

慢性喘息モデルによる 喘息の難治化要因に関する研究

第 2 編

肺局所や血液中における出現細胞及び液性反応に関する検討

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

菅 野 尚

(平成 6 年 2 月 18 日受稿)

Key words : chronic asthma, guinea pig, IgG subclass antibodies
leukotrienes, histamine

緒 言

成人の慢性呼吸器疾患のなかで日常診療上頻度の多い気管支喘息は、時に喘鳴と軽い呼吸困難のみの軽症例から、ほとんど毎日呼吸困難を示す慢性の重症喘息まで多様である。そのうち通年性に症状が持続する慢性喘息の日常管理は重要であるが、かかる症例は中高年で発症し、小児喘息のようにアトピー素因が明確でなく、木村の提唱する「中高年発症型難治性喘息」¹⁾の疾患概念に合致する病態が示唆され、さらに Candida 抗原が重症化、難治化の重要な要因となっている症例の多いことも判明している²⁾。

このような重症、難治性喘息の発症機序を解明する研究の一環として、沖³⁾は遅発型気道反応 (Late asthmatic response: 以下 LAR) を呈する動物モデルを用い、抗原の再吸入を行い、呼気の延長が遷延すること及び BALF 中のロイコトリエンが上昇することを報告している。そこで著者は、通年性の難治性喘息病態に類似したモデルを作製する目的で、第 1 編において抗原の繰り返し吸入を行ったところ、即時型気道反応 (Immediate asthmatic response: 以下 IAR) しか出現しないモルモットでも抗原吸入を繰り返すに従い次第に発作の寛解しない慢性喘息のモデルを確立することに成功した。そこで本編ではヒトの慢性喘息病態を解明する目的で、

かかる動物モデルを対象に、血液中及び気道内の出現細胞や化学伝達物質の動態について詳細な検討を行った。

対象と方法

1) 実験動物

実験には約 200 g のハートレー系雄性モルモット 70 匹を用いた。

2) 感作と吸入誘発法

第 1 編と同様に飯島⁴⁾らの変法を用い感作を行った。すなわち *Ascaris suum* 抗原 (Greer Laboratories 社製) 0.1 ml と水酸化アルミニウム 10 mg に生理食塩水を加えて 1.0 ml とした抗原液を作製し、2 週間間隔で 3 回腹腔内注射をすることにより感作を行った。最後の感作から 1 週間後に *Ascaris suum* 抗原 0.5 ml を生理食塩水 2.5 ml で希釈した抗原液を加圧式ネブライザーで 10 分間吸入させた。その際の各気道反応の判定は、まず抗原吸入前、抗原の吸入直後及び吸入 5 時間後に小動物呼吸ピックアップ (日本光電社製) をモルモットの胸壁に装着し、電気信号をアンプで増幅して呼吸曲線を記録し、教室の方法⁵⁾に準じて呼気/吸気が 2.0 以上示す場合を陽性とした。第 1 編で報告した如く抗原を 8 日間連続吸入させることにより、第 1 日目に IAR のみのモルモットが次第に 2 相性の気道反応 (Dual asthmatic response: 以下 DAR) を示すように

Table 1 抗原繰り返し吸入による気道反応の様式

	抗原吸入日数							
	1	2	3	4	5	6	7	8
No. 1	○	○	○	○	○	○	○	●
No. 2	○	○	○	○	○	●	○	●
No. 3	○	○	○	○	○	●	●	●
No. 4	○	○	○	○	○	●	●	●
No. 5	○	○	○	○	●	●	●	●
No. 6	○	○	○	○	●	●	●	●
No. 7	○	○	○	○	●	●	●	●
No. 8	○	●	○	●	●	○	●	●
No. 9	○	●	●	●	●	●	●	●

○ : immediate asthmatic response (IAR)
 ● : late asthmatic response (LAR)
 ● : dual asthmatic response (DAR)

