

難治性喘息の発症に関する研究

第 2 編

フローサイトメトリーによる喘息患者末梢血の リンパ球サブセット・表面抗原の検討

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

高 田 稷

(平成 4 年 5 月 25 日受稿)

Key words : intractable asthma, lymphocyte subpopulation, flow cytometry

緒 言

気管支喘息においてリンパ球は、アレルゲン特異的抗体の産生調節に中心的役割をはたしていると考えられるが、近年、さらに、剥離性好酸球性気管支炎とされる気道病態の形成にも深く関わっていると考えられるようになってきた¹⁾。すなわち、抗原を認識して活性化されたリンパ球が、IL-3, IL-5, IL-8, GM-CSF 等、様々なインターロイキンを遊離し、その細胞遊走活性によって局所に炎症細胞を集積させ、複雑な気道病変の形成の一端を担っていると考えられる。

一方、近年の目覚ましいモノクローナル抗体の開発や Flow cytometry (FCM) の発達により、活性化リンパ球の marker やリンパ球のサブセットが詳細に解明されている²⁾。このような末梢血や肺局所リンパ球の特性を明らかにすることにより、喘息の免疫学的病態が漸次解明されてゆくものと考えられる。かかる観点から、喘息患者の末梢血リンパ球サブセットについては、現在までに様々な報告がなされてきたが、多くの報告は軽症を対象としており、重症例における特徴は十分に解明されていない。また、FCM を応用した詳細な検討はさらに限られているように思われ、成人の重症喘息病態における各種リンパ球の役割分担は、いまだ不明な点が多い。そこで我々は、種々のモノクローナル抗体を用いて two-color FCM により末梢血リン

Table 1 Characteristics of the patients.

No.	age	sex	RAST/skin*	steroid*	attack	IgE RIST
1	23	F	+ HD	-	-	1474.7
2	36	M	+ HD	-	-	1405
3	52	M	+ Wheat	-	-	1894
4	40	F	+ HD	-	-	914
5	42	M	+ HD	-	-	1308
6	38	F	+ HD	-	-	336.8
7	36	F	+ HD	-	-	174.1
8	53	F	+ HD	-	-	1150
9	2	M	+ HD	-	-	93.2
10	48	F	+ HD	-	-	535.4
11	35	M	+ HD	-	-	4816
12	42	F	+ HD	-	-	165
13	32	M	+ HD	-	-	528
14	48	M	+ Asp, Pc	-	-	1634
15	56	F	-	-	-	78.6
16	56	F	-	-	-	49.8
17	54	M	-	-	-	19.7
18	67	M	-	-	-	113
19	69	F	-	-	-	103.1
20	64	M	-	-	-	291.3
21	31	M	-	-	-	192.5
22	34	M	-	-	-	38.9
23	58	M	-	-	-	132.6
24	43	F	-	-	-	113.8
25	36	M	+ JC	+	-	89.1
26	54	F	-	+	-	257
27	48	F	-	+	-	307.3
28	65	F	-	+	-	126.2
29	61	F	+ Silk, Asp	-	+	579.9
30	57	F	+ Cand	-	+	39.3
31	51	M	+ SVG	-	+	1127
32	47	M	+ Wheat	-	+	106.5

* RAST and intradermal test * Steroid dependency

HD : house dust Asp : Aspergillus Dand : Candida albicans

Pc : Penicillium JC : Japanese Cedar SVG : Sweet Vernal Grass

バ球のサブセットを解析し、また発作時との比較や難治例の特徴についても検討したので報告する。

対象と方法

1. 対 象

対象には岡山大学医学部第2内科外来を受診中あるいは入院中の喘息患者32例(20~69歳, 平均46.8歳, 男性15例, 女性17例)を選び, 健康人対照としてアトピー歴が無く, 特に疾患を有さない24例(24~58歳, 平均39.7歳, 男性22例, 女性2例)を用い, 午前11時~午後2時に末梢静脈血を採取した。なお, 各喘息症例の特徴はTable 1に示す如くで, アトピー性皮膚炎を合併した症例は含まれていない。

