

# 好塩基球の反応性に関する研究

## 第 1 編

### 抗原, 抗ヒト IgE 刺激時の好塩基球の経時的形態的变化とヒスタミン遊離

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

中 川 三 郎

(平成 2 年 7 月 17 日受稿)

**Key words** : 気管支喘息, 好塩基球, 形態的变化, 特異抗原, 抗ヒト IgE

#### 緒 言

好塩基球とアレルギー反応の関連については近年多数の報告がなされ, 教室の木村, 谷崎<sup>1)-5)</sup>らは喘息発作前段階で末梢血好塩基球が増加し, 発作出現後に減少することを報告している。さらに, 木村らは skin vesicle test<sup>6)7)</sup>により好塩基球がアレルギー反応局所皮膚に出現すること, また喀痰の検索により好塩基球が気管支喘息患者の喀痰中に出現することをつきとめ, アレルギー反応局所への好塩基球の遊走を明らかにした。一方, 1967年に石坂<sup>8)</sup>らが, IgE を見だし, その target cell が好塩基球であることを報告<sup>9)10)</sup>して以来, IgE を介した I 型アレルギー反応と好塩基球の密接な関連性が明らかにされている。この IgE を介した I 型反応において, 抗原と接触し反応をおこした個々の好塩基球の形態的变化については Hastie<sup>11)</sup> らが位相差顕微鏡を用いて, また木村<sup>12)</sup> らは微分干渉顕微鏡および位相差顕微鏡を用いた観察結果を報告している。しかし, 抗原ないしその他の刺激物質に対する好塩基球の反応性を一つの細胞集団として観察した報告は少ない。今回著者は, アトピー型気管支喘息患者の末梢血好塩基球を用い抗原刺激後の経時的形態変化を, ヒスタミン遊離との関連のもとに観察し, 同時に抗ヒト IgE 刺激時の同様の観察と比較検討したのでその結果を報告する。

#### 対象と方法

対象としては当科外来通院中の臨床的に診断の確定した気管支喘息患者で, ハウスダストに対する RAST score が 2 + 以上の 9 例 (男 7 例, 女 2 例, 平均年齢 31.9 歳, 平均血清 IgE 値 1143 IU/ml) を選んだ。全例アトピー型気管支喘息症例であり, これらの症例ではハウスダストに対する RAST score 陽性以外に, 小児期よりの発症, あるいはアレルギー疾患の既往歴, 家族歴の存在, 末梢血中の好酸球増多, 血清 IgE 値 (RIST) の高値, ハウスダストに対する即時型皮内反応陽性などの項目がほぼ観察された。

対象症例より採取した計 7 本のヘパリン加静脈血 2 ml に, ハウスダストエキス (鳥居薬品製) × 100 倍希釈液 0.1 ml, あるいは抗ヒト IgE 血清 (Hoechst) × 100 倍希釈液 0.1 ml を添加し 0 分, 3 分, 6 分, 9 分, 12 分, 15 分間各々 37°C で incubation した。ice bath にて反応停止し血液塗抹標本を作成したのち, 4°C 1500rpm にて 15 分間遠心分離し, 上清を採取して, それぞれ以下の実験に供した。

#### 1. 好塩基球の経時的形態的变化

好塩基球の観察はすべて May-Giemsa 染色の塗抹標本上でおこない, 好塩基球数は, 白血球を 1000 個観察してもとめた。好塩基球の形態的变化としては, 好塩基球数, 平均直径, 長径/短径比, 細胞内顆粒数及びその分布, 空胞数, 偽足状突起の有無を検討した。好塩基球の形態的

変化はすべて写真判定によりおこない、各指標は12個の好塩基球の平均値で表した。平均直径は、長径+短径/2 ( $\mu\text{m}$ )で、長径/短径比は除したそのままの値で表した。顆粒数は細胞内のもののみを算定し、好塩基球1個あたりの平均顆粒数として表した。また顆粒の分布は核の一侧への偏位及び対側に大半の顆粒が認められる場合を限局型とし、それ以外の場合を汎細胞型として他の指標と同様に好塩基球12個中の出現率(%)で表した。空胞は細胞内顆粒より明らかに大きいもののみを算定し、結果は空胞数が1個以上あるいは5個以上出現した好塩基球の出現頻度で検討した。さらに偽足状突起については、好塩基球の胞体表面上に1個以上の明かな突起形成が認められる場合を陽性とした。

