

卵白 IgE RAST 陽性アレルギー患児末梢血単核細胞における B 細胞刺激因子活性産生能について

東邦大学医学部第二小児科

諸井 孝

卵白 IgE RAST 陽性アレルギー患児の IgE 抗体産生にインターロイキン 4 (interleukin 4: IL-4) が関与しているかどうかをみる目的で今回はまず、末梢血単核細胞からの B 細胞刺激因子活性産生能を検討した。卵白 IgE RAST 陽性アレルギー患児の OVA 刺激時末梢血単核細胞からの B 細胞刺激因子活性産生能とアレルギー諸因子 (年齢, IgE RIST 値, 卵白 IgE RAST 値, 卵白 IgG₄ 抗体値) の間には関連が認められなかった。以上より、卵白 IgE RAST 陽性アレルギー患児のリンパ球は、卵白抗原刺激で IL-4 と考えられる B 細胞刺激因子を産生し、そのことが患児における IgE 抗体産生の一因となっていることが予想されたが、また、IL-4 以外の因子が B 細胞増殖刺激に関与している可能性も示唆する。いずれにしても今回示した方法は、新しい食物アレルギーの検索法として評価されうと思われる。

Key words: IL-4 — IgE RAST — IgE RIST — IgE₄ antibody — ovalbumin

緒 言

近年、Coffman ら¹⁾は、インターロイキン 4 (interleukin 4: IL-4) が、IgE 抗体産生に関与していると報告している。IL-4 はヘルパー T 細胞より産生分泌され、また B 細胞に作用し、IgE 抗体産生を促し、B 細胞上に IgE-Fc receptor を発現させることが考えられている²⁾。アレルギー疾患、特にダニ抗原に感作された気管支喘息患児の末梢血単核細胞を *Dermatophagoides farinae* (D.f.) で刺激した際の IL-4 産生についての研究は、同教室の斎藤ら³⁾が既に報告している。

今回、著者は、卵白 IgE RAST 陽性アレルギー患児の IgE 抗体産生に IL-4 が関与しているかを調べる目的で、末梢血単核細胞からの IL-4 様 B 細胞刺激因子活性産生能を検討したので報告する。

対象および方法

1. 対象

対象は、東邦大学医学部第 2 小児科アレルギー外来受診中の患児 27 名と健康成人 7 名である。アレルギー疾患を有する 27 名のうち、卵白 IgE RAST 陽性者 10 名、陰性者 17 名である。卵白 IgE RAST 陽性とは、radio-allergosorbent test (RAST) 法で 0.7 PRU/ml 以上をさす。卵白 IgE RAST 陽性者 10 名の内訳は、気管支喘息 6 名、アトピー性皮膚炎 2 名、気管支喘息とアトピー性皮膚炎の両方を有する者 2 名である。性別は男子 19 名、女子 15 名である。年齢は 1 歳 5 カ月から 48 歳である (Table 1)。

2. 方法

ヘパリン加末梢血から、Ficoll-Hypaque 比重遠心法により単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) を採取し⁴⁾、96 穴マイクロプレートに 5×10^5 /well の単核細胞を入れ、10 μ g/ml ovalbumin (OVA: Sigma) または phytohemagglutinin (PHA: Wellcome Research Laboratories) を 800 倍希釈で添加し、10% ウシ胎仔血清 (fetal calf serum: FCS) 加 RPMI1640 培養液にて、37°C 5% CO₂ 下にて 3 日間培養し、上清を凍結保存 (-80°C) した。次に、高比重 B 細胞は抗原刺激を受けた際 BSF-1 (IL-4) 存在下にお

Received: July 18, 1990

Accepted: January 11, 1991

Abbreviations: AET 2-aminoethyl isothiuronium bromide; D.f. *Dermatophagoides farinae*; FCS fetal calf serum; IL-2 interleukin-2; IL-4 interleukin-4; OVA ovalbumin; PBMC peripheral blood mononuclear cells; PBS phosphate buffered saline; RAST radioallergosorbent test; RIST radioimmunosorbent test; S.I. stimulation index; SRBC sheep red blood cells

