

非即時型鶏卵アレルギーにおける細胞性免疫反応の関与

岐阜大学医学部小児科

縣 裕篤 近藤直実 福富 悌 折居忠夫

食餌アレルギーの臨床症状は多彩であるが、臨床上、食餌抗原摂取後即時に反応を認める症例と、非即時に反応を認める症例とに大別される。筆者らは非即時型食餌アレルギーの抗原検索の一つとして、食餌抗原によるリンパ球幼若化反応の有用性につき報告してきた。今回この反応がリンパ球レベルでのどのような反応であるかにつき、鶏卵アレルギー患者4例を対象に検討した。その結果、T細胞分画は ovalbumin (OA) に対し明らかな反応を示したのに対し、B細胞分画はOAのいかなる濃度に対しても反応を認めなかった。またOA刺激によりT細胞サブセットのうちOKT4陽性細胞が増加を示した。

以上の成績から、非即時型食餌アレルギーには細胞性免疫、特にT細胞が重要な役割を担っていると考えられた。

Key words: cell-mediated immunity — hen egg allergy — lymphocyte blastogenesis — non-immediate food allergy — ovalbumin

緒言

食餌アレルギーの臨床症状は多彩であるが、臨床上、食餌抗原摂取後即時に反応を認める症例（即時型）と、非即時に反応を認める症例（非即時型）とに大別される。即時型の反応が、Coombs & Gell¹⁾のアレルギー分類のうちI型アレルギーに関与していると考えられている一方、非即時型の反応は、III型あるいはIV型のアレルギー反応の関与が示唆されている。筆者らは非即時型食餌アレルギーの抗原検索の一つとして、食餌抗原によるリンパ球幼若化反応の有用性につき報告してきた²⁾が、今回この反応が、リンパ球レベルでどのような反応であるかにつき鶏卵アレルギー患児を対象に検討したので若干の考察を加え報告する。

対象および方法

臨床上、問診、鶏卵の除去および誘発試験などから、症状発現が鶏卵摂取後6時間以降、多くは1日から数日後にいわゆるアトピー性皮膚炎の悪化が認められた非即時型の鶏卵アレルギー患児6例および健康児を対

象とした。

方法³⁾は、ヘパリン加末梢血からFicoll-Paqueを用いた比重遠心法により末梢リンパ球・単球分画(PBL)を得、15%ヒトブールAB血清あるいは自己血漿を含むRPMI 1640培養液に 1×10^6 /mlの濃度に浮遊させ、マイクロUプレート(0.2ml/ウェル)にてovalbumin(OA)存在下あるいは非存在下で、37℃5%炭酸ガス培養器内で培養を開始した。一部の症例でin vitroで2回抗原刺激を行い、booster効果を検討する場合には、まず培養試験管で抗原存在下5日間培養し、その後細胞を洗浄し、再び同一の抗原存在下または非存在下でマイクロUプレートにて、上記と同様に培養を開始した。培養終了4時間前に³H-thymidine(³H-TdR) 0.5μCiを各ウェルに添加し、培養終了時にセルハーベスター(ラボサイエンス)を用いて細胞を採集し、液体シンチレーションカウンターで各ウェルの放射活性を測定した(Fig. 1)。

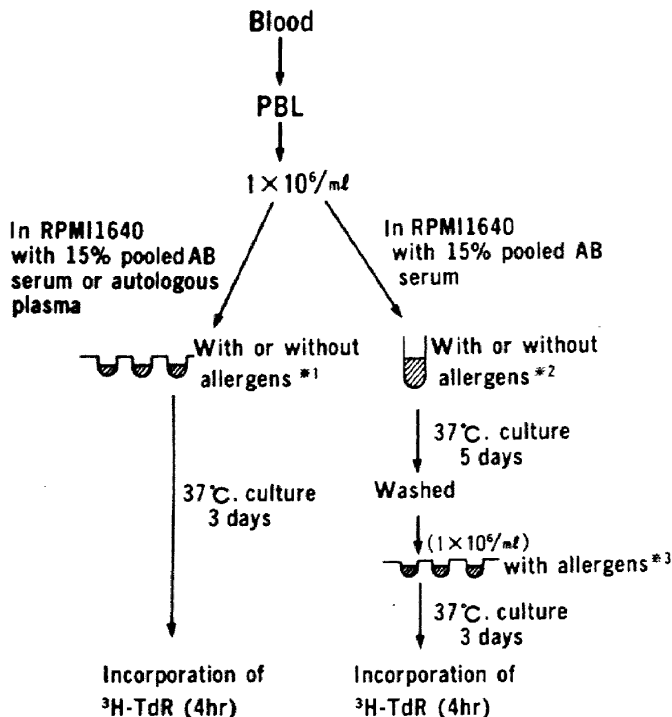
抗原としてのOAはウェルあたり0.25μg/ml、2.5μg/ml、および25μg/mlの濃度で用いた。booster効果を検討する場合は、1回目は2.5μg/ml、2回目は0.25μg/mlおよび2.5μg/mlの濃度を用いた。またOAの純度のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により単一バンドとして確認した。

