

成人気管支喘息患者における卵摂取試験後の IgG サブクラス 抗体および免疫複合体の変動

東京大学医学部物療内科

中川武正 吉野谷定美 高橋孝喜 宮本昭正

国立相模原病院臨床研究部

西村 浩 早川哲夫 信太隆夫

卵が原因食物と推定された成人気管支喘息症例において経口摂取誘発試験を実施した結果、5例中3例が喘鳴を呈して誘発陽性と判断された。誘発試験前後での血清中 ovalbumin 特異的 IgG サブクラス抗体および C1q 結合性免疫複合体の変動をあわせて検索したが、5例中1例において卵摂取15分後に血中 IgG 1 抗体の低下、免疫複合体の増加を認めた。本例では摂取8時間後に1秒量の低下をとまなう喘息症状を認めており、あたかもIII型アレルギー反応が症状発現に関与している印象をうけた。なお、卵アレルギーにおける IgG 4 抗体の役割に関してもあわせて言及した。

Key words: food allergy — immune complex — IgG subclass — ovalbumin

緒言

食物アレルギーは、乳幼児期アレルギー性疾患の成因として非常に重要な位置を占めているだけではなく、成人の気管支喘息の症状発現においても深く関与する場合があることが知られている。食物アレルギーによる臨床症状は極めて多彩であるが、その症状発現の時期から食物摂取後1時間以内に症状が発現する即時型の反応と、摂取後数時間して症状をみる遅発型の反応、そして摂取後1-3日以降出現する遅延型の反応に大別できる。そのおのおのがCoombs and Gell¹⁾のI, III, IV型アレルギー反応と対応する可能性があるが、従来の食物アレルギーに関する研究はI型アレルギー反応にのみ重点がおかれていて、後2者に対する検索は不十分であったといえよう。

我々は以前に卵アレルギーを有するアトピー患児の検索において、IgE 抗体が症状発現に重要な役割をはたすが、IgE 抗体が証明できない例ではIgG 1 および

IgG 4 抗体が高値を示しており、IgG 1 抗体が免疫複合体を形成して症状発現に関与する可能性を報告した²⁾。本研究ではその可能性をさらに追求し、食物アレルギーにおけるIII型アレルギー反応の位置付けを探る目的にて、卵が原因食物と推定された成人気管支喘息患者に経口摂取誘発試験を実施して、その後のIgG サブクラス抗体や免疫複合体 (immune complex: IC) の変動を観察し、興味ある知見を得たので報告する。

対象と方法

临床上、問診、卵による除去試験、経口誘発試験から卵が喘息症状の起因食物と推定された成人気管支喘息患者5例を対象とした。内訳は男3名、女2名、年齢は21-55歳であり、このうち症例S.I.のみ卵白に対するIgE 抗体陽性であった (Table 1)。

経口摂取試験は朝7時30分に下記に述べる検索を行って前値を得たあと、8時に全卵2コを摂取させた。以降、摂取15分、1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72時間後に体温、脈拍、血圧の測定、オートスパイロアナライザー (ASC 1000 型: 朝日メディカル) による努力性肺活量および1秒量の測定を行った。また、咳、痰、喘鳴、呼吸困難、口内しびれ感、腹痛、下痢、悪心、嘔吐、くしゃみ、鼻汁、鼻閉などの臨床症状を観察し、同時に採血を行った³⁾。抗喘息薬は特に制限をもうけ

Received: December 8, 1986

Accepted: March 5, 1987

Abbreviations: BSA bovine serum albumin; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay; HAG heat-aggregated IgG; IC immune complex; IgG S-TS IgG short-term sensitizing antibody; OA ovalbumin; PBS phosphate-buffered saline

Table 1 Clinical features of the asthmatic patients studied

	Sex	Age	Asthma	IgE (IU/ml)	Skin test	IgE RAST	Provocation
S. I.	M	42	Atopic	3000	HD, <i>Aspergillus</i> <i>Alternaria</i> etc.	HD(2)*, Egg White(3),	Positive
Y. N.	M	21	Atopic	1280	HD, <i>Candida</i>	HD(2)	Positive
S. K.	F	55	Infectious	50	<i>Candida</i> (±)	N.D.**	Positive
T. N.	M	42	Atopic	50	HD, <i>Aspergillus</i>	HD(1)	Negative
Y. K.	F	42	Infectious ?	236	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> (2)	Negative

*RAST score.

