

難治性喘息における好中球の 役割に関する研究

第 1 編

好中球からの Leukotrienes 産生能及び superoxide 産生能に関する検討

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

清 水 一 紀

(平成 4 年 4 月 20 日受稿)

Key words: 難治性喘息, 好中球, ロイコトリエン, スーパーオキシド

緒 言

気管支喘息における病態は, IgE 抗体を介して肥満細胞・好塩基球系がヒスタミンを遊離するいわゆるアトピーの反応系が古くから知られている。しかし特異的 IgE 抗体の存在や好酸球増多, ヒスタミン遊離などを認めず, 前者とは異なった病態と考えられる喘息も日常多く経験する。このような喘息は教室の一連の研究により, 中高年に発症し重症, 難治性喘息に進展し¹⁾, しかもその肺胞洗浄液中には好中球が増加していること²⁾, 好塩基球の IgG レセプターが増加し, 反応好塩基球が増加している成績³⁾等から, かかる中高年発症型喘息の難治化に好中球及び IgG 系の免疫反応が関与する可能性が想定されている⁴⁾。

一方, 1979年に Samuelsson らが slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) の本態を解明し, その特異構造よりロイコトリエン (Leukotrienes, 以下 LTs) と命名した⁴⁾。この LTs は現在, SRS (もしくは SRS-A) 作用を持つペプチド LTs (LTC₄, LTD₄, LTE₄)⁵⁾ と強力な NCA 活性を持つ LTB₄⁶⁾⁷⁾ が知られており, それらが好中球⁸⁾, 好酸球^{9)~12)} を中心とした顆粒球より産生されることも判明している。さらに, 気道粘膜剥離性病変による気道過敏性亢進が喘息の重症化に関与する報告¹³⁾や, 気道粘膜に好酸球と共に好中球の浸潤が認められる¹⁴⁾こ

となどから, 好中球のもつプロテアーゼやエラストラーゼ, 活性酸素などの組織障害性を有する化学伝達物質の関与が示唆される。そこで, 喘息の重症化における好中球の役割を知る目的で, 喘息患者好中球からの LTs 及び superoxide (以下 O₂⁻) 産生能を検討し興味ある成績が得られたので報告する。

対象と方法

1. 対 象

対象は, 岡山大学第 2 内科呼吸器外来に通院あるいは入院中の気管支喘息患者 99 例 (18~73 歳, 平均 41.6±16.3 歳; 男性 58 例女性 48 例) を選んだ。そのうち吸入アレルゲンの IgE RAST スコアや即時型皮内反応が陽性のもの 62 例, それらが陰性のものは, 37 例であった。また, 重症度別では日本アレルギー学会の重症度分類にて軽・中等症に相当する 58 例と重症 41 例であり, 病型診断時から過去 1 年間にプレドニゾロン (PSL) 換算 5 mg/日以上を内服しているステロイド依存性難治性喘息は 29 例を占めていた。かかる喘息患者の採血は非発作時におこない, 少なくとも採血前或は採血後 6 時間以内に発作を認めた症例は検討から除外した。なお対照には健常人 18 例 (21 歳~60 歳, 平均 31.3±10.4 歳; 男性 13 例女性 5 例) を選んだ。

2. 方 法

1) 好中球分離方法

ヘパリン化静脈血35mlを肘静脈より採取し、6%デキストラン4mlを加えて室温に1時間静置後、HISTOPAQUE®とPERCOLL®を5.625:1の割合で作成した比重1.085溶液とHISTOPAQUE(比重1.077)を4mlずつ重層したシリコン化遠沈管に、得られた白血球を5mlずつさらに重層し、4℃で120G、20分間遠沈して好中球分画を得た。その純度はHinkelman液による染色で平均97%であり、混入細胞の大多数は好酸球であった。また toluidine blue 染色による細胞生存率は95%以上であった。この細胞浮遊液に蒸留水2mlを添加し低張処理にて赤血球を溶血させた後、同量の1.8%食塩水を加えて等張にもどした。こうして得られた好中球分画を4℃で150G、10分間遠沈後、LTs測定用として Tris buffer (ヒトアルブミン、Ca⁺⁺、Mg⁺⁺添加、pH7.38)にて7×10⁶PMNs/mlに細胞数を再調整し、またO₂⁻測定用には Krebs ringer phosphate buffer (KRP, pH7.40) 5×10⁶PMNs とした。

2) LTs 産生能の測定

先ず前述の方法で得た好中球分画1mlを遮光した試験管内に移し、Calcium ionophore A23187(Cal)を5μg加えて37℃、15分間反応させた。その反応液に4倍量の氷冷した99.5%エタノールを加えてLTsを抽出後、窒素ガスにて置換後密封し測定時まで-80℃で保存した。次に、遠沈したエタノール混合液の上清を concentrator TC-8 (大洋化学工業社製)にて蒸留濃縮し、10%アセトニトリル500μlで再度溶解したのち C₁₈ ODS カートリッジカラムを用いて精製を行った。カートリッジカラムによる精製法は以下のごとく行った。すなわち検体1mlにつき0.25mlの2M塩酸を解凍した保存検体に加えた後よく混和し、3000rpm 30分4℃で遠沈し得た上清を、前処理としてメタノール2ml、水2mlを通したカートリッジカラムに注入し、その後、水5ml、ヘキサン2ml、10%エタノール5mlの順に通した後、ギ酸メチル3.5mlにて回収した。これを evaporator にて蒸留濃縮した後、50%アセトニトリル500μl/mlで溶解、HPLC

用マイクロサンプルチューブに入れ、3000rpm 30分4℃で遠沈後上清を再度 HPLC 用マイクロチューブに入れ HPLC 用の検体とした。このうち150μlを TSK-GEL ODS-120T (東ソー社製)カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(High performance liquid chromatography, HPLC, Waters 社製)に注入した。LTsの溶出はアセトニトリル・水・メタノール・酢酸の混合液(pH5.6)を用い、UV280nmにて検出した。各LTsの同定は、合成、LTC₄、LTB₄のピークに相当する溶出時間で判定し、その分画を分取してモルモット回腸を用いた bioassay 法によりその収縮能を検討した。LTsの定量は、既知量の合成 LTC₄、B₄で得られた溶出曲線のピークの高さと面積を測定し注入量と比較した結果、各LTsともピークの高さの方がよく相関することから、Fig. 1のLTC₄の標準直線に示すごとく各標準直線から算出し、好中球分画7×10⁶個当りのLTs産生能として表現した。

