

食物アレルギーが疑われた小児におけるヒスタミン遊離試験 (HRT) の有用性ならびにヒスタミン non releaser についての検討

伊藤 玲子¹⁾ 奥山 健一¹⁾ 横田 俊平²⁾ 相原 雄幸¹⁾

横浜市立大学医学部附属市民総合医療センター¹⁾, 横浜市立大学医学部小児科²⁾

key words : ヒスタミン遊離試験 (HRT), 食物アレルギー, non releaser

和文抄録

近年 I 型アレルギーの検査法のうちヒスタミン遊離試験 (HRT) はアレルゲン特異的 IgE 抗体測定法 (CAP-RAST®) に比べ、肥満細胞や好塩基球からのヒスタミン遊離という生体反応を *in vitro* で観察できることからアレルゲン検索法として頻繁に用いられるようになってきた。

今回我々は食物アレルギーが疑われた小児アレルギー疾患患児 54 例に対して 2 種類の方法 (ルシカ®, シオノギ®) を用いて HRT を行い、CAP-RAST® の結果との比較も含めてその有用性、限界などについて検討を行った。

いずれの方法においても CAP-RAST® の結果に比較して、HRT の陽性率は低い傾向があり、また抗原により陽性率に差を認めた。さらに、臨床症状、特に即時型反応を認めた症例では HRT の陽性率が高い傾向を認めた。しかしシオノギ® で抗 IgE 抗体刺激によるヒスタミン遊離を測定したところ、即時型の症状を有する症例の中にもヒスタミン遊離を認めない anti-IgE non releaser が 7 名存在した。これらの症例は主に低年齢層であり比較的血清総 IgE 値の低い症例であることが明らかになった。一方、卵白に対する即時型反応を呈する症例の中にも *in vitro* で卵白抗原で刺激してもヒスタミン遊離を認めない allergen non releaser が 3 名存在した。今回の検討から、それぞれの検査法の特徴を把握した上で検査を行っていくことが大切であると思われた。

はじめに

近年 HRT (ヒスタミン遊離試験) が保険適応となり、臨床的にもアレルゲン検索の手段としてしばしば用いられてきている。HRT は感作された好塩基球からアレルゲン刺激により遊離されるヒスタミン量を測定する方法であり、I 型アレルギー反応に近い状況を *in vitro* で作り出していることからアレルゲン診断における有用性が期待されている。これまでに我々はルシカ HRT® を用いて小児アレルギー患者について検討を行い、吸入抗原における HRT の陽性率に比較して、食物抗原に対する陽性率が低いことを報告した¹⁾。

今回我々は食物アレルギーが疑われる小児アレルギー性疾患患児を対象として、2 種類の方法 (ルシカ®²⁾, シオノギ®^{3, 4)}) を用いて HRT を行ない、その有用

性や限界について CAP-RAST® の結果も含めて比較検討した⁵⁾。また抗 IgE 抗体刺激による HRT においてヒスタミンを遊離しない anti-IgE non releaser について検討した。さらに、アレルゲンに対する即時型反応を有し、アレルゲン特異的 IgE 抗体陽性であるにもかかわらずアレルゲン刺激においてヒスタミンを遊離しない allergen non releaser についても検討を行った。

対象と方法

対象は 2000 年 7 月から 12 月までの間に横浜市立大学医学部附属市民総合医療センター小児科アレルギー外来を受診した、6 ヶ月から 16 歳の食物アレルギーが疑われた 54 例 (平均年齢 3.2 歳) である。男児 31 名、女児 23 名。今回検討した対象症例の年齢構成は、0～2 歳までで 52%、4 歳までで約 75% と低年齢症例が多く、ほとんどが乳幼児であった。対象症例の基礎アレルギー疾患は、重複例を含めアトピー性皮膚炎 32 名、気管支喘息 26 名などであり、これらの症例が食物によって誘発された臨床症状は急性蕁麻疹 32 名、湿疹 23 名、

