

気管支喘息の診療における鼻粘膜細胞診

—鼻粘膜スメア細胞診上の肥満細胞, 好酸球, 好塩基球と RAST 法による
ダニに対する特異 IgE 抗体価との関連の検討—

千葉大学医学部小児科

平野清美 下条直樹 斎藤公幸 星岡 明
 勝木利行 本間季里 河野陽一 新美仁男

生後半年～12歳までの気管支喘息患者39名を対象として, 鼻粘膜スメア細胞診を行い, スメア上に出現している肥満細胞, 好酸球, 好塩基球の出現と RAST 法によるダニに対する IgE 抗体価との関連を解析し, 以下の結果を得た。

(1) 鼻粘膜スメア細胞診上での好酸球の出現数はダニに対する RAST スコアと明らかな相関が認められた。(2) ダニ抗原に対する感作が血清学的に検出されるよりも以前に, また鼻粘膜スメア好酸球の出現に先だって, 鼻粘膜スメア上に肥満細胞の出現が観察された。(3) 好塩基球は, 好酸球の出現してきた症例においてのみ, 好酸球が出現してきた後に認められた。

以上より, 鼻粘膜スメア細胞診はアレルギー反応が起こる粘膜局所での細胞の動態を観察でき, 特に肥満細胞の存在は気道アレルギー疾患における局所でのアレルギー性炎症を早期に診断する方法として, 有用と考えられた。

Key words: bronchial asthma — IgE RAST — house dust mite — nasal smear cells

はじめに

鼻粘膜スメア細胞診は Bryan により1950年代からアレルギー疾患の診断に応用された¹⁾。鼻粘膜細胞診は, 喀痰細胞診と異なり気管支喘息の炎症の場である気管支での細胞像をみているわけではない。しかし喀痰細胞診が頻回に行い得ないのに対して, 鼻粘膜細胞診は経時的な観察もでき, また簡単に行える利点がある。特に, 喀痰採取が容易ではない乳幼児期の患者においてはその利点は特に重要である。さらに, 鼻粘膜細胞像は喀痰細胞像と明確な関連がみられる²⁾ことからその臨床的意義は大きい。このような利点から, 鼻粘膜スメア細胞診は, 長くアレルギー疾患の補助的な診断検査法として用いられ^{3)~7)}, アレルギー反応を示唆する細胞群として好酸球と好塩基性細胞の存在が重要であることが明らかとされた。しかしその後, アレルギー特異的 IgE 抗体が RAST 法により測定されるようになってから, 小児科においては日常の臨床検

査として用いられることは少なくなった。本邦の鼻粘膜スメア細胞診の報告においては, アレルゲンに対する特異的 IgE 抗体価, すなわちアレルゲンに対する感作とアレルギー性炎症反応との関連という観点からの鼻粘膜スメア細胞像の解析は, 市村らの詳細な報告⁷⁾を除いてきわめて少ない。しかし最近, アレルギー性疾患発症の予測や局所におけるアレルギー性炎症の細胞学的解析といった観点から, 主として海外で再び鼻粘膜スメア細胞診が注目されている⁸⁾⁹⁾。さらに, 近年免疫組織学的手法を用いて肥満細胞と好塩基球をそれぞれ同定することが可能となっている¹⁰⁾。そこで今回, 我々は気道におけるアレルギー性炎症の指標として気管支喘息患者の鼻粘膜スメア細胞診を行い, 肥満細胞, 好酸球, 好塩基球数と, RAST 法によるダニ特異 IgE 抗体価との関連を検討した。

対象と方法

食物に対する RAST が陰性か弱陽性で病歴からも食物アレルギーの関与がないと考えられる生後半年～12歳迄の千葉大学医学部小児科外来を受診している

Received: February 10, 1995

Accepted: July 4, 1995

Abbreviations: RAST radioallergosorbent test;

Dp *Dermatophagoides pteronyssinus*

Table 1 Grading of number of nasal smear cells

Mast cell (numbers/ whole slide)	Eosinophil (numbers/500×field, mean of 5 fields)	Basophil (numbers/ whole slide)
0 : no cells	0 : no cells	0 : no cells
1 : 1-15	1 : 1-5	1 : 1-15
2 : 16-20	2 : 6-10	2 : 16-20
3 : 21-30	3 : 11-20	3 : 21-30
4 : 31-50	4 : 21-50	4 : 31-50
5 : >51	5 : >51	5 : >51

Table 2 Effect of ethanol fixation on staining of mast cell granules

Patients (Dp RAST)	Mast cell number/whole slide			
	Time after fixation with 95% ethanol			
	(-)	10min	30min	60min
Patient 1 (Dp RAST 0)	35	0	0	0
Patient 2 (Dp RAST 4)	>500	100	90	NT

