

原 著

マイコプラズマによる白血球ヒスタミン遊離と
skin test における検討

東京女子医科大学第二病院 小児科 (部長: 草川三治教授)

キフジカヨコ コイズミマリコ ホンジョウミチエ
木藤香代子・小泉真理子・本城美智恵ハシモト セツコ トミタ ユウスケ
橋本 節子・富田 有祐

東京女子医科大学 微生物学教室

アラ アケ ミ ナ コ
荒 明 美 奈 子

(受付 昭和62年6月18日)

Study on Histamine Release from Human Leukocytes after Challenge
with Mycoplasma and Skin TestsKayoko KIFUJI, Mariko KOIZUMI, Michie HONJO,
Setsuko HASHIMOTO and Yusuke TOMITADepartment of Pediatrics (Director: Prof. Sanji KUSAKAWA)
Tokyo Women's Medical College Daini Hospital

Minako ARAAKE

Department of Microbiology, Tokyo Women's Medical college

We studied histamine release rates from human leukocytes after challenge with mycoplasma antigens and performed skin tests using these antigens.

The histamine release rates and positive rate of the immediate skin reaction were high with *M. pneumoniae*, which is closely associated with human infection. These findings suggest that histamine release is mediated by IgE produced with human leukocyte with *M. pneumoniae*. However in children without asthma, histamine was also released from leukocytes after challenge with mycoplasma antigens, and immediate and delayed skin reactions were positive, which shows the possibility of immunological mechanisms that are not mediated by IgE or non-immunological mechanisms.

はじめに

気管支喘息の発症または増悪に感染が関与していることは、日常診療の場でしばしば経験することである。中でも *Mycoplasma pneumoniae* (以下 M.p. と略す) 感染に関しては、喘息発作に重要な役割を果していると考えられている^{1)~3)}が、その機序については明らかにされていない。

今回我々はヒト白血球にマイコプラズマ抗原を添加した場合のヒスタミン遊離率を、非喘息児で

M.p. の間接赤血球凝集反応 (以下 IHA と略す) 抗体の上昇を認めないものと認めたもの、喘息児で IHA 抗体の上昇を認めないものと認めたもの、以上4グループについて検討し、あわせて skin test についても検討したので報告する。

方 法

1. 白血球ヒスタミン遊離

マイコプラズマ抗原は、*M. orale* (以下 M.o. と略す)、*M. hominis* (以下 M.h. と略す)、M.p. を

液体培地 (PPLO broth) で1週間培養して, 1分間13,000回転で遠沈し, Tris buffer で3回洗浄した後20kHzで30秒間sonicateしたもので, 蛋白量はM.o., M.h. では $15\mu\text{g/ml}$, M.p. では $15\mu\text{g/ml}$, $150\mu\text{g/ml}$ とに調整した. 抗体価の測定は, IHA法によった. IHA抗体測定は, 富士レビオ製

のセロダイア-MYCOを用い, ペア血清の場合は4倍以上の上昇があったもの, 単独血清の場合は全希釈倍数で640倍以上の患児を対象とした. 非喘息児でIHA抗体上昇を認めないもの5名, 認められたもの3名, 喘息児でIHA抗体上昇を認めないもの5名, 認めたもの4名であった.

白血球ヒスタミン遊離率は, 以下の方法で求めた (図1). まず Tris CM buffer を用いて作製した白血球浮遊液1.8mlに, Tris CM buffer で調整したマイコプラズマ抗原液0.1mlと Tris CM buffer 0.1mlを加え全体で2.0mlとする. これを 37°C , 60分間incubateし, 次いで6分間遠心 (0°C , 1,500回転/分 \div 415G)して上清と細胞層に分け, Shore⁴⁾, Anton⁵⁾の変法 (図2)によってヒスタミンを抽出・測定した. ヒスタミン遊離率は, 次の式に従って求めた.

$$A = \frac{B}{B+C} \times 100$$

A = 特異的ヒスタミン遊離率 (%)

B = 上清中のヒスタミン量

C = 細胞中のヒスタミン量

また対照として, マイコプラズマ抗原液の代わりに, Tris CM buffer を加えた場合の非特異的ヒスタミン遊離率も同様に求めた.

2. skin test

非喘息患者5名と喘息患者5名にマイコプラズマ抗原液を各々 $15\mu\text{g/ml}$, $150\mu\text{g/ml}$ の濃度のものを0.02ml使用し, skin testを行なった. 判定は, 即時型は15分後, 遅延型は24時間後, 48時間後に行なった.