Abbreviation : HRT ; histamine release test, NR ; non releaser, R ; releaser, RAST ; radioallergosorbent test, SD ; standard deviation

咳1名，下痢，嘔吐などの消化器症状が3名であった（重複例を含む）．その反応は即時型反応28名（卵白18名，牛乳8名，小麦1名，大豆1名），遅発型反応15名（卵白11名，牛乳4名），二相型反応8名（卵白5名，牛乳3名）であった．

方法はHRT検査には末梢血を用い，食物アレルギーとしては，卵白，牛乳，小麦，米，大豆の5種類を選択し，測定は外部検査所に依頼した．シオノギ®では抗IgE抗体刺激によるヒスタミン遊離も同時に測定した．また末梢白血球数，ならびにその分画，血清IgE抗体，前述の5つのアレルギー特異的IgE抗体（CAP-RAST®）を同時に測定した．さらに，病歴ならびに食物負荷試験結果より臨床症状の有無を調査し，種々の比較検討を行った．なおCAP-RAST®はclass 2以上を，HRTではclass 1以上を陽性と判定した．統計にはFisherの直接法，ピアソン，t検定を用い，相関係数や有意差を検討し， $p<0.05$ を有意差ありと判定した．

結 果

対象症例の末梢白血球数は $8,766 \pm 2,859/\text{ml}$ (mean $\pm$ SD)，好酸球分画は $6.2 \pm 4.5\%$ ，好塩基球分画は $0.5 \pm 0.5\%$ ，血清総IgE値は $1,244 \pm 2,038 \text{ IU/ml}$ であった．5種類のアレルギーに対する検査結果を比較検討したところ，卵白，牛乳，小麦，米，大豆のすべてに関し

てCAP-RAST®とHRTの結果の相関を検討したところ，5つのすべてのアレルギーに対して比較的低い相関係数であった（表2a）．そのなかでシオノギ®はルシカ®を上回る相関係数を示した．さらに二種類のHRT測定結果の相関を検討したところ，最も相関係数が高かったのは牛乳の0.960 ($p<0.01$)であった（表2b）．また，小麦を除く他のアレルギーでも0.65以上 ($p<0.01$)と比較的相関は良好であったが，必ずしも高値ではなかった．小麦における相関係数が低い理由は不明であるが，陽性症例が少なかったことが考えられる．同様に，それぞれの検査結果の一致率についても検討を行った（表2a，2b）．牛乳を除く4種類のアレルギーについての検査結果については高い一致率が得られた．

HRTと臨床症状に関しては陽性症例数の関係から卵白と牛乳についてのみ検討を行った．鶏卵摂取により症状を認める症例では無症例よりHRT陽性率は高く，さらに即時型反応陽性例では遅発型反応例と比較して陽性率はさらに高くなった（表3）．しかしルシカ®では5.9%，シオノギ®では29.4%の高い偽陽性を認めた．次に卵白に対するそれぞれの検査結果と症状との関係を調べた（図1a-1c）．この図よりそれぞれの検

表 1. 各検査の陽性率%（陽性数／検査人数）

	卵白	牛乳	小麦	米	大豆	抗IgE抗体
ルシカ®	38.9(21/54)	18.5(10/54)	11.5(6/52)	13.5(9/52)	7.7(4/52)	ND
シオノギ®	51.9(27/54)	18.5(10/54)	11.1(6/54)	29.6(15/54)	25.9(14/54)	87.0(47/54)
CAP-RAST®	77.8(42/54)	35.2(19/54)	35.2(19/54)	39.6(21/53)	47.2(25/53)	ND