NT : not tested

気管支喘息患者39名を対象とした。これらの患者は、鼻閉、鼻汁、くしゃみなどの臨床的に明らかな鼻アレルギー症状を示していない。薬剤を未使用の非発作時にこれらの患児の下鼻甲介を乾燥綿棒で擦過し、直ちにスライドガラス上に塗抹し、乾燥後ハンセル染色(エオジノステイン、鳥居薬品)により肥満細胞、好酸球、好塩基球を顕微鏡下で同定した。肥満細胞は細胞の大きさ及び核の形態より好塩基球と区別し、さらに抗トリプターゼ抗体 (Chemicon International Inc., Temecula, CA) による染色を行って肥満細胞を同定した。好塩基球は標本全体の好塩基性細胞の中で抗トリプターゼ抗体で染色されない細胞をカウントした。

肥満細胞、好酸球、好塩基球の数の評価は Table 1 に示す基準に基づいて行い、細胞数に応じて0から5までのgradeで示した。ヤケヒョウヒダニ (Dp) 特異的IgE抗体は、radioallergosorbent test (RAST) 法により測定し、スコアにて示した。

結 果

(1) 固定法による肥満細胞数の変化

自然乾燥とエタノール固定による肥満細胞の染色性について検討した。Table 2に示すように自然乾燥に

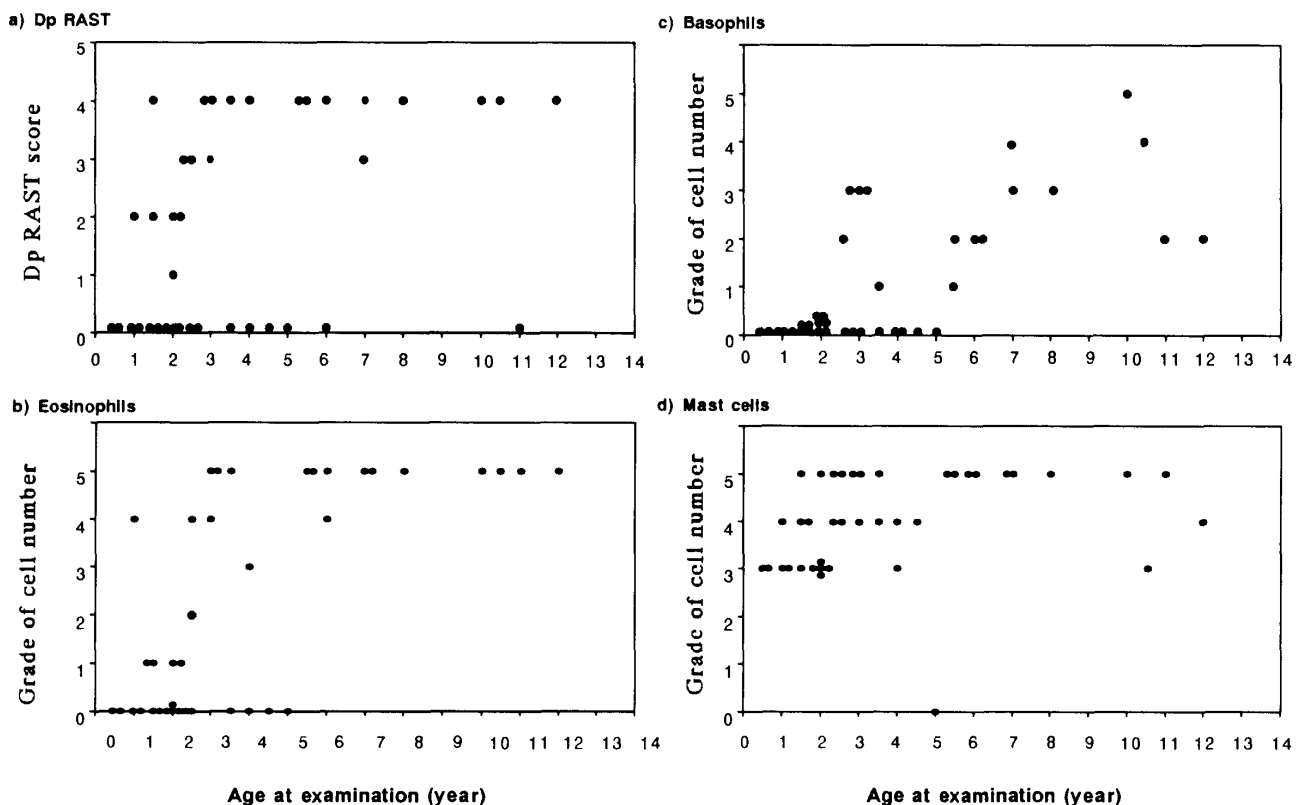


Fig. 1. Correlation of nasal smear cells, Dp RAST and age.

