薬物その他によるアレルギーにおける 白血球の関与についての研究

特に白血球蛋白感作カオリン凝集反応、および
白血球を用いる Cytotoxic Test について

第四篇 —アレルギー性疾患、とくに気管支喘息における Cytotoxic Activity Test を用いるアレルゲンの検出法—

関西医科大学第一内科教室（指導 大久保晃教授）

竹 尾 信 男

I 結 言

アレルギー性疾患の診断にあたりアレルゲンの検出は最も重要なことである。アレルギー性疾患においては、補体結合反応、沈降反応などの血清学的検査法によつて血中抗体が証明されることは非常にすくない。また皮膚テストも特定のアレルギー疾患、たとえば吸入性アレルギー、ペニシリン・アレルギーにおいては診断的価値を有するが、薬物過敏症における診断的価値はそれほど高いものではない。さらに *in vivo* Test では、ショック、Transferring Disease を来す危険性がある。

Favour ら^{1),2),3)}は結核患者の白血球が Tuberculin によつて溶解現象を起すと報告し、Storck ら^{4),5)}は栓球凝集反応、村中ら⁶⁾は栓球溶解反応が本疾患の診断に有力な方法であると主張している。Storck らの方法は優れた診断法とは云え、微量ながら抗原を内服または注射することになるので決して安全な検出法とはいえない。

最近、細胞単位の反応にもとづいた immunological technique を用いて抗体を検出する方法として、アレルギー性疾患患者の白血球が、抗原存在のもとに release するヒスタミン量を測定する方法^{7),8)}や、Basophilic Degranulation Test⁹⁾、Halpern ら¹⁰⁾の提唱した培養された患者リンパ球の lymphoblast の出現程度によりアレルゲンを決定する Lymphocyte Transformation Test などが実施されている。これらの検査法ではショック、Transferring Disease を来す危険性はないが、それぞれの検査法の特異性や再現性について研究者の間で意見の一致をみないことが多い。

薬物過敏症について私は Engelfriet^{11),12)}, (van Loghem)らの方法による白血球の Dye Exclusion Test をおこない、薬物過敏症患者血清の cytotoxic activity を、原因と考えられる薬剤を添加して検べたが、かなりの特異性と再現性を認めた¹⁶⁾（第二篇、第6表）。そこで薬物過敏症とともに、アレルギー疾患の代表的疾患である気管支喘息をえらび、アレルゲンとして室内塵エキスを（ただし1例はブタクサエキスをもち）用い、皮膚反応とともに、患者血清についての cytotoxic activity を検査した。

II 実験対象並びに実験方法

1. 実験対象

関西医科大学第1内科アレルギー外来受診の気管支喘息患者について実施した。

2. 抗原液

鳥居薬品提供の100倍室内塵エキスおよび100倍ブタクサ抽出液を使用した。室内塵エキスは複雑な抗原であり、エキスの作成された時の条件でその内容の異なることが想像されるため、検査に用いたアレルゲンエキスは同一ロット番号のものを使用した。

3. 所要溶液

1) 白血球浮游液

第1図に示すごとく、皮内反応の認められない non-allergic な健康人 O 型血液を脱線維後、3%デキストラン（分子量180,000以上）溶液を、血液5容に対し1

Materials

1. Leucocyte suspensions
defibrinated blood of O group
dextran sedimentation method
4,000 leucocytes/mm³ kept at 4°C
2. Serum
inactivated by heating at 56°C for 30 min.
3. Complement
guinea-pig complement absorbed with human
red cells at 0°C hemolytic titer×250
cf. 3 times with A group for 1, 5 and 15 min.
successively, next 3 times with B group
and the last 3 times with O group as men-
tioned above
4. Tube non siliconized 55×11mm glass tube
5. Dye trypan-blue (British Drug House)

