

小児アトピー患者末梢血リンパ球のダニアレルゲン誘発細胞増殖の フローサイトメトリーによる測定とその意義

静岡県立こども病院感染免疫アレルギー科

木村光明 鶴田 悟 吉田隆実

3歳以上の小児アトピー患者の末梢血単核球をダニアレルゲンで刺激し反応性に増殖する細胞の比率をフローサイトメトリーで測定した。増殖の程度を刺激指数 (S.I.F.: stimulation index measured by flow cytometry) で表わすと、アトピー児14名のダニ S.I.F. 値は 165.6 ± 49.8 と非アトピー児6名のダニ S.I.F. 値 113.2 ± 12.2 より有意に高値であった ($p < 0.05$)。ダニ S.I.F. 値と血清総 IgE 値との間には密接な正相関が認められ ($r = 0.67$, $p < 0.001$)、またダニ IgE-RAST 高度上昇群 (100PRU/ml 以上) のダニ S.I.F. 値は 178.4 ± 53.8 とダニ IgE-RAST 陰性群の 113.2 ± 12.2 に比べ有意に高値であった ($p < 0.02$)。ダニ S.I.F. 値にはダニアレルゲン特異的 IgE 抗体産生系の機能亢進状態が反映されており、アトピー患者におけるリンパ球機能異常の指標として利用できる可能性がある。

Key words: allergen — atopic disorders — flow cytometry — house dust mite — lymphocyte proliferation

はじめに

IgE はアトピー疾患発生の最も重要な因子の一つであり、アトピー患者ではその産生が亢進している。近年 IgE 抗体の産生はサイトカインによる直接的なコントロール下にあることが明らかにされた。インターロイキン 4 (IL4) は B 細胞による IgE 産生を増加させ、逆にインターフェロン- γ (IFN- γ) は IgE 産生を抑制する¹⁾⁻³⁾。これらのサイトカインはそれぞれ Th2 および Th1 と呼ばれるヘルパー T 細胞から特異的に分泌される⁴⁾⁵⁾。そのため、これらの細胞分画のバランスの崩れ、特に Th2 細胞の増加がアトピー疾患の発生と深く関連しているものと考えられている。実際、気管支喘息⁶⁾やアトピー性皮膚炎⁷⁾、アレルギー性鼻炎⁸⁾の病変局所では Th2 細胞が増加しており、アトピー患者の末梢血中にも Th2 細胞が増加している⁹⁾。アトピー患者ではアレルゲン特異的 IgE 抗体のみでなく

IgG 抗体も増加している¹⁰⁾。最近 IL4 は IgE のみでなく IgG1, IgG3 や IgG4 へのクラススイッチも促進するという報告があり¹¹⁾、これも Th2 細胞の増加と関連した現象である可能性がある。

アトピー患者の末梢血単核球 (PBMC) をダニアレルゲンで刺激すると強い反応性増殖が誘導されることはよく知られており、その結果主にヘルパー T 細胞が増加する¹²⁾¹³⁾。最近、アトピー患者の PBMC からダニアレルゲン刺激により誘導・樹立されるアレルゲン特異 T 細胞クローンのほとんどが Th2 細胞であることが報告された¹⁴⁾。これは、ダニアレルゲン刺激で増殖するアトピー患者末梢血ヘルパー T 細胞中には Th2 あるいはその前駆細胞が多く含まれているであろうことを示唆するものである。もしそうであれば、ダニアレルゲン誘発リンパ球増殖反応は、Th2 細胞の増加というアトピー患者の核心的免疫異常の形成に関与している可能性が高く、アトピー疾患の病理解明のためにその詳細な解析が望まれる。

現在、ダニアレルゲン誘発リンパ球増殖反応の研究は活発とは言いが、その原因の一つは増殖反応測定の困難さにあると思われる。アレルゲン刺激に対する増殖反応は通常放射性同位元素標識アミノ酸 (トリチウム・サイミジン) の取り込みにより測定されるが、放射性同位元素の取扱いは煩雑であり、またごく限られた施設でしか使用できない。

Received: March 21, 1996

Accepted: July 25, 1996

Abbreviations: Con A concanavalin A; PBMC peripheral blood mononuclear cell; PBS phosphate-buffered saline; PHA phytohemagglutinin; S.I.F. stimulation index measured by flow cytometry; S.I.W stimulation index measured by WST-1 method

