食物アレルギー児における食物抗原負荷試験後の血中 Leukotriene の変動

昭和大学 小児科
松　丸　信　一

Key words：Leukotriene，Histamine，Neutrophil，Food allergy，Food challenge

要　旨

該当食物に対する特異 IgE 抗体陽性の食物アレルギー児12例に対し13回の経口食物負荷試験を行い，誘発された症状と血中ロイコトリエン B_4，ロイコトリエン $C_4+D_4+E_4$（以降 Peptide LT）濃度，血中好中球数の変化を経時的に測定した．

その結果，即時型の誘発症状を示す群では，血中 Peptide LT，LTB_4 濃度はともに誘発症状の発現時期とほぼ一致した負荷後1時間と，症状のピークよりやや遅れた負荷後4時間に二相性の上昇を認めた．また血中好中球数は LTB_4 の第一のピークにやや遅れて上昇し始め，LTB_4 の第二のピークとほぼ同時期にピークを示した．

遅発型の誘発症状のみを認めた群では，血中 Peptide LT 濃度は負荷後30分と負荷後3～4時間に二相性の軽度な上昇が認められたものの，即時型の誘発症状はなかった．一方，血中 LTB_4 濃度は負荷後6時間のみに明かな上昇を認めた．しかし血中好中球数は明かな上昇は認めなかった．

以上より，ロイコトリエンが即時型アレルギー反応の症状誘発，遷延に関与している可能性が示唆された．

はじめに

アレルギー性疾患の症状発現にはヒスタミンをはじめ，ロイコトリエン，トロンボキサンなど様々なケミカルメディエーターが関与している．しかし以前に我々が食物アレルギー児に行った抗原負荷試験での結果では，誘発症状の発現時早期にはヒスタミンの上昇は認めなかった[1]．このことはヒスタミン以外の物質が症状発現に関与していると考えられる．今回我々は，食物アレルギー児に食物負荷試験を施行し，その前後での血中 LTB_4，Peptide LT 濃度，血中好中球数の変化を経時的に測定し，若干の知見を得たので報告する．

対　象

平成5年1月から平成6年10月までに，特異 IgE 抗体が陽性を示し，かつ特定食物に明かな過敏症状の既往を有するか，除去試験で過敏症状の改善を示した12例を対象とした．その内訳は，男児10例，女児2例で，年齢は10カ月から6才（平均 3.3才）であった．この12例における基礎アレルギー疾患は，アトピー性皮膚炎単独が1例，アトピー性皮膚炎＋急性蕁麻疹が1例，アトピー性皮膚炎＋気管支喘息が6例，気管支喘息＋急性蕁麻疹が3例，血管性浮腫が1例であった．（表1）

表1．患者背景

患児	年齢,性別		基礎疾患	誘発抗原,CAP-RAST	
■	10M	♂	AE	卵白	class6
	1Y	♂	BA,AD	卵白	class3
	1Y	♂	AD	卵白	class3
	2Y	♀	BA,AD	卵白	class3
	2Y	♂	AD,AU	卵白	class4
	3Y	♂	BA,AU	卵白	class2
	5Y	♀	BA,AD	卵白	class5
	6Y	♂	BA,AD	卵白	class4
	3Y	♂	BA,AU	牛乳	class2
	4Y	♂	BA,AD	牛乳	class6
	5Y	♂	BA,AU	牛乳	class4
	5Y	♀	BA,AD	牛乳	class3
	11M	♂	BA,AD	小麦	class3

AU;急性蕁麻疹　AD;アトピー性皮膚炎　BA;気管支喘息　AE;血管性浮腫

Abbreviation：**EIA**：enzyme immunoassay，**IgE**：immunoglobulin E，**LT**：leukotriene，**RAST**：radioallergosorbent test，**RIA**：radioimmunoassay

