

High Performance Liquid Chromatography と Radioimmunoassay による全血液を用いた ヒスタミン遊離反応の測定

国立小児病院アレルギー科

岩崎 郁美 勝沼 俊雄 秋本 憲一
赤沢 晃

国立小児医療研究センター

大宜味 亜谷子 海老澤 元宏 斉藤 博久
飯倉 洋治

Key Words : High Performance Liquid Chromatography, Radioimmunoassay,
The Release Of Histamine From Antigen Activated Leucocytes, Bronchial Asthma

要 旨

ダニ抗原刺激による全血よりのヒスタミン遊離試験を行ない、そのヒスタミン値を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と Radioimmunoassay (RIA) で測定し比較検討した。対象は、当院入院または通院中のダニ IgE RAST Score 4 の気管支喘息患児9例 (男5, 女4, 6~13才) である。ヒスタミン遊離試験において、ダニ抗原添加濃度が 10^{-4} ~ $10^0 \mu\text{g/ml}$ での遊離ヒスタミン量と Spontaneous 遊離ヒスタミン量、そして凍結融解法で得られた総ヒスタミン量を2つの方法で測定し、両対数で比較すると、非常に高い相関 ($r=0.948$, $n=63$, $p<0.001$) を示した。RIA 法による *in vitro* のヒスタミン遊離試験は、1 ml 程度の少量の採血で比較的簡便にでき、個々のアレルギー疾患の病態とヒスタミンの関わりを検討することも可能な臨床上有用かつ信頼できる検査法といえる結果であった。

はじめに

末梢白血球よりのヒスタミン遊離試験は¹⁾²⁾、I 型アレルギー反応を *in vitro* で再現できる有用な検査法である。それゆえヒスタミン定量は、より高感度迅速簡便な方法が望まれる。これまで多くのヒスタミン定量法が報告されてきているが、今回、著者らは、全血液を用いてダニ抗原刺激によるヒスタミン遊離試験を行い、得られたヒスタミン量を、HPLC (High performance liquid chromatography) と RIA (Radioimmunoassay) で比較検討した。また、採血後の室温放置時間の血漿ヒスタミン値に及ぼす影響についても検討した。

方 法

1. 全血液よりのヒスタミン遊離試験

(1) 対象

対象は、当院入院または通院中のダニ IgE RAST Score 4 の気管支喘息患児9名 (男5名, 女4名, 6~13才) である。その患者背景は Table 1 の如くである。重症度は、日本小児アレルギー学会重症度判定基準に従った。採血に際しての食事や服薬等の制限はせず、9:00am~11:00amの時間帯で採血を行なった。

(2) 試料の作成

肘静脈より21G針を用いて2 ml へパリン加採血し、その全血を用いてヒスタミン遊離試験を行なった³⁾。直ちに実施できなかった場合は、4℃で保存し6時間以内に測定を行なった。

試薬はすべて Immuntotech 社製の RIA キットを用い、抗原液は鳥居の Lot. No. QS-aF (ダニ), D6S-bF (卵白) を使用し、Fig. 1 に示す如く、へパリン採血した血

Abbreviations : HPLC High Performance Liquid Chromatography, RIA Radioimmunoassay OPA o-phthalaldehyde

Table.1 Patient's Profile

No.	Name	Age <y>	Sex	IgE <IU/ml>	Severity	Complication
1		6	F	2200	Severe	AR
2		7	M	610	Severe	AR
3		6	M	570	Severe	AD, AR
4		8	M	2800	Severe	AD, AR
5		13	M	700	Severe	AD, AR, AC
6		13	F	1200	Severe	AR
7		7	F	730	Severe	AR
8		6	F	2300	Severe	AD, AR, AC
9		12	M	350	Severe	AD

M: male, F: female, AD: Atopic Dermatitis, AR: Allergic Rhinitis, AC: Allergic Conjunctivitis, Severity: by the Classification of Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical Immunology

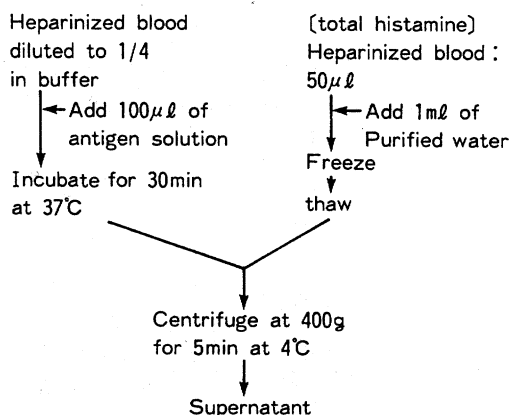


Fig.1 Whole blood method for the release of histamine from antigen-activated leucocytes