## 2. ヒスタミン遊離

上清への遊離ヒスタミン量は、上清1mlに同量の0.4Nの過塩素酸を加え1時間室温下で放置した後、4℃3000rpmで遠心後上清を採取しTechnicon社のヒスタミン自動分析装置により測定した<sup>13)-18)</sup>。また、総ヒスタミン量は全血2mlを100℃で15分間熱処理後、同量の0.8N過塩素酸を加え混和後1時間室温下で放置し以下上清の場合と同様にして測定した。結果はコントロールを減じた%ヒスタミン遊離で表した。なお、ヒスタミン遊離におけるコントロールとして生理食塩水0.1mlをヘパリン加静脈血2mlに添加し37℃にて15分間 incubation した。

## 結 果

### 1. ハウスダスト添加時における好塩基球の経時的形態的变化とヒスタミン遊離の関係

ハウスダスト添加時におけるヒスタミン遊離は添加6分後(36.4±15.2%, Mean±SD)までに急激な増加を示し、12分後(44.7±19.3%)にはほぼ plateau に達した。一方好塩基球数は、ハウスダスト添加6分後(11.3±2.5%)より有意の減少を示し( $p < 0.05$ )、添加12分後(4.2±1.9%)まではほぼ同様の減少傾向を示し、ヒスタミン遊離とは逆の相関関係が認められた(Fig. 1)。

好塩基球の平均直径は、添加3分後(13.3±0.5 $\mu\text{m}$ )より有意の増加傾向を認め( $p < 0.05$ )、

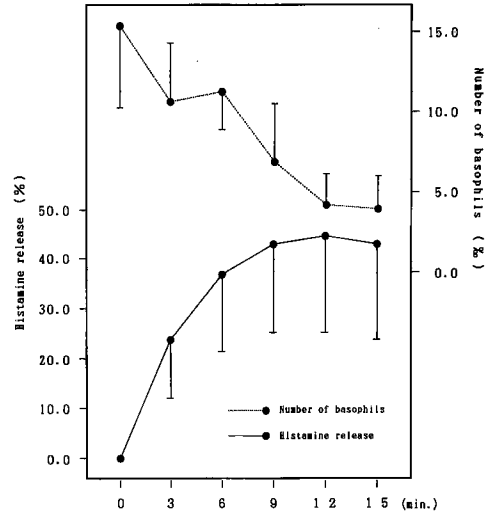


Fig. 1 Time course of the number of basophils and histamine release after stimulation with house dust

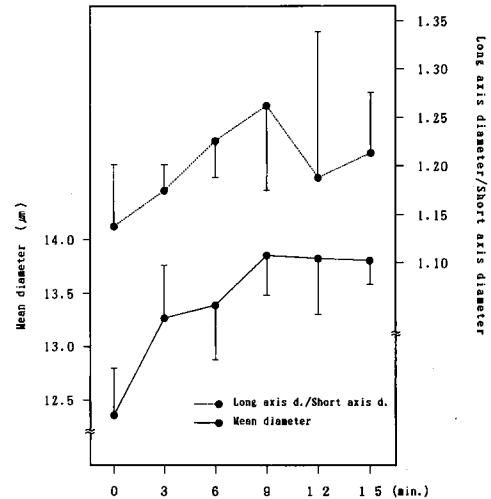


Fig. 2 Changes of mean diameter and ratio of short axis diameter to long axis diameter of basophils after stimulation with house dust

添加9分後(13.9±0.4 $\mu\text{m}$ )には plateau に達して、ヒスタミン遊離とはほぼ同様な変動を示した。また、長径/短径比においては添加9分後まで増加傾向を示しており、6分(1.22±0.01)、

9分後 ( $1.25 \pm 0.12$ ) において有意差を認めたが ( $p < 0.05$ ), その後12分後 ( $1.19 \pm 0.12$ ) にはむしろ減少傾向を示した後再度増加傾向を示した。すなわち, 添加時より添加9分後までは好塩基球の長径/短径比は増大傾向を示したが, これは抗原刺激に対する好塩基球の形態的変化の表れであると考えられた (Fig. 2)。