Methods

Serum	6 drops	Serum	6 drops
	+		+
	← Drug (0.2%)		1 "
Leuco. susp.	4 +		
Leuco. count	↓ 37°C 1h.		
Complement	6		negative (-) < 5%
	↓ " ½ h.		weaker
2 % trypan-	2		reaction (±) 6~9%
blue	↓ " ½ h.		positive (+) > 10%
coloured cells			
counted with magnification			
of 400× (Leuco. count)			

第 1 図

容の割合で混合し、よく攪拌後37°Cフラン器に45分間静置、白血球を含む Plasma 層と赤血球層とに分離した後、Plasma の部分を取り、500R. P. M. 3分間の遠沈を数回くり返し赤血球を除去し、4,000白血球/mm³とし4°Cに保存し、採血後8時間以内に実験が終了するように留意して使用した。

2) 補 体

使用した補体はモルモット補体(完全溶血価250単位)で、A, B, O型人赤血球で0°C 1分、5分、15分吸収操作後15,000R. P. M. 30分間遠沈し血球基質を除去し使用時まで-80°Cに保存した。

3) 色 素

2%トリパンブルー溶液 (British Drug House)

4. 試験管および器具

試験管(55×11mm)および器具はすべてシリコン加工をしないものを使用した。

5. 術 式

第1図に示すごとく、あらかじめ56°C30分間非動化し

た被検血清を1滴が $\frac{1}{4}$ mlのピペットで55×11mmの小試験管に6滴とり、前述の白血球浮游液4滴を加え、抗原液を1滴加え37°Cフラン器に1時間放置した後、モルモット補体を6滴加えて37°Cフラン器に30分間置き、さらに2%トリパンブルー溶液を2滴加え37°Cフラン器に30分間置いた後、Bürker : Türk 計算盤に入れて400倍で鏡検判定した。

判定基準は Engelfriet, van Loghem らの判定に準じ、白血球100個を算定し染色細胞数 5% 以下を陰性、10%以上を陽性、6~9%を弱反応性と判定した。このさい抗原液および白血球浮游液を加えた直後および実験終了時に白血球を算定し、細胞融解現象を白血球減少率によつて検討した。減少率は健康対照との差をもつて表わしている。

皮膚テストは鳥居薬品発売の1,000倍室内塵エキスならびに1,000倍ブタクサ液を使用し、皮内法、搔破法ならびにPK反応を実施し、判定基準は石崎¹³⁾の方法にしたがつた。

III 実 験 成 績

実験成績は第1~4表、第2~5図に示すごとくである。

第 2 図 Cytotoxic Activity

第1表 皮膚反応陽性喘息患者における Cytotoxic Activity と白血球減少率

症 例	年令	性	Cytotoxic Activity		白血球減少率		末梢白血球数 (好 中 球)
			抗原非添加	抗原添加	抗原非添加	抗原添加	
西 垣	44	♀	6	11	9.7%	17.0%	6,850 (4,658)
石 川	37	♂	8	14	5.1	18.8	5,400 (2,268)
加 地	52	♂	7	13	10.6	22.8	10,150 (5,227)
吉 本	51	♀	6	12	10.5	15.0	5,800 (4,060)
築 井	34	♀	※ 5	※ 10	※ 2.9	※ 7.4	12,600 (8,190)
苗 木	27	♂	6	14	2.9	23.2	9,650 (5,693)
元 田	50	♀	6	12	8.2	13.2	5,500 (2,530)
山 本	37	♂	7	11	3.3	10.1	9,000 (4,590)
小 西	33	♂	8	12	2.5	16.0	6,800 (3,672)
樋 口	39	♀	7	13	+ 3.7	9.6	8,100 (4,941)
佐 藤	46	♀	4	11	5.0	18.6	12,100 (8,832)
神 部	23	♂	6	8	7.1	22.2	8,350 (4,592)
束 田	33	♂	7	10	3.7	23.3	—

