

即時型皮内検査法による犬のアレルギー性皮膚炎の診断

早崎峯夫 松井利依 紺野克彦 大石 勇

東京農工大学農学部 (府中市幸町 3-5-8, 〒183)

(平成 4 年 6 月 12 日受付・平成 4 年 11 月 12 日受理)

Diagnostic Analysis of Canine Allergic Dermatitis by Immediate Type-Skin Test
Mineo HAYASAKI, Rie MATSUI, Katsuhiko KONNO and Isamu OHISHI
Tokyo University of Agriculture and Technology, School of Veterinary Medicine,
Fuchu-shi, Tokyo 183, Japan

SUMMARY

Twenty-two dogs with allergic dermatitis, which are evaluated from physical findings, and 30 normal dogs were tested for this allergy using the immediate type-intradermal test with 25 allergens, including house dust, red pine pollen, Japanese cedar pollen, ragweed pollen, wheat flour, cow's milk, whole eggs, egg yolks, egg whites, beef, pork, chicken, yeast, dog hair, cat hair, chicken feathers, sheep hair, cigarette smoke, kapok, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Penicillium*, and fleas, with both of the histamine phosphates diluted 1 : 10,000 as the positive control and 0.5% phenol-saline as the negative control. The tests were read 15 min after injection. According to fundamental study for standardization of criterion of the positive response, a positive reaction was determined when the diameter of the wheal at the injection site was larger than the median value between the positive and negative controls. Eleven of the 22 dogs with dermatitis were positive for fleas and one for both fleas and house dust. In 4 of the 30 normal dogs, 2 dogs were positive for fleas and one for ragweed and another one for *Candida*. The histological examination showed marked perivascular infiltrations of basophils, mast cells and eosinophils in the positive site for flea allergen. —**Key Words** : allergic skin disease, allergens, histological examination, immediate type-intradermal test.

.....J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 46, 236~240 (1993)

要 約

アレルギー性皮膚炎の疑われた皮膚病罹患犬 22 頭と正常犬 30 頭について、25 種の各アレルギーと陽性 (1 万倍希釈リン酸ヒスタミン・0.5% フェノール生理食塩液) および陰性 (同フェノール液) 対照液を用いた即時型皮内検査を実施した。判定は 15 分後に行い、陽性反応の判定は基礎的検討を行った結果、被験液の発赤の直径が陽性、陰性対照液の中間値より大きいものを反応陽性とした。その結果、22 頭の皮膚病犬のうち 11 頭 (50%) がノミに陽性を示し、うち 1 頭はハウスダストにも陽性であった。非皮膚病犬では 30 頭のうち 4 頭 (7.5%) がノミ、ブタクサ、カンジダに陽性を示した。ノミアレルギーに対して陽性反応を示した注射部位の組織学的所見では多数の好塩基球やマスト細胞と比較的少数の好酸球の血管性浸潤が認められた。

——**キーワード** : アレルギー性皮膚疾患, アレルギー, 組織学的検査, 即時型皮内検査。

.....日獣会誌 46, 236~240 (1993)

犬のアレルギー疾患は皮膚炎を主症状として発現し、激しい痒痒症を伴って難治性であることが多い。アレルギー疾患の診断は獣医領域では問診や臨床症状によって推定的に下されることが多く、皮内検査、ブリックテスト、パッチテスト等の *in vivo* 検査が日常的に行われることは少ない。しかも、犬におけるアレルギー検査法は必ずしも標準化されていないため、診断液の濃度や判定基準等は報告者によって少しずつ異なる。

そこで、本研究では犬における即時型皮内検査の判定基準の検討とアレルギー皮膚炎の発生状況を調査した。

材料および方法

実験犬群

実験群は、皮膚病群として一般臨床所見の変化と飼育状況⁹⁾からアレルギー性皮膚炎が疑われた犬 22 頭 (表 1) と非皮膚病群として皮膚所見に異常がなく、呼吸器症状や消化器症状も認められない雑種犬 30 頭 [平均年齢 3.5 (1~10<) 歳, 平均体重 12.4 (7.5~24) kg, 雄 12 頭, 雌 18 頭] を用いた。

