

難治性喘息における好中球の 役割に関する研究

第 2 編

好中球からの免疫学的刺激による Leukotrienes 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, 好酸球, ロイコトリエン

緒 言

気管支喘息は古くから肥満細胞から遊離されるヒスタミン, Slow reacting substance of anaphylaxis (以下 SRS-A) により惹起される可逆性気道収縮を特徴とする疾患群として知られている。一方, 近年のアラキドン酸代謝産物, サイトカイン, ニューロペプチド等のメディエーターの発見や, 気道粘膜剥離性病変の概念¹⁾, 遅発型気道反応 (以下 LAR)²⁾の研究などから, その病態生理における理解は大きく変化しつつある。中でも難治性喘息は, 従来より I 型アレルギー反応における病態機序では説明できない点が多かったため, このような新たな化学伝達物質による病態解明が試みられている。特に, 以前から SRS-A としてアレルギー性病変に深く関与することが考えられているペプチド leukotrienes (以下 LTs) は, 平滑筋収縮能や血管透過性の亢進がヒスタミンに比べ長い持続性を持ちしかもその作用は強力であるという生理活性^{3,4)}より, 重症発作及び喘息の重症化との関連性が想定されている。著者は, 第 1 編で Calcium ionophore (以下 Cal) 刺激における喘息患者好中球からの LTC₄, LTB₄ 産生能が健常人に比し亢進しており, 難治性喘息では, その傾向がより著明であることを明らかにした。さらに難治性喘息では好中球からの superoxide (以下 O₂⁻) 産生能も亢進しており, 好中球の活性化が喘息

の重症化に関連している可能性を示した。さらに, 好塩基球の反応性や免疫走査電顕法の手技を用いた好塩基球表面の IgG 受容体の態度など教室の一連の研究により, 難治性喘息における抗 IgG 抗体の関与が明かとなっている⁵⁾⁶⁾⁷⁾。従って難治性喘息においては, IgG を介した免疫学的反応により好中球から種々の化学伝達物質が産生され, その結果アレルギー炎症が増幅され喘息が重症化, 難治化するという過程が想定される。かかる観点から本論では, 免疫学的刺激による好中球からの LTs 産生能を難治性と非難治性喘息群とで比較検討を行った。

対象と方法

1. 対 象

対象は, 健常人 18 例 (21~60 歳, 平均 31.3 ± 10.4; 男性 13 例 女性 5 例) と岡山大学第 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 32 名 (18~71 歳, 平均 43.5 ± 16.6 歳; 男性 20 例 女性 12 例) を選んだ。そのうち吸入アレルギーの IgE RAST スコアや即時型皮内反応が陽性のもの 16 例, それらが陰性のもの 16 例であった。また日本アレルギー学会の重症度判定基準に従った軽中等症に相当するものは 10 例, 重症は 22 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 20 例であった。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。

2. 方 法

まず、好中球分離を第1編と同様の方法で行った。すなわち、得られた好中球分画1mlを遮光した試験管内に移し、自己血清にて preincubate した後、濃度別に刺激し最大産生を認める抗体量を決定した。すなわち、抗 IgG 抗体、抗 IgG₁ 抗体、抗 IgG₂ 抗体、抗 IgE 抗体 (Hyland 製, 1:10) を 0.05ml, あるいは zymosan activated serum (ZAS) を 100 μ l, Candida 抗原を 150 μ g/ml 加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分反応させた。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 $^{\circ}$ C で保存した。

High performance liquid chromatography (HPLC) にて LTs 測定するための検体処理方法は第1編と同様に行った。すなわち、遠沈したエタノール混合液の上清を concentrator にて蒸発濃縮し、10% アセトニトリルで溶解したのち C₁₈ ODS カートリッジカラムを用いて精製を行った。回収したギ酸メチルを evaporator にて再度蒸発濃縮した後、50% アセトニトリル 500 μ g/ml で溶解し HPLC 用検体とした。HPLC は Waters 社製を用い、カラムは逆層の TSK-GEL ODS-120T (東ソー社製) を用いた。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, D₄, B₄ のピークに相当する溶出時間で判定し、定量は、既知量の合成 LTC₄, D₄, B₄ で得られた溶出曲線のピークの高さから算出し、好中球分画 7 \times 10⁶ 個当たりの LTs 産生能として表現した。結果の数値は LTs については 7 \times 10⁶ 個を mean \pm SD 表現し、有意差の検定は、student's test を用い、p<0.05 を有意差ありとした。

結 果

1. 抗 IgG 抗体及び ZAS, Candida 抗原刺激での至適反応時間の検討

抗 IgG 抗体の反応時間は Fig. 1 のごとく LTC₄, LTB₄ とも 30 分がピークであり、推計学的に有意であったため、抗体を用いた刺激にお

ける至適反応時間は 30 分とした。また、ZAS 刺激でも同様に 30 分が至適条件であったが (Fig. 2), Candida 抗原刺激の反応時間は LTC₄, LTB₄ とも 15 分から 60 分の間いずれも差を認めなかったため 15 分を至適時間とした (Fig. 3)。

