鼻アレルギーにおける全血遊離ヒスタミン測定の意義

日本医科大学耳鼻咽喉科学教室（主任：奥田 稔教授）

大塚 博 邦, 奥 田 稔, 坂 口 幸 作, 坂 口 喜 清,
谷垣内 由 之, 大 西 正 樹, 渡 瀬 隆 雄, 目 沢 朗 憲SIGNIFICANCE OF DETERMINATION OF HISTAMINE RELEASE
FROM WHOLE BLOOD IN NASAL ALLERGYHIROKUNI OHTSUKA, M. D., MINORU OKUDA, M. D., KOSAKU SAKAGUCHI, M. D.,
YOSHIKIYO SAKAGUCHI, M. D., YOSHIYUKI TANIGAITO, M. D.,
MASAKI OHNISHI, M. D., TAKAO WATASE, M. D. and AKINORI MEZAWA, M. D.

Department of Otorhinolaryngology, Nippon Medical School, Tokyo

We studied on the clinical significance of released histamine of whole blood obtained from 35 patients with nasal allergy.

The released histamine was measured by means of direct addition of antigen to the whole blood without separating leukocytes.

- 1) The percentage of histamine release by incubation of whole blood with saline was less than 10%.
- 2) The correlation coefficients for the degree of clinical symptoms among the percentage of histamine release, nasal provocation by antigen, duration period of specific hyposensitization, the number of basophilic cells of surface of nasal mucous membrane and total histamine content of whole blood were $r=0.488$ ($p<0.01$), $r=0.175$ (NS), $r=0.409$ ($p<0.01$), $r=0.518$ ($p<0.01$) and $r=0.426$ ($p<0.05$), respectively.

Moreover, the percentage of histamine release rised correlatively with radio-counts in RAST.

In conclusion, the determination of histamine release from whole blood is simpler and less time-consuming method comparing with the method of separating leukocytes, and is useful as clinical examinations of nasal allergy.

Key words: histamine release, whole blood, nasal allergyA87—0287—32861

は じ め に

末梢血の好塩基球からのヒスタミン遊離能の測定のために Lichtenstein¹⁾ 以来分離白血球が用いられてきたが、分離操作過程で好塩基球に機械的刺激が加わるため control におけるヒスタミン遊離率が 10～30%と高値を示すものが多く、このため治療前後の比較が少なからず困難であった。今回我々はこの点を重視し、白血球を分離することなく、全血を用いてヒスタミン遊離実験を行

ったところ、control におけるヒスタミン遊離が 10%以下で再現性の面でも優れていた。そこでこの方法を用い、鼻アレルギーにおける末梢血からの遊離ヒスタミン測定の臨床的意義を検討した。

対 象

日本医科大学耳鼻咽喉科アレルギー外来を受診し、ハウスダスト（以下 HD）アレルギーと診断された未治療

者 7 名, 特異的減感作施行中の患者 28 名の計 35 名である。未治療者 7 名中 5 名は減感作施行中再度測定を行った。

方 法

1. 全血からの%ヒスタミン遊離測定

患者の肘静脈から末梢血 6ml を採血し (加ヘパリン), 2ml ずつ 3 本のシリコン加工試験管に入れ (a, b, c), a と b には Tris ACM buffer solution を 0.9ml ずつ加え, 37°C 20 分間放置後, a には HD 抗原エキスを $100, 0.1\text{ml}$ (鳥居製, 最終濃度 $1.5 \times 10^{-2} \mu\text{g PN/ml}$), b には生食 0.1ml を加え, 37°C 30 分間 incubate した後, $\times 120\text{G}$ 8 分間遠沈し, a, b の上清液のヒスタミン濃度を Shore の方法¹⁸⁾ で測定し, A, B を求めた。C には蒸留水 1.0ml を加え, 凍結融解を繰り返し 3 回行ったのち, 遠沈し上清液中ヒスタミン濃度 C を求めた。そして % histamine release は A/C または B/C とし, net % histamine release は $A/C - B/C$ とした (図 1)。

2. 鼻誘発テスト

ハウスダスト粗抗原エキス $250\mu\text{g/disc}$ を含む市販の誘発ディスク (鳥居) を両側下甲介の前端部よりやや後部に刺激が加わらないよう付着した。反応の強さの程度は奥田²⁾ の分類に従った。すなわち症状を ① くしゃみ, ② 痒感, ③ 鼻漏, ④ 粘膜腫脹の 3 つに分け, (－): 症状がないか 1 つだけ, (+): 三症状の中の 2 つ, (++) : 三症状, しかしくしゃみ 5 回以下, (+++) : 三症状でくしゃみ 6 回以上とした。

