

各種疾患における DNCB 試験について

川崎医科大学 皮膚科

中川昌次郎, 箕持 淳

武井洋二, 三村 茂

幸田 衛, 益田 俊樹

植木 宏明

(昭和54年8月22日受付)

DNCB Test in Various Diseases

Shojiro Nakagawa, Atsushi Hatamochi

Yoji Takei, Shigeru Mimura

Mamoru Kohda, Toshiki Masuda

and Hiroaki Ueki

Department of Dermatology, Kawasaki Medical School

(Accepted on Aug. 22, 1979)

各種疾患患者78例について DNCB 試験を行なった結果、悪性腫瘍、自己免疫性疾患、アトピー性皮膚炎、結節性紅斑、潰瘍性大腸炎において陰性例が多くみられた。

Sensitization to DNCB was attempted by an application of the chemical to skin in 78 patients with various diseases. Patients with malignant tumors, autoimmune diseases, atopic dermatitis, erythema nodosum and ulcerative colitis were found to have a greater tendency to show negative reaction in patch testing with DNCB.

I. はじめに

近年個体の免疫能が病因、病態、経過、予後などと深く関連することが明らかになるにつれ、種々の疾患における免疫能の研究が盛んに行なわれるようになった。個体の免疫応答は細胞性免疫と液性免疫に大別されるが、in vivo における細胞性免疫能の検索にはツベルクリン反応、DNCB 試験など遅延型皮膚反応が繁用されている。今回我々は種々の疾患患者につい

て DNCB 試験を行なったのでその結果を報告する。

II. 検査方法

1. 対象：昭和51年7月から昭和54年6月までの3年間に当科外来を訪れ、あるいは入院した各種疾患患者で、年齢は2歳から80歳、男性69例、女性74例、合計143例である。原則として初診時あるいは初回入院の治療を開始しない時点で検査した。

2. DNCB 試験：感作は5% 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) エタノール溶液 0.04 ml (2,000 μ g) を前腕屈側の直径 1.5 cm の円内に塗布して行ない、衣服などで擦れて他部に付着しないよう円型にくり抜いたスポンジを塗布部位に接着させ、その上を包帯で覆った。また同時に0.5, 0.25, 0.1% DNCB エタノール溶液 0.01 ml (50, 25, 10 μ g) を前腕屈側の直径 1 cm の円内に塗布した。塗布後24時間これら塗布部の一次刺激反応を観察した。一部の症例で感作部位に一次刺激反応が消退した後再び炎症症状が生ずる spontaneous flare up 反応が観察された (Fig. 1)。

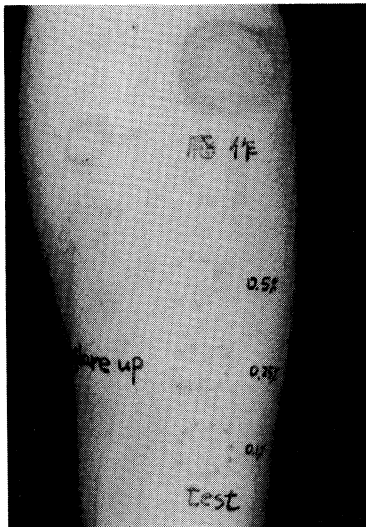


Fig. 1. spontaneous flare up 反応。感作13日後、2,000, 50, 25, 10 μ g 塗布部に発赤と浸潤が再燃 (感作, flare up と書いてある部分)。

誘発試験は flare up 反応がみられた症例ではそれを確認した時点で、明らかでない例では原則として1ヵ月後に、0.5, 0.25, 0.1% DNCB エタノール溶液 0.01 ml を反対側前腕屈側の直径 1 cm の円内に塗布して行ない、24時間後に判定した。一次刺激反応, flare up 反応, 誘発反応の強さは international contact dermatitis research group の判定基準に基づき, -, 反応なし, +?, 軽い紅斑のみ, +, 紅斑, 浸潤, とときに少数の丘疹, 卍, 紅斑, 浸潤, 丘疹, 小水疱, 卍, 水疱化の5段階に分け, 各段階を

0, 0.5, 1, 2, 3 と数量化して各々の濃度の反応の強さを表わし, これらを合計して総合の反応の強さとした (Table 1)。

3. PPD 反応：一般診断用 purified protein delivertive (PPD) 0.05 μ g/0.1 ml を前腕屈側に皮内注射し, 48時間後に発赤, 硬結の直径を測定した。反応の強さを日本結核予防会の基準に基づき, -, 反応なし, ±, 発赤 5 mm 以上, 硬結なし, 以下発赤と硬結の大きさを+, 10mm 以上, 5 mm 以上, 卍, 30 mm 以上, 15mm, 卍, 50 mm 以上, 30 mm 以上と判定した。