なった。従って、かかる気道反応態度の変化する過程に、成人喘息の重症、難治化機序の鍵があると考え、対象には抗原吸入1日目にIARのみ陽性でLAR陰性のモルモットのみを選び、24時間間隔で合計8回繰り返し吸入を行った(Table 1)。次に感作のみの群(コントロール群)、第1日目にIARのみ出現した群(1日吸入群)、8日間連続吸入しLARも出現するようになった群(8日間吸入群)について、抗原吸入5時間で気道反応を判定後採血を行い、さらに後述の如くBALを施行した。

3) 静脈血中の化学伝達物質等の測定

まず静脈血中の白血球算定と塗抹標本をMay-Giemsa染色し白血球分類を行った。次いで採血した静脈血2mlを遮光遠沈管にて永冷したエタノール8mlと混和し、遠沈した上清を用い、SEP-PACK C18カラムで抽出後、RIAキット(Amersham社)にてロイコトリエン C_4 (Leukotriene C_4 :以下 LTC_4)、ロイコトリエン B_4 (Leukotriene B_4 :以下 LTB_4)を測定した。ヒスタミンは採血した血液5mlをあらかじめ冷却したEDTA-2Naの入ったチューブに加え、直ちに水中で冷却した後遠心分離し、RIAキット(栄研)にて測定した。また吸入前、第4日目、第8日目に採血した血液を用いて、ELISA法にて抗原特異的IgG、IgG₁、IgG₂抗体の測定を行った。

4) BALF中化学伝達物質の測定

BALはモルモット頸部より気管を露出し、カニューレを挿入後、注射器により生理食塩水10

mlで計5回繰り返し洗浄した。次に、まず得られた回収液(BALF)の回収率、回収総細胞数を算定し、さらにオートスマアで塗抹標本作製しMay-Giemsa染色後細胞分類を行った。さらにBALF中ロイコトリエンについては、BALF 2mlを前述の静脈血と同様に処理した後測定した。ヒスタミンは氷冷した遠沈管にBALF 10mlをとり、遠沈後静脈血と同じくRIAにて測定した。なおBALF中ヒスタミンについては第1日のみ吸入したIAR時のものについても検討を加えた。

5) 肺組織中浸潤細胞の測定

摘出した肺組織を、10%ホルマリン固定後パラフィン包埋し、hematoxylin-eosin染色及びtoluidine blue染色を施し、各種炎症細胞の変化を中心に観察を行った。

6) 統計学的検討

結果のデータは全てMean±SEMで表し、検定はstudent's t testを用いたが、IgG抗体については、paired t testを用いた。p valueは0.05以下を推計学的に有意差ありとした。