細胞増殖はフローサイトメトリーによっても解析可能である¹⁵⁾。フローサイトメトリーでは個々の細胞を鑑別でき、さらに二重染色により DNA 量以外の情報も同時に分析できるという放射性同位元素法にない特長を備えている¹⁶⁾¹⁷⁾。このような利点を活用するため、われわれはダニアレルゲン刺激による PBMC の増殖反応の解析にフローサイトメトリーを応用することを試みた。その結果フローサイトメトリーによりダニアレルゲン誘発細胞増殖が測定可能であり、その値はダニ IgE-RAST 値や血清 IgE 値と比例して上昇していることが明らかになった。フローサイトメトリーによるアレルゲン誘発細胞増殖測定法はアトピー患者の免疫異常の研究法として有用と思われるのでここに報告する。

対象と方法

1. 対象

3 歳から 15 歳の小児アトピー患者 14 名および非アトピー小児 6 名を対象とした (Table 1)。アトピー患者の構成は気管支喘息 9 名およびアトピー性皮膚炎 5 名であり、いずれも入院歴があるかそれに準ずる中等症または重症の患者である。非アトピー対照は免疫・アレルギー・血液系疾患をもたず、かつ急性感染・炎症性疾患に罹患していない小児を対象とした。

2. 細胞培養

静脈血を 5ml ヘパリン採血しリンパ球分離液 (ナカライ) 上に重層、遠心分離により PBMC を得た。燐酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄後、10% ウシ胎児血清 (FCS), 2mM グルタミンおよび抗生物質 (ペニシリン 100U/ml, ストレプトマイシン 100 μ g/ml) を含む RPMI1640 培養液に 1×10^6 cells/ml となるように浮遊させた。48 穴カルチャープレート (ファルコン 3078, Becton Dickinson Labware, NJ., USA) に 0.5ml/穴ずつ細胞浮遊液を注入し、10 μ l のダニアレルゲン液または対照液 (PBS) を加えて所定の時間培養器 (37°C, 5% CO₂) で培養した。ダニアレルゲン (Der f) 凍結乾燥粉末は鳥居薬品から提供されたものを使用し、通常の培養には 50 μ g/ml の濃度で使用した。

3. ヨウ化プロピディウムによる DNA 染色

培養終了後 PBMC を 12 $\times$ 75mm のガラス管 (Corning, NY, USA) に移し 2 回 PBS で洗浄した後、攪拌しながら -20°C に冷却した 70% エタノール 600 μ l を加

Table 1 List of subjects

Subjects	No	Age (y)	Sex	Disorders	IgE (IU/ml)	IgE-RAST* (PRU/ml)
Non-atopic	1	3	f		77	0.22
	2	3	m		55	0.16
	3	5	f		231	0.22
	4	6	f		30	0.19
	5	10	m		119	0.13
	6	12	m		60	0.19
Atopic	1	3	m	AD	7092	>100
	2	4	m	BA	2913	>100
	3	4	f	BA	624	>100
	4	4	m	AD	671	19.33
	5	4	m	BA	585	93.16
	6	5	m	BA	415	70.81
	7	7	m	AD	7095	>100
	8	8	f	BA	1064	>100
	9	9	m	BA	6013	93.2
	10	9	m	BA	3388	>100
	11	11	m	BA	745	92.07
	12	12	f	BA	1052	99.54
	13	13	f	AD	6635	>100
	14	14	f	AD	5985	>100

*: IgE-RAST levels for house dust mite Der p.

AD: atopic dermatitis, BA: bronchial asthma.

え一晩 4°C に静置して固定した。固定後、PBS で 2 回洗浄し RNA を取り除くため 100 μ g/ml の RNase を含む PBS250 μ l に浮遊させ 37°C に 1 時間静置した。PBS250 μ l を加え計 500 μ l の細胞浮遊液とし 40 μ g/ml となるようにヨウ化プロピディウム (Sigma Chemical Company, MO, USA) を加えて 1 時間静置した。その後フローサイトメトリー (EPICS-CS, Coulter Corporation, FL, USA) で個々の細胞が発する赤色蛍光強度を測定し、S 期に相当する細胞の比率を記録した。サンプルは同一条件で 2 つずつ作製しその平均値を解析に用いた。

4. 生細胞絶対数の測定

9 人のアトピー患者 (No. 2, 6~8, 10~14) を対象にダニアレルゲン刺激による生細胞数の変動を WST-1 色素を利用した生細胞数測定キット (cell counting kit, 同仁化学研究所) を用いて評価した。96 穴のカルチャープレート (ファルコン 3072) に上述の細胞浮遊液 (1×10^6 cells/ml) を 90 μ l/穴ずつ分注し、

