

ダニ抗原刺激によるリンパ球のIL2反応性の獲得及びその培養上清 による皮膚反応との比較検討

¹⁾ 埼玉医大小児科, ²⁾ 毛呂病院光の家

³⁾ 同愛記念病院小児科, ⁴⁾ 東京医歯大小児科

野間 剛¹⁾ 吉沢いづみ¹⁾²⁾ 川野 豊¹⁾

前田和一¹⁾ 市川邦男³⁾ 山口公一³⁾

馬場 実³⁾ 矢田純一⁴⁾

ダニ抗原 (*Dermatophagoides farinae*: Df) で刺激したリンパ球の培養上清を自己の前腕に皮内注射することにより, Df で活性化した T 細胞の作用を *in vivo* で検討した. 健康者では, 皮内反応は陰性あるいは, 平均直径は1.5cm 以下であったが, ダニ抗原で感作されている患者では, 有意な陽性を認めた. 抗原非添加の場合にえられた上清でも皮内反応は陽性を示したことから患者リンパ球は生体内ですでに活性化されていることが示唆されたが Df 抗原を用いて *in vitro* で再刺激した場合にその反応は大きかった. 4℃にてえた上清ではこれらの反応はえられなかった. また卵白アルブミンで再刺激した場合にも反応の増強は認められなかったことから, これらの反応はダニ抗原に特異的であると考えられた. 経時的パターンは, 注射後15~20分後に認められる一過性の反応と, 1~2時間後から開始し, 5~6時間後に徐々に拡大し, 24~48時間まで継続する反応から構成され, 両者の複合反応あるいは後者のみの反応からなっていた. リンパ球の Df 刺激により誘導される interleukin2(IL2)の反応性が陽性であった個体では, これらの皮内反応系は陽性であった. 今回の皮内反応の成績は気管支喘息患児の二相性の気道反応と類似していた. Df 特異的 IL2反応性は *in vivo* における皮内反応系とほぼ相関していることを考えると, *in vitro* における即時型あるいは遅発型アレルギー反応を示唆している反応系であると考えられた.

Key words: bronchial asthma — mite antigen specific IL2 responsiveness — skin reactive factor(s) derived from Df-stimulated lymphocytes

緒 言

アレルギーで刺激したリンパ球の培養上清を患者に皮内注射すると皮膚の発赤が誘導されるが, 従来よりこれらの因子は skin reactive factor とよばれ遅延型過敏反応を反映していると考えられる^{1)~4)}. 一方病因抗原で刺激を受けたアトピー疾患患児のリンパ球は活性化され interleukin 2 (IL2) に対する反応性を獲得して増殖し, I 型アレルギー反応の主体をなす IgE 産生系や遅延型アレルギー反応のヘルパー T 細胞あるいは effector 細胞として作用することが報告されてい

る^{5)~8)}. これらの *in vitro* の反応系はアレルギー疾患における病因抗原の検索や病勢の把握に重要であることを報告した^{9)~13)}が, 今回, 抗原刺激でリンパ球から誘導される skin reactive factor による皮内反応系を再検討し, *in vitro* におけるリンパ球の抗原特異的 IL2 反応誘導系と比較検討を行った.

対 象

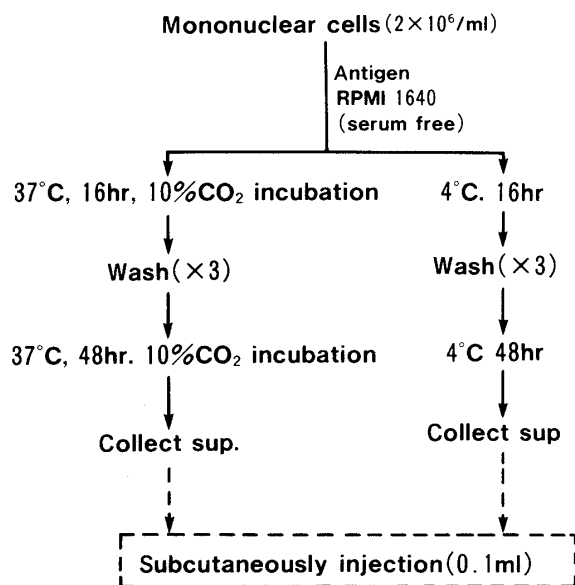
Df (*Dermatophagoides farinae*) に対する IgE RAST スコアが2 以上で, 学童期に気管支喘息の既往があり, 現在何らかの呼吸器症状のある成人4 名及び非アトピー健康成人4 名を用いた. 検査および試験の施行に対して被験者全員の了解と承諾を得た.