ND; no data, * $p<0.01$

表 2. a) 2種類のHRTとCAP-RASTとの相関

アレルギー	ルシカ®		シオノギ®	
	相関係数	一致率(%)	相関係数	一致率(%)
卵白	0.51*	61.1	0.58*	72.2
牛乳	0.66*	40.7	0.67*	79.6
小麦	0.34**	72.2	0.52*	75.9
米	0.42*	70.4	0.49*	77.8
大豆	0.45*	61.1	0.65*	68.5

b) 2種類のHRT測定結果の相関

アレルギー	相関係数	一致率(%)
卵白	0.67*	81.5
牛乳	0.91*	92.6
小麦	0.34**	87.0
米	0.65*	81.5
大豆	0.65*	81.5

* $p<0.01$, ** $p<0.05$

表3. 卵白に対する症状の有無による検査陽性率(%)

症状(例数)	あり(33)		なし(17)	
	即時型(21)		遅発型(12)	
ルシカ®	45.5	57.1	25.0	5.9
シオノギ®	66.7	76.1	50.0	29.4
CAP-RAST®	93.9	95.2	91.7	41.2

*p<0.05

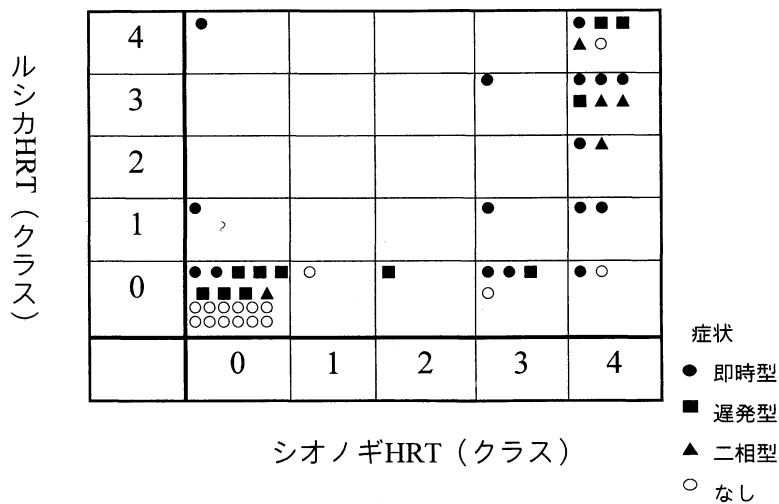


図1-a. 卵白HRT

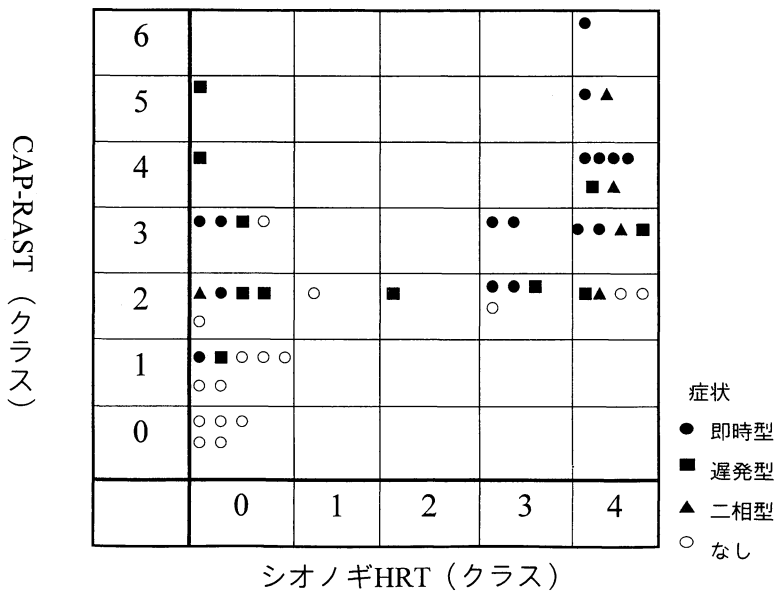


図1-b. 卵白シオノギHRTとCAP-RAST

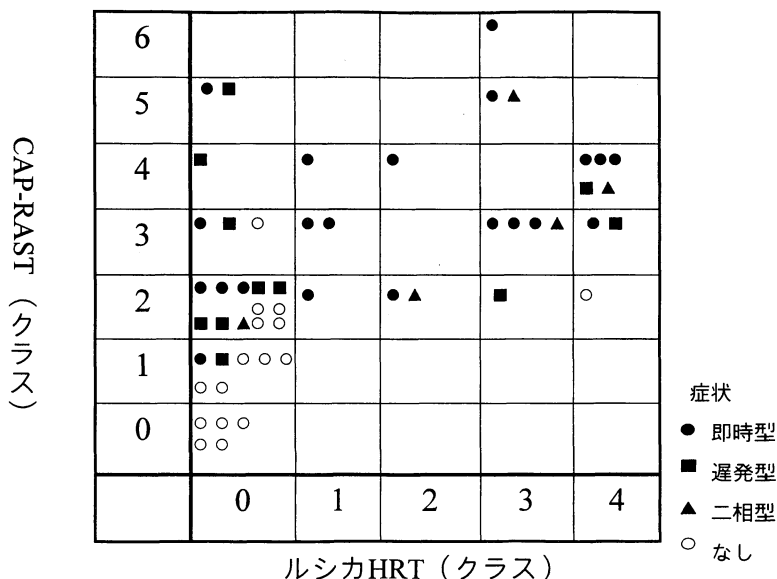


図1-c. 卵白ルシカHRTとCAP-RAST

査結果が必ずしも一致しないこと、また即時型反応を示す症例の中にもHRTではヒスタミン遊離が見られないnon releaserが存在すること、さらにアレルギーに対する症状がない場合でもHRTが陽性となる症例が存在することが示された。一方、牛乳の場合でも鶏卵とほぼ同様の結果であったが、即時型反応陽性例ではHRT陽性率が高く（80%）、無症状例における偽陽性率は低い傾向を認めた（5～8%）。