※ プタクサ鼻炎 抗原：プタクサ抽出液

第2表 皮膚反応陰性喘息患者における Cytotoxic Activity と白血球減少率

症 例	年令	性	Cytotoxic Activity		白血球減少率		末梢白血球数 (好 中 球)
			抗原非添加	抗原添加	抗原非添加	抗原添加	
今 井	34	♂	5	8	12.7%	16.2%	10,050 (5,527)
小 倉	32	♀	4	11	5.9	16.1	7,200 (3,672)
松 下	41	♂	5	13	9.4	20.6	10,350 (7,550)
阪 本	42	♀	5	4	10.6	+ 2.4	13,300 (7,980)
阪 本寿	24	♀	4	5	6.9	9.7	7,150 (4,290)

1. Cytotoxic Test の成績

第2図に示すごとく、正常健康人血清では室内塵エキスを非添加、添加のいずれも5%以下のものが大部分である。喘息症状はあるが室内塵エキスによる皮膚テスト陰性の患者は、室内塵エキスを非添加のばあいには全例陰性、室内塵エキスを添加したばあい2例が陽性化した。陽性化した2例は室内塵エキスを、パスパートによる減感作の既往のあるものである。皮膚テスト陽性の気管支喘息患者は、抗原非添加のばあい大部分(14例中11例)が弱反応性を示しているが、抗原液を添加したばあい、弱反応性2例でそのほかはすべて陽性化している。弱反応性を示した2例も添加しないばあいに比べると増強の傾向を示した。

2. 白血球減少率の成績

第3図に示すごとく、喘息症状はあるが室内塵エキスを

による皮膚テストが陰性の患者は、室内塵エキスを非添加のばあいにはすべて15%以下の減少率であるが、室内塵エキスを添加のばあい、室内塵エキスを、パスパートによる減感作の既往のあるものは15%以上の高い減少率を示したが、これらの既往の有しないものでは高い減少率を示すものもあり一定しない。皮膚テスト陽性の気管支喘息患者では抗原液非添加のばあいすべて15%以下の減少率であるが、抗原液を添加したばあい14例中10例が15%以上の減少率を示し、著しい対照を示している。

3. 皮膚テスト、臨床効果との相関

第1、3表は減感作前の皮膚テスト陽性のものについて、減感作療法による皮膚テスト(皮内法、搔破法)の変動とPK反応、Cytotoxic Test、白血球減少率ならびに臨床効果について示したものである。減感作療法により皮膚テストが陰性化するものがあるが臨床効果とはか

第3図 白血球減少率

第3表 皮膚反応陽性喘息患者における皮膚反応の成績

症 例	減感作前 皮内反応	減感作療法後		P K 反応	臨床効果
		皮内反応	搔破反応		
西垣	+	-	-	+	+
石川	+	+	-	±	卅
加地	-	/	+	-	/
吉本	+	-	-	+	+
築井	+	-	+	+	卅
苗木	+	+	+	-	÷
元田	+	+	+	+	卅
山本	+	-	-	-	卅
小西	+	+	-	+	卅
樋口	+	+	-	-	÷
佐藤	+	-	-	-	+
神部	+	+	+	±	+
束田	+	+	+	+	卅

ならずしも一致を見ない。第2, 4表は皮膚テスト陰性で臨床気管支喘息症状を呈する症例について室内塵エキスを抗原として実施した成績で、P K 反応は1例陽性でほかは全例陰性である。Cytotoxic Test で2例の陽性をみるが、この2例は室内塵エキス、パスポートで

第4図 皮膚反応、皮内法と搔破法抗原 H D

第5図 Cytotoxic Test 反応

減感作療法をおこなったものであり、その影響が考えられる。また白血球減少率については3例に高い減少率をみるが、そのうち2例は前述の減感作療法をおこなったもので Cytotoxic Test 同様その影響が考えられる。

以上の症例について実施した各テスト間の相関について検討すると、第4図に示すごとく皮内法と搔破法との間には正の相関を認める。皮膚テストとPK反応では18例中12例に判定が一致する(第3, 4表)。Cytotoxic