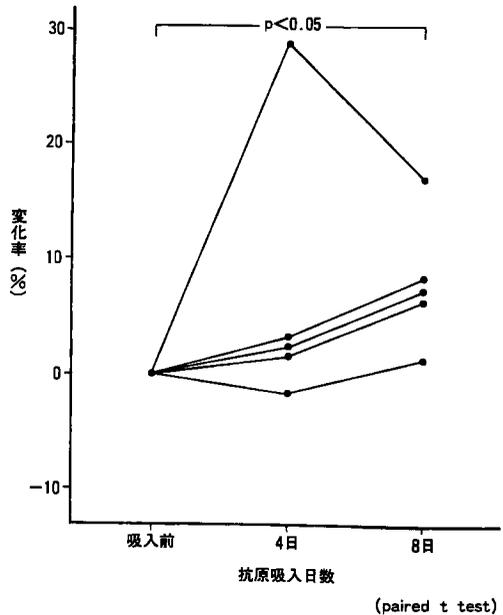


Fig. 1 抗原吸入日数別にみた抗原特異的IgG抗体の変化率

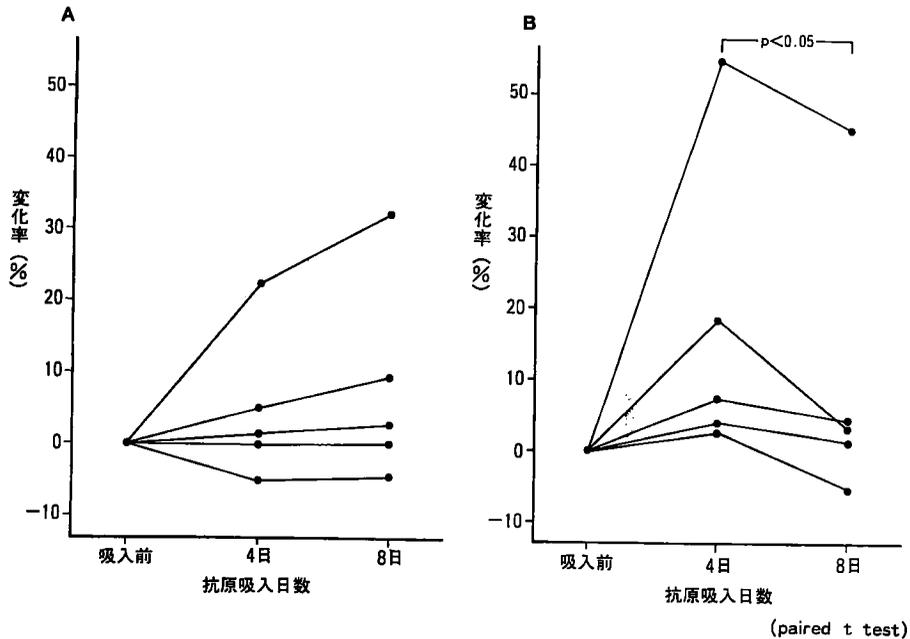


Fig. 2 抗原吸入日数別にみた抗原特異的 IgG₁及び IgG₂抗体の変化率
(A) 抗原特異的 IgG₁抗体 (B) 抗原特異的 IgG₂抗体

結 果

1) 抗原吸入日数別にみた抗原特異的 IgG サブクラス抗体の変化

気道反応の変化に対して IgG 系がいかに関与しているかを検討する目的で、抗原吸入日数別にみた抗原特異的 IgG、IgG₁、IgG₂抗体の比較を行った。まず抗原特異的 IgG 抗体は、Fig. 1 に示す如く抗原吸入を繰り返すに従って漸次増加し、8 日目には $7.88 \pm 2.54\%$ と吸入前に比し有意に増加した ($P < 0.05$)。

さらに IgG 抗体サブクラス別に検討したところ Fig. 2A の如く抗原特異的 IgG₁抗体は、抗原吸入後増加する傾向が認められたが、吸入前に比して有意差はなかった。一方抗原特異的 IgG₂抗体については、Fig. 2B の如く抗原吸入 4 日目に増加がみられたが、8 日目には吸入前より高値ではあるが 4 日目に比し有意な減少が認められた ($P < 0.05$)。