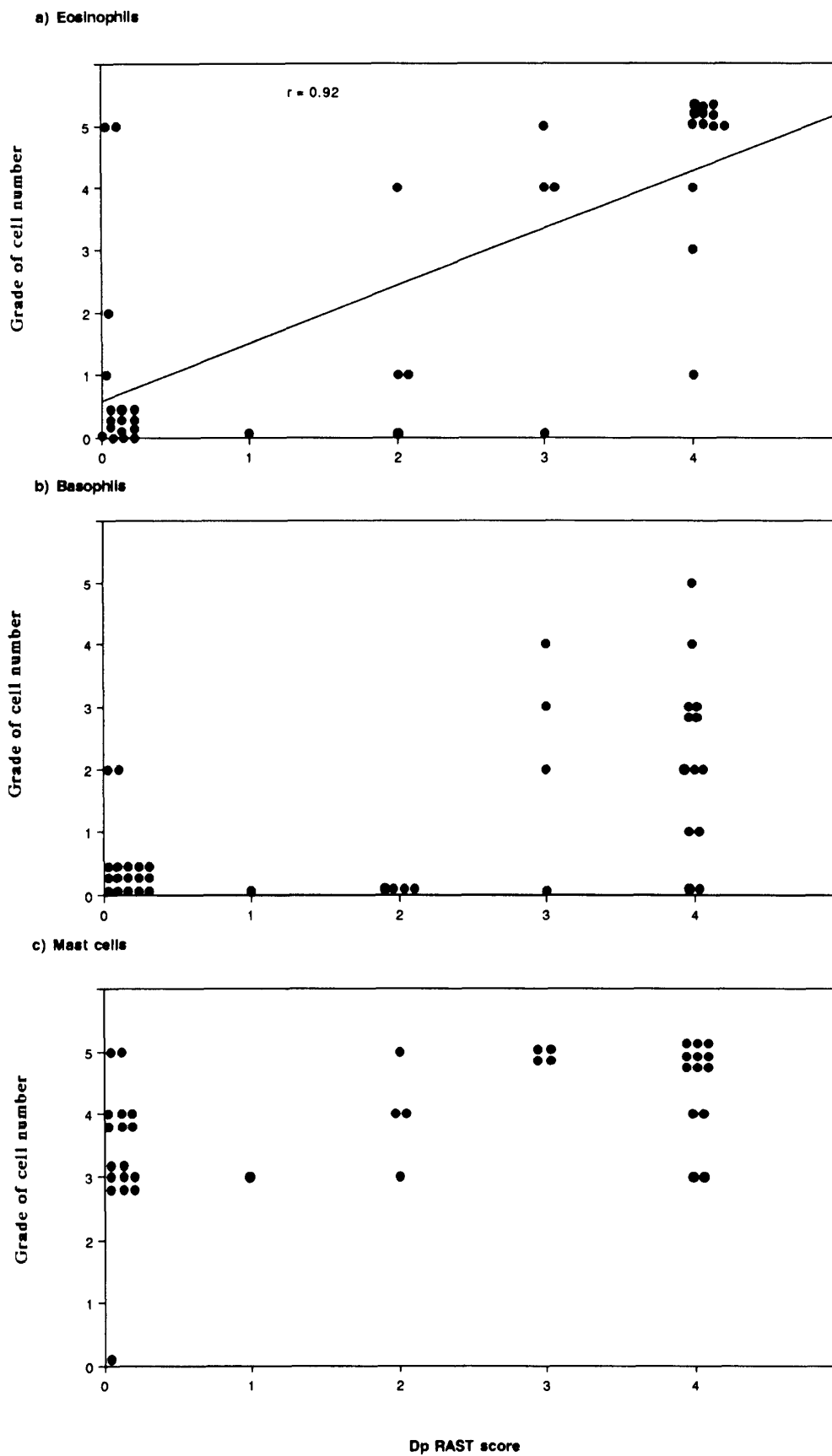


Fig. 2. Correlation of nasal smear cells and Dp RAST score.