方　法

1）食物負荷試験

抗原負荷試験は全て入院させて行った．入院前から該当食物の完全除去を行っている児は，入院後も引き続き完全除去食とし，入院前に除去が行われていない児は，負荷試験までの2週間は完全除去食とした．また服薬中の抗アレルギー剤，抗ヒスタミン剤は負荷試験開始の1週間以上前から中止し，その他の薬剤も負荷試験当日は中止とした．その後，該当食物（卵 8回，牛乳 4回，小麦 1回）による負荷試験をオープンチャレンジの単回負荷にて施行し，負荷前後での血中 LT 濃度，血中好中球数を測定した．負荷試験当日は，負荷後4時間の採血まで絶飲食とした．また負荷食物の投与量については，個々の症例の過去の誘発歴，RAST score などを参考として，卵はかたゆで全卵を1/4から1個，牛乳は50から200ml，小麦はうどんを100gとした．

2）採血

少なくとも負荷1時間前に，被検者の肘静脈にヘパリン加生理食塩水を満たしたディスポ注射器を20Gの留置針を用い留置し，食物負荷前，負荷後30分，1，2，3，4，6，8，24時間の計9回採血した．血液はヘパリン加したプラスチックチューブに移し，直ちに4倍量のエタノールを加えて除蛋白をした後，2000 rpm，4℃，15分間遠心を行い，その上清を試料とし，測定時まで−40℃で凍結保存した．

3）LT の精製，測定[2]（表2）

精製は，ウォーターズ社製の Sep–Pack C_{18} カラムを用い，カラムに無水エタノール 20ml，蒸留水 20mlを通した後，N_2 気流下で濃縮し，蒸留水 20mlを加え，pHを5.1に調整した試料を通し，その後塩類，中性脂肪を除去するため，蒸留水 20ml，石油エーテル 20mlを加えた後，メタノール 10mlにて LTB_4，Peptide LT を抽出し，N_2 気流下で濃縮した．その後アマシャム社製の EIA キットを用い LTB_4，Peptide LT を測定した．

表2．Procedure for purification and assay of Leukotriene

Sample
↓ ← Addition of EtOH (4 volume)
↓ ← Centrifugation at 3000rpm for 10min
Supernatant
↓ ← Evaporation for removal of EtOH
↓ ← Addition of H_2O and adjustment to pH 5.1 (0.1N HCl)
↓ ← Application to Sep-pak C_{18} Column
Sep-pak C_{18} Column ← Washing with EtOH 20ml+H_2O 20ml
↓ ← Washing with H_2O 20ml+Petroleum ether 20ml
↓ ← Elution with MtOH 10ml
Methanol fraction
↓ ← Evaporation
Enzymeimmunoassay

4）測定データの解析

負荷後の各時間の測定値を mean±SE で示し，Paired T test により負荷前値と比較した．

結　果

1）誘発症状（表3）

13回の負荷試験で，11回で即時型，2回で遅発型の誘発症状を認めた．誘発症状の内訳は，即時型の症例では掻痒感と嘔吐が1例，蕁麻疹のみが4例，蕁麻疹と嘔吐が3例，蕁麻疹と喘鳴が1例，蕁麻疹，喘鳴，腹痛が1例，蕁麻疹，喘鳴，下痢が1例であり，遅発型のみの症例ではアトピー性皮膚炎の皮疹の悪化であった．症状発現時間は，即時型の症例では，30分頃より出現し始め，3～4時間後に症状のピークを迎え，6～8時間後に消退を認めた．遅発型の誘発症状のみの症例は24時間前後からアトピー性皮膚炎の皮疹の悪化を認めた．

2）食物アレルギー児の血中 Peptide LT，LTB_4 濃度の基礎値

食物アレルギー児での基礎値は，Peptide LT 77.7±7.0pg/ml.Blood，LTB_4 450±53.8pg/ml.Bloodであり，栗本[3]が測定した健常人での Peptide LT<10 pg/ml.Blood，LTB_4 133±59pg/ml.Blood と比べて高値を示した．