3) O₂⁻産生能の測定

教室の方法に準じて¹⁵⁾以下の如く行った。すなわち、まず65μMの酸化型チトクロームCを含むKRPに前述の好中球分画0.5mlを加えて37℃で5分間反応させ、次いで10μg/mlのコンカナバリンA20μlとジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解した20μg/mlのサイトカラシンD20μlを、最終反応液量が2.0mlとなるように同時に添加した。かかる反応により産生されたO₂⁻で還元されるチトクロームCの吸光度の変化を double

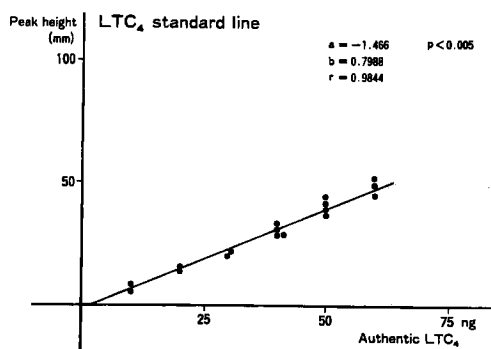


Fig. 1 Standard line of leukotriene C₄. Amount of leukotriene C₄ was measured by peak height of elution curve.

beam spectro-photometer UV-210A (島津) を用いて UV550nm で測定し、好中球分画 10^6 個当りの O_2^- 産生能として表現した。

4) 統計学的検討

成績の数値は LTs については 7×10^6 個、 O_2^- では 10^6 個当りの産生量を mean \pm SD で表現し、有意差の検定は、student's test を用い、Pvalue は $P < 0.05$ を有意とした。

結 果

1. HPLC による LTs の同定と定量

喘息患者の好中球分画を Cal で刺激すると Fig. 2 の実線で示す溶出曲線が得られた。次いで、同一検体に合成 LTC₄、LTD₄、LTB₄を加えると、破線のごとく各 LTs の溶出時間に一致した位置にピークの増加がみられたことから、対応する検体のピークが各 LTs と判定された。さらに、検体の LTC₄あるいは LTD₄に相当するピークの分画を採取して bioassay を行った結果、Fig. 3 (A) (LTC₄分画)のごとくモルモット回腸の収縮がみられ、抗 SRS-A 剤である FPL55712の $0.1 \mu\text{g/ml}$ で完全に収縮が回復した。なお、合成 LTD₄による収縮も Fig. 3 (B)のごとく同様の態度を示したことから、かかる

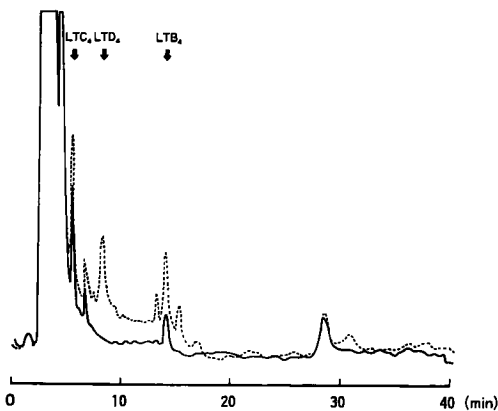


Fig. 2 Elution curve of leukotrienes by HPLC. The arachidonic acid production from neutrophil-rich fraction stimulated by Cal was shown by solid line. The peak of broken line by the same sample included with authentic leukotriene C₄, D₄ and B₄ were estimated by the elution time of each leukotrienes production.

分画は平滑筋収縮能を有することが確認された。

2. LTC₄回収率

試料に³H-LTC₄を加え、各分画の放射活性を RIA 法にて測定し回収率を確認した。concentrator による蒸発濃縮では、完全乾固した状態では平均26.4%の回収率であったのに比し、不完全でやや液状な状態では平均88.6%の回収率であった。また、カートリッジカラムの処理方法が水、エーテル、80%エタノールの順による方法では平均84.8%であったのに比し、水、ヘキサン、10%エタノール、ギ酸メチルの順による処理では平均95.6%であった。

3. LTs 産生能における至適濃度と反応時間

好中球分画から LTs を産生する Cal 刺激の至適濃度を検討するため、最終濃度が $2.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $5 \mu\text{g/ml}$ 、 $7.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$ 、 $12.5 \mu\text{g/ml}$ となるように Cal を添加したところ、LTC₄、LTB₄とも $5 \mu\text{g/ml}$ 、 $7.5 \mu\text{g/ml}$ で最大の産生能を示した (Fig. 4)。また、反応時間は Fig. 5のごとく LTC₄は15、20分、LTB₄は15分で最大の産生能を示した。

4. 気管支喘息及び健康人末梢血好中球の LTs 産生能

好中球分画の Cal 刺激による LTs 産生能を検討すると、LTC₄は健康人が $6.4 \pm 6.9 \text{ng} / 7 \times 10^6 \text{PMNs}$ に比して、喘息患者では $23.1 \pm 20.0 \text{ng}$ と推計学的に有意に高い産生能を示した ($p < 0.01$)。また、LTB₄は健康人 $1.2 \pm 1.3 \text{ng}$ に比し、喘息群が $5.0 \pm 4.8 \text{ng}$ と高い産生能を示した ($p <$

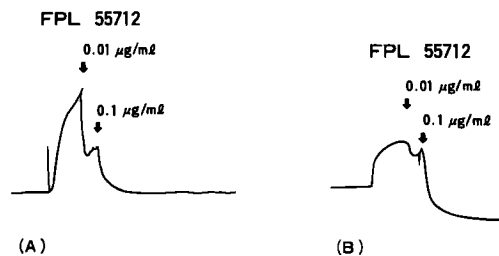


Fig. 3 Contraction of guinea pig ileum by (A) the fraction of leukotriene C₄ from neutrophil-rich fraction stimulated by Cal. and (B) authentic LTD₄ (10ng). These contractions were dissolved by FPL55712 as a leukotriene antagonist.

