源太 : アトピー性皮膚炎における enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いた抗ダニ (Dermatophagoides farinae) 抗体の測定 — 特に IgG, IgG subclass および IgE 抗体について. アレルギー (1982) **31**, 244—251.
 - 12) 飯倉洋治, 永倉俊和, 秋本憲一, 岩原順子, 植草 忠, 恩田威文 : 小児アレルギー性疾患に対する特異 IgE, IgG 抗体の研究. 第1編アトピー性皮膚炎における卵白, 牛乳, 大豆特異 IgE, IgG, IgG 4 抗体測定の意義. アレルギー (1987) **36**, 921—930.
 - 13) Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S : The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. J Histochem Cytochem (1979) **27**, 1131—1139.
 - 14) Pepys J, Hargreave FEM, Chan M and McCarthy DS : Inhibitory effects of disodium cromoglycate on allergen-inhalation test. Lancet (1968) **ii**, 134—137.
 - 15) Booij-Noord H, Oride NGM and de Vries K : Immediate and late bronchial obstructive reactions to inhalation of house dust and protective effects of disodium cromoglycate and prednisolon. J Allergy Clin Immunol (1971) **48**, 344—354.
 - 16) 伊藤幸治, 工藤宏一郎, 奥平博一, 吉野谷定美, 森田 寛, 中川武正, 太田 健, 中田 俊, 庄司俊輔, 滝沢 始, 木谷誠一, 石井 彰, 堀内 正, 灰田美智子, 山下直美, 本田善一郎, 宮本昭正, 早川哲夫, 秋山一男, 浦田誓夫, 大和田厚, 和田 博 : 二相性喘息反応における抗体などの血清蛋白因子および各種 chemical mediator の時間的推移. 日胸疾患会誌 (1986) **24**, 1113—1122.
 - 17) 中沢次夫, 豊田武久, 松下正也, 稲沢正士, 金谷邦夫, 根本俊和, 笛木隆三, 小林節雄 : 遅発型気道反応における各種抗体について. アレルギー (1987) **36**, 902—908.
 - 18) 月岡一治, 中俣正美, 広野 茂 : カンジダ喘息の発症機序に関する研究. 第4報 カンジダに対する IgE 抗体, 凝集抗体, 沈降抗体と喘息重症度および吸入誘発型との関連. アレルギー (1977) **26**, 640—644.
 - 19) Kurimoto Y : Relationship among skin test, bronchial challenge and serology in house dust and Candida albicans allergic asthma. Ann Allergy (1975) **35**, 131—141.
 - 20) Takahashi K and Kimura I : A considerable technique for identification of peripheral basophils