実験はすべてtriplicateで行い、³H-TdRの摂取率の評価は、OA非添加群のDPMを分母に、OA添加群のDPMを分子にとり100倍したstimulation index(S.I.)で表現し、S.I. 200以上を反応陽性と判定した²⁾。

Received: June 18, 1987

Accepted: January 5, 1988

Abbreviations: ³H-TdR tritiated-thymidine;
OA ovalbumin; PBL peripheral blood
lymphocyte; S.I. stimulation index



※1 Various concentrations (0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of ovalbumin.

※2 Ovalbumin (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

※3 Various concentrations (0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of ovalbumin.

Fig. 1. Method of blastogenesis of lymphocytes.

今回、リンパ球レベルでの反応を検討するため、さらにナイロンウールカラム法でT細胞分画をB細胞分画とにPBLの一部を分離した。すなわち、15%ヒトプールAB血清を含むRPMI 1640培養液に前述の方法で得られたPBLを浮遊し、全量0.4mlとした後、RPMI 1640培養液で十分に洗い流したナイロンウールカラムに浸して37°C 30分間静置。RPMI 1640培養液を流し、自然落下にてT細胞分画を得、その後ナイロンウールを2回圧縮してB細胞分画を得た。そして、それぞれの分画を前述の方法で検討した。

また、一部の症例ではPBL $1 \times 10^6/\text{ml}$ を培養試験管内でOA存在下または非存在下で培養し、培養3日後にPBL中のT細胞サブセットの比率を測定した。T細胞サブセットの測定は、モノクローナル抗体であるOKT3, OKT4, OKT8, OKTIaIを用いて蛍光抗体法により行い、その判定はcytofluorograph (FACS)に依った。

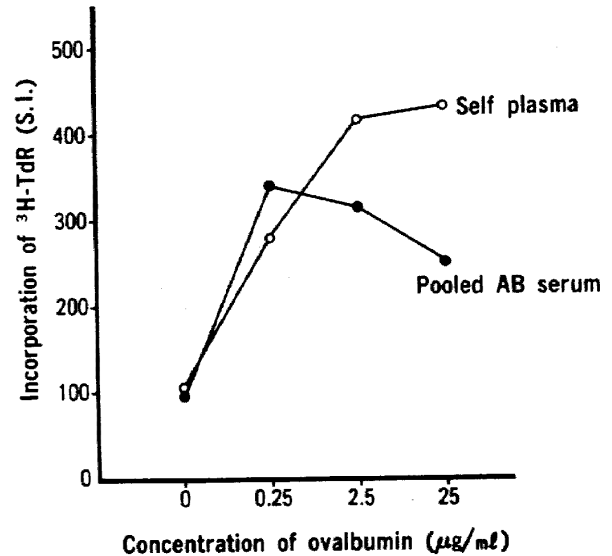


Fig. 2. Incorporation of ³H-TdR of PBL stimulated by various concentrations of ovalbumin (K. Gamou).

成績

患児のPBLでのリンパ球幼若化反応を示す (Fig. 2)。縦軸にS.I., 横軸にOAの各濃度を取り、それぞれの反応をみると、ヒトプールAB血清、自己血漿を用いた検討の結果、どの濃度でもS.I. 200以上の陽性反応が認められた。

次に、他の症例でのprimary効果およびbooster効果の成績を示す (Fig. 3)。in vitroで1回刺激したprimary効果の検討では、ヒトプールAB血清および自己血漿を用いた場合の両方で陽性反応が認められ、さらにin vitroで2回刺激したbooster効果の検討でも、やはりS.I. 200以上の陽性反応が認められた。なお、健康児4例を対象とした成績は全例陰性で、平均S.I. は 152.7 ± 16.6 であった。既に筆者らが報告したように、非即時型食餌アレルギー患児でのリンパ球幼若化反応はOAに対し78%と高い陽性率を示しており、食餌抗原の検索に有用であった²⁾が、これらのPBLでの反応がリンパ球のどのレベルでの反応かをみるため、4例につきPBL, T細胞分画, B細胞分画のそれぞれのリンパ球幼若化反応を次に示す。

