

小児気管支喘息患者におけるダニアレルゲン 特異的リンパ球増殖反応の年齢変動

静岡県立こども病院感染免疫アレルギー科

木村光明 鶴田 悟 吉田隆実

小児気管支喘息 (BA) 患者のダニ特異的リンパ球増殖反応をフローサイトメトリーで測定し, アトピー性皮膚炎 (AD) 患者と比較検討した. 2~7歳の年少 AD 患者のダニ S.I.F. (stimulation index measured by flow cytometry) 値は非アトピー対照より有意に高いが (189.6 ± 70.7 vs 115.9 ± 11.0 , $p < 0.05$), 年少 BA 患者のダニ S.I.F. 値は低く (122.6 ± 23.4), 非アトピー対照と差がなかった. AD および小児 BA の病理はそれぞれアレルギー性炎症およびアトピー型アレルギー反応と考えられており, ダニ S.I.F. 値の亢進は前者との関係が深く, 後者との関係は弱いことが示唆される. 年少 BA 患者でもダニ IgE-RAST 値はすでに高く (93.6 ± 41.2 PRU/ml), この結果はまた末梢血ダニ S.I.F. 値の上昇とダニ特異的 IgE 抗体産生亢進との間には直接的な関係はないことをも示唆する. BA 患者のダニ S.I.F. 値は 8 歳以降急に上昇し (176.0 ± 54.6), AD 患者と同程度になった (162.0 ± 30.0). 成人 BA 患者ではダニ特異的リンパ球増殖反応が AD 患者と同程度に亢進していることが報告されており, これらの所見は BA の小児型から成人型への移行がこの時期に始まることを示している可能性がある.

Key words: atopic dermatitis — bronchial asthma — house dust mite — lymphocyte proliferation

はじめに

アトピー患者の末梢血単核球をダニアレルゲンで刺激すると主としてヘルパー T 細胞の増殖が誘導される¹⁾²⁾. ダニアレルゲン特異的リンパ球増殖反応はアトピー患者で亢進しており, また血清 IgE あるいはダニ IgE-RAST と正相関が認められることから, アトピー疾患の発生や IgE 抗体産生促進に関係する T 細胞の活性が比較的選択的に反映されていると考えられる. ダニアレルゲン特異的リンパ球増殖反応は通常, 放射性同位元素を用いて測定されるが, われわれは先にフローサイトメトリーでもこれを測定できることを示し, S.I.F. (stimulation index measured by flow cytometry) 値で表わした³⁾. ダニ S.I.F. 値はこれまでの報告と同様アトピー患者で上昇しており, 3 歳以上のアトピー患者ではダニ S.I.F. 値とダニ IgE-RAST 値あるいは血清 IgE 値との間に密接な正相関が認められた.

小児アトピー患者の血清 IgE レベルおよび症状は年齢とともに変化する. 小児の代表的なアトピー疾患であるアトピー性皮膚炎 (AD) の患者を対象として年齢とダニ S.I.F. 値との関係について調べたところ, 著明な年齢変動が認められ, 乳児で最も高く, 年長児では比較的低値であった⁴⁾. 小児気管支喘息 (BA) は AD と並ぶ小児の代表的なアトピー疾患であるが, 両者の病理には大きな違いがある. すなわち, 前者は典型的な即時型アレルギー反応と考えられており⁵⁾, 後者はアレルギー性細胞性炎症に基づく疾患と考えられている⁶⁾. AD 患者で見られたようなダニ S.I.F. 値の年齢変動が AD に特異的なものであるのか, あるいは BA 患者にも共通に認められるものであるのかは S.I.F. 値の生物学的意義を考察する上で重要な情報である. それで本研究では AD を合併していない BA 患者のダニ S.I.F. 値を測定し, BA を合併していない AD 患者のものと比較・検討した.