2. 抗 IgE 抗体刺激による LTs 産生能

喘息患者のうち特に難治群の好中球分画は、非免疫学的刺激 (Cal) で高い LTs の産生能を示したが、免疫反応に基づく刺激において好中球から産生される LTs について検討を行った。その結果 Fig. 4 のごとく抗 IgE 抗体刺激ではほとんど LTs 産生能を示さなかった (LTC₄ 0.7 \pm 1.9ng, LTB₄ 0.0 \pm 0.0ng)。

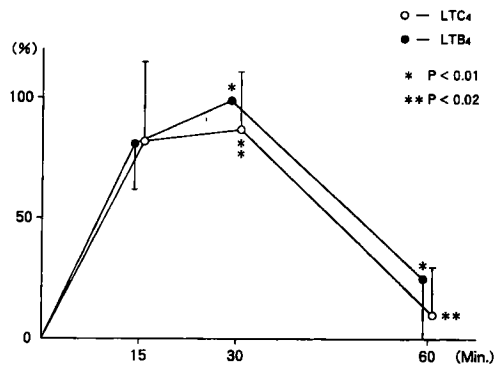


Fig. 1 The time course of LTC₄ (○) and LTB₄ (●) production from neutrophil-rich fraction stimulated by anti-IgG. Each point represents the mean \pm SD of six different experiments.

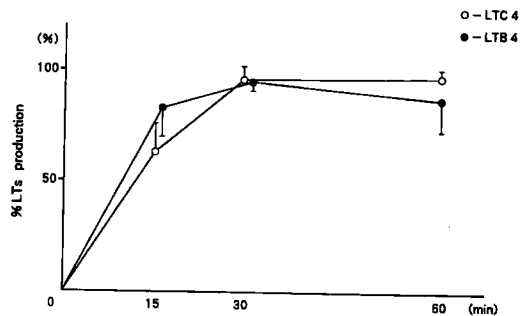


Fig. 2 The time course of LTC₄ (○) and LTB₄ (●) production from neutrophil-rich fraction stimulated by ZAS. Each point represents the mean \pm SD of three different experiments.

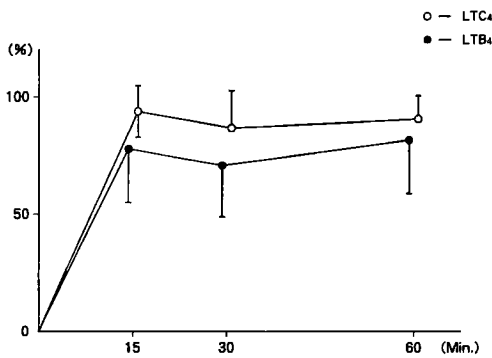


Fig. 3 The time course of LTC₄ (○) and LTB₄ (●) production from neutrophil-rich fraction stimulated by candida antigen. Each point represents the means±SD of six different experiments.

3. 抗 IgG 刺激による LTs 産生能

抗 IgG 抗体刺激では LTC₄は4.1±1.8ng/7×10⁶PMNs と抗 IgE 抗体に比し有意に高い産生能を示した (p<0.01) (Fig. 5). さらに, LTB₄も抗 IgG 抗体では抗 IgE 抗体刺激に比して0.4±0.7ng と産生亢進と傾向はみられたが, 有意差は認められなかった (Fig. 6). さらに重症群における抗 IgG 抗体による LTC₄産生能を比較すると, 非難治群の3.5±3.3ng に比し難治群は8.0±12.1ng と産生能は亢進する傾向が認められたが, LTB₄と同様, 推計学的には有意差はなかった (Fig. 7).

4. 抗 IgG₁, 抗 IgG₄抗体による LTs 産生能

同様に抗 IgG 抗体サブクラスについて好中球分画からの LTs 産生能を検討した結果, 抗 IgG₁抗体と抗 IgG₄抗体刺激での LTC₄ (Fig. 8), LTB₄ (Fig. 9) の産生はいずれも有意差は認められなかった. 次に重症群での抗 IgG₁抗体刺激による LTC₄と LTB₄産生能の検討を行ったが難治性群と非難治性群の間に差は認められなかった (Fig. 10). 同様に抗 IgG₄抗体刺激による重症間でも同様に差は認められなかった (Fig. 11).

