気管支喘息および薬物過敏症の抗原および 薬物によるリンパ球幼若化現象

長崎大学医学部附属原爆後障害研究施設

治療部門（主任 朝長正允教授）

市丸 道人 豊増 省三

木下研一郎 朝長万左男

HUMAN LYMPHOCYTE BLASTTRANSFORMATION IN BRONCHIAL ASTHMA AND DRUG HYPERSENSITIVITY INDUCED BY ASTHMA ALLERGEN OR SPECIFIC DRUG

Michito ICHIMARU, Shōzo TOYOMASU, Kenichiro KINOSHITA
and Masao TOMONAGA

Department of Hematology Atomic Disease Institute, Nagasaki University
School of Medicine, Nagasaki, Japan

(Director: Professor Masanobu Tomonaga)

概要 即時型アレルギーとされる気管支喘息、薬物過敏症を有する症例の末梢血リンパ球をそれぞれのアレルゲン水溶液（気管支喘息では皮膚試験陽性を示したハウスダスト、真菌類、ブタクサ等、薬物は起因薬物と考えられるもの）の適量で、培養液T C 199、自己血漿と共に5日間培養し、おのおの約60%の症例に有意のリンパ球幼若化現象を認めた。幼若化細胞は喘息アレルゲンで最高16.4%、若薬物で3.4%であった。比較的高率を示した症例3例について再度観察したが、やはり比較的高率の幼化がみられた。以上の成績から、抗原の特異性に問題は残るにしてもこのような即時型アレルギーにおいても抗原認識はリンパ球が担当しており、抗原再刺激により immunologically performing cell になるものと思われる。しかしアレルギー現象であるそれぞれの身体症状の発現の機序については種々の問題があると思われ、リンパ球幼若化現象とそれらの関係について多少の考察を加えた。

I. 緒 言

1960年、Nowell¹⁾によつてヒト末梢血リンパ球が phytohemagglutinin (PHA) により試験管内で、いわゆる幼若化現象をおこすことを報告されたことに端を発し、Paermain²⁾が1963年、ツ反陽性者のリンパ球がP P Dにより同じ幼若化現象をおこす

ことを報告し、このような幼若化現象が抗原的刺激によつておこる感作リンパ球の変化であることが認められた。その後、ヒト末梢血リンパ球の幼若化をおこす物質は次々と報告されてきたが、これ等の物質は大きくわけてPHAの様な非特異的に幼若化をおこす物質と、もう一つはP P Dの様な特異的抗原物質に分けることが出来る。このうち、特異的抗原物質によるこの様な変化は免疫理論か

〔昭和45年11月2日受稿〕

ら言えば、一次的抗原感作を受けた immuno-competant cellであるリンパ球が(immunological memory cellと言えよう)二次的な抗原刺激によってimmunologically performing cellに変わる変化であろうと考えられる。この形式およびリンパ細胞がおこす変化であることから一般には細胞性、又は遅延型反応に属すると考えられている。しかしながらアレルギーの反応型式としては即時型とされるペニシリン過敏症や気管支喘息発作を有する症例の末梢血リンパ球が、ペニシリン³⁾や喘息アレルゲンによつてin vitroで幼若化現象がみられることも報告されてきた。このような事実は即時型とされる免疫反応にもリンパ球が大きく関与していることを示唆するが、この幼若化現象と体液性抗体、さらには抗原抗体反応にもとづく身体的症状の発現とがどのように関係があるのか、一連の免疫現象の解明に興味ある問題を提供していると思われる。勿論、この様な大きな問題の解明は容易なことではないと思われるが、ここでは29例の気管支喘息患者リンパ球を皮膚試験陽性を示したアレルゲンエキスイ水溶液にて行なつた幼若化成績と、薬物性皮診又は薬物過敏症を有するヒト若干例のリンパ球を起因薬と思われる薬物水溶液で培養した幼若化成績を報告し、若干の考察を加えてみたい。

II. 実験材料および方法

1. 気管支喘息患者リンパ球のアレルゲン培養
主として「トリキ」のアレルゲンエキスをを用いて皮内反応を行ない膨疹9mm以上、発赤20mm以上を示したものを陽性とする。

気管支喘息患者にて種々のアレルゲンによる皮膚試験を行ない、1種又は2種以上のアレルゲンエキスイにて陽性を示したものの末梢血をヘパリン加採血し(通常10~20ml)、室温で1.5~2時間放置し、血漿分離を行ない、血漿中白血球数を4,000~6,000/mm³に調製する。