対して、10分間以上のエタノール固定を行った場合には著しく染色性が低下した。従って、以下の実験については、エタノール固定をせず、自然乾燥後に続いて染色を行った。

(2) 患者の年齢と鼻粘膜スミア上の好酸球, 好塩基球, 肥満細胞数および Dp RAST スコアとの関係 (Fig. 1)

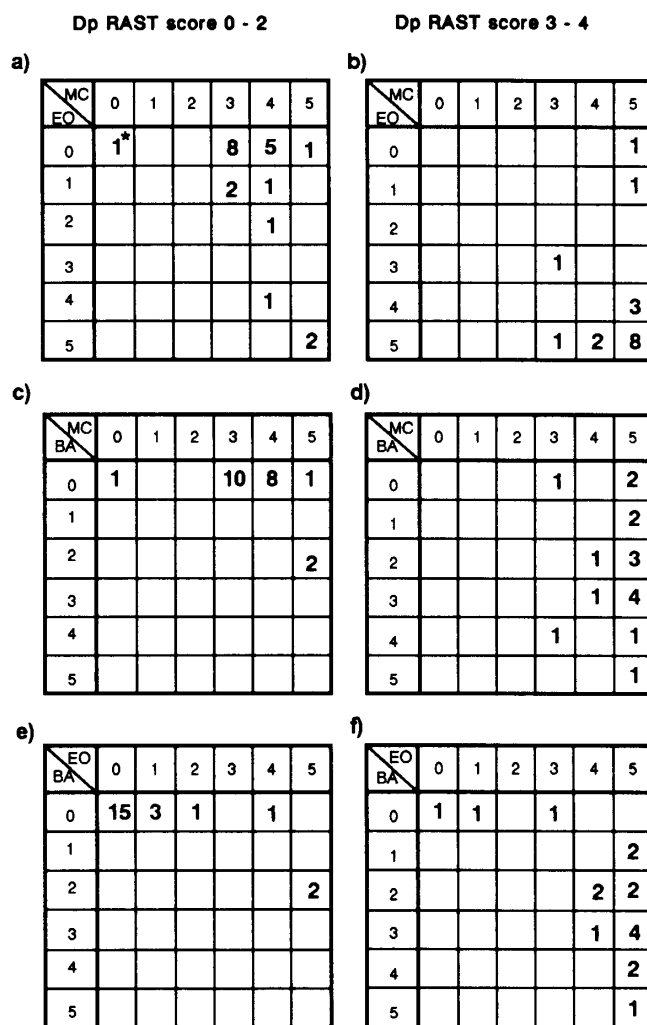
年齢と Dp に対する RAST スコアの検討では, 低年齢でスコア 0 の患者が多く認められた。年長児では, Dp RAST スコア 0 の患者も存在するものの多くの症例で Dp RAST スコアは陽性であった (Fig. 1a)。

年齢と鼻粘膜スミア上に出現してくる細胞群の検討では, 好酸球は, 低年齢児においてまったく出現していない症例も多数存在し, 年齢が高くなるにつれ多く出現する傾向がみられた。また, 高年齢ではほとんどの患者で grade 5 と多くの好酸球が鼻粘膜スミアに認められた (Fig. 1b)。好塩基球は, 好酸球と同様に年齢が高くなるにつれ多く出現する傾向がみられたが, 好酸球と異なり高年齢においても陰性または細胞数の少ない患者も存在した。また, 2 歳以下の患者群で, 好酸球が出現してきても好塩基球の認められない症例が存在した (Fig. 1c)。これに対して, 肥満細胞は 0~12 歳までについては患者の年齢にかかわらず, 5 歳の 1 例を除き, すべての症例に grade 2 以上と有意な出現が認められた (Fig. 1d)。

(3) 鼻粘膜スミア好酸球, 好塩基球, 肥満細胞と Dp RAST スコアの関連 (Fig. 2)

好酸球数と Dp RAST スコアの関連では, Dp RAST スコアが陽性で好酸球の認められない症例と好酸球は認められるが Dp RAST スコアが 0 の症例はごく少数であり, 好酸球数と Dp RAST スコアの間には相関係数 $r=0.92$ と高い相関が認められた (Fig. 2a)。鼻粘膜スミア好塩基球数も Dp RAST スコアと好酸球のように高い相関はないが, Dp RAST スコアが 3~4 と高値を示す群に多く認められた。また, 好塩基球の出現してきている症例 16 名中, Dp RAST スコアが 0 の患者は 2 名のみであり, またその grade も 2 と低値であった (Fig. 2b)。一方, 鼻粘膜スミア肥満細胞と Dp RAST スコアの関連を検討すると, Dp RAST スコア高値の症例では, 肥満細胞数の grade が高値を示す傾向が認められるが, Dp RAST スコアの陽性, 陰性にかかわらず 1 例を除いて全例に grade 3 以上と陽性であった (Fig. 2c)。

(4) Dp RAST スコアの変化に伴う好酸球, 好塩基球, 肥満細胞数の関係 (Fig. 3)



