HUMAN BASOPHIL DEGRANULATION TEST IN ALLERGIC PATIENTS

SATOSHI OGINO, M. D.

Department of Otolaryngology, Osaka University Medical School, Osaka

The basophil which bears specific IgE degranulates and disappears after challenge with allergen. This phenomenon was used as diagnostic test of allergies. A human basophil degranulation test (HBDT) was carried out on a slide using an enriched cell suspension. On each slide, 20 μ l of enriched cell suspension and 10 μ l of the allergen or, as a control, 10 μ l of buffer solution were placed in wells. After fixed and stained, the basophil count was made on an equal number of random distributed microscopic fields. When numbers of basophil decreased more than 35% in allergen wells, HBDT was determined as positive.

In the present report, five allergens were included, namely house dust (HD), mites (mixture of *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae*), pollen, hairs of cat and dog. In all allergens, there were good correlations between results of HBDT and skin test, and the concordance rate were 69.2% in HD, 80.8% in mites, 90.5% in pollen and 91.7% in cat and dog. There was also good correlation between the results of HBDT and RAST score. Its concordance reached 91%.

This HBDT is plain and simple, and shows similar reliability to RAST. HBDT will prove to be an additionally useful diagnostic clue for allergy.

A86—0144—90862

アレルギー患者における好塩基球脱顆粒試験

大阪大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：松永 亨教授）

荻 野 敏

I はじめに

アレルギー患者は、最近増加の一途をたどり、耳鼻咽喉科領域においても鼻アレルギーの増加は著しい。その診断には問診、皮膚テスト、誘発テストなどが行われ、またしばしば特異的 IgE の測定として RAST も行われ有用性が認められている。

IgE は mast cell, basophil に結合し、それに対するアレルギーと反応することにより histamine などの chemical mediator を放出すると同時に、その basophil は消失する¹⁾²⁾。この反応を利用し histamine release 量より特異的 IgE の測定も行われ RAST と同様、ある

いはそれ以上の有用性が認められている。しかし、basophil の消失をマーカーとした特異的 IgE の測定法は、basophil が血中に極めて少ない (40/ μ l) こともありほとんど利用されていない。

今回著者は、脱顆粒後 basophil の消失する現象を利用した特異的 IgE 測定、いわゆる human basophil degranulation test (HBDT) をフランス留学時に経験する機会を得た。この測定法は、フランスでは数年前から行われ有用性を認められているが、本邦においてはほとんど知られていないため、今回その方法を中心に報告する。

II 対象および方法

1) 対象

フランス・パリ・ロチルド病院アレルギーセンターを1981年10月より1982年6月にかけて受診した鼻アレルギーあるいはその疑いの患者の中より無作為に30名選び対象とした。なお対象のほとんどの者は気管支喘息などの他アレルギー疾患を合併していた。

2) 方法 (human basophil degranulation test, HBDT)³⁾

空腹時において対象患者より EDTA 加シリンジ (Venoject®) にて約10mL の採血を行い、それをただちに150g×15分間の遠心を行った。白層部分 (buffy coat) を100×18mm の plastic tube に集め、5mL の Hepes buffer を加え、さらに5mL の gradient density (1.080 g/mL, sodium metrizoate 9.05% (Nyegaard, OSLO), Ficoll 7.6% (Pharmacia)) をその tube 底部に静かに注意深く加えた。

400g×30分間の遠心後、buffy coat を集め Hepes buffer で1回洗い (150g×10分)、上清を取り除き沈殿部分を0.5~1.0mL とし、それを enriched cell suspension とした。

つぎに、パラフィンにて同径の円を描いたスライド上に、各円ごと20 μ L の enriched cell suspension、続いて10 μ L のアレルギー (下記に示す各種、各濃度のもの)、あるいはコントロールとしての Hepes buffer を加え37°C にて15分間反応させた。

その後ただちに乾燥させ methanol で10分以上固定した。次いで toluidine blue (cetyl pyridinium chloride Prolabo 0.5g, aluminium sulfate Prolabo 5g, toluidine blue 0.4g, distilled water 100mL, pH 2.6) にて30秒染色を行い、次いで distilled water 30秒、absolute ethanol 30秒で洗い、最後に xylene と反応させた後封入した (Eukitt®)。