**Not done.

ず、従来のごとく常用量を服用させたが、誘発陽性判定の際に喘息発作の日内変動が問題となるため、これらの治療により喘息症状がコントロールされていたことは喘息日誌などにより確認をした。なお、この摂取試験の詳細は、著者の1人(H.N.)が別途に報告するはずであるので、ここでは割愛する。

これらの検体のうち、誘発後12時間までの血清が著者(T.N.)の教室で利用できたので、血清中の ovalbumin (OA) 特異的 IgG1 および IgG4 抗体価を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて、IC 価を C1q を用いた radioimmunoassay にて既報^{4)~8)}のごとく測定した。以下、その概要を述べる。

1) IgG 1, IgG 4 抗体価の測定

i) polyvinyl chloride microtiter plate (Dinatech, Alexandria, Va) の各 well に phosphate buffered-saline (PBS: 0.1M sodium phosphate, 0.15M sodium chloride, pH 7.2) にて $10\mu\text{g/ml}$ の濃度に溶解した ovalbumin (OA, Sigma) を $100\mu\text{l}$ ずつ注入し、 4°C にて overnight 静置した。その後、同バッファーにて3回洗浄し、次いで各 well に 1% bovine serum albumin (BSA) を加えた PBS (PBS-BSA) $200\mu\text{l}$ を加えて、 37°C にて1時間静置して、残存する付着部位を block した。

ii) PBS にて再洗浄後、PBS-BSA にて20倍に希釈した被検血清を各 well に $100\mu\text{l}$ ずつ注入し、 37°C で2時間 incubate した。

iii) 再洗浄後、PBS-BSA で希釈したヒツジ抗ヒト IgG 1 抗体 (ベルン大学, 1:500) もしくはマウスモノクローナル抗ヒト IgG 4 抗体 (ヤマサ醤油研究所, 1:1000) を各 well に $100\mu\text{l}$ ずつ注入し、 4°C で overnight incubate した。

iv) 再洗浄後、PBS-BSA で10000倍に希釈した peroxidase 標識抗ヒツジ IgG もしくは抗マウス IgG 抗

体 (Cappel Lab.) を各 well に $100\mu\text{l}$ ずつ注入し、 37°C 1時間 incubate した。

v) 再洗浄後、substrate として O-phenylenediamine 溶液を各 well に $100\mu\text{l}$ ずつ注入し、室温で1時間 incubate した。

vi) 次いで、 $4\text{N H}_2\text{SO}_4$ を $100\mu\text{l}$ ずつ各 well に追加流入して反応を停止させた後、automated microtiter plate reader (MTP-12, Corona Electric, 東京) にて各 well の 500nm における吸光度を測定した。それぞれの被検血清は duplicate にて測定し、その平均値より background をさしひいて、 OD_{500} としてその抗体価を表した。なお、全ての assay は同一実験下に行ったが、本法の intraassay experimental error は、5%以下であった。

2) 免疫複合体の測定

i) プラスチックチューブ ($12\times 75\text{mm}$, 塩野義製薬) に PBS にて $2.5\mu\text{g/ml}$ の濃度に溶解した C1q を $500\mu\text{l}$ 注入し、 4°C にて overnight 静置した。翌朝吸引し、1%BSA を加えた PBS-EDTA を 1ml 加えて 4°C にて1時間静置して、残存する付着部位を block した。

ii) PBS-EDTA にて3回洗浄後 PBS-EDTA-BSA にて50倍に希釈した被検血清もしくは heat aggregated IgG (HAG) を $500\mu\text{l}$ ずつ注入し、室温で3時間反応させた。

iii) 再洗浄後、 ^{125}I -ウサギ F(ab')₂-抗ヒト Fc 抗体 ($2\mu\text{g/ml}$) を $500\mu\text{l}$ ずつ注入し、室温で1時間反応させた。

iv) 再洗浄後、ガンマカウンター (Aloka) にて放射活性を測定した。それぞれの検体は duplicate にて測定し、その平均値より background 値をさしひいて、HAG による standard curve より求めた HAG 換算値 ($\mu\text{g/ml}$) にて IC 価をあらわした。なお、全ての assay