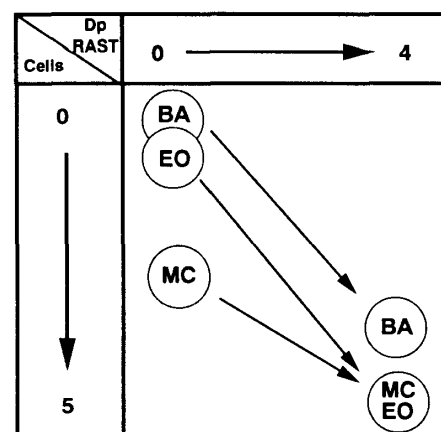
*: number of patients; MC: mast cells; EO: eosinophils; BA: basophils

Fig. 3. Correlation between nasal smear cells in accord with Dp RAST score.

Dp に対する感作の程度別に鼻粘膜スミアにおける肥満細胞, 好酸球, 好塩基球数の関係を Fig. 3 に示した。肥満細胞と好酸球数の関係を検討すると, Dp RAST スコアが 0~2 の気管支喘息患者 22 名中, 14 名において好酸球が認められないにもかかわらず肥満細胞は出現していた (Fig. 3a)。また, 好酸球が認められた 7 名においても 4 名は好酸球数の grade は 2 以下であり好酸球は少数であった。これに対して, Dp RAST スコア 3~4 の強陽性群では, 好酸球, 肥満細胞とも図の右下方の grade 5 に集中していた (Fig. 3b)。肥満細胞と好塩基球数の関係では, Dp RAST 0~2 の群ではほとんど好塩基球は認められず (Fig. 3c), Dp RAST 3~4 の群においても, 肥満細胞がすべて grade 3 以上でその多くが grade 5 であるのに対し, 好塩基球は grade 0 から 5 まで広く分布していた

(Fig. 3d). 好酸球と好塩基球数の関連では, Dp RAST スコア 0~2 の群では好塩基球は好酸球数が grade 5 の患者 2 名にのみ出現しており (Fig. 3e), Dp RAST スコア 3~4 の群でも好塩基球陽性患者は著増しているが, すべて好酸球が陽性の患者であることが明らかとなった (Fig. 3f). Dp RAST の陽性化と鼻粘膜スミアに出現する細胞群の関係を Fig. 4 に模式的に示した. すなわち, ダニに対する感作が軽度の時には, 肥満細胞のみが鼻粘膜スミア上に存在しており, 感作が進むにつれ好酸球が出現してくる. さらに, 好酸球の grade が 4~5 と高値になるにつれ好塩基球が出現してくることが示唆された.

(5) 同一患者における鼻粘膜細胞像と Dp RAST スコアの変化



MC: mast cells; EO: eosinophils; BA: basophils

Fig. 4. Flow of cellular pattern in accord with RAST positivity.