培養液TC-199の8mlに上記白血球浮遊血漿2mlを加えよく混和する。更に皮膚試験陽性を示したアレルゲンエキスの適量を加え密閉し37℃の

孵卵器にて培養を行なう。5日後、培養細胞の回収を行ない遠沈して塗抹標本作製しギムザ染色を施す。

回収2時間前に0.005%コルヒチン0.5mlを培養液中に添加し、分裂期細胞を停止の状態にする。又回収1時間前に³H-thymidine 0.5μcを注入しDNA合成期細胞をラジオオートグラフ操作にて検出する。

それぞれの標本について幼若化細胞、分裂期細胞、³H-TdRラベル細胞の数をリンパ系細胞1,000コについて計測する。

なお、オートラジオグラフ操作はNR-M₂乳剤によるDipping法にて行なつた。

2. 薬物過敏症リンパ球の薬物添加培養

薬疹又は薬物過敏症と診断されたヒトの血液を気管支喘息患者の場合と同じようにして採血し、同様の操作を行なつて培養液+白血球浮遊血漿に適量の薬物(起因薬と思われるもの)稀釈液を加え5日間培養にて観察した。その他の各操作は喘息の場合と全く同様である。

III. 成績

1. 気管支喘息患者リンパ球のアレルゲン培養

培養に際して添加するアレルゲンの量が問題であるが、二、三の検討の結果、ハウスダスト(HD)は「トリキ」のアレルゲンエキスイ1,000×溶液の2滴が適当と思われたのでHD培養の場合、すべてHD液2滴を添加した。同様にカンジダ、クラドスポリウム、アルテルナリヤ等真菌類のエキスイは10,000×溶液の0.1ml、ブタクサは1,000×0.1ml、PASPAT液は0.05mlを添加した。

これらのアレルゲン添加培養によるリンパ球幼若化成績は表1に示す通りである。すなわち29例中18例(62.4%)に有意の幼若化を認めた。

皮膚反応陽性の最も多くみられたHD、カンジダについてみればその幼若化陽性率はそれぞれHD14例中9例(62.4%)、カンジダ9例中4例(44.4%)であつた。表中にて陰性としたもののなかには0.3%以下の芽球出現率を示したものがあるが、³H-TdRラベル細胞の全く認められないものは一

表1 a. 気管支喘息患者の末血リンパ球，抗原培養による幼若化成績

(皮膚試験 膨疹 = 9mm以上
発赤 = 20mm以上 = +)

症例	添加アレルゲン	皮膚試験	アレルゲン 添加量	幼若化細胞 %	³ H-TdR ラベル率	分裂期細胞 %
1	MS ハウスダスト (HD)	+	2 滴 (1000×)	0.9	0.2	0
2	KM HD	+	2 滴	16.4	7.6	0.5
3	SY HD	+	2 滴	3.4	2.2	0.3
4	YY HD	+	2 滴	0.9	0.2	0
5	HF HD	+	2 滴	1.0	0.4	0.1
6	NF HD	±	2 滴	0.9	0.4	0
7	SS HD	+	2 滴	0.4	0.1	0
8	FK HD	+	2 滴	0.6	0.2	0
9	KA HD	+	2 滴	0.5	0.2	0.1
10	KM カンジダ	+	0.1ml (10000×)	10.0	6.7	1.3
11	DK カンジダ	+	0.1	1.0	0.2	0
12	HN カンジダ	+	0.1	0.5	0.1	0
13	KT カンジダ	PK(+)	0.1	1.0	0.5	0
14	KK クラドス ポリウム	+	0.1	8.2	4.0	0.8
15	MK アルテルナリア	+	0.1	2.4	0.7	0.2

表1 b. 気管支喘息患者の末血リンパ球，抗原培養による幼若化成績

(皮膚試験 膨疹 = 9mm以上
発赤 = 20mm以上 = +)