アレルギー皮内検査

使用したアレルギーは表 2 に示したように 25 種を用

いた。このうちノミアレルゲンを除く24種は市販の診断用アレルギー皮内エキス*を用いた。

ノミアレルゲンは自家製造アレルギー液を用いた。原料のノミは犬より採集したもので犬ノミと猫ノミが任意の割合で混在していた。アレルギーの作製は、まずノミに0.5%フェノール加生理食塩液を少量加え、組織破砕器に入れ、4℃下で15分間ホモジェナイズし、重量容量比で1,000倍となるよう希釈した。次いで、超音波細胞破砕装置を用いて超音波曝射(50W, 15分間)し、12,000rpm, 60分間高速遠心分離を行った。得られた上清は滅菌用フィルター(孔径0.22 μ m, Millipore)にて濾過し、濾液は無菌的に滅菌バイアルに分注し65℃に1時間静置した後、4℃にて保存した。各アレルギーの有効期限は製品表示期限に従い、またノミアレルゲンは作製日より3カ月間とした。陰性対照にはアレルギーの溶解液として用いられている0.5%フェノール加生理食塩液を用いた。陽性対照はリン酸ヒスタミンを0.5%フェノール加生理食塩液で10,000倍に希釈したものをを用いた。前処置として、すでに皮膚炎に対して薬物が投与されている症例は、皮内検査前に2週間の休業期間を置いた。アレルギーの注射部位は胸部側面または腹部側面としバリカンで皮膚面に傷をつけないように注意深く毛を刈り、油性マジックインクを用いて3cm間隔で点を列状に打ち注射部位の目印とした。皮内注射には1ml ツベルク

リン用シリンジと皮内注射用(27Gx1/2)2段針を用いた。皮内反応の発現性は抗原注射量よりはむしろ抗原濃度に依っている¹³⁾ため抗原注射量はできるだけ少量が望ましいことから、1回の注射量を0.05mlとした。反応の測定はマスト細胞からのケミカルメディエーターの遊離が最大に達する¹³⁾注射後15分に行った。

副作用の対策として全身アナフィラキシーショックの発現に備えて、ノルエピネフリン1,000倍液(0.1%ボスミン, 0.2~0.5ml筋注)、副腎皮質ステロイド(プレドニゾロン2mg/kg, 筋注)を用意した。

病理組織学的検討

ノミアレルゲンに対する陽性反応部位を生検し病理組織学的検討を行った。生検組織は10%緩衝ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋を行い8 μ mに薄切し、ヘマトキシリンエオシン染色、トルイジンブルー染色を施し鏡検した。

類症鑑別

アレルギー性要因以外の原因による皮膚炎の発症を鑑別するために、飽和硝酸ナトリウム溶液を用いた浮遊集卵法による腸内寄生虫卵検査、ウッド灯照射法またはDTM培地培養法による皮膚糸状菌検査、皮膚スクラッチ法による毛包虫や疥癬虫の検査を行い、これらの原因による皮膚炎発症犬は本実験から除いた。

表1 皮膚病群の皮内検査成績

| 番号 | 犬種 | 年齢(*) | 体重(kg) | 性別 | 屋内/屋外 | 皮内検査 |
|----|-----------|-------|--------|----|-------|------|
| 1 | 柴犬 | 12(2) | 9.5 | 雌 | 屋外 | 陰性 |
| 2 | 柴犬 | 4(3) | 14.0 | 雌 | 屋外 | 陰性 |
| 3 | 柴犬 | 7(4) | 10.0 | 雄 | 屋外 | 陰性 |
| 4 | 柴犬 | 2(1) | 7.5 | 雄 | 屋外 | 陽性 |
| 5 | シェルティ | 5(3) | 10.5 | 雄 | 屋内 | 陽性 |
| 6 | シェルティ | 6(5) | 12.5 | 雄 | 屋内 | 陽性 |
| 7 | シェルティ | 5(4) | 12.5 | 雌 | 屋内 | 陰性 |
| 8 | トイ・プードル | 10(4) | 2.5 | 雌 | 屋内 | 陰性 |
| 9 | トイ・プードル | 11(8) | 7.0 | 雌 | 屋内 | 陰性 |
| 10 | 甲斐犬 | 11(3) | 13.5 | 雄 | 屋外 | 陰性 |
| 11 | W・ホワイトテリア | 8(2) | 11.5 | 雄 | 屋内 | 陰性 |
| 12 | ミニ・ダックス | 8(8) | 8.0 | 雌 | 屋内 | 陽性 |
| 13 | ミニ・シュナウザー | 5(4) | 7.0 | 雌 | 屋内 | 陽性 |
| 14 | ケアンテリア | 6(3) | 11.0 | 雌 | 屋内 | 陽性 |
| 15 | ビーグル | 8(5) | 14.0 | 雌 | 屋外 | 陽性 |
| 16 | 雑種 | 13(8) | 10.0 | 雌 | 屋外 | 陰性 |
| 17 | 雑種 | 3(2) | 17.0 | 雌 | 屋内 | 陽性 |
| 18 | 雑種 | 4(4) | 26.5 | 雄 | 屋内 | 陽性 |
| 19 | 雑種 | 4(2) | 11.0 | 雌 | 屋外 | 陽性 |
| 20 | 雑種 | 3(1) | 2.5 | 雌 | 屋内 | 陽性 |
| 21 | 雑種 | 11(8) | 7.0 | 雌 | 屋外 | 陰性 |
| 22 | 雑種 | 8(6) | 14.5 | 雄 | 屋外 | 陰性 |