Test とPK反応との関係は第5図に示すごとく正の相関を示すものと、図の右下に沈んでいるものと2つのグループがみられる。右下に沈んでいるものはPK反応の弱いもので減感作処置で症状の改善を示した症例が多く含まれている。これは減感作処置が有効でPK反応が陰性化したものでもなお Cytotoxicity が高いことを示しており、これは PK反応が reagin のみに関係していると仮定するならば、reagin 以外で室内塵エキスと反応する抗体が血清中に存在していることを示唆するものと考ええる。

第4表 皮膚反応陰性喘息患者における
皮膚反応の成績

症 例	減感作前	減 感 作 後			P K 反 応	臨床効果
	皮内反応	皮 反	内 搔 破 反 応	破 反 応		
今 井	—	—	—	—	—	+(A u 剤)
小 倉	—	—	—	—	—	+(P. P.)
松 下	—	—	—	—	—	—(H. D.) —(P. P.)
阪 本	—	—	—	—	—	+(A u 剤)
阪本寿	—	—	—	—	+	—(H. D.) +(A u 剤)

H. D. : 室内塵, A u 剤 : 金ゾル
P. P. : パスパート

各反応相互の一致率は第5表に示すごとく、Cytotoxic Test と皮内テストが一致するものは18例中14例、Cytotoxic Test と白血球減少率が一致するものは18例中13例、白血球減少率とPK反応の一致するものは18例中10例である。

IV 考 按

アレルギー性疾患の診断にあたりアレルゲン検出に、

諸種の検査法が用いられているが、それぞれの検査法の特異性や再現性について異論があり、また検査法相互間にならずしも相関を認めることができない。その理由としてアレルギー反応そのものが多様性であり、われわれが臨床上遭遇する症例がすべてのアレルギー現象を具備していることは稀で、諸種の検査法はこれら多様性に富んでいる。アレルギー現象の一面のみを直接的に、あるいはヒスタミンやセロトニンなどの mediator を介して間接的に検べているためである。またアレルゲン側の原因として、pollen 以外はアレルゲンの構成が複雑であり、すべてのアレルゲンで検査をおこなうことは実際上不可能であり、真のアレルゲンを見逃している可能性が潜在している。患者の臨床症状と検査の結果とがかならずしも一致しないことは周知のごとくで、ここに特異抗体の検出が必要である。

私は薬物過敏症について Engelfriet^{11),12)}, (van Loghem)らの白血球の Dye Exclusion Test をおこない。過敏症患者血清の Cytotoxic activity を、原因と考えられる薬剤を添加して検べ、かなりの特異性と再現性を認めた(第一、二篇)。そこで気管支喘息患者のアレルゲン検出にこの方法を利用し、室内塵エキスによる皮膚テスト陽性患者に高い陽性率を得た。また、同時に白血球数を算定し、抗原抗体反応にともなう細胞溶解現象の面より検討したが、室内塵エキスによる皮膚テスト陽性患者にかなり高い白血球減少率を認めた。

アナフィラキシーにおいてショック症状の著明なばあい、末梢血中の白血球数、血小板数が減少することは一般にみとめられるところであり、このような現象がなぜ起るかという問題の解明は容易ではないが、流血中あるいは組織内で発生した抗原抗体反応の結果、白血球、血小板に変化が起り、凝集、脆弱化、融解、または特定臓器への集積の結果、末梢血中より消失すると想像される。

第5表 各 反 応 判 定 一 致 率

	皮 内 反 応	搔 破 反 応	Cytotoxic Test	白血球減少率	P K 反 応
皮 内 反 応	—	14/18(77.7%)	14/18(77.7%)	10/18(55.5%)	12/18(66.6%)
搔 破 反 応	4/18(22.2%)	—	13/18(72.2%)	10/18(55.5%)	11/18(61.1%)
Cytotoxic Test	4/18(22.2%)	5/18(27.7%)	—	13/18(72.2%)	9/18(50.0%)
白血球減少率	8/18(44.4%)	8/18(44.4%)	5/18(27.7%)	—	10/18(55.5%)
P K 反 応	6/18(33.3%)	7/18(38.8%)	9/18(50.0%)	8/18(44.4%)	—