病型別検討は, 非難治群を, 吸入性抗原8種のうちのいずれかのIgE-RASTないし即時型皮内反応が陽性(14例)と陰性(10例)に分けて検討した。RAST scoreは2以上を陽性とした。陽性例の年齢は平均38.9歳(20~53歳), 陰性例は53.2歳(31~69歳)であった。

喘息の重症度別検討は, 病型判定以前にプレドニソロン換算1日5mg以上, 1年間以上ステロイド剤を全身投与している症例をステロイド依存性難治群(4例)とし, それ以外の症例を非難治群(24例)とした。難治群の年齢は平均50.8歳(36~65歳)で, 非難治群は平均44.9歳(20~69歳)であった。非難治群と健康人の年齢はほぼ一致しており, 統計学的有意差は認められなかった。

さらに発作時の検討は, ステロイド投与を受けていない4例について, 発作中に採血(発作群)(小発作1例, 中発作3例)をおこなった。発作群の年齢は平均54.0歳(47~61歳)であった。

2. 方 法

リンパ球表面抗原の解析³⁾は以下の如く行った。喘息患者および健康人の末梢血1.5mlをEDTA加で採血し, 溶血薬(ナカライ化学特注)約45mlを加え穏やかに混和して5分程度室温放置し, 溶血させた。遠沈後(1200rpm, 5分), ペレットを0.1%BSA(bovine serum albumin)と0.1%アザイドを加えたPBS(PBS-BSA-アザイド)

Table 2 Monoconal antibodies used in this study.

mAb	specificity/CD	fluorochrome
Anti-Leucocyte	leucocytes/CD 45	FITC*
Anti-Leu-M 3	monocytes/CD 14	PE*
Mouse IgG 1	KLH	FITC*
Mouse IgG 2 a	KLH	PE*
Anti-Leu-4	T-cell/CD 3	FITC*
Anti-Leu-12	B-cell/CD 19	PE*
Anti-HLA-DR	HLA-DR	PE*
Anti-Leu-3 a	CD 4	FITC*
Anti-Leu-2 a	CD 8	PE*
Anti-Leu-5 b	CD 2	FITC
Anti-Leu-11 c	FcγR/CD 16	PE
Anti-Leu-3 a	CD 4	PE
Anti-IL-2 R	IL-2 R/CD 25	FITC

* These mAbs were purchased as mixture of two antibodies for two-color analysis (Simultest).

で2回遠沈洗浄し, 1mlのPBS-BSA-アザイドに浮遊させた。これを小試験管に分注し, さらにモノクローナル抗体を加え, 氷上暗所で30分反応させた。モノクローナル抗体はいずれもLeuシリーズ(Beckton-Dickinson)のもので, 蛍光色素標識(FITCとPE)されたものを小試験管1本につき各20μlずつ使用した。使用した抗体名と蛍光色素標識, 認識する抗原についてはTable 2に示した。なお, 2種類の抗体がそれぞれFITCとPE標識されたものの混合を用いた場合(Simultest)には, 小試験管1本につき各20μlずつ用いた。反応後, さらに2回浄して, 250μlのPBS-BSA-アザイドに浮遊させ, 検体作成後は氷上暗所に保存し, 2時間以内にFCM解析をおこなった。

Flow cytometerはFACScan(Beckton-Dickinson)を用い, リンパ球の分画にゲートをかけて解析した。コンピューターのソフトウェアは, IL-2 Rの解析についてはConsort 30を用いたが, 他の表面抗原の解析では, Simultest programを使用した。

なお, Anti-leucocyteとAnti-Leu-M 3抗体は各自白血球分画の同定用の抗体であり, リンパ球のゲート内で顆粒球・単球の割合を算定するのに用いた。その結果ゲート内のリンパ球の割合が95%に満たない検体は対象から除外した。また, 陰性対照として, 人体に存在しないkeyhole

limpet hemocyanin に対するマウスモノクローナル抗体で, isotype が IgG 1, IgG 2 a の 2 種類にそれぞれ FITC・PE が標識されたものを用いた。

FACScan flow cytometer の calibration と compensation には Calibrant beads(Beckton-Dickinson) と Autocomp software を用い,

Table 3 Percentages of lymphocytes subpopulations in non-intractable and intractable asthmatic patients compared to normal individuals.

