

〔原 著〕

卵アレルギー患児末梢血リンパ球の卵白アルブミン
特異的 IgA 産生能についての検討

同愛記念病院小児科

山口公一 馬場 実

埼玉医大小児科

野間 剛

東京医歯大小児科

矢田純一

間接型ブラック形成細胞法を用いて卵アレルギー患児リンパ球からの卵白アルブミン (OVA) 特異免疫グロブリン産生能を検討した。相当年齢の健康小児では $10\mu\text{g/ml}$ OVA で刺激し 5 日間培養した末梢血リンパ球から $112 \pm 18/7 \times 10^4$ non T 細胞 ($n=12$) の IgA 特異ブラック形成細胞の出現を認めたが、患児では $6 \pm 3/7 \times 10^4$ non T 細胞 ($n=24$) と、その出現数の低下を認めた。特異 IgG, IgM の検討では患児ではそれぞれ $84 \pm 42/7 \times 10^4$ non T 細胞 ($n=9$), $93 \pm 13/7 \times 10^4$ non T 細胞 ($n=9$) で、対照と比較して有意差を認めなかった。以上より、卵アレルギー患者では末梢血リンパ球からの OVA 特異 IgA 産生能は低下していると考えられた。

Key words: egg allergy — IgA — ovalbumin — plaque forming cell

緒 言

免疫グロブリン A (IgA) は分泌型 IgA として気道粘膜や消化管、外分泌腺などの局所免疫において重要な役割を演じている。ウイルスや細菌に対する中和抗体としての働きを持ち¹⁾、またその高い凝集活性や結合能などにより毒素や食物抗原などと複合体を形成し、異種蛋白の生体内への取り込みを防ぎ、生体感作を阻止している²⁾。アトピー性疾患においては IgA 欠損症の頻度が高く^{3,4)}、アトピー素因のある乳児のうち血清 IgA 値が低い群では湿疹の発症率が高いという報告などから⁵⁾、これまで IgA 欠損がアトピー性疾患の発症に関与している可能性が示唆されてきた。我々は唾液中の分泌型 IgA を ELISA 法にて測定し、乳幼児期の食物アレルギー患児では同年齢の健康小児に比較して明らかにその値が低値であることを既に報告したが⁶⁾、今回はさらに食物アレルギー患児と IgA との

関係を検討するために乳幼児期の食物アレルギー患者リンパ球の抗原特異的 IgA 産生能を、末梢血リンパ球を用いた間接型ブラック形成細胞法⁸⁾にて検討したので報告する。

対 象

卵白抗原の皮膚反応あるいは IgE RAST 陽性の気管支喘息、アトピー性皮膚炎患者で、鶏卵経口負荷試験で蕁麻疹の出現や湿疹の悪化あるいは咳嗽、喘鳴の出現などをみとめたアレルギー反応陽性の11ヵ月から6歳まで(平均 2.1 ± 1.4 歳)の卵アレルギー患者24名(男児15名、女児9名)の末梢血リンパ球を用いた、対照として同年齢(平均 2.4 ± 1.1 歳)の健康小児11名(男児5名、女児6名)の末梢血リンパ球を用いた。

方 法

Received: March 23, 1989

Accepted: August 28, 1989

Abbreviations ; OVA ovalbumin; β -Lg beta-lactoglobulin; PFC plaque forming cell; SRBC sheep red blood cell