3) 好塩基球算出, Degranulation Index

400倍の視野にて各円とも無作為に10視野の basophil を数えた。Basophil は青、あるいは濃紺に見え、他細胞とは容易に判別し得た。なお、コントロールの basophil が少ない時にはより多くの視野で数え、他もそれにならった。

$$\text{Degranulation Index (I. D)} = \frac{B_c - B_a}{B_c} \times 100(\%)$$

B_c : numbers of basophil in control circle

B_a : numbers of basophil in allergen circle

上記のごとく各アレルギーごとに index をもつて、35%以上を陽性とした。

4) アレルギー

今回は house dust (以下 HD), ダニ, pollen, 猫毛, 犬毛の5種のアレルギーを使用した。各アレルギーとも Institute Pasteur (Dr. David, service d'Allergen) より提供を受けた。HD 100 μ g/mL, 10 μ g/mL, ダニ 1 μ g/mL および 0.1 μ g/mL, pollen 2 μ g/mL, 0.2 μ g/mL, 猫毛 20 μ g/mL, 1 μ g/mL, 犬毛 20 μ g/mL, 2 μ g/mL と各アレルギーとも2種の濃度に希釈し使用した。ダニとしては Dermatophagoides pteronyssinus を用い、花粉は Dactyle, Irvaie, Phléole, Seigle, Agrostis, Floute, Houque, Pâturin, Brome, Fétuque の10種の花粉の mixture を使用した。

5) 皮内テスト

前腕屈側に0.05mL の皮内注射を行い、20分後の発赤の直径により判定した。20mm 未満を陰性、20mm 以上を陽性とした。なお各アレルギーとも commercial extract (Institute Pasteur) を用い、HD 1/50,000, ダニ 1/10,000, pollen 1/10,000, 猫毛 1/10,000, 犬毛 1/10,000 の濃度のものを使用した。なお各アレルギーとも前述の HBDT に使用した各アレルギーと抗原的に同一性が認められている。

6) RAST

従来の方法によった (Phadebas® RAST). RAST score は 0, 1+, 2+, 3+, 4+ の5段階に分類し、score 2+ 以上を陽性と判定した。なお、HD は H1 (Greer Labs), ダニは D1 (Dermatophagoides pteronyssinus), pollen は10の花粉中のフランスでの主アレルギーである Dactyle を測定した。

なお、現在パリでは、この HBDT に使用される Hepes buffer, toluidine blue, gradient density, プレート (アレルギー加) はキットとなり、Institute Pasteur より提供を受けることができるため、今回は主にそれを利用した。

III 成績

1) HBDT と皮内テストとの関係

HBDT を行った各アレルギーの症例数は、HD 26名、ダニ 26名、pollen 21名、猫毛 6名、犬毛 6名であった。猫毛・犬毛の症例は数が少ないため合わせて計算した。

HD において、HBDT と皮内テストの相関をみると (表1)、皮内テスト陽性14名中、HBDT 陽性は9名

(64.3%)であり、皮内テスト陰性12名中 HBDT 陰性は9名(75%)と両者に相関は認められたが、一致率は69.2%とあまり高くはなかった。

ダニでは(表2)、皮内テスト陽性17名中、HBDT 陽性12名(70.6%)、逆に皮内テスト陰性者は全例とも HBDT 陰性であった。両者には著明な相関も認められ、一致率も80.8%と高かった。

Pollen においても(表3)、両者には有意な相関が認められ、その一致率も90.5%と極めて高かった。

猫毛、犬毛の12症例でも(表4)、症例数は少なかったが両者に有意な相関が認められ、一致率も91.7%と高値を示した。

以上のごとく、いずれのアレルゲンにおいても皮内テストと有意な相関を認め、一致率も HD を除き高かった。

2) HBDT と RAST との関係(表5)

延べ85例中、同時に RAST を施行したのは、HD 12例、ダニ12例、pollen 5例、猫毛、犬毛それぞれ2例の計33例であった。

HD と H1, ダニと D1, pollen と Dactyl などそれぞれ対応させた時の成績は表5のごとく、一致率は91%にものぼり、極めて高い相関が認められた。なお pollen を除く28例では(成績未掲載)一致率は92.9%にものぼり極めて有意な相関が認められた($\chi^2=20.16$, $p<0.0001$)。