5. ZAS 刺激による LTs 産生能

補体系を介する反応の関与を知る目的で, ZAS 刺激による好中球分画からの LTs 産生能を検討したところ, LTC₄, LTB₄の産生がみられたも

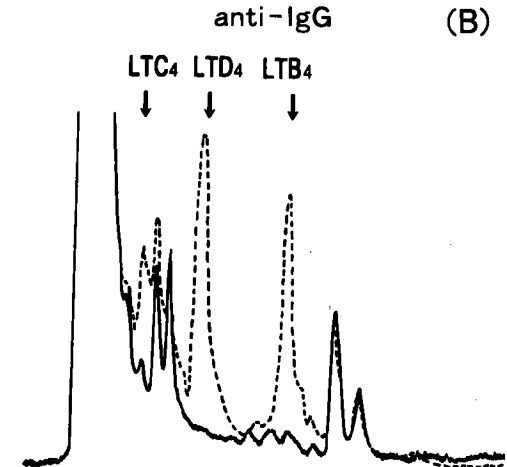
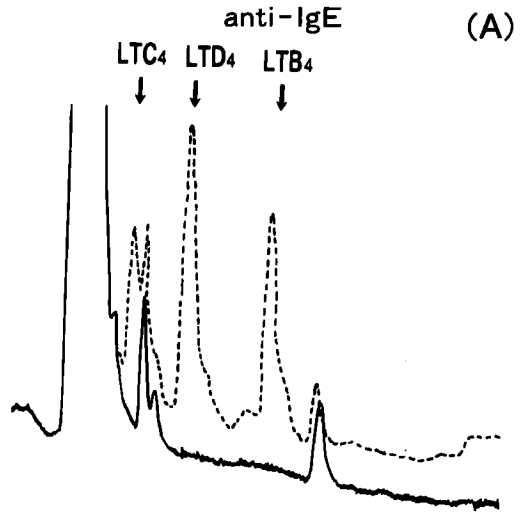


Fig. 4 Elution curve of leukotrienes by HPLC. The arachidonic acid production from neutrophil-rich fraction stimulated by anti-IgE (A) and anti-IgG (B) was shown by solid line. The peaks of broken line by the same sample included with authentic leukotriene C₄, D₄ and B₄ were estimated by the elution time of each leukotriene production.

の, その産生量は Cal に比して全般に低く, 難治群の一部に高い症例が認められたが両群間に有意差は認められなかった (Fig. 12).

6. Candida 抗原による LTs 産生能

次に, Candida 抗原で刺激すると Fig. 12のごとく LTC₄, LTB₄ともかなりの産生がみられ

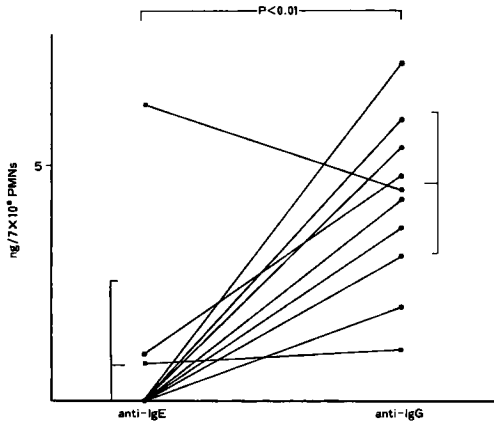


Fig. 5 A production of leukotriene C₄ from neutrophil-rich fraction of bronchial asthmatics stimulated by anti-IgE and anti-IgG (Paired t test).

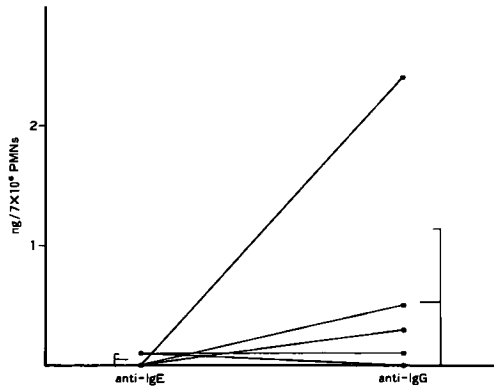


Fig. 6 A production of leukotriene B₄ from neutrophil-rich fraction of bronchial asthmatics stimulated by anti-IgE and anti-IgG (Paired t test).

た。重症度別に検討すると非難治群の LTC₄が 5.6±4.3であったのに比し、難治群では12.3±10.4と有意に高値を示した (P < 0.05)。しかし、LTB₄は非難治群、難治群の両群間に差は認められなかった (Fig. 13)。

7. 免疫学的刺激における LTs 産生比

同一症例における Cal 刺激と免疫学的刺激の LTs 産生比 (免疫学的刺激による LTs 値/Cal 刺激による LTs 値×100) を検討した結果, Fig. 14に示すごとく LTC₄では ZAS を最少として抗 IgE 抗体, 抗 IgG₁抗体, 抗 IgG₄抗体, Candida 抗原, 抗 IgG 抗体の順に高値を示した。

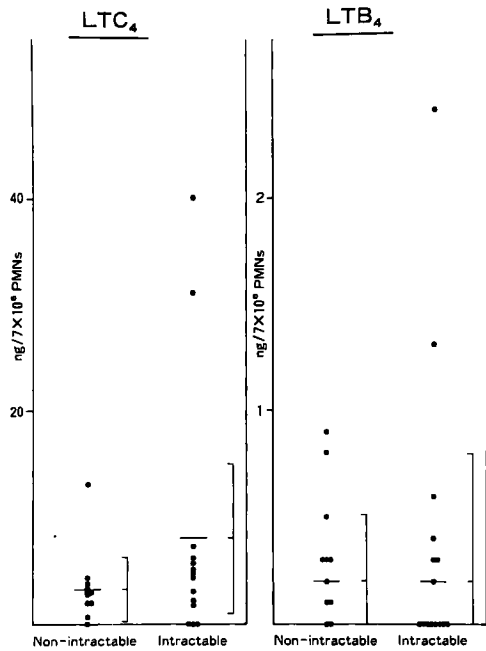


Fig. 7 A production of leukotriene C₄ and B₄ from neutrophil-rich fraction of bronchial asthmatics stimulated by anti-IgG. The production of LTs was compared with severity of bronchial asthma.