3）即時型の誘発症状を示した群での血中 Peptide

表3．誘発症状と出現時間

患児	誘発抗原と負荷量	誘発症状	症状の発現時間	症状がpeakの時間
	かたゆで全卵 1/4個	蕁麻疹	45分	3時間
	かたゆで全卵 1個	蕁麻疹,嘔吐	40分	4時間
	かたゆで全卵 1個	蕁麻疹	30分	3時間
	かたゆで全卵 1個	蕁麻疹	15分	6時間
	かたゆで全卵 1/4個	蕁麻疹,嘔吐	20分	2時間
	かたゆで全卵 1/2個	蕁麻疹,喘鳴,下痢	2時間	2時間30分
	かたゆで全卵 1/4個	蕁麻疹,嘔吐	1時間45分	5時間
	かたゆで全卵 1/4個	蕁麻疹,喘鳴,腹痛	20分	2時間30分
	生牛乳 50ml	腹痛,蕁麻疹	5分	20分
	生牛乳 100ml	蕁麻疹,喘鳴	10分	1時間30分
	生牛乳 30ml	掻痒感,嘔吐	25分	4時間
	生牛乳 200ml	皮疹の増悪	24時間	
	うどん 100g	皮疹の増悪	24時間	

LT，LTB_4 濃度，血中好中球数の変動

即時型の誘発症状を認めた群では，Peptide LT は，負荷前の78±8pg/ml.Blood から，負荷後30分より上昇し始め，負荷後1時間に172±20pg/ml.Blood となり，その後一時低下したものの負荷後4時間に191±38 pg/ml.Blood と負荷前に比し二相性の有意な上昇が認められた(P<0.01)（図1，2）．また LTB_4 も同様に負荷前の395±45pg/ml.Bloodから，負荷後1時間と負荷後4時間にそれぞれ2593±410pg/ml.Blood および2010±562pg/ml.Bloodと負荷前に比し二相性の有意な上昇が認められた(P<0.01)（図3，4）．誘発症状と負荷後の LT との時間的相関は，症状の発現時間にほぼ一致して LT は上昇し始め，一度低下はするものの症状のピークにやや遅れて再び上昇を示した．

血中好中球数は負荷前の3725±770/mm^3 から負荷後2時間より上昇し始め，負荷後4時間に15125±4685/mm^3 とピーク(P<0.05)となった（図5）．

4）遅発型の誘発症状のみを示した群での血中 Peptide LT，LTB_4 濃度，血中好中球数の変動

遅発型の誘発症状のみを示した群は2例であった．この2例での Peptide LT は1例では負荷前の60pg/ml.Bloodから，負荷後30分,1時間に120pg/ml.Blood そして負荷後3時間に80pg/ml.Bloodと二相性の軽度

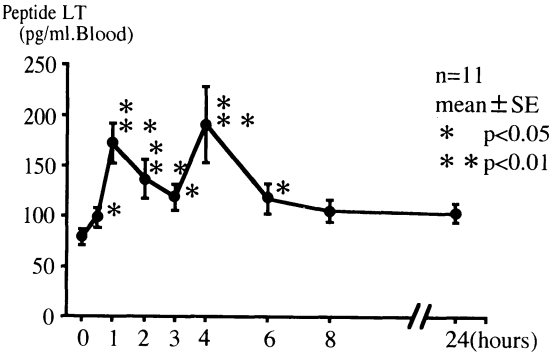

図1．抗原負荷後の Peptide LT の経時的変動（即時型）

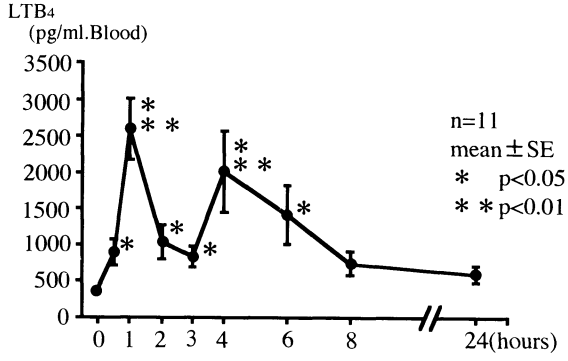

図3．抗原負荷後の LTB_4 の経時的変動(即時型)