Received: December 24, 1996

Accepted: March 7, 1997

Abbreviations: AD atopic dermatitis; BA bronchial asthma; S.I.F. stimulation index measured by flow cytometry

対象と方法

1. 対象

平成 7 年 12 月より平成 8 年 10 月までに当科を受診し

た BA あるいは AD 患者で診断や治療のため血液検査が必要であった児のうち本人または家族から同意が得られた者からヘパリン加静脈血を得た。乳児期の BA は診断が容易でなく、症例数も少ないため、本研究では 2 歳以上の BA 患者を対象とし、それに伴い、AD 患者も 2 歳以上を対象とした。BA 患者は現在および過去において AD 合併のない者とし、26 名 (Table 1c), AD 患者は現在および過去に BA 症状のない者とし、16 名であった (Table 1b)。また同時期に当科を受診した 13 名の 2 歳以上の非アトピー患者からも同様に静脈血を得た (Table 1a)。非アトピー対照は免疫・アレルギー・血液系疾患を持たず、かつ急性感染症や慢性炎症性疾患に罹患していない小児を対象とした。

Table 1 List of subjects

Table 1-a

Subjects	No	Age (y)	IgE (IU/ml)	IgE-RAST (PRU/ml)
Non-atopic	1	2	23	0.11
	2	2	38	0.11
	3	3	77	0.22
	4	3	55	0.16
	5	5	231	0.22
	6	6	30	0.19
	7	6	6	0.25
	8	7	4	0.14
	9	8	89	0.14
	10	10	119	0.13
	11	10	5	0.16
	12	12	60	0.19
	13	15	39	0.21

Table 1-b

Subjects	No	Age (y)	IgE (IU/ml)	IgE-RAST (PRU/ml)
Atopic dermatitis	1	2	182	23.07
	2	2	1331	108
	3	2	2831	105
	4	2	2231	113
	5	2	67	22.51
	6	4	7092	110
	7	4	671	19.30
	8	5	5996	171
	9	6	677	167
	10	6	399	15.20
	11	8	190	111
	12	10	1051	89.53
	13	10	978	6.34
	14	13	6635	120
	15	14	6812	105
	16	14	2180	101

Table 1-c

Subjects	No	Age (y)	IgE (IU/ml)	IgE-RAST (PRU/ml)
Asthma	1	2	12	0.19
	2	2	464	134
	3	3	341	11.14
	4	3	1909	124
	5	3	1085	118
	6	3	578	106
	7	4	624	138
	8	4	585	93.16
	9	5	415	70.80
	10	5	6726	98.39
	11	6	3194	102
	12	6	1243	117
	13	7	299	104
	14	8	1064	111
	15	8	438	114
	16	8	974	150
	17	9	6013	93.20
	18	9	3388	112
	19	9	804	127
	20	11	745	92.21
	21	11	1005	79.82
	22	11	231	1.63
	23	12	1052	99.74
	24	12	528	122
	25	12	1082	97.98
	26	15	530	73.96

a, non-atopic : b, atopic dermatitis :
c, bronchial asthma.

2. 方法

S.I.F. 値の測定は先に報告した方法に従い実施した³⁾。単核球を 1×10^6 cells/ml の濃度で RPMI1640 培養液 (10% FCS および抗生物質 (ペニシリン 100 U/ml, ストレプトマイシン 100 μ g/ml 添加) に浮遊させ、48 穴培養プレート (ファルコン 3078, Becton Dickinson Labware, NJ, USA) に 0.5 ml ずつ分注し、50 μ g/ml のダニアレルゲン (ダニ凍結乾燥粉末, 鳥居薬品) を加えて 5% CO₂, 37°C の加湿条件下で 6 日間培養した。培養終了後、細胞を 70% エタノールで固定し、RNase 処理により RNA を除去した後、ヨウ化プロピディウム (propidium iodide, Sigma Chemical Company, MO, USA) で細胞内 DNA を染色、細胞当たりの蛍光強度をフローサイトメトリー (EPICS-CS, Coulter Corporation, FL, USA) で測定した。蛍光強度ヒストグラム上、G0/G1 期細胞と G2/M 期細胞に挟まれた中央の平坦な部分に現われる中等度に DNA 合成の進んだ S 期細胞比率を記録し、刺激・非刺激サンプルの

