

# 気管支喘息における 好酸球動態の調節に関する研究

## 第 1 編

### 喘息患者末梢血単核球由来の好酸球遊走因子 (ECF) の解析

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

高 橋 寿 保

(平成3年3月20日受稿)

**Key words :** Bronchial asthma, *Candida* antigen  
Eosinophil chemotactic factor, Interleukin-5

## 緒 言

気管支喘息の発症には、心因性や物理化学的要因も否定できないが、むしろ吸入抗原に起因する種々のアレルギー反応の関与が重要な要因と考えられている。かかる観点から喘息病態を解析すると、若年発症型に多くみられるアトピー型喘息では、主に house dust, ダニ抗原に対する IgE 抗体の産生亢進に基づく I 型アレルギー反応により即時型の発作が惹起される。一方、木村により提唱された中高年発症型難治性喘息は<sup>1)</sup>、非アトピー型で、通年性に発作を繰り返し治療抵抗性であり、真菌抗原の *Candida* に特異的な IgG 抗体を介した III 型アレルギー反応とリンパ球・マクロファージ系による IV 型アレルギー反応の混在した細胞反応型アレルギー<sup>2)</sup>がその病態に深く関与していると想定され、成人喘息の特徴的な病態を代表するとされている<sup>3)4)5)6)</sup>。

一方、気管支喘息の病理学上の特徴的な所見の一つに、気管支壁および気管支腔内への好酸球浸潤があり、喘息発作時には非発作時よりも高度の好酸球浸潤が認められ、喘息発作と気道好酸球浸潤との間の密接な関係が報告されている<sup>7)</sup>。かかる末梢気道のアレルギー性炎症の場合の好酸球集積には、種々の好酸球遊走因子 (Eosinophil chemotactic factor : ECF) が関与しており、従来から肥満細胞・好塩基球系由

来の ECF-A 等以外に、リンパ球由来の ECF-Ly が重視されていた<sup>8)</sup>。近年のめざましい T リンパ球由来のサイトカインに関する研究の結果、Interleukin-5 (IL-5) に ECF 活性が見いだされている<sup>9)</sup>。また、教室の河田<sup>10)</sup>は、喘息患者末梢血単核球の *Candida* 抗原刺激培養上清中の ECF 活性を測定し、気管支喘息のなかでも非アトピー群や重症例のリンパ球は ECF 産生能が亢進しており、*Candida* 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重要な役割を果たしていることを報告している。そこで著者は、かかる喘息患者末梢血単核球培養上清中の ECF の成分を、IL-5 の観点から、gel filtration と特異抗体による blocking test を応用して解析した。

## 対象と方法

対象には、岡山大学第2内科外来通院中の気管支喘息患者で、末梢血単核球の *Candida* 抗原刺激培養上清中の ECF 活性が、河田の報告<sup>10)</sup>した健常人 (7例) の ECF 活性  $29 \pm 12$  Cells/10 hpf に比し  $71 \pm 31$  Cells/10 hpf と有意に高値であった喘息群 (20例) の中でも、著しく高値を示した4例を対象とした。かかる4症例はいずれも非アトピー型重症例で、*Candida* 抗原吸入誘発試験にて遅発型気道反応 (Late asthmatic response : LAR) を呈し、*Candida* 抗原に対す

表1 対象症例の背景因子

病型は、①発症年齢40歳未満、②他のアレルギー疾患の合併、③IgE (RIST) 高値 (>500U/ml)、④IgE (RAST) 陽性、⑤即時型皮内反応陽性(真菌類のみ陽性の場合を除く)、の5項目のうち、3項目以上を満たすものをアトピー型とし、それ以外を非アトピー型とした。重症度は、日本アレルギー学会の分類に従った。プレドニゾン換算5mg/day×1年間以上をステロイド依存群とした。I: immediate, L: late, MNCS: 単核球培養上清。

Case NO.	1	2	3	4	
発症年齢(歳)	30	29	27	20	
病型	非アトピー	非アトピー	非アトピー	非アトピー	
重症度	重症	重症	重症	重症	
ステロイド依存性	非	依	非	非	
末血好酸球数(/μl)	980	50	72	360	
皮内反応 I	(+)	(-)	(+)	(+)	
	L (-)	(+)	(-)	(-)	
カン	RAST score	0	0	0	0
ジ	リンパ球幼若	3.08	4.18	4.72	2.62
ダ	化反応 (S.I.)				
抗原	MNCS ECF	218	175	120	190
	活性 (/10hpf)				
	吸入誘発 I	(+)	(-)	(+)	(+)
	試験 L	(+)	(+)	(+)	(+)

