

気管支喘息の発症機序における 好酸球の動態に関する研究

第 2 編

カンジダ抗原による末梢血単核球由来 好酸球遊走因子について

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

河 田 一 郎

(平成 2 年 3 月 27 日受稿)

Key words: Bronchial asthma, Candida antigen,
Eosinophil chemotactic factor

緒 言

気管支喘息の発症機序に関与するアレルギー反応には、I 型アレルギー反応のほかに、III 型、IV 型アレルギー反応の関与も推測されている。小児喘息を初めとする若年発症型喘息は、その多くが家系、既往歴にアレルギー素因の強く認められるアトピー型喘息であり、主にハウスダスト、ダニ抗原に対する IgE を介した I 型アレルギー反応により即時型の発作を引き起こすことは良く知られている。しかし、大人の喘息の最も特徴的な病態を代表する中高年発症型難治性喘息は、木村により提唱されたように通年性、非アトピー型喘息で、真菌抗原のなかでもカンジダに特異的な IgG 抗体の優位な III 型アレルギー反応が関与することが想定されている¹⁾²⁾³⁾。さらに気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar lavage fluid: BALF) 中にリンパ球の増加が認められたり⁴⁾、肺組織内に単核球の浸潤が認められる例があり⁵⁾、末梢血中あるいは BALF 中リンパ球のカンジダ抗原に対する幼若化反応の亢進⁶⁾、Interleukin-2 および好中球遊走因子産生能の亢進が認められる⁷⁾ など、カンジダに対する IV 型アレルギー反応の関与も想定されている。

一方、喘息発作時には非発作時よりも多くの好酸球が肺局所に認められ⁸⁾、喘息発作と肺の好

酸球浸潤との間には密接な関係があると考えられている。かかる末梢気道への好酸球の集積機序については、肥満細胞・好塩基球系⁹⁾ や肺胞マクロファージを介する報告¹⁰⁾ がよく知られているが、リンパ球を介する反応については、好酸球遊走因子 (Eosinophil chemotactic factor: ECF) が T-cell 由来と想定される報告¹¹⁾ や、IL-5 に ECF 活性があるとの報告¹²⁾ 以外は少ないようである。そこで著者は、気管支喘息における好酸球の役割に係わるリンパ球機能を解明する目的で、喘息患者末梢血単核球をカンジダ抗原で刺激した培養上清中の ECF 活性を測定して種々の喘息病態との関連性を検討し、さらにこの ECF の特性についても若干の検討を行った。

対 象

対象には岡山大学第二内科外来通院中および入院中の気管支喘息患者 20 例を選んだ。その病型別内訳は、アトピー型 10 例、非アトピー型 10 例、重症度別では、軽症 6 例、中等症 4 例、重症 10 例で、重症の中でもステロイド依存性重症群は 6 例であった (Table 1)。なお病型分類は、即時型皮内反応陽性 (真菌類のみ陽性の場合を除く) で IgE (RAST) 陽性の症例をアトピー型とし、それ以外を非アトピー型とした。アト

Table 1 Characteristics of atopic and non-atopic asthmatics.

Type of bronchial asthma		Atopic	Non-atopic
No. of cases		10	10
Age (yr)		39 (16~ 63)	47 (26~69)
Age of onset (yr)		22 (1~ 43)	37 (18~56)
IgE (RIST) (U/ml)		1344 (258~2430)	270 (12~528)
Type of positive skin reaction	Immediate	60%	40%
	Late	30%	0%
	Delayed	40%	50%

ピー型の症例中には IgE (RIST) 高値, 発症年齢が小児期でアレルギー疾患の家族歴, 既往歴を有するものが多数を占めていた。重症度は日本アレルギー学会の分類に従って分類した。

方 法

1) 末梢血好酸球の分離

好酸球増多のない健康人より末梢血 5 ml をヘパリン加で採血し, 6% デキストラン 1 ml を加えて室温で30分間静置したのちに buffy coat を回収した。混入する赤血球を除くために, まず Phosphate buffer saline (PBS) 10 ml を加えて 4℃, 250 g で5分間洗浄し, その沈渣に蒸留水 1 ml を加えて30秒間ピペッティングして溶血させたのち, 1.8% 生理食塩水 1 ml を加えて等張に戻した。さらに PBS を加えて 4℃, 250 g で5分間洗浄したのちに, フローサイトメトリー¹³⁾ を利用した方法で好酸球を分離した。得られた好酸球を, Hanks' balanced salt solution (HBSS: GIBCO) で 2×10^4 個/100 μ l の濃度に調整し, 好塩基球・好酸球同時直接算定液にて90%以上の純度を, trypan blue 染色にて90%以上の viability を確認した検体を用いた。