は同一実験下で行ったが、この検索における健康成人15例での測定平均値は、 $23.2 \pm 7.7 \mu\text{g}$ であり、 $38.6 \mu\text{g}$ (mean+2SD) 以上がIC陽性と判断された。また intraassay experimental error は5%以下であった。

成績

今回、卵摂取試験を実施した5症例の試験前後での1秒量、ovalbumin 特異的 IgG 4 抗体・IgG 1 抗体価

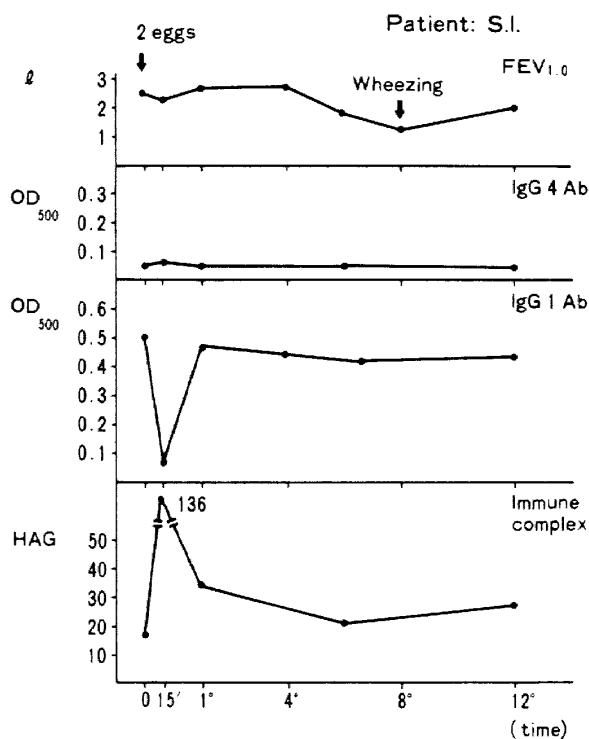


Fig. 1-a.

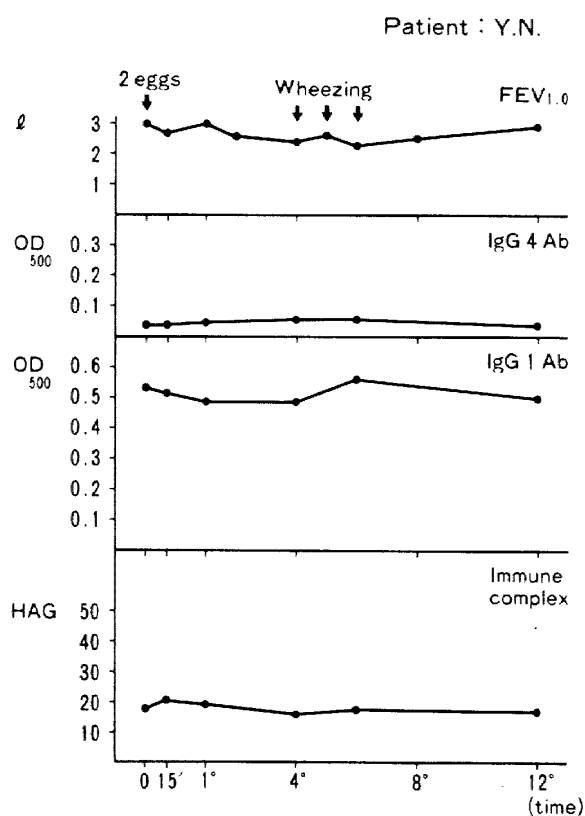


Fig. 1-b.