Table 1 Subject

Group		Number	Sex		Age	Diagnosis		
			Male	Female		BA	AD	BA+AD
Healthy adults		7	3	4	18y~48y	0	0	0
Allergic children	Positive IgE RAST score to egg white	10	7	3	1y5M~14y	6	2	2
	Negative IgE RAST score to egg white	17	9	8	1y5M~16y	8	4	5
Total		34	19	15	1y5M~48y	14	6	7

BA : Bronchial asthma AD : Atopic dermatitis

いてのみ増殖反応を示すという事実⁵⁾を基に以下の方法より IL-4様 B 細胞刺激因子活性産生能を測定した。まず健康成人のヘパリン加末梢血から、Ficoll-Hypaque 比重遠心法にて、単核細胞を採取し⁴⁾、2-aminoethyl isothiuronium bromide hydromide (AET) 処理したヒツジ赤血球で2回ロゼット形成を行い、non-rosette-forming cell (non-RFC) に富んだ分画を得た⁵⁾。更にペトリ皿へ2回付着させ、付着細胞を除去し、パーコル不連続密度勾配法を用い、2500回転、4℃20分にて、高比重 B 細胞分画(パーコル濃度60~70%)を得た⁶⁾。高比重 B 細胞 5×10^4 /well に抗ヒト IgM 抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ 、OVA 刺激培養上清 $40 \mu\text{l}$ 、10% FCS を含む RPMI1640 培養液を入れ全量 $200 \mu\text{l}$ とし、37℃ 5%CO₂ 下で4日間培養した。培養終了4時間前に³H-thymidine を $1 \mu\text{Ci}$ 添加し、シンチレーションカウンタにてカウントした。また、recombinant IL-4(Genzyme 社)を OVA 刺激リンパ球の培養上清の代わりに添加し、比較し測定を行った(Fig. 1)。その結果、IL-4様 B 細胞刺激因子活性能を stimulation index (S.I.) で検討した。計算式は下記のとおりである。

$$\text{S.I.} = \frac{\text{cpm of (PBMC+OVA 培養上清)}}{\text{cpm of (PBMC only)}}$$

なお、統計学的処理は、Student-t 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1) 健康成人、卵白 IgE RAST 陰性アレルギー患児及び卵白 IgE RAST 陽性アレルギー患児各群の OVA 刺激時の末梢血単核細胞から IL-4様 B 細胞刺激因子活性産生能の比較検討

Peripheral blood mononuclear cells

↓ Incubation in dishes for 2 hrs in 37℃
↓ Rosette formation with SRBC treated with AET

Non-rosette forming cells (non-RFC)

↓ Rosette formation with SRBC treated with AET

Non-RFC

↓ Incubation in dishes for 2 hrs in 37℃

B cells

↓ Centrifugation with Percoll discontinuous density gradient fluid

High density B cells

↓ Culture for 4 days (anti IgM antibodies, ※ sample)

↓ Addition of ³H-thymidine for 4 hrs supernatant fluids for 4 hrs

Count

※ Samples : culture supernatants of peripheral blood mononuclear cells incubated for 72 hrs with or without OVA and PHA

SRBC : sheep red blood cell

AET : 2-aminoethyl isothiuronium bromide hydromide

OVA : ovalbumin

PHA : phytohemagglutinin

Fig. 1. Method for measurement of B cell stimulating activity.

上記3群の IL-4様 B 細胞刺激因子活性産生能を比較すると卵白 IgE RAST 陽性アレルギー患児の IL-4様 B 細胞刺激因子活性産生能の平均値は、他の2群の値に比し、高値を示した。また、卵白 IgE RAST 陽性アレルギー患児の IL-4様 B 細胞刺激因子活性産生能は、健康成人のそれに比し、有意に高値を示した($p < 0.05$) (Fig. 2)。