- under scanning electron microscopy. *J Clin Electron Microsc* (1984) **17**, 593-594.
- 21) 岡田千春, 高橋 清, 宗田 良, 松岡 孝, 難波一弘, 荒木洋行, 木村郁郎, 岸本卓巳: 遅発型気道反応における好塩基球表面免疫グロブリンの検討. *アレルギー* (1988) **37**, 5-11.
 - 22) 岡田千春: 気管支喘息患者好塩基球表面のIgG結合に関する研究. 第1編 遅発型気道反応におけるIgG抗体の関与について. *岡山医誌* (1989) **101**, 1015-1025.
 - 23) 岡田千春: 気管支喘息患者好塩基球表面のIgG結合に関する研究. 第2編 遅発型気道反応におけるIgGサブクラスの役割について. *岡山医誌* (1989) **101**, 1027-1036.
 - 24) 木村郁郎: 気管支喘息における気道洗浄液. *医のあゆみ* (1982) **123**, 401-411.
 - 25) 難波一弘, 高橋 清, 多田慎也, 清水一紀, 中藤研一, 岡田千春, 辻 光明, 沖 和彦, 木村郁郎, 谷崎勝朗: House Dustによる気管支喘息患者の遅発型気道反応の発症機序に関する検討—気管支肺胞洗浄法を中心に. *アレルギー* (1988) **37**, 67-74.
 - 26) de Monchy JGR, Kauffmann HF, Venge P, Koeter GH, Sluiter HJ, Jansen HM and de Vries K: Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reaction. *Am Rev Respir Dis* (1985) **131**, 373-376.
 - 27) 高橋 清, 清水一紀, 難波一弘, 中山堅吾, 岡田千春, 辻 光明, 中藤研一, 多田慎也, 木村郁郎, 周藤真康, 谷崎勝朗: 重症難治性喘息患者における末梢血好中球分画からのロイコトリエン産生能に関する検討. *アレルギー* (1988) **37**, 322-330.
 - 28) Kay AB and Walsh GM: Chemotactic factor-induced enhancement of the binding of human immunoglobulin class and subclasses to neutrophils and eosinophils. *Clin Exp Immunol* (1984) **57**, 729-734.
 - 29) Venge P, Hakansson L and Peterson CG B: Eosinophil activation in allergic disease. *Int Arch Allergy Appl Immunol* (1987) **82**, 333-337.
 - 30) Barnes PJ: Asthma as an axon reflex. *Lancet* (1986) **1**, 242-245.
 - 31) De Simone C, Ferrari M, Ferrarelli G, Rumi C, Pugnali L and Sorice F: The Effect of Substance P on Human Eosinophil Receptors and Functions. *Ann NY Acad Sci* (1987) **496**, 226-232.
 - 32) Stain C, Stockinger H, Scharf M, Jager U, Gossinger H, Lechner K and Bettelheim P: Human blood basophils display a unique phenotype including activation linked membrane structures. *Blood* (1987) **6**, 1872-1879.
 - 33) 末村正樹: Fcε レセプターとアトピー. *臨科学* (1987) **9**, 1168-1174.
 - 34) Snapper CM, Finkelman FD and Paul WE: Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. *J Exp Med* (1988) **167**, 183-196.
 - 35) Del Prete G, Maggi E, Parronchi P, Chretien I, Tiri A, Macchia D, Ricci M, Banchereau J, De Vries J and Romagnani S: IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J Immunol* (1988) **140**, 4193-4198.
 - 36) Matthews RC, Burnie JP and Tabaqchali S: Isolation of Immunodominant antigens from sera of patients with systemic candidiasis and characterization of serological response to *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* (1987) **25**, 230-237.

**Studies on IgG subclass antibodies in asthmatics with late
asthmatic responses**

**Part 1. Serum antigen-specific IgG subclass antibodies in
asthmatics with late asthmatic response**

Kazuro OGURUSU

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

The immediate asthmatic response is mainly induced by IgE-dependent mechanisms. However, the late asthmatic response (LAR) is induced by inhalation of antigens without the participation of antigen-specific IgE antibodies in some asthmatics, especially in intractable asthma induced by *Candida* antigen. To elucidate the relationship between antibodies and those bronchial responses, the antigen-specific IgG subclass antibodies in sera from asthmatics were measured and compared with IgE antibody.

The avidin-biotin ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) method was established for the measurement of specific IgG and IgG subclass antibodies to mite or *Candida* antigen.

Serum levels of IgG and IgG1 antibodies to mite and *Candida* antigen in bronchial asthmatics were significantly higher than those in healthy subjects ($p < 0.01$).

Bronchial asthmatics who were tested with inhalation of house dust or *Candida* antigen were divided into group A (higher levels of serum IgG1 antibody) and group B (lower levels of serum IgG1 antibody). The percentages of LAR including DAR after inhalation of house dust antigen in group A were significantly higher than those in group B ($p < 0.01$). The percentages of LAR and LAR including DAR after inhalation of *Candida* antigen in group A were significantly higher than those in group B ($p < 0.01$).

Serum levels of antigen-specific IgG and IgG1 antibodies in asthmatics with LAR after inhalation of house dust or *Candida* antigen were significantly higher than those in asthmatics with IAR or non-responders ($p < 0.01$).

The serum level of specific IgE antibody to these antigens in asthmatics with LAR after inhalation of house dust or *Candida* antigen was slightly lower than that in the asthmatics without LAR, though the difference was not significant.

These findings suggest that high serum levels of specific IgG and IgG1 antibodies to adequate antigens play a role in inducing an attack in asthmatics with LAR.