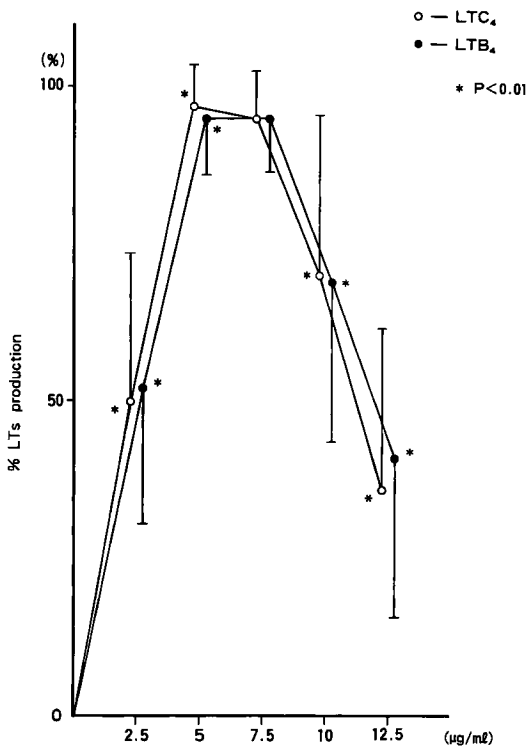


Fig. 4 Effect of the Cal concentration on LTC₄ (○) and LTB₄ (●) production from neutrophil-rich fraction. Each point represents the mean±SD of six different experiments.

0.01) (Fig. 6).

次に、喘息の各病態間での LTs 産生能の検討を行った。まず吸入アレルゲンの IgE RAST または、即時型皮内反応が陽性群の LTC₄ は 19.6 ± 17.6 ng, LTB₄ は 4.2 ± 4.2 ng であったが、それらが陰性群の LTC₄ は 26.2 ± 23.4 ng, LTB₄ は 5.5 ± 5.2 ng であり、両群間の LTs 産生能には有意差は認められなかった (Fig. 7)。

さらに喘息群を重症度別に比較すると、LTC₄, LTB₄ ともに軽・中等症群と重症群間に有意差は認められなかった (Fig. 8)。

次に難治性喘息群と非難治性喘息群とで比較した結果、非難治群が LTC₄ 18.8 ± 18.8 ng に比し難治群は LTC₄ 37.3 ± 33.8 ng と有意に高値を示した ($p < 0.01$)。一方、LTB₄ は非難治群 4.4 ± 4.5 ng, 難治群 5.2 ± 2.2 ng と両群間に差は認められなかった (Fig. 9)。

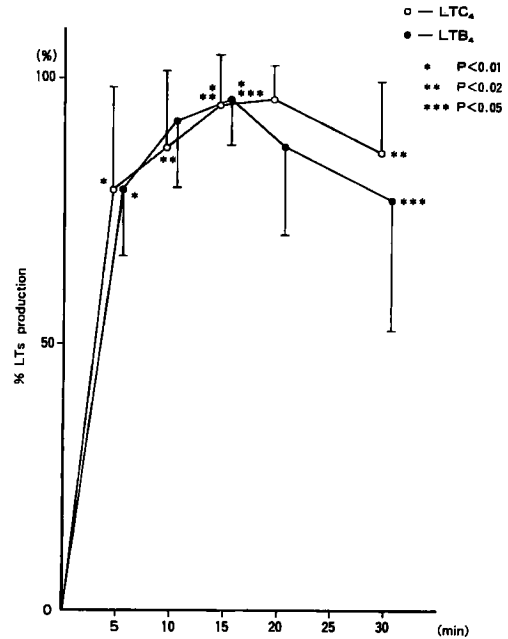


Fig. 5 Time course of LTC₄ (○) and LTB₄ (●) production from neutrophil-rich fraction stimulated Cal (5 µg/ml). Each point represents the mean±SD of six different experiments.

さらに、難治性喘息におけるステロイドの影響を検討するために、プレドニゾン (以下 PSL) 換算 10mg/日未満群 (PSL < 10mg) と 10mg/日以上群 (PSL ≥ 10mg) における好中球からの LTs 産生能を比較検討したが、LTC₄, LTB₄ ともに両群間に有意差は認められなかった (Fig. 10)。

5. 末梢血好中球の O₂⁻産生能

次に、好中球分画の O₂⁻産生能を検討したところ、Fig. 11のごとく健常人と喘息群間に有意差は認められなかった。さらに、喘息群のうち吸入アレルゲンの IgE RAST または即時型皮内反応が陽性と陰性群間の検討でも、同様に有意差は認められなかった (Fig. 12)。また、重症度別では、軽・中等症群と重症群間、並びに非難治群、難治群ではいずれも有意差は認められなかった (Fig. 13, 14)。

さらにステロイド剤の影響を、難治性喘息群のうちで PSL 10mg/日未満とそれ以上の群について比較すると、未満の群は 7.40 ± 0.90 nmol と、10mg/日以上の群の 5.10 ± 1.60 nmol に比して

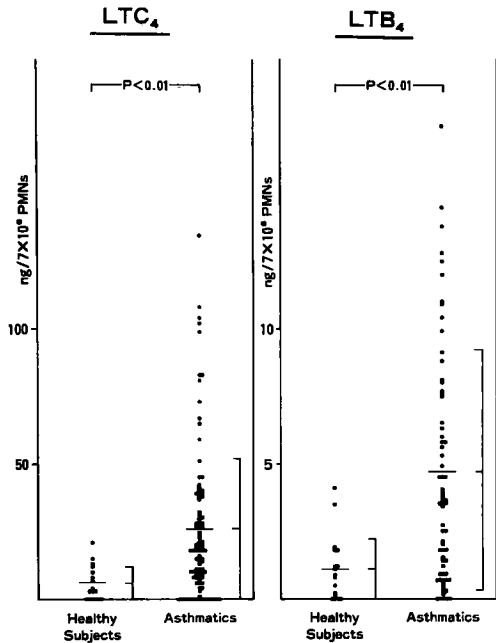


Fig. 6 A production of leukotriene C₄ and B₄ from neutrophil-rich fraction of bronchial asthma and healthy subjects by Cal.

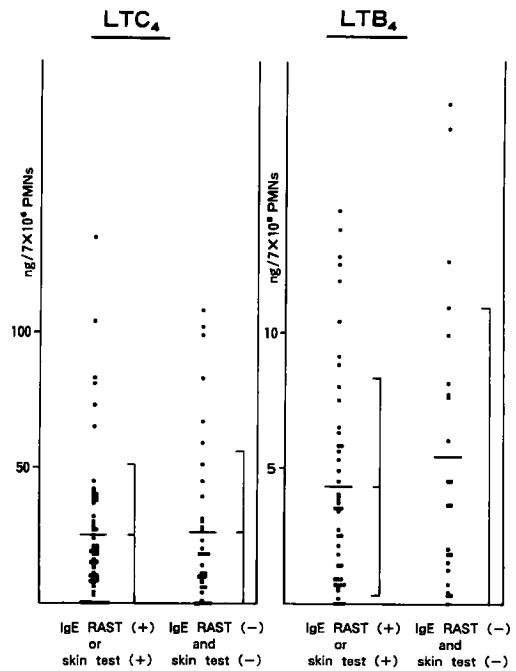


Fig. 7 A production of leukotriene C₄ and B₄ from neutrophil-rich fraction of bronchial asthma by Cal. The production of LTs was compared with type of bronchial asthma.