*: 皮膚病初発年齢

* 診断用アレルギー皮内エキス: 鳥居薬品(株)・東京

表2 皮内検査用アレルギー

| | | |
|----|----------|----------------|
| 1 | ノミ | 1:1,000W/V |
| 2 | ハウスダスト | 1:1,000W/V |
| 3 | アカマツ | 1:1,000W/V |
| 4 | スギ | 1:1,000W/V |
| 5 | ブタクサ | 1:1,000W/V |
| 6 | 小麦粉 | 1:1,000W/V |
| 7 | 牛乳 | 1 μ gPN/ml |
| 8 | 全卵 | 1:1,000W/V |
| 9 | 卵黄 | 1:1,000W/V |
| 10 | 卵白 | 1:1,000W/V |
| 11 | 牛肉 | 1:1,000W/V |
| 12 | 豚肉 | 1:1,000W/V |
| 13 | 鶏肉 | 1:1,000W/V |
| 14 | イースト | 1:1,000W/V |
| 15 | 犬毛 | 1:1,000W/V |
| 16 | 猫毛 | 1:1,000W/V |
| 17 | 羽毛 | 1:1,000W/V |
| 18 | 羊毛 | 1:1,000W/V |
| 19 | タバコ煙 | 1 μ gPN/ml |
| 20 | カボック | 1:1,000W/V |
| 21 | アルテルナリア | 1:10,000W/V |
| 22 | アスペルギルス | 1:10,000W/V |
| 23 | カンジダ | 1:10,000W/V |
| 24 | クラドスポリウム | 1:10,000W/V |
| 25 | ペニシリウム | 1:10,000W/V |

陰性対照 0.5%フェノール加生理食塩液

陽性対照 1:10,000W/Vリン酸ヒスタミン

W/V: 重量/容量 PN: 蛋白窒素

成 績

即時型皮内反応の判定基準

全実験犬 54 頭を対象にノミ [1:1,000 重量/容量 (W/V) 濃度], ハウスダスト (1:1,000 W/V) の各アレルギー液と陰性および陽性対照液における膨疹の発現頻度分布図を作成した (図 1) ところ, 陰性対照液の膨疹直径は 0~7mm の範囲にあったのに対して陽性対照液のそれは 8~20mm の範囲にあり, 両者は 7mm と 8mm の間を境界として明確に分離して分布した. いっぽう, ノミとハウスダストのアレルギー液では陰性対照液の反応分布とほぼ一致する第 1 グループと, それより大きい独立した第 2 グループが存在し, 両グループはともに 8mm 付近に分布の谷間が一致して認められた. しかも両アレルギーとも 9mm 以上の場合はずべて紅斑を示した.

しかし, 陽性反応の判定には皮内反応における反応性の個体差を十分に考慮したうえで判定には高い確度を持たせて判定することが要求される. 実際, 本研究でも陰性対照液では実験犬の 54% が 3~7mm の膨疹を示し, しかも陰性対照液の膨疹が大きい個体は陽性対照液の膨疹も大きい傾向が認められることから, 即時型アレルギー反応の判定基準は陰性対照液計測値と陽性対照液計測値の中間値以上の直径を有し, かつ紅斑を伴う反応を特異反応 (陽性), それ以下を非特異反応 (陰性) と判定した.