まず、Fig. 4に示す症例は、卵白特異IgE抗体 (RAST)はscore 3であるが、PBLでOAの濃度に依存して³H-TdRの摂取率が増加し、さらにT細胞分画でもPBLと同様に、OAの濃度に依存して³H-TdRの摂取率が増加したのに対し、B細胞分画ではOAのいかなる濃度でも反応を認めなかった。

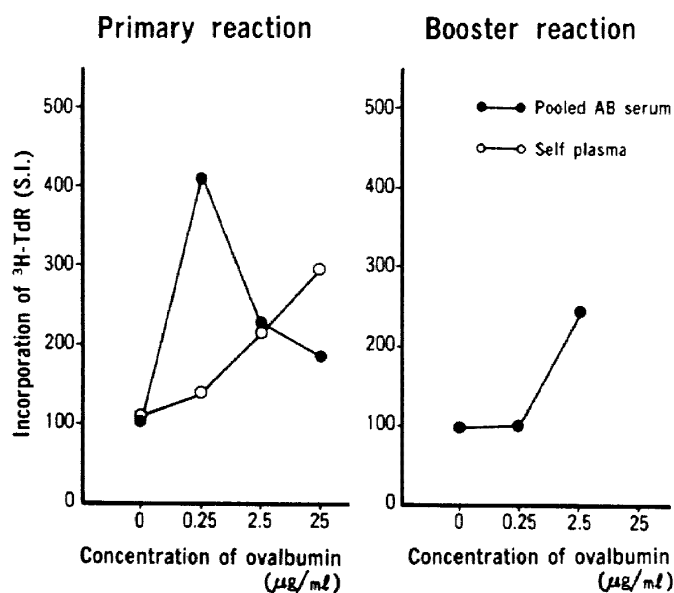


Fig. 3. Incorporation of ³H-TdR of PBL stimulated by various concentrations of ovalbumin (M. Nakaya).

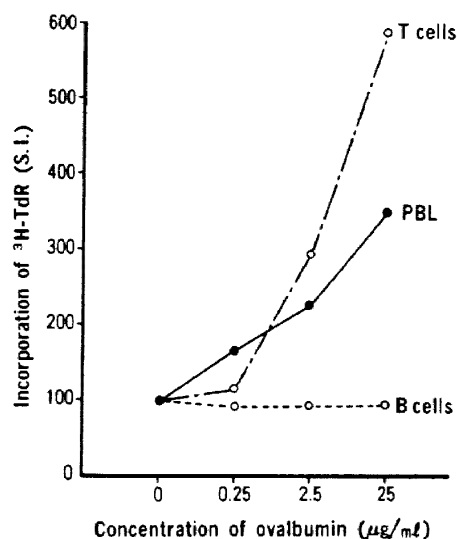


Fig. 4. Incorporation of ³H-TdR of PBL, T cells or B cells stimulated by various concentrations of ovalbumin (K. Naruse).

Fig. 5 に示す症例は、卵白特異 IgE 抗体 (RAST) は 0 であるが、PBL で OA 2.5 µg/ml の濃度において陽性反応を示し、T 細胞分画でも OA 0.25 µg/ml, 2.5 µg/ml の各濃度において陽性反応を示したのに対し、B 細胞分画では OA 0.25 µg/ml でも S.I. 184 であり、やはり陽性反応を認めなかった。

Fig. 6 の症例は、卵白特異 IgE 抗体 (RAST) は score 2 であるが、PBL で OA 2.5 µg/ml の濃度において陽性を示し、T 細胞分画でも同様の濃度で陽性を示

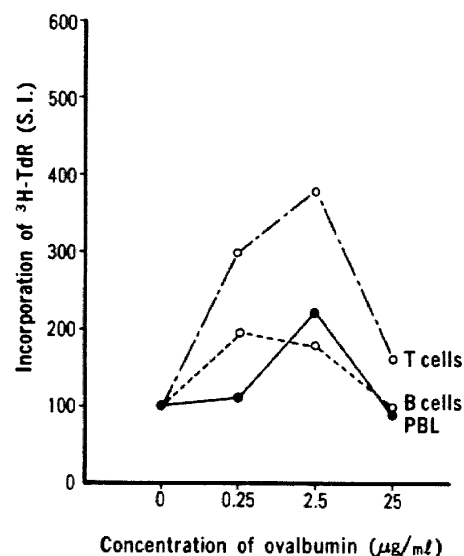


Fig. 5. Incorporation of ³H-TdR of PBL, T cells or B cells stimulated by various concentrations of ovalbumin (K. Kouyama).