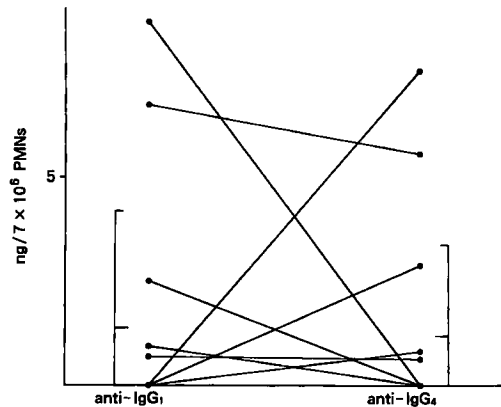


Fig. 8 A production of leukotriene C₄ from neutrophil-rich fraction of bronchial asthmatics stimulated by anti-IgG₁ and anti-IgG₄ (Paired t test).

また、LTB₄は抗 IgE 抗体を最少に ZAS, 抗 IgG 抗体, Candida 抗原, 抗 IgG₄抗体, 抗 IgG₁抗体の順に高かったが、LTC₄、LTB₄とも特定の

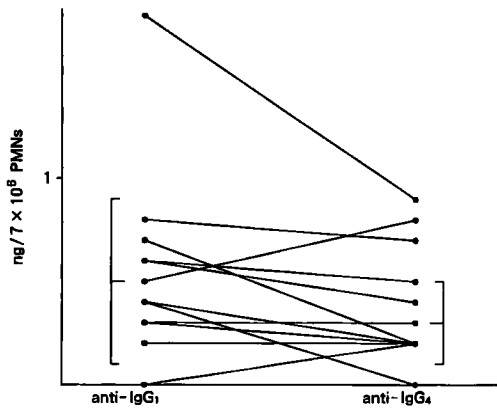


Fig. 9 A production of leukotriene B₄ from neutrophil-rich fraction of bronchial asthmatics stimulated by anti-IgG₁ and anti-IgG₄ (Paired t test).

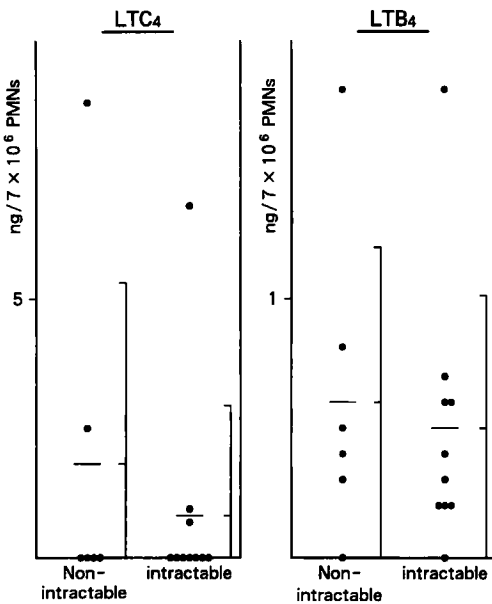


Fig. 10 A production of leukotriene C₄ and B₄ from neutrophil-rich fraction of bronchial asthmatics stimulated by anti-IgG₁. The production of LTs was compared with severity of bronchial asthma.

刺激における有意差は認められなかった。

考 察

難治性喘息の病態はいわゆるステロイド依存性喘息⁹⁾という概念で理解されているごとく、通

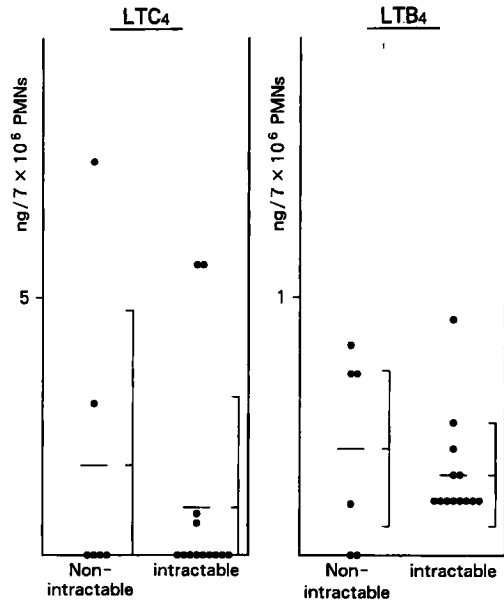


Fig. 11 A production of leukotriene C₄ and B₄ from neutrophil-rich fraction of bronchial asthmatics stimulated by anti-IgG₄. The production of LTs was compared with severity of bronchial asthma.