10 μ l のアレルゲンまたは対照液を加えた後 7 日間培養した。ダニアレルゲン濃度は 50 μ g/ml とした。WST-1 試薬を 10 μ l/穴ずつ加えさらに 37°C で 2～4 時間インキュベートして発色させ吸光度測定装置 (Immuno Mini NJ2300, 日本インターメッド) で 405nm の波長の吸光度を測定した。同じ条件のサンプルを 3 つずつ作りその平均値を解析に用いた。

S.I.W. (stimulation index measured by WST-1 method) = (刺激サンプルの吸光度/非刺激サンプルの吸光度) $\times$ 100

5. その他

血清 IgE 値は RIST 法でダニ (Der p) アレルゲン特異的 IgE 量は IgE-RAST で測定した。差の有意性は t-test で検定し、 $p < 0.05$ のとき有意とした。

結 果

1. S 期細胞比率の測定と刺激指数への変換

フローサイトメトリーで個々の細胞に含まれる DNA 量を測定しヒストグラムに表わすと Fig. 1A のようになる。concanavalin A (Con A) などの強力な細胞増殖誘導因子で刺激すると増殖細胞 (DNA 合成期 (S) + 分裂期 (G₂/M) 細胞) 比率は 10～20% 程度まで増加する。ダニアレルゲン刺激で誘発される細胞増殖は Con A に比べると弱い。Fig. 1B のように基底部を拡大すると静止期 (G₀/G₁) 細胞と G₂/M 期細胞のピークに挟まれた平坦な部分の細胞が増加しているのが確認された。

G₂/M 期細胞は G₀/G₁ 期細胞の 2 倍の DNA 量を持つが、静止期細胞が二つ会合した 2 連細胞もヒストグラム上では G₂/M 期細胞と同じ場所に現われる。2 連細胞は顕微鏡検査では 1～3% 程度存在しており、真の分裂期細胞の比率が低いと相対的にこのような偽分裂期細胞の影響が大きくなる。G₂/M 期細胞も通常は増殖細胞に含まれるものであるが偽分裂期細胞の影響を避けるため本研究では G₂/M 期細胞およびそれとヒストグラム上区別できない末期 S 期細胞は測定対象から除外した。ダニアレルゲンで刺激しても大多数の PBMC は G₀/G₁ 期にあり、これがわずかでも紛れ込むと S 期細胞の比率に大きな影響を及ぼす。したがって S 期細胞でもヒストグラム上で G₀/G₁ 期細胞と区別できない DNA 合成初期のものも測定対象から除外した。

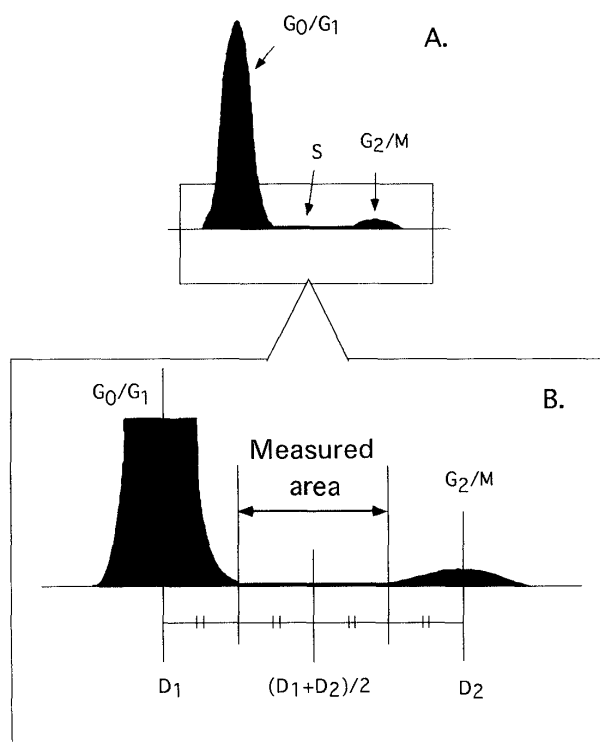


Fig. 1. Measurement of proliferating PBMC stimulated with mite allergen.

A. Schematic representation of a histogram of the amount of DNA per cell of PBMC analysed by flow cytometry. B. The area of the histogram enclosed by the rectangle in enlarged to show how the percentage of S-phase cells was measured in this study. D₁ and D₂ are the intensities of fluorescence of the G₀/G₁- and G₂/M-phase cells, respectively. The percentage of S-phase cells located in the internal two quarters of the range between the G₀/G₁- and G₂/M-phase cells was measured as the S-phase cells.