比 S.I.F. (stimulation index measured by flow-cytometry) 値に変換した。

S.I.F. = (アレルギー刺激サンプル中の S 期細胞比率 / 非刺激サンプル中の S 期細胞比率) $\times 100$

3. その他

血清 IgE は RIST 法で、アレルギー特異的 IgE 抗体は IgE-RAST 法で測定した。S.I.F. 値は平均 $\pm$ 1SD で表し、差の有意性は t 検定で判定した。平均値の差および相関関係は $p < 0.05$ のとき有意とした。

結 果

1. 気管支喘息およびアトピー性皮膚炎患者におけるダニ S.I.F. 値とダニ IgE-RAST および血清 IgE との相関

われわれは先に 1 歳以上の AD 患者ではダニ S.I.F. 値とダニ IgE-RAST 値との間に有意な正相関が認められることを示した⁴⁾。本研究で対象とした 2 歳以上の AD 患者でも両者の間に有意な正相関が認められた (Fig. 1B)。BA 患者でも両者間に正相関は認められ

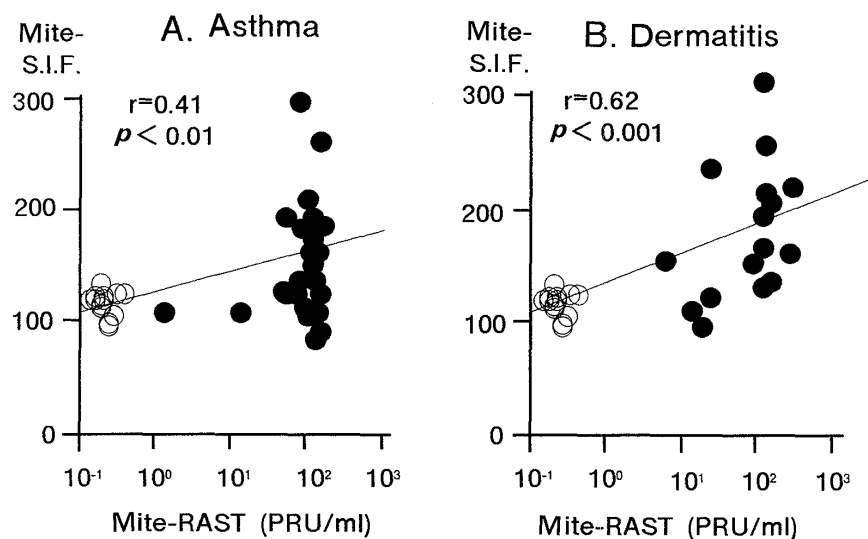


Fig. 1. Correlation between the mite-specific S.I.F. and the mite-specific IgE-RAST levels.

Atopic and non-atopic subjects are indicated as ● and ○, respectively.

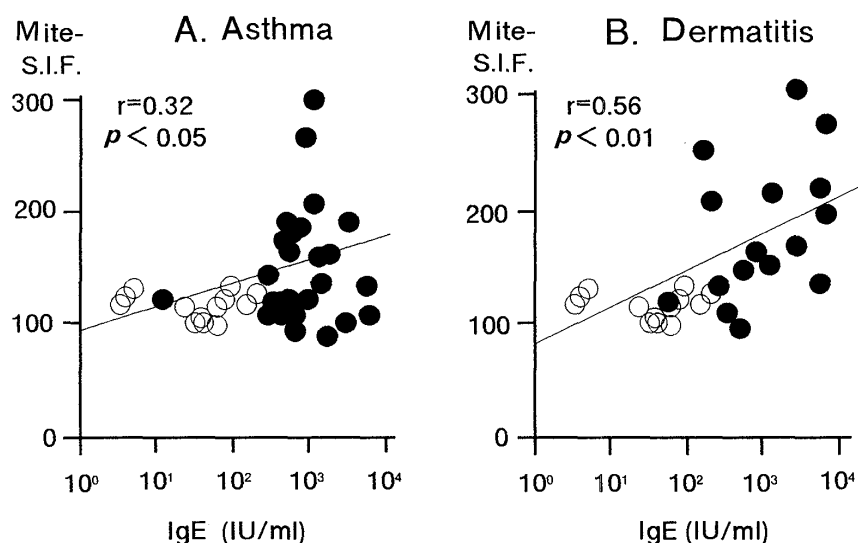


Fig. 2. Correlation between the mite-specific S.I.F. and the serum IgE levels.