年性の重症発作を繰り返し、時として喘息死の危険にさらされステロイド治療を必要とすることや、その発症年齢が40歳以降の症例が多いという特徴を有し、日常生活管理が難しく入院生活を余儀なくされることが多いなど、quality of life (QOL) の向上を考える上で多くの問題を抱える疾患の一つである。このように同じ気管支喘息ではあるが、小児のアトピー型気管支喘息とはかなり異なる臨床的特徴を持つことにより、その発症機序や病態生理が異なる可能性があり、木村は中高年発症型難治性喘息として独立した病態を提唱している⁹⁾。つまり、慢性持続型で、季節型に乏しく通年性という喘息発作を有し、40歳以上になって初めて発症し家族歴や既往歴などアレルギー疾患がなく、比較的急速に重症発作に移行しステロイド依存性となるという病態を有している⁹⁾。

著者はこのような病態に、好中球及びLTsが如何なる形で関与しているかを知る目的で、喘息患者好中球からのLTs産生能及びO₂⁻産生能を検討した結果、好中球からのLTs産生能は

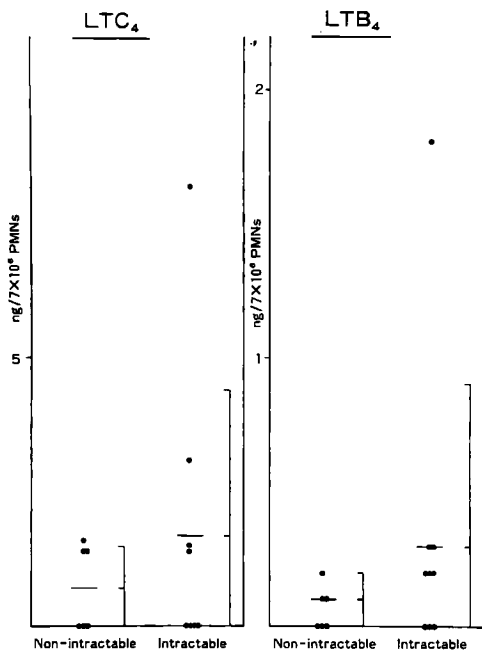


Fig. 12 A production of leukotriene C₄ and B₄ from neutrophil-rich fraction of bronchial asthmatics stimulated by zymosan-activated serum. The production of LTs was compared with severity of bronchial asthma.

気管支患者で亢進し、難治性喘息では LTC₄ 産生能が特に高くしかも O₂⁻ 産生能も亢進し、好中球機能の活性化が強いことを第 1 編で明らかにした。本編ではさらに、抗原や抗 IgG 抗体などの免疫学的刺激を用いて検討を行ったところ、難治性喘息では非難治性喘息に比し、Candida 抗原刺激により有意に LTC₄ 産生能が亢進しており、また、抗 IgG 抗体や ZAS 刺激などでも LTs 産生が認められた。これより、難治性喘息では好中球から産生される LTs がその病態に関与し、その好中球を活性化させる機序として、抗 IgG 抗体や Candida 抗原などの関与が示唆された。

前述したごとく、教室の一連の研究より⁵⁾⁶⁾⁷⁾かかる病態の反応系に於て、好塩基球やリンパ球が IgG を介した免疫機序を介することが明らかとなっているが、Shaw らは IgG-coated beads を用いて好酸球を刺激し LTC₄ 産生を認め、f-Met-Leu-Phe (fMLP) によりこの産生が増強さ

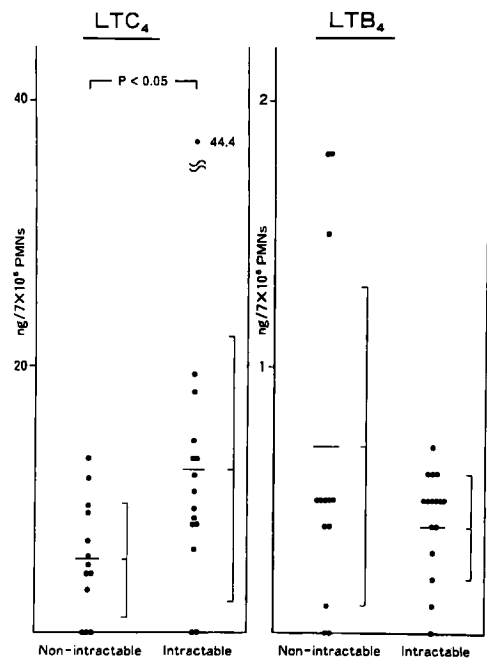


Fig. 13 A production of leukotriene C₄ and B₄ from neutrophil-rich fraction of bronchial asthmatics stimulated by candida antigen. The production of LTs was compared with severity of bronchial asthma.