具体的な測定範囲の決定法を Fig. 1B に示す。すなわち G₀/G₁ 期細胞のピークと G₂/M 細胞のピークの間を 4 等分し、両端を捨て、中央の 2 分画中に現われる細胞の比率を測定した。要点は中央の平坦でバックグラウンドの少ない部分に現われる中等度に DNA 合成の進んだ S 期細胞のみ測定することであり、もしこのようにして定めた測定範囲が G₀/G₁ や G₂/M 期細胞の端の斜面と重なるようなら測定範囲の幅は変えずに左右にずらして微調整する。ただし対になっている非刺激サンプルと刺激サンプルは同じ条件で測定する。

S 期細胞 (S-phase cells) 比率はダニアレルゲンの濃度に比例して増加し 40 μ g/ml でほぼ最大値に達す

る (Fig. 2). したがって以下の実験では $50\mu\text{g/ml}$ の濃度のダニアレルゲンで PBMC を刺激した. 非刺激サンプル中の S 期細胞比率にはかなりの個人差があり, それを吸収して多人数間での比較を可能にするため S 期細胞比率を刺激指数 (S.I.F.: stimulation index measured by flow cytometry) に変換した.

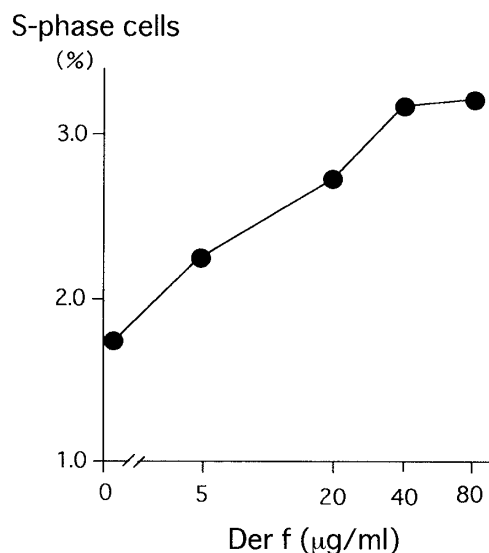


Fig. 2. Dose-response curve of the percentage of S-phase cells in PBMC stimulated with mite allergen.

The percentages of S-phase cells in PBMC were measured as described in Fig. 1 after incubation with various concentrations of mite allergen Der f for 6 days.

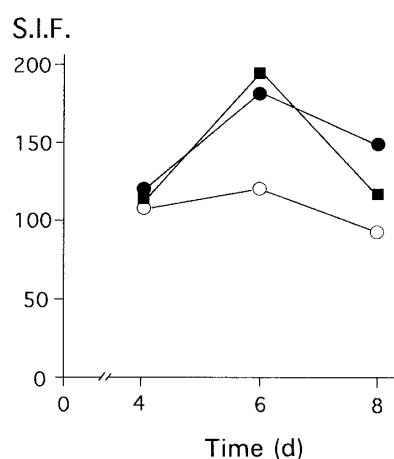


Fig. 3. Time course of S.I.F. of PBMC stimulated with mite allergen.

S.I.F.s of PBMC from a non-atopic (○) and two atopic (●, ■) subjects were measured after incubation with $50\mu\text{g/ml}$ Der f for the indicated periods.

S.I.F. = (アレルゲン刺激サンプル中の S 期細胞比率 / 非刺激サンプル中の S 期細胞比率) $\times 100$

アトピー患者のダニ S.I.F. 値は培養 6 日で最大となった (Fig. 3). 非アトピー対照では培養 4 日と 6 日で大きな差がなく, アトピー患者と非アトピー対照との差は培養 6 日で最も大きくなった. したがって本研究では培養 6 日の S.I.F. 値を解析の対象とした.

2. S.I.F. 値と血清 IgE 値との相関

血清 IgE 値は年少児で低く逆に末梢血 CD23 陽性細胞比率は年少児で高い¹⁸⁾. またダニ RAST は年少児で

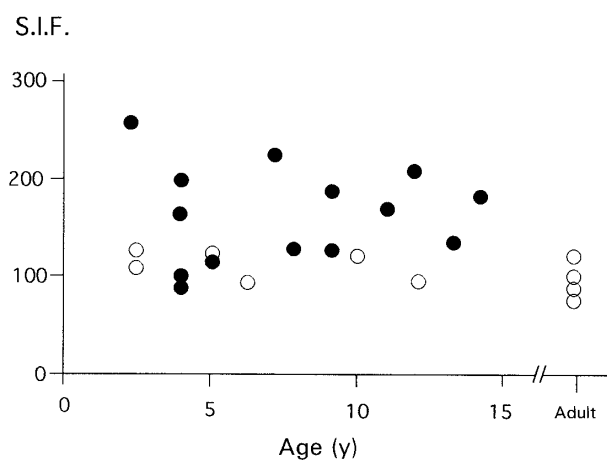


Fig. 4. Relationship of S.I.F. with age.