O₂⁻産生能が推計学的に有意に高かった (p < 0.01) (Fig. 15). また, この PSL 10mg/日未満群は非難治群と比較しても高く, 有意差が認められた (p < 0.05).

6. LTs と O₂⁻の相関

健常者及び気管支喘息患者における LTC₄, LTB₄の相関, LTC₄と O₂⁻の相関, LTB₄と O₂⁻の相関は Table 1 に示すごとく, 健常人では各々の項目で相関が認められなかったが, 喘息では LTC₄と LTB₄の間に相関係数=0.24226, LTB₄と O₂⁻の間には相関係数=0.47204の相関が認められた (p < 0.05).

考 察

気管支喘息の発症には IgE 抗体-肥満細胞-ヒスタミンによる機序が広く知られているが, 近年成人の特に中高年発症の難治性喘息は IgE 以外の抗体を介して好酸球, 好中球などの炎症細胞から産生放出される種々の化学伝達物質によって発症することが想定されている。そこで著者は喘息患者の好中球の役割を明らかにする目

的で, 各種刺激に対するロイコトリエン及び O₂⁻産生能を検討した。その結果, 喘息患者の好中球分画は Cal 刺激による LTs 産生能が健常者よりも亢進しており, しかも難治性喘息ほどその傾向は著明であった。さらに好中球の重要な化学伝達物質のひとつであり, 組織障害的に作用しうる O₂⁻産生能も PSL 10mg以下の難治群ではその産生能が亢進していた。

ロイコトリエン (LTs) は, 1979年に Samueleson らにより発見された 5-リポキシゲナーゼ系アラキドン酸代謝産物で, 強力な平滑筋収縮作用⁵⁾¹⁶⁾及び血管透過性作用¹⁷⁾¹⁸⁾を持ち, かつて SRS (SRS-A) といわれたペプチド LTs 類⁵⁾ (LTC₄, LTD₄, LTE₄) と, NCA 活性を持つ LTB₄⁶⁾⁷⁾とがあり, 顆粒球⁸⁾⁻¹²⁾¹⁹⁾²⁰⁾や肺組織²¹⁾などにより産生されることが判明している。Weller らは好中球から産生される LTB₄は LTC₄の 6 倍⁹⁾, Borgeat らは 10-25 倍²²⁾と報告しているが, 今回の検討では LTC₄の産生が多い症例も LTB₄

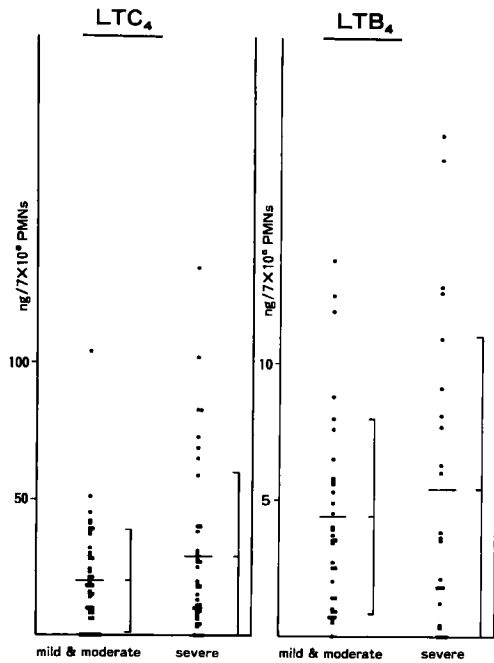


Fig. 8 A production of leukotriene C_4 and B_4 from neutrophil-rich fraction of bronchial asthma by Cal. The production of LTs was compared with severity of bronchial asthma due to definit of Japanese Allergy Societies.

の産生が多い症例もあり、一定の傾向を認めなかった。

また、喘息患者好中球からの LTs 産生能を検討する場合、好酸球の混入を考慮しなければならない。本検討においても、分離された好中球分画中には低率ながら好酸球が混入していた。かかる好酸球からの LTC_4 の産生能について、Kay らは好中球に比べて3から5倍、 LTB_4 は逆に1/3ないし1/5倍とし¹¹⁾、Weller らも LTC_4 は約10倍、 LTB_4 は1/10⁹⁾と報告している。今回の検討では、 LTC_4 は好中球の2.5-75倍(平均21.3倍)と症例によりばらつきが大きいものかなりの産生能を有しており、今回示した成績に好酸球由来の LTC_4 が一部含まれていることは否定できなかった。

また、 LTB_4 については好酸球からの産生は殆ど認められず、好中球由来と考えられたが、その産生能については著者の検討結果と同様、喘息患者好中球からの LTC_4 、 LTB_4 産生能とも健

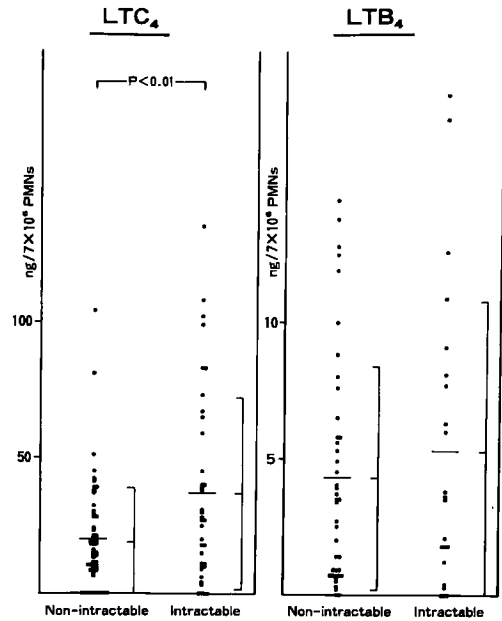


Fig. 9 A production of leukotriene C_4 and B_4 from neutrophil-rich fraction of bronchial asthma by Cal. The production of LTs was compared with severity of bronchial asthma due to definit of intractable asthma.