3名で RAST(-), HBDT(+) と両成績に不一致を認めたが、HBDT に使用したアレルゲンと RAST のそれが必ずしも同一でないことに関係しているのかもしれないが、いずれにしてもこの HBDT は RAST と同様、極めて有用な方法と思われた。

Ⅳ 考 察

I 型アレルギーが原因と考えられる鼻アレルギーの治療には、抗ヒスタミン剤やステロイドホルモンなどの対症療法や、原因アレルゲンの除去、減感作療法などが行われる。

アレルゲンの検索は、診断および治療において重要であり、そのために一般に皮膚テストが行われているが、その成績と実際の原因としてのアレルゲンは必ずしも一致しない。鼻内誘発反応も行われるが、ディスクの種類が少ないことより一部のアレルゲンに限られている。その目的のため RAST が開発され、有用なことが認められている。

表1 Correlation between skin test and HBDT with house dust allergy ($\chi^2=4.01$ $P<0.05$)

Skin test	HBDT	
	positive	negative
positive	9	5
negative	3	9

表2 Correlation between skin test and HBDT with dermatophagoides allergy ($\chi^2=11.80$ $P<0.001$)

Skin test	HBDT	
	positive	negative
positive	12	5
negative	0	9

表3 Correlation between skin test and HBDT with pollinosis ($\chi^2=14.32$ $P<0.001$)

Skin test	HBDT	
	positive	negative
positive	10	2
negative	0	9

表4 Correlation between skin test and HBDT with dog and cat allergy ($\chi^2=8.00$ $P<0.01$)

Skin test	HBDT	
	positive	negative
positive	3	0
negative	1	8

表5 Correlation between RAST and HBDT ($\chi^2=22.07$ $P<0.0001$)

RAST	HBDT	
	positive	negative
positive	10	0
negative	3	20

血清中の free な特異的 IgE を測定する RAST に対し、特異的 IgE が結合し脱顆粒をおこす細胞である basophil や mast cell に注目した測定法も出現した。その1つが、その細胞からのアレルギー反応後の chemical mediator の release をみる histamine release の測定法⁴⁾であり、その値は RAST 値とよく相関し、臨床的にも有用なことも証明されている。もうひとつが、今回報告した方法で basophil がアレルギーと反応後脱顆粒を起こし、消失することを利用した方法であり、この反応を用い、最初に Hirsch らが有用な方法として報告⁵⁾⁶⁾している。

以前より basophil からの脱顆粒をみる方法は特異的と思われていたが、血中に basophil が極めて少ない (40/ μ l) ことが障害となっていた。今回、gradient density などを用いることにより、enriched cell suspension を得ることができ⁷⁾、それを利用し測定を行った。

その成績は、今まで Dry, Leynadier らがしばしば報告しており、pollen⁸⁾、Dermatophagoides⁹⁾ などのアレルギーにおいて皮膚テストや他の検査とよく相関を示し、臨床的に有効に用いられている。また特に、hydatidosis¹⁰⁾ や schistosomiasis¹¹⁾ などの寄生虫疾患でその特異性は極めて高い成績が得られている。

今回、著者自ら同様のテストを行ったが、今までの報告と同じく、種々のアレルギーとも皮内テストとよく相関し、RAST とも良い相関が認められた。Leynadier によれば¹²⁾、HBDT の ID 値は histamine release の値ともよく相関を示したという。

このように HBDT は極めて容易で単純であり、また特異性も高く、半日で結果を得ることもでき、また必要に応じ封入後のプレートは数カ月以上の保存も可能である。フランスでは、すでに述べたごとく Institute Pasteur よりアレルギー加プレート、Hepes buffer, gradient density, toluidine blue がキットになり容易に手に入り、また RAST のようにアイソトープを用いないため、特別の部屋や器具、機械も必要としない利点がある。抗原の違いにより、我国においてすぐにこのテストが行えるかには問題があるが、我国にあったアレルギーを用いることにより有用なテストとなる。

しかしながら、自らの経験で述べれば、いくつかの問題点はある。以下にそれを述べる。

1) Degranulation index の陽性下限は 35% であるが、その値は著者の成績からでも適当と思われる。しかしながら 35~50% では、strong positive より probably

positive に近く、RAST score での 1+ ように思われた。この点は症例を増し、また RAST との関係をみることにより解決できよう。

2) RAST, 誘発反応, 皮膚テストにおいてもいえるが、HBDT においても使用するアレルギーが常に一定とは限らず、また他検査に使用のアレルギーと必ずしも同じではないため、しばしば各成績に一致を認めないことがある。これは、いずれの検査においても考慮に入れねばならない問題である。