顆粒数とヒスタミン遊離の関係では, ハウスダスト添加直後より急速な顆粒数の減少を認め, 6分後 ( $26.4 \pm 2.1$ ) に有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。これは反応早期のヒスタミンの急激な放出に一致した所見と思われた。その後12分後 ( $24.2 \pm 3.6$ ) に最少となり15分後 ( $29.3 \pm 10.0$ ) にはやや増加傾向を示した。また顆粒の分布の検討では, 添加3分後より12分後まで限局型の顆粒分布を示す好塩基球の出現率が漸増し, 9分 ( $11.5 \pm 6.7\%$ ) 及び12分後 ( $17.4 \pm 8.6\%$ ) において有意差を認め ( $p < 0.05$ ), 添加15分後 ( $15.3 \pm 13.1\%$ ) には減少傾向を示した。この限局型の顆粒分布を示す好塩基球の出現率と長径/短径比の経時変化にはある程度の関連性があるように思われた (Fig. 3)。

偽足状突起の観察においては, 反応全般を通して偽足状突起を有する好塩基球の出現率における変動はほとんどなく, ヒスタミン遊離との相関も明らかではなかった。空胞の出現頻度の検討においては, 1個以上の空胞出現率では添加12分後に1峰性の増加傾向を認めたものの, 5個以上の空胞出現頻度の検討では, ほとんど変動を認めずヒスタミン遊離との関連は明らかでなかった (Fig. 4)。

## 2. 抗ヒト IgE添加時における好塩基球の形態的变化とヒスタミン遊離の関係

抗ヒト IgE  $\times 100$ 倍希釈液添加時のヒスタミン遊離は, ハウスダストの場合と同様に経時的に増加し, 12分後 ( $20.3 \pm 15.9\%$ ) にはほぼ plateau に達した。一方好塩基球数は添加6分後 ( $11.0 \pm 4.0\%$ ) より有意の減少を示し ( $p < 0.05$ ), 添加15分後 ( $7.6 \pm 2.1\%$ ) までその減少は観察され, ハウスダストと同様ヒスタミン遊離と逆の相関関係が認められた (Fig. 5)。

好塩基球の平均直径は添加3分後 ( $13.9 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ) より漸増し, 12分 ( $14.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ) 及び15

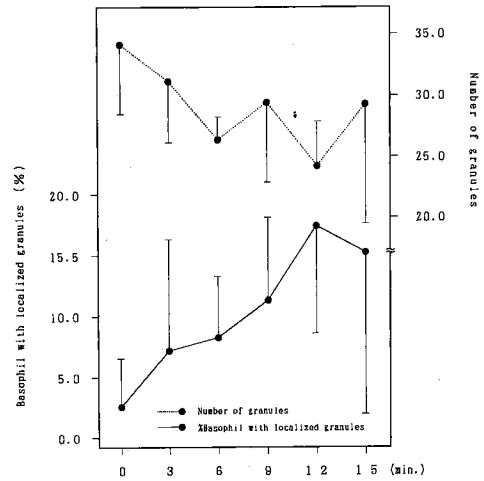


Fig. 3 Changes of number of basophil granules and of basophils with localized distribution of intracellular granules after stimulation with house dust

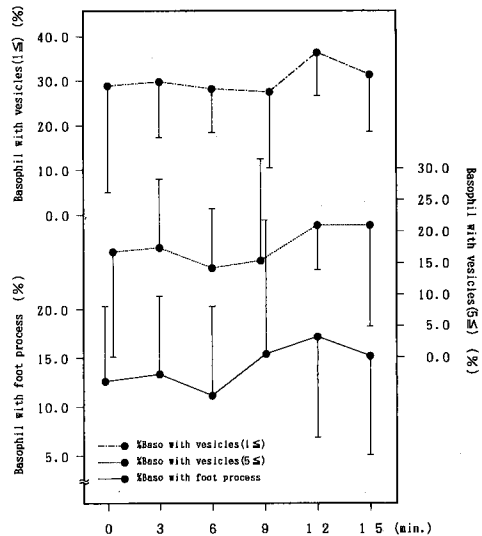


Fig. 4 Changes of number of basophils with vacuolation or foot process formation after stimulation with house dust

分後 ( $14.3 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ) には有意差がみられ ( $p < 0.05$ ) ヒスタミン遊離との正の相関が認められた。長径/短径比の変化では, 添加9分 ( $1.19 \pm 0.02$ ) 及び12分後 ( $1.19 \pm 0.07$ ) に若干の増加