Received: June 25, 1992

Accepted: February 26, 1993

Abbreviations: Df *Dermatophagoides farinae*; IL2 interleukin 2; LEIZ drawing ink; MIF migration inhibitory factor; OVA ovalbumin; RSF skin reactive factor

Table 1 Preparation of antigen-induced skin reactive factor (s)



方 法

1) 抗原刺激リンパ球培養上清の調製及びその皮内反応

患者あるいは健康者の末梢血より比重遠心法¹⁴⁾にて分離採取した単核細胞 $2 \times 10^6/\text{ml}$ に $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ *Dermatophagoides farinae* (Df, 鳥居)あるいは $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ovalbumin (OVA, Sigma) を添加し、無血清加 RPMI1640 にて 37°C あるいは 4°C にて16時間培養した後3回洗浄して抗原を除去し、さらに2日間あるいは5日間、 37°C 又は 4°C にて培養して得た上清 0.1ml を被験者の前腕腹側に皮内注射して、それぞれの経時的経過を発赤の mean diameter にて評価した (Table 1).

2) 抗原刺激リンパ球の IL2 反応性の測定¹³⁾

比重遠心法にて分離、採取した $1 \times 10^6/\text{ml}$ の単核細胞に $10\text{g}/\text{ml}$ Df を添加し、 5ml 培養チューブ (Falcon) にて5日間培養したのち、96穴平底マイクロプレート (マックス) に細胞数が $2 \times 10^5/150 \mu\text{l}/\text{穴}$ になるように調製して分注したのち、あるいは培養チューブ中で沈んでいる細胞を底にのこして培養液を捨て、さらに二次培養の為に培養液を一定量添加してよく攪拌後4等分し、その2等分ずつを96穴平底マイクロプレート (マックス) に分配したのち、2穴に 0.1 units recombinant IL2 (タケダ) を添加して IL2 非添加群と共にさらに3日間培養したのち、LSQ Medium [lysing staining quencing medium: 2倍希釈 PI stock 液 ($1\text{mg}/\text{ml}$

propidium iodide in 4.9% EDTA; シグマ) 1.5ml , EDTA 液 (4.9% pH 7.0; 和光純薬) 7.5ml , Triton X-100 (8% v/v; 和光純薬) 1.5ml , 2^{10} 希釈 drawing ink (LEIZ) 0.1ml から成る] を $50 \mu\text{l}$ 添加後遠心し 37°C , 30分間静置したのち顕微光度計 (ZEISS, MPM-03) を用いて各穴中の検体の蛍光を測定することにより生細胞数を定量し、IL2 添加群と比較することにより以下のごとく IL2 反応性 (S.I.) を評価した.

IL2 反応性 (stimulation index: S.I.) =

$$\frac{\text{IL2 添加時色素量} - \text{細胞非添加時色素量}}{\text{IL2 非添加時色素量} - \text{細胞非添加時色素量}}$$

3) 成績の評価

得られた成績は対照と比較することにより two-tailed Student's t-test により検定した. IL2 反応性 (SI) は抗原刺激をしない群と比較して統計学的に有意のものを陽性とした. また, IL2 反応性 (SI) の疾患 (抗原) 特異性は健康者群と比較して有意に高いものを陽性とした.

結 果

1) ダニ抗原刺激リンパ球培養上清による皮膚反応の誘導

皮膚反応に用いる培養上清の採取条件を検討する為に、ダニアレルギー陽性群において、ダニ抗原刺激を 37°C で処理して得た上清と、 4°C で処理した上清とを比較したところ、 37°C の上清では注射後約15分で発赤を認め、5~6時間後徐々に拡大し、約24時間継続したが、 4°C の上清では発赤を認めなかった (Fig. 1). よって 37°C 処理にて採取した上清を用いた場合、皮膚テストで認められた発赤は上清に混入した可能性が考えられるダニ抗原自身によるものではなく、ダニ抗原で刺激されたリンパ球から産生される因子によるものであることが示唆された. Fig. 2 にダニアレルギー陽性群に各条件で採取した培養上清を皮内注射したのち約15~20分経過後の皮内反応を示した. ダニ抗原刺激後 37°C にて2日間培養して採取した上清と、5日間培養して採取した上清では、共に発赤を認めた. よって、今回の検査ではダニ抗原刺激後 37°C にて2日間培養した上清を用いて検討した. また、ダニ抗原のみに感作されている個体では、対照抗原である卵白アルブミン刺激で採取した上清、及び抗原刺激なしで採取した上清を皮内注射した場合は、いずれも発赤を認めなかつ

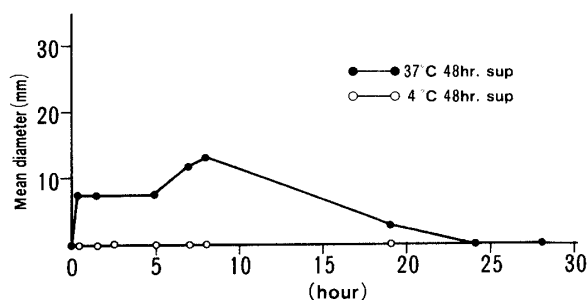


Fig. 1. Supernatants from culture of Df-pulsed lymphocytes at 37°C are capable of inducing skin reaction, but not at 4°C. The result showed a representative experiment.