以上の臨床症状と検査結果の検討から、各検査法の感度と特異度を算出した（表4）。その結果、卵白に対する各検査の感度は45.5%から93.9%で、高いものから順にCAP-RAST®>シオノギ®>ルシカ®であるのに対し、特異度は58.8%から94.1%であった。一方牛乳では感度は50%から75%で高い順にCAP-RAST®>ルシカ®>シオノギ®であり、特異度は81.6%から94.7%で卵白に対する特異度より高かった。

次にHRTにおけるnon releaserについて検討を行った。抗IgE抗体刺激によってヒスタミンを遊離しないanti-IgE non releaserは7例（13%）であった。これらのnon releaserは全例が2歳以下であり、releaserと比較して有意に低年齢に多くみられた（ $p<0.05$ ）。また比較的血清IgE値が低い症例に多い傾向を認めた（表5）。またanti-IgE non releaserに関して即時型反応の有無についても検討した。7例のnon releaserのうち卵白、牛乳に対する即時型反応を3例で認めた。また5種類の

アレルギーに対するCAP-RAST®陽性率に関しては、non releaserとreleaser間で明らかな差を認めなかった（ $p>0.05$ ）。

さらに卵白に対する即時型反応を示す症例のHRTを検討したところ、卵白刺激でヒスタミン遊離を認めたreleaserとnon releaserに分類された（表6）。その結果、卵白に対して即時型の症状を認めるにもかかわらず、in vitroの卵白刺激でヒスタミンを遊離しない卵白に対するnon releaserは3例（14.2%）であった。またこれらの3例は抗IgE抗体刺激に対してはヒスタミン遊離がみられた。Allergen non releaserとreleaserの比較検討を行ったところ、non releaserでは有意に好酸球数が高値であった（ $p<0.01$ ）。