また IgG₁/IgG₂の推移は、Fig. 3 の如く抗原吸入 4 日目には低下したが 8 日目には再度有意

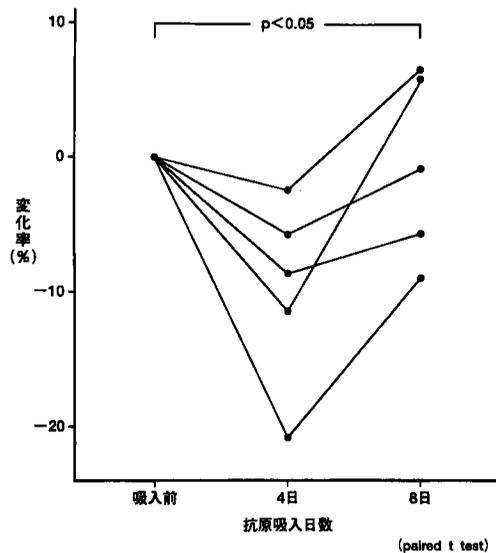


Fig. 3 抗原吸入日数別にみた IgG₁/IgG₂の変化率

に増加した ($P < 0.05$)。

2) BALF 及び血液中の細胞組成の変化

抗原吸入 5 時間後の BALF 中細胞組成につい

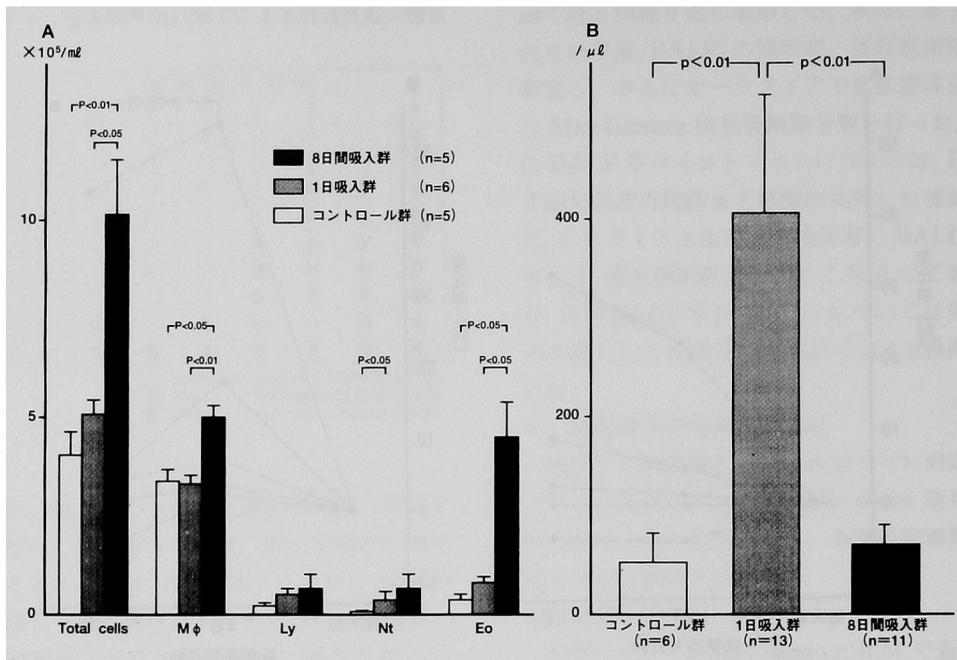


Fig. 4 (A) 抗原吸入5時間後のBALF所見 (B) 抗原吸入5時間後の末梢血中の好酸球数

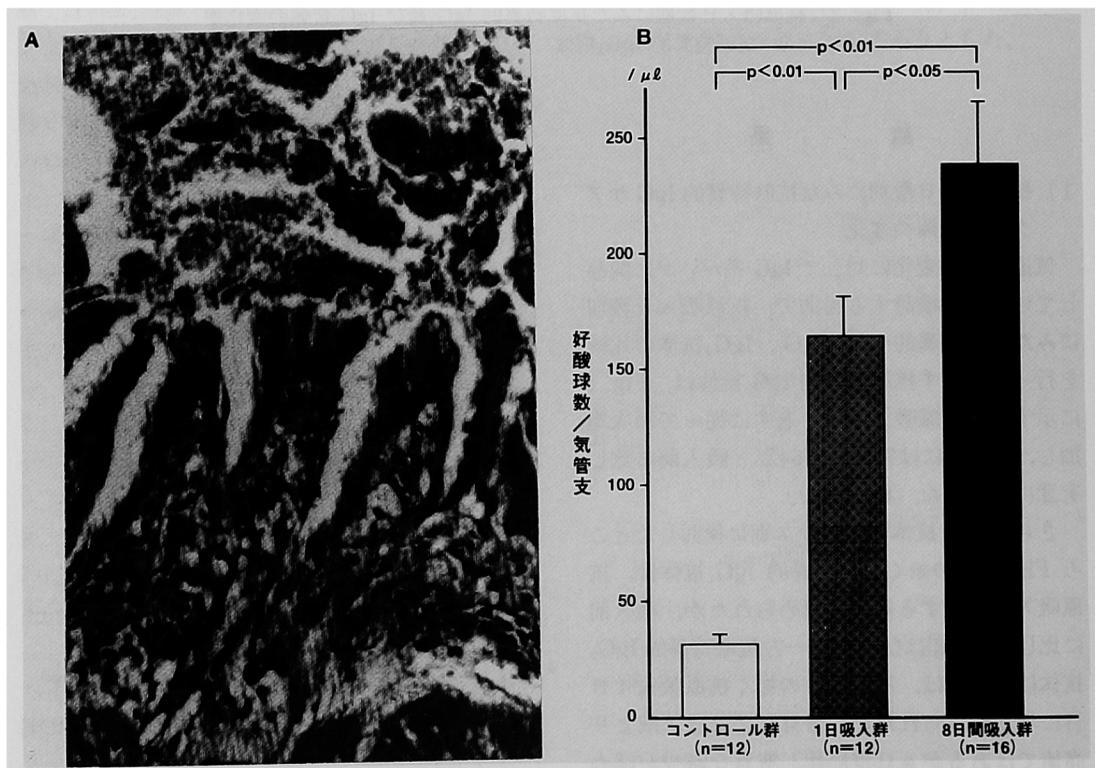


Fig. 5 (A) 8日間吸入群の肺組織
コントロール群や1日吸入群に比し気管支粘膜の浮腫や上皮の増高, 増生さらに変性や剥離, 粘膜下層への単核球, 好酸球浸潤がみられた。
(B) 抗原繰り返し吸入による気管支組織への好酸球浸潤