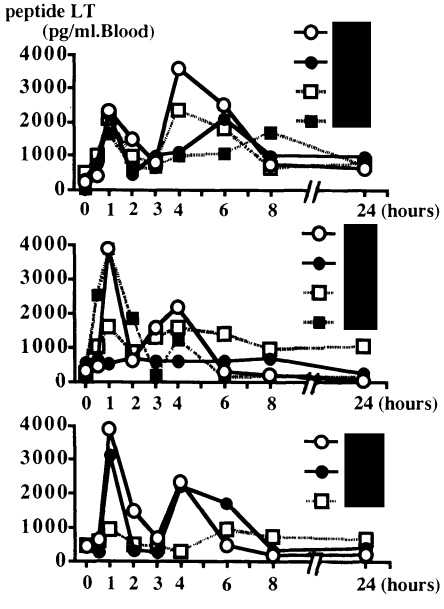

図2．各症例での Peptide LT の変動

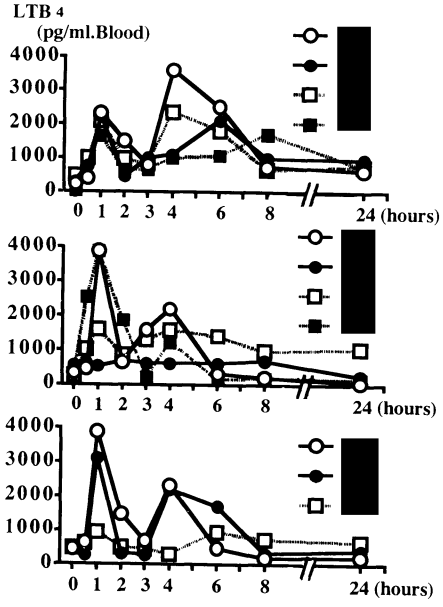

図4．各症例での LTB_4 の変動

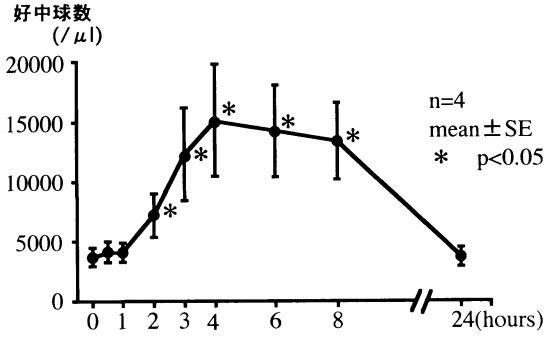

図5．抗原負荷後の好中球数の経時的変動(即時型)

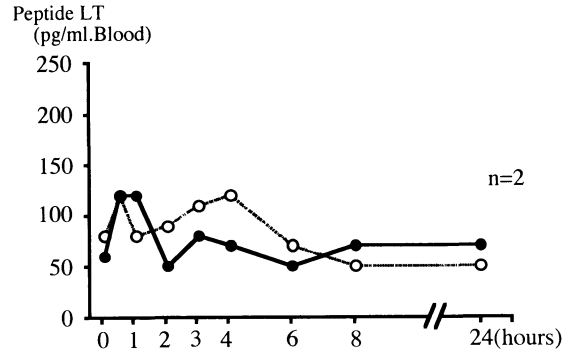

図6．抗原負荷後の Peptide LT の経時的変動
(遅発型)

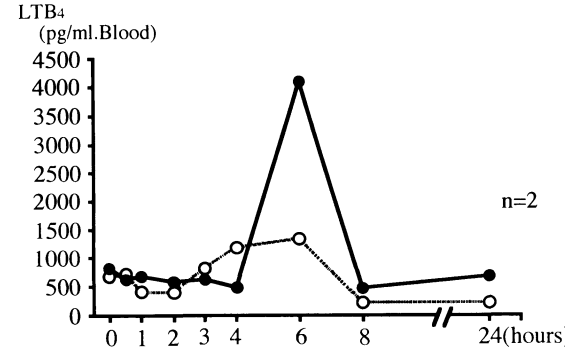

図7．抗原負荷後の LTB_4 の経時的変動(遅発型)

な上昇が認められ，もう1例では負荷前の80pg/ml.Bloodから，負荷後30分と負荷後4時間にそれぞれ120pg/ml.Bloodおよび120pg/ml.Bloodと二相性の軽度な上昇が認められた（図6）．また LTB_4 はそれぞれ負荷前の830および680pg/ml.Bloodから負荷後6時間のみに4100および1340pg/ml.Bloodと明かな上昇を認めた（図7）．誘発症状との関連は，LTが上昇し誘発症状の発現したと思われる負荷後8～24時間の間にはLTの測定を行っていないため，明らかにはできなかった．