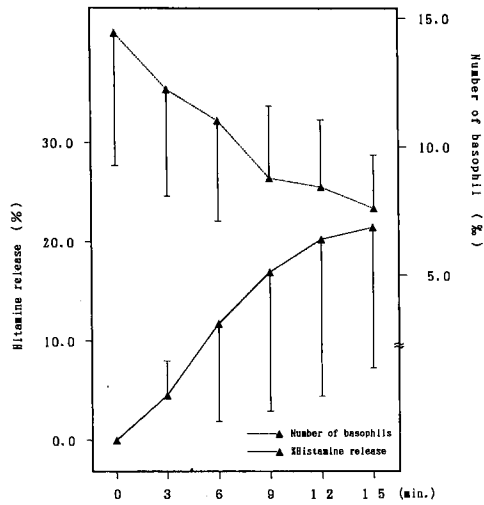


Fig. 5 Time course of number of basophils and histamine release after stimulation with anti-IgE

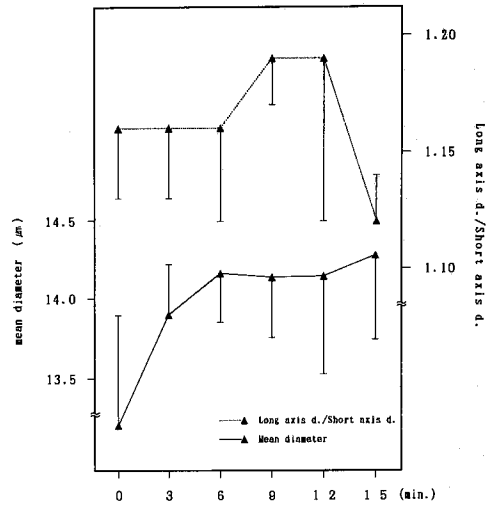


Fig. 6 Changes of mean diameter and ratio of short axis diameter to long axis diameter of basophils after stimulation with anti-IgE

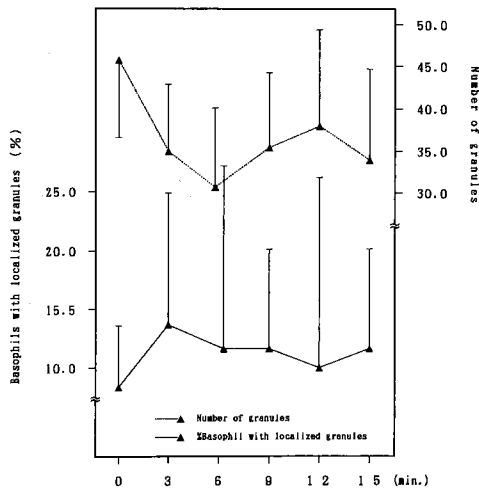


Fig. 7 Changes of number of basophil granules and of basophils with localized distribution of intracellular granules after stimulation with anti-IgE

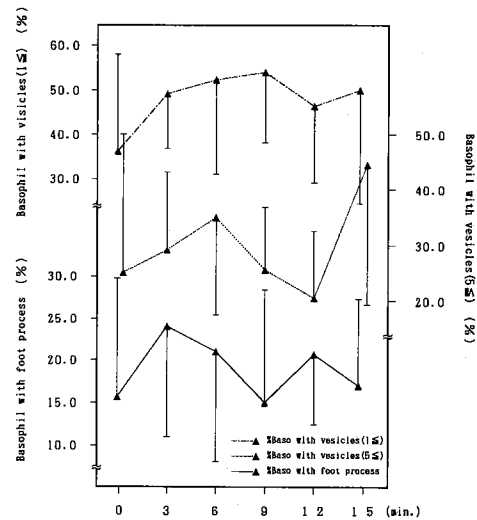


Fig. 8 Changes of number of basophils with vacuolation or foot process formation after stimulation with anti-IgE

が認められたが、15分後 ( $1.12 \pm 0.02$ ) にはむしろ減少傾向が見られた。すなわちハウスダスト添加時ほどの著しい変化ではなかったがほぼ同様の傾向と考えられ、ヒスタミン遊離との関係がある程度うかがわれた (Fig. 6)。

顆粒数は添加3分 ( $34.5 \pm 7.8$ ) から6分後 ( $30.7 \pm 9.4$ ) にかけて急激に減少し、ハウスダストの場合と同様に反応早期の急激なヒスタミン遊離を反映しているものと思われたが、添加