結果

1. 白血球ヒスタミン遊離 (図3)

まず4グループの結果を総合して, 対照の Tris buffer 添加群と, マイコプラズマ抗原添加群を比較すると, 対照は $18.1 \pm 5.0\%$ なのに対し, M.o. 添加群では $23.9 \pm 7.1\%$, M.h. 添加群では $24.0 \pm 6.6\%$, M.p. 添加群では $15\mu\text{g/ml}$ の濃度で $30.2 \pm 9.9\%$, $150\mu\text{g/ml}$ の濃度で $32.0 \pm 9.3\%$ とそれぞれ危険率0.01以下で有意にマイコプラズマ抗原添加群のヒスタミン遊離率が高かった. ことにM.p. については高いといえる.

Control (non specific histamine release)		
WBC in TCM+TCM		} 37°C 60m } histamine assay
1.8ml	0.2ml	
Mycoplasma related histamine		
WBC in TCM+TCM+M in TCM		
1.8ml	0.1ml 0.1ml	

TCM: Tris CM buffer, M: Mycoplasma

図1 Schematic diagram for measuring histamine release from human leukocytes

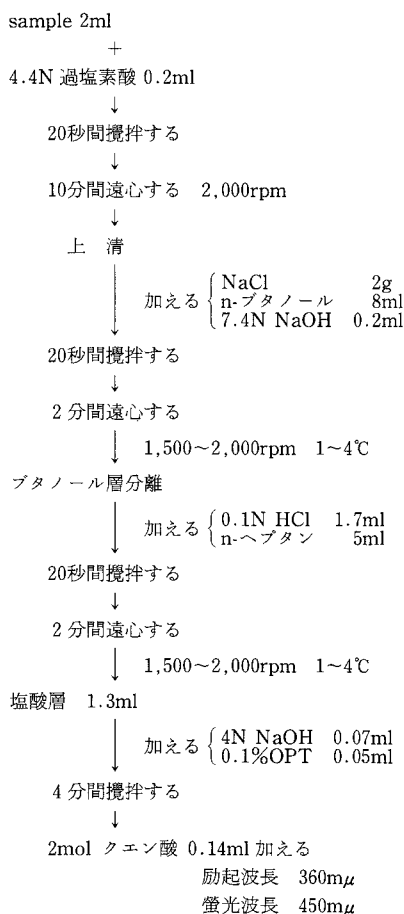


図2 ヒスタミンの抽出および測定

次に、4グループそれぞれに関して検討してみると(図4)、全体に個体差が大きく、対照との差が最高31.4%に遊離する症例からほとんど遊離しない症例まであった。また、それぞれのグループのヒスタミン遊離率の平均値をみると、非喘息児

群ではIHA抗体非上昇群では、対照17.1%、M.o.添加群25.2%、M.h.添加群25.2%、M.p. 15 μ g/ml添加群34.2%、M.p. 150 μ g/ml添加群36.8%であった。非喘息児群でIHA抗体上昇群では、対照18.7%、M.o.添加群22.4%、M.h.添加群19.8%、