血中好中球数は，負荷前の2300/mm^3 から負荷後30分で3300/mm^3 となっただけで，その後も明かな上昇はなかった（図8）．

考　案

食物アレルギーは多彩な誘発症状を呈し，時には呼吸器症状といった生命に関わる症状さえ示すことがある．しかし食物アレルギーの病態にはヒスタミンが関与しているといわれるものの，症状発現時と血漿ヒスタミン濃度のピークとは必ずしも同一ではなく，ヒスタミンだけでは説明できないことも多い．

LTは白血球の細胞膜中でアラキドン酸に5-リポキシゲナーゼが作用し生合成される3つの共役二重結合を持つ不飽和脂肪酸である．このうち LTB_4 は主として好中球，マクロファージなどから産生され，多核白血球の遊走，活性作用，軽度の血管透過性の亢進をもたらす．また LTC_4，D_4，E_4 は好酸球，マクロファージ，肥満細胞などから産生され，平滑筋の収縮，血管透過性の亢進，ヒスタミンの作用増強などを示す．これらはともにアレルギー性炎症に関与するケミカルメディエーターとして知られている[4]．しかしLTは極

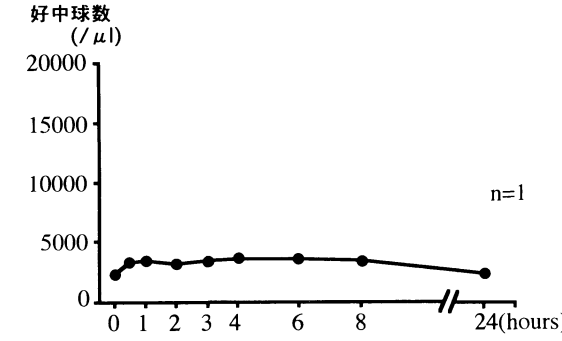

図8．抗原負荷後の好中球数の経時的変動(遅発型)

微量にしか産生されず，生体内での代謝は速やかで LTB_4 の83%が10分以内に代謝され，LTC_4 は約30分で50%が LTD_4 になり，約60分で全てが LTE_4 に代謝される[4]．さらに除蛋白，精製，抽出などの過程にかなりの時間を要するため，LTの測定は非常に困難であった．これは従来の方法が高速液体クロマトグラ

フィー（high performance liquid chromatography：HPLC）を用いて測定していた[5]ために，生体内で産生される微量なLTは感度以下となり測定できなかった．近年，免疫測定法（radioimmunoassay：RIA）が開発された[5-12]ことによって微量なLTの測定が可能となり，さらに最近ではより簡便で放射性元素を使用しない酵素免疫測定法（enzymeimmunoassay：EIA）が開発されている[13]．

そこで我々は食物アレルギー児に原因食物を負荷し，LTを経時的に測定することにより，LTがアレルギー症状出現にどのように関与しているかを検討した．

従来，即時型アレルギー反応の即時相にはヒスタミンが，遅発相にはLTが強く関与しているとされている．しかし以前に我々の教室の大塚ら[1]が報告したように，食物抗原負荷により血漿ヒスタミンは，誘発症状がピークを示した負荷後3時間前後に上昇を示し，症状発現早期には明かな上昇は認められない．

実際にアレルギー患者の末梢白血球を直接原因抗原で刺激した実験[14][15]で，ヒスタミンは30～45分後に遊離されてくる．このことは，ヒスタミンは誘発症状に強く関与しているが，症状発現の初期には他のケミカルメディエーターが関与していることが示唆される．またPeptide LTは10分後に遊離され，その後プラトーとなり，LTB_4は5分後に遊離され始め，40分後にピークとなる[14-16]．

気管支喘息における検討では，鈴木ら[17]は抗原吸入後に二相性の誘発症状を認めた群で，LTB_4が負荷後1時間と4時間に二相性に上昇したと報告し，岡田ら[18]は抗原吸入後に即時型の反応を認めた群と二相性の反応を認めた群でLTC_4が即時型反応出現時に上昇したと報告している．

また寺田ら[19]は鼻アレルギー患者を抗原刺激し，鼻腔洗浄液中のLTを経時的に測定し，誘発後10分と4時間以降にLTの増加を認めたことより，LTが鼻アレルギー症状の即時相，遅発相に関与しているのではないかと推測している．