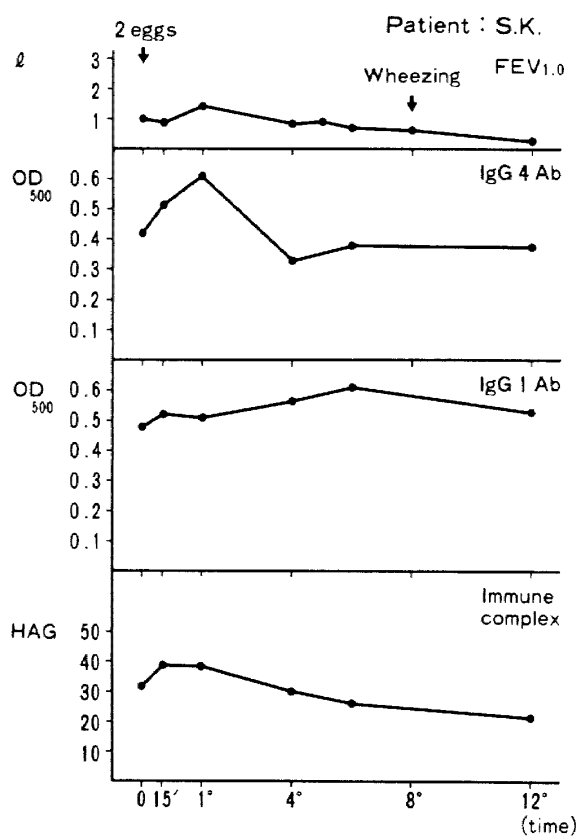


Fig. 1-c.

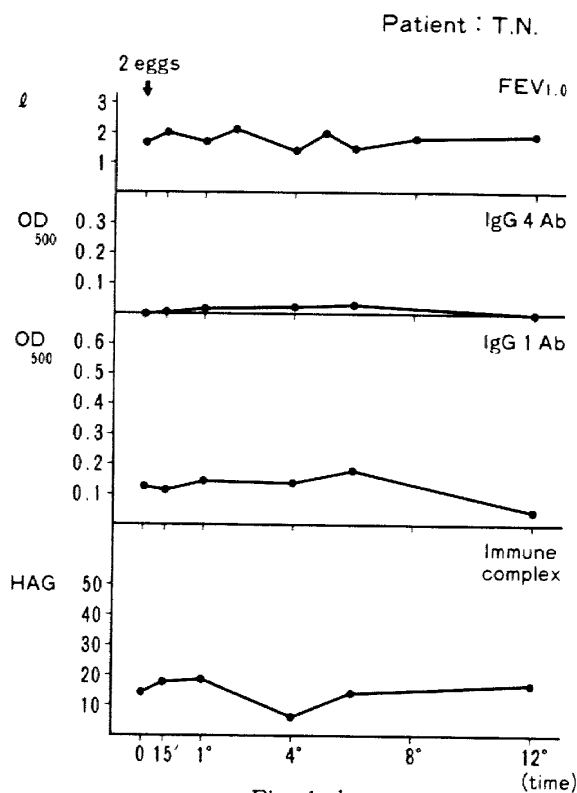


Fig. 1-d.

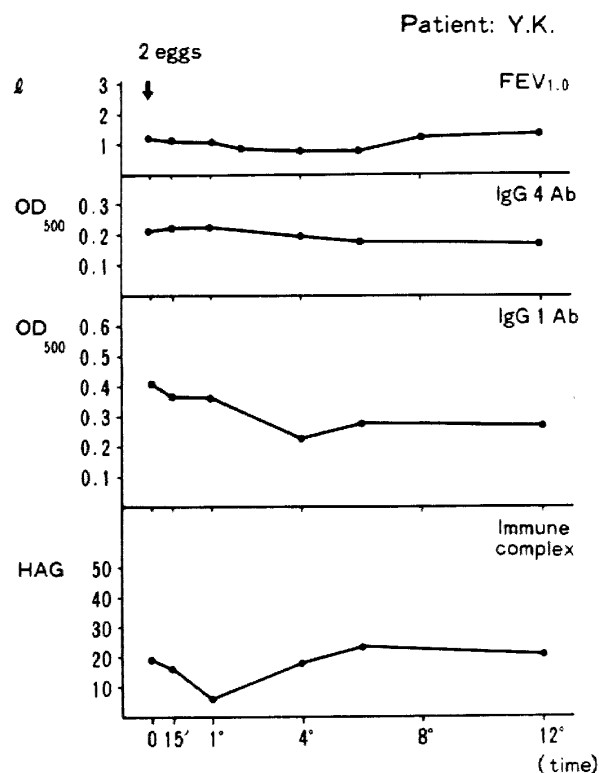


Fig. 1-e.

Fig. 1 a-e. Changes of FEV_{1.0} (upper panel), ovalbumin-specific IgG subclass antibodies (middle panel) and immune complexes (lower panel) following oral provocation tests in 5 adult asthmatic patients.