9分(35.3±8.3)以後は一定の減少傾向は見られなかった。また、顆粒の分布では添加3分後(13.7±11.2%)に限局型の顆粒分布を示す好塩基球の出現率が増加傾向を示したもののその後は横ばいであり、抗ヒトIgE添加時にはハウスダスト添加時ほどの持続性の変化はみられなかった(Fig. 7)。

偽足状突起の出現率は添加3分及び12分後に2峰性のpeakを認めたものの一定の傾向を示さず、ヒスタミン遊離との相関は不明確であった。また空胞の認められた好塩基球の出現率の検討では、1個以上の場合、経時的にその増加がみられたものの、5個以上の出現頻度では15分に明らかな増加傾向を認めるのみで、ヒスタミン遊離の経時変化と明かな相関は認められなかった(Fig. 8)。

#### 考 察

アレルギー反応における好塩基球の役割の一つとしてヒスタミン、SRS-Aなどのchemical mediatorの遊離があり、特にヒスタミンはI型アレルギー反応の指標として古くから測定されてきた。一方I型アレルギー反応における好塩基球の形態的变化については、木村<sup>11)</sup>らは位相差顕微鏡及び微分干渉顕微鏡を用いて好塩基球の生体観察をおこない、抗ヒトIgE添加後好塩基球が運動能亢進に伴い洋梨状の形態的变化を示し、さらにはHand shape様突起を出し顆粒を放出する時期と、むしろ運動能が減じて顆粒の減少、細小化及び空胞の出現などの細胞内の変化が主体をしめる時期の2つの時期があることを報告し、その現象がアレルギー反応における好塩基球の形態的变化であることを明らかにしている。また木村<sup>19)</sup>らは塗抹標本を用いた好塩基球脱顆粒試験において、アレルギー反応における好塩基球の形態的变化として、洋梨状好塩基球の出現および顆粒数の減少した膨化型好塩基球の出現を明らかにしている。さらに、アトピー型気管支喘息患者の末梢血好塩基球は抗ヒトIgEに、重症難治性喘息患者の末梢血好塩基球は抗ヒトIgGに反応性が高いことより、かかる好塩基球の反応性の違いが喘息の病態把握の重要な鍵を握っていること<sup>19)</sup>を明らかにして

いる。

今回著者は、好塩基球の反応性とヒスタミン遊離の関係を明らかにするため、塗抹標本における好塩基球の形態的变化とヒスタミン遊離を経時的に観察した。その結果、ハウスダストおよび抗ヒトIgE添加時の共通の所見として、抗原添加後早期よりの平均直径の経時的な増大、及び反応早期の細胞内顆粒数の減少、さらに経時的な好塩基球数の減少が、ヒスタミン遊離と相関しているものと思われた。特に反応早期の細胞内顆粒数の減少は、その後の脱顆粒の進行に伴う好塩基球数の減少及びヒスタミン遊離の増加をよく反映しているものと考えられた。また、当然脱顆粒の進行に伴い細胞内に空胞を形成することが予想されるが、それに反し、ハウスダスト添加時及び抗ヒトIgE添加時における空胞出現率は1個以上あるいは、5個以上のどちらにおいても共通の変化には乏しかった。この理由としては急激に顆粒を放出し細胞内顆粒を失った好塩基球をもちやMay Giemsa染色下では好塩基球と同定できないため、結果として好塩基球数の減少としてしか認識できないことに由来するのではないと思われる。

とくにヒスタミン遊離に関しては、ハウスダスト添加時はplateauである添加15分後において42.6%におよび、その90%近いヒスタミンをわずかに添加6分後に放出している。逆に抗ヒトIgE添加時ではヒスタミン遊離の15分値は21.5%とハウスダスト添加時に比べ低値でありさらに添加6分後の値においても11.6%とmaximal releaseの50%程度の値であった。したがって、ハウスダスト添加時には抗ヒトIgE添加時よりヒスタミン遊離のtime courseにおける立ち上がりが急峻であることが考えられ、その差が空胞出現率の両者における違いとなったのかもしれない。

長径/短径比の検討ではハウスダスト添加時において添加9分後まで漸増し6分及び9分後の時点で有意差を認めた。また抗ヒトIgE添加時においても添加9分及び12分後において長径/短径比の増加傾向を認め、両者とも類似の傾向を示した。この長径/短径比の増大は、好塩基球の運動能の亢進を意味するものと考えられる。