る末梢血リンパ球幼若化反応が亢進していた(表1)。

#### 1) 末梢血好酸球の分離

Boyden chamber 法による ECF 活性測定に必要な好酸球の分離法は、教室の河田の方法<sup>11)</sup>に準じた。すなわち、好酸球増多のない健常人より末梢血5mlをヘパリン加で採血し、6%デキストラン1mlを加えて室温で30分間静置した後 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) 10mlを加えて4℃、250gで5分間洗滌し、その沈渣に蒸留水1mlを加えて30秒間ピペティングして溶血させた後、1.8%食塩水1mlを加えて等張に戻した。さらにPBSを加えて4℃、250gで5分間洗滌した後に、Flow cytometry (Becton Dickinson 社: FACStar) を利用した方法<sup>11)12)</sup>で好酸球を分離した。得られた好酸球を、Hanks' balanced salt solution (HBSS: GIBCO) で $2 \times 10^4$ 個/100μl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) ECF 活性の測定

Multiwell microchemotaxis chamber (Neuroprobe) と、孔径5μmのfilter (Nucleopore) を用いた、modified Boyden chamber 法<sup>13)</sup>にて測定した。すなわち、後述の培養上清やその分画液の50μl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 $2 \times 10^4$ 個を入れて、37℃のCO<sub>2</sub>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、好酸球の染色をエオジノステイン(鳥居薬品)を用いて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後400倍拡大で鏡検し、filterの下室側まで遊走した好酸球数を無作為に10視野数えてECF活性(遊走細胞数/10hpf)とした。ECF活性の測定は triplicate または duplicate で行い、好酸球は同一健常人のものを用いた。

#### 3) Candida 抗原刺激末梢血単核球培養上清の作成

Candida 抗原刺激末梢血単核球培養上清の作成は河田の方法<sup>10)</sup>に準じて行った。すなわち、気管支喘息患者の末梢血10ml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、450gで30分遠心分離した。得られた単核球層にRPMI 1640 (GIBCO) を加えて4℃、250gで5分間の洗滌を2回繰り返し、RPMI 1640で $1 \times 10^6$ 個/500μl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 tissue culture cluster (Costar) に $1 \times 10^6$ 個/well ずつ分注して、添加抗原として Candida 抗原凍乾末(鳥居薬品)をRPMI 1640にて溶解したもの150μgを添加し、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーター内で2日間培養した後に、その上清を室温、1400gで30秒間遠沈して回収した。

#### 4) Candida 抗原刺激末梢血単核球培養上清中 ECF 活性の分子量の検討

得られた培養上清の分子量測定は以下の方法で行った。まず、分子量1万以下 cut off の限外濾過フィルター(Ultrafilter: TOYO)を用い

て10倍の濃度に濃縮し、ついで分子量10 kD 以上の物質を含む濃縮液を、ベッド径16mm、高さ70cmの Sephacryl S 200 HR カラム (Pharmacia) を用い、pH 7.4の HBSS で4℃、流速4.5ml/hrにて gel filtration を行い、各分画を1.5mlずつシリコン化ガラス試験管に分取した。カラムのキャリブレーションには、Thyroglobulin (670 kD), Gamma globulin (158 kD), Ovalbumine (44 kD), Myoglobin (17 kD), Cyanocobalamin (1.35 kD) (Gel filtration standard: BIO-RAD) を用いた。分取した各分画および限外濾過の際に得られた分子量10 kD 以下の濾液の ECF 活性を測定した。

5) *Candida* 抗原刺激単核球培養上清中の IL-5 の同定—ECF 活性の抗マウス IL-5 抗体による中和試験—

単核球培養上清の gel filtration 後の各分画中の IL-5 の存在を検討する目的で、種々の濃度のリコンビナントヒト Interleukin-5 (rhIL-5: サントリー)<sup>14)</sup>と培養上清の各分画液に、

リコンビナント抗マウス (m) IL-5 抗体 (オリンパス)<sup>15)</sup>を添加し37℃で2時間インキュベートの後、その ECF 活性を測定し、抗体非添加時の ECF 活性との比から抑制率 (%) を算出した。

## 成 績

1) 単核球培養上清中 ECF 活性の gel filtration による分子量の検討

対象症例全例の ECF 活性は、図1に示すごとく、すべて約20~65 kD の分画の範囲に認められ、40~50 kD 付近にピークが認められた。なお、10 kD 以下の分画には ECF 活性は認められなかった。

2) rhIL-5 の ECF 活性に及ぼす抗 mIL-5 抗体の抑制効果

rhIL-5 (5 ng/ml) の ECF 活性を中和するのに至適な抗 mIL-5 抗体濃度の検討を行ったところ、図2に示すごとく抗体濃度が5 µg/ml以上で rhIL-5 (5 ng/ml) の ECF 活性に対して約