れることにより、Fc レセプターを介した反応であろうと推測している¹⁰⁾。Ferreri らは IgG, IgA, IgE, IgM を用いて単球からの LTs 及び PGE₂ を測定した結果、細胞膜表面レセプターに一致して、IgG により高い産生を認め、IgA, IgE もわずかに産生を認めたが IgM よりは産生を認めていない。さらにこの産生はサイトカラシン B による前処理により抑制されなかったことより、貪食による反応ではなく Fc レセプターを介した反応であることを示唆している¹¹⁾。今回の好中球を用いた結果においても抗 IgE 抗体刺激ではほとんど認められなかった LTs 産生が、抗 IgG 抗体刺激では認められたことにより、好中球においても同様の機序が考えられた。さらに、補体が関与しない抗 IgG₁ 抗体刺激によっても産生が認められ、しかも抗 IgG₁ 抗体刺激と差を認めなかったことや、ZAS 刺激において強い産生能が認められなかったことは、LTs 産生に関わる

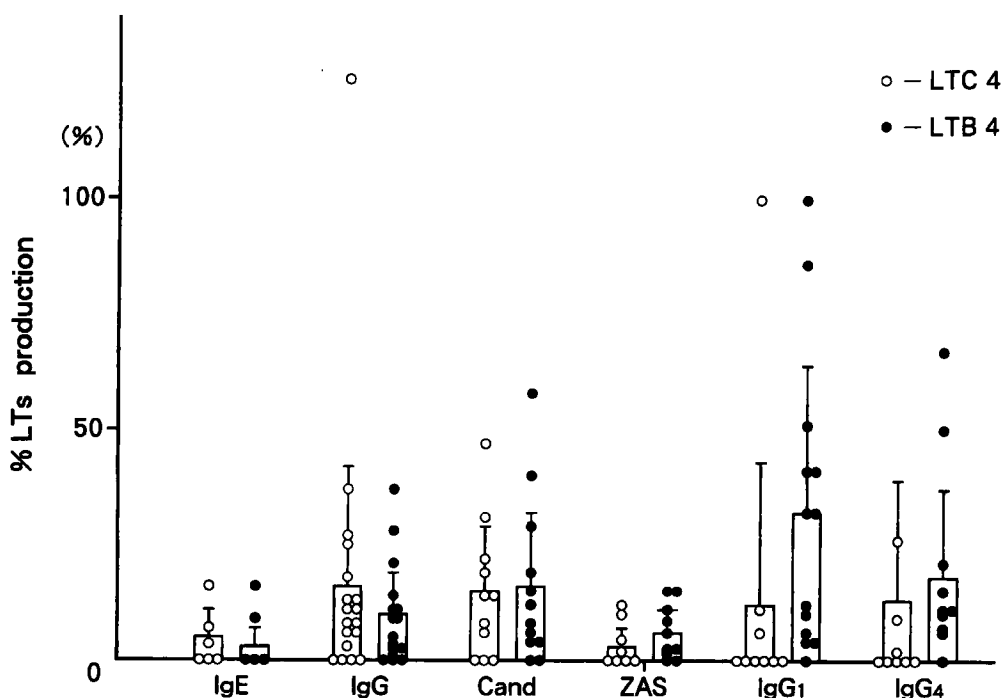


Fig. 14 Compared with the production of LTC₄ (○) and LTB₄ (●) from neutrophil-rich fraction of bronchial asthmatics by Cal stimulation and immunological stimulation.

レセプターは補体を介さない可能性が示唆される。

また、免疫学的刺激における LTs 産生量は諸家より Cal 刺激の約10—20%とされているが¹⁰⁾¹¹⁾、今回の検討では2.8—15.9%であった。

さて、難治性喘息における好中球からの LTs 産生能の明らかな亢進は、発作時の血清中 NCA 活性が高値を示している報告¹²⁾や発作時に好中球からの活性酸素の産生能が亢進¹³⁾していることなどから、細胞活性化の側面を見ているだけなのか、それとも喘息の難治化と好中球からの LTs 産生が何らかの関連性を有しているのか不明な点があり、さらに他のアラキドン酸代謝産物を含めた今後の検討が必要と思われる。また、LTs は酸素や光により分解¹⁴⁾、合成 LTC₄を10分間100℃で熱しても全く破壊されずに熱には安定である反面、pH に対し非常に敏感であり、回収率などによりかなり影響し、測定過程で行われる蒸発濃縮も完全に乾固するとやはり回収率に影響してつくること¹⁵⁾、HPLC におけるプレカラム

の汚れの状態に敵感なこと、RIA における抗体の特異性に関題があること¹⁶⁾など測定における問題点も数多く残されており、今後に対する研究課題と思われる。

一方、難治性喘息病態において好中球以外の炎症細胞でアレルギー性炎症に深く関与する好酸球は、難治性喘息では脱顆粒した低比重好酸球が出現するが、この低比重の好酸球の LTC₄¹⁷⁾や O₂⁻¹⁸⁾の産生が亢進し、また喘息発作時の好酸球は O₂⁻産生が亢進している報告¹⁹⁾など好酸球と重症化との関り方を示す報告は多い。さらに、近年好酸球由来の eosinophil cationic protein (ECP), eosinophil peroxidase (EPO), major basic protein (MBP) などの物質が気道粘膜剥離と関連がある報告¹⁹⁾²⁰⁾も多く、かかる病態の一翼を担う細胞と考えられている²¹⁾。また、喘息病態での各種炎症細胞は活性化されており、特に難治性喘息において顕著であるが、慢性炎症の主役であるリンパ球についても、難治性喘息ではその IL 2 産生能や NCA 活性が亢進する