2) 卵白 IgE RAST 陽性アレルギー患児における OVA 刺激時末梢血単核細胞からの IL-4様 B 細胞刺激因子活性産生能と年齢との関係

OVA 刺激時末梢血単核細胞からの IL-4様 B 細胞刺

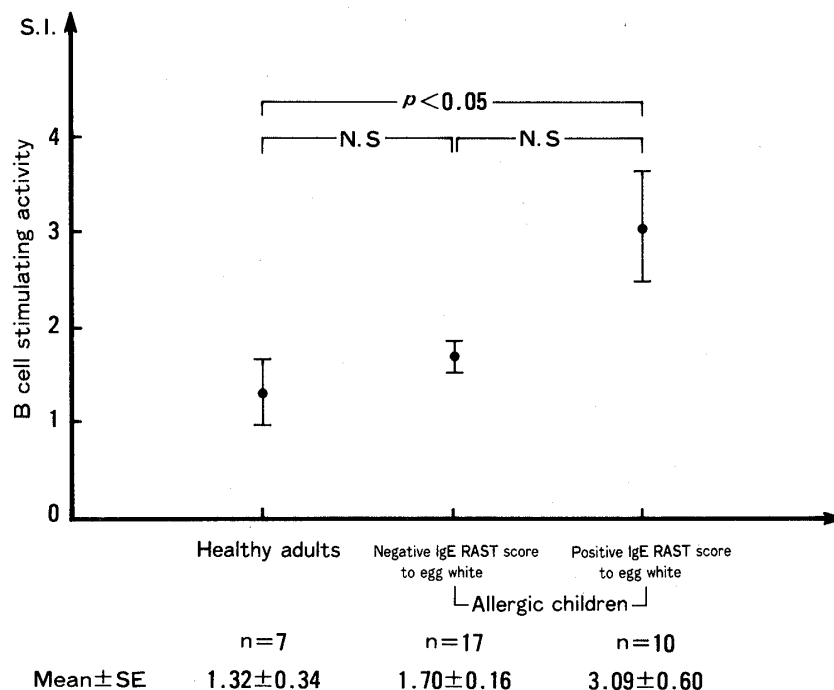


Fig. 2. B cell stimulating activity of the culture fluid of the lymphocytes from healthy adults and allergic children stimulated with OVA.

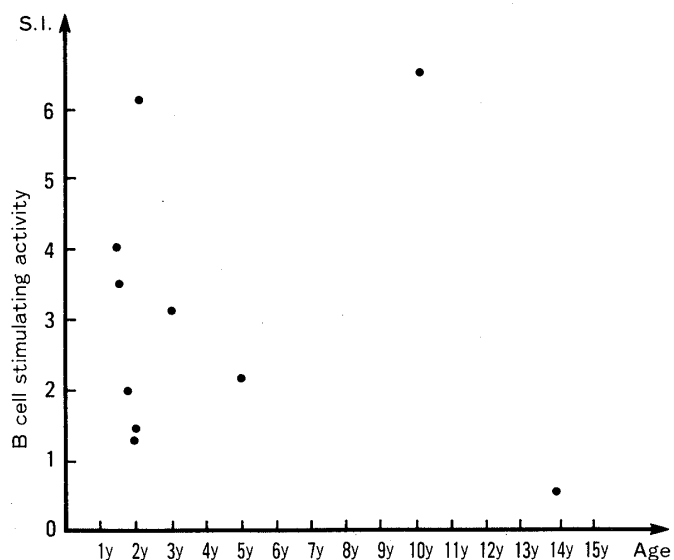


Fig. 3. Relationship between B cell stimulating activity and age. (n=10)

刺激因子活性産生能と年齢の間には、相関関係は認められなかった (Fig. 3). また、2歳ごとに年齢区分し、3群で比較してみたが、2歳から3歳11カ月の群は、他の2群に比し、IL-4様B細胞刺激因子活性産生能は有意差はなかったが、平均値は高値を示した (Fig. 4).