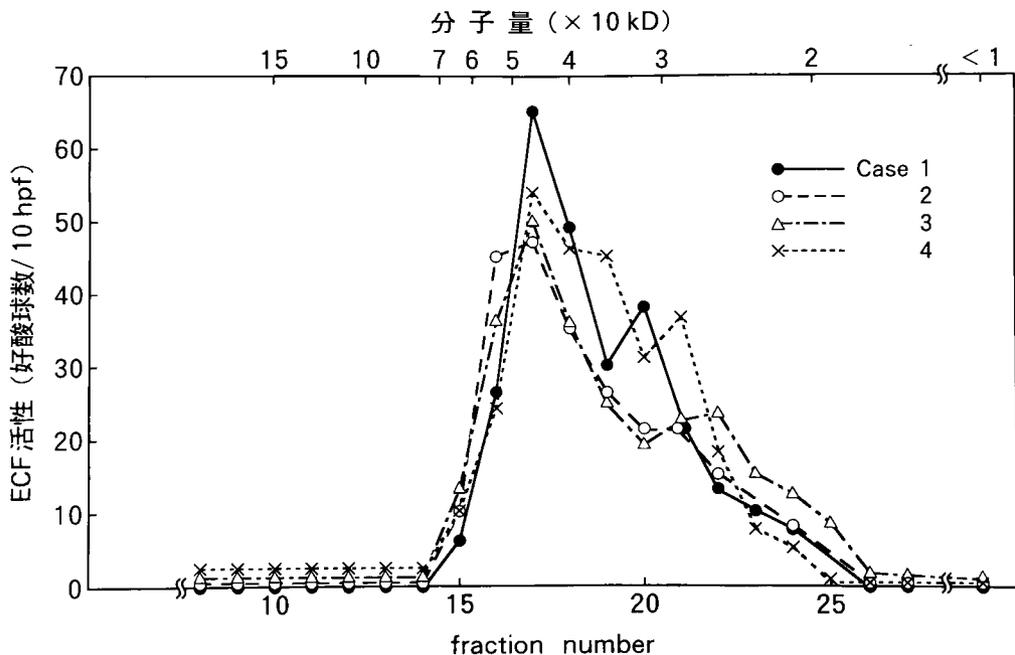


図1 *Candida* 抗原刺激末梢血単核球培養上清の gel filtration による各分画中 ECF 活性の検討  
ECF 活性は約20~65 kD に認められ、40~50 kD 付近にピークが認められた。10 kD 以下の分画には認められなかった。

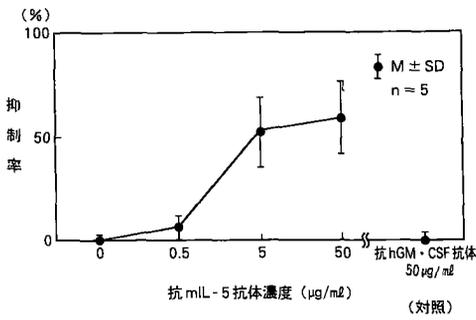


図2 各濃度の抗 mIL-5 抗体の rhIL-5 (5 ng/ml) の ECF 活性に及ぼす抑制効果  
抗 mIL-5 抗体 5 µg/ml 以上で約50%の抑制が認められ、50 µg/ml で充分量と考えられた。

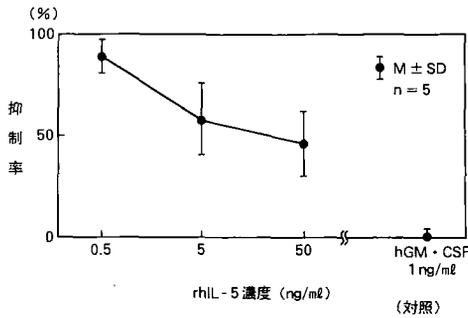
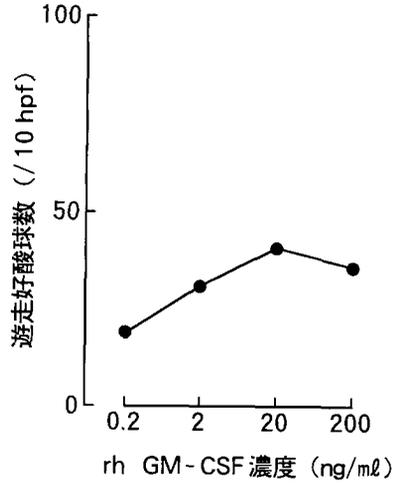


図3 各濃度の rhIL-5 の ECF 活性に及ぼす抗 mIL-5 抗体 (50 µg/ml) の抑制効果  
ほぼ濃度依存性に低下し、IL-5 50 ng/ml で約50%の抑制が認められた。

50%の抑制効果が認められた。一方対照として、抗 mIL-5 抗体と同じく mouse の IgG 1 抗体である抗ヒト GM-CSF 抗体 (Genzyme) では抑制されないことから、mouse IgG 1 抗体自体には抑制効果がないと考えられた。したがって、抗 mIL-5 抗体の濃度は、抗体過剰と考えられる 50 µg/ml で充分量と考えられ、以下の検討にはこの濃度の抗体を用いた。