III. 成績

144 例に DNCB を塗布して感作したが, その内78例に flare up 反応あるいは誘発試験により感作成立の有無が確認された (Table 1)。flare up 反応の確認のみで誘発試験が行なわれなかった例は19例あり (Table 1 f. u. と付記), 他は flare up 反応がみられた時期あるいは感作後1ヵ月以上を経て誘発試験が行なわれた (Table 1 陽性例に総合判定の数字を付記)。個々の疾患の症例数が少ないため疾患別の陽性率など数量的な処理が出来なかったが, 悪性腫瘍, 自己免疫性疾患, アトピー性皮膚炎, 結節性紅斑, 潰瘍性大腸炎の症例で感作不成立例が多くみられた。中でも悪性リンパ腫, 多発性骨髄腫などリンパ組織の悪性増殖を来す疾患に特に陰性例が多くみられた。DNCB 試験と PPD 反応の結果の相関をみると両反応の陽, 陰一致例28例, 不一致例は18例であった (Table 2)。

感作後 flare up 反応が出現する迄の時間は6から20日後であった (Fig. 2)。また flare up 反応は 2,000 μ g DNCB を塗布した部位だけではなく, 相当数 50 μ g 以下の部位にもみられた (Table 3)。flare up 反応と誘発反応との相関をみると, 殆どどの症例で両反応の結果は一致した (Table 4)。

感作時に観察した DNCB 各濃度の一次刺激反応をみると 2,000 μ g には40.8%, 50 μ g 25.9

Table 1. 各種疾患における DNCB 試験 PPD 反応

年齢別	病名	DNCB	PPD	年齢別	病名	DNCB	PPD
64 M	悪性リンパ腫	-	-	63 F	皮膚筋炎	-	±
63 F	" "	+ 1.0		78 F	水疱性類天疱瘡	+ 1.0	
74 F	" "	-		72 F	尋常性天疱瘡	-	卅
52 M	ホジキン病	-	-	11 F	アトピー性皮膚炎	-	
56 F	急性リンパ性白血病	-		22 F	" "	-	-
67 F	多発性骨髄腫	-		15 F	" "	+ 3.0	
64 M	" "	-	+	2 M	" "	+ f. u.	
54 F	" "	-		18 F	" "	+ f. u.	±
68 F	乳癌(転移性)	-		35 F	結節性紅斑	-	+
53 F	" "	+ 1.0		38 F	" "	-	卅
60 F	" (再発性)	-	卅	49 F	" "	+ 3.0	
54 F	肺癌	+ f. u.		47 M	尋常性乾癬	+ f. u.	+
63 M	" "	-	+	76 M	" "	+ 1.0	+
56 F	大腸癌(肝転移)	+ 3.5		19 F	" "	+ f. u.	卅
64 F	胃癌(带状疱瘡)	+ 6.0	+	73 M	薬疹(紅皮症型)	-	
72 M	有棘細胞癌	-	+	54 M	" (肝障害)	+ f. u.	
72 M	" "	+ 1.0	-	42 M	尋常性白斑	+ 1.0	+
64 M	" "	+ 1.0		33 M	皮膚掻痒症	-	
76 F	ボーエン癌	-	-	21 M	集簇性瘡瘡	+ 1.0	+
28 M	悪性黒色腫	+ f. u.	+	22 F	人工蕁麻疹	+ f. u.	+
46 M	" "	-	-	14 M	蚊アレルギー	+ 0.5	
67 F	基底細胞癌	-	+	64 M	放射線皮膚炎	+ 0.5	卅
60 M	乳房外ページェット病	+ f. u.	-	50 F	環状紅斑	+ f. u.	
57 F	血管肉腫	-	-	4 M	チェルズス禿瘡	+ 2.5	
58 M	带状疱瘡	+ 4.0		37 F	丘疹状壞疽性結核疹	+ 3.5	卅
69 M	" "	+ 6.0		49 M	" "	+ f. u.	卅
63 M	" (汎発化)	-		18 F	潰瘍性大腸炎	-	-
57 F	" "	+ f. u.	-	27 M	" "	-	
36 M	" "	+ 3.0	+	29 M	" "	+ 4.5	
24 M	単純性疱瘡	+ f. u.		30 M	サルコイドーシス	+ 0.5	
39 F	" "	+ f. u.	+	75 F	" "	-	
43 M	" "	+ f. u.	+	21 M	多発性小腸潰瘍	-	±
25 M	水痘	+ f. u.	+	26 M	好酸球性肉芽腫	+ f. u.	
29 F	S L E	+ 1.0	-	49 M	WPW 症候群	+ 3.5	卅
34 M	" "	+ 1.0	+	50 M	腸ランブリア症	+ f. u.	
32 F	" "	+ 1.0	+	61 M	クロンクハイトカナダ症候群	+ 4.5	
51 F	P S S	-	+	45 M	純赤芽球癆	+ f. u.	
23 M	ペーチェット病	-	+	51 F	ポリボージス	+ 1.5	-
50 F	" "	+ 2.5	+	48 M	肺, 舌結核	+ 3.0	