およびC1q結合性免疫複合体の変動をFig. 1a-eに示す。このうち、症例S.I., Y.N., S.K.が喘鳴(図中↓印で示す)を生じて誘発陽性であったが、症例T.N., Y.K.は誘発陰性であった。以下、個々の症例における誘発試験の成績の概要を述べる。

1) 症例S.I.

全卵2コ摂取15分後に血清中のIgG 1抗体は著明な低下を示し、それと対応して血清中ICは著明な増加を認めた。この変化は1時間後には前値に近いレベルまで復した。摂取後6-8時間後に1秒量の低下を認め、喘鳴も聴取された。本症例は卵白特異的IgE抗体陽性であり、IgG 4抗体が低値であったことは注目に値する。

2) 症例Y.N.

全卵摂取4-6時間後に喘鳴を生じて誘発陽性であり、1秒量も前値に比して20%程度の低下を認めた。本症例ではIgG 4抗体は低値であったが、IgG 1抗体の低下やICの増加といった変化は認めなかった。

3) 症例S.K.

全卵摂取後6-12時間にかけて1秒量の低下を認め喘鳴も生じて、誘発陽性と判断された。本症例ではIgG 1, IgG 4抗体の双方が比較的高値を示した。生卵摂取1時間後までIgG 4抗体は増加し、4時間後に低下した。IgG 1抗体やICには著明な変化を認めなかった。

4) 症例T.N.

全卵摂取後1秒量もさほど変化せず誘発陰性と判断された。本症例ではIgG 4抗体低値であったが、IgG 1抗体やICには著明な変化は認めなかった。

5) 症例Y.K.

本症例も誘発陰性であった。IgG 1抗体は卵摂取後低下したもののそれに対応するICの増加は明らかではなかった。IgG 4抗体は血中にdetectできたものの、著明な変動は認められなかった。

考 案

食物アレルゲンによって惹起される臨床症状は極めて多彩であり、病因論的にはCoombs and Gell⁹⁾のI, III, IV型アレルギー反応がそれぞれ単独に、あるいは複雑に絡みあって発症に関与しているものと考えられる。本研究ではIII型すなわち免疫複合体が関与するアレルギー反応の位置付けを探る目的で、5例の成人気管支喘息患者において卵摂取試験を実施し、その前後でのOA特異的IgG 1, IgG 4抗体およびICの変動を検討したが、5例中1例において摂取15分後に血中IgG 1抗体が低下し、ICが著増することを認めた。本症例では摂取8時間後に喘息症状が出現し、時間という面からみてもいわゆるIII型アレルギー反応によって症状が発現した印象をうけた。しかし、その詳細な因果関係は不明であり、ただ1回の検索結果であるので断定的な結論はさしひかえたいが、C1qがIgG 1, 2, 3サブクラスとのみ反応する⁹⁾ことからみても興味ある知見と考える。なお、卵摂取15分後のIgG 1抗体の低下はおそらくは口腔粘膜などからのすみやかなアレルゲン吸収にもとづくものであろう。梶沢ら¹⁰⁾らは卵アレルギー患児において卵摂取数分後の症状発現ならびにアレルギー患児の父親での摂取1時間後のWalzer反応を報告している。

他の4例においては、このようなIgG 1抗体やICの変化は認められなかった。個々の症例によって差異は

あるものの、一般に IgG 1 抗体が高値の場合には症状が発現しやすい傾向を認めた。また、IgG 4 抗体については IgG 1 抗体と共存する時には、IgG 4 抗体の方が main に反応する症例（症例 S.K.）も存在した。