3) 卵白IgE RAST陽性アレルギー患児におけるOVA刺激時末梢血単核細胞からのIL-4様B細胞刺激

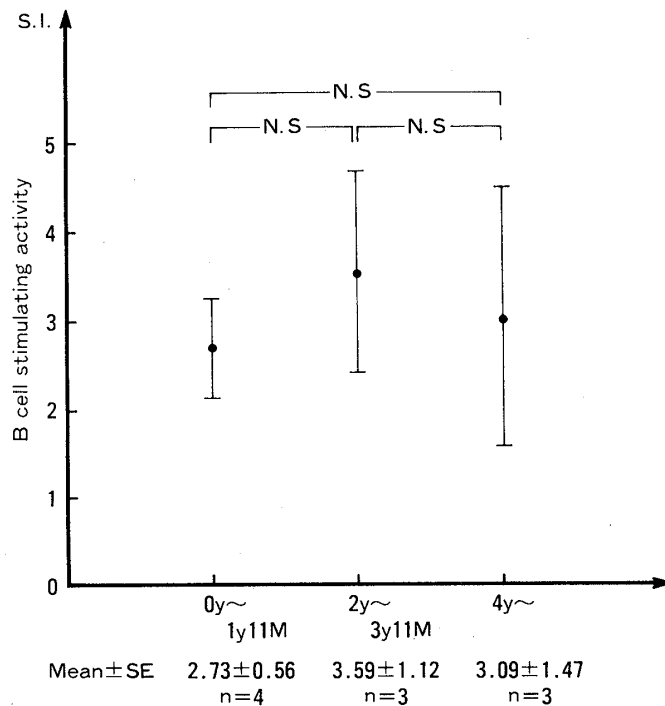


Fig. 4. Change of B cell stimulating activity by age.

因子活性産生能とIgE RAST値との関係

OVA刺激時末梢血単核細胞からのIL-4様B細胞刺激因子活性産生能とIgE RAST値の間には、相関関

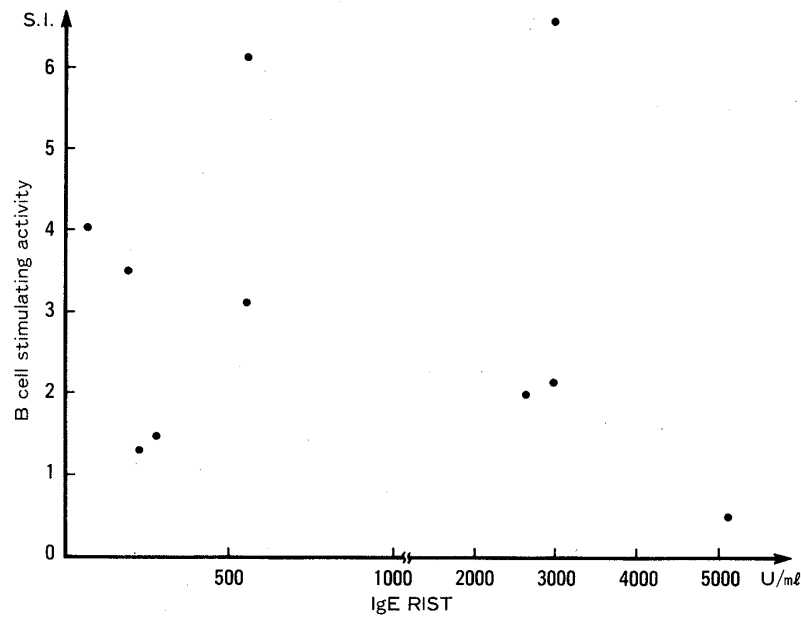


Fig. 5. Relationship between B cell stimulating activity and IgE RIST.
(n=10)

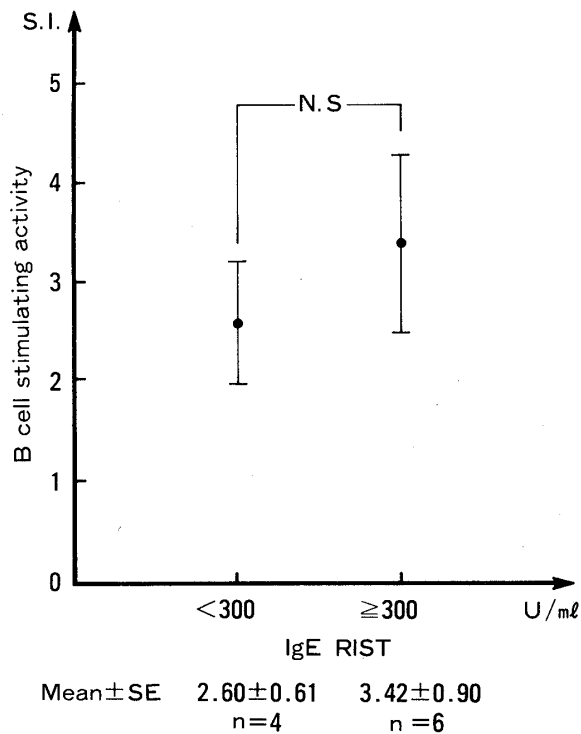


Fig. 6. Comparison of B cell stimulating activity by classification of IgE RIST.