%, 25 µg に 7.4%, 10 µg に 0.7% が何らかの刺激反応を示した (Fig. 3). 2,000 µg の DNCB に対して全く反応を表わさない症例があり, これらの症例の誘発試験の結果をみると全て陰性

であった (Table 5).

今回の試験においていくつかの興味ある現象が観察された. 症例 1. 46 歳男性, 悪性黒色腫, 術前 DNCB 試験, PPD 反応とも陰性であ

Table 2. DNCB 試験と PPD 反応の相関

	DNCB	+	-
PPD			
+		20	11
-		7	8

Table 4. flare up 反応と誘発反応の相関

	誘発反応	+	-
flare up 反応			
+		16	1
-		2	11

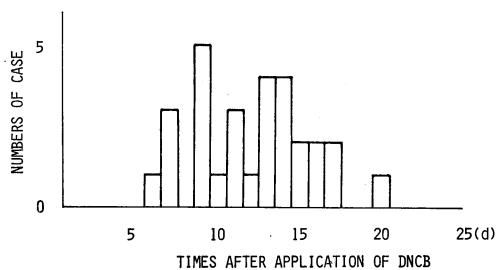


Fig. 2. 感作後 flare up 反応の出現する迄の時間

Table 3. 感作時の DNCB 濃度と flare up 反応

DNCB 濃度	2,000 μ g	50 μ g	25 μ g	10 μ g
+	21	18	12	8
-	0	3	9	13

Table 5. 2,000 μ g DNCB に対する一次刺激反応陰性例

年齢, 性	病 名	DNCB 反応
60 M	帯 状 疱 疹	
47 F	〃 〃	
73 F	〃 〃	
80 F	〃 〃	
63 M	肺 癌	-
72 M	有 棘 細 胞 癌	-
57 F	血 管 肉 腫	-
63 F	皮 膚 筋 炎	-
72 F	尋 常 性 天 疱 瘡	-
60 F	深 在 性 真 菌 症	-
6 M	アトピー性皮膚炎	
73 M	薬 疹 (紅皮症型)	-
63 M	ク ロ ー ン 病	