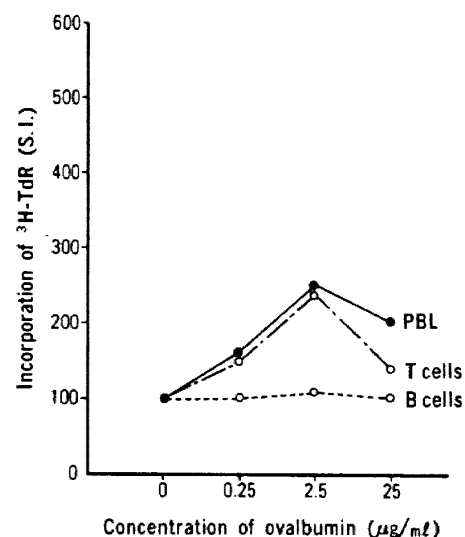


Fig. 6. Incorporation of ³H-TdR of PBL, T cells or B cells stimulated by various concentrations of ovalbumin (T. Maruyama).

したが、B 細胞分画ではやはりどの濃度でも陽性反応を認めなかった。

Fig. 7 の症例は、卵白特異 IgE 抗体 (RAST) は score 1 であるが、PBL で OA 2.5 µg/ml の濃度において、また T 細胞分画では OA 0.25 µg/ml の濃度においてそれぞれ陽性反応を示したのに対し、B 細胞分画ではやはり反応を認めなかった。

以上、PBL で OA に対しリンパ球幼若化反応が陽性を認めた非即時型鶏卵アレルギー患児では、T 細胞分画に PBL 同様のリンパ球幼若化反応が認められたの

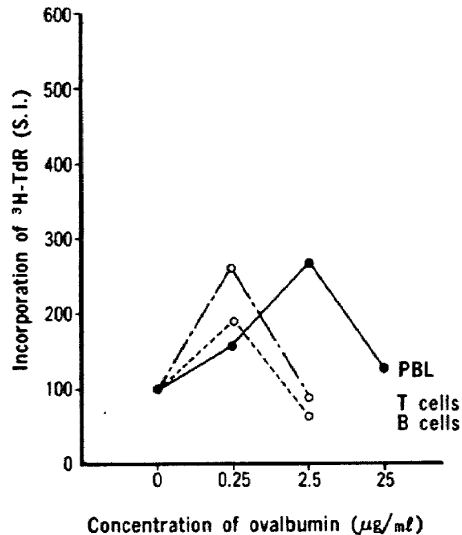


Fig. 7. Incorporation of ^3H -TdR of PBL, T cells or B cells stimulated by various concentrations of ovalbumin (T. Ōno).

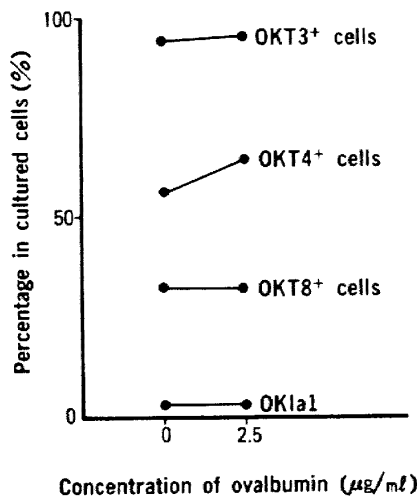


Fig. 8. Ratio of T cell subsets after 3 days culture with or without ovalbumin (M. Ōno).

に対し、B細胞分画では全く反応が認められなかった。

次に、このT細胞分画の反応が、T細胞サブセットではどのような反応であるかにつき検討した。PBLをOA 2.5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加あるいは非添加にて3日間培養した後のT細胞サブセットの比率を示す (Fig. 8)。OA添加群では、非添加群に比してOKT4陽性細胞の比率がやや高値を示しており、ここには示さないが、他の2例でも同様の傾向を示した。

考 察

食餌アレルギーは臨床上、即時型と非即時型に大別されるが、即時型で特異的IgE抗体が診断に有用である⁴⁾一方、特異的IgE抗体が陰性の場合でも、問診、食餌抗原の除去試験および負荷試験によって明確な食餌抗原が明らかとなる非即時型も少なくない。I型アレルギー反応を表現する特異的IgE抗体が、食餌アレルギーでは必ずしも有用でなく⁵⁾、III型アレルギー反応の関与⁶⁾およびIV型アレルギー反応の関与⁷⁾を示唆する報告がみられることから、食餌アレルギー全体を包括してI型アレルギー反応のみで語ることはできない。