考 察

今回比較検討を行った2種類のHRT法の違いに関して検討した（表7）。両者とも末梢血を用いin vitroでアレルギー刺激によるマスト細胞あるいは好塩基球からのヒスタミン遊離を測定するものであるが、主な違いはルシカ®では全血を用いるのに対し、シオノギ®では末梢血から白血球を分離した後に測定する点、また検査結果の判定に関してルシカ®ではヒスタミンの遊離量を測定しているのに対してシオノギ®ではヒスタミンの遊離率を用いている点である。今回2種のHRTの

表4. 各検査の感度と特異度 (%)

アレルゲン		ルシカ®	シオノギ®	CAP-RAST®
卵白	感度	45.5	66.7	93.9
	特異度	94.1	70.5	58.8
牛乳	感度	58.3	50.0	75.0
	特異度	94.7	92.1	81.6

表5. Anti-IgE non releaser と release の比較

	NR	R
症例数 (%)	7(13.0)	47(87.0)
年齢 (歳)	0.57±0.8 *	3.57±3.6 *
男:女 (人)	4:3	27:20
血清総IgE (IU/ml)	116±72 (56~225)	1,411±2,136 (18~10,323)
WBC (/μl)	9,506±2,796	8,320±2,882
好酸球 (%)	5.96±4.6	6.1±4.5
食物摂取にて即時型症状あり/総数 (人)		
卵	2/7	20/43
牛乳	1/7	8/45
CAP-RAST®陽性率 % (陽性数/検査人数)		
卵白	57.1 (4/7)	83.0(39/47)
牛乳	42.9 (3/7)	31.9(15/47)
小麦	0 (0/7)	34.0(16/47)
米	16.7 (1/6)	40.4(19/47)
大豆	33.3 (2/6)	49.0(23/47)

NR: non releaser R: releaser、*p<0.05

表6. 卵白刺激に対する即時型反応を認めた患児における non releaser と release の比較

	NR	R
症例数 (%)	3(14.2)	18(85.8)
年齢 (歳)	2±1	3.2±3.42
男:女 (人)	2:1	8:10
血清総IgE (IU/ml)	2,984±3,736	1,181±1,900
WBC (/μl)	9,000±2,468	8,191±2,292
好酸球 (%)	12.2±5.95 *	4.89±2.95 *
好塩基球 (%)	0.3±0.3	0.5±0.5
卵白CAP-RAST®(score)	1.9±1.3	32±41

NR: non releaser R: releaser、*p<0.01

表7. 2種類のHRTの比較

	ルシカ®	シオノギ®
検体	末梢血全血	末梢血白血球
採血管	ヘパリン管	EDTA-2Na 管
抗原	Greer Labo 社	Greer Labo 社
抗原種類	食物10種 吸入抗原10種	食物5種,吸入5種 抗IgE抗体刺激
検体量	25 μ l	20 μ l
反応時間	37°C 90min	37°C 60min
測定	遊離量	遊離率
カットオフ値	15ng/ml	20%
クラス	0~4	0~4
好塩基球数の影響	あり	なし
その他		アレルギー濃度による ヒスタミン遊離曲線

結果に差が出た理由に関してはシオノギ®では洗浄白血球を用いて血清非存在下に測定を行っているのに対し、ルシカ®では全血を用いて測定しているため、血清の影響を受けていることが考えられること、また測定結果の判定法の違いから、シオノギ®では全ヒスタミン量を測定してヒスタミン遊離率を測定しているのに対し、ルシカ®ではヒスタミン遊離量を測定しているため、好塩基球数が結果に影響していることなどが考えられた。またシオノギ®では、検査結果にアレルギー濃度によるヒスタミン遊離曲線グラフが添付されることも検査結果を判定する際に有益である。さらにシオノギ®では抗IgE抗体刺激によるヒスタミン遊離を測定しており、抗IgE抗体刺激によるnon releaserが明らかとなった。