1) T 細胞および non T 細胞の分離 (Fig. 1- (I))
患者および健康者のヘパリン加末梢血から、Ficoll-

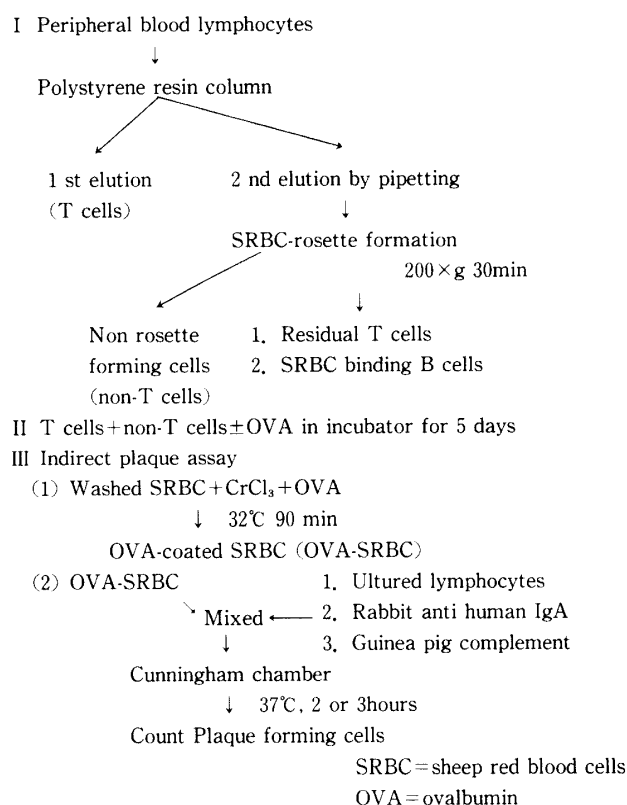


Fig. 1. Method for detection of OVA-specific plaque forming cells.

Conray 比重遠心法⁹⁾(比重1.077)にて分離した単核細胞 1×10^7 個を胎児ウシ血清(FCS)0.4mlに浮遊し、あらかじめ3ml FCSにて洗ったポリスチレン系樹脂カラム¹⁰⁾(Asahi Chemical Inducters)に充填し、さらに0.1mlのFCSを追加し、カラムのコックをとじ、37°C 1時間静置後、一方で調整した37°C 10%FCS加リン酸バッファー(PBS)4-5mlを静かにカラムに流し、コックを開けて第一流出画分を得、これをT細胞群とした。次にカラムに残留する細胞をPBS 10mlを加えながらピペットにてよく攪拌して、物理的に樹脂から分離し、第二流出画分を得、この画分からヒツジ赤血球(SRBC)ロゼット形成法にてSRBCに反応するB細胞群と上記のカラム法にて分離したさい混入してくるT細胞をSRBCと結合させたのちFicoll-Conray比重遠心法にて除去し、non T細胞群とした⁹⁾¹⁰⁾。

2) 培養液

AB型血液の成人5名以上から採取した血清を等量ずつ混合し、56°C 45分間不活化したのち、SRBCと0°Cにて反応させ抗SRBC抗体の吸収を行い、培養液RPMI1640(GIBCO)に10%になるように混和した。さらに2ME(mercaptoethanol)と1-glutaminをそれ

ぞれ50 μ M, 2mMになるように添加し、以下に用いる培養液とした⁸⁾¹⁰⁾。

3) 卵白アルブミン(ovalbumin, OVA)抗原および β -ラクトグロブリン(β -lactoglobulin, β -Lg)抗原はSigma(St. Louis Mo)から購入した。

4) ブラック法の標的細胞に用いる抗原被覆ヒツジ赤血球の調製

PBSでよく洗浄したSRBC0.1mlに1mg/mlのOVAを0.2ml加え、生理食塩水にて全量を4.3mlとしたものに1.25mMのCrCl₃0.4mlを加え、よく攪拌したのち、32°C 90分間培養後、PBSにて3回洗浄し、OVA被覆SRBCを9-11%になるように培養液に浮遊した⁸⁾¹⁰⁾。一方、OVA非被覆SRBCも同様の濃度に調製した。

5) 卵白アルブミン特異的ブラック形成細胞の検出(Fig. 1-(II)(III))

分離した患者および健康者のnon T細胞 7×10^4 個に 1.4×10^5 個のT細胞をそれぞれ加え、方法2)で得た培養液で0.2mlに浮遊したのち培養プレート(Nunc-clon 1-63320, round bottom 96 well microplate)に移し、OVAを10 μ g/mlの割合で添加し、37°C 10% CO₂培養器にて5日間培養後、OVA被覆SRBC浮遊液25 μ l、各濃度のウサギ抗ヒトIgA抗体(医学生物学研究所)25 μ l、および5倍希釈のモルモット補体10 μ lを細胞ペレットに添加し全量をCunningham chamberに移し、パラフィンにて密封し、37°C 2時間~3時間静置した後、検鏡(40倍)にてplaque forming cell(PFC)を同定し、その総数を算定した。

6) ブラック形成細胞のOVA特異性の検討

出現してくるブラック形成細胞がOVA特異であることを検討するために、①PFC assay時、補体を加えなかった場合、②培養細胞を加えなかった場合、③標的細胞として非被覆SRBCを用いた場合、④PFC assay時に大量のOVA抗原を加えた場合、⑤PFC assay時に β -Lgのように他の抗原を加えた場合のそれぞれのPFC数を算定した⁸⁾¹⁰⁾。