アレルギー皮内検査

皮膚病群 22 頭中 11 頭にアレルギー皮内反応の陽性反応が認められた. このうち 11 頭全例がノミアレルギーに対して陽性反応を示し, 特に 1 頭 (No. 15) は強い反応を示し偽足形成がみられた. また, 他の 1 頭 (No. 5) はノミアレルギーの他にハウスダストアレルギーに対しても陽性反応を示した. 残る 11 頭は反応陰性であった.

非皮膚病群ではブタクサアレルギーに 1 頭 (3.3%), カンジダアレルギーに 1 頭 (3.3%), ノミアレルギーに 2 頭 (6.7%) の陽性反応が認められ, 他の 26 頭はいずれのアレルギーに対しても陰性であった. このように少数例では皮膚炎症状は発症していなくてもアレルギー感作状態にあることが示された.

なお, 皮膚病群と非皮膚病群のいずれにおいても皮内検査に伴うアナフィラキシーショック等の副作用はまったく認められなかった.

皮膚病群の皮膚炎症状の比較

本群の全 22 頭では, 皮膚炎は多くの症例で背部と腹部を中心に四肢, 顔面, 趾間部に, 紅斑, 丘疹を発症し, 痒覚も強度で掻きむしりによる脱毛が著明なものが多数 (17 頭, 77.3%) を占めた. 急性型のものでは皮膚の糜爛, 滲出液の浸潤や痂皮の形成がみられ, 慢性型のもの

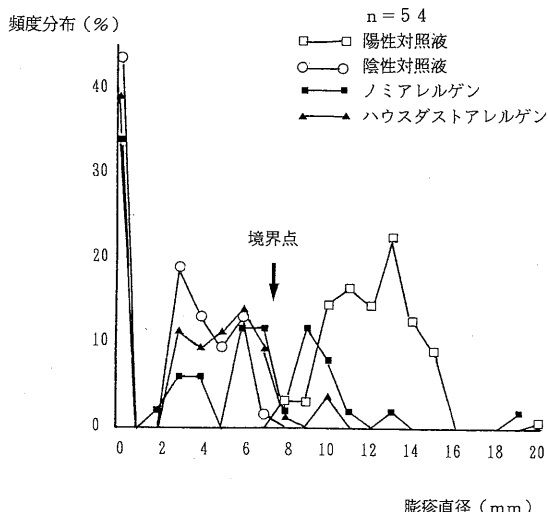


図 1 皮内反応 (膨疹) 分布よりみた特異反応と非特異反応の境界点

では色素沈着や苔癬化が認められた. また, 少数に膿皮症, 外耳炎, 結膜炎を呈するものも認められた. 皮内検査陽性群においては同陰性群と比較して全例 (11 頭, 100%) が強い痒覚のため脱毛は顕著で, 半数以上 (6 頭, 54.5%) に色素沈着が認められたが, これ以外の皮膚炎の重篤度, 発現部位および発現頻度については両群間に著差は認められなかった.

皮膚病群の疫学的検討

皮膚病群 22 頭を年齢別に分類すると年齢と陽性率との間に特異的差異は認められなかった. また, 性別による分類でも陽性率は雄では 4/8 頭 (50%), 雌では 7/14 頭 (50%) であり, 両者間に有意差は認められなかった. しかし, 屋内/屋外飼育別による分類によれば陽性率は屋内犬群では 2/12 頭 (16.7%), 屋外犬群では 9/10 頭 (90%) であり, 両者間に有意差 ($P < 0.01$) が認められた. さらに, 季節性/非季節性別に分類しても季節性 (夏) 群では 8/11 頭 (72.7%), 非季節性群では 3/11 頭 (27.3%) であり, 両者間に有意差 ($P < 0.05$) が認められた.

病理組織学的検討

皮膚病犬 No. 19 の陽性対照, 陰性対照およびノミアレルギー陽性反応部位について検討した. 病理組織学的判定には非皮膚病犬 2 頭を陰性対照とした.

皮膚病犬 No. 19 の陽性対照は多数の好塩基球やマスト細胞の細胞浸潤が認められ, また好酸球も散見され, 他に比較して最も強い炎症反応が観察された. ノミアレルギーに対して陽性反応を示した注射部位では真皮層の血管周囲を中心に好塩基球あるいはマスト細胞の細胞集簇が認められ, その中に好酸球が散見された.