← 不 一 致 →

私は¹⁶⁾結晶活性ヒスタミンを用いて比較検討したところによると(第二篇参照), 薬物過敏症患者血清中には $1.0 \times 10^{-14} \text{g/dl}$ 以上のヒスタミン濃度に相当する mediator が存在することを示唆する結果を得ている。同様に室内塵エキスによる皮膚テスト陽性患者の血清中にも $1.0 \times 10^{-14} \text{g/dl}$ 以上のヒスタミン濃度に相当する mediator が存在することが想像される。

reaginic antibody は非動化することにより活性を失うと考えられているが, 石坂¹⁴⁾の報告によれば, 非動化によつて皮膚に対する affinity はおちるが, antigen binding activity はなくなるわけではないとされており, 本実験において被検血清を非動化しているが, この antigen binding activity を検出しているものと考えている。

減感作療法が有効で臨床症状も改善され, PK 反応も陰性化したのにもかかわらず, なお Cytotoxic activity の高い症例をみるが, このことは, PK 反応が reagin のみに関係していると仮定¹⁸⁾するならば, reagin 以外に室内塵エキスと反応する抗体が患者血清中に存在していることを示唆している。この抗体が, 石坂の報告しているごとく, 皮膚に対する affinity はおちているが, antigen binding activity をもっているものかはさておき, アレルゲンと反応するか, あるいは reagin 活性を低下せしめる血清因子であることを示唆するものと考える。

私の成績によつて, 気管支喘息患者血清中には皮膚感作抗体 reagin のほかに同じアレルゲンと反応する血清抗体があることがわかった。これは reagin のごとく皮

膚に固着され難いため, 皮膚テストが陰性であつても anaphylaxy の発生するとき感作状態ではないと云うことは云えない¹⁵⁾。したがつてアレルゲンの検出に際しては, 気管支喘息のばあいにも, 薬物過敏症のばあいにも, 皮膚テストのほかに血清抗体を細胞レベルで検査する Cytotoxic Activity Test を行なうことが必要と考える。

V 結 語

気管支喘息患者血清に抗原を添加し, Cytotoxic activity (白血球を用いる Dye Exclusion Technique による)ならびに細胞溶解現象を検討し次の結論を得た。

1) 気管支喘息患者血清は抗原の添加により高い Cytotoxic activity を示した。

2) 気管支喘息患者血清に試験管内で抗原を添加したばあい著明な白血球減少が認められる。

3) 気管支喘息患者血清中には, 皮膚感作抗体以外に同じアレルゲンに反応する血清抗体の存在を示唆する結果を得た。

この論文の要旨は教室の黒川が, 第6回近畿アレルゲン研究会において発表した。

稿を終るに当り, 恩師関西医科大学第一内科学教室大久保晃教授の御指導と御校閲に対し深く感謝いたします。また, 黒川伝太郎講師の御援助と御指導に感謝いたしますと共に教室の東田二郎先生, ならびにアレルギー外来の諸氏の御援助に対し心から感謝します。