症例	添加アレルゲン	皮膚試験	アレルゲン 添加量	幼若化細胞 %	³ H-TdR ラベル率	分裂期細胞 %
16	DK ブタクサ	+	0.1 (1000×)	1.2	0.3	0.1
17	IS ブタクサ	+	0.1	1.1	0.2	0.1
18	HI PASPAT	±	0.05	1.2	0.3	0.2
19	NH カンジダ	+	0.1	0.3	0	0
20	TN カンジダ	+	0.1	0.05	0	0
21	HS カンジダ	+	0.1	0.05	0	0
22	KY カンジダ	+	0.1	0.05	0	0
23	OS カンジダ	+	0.1	0	0	0
24	SM HD	+	2 滴	0.3	0	0
25	MM HD	+	2 滴	0	0	0
26	TK HD	+	2 滴	0	0	0
27	NK HD	+	2 滴	0	0	0
28	MY HD	+	2 滴	0	0	0
29	HS ブタクサ	+	0.1	0	0	0

応陰性とした。

幼若化細胞の出現率は最高16.4%を示したものの以下、種々であるが、一般に1%前後の率を示すものが多く、低率である。しかしながら第2例、

第10例、第14例の如くかなり高率に認められるものがあり、これらは³H-TdRラベル率、分裂細胞率も高率である。幼若化細胞は写真に示す如く、一般に大型でPHAによる幼若化細胞と形態的に

表2. 薬物アレルギー患者. 起因薬物によるリンパ球幼若化成績

	症例	薬物	症状	添加薬量	幼若化細胞 %	³ H-TdR ラベル%	Mitosis %
1	NR	アプレゾリン	皮 疹	0.2mg	1.5	0.7	0.1
2	SH	ペニシリン	過敏症	400u	1.0	0.3	0
3	MY	ペニシリン	過敏症	400u	0.8	0.2	0
4	TH	ACTH	過敏症	2u	1.4	0.8	0.2
5	SM	スルピリン	皮 疹	1 mg	1.0	0.6	0.1
6	HT	フェノバール	皮 疹	1 mg	1.2	0.7	0.1
7	NY	ロイコマイシン	皮 疹	1 mg	3.4	1.5	0.2
8	TH	アミノピリン	アグラヌロ チトーゼ	1 mg	0.2	0.1	0
9	HF	スルピリン	アグラヌロ チトーゼ	1 mg	0.05	0	0
10	KM	クロロマイセチン	皮 疹	1 mg	0	0	0
11	YM	ピラピタール	過敏症	1 mg	0	0	0
12	NO	ノボピオシン	皮 疹	1 mg	0.1	0	0

写真1. ハウスダスト溶液刺激による
幼若化リンパ球 写真3. 薬物（ロイコマイシン）による
分裂期幼若化リンパ球 写真2. 喘息アレルギー刺激によるマクロフ
アージ周辺の幼若化リンパ球 写真4. 薬物（アプレゾリン）による
幼若化リンパ球S期細胞

大差なく、強い好塩基性の原形質と大きくて微細構造を有する核を有し明瞭な核小体が認められる。なお、写真2に示したように、マクロファージ周囲に集合するリンパ球とその一部が幼若化している像が時に認められた。比較的高率な幼若化の認められた第2例、第3例および第10例について日を改めて再培養を行なった所第一回程ではなかったが、やはり第3表に示すように比較的高率の幼若化細胞出現をみた。

2. 薬疹、および薬物過敏症リンパ球の薬物による幼若化現象

薬物過敏症リンパ球培養における添加薬物量の決定は喘息アレルゲンよりも更に困難であり、各例について適量と思われる量を検討する必要がある。その微妙な添加量の問題を紹介するのが本文の目的ではないので割愛するが、少なくとも4～5段階の濃度の薬物量で検討する要があり、従って採血量がそれだけ増加するわけである。薬疹、又は薬物過敏症と思われる症例についてそれぞれ起因薬物を加えて培養し、リンパ球が破壊されず、しかも有効な薬物量が添加されたと思われる12例の成績を第2表に示した。添加薬物量は大体1mg程度が適量と思われるものが多いが、表に示すように必ずしも一定しない。とにかく12例中約半数の7例に有意の幼若化細胞の出現をみた。一般に喘息アレルゲン培養と同様、1%前後の比較的低い出現率であるが、何れも有意の ^3H -TdRラベル細胞の増加を示した。薬物（アミノピリン、スルピリン）によつてかつて無顆粒球症をおこした2例についてそれぞれアミノピリン、スルピリ