係は認められなかった (Fig. 5). また, IgE RIST 値が300U/ml 未満の者 (n=4) と300U/ml 以上の者 (n=6) の2群に分類し, 各々の末梢血単核細胞からの IL-4様 B細胞刺激因子活性産生能を比較したところ, 有

意差は認められなかったが, IgE RIST 値300U/ml 以上の群は, 300U/ml 未満の群に比し, 平均値が高値を示した (Fig. 6).

4) 卵白 IgE RAST 陽性アレルギー患児における OVA 刺激時末梢血単核細胞からの IL-4様 B細胞刺激因子活性産生能と卵白 IgE RAST 値との関係

OVA 刺激時末梢血単核細胞からの IL-4様 B細胞刺激因子活性産生能と卵白 IgE RAST 値の間には, 相関関係は認められなかった (Fig. 7).

5) 卵白 IgE RAST 陽性アレルギー患児における OVA 刺激時末梢血単核細胞からの IL-4様 B細胞刺激因子活性産生能と卵白 IgG₄抗体値との関係

OVA 刺激時末梢血単核細胞からの IL-4様 B細胞刺激因子活性産生能と卵白 IgG₄抗体値の間には, 相関関係は認められなかった (Fig. 8).

考 案

最近, 小児科領域のアレルギー疾患の中で特に, 気管支喘息やアトピー性皮膚炎についての免疫学的研究, すなわち, インターロイキン2 (interleukin 2: IL-2), IL-4についての研究⁷⁾⁻¹⁶⁾が盛んになってきた。IL-4については, 1980年代に入り, Howard ら⁵⁾がレクチン刺激を受けた T細胞上清中に抗 IgM 抗体存在下

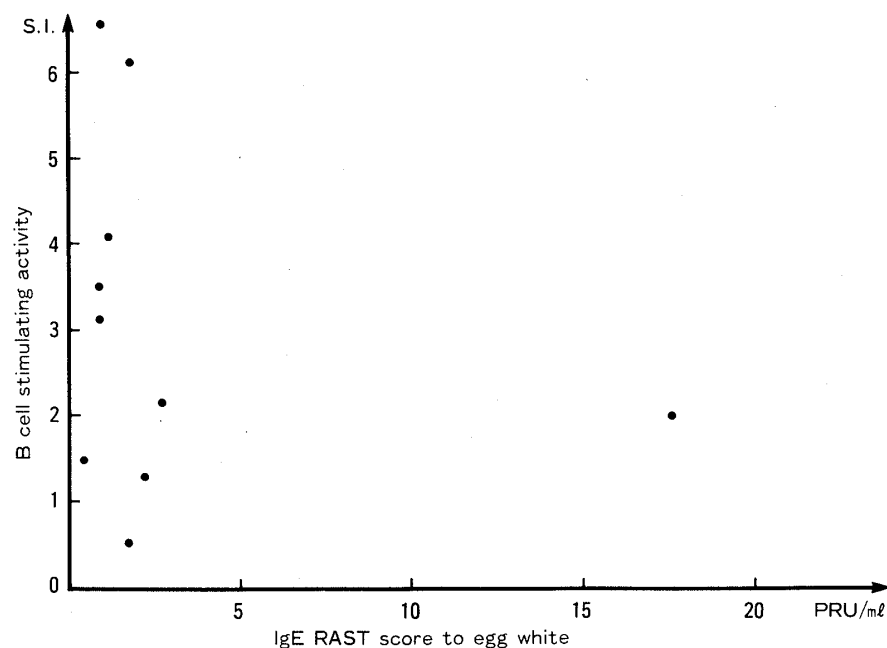


Fig. 7. Relationship between B cell stimulating activity and IgE RAST score to egg white. (n=10)