文 献

- 1) Favour, C. B. : Leucocyte Blockade in vitro Tuberculin Cytolysis, Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 70, 369, 1949.
- 2) Miller, J. M., Favour, C. B., Wilson, B. A. and Umbarger, M. A. : A Plasma Factor Responsible for in vitro Lysis of Leucocytes by Tuberculo-protein, Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 70, 738, 1949.
- 3) Miller, J. M., Favour, C. B., Wilson, B. A. and Umbarger, M. A. : Nature of the plasma Factor Responsible for In vitro Lysis of Leucocytes by Tuberculo-protein, Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 71, 287, 1949.
- 4) Storck, H., Hoigné, V. R. and Koller, F. : Thrombocytes in Allergic Reactions, Int. Arch. Allergy & Applied Immunol., 6, 372, 1955.
- 5) Hoigné, V. R., Grossmann, W. and Storck, H. : Über eine neue serologische Methode zum Nachweis von allergischen Reaktionen, Int. Arch. Allergy & Applied Immunol. 7, 184, 1955
- 6) 村中正治, 北村芳太郎, 野原浩, 西沢一郎, 菊谷豊彦, 竹田浩洋, 吉田超夫: アレルギー性疾患における血小板の変動, 臨床血液, 4, 292, 1963.
- 7) 堀内淑彦, 渥美剛, 坂本悟哉, 柴田皓示: 試験管内ヒスタミン遊離試験, 日本臨床, 24(4), 769,

- 1966.
- 8) **Pruzansky, J. J. and Patterson, R.** : Histamine Release from Leucocytes of Hypersensitive Individuals, *J. of Allergy*, **38**(5), 315, 1969.
- 9) **Shelly, W. B.** : Indirect Basophil Degranulation Test for Allergy to Penicillin and Other Drugs, *J. A. M. A.*, **184**, 171, 1963.
- 10) **Halpern, B., Ky, N. T. and Amache, N.** : Diagnosis of Drug Allergy in vitro with the Lymphocyte Transformation Test, *J. of Allergy*, **40**(3), 168, 1967.
- 11) **Engelfriet, C. P. and Eijssvoogel, V. P.** : Cytotoxic Iso-Antibodies Against Leucocytes, *Vox Sang.*, **10**, 228, 1965.
- 12) **Engelfriet, C. P. and Britten, A.** : The Cytotoxic Test for Leucocyte Antibodies, *Vox Sang.*, **10**, 660, 1965.
- 13) **石崎達** : 即時皮内反応の特性, *アレルギー*, **15**, 453, 1966.
- 14) **石坂公成** : 皮膚感作抗体の性状, 第5回 近畿アレルギー研究会, 特別講演, 1967.
- 15) **Ovary, Z.** : Immediate Reactions in the Skin of Experimental Animals Provoked by Antibody-Antigen Interaction, *Progr. Allergy*, **5**, 459, 1958.
- 16) **竹尾信男, 鉄谷多美子, 後藤真清, 岡本緩子, 黒川伝太郎, 大久保潤** : 臨床例に於ける抗白血球抗体の検索(Ⅱ) 薬物過敏症患者血清の Cytotoxic activity について, *日本血液学会雑誌*, **30**, 634, 1967.
- 17) **Siqueira, and., Nelson, R. A.** : Platelet Agglutination by Immune Complexes and Its Possible Role in Hypersensitivity *J. of Immunol.*, **86**, 516, 1961.
- 18) **伊藤幸治** : 皮膚感作抗体の免疫化学的研究, *アレルギー*, **14**(10), 536, 1965.

(欧 文 抄 録)

Studies on the Participation of Leucocytes in Allergic Reactions Due to Drugs or Other Agents, Especially on the Agglutination Reaction of Kaolin Particles Coated with Leucocyte Proteins and on the Cytotoxic Activity Test Using Leucocytes

Part 4. Detection of Allergens by the Cytotoxic Activity Test in the Patients with Allergic Disease, Particularly in Those with Bronchial Asthma

Nobuo Takeo

First Department of Internal Medicine, Kansai Medical School,
Moriguchi, Osaka, Japan
(Director : Prof. H. ŌKUBO)

Both cytotoxic and cytolytic activities in the presence of allergens in sera samples obtained from bronchial asthma patients were studied by means of the dye-exclusion technique. The results obtained were as follows :

- 1) The sera showed high cytotoxic activity brought on by the addition of the responsible allergens.
- 2) The leucocyte counts were markedly decreased in vitro by the addition of the responsible allergens.

These results suggest that bronchial asthma patients not only have the well-known skin sensitizing antibodies, but also seral antibodies as well.