考 察

最近、犬におけるアレルギー性皮膚炎が注目されており、アレルギー性皮膚炎の分類、診断、治療に関する総説をみる^{4,19)}。しかし、診断法、特に皮内検査法は報告者により検査方法・検査条件が異なり、いまだ統一され標準化された診断法は確立されていない。皮内検査の検査条件についてみても診断用アレルギー濃度は蛋白窒素単位(PNU)濃度とW/V濃度の両方が現在広く採用されているが、PNU濃度では250~1,000PNU/mlの範囲で用いられ、W/V濃度では1:10,000~1:1,000W/Vの範囲で用いられている。さらに、アレルギー液の皮内注射量は0.05ml~0.1ml、注射から判定までの時間は即時型反応で15あるいは30分、ツベルクリン型反応で24あるいは48時間、また対照液の使用の有無などのように種々の点で異なっている^{2,3,5,8,15,16,22,27,28)}。

このうち、特にアレルギーの濃度は重要で、高濃度の液を用いると偽陽性反応も増加する。なお、アレルギー希釈液の種類も同様に重要で、グリセリン液を用いたものは同液の刺激性により偽陽性反応が生じ易い。

判定基準については、EDMONDS⁹⁾、HIRSHMANら¹²⁾、NESBITTら¹⁶⁾らは検査アレルギー液の注射部位の膨疹が陰性対照のそれより3mm以上大きなものを陽性反応と判定している。しかし、この判定基準では明らかに偽陽性反応が増え診断精度が低くなり、不適当である。また、陰性対照の膨疹を0、陽性対照のそれを+4として段階分けする方法^{3,16,20,24)}も報告されているが、これは判定が主観的になり易く客観性が低くなることが考えられるため、この基準も不適当と考える。

われわれの研究では、皮内検査の判定は前述したように陰性対照(0.5%フェノール加生理食塩液)と陽性対照(リン酸ヒスタミン液)の膨疹をノギスを用いて計測し、両者の中間値以上でなおかつ紅斑を伴った反応を陽性反応とした。この反応基準は既報の文献にみられる判定基準より厳しい基準であるが、陽性反応に高い診断精度を与え確実な陽性反応と判定できることが臨床的に重要と考え採用した。さらに、陽性対照液と陰性対照液を検査実施のたびに用い、被験動物の免疫応答性の個体差を平均化して客観的に判定が下せるようにした。

本研究では犬のアレルギー性皮膚炎の原因としてノミが最も重要であることが示唆された。既報においてもノミアレルギーの皮内反応陽性率は45~90.6%と高い成績が示されている^{15,17,19)}。ただし、ノミアレルギー発症犬では大多数に即時型反応と遅延型反応の両方が認められることが知られており、いずれか一方の反応を示すものは5~10%にすぎない¹⁹⁾が、1~2日後に再び判定すればさらに診断精度は高くなるろう。

疫学的検討では症例数が少なかったが、年齢および性

別と陽性率の間に相関性は認められなかったが、屋内/屋外飼育別と季節性(夏)発症/非季節性別では屋外飼育群と季節性(夏)群の陽性率が有意に高く(P<0.01およびP<0.05)、ノミの活動が活発になるにつれて皮膚炎症状が惹起されることが示された。

ハウスダストアレルギーについては、今回の成績では陽性率4.5%であったが、米国の報告ではハウスダスト陽性率は39.4~92.9%^{8,16,20,27)}と比べて高率の報告がみられる。しかし、これら既報も判定基準があいまいで基準の設定根拠も示されてなく、判定の客観性に欠ける。したがって、診断精度が低く多くの偽陽性反応が陽性と誤判定されている可能性は高いと考える。このように根拠のあいまいな判定基準を設定した場合、陽性率が増高し研究が誤った結論に導かれる原因となる。

今回の非皮膚病群における成績では数種のアレルギーに対して特異抗体を保有しているものが少数であることが明らかとなったが、既報^{2,25-27)}にも正常犬において真菌、ハウスダスト、猫被毛などのアレルギーに陽性反応を示したとの報告がみられる。このように皮膚病変を持たない個体でもアレルギー特異抗体を保有する場合があります。いわゆるアレルギー前駆状態にあることが示された。