2) 末梢血単核球のカンジダ刺激培養上清の作成

気管支喘息患者の末梢血 10 ml をヘパリン加で採血し, 等量の生理食塩水と混和した後に Histopaque 1077 (Sigma) に重層して, 室温, 450 g で30分間遠心分離した。得られた単核球層に RPMI 1640 (GIBCO) を加えて 4℃, 250 g で5分間の洗浄を2回繰り返し, RPMI 1640 で 1×10^6 個/500 μ l に再調整して, trypan blue 染色にて95%以上の viability を確認した検体を用いた。

この単核球を 24 well の tissue culture cluster (Costar) に 1×10^6 個/well ずつ分注して, 添加抗原としてカンジダ抗原凍乾末 (鳥居薬品) を RPMI 1640 にて溶解したもの 150 μ g を添加し, 37℃ の CO₂ インキュベーター内で2日間培養したのちに, その上清を室温, 1400 g で30秒間遠沈して回収した。

3) ECF 産生能の測定

Multiwell microchemotaxis chamber (Neuro probe) と, 孔径 5 μ m の filter (Nucleopore) を用いた, modified Boyden chamber method¹⁴⁾ にて測定した。即ち, 2) で得られた培養上清 50 μ l を chamber 下室に入れて filter で仕切り, chamber 上室に 1) で得られた好酸球 2×10^4 個を入れて, 37℃ の CO₂ インキュベーター内で30分間反応させた。その後, filter を取り出してメタノールで5秒間固定し, eosin 染色 (エオジノステイン: 鳥居薬品) を2分間行い, キシレンに1分間浸してスライドグラスに固定して400倍で10視野鏡検し, filter の下室側まで遊走した好酸球数を無作為に数えて ECF 産生能 (遊走細胞数/10HPF) とした。ECF 産生能の測定はすべて duplicate で行い, 好酸球は同一健康人の血球を用いた。negative control としては, RPMI 1640 にカンジダ抗原のみ加えたものを用いた。

4) 好塩基球除去単核球によるカンジダ刺激培養上清の作成

単核球に混入する好塩基球は以下の如き panning 法¹⁵⁾ により除去した。あらかじめ径 10 cm の plastic dish (Costar) に Human IgE antiserum (Behring) 2 万単位を入れ, 4℃ にて12時間静置することにより固着させたものを作成し, 1% BSA を加えた EDTA 加 PBS 10 ml にて数回洗浄後, 使用するまで -80℃ で凍結保存した。2) の方法にて得られた単核球を, Ca, Mg を含まない HBSS 5 ml に浮遊させ, 解凍した前述の panning 用 dish に入れて 4℃ で30分間反応させた。dish に結合した好塩基球が遊離しないように単核球を回収し, RPMI 1640 にて洗浄して 1×10^6 個/500 μ l に調整したのち, カンジダ抗原 150 μ g を添加して 37℃ の CO₂ インキュベーター内で2日間培養した後に, その上清を回収

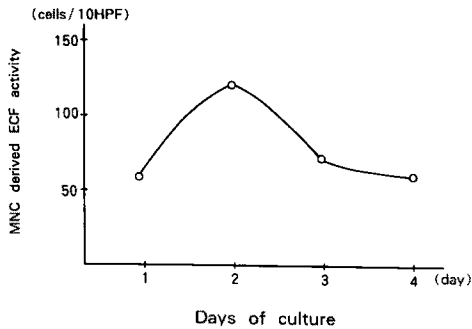


Fig. 1 Time course of ECF activity in mononuclear cell (MNC) supernatant incubated with Candida antigen. The level of ECF activity reached to its peak after 2 days' culture.

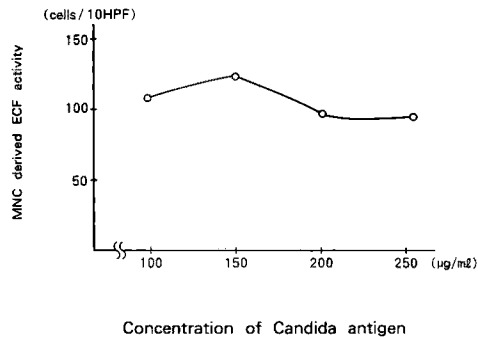


Fig. 2 Correlation between ECF activity in mononuclear cell (MNC) supernatant and concentration of Candida antigen added. The optimal concentration of Candida antigen for ECF production was found to be 150 μ g/ml.

した。

成 績

1) ECF 産生能測定の基礎的検討

末梢血単核球の ECF 産生能測定における至適培養日数と至適添加カンジダ抗原量についての検討を行った。至適培養日数について培養1日目から4日目までの各上清中 ECF 活性を測定したところ、2日目で peak に達し3日目以降は活性が低下するため、2日を至適と考えた。

(Fig. 1) また、添加カンジダ抗原量について、100 μ g から250 μ g の範囲で検討を行い、150 μ g

Table 2 Checkerboard assay of the eosinophil chemotactic activity in mononuclear cell (MNC) supernatant. Migrated eosinophils increases along the diagonal from the upper left to the lower right which shows the chemokinetic activity in the supernatant. And below the diagonal, cells migrate in a positive gradient which shows the chemotactic activity in the supernatant.