3. 鼻症状

奥田²⁾ の重症度分類に従った。すなわち, くしゃみの 1 日平均発作回数また擤鼻回数, および鼻閉の組み合わせから分類した。

4. 減感作の方法

川上³⁾ の方法に準じて行った。初回量は皮内反応閾値の $1/10$ 濃度, 0.02ml とし, 約 50% ずつ増量して週 2 回注射を行い, 0.5ml に達したならばエキスの濃度を 10 倍濃くし, 投与量を 0.05ml とした。以後同様に増量しながら 3 または 4 クール行い維持量とした。後は週に 1 回の注射を 4 回, ついで 2 週に 1 回を 4 回, 次いで月に 1 回の割合で継続した。

5. 鼻粘膜表層好塩基性細胞数

下甲介前端部付近を小両頭鋭匙で軽く擦過して採取した約 4mm^2 (面積) $\times 40\mu\text{m}$ (厚さ) の粘液 および上皮層

図 1 全血遊離ヒスタミン測定法

をスライドガラス上にうすくのぼすようにして塗布し, 乾燥後純メチルアルコールで固定, ハンセル液で 40 秒間染色の後, 数秒間水洗, メタノールで脱色, キシレンで透徹, ビオライトで封入し, 400 倍顕微鏡下で全好塩基性細胞数をカウントした。すべての患者について, 両側下甲介の擦過片中の全細胞数を算定した。

6. 血清中 IgE 抗体値

血清中抗 HD IgE 抗体を RAST 法で測定した。

結 果

1. 全血ヒスタミン遊離能

i) 抗原と control の差

HD アレルギー 35 例の抗原付加時の % histamine release は $40.9 \pm 23.8\%$ に対し, control は $6.1 \pm 3.8\%$ であり, control における % histamine release は低値を示した (図 2)。

ii) 再現性の問題

7 例で同時に抗原, control とともに duplicate でヒスタミン遊離の測定を行ったが表 1 のごとくほとんど差はみられなかった。また 3 例で 1 カ月後に再検したが前後

図 2 全血ヒスタミン遊離能, HD と control (saline) の比較

図 3 血清中 IgE 抗体価と net % histamine release との関係

表 1 全血ヒスタミン遊離測定再現性

case	control(%)		HD(%)	
1	8.2	8.0	29.3	29.3
2	1.4	2.0	44.3	46.4
3	2.6	3.2	65.2	61.4
4	3.7	3.7	40.3	40.3
5	4.6	4.6	51.7	46.7
6	4.1	4.1	59.8	60.9
7	3.7	2.6	80.7	82.9

表 2 3 例における減感作前と開始 1 カ月後の推移

case	pre-treatment		1 month	
	control	HD	control	HD
1	4.6%	51.7%	8.5%	49.4%
2	3.7%	40.3%	5.7%	39.5%
3	6.3%	8.6%	11.8%	12.1%

で差がほとんどなかった (表 2)。

2. net % histamine release と IgE 抗体価との関係

未治療群 7 名のうち 5 名の net % histamine release と RAST 法による放射能カウント数との関係を見た。放射能カウントの上昇とともに net % histamine release

図 4 net % histamine release と鼻アレルギー症状の程度との関係

の上昇がみられた (図 3)。

3. net % histamine release と鼻症状および鼻誘発反応との関係

net % histamine release と鼻症状との間には相関係数 0.488 ($p < 0.01$) で相関性が認められたが、鼻誘発反応の間では鼻誘発反応の程度が (卅) までは相関性があったが、(卅) 群では net % histamine release の平均値は低くなり、全体では相関性はみられなかった (図 4, 5)。

図 5 net % histamine release と抗原による鼻誘発反応との関係

図 6 net % histamine release と減感作治療期間との関係

4. net % histamine release と減感作との関係

減感作の期間とともに net % histamine release は低値を示す症例が多い傾向にあったが1年をすぎたものの中には高値を示すものがあり、現在の維持法が最適かどうか検討する必要があると考えられた (図 6)。

5. net % histamine release と鼻粘膜表層好塩基性細胞数との関係

両者間には相関係数 0.518 ($p < 0.01$) で相関性が認められ、これは好塩基性細胞のもつ局所への遊走性とヒスタミン遊離能とは関連性があるものと考えられた (図 7)。