限局型の顆粒分布を呈する好塩基球の出現率は、ハウスダスト添加時において反応早期から後期にかけて有意の増加を認め、抗ヒト IgE 添加時には反応早期に若干の増加傾向を認めたもののその後は横ばいとなった。両刺激物質添加時における限局型顆粒分布を示す好塩基球の出現率の変動は、長径/短径比の経時的変化と若干の類似性が認められ、運動能の亢進と顆粒分布の関連性について興味をもたれるところである。

以上のごとく、ハウスダストと抗ヒト IgE 刺激による好塩基球の形態的变化では、そのヒスタミン遊離と関連して、ほぼ類似した経時的変化として観察された。しかし、抗ヒト IgE 刺激時には、細胞内顆粒数、平均直径、長径/短径比、限局型顆粒分布を示す好塩基球数などの形態的变化はハウスダスト刺激時に比べ、時間の経過とともに減弱傾向がより高度であった。すなわち、今回使用した抗ヒト IgE 濃度では、ハウスダストに比べ刺激後の形態的变化の表れ方がより緩徐であり、しかもその持続時間が長い可能性が示唆された。そしてこれらの所見は、好塩基球からのヒスタミン遊離における抗原と抗ヒト IgE 刺激時の差 — 抗原刺激時の場合がより短時間にかつより急激にヒスタミン遊離が観察される — についての Marone<sup>20)</sup> らの報告とある程度合致するものと考えられる。

## 結 論

ハウスダストアレルギーを有するアトピー型

気管支喘息患者 9 症例の末梢血好塩基球に、ハウスダストエキスあるいは抗ヒト IgE 血清を添加し、May Giemsa 染色下の塗抹標本における形態的变化とヒスタミン遊離を経時的に検討し、以下の結果を得た。

1. ヒスタミンは、ハウスダストあるいは抗ヒト IgE 添加後急激に遊離され、それにともない好塩基球数は経時的に漸減し逆相関の関係を示した。

2. ハウスダスト及び抗ヒト IgE 添加後の好塩基球の平均直径は反応早期より漸増し、また長径/短径比及び限局型の顆粒分布を示す好塩基球の出現率は、反応中期から中期後半にかけて漸増傾向を示した。さらに、細胞内顆粒数は反応早期に急激に減少し、それぞれヒスタミン遊離とある程度の関連があることが示された。

3. 細胞内顆粒数、平均直径、長径/短径比、限局型顆粒分布を示す好塩基球数などでは、ハウスダストと抗ヒト IgE 刺激後の変化にある程度の差がみられた。

4. 空胞出現率、偽足状突起の有無はハウスダスト、抗ヒト IgE いずれの刺激時にも、ヒスタミン遊離と明かな相関関係を認めなかった。

稿を終るにあたり、御指導御校閲を賜った恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表するとともに、終始御懇篤なるご指導を賜った三朝分院内科谷崎勝朗教授に深謝致します。

## 文 献

- 1) 木村郁郎, 守谷欣明, 西崎良知, 谷崎勝朗: 気管支喘息における好塩基球の臨床的意義. アレルギー (1968) 17, 558—561.
- 2) 木村郁郎, 谷崎勝朗: 気管支喘息における好塩基球の変動と発作閾値について — ステロイドホルモン投与時の変動を含めて —. アレルギー (1970) 19, 605—612.
- 3) 木村郁郎, 守谷欣明, 谷崎勝朗, 齊藤勝剛: レアギン型アレルギー(ホヤ喘息)における好塩基球の動態に関する研究. アレルギー (1971) 20, 596—598.
- 4) 谷崎勝朗: 好塩基球に関する研究; II. 気管支喘息における好塩基球の動態に関する研究. 岡山医誌 (1973) 85, 199—210.
- 5) Kimura I, Moritani Y, and Tanizaki Y: Basophils in bronchial asthma with reference to reagin-type. Clin Allergy (1973) 3, 195—202.
- 6) 木村郁郎, 守谷欣明, 谷崎勝朗, 齊藤勝剛, 高橋 清, 上田暢男, 佐藤周一, 小野波津子: アレルギー反応