しかしながら，食物アレルギーにおいてLTについて検討した報告は見あたらない．今回の我々の研究では，症状の発現時期とほぼ一致する負荷後1時間と症状のピークにやや遅れた負荷後4時間に二相性のPeptide LT，LTB_4の上昇を示した．このことは即時型反応ではPeptide LT，LTB_4がまず遊離され，初期の症状を誘発し，その後遊離されるヒスタミンにより，症状が増強され，またさらなるPeptide LT，LTB_4の上昇により，症状が遷延するのではないかと推測される．

また遅発型の誘発症状のみの症例では，Peptide LTは負荷後30分と3～4時間にわずかな上昇を認め，LTB_4は負荷後6時間のみに上昇を示した．このことは，遅発型のみの症状を呈する症例でも，即時型の誘発症状を起こさない程度に即時型のアレルギー反応は存在し，それにより各種臓器に遊走した好酸球や好中球などがPeptide LT，LTB_4などを産生するため症状が発現しているのではないかと考えられる．しかし今回の検討では負荷後8時間以降は24時間まで測定しておらず，遅発型の症状を呈する症例ではさらに検討の余地があると思われた．

またPeptide LT，LTB_4が二相性のピークを認めたことについては，今回の検討からは明らかにできないが，LT，LTB_4の第一のピーク後より好中球を中心とする血中の炎症細胞が徐々に上昇し始め，第二のピークとほぼ同時期にピークとなっていること，I型アレルギー反応の皮膚の組織像では即時型反応に続いて2～4時間以内に単核球と好酸球を中心とする炎症細胞の浸潤がみられることより次のことが考えられる．すなわち第一のピークは，消化管に存在する高親和性IgEレセプターを有するマクロファージ，肥満細胞などにより，あるいは血中の好酸球や好塩基球，単核球などにより産生放出され形成される．また第二のピークは，第一のピークにより増加した好中球などが標的臓器に遊走し，Peptide LT，LTB_4を産生放出することにより形成されるのではないかと予想される．

今後はさらに症例を重ねて，食物アレルギーにおけるPeptide LT，LTB_4の関与について検討を重ね，この二相性のピークに関与する産生細胞，産生臓器についても明らかにする必要があると考えられる．

本論文の要旨は，第44回日本アレルギー学会において発表した．

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜りました昭和大学医学部小児科学教室，奥山和男教授，有田昌彦助教授に深謝致します．

また血中ロイコトリエン測定にあたり，御指導，御協力いただきました昭和大学薬学部薬品分析化学教室，辻章夫教授ならびに岡本美智子さんに感謝致します．

文　献

1) Ohtsuka T., Matsumaru S., Uchida K., Onobori M., Matsumoto T., Kuwahata K., Arita M. : Time course of plasma histamine and tryptase following food challenges in children with suspected food allergy. Ann. Allergy 71, 139–146, 1993.

2) 腰原康子,磯野豊和：ラジオイムノアッセイ法による生体試料中の LTC_4 の測定. 炎症 5, 107–110, 1985.

3) 栗本文彦：ロイコトリエン. 日本臨床. 広範囲血液尿化学検査免疫学的検査（下巻） 48, 213–216, 1990.

4) 室田誠逸, 冨岡玖夫（編）：ロイコトリエンと病態. 医学書院, 1987.

5) 佐竹辰夫,信太隆夫（編）：アレルギー性疾患におけるケミカルメディエーター定量法の進歩. ライフサイエンス・メディカ, 1991.

6) Hayes, E.C., Lombardo, D.L., Girard, Y., Maycock, A.L., Rokach, J., Rosenthal, A.S., Yong, R.N., Egan, R.W., Zweerink, H.J. : Measering Leukotrienes of slow reacting substance of anaphylaxis : Development of a specific Radioimmunoassay. J. Immunol. 131, 429–433, 1983.

7) Lindgren, J.A., Hammarstrom, S., Goetzl, E.J.: A sensitive and specific radioimmunoassay for Leukotriene C_4. FEBS LETTER 152, 83–88, 1983.