液は遊離試験用緩衝液（トリス-ヒドロキシメチル-アミノメタン含有）で4倍希釈した。測定にはその200 μ lを、希釈したダニ抗原液100 μ lに加え、ダニ抗原濃度が 10^{-4} ~ 10^0 μ g/mlの希釈系列を作り、37°Cで30分間インキュベートした。その後4°C、400gで5分間遠心し、その上清を試料とした。Spontaneous 遊離には、ダニ抗原液の代わりに遊離試験用緩衝液100 μ lを使用した。総ヒスタミン量は、全血液50 μ lに精製水1 mlを加え、凍結融解後同様に遠心し、その上清を試料とした。

試料の作成にあたっては、同一条件下で行ない、操作上の非特異的なヒスタミン遊離を最小にするよう注意し、上清の上1/2~1/3をしずかに採取した⁴⁾。

(3) ヒスタミンの測定

RIA 法³⁾: Immunotech 社製の RIA キットを用いて、¹²⁵I をトレーサーとして競合法に基づく固相法で二重測定した。Fig. 2 に示すように、試料または標準ヒス

タミン (0, 0.5, 1.5, 5, 15, 50, 150nM) 100 μ l ずつを¹²⁵I 標準ヒスタミン 1 ml とともにアシル化試薬チューブ (N-ヒドロキシスクシンイミドエステル-スクシニルグリシンアミド含有) に入れ、さらにアシル化緩衝液 (ホウ酸緩衝液) 50 μ l を加え、その混液500 μ l ずつを氷浴上でヒスタミン抗体チューブに入れ4°Cで24時

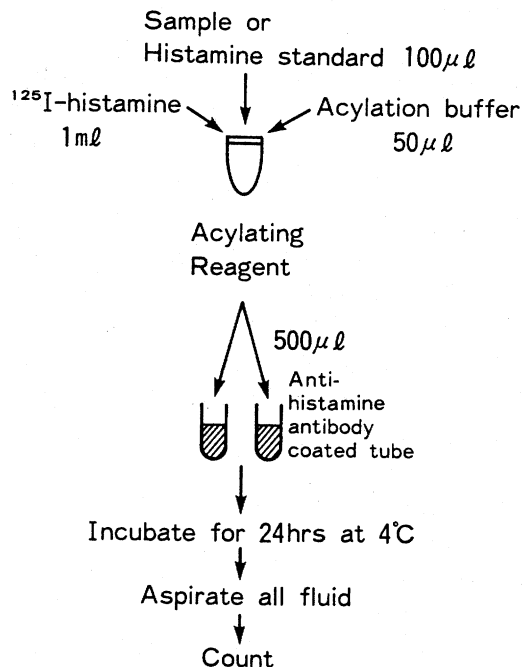
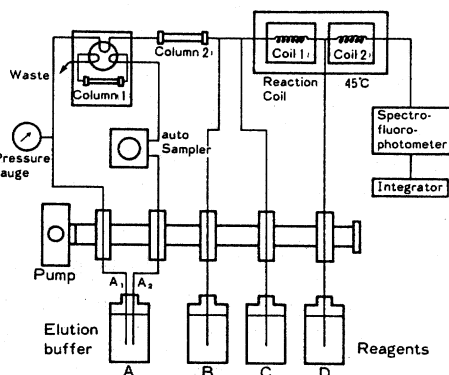


Fig.2 Radioimmunoassay



Column: TSK gel Catechopak, particle size 5 μ m, (1) 4.0mmID $\times$ 60mm, (2) 6.0mmID $\times$ 150mm. Mobile phase: (A₁) 0.25MKH₂PO₄ (0.6ml/min). (A₂) 0.25MKH₂PO₄ (1.2ml/min). Reagents: (B) 0.1% OPA (0.2ml/min). (C) 4NNaOH (0.2ml/min). (D) 10% H₂SO₄ (0.25 ml/min). Reaction coil 1: 0.5mm $\times$ 3 mm. Reaction coil 2: 0.5mm $\times$ 2 mm. Spectrofluorophotometer: excitation wave length 360nm, emission wave length 450nm. (ml/min): flow rate