7) 統計学的検討はnon-parametric Wilcoxon rank sum testによった。p valueが0.05以下の場合有意とし、すべてのデータはmean $\pm$ standard error(S.E.)で表した。

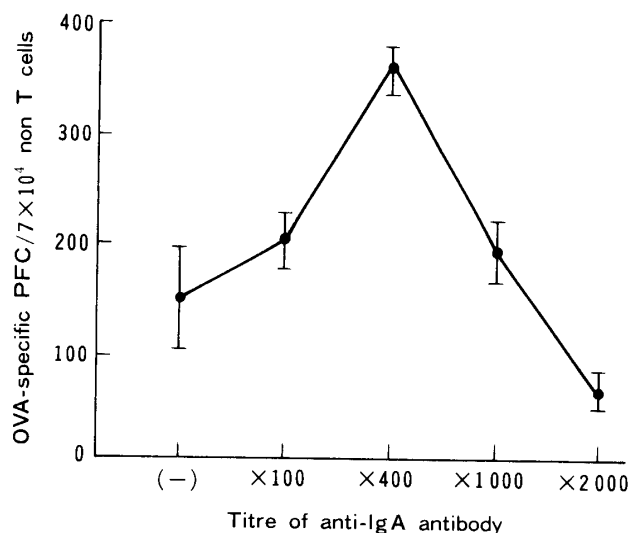


Fig. 2. Generation of OVA-specific IgA-PFC (n=5), mean±SE.

結 果

1) ブラック形成細胞の検出

健康者 non T 細胞 7×10^4 個に 2 倍の健康者 T 細胞を組み合わせ、 $10 \mu\text{g/ml}$ OVA を添加して 5 日間培養したのち、OVA 被覆ヒツジ赤血球を標的細胞とする間接型ブラック法にて、出現してくるブラック形成細胞 (OVA-PFC) を検討した。PFC assay 時に 2 次抗体として 400 倍希釈の抗ヒト IgA 抗体を添加した場合 214 ± 56 の PFC が出現し、他の希釈濃度と比較して最大値を示した (Fig. 2)。また、2 次抗体として 2000 倍希釈した抗ヒト IgG 抗体を用いた場合では 289 ± 13 の PFC が出現し、他の希釈濃度と比較して最大値を示した (Fig. 3)。

2) ブラック形成細胞の特異性についての検討

PFC assay 時に補体を加えなかった場合、および培養細胞を加えなかった場合には PFC は出現しなかった。標的細胞として抗原非被覆 SRBC を用いた場合には PFC 数はほとんど検出されなかった (Fig. 4)。よって、このブラックは免疫細胞融解現象によるものと考えられ、また、ヒツジ赤血球に対する抗体産生をみているのではないと考えられた。

3) ブラック形成細胞の抗原特異性についての検討

PFC assay 時に OVA 抗原 $1000 \mu\text{g/ml}$ を添加したところ、PFC の出現は抑制された。対照抗原として用いた β -Lg 抗原ではそのような抑制をみとめなかった (Fig. 5)。よって、このブラックは OVA 特異的抗体産生細胞を観察しているものと考えられた。

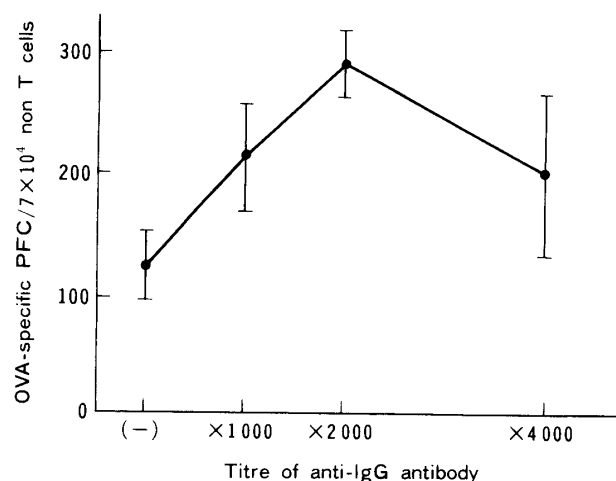


Fig. 3. Generation of OVA-specific IgG-PFC (n=5), mean±SE.