好塩基球に免疫学的刺激を与えたときに健常者で10~20%の割合でヒスタミンを遊離しない症例(non releaser)が存在する。Non releaserにはanti-IgE抗体刺激に反応しないanti-IgE non releaser とanti-IgE抗体には反応するが、アレルギーには反応しないallergen non releaserが知られている。今回の我々の検討でも小児アレルギー患者54症例中7例(13%)にanti-IgE non releaserが認められ、さらに卵白摂取で即時型反応を認めた21症例中3例(14.8%)のallergen(卵白)non releaserが認められた。その原因は明らかではないがallergen non releaserの場合、好塩基球中のヒスタミン含有量や細胞表面のIgE抗体の量は正常であることから、ヒス

タミンを分泌するシステムの異常などの好塩基球の内因性の欠陥、またはIgE receptorの器質的異常などが考えられている^{6,8)}。またallergen non releaserは環境や季節ごとのアレルギー暴露量、さらにはアレルギーの治療によりreleaserとなることも知られている⁸⁾。

Anti-IgE non releaserに関しても様々な検討が行われており、やはり原因は明らかではないが、原因としては同様に好塩基球中のヒスタミン含有量は正常であり、IgE receptorの構造や発現量は正常であることから、IgE receptorを介する反応に異常があることが報告されている^{7,9-11)}。さらにanti-IgE non releaserに関しては20歳以下の低年齢層では血清総IgE値が高くなるにつれて、ヒスタミン遊離やanti-IgE抗体に対する感受性が上がり、IgEを介するヒスタミン遊離や好塩基球のanti-IgEに対する感受性が年齢とともに有意に上昇することが知られている⁷⁾。実際にこの点に関しては我々の検討でもnon-releaserは低年齢層で多く見られ、また比較的血清総IgE値の低い症例に多くみられている。またnon releaserに関して臨床症状の有無について調べた結果、卵白、牛乳に即時型反応を呈する症例が3人いたことに関しては、その原因としてHRTの検査そのものの限界の可能性(アレルギー刺激に対して遊離されたヒスタミンがHRTのカットオフ値以下であった可能性)、あるいはこの即時型反応には他のメディエーターが関与している可能性などが考えられた。

HRTはCAP-RAST®に比較して生体内の反応をより鋭敏に反映している点で有用な検査ではあるが、食物アレルギーに対して即時型反応を認める症例の中にもnon releaserが存在していることが我々の検討からも明らかになった。したがってHRTの有用性には限界があることを認識する必要がある。そのため食物負荷試験により引き起こされる症状を予測する際には他の検査結果も含めて慎重に検討していくことが必要であると思われた。

今回の検討の結果、HRTは食物アレルギーの検索において感度はやや劣るものの特異度は高く、有用な検査法の一つであると考えられた。しかし2種類の測定は必ずしも同一とはいえず、さらにそれぞれ長所や短所があり、それぞれの特徴を考慮した上で使用することが必要であると思われた。さらにnon releaserに関しては今回比較的低年齢層で、また血清総IgE値の比較的低い症例に多いことを明らかにしたが、原因はまだ明らかでなく、年齢が上がるにつれて、または血清総IgE値が増えるにつれてreleaserとなる可能性も考えられるため、今後さらに症例数を増やし検討していくことが必要であると思われた。