ことが判明している²²⁾。この病態については、抗原刺激により肥満細胞から放出される LTB_4 、ECF-A、NCA などの遊走因子により気道に動員された炎症細胞を、Tリンパ球から放出されたサイトカインが活性化すると考えられている²³⁾。さらに難治性喘息の病態は種々の炎症細胞が複雑に相互作用することにより成立しているが、好中球がかかる病態の中でいかなる役割を分担しているかという疑問に対する解答のひとつとして、遅発型気道反応 (以下LAR) における好中球の態度があげられる。教室の難波は、ハウスダスト抗原吸入誘発試験で惹起されるLARは即時型気道反応 (以下IAR) に比し気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中に好中球が増加し、さらにこの際末梢血ではLARの発作前に漸増した好中球と LTB_4 がLAR発作時には減少し、末梢血好中球が気道に放出したためと推論している²⁴⁾。また、永倉らはLARの際のNCA活性を測定し、そのピークは30分以内であり肥満細胞に由来するものと考えられている²⁵⁾。

かかる気道に遊出した好中球は LTC_4 産生能が亢進していることにより、重要な effector cell のひとつとしての役割が想定される。難治性喘息においては、ステロイドの影響で易感染症となった宿主は気道内感染も起こりやすく、感染により生じたIgGやfMLPなどの菌体物質そのものによる刺激も加わり、 LTC_4 が生ずる可能性もある。事実、発作死での剖検における区域気管支壁には非発作死や慢性閉塞性肺疾患に比し有意にIgA、IgM、IgG陽性細胞が増加しているとの報告²⁶⁾もある。また eosinophil derived neurotoxin (EDN) の mRNA が好中球でも発見され²⁷⁾、今まで好酸球由来といわれてきた組織障害性物質の関与も示唆されており、好酸球と類似した機能を持つ好中球が存在する可能性も考慮されるべきであろう。

以上、LARや炎症が遷延持続する難治性喘息

において、好中球は肥満細胞・好塩基球系などが放出した種々の化学伝達物質により局所に動員され、その炎症の場の抗原や抗体によりさらに活性化された結果、化学伝達物質を産生、放出して、炎症の増幅を誘導するものと考えられ喘息難治化因子として重要な役割を担っているものと思われる。このことはかかる喘息の予後を決定する上で臨床上重要であると考えられる。

結 論

難治性喘息では、非免疫学的刺激 (Cal A23187) による好中球からの LTC_4 産生能や superoxide 産生が亢進しており、かかる病態に好中球が深く関与する可能性があることを第1編で示した。かかる喘息における好中球活性化の機序を知る目的で、より病態に準じた免疫学的刺激により好中球からのLTs産生能を検討したところ以下に示す結果を得た。

1. 抗IgE抗体の刺激ではLTsの産生は認められなかったが、抗IgG抗体とZAS刺激でLTs産生が認められた。しかし重症度間では有意な差は認められなかった。
2. アレルゲンとしてのCandida抗原による刺激では、難治性喘息は非難治群に比し有意な LTC_4 産生亢進が認められた ($P < 0.05$)。

以上より難治性喘息の病態に、活性化された好中球が重要な役割を持ち、しかもIgE以外の免疫学的機序を介したCandida抗原刺激でLTs産生を起こすことにより、難治化の要因となっている可能性が示唆された。

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25回日本胸部疾患学会総会 (1985年名古屋) において発表した。

文 献

- 1) Frigas E and Gleich GJ: The eosinophil and the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* (1986) 77, 527-537.
- 2) Pepys J, Hutchcroft BJ: Bronchial provocation tests in etiologic diagnosis and analysis of asthma.