S.I.F.s of PBMC from atopic (●) and non-atopic (○) subjects were measured after 6d of incubation with $50\mu\text{g/ml}$ Der f and plotted against age.

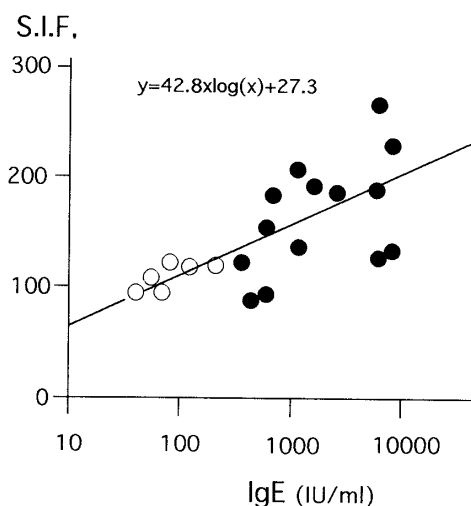


Fig. 5. Relationship of S.I.F. with the serum level of IgE.

S.I.F.s of 14 atopic (●) and 6 non-atopic (○) subjects were plotted against the serum level of IgE.

は陽性率が低い¹⁹⁾。このように年少児と年長児では免疫・アレルギーに関するパラメーターにかなりの差が認められるため、本研究では対象を3歳以上の年長児に限った。年長児ではS.I.F. 値に明らかな年齢依存性の変動を認めなかった (Fig. 4)。

ダニ S.I.F. 値と血清 IgE 値との相関を調べたところ Fig. 5 に示すように両者間に密接な正相関が認められた ($r=0.67$, $p<0.001$)。これに相応してアトピー児のダニ S.I.F. 値は非アトピー児よりも有意に高値であった (Table 2, $p<0.05$)。さらに同じアトピー患者でも IgE 値の高いものと低いものとではダニ S.I.F. 値に明らかな差が認められ、高 IgE アトピー群 ($\geq 1000\text{IU/ml}$) のダニ S.I.F. 値は非アトピー児より有意に高い ($p<0.01$) のみならず、低 IgE アトピー群 ($<1000\text{IU/ml}$) のダニ S.I.F. 値は非アトピー児と有意な差はなかった。高 IgE アトピー群は4名のアトピー性皮膚炎患者 (IgE=6702+454IU/ml) と5名の気管支喘息患者 (IgE=2886+1828IU/ml) で構成されているが、両者のダニ S.I.F. 値は 204.2 ± 50.7 および 171.4 ± 32.8 と有意な差を認めず、また両者ともに非アトピー群のダニ S.I.F. 値より有意に高値であった (両者とも $p<0.01$)。

3. S.I.F. 値と IgE-RAST 値との相関

ダニ S.I.F. 値はダニ特異的な反応の指標であり、一般的な IgE 抗体産生よりむしろダニ特異 IgE 抗体の産生調節により密接な関連があるものと推測される。実際、ダニ IgE-RAST 値が高い児ではダニ S.I.F. 値も高値を示す傾向がみられた (Fig. 6)。ダニ IgE-RAST 高度陽性群 (100PRU/ml 以上) のダニ S.I.F. 値は

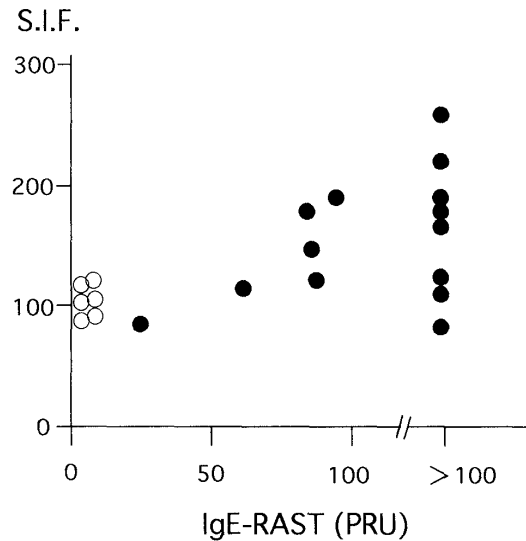


Fig. 6. Relationship of S.I.F. with the IgE-RAST level for Der p.

S.I.F.s of 14 atopic (●) and 6 non-atopic (○) subjects were plotted against IgE-RAST levels for Der p.