逆に、抗 mIL-5 抗体が 50 µg/ml の場合には、rhIL-5 の各濃度における ECF 活性は、図 3 のごとくその濃度が上昇するに従い抑制率が低下する傾向が認められ、5 ng/ml 以上で約 50% の抑制率であった。なお、リコンビナントヒト Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) は、図 4 の checkerboard



		上室 GM-CSF 濃度 (ng/ml)		
		0	2	20
下室 GM-CSF 濃度	0	4	—	14
	2	32	23	—
	20	42	36	30

図4 rhGM-CSF の ECF 活性  
上図：各濃度の GM-CSF に対する ECF 活性。20 ng/ml で活性のピークが認められた。  
下図：checkerboard assay, chemokinetic および chemotactic effect が認められた。

assay に示すごとく、IL-5 よりは弱いながら chemokinetic および chemotactic effect を示したが、それは抗 mIL-5 抗体では抑制されなかった。即ち、抗 mIL-5 抗体による抑制は、IL-5 に特異的なものと考えられた。

3) 単核球培養上清の gel filtration 各分画に含まれる ECF 活性の抗 mIL-5 抗体による抑制

症例 1 につき約 25 から 55 kD までの各分画の ECF 活性に及ぼす抗 mIL-5 抗体の 50 µg/ml での抑制効果を検討したところ、図 5 のごとく、およそ 40~55 kD の範囲で全活性の半分程度の抑制が認められた。

そこで、単核球培養上清中の ECF 活性が最

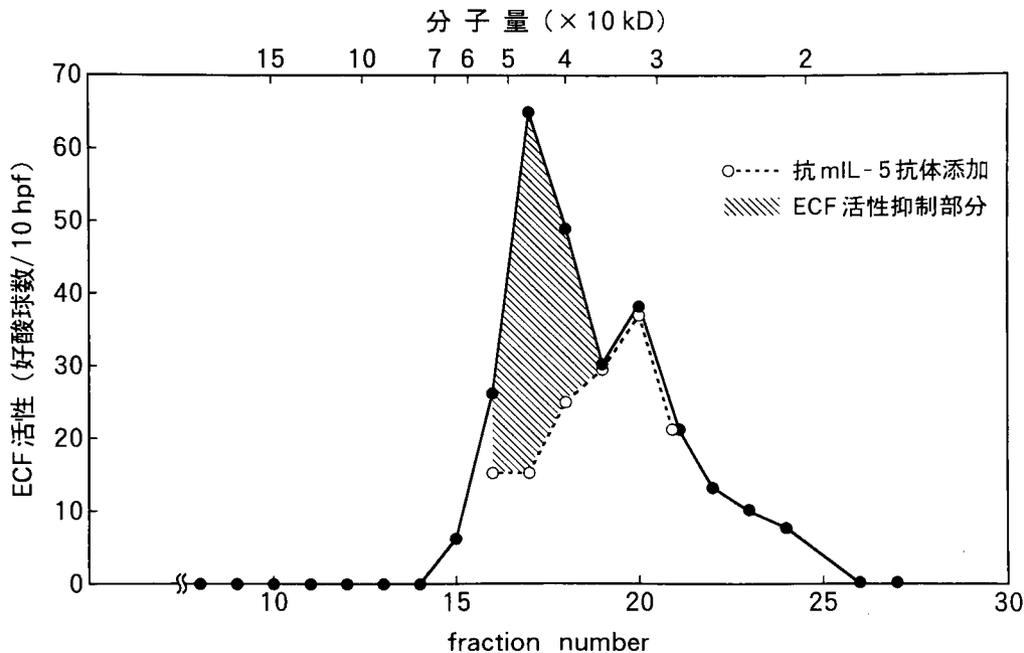


図5 症例1の末梢血単核球培養上清の gel filtration による各分画 ECF 活性に及ぼす抗 mIL-5 抗体の抑制効果  
約40~55 kD で抑制された。

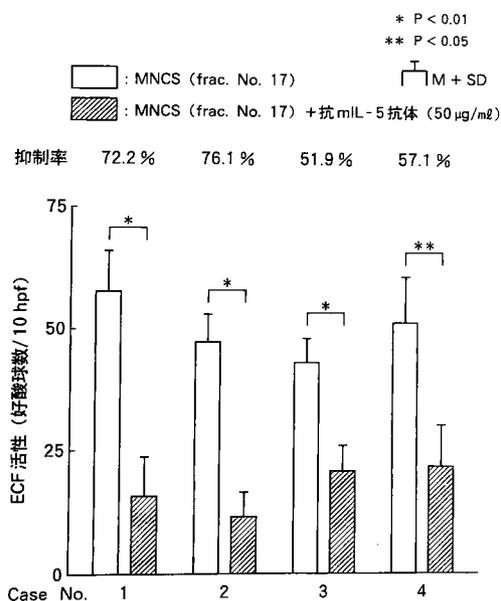


図6 末梢血単核球培養上清における gel filtration fraction No.17 (40-50 kD) の ECF 活性に及ぼす抗 mIL-5 抗体の抑制効果  
76.1%~51.9%の抑制が認められた。