	Normals	Non-intractable asthmatics	Intractable asthmatics
n	24	24	4
CD 3 ⁺	70.6 ± 7.1*	69.5 ± 7.8	69.8 ± 11.6
CD 19 ⁺	12.3 ± 4.3	9.3 ± 5.1*	8.5 ± 4.8
CD 3 ⁺ DR ⁺	14.2 ± 5.3	15.6 ± 6.7	15.6 ± 6.7
CD 4/8 ratio	1.55 ± 0.7	1.46 ± 0.4	1.46 ± 0.4
CD 4 ⁺	45.3 ± 9.6	46.7 ± 5.8	50.5 ± 9.0
CD 8 ⁺	33.3 ± 9.1	33.3 ± 6.1	30.8 ± 3.4

* Values were mean ± SD.
* p < 0.05 compared to normals.

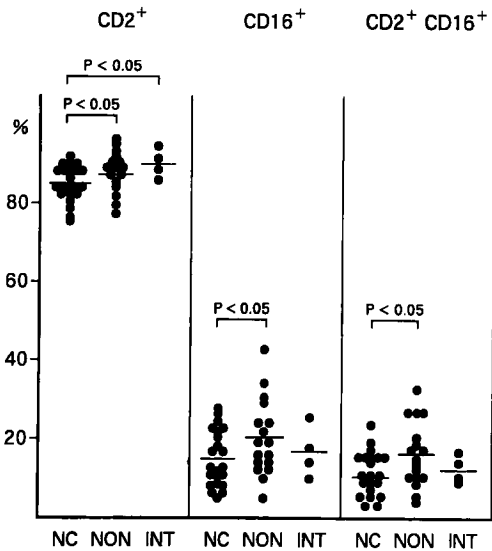


Fig. 1 Percentages of CD2⁺, CD16⁺ and CD2⁺ CD16⁺ lymphocytes in asthmatics and normal individuals.
N ; Normals
NON ; Non-intractable asthmatics
INT ; Intractable asthmatics

manual にて多少の補正を加えた上で使用した。結果はすべてゲート内細胞における陽性率として表した。

統計学的有意差検定には Student's T tests を用い, p < 0.05 を有意差ありとした。

結 果

まず, ステロイド非投与で発作の影響がない状態の非難治性喘息患者と, 健常人のリンパ球サブセットとを比較検討すると, 非難治群で CD19 が有意に低値であり (p < 0.05), B 細胞が減少していることが示唆された (Table 3)。さらに, CD2・CD16 の解析でも, 非難治群で CD2⁺・CD16⁺・CD2⁺ CD16⁺ がすべて有意に高値であった (p < 0.05) (Figure 1)。

次に, 喘息の病型によるリンパ球サブセットの違いを明らかにするために, 非難治群を IgE-RAST ないし皮内反応の陽性・陰性群間で比較したところ, 両群間の IgE-RAST 値は有意な差を認めたが (p < 0.01), リンパ球の表面抗原陽性率については全項目で有意差は認められなかった。

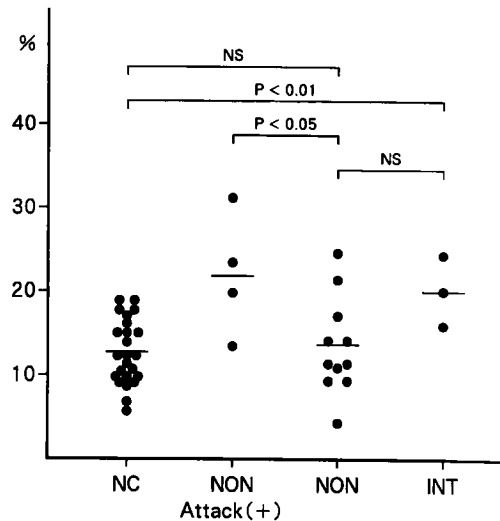


Fig. 2 Percentages of CD4⁺ CD25 (IL-2 R)⁺ lymphocytes in asthmatics and normal individuals.
N ; Normals
NON ; Non-intractable asthmatics
INT ; Intractable asthmatics