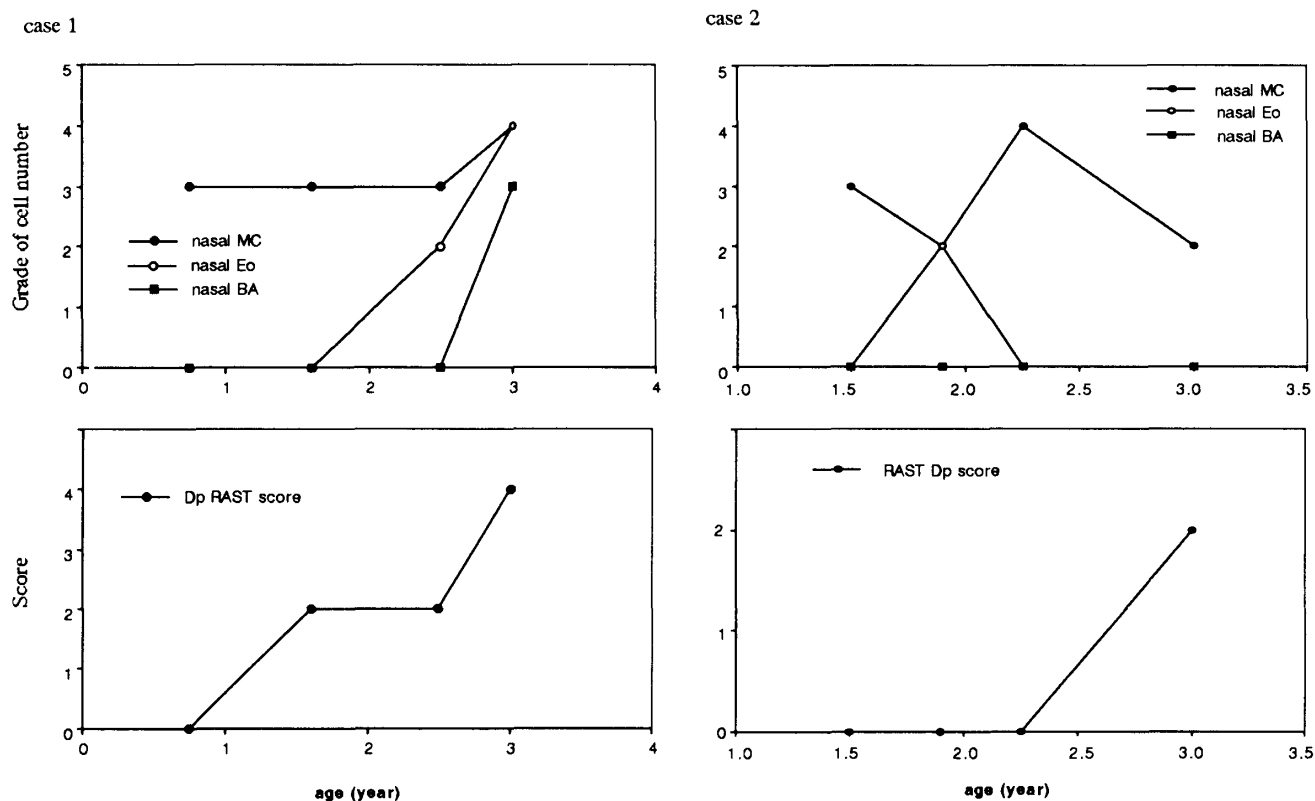


Fig. 5. Appearance of nasal smear cells in patients: time course.

以上示した結果は, 鼻粘膜スミア上に出現する細胞群を同一患者において経時的に観察して得られたものではない. そこで, 同一患者における鼻粘膜肥満細胞, 好酸球, 好塩基球数と Dp RAST スコアの変化を経時的に追跡した. 代表的症例を Fig. 5 に示した. 患者 1 (case 1) は生後 7 カ月で気管支喘息と診断された. この時点では, 鼻粘膜スミア細胞診にて好酸球, 好塩基

球は認められず, 肥満細胞のみが grade 3 と陽性であった. Dp RAST スコアは 0 であった. 図に示すように, 本患者においてその後, Dp RAST スコアの陽性化, 鼻粘膜スミア上の好酸球, さらに好塩基球の出現が認められた. 患者 2 (case 2) は, 1 歳 6 カ月で気管支喘息と診断された. この時点では Dp RAST スコアは 0, また鼻粘膜好酸球は陰性であり, 肥満細胞

のみが grade 3 と陽性であった。1 歳 8 カ月時には、一過性に好酸球が出現したが、後には陰性化した。Dp RAST は、3 歳時にスコア 2 と陽性化した。経過を通じて肥満細胞は陽性であった。

考 察

従来の報告では、鼻粘膜スミア細胞診上、肥満細胞と好塩基球は、ともに好塩基性細胞として示されており、両者の区別は明らかではなかった³⁾⁻⁹⁾。本研究で我々は、好塩基球には存在せず、肥満細胞にのみ認められるトリプターゼ¹⁰⁾に対する抗体を用いて肥満細胞と好塩基球を区別することにより、鼻粘膜スミア細胞像とダニに対する IgE 抗体価の関連を解析した。ほとんどの症例において鼻粘膜好酸球は Dp RAST が陽性の患者に出現していた。この傾向は、特に好塩基球でより明らかであり、鼻粘膜スミア好塩基球は 2 例を除いてすべて Dp RAST 陽性の患者に認められた。これに対して、肥満細胞は血清学的なダニ RAST 陽性に先立って、その出現が認められた。ダニに対する IgE 抗体の検出よりも早期に鼻粘膜スミアに出現する肥満細胞の重要性は、Kemp らも報告している⁶⁾。彼らは、通年性のアレルギー性鼻炎の小児の鼻粘膜スミア細胞診を検討し、乳時期では好酸球の出現やダニに対する皮膚テストの陽性化に先立って肥満細胞のみが認められることを示している。

気道アレルギー疾患における好塩基性細胞の診断的意義については、いくつかの報告が見られるが、その陽性頻度は 60% 前後と、それほど高くない⁴⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾。我々の今回の検討では、1 名を除いて対象患者のすべてに肥満細胞が認められた。現在までの報告と我々の結果の相違は、一つには染色の手技の違いによる可能性が考えられる。これまでの報告では、鼻粘膜スミアはアルコール固定をした後にハンセル染色を行い、好塩基性細胞を同定している。我々の解析では、同一検体をアルコール固定の有無で分けてハンセル染色を行うと、アルコール固定した標本では肥満細胞の顆粒の染色性が大きく変化し、染色陽性の肥満細胞数は有意に減少していた。この傾向は、特に Dp RAST 陰性の乳児喘息患者において著しかった。したがって、アルコール固定をしなければ肥満細胞の陽性率はきわめて高くなると考えられる。