Atopic and non-atopic subjects are indicated as ● and ○, respectively.

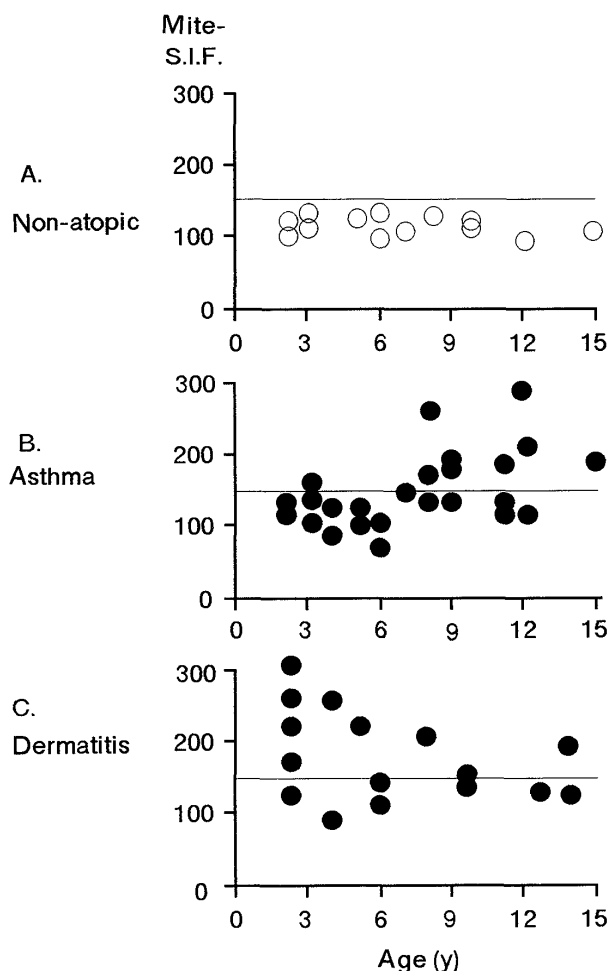


Fig. 3. Age-dependent changes in the level of mite-specific S.I.F.

The horizontal line in the figure indicates the level of 152 which is the mean+3SD of the mite-specific S.I.F. in the non-atopic controls (115.4 ± 12.2).

たものの AD 患者ほど明瞭でなかった (Fig. 1A). ダニ S.I.F. 値と血清 IgE 値との相関についても同様な所見が認められ, AD 患者では両者間に明瞭な相関が, BA 患者では両者間に弱い相関が認められた (Fig. 2).

2. 気管支喘息患者およびアトピー性皮膚炎患者におけるダニ S.I.F. 値の年齢変動

非アトピー対照児のダニ S.I.F. 値に明らかな年齢変動は認められなかった (Fig. 3A). AD 患者では幼児のダニ S.I.F. 値が高く, 年長児では相対的に低かった (Fig. 3C). BA 患者のダニ S.I.F. 値の年齢変動はこれとは著しく異なるパターンを示した (Fig. 3B). 7 歳以下の年少 BA 患者のダニ S.I.F. 値は 122.6 ± 23.4 と

Table 2 The level of the mite-specific S.I.F. in the younger (2-7y) and older (8-15y) atopic and non-atopic subjects

Subjects	Younger	Older	<i>p</i>
Non-atopic (n)	115.9 ± 11.0 (7)	114.6 ± 13.9 (5)	N.S.
Asthma (n)	122.6 ± 23.4 (13)	176.0 ± 54.6 (13)	<0.05
<i>p</i>	N.S.	<0.05	

n: number of subjects, *p*: the significance of the difference in the mite-specific S.I.F. level.