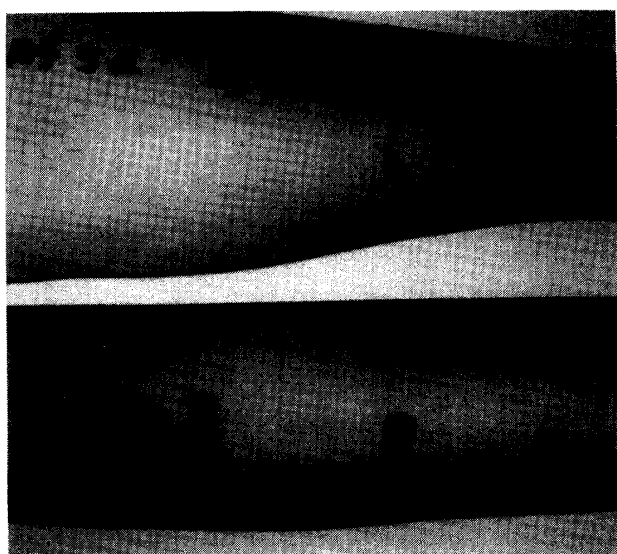


Fig. 2. Skin reaction(s) by culture supernatant (s) from antigen-stimulated lymphocytes. Culture supernatant(s) from lymphocytes was intracutaneously injected into autologous donor's fore arm. Df-stimulated lymphocytes cultured at 37°C but not 4°C from mite-sensitized atopic individuals such as bronchial asthma induced erythema. The inflammation was at its peak approximately after 20 min. Supernatant of OVA-stimulated lymphocytes was incapable of inducing such reaction.

た。また、Fig. 2に示すように、4°Cで処理した上清の場合にも発赤を認めなかった。次にダニ抗原に感作されていない陰性群において各上清の皮内試験を検討したところ、抗原非刺激で採取した上清でも軽度の発赤を認めた (Fig. 3)。ダニ抗原で刺激後採取した上清では、その mean diameter は軽度増加する症例が存在したが、stimulation index は1.5以下と低値を示した

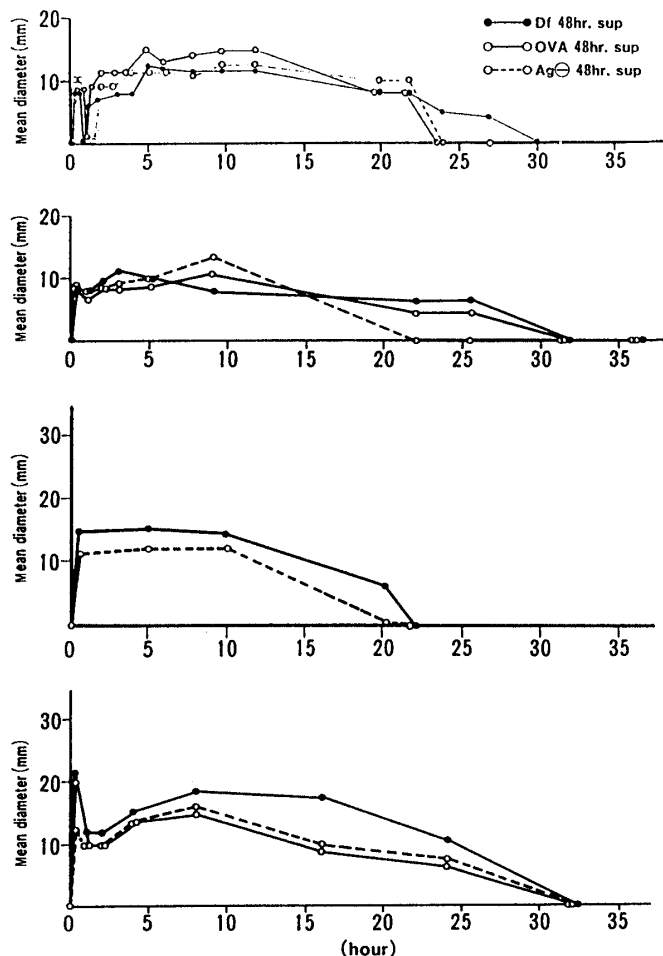


Fig. 3. Skin reaction(s) by culture supernatant (s) from Df-stimulated normal lymphocytes.

Data showed 4 independent experiments using 4 independent subjects. Df; culture supernatant(s) from *Dermatophagoides farinae* (Df)-stimulated lymphocytes, OVA; culture supernatant(s) from ovalbumin(OVA) stimulated lymphocytes, Ag; culture supernatant(s) from unstimulated lymphocytes.