著者らは先に成人気管支喘息患者における OA 特異的 IgG サブクラス抗体を検索したが、その折認められた卵アレルギーの 1 例は IgE 抗体陽性であり、IgG 4 抗体はきわめて低値であった¹¹⁾。OA 特異的 IgG 4 抗体は、著者らが検索した範囲では、全年齢層において高、低に幅広く分布し²⁾¹¹⁾、あるいは人間は OA に対する high responder と low responder とにわけることができるのかもしれない。一方、IgG 1 抗体は一般に年齢が長じるにつれて低下するが、卵アレルギー患児においては比較的高値を示す²⁾。向山らの報告においても、卵アレルギー患児と非卵アレルギー・アトピー児との間には、OA 特異的 IgG 4 抗体には差はなく OA 特異的 IgG 抗体には有意の差があり⁶⁾、これは IgG 1 抗体の存在にもとづくものであろうと考えられる。これらの結果を総合すると、卵アレルギーの症状発現には IgE 抗体および IgG 1 抗体が関与しており、IgG 4 抗体はむしろ阻止抗体 (blocking antibody) として症状発現を抑制する方向に働くのではなかろうか¹²⁾。この推定は、ダニ抗原に過敏な喘息症例において IgG 1 抗体は遅発型反応の発現に関与し⁹⁾、IgG 4 抗体は減感作療法によって増加して阻止抗体と関連するという報告¹³⁾¹⁴⁾と一致するものである。食物アレルギーにおける IgG 抗体や IC の役割に関しては若干の報告があるが、なかでも Dannaeus ら^{15)~17)}は OA に対する血清中 IgG 抗体の存在を証明し、OA による経口 challenge によって IgG 抗体が減少するだけではなく、OA を含んだ IC が増加すると述べている。今回の筆者らの報告も Dannaeus らの報告と一部合致するものと考えられるが、いずれにせよ、食物アレルギーにおける IgG サブクラス抗体の役割の解明にはさらなる詳細な研究が必要であることは疑いのないところである。なお、食物による challenge で、IgG 抗体だけでなく IgE 抗体が関与する IC も変動することが報告¹⁸⁾されており、抗アレルギー剤によってその変動が阻止できるとされている。本報告のような IgG サブクラス抗体や IC の変動をみる試験も、食物アレルギーにおける抗アレルギー剤の有用性を評価する手段となり得る可能性がある。

最後に、IgG サブクラス抗体を論じる時には Parish¹⁹⁾の提唱した IgG short-term sensitizing anti-

body (IgG S-TS) との異同が問題となるが、IgG S-TS はもともとアレルゲン存在下に補体を結合する heat-stable な IgG 抗体として記載されたものであり、そのものが IgG 1 抗体である可能性が強いと考える。

結 語

卵が原因食物と推定された成人気管支喘息症例において経口摂取誘発試験を実施した結果、5 例中 3 例が喘鳴を呈して誘発陽性と判断された。そのうちの 1 例においては卵摂取 15 分後に血中 IgG 1 抗体の低下、免疫複合体の増加を、8 時間後に喘鳴を認めて、あたかも III 型アレルギー反応が症状発現に関与している印象をうけた。

本研究に御協力頂いた東京大学医学部物療内科、猪巻恵美嬢、小野沢薫子嬢に感謝いたします。なお、本研究の一部は文部省特定研究 (1) 「食品機能の系統的展開と解析」によって support されたものであり、ここに感謝の意を表します。

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" (Eds. by P.G. H. Gell, R.R.A. Coombs and P.J. Lachmann), Blackwell Scientific Pub., Oxford, pp.761-761, 1972.
- 2) Nakagawa, T., Mukoyama, T., Baba, M., Sakai, Y., Yamashita, N. and Miyamoto, T.: Egg white-specific IgE and IgG4 antibodies in atopic children. *Ann. Allergy* 57, 359-362, 1986.
- 3) 西村 浩, 相馬幸子, 安枝 浩, 山田哲夫, 信太隆夫: 成人気管支喘息における卵摂取試験と DSCG 内服薬 (ナルクロム) の効果. アレルギー 33, 753-753(抄録), 1984.
- 4) 中川武正, 高石敏昭, 宮本昭正, 杉 正人, 石毛雅夫: モノクローナル抗ヒト IgG 4 抗体の作製とその enzyme-linked immunosorbent assay への応用. アレルギー 34, 277-283, 1985.
- 5) Ito, K., Kudo, K., Okudaira, H., Yoshinoya, S., Morita, Y., Nakagawa, T., et al.: IgG1 antibodies to house dust mite (*Dermatophagoides*