皮内検査陽性判定部位での病理組織像はIgE依存性の即時型反応の組織像の特徴をよく示していた^{6,7,11,18)}。陰性対照部位においても真皮層に若干の細胞浸潤が認められたが、これは注射針の刺入やフェノール液の刺激作用によるものと考えられる¹¹⁾。アレルギー性疾患の診断にはELISA(酵素免疫抗体法)やRAST(放射性アレルギー吸着テスト)が試みられているが、皮内検査との一致率も低く^{1,8,23)}、現在のところ確実な診断法とはいえない。いっぽう、皮内検査の有用性にも限度があり、食餌性アレルギーの場合犬では皮内検査における有効性が低く^{8,14)}、さらにアレルギー性接触性皮膚炎の場合は皮内検査よりもむしろパッチテスト^{10,21)}が適していることから、皮内検査の実施にあたってはこのような犬における皮膚を用いる検査の特性を承知し、アレルギーの種類によっては皮内検査以外の検査法を併用することも必要である。

病理組織学的検討に際しご助言くださいました本学家畜病理学教室の桐生啓治先生、町田 登先生に感謝します。また、ノミの収集にご協力くださいました小林雅樹(川崎市)、猪野 徹(熊谷市)、原山 明(本庄市)、宗像 彰(練馬区)、金原史明(豊橋市)、伊藤悦子(千葉県)の各先生に感謝します。

引用文献

- 1) ACKERMAN L: Vet Med, 83, 779-788 (1988)
- 2) AUGUST JR: J Am Anim Hosp Assoc, 18, 157-163 (1982)
- 3) AUGUST JR: J Am Anim Hosp Assoc, 18, 164-171 (1982)

- 4) BAKER E. : 実用ガイド, 小動物のアレルギー, 早崎峯夫訳, 学窓社, 東京 (1992)
 - 5) BAKER KP : J Small Anim Pract, 12, 445-452 (1971)
 - 6) BECKER AB, CHUNG KF, McDONALD DM et al : J Allergy Clin Immunol, 78, 937-942 (1986)
 - 7) BECKER AB, CHUNG KF, McDONALD DM et al : J Allergy Clin Immunol, 81, 441-448 (1988)
 - 8) DEBOER DJ : J Am Vet Med Assoc, 195, 1357-1363 (1989)
 - 9) EDMONDS MJ : J Small Anim Pract, 21, 153-167 (1980)
 - 10) GRANT DI, THODAY KL : J Small Anim Pract, 21, 17-27 (1980)
 - 11) GROSS TL, HALLIWELL REW : Vet Pathol, 22, 78-81 (1985)
 - 12) HIRSHMAN CA, LEU DB, AUSTIN DR et al : J Allergy Clin Immunol, 79, 46-53 (1987)
 - 13) 石崎 達 : 寄生虫皮内反応の本質とその応用. 寄生虫誌, 22, 13-33 (1973)
 - 14) JEFFERS JG, SHANLEY KJ, MEYER EK : J Am Vet Med Assoc, 198, 245-250 (1991)
 - 15) NESBITT GH : J Am Vet Med Assoc, 172, 55-60 (1978)
 - 16) NESBITT GH, KEDAN GS, GACIOLO P : Comp Cont Edu Pract Vet, 6, 73-84 (1984)
 - 17) NESBITT GH, SCHMITZ JA : J Am Vet Med Assoc, 173, 283-288 (1978)
 - 18) NIMMO-WILKIE JS, YAGER JA, EYRE, P et al : Vet Pathol, 27, 179-186 (1990)
 - 19) REEDY LM, MILLER Jr WH : 犬と猫のアレルギー性皮膚疾患, 大島 慧訳, 文永堂, 東京 (1989)
 - 20) SCHICK RO, FADOK VA : J Am Vet Med Assoc, 189, 1493-1496 (1986)
 - 21) SCOTT DW : Vet Clin of North America : Small Anim Pract, 8, 641-664 (1978)
 - 22) SCOTT DW : J Am Anim Hosp Assoc, 17, 91-100 (1981)
 - 23) SOUSA CA : Vet Clin of North America : Small Anim Pract, 18, 1049-1059 (1988)
 - 24) WELLINGTON J, MILLER Jr WH, SCARLETT JM : Cornell Vet, 81, 37-42 (1991)
 - 25) WHITE SD, OHMAN JL : Am J Vet Res, 49, 1873-1875 (1988)
 - 26) WILLEMSE A, VAN DEN BROM WE : Res Vet Sci, 32, 57-61 (1982)
 - 27) WILLEMSE A, VAN DEN BROM WE : Res Vet Sci, 34, 261-265 (1983)
 - 28) VAN WINKLE KA : J Am Anim Hosp Assoc, 17, 343-354 (1981)
-