常人に比し亢進を認めたと一致する報告²³⁾²⁴⁾と、 LTC_4 のみ産生能の亢進を認めたものの LTB_4 産生能は健常人と差がないとする報告²⁵⁾がある。これに関して、5-リボキシゲナーゼ活性が喘息患者顆粒球では亢進しているとの報告²⁶⁾や、抗アレルギー剤であるアゼラスチンハイドロクロライドの LTs 産生抑制効果は LTC_4 、 LTB_4 とも同程度認められる²²⁾²⁷⁾ことなどから、好中球が活性化された場合は、 LTA_4 から LTC_4 への変換酵素であるグルタチオン-S-トランスフェラーゼが特異的に活性化されない限り LTC_4 、 LTB_4 とも産生が亢進するものと考えられる。しかし、重症難治群と非難治群との検討では、 LTC_4 産生能のみ亢進し LTB_4 は有意差を認めなかったことや、発作時に LTC_4 産生能は亢進するが LTB_4 は変化を認めないといった報告²⁵⁾など、喘息の病態の相違により LTC_4 と LTB_4 の解離を認めており、今後酵素レベルの検討が必要と思われる。

一方、活性酸素はフリーラジカルである Super-oxide anion, Hydroxy radical, 非ラジカルで

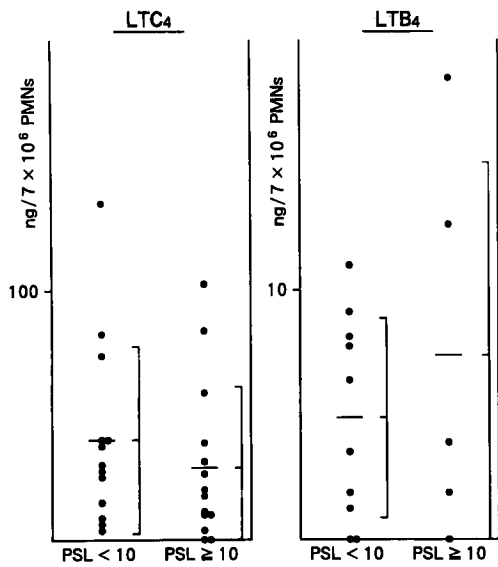


Fig. 10 A production of leukotriene C₄ and B₄ from neutrophil-rich fraction stimulated by Cal. The production of LTs was compared with asthmatics of PSL (<10 mg/day) and PSL (≥10mg/day) asthmatics.

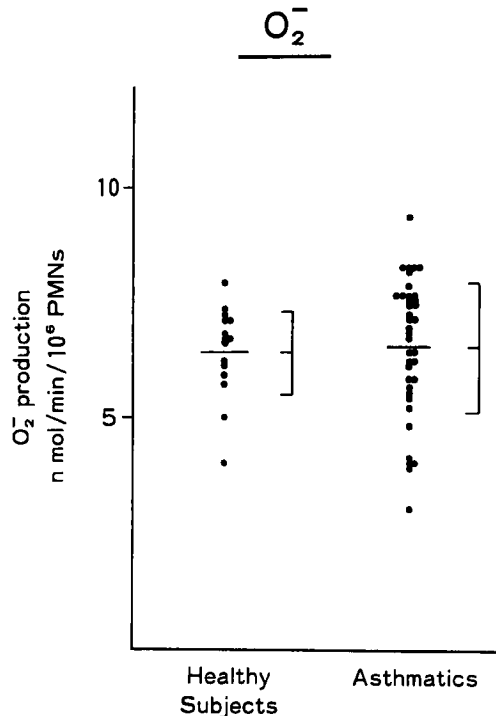


Fig. 11 Superoxide production from neutrophil-rich fraction of bronchial asthmatics and healthy subjects stimulated by Con A using a Cytochrome C reduction method.

ある Hydrogen peroxide, Singret oxygen などが知られており、食後の細胞内殺菌の主役を担っているが、他方組織障害に働き種々の病態に関与することが注目されている²⁸⁾。炎症像における O₂⁻の役割は、ラットのカラゲニン浮腫を scavenger である superoxide dismutase (SOD) が抑制すること²⁹⁾からも明らかで、呼吸器疾患においても成人呼吸窮迫症候群³⁰⁾や特発性間質性肺炎³¹⁾³²⁾、プレオマイシン肺臓炎³³⁾などの病態において O₂⁻の関与が考えられている事や、高濃度の酸素吸入により肺損傷を起こす報告³⁴⁾などから活性酸素の組織及び細胞障害性は明らかである。しかし、これらの疾患群は明らかな形態変化を示すものであり、気管支喘息のような機能的変化を特徴とする疾患に O₂⁻の関与は想像し難い感がある。しかし、好酸球を中心とした古典的アレルギー性炎症の考え方は、新しい化学伝達物質の発見やミクロの分野での進歩により変遷し、気管支喘息においても粘膜剝離性変化が存在することが証明¹³⁾³⁵⁾されている。難治性喘息患者好中球からの O₂⁻産生能亢進と

いう今回の結果は、慢性気道閉塞性疾患患者における O₂⁻と気道過敏性とが相関する報告³⁶⁾や、喘息患者の O₂⁻産生能は健康人より亢進しておりしかも気道過敏性が亢進している喘息の方が O₂⁻産生能が高かったとの報告³⁷⁾などから考え合わせて、気道に浸潤した好中球から発生する O₂⁻が喘息の組織的变化を起こし、その結果気道過敏性の亢進を誘導して喘息の重症化に至るといった推論が成り立つ。しかし、O₂⁻とともに重要な活性酸素である H₂O₂を反映する chemiluminescence 法 (CL法) では、全血法での実験系では喘息群の CL は亢進しているが³⁸⁾、好中球分画を使用した実験系では健康人と差がない³⁹⁾など、まだ不明な点も多く残されている。

このように難治性喘息の病態下では、好中球が活性化されていることが考えられるが、その

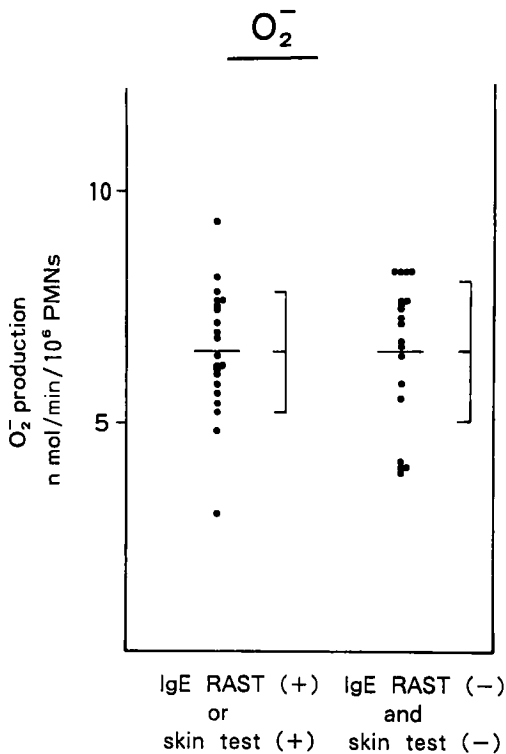


Fig. 12 Superoxide production from neutrophil-rich fraction of bronchial asthmatics stimulated by Con A using a Cytochrome C reduction method. The production of superoxide was compared with type of bronchial asthma.