今回、筆者らは非即時型鶏卵アレルギーにつき、リンパ球幼若化反応をPBLのみならず、T細胞分画およびB細胞分画に分離して反応をみたところ、4例ともPBLでリンパ球幼若化反応を認め、T細胞分画でも同様に反応を認めたが、B細胞分画では反応を認めなかった。このことは、非即時型ではT細胞の関与するアレルギー反応を示唆するものであり、アトピー性皮膚炎にさまざまな細胞性免疫が関与するという報告⁸⁾の一端を裏付けるものと考えられる。さらに、抗原刺激したPBLでは、抗原無刺激のPBLに比べOKT4陽性細胞が高値を示したという成績も得られたが、アトピー性皮膚炎でOKT3陽性細胞およびOKT8陽性細胞の減少がみられたという報告⁹⁾と考えあわせると、T細胞のうちヘルパーT細胞の増殖あるいはサブレッサーT細胞の減少が、食餌アレルギー発症に何らかの関与をしているとも考えられ興味深いところであるが、この点につきさらに検討を進めている。

なお、本論文の要旨は第23回日本小児アレルギー学会において発表した。(昭和61年11月、北九州)

文 献

- 1) Coombs, R.R.A. and Gell, P.G.H.: Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In "Clinical Aspects in Immunology" (ed. by P.G. H. Gell, R.R.A. Coombs and P.J. Lachmann), Blackwell Scientific Pub., Oxford, pp.761-781, 1975.

- 2) 近藤直実, 縣 裕篤, 寺澤総介, 折居忠夫: 食物アレルギーに関する検討—食物抗原によるリンパ球幼若化反応の臨床応用. アレルギー 35, 336-341, 1986.
- 3) 近藤直実, 縣 裕篤, 寺澤総介, 折居忠夫: 卵白アルブミンおよび牛血清アルブミンによるリンパ球幼若化反応の方法. アレルギーの臨床 6, 473-475, 1986.
- 4) 山田一恵, 岸本真知子, 稲垣義彰, 稲本 真, 駒田英勝, 山田政功, 鳥居新平: アトピー性皮膚炎における食餌性アレルギーの検討—とくに穀物アレルギーについて. 小児科臨床 38, 2545-2552, 1985.
- 5) Buckley, R.H. and Metcalfe, D.: Food allergy. *JAMA* 248, 2627-2631, 1982.
- 6) Matthews, T.S. and Soothill, J.F.: Complement activation after milk feeding in children with cow's milk allergy. *Lancet* 2, 893-895, 1970.
- 7) 宮田隆夫, 近藤 久, 津田こずえ, 鶴田光敏, 中原務, 早川洋一, 岩山精三, 浅野喜造, 矢崎雄彦: 食物アレルギーの臨床的検討. 小児科 25, 157-161, 1984.
- 8) Hanifin, J.M.: Atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 73, 211-222, 1984.
- 9) Faure, M.R., Gaucherand, M.A., Thivolet, J., Czernielewski, J.M. and Nicolas, J.: Decreased levels of T-cells and cells with suppressor T-cell phenotype as defined by specific monoclonal antibodies in patients with atopic dermatitis. *Clin. Exp. Dermatol.* 7, 513-518, 1982.

PARTICIPATION OF CELL-MEDIATED IMMUNITY IN NON-IMMEDIATE TYPE HEN'S EGG ALLERGY

Hiroatsu Agata, Naomi Kondo, Osamu Fukutomi and Tadao Orii
Department of Pediatrics, Gifu University School of Medicine

Food allergies can be classified into two types, immediate type and non-immediate type. There is a discrepancy between specific IgE antibodies and clinical symptoms. On the other hand, blastogenesis of lymphocytes to antigens or lectins represents at least one part of cell-mediate immunity.

We have previously reported that blastogenesis of lymphocytes to food allergens is useful for the detection of food allergens in patients with non-immediate type food allergy.

In this study, blastogenesis of lymphocytes, T cells and B cells to food allergen ovalbumin (OA) was investigated in four patients with hen egg allergy.

Blastogenesis of lymphocytes to OA was positive in all of the four cases. Further, blastogenesis of T cells to OA as well as lymphocytes to OA was positive but that of B cells to OA was all negative. And the rate of OKT₄⁺ cell in peripheral blood lymphocytes (PBL) stimulated by OA was higher than that of unstimulated PBL.

From these results, it was shown that T cells may play an important role in non-immediate type food allergy.