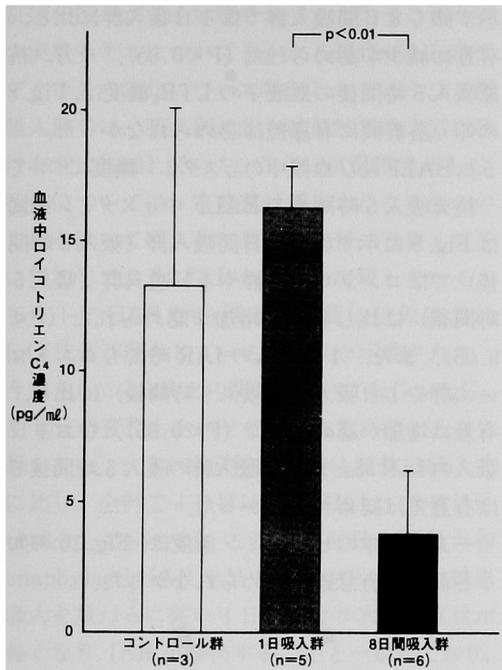


Fig. 6 抗原吸入5時間後における血液中のロイコトリエン C₄濃度

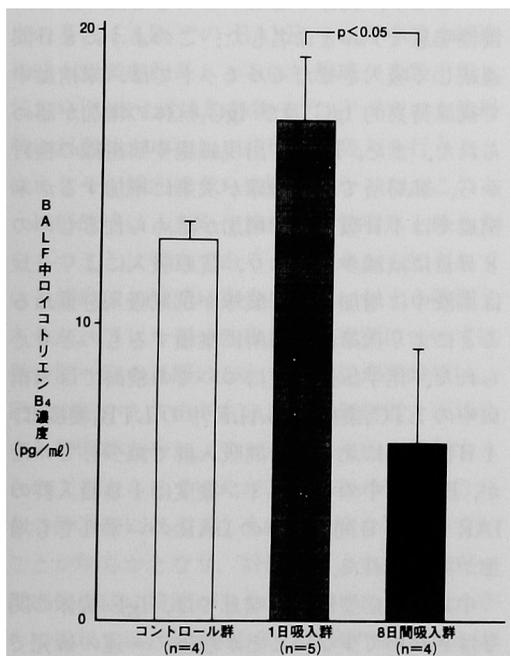


Fig. 7 抗原吸入5時間後における BALF 中のロイコトリエン B₄濃度

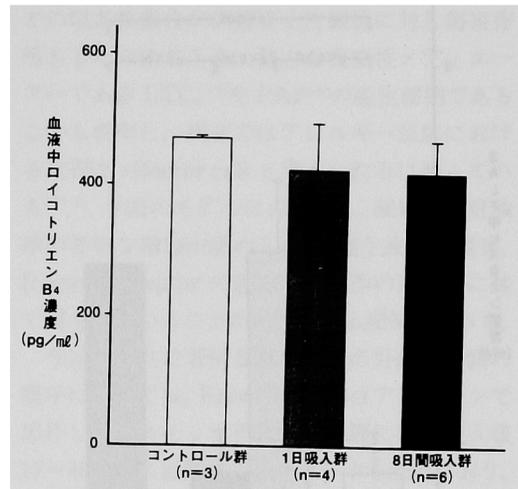


Fig. 8 抗原吸入5時間後における血液中のロイコトリエン B₄濃度

て検討したところ, Fig.4A に示す如く総細胞数は, 8日間吸入群ではコントロール群及び1日吸入群に比し有意に増加していた($P < 0.01$, $P < 0.05$). マクロファージも8日間吸入群では, コントロール群と1日吸入群に比し有意に増加していたが($P < 0.05$, $P < 0.01$), リンパ球は各群間に有意差は認められなかった. 好中球はコントロール群に比し1日吸入群で有意に増加が認められ ($P < 0.05$), 好酸球はコントロール群や1日吸入群に比し, 8日間吸入群で有意に増加が認められた ($P < 0.05$). さらに, 