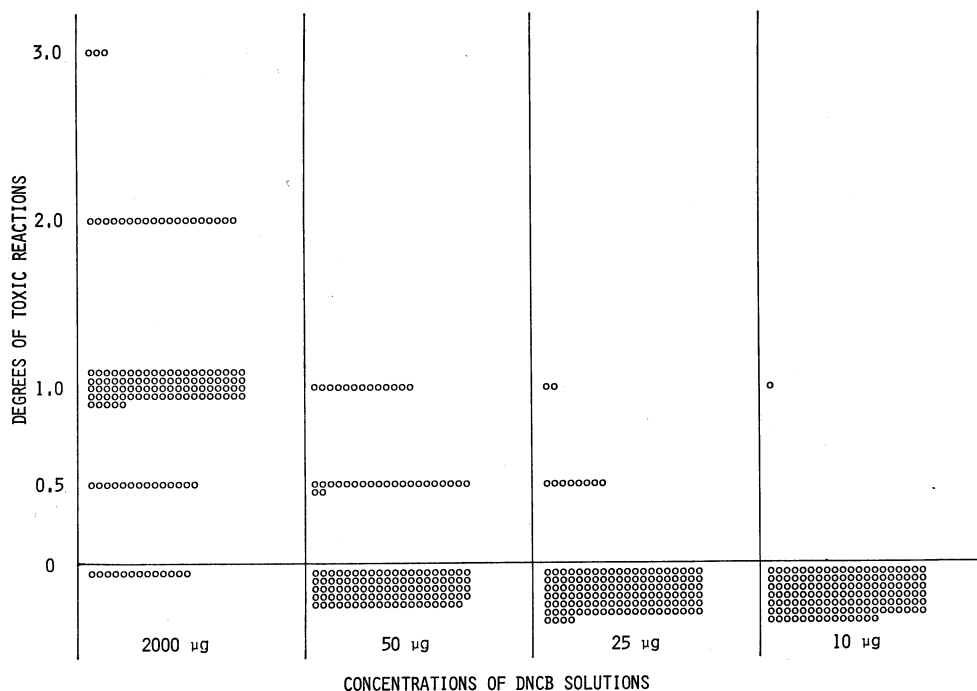


Fig. 3. 1 次 刺 激 反 応

ったが、術後半年の検査で両者とも陽転、以後陽性を保ち、黒色腫の経過は再発もなく良好である。症例2. 22歳女性、人工蕁麻疹、感作9日後に感作部位に flare up 反応が現われ、同時に両手指、下腿屈側に地図状浮腫性紅斑が出現した (Fig. 4)。症例3. 29歳男性、潰瘍性大

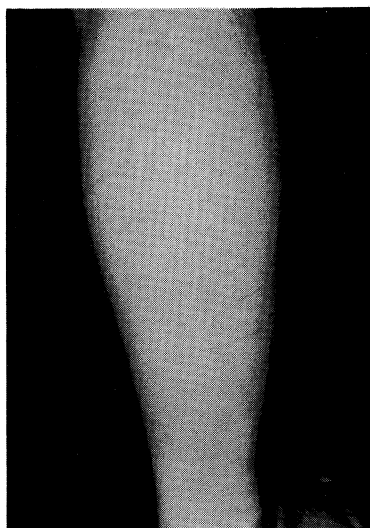


Fig. 4. flare up 反応出現と同時にみられた浮腫性紅斑

腸炎、感作13日後に 2,000 μ g 塗布部位に flare up 反応が出現し、その時点で行なった誘発試験では各濃度陽性の結果が得られた。感作30日後再び反対側の前腕で誘発試験を行なったところ、flare up 反応部位 (2,000 μ g 塗布部)、前回の誘発反応部位 (感作13日後の試験部) にも発赤がみられた。同様の所見は他の1例でも観

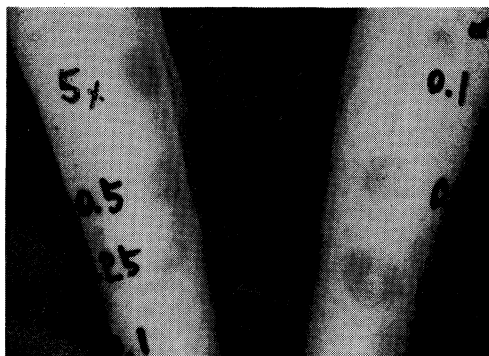


Fig. 5. 左腕で誘発試験を行なったところ、右腕の感作時塗布部位に発赤、浸潤出現

察された、症例4. 48歳男性、肺および舌の結核、感作後 flare up 反応はみられず33日後に反対側前腕で誘発試験を行なったところ、感作部位 (2,000, 50, 25 μ g DNCB 塗布部) に発赤がみられた (Fig. 5)。

IV. 考 察

免疫反応に質的あるいは量的に異常のある疾患は免疫異常病 (免疫病) と総称され、これは臨床的に免疫反応が異常に低下している免疫不全症候群 (先天性免疫不全症候群、後天性免疫不全症候群)、逆に亢進した状態のアレルギー (アトピー性疾患、免疫複合体病) あるいは自己抗体のように質的に異なった抗体の出現する自己免疫性疾患 (臓器特異性自己免疫性疾患、全身性自己免疫性疾患) に大別することができたり。また個体の免疫反応の状態を分析するには種々の方法があり、まず液性免疫能については、(1) 血清 γ グロブリンの定量、(2) 血清免疫グロブリンの定量、(3) 免疫グロブリン産生細胞、B cell の測定、(4) 抗体の測定 (同種、異種赤血球凝集素、抗ブドウ球菌、カンジダ、大腸菌抗体、ASLO, Schick test など自然抗体の測定、ジフテリア、破傷風、ポリオ、チフスなどワクチンあるいは肺炎双球菌、インフルエンザ桿菌の多糖類やフラゲリンなどを接種してその抗体の測定) (5) 自己抗体の測定、(6) mitogen に対する B cell の試験管内反応性の検討 (poke weed mitogen, lipopolysaccharide など) (7) T cell による B cell の成熟の抑制の検討、(8) T cell 因子による B cell の成熟の検討、(9) helper T cell に対する B cell の反応性の検討、(10) 免疫グロブリンの異化の検討、(11) B cell の分化段階の検討、などが行なわれている。一方細胞性免疫については、(1) 遅延型皮膚反応、(2) 同種移植拒否反応、(3) 抗原、mitogen に対する T cell の試験管内反応性の検討 (同種白血球など抗原あるいは phytohaemagglutinin (PHA), concanavalin A など mitogen を用いた幼若化試験、マクロファージまたは白血球遊走阻止試験、細胞