6. net % histamine release と全血ヒスタミン量との関係

両者間には相関係数 0.426 ($p < 0.05$) で相関性があった。全血ヒスタミン量は血中好塩基球の増減に最も反映されるので血中好塩基球数の多い例はその好塩基球のも

図 7 net % histamine release と鼻粘膜表層好塩基性細胞数との関係

図 8 net % histamine release と全血ヒスタミン量との関係

つヒスタミン遊離能が大であることを示唆している (図 8)。

考 察

Katz⁴⁾ は 1940年、感作ウサギの血液に抗原を添加すると血漿にヒスタミンが遊離することを最初に報告し、次いで Katz と Cohen⁵⁾ (1941年), Noah と Brand⁶⁾ (1955) は人においても血液に抗原を添加すると同じくヒスタミンが遊離することを報告した。1964年に Lichtenstein と Osler¹⁾ は血液から分離した白血球を用いて行うヒスタミン遊離能を報告し、現在では広くこの方法が用いられている。Lichtenstein らの方法は採血の後、白血球を分離し、数回洗浄を行うというもので、血清成分の影響を除去できるというのが特徴であるが、この方法では操作に手間がかかり、分離、洗浄、遠沈の過程で好塩基球が機械的刺激によって一部毀れるものや脆弱化するものもあり、control 添加時のヒスタミン遊離能が高くなる傾向がある。富田⁸⁾ らの喘息患児分離白血球の

実験では control による ヒスタミン遊離能は 30%前後であり、著者らも鼻アレルギー患者の分離白血球では 30%前後の遊離能であった⁹⁾。しかしながら分離白血球を用いても duplicate で行った場合の誤差は 5~15% (平均 6.2%) であるとの報告もある¹⁰⁾。著者らはこのような問題を考慮して全血からのヒスタミン遊離実験を行ったところ、control によるヒスタミン遊離能はほとんど 10%以下であり、また再現性において優れていた。

Lichtenstein らの分離白血球を用いる方法は血清成分の種々の因子による影響を少なくするというものであるが、Middlton と Sherman¹¹⁾ は枯草熱患者における実験で白血球からのヒスタミン遊離には血清成分は全く関与しないと述べている。仮に血清成分の関与があったとしても、臨床所見との関連をみる場合むしろ目的にかなっているかも知れない。

今回の研究で異なった未治療患者血清中の RAST カウント値の上昇とともに net % histamine release の上昇が認められ、Pauli¹²⁾ とも HD アレルギー患者の血清 RAST 値とヒスタミン遊離能との間には、相関性があったと述べている。

Pruzansky¹³⁾、齊藤¹⁴⁾らは喘息患者の全血を用いて抗原添加によるヒスタミン量を測定し、減感作によって遊離されるヒスタミン値は減少すると述べている。また Lichtenstein¹⁵⁾らはブタクサ花粉症で減感作によってヒスタミン遊離能が低下すると報告している。著者らも減感作施行後 1 カ月においてはほとんど差はみられなかったが、その後数カ月間の治療とともに低下例が多くなる傾向にあった。しかし 1 年をすぎたものの中には高値を示すものもあり、この方法は減感作療法の効果判定の一つの指標に利用できると同時に現在の減感作の維持法が適当かどうか今後検討の必要があると考えられた。

この方法による net % histamine release と鼻症状と鼻誘発反応との関係を見ると、鼻症状との間には相関性 ($p<0.01$) があったが、鼻誘発反応との間には誘発反応の程度が (一) ~ (十) 群の間では相関性があったが (卅) 群の net % histamine release の平均値は低くなり、全体としての相関性は認められなかった。また全血 net % histamine release と鼻粘膜表層好塩基性細胞数あるいは全血ヒスタミン量との関係をみたところ、前者においては相関係数 0.518 ($p<0.01$)、後者においては相関係数 0.426 ($p<0.05$) と相関性が認められた。これらのことは好塩基性細胞の血中および局所の増加または遊走能とヒスタミン遊離能とは関連性があるこ

とを示唆している。

著者らは鼻アレルギー患者の血中好塩基球数と鼻粘膜表層好塩基性細胞数との間には強い相関性があること¹⁶⁾、さらには鼻粘膜表層好塩基性細胞からのヒスタミン遊離能と鼻誘発反応の強さとの間には強い相関性のあること¹⁷⁾をすでに報告したが、今回の成績と合わせて考えると感作程度の強いもののほど血中好塩基球、鼻粘膜表層好塩基性細胞の数が増加し、これらの細胞からのヒスタミン遊離能が上昇するものと考えられた。