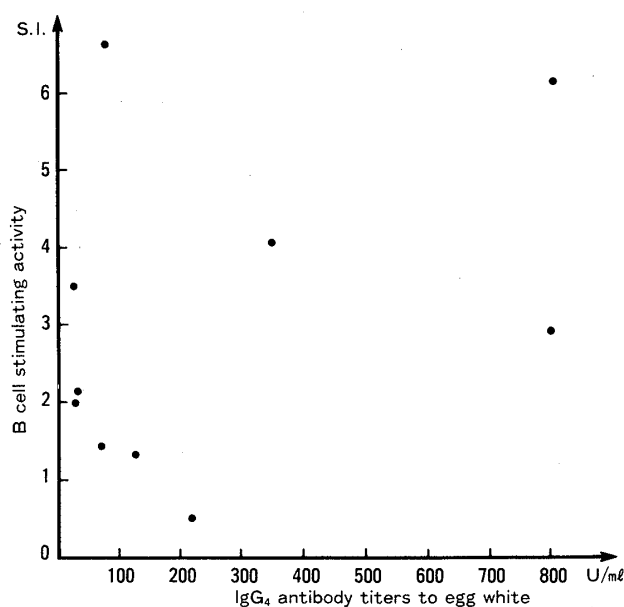


Fig. 8. Relationship between B cell stimulating activity and IgG₄ antibody titers to egg white. (n=10)

でB細胞の増殖を促す因子 (B cell growth factor: BCGF)を報告してから、各研究者が、BCGF-1, B cell stimulatory factor-1(BSF-1)⁶⁾, B cell differentiation factor γ (BCDF γ)¹⁷⁾, IgG₁誘導因子¹⁸⁾を発表し、それらが同一であることが確認され、IL-4と呼称されるに至った。更に、精製された BSF-1が lipopolysacchar-

ide (LPS)で刺激を受けたB細胞の *in vitro* のIgE抗体、IgG₁抗体産生能を促進することをCoffman¹⁾, Vittelaら¹⁹⁾が報告し、アレルギー疾患との係りが示唆されるようになった。そこで今回、著者は、卵白IgE RAST陽性アレルギー患児において、OVAで刺激した末梢血単核細胞からのIL-4様B細胞刺激因子活性産生能を検討した。卵白IgE RAST陽性アレルギー患児、卵白IgE RAST陰性アレルギー患児、健康成人の3群におけるOVA刺激時末梢血単核細胞からのIL-4様B細胞刺激因子活性産生能を比較した際、卵白IgE RAST陽性アレルギー患児のIL-4様B細胞刺激因子活性産生能は、他の2群のそれに比し、高値を示した。また、食物アレルギーにおいて、卵白抗原に対する特異的IgE抗体が年長児に比し、2歳から3歳児でピークを示し、それ以後の年齢では減少するという報告²⁰⁾²¹⁾があるため、著者は、卵白IgE RAST陽性アレルギー患児におけるOVA刺激時末梢血単核細胞からのIL-4様B細胞刺激因子活性産生能と年齢区分(3群)を比較したが、有意な結果は得られなかった。これより年齢とIL-4様B細胞刺激因子活性産生能には相関はなかった。年齢が高くても、反応性が高い場合が認められたという事実は、OVA反応性が潜在的に継続しており、かつその反応性を阻止するシステムが作動している可能性を示唆していると思われた。

近年、食物の特異的IgG₄抗体における各種アレルギー

ギー疾患への係り合いが諸家²²⁾⁻²⁵⁾により報告されてきており、著者は、卵白 IgE RAST 陽性アレルギー患児の卵白 IgG₄抗体値と IL-4様 B 細胞刺激因子活性産生能の関係を調べてみた。結果は、相関関係は認められなかった。同様に、IgE RIST 値、卵白 IgE RAST 値にも相関関係は認められなかった。山田ら²⁶⁾は、気管支喘息児における腸管からの OVA の吸収をみるため、鶏卵負荷試験を行っており、その際の serum-OVA を測定し、濃度 1ng/ml を得ている。今回の著者の研究では、OVA 10 μ g/ml を付加しており、単純に比較換算すると多量の卵を負荷した状態となり、日常生活にて起きている現象とはかけ離れた状態が想定された。このことが、IL-4様 B 細胞刺激因子活性産生能と IgE RIST 値、卵白 IgE RAST 値、卵白 IgG₄抗体値との相関が認められなかった事実の一因ではないかと思われる。また、B 細胞刺激活性中に IL-4以外の因子の存在をも示唆するのではないかと考えられてきた。アレルギー反応の一部として、IL-4の検討をさらに進め、IL-2やその他の反応系の指標を加え検討することが、IL-4様 B 細胞刺激因子活性産生能の意味を考えるために必要であると思われる。