ン水溶液で培養を行なったが、1例は（±）、1例は陰性と思われる成績を得た。幼若化細胞の形態は喘息アレルゲンの場合と、大差なかった。

IV. 考 察

アトピー性アレルギー患者リンパ球のアレルゲンによる幼若化現象はElves⁴⁾、Zeitz⁵⁾らを始めとしてGirard⁶⁾、わが国では小林ら⁹⁾が報告しているが、未だ数少ないと言えるだろう。元来、リンパ球幼若化現象は遅延型アレルギー反応に関連すると考えられていた為に、このように即時型反応にもみられることは興味深い事である。薬物アレルギーにおいてもRipps¹⁴⁾、高橋¹⁰⁾らによつて有意の幼若化現象がみられることが報告されている。われわれの症例はペニシリンやACTHによる過敏症、又は各種抗生物質による薬疹を発したものであり、その大部分は即時型アレルギーに属するものであると思われる。これ等のアレルギー疾患を有するヒトの末梢血リンパ球が、喘息の抗原性物質や薬物性抗原物質によりin vitroで幼若化現象を示すことは抗原を認識している免疫担当細胞である小リンパ球が更に抗原刺激を受け（この際、抗原の直接的刺激というより、抗原を吞噬したマクロファージがその抗原情報を周囲に集るリンパ球に伝達するものと考えられる）、大型に変化し、RNA、DNAの合成を行なつて分裂増殖する細胞となりimmunologically performing cellに変るものと考えられる。この際、薬物が抗原としてそのまま働くかどうかという問題があるが、恐らくハプテンとしての性格を有するのであろう。ところで抗原刺激によるリンパ球幼若化相象はPPDによるツ反応陽性者の経験以来、血清抗体よりはむしろ遅延型反応によく併行することが多いということから、遅延型反応のin vitroにおける二次反応の表現とみなされてきたようである。しかしながら、本論文に示したようにアトピー性アレルギー、薬物過敏症においても明らかに有意の幼若化現象がみられることは、血清抗体が主役を演ずるとみなされるこれらのアレルギー現象にもリンパ球が相当に関与していることを物語っている

表3. 気管支喘息患者リンパ球幼若化成績
(2回検査比較)

	症例	実施月日	アレルゲン	添加量	幼若化細胞 %	^3H -TdR ラベル率	分裂期細胞 %
1	K.M	8.14	HD	0.05ml	16.4	7.6	0.5
		10.11	HD	2滴	3.0	1.0	0
2	K.M	8.14	カンジダ	0.1ml	10.0	6.7	1.3
		10.11	カンジダ	0.1	6.2	1.2	0.1
3	S.Y	8.11	HD	2滴	3.4	2.2	0.3
		10.11	HD	2滴	0.8	0.4	0.1

と考えられる。本リンパ球幼若化現象とこれらの疾患における血清抗体価の関連性を検討し、更に身体症状の発現との関連を調べることによりリンパ球幼若化の役割が解明されるものと思われる。又使用する各アレルゲンが抗原的に単一純粋なものであることも今後の問題解明に必要となつてくるであろう。われわれの臨床的観察からみれば、例えば喘息においてはリンパ球幼若化現象の程度は皮膚反応の強さと必ずしも平行しないし、われわれの行なつた実験成績にては、皮膚試験陽性のものでも約40%はリンパ球幼若化は陰性に終つた。

又リンパ球幼若化現象が喘息発作の発現とも直接的関連はみられないし、脱感作とも関連性をみとめることは困難であつた。そこで考えられることはツベリクリン型反応と同じく、これらの喘息型又は薬物型アレルギーにおいても抗原の認識はリンパ球が担当しており抗原による刺激によりimmunologically performing cellに変わるが、in vivoでは更にいくつかの条件が加わつて形質細胞に変化し、血清抗体を産生するに至るのか、或いはリンパ球幼若化が一つの刺激となり、その刺激がなんらかの形で形質細胞系に伝達され、形質細胞系による免疫抗体産生につながるのか等が考えられ、興味ある問題を残している。今の所、抗原の認識と身体的症状の発現とは直接的には余り関係がないようで、血清抗体と抗原間におこると思われる抗原抗体反応が直接的に身体症状の発現につながるものであろう。現在の所、in vitro又はin vivoにおいてリンパ球が形質細胞に変換することを肯定する成績は得られていない¹⁸⁾。しかしリンパ球が形質細胞に形態転換し得ることを示唆する報告もないことはない。

ただ、われわれは別誌¹¹⁾に報告したように喘息抗原にせよ薬物性抗原にせよ、その刺激によつておこるリンパ球幼若化現象の率に比例して細胞障害因子(cytotoxic factor)を産生することを確認めた。しかも、これは抗原と感作リンパ球の接触によつて比較的短い時間で産生されるようである。われわれはこの因子の存在をリンパ球ないし