参考文献

- 1) 琴寄 剛, 高橋由利子, 横田俊平, 相原雄幸: 小児アレルギー疾患の抗原検索におけるヒスタミン遊離試験の有用性と限界. 日本小児アレルギー学会誌14, 132-140, 2000.
- 2) 山越 勝, 藤井陽子, 永井宏幸, 大山邦夫: 新しいアレルギー検査薬“ルシカHRT”. 臨床病理45, 163-173, 1997.
- 3) 中川武正, 駒瀬裕子, 森 直行, 松田健志, 岡野祐二, 秋山一男, 長谷川真紀, 岩崎栄作, 東 日出夫, 伊藤節子: HRTシオノギ (ヒスタミン遊離試験)の臨床的有用性の検討. 医学と薬学43, 861-870, 2000.
- 4) Nishi, H., Nishimura, S., Higashiura, M., Ikeya, N., Ohta, H., Tsuji, T., Nishimura, M., Ohnishi, S., Higashi, H.: A new method for histamine release from purified peripheral blood basophils using monoclonal antibody-coated magnetic beads. J Immunol Methods 240, 39-46, 2000.
- 5) 伊藤節子: ヒスタミン遊離試験の食物アレルギーの診断における有用性. 小児科41, 265-271, 2000.
- 6) Black ,K.M., Lussier, A.M., Gion, W.R., Kasaian, M.T.: Cytokine priming of human basophils: Description of allergen 'nonreleasers'. Int Arch Allergy Immunol 111, 142-151, 1996.
- 7) Marone, G., Poto, S., di Martino, L., Condorelli, M.: Human basophil releasability. J Allergy Clin Immunol 77, 377-383, 1986.
- 8) Bernstein, I.L., Vijay, H.M., Perelmutter, L.: Non-responder basophils in highly ragweed-sensitive subjects. Int Arch Allergy Immunol appl. 55, 215-216, 1997.
- 9) Kepley, C.L., Youssef, L., Andrews, R.P., Wilson, B.S., Oliver, J.M.: Syk deficiency in nonreleaser basophils. J Allergy Clin Immunol 104, 279-284, 1999.
- 10) Nguyen, K.-L., Gills, S., MacGlashan, Jr. D.W.: A comparative study of releasing and nonreleasing human basophils: Nonreleasing basophils lack an early component of the signal transduction pathway that follows IgE cross-linking. J Allergy Clin Immunol 85, 1020-1029, 1990.
- 11) Knol, E.F., Mul, F.P.J., Kuijpers, T.W., Verhoeven, A.J., Roos, D.: Intracellular events in anti-IgE nonreleasing human basophils. J Allergy Clin Immunol 90, 92-103, 1992.

COMPARISON OF TWO DIFFERENT HRT METHODS IN PATIENTS SUSPECTED TO HAVE
FOOD ALLERGY AND ANALYSIS OF ANTI-IgE NON RELEASERS AND ALLERGEN NON RELEASERS.

Reiko Ito¹⁾, MD, Kenichi Okuyama¹⁾, MD, Shumpei Yokota²⁾, MD, Yukoh Aihara¹⁾, MD.

Department of Pediatrics Yokohama City University Medical Center¹⁾

Department of Pediatrics Yokohama City University School of Medicine²⁾

Histamine release test (HRT) is one of popular and frequently used in vitro tests for identifying causative allergens in patients with allergic disease. Five allergens (egg white, cows milk, wheat, rice, and soy) in 54 children with food allergy were examined by two methods of HRT (Lucica HRT[®], Shionogi[®]) and CAP-RAST[®]. Positive rate of CAP-RAST[®] exceeded that of both methods of HRT. Although in patients with early phase response in allergic reaction, positive rate of HRT exceeded the results of patients without any symptoms. Furthermore, HRT revealed lower sensitivity and higher specificity than CAP-RAST[®] in egg white and cows milk.

In addition, we evaluated histamine release to anti-IgE antibody. Seven anti-IgE non releasers were found in 54 patients. All anti-IgE non releasers aged under two years old (0.57 ± 0.8 years) and their serum total IgE levels were relatively lower (116 ± 72 IU/ml) compared with those of releasers. Also, three of seven non releasers manifested early phase reaction to egg white and/or cows milk.

On the other hand, three allergen (egg white) non releasers were found in 21 patients who showed early phase reaction to egg white. Their percentage of eosinophil in peripheral blood leukocytes were relatively higher than those of releasers ($p < 0.01$). The mechanism and pathogenesis of anti-IgE and allergen non releasers have not been elucidated yet.

HRT might be useful in predicting clinical symptoms. However, there is a limitation of its usefulness. Therefore, we should be careful in choosing clinical test in detecting causative allergens.