稿を終えるにあたり、直接御指導を賜りました東邦大学医学部第二小児科助教授 小屋二六先生に心から深謝いたします。また、御校閲を賜りました東邦大学医学部第二小児科教授 青木継稔先生ならびに国立小児病院アレルギー科の斉藤博久先生に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は、第26回日本小児アレルギー学会にて発表した。

文 献

- 1) Coffman, R.L., Ohara, J., Bond, M.W., Carty, J., Zlotnik, A. and Paul, W.E.: B cell stimulatory 1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J. Immunol.* 136, 4538-4541, 1986.
- 2) Yokota, T., Arai, N., de Vries, J.E., Spites, H., Branchereau, J., et al.: Molecular biology of interleukin 4 and interleukin 5 genes and biology of their products that stimulate B cells, T cells and hemopoietic cells. *Immunol. Rev.* 102, 137-187, 1988.
- 3) 斎藤誠一, 四宮範明, 諸井 孝, 笹本明義, 細野稔彦, 他: ダニ感作喘息患者末梢血リンパ球からの B 細胞刺激因子の産生について. *アレルギー* 37, 821-821, 1988.
- 4) Boyum, A.: A one stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Labo. Invest.* 21, 51-76, 1968.
- 5) Howard, M., Farrar, J., Hilfiker, M., Johnson, B., Takatsu, K., Hamaoka, T. and Paul, W.E.: Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2. *J. Exp. Med.* 155, 914-923, 1982.
- 6) Swain, S.L., Howard, M., Kappler, J., Marrack, P., Watoson, J., et al.: Evidence for two distinct classes of murine B cell growth factors with activities in different functional assays. *J. Exp. Med.* 158, 822-835, 1983.
- 7) 向山徳子, 馬場 実, 野間 剛, 矢田純一: 気管支喘息小児におけるダニ抗原 (*Dermatophagoides farinae*) 刺激及び phytohemagglutinin 刺激時のインターロイキン-2 反応性ならびに産生能について. *アレルギー* 36, 351-357, 1987.
- 8) 野間 剛, 吉沢いづみ, 川野 豊, 伊藤雅彦, 馬場 実, 矢田純一: アレルゲンに対するアトピー患者リンパ球の応答性一年齢による変動, 健康児との比較及び診断的意義. *アレルギー* 36, 1075-1085, 1987.
- 9) 川野 豊, 野間 剛, 吉沢いづみ, 馬場 実, 矢田純一: 特異抗原で誘導されるリンパ球のインターロイキン-2 反応性に及ぼすトラニラストの影響についての検討. *アレルギー* 37, 47-52, 1988.
- 10) 市川邦男, 馬場 実, 吉沢いづみ, 野間 剛: 特異抗原で誘導される interleukin-2 反応性に対する disodium cromoglycate (DSCG) の処理効果についての検討. *アレルギー* 38, 1163-1168, 1989.
- 11) Yoshizawa, I., Noma, T., Kawano, Y. and Yata, J.: Antigen specific induction of IL-2 responsiveness in lymphocytes from bronchial asthma children. 1. Antigen specificity and initial events of the induction. *J. Allergy Clin. Immunol.* 84, 246-255, 1989.
- 12) Noma, T., Yoshizawa, I., Maeda, K., Ichikawa, K., Baba, M. and Yata, J.: Allergen specific induction of IL2 responsiveness by supernatants of normal lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 84, 255-262, 1989.
- 13) 大槻マミ太郎, 小方冬樹, 古江増隆, 石橋康正: アトピー性皮膚炎における細胞性免疫調節—インターロイキン 4 に対する hyperresponsiveness とインターロイキン 2 に対する hyporesponsiveness について—. *アレルギー* 38, 1169-1172, 1989.
- 14) Noma, T., Kawano, Y., Yoshizawa, I., Itoh, M.,