乳児期の鼻粘膜スミアの肥満細胞の存在は、気道ア

レルギーの早期の診断上きわめて有用な所見であるが、このような患者では食物アレルギーの関与が疑われることが知られている⁴⁾。筆者らも、病歴および検査結果から食物が原因と考えられるアトピー性皮膚炎やアレルギー性胃腸炎の患者の鼻粘膜スミア上に肥満細胞が出現してくることを確認している。しかし本研究では、食物アレルギーの関与がほとんど考えられない気管支喘息患者を対象として、吸入アレルゲンに対する感作との関連で鼻粘膜スミア細胞像の解析をおこなった。我々は既に、皮膚テストや RAST が陰性で鼻粘膜スミア上肥満細胞のみが認められる乳幼児気管支喘息患者においても、その多くの症例で肥満細胞上にダニ特異的 IgE 抗体が存在することを報告している¹¹⁾。すなわち、これらの患者の鼻粘膜に存在する肥満細胞は局所においてはダニ特異的 IgE 抗体に感作されており、ダニに対するアレルギー反応に関与していると考えられる。

Zeiger らは、アトピー素因を有する親から生まれた乳児を対象として生後 4 カ月から 4 年間にわたり鼻粘膜細胞像を観察し、好塩基性細胞、好酸球数とダニに対する IgE 抗体価に有意の相関を認めている⁹⁾。また、本邦では、市村らが鼻粘膜スミア細胞像とダニ RAST 値の間に有意の関連を認めている⁷⁾。今回の我々の解析でも、Dp RAST スコアと鼻粘膜スミア好酸球数の間には統計学的に有意な相関が存在し、また好塩基球の出現も Dp RAST の陽性化に伴って認められた。さらに、鼻粘膜スミア好塩基球は好酸球の出現した症例にのみ認められ、好酸球の出現後に気道粘膜に現われることが示唆された。気管支喘息は病理学的に好酸球を主体とした慢性のアレルギー性炎症反応と理解され¹²⁾、さらに、喘息患者の気道に好塩基球が浸潤していることも免疫組織学的に証明されている¹³⁾。これらのアレルギー性炎症細胞の血中からの局所への浸潤は、アレルゲン特異的 T 細胞からのインターロイキン 4 をはじめとするサイトカインによって惹起される¹⁴⁾が、肥満細胞もまた好酸球、好塩基球の遊走因子を産生することも良く知られている¹⁵⁾。今回の解析は、炎症局所において肥満細胞がまず活性化された後に、血中から好酸球、好塩基球が動員されてアレルギー性炎症反応が進行する可能性を裏付けたものと考えられる。このような細胞像の変化は、内科や耳鼻科領域など年長児や成人の気管支喘息患者では観察が比較的困難であり、乳児期から気管支喘息の経過を追跡する小児科において観察しやすかったことが考えられる。

今回の解析においては、いわゆる鼻アレルギーの3主徴を示す臨床的に明らかな鼻アレルギーを合併する患者は除いた。さらに、典型的な気管支喘息患者で鼻粘膜スメア細胞診上肥満細胞のみが認められる患者の一部については、耳鼻科的診察にて鼻炎の所見がなく、さらに誘発試験も陰性であることを確認している。しかしながら、小児期の鼻アレルギーは、症状が典型的でなく診断が困難なことも知られており、今回の我々の解析において潜在的な鼻アレルギーを有する患者が(特に学童期の患者で)混入していることは否定し得ない。以上から、今回の解析結果は、鼻粘膜スメア細胞診、特に肥満細胞の出現が、単に気管支喘息のみでなく、気道アレルギー疾患におけるダニに対する感作とそれに伴うアレルギー性炎症の早期診断に有用であることを示唆していると考えられる。

気管支喘息発症前に、アトピー性皮膚炎患者に対して抗アレルギー薬を投与することにより有意に気管支喘息の発症率を低下させえた臨床報告がみられる¹⁶⁾。したがって、鼻粘膜スメア細胞診により、肥満細胞のみが認められ、アレルギー性炎症が強くない時期から室内塵、ダニの駆除等の環境調整や抗アレルギー薬の使用により、気道アレルギー疾患の発症を制御しうる可能性が考えられ、現在解析を進めている。