活性化機構に化学伝達物質の影響が考えられる。LTB₄は好中球遊走因子であり、かつO₂⁻産生能を亢進させる⁴⁰⁾ことも知られているが、今回の検討で健常人では認められなかったLTB₄産生能とO₂⁻産生能の相関が喘息群において認められたことより、O₂⁻産生にLTB₄は重要な役割を担っているものと推測される。さらにLTB₄以外にも、PAF刺激により好中球が活性化⁴¹⁾され、O₂⁻産生⁴²⁾やLTB₄産生が起こる⁴³⁾ことや、その他のC5a, IL-8⁴⁴⁾など好中球を活性化する化学伝達物質が新たな化学伝達物質や、組織、細胞障害性物質の産生といった炎症の増幅、長期化を起し、喘息を重症化に至らしめるものと考えられる。むしろ、O₂⁻は scavenger の存在や xanthineoxidase (XOD)、金属イオンなど様々

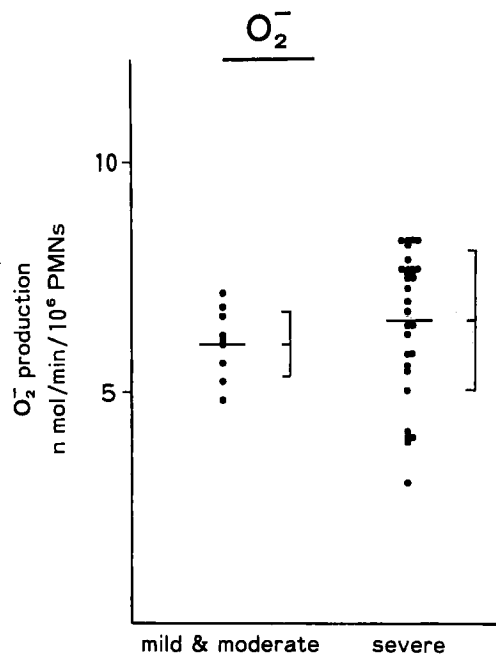
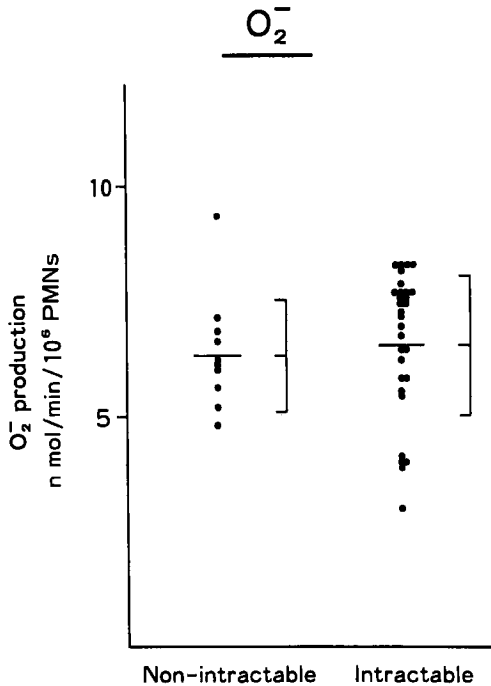


Fig. 13 Superoxide production from neutrophil-rich fraction of bronchial asthmatics by stimulated by Con A using a Cytochrome C reduction method. The production of superoxide was compared with severity of bronchial asthma due to definit of Japanese Allergology Societies.

な要素²⁸⁾により、またLTsはその感受性により影響される⁴⁵⁾ため、好中球活性化とその組織障害性、及び重症化は単純に結び付けられるものではない。しかし、アトピー性疾患でO₂⁻産生能が亢進していること⁴⁶⁾や、軽症喘息においても気管粘膜上皮の剥離が認められたとの報告⁴⁷⁾などが増えつつあり、アレルギー炎症における好中球の気道組織障害作用にも注目する必要がある。かかる観点から、将来臨床応用されるであろうSODのような好中球に対する治療的アプローチが、喘息の重症難治化の一治療法として有用となる可能性がある。

結 論

難治性喘息における好中球の役割を明らかにする目的で、末梢血好中球を精製(≥95%)し、



+ Fig. 14 Superoxide production from neutrophil-rich fraction of bronchial asthmatics by stimulated by Con A using a Cytochrome C reduction method. The production of superoxide was compared with severity of bronchial asthma due to definit of intractable asthma.

Cal 刺激を加えた際の LTs 産生能を HPLC にて定量し、同時にチトクロームC還元法による

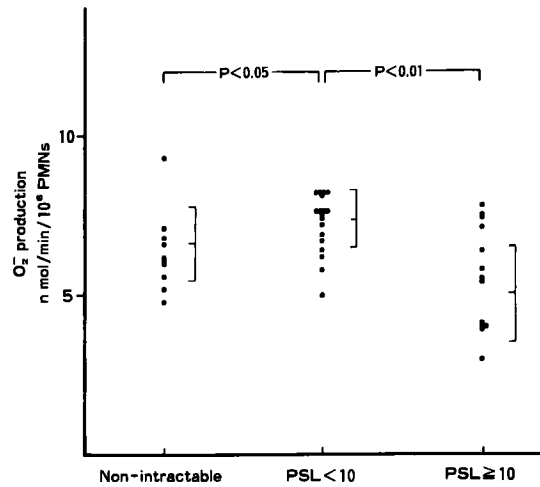


Fig. 15 A production of superoxide from neutrophil-rich stimulated by Con A. The production of superoxide was compared with asthmatics of PSL (<10 mg/day) and PSL (≥10mg/day) asthmatics.

superoxide 産生能も測定し以下に示す結果をえた。

1. Cal 刺激では健常人に比し喘息群で LTC₄, B₄の産生能がいずれも有意に亢進しており (P < 0.01), 特に重症難治群では非難治群に比し LTC₄の産生能が著明に亢進していた (P < 0.05).

2. Con A 刺激による superoxide 産生能は、健常人と喘息群、非難治群と難治群とも差は認められなかったが、prednisolone (PSL) 10mg/

Table 1 Correlation between leukotrienes production and superoxide production from neutrophil-rich fraciton in bronchial asthmatics and healthy subjects.