続いて、ステロイド投与が必要な症例の特徴を明らかにするため、ステロイド依存性難治群を、非難治群、及び健常人と比較検討した。その結果、Table 3に示す如く、ほとんどの項目は有意な差を認めなかったが、CD2陽性率は非難治群同様、健常人に比して増加していた ($p < 0.05$) (Figure 1)。また、難治群では、健常人に比し CD4⁺ CD25 (IL-2 R) ⁺細胞が有意に高値であり ($p < 0.01$)、非難治群に比べても有意差はなかったが、高値の傾向を示した (Figure 2)。

次に、発作時のリンパ球の関与を検討するため、ステロイド剤の全身投与を受けていない症例の発作中に採血した発作群と、非難治群とを比較した。その結果、発作群で CD4⁺ CD25 (IL-2 R) ⁺細胞が有意に高値であった ($p < 0.05$) (Figure 2)。

考 察

喘息の発症機序は、IgE-肥満細胞-ヒスタミンの反応系のみならず、リンパ球をはじめとする多彩な炎症細胞の集大成で成り立つことが近年次第に明らかにされつつある。そこで我々は、リンパ球が発症病態の中心的役割をなしていると考えられつつある成人喘息患者におけるリンパ球のサブセットの特徴を明らかにする目的で、各病型別・重症度別・発作の有無などにつき、健常人を対照として FCM を用いて解析を加えた。その結果、喘息患者におけるB細胞の減少、T γ 細胞 (CD2⁺ CD16⁺) の増加、難治症例や発作時における CD4⁺ CD25 (IL-2 R) ⁺細胞の増加などが判明した。

まず、喘息患者と健常人とを比較する上で、今回はステロイド全身投与されていない症例を選び、非発作時に採血し、健常人対照と年齢をほぼ一致させ、できるだけサブセットに影響を与える因子を除去して解析した。その結果、CD4/CD8比など、一般のリンパ球サブセットに有意な相違を見いだし得なかったが、B細胞の有意な減少が検出された。

気管支喘息のまず第一の免疫学的特徴は、IgE抗体に代表されるアレルゲン特異的抗体の産生であろう。それに従って、アトピー性あるいは

外因性喘息といわれる病型分類がなされているが、他方、非アトピー性あるいは内因性といわれる病型の存在も広く認められている⁴⁾⁵⁾。同じ喘息でも、IgEの産生調節において両病型は何らかの相違があると考えられ、気道における反応病態にも両者の違いが指摘されている⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾。以前の報告で、喘息患者ではサプレッサー機能を担うとされている CD8 陽性細胞が減少し、特異的 IgE 体産生亢進機序を示唆するとしたものがあるが¹⁰⁾、変化を認めないとする報告もある¹¹⁾¹²⁾。また、病型間で比較して内因型で CD8 が減少していたとする報告や¹³⁾¹⁴⁾、なんら変化はなかったとする報告もあり¹⁵⁾、一定の見解がないのが現状であろう。

今回の検討では、他の報告でみられたような CD8 陽性細胞の変化は、喘息と健常人との比較でも、病態の違いによる比較でも認められなかった。これは、IgE 産生調節の違いは今回測定したサブセットには反映されていないためか、あるいは、末梢血のリンパ球は IgE 産生調節にはあまり関与していない可能性が考えられる。また、外因型と内因型の比較のさいに、両群間には多くの場合年齢の違いが存在するため、病態の違いか、年齢の違いによる差異を見ているのか、解釈のうえで注意が必要と思われる。特に、CD4/8比は加齢とともに上昇すると言われており¹⁶⁾、いくつかの報告における内因型喘息での CD8 の減少は、年齢の影響による可能性もあり、いまだ確立した所見とは言い難いと考えられる。