		MCS concentration above filter (%)			
		0	25	50	100
MCS concentration below filter (%)	0	0	10	—	—
	25	25	44	38	—
	50	50	72	—	58
	100	100	116	—	96

MCS : mononuclear cell culture supernatant

で peak に達したためにこれを至適と考えた。

(Fig. 2) なお、カンジダ抗原自体には、ECF 活性は認められなかった。

2) 単核球培養上清における chemotactic-chemokinetic activity についての検討

このようにして培養上清中に産生される物質の chemotactic activity, chemokinetic activity について checkerboard assay にて検討した。Table 2 に示す如く、chamber 下室の培養上清濃度を増加させることにより遊走細胞数の増加が認められるとともに、chamber 上下の培養上清濃度差を一定にした状態で、その濃度を増加させることにより遊走細胞数の増加が認められた。即ち、単核球の培養上清中に産生される物質には、好酸球に対する chemotactic activity と chemokinetic activity の両者が認められた。

3) 単核球中に混入する好塩基球由来 ECF の影響

panning 前の好塩基球の混入は、回収総細胞数の0.5～1%を占めていたが、panning により0.2%以下にまで減少させることができた。かかる方法で好塩基球の除去を行う前後での ECF 産生能の変化は Fig. 3 に示す如く軽度であった。

4) 気管支喘息患者における末梢血単核球の ECF 産生能

まず末梢血リンパ球のカンジダに対する感作

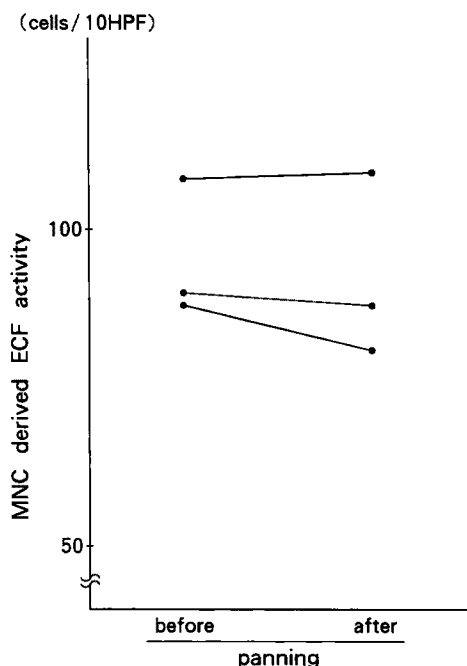


Fig. 3 The effect of basophils in mononuclear cells. Basophils were deleted using panning method and remaining mononuclear cells were incubated with *Candida* antigen. ECF activity in mononuclear cell (MNC) supernatant did not change before and after basophil deletion.

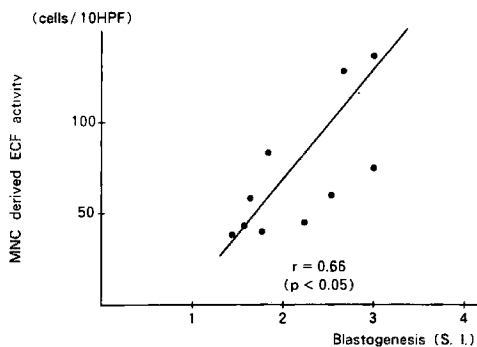


Fig. 4 Correlation between ECF activity in mononuclear cell (MNC) supernatant incubated with *Candida* antigen and lymphocyte blastogenesis with *Candida* antigen. Positive correlation ($p < 0.05$) was statistically significant between these two parameters.

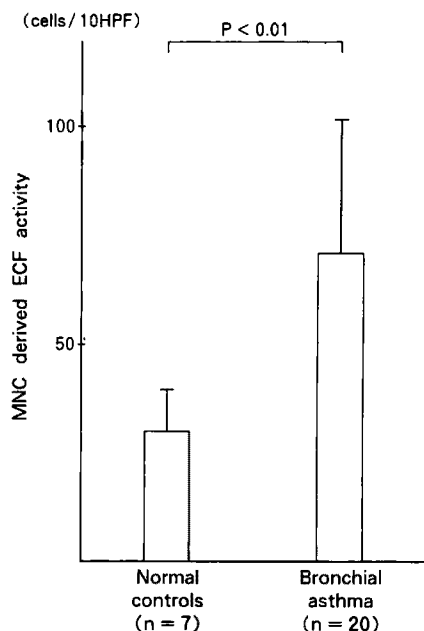


Fig. 5 Comparison of ECF activity in mononuclear cell (MNC) supernatant incubated with *Candida* antigen in patients with bronchial asthma and normal controls. Patients with bronchial asthma showed higher ECF production than normal controls ($p < 0.01$).