(Fig. 3). また、対照として用いた卵白アルブミンで刺激した後採取した上清においては、非刺激のものと比較して有意差を認めなかった。次に、ダニ抗原陽性でアレルギー症状をもつ群について検討したところ、抗原非刺激時の上清に比較してダニ抗原で刺激したリンパ球の培養上清で、有意の皮膚反応の陽性を認めた (Fig. 4)。その経時的变化は、注射後15~20分後に一過性に認められる反応と、1~2時間後から開始し5~6時間後に徐々に拡大し、24~48時間、時には60時間まで継続して認められる反応からなっていることが想定され、症例によって両者の反応が複合され二相性

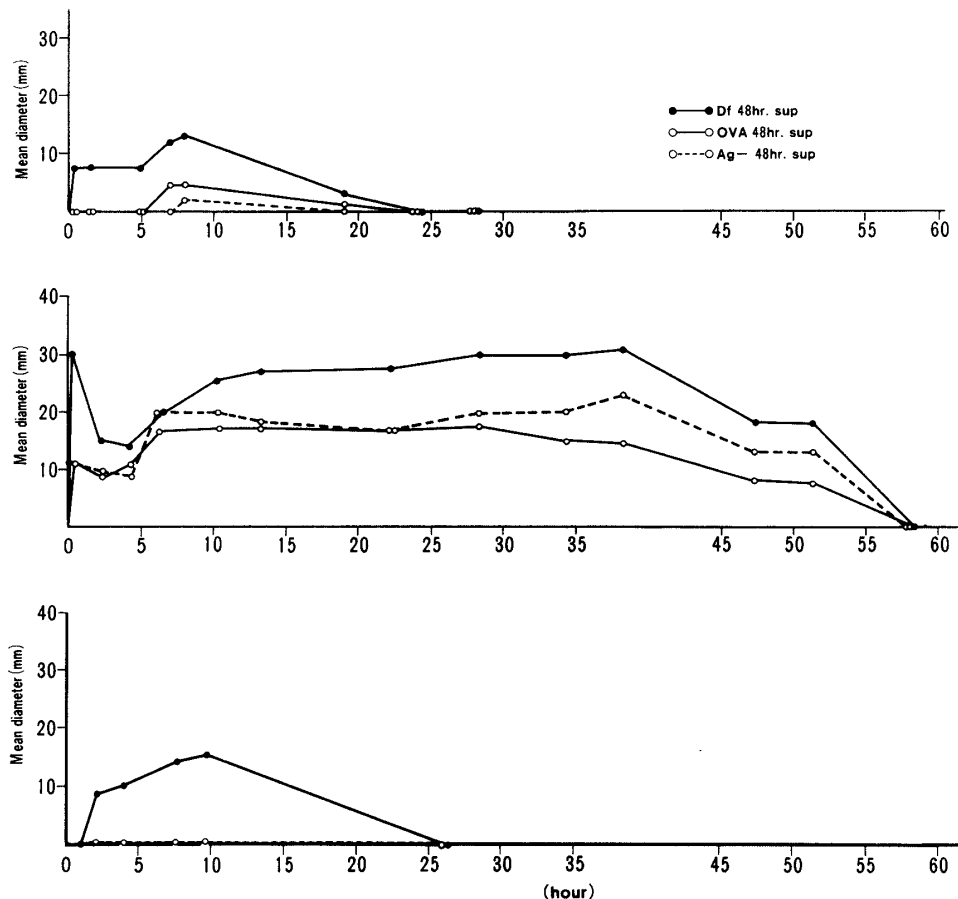


Fig. 4. Skin reaction (s) by culture supernatant(s) from Df- stimulated lymphocytes allergic to mite antigen. Data showed 3 independent experiments using 3 independent patients.

Df; culture supernatant (s) from *Dermatophagoides farinae* (Df)-stimulated lymphocytes, OVA; culture supernatant (s) from ovalbumin (OVA)-stimulated lymphocytes, Ag-; culture supernatant(s) from unstimulated lymphocytes.

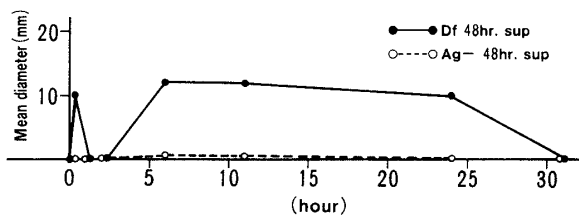


Fig. 5. Skin reaction(s) by culturesupernatant (s) from Df-stimulated lymphocytes obtained from a subclinical patient.

Df; culture supernatant(s) from *Dermatophagoides farinae*(Df)-stimulated lymphocytes, Ag-; culture supernatant(s) from unstimulated lymphocytes.

の反応であることが明瞭なもの、複合されているが、両者の反応が融合しその境界が不明瞭なもの、あるいは

は後者反応のみからなっているものなどが存在した。後者の遅発型反応は全症例に共通していると考えられたが、これらのダニ抗原陽性群で見られる反応の経時的变化は、基本的には健康者でも同様に認められるものであったが、患者群ではその反応は大きくダニ抗原による stimulation index の増加は有意であった。また、対照抗原である卵白アルブミン刺激後採取した上清の皮膚テストにおいては非刺激時の上清と比較して、有意な皮膚反応は認められなかった。現在は明瞭なアレルギー症状を認めないが、ダニ抗原に感作されている個体においても反応は二相性で、抗原で刺激しない上清と比較して、ダニ抗原で刺激した上清の場合の mean diameter は大きかった(Fig. 5)。よって、ダニ抗原のみに感作されている個体においては、ダニ抗原で刺激して得られたリンパ球の培養上清中に、有意