障害性試験, DNA 合成の測定など) (4) T cell の測定, (5) T cell の芽球化反応抑制因子の検討, (6) マクロファージの機能の検討, (7) T cell の欠陥段階の検討などが行なわれる²⁾. *in vivo* において個体の細胞性免疫能を検査することができる遅延型皮膚反応には, (1) recall antigen (PPD, カンジダ, トリコフィティン, mumps-virus, streptokinase, streptodornase など), (2) newly encountered antigen (DNCB, DNFB, keyhole limpet haemocyanin など), (3) 植物凝集素 (PHA などレクチン) (4) 特異抗原 (腫瘍抗原など) の4つに大別される抗原が用いられるが³⁾, 抗原の種類によって検査の意味が異なる. すなわち (1) を用いた検査は既にこれらの抗原に対して自然感作された生体の免疫記憶反応をみるものであり, (2) は日常遭遇する可能性の少ないこれらの抗原で生体を感作してその反応をみるもので, 感作の成立からその発現までの細胞性免疫の全段階をみる事ができる. (3) は mitogen を皮内接種してその反応をみるもので, リンパ球の機能を表わすとされ, (4) は担癌患者など癌そのものに対する免疫反応の状態をみる事ができる.

DNCB 試験のメカニズムは Fig. 6 に示すように, 感作過程, 領域リンパ節, 誘発過程の3段階に分れ, これらの全ての過程が機能して初

めて反応が現れると考えられている. 皮膚表面に塗布された DNCB は皮膚内に浸透して表皮成分など (特に膜成分) と化学的に結合して抗原となり, 輸入リンパ管を経て領域リンパ節に達する. リンパ節ではその抗原刺激により感作リンパ球が産出され, それは輸出リンパ管を経て血流に入り体内を循環する. この時点で感作時の抗原が皮膚に十分残存しておればこの抗原に血管から皮膚に遊走した感作リンパ球が反応して flare up 反応が現われる. 更に誘発試験により再度 DNCB が塗布されると感作の際と同様に表皮成分と結合して抗原を形成し, これと感作リンパ球が表皮内で反応して誘発反応が生じる. flare up 反応と誘発反応とは同じ意味をもちともに感作の成立と発現を示し, Table 4 の結果は flare up 反応と誘発反応が相関していることを示唆している.

悪性腫瘍患者とくにリンパ系組織の悪性増殖を来す疾患において, ツベルクリン反応を初めとする遅延型皮膚反応が減弱していることは古くから知られており^{1), 4)}, 近年 immunological surveillance の概念のもとに腫瘍免疫学が著しい進歩をとげ, 腫瘍と個体の免疫反応との関係が次第に明らかとなってきた. ツベルクリン反応, DNCB 試験など遅延型皮膚反応は *in vivo* における腫瘍患者の細胞性免疫能のパラメーターとして確立され, 予後の推定, 治療方法の選択, 治療効果の判定などに利用されている⁵⁾. 今回の我々の成績においても DNCB 試験, PPD 反応とも悪性腫瘍症例, とくにリンパ系腫瘍患者に陰性例が多くみられた. その他 PSS, ベーチェット病, 皮膚筋炎, 尋常性天疱瘡など自己免疫性疾患, アトピー性皮膚炎, 結節性紅斑, 潰瘍性大腸炎の症例に陰性例がみられた. SLE, 皮膚筋炎, アトピー性皮膚炎患者は DNCB 試験に陰性を示す例が多いことは指摘されている⁶⁻⁹⁾.