状態を表すと考えられる、カンジダに対する幼若化反応と ECF 産生能との相関を検討した結果、これら間には $r = 0.66$ ($p < 0.05$) の正の相関が認められた。(Fig. 4)

次に、喘息群と健常群の ECF 産生能を比較したところ、喘息群は 71 ± 31 (個/10HPF) で健常群の 29 ± 12 (個/10HPF) に比し有意 ($p < 0.01$) に ECF 産生能の亢進が認められた。(Fig. 5)

また、喘息患者における血清 IgE 値と ECF 産生能との関連性を検討したところ、血清 IgE 値が 500 単位以下の群は 79 ± 31 (個/10HPF) で、500 単位より多い群 51 ± 22 (個/10HPF) に比し有意 ($p < 0.05$) に ECF 産生能が亢進していた。(Fig. 6)

さらに喘息の病型別で ECF 産生能を検討したところ、アトピー群では 57 ± 28 (個/10HPF) で、健常群に比べて ECF 産生能が有意 ($p <$

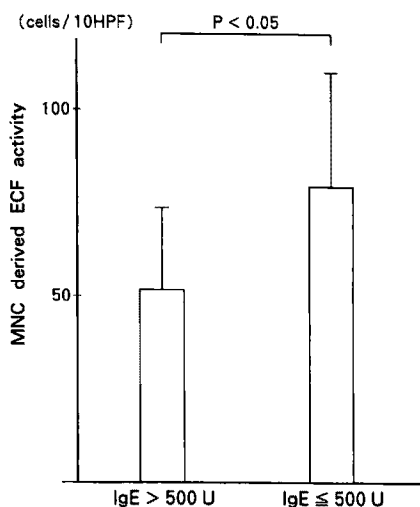


Fig. 6 Comparison of ECF activity in mononuclear cell (MNC) supernatant incubated with *Candida* antigen in asthmatics with serum IgE > 500 U/ml and those with IgE ≤ 500 U/ml. Asthmatics with IgE ≤ 500 U/ml showed higher ECF production than those with IgE > 500 U/ml ($p < 0.05$).

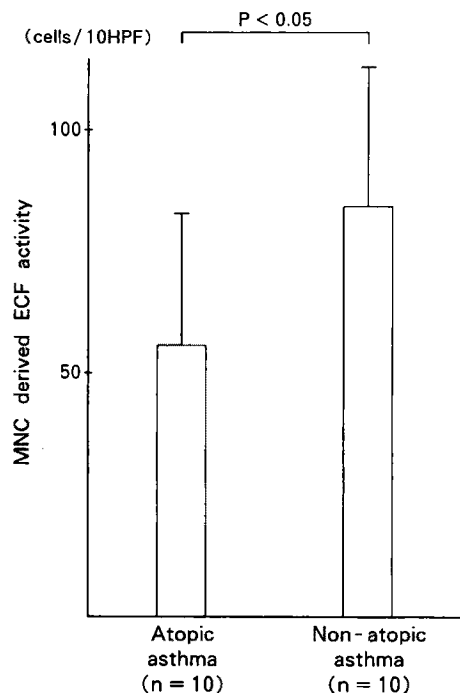


Fig. 7 Comparison of ECF activity in mononuclear cell (MNC) supernatant incubated with *Candida* antigen in atopic asthmatics and non-atopic asthmatics. Non-atopic asthmatics showed higher ECF production than atopic asthmatics ($p < 0.05$).

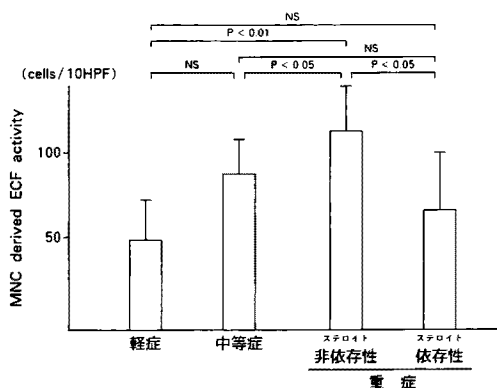


Fig. 8 Comparison of ECF activity in mononuclear cell (MNC) supernatant incubated with *Candida* antigen and patients' severity. Although severe but non steroid-dependent asthmatics showed higher ECF production than less severe asthmatics, severe but steroid-dependent asthmatics showed less ECF production than severe but non steroid-dependent asthmatics ($p < 0.05$).

0.05)に亢進しており、非アトピー群では 85 ± 29 (個/10HPF)と、健常群 ($p < 0.01$)、及びアトピー群 ($p < 0.05$)に比べてさらにECF産生能が亢進していた。(Fig. 7)

喘息の重症度別でECF産生能を検討したところ、軽症群 50 ± 21 (個/10HPF)、中等症群 82 ± 18 (個/10HPF)、ステロイド非依存性重症群 105 ± 25 (個/10HPF)と、重症な症例ほどECF産生能が亢進する傾向が認められた。また、重症群の中でもステロイド依存性になると、長期連用するステロイド剤の影響か、ECF産生能は 62 ± 31 (個/10HPF)とステロイド非依存群より有意 ($p < 0.05$)に低下し、軽症、中等症群と同程度であった。(Fig. 8)

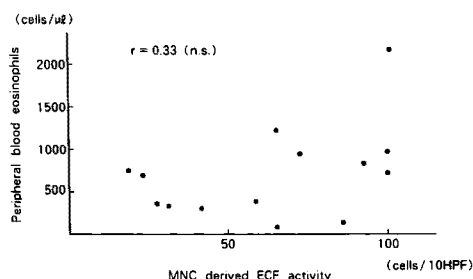


Fig. 9 Correlation between ECF activity in mononuclear cell (MNC) supernatant and peripheral blood eosinophils. No statistical significance was noticed between these two parameters.