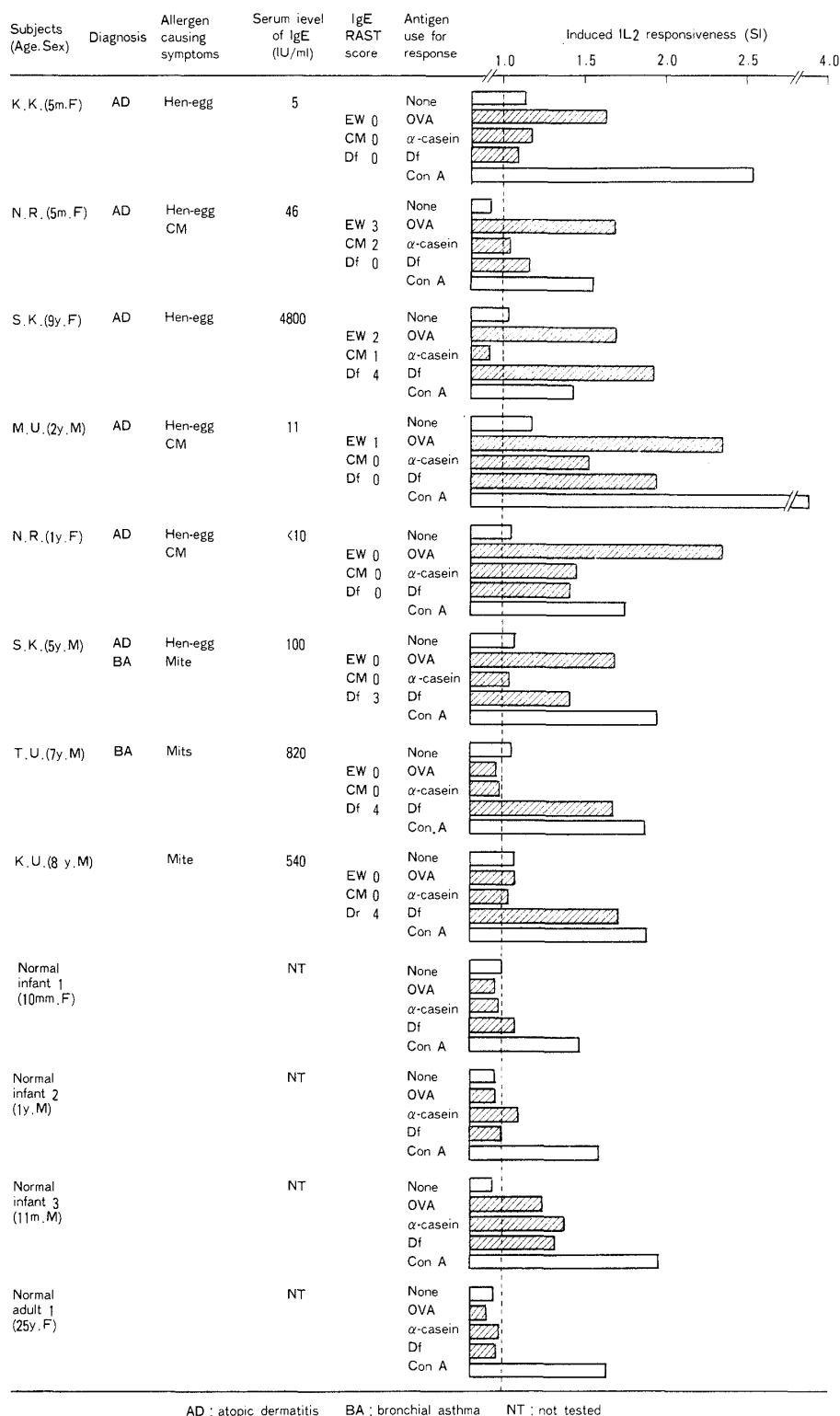


Fig. 6. Induced IL2 responsiveness of patient lymphocytes stimulated with allergen was specific for antigen.

な皮膚反応を誘導する因子が含まれていることが推察された。

2) ダニ抗原刺激リンパ球の IL2反応性及びその培養

上清による皮内反応誘導の比較検討

in vitro におけるリンパ球の抗原特異的 IL2反応系とその培養上清による皮内反応系の誘導を比較検討し

Table 2 Relationship between skin reaction and IL2 responsiveness

Subject	Df-sensitization	Antigen	Skin reaction (mm)		IL2 responsiveness (m±SE)
			Immediate max(S.I)	Delayed max(S.I)	
K. Y.	—	None	9.0	13.5	0.98±0.03
		Df	8.5(0.94)	11.0(0.81)	1.10±0.07
I. M.	—	None	15.0	16.0	1.01±0.02
		Df	21.5(1.43)	18.5(1.16)	1.05±0.03
Y. K.	—	None	12.5	12.5	1.08±0.06
		Df	15.5(1.24)	15.5(1.24)	1.11±0.04
T. N.	—	None	10.5	12.5	0.97±0.02
		Df	8.0(0.76)	12.0(0.96)	1.14±0.01
Y. I.	+	None	0.0	0.5	1.10±0.06
		Df	3.5	12.0(24.00)	1.18±0.10
N. T.	+	None	0.0	2.0	1.02±0.03
		Df	7.5	14.0(7.00)	1.53±0.05
M. Y.	+	None	11.5	23.0	1.17±0.05
		Df	30.0(2.61)	31.0(1.35)	1.38±0.06
I. K.	+	None	0.0	0.0	0.91±0.02
		Df	0.0	15.0(>15.0)	2.08±0.04

Df: *Dermatophagoides farinae*, SI: stimulation index, m: mean, SE: standard error, IL2: interleukin 2.