は培養液上清と併置培養したヒト又はモルモットのマクロファージの遊走を阻止することによつて確かめたが、このような細胞障害因子の果す役割についても検討の余地があろう。

とにかく、培養条件の変化による微妙な培養成績への影響も考慮に入れねばならないが、喘息抗原、薬物性抗原の刺激によつてリンパ球幼若化現象がおこることは興味深い事実であり、即時型、遅延型反応いずれにおいても、抗原の認識はリンパ球が担当しているということであろうと思われる。第1回にかなり高率の幼若化を認めた例について再度、同一抗原で幼若化現象を観察し、必ずしも第1回の成績と同じではなかつたが、いずれも有意の幼若化現象を認めた。これは或る抗原を認識しているリンパ球のクローンは(一次反応又はその後の同じ抗原刺激で増殖したものと思われる)或程度、常に流血中に存在することを意味していると思われ、幼若化成績に変動があることは時により本クローンに属するリンパ球の混在の比率に変動のあること、又in vitroの実験に際し、混在するマクロファージの数に差異のあることなどがその理由として考えられる。いずれにしてもこのような種類の抗原性物質によつて、かなりの程度に惹起されるリンパ球幼若化現象の示唆するものは大きいと考えられる。

結 論

気管支喘息患者にハウスダスト、カンジダ、アルテルナリヤ、クラドスポリウム、ブタクサ、PASPATなどのアレルゲン水溶液で皮膚試験を行ない、陽性を示した29例についてそれぞれのアレルゲン水溶液の適量を陽性を得たヒトの末梢血リンパ球に加えて培養し、5日間培養の結果、約60%の症例に有意のリンパ球幼若化現象を認めた。幼若化細胞は最高16.4%を得た。

薬疹、又は薬物過敏症を有するヒトの末梢血リンパ球を抗原的薬物の適量を加えて5日間培養し約60%の症例に有意のリンパ球幼若化を認めた。最高の幼若化率は3.4%であつた。

これら、即時型反応と思われるアレルギー反応

とリンパ球幼若化現象との関係について多少の考案を加えた。

文 献

- 1) Nowell, P.C.: Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in culture of normal human leukocyte. *Cancer Res.* 20: 462, 1960. —2) Pearmain, G. et al.: Tuberculin induced mitosis peripheral blood leukocytes, *Lancet*, I. 637, 1963. —3) Hirschhorn, K., Bach, F., Kolodny, R.L., Firschein, L. and Hashem, N.: Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Science* 142: 1185, 1963. —4) Elves, M.W., Roath, S. and Israels, M.C.G.: The response of lymphocytes to antigen challenge in vitro. *The Lancet* I: 806, 1963. —5) Zeitz, S.J., Van Arsdel, P.P., McClure, D.K. Wachs, S. and Almen, M.C.: Specific response of human lymphocytes to pollen antigen in tissue culture *The J. of Allergy* 38: 321, 1966. —6) Girard, J.P., Rose, N.R., Kunz, M.L., Kobayashi, S. and Arbesman C.E.: Invitro lymphocyte transformation in atopic patients: Induced by antigens *The J. of Allergy* 39: 65, 1967. —7) Lycette, R.R. and Pearmain, G.E.: Further observations on antigen-induced mitosis. *The Lancet*. II: 386, 1963. —8) Cowling, D.C. and Quagliuolo, D.: Effect of some antigens on leukocyte cultures *J. Path. Bact.* 89: 63, 1965. —9) 小林登, 早川浩: 免疫細胞としての小リンパ球—特に抗原刺激によるその Blastogenesis について, *アレルギー*, 16: 79, 1967. —10) 高橋勇: 薬疹の診断, *西日本皮膚科*, 31: 119, 1969. —11) 市丸道人: リンパ球幼若化現象と非特異的細胞障害因子について. 毛細管遊走阻止法の応用. *九血会誌*, 20: 26, 1970. —12) Holub, M.: Potentialities of the small lymphocyte as revealed by homotransplantation and auto transplantation experiments in diffusion chambers. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 99: 477, 1962. —13) 難波雄二郎: DNA 合成阻害と抗体産生 細胞化学シンポジウム. 18: 11, 1967. —14) Ripps, C.S. and Fellner, M.J.: Lymphocytes and drug hypersensitivity *Lancet* 2: 803, 1966.