- Am Rev Respir Dis (1975) **112**, 829—859.
- 3) Hanna CJ, Bach MK, Pare PD and Schellenberg RR : Slow-reacting substances (leukotrienes) contract human airways and pulmonary vascular smooth muscle in vitro. *Nature* (1981) **290**, 343—344.
 - 4) Dahren S, Bjork J, Hedqvist P, Arfors KE, Hammarstrom S, Lindgren JA 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.
 - 5) Takahashi K, Kimura I : A considerable technique for identification of peripheral basophils under scanning electron microscopy. *J Clin Electron Microsc* (1984) **17**, 593—594.
 - 6) 松岡 孝 : 気管支喘息患者好塩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.
 - 7) 岡田千春, 高橋 清, 宗田 良, 松岡 孝, 難波一弘, 荒木洋行, 木村郁郎, 岸本卓巳 : 遅発型気道反応における好塩球表面結合免疫グロブリンの検討—IgG レセプターの関与を中心に—. *アレルギー* (1988) **37**, 5—11.
 - 8) 木村郁郎, 高橋 清 : 難治性喘息の病因—中高年発症型難治性喘息を中心に—. *アレルギーの臨* (1989) **9**, 16—21.
 - 9) 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—. *日胸疾患会誌* (1983) **21**, 181—182.
 - 10) Show RJ, Walsh GM, Cromwell O, Moqbel R, Spry CJF and Kay AB : Activated human eosinophils generate SRS-A leukotrienes following IgG-dependent stimulation. *Nature* (1985) **316**, 150—152.
 - 11) Ferreri NR, Howland WC and Spiegelberg HL : Release of leukotrienes C₄ and B₄, prostaglandin E₂ from human monocytes stimulated with aggregated IgG, IgA, and IgE. *J Immunol* (1986) **136**, 4188—4193.
 - 12) Buchanan DR, Cromwell O and Kay AB : Neutrophil chemotactic activity in acute severe asthma (status asthmaticus). *Am Rev Respir Dis* (1987) **136**, 1397—1402.
 - 13) 吉国裕文 : ヒト好酸球及び好中球の活性酸素種産生の比較検討—とくにアレルギーにおける好酸球活性酸素の意義について—. *日臨免疫会誌* (1991) **14**, 166—173.
 - 14) 寺尾泰次 : ロイコトリエンの化学. 代謝 (1983) **20**, 1171—1181.
 - 15) 腰原康子, 磯野豊和 : ラジオイムノアッセイによる生体試料中の LTC₄ の測定. *炎症* (1985) **5**, 107—110.
 - 16) 沢田正文 : 放射免疫測定法による LTC₄, LTD₄ の定量 ; プロスタグランジン研究法 (上), 山本尚三, 鹿取信編, 東京化学同人, 東京 (1986) pp211—214.
 - 17) Hodges MK, Weller PF, Gerard NP, Ackerman SJ and Drazen JM : Heterogeneity of leukotriene C₄ production by eosinophils from asthmatic and from normal subjects. *Am Rev Respir Dis* (1988) **138**, 799—804.
 - 18) Sedgwick JB, Geiger KM, and Busse WW : Superoxide generation by hypodense eosinophils from patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* (1990) **142**, 120—125.
 - 19) Frigas E, Loegering DA and Gleich GJ : Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. *Lab Invest* (1980) **42**, 35—43.
 - 20) Motojima S, Frigas E, Loegering DA and Gleich GJ : Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium in vitro. *Am Rev Respir Dis* (1989) **139**, 801—805.
 - 21) Gleich GJ, Motojima S, Frigas E, Kephart GM, Fujisawa T and Kravis LP : The eosinophilic leukocyte and the pathology of fatal bronchial asthma : evidence for pathologic heterogeneity. *J*

- Allergy Clin Immunol (1987) **80**, 412-415.
- 22) 宮川秀文：重症難治性喘息における IV 型アレルギー反応に関する研究。第 1 編 Candida 抗原による末梢血中及び BALF 中リンパ球の interleukin 2 (IL-2) 産生能の検討。岡山医誌 (1988) **100**, 565-575.
 - 23) Kay AB: Leukocytes in asthma. Immunol Invest (1988) **17**, 679-705.
 - 24) 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.
 - 25) 永倉俊和, 大野浩治, 飯倉洋治: 好中球遊走因子. 免疫薬理 (1987) **5**, 501-507.
 - 26) 坂本祥一, 富地信和, 気管支喘息の気管支壁細胞反応に関する免疫組織学的研究. アレルギー (1991) **40**, 1255-1264.
 - 27) Rosenberg HF, Tanen D, and Ackerman SJ: Molecule cloning of human eosinophil derived neurotoxin. A member of the ribonucleus gene family. Proc Natl Acad Sci USA (1988) **86**, 4460-4464.

Studies on the role of neutrophils in intractable asthma
Part 2. Leukotriene production of neutrophils by
immunological stimulation

Ikki SHIMIZU

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

Previously, I reported that more leukotrienes (LTs) and superoxides were produced from the neutrophil-rich fraction by non-immunological stimulation with CaI in intractable asthmatics than in non-intractable asthmatics. This suggested that neutrophils are involved in the pathogenesis of intractable asthma. To investigate the process of neutrophil activation in intractable asthma, the LTs production from neutrophils by immunological stimulation was measured by high performance liquid chromatography (HPLC). LTs were produced from neutrophils by stimulation of anti-IgG and zymosan activated serum (ZAS), but not anti-IgE. However, there was no significant difference with each disease severity of asthma. The production from neutrophils was also detected by Candida antigen stimulation. Moreover, the production of LTC₄ from neutrophils by this stimulation was higher in intractable asthmatics than in non-intractable asthmatics.

These findings suggested that neutrophils are produced LTs by immunological stimulation such as by Candida antigen based on the IgG mediated allergy reaction, and play an important role in the pathogenesis of intractable asthma.