Fig.3 Flow diagram of the HPLC system

間インキュベートした。次に未反応の ^{125}I 標識ヒスタミンを除去し、ヒスタミン抗体チューブに結合した放射能を、 γ -シンチレーションカウンタ (Aloka の Auto well gamma system, ARC-251) で測定した。トータルカウントと標準ヒスタミンの測定結果から結合%を算出し、それから標準曲線を作成し、試料のヒスタミン値を読み取った。なお、値に0.11を乗じてnM からng/mlに換算した。

HPLC 法：装置は、Shore らの蛍光定量法⁵⁾を自動化し、HPLCにオンライン化で接続するポストカラム法を用いた TOSOH のヒスタミン分析システムを使用した⁵⁾。Fig. 3 の流路図に示す如く、まずプレカラムで前処理したのち、固定相に陽イオン交換樹脂を充填したカラムを、移動相に0.25MKH₂PO₄を用いてポストカラムでヒスタミンを分離溶出したのち、0.1% OPA 溶液、4 N NaOH を加え、テフロンチューブ内で45℃で反応させた。さらに10% H₂SO₄を加えテフロンチューブ内で混和後蛍光モニターに接続し蛍光強度を記録した。測定用試薬 Histamine-2 HCl は半井化学製を用いた。

(4) 室温放置時間と血漿ヒスタミン値

21G 針で肘静脈より12ml 採血し、直ちに EDTA 加スピッツに2 ml ずつ6本に分取した。分取前にスピッツを氷中に冷却していたもの1本 (Pre)、分取直後に冷却したもの1本、そして5分・10分・20分・30分間室温に放置後冷却したもの4本を冷却後20分以内に遠心 (1600g, 10分間) し血漿分離を行なった。その分離血漿の上1/2~1/3をすずかに採取し、血漿ヒスタミンをRIA キットを用いて8例について測定した。さらに分取後30分室温に放置し冷却せずに血漿分離した1本 (NC) も同様に測定した。

結 果

1. HPLC と RIA によるダニ抗原刺激による全血より遊離ヒスタミンの測定

Table 1 に示す9例にダニ抗原を用いて、全血よりのヒスタミン遊離試験を行い、それぞれ spontaneous 遊離ヒスタミンとダニ抗原濃度が 10^{-4} ~ $10^0 \mu\text{g/ml}$ で刺激したときの遊離ヒスタミン量そして総ヒスタミン量を HPLC と RIA で測定し、両対数グラフに表すと、回帰直線は $y=0.332+0.617x$ 、相関係数 $r=0.948$ ($n=63$, $p<0.001$) と非常に良い相関を示した (Fig. 4)。

2. 添加抗原濃度とヒスタミン遊離率 (%)

RIA で測定した spontaneous ヒスタミン遊離とダニ抗原濃度が 10^{-4} ~ $10^0 \mu\text{g/ml}$ でのヒスタミン遊離曲線は Fig 5 の如くである。ヒスタミン遊離率が最大となるダ

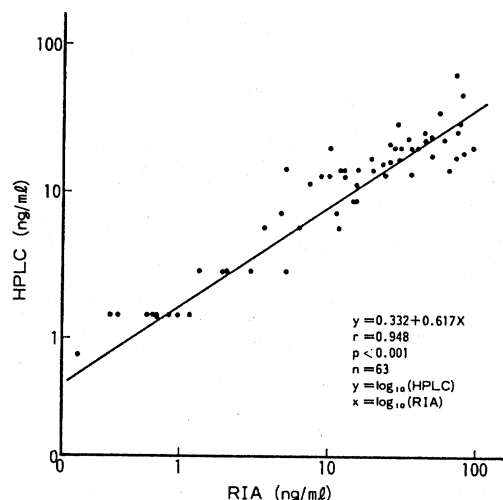


Fig.4 Relationship between histamine concentration from antigen-activated leucocytes measured by the HPLC and the RIA method