症例 3, 4 において観察された現象は所謂 flare up phenomenon として以前より知られている¹⁰⁾. アレルギー性接触皮膚炎を生じた部位はのちに接触原 (ハプテン) を静注あるいは他の部位に塗布することによって再び炎症症状

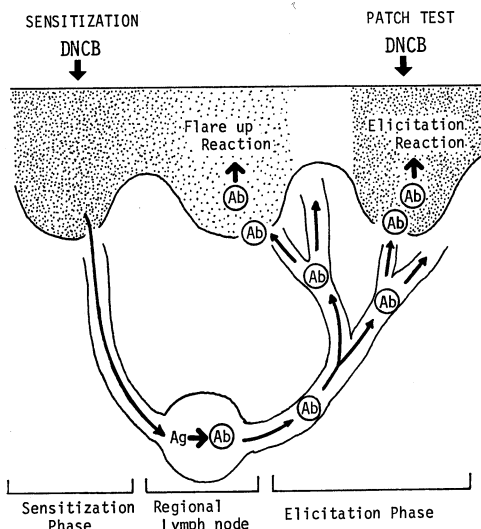


Fig. 6 DNCB 試験のメカニズム

を示すという現象であり、静注あるいは塗布されたハプテンが血流を経て表皮成分と結合し、それとあつて皮膚炎を生じた部位に残存している感作リンパ球とが反応して生ずると考えられている¹¹⁾。症例4は気付かない程度に flare up 反応が生じていたと思われる。

今回得られた成績から次の点を示唆される。

- (1) DNCB 2,000 μ g は感作に十分な量である。
- (2) 塗布3週間後には感作は成立している。
- (3) DNCB 10 μ g の塗布により一次刺激反応は生じない。
- (4) 誘発3日後に反応は最高に達する例が多い。これを基に今後 Fig. 7 に示すスケジュールで DNCB 試験を行ないたいと考えている。

DNCB 試験	
感 作	誘 発
月 日	感作3週間後 月 日
5% DNCB エタノール 溶液 0.04 ml を前腕屈 側の直径 1.5 cm の円内 に塗布	0.1, 0.05, 0.025 % DNCB エタノール溶液 0.01 ml を前腕屈側の直 径 1 cm の円内に塗布
	判 定
	誘発3日後 月 日
	± (0.5) : 部分的な紅斑 + (1) : 環, 円形の紅斑 ときに軽い浸潤 卍 (2) : 紅斑, 明らかな浸潤 卍 (1) : 紅斑, 浸潤, 丘疹, 小水疱 総合判定: 各濃度反応の合計
	0.1 %
	0.05 %
	0.025 %
	総合判定
Flare up	感作1~3週間后感作部位に潮紅, 浸潤, 掻痒など炎症症状 (有り, なし, 不明)

Fig. 7. DNCB 試験のスケジュール

文 献

- 1) 植木宏明: 免疫異常と皮膚疾患. あすへの皮膚科展望 '75. 東京, 金原出版. 1975, p. 1
- 2) 矢田純一: 免疫不全. 代謝12 (臨時増刊号, 免疫): 801—809, 1975
- 3) 小林 博, 細川真澄男, 水島 豊: 癌免疫皮膚反応. 日本医事新報 2805: 8—12, 1978
- 4) 加納 正, 高月 清: 単クローン性 γ -グロブリン血症における免疫不全症, 免疫不全症候群. 東京, 医学書院. 1972, p. 108
- 5) 三輪恕紀, 福田範三, 小川 潔, 折田薫三, 田中早苗: リンパ球幼若化率, ツベルクリン反応, DNCB 反応による癌進行度の判定. 外科 36: 477—482, 1974
- 6) 植木宏明: エリテマトーデスの皮膚病変についての免疫組織化学的考察. 臨床免疫 1: 595—609, 1969
- 7) 田久保浩: DNCB 反応について. 臨床皮膚科 24: 1165—1169, 1970
- 8) 石氏道夫: 各種皮膚疾患における末梢血リンパ球 subpopulation と遅延型皮膚反応の関係. 日皮会誌 89: 403—413, 1979
- 9) Forsbeck, M, Hovmark, A. and Skog, E.: Patch testing, tuberculin testing and sensitization with dinitrochlorobenzene and nitrosodimethylanilini of patients with atopic dermatitis. Acta Derm. Venereol. 56: 135—138, 1976
- 10) Polak, L., Turk, J. L. and Frey, J. R.: Studies on contact hyprisensitivity to chromium compounds. Progr. Allergy 17: 145—210, 1973
- 11) Fukushima, S., Nakagawa, S., Gotoh, M., Koshizawa, M. and Tanioku, K.: Distribution of antigen in flare up reaction in contact sencitivity to DNCB. Immunology 34: 549—553, 1978