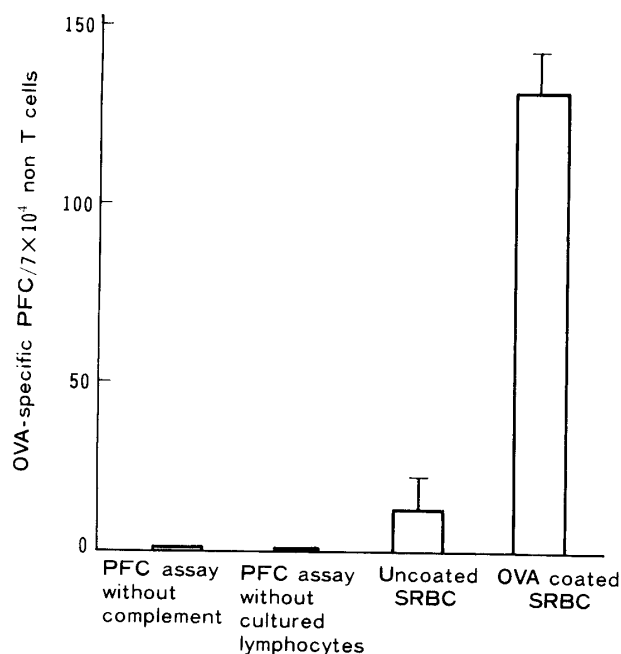


Fig. 4. Specificity of PFC. Generation of OVA-specific PFC was showed when the target cells for the PFC assay were OVA coated SRBC but not uncoated SRBC. (n=3), mean±SE

4) 卵アレルギー患児末梢血リンパ球における OVA 特異的 IgA 産生ブラック形成細胞の検出

健康者の場合と同様に non T 細胞を T 細胞に組み合わせ、OVA 抗原を添加したのち、5 日間培養後、400 倍希釈の抗ヒト IgA 抗体を 2 次抗体として用い測定し出現してくる IgA-PFC を検討したところ、non T 細胞 7×10^4 当り 6 ± 3 の PFC しか出現せず、患者では健康者に比較して有意の低値を示した (Fig. 6)。この場

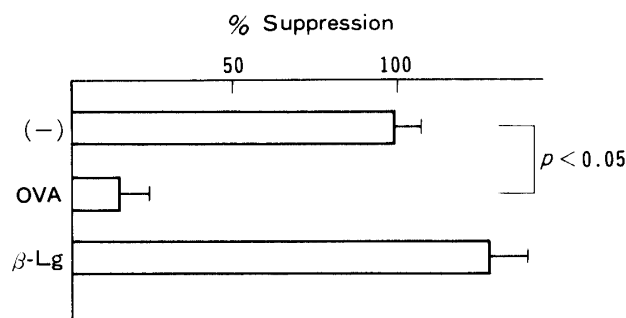


Fig. 5. Inhibition of IgA-PFC production by OVA antigen. Results showed a representative data of three independent experiments.

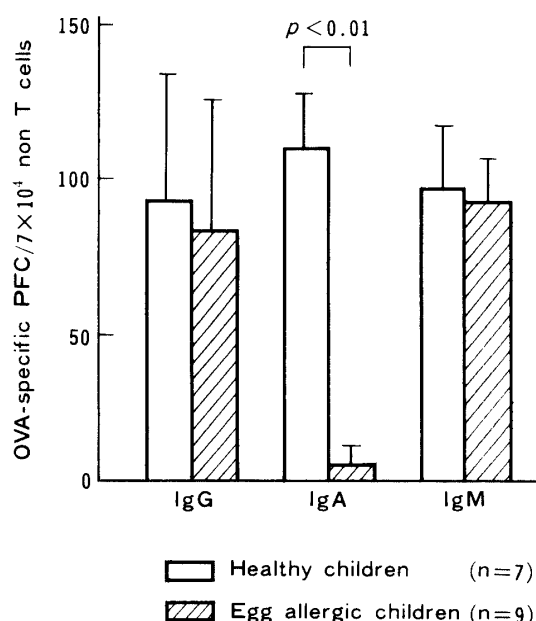


Fig. 6. Comparison of OVA-specific IgG, IgA and IgM-PFC between healthy and egg allergic children. mean ± SE