た。既に報告したとおり、ダニ抗原のみに陽性の患者では、ダニ抗原刺激により、リンパ球の IL2 反応性が誘導されたが、卵白アルブミンで刺激してもその反応性は誘導されなかった (Fig. 6)。また、卵アレルギーのみの患者では、卵白アルブミンで刺激した場合、IL2 反応性が誘導されたが、ダニ抗原で刺激してもその反応性は誘導されなかった (Fig. 6)。一方、非アトピー健康人のリンパ球はダニ抗原あるいは卵白アルブミンで刺激しても IL2 反応性の誘導を認めなかった (Fig. 6)。よって、ダニ抗原などのアレルゲンにより誘導されるこれらの IL2 反応性は、抗原特異的であると考えられた。このリンパ球の抗原特異的 IL2 の反応系と皮内反応系を比較した。皮内反応を、抗原非刺激時の上清を用いた場合に認められる発赤の mean diameter に対するダニ抗原刺激時の mean diameter の比 stimulation index (S.I.) で評価した場合、ダニ抗原に感作されていない陰性群では in vitro におけるダニ抗原特異的 IL2 反応性の誘導を認めなかった。皮内反応の S.I. も 1.5 以下と低値を示した (Table 2)。ダニ抗原に感作されており現在症状を認める群においては、皮内反応の S.I. は 7.0 あるいは 15.0 と高値、あるいは mean diameter が他の検査と比較して著しく大きかった。一方ダニ抗原特異的 IL2 反応性は有意に認められた (Table 2)。また、ダニ抗原に感作されているが過去に症状を認め現在は症状を認めない個体においては、皮

内反応は S.I. が 24.0 と高値を示した。ダニ抗原特異的 IL2 反応性は誘導されなかった。以上の結果より、in vitro におけるリンパ球のダニ抗原刺激により誘導される IL2 反応性は、その培養上清による皮内反応の誘導を反映していると考えられた。以上よりこれらの IL2 反応系は in vivo における抗原特異的アレルギー反応を示唆する in vitro の反応系である可能性が示唆された。この in vitro における反応系は、アレルギーの病因抗原の検索に有用な方法であることを裏付けるものと考えられた。

考 察

細胞性免疫の成立に従ってリンパ球より分泌される因子としては、従来より、migration inhibitory factor (MIF)¹⁵⁾ や skin reactive factor (SRF)¹²⁾¹³⁾ が知られている。後者ではこれらの作用因子が単一因子かリンホカインの総合的反應結果か不明な点が多い⁴⁾。現在では細胞性免疫の成立に従ってリンホカインカスケードを形成して誘導されるアレルギー反応系がよく研究されている。即ち、抗原暴露をうけた感作 T 細胞は抗原を認識して抗原特異的に多くのリンホカインを生成し遊離する^{5)~8)}。これらの因子は非特異的にマクロファージやリンパ球その他の標的細胞に作用して細胞

性免疫反応が発現することが知られている。MIF 検査は生体における遅延型アレルギーの成立を知る検査法として古くから知られているが、生体内における感作 T 細胞の *in vitro* の証明として我々は独自の検査法を確立した^{9)~13)}。

即ち、ダニ抗原に感作されている気管支喘息患児の末梢血リンパ球を Df で刺激を加え培養すると、IL2 に対する感受性を獲得してリンパ球は増殖すること、この *in vitro* の反応系は、アレルギー疾患における病因抗原の検索や病勢の把握に重要であることを報告した^{9)~11)13)}。これらの培養リンパ球は、みずから IL2 に反応することにより増殖し、IL4、IL5 などのリンホカインを産生し I 型アレルギーの主体をなす IgE 産生系を補助する一方、さらに IL3、IL4 を産生することにより肥満細胞を分化増殖させ、また一方遅延型アレルギー反応を惹起するヘルパー T 細胞を誘導することによりアレルギー反応と深く関わっている^{5)~8)}。これらのダニ抗原で活性化されたリンパ球の生体内における生物学的あるいは臨床的な作用は、ヒトにおける *in vivo* の系ではこれまで十分な成績が得られていない。我々は、ダニ抗原で刺激したリンパ球の培養上清を用いて、自己の前腕にこれらの上清を皮内注射することによりダニ抗原で誘導される活性化 T 細胞の作用について検討を加えた。健康者の場合、皮内テストは *meandiameter* が 1.5mm 以下と低値であったが、ダニ抗原で感作された患者の場合、有意な皮膚反応の陽性を認めた。抗原非添加の場合にも皮膚反応は陽性を示したことから、患者ではすでに生体内でリンパ球は活性化されていることが示唆されたが、*in vitro* で再刺激した場合にその反応は大きかった。また、卵白アルブミンのような他の抗原で再刺激をしても、反応の増強は認められなかったことから、これらの反応はダニ抗原に特異的な反応であると考えられた。これは反応の経時的パターンは、注射後 15~20 分後に一過性に認められる即時型反応と 1~2 時間後から開始し、5~6 時間に徐々に拡大し 24~48 時間、場合によっては 60 時間まで継続して認められる遅発型、遅延型の反応から構成されていると考えられたが、後者の反応は全症例において共通して認められる反応であった。症例によって、両者の反応が複合され二相性の反応であることが明瞭なもの、複合されているが、両者の反応が融合しその境界が不明瞭なもの、あるいは後者の反応のみからなっているものなどが存在した。それぞれの反応形式の頻度は、今後症例数を増やして検討する必