上昇しておらず, 非アトピー対照の 115.9 ± 11.0 と同レベルであり (Table 2), 年少 AD 患者のダニ S.I.F. 値 189.6 ± 70.7 ($n=10$) より有意に低かった ($p < 0.05$). 8 歳を境に BA 患者のダニ S.I.F. 値は急に上昇し, 年長 BA 患者のダニ S.I.F. 値は 176.0 ± 54.6 と非アトピー対照 (114.6 ± 13.9) および年少 BA 患者のものより有意に高値であった (Table 2, $p < 0.05$).

3. 気管支喘息患者におけるダニ S.I.F. 値とダニ IgE-RAST および血清 IgE 値との相関の年齢による変化

ダニ S.I.F. 値の年齢変動の検討から BA 患者の末梢血リンパ球に年齢による質的あるいは組成的变化が起きている可能性が示唆された. そこで BA 患者を年齢により二群に分け, さらにダニ S.I.F. 値とダニ IgE-RAST 値との相関について検討した. その結果, Fig. 4 に示すように, 7 歳以下の BA 患者では両者間に全く相関が認められないのに対し, 8 歳以上の患者では両者の間に明らかな正相関が認められた. ダニ S.I.F. 値と血清 IgE 値との相関についても同様の所見が認められ, 年少 BA 患者では両者間に全く相関が認められないのに対し, 年長 BA 患者では明瞭な正相関が認められた (Fig. 5).

考 察

われわれは先に 1 歳以上の小児 AD 患者ではダニ S.I.F. 値が亢進し, またダニ S.I.F. 値とダニ IgE-RAST 値との間に明瞭な正相関が認められることを報告した⁴⁾. これは末梢血ダニ S.I.F. 値の上昇がアトピー疾患の発生や IgE 抗体産生亢進と深く関連していることを示唆するものと思われた. ダニ S.I.F. 値の生物学的意義をより明確にするため, 本研究ではもう一つの代表的な小児アトピー疾患である BA 患者を対象と

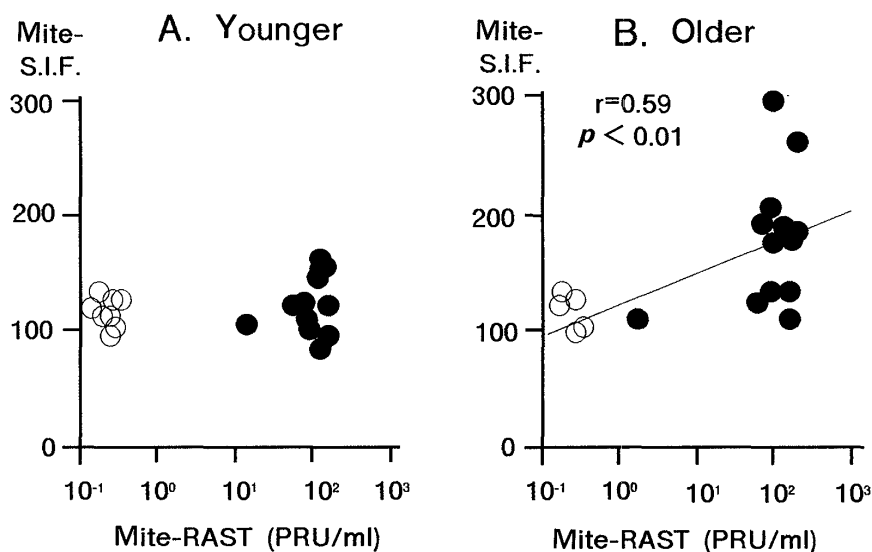


Fig. 4. Correlation between the mite-specific S.I.F. and the mite-specific IgE-RAST levels in the younger and older asthmatic children.

Atopic and non-atopic subjects are indicated as ● and ○, respectively.