も強く、抗 mIL-5 抗体での抑制が顕著と考えられた40-50 kD の分画について、各症例の ECF 活性の抑制効果を検討したところ、図6に示すごとく50µg/mlの抗 mIL-5 抗体によって76.1%から51.9%の抑制が認められた。したがって、この分画の大部分の ECF 活性物質は IL-5 であると考えられた。

考 察

気管支喘息のうち、特に非アトピー群、重症群では、リンパ球がその病態の重要な役割を担っていると考えられている<sup>2)9)</sup>。一方、喘息病態上の特徴の一つである肺局所への好酸球集積に関しても、非アトピー群や重症群では *Candida* 抗原刺激による末梢血単核球からの ECF 産生能の亢進を認めており、*Candida* 抗原に感作されたリンパ球を介する細胞反応型アレルギーが局所好酸球浸潤を介して、喘息の重症化に深く関わっているものと思われる<sup>10)</sup>。そこで今回は、喘息患者末梢血単核球に *Candida* 抗原を添加した際に産生される ECF の解析を試みた。その結

果、ECFの分子量はおよそ20~65 kDにわたっており、活性のピークは40~50 kDであった。さらに、rhIL-5のECF活性が抗mIL-5抗体により不完全ながら中和されることを利用して、IL-5の分子量に当たる40~50 kDの分画中に認められたECF活性の中和試験を行ったところ、抗mIL-5抗体により76.1~51.9%の抑制が認められ、この分画にはIL-5が存在することが判明した。

気管支喘息の発症機序は従来単一的なものと考えられていたが、種々の検索の結果から、最近では喘息という同一の症候でありながら異なった疾患病態が混在していると考えられつつある。即ち気管支喘息は、その発症年齢に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相違が指摘されており、特に中高年発症型は通年性・非アトピー型の喘息で、その病態には *Candida* を主要抗原とするIII型アレルギー反応およびIV型アレルギー反応が混在した細胞反応型アレルギーの関与が想定されている<sup>1)2)3)4)6)</sup>。今回検討した4症例は、IL-5を主体とした *Candida* 抗原刺激単核球由来 ECF の産生亢進を認めた。これらの症例のように、*Candida* 抗原に対するリンパ球幼若化反応の亢進や *Candida* 抗原吸入誘発試験で遅発型気道反応 (LAR) が認められる場合、IL-5が重症化・難治化に深く関与しているものと思われる。

気管支喘息発作と肺の好酸球浸潤との間には密接な関係が想定されており、例えば抗原吸入誘発試験では、即時型気道反応 (Immediate asthmatic response : IAR) 発現の前後で気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の細胞成分に変化は認められなかったが、遅発型気道反応 (Late asthmatic response : LAR) 発現時には著明な好酸球の増加が認められている<sup>16)</sup>。また喘息発作による窒息死の例では、気管支壁および気管支腔内等肺局所に著明な好酸球浸潤が認められる<sup>17)</sup>。かかる好酸球の顆粒中に含まれる Major basic protein (MBP)<sup>18)</sup>、Eosinophil cationic protein (ECP)<sup>19)</sup>、Eosinophil peroxidase (EPO)<sup>20)</sup>、Eosinophil derived neurotoxin (EDN)<sup>21)</sup> などには強い組織傷害性があり、喘息発作死症例の

気管支粘膜上皮組織中の好酸球周囲に多量の MBP がみられている<sup>22)</sup>。また、好酸球から産生される newly formed mediator である Leukotriene (LT) C<sub>4</sub><sup>23)</sup> や platelet activating factor (PAF)<sup>24)</sup> は強い平滑筋収縮作用を有していること等の報告から、好酸球は気管支喘息発作の病態において組織傷害的に働いていると考えられる。

かかる気管支喘息における肺局所への好酸球の浸潤は、原因抗原に対する各アレルギー反応に連動して誘導されるものと考えられ、すなわち、I型アレルギー反応に関しては、好塩基球・肥満細胞系が抗原刺激を受けると、Histamine<sup>25)</sup>、Eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A)<sup>26)</sup>、PAF<sup>27)28)</sup>、アラキドン酸代謝産物<sup>29)</sup>などのECF活性をもつ mediator が放出され、肺局所へと好酸球が動員される。一方III型アレルギー反応の場合には、木村は好塩基球・肥満細胞系の IgG receptor 刺激を介する反応を想定しており<sup>1)2)3)4)</sup>、その他に抗原抗体複合体による補体活性化により産生される C<sub>5a</sub> にも ECF 活性が認められている<sup>30)</sup>。さらにIV型アレルギー反応の場合には、前述のごとく、非アトピー群・重症群では *Candida* 抗原に対する末梢血単核球の ECF 産生能が亢進しており、重症化・難治化に深く関与していることが想定される<sup>10)</sup>。