3) 採血量がやや多く、1~2 プレート行うのに約 10 ml の血液を必要とする。成人例においてはともかく、小児において頻回にくりかえすには問題となる点である。

4) Enriched cell suspension を作っても basophil が極めて少ない症例が認められる。これらでは値が不正確になりやすい傾向がある。

5) Total IgE が低い症例において、HBDT 値と他検査の不一致が認められやすい傾向がある。この点については症例を増やし、検討を加える必要がある。

以上のごとく、いくつかの問題点はあるにしても、このテストは技術的に極めて容易であり、アレルギーの問題を解決することにより我国においても極めて有用なテストとなるであろう。

V ま と め

1) アレルギーと反応後の脱顆粒により basophil が消失する現象を利用した human basophil degranulation test (HBDT) を行い、特異的 IgE 検出に有効な手段かを研究した。

2) いずれのアレルギーにおいても皮内テストと相関が認められ、RAST とも有意な相関が認められた。

3) いくつかの問題点はあるが、このテストは技術的に極めて容易であり、特異性も高く比較的短時間でさえ、特別な設備を必要としないなどの利点がある。アレルギーの問題さえ解決すれば、我国においても RAST と並び特異的 IgE の検出に有用な方法となるであろう。

参 考 文 献

- 1) Pruzansky J J and Patterson R: Decrease in basophils after incubation with specific antigens of leukocytes from allergic donors. *Int Arch Allerg* 38: 522-526, 1970.
- 2) Shelly W B: Functional cytology of the human

- basophil in allergic and physiologic reactions: technic and atlas. *Blood* 19: 208-216, 1962.
- 3) Leynadier F, Luce H and Dry J: Méthodologie simplifiée du test de dégranulation des basophiles humains. *Rev Fr Allergol* 21: 173-175, 1981.
 - 4) Siraganian R P: Automated histamine analysis for in vitro allergy testing. Correlation of skin test results with in vitro whole blood histamine release in 82 patients. *J Allerg Clin Immunol* 59: 214-222, 1977.
 - 5) Hirsch S R and Zastrow J E: Basophil degranulation a new method of observation and its correlation with skin testing. *J Allerg Clin Immunol* 50: 338-347, 1972.
 - 6) Soifer M M and Hirsch S R: The direct degranulation test and the intracutaneous test: A comparison using food extracts. *J Allerg Clin Immunol* 56: 127-132, 1975.
 - 7) Leynadier F, Luce H and Dry J: Une technique simple d'isopement et de fixation des polynucleaires basophiles humains. *Rev Fr Allergol* 17: 215-218, 1977.
 - 8) Dry J, Leynadier F and Luce H: Corrélation entre test de dégranulation des basophiles humains et tests cutanés au cours des la pollinose (95 sujetes). *Sem Hop Paris* 56: 719-722, 1980.
 - 9) Dry J, Leynadier F and Luce H: Human basophil degranulation in dermatophagoides allergies: 93 cases. *Annals of Allergy* 44: 308-312, 1980.
 - 10) Leynadier F, Luce H, Abrdgo A, Huguier M, Dry J and Huguet C L: Human basophil degranulation test in diagnosis of hydatidosis. *Brit Med J* 280: 1251-1252, 1980.
 - 11) Abrego A, Leynadier F, Luce H, Deluol A M, Couland J P and Dry J: Dégranulation des basophiles humains dans les schistosomiasis. *Nouv Presse Med* 10: 258, 1981.
 - 12) Leynadier F, Luce H, Abrego A and Dry J: Automated measurement of human basophil degranulation. *Allergy* 36: 239-244, 1981.
-
- 本研究は、1981年6月より1982年8月にかけて、France, Paris, Hôpital Rothschild, Allergy Center での留学中に行った。
- この留学の機会を与えて下さり、また御校閲を頂いた松永亨教授に感謝致します。また留学中、直接御指導下さった J. Dry 教授, F. Leynadier 教授に深謝致します。
-
- (原稿受付 昭和 57. 9. 22日)
- 別刷請求先 〒553 大阪市福島区福島 1-1-50
大阪大学医学部耳鼻咽喉科学教室 荻野 敏