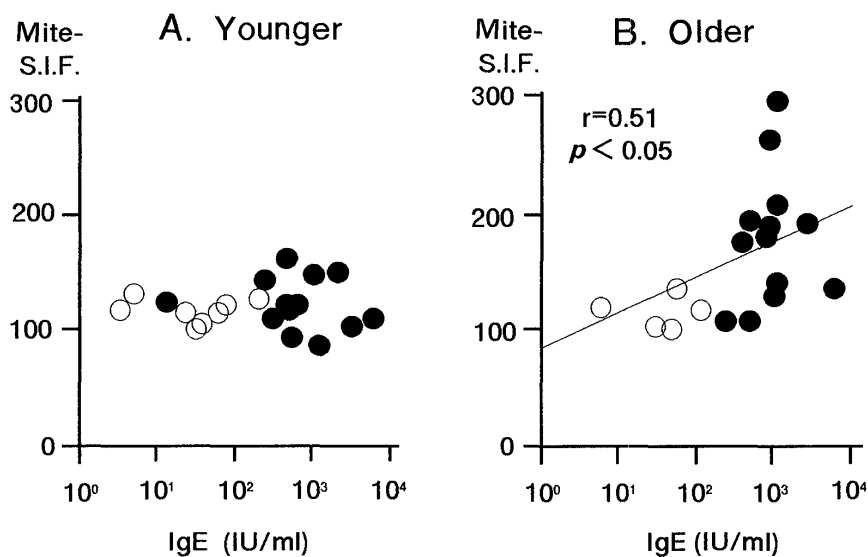


Fig. 5. Correlation between the mite-specific S.I.F. and the serum IgE levels in the younger and older asthmatic children.

Atopic and non-atopic subjects are indicated as ● and ○, respectively.

してダニ S.I.F. 値を測定した。その結果、小児 BA 患者におけるダニ S.I.F. 値の年齢変動のパターンが AD 患者のものと著しく異なることが明らかになった。AD 患者では年少児のダニ S.I.F. 値が最も高いのに対し、BA 患者では年少児のダニ S.I.F. 値は上昇しておらず、非アトピー対照と同レベルであった。年少 BA 患者においても既にダニ特異 IgE 抗体価は上昇していることから (Table 1c), これは末梢血ダニ特異的リンパ球増殖反応の亢進とダニ特異的 IgE 抗体の産生

増加との間には直接的な関係はないことを示すものである。BA 患者では、IgE 抗体の産生を調節するダニ特異的ヘルパー T 細胞は、恐らく気管支関連リンパ組織などリンパ組織中に局限して存在し、末梢血中には殆ど出現していないのではないかと考えられる。

小児 BA はアトピー型アレルギー反応であり⁵⁾, AD はアレルギー性細胞性炎症と考えられている⁶⁾⁷⁾。年少 BA 患者でダニ S.I.F. 値は上昇せず、年少 AD 患者では上昇することからダニ S.I.F. 値はアレルギー性細胞

性炎症との関係が深いように思われる。近藤らは食物アレルギー児のアレルゲン特異的リンパ球増殖反応を測定し、AD など遅延型アレルギー症状を呈する患者では食物アレルゲンに対するリンパ球増殖反応が亢進していることを報告している⁸⁾。彼らは同時に、食物アレルギー児でも蕁麻疹など即時型アレルギー症状を呈する患者では食物アレルゲンに対するリンパ球増殖反応は亢進していないことを示している。これは、食物とダニという違いはあるが、アレルギー性細胞性炎症が存在する場合のみ末梢血のアレルゲン特異的リンパ球増殖反応が亢進することを明らかにしている点で本研究の所見と符合している。

アレルギー性炎症の主要細胞成分の一つはTリンパ球であるが、これらはアレルゲンの侵入に際して末梢血中から炎症局所に遊走してくるものと考えられている。実際、AD 患者では末梢血中にこのような炎症性エフェクターTリンパ球のプールが形成されているようである^{9)~11)}。アレルゲン特異的リンパ球増殖反応はこれらの炎症性Tリンパ球がアレルゲン刺激に反応して増殖する現象を観察しているものと考えられる。したがって末梢血単核球でのアレルゲン特異的リンパ球増殖反応の亢進は、末梢血中のアレルゲン特異的炎症性Tリンパ球プールの拡大を反映しているのではないと思われる。