寄生虫疾患をはじめとするアレルギー疾患の組織好酸球浸潤、あるいは好酸球活性化における単核球の関与については数多くの報告がある。ECFに関しては、抗原刺激された住血吸虫症患者リンパ球から分子量23~56 kDのECFが産生される<sup>31)</sup>とか、木村氏病では granuloma 中の Tリンパ球が分子量45~70 kD と12.5 kDの2種類の ECF を産生する<sup>32)</sup>等の報告がある。好酸球の脱顆粒や補体 receptor 発現、LTC<sub>4</sub>、活性酸素産生、細胞傷害作用などの各種機能を活性化する物質としては、中等度の好酸球増多症例の単核球から非刺激下でも産生される約40 kDの Eosinophil activating factor (EAF)<sup>33)</sup>や、住血吸虫感染マウスの脾リンパ球を抗原刺激した際に産生される Eosinophil stimulation promotor (ESP) が報告されており、ESPの主

たる活性は最近になって IL-5 および GM-CSF であると報告されている<sup>34)</sup>。今回著者が検討した *Candida* 抗原刺激単核球培養上清中の ECF 活性は 20~65 kD に認められ、IL-5 がその主たる活性であることが判明した。なお、今回成績として示していないが、GM-CSF の混在を証明するため、IL-5 の場合と同様抗 GM-CSF 抗体を用いた中和試験を試みたが、GM-CSF の分子量に相当する 23 kD 付近の ECF 活性は弱く検討できなかった。その点に関しては、他の報告にみられるように培養上清中には GM-CSF も含まれていることが想像されるが、今回の条件下では ECF 活性としてはその影響は少ないと考えられた。また、40~50 kD の主たるピーク以外に 30 kD 付近にも弱いピークが認められ、未知の ECF の存在が想定されたが、この点については今後の詳細な検討が必要と思われた。

ヒトとマウスの IL-5 は、そのヌクレオチドおよびアミノ酸配列において 7 割程度が同じであり、このため抗マウス IL-5 抗体でもヒト IL-5 の ECF 活性が抑制可能であると考えられた<sup>35)</sup>。一方、相当量の抗 mIL-5 抗体でも rhIL-5 の ECF 活性を完全には抑制できなかった点については、第 1 にヒトとマウス間での IL-5 の構造の若干の相違による抗体の affinity の問題が考えられた。第 2 点としては、今回の実験系では、IL-5 と抗 mIL-5 抗体を反応させた溶液を免疫複合体を除去することなくそのまま ECF 活性の測定に用いており、抗体が結合したとしても IL-5 の ECF 活性発現部位の残存している可能性も想定される。したがって、かかる抗 mIL-5 抗体を用いた ECF 活性の中和試験では、IL-5 の定性は可能であるが、厳密な定量には不相当と思われた。

骨髄幹細胞に対し好酸球の分化増殖因子として作用する物質には、IL-5、GM-CSF、IL-3 が知られており<sup>36)</sup>、これらは同時に成熟好酸球に対しての活性化能も有している。即ち、抗体依存性殺寄生虫作用や食食能、活性酸素・LTC<sub>4</sub> 産生能などの亢進や、好酸球寿命の延長、好酸球の低比重化の促進、表面 receptor の発現および脱顆粒の増強などが認められている<sup>37)38)39)40)41)42)</sup>。そのなかでも、主にヘルパー T 細胞から産生さ

れる IL-5 は、好酸球に選択的に作用し、それ自体好酸球に対する chemokinetic および chemotactic effect を有する<sup>9)43)</sup>他、PAF などによる chemotaxis を増強する作用が報告されている<sup>44)</sup>。著者の検討では、IL-5 単独の chemotactic effect が PAF のそれと同等となる濃度は 100 ng/ml と生体内では考え難い高濃度であり、実際のアレルギー性炎症の場では、IL-5 が単核球由来の他の ECF や PAF 等のサイトカインとの相乗効果を発揮することによって好酸球の局所への遊走が起こっていると想像される。さらに IL-5 は、CD11/18 receptor complex を介する好酸球の粘着能を亢進させるとの報告もあり<sup>45)</sup>、アレルギー反応局所へ好酸球を持続的に集積させ、かつ活性化させて組織傷害を増強し、喘息発作を遷延化させ、さらに非可逆的・器質的な変化を誘導させると考えられる。以上のごとく IL-5、すなわち気道局所のリンパ球は、気管支喘息の重症化・難治化要因として重要な役割を演じていると考えられる。

## 結 論

*Candida* を主要抗原とする気管支喘息患者の末梢血単核球を *Candida* 抗原で刺激した際に産生される ECF の分析を試み、以下の結果を得た。

(1) 単核球培養上清中の ECF は、gel filtration にて 20~65 kD に認められ、40~50 kD に活性のピークが認められた。

(2) rhIL-5 の ECF 活性は、抗 mIL-5 抗体により抑制された。

(3) 培養上清 40~50 kD の分画中の ECF 活性は、抗 mIL-5 抗体によって抑制され、IL-5 の存在が示された。

以上、カンジダ喘息患者では、抗原刺激により産生された単核球由来の ECF に IL-5 が含まれており、*Candida* 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好酸球の局所集積を介する重症化、難治化に重要な役割を担っていることが想定された。