抗原吸入5時間後の末梢血中の細胞分類については, Fig. 4 B の如く好酸球についてはコントロール群や8日間吸入群に比して, 1日吸入群が有意に増加していた ($P < 0.01$).

3) 出現細胞についての組織学的検討

気管支領域の組織学的検討では, Fig. 5A の如く8日間吸入群は, コントロール群や1日吸入群に比し気管支粘膜の浮腫や上皮の増高, 増生さらに変性や剥離, 粘膜下層への単核球, 好酸球浸潤が著明であった. そのうち最も特徴的な組織所見として, 気管支平滑筋周囲の浸潤好酸球を算定し気管支一個相当の平均値と比較したところ, Fig. 5B の如く8日間吸入群はコントロール群や1日吸入群に比し, 有意に高値であった ($P < 0.01$, $P < 0.05$). また, 1日吸入群もコントロール群に比し, 有意に増加していた

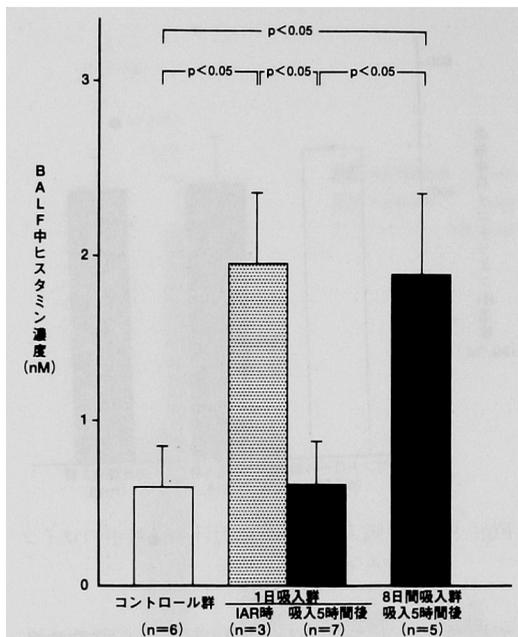


Fig. 9 抗原吸入によるBALF中のヒスタミン濃度

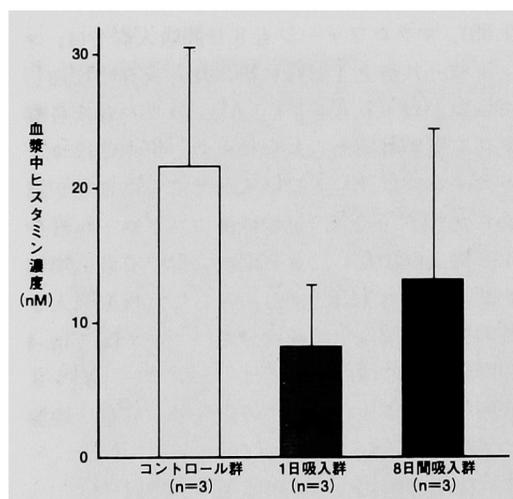


Fig. 10 抗原吸入5時間後における血漿中のヒスタミン濃度

($P < 0.01$).