成人型BAの病像は小児BAと明らかな相違がある^{12)~14)}。これは小児BAがアトピー型アレルギー反応であるのに対し、成人BAは気道のアレルギー性細胞性炎症が主要な病理となっているためと考えられる⁷⁾。つまり、成人型BAでは、気道と皮膚という違いはあるもののADと同様アレルギー性細胞性炎症が存在する。成人BA患者では、小児BAと違い、ダニ特異的リンパ球増殖反応がADと同程度に亢進していることが報告されているが²⁾、これもアレルギー性細胞性炎症の存在と関連した現象と思われる。

BAの小児型と成人型が何歳頃移行するのか明らかでない。小児BAの頻度が最も高いのは幼児期から学童期前半であり、この年代の患者が小児BAの典型を構成するものと思われる⁵⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。本研究でわれわれはこの年代のBA患者ではダニ特異的リンパ球増殖反応は上昇していないことを明らかにした。しかし、小児期のBAでも思春期以降の患者では成人型気管支喘息に近い症状を呈することも少なくない。また、Piacentiniらは8歳以上の小児BA患者の気道分泌物中の好酸球比率を測定し、これらの患者では気道にア

レルギー性炎症が存在することを示す結果を得ている¹⁷⁾。本研究でわれわれは小児BA患者のダニS.I.F.値が8歳を境に急に上昇することを明らかにした。ダニ特異的リンパ球増殖反応は小児型BAの典型と考えられる2~7歳のBA患者では上昇しておらず、成人BA患者では上昇していることを考慮すると、この所見はこの時期に小児型BAから成人型BAへの移行が始まることを示唆しているのかもしれない。

小児期のBAが一様でないことは多くの小児アレルギー専門医の感じるところと思われる。本研究によりその多様性を明確にしていく指標として、ダニ特異的リンパ球増殖反応を利用できる可能性があることが示された。今後この反応の機序の解析や関与する細胞成分・サイトカインなどの解明を通してその指標としての価値を明らかにしていく必要があると思われる。

文 献

- 1) Hiratani, M., Muto, K., Oshida, Y., Ito, S. and Kasei, M.: Lymphocyte responsiveness to *Dermatophagoides farinae* extract in mite-sensitive patients; effect of immunotherapy on cellular proliferative response and specific immunoglobulin E antibody (RAST score). *J. Allergy Clin. Immunol.* 68, 205-211, 1981.
- 2) Rawle, F.C., Mitchell, E.B. and Platts-Mills, T. A.E.: T cell responses to the major allergen from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*, antigen P1; comparison of patients with asthma, atopic dermatitis, and perennial rhinitis. *J. Immunol.* 133, 195-201, 1984.
- 3) 木村光明, 鶴田 悟, 吉田隆実: 小児アトピー患者末梢血リンパ球のダニアレルゲン誘発細胞増殖のフローサイトメトリーによる測定とその意義. *アレルギー* 45, 1119-1126, 1996.
- 4) 木村光明, 鶴田 悟, 吉田隆実: 乳児期アトピー性皮膚炎患者におけるダニアレルゲン特異的リンパ球増殖反応の亢進. *アレルギー* 46, 34-41, 1997.
- 5) 西間三馨: 小児気管支喘息. “臨床アレルギー学” (宮本昭正 監修), 南江堂, 東京, pp.420-430, 1992.
- 6) 吉田彦太郎: アトピー性皮膚炎. “臨床アレルギー学” (宮本昭正 監修), 南江堂, 東京, pp.346-355, 1992.
- 7) 福田 健: アレルギー性炎症, 炎症細胞. “臨床アレルギー学” (宮本昭正 監修), 南江堂, 東京, pp.114-124, 1992.
- 8) Kondo, N., Agata, H., Fukutomi, O., Motoyoshi,