要があると考えられた。これらのダニ抗原陽性群でみられる反応の経時変化は、基本的には健康者でも同様に認められるものであったが、患者群ではその反応は一般に大きくダニ抗原による *stimulation index* の増加は有意であった。

しかしながら、抗原刺激の有無にも拘わらず健康者リンパ球由来の上清によっても有意な皮内反応が認められ、しかもそれは患者の場合よりも強い場合が認められた。生体はアレルゲンをはじめとするあらゆる外来抗原に反応し、症状発現に至らなくとも免疫担当細胞は種々の炎症性サイトカインを分泌することが想定されるが、個人によりその反応の程度は異なると考えられる。反応そのものの大きさは必ずしもアレルギー反応の大きさを示すものではなく、臨床的には特異抗原刺激による場合の *stimulation index* が重要であると考えられた。ダニ抗原を吸収した患児では一般に吸入後約 20 分で気道の平滑筋の収縮を伴う即時型アレルギー反応が惹起され、引続き 5~6 時間後から遅発型の気道反応が誘導されるようになる。あるいは前者後者のどちらかの気道反応が誘導される。これらの気道反応の誘導は、前者は IgE を主体とする I 型アレルギー反応によって誘導されるが、後者の遅発型反応は、III 型、IV 型の機序も考えられ、最近ではサイトカインに誘導される好酸球の働きによることも注目されている¹⁶⁾。今回報告したダニ抗原刺激リンパ球の培養上清の皮内反応の経時的変化が、ダニ抗原誘発気道反応の即時型反応と遅発型反応からなる二相性パターンと類似していたことは興味深いことであると考えられた。即時型皮内反応はおそらく、培養上清に含まれる化学伝達物質によるものであると推察されたが、遅発型皮膚反応は、培養上清に含まれる因子が、生体内で好酸球やリンパ球などの細胞を活性化させることによって誘導されたものであることが示唆された。これらの培養上清の因子は従来より存在する SRF^{11)~14)}と同類の概念と考えられるが、どのような細胞がどのような機序で誘導されたのかは *in vitro* の解析を含め今後詳しい検討をまつ必要があると考えられた。ダニ抗原刺激により得られた培養上清の皮内反応が陽性であった個体では、そのリンパ球の IL2 に対する感受性が亢進し、ダニ抗原特異的 IL2 反応性が陽性であったことは、今回の報告において注目すべき点であると考えられた。皮内反応が陽性であるにもかかわらず、アレルギー症状が明瞭でない症例でダニ抗原で誘導される IL2 反応性が認められないものがあったが、IL2 反応

性が病勢の把握に有用である⁹⁾⁻¹³⁾観点から考え合わせると、アレルギー症状の発現に至っていない症例では、皮内反応などの *in vitro* の反応はその感受性が高く陽性となるにもかかわらず、*in vitro* の反応系では、その反応が誘導されない可能性があることを示唆していると考えられた。*in vivo* と *in vitro* におけるこれらの検査において臨床的意味合いからその差異が存在すると考えられたが、ダニ抗原で誘導されるリンパ球の IL2 の反応性の獲得は、*in vivo* の細胞性免疫の成立、即ち、*in vivo* においてダニ抗原による即時型あるいは遅発型反応を反映している可能性があると考えられた。この *in vitro* の検査法は病因抗原の検索あるいは病勢の把握に有用であるが⁹⁾⁻¹³⁾、*in vivo* における皮内反応と IL2 反応性検査の相関は *in vitro* における IL2 反応性検査の有用性を支持していると考えられた。