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致します。 (にて発表した。)

(本論文の要旨は第40回日本アレルギー学会総会

## 文 献

- 1) 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。日本胸部疾患学会雑誌 (1983) **21**, 181—182.
- 2) 木村郁郎：気管支肺病変におけるアレルギーとリンパ球。アレルギー (1990) **19**, 12—16.
- 3) 木村郁郎：遅発型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議事録，デー・エム・ペー・ジャパン，東京 (1985) pp 23—40.
- 4) 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.
- 5) 月岡一治：カンジダ喘息の発症機序に関する研究—第3報，吸入誘発型とI型及びIII型アレルギーの関連について。アレルギー (1985) **34**, 289—296.
- 6) 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.
- 7) 福田 健，沼尾利郎，阿久津郁夫，本島新司，牧野荘平：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議事録，デー・エム・ペー・ジャパン，東京 (1987) pp 59—72.
- 8) Parish WE and Luckhurst E：Eosinophilia VI, spontaneous synthesis of chemokinetic, chemotactic, complement receptor-inducing activities for eosinophils by bronchial T lymphocyte of asthmatic-bronchitis patients. Clin Allergy (1982) **12**, 475—488.
- 9) Wang JW, Rambaldi A, Biondi A, Chen ZG, Sanderson CJ and Montovani A：Recombinant human interleukin 5 is a selective eosinophil chemoattractant. Eur J Immunol (1989) **19**, 701—705.
- 10) 河田一郎：気管支喘息の発症機序における好酸球動態に関する研究—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。岡山医誌 (1990) **102**, 745—755.
- 11) 河田一郎：気管支喘息の発症機序における好酸球動態に関する研究—第1編フローサイトメトリーを用いた好酸球分離法と好酸球遊走因子について。岡山医誌 (1990) **102**, 733—743.
- 12) 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.
- 13) Boyden SV：The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. J Exp Med (1962) **115**, 453.
- 14) Tsujimoto M, Adachi H, Kodama S, Tsuruoka N, Yamada Y, Tanaka S, Mita S and Takatsu K：Purification and characterization of recombinant human interleukin 5 expressed in chinese hamster ovary cells. J Biochem (1989) **106**, 23—28.
- 15) Harada N, Takahashi T, Matsumoto M, Kinashi T, Ohara J, Kikuchi Y, Koyama N, Severinson E, Yaoita Y, Honjo T, Yamaguchi N, Tominaga A and Takatsu K：Production of a monoclonal antibody useful in the molecular characterization of murine T-cell-replacing factor/B-cell growth factor II. Proc Natl Acad Sci USA (1987) **84**, 4581—4585.
- 16) 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.
- 17) 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.

- 18) 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.
- 19) Ding-E Young J, Peterson CGB, Venge P and Cohn ZA : Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature* (1986) **321**, 613—616.
- 20) 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.
- 21) Gleich GJ, Loegering DA, Bell MP, Checkel JL, Ackerman SJ and Mckean DJ : Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein : homology with ribonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA* (1986) **83**, 3146—3150.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) Lee TC, Leniham DJ, Malone B, Roddy LL and Wasserman SI : Increased biosynthesis of platelet-activating factor in activated eosinophils. *J Biol Chem* (1984) **259**, 5526—5532.
- 25) 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.
- 26) Kay AB, Stechschulte DJ and Austin KF : An eosinophil leukocyte chemotactic factor of anaphylaxis. *J Exp Med* (1971) **133**, 602—619.
- 27) Wardlaw AJ, Moqbel R, Cromwell O and Kay AB : Platelet-activating factor : A potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. *J Clin Invest* (1986) **78**, 1701—1706.
- 28) 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.
- 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 : 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.
- 31) Sher R, Wade A and Joffe M : The enhancement of eosinophil function by lymphocyte supernatants. *Clin Exp Immunol* (1983) **51**, 525—534.
- 32) Hirashima M, Tashiro K, Sakata K, Muramoto K and Iyama K : Eosinophil chemotactic factors from granuloma of Kimura's disease, with special reference to T lymphocyte-derived factors. *J Leukocyte Biol* (1986) **40**, 393—405.
- 33) Thorne KJI, Richardson BA, Veith MC, Tai PC, Spry CJF and Butterworth AE : Partial purification and biological properties of an eosinophil-activating factor. *Eur J Immunol* (1985) **15**, 1083—1091.
- 34) Secor WE, Stewart SI and Colley DG : Eosinophils and immune mechanism : IV. The synergistic combination of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-5 accounts for eosinophil-stimulation promoter activity in *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J Immunol* (1990) **144**, 1484—1486.