合、2次抗体を添加しなかった場合のブラックをIgM特異的ブラック形成細胞とし、2次抗体として抗IgA抗体を添加した場合に出現してくるブラックから抗IgA抗体非添加の場合に出現してくるブラックを差し引いたものをIgA特異的ブラック形成細胞とした。

5) 卵アレルギー患児末梢血リンパ球におけるOVA特異的IgG産生ブラック形成細胞の検出

2000倍希釈の抗ヒトIgG抗体を2次抗体として用い出現してくるIgG特異的ブラック形成細胞を検討したところ、non T細胞7×10⁴当たり84±42 (n=9)で、健康小児の94±44 (n=7)と比較して有意の差はみとめられなかった (Fig. 6)。この場合、2次抗体として抗IgG抗体を添加した場合のPFCから抗IgG抗体非添加の場合出現してくるブラックを差し引いたも

のをIgG特異的ブラック形成細胞とした。

6) 卵アレルギー患児末梢血リンパ球におけるOVA特異的IgM産生ブラック形成細胞の検出

2次抗体を添加しない場合のPFC数をIgM特異的ブラック形成細胞として検討したところ、患児では出現したブラックは93±13 (n=9)で健康小児の場合の98±22 (n=7)と比較して有意の差はみとめられなかった (Fig. 6)。

7) 今回対象とした卵アレルギー患児の血清中の総免疫グロブリン値はそれぞれIgG894.4±99.6mg/dl, IgA87.7±21.5mg/dl, IgM170.1±21.9mg/dlで、健康小児の場合のIgG934±113.7mg/dl, IgA76.4±16mg/dl, IgM158±13.5mg/dlと比較してそれぞれ有意差はみとめられなかった。

考 察

アレルギー性疾患とIgAとの関係については未だ明らかな結論は得られていないが、IgAは皮膚や粘膜面からの抗原の侵入に対する免疫学的反応の主役として抗原の侵入を阻止すると一般に考えられている¹¹⁾。したがって、粘膜の障害や欠損によりIgA生成が障害されると、抗原除去能に破綻が生じて大量の抗原が侵入し、その結果IgEなど他のクラスの抗体の産生が増加しアレルギー性疾患が発症しやすくなると考えられている¹²⁾。また、血清レベルでの検討でも食物アレルギー児のIgA値はやや低値を示すという報告がみられ¹³⁾、我々も乳幼児における食物アレルギー患者の唾液分泌型IgAが同年齢の健康児に比較して明らかに低値であることを示した⁶⁾。このように、食物アレルギー患者におけるIgAあるいは分泌型IgAはその遮断抗体としての働きにおいて注目されている。しかし、選択的IgA欠損症におけるアトピー性疾患発症の頻度は報告によりまちまちで、一般人口における頻度とそれほど差がないとする報告も多く、IgA欠損症によって抗原除去能に欠陥があっても、それだけではアレルギー疾患発症の要因とはならないともいわれている。すなわち、アトピー素因をもった個体における抗原除去能の欠陥がアレルギー疾患発症の引き金になるのではないかと考えられる。

末梢血リンパ球をPWM (pokeweed mitogen)で刺激して得られた培養上清中のIgAの多くはdimer型であるといわれ、末梢血リンパ球中にGALT (gut-

associated lymphoid tissue) 由来の IgA 産生細胞ないしその前駆細胞の存在が推測され、末梢血リンパ球培養によって IgA 産生細胞の“homing”現象の一局面をとらえることができると考えられている¹⁴⁾。そこで今回我々は、食物アレルギー患者における抗原除去能低下としての分泌型 IgA 低値の原因を検討するために、卵アレルギー患児の末梢血リンパ球を用いて OVA 被覆 SRBC を標的細胞とした間接型ブラック法によって末梢血リンパ球から産生されてくる抗 OVA 抗体産生細胞を検出し、末梢血リンパ球レベルでの抗原特異的な IgA 産生能を検討した。この方法の要点は、ポリスチレン系樹脂カラムで分離した T 細胞を用いることによって、SRBC ロゼット法によって分離した場合における SRBC 抗原による T 細胞の感作をさけることができたこと、non T 細胞から SRBC 結合細胞をロゼット法により除去するという工夫を加えることにより、SRBC 自身に対する抗体産生細胞の出現を減少させ、出現してくる OVA 特異的ブラック形成細胞を検出しやすくしたことである。今回この方法により、卵アレルギー患児では IgG, IgA, IgM 各クラスの OVA 特異的免疫グロブリン産生能において IgA の産生能が低下していることが示唆され、食物アレルギー患者における分泌型 IgA の低値の要因であると推測された。また、食物アレルギー患児では末梢血中の IgA 抗体産生細胞が粘膜局所の反応部に集中した結果 IgA 抗体産生が低下しているとも考えられ、現在この IgA 産生の低下している原因については不明であるが、さらにこの方法を用いることによって、卵アレルギー患者における OVA 特異的 IgA 産生能低下の解析が可能になると考えられた。