以上のことより全血からの遊離ヒスタミン測定法は分離白血球を用いるより操作が簡単で、再現性に優れ、臨床的に有用であると考えられた。

ま と め

HD 鼻アレルギー患者の血液を白血球を分離することなく直接抗原を添加することにより全血遊離ヒスタミン測定を行い臨床における有用性について検討した。その結果、

1. control におけるヒスタミン遊離能は 10%以下であり、再現性の面においても優れていた。
2. net % histamine release と臨床症状との間には $r=0.488$ ($p<0.01$) と相関性が認められたが、鼻誘発反応の程度との間には相関性はなかった。
3. 血清中の RAST 法による IgE 抗体価の上昇とともに net % histamine release の上昇がみられた。
4. 減感作の期間とともに net % histamine release は低下を示す症例が多かった。
5. 鼻粘膜表層好塩基性細胞数と net % histamine release の間には、 $r=0.518$ ($p<0.01$)、全血ヒスタミン量と net % histamine release の間には $r=0.426$ ($p<0.05$) と相関性があり、局所または血中の好塩基性細胞の増加とヒスタミン遊離能とは関連性があると考えられた。

以上のことより全血ヒスタミン遊離試験は操作が簡単で、再現性に優れ、臨床的に意義があるものと考えられた。

参 考 文 献

- 1) Lichtenstein LM and Osler A: Studies on the mechanisms of hypersensitivity phenomena: IX. Histamine release from human leukocytes by ragweed pollen antigen. J Exp Med 120: 507-530, 1964.

- 2) 奥田 稔: 鼻アレルギーの基礎と臨床 耳鼻: 297-344, 1974.
- 3) 川上保雄: 気管支喘息の治療 臨床の日本 4: 632-639, 1958.
- 4) Katz G: Histamine release from blood cells in anaphylaxis in vitro. Science 91: 221, 1940.
- 5) Katz G and Cohen S: Experimental evidence for histamine release in allergy. JAMA 117: 1782-1783, 1941.
- 6) Noah JW and Brand A: Release of histamine in the blood of ragweed sensitive individuals. J Allergy 25: 210-214, 1954.
- 7) Noah JW and Brand A: Correlation of blood histamine release and skin test response to multiple antigens. J Allergy 26: 385-393, 1955.
- 8) 富田有祐: 小児気管支喘息における白血球過敏度に関する研究. 第1編: 小児気管支喘息児における白血球ヒスタミン遊離反応について 小児科学会雑誌 74: 894-899, 1970.
- 9) 鼻アレルギー鼻汁好塩基性顆粒細胞の研究. 第4報 鼻洗浄液中好塩基性顆粒細胞のヒスタミン遊離 アレルギー 28: 633-639, 1979.
- 10) May CD, Lyman M, Allerto R and Cheng J: Procedures for immunological study of histamine release from leukocytes with small volume of blood. J Allergy 46: 12-20, 1970.
- 11) Middleton E and Sherman WB: Relationship of complement to allergic histamine release in blood of ragweed sensitive subjects. J Allergy 31: 441-447, 1960.
- 12) Pauli G, Bessot JC, Hirth C and Thierry R: Dissociation of house dust allergies: A comparison between skin test, inhalation tests, specific IgE and basophil histamine release measurements. J Allergy Clin Immunol 63: 245-252, 1979.
- 13) Pruzansky JJ and Patterson R: Histamine release from leukocytes of hypersensitive patients. II. Reduced sensitivity of leukocytes after injection therapy. J Allergy 39: 44-50, 1967.
- 14) 斉藤 紘: 気管支喘息における試験管内ヒスタミン遊離試験に関する研究. アレルギー 22: 745-756, 1973.
- 15) Lichtenstein LM, Norman PS and Winkenwerder WL: A single year of immunotherapy for ragweed hay fever. Immunologic and clinic studies. Ann Intern Med 75: 663-670, 1971.
- 16) 大塚博邦 奥田 稔 坂口喜清: 鼻アレルギー鼻粘膜好塩基性細胞の研究 第6報: 好塩基球と肥胖細胞の関係 日耳鼻 (投稿中)
- 17) Otsuka H and Okuda M: Important factors for nasal manifestation of allergy. Arch Otorhinolaryngol 233: 227-235, 1981.
- 18) Shore PA, Burkhalter A and Cahn VH: A method for the fluorometric assay of histamine in tissue. J Pharm Exp Ther 127: 182-186, 1959.

(原稿受付 昭和 58. 9. 24日)

別刷請求先 〒113 東京都文京区千駄木 1-1-5

日本医科大学耳鼻咽喉科学教室 大塚博邦