つぎに、各症例の ECF 産生能と末梢血好酸球数との関係について検討した。末梢血好酸球数はステロイド依存群ではその影響を受けるため、ステロイド非依存群を対象に検討したが、これらの間には有意な相関は認められなかった。(Fig. 9)

考 索

気管支喘息は、その発症年齢より若年発症型と中高年発症型に大別され、それぞれ関与する抗原およびアレルギー反応に違いが認められている。特に中高年発症型は、通年性、非アトピー型の喘息で、その発症機序にはⅢ型アレルギー反応の他にカンジダを主要抗原とするⅣ型アレルギー反応が関与することが想定されている¹⁾²⁾³⁾。また以前より末梢血中好酸球増多はアトピー型喘息に特徴的とされていたが、教室の成績¹⁶⁾から非アトピー型喘息との間に有意差のないことが判明し、好酸球は非アトピー型喘息の発症機序においても関与するものと考えられる。そこで今回は、気管支喘息の発症機序における肺局所への好酸球集積にかかわるリンパ球の役割を解明する目的で、各病態の喘息患者末梢血単核球にカンジダ抗原を添加した場合の ECF 産生能を検討した。その結果、喘息患者ではカンジダ刺激による ECF 産生能は、カンジダに対するリンパ球の blastogenesis と正の相関関係にあり、かつ健康人に比しその産生能は有意に高かった。さらに非アトピー群、重症群では ECF

産生能の亢進が認められ、非アトピー型喘息の重症化には、カンジダ抗原刺激に対するリンパ球幼若化反応に伴う ECF 産生が一要因となるものと考えられた。なお、この末梢血単核球に含まれる好塩基球由来の ECF は、今回の検討にはほとんど影響していなかった。

気管支喘息における特徴的な病理学的所見のひとつに、気管支壁および気管支腔内への好酸球浸潤がある。抗原吸入誘発試験 (Bronchial provocation test : BPT) により誘発される即時型気道反応 (Immediate asthmatic response : IAR)、遅発型気道反応 (Late asthmatic response : LAR) 発現時の肺組織及び、BALF 中の細胞分類では、IAR 発現時には特別な細胞成分の変化は認められないが、LAR 発現時には著明な好酸球の増加が認められる¹⁷⁾。また、喘息発作による窒息死の症例については、著明な好酸球の浸潤が肺局所に認められる¹⁸⁾など、喘息発作と好酸球の組織浸潤との間には密接な関係が認められている。さらに、好酸球の顆粒中に含まれる Major basic protein (MBP)¹⁹⁾、Eosinophil cationic protein (ECP)²⁰⁾、Eosinophil peroxidase (EPO)²¹⁾ には組織障害性のあることが報告されるとともに、喘息発作時の喀痰中²²⁾や喘息により窒息死した症例の気管支上皮に MBP が証明され²³⁾、また BPT により IAR および LAR を示す症例における血清中の ECP の増加も報告されている²⁴⁾。さらに、好酸球から多量に産生される Leukotriene (LT) C₄ は気管支平滑筋の収縮作用が認められるなど²⁵⁾、気管支喘息の発作における好酸球の機能は、むしろ組織障害的なものと考えられている。

気管支喘息におけるこのような肺局所における好酸球の浸潤は、ハウスダスト、真菌類などを原因抗原とするアレルギー反応に連動して誘導されると考えられており、その原因抗原のうちでも、アトピー型喘息におけるハウスダスト、非アトピー型喘息でのカンジダが重要であるとされている。特にカンジダ吸入後の気道反応は重症難治性の発作を起こしやすく、また重症難治性喘息においてはカンジダ抗原に対する皮内反応陽性例 (特に遅発、遅延型)、BPT 陽性例が多く認められる¹⁾²⁶⁾。

気管支喘息の発症病態におけるI型アレルギー反応に関しては、末梢血好塩基球からのヒスタミン遊離がIgE (RAST) スコアに比例して起こることが報告され²⁷⁾、抗原刺激を受けた好塩基球・肥満細胞系より放出されるヒスタミン²⁸⁾、アラキドン酸代謝物²⁹⁾、Eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A)³⁰⁾、PAF³⁶⁾などのECF活性を持つメディエーターが肺局所への好酸球遊走に関与しているものと考えられている。III型アレルギー反応に関しては、月岡がカンジダ喘息患者血清中における高い凝集抗体価の存在を報告し³²⁾、木村は好塩基球・肥満細胞系のIgG receptor刺激によるIII型アレルギー反応の関与を想定しており¹²⁾³³⁾、抗原抗体複合体と補体との反応により産生されるC5aにはECF活性が認められている³³⁾。IV型アレルギー反応に関しては、重症難治群の末梢血及びBALF中リンパ球のカンジダに対する幼若化反応⁶⁾、IL-2産生能、好中球遊走因子産生能の亢進などがすでに報告されており⁷⁾、喘息の重症化に深く関与していることが想定されている。