文 献

- 1) Pick, E., Krejci, J. and Turk, J.L.: Release of skin reactive factor from guinea-pig lymphocyte by mitogens. *Nature* 225, 236-239, 1970.
- 2) Altman, L.C.: Chemotactic lymphokines. A review. "Leukocyte Chemotaxis: Methods, Physiology, and Clinical Implications" (ed by J.I. Gallin and P.G. Quee), Academic Press, New York, pp.267-287, 1978.
- 3) Bennett, B. and Bloom, B.R.: Reactions *in vivo* produced by a soluble substance associated with delayed-type hypersensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56, 756-762, 1968.
- 4) Adelman, N.E., Hammond, M.E., Cohen, S. and Dvorak, H.F.: Lymphokines as inflammatory mediators. "Biology of the Lymphokines" (ed by S. Cohen, et al.), Academic Press, New York, pp.13-58, 1979.
- 5) Yokota, T., Arai, N., de Vries, J., Spits, H., Banchereau, 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, 137-151, 1988.
- 6) Mosmann, T.R. and Coffman, R.L.: TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* 7, 145-173, 1989.
- 7) Finkelman, F.D., Holmen, J., Katona, I.M., Urban, J.F. Jr., Beckmann, M.P., et al.: Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype selection. *Ann. Rev. Immunol.* 8, 303-330, 1990.
- 8) Romagnani, S.: Regulation and deregulation of human IgE synthesis. *Immunol. Today* 11, 316-321, 1990.
- 9) Noma, T., Yoshizawa, I., Kawano, Y., Itoh, M., Baba, M. and Yata, J.: Allergen-induced IL2 responsiveness in lymphocytes from patients with atopic dermatitis and/or bronchial asthma: Its chronological change and clinical significance. *Jpn. J. Allergol.* 36, 1075-1085, 1982.
- 10) Yoshizawa, I., Noma, T., Kawano, Y. and Yata, J.: Allergen specific induction of IL2 responsiveness in lymphocytes from children with asthma. I. Antigen specificity and initial events of the induction. *J. Allergy Clin. Immunol.* 84, 246-255, 1989.
- 11) Noma, T., Yoshizawa, I., Maeda, K., Ichikawa, K., Baba, M. and Yata, J.: Allergen specific induction of IL2 responsiveness in lymphocytes from children with asthma. II. Regulation of IL2 responsiveness by supernatants of normal lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 84, 255-262, 1989.
- 12) Noma, T., Kawano, Y., Yoshizawa, I., Mukouyama, T., Baba, M. and Yata, J.: Ovalbumin antigen specific induction of IL2 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.
- 13) 野間 剛, 吉沢いづみ, 中村 靖, 川野 豊, 中島 忠, 他: PI 蛍光色素を用いたヒト末梢血リンパ球の抗原特異的 IL2 反応性の迅速測定とアレルギー性疾患における病因抗原の検索. *アレルギー* 41, 1354-1366, 1992.
- 14) Boyum, A.: Separation of lymphocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21, 31-50, 1968.
- 15) George, M. and Vaughan, J.H.: *In vitro* cell migration as a model for delayed hypersensitivity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111, 514-521, 1962.
- 16) 牧野荘平: "気管支喘息; 好酸球" (牧野荘平, 石川 哮 編), 国際医学出版, 東京, pp.181-194, 1991.

SKIN REACTION(S) TO CULTURE SUPERNATANT(S) FROM *DERMATOPHAGOIDES FARINAE*
(Df)-STIMULATED LYMPHOCYTES, AND THEIR CORRELATION WITH
Df-INDUCED INTERLEUKIN 2 RESPONSIVENESS BY LYMPHOCYTES
FROM PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

Takeshi Noma¹⁾, Izumi Yoshizawa¹⁾²⁾, Yutaka Kawano¹⁾, Kazuhichi Maeda¹⁾, Kunio Ichikawa³⁾,
Kouichi Yamaguchi³⁾, Minoru Baba³⁾ and Junichi Yata⁴⁾

*Department of Pediatrics, ¹⁾Saitama Medical School, ²⁾Moro Hospital, ³⁾Doai Memorial Hospital and
⁴⁾Tokyo Medical and Dental University*

To investigate the inflammatory function of *Dermatophagoides farine* (Df)-activated lymphocytes, supernatants from cultures of the lymphocytes were intracutaneously injected into donors' forearms. Injection of the supernatants of Df-stimulated lymphocytes from mite-sensitized atopic individuals with such diseases as bronchial asthma induced a profound inflammatory reaction in the autologous skin, characterized by erythema extending more than 15 mm in mean diameter and edema. The inflammation was at its peak after approximately 20 min, which was followed by gradually re-growing erythema lasting for as long as 24 hours after injection. Supernatants of unstimulated lymphocytes were also capable of inducing the same reaction, indicating the presence of in vivo activated lymphocytes, although the extent of the response was always smaller. The induced response in normal individuals was erythema of less than 15 mm in mean diameter. The supernatants obtained from cultures at 4°C failed to induce such inflammation. The culture supernatants of ovalbumin-restimulated lymphocytes were also incapable of augmenting the response. The combined data show that the production of inflammatory response-inducing factor(s) from Df-stimulated lymphocytes was antigen specific. Significant skin reactions was correlated with the IL2 responsiveness of Df-stimulated lymphocytes. The skin reaction induced by factor(s) derived from Df-stimulated lymphocytes, which might be similar to the bronchial hyperreactivity of patients with bronchial asthma. The in vitro assay for Df-induced IL2 responsiveness by lymphocytes might reflect the in vitro immediate, late and/or delayed type hypersensitivity.