次に、CD16陽性であることから NK 細胞を主体とすると考えられる¹⁷⁾T γ 細胞 (CD2⁺ CD16⁺) の解析もおこなったところ、健常人に比べて喘息患者において CD2⁺・CD16⁺・CD2⁺ CD16⁺のいずれも増加していることが窺われた。CD2はT細胞とNK細胞上に発現しており、T細胞・NK細胞・B細胞の三者でリンパ球のほとんどを占めていること、また、CD3については増減がみられなかったことを考えあわせると、これらの結果は喘息患者におけるNK細胞の増加、B細胞の減少という一連の変化を示すものと考えられ、我々のFCMによる算定が正確に行われている事の証左でもあろう。なお、喘息患者ではNK活性が亢進しているとの報告もあり¹⁸⁾、

我々の結果はNK細胞数(率)の算定ではあるが、一致した所見と考えられる。また、B細胞の減少については、その意義は不明であるが、あるいはNK細胞の増加による二次的な減少とも考えられる。

一方、重症のアトピー性疾患ではT γ 細胞は減少しており、減感作療法にて正常に回復するとの報告が見られる¹⁹⁾²⁰⁾。今回、我々が用いた対象はアトピー性皮膚炎のない症例であり、むしろアトピー素因の弱い症例が多く、また、減感作療法を受けていた患者は3例しか含まれておらず、結果の不一致は対象の違いによるものと考えて良いと思われる。さらに、吸入誘発試験の即時・遅発相で末梢血のNK活性が上昇するという報告があり²¹⁾²²⁾、近年NK細胞からの様々なサイトカインの遊離が示されている²³⁾²⁴⁾ことなども併せて考えれば、NK細胞の気道反応における役割が示唆されよう。ただし、気管支肺胞洗浄液のリンパ球の表面抗原解析によれば、気道にはほとんどNK細胞は存在しないとの報告もあり²⁵⁾、喘息におけるNK細胞の関与については、さらに明らかにされるべき点が多く残されている。

次に、重症度によるリンパ球サブセットの特徴を検討する目的で、ステロイド依存性難治群を非難治群、健常人と比較した。その結果、難治群では健常人に比べ、CD2の陽性率が高かったが、これは非依存症例と共通した所見であった。また、難治症例では健常人よりIL-2レセプター陽性率が上昇し、さらに非依存症例に比べてもIL-2R陽性率が増加する傾向にあった。これは、難治症例ではリンパ球の活性化がおこっており、従ってリンパ球の関与がより大きいことを示すものと考えられた。

最後に、発作時と非発作時での比較を行ったところ、発作によりIL-2レセプター陽性細胞の増加が認められ、リンパ球が活性化されている所見と考えられた。Kayらは喘息重積状態の患者のリンパ球表面抗原解析をおこない、IL-2R・HLA-DR・VLAなどの活性化抗原が強く発現していたと報告しており²⁶⁾、今回の結果とほぼ一致していた。しかし、我々の解析ではHLA-DRの変化は認められなかったが、これは今回の対

象症例の発作が、小さいし中発作までであったためかもしれない。また、健常人にくらべ喘息患者は、非発作時に採血してもIL-2レセプター陽性細胞が増加しているとの報告もあるが¹⁴⁾、我々の検討では非発作時の喘息患者と健常人のIL-2R陽性率には差は認められなかった。この違いの理由は不明であるが、いずれにせよ喘息の病態における活性化リンパ球の関与は疑いのない所見と言えよう。

一方、発作症例のCD4/CD8比は非発作に比べて特に差は認められず、他のグループの報告でも同様の結果である²⁶⁾。吸入誘発後の末梢血でCD4⁺細胞の減少を認めた報告や²⁷⁾、即時型気道反応後の気道でCD8⁺細胞の増加を認めた報告²⁸⁾など、CD4⁺ないしCD8⁺細胞が気道反応を惹起あるいは調節している事が考えられるが、今回検討した発作では有意なCD4/CD8比の変化は検出できず、これは各症例の発作が様々な気道反応の混在状態であることを示しているのかもしれない。

以上、喘息患者リンパ球サブセットの解析を通じて、その免疫学的特徴のいくつかを明らかにすることができた。今後は肺局所のリンパ球の表面抗原や、発現しているT細胞レセプターの特徴を明らかにすることなどの検討が必要と考えられる。