以上、気管支喘息においては好酸球の局所浸潤に種々のアレルギー反応が複雑に関与しており、特にIV型アレルギー反応を介するECF活性を有するリンホカインの産生が好酸球の関与する喘息病態に重要な要因を担っているものと思われる。今回の検討により、気管支喘息患者末梢血単核球のカンジダ抗原刺激によるECF産生能は健康人に比し有意に亢進しており、喘息患者間においては非アトピー群、重症群がアトピー群、軽症群に比して亢進していた。ステロイド治療を必要とする、いわゆるステロイド依存性の重症群においては、使用されたステロイドのためか非依存性重症群に比べてECF産生能は低下していたが、なお軽症から中等症と同程度の産生は認められた。これらのことより、重症群、非アトピー群における単核球を介するIV型アレルギー反応の亢進状態は、IgEを介するI型アレルギー反応よりもその病態に重要な影響を及ぼしていると思われる。さらにステロイド依存性重症喘息群では、ステロイド剤の治療効果のひとつとしてECF産生能が低下しており、かかる喘息の治療理念としては、リンパ

球を介するECF産生の抑制を迫及することが重要であると考えられた。

なお、気管支喘息以外のアレルギー疾患、特に寄生虫疾患における組織の好酸球浸潤における単核球の関与についての報告は以前より数多く見られている。抗原刺激により産生されるリンホカインは末梢血のT-cell由来で好酸球の遊走を刺激するECF活性を持つとともに、好酸球の表面レセプターの変化を起こしたり¹¹⁾脱顆粒を誘導してsuperoxideやECPを放出する作用があるとの報告³⁵⁾や、またECF活性を持つ物質と好酸球の貪食能を増強させる物質の二種類の物質があるとの報告³⁶⁾も認められる。今回著者の検討した気管支喘息患者の末梢血単核球培養上清中の物質は、ECF活性を持つとともにchemokinetic activityも有していたが、これらが好酸球の脱顆粒を惹起するかどうかは今後の問題である。しかし、フィルター裏面まで遊走した好酸球を顕微鏡で見ると、胞体の膨化は認めるが顆粒の染色性はフィルターの表面のものと比較して明らかな変化は認められず、少なくとも30分の反応下では著明な脱顆粒を惹起するには及んでいないものと考えられた。一方鳥巢³⁷⁾によると、T-cellにより産生された物質はそれ自体はECF活性を持たない前駆物質で、抗原抗体複合体と結合することによりはじめてECF活性を持つと報告されているが、著者の実験系では外因性に抗原抗体複合体は加えておらず、抗体を含むと考えられる患者血清の添加なしでの培養条件であり、また抗原に対する特異的抗体を産生するには不十分な培養条件であるため、内因性の抗原抗体複合体はこの実験系に関与しないものと考えられた。従って、今回の検討により測定された気管支喘息患者の末梢血リンパ球由来のECFは、鳥巢らの報告とは異なる物質であると考えられた。なお近年、リンパ球から産生されるリンホカインであるIL-5には骨髄を刺激して好酸球の分化増殖を誘導する作用のほかに、ECF活性、好酸球の脱顆粒作用などが認められるとされており¹²⁾、今回の実験系により培養上清中に産生された物質と同一の物質である可能性もあるが、この点についてはさらに詳細な分析が必要である。

結 語

カンジダを主要抗原とするような気管支喘息において、その発症要因として重要な好酸球の集積にかかわるリンパ球の役割を解明する目的で末梢血中リンパ球のカンジダ抗原刺激による ECF 産生能を検討し、以下の結果を得た。

(1)好塩基球除去により単核球の ECF 産生能の変化は認められなかった。

(2)単核球培養上清中には好酸球の chemotactic activity と chemokinetic activity の両活性が認められた。

(3)喘息患者単核球の ECF 産生能とカンジダの blastogenesis との間に正の相関関係 ($r=0.66$, $p<0.05$) が認められた。

(4)気管支喘息患者末梢血単核球のカンジダ刺激による ECF 産生能は、健康人より有意に亢進していた。 ($p<0.01$)

(5)非アトピー群はアトピー群より ECF 産生能が有意に亢進していた。 ($p<0.05$)

(6)ステロイド非依存性重症喘息群の ECF 産生能は、軽症群より有意に亢進し ($p<0.01$)、

また中等症群に比しても有意に亢進していた。

($p<0.05$)しかし、ステロイド依存性重症喘息群の ECF 産生能は、ステロイド非依存性重症喘息群より有意に低く ($p<0.05$)、軽症、中等症群との間に有意差は認められなかった。