- Mukoyama, T., Baba, M. and Yata, J.: Ovalbumin (OVA)-antigen specific induction of IL-2 responsiveness in lymphocytes from patients with hen-egg allergy and its regulation by the culture supernatant of normal lymphocytes. *Ann. Allergy* 64, 33-41, 1990.
- 15) 川野 豊, 野間 剛, 吉沢いづみ, 前田和一, 山口公一, 馬場 実, 矢田純一: 末梢血リンパ球における特異抗原刺激による interleukin 2 (IL2) 反応性の誘導とそれに対する抗 CD45R 抗体処理の効果. *アレルギー* 39, 48-53, 1990.
 - 16) 野間 剛, 吉沢いづみ, 川野 豊, 中山 徹, 赤坂 徹, 他: アトピー小児におけるアレルギー剤刺激リンパ球からの interleukin 4 (IL4) 産生についての検討. *日児誌* 94, 146-146, 1990.
 - 17) Isakson, P.C., Puré, E., Vitetta, E.S. and Krammer, P.H.: T cell derived B cell differentiation factor(S)—Effect on the isotope switch of murine B cells. *J. Exp. Med.* 155, 734-748, 1982.
 - 18) Bergstedt-Lindquist, S., Sideras, P., Macdonald, H.R. and Severinson, E.: Regulation of Ig class secretion by soluble products of certain T-cell lines. *Immunol. Rev.* 78, 25-50, 1984.
 - 19) Vitetta, E.S., Ohara, J., Myers, C.D., Layton, J. E., Krammer, P.H. and Paul, W.E.: Serological, biological, and functional identity of B cell stimulatory 1 and B cell differentiation factor for IgG₁. *J. Exp. Med.* 162, 1726-1731, 1985.
 - 20) Foucard, T.: A follow-up study of children with asthmatoïd bronchitis. *Acta Paediatr. Scand.* 62, 633-644, 1973.
 - 21) 向山徳子, 岩崎栄作, 馬場 実, 林 義久, 有田昌彦: 卵アレルギー小児における卵白抗原, オバルブミン, オボムコイドの IgE 抗体ならびに IgG 抗体. *アレルギー* 31, 106-113, 1982.
 - 22) 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, IgG₄ 抗体について. *アレルギー* 35, 166-170, 1986.
 - 23) 伊藤節子, 細井 進, 井上康広, 平家俊男, 真弓光文, 四宮敬介, 三河春樹: 卵白アレルギーの証明されたアトピー性皮膚炎における卵白特異 IgE および IgG 抗体について. *アレルギー* 35, 840-840, 1986.
 - 24) 飯倉洋治, 永倉俊和, 秋本憲一, 岩原順子, 植草忠, 恩田威文: 小児アレルギー性疾患に対する特異 IgE, IgG, IgG₄ 抗体の研究 第1編 アトピー性皮膚炎における卵白, 牛乳, 大豆特異 IgE, IgG, IgG₄ 抗体測定の意味. *アレルギー* 36, 921-930, 1987.
 - 25) 諸井 孝: 小児アレルギー疾患における特異 IgE, IgG₄ 抗体について 第1編 IgG₄ 抗体値と IgE RAST 値およびアレルギー諸因子の関係について. *アレルギー* 37, 331-343, 1988.
 - 26) 山田 享, 安枝 浩, 柳原行義, 影山さち子, 三島健: 食物アレルギーの発症および out-grow の機序における検討. *小児科臨床* 38, 2480-2489, 1985.

THE PRODUCTION OF B CELL STIMULATING ACTIVITY IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS FROM ALLERGIC CHILDREN WITH POSITIVE IGE RAST SCORE TO EGG WHITE

Taka Moroi

Second Department of Pediatrics, Oohashi Hospital Toho University School of Medicine

We investigated B cell stimulating activity in peripheral blood mononuclear cells from allergic children with positive IgE RAST score to egg white in order to study whether interleukin-4 (IL-4) was participating in production of IgE antibody. B cell stimulating activity in peripheral blood mononuclear cells from allergic children with positive IgE RAST score to egg white stimulated with ovalbumin (OVA) was higher than that observed in allergic children with negative IgE RAST score to egg white. In allergic children with positive IgE RAST score to egg white stimulated with OVA, B cell stimulating activity in peripheral blood mononuclear cells did not correlate each other; age, IgE RAST, IgE RAST score to egg white and IgG₄ antibody to egg white.

These results suggest that the production of B cell stimulating activity other than IL-4 may be involved in the patients with egg allergy.