Y = A + BX

Healthy subjects				Asthmatics			
n	17	15	14	n	67	38	21
X	LTC ₄	LTC ₄	LTB ₄	X	LTC ₄	LTC ₄	LTB ₄
Y	LTB ₄	O ₂ ⁻	O ₂ ⁻	Y	LTB ₄	O ₂ ⁻	O ₂ ⁻
A	0.6412	6.1259	6.2922	A	3.7582	6.2306	6.3704
B	0.0795	0.0463	0.0854	B	0.0388	0.0089	-0.1129
Relation index	0.4363	0.3240	0.1116	Relation index	0.2423	0.2148	0.4720
Significant	ns	ns	ns	Significant	P < 0.05	ns	P < 0.05

日未満群では PSL10mg以上群に比し有意に高値を示した ($P < 0.01$).

3. かかる喘息群の superoxide と LTs 産生能の間には, LTC₄ と LTB₄ 及び, LTB₄ と superoxide の間に相関を認めた.

以上, 難治性喘息の病態には, 気道反応局所に多数出現する好中球をはじめとする炎症細胞から産生される LTs, superoxide などの化学

伝達物質の役割が重要であると思われた.

稿を終えるにあたり御指導ならびに御校閲を賜わった恩師木村郁郎教授に深謝するとともに, 終始懇切なる御指導と御助言をいただいた高橋 清講師に感謝の意を表す.

尚本論文の要旨は第35回日本アレルギー学会総会(1984年京都)において発表した.

文 献

- 1) 木村郁郎: 気管支喘息—中高年発症型難治性喘息を中心に—. 老人科診療 (1983) 4, 378—385.
- 2) 竹山博泰, 谷崎勝朗, 細川正男, 多田慎也, 中村之信, 原田 寛, 佐藤利雄, 木村郁郎: 気道細胞反応からみた気管支喘息の病態に関する研究—気管支肺胞洗浄法による検討—. アレルギー (1980) 29, 875—881.
- 3) 松岡 孝: 気管支喘息患者好塩基球の免疫グロブリンレセプターと IgG 抗体の作用機作に関する研究. 第1編 重症難治性喘息における IgG 抗体の役割に関する検討. 岡山医誌 (1986) 98, 525—535.
- 4) Borgeat P and Samuelsson B: Transformation of arachidonic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. J Biol Chem (1979) 254, 2643—2646.
- 5) Dahlen S, Hedqvist P, Hammarstrom S and Samuelsson B: Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. Nature (1980) 288, 484—486.
- 6) Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doin MV, Shipley ME and Smith MJH: Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. Nature (1980) 286, 264—265.
- 7) Goetzl EJ and Pickett WC: The human PMN leukocyte chemotactic activity of complex hydroxy-eicosatetraenoic acids (HETEs). J Immunol (1980) 125, 1789—1791.
- 8) Conroy MC, Orange RP and Lichtenstein LM: Release of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) from human leukocytes by the calcium ionophore A23187. J Immunol (1976) 116, 1677—1681.
- 9) Weller PF, Lee CW, Foster DW, Corey EJ, Austen KF and Lewis RA: Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophils: Predominant production of Leukotriene C₄. Proc Natl Acad Sci USA (1983) 80, 7626—7630.
- 10) Jorg A, Henderson WR, Murphy RC, and Klebanoff SJ: Leukotriene generation by eosinophils. J Exp Med (1982) 155, 390—402.
- 11) Shaw R J, Cromwell O and Kay A B: Preferential generation of leukotriene C₄ by human eosinophils. Clin Exp Immunol (1984) 56, 716—722.
- 12) Capron M, Capron A, Dessaint JP, Torpier G, Johansson SGO and Prin L: Fc receptors for IgE on human and rat eosinophils. J Immunol (1981) 126, 2087—2092.
- 13) Empey DW, Laitinen LA, Jacobs L, Gold WM and Nadel JA: Mechanisms of bronchial hyper-reactivity in normal subjects after upper respiratory tract infection. Am Rev Respr Dis (1976) 113, 131.
- 14) O'Byrne PM, Walters EH, Gold BD, Aizawa HA, Fabbri LM, Alpert SE, Nadel JA and Holtzman MJ: Neutrophil depletion inhibits airway hyperresponsiveness induced by ozone exposure. Am Rev Respir Dis (1984) 130, 214—219.

- 15) 厚井文一：好中球スーパーオキシド産生に関する基礎的並びに臨床的研究 第1編 スーパーオキシド産生能の測定に関する基礎的検討。岡山医誌 (1981) **93**, 873—883.
- 16) Hanna CJ, Bach MK, Pare PD and Schellenberg RR : Slow-reacting substances (leukotrienes) contract human airway and pulmonary vascular smooth muscle in vitro. *Nature* (1981) **290**, 343—344.
- 17) Dahlen SE, Bjork J, Hedqvist P, Arfors KE, Hammarstrom S, Lindgren J A and Samuelsson B : Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules : In vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA* (1981) **78**, 3887—3891.
- 18) Ueno A, Tanaka K, Katori M, Hayasi M and Arai Y : Species difference in increased vascular permeability by synthetic leukotriene C₄ and D₄. *Prostaglandins* (1981) **21**, 637—648.
- 19) Murphy RC, Hammarstrom S and Samuelsson B : Leukotriene C : A slow-reacting substance from murine mastocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1979) **76**, 4275—4279.
- 20) Jakschik BA, Harper T and Murphy RC : Leukotriene C₄ and D₄ formation by particulate enzymes. *J Biol Chem* (1982) **257**, 5346—5349.
- 21) Dahlen SE, Hansson G, Hedqvist P, Bjorck T, Granstrom E and Dahlen B : Allergen challenge of lung tissue from asthmatics elicits bronchial contraction that correlates with the release of leukotrienes C₄, D₄, and E₄. *Proc Natl Acad Sci USA* (1983) **80**, 1712—1716.
- 22) Borgeat P, Lacroix BF, Rabinovitch H, Picard S, Braquet P, Hebert J and Labiolette M : Eosinophil-rich human polymorphonuclear leukocyte preparations characteristically release leukotriene C₄ on ionophore A23187 Challenge. *J Allergy Clin Immunol* (1984) **74**, 310—315.
- 23) 松本 裕：気管支喘息患者における末梢血好中球よりの Leukotriene B₄, C₄, 及び血小板活性因子の産生、遊離能と、その抗アレルギー薬による抑制に関する研究。横浜医 **40**, 77—88.
- 24) 篠川真由美：気管支喘息患者における末梢白血球のロイコトリエン (LTC₄, D₄, E₄, B₄) 遊離能に関する検討。アレルギー (1990) **39**, 1556—1566.
- 25) 吉川佐和子：気管支喘息患者における末梢白血球の Leukotriene C₄及び B₄産生遊離能の検討。信州医誌 (1989) **37**, 583—595.
- 26) Mita H, Yui Y, Taniguchi N, Yasueda H and Shida T : Increased activity of 5-lipoxygenase in polymorphonuclear leukocytes from asthmatic patients. *Life Sci* (1985) **37**, 907—914.
- 27) 清水一紀, 細井みち子, 榎本 晃, 田辺耕三, 滝沢千之助, 高橋 清, 木村郁郎 : Azelastine 投与における気管支喘息患者の血中 Leukotrienes 及び Arachidonic acid の変動。ASTHMA (1989) **2**, 135—140.
- 28) 近藤元治 企画構成 : 生体内フリーラジカルの臨床。Mebio (1988) **5**, 15—94.
- 29) Oyanagi Y : Participation of superoxide anions at the prostaglandin phase of carrageenan foot-oedema. *Bio Pharm* (1976) **25**, 1465—1472.
- 30) Mcguire WW, Spragg RG, Cohe AB, Cochrane CG : Studies on the pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* (1982) **69**, 543—553.
- 31) Martin WJII, Gadek JE, Hunninghake GW, Crystal RG : Neutrophil mediated lung injury : a lung explant system of cytotoxicity. *Am Rev Respir Dis* (1980) **121**, 82.
- 32) Gadek JE, Fells GA, Zimmerman RL, Martin PG, Keogh BA, Crystal RG : A role for oxidative products of neutrophils in both fibrotic and destructive lung diseases. *Clin Res* (1982) **30**, 429A, abstract.
- 33) Sausville EA, Stein RW, Peisach J, Horwitz SB : Properties and products of the degradation of DNA by bleomycin and iron (II). *Biochemistry* (1978) **17**, 2746—2754.