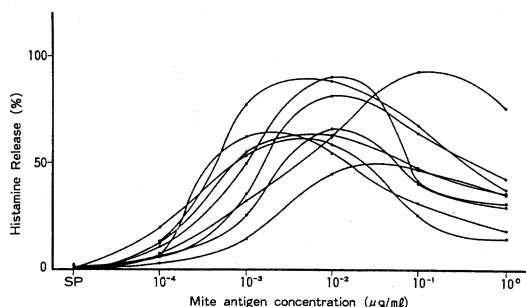


Fig.5 Histamine-release (%) -mite antigen concentration curve

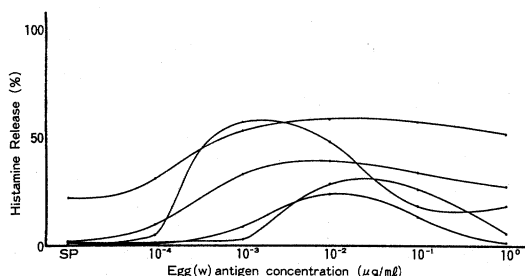


Fig.6 Histamine release (%) -egg (w) antigen concentration curve
SP: spontaneous

ニの添加抗原濃度は、 $10^{-2} \mu\text{g/ml}$ の例が多く、その最大遊離率は、59.3%~93.6%であり症例間でばらつきがみられた。また cell responsibility と cell sensitivity にも各症例間で差がみられ、ヒスタミン遊離反応の仕

方は、各症例間で異なっていた。

ダニ抗原添加の場合と同様にして得られた卵白抗原添加の場合のヒスタミン遊離曲線は Fig6 の如くである。対象は、卵白 IgE RAST Score3 または 4 のアトピー性皮膚炎患児 8 例である。ほぼ同様の結果であった。

3. 室温放置時間と血漿ヒスタミン値

Fig 7 に示す如く、血漿ヒスタミン値は、分取直後に氷冷したものは $0.26 \pm 0.12 \text{ ng/ml}$ 、分取 5 分後に冷却したものは $0.75 \pm 1.18 \text{ ng/ml}$ と 5 分間の室温放置で増加する傾向にあった ($p < 0.1$)。また分取後 30 分間室温放置して冷却せずに血漿分離したものは、 $0.92 \pm 1.03 \text{ ng/ml}$ で直後に冷却したものと比較して有意に増加していた ($p < 0.05$)。

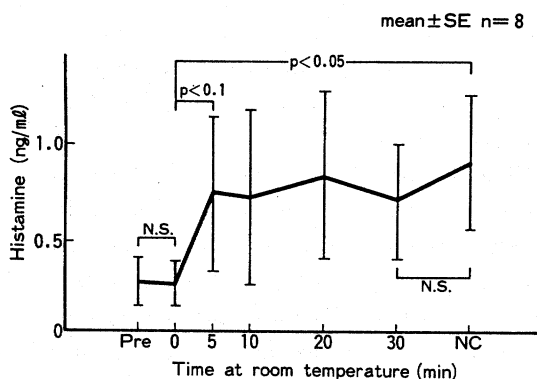


Fig.7 Effect of time stored at room temperature on histamine measurement

Pre: Blood is collected in a cold tube
NC: Blood is not cooled before centrifugation;
(Held at room temperature for 30 min)

考 案

これまで多くのヒスタミン定量法が開発報告されてきているが、その中で蛍光法⁵⁾・酵素アイソトープ法⁵⁾⁻⁹⁾は、現在広く用いられている方法である。Shore らによって報告された蛍光法に、自動分析装置¹⁰⁾⁻¹¹⁾が導入され、さらに大和谷らによって HPLC¹²⁾にオンラインで接続する post-column derivatization 法⁵⁾が開発され、高感度でしかも短時間でヒスタミンの高度の分離が可能となった。これは現在最も信頼できる測定法と考えられている。一方近年開発された RIA 法¹³⁾⁻¹⁵⁾は感度も高く簡便であるためその信頼性が確立されれば、臨床上有用な検査法になると考えられる。RIA 法とオートアナライザーを利用した蛍光法、RIA 法と酵素アイソ

トープ法によるヒスタミンの定量値はすでに比較検討され、良い相関を示していることが報告された¹⁴⁾。しかし、低濃度での信頼性には問題が残されている。しかも Gleich らは、オートアナライザー法と酵素アイソトープ法によるヒスタミンの定量値は施設や実験者によってばらつきが非常に大きいと報告している¹⁶⁾。したがって HPLC と RIA での定量値を比較検討することが、RIA を臨床に利用するうえで必要と考えられる。