178.4 ± 53.8 であり、ダニ IgE-RAST 陰性群の 113.2 ± 12.2 に較べ有意に高かった ($p<0.02$, Table 3)。ダニ IgE-RAST 軽・中等度陽性群 (0.35~99.9PRU/ml) のダニ S.I.F. 値は 148.5 ± 37.6 と、ダニ IgE-RAST 陰性群のダニ S.I.F. 値より高値であったが有意な差ではなかった ($p<0.10$, Table 3)。

4. S.I.F. 値と生細胞絶対数との関係

最後に S.I.F. 値によって測定される S 期細胞比率の増加と生細胞数との関係について検討した (Fig. 7)。生細胞数は WST-1 色素法により測定した。WST-1 色

Table 2 S.I.F. in atopic and non-atopic subjects

Subjects		n	S-phase cells (%)		S.I.F.
			Non-stimulated	Stimulated	
Non-atopic		6	1.40 (1.08~3.62)	1.69 (1.05~4.10)	113.2 ± 12.2
Atopic	whole	14	1.01 (0.65~3.08)	1.57 (0.89~4.76)	$165.6\pm 49.8^*$
	IgE<1000	5	1.04 (0.82~3.08)	1.48 (0.97~4.76)	129.0 ± 35.1
	IgE $\geq$ 1000	9	0.97 (0.65~1.88)	1.66 (0.89~4.28)	$185.9\pm 47.5^{**}$

S.I.F. was presented as the mean $\pm$ ISD, whereas the percentage of S-phase cells is presented as the median, with the range in parentheses, because it did not form a normal distribution. Atopic subjects were divided into two groups using a serum IgE level of 1000 IU/ml.

n: number of subjects. *: significantly higher than in the non-atopic group ($p<0.05$), **: significantly higher than in the non-atopic group ($p<0.01$) and in the atopic group with a low serum IgE level ($p<0.05$).

Table 3 Relationship of S.I.F. with IgE-RAST

RAST	n	S.I.F.	p
---	6	113.2±12.2	/
0.35~99.9	6	148.5±37.6	<0.10
≥100	8	178.4±53.8	<0.02

Total subjects were divided into three groups according to the RAST score. S.I.F.s of the members of each group are shown as means±1SD. The p value indicates the significance of the difference in the mean S.I.F. between each group with an elevated RAST score and the group with a negative RAST score. n: number of subjects.

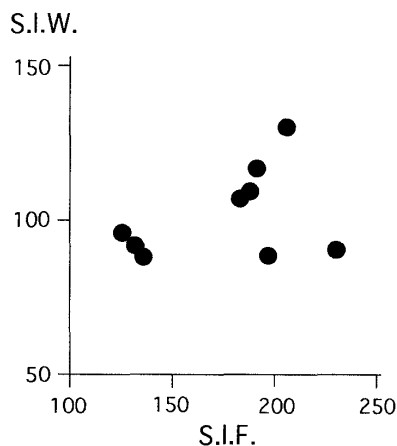


Fig. 7. Estimation of absolute number of viable cells in Der f-stimulated PBMC by the WST-1 method.

The ratio of the absolute number of viable cells in allergen-stimulated PBMC to that in non-stimulated PBMC was estimated by the WST-1 method after 7d of culture with Der f and presented as S.I.W. S.I.W.s of 9 atopic subjects were plotted against S.I.F.s.

素法はミトコンドリア活性を吸光度の変化として測定するもので、吸光度の比は生細胞数の比とほぼ一致する。ダニアレルゲン刺激サンプルと非刺激サンプルのWST-1色素法による吸光度の比 (S.I.W.) は90以上あり、ダニアレルゲンの細胞障害作用は強くないことを示している。S.I.F. 値が150以上のグループでは過半数がS.I.W. 値も上昇しており、S期細胞の増加が軽度ながら実際に生細胞数の増加につながることを示している。

考 察

ダニ特異的 S.I.F. 値は放射性同位元素法により測定されたダニ特異的増殖指数と同様、アトピー患者で有意に上昇していた¹²⁾¹³⁾。これはダニ IgE-RAST 値が高い児ではダニ S.I.F. 値も上昇していることによると思われる。ダニ S.I.F. 値と血清 IgE との間にも密接な正相関が認められたが、これはダニ IgE-RAST 値が高い児では多くの場合血清 IgE 値も上昇していることによると思われる¹²⁾。これらの所見は同時に行ったカンジダ抗原や Con A による刺激では認められず (未発表データ)、ダニアレルゲン特異的である。ダニ S.I.F. 値はアトピー患者におけるダニ特異 IgE 抗体産生および全般的 IgE 抗体産生の増進に關与するリンパ球集団の機能亢進状態を反映していると考えられ、その指標として利用できると思われる。