4) BALF 及び末梢血中のロイコトリエン濃度について

BALF 中 LTC_4 濃度は、検出不能のものが多く、今回は検討できなかった。抗原吸入5時間後における血液中 LTC_4 濃度については、8日間吸入群は1日吸入群に比し、有意に減少が認められた ($P < 0.01$) (Fig. 6)。抗原吸入5時間

後における BALF 中の LTB_4 濃度は、Fig. 7 に示す如く8日間吸入群では1日吸入群に比し、有意に減少が認められた ($P < 0.05$)。一方、抗原吸入5時間後の血液中の LTB_4 濃度は、Fig. 8 の如く各群間に有意差は認められなかった。

5) BALF 及び血漿中のヒスタミン濃度について

抗原吸入5時間後の BALF 中ヒスタミン濃度は Fig. 9 に示す如く8日間吸入群（吸入5時間後）ではコントロール群や1日吸入群（吸入5時間後）に比し有意に増加が認められた ($P < 0.05$)。また、1日吸入の IAR 時でもコントロール群や1日吸入群（吸入5時間後）に比し、有意に増加が認められた ($P < 0.05$)。なお1日吸入の IAR 時と8日間吸入群の吸入5時間後では有意差は認められなかった。

一方血漿中のヒスタミン濃度は、Fig. 10 の如く各群間に有意差は認められなかった。

考 察

抗原を繰り返し吸入させた際の気道反応態度の変化を第1編で検討し、発作的な比較的軽度で短時間に回復する IAR のみのモルモットも、抗原吸入を重ねるに従い次第に DAR を呈するのみならず、発作が遷延することを見出し、慢性喘息モデルと命名した。このように8日間連続して吸入させたモルモットでは、末梢血中で抗原特異的 IgG 及び IgG₁ 抗体の増加が認められた。また、BALF 出現細胞や肺組織の検討から、肺局所では好酸球が次第に増加するが末梢血では1日吸入群で増加が認められるものの8日目には減少しており、抗原吸入により一旦は血液中に増加した好酸球が抗原吸入を重ねることにより次第に肺局所に集積するものと考えられた。化学伝達物質についての検討では末梢血中の LTC_4 濃度や BALF 中の LTB_4 濃度は、1日吸入群に比し8日間吸入群で減少していたが、BALF 中のヒスタミン濃度は1日吸入群の IAR 及び8日間吸入群の DAR のいずれでも増加が認められた。

中高年発症型難治性喘息では、IgE 抗体の関与はきわめて少ないことが教室の一連の研究で明らかにされている。すなわち皮膚反応、抗原特異的 IgG 抗体、吸入誘発試験などの結果⁶⁾⁷⁾が

ら, *Candida* 抗原による IgG 抗体, 特に IgG₁ 抗体の関与が強く示唆されている⁹⁾. そこで今回の実験モデルについてもかかる観点から IgG サブクラスの変化について検討したところ, 8日間吸入群では, 吸入前に比し抗原特異的 IgG 抗体は有意に増加していた. さらに抗原特異的 IgG₁ 抗体については, 有意差は認められないものの 1例を除いて吸入前に比し 4日目, 8日目と次第に増加しており, IAR のみしか出現しないモルモットに DAR が出現する過程に抗原特異的 IgG₁ 抗体が関与している可能性が示唆された. 今後さらに LAR との関連について IgG_{1a}・IgG_{1b} や IgE の変化もあわせて検討する必要があると思われた. 一方, 抗原特異的 IgG₂ 抗体は吸入前に比し, 全例で 4日目に一旦増加し, 8日目には減少していたが, これは抗原吸入開始当初 anaphylactic IAR を呈するモルモットが, 抗原吸入を重ねるに従い 4日目頃より次第に症状が軽くなり, IAR が軽快することと一致しており, 抗原特異的 IgG₂ 抗体が blocking antibody として働く可能性を示唆するものと思われた⁹⁾.