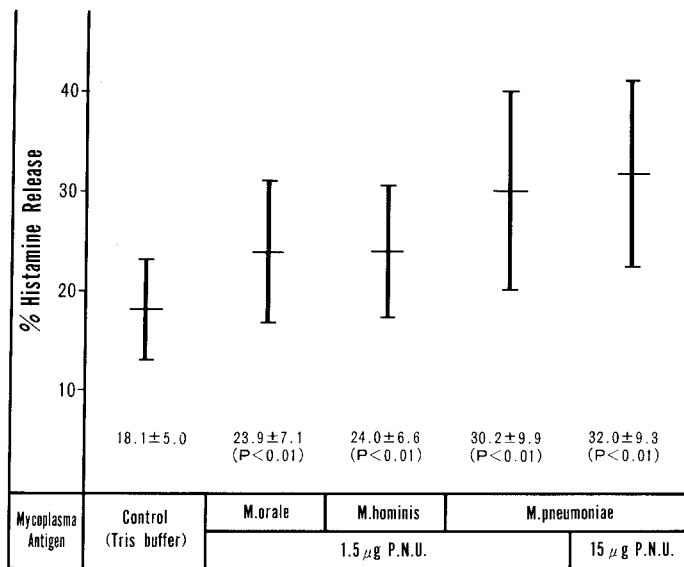


図3 Histamine release from human leukocytes after challenge with mycoplasma 1

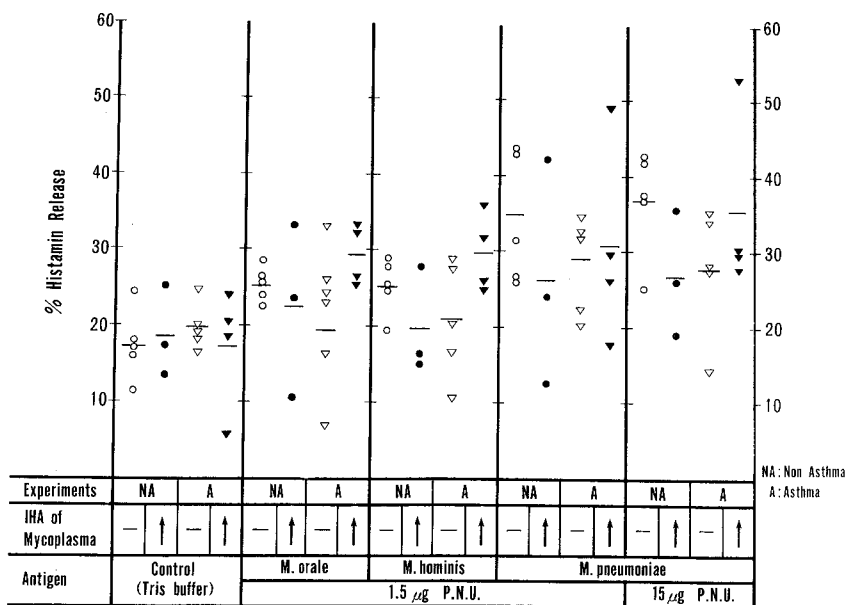


図4 Histamine release from human leukocytes after challenge with mycoplasma 2

表1 Mycoplasma 抗原による皮内テスト陽性者

抗原蛋白濃度 判定時間		M. orale		M. hominis		M. pneumoniae	
		15 μ g/ml	150 μ g/ml	15 μ g/ml	150 μ g/ml	15 μ g/ml	150 μ g/ml
15分後	NA	0/5	3/5	1/5	3/5	3/5	5/5
	A	2/5	1/5	0/5	1/5	2/5	5/5
24時間後	NA	0/5	4/5	2/5	3/5	4/5	5/5
	A	0/5	5/5	0/5	3/5	3/5	4/5
48時間後	NA	0/5	4/5	2/5	2/5	4/5	5/5
	A	0/5	5/5	1/5	3/5	4/5	3/5

A: Asthma NA: Non Asthma

M.p. 15 μ g/ml 添加群26.3%, M.p. 150 μ g/ml 添加群26.8%であった。喘息群で IHA 抗体非上昇群では、対照19.7%, M.o. 添加群19.3%, M.h. 添加群20.8%, M.p. 15 μ g/ml 添加群28.1%, M.p. 150 μ g/ml 添加群27.6%であった。喘息群で IHA 抗体上昇群では、対照17.1%, M.o. 添加群29.0%, M.h. 添加群29.7%, M.p. 15 μ g/ml 添加群30.6%, M.p. 150 μ g/ml 添加群35.2%であった。このように、非喘息群と喘息群、IHA 抗体非上昇群と IHA 抗体上昇群との間には、はっきりとした有意差は出なかった。しかし、喘息群で IHA 抗体上昇のあった例では、特に M.p. に関して遊離の高いものが見られた。

2. skin test (表1)

非喘息群と喘息群に大きな差を認めなかった。M.p. に関しては即時型、遅延型とも陽性率が高く、M.o. と M.h. は抗原の濃度が高いものに、遅延型の陽性率が高いことが認められた。

考 察

M.p. 感染は、喘息発作に重要な役割を果たしていると考えられている。赤坂ら⁶⁾は、喘息発作中、肺炎合併時の M.p. の培養陽性率が高い傾向を示していることを報告しており、上原ら⁷⁾は、M.p. に対する IHA 抗体の上昇が発作の有無と発作の程度に関連していることを報告している。しかし、M.p. 感染がどのような機序で発作と関連しているのかは明らかにされていない。現在のところ、M.p. 感染により気道の過敏性が高まること⁸⁾と、アレルギーの機序が関与しているという報告が散見される。後者については、Tipirneni ら⁹⁾の喘息