結 論

リンパ球が成人喘息の発症病態の中心的役割を成すことが想定されているため、そのリンパ球のサブセットの特徴を明らかにする目的で、喘息患者を対象に、各病型別・重症度別・発作の有無などにつき、健常人を対照として解析した。

1. ステロイドに依存しない非難治群では、健常人に比して、B細胞の減少と、NK細胞を主体としたT γ 細胞の増加が見られた。かかるNK細胞の喘息病態への関与の可能性が想定された。
2. IgE-RAST値ないし皮膚反応陽性・陰性群間では、IgE産生能は明らかに異なるにもかかわらず、サブセットの違いは認められなかった。
3. 発作群、難治群においてはIL-2R⁺細胞が高値であった。喘息の難治化とか発作の病態に活

性化リンパ球の関与が示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜った岡山大学医学部第二内科学教室木村郁郎教授に

深甚の謝意を表します。また、直接御指導いただいた高橋 清講師に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第30回日本胸部疾患学会総会（1990年、東京）にて発表した。

文 献

- 1) Rochester CL, Rankin JA : Editorials : Is Asthma T-cell Mediated ? *Am Rev Resp Dis* (1991) 144, 1005—1007.
- 2) Leucocyte Typing IV. White Cell Differentiation antigens. Knapp, Dörken, Gilks, Rieber, Schmidt, Stein and von dem Borne eds, Oxford University Press, Oxford (1989)
- 3) Monoclonal Antibody Source Book. Beckton Dickinson Immunocytometry Systems.
- 4) Rackeman FM : A working classification of asthma. *Am J Med* (1947) 3, 60.
- 5) Swineford O Jr : Asthma : Classification of Causes. *J Allergy* (1954) 25, 151—167.
- 6) 木村郁郎 : 喘息の病型とその本質論—中高年発症型難治性喘息の独立性. *日胸疾会誌* (1983) 21, 181—182.
- 7) Kimura I, Tanizaki Y, Saito S and Takahashi K : Differences in response to anti-Ig E and to anti-Ig G in basophils from patients with bronchial asthma. *Clin allergy* (1981) 11, 31—36.
- 8) 木村郁郎 : 遅発アレルギーの発症機序—細胞反応を中心に— ; 第3回免疫薬理シンポジウム記録集, 富岡 玖夫編, デー・エムペー・ジャパン, 東京 (1985) pp 23—40.
- 9) Kimura I, Takahashi K, Tada S, Takeda M, Eda R, Miyagawa H, Ogurusu K, Kanehiro A, Kimura G : Studies on the mechanisms of steroid dependent intractable asthma. —With reference to type III and type IV allergy — ; in *advances in Asthmology*, Kobayashi and Bellanti eds, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam (1991) pp 431—436.
- 10) Kus J, Tse KS, Vedal S, Chan-Yeung M : Lymphocyte sub-populations in patients with allergic and non-allergic asthma. *Clin allergy* (1985) 15, 523—529.
- 11) Schuyler M, Gerblich A, Urda G : Atopic asthma : T lymphocyte subpopulations. *Clin allergy* (1985) 15, 131—138.
- 12) Matsumoto T, Takahashi H, Miike T : Increase of T cells bearing FcεR-associated antigen in patients with atopic asthma. *Ann Allergy* (1987) 58, 261—264.
- 13) Bruijnzeel PL, Hamelink ML, Prins K, Remmert G, Meyling FHJG : Blood lymphocyte subpopulations in extrinsic and intrinsic asthma. *Ann allergy* (1987) 58, 179—182.
- 14) Walker C, Virchow JC Jr, Bruijnzeel P LB, Blaser K : T cell subsets and their soluble products regulate eosinophilia in allergic and nonallergic asthma. *J Immunol* (1991) 146, 1829—1835.
- 15) Kochman S, Bernard J, Cazabat A, Lavaud F, Lorton C, Liehn J C : Double pheno-typing of immuno-regulatory T cell subsets in patients with allergic asthma. *Clin Allergy* (1987) 17, 579—588.
- 16) Moody CE, Innes JB, Staiao-Coico L, Incefy GS, Thaler HT, Weksler ME : Lymphocyte transformation induced by autologous cells. XI. The effect of age on the autologous mixed lymphocyte reaction. *Immunology* (1981) 44, 431—437.
- 17) Perussia B, Acuto O, Terhorst C, Faust J, Lazarus R, Fanning V, Trinchieri G : Human natural killer cells analyzed by B 73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. *J Immunol* (1983) 130, 2142—2148.
- 18) Timonen T, Stenius-Aarniala B : Natural killer activity in asthma. *Clin Exp Immunol* (1985) 59,