8) Rokach, J., Hayes, E.C., Girard, Y., Lombardo, D.L., Maycock, A.L., Rosenthal, A.S., Young, R.N., Zamboni, R., Zweerink, H.J. : The development of sensitive and specific radioimmunoassay for Leukotrienes. Prostag. Leukot. Med. 13, 21–25, 1984.

9) Salmon, J.A., Simmons, P.M., Palmer, R.M.J.: A radioimmunoassay for Leukotriene B_4. Prostaglandins 24, 225–235, 1982.

10) Lewis, R.A., Mencia-Huerta, J.M., Soberman, R.J., Hoover, D., Marfat, A., Corey, E.J., Austen, K.F.: Radioimmunoassay for Leukotriene B_4. Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 7904–7908, 1982.

11) Beaubien, B.C., Tippins, J.R., Morris, H.R.,: Leukotriene biosynthesis and metabolism detected by the combined use of HPLC and radioimmunoassay. Bioche. Biophy. Res. Comm. 125, 97–104, 1984.

12) Poubelle, P.E., Borgeat, P., Pleszczynski, R.M.: Assessment of Leukotriene B_4 synthesis in human Lymphocytos by using High Performance Liquid Chromatographys and radioimmunoassay methods. J. Immunol. 139 : 1273–1277, 1984.

13) Ramis, I., Hotter, G., Rosello, C.J., Bulbna, O., Picado, C., Gelpi, E. : Application of totally automated on-line sample clean up system for extraction and high-performance liquid chromatgraphy separation of peptide leukotrienes. J. Pharm. Biomed. Anal. 11 : 1135–1139, 1993.

14) MacGlashan, Jr. D.W., Peters, S.P., Warner, J.W., Lichtenstein, L.M. : Characteristics of human basophil sulfidopeptide leukotriene release : Releasability defined as the ability of the basophil to respond to dimeric cross-links. J. Immunol. 136, 2231–2239, 1986.

15) 三田晴久, 油井泰雄, 安枝浩, 梶田俊行, 斎藤博士, 信太隆夫：喘息患者の末梢白血球からの抗原によるロイコトリエン C_4 とヒスタミンの遊離. 炎症 8, 141–145, 1988.

16) 木川芳春, 中井昭夫, 重松陽介, 須藤正克, 末広豊, 平尾敬男：末梢全血 Leukotriene 産生能の開発とその小児気管支喘息患者に対する応用について. アレルギー 38, 459–465, 1989.

17) 滝島任（編）：遅発型喘息の基礎と臨床. 文光堂, 1988.

18) 岡田哲朗, 足立満, 岡田陽子, 水野雅夫, 丸山繁, 高橋昭三, 前田昌子, 辻章夫：抗原吸入誘発試験における血中ケミカルメディエーターの変化について. 昭医会誌 48, 693–698, 1988.

19) 寺田修久, 安藤英樹, 伊藤永子, 杉山達朗, 吉野泰弘, 戸川 浩, 今野昭義, 寺田恵美：鼻アレルギーとロイコトリエン（第2報）抗原誘発後の鼻腔洗浄液におけるペプチドロイコトリエンおよび炎症細胞の経時的変化. 日耳鼻誌 92, 1337–1344, 1989.

TIME COURSE OF THE BLOOD LEUKOTRIENE FOLLOWING FOOD CHARENGES IN CHILDREN WITH FOOD ALLERGY

Shin' ichi Matsumaru
Department of pediatrics, Showa university school of medicine

We studied time course of the blood peptide LT, LTB_4 and the neutrophil count in blood following food challenge in children with food allergy. Of 13 challenges, 11 challenges induced immediate reactions. The mean blood peptide LT and LTB_4 levels rose significantly at 1 hour after challenge when immediate reactions began to appear. At 2 and 3 hours the levels decreased and they rose again at 4 hours when symptoms continued. The mean neutropil counts in blood began to rise significantly at 2 hours after challenge later than the first peak of LT level and showed the peak at 4 hours. Two challenges induced late reactions. Blood peptide LT levels slightly rose at 1 hour and 4 hours after challenge. Blood LTB_4 levels rose at 6 hours after challenge before late reactions began to appear. The neutropil counts in blood did not rise. This study suggests the elevation of LT may be associated with the appearance and duration of the allergic reaction.

(Accepted: May 12, 1995)