貴重な助言を頂きました千葉大学医学部耳鼻科、今野昭義教授ならびに山越隆行先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Bryan, W.T.K. and Bryan, M.P.: Cytologic diagnosis in otolaryngology. *Am. Acad. Ophth. Otolaryngol.* **63**, 597-615, 1959.
- 2) 久保政次: nasal smearの細胞像。新しい考え方による小児気道疾患の日常診療(久保政次 編)。南山堂、東京, pp. 32-34, 1981.
- 3) 三島 健: アレルギー性疾患の nasal smear についての細胞学的研究。第2編 アレルギーにおける mast cell の意義について。日児誌 **67**, 146-151, 1965.
- 4) 田中富美子: アレルギー疾患の細胞学的研究 第3編 乳児喘息の診断における nasal smears の意義。日児誌 **79**, 724-730, 1975.
- 5) Kajosaari, M., Backman, A. and Holopainen, E.: Children's atopy and mastocytosis in the nasal smear. *Allergy* **36**, 405-410, 1981.
- 6) Kemp, A.S., Simpson, J. and Mellis, C.M.: The significance of nasal eosinophils and mast cells in children with nasal symptoms. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **4**, 293-299, 1982.
- 7) 市村登寿, 関根勇夫, 山田 喬, 他: 小児の気道アレルギー性疾患とアデノイド・鼻咽腔。日本医事新報 **3231**, 22-34, 1986.
- 8) Borres, M.P., Irander, K. and Bjorkstein, B.: Nasal metachromatic cells in infants in relation to allergic disease and family history of atopy. *Pediatr. Allergy Immunol.* **4**, 184-189, 1991.
- 9) Zeiger, R.S. and Heller, S.: Development of nasal basophilic cells and nasal eosinophils from age 4 months through 4 years in children of atopic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* **91**, 723-734, 1993.
- 10) Holgate, S.T., Robinson, C. and Church, M.K.: Mediators of immediate hypersensitivity. In "Allergy: Principle and Practice" (ed. by E. Middleton, C.E. Reed, F.E. Ellis, N.F. Adkinson and J.W. Yunginger), The CV Mosby Co, St Louis, pp. 272-274, 1993.
- 11) Shimojo, N., Hirano, K., Saito, K., Niimi, H. and Kohno, Y.: Detection of house dust mite (HDM)-specific IgE antibodies on nasal mast cells from asthmatic patients whose skin prick test and RAST are negative for HDM. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **98**, 135-139, 1992.
- 12) Bousquet, J., Chanez, P., Lacoste, J.Y., Barnéon, G., Ghavanian, N., et al.: Eosinophilic inflammation in asthma. *N. Engl. J. Med.* **323**, 1033-1039, 1990.
- 13) Koshino, T., Teshima, S., Fukushima, N., Takaishi, T., Hirai, K., et al.: Identification of basophils by immunohistochemistry in the airways of post-mortem cases of fatal asthma. *Clin. Exp. Allergy* **23**, 919-925, 1993.
- 14) Yamaguchi, Y., Suda, T., Suda, J., Eguchi, M., Miura, Y., et al.: Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. *J. Exp. Med.* **167**, 43-56, 1988.
- 15) Plaut, M., Pierce, J.H., Watson, C.J., Hanley-Hyde, J., Nordan, R.P. et al.: Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of FcεR I or to calcium ionophores. *Nature* **339**, 64-67, 1989.
- 16) 飯倉洋治, 馬場 実, 三河春樹, 西間三馨, 前田和一, 他: 小児気管支喘息発症予防に関する研究: ketotifen 二重盲検群間比較法による検討。アレルギー **40**, 132-140, 1991.

NASAL SMEAR CYTOLOGY IN BRONCHIAL ASTHMA: CORRELATION OF
APPEARANCE AND NUMBERS OF NASAL SMEAR MAST CELLS,
EOSINOPHILS OR BASOPHILS AND SERUM IgE
ANTIBODIES TO HOUSE DUST MITE IN
PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

Kiyomi Hirano, Naoki Shimojo, Kimiyuki Saito, Akira Hoshioka, Toshiyuki Katsuki,
Kiri Homma, Yoichi Kohno and Hiroo Niimi

Department of Pediatrics, School of Medicine, Chiba University

Nasal smear cytology was studied in pediatric patients with bronchial asthma with special reference with IgE RAST to house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp). Results obtained were as follows: (1) Numbers of eosinophils on the nasal smear correlated well with Dp RAST score, (2) mast cells were detected before Dp RAST becoming positive and appearance of eosinophils, (3) basophils appeared after detection of eosinophils and only in patients with nasal smear eosinophils. These results suggest that mast cells are the early marker for allergic inflammation and basophils and eosinophils appear in association with overt sensitization with house dust mite in house dust mite-sensitized asthmatic patients.