今回著者らは、ダニ抗原刺激による全血液からのヒスタミン遊離試験を行い、そのヒスタミン値を HPLC と RIA で測定した。RIA 法での標準曲線は、 $0.5 \text{ nM} \sim 150 \text{ nM}$ ($0.065 \text{ ng/ml} \sim 16.5 \text{ ng/ml}$) の範囲で作成した。HPLC での感度はおよそ 5.5 pg と報告されているので、HPLC よりも劣るが、高い感度を有しているといえる。2つの方法での定量値を両対数で比較すると高い相関を示したが、ヒスタミン遊離試験においては遊離があればそのヒスタミン値は高濃度である。したがって、高濃度での相関は非常に良好だが、血漿ヒスタミン値のような低濃度についてはさらに検討が必要と考えられる。

著者らが検討した HPLC と RIA による血漿ヒスタミン測定値の両対数による比較では、相関係数 $r = 0.498$ ($n = 56$) と良好な相関は得られず、 1 ng/ml 以下では、相関係数 $r = 0.2384$ ($n = 42$) とばらつきが大きかった。高木らの報告¹⁷⁾による HPLC と RIA による血漿ヒスタミン定量値の検討では、相関係数 $r = 0.768$ ($p < 0.01$) と良好な相関を示している。今回著者らが検討したダニ抗原刺激により得られた全血よりの遊離ヒスタミン値は高濃度であり、この場合には HPLC と RIA によるヒスタミン測定値は、良好な相関を示した。

ところで抗原刺激によるヒスタミン遊離, spontaneous ヒスタミン遊離, 総ヒスタミンの各場合とも、希釈血漿中に含まれるヒスタミンや測定操作上の非特異的遊離ヒスタミンなどが含まれる。したがって純粋に白血球よりの遊離ヒスタミンのみを測定しているのではない。遊離率の算出においてはこれらの遊離ヒスタミン量を考慮しなければならないが、ヒスタミン遊離試験においては、その遊離ヒスタミン量は比較的高濃度であり、血漿ヒスタミンは、 1 ng/ml 以下であることが多いのでヒスタミン遊離率を次のように簡略化した。
ヒスタミン遊離率 (%) = (遊離ヒスタミン量 - spontaneous 遊離ヒスタミン量) / (総ヒスタミン量 - spontaneous 遊離ヒスタミン量) × 100。また spontaneous 遊離率 (%) = spontaneous 遊離ヒスタミン量 / 総ヒスタミン

量×100とした。

RIA 法によるヒスタミン遊離の測定は、RIA キットを用いると採血量は1検体50 μ lと少量ですみ、RI施設があれば比較的簡便にできるので、RIA 法はヒスタミン遊離試験には有用な検査法といえる。また RIA 法で測定したダニ抗原刺激そして卵白抗原刺激によるヒスタミン遊離曲線から、白血球のヒスタミン遊離能、アレルギーさらには個々のアレルギー疾患の病態とヒスタミンの関わりを検討することも可能と考えられる。ヒスタミンは、血液中には極めて微量しか存在しないため、その定量値は測定条件の影響を受けやすいことは良く知られている。今回著者らは、RIA 法で血漿ヒスタミンの測定を行う際に、EDTA 加スピッツに分取後血漿分離するまでの室温放置時間のヒスタミン定量値に及ぼす影響を検討した結果、5分間室温放置群でヒスタミン値は上昇する傾向にあり、さらに30分間室温放置群では有意に増加していた。前述したように RIA による血漿ヒスタミン値の信頼性にはまだ問題が残されているが、これらの結果から、より正確なヒスタミンの定量をするためには採血後直ちに冷却するなどの測定操作上の注意も大切といえる。

結 論

1. ダニ抗原刺激による全血液よりのヒスタミン遊離試験で得られたヒスタミン値は高濃度(> 1 ng/ml)では HPLC と RIA で高い相関を示した。
2. RIA 法による in vitro のヒスタミン遊離試験は、少量の採血で比較的簡便にでき、臨床上有用かつ信頼できる検査法といえる。