(7)末梢血好酸球数と ECF 産生能との間には特別の関係は認められなかった。

以上、気管支喘息のなかでも重症群、非アトピー群では ECF 産生能の亢進が認められ、カンジダ抗原に感作されたリンパ球を介する IV 型アレルギー反応が気管支喘息の重症化に深く関わっていることが想定された。また、重症難治性喘息におけるステロイド剤の治療効果のひとつとしては、ECF の産生抑制が重要であると考えられた。

稿を終えるにあたり、終始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と共に、直接御指導頂いた高橋清講師に深謝いたします。

(本論文の要旨は第39回アレルギー学会総会にて発表した。)

文 献

- 1) 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 (1985), 23—38.
- 2) 木村郁郎：気管支喘息—アトピー型喘息と中高年発症型難治性喘息の病態, 香川医師会誌 (1987) 40, 16—26.
- 3) 木村郁郎：気管支喘息—その病態と好塩基球—, アレルギー診療 (1986) 5, 119—131.
- 4) 多田慎也：難治と局所リンパ球, アレルギー (1986) 35, 581.
- 5) 難波一弘, 沖 和彦, 辻 光明, 荒木雅史, 中藤研一, 清水一紀, 尾崎公孝, 多田慎也, 高橋 清, 谷崎勝朗, 木村郁郎：遅発性気道反応の発症機序に関する検討—カンジダ喘息を中心に, アレルギー (1986) 35, 586.
- 6) 木村郁郎, 武田 昌, 多田慎也, 谷崎勝朗, 高橋 清, 塩田雄太郎, 佐藤 恭, 田村尚彦：気管支喘息患者の BAL 液中及び末梢血リンパ球の吸入抗原に対する反応性の検討, アレルギー (1984) 33, 812.
- 7) 宮川秀文, 難波一弘, 白石高昌, 名部 誠, 榎本 晃, 佐藤 恭, 武田 昌, 多田慎也, 高橋 清, 木村郁郎：重症難治性喘息における IV 型アレルギーの関与について—Candida 抗原による IL-2 産生能と好中球遊走活性—, アレルギー (1988) 37, 12—18.
- 8) 夏井坂徹, 岡本賢三, 小場弘之, 田垣 茂, 菅原好孝, 鈴木 明, 神谷美保：気管支喘息の内視鏡学的及び組織学的検討—発作の程度との関連性について—, 気管支学 (1981) 3, 407—411.
- 9) 福田 健, 沼尾利郎, 阿久津郁夫, 本島新司, 牧野莊平：I 型アレルギー反応における好酸球遊走活性メディエーターの解析, 第5回免疫薬理シンポジウム記録集 (1987), 59—72.

- 10) Gosset P, Tonnel AB, Joseph M, Prin L, Mallart A, Charon J and Capron A : Secretion of a chemotactic factor for neutrophils and eosinophils by alveolar macrophages from asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* (1984) **74**, 827—834.
- 11) Wardlaw AJ and Kay AB : The role of the eosinophil in the pathogenesis of asthma. *Allergy* (1987) **42**, 321—335.
- 12) Yamaguchi Y, Hayashi Y and Sugawa Y : Highly purified murine interleukin-5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival : IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *J Exp Med* (1988) **167**, 1737.
- 13) Weil GJ and Chused TM : Eosinophil autofluorescence and its use in isolation and analysis of human eosinophils using flow microfluorometry. *Blood* (1981) **57**, 1099—1104.
- 14) Boyden SV : The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* (1962) **115**, 453.
- 15) Landry FJ and Findlay SR : Purification of human basophils by negative selection. *J Immunol Methods* (1983) **63**, 329—336.
- 16) 高橋 清, 河田一郎 : 肥満細胞と好酸球の相互作用. *臨免疫* (1989) **21**, 1324—1332.
- 17) 難波一弘, 高橋 清, 多田慎也, 清水一紀, 中藤研一, 岡田千春, 辻 光明, 沖 和彦, 木村郁郎, 谷崎勝朗 : House Dust による気管支喘息患者遅発型気道反応の発症機序に関する検討—気管支肺胞洗浄法を中心に—. *アレルギー* (1988) **37**, 67—74.
- 18) 無江照子 : 気管支喘息の病理学的研究—気管支喘息の病理形態像—. *アレルギー* (1971) **20**, 885—902.
- 19) Gleich GJ, Frigas E, Loegering DA, Wassom DL and Steinmuller D : Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein. *J Immunol* (1979) **123**, 2925—2927.
- 20) Ding-E Young J, Peterson CGB, Venge P and Cohn ZA : Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature* (1986) **32**, 631—616.
- 21) Henderson WR, Jorg EC and Klibanoff SJ : Binding of eosinophil peroxidase to mast cell granules with retention of peroxidatic activity. *J Immunol* (1980) **124**, 1383—1388.
- 22) Frigas E, Loegering DA, Solley Go, Farrow GM and Gleich GJ : Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clin Proc* (1981) **56**, 345—353.
- 23) Filley WV, Holley KE, Kephart GM and Gleich GJ : Identification by immunofluorescence of eosinophil granule major basic protein in lung tissue of patients with bronchial asthma. *Lancet* ii (1982), 11—16.
- 24) de Monchy JGR, Kauffman HF, Venge P, Koeter GH, Jansen HM, Sliter HJ and Vries KD : Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis* (1985) **131**, 373—376.
- 25) Weiss JW, Drazen JM, Coles N, McFadden ER Jr., Weller PF, Corey EJ, Lewis RA and Austen KF : Bronchoconstrictor effects of leukotriene C in humans. *Science* (1982) **21**, 196—198.
- 26) 可部順三郎 : 真菌とアレルギー. *治療* (1986) **68**, 2030—2034.
- 27) 谷崎勝朗, 駒越春樹, 周藤真康, 貴谷 光, 多田慎也, 高橋 清, 木村郁郎 : 気管支喘息の発症病態におよぼす加齢の影響について. 2. 好塩基球の反応性. *日老医学会誌* (1987) **24**, 421—426.
- 28) Bryant DH, Turnbull LW and Kay AB : Eosinophil chemotaxis to an ECF-A tetrapeptide and histamine : the response in various disease states. *Clin Allergy* (1977) **7**, 219.
- 29) Goetzl EJ, Woods JM and Gorman RR : Stimulation of human eosinophil and neutrophil polymorphonuclear leukocyte chemotaxis and random migration by 12-L-hydroxy-5, 8, 10, 14-