- 35) Azuma C, Tanabe T, Konishi T, Kinashi T, Noma T, Matsuda F, Yaoita Y, Takatsu K, Hammarstrom L, Smith CIE, Severinson E, Honjo T : Cloning of cDNA for human T-cell replacing factor (interleukin-5) and comparison with the murine homologue. *Nucleic Acids Res* (1986) **14**, 9149.
- 36) Sonoda Y, Arai N and Ogawa M : Humoral regulation of eosinophilopoiesis in vitro : Analysis of the targets of interleukin-3, Granulocyte/Macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), and interleukin-5. *LEUKEMIA* (1989) **3**, 14—18.
- 37) Owen WFJr., Rothenberg ME, Silberstein DS, Gasson JC, Stevens RL, Austen KF and Soberman RJ : Regulation of human eosinophil viability, density, and function by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in the presence of 3T3 fibroblasts. *J Exp Med* (1987) **166**, 129.
- 38) Rothenberg ME, Owen WFJr., Silberstein DS, Woods J, Soberman RJ, Austen KF and Stevens RL : Human eosinophils have prolonged survival enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3. *J Clin Invest* (1988) **81**, 1988.
- 39) Lopez AF, Begley CG, Williamson DJ, Warren DJ, Vadas MA and Sanderson CJ : Murine eosinophil differentiation factor ; an eosinophil-specific colony-stimulating factor with activity for human cells. *J Exp Med* (1986) **163**, 1085—1099.
- 40) Rothenberg ME, Pomeranz JL, Owen WFJr., Avraham RJ, Soberman RJ, Austen KF and Stevens RL : Characterization of a human eosinophil proteoglycan, and augmentation of its biosynthesis and size by interleukin 3, interleukin 5, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Biol Chem* (1988) **263**, 1390.
- 41) Rothenberg ME, Peterson J, Stevens RL, Silberstein DS, McKenzie DT, Austen KF and Owen WFJr : IL-5-dependent conversion of normodense human eosinophils to the hypodense phenotype uses 3T3 fibroblasts for enhanced viability, accelerated hypodensity, and sustained antibody-dependent cytotoxicity. *J Immunol* (1989) **143**, 2311—2316.
- 42) Fujisawa T, Abu-Ghazaleu R, Kita H, Sanderson CJ and Gleich GJ : Regulatory effect of cytokines on eosinophil degranulation. *J Immunol* (1990) **144**, 642—646.
- 43) Yamaguchi Y, Hayashi Y, Sugama Y, Miura Y, Kasahara T, Kitamura S, Torisu M, Mita S, Tominaga A, Takatsu K and Sudo T : 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—1742.
- 44) Numao T, Fukuda T, Akutsu I, Makino S, Enokihara H, Honjo T : Selective enhancement of eosinophil chemotaxis by recombinant human interleukin-5 (Abstract). *J Allergy Clin Immunol* (1989) **83**, 298.
- 45) Walsh GM, Hartnell A, Wardlaw AJ, Kurihara K, Sanderson CJ, Kay AB : IL-5 enhances the in vitro adhesion of human eosinophils but not neutrophils, in a leucocyte integrin (CD 11/18)-dependent manner. *Immunology* (1990) **71**, 258—265.

**Studies on the regulation of eosinophils in bronchial asthma**  
**Part I. Characterization of eosinophil chemotactic factor (ECF)**  
**derived from peripheral blood mononuclear cells**  
**stimulated with *Candida* antigen**

**Hisaho TAKAHASHI**

**Second Department of Internal Medicine,**

**Okayama University Medical School,**

**Okayama 700, Japan**

**(Director : Prof. I. Kimura)**

Eosinophilic infiltration in bronchial tissue is characteristic in the pathogenesis of bronchial asthma. The eosinophil chemotactic factor (ECF) derived from mononuclear cells has been reported to have some effect on the cell infiltration, and interleukin-5 (IL-5), a lymphokine derived from T lymphocytes, to be a factor related to growth, chemotaxis and activation for eosinophils. Lymphocytes accumulated in the bronchoalveolar lavage fluids of non-atopic and severe asthmatics have been shown to be highly responsive to *Candida* antigen, and high ECF production was observed in non-atopic and severe asthmatics by measurement of ECF activity in the supernatant of peripheral blood mononuclear cells cultured with *Candida* antigen. In this report, the molecular weight by gel filtration and inhibition test using anti-murine IL-5 antibody were studied to characterize the lymphocyte-derived ECF. Gel filtration analysis of the ECF indicated a molecular weight of 20,000 to 65,000 Da with a peak of activity around 40,000 to 50,000 Da. The ECF activity was reduced by incubation with anti-murine IL-5 antibody, which suggests that the supernatant contains IL-5. ECF from mononuclear cells, containing IL-5, may play an important role in the pathogenesis of eosinophil infiltration in non-atopic and severe asthmatics.