文 献

- 1) 安枝 浩：ヒスタミン遊離試験，臨床免疫，20，237-247，1988
- 2) 富田有祐，城 宏輔，荒井康男：化学伝達物質の測定—白血球ヒスタミン遊離反応を中心に—，小児科 Mook，No.41，91-104，1986
- 3) ヒスタミンキット「栄研」添付説明書，1988
- 4) Takao Fujisawa, MD, Mikihiro Komada, MD, Kousei Iguchi, MD, and Yukinori Uchida, MD : Plasma histamine levels in normal and atopic children, *Annals of Allergy*, Vol.59, 303-306, 1987
- 5) Shore, P. A., Burkhalter, A. and Cohn, V. H. : A method for the fluorometric assay of histamine in tissues, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 127, 182-186, 1959
- 6) Atsushi Yamatodani, Hiroshi Fukuda, and Hiroshi Wada : High performance liquid chromatographic determination of plasma and brain histamine without previous purification of biological samples : cationexchange chromatography coupled with post-column derivatization fluorometry, *Journal of Chromatography*, 344, 115-123, 1985
- 7) M. Haimart, J. M. Launay, G. Zurcher, N. Cauet, C. Dreux, and M. Daprade : Simultaneous determination of histamine and N α -Methyl histamine in biological samples by an improved enzymatic single isotope assay, *Agents and Actions*, vol. 16, 3/4, 71-75, 1985
- 8) M. J. Brown, P. W. Ind, P. J. Barnes, D. A. Jenner, and C. T. Dollery : A sensitive and specific radiometric method for the measurement of plasma histamine in normal individuals, *Analytical Biochemistry*, 109, 142-146, 1980
- 9) Shuff, R. E., M. A. Beaven : Increased sensitivity of the enzymatic isotopic assay of histamine : measurement of histamine in plasma and serum, *Analytical Biochemistry*, 94, 425-430, 1979
- 10) Siraganian, R. P. : An automated continuous flow system for the extraction and fluorometric analysis of histamine : *Anl. Biochem.* 57, 383-394, 1974
- 11) Siraganian, R. P. : Automated histamine release. A method for in vitro allergy diagnosis, *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.* 49, 108-110, 1975
- 12) Tsuruta Y, Kohashi K. and Ohkura Y. : Determination of histamine in plasma by high speed liquid chromatography, *I. Chromatogr.* 146, 490-493, 1978
- 13) Haydik, I. B. : Histamine determination by radioimmunoassay, *J. Allergy Clin. Immunol.* 71, 152-152, 1983
- 14) 三田晴久，油井泰雄，安枝 浩，信太隆夫，田川宗教：Radioimmunoassay によるヒスタミンの定量，アレルギー-36(3)，121-129，1987
- 15) 渡辺茂男，福田 健，牧野莊平：Radioimmunoassay キットを用いたダニ抗原による白血球ヒスタミン遊離と血漿ヒスタミン値の検討，アレルギーの臨床，7(14)，43-46，1987
- 16) Gerald J. Gleich, M. D., and Willam M. Hull, M.

S.; Measurement of histamine: A quality control study, *J. Allergy Clin. Immunol.* vol166, No.4, 295-298, 1980

谷川高明, 佐竹辰夫, 大和谷厚; 気管支喘息患者における血漿ヒスタミンの高速液体クロマトグラフィーによる測定, *アレルギー* 38(9), 1070-1076, 1989

17) 高木健三, 渡辺孝子, 山本健市, 鈴木隆二郎, 長

DETECTION OF ANTIGEN-INDUCED HISTAMINE RELEASE IN WHOLE PERIPHERAL BLOOD FROM ASTHMATIC CHILDREN: A COMPARATIVE STUDY BETWEEN HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND RADIOIMMUNOASSAY

Ayami Iwasaki, Toshio Katsunuma, Kenichi Akimoto, Akira Akasawa

Department of Allergy, National Children's Hospital

Ayako Oogimi, Motohiro Ebisawa, Hirohisa Saito, Yoji Iikura,

Department of Allergy, National Children's Medical Research Center

Mite antigen-induced histamine release was examined using whole peripheral blood from asthmatic patients. Released histamine concentrations were determined by both high performance liquid chromatography (HPLC) and radioimmunoassay (RIA) and the values were compared statistically.

Samples were taken from 9 children (5 males and 4 females; Age 6-13 years) with IgE RAST Score 4 positive to housedust mite, *Dermatophagoides farinae*.

Three different histamine levels, histamine release challenged with mite antigen at concentrations ranging from 10^{-4} to 10^0 $\mu\text{g/ml}$, spontaneous histamine release, and total histamine levels taken by repeated freeze/thawing, were measured by both HPLC and RIA.

There was a strong correlation ($r = 0.948$, $n = 63$, $p < 0.001$) between the logarithm of values determined by RIA and those determined by HPLC. In addition, the RIA method needs only about 1ml of whole peripheral blood.

Since the reliability of histamine level determination by HPLC is established, these results indicate that the measurement of histamine release in vitro by RIA is sufficiently reliable, simple, and clinically beneficial for young asthmatic children.

(Accepted: August 15, 1990)