文 献

- 1) Tomasi, T.B. Jr., Tan, E.M., Solomon, A. and Pendergast, R.A.: Characteristics of an immune system common to certain external secretions. *J. Exp. Med.* 121, 101-123, 1965.
- 2) Newcomb, R.W. and Devald, B.L.: Protein concentration in suputa from asthmatic children. *J. Lab. Clin. Med.* 73, 734-743, 1969.
- 3) Buckley, R.H.: Clinical and immunologic feature of selective IgA deficiency. *Birth Defects.* 11, 134-142, 1975.
- 4) Kaufman, H. and Hobbs, J.: Immunoglobulin deficiencies in atopic population. *Lancet* 2, 1061-1063, 1970.
- 5) Taylor, B., Norman, A.P., Drgel, H.A., Stokes, C.R., Turner, M.W. and Soothill, J.F.: Transient IgA deficiency and pathogenesis of infantile atopy. *Lancet* 2, 111-113, 1973.
- 6) 山口公一, 他: 気管支喘息小児における分泌型 IgA の検討. *アレルギー* 34, 234-238, 1985.
- 7) Payette, K. and Weiss, N.S.: Salivary IgA levels in atopic children. *Ann. Allergy* 39, 328-331, 1977.
- 8) Noma, T., Yata, J., Shishiba, Y. and Inatsuki, B.: In vitro detection of anti-thyroglobulin antibody forming cells from the lymphocytes of chronic thyroiditis patients and analysis of their regulation. *Clin. Exp. Immunol.* 49, 565-571, 1982.
- 9) Boyum, A.: Separation of lymphocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Labo. Invest.* 21, 51-53, 1968.
- 10) Noma, T., Kawano, Y., Yoshimura, N., Abe, T., Inagaki, K. and Yata, T.: A rapid isolation technique of unmodified human T cells on a polystyrene resin column. *Eur. J. Immunol.* 15, 833-837, 1985.
- 11) Stokes, C.R., Soothill, J.F. and Turner, M.W.: Immune exclusion is a function of IgA. *Nature* 255, 745-746, 1975.
- 12) Walker, W.A. and Isselbacher, K.J.: Intestinal antibodies. *N. Engl. J. Med.* 297, 767-773, 1977.
- 13) 岩崎栄作, 他: 小児気管支喘息における食餌アレルギーの検討. *小児保健研究* 38(2), 104-111, 1979.
- 14) 嵐 方之, 赤保内良和, 大嶋哲夫, 谷内 昭: リンパ球培養により産生される IgA の分子性状の解析. *臨床血液* 23, 1847-1854, 1982.

IN VITRO DETECTION OF OVALBUMIN-SPECIFIC IgA PRODUCING CELLS FROM LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH HEN-EGG ALLERGY

Koichi Yamaguchi¹⁾, Tsuyoshi Noma²⁾, Minoru Baba¹⁾ and Junichi Yata³⁾
Departments of Pediatrics, ¹⁾Doai Memorial Hospital, ²⁾Saitama Medical School,
³⁾Tokyo Medical and Dental University

We studied antigen-specific IgA production from the peripheral lymphocytes of children with hen-egg allergy by using the method of indirect plaque forming cell (PFC) assay. The number of OVA-specific IgA-PFC generated from the patient lymphocytes was low ($6 \pm 3/7 \times 10^4$ non T cells) in comparison with age-matched normal children ($112 \pm 18/7 \times 10^4$ non T cells). The numbers of OVA-specific IgG-PFC and IgM-PFC generated from the patient lymphocytes were not so different from those of the age-matched normal children. This indicates that the activity of OVA-specific IgA-antibody production was reduced in patients with hen-egg allergy.