今回作製した慢性喘息モデルの肺局所で著明な増加を示した好酸球と喘息病態の係わりに関しては, 中高年発症型難治性喘息の病態と類似点の多い LAR での BALF 中に好中球, 好塩基球・肥満細胞系とともに好酸球が多数出現しており¹⁰⁾, また LAR 動物モデル⁹⁾⁻⁵⁾¹¹⁾でも肺局所に好酸球が増加し, 抗原の再吸入を行うことによりその傾向はさらに顕著となった. このように好酸球は LAR や重症難治性喘息と係わりをもつことは明白であろう. 従来から知られている好酸球の機能は寄生虫感染に対する防御であるが, アレルギー性疾患での役割については長い間一定の見解はなかった. 従来好酸球は, 肥満細胞から放出される炎症惹起物質を不活化する酵素群を有し, アレルギー反応を抑制するものと考えられていたが, その後の研究でこれらの酵素群には必ずしもそのような活性のないことが明らかとなり, 好酸球によるアレルギー反応修復説に疑問がもたれるようになった. さらに近年では, 好酸球由来の MBP (major basic protein)¹²⁾, ECP (eosinophil cationic protein)¹³⁾, EPO (eosinophil peroxidase)¹⁴⁾な

どの塩基性蛋白が気管支上皮細胞に対し傷害作用をもたらすことや, 強力な炎症性メディエーターである LTC₄¹⁵⁾ や PAF¹⁶⁾ の産生細胞であることも判明し, 現在ではアレルギー反応における重要な effector cell と考えられるに至っている¹⁷⁾¹⁸⁾. 今回のモデルにおいても, 肺局所に好酸球の著明な増加が認められ, 気道上皮細胞傷害, Irritant receptor の露出等, 発作の慢性化に強く関与していることが示唆される結果であった.

今回得られた著明な肺局所への好酸球浸潤の機序については, Frew¹⁹⁾らは卵白アルブミンで感作したモルモットの気管支粘膜に抗原吸入後 17~48時間に好酸球の上昇ピークを認めており, その際同時に CD3 (+) CD8 (-) Tリンパ球が増加していることを報告し, 気道での T cell の集積は LAR の特徴であるとしている. 今回はリンパ球の検討はできておらず, リンパ球由来の ECF ともあわせて今後検討する必要があると考えられた.

教室の動物モデルを用いた研究³⁾⁵⁾では, LAR においては抗原吸入により気道に遊出した好中球から LTB₄ が放出され更に好酸球が気道に集積し, 両細胞から LTC₄ が産生され強い気道収縮がおこるものと考えられる. 今回得られた 8日間吸入群での BALF 中好酸球集積の所見に加え, 好中球も増加傾向が認められたが, なかには全く好中球増加を示さないものもあった. 木村²⁰⁾は重症, 難治性喘息患者の肺局所に好中球の増加することを報告しているが, 今回の実験結果と異なる理由として, 動物の種差や抗原の違いが考えられた. BALF 中 LTB₄ が 8日間吸入群では 1日吸入群に比しむしろ減少しているのも, 繰り返す発作のため, また吸入抗原量の過剰投与のために反応が強すぎて, LTB₄ 産生細胞である好中球が枯渇している可能性が考えられた. また LTC₄ は BALF 中では今回検出されなかったが, BAL 施行時注入する生理食塩水が多すぎるためか, また阻害物質の存在, LTC₄ が非常に不安定な物質であるため BAL 施行中代謝された可能性等が考えられた. 血液中の LTC₄ も 8日間吸入群では 1日吸入群に比し減少していたが, 肺局所への LTC₄ 産生細胞の集積, また BALF 中 LTB₄ の場合と同様, 化学伝達物

質が枯渇した可能性が考えられた。

ヒスタミンの変動に関して、今回の動物実験では血中では有意差は認められなかったが、Okayama²¹⁾らはヒツジにアスカリス抗原の吸入を行い、IAR では BALF