- 局所への好塩基球および好酸球の出現について—Skin Vesicle Testの提唱—。アレルギー (1973) **22**, 207—213.
- 7) 木村郁郎, 守谷欣明, 谷崎勝朗, 齊藤勝剛, 高橋 清, 上田暢男, 佐藤周一: 好塩基球の血管外への出現について—アレルギー反応局所を中心に—。日血会誌 (1973) **36**, 93—97.
  - 8) Isizaka K and Isizaka T: Identificaion of  $\gamma$  E-antibodies as a carrier of reaginic activity. J Immunol (1967) **99**, 1187—1198.
  - 9) Isizaka K, Tomioka H and Isizaka T: Mechanisms of passive sensitization: I. Presence of IgE and IgG molecles on human leukocytes. J Immunol (1970) **105**, 1459—1467.
  - 10) Isizaka T, Tomioka H and Isizaka K: Degranuration of human basophil leukocytes by anti- $\gamma$  E antibody. J Immunol (1971) **106**, 705—710.
  - 11) Hastie R: The antigen-induced degranulation of basophil leukocytes from atopic subjects, studied by phase-contrast microscopy. Clin Exp Immunol (1971) **8**, 46—61.
  - 12) 木村郁郎, 谷崎勝朗, 佐藤周一, 高橋 清, 上田暢男, 齊藤勝剛: アトピー型気管支喘息と好塩基球—位相差顕微鏡と微分干渉顕微鏡所見—。臨免疫 (1974) **6**, 1039—1047.
  - 13) Tanizaki Y, Komagoe H, Sudo M, Morinaga H, Kitani H, Tada S, Takahasi K and Kimura I: Histamine release from whole blood induced anti-IgE: Relationship to patient age, age at onset and serum IgE levels. Acta Med Okayama (1984) **38**, 275—280.
  - 14) Tanizaki Y, Komagoe H, Sudo M, Morinaga H, Kitani H, Nakagawa S, Takahasi K. and Kimura I: Reactivity of sensitized basophils, as expressed by histamine release. Jpn J Allergol (1984) **33**, 31—35.
  - 15) Siraganian RP: An automated continuous-flow system for the extraction and fluorometric analysis of histamine. Anal Biochem (1974) **57**, 383—394.
  - 16) Siraganian RP and MJ Brodsky: Automated histamine analysis for in vitro allergy testing. I. A method utilizing allergen induced histamine release from whole blood. J Allergy Clin Immunol (1976) **57**, 525—540.
  - 17) Tanizaki Y, Komagoe H, Sudo M, Morinaga H, Kitani H, Goda Y, Tada S, Takahasi K and Kimura I: IgE-mediated histamine release from whole blood in atopic asthmatics. Jpn J Allergol (1983) **32**, 1079—1083.
  - 18) Tanizaki Y, Komagoe H, Sudo M, Kitani H, Goda Y and Kimura I: Allergen-and anti-IgE-induced histamine release from whole blood. Int Arch Allergy Appl Immunol (1984) **73**, 141—143.
  - 19) 木村郁郎, 谷崎勝朗, 佐藤周一, 高橋 清, 上田暢男, 齊藤勝剛: アトピー型気管支喘息と好塩基球—好塩基球脱顆粒試験—。日臨 (1974) **6**, 865—869.
  - 20) Marone G, Kagey-Sobotka A and Lichtenstein LM: IgE-mediated histamine release from human basophils: Differences between antigen E-and anti-IgE induced secretion. Int Archs Allergy Appl Immunol (1981) **65**, 339—348.

**Studies on the reactivity of human basophilic leukocytes  
Part 1. Correlation between morphological changes of  
human basophilic leukocytes and histamine release  
after stimulation with antigen or anti-IgE**

**Saburo NAKAGAWA**

**Second Department of Medicine,  
Okayama University Medical School,  
Okayama 700, Japan**

**(Director : Prof. I. Kimura)**

Morphological changes in human basophils from atopic asthmatics were observed in whole blood smears with respect to histamine release after stimulation with antigen or anti-IgE. Histamine was rapidly released and was accompanied by morphological changes in basophils upon stimulation with antigen and anti-IgE.

A decreased number of basophils and morphological changes including increased cell diameters, increased ratios of the short to long axis diameters, and decreased intracellular granule counts were observed upon the release of histamine after antigen and anti-IgE stimulation. Antigen stimulus induced both more rapid histamine release and morphological changes than anti-IgE stimulation.