フローサイトメトリーによる検査では通常1回の測定に1万個前後の細胞を調べるが、ある程度のバックグラウンドは避けられず、1万個中100個前後以上は陽性細胞がないと信頼性のあるデータが得にくい。自然の抗原数は百万以上といわれており、ダニ凍結乾燥粉末がたとえ100の抗原を含んでいたとしても抗原当たりの特異的 T 細胞数が均等であるならば多くて1万個に1つしか反応性増殖を期待できない。この程度の頻度の細胞をフローサイトメトリーで検出するのはほとんど不可能である。しかし、トリチウム・サイミジンの取り込みデータを見るとダニアレルゲン刺激による取り込みの最大値は強力な T リンパ刺激因子である phytohemagglutinin (PHA) によるものの1/10を超えている¹³⁾。Con A は PHA よりやや弱いがほぼ同等のリンパ球増殖誘導活性を持ち、本論文中に示した方法で S 期細胞比率を測定すると5~10%になる (未発表データ)。この比率で換算するとダニアレルゲン刺激により少なくとも0.5~1%の細胞が本論文で定義した S 期細胞の測定領域に現われると見積られ、これはフローサイトメトリーで十分測定可能な量である。実際にダニアレルゲン刺激した場合1.5%前後の S 期細胞が測定領域に現われた (Table 2)。非特異的増殖細胞を差し引くと高 IgE アトピー群では1万個当たり50~100個前後のダニアレルゲン特異的増殖細胞が存在すると思われる。このように増殖細胞比率の評価ができるのもフローサイトメトリー法の大きな特徴の一つである。

フローサイトメトリー法では二重染色により増殖細

胞の性質をさらに詳しく解析することができる¹⁶⁾¹⁷⁾²⁰⁾。増殖細胞の内容についてはこれまで刺激前後のリンパ球亜集団の構成比の変化などから間接的に推測されてきたが、フローサイトメトリーではCD4やCD8などの細胞表面抗原とDNAとの二重染色により増殖細胞中のリンパ球亜集団の構成を直接測定することができる。CLA (cutaneous lymphocyte antigen) のようなリンパ球ホーミングに関連する抗原²¹⁾²²⁾との二重染色により増殖中のリンパ球がどの組織や器官の病変に関わるのか明らかにできる可能性もある。細胞質のサイトカインとDNAとの二重染色が可能になればアレルギー刺激により増殖するリンパ球中のTh1細胞とTh2細胞の比率も測定できるようになるであろう²³⁾。フローサイトメトリーはアレルギー誘発リンパ球増殖反応の意義や重要性を解明するための有用な手段としてさらに広く活用される価値があると思われる。

文 献

- 1) Del-Prete, G., Maggi, E., Parronchi, P., Chretien, I., Tiri, A., et al.: IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced *in vitro* by human T cell clones and their supernatants. *J. Immunol.* **140**, 4193-4198, 1988.
- 2) Pene, J., Rousset, F., Briere, F., Chretien, I., Bonnefoy, J.Y., et al.: IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 6880-6884, 1988.
- 3) Vercelli, D., Jabara, H.H., Arai, K. and Geha, R. S.: Induction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC class II antigens. *J. Exp. Med.* **169**, 1295-1307, 1989.
- 4) Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Gredlin, M.A. and Coffmann, R.I.: Two types of murine helper T cell clones. *J. Immunol.* **136**, 2348-2357, 1986.
- 5) Mosmann, T.R. and Coffmann, R.L.: TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* **7**, 145-173, 1989.
- 6) Robinson, D.S., Hamid, Q., Ying, S., Tsiopoulos, A., Barkans, J., et al.: Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N. Engl. J. Med.* **326**, 298-304, 1992.
- 7) Kay, A.B., Ying, S., Varney, V., Gaga, M., Durham, S.R., et al.: Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin 3 (IL-3), IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J. Exp. Med.* **173**, 775-778, 1991.
- 8) Durham, S.R., Ying, S., Varney, V.A., Jacobson, M.R., Sudderick, R.M., et al.: Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation; relationship to tissue eosinophilia. *J. Immunol.* **148**, 2390-2394, 1992.
- 9) 中沢正年, 南 陸彦, 杉 央子, 川口博史, 石井 則久, 他: アトピー性皮膚炎患者における Th1 および Th2 サイトカイン産生 T 細胞サブセットの FACSscan による解析. *アレルギー* **45**, 284, 1996.
- 10) 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.
- 11) Fujieda, S., Chang, K. and Saxon, A.: IL-4 plus CD40 monoclonal antibody induces human B cells γ subclass-specific isotype switch; switching to $\gamma 1$, $\gamma 3$, and $\gamma 4$, but not $\gamma 2$. *J. Immunol.* **155**, 2318-2328, 1995.
- 12) Hiratani, M., Muto, K., Oshida, Y., Ito, S. and Kasei, M.: Lymphocyte responsiveness to *Dermatophagoides farinae* extract in mite-sensitive patients; effect of immunotherapy on cellular proliferative response and specific immunoglobulin E antibody (RAST score). *J. Allergy Clin. Immunol.* **68**, 205-211, 1981.
- 13) Rawle, F.C., Mitchell, E.B. and Platts-Mills, T. A.E.: T cell responses to the major allergen from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*, antigen P1: Comparison of patients with asthma, atopic dermatitis, and perennial rhinitis. *J. Immunol.* **133**, 195-201, 1984.
- 14) Wierenga, E.A., Snoek, M., De Groot, C., Chretien, E., Bos, J.D., et al.: Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD4+ T lymphocytes in atopic patients. *J. Immunol.* **144**, 4651-4656, 1990.
- 15) Krishan, A.: Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium

- iodide staining. *J. Cell. Biol.* **66**, 188-193, 1975.
- 16) Dolbeare, F., Gratzner, H., Pallavicini, M.G. and Gray, J.W.: Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromdeoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 5573-5577, 1983.
 - 17) Braylan, R.C., Benson, N.A., Nourse, V. and Kruth, H.S.: Correlated analysis of cellular DNA, membrane antigens and light scatter of human lymphoid cells. *Cytometry* **2**, 337-343, 1982.
 - 18) Kim, K.-M., Mayumi, M., Iwai, Y., Tanaka, M., Ito, S., et al.: IgE receptor-bearing lymphocytes in allergic and nonallergic children. *Pediatric. Res.* **24**, 254-257, 1988.
 - 19) 小田島安平, 勝沼俊雄, 赤沢 晃, 近藤知己, 秋本 憲一, 他: 小児アレルギー疾患における卵白, 牛乳, 大豆, ダニ特異 IgG, IgE 抗体の年齢別推移. *アレルギー* **37**, 419-426, 1988.
 - 20) 八木田秀雄: multiparameter フローサイトメトリーによる細胞周期の解析. *細胞工学* **4**, 957-971, 1985.
 - 21) Babi, L.F.S., Picker, L.J., Soler, M.T.P., Drzimalla, K., Flohr, P., et al.: Circulating allergen-reactive T cells from patients with atopic dermatitis and allergic contact dermatitis express the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen. *J. Exp. Med.* **181**, 1938-1940, 1995.
 - 22) Abernathy-Carver, K.J., Sampson, H.A., Picker, L.J. and Leung, Y.M.: Milk-induced eczema is associated with the expansion of T cells expressing cutaneous lymphocyte antigen. *J. Clin. Invest.* **95**, 913-918, 1995.
 - 23) Jung, T., Lack, G., Schauer, U., Uberuck, W., Renz, H., et al.: Decreased frequency of interferon- γ - and interleukin-2-producing cells in patients with atopic diseases measured at the single cell level. *J. Allergy Clin. Immunol.* **96**, 515-527, 1995.

MEASUREMENT OF PROLIFERATION OF ALLERGEN-STIMULATED PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES BY FLOW CYTOMETRY

Mitsuaki Kimura, Satoru Tsuruta and Takami Yoshida

*Division of Allergy, Clinical Immunology and Infectious Diseases,
Shizuoka Children's Hospital*

The percentage of S-phase cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 14 atopic and 6 non-atopic subjects was measured by flow cytometry after stimulation with mite allergen (Der f) for 6 days and converted to the stimulation index (S.I.F.: stimulation index measured by flow cytometry). S.I.F. showed a close positive correlation with the serum IgE level ($r=0.67$, $p=0.001$). S.I.F. in the atopic subjects was significantly higher than in the non-atopic subjects (165.6 ± 49.8 vs 113.2 ± 12.2 , $p<0.05$). S.I.F. in subjects with a high (≥ 100 PRU/ml) IgE-RAST level for mite allergen Der p was significantly higher than that in subjects with a negative RAST level (178.4 ± 53.8 vs 113.2 ± 12.2 , $p<0.02$). Flow-cytometric measurement of the proliferation of PBMC in response to allergenic stimulation may be a useful method for studying the immunological abnormality present in atopic subjects.