- 34) Repine JE : Neutrophils, Oxygen radicals, and the adult respiratory distress syndrome ; in *The pulmonary circulation and acute lung injury*, Sami eds, Mount Kisco, New York (1985) pp249—281.
- 35) Frigas E and Gleich GJ : The eosinophil and the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* (1986) **77**, 527—537.
- 36) Postma DS, Renkema TEJ, Noordhoek JA, Faber H, Sluiter HJ and kauffman H : Association between nonspecific bronchial hyperreactivity and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes in chronic airflow obstruction. *Am Rev Respir Dis* (1988) **137**, 57—61.
- 37) Neijens HJ, Raatgeep RE, Degenhart HJ, Duiverman EJ, and Kerrebijn KF, : Altered leukocyte response in relation to the basic abnormality in children with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Am Rev Respir Dis* (1984) **130**, 744—747.
- 38) 小橋 修, 小橋悠紀子, 柴田真希, 橋本修一, 友岡真樹, 高橋弘子, 今村美奈子, 重松信昭 : 全血法と分離白血球法からみた好中球と好酸球のルミノール依存性化学発光—感染症, 肺線維症, 過敏性肺炎, 好酸球増多症において—。炎症 (1988) **8**, 123—130.
- 39) 福田康二, 安場広高, 佐竹範夫, 木野稔也, 大島駿作, 荏原順一 : 気管支喘息患者の末梢血好中球のルミノール依存性化学発光についての検討。日胸疾患会誌 (1989) **27**, 200—205.
- 40) Sumimoto H, Takashige K and Minakami S : Superoxide production of human polymorphonuclear-leukocytes stimulated by leukotriene B₄. *Biochem Biophys Acta* (1984) **803**, 271—277.
- 41) Shaw JO, Pinckard RN, Ferrigni KS, Mcmanus LM, and Hanahan DJ : Activation of human neutrophils with 1-0-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine (platelet activating factor). *J Immunol* (1981) **127**, 1250—1255.
- 42) Smith RJ, Bowman BJ and Iden SS : Stimulation of the human neutrophil superoxide anion-generating system with 1-0-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine. *Biochem Pharmacol* (1984) **33**, 135—144.
- 43) Lin AH, Morton DR and Gorman RR : Acetyl glyceryl ether phosphorylcholine stimulates leukotriene B₄ synthesis in human polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* (1982) **7**, 1058—1065.
- 44) Peveri P, Walz A, Dewald B and Baggiolini M : A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Exp Med* (1988) **167**, 1547—1559.
- 45) Arm JP, Spur BW and Lee TH : The effects of inhaled leukotriene E₄ on the airway responsiveness to histamine in subjects with asthma and normal subjects. *J Allergy Clin Immunol* (1988) **82**, 654.
- 46) Styrt B, Rocklin RE and Klempner MS : Characterization of the neutrophil respiratory burst in atopy. *J Allergy Clin Immunol* (1988) **81**, 20—26.
- 47) Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, and Kay AB : Bronchial biopsies in asthma. *Am Rev Respir Dis* (1989) **140**, 1745—1753.

Studies on the role of neutrophils in intractable asthma
Part 1. Leukotriene and superoxide production of neutrophils

Ikki SHIMIZU

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

The role of neutrophils migrated in the sputum and bronchoalveolar lavage fluid of intractable asthmatics is not difficult to understand. The production of leukotrienes (LTs) and superoxide stimulated by the calcium ionophores (CaI) from neutrophil-rich fraction of 29 intractable, 70 non-intractable asthmatics and 18 healthy subjects was examined by high performance liquid chromatography and a cytochrome C reduction method.

Significantly larger amounts of LTC₄ and LTB₄ were produced by CaI in the neutrophil-rich fraction from asthmatics, than in that from the healthy subjects ($p < 0.01$). Moreover, a significantly larger amount of LTC₄ was produced in the fraction obtained from the intractable asthmatics than in that from the non-intractable asthmatics ($p < 0.05$). However, there was no significant difference in LTB₄ production between the two groups of asthmatics. The production of superoxide by concanavalin A was significantly increased in the neutrophil-rich fraction from prednisolone-within-10mg-dependent asthmatics than in those from prednisolone-over-10mg-dependent patients ($p < 0.01$). There were correlations between the LTC₄ and LTB₄ production, and also between LTB₄ and superoxide production.

LTs and superoxide released from inflammatory cells, especially neutrophils, may play an important role in the pathogenesis of intractable asthma.