- 85—90.
- 19) Canonica GW, Mingari MC, Melioli G, Colombatti M, Moretta L : Imbalances of T cell subpopulations in patients with atopic disease and effect of specific immunotherapy. *J Immunol* (1976) **123**, 2669—2672.
 - 20) Thompson LF, Mellon MH, Zeiger RS, Spiegelberg HL : Characterization with monoclonal antibodies of T lymphocytes bearing Fc receptors for I g E (T ϵ cells) and I g G (T γ cells) in atopic patients. *J Immunol* (1983) **131**, 2772—2776.
 - 21) Vesterinen E, Timonen T : Natural killer cell activity in specific and non-specific bronchial challenge. *Ann Allergy* (1988) **60**, 247—249.
 - 22) Jira M, Antosova E, Vondra V, Strejcek J, Mazakova H, Prazakova J : Natural killer and interleukin-2 induced cytotoxicity in asthmatics. *Allergy* (1988) **43**, 294—298.
 - 23) Aneon I, Cuturi MC, Trinchieri G, Perussia B : Interaction of Fc receptor (CD 16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD 25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. *J Exp Med* (1988) **67**, 452—472.
 - 24) Cuturi MC, Aneon I, Sherman F, Loudon R, Clark SC, Perussia B, Trinchieri G : Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *J Exp Med* (1989) **69**, 569—583.
 - 25) 田村尚亮, 篠原直樹, 山田充宏 : 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中リンパ球の two color 分析. *Med Immunol* (1985) **10**, 531—536.
 - 26) Corrigan CJ, Hartnell A, Kay AB : T lymphocytes activation in acute severe asthma. *Lancet* (1988) **1**, 1129—1131.
 - 27) Gerblich AA, Campbell AE, Schuyler MR : Changes in T-lymphocyte subpopulations after antigenic bronchial provocation in asthmatics. *N Eng J Med* (1984) **310**, 1349—1352.
 - 28) Gonzalez MC, Diaz P, Galleguillos FR, Ancic P, Cromwell O, Kay AB : Allergen-induced recruitment of bronchoalveolar helper (OKT 4) and suppressor (OKT 8) T-cells in asthma. *Am Rev Resp Dis* (1987) **136**, 600—604.

Studies on the mechanism of initial attack in intractable asthma**Part 2.****Lymphocyte subpopulations of asthmatics analyzed
by two-color flow cytometry****Minoru TAKATA****Second Department of Internal Medicine,****Okayama University Medical School,****Okayama 700, Japan****(Director : Prof. I. Kimura)**

To elucidate the role of lymphocytes in asthmatics, lymphocyte subpopulations were analyzed using monoclonal antibodies (CD2, CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD25, and HLA-DR, all from Leu series) and flow cytometry (FACScan, Beckton-Dickinson). Blood samples were obtained when there was no attack unless otherwise stated. Patients were defined as intractable when they had been taking more than 5 mg of prednisolone for at least one year.

(1) Non-intractable asthmatics had greater % of CD16+NK cells as compared with age-matched normal subjects. (2) No differences were observed between RAST or intradermal test-positive and negative patients, although the former had significantly higher serum IgE levels than the latter. (3) Intractable asthmatics showed an increased proportion of IL-2R+ lymphocytes as compared with normal subjects. (4) Patients on attack also had a higher % of IL-2R+ lymphocytes than patients without attack.

These findings suggest that NK cells play an important role in bronchial asthma, and that activated lymphocytes are involved in the pathogenesis of intractable asthma and asthmatic attack.