- farinae*) and late asthmatic response. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 81, 69-74, 1986.
- 6) 向山徳子, 市川邦男, 馬場 実, 中川武正, 宮本昭正: 小児アトピー性疾患におけるダニ抗原 (*Dermatophagoides pteronyssinus*) および卵白抗原に対する特異 IgE, IgG, IgG 4 抗体について, アレルギー 35, 166-170, 1986.
 - 7) Yoshinoya, S. and Pope, R.M.: Detection of immune complexes in acute rheumatic fever and their relationship to HLA-B5. *J. Clin. Invest.* 65, 136-145, 1980.
 - 8) Nakagawa, T., Yoshinoya, S., Sakamoto, Y., Ito, K. and Miyamoto, T.: Circulating immune complexes in patients with house-dust-mite-sensitive bronchial asthma. *Clin. Allergy* 14, 129-138, 1984.
 - 9) 山下直美, 中川武正: アレルギー性疾患における IgG サブクラスの意義. アレルギーの臨床 6, 680-683, 1986.
 - 10) 柁沢靖弘, 村田英雄, 斉藤喜親: 卵アレルギーの 2 症例, 小児科診療 39, 1247-1251, 1976.
 - 11) 中川武正: 食物アレルギーの臨床, 内科. 食物アレルギーをめぐって(宮本昭正, 長野 準, 小林節雄, 中島重徳 編), メディカルトリビューン, 東京, pp. 84-95, 1986.
 - 12) Nakagawa, T.: Egg white-specific IgE and IgG subclass antibodies and their associations with clinical egg hypersensitivity. In "Proceedings of the International Symposium of Clinical Immunology and the Role of IgG4" (ed. by G.M. Halpern and E.M. Gershwin), 1987. (in press)
 - 13) Nakagawa, T., Takaishi, T., Sakamoto, Y., Ito, K., Miyamoto, T. and Skvaril, F.: IgG4 antibodies in patients with house-dust-mite sensitive bronchial asthma: Relationship with antigen specific immunotherapy. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 71, 122-125, 1983.
 - 14) Nakagawa, T.: IgG subclass changes in response to desensitization. *Monogr. Allergy* 19, 253-261, 1986.
 - 15) Danneaus, A., Johansson, S.G.O., Foucard, T. and Öhman, S.: Clinical and immunological aspects of food allergy in childhood. I. Estimation of IgG, IgA and IgE antibodies to food antigens in children with food allergy and atopic dermatitis. *Acta Paediatr. Scand.* 66, 31-37, 1977.
 - 16) Danneaus, A., Inganäs, M., Johansson, S.G.O. and Foucard, T.: Intestinal uptake of ovalbumin in malabsorption and food allergy in relation to serum IgG antibody and orally administered sodium cromoglycate. *Clin. Allergy* 9, 263-270, 1979.
 - 17) Inganäs, M., Johansson, S.G.O. and Danneaus, A.: A method for estimation of circulating immune complexes after oral challenge with ovalbumin. *Clin. Allergy* 10, 293-302, 1980.
 - 18) Brostoff, J., Carini, C., Wraith, D.G. and Johns, P.: Production of IgE complex by allergen challenge in atopic patients and the effect of sodium cromoglycate. *Lancet* 1, 1268-1270, 1979.
 - 19) Parish, W.E.: Short-term anaphylactic IgG antibodies in human sera. *Lancet* 2, 591-592, 1970.

CHANGES IN IMMUNE COMPLEXES AND IgG SUBCLASS ANTIBODIES FOLLOWING ORAL PROVOCATION TESTS IN EGG-SENSITIVE ADULT ASTHMATIC PATIENTS

Takemasa Nakagawa, Sadayoshi Yoshinoya, Koki Takahashi
and Terumasa Miyamoto

Department of Medicine and Physical Therapy, School of Medicine, University of Tokyo

Hiroshi Nishimura, Tetsuo Hayakawa and Takao Shida

Clinical Research Center for Allergy, National Sagamihara Hospital

Oral provocation tests were performed on 5 adult asthmatic patients, determined to be egg-sensitive on the basis of clinical history, elimination and/or provocation diet. Three out of 5 patients produced asthmatic symptoms with decrease of FEV_{1.0} upon challenge, and were judged to be provocation-positive. Changes in C1q-binding immune complexes and ovalbumin-specific IgG subclass antibody levels were also evaluated in sera before and after provocation tests. One patient showed decrease of IgG1 antibodies together with increase in immune complexes 15 minutes after ingestion of eggs, followed by wheezing with decrease of FEV_{1.0} 8 hours thereafter. It was speculated that the type III allergic reaction, defined by Coombs and Gell, might have been responsible for clinical manifestations in this case.