- eicosatetraenoic acid (HETE). *J Clin Invest* (1977) **59**, 170—183.
- 30) Kay AB, Stechschulte DJ and Austin KF : An eosinophil leukocyte chemotactic factor of anaphylaxis. *J Exp Med* (1971) **133**, 602—619.
 - 31) Tamura N, Agrawal DK, Sulian FA and Townley RG : Effect of platelet activating factor on the chemotaxis of normodense eosinophils from normal subjects. *Biochem Biophys Res Commun* (1987) **142**, 638—644.
 - 32) 月岡一治 : カンジダ喘息の発症機序に関する研究, 第3報, 吸人誘発型とI型およびIII型アレルギーの関連について. *アレルギー* (1985) **34**, 289—296.
 - 33) Kay AB : Studies on eosinophil leukocyte migration. II. Factors specifically chemotactic for eosinophils and neutrophils generated from guinea-pig serum by antigen-antibody complexes. *Clin Exp Immunol* (1970) **7**, 723—737.
 - 34) Veith MC, Taylor DW, Thorne K, Richardson BA and Butterworth AE : Studies on the enhancement of human eosinophil function by mononuclear cell products in vitro. *Clin Exp Immunol* (1984) **58**, 603—610.
 - 35) Thorne K, Richardson BA, Veith MC, Tai P, Spry CJF and Butterworth AE : Partial purification and biological properties of an eosinophil-activating factor. *Eur J Immunol* (1985) **15**, 1083—1091.
 - 36) Sher R, Wadde A and Joffe M : The enhancement of eosinophil function by lymphocyte supernatants. *Clin Exp Immunol* (1983) **51**, 525—534.
 - 37) Torisu M, Yoshida T, Ward PA and Cohen S : Lymphocyte-derived eosinophil chemotactic factor. II. Studies on the mechanism of activation of the precursor substance by immune complexes. *J Immunol* (1973) **111**, 1450—1458.

**Studies on the role of eosinophils
in the pathogenesis of bronchial asthma
Part 2. Production of eosinophil chemotactic factor
by peripheral blood mononuclear cells
incubated with Candida antigen**

Ichiro KAWADA

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

(Director : Prof. I. Kimura)

The role of the eosinophil chemotactic factor (ECF) produced by peripheral blood mononuclear cells in the pathogenesis of bronchial asthma was studied. Bronchial asthma in childhood is characterized by its atopic history and such an asthmatic attack is induced by house dust or mite antigen through the type I allergic reaction. The lymphocytes found in bronchoalveolar lavage fluid have high responsiveness to Candida antigen. This suggests the participation of the type IV allergic reaction in the pathogenesis of asthmatic attack. Eosinophilic granulocyte infiltration in the lungs during the asthmatic attack was evaluated by measuring ECF activity produced by peripheral blood mononuclear cells incubated with Candida antigen. Chemotactic and chemokinetic activities to eosinophilic granulocytes were present in the supernatant, and basophilic granulocyte depletion did not change such chemotactic activity. High ECF production was observed in non-atopic asthmatics and in severe but non-steroid-dependent asthmatics. ECF may be produced at least in part from the lymphocyte blastogenic response to Candida antigen and may have some effect on the pathogenesis of non-atopic and severe asthmatics.