児で M.p. に対する IgE 抗体を認めたとの報告や、堀内¹⁰⁾の M.p. 粗抽出液で小児・成人合計322人に皮内テストを行い、即時型反応陽性が31人(9.3%)に認められ、P-K 反応は皮内反応陽性者17例中9例に陽性反応を認めたとの報告から、IgE を介する I 型アレルギーの機序が考えられる。

今回の我々の報告では、ヒトの感染と関係の深い M.p. によって白血球のヒスタミン遊離率が高い傾向があり、即時型 skin test が陽性になることから、M.p. による IgE 産生により IgE を介したヒスタミン遊離がおきていると考えられた。しかし、非喘息児においても、マイコプラズマ抗原の添加により白血球のヒスタミン遊離が認められ、即時型 skin test も陽性になることもあり、さらに skin test で遅延型反応も認められることから、IgE を介さない免疫学的機序あるいは非免疫学的機序も考えられた。

IgE を介さない免疫学的機序の1つとしては、生体内ではインフルエンザ・ウイルスと同様に neuraminidase の関与¹¹⁾¹²⁾や、interferon induce¹³⁾が考えられ、非免疫学的機序では、レクチン物質¹⁴⁾など M.p. の構成成分によりヒスタミン遊離機序など、種々の機構が考えられた。非喘息群と喘息群、IHA 抗体非上昇群と IHA 抗体上昇群では明らかな差は見られなかったが、症例数が少ないためと考えられ、今後症例を増やしてさらに詳細に検討していく予定である。

稿を終えるにあたり、マイコプラズマ抗原の使用に

ついでご配慮ご助言を頂いた、東京女子医科大学微生物学教室、吉岡守正教授に深謝いたします。また同時に、ご校閲を頂いた草川三治教授に深謝いたします。

この論文の要旨は、第23回日本小児アレルギー学会で発表した。

文 献

- 1) **Berkovich S, Millian SJ, Snyder RD**: The association of viral and mycoplasma infections with recurrence of wheezing in the asthmatic child. *Ann Allergy* 28 : 43-49, 1970
- 2) **Huhti E, Mokka T, Nikoskelainen J et al**: Association of viral and mycoplasma infections with exacerbations of asthma. *Ann Allergy* 33 : 145-149, 1974
- 3) **Horn MEC, Gregg I**: Role of viral infection and host factors in acute episodes of asthma and chronic bronchitis. *Chest* 63(Suppl) : 44-48, 1973
- 4) **Shore PA, Burkhalter A, Cohn VH Jr**: A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 127 : 182, 1959
- 5) **Anton AH, Sayre DF**: Modified fluorometric procedure for tissue histamine and its distribution in various animals. *J Pharmacol Exp Ther* 166 : 285, 1968
- 6) 赤坂 徹, 鈴木五男, 山中喜弘ほか: 小児呼吸器疾患における *Mycoplasma pneumoniae* の分離と臨床所見. *埼玉医大誌* 4 : 255-264, 1977
- 7) 上原すゞ子, 寺島 周, 桜井信清ほか: 感染と気管支喘息. *小児科 Mook*, No. 2, 小児気管支喘息 : 92-103, 1978
- 8) **Boushey HA, Holtzman MJ, Sheller JR et al**: Bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 121 : 389, 1980
- 9) **Tipirneni P, Moore BS, Hyde JS et al**: IgE antibodies to mycoplasma pneumoniae in asthma and other atopic disease. *Ann Allergy* 45 : 1-7, 1980
- 10) 堀内俊晴: 気管支喘息における *Mycoplasma Pneumoniae* の抗原性に関する研究. *アレルギー* 21 : 336, 1972
- 11) 富田有祐: 小児気管支喘息の病理. *小児科 Mook*, No. 2, 小児気管支喘息 : 58-71, 1978
- 12) 吉良登志子: 感染型喘息成立機序に関する研究. 第1編. neuraminidaseによるヒト白血球 histamine 遊離反応. *慈医誌* 94 : 1069-1073, 1979
- 13) **Ida S, Hooks JJ, Siraganian RP et al**: Enhancement of IgE mediated histamine release from human basophils by viruses; role of interferon. *J Exp Med* 145 : 892-906, 1977
- 14) **Barile MF, Razin S**: The Mycoplasmas I; *Cell Biology*. pp289-322, Academicpress, New York (1979)