- F. and Oriei, T.: Lymphocyte response to food antigens in patients with atopic dermatitis who are sensitive to foods. *J. Allergy Clin. Immunol.* **86**, 253-260, 1990.
- 9) Babi, L.F.S., Picker, L.J., Soler, M.T.P., Drzimalla, K., Flohr, P., et al.: Circulating allergen-reactive T cells from patients with atopic dermatitis and allergic contact dermatitis express the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen. *J. Exp. Med.* **181**, 1938-1940, 1995.
- 10) Abernathy-Carver, K.J., Sampson, H.A., Picker, L.J. and Leung, Y.M.: Milk-induced eczema is associated with the expansion of T cells expressing cutaneous lymphocyte antigen. *J. Clin. Invest.* **95**, 913-918, 1995.
- 11) 富板美奈子, 下条直樹, 小島博之, 勝木利行, 河野陽一, 他: アトピー性皮膚炎の発症と寛解における食物アレルギー応答性 T 細胞上の皮膚ホーミングレセプターの発現. *日小ア誌* **10**, 380, 1996.
- 12) 牧野荘平, 本島新司, 中島重徳, 可部順三郎: 気管支喘息. “臨床アレルギー学” (宮本昭正 監修), 南江堂, 東京, pp.259-283, 1992.
- 13) 荒井康男: 小児・成人の気管支喘息の病理と病態. *日小ア誌* **10**, 270, 1996.
- 14) 西川 清: 小児喘息. *日本臨床* **54**, 141-146, 1996.
- 15) 貴島金男: 小児気管支喘息の疫学. “小児科 Mook, No. 2. 小児気管支喘息” (小林 登, 馬場一雄 編), 金原出版, 東京, pp.6-15, 1978.
- 16) 馬場 実: 小児気管支喘息の経過・予後. “小児科 Mook, No. 2. 小児気管支喘息” (小林 登, 馬場一雄 編), 金原出版, 東京, pp.16-27, 1978.
- 17) Piacentini, G.L., Martinati, L., Mingoni, S. and Boner, L.: Influence of allergen avoidance on the eosinophil phase of airway inflammation in children with allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **97**, 1079-1084, 1996.

ENHANCED LYMPHOCYTE PROLIFERATIVE RESPONSE TO HOUSE DUST MITE IN THE OLDER BUT NOT IN THE YOUNGER ASTHMATIC CHILDREN

Mitsuaki Kimura, Satoru Tsuruta and Takami Yoshida
Division of Allergy, Clinical Immunology and Infectious Diseases,
Shizuoka Children's Hospital

Allergen-specific lymphocyte proliferation was measured by flow cytometry in 16 children with atopic dermatitis (AD), 26 with bronchial asthma (BA) and 13 non-atopic controls. Although the level of mite-S.I.F. (stimulation index measured by flow cytometry) in the younger AD children (2-7 y) was significantly higher than that in the non-atopic subjects (189.6 ± 70.7 vs 115.9 ± 11.0 , $p < 0.02$), there was no elevation in the younger BA children (122.6 ± 23.4). It is therefore likely that the elevated mite-S.I.F. level is related to the development of the allergic cellular inflammation representing the pathology of AD, rather than the IgE-mediated allergic reaction as a mechanism of childhood BA. Because the level of mite-specific IgE antibody in the younger BA children is elevated (93.6 ± 41.2 PRU/ml), the result also indicates that mite-specific peripheral T lymphocytes do not play a critical role in stimulating the mite-specific IgE synthesis. On the contrary, the older BA children (8-15 y) showed an elevated mite-S.I.F. level (176.0 ± 54.6) significantly higher than that in the non-atopic subjects (114.6 ± 13.9 , $p < 0.05$) as well as that in the younger BA children ($p < 0.05$). Because other investigators have reported that the level of mite-specific lymphocyte proliferation is increased in the adult BA patients, the transition from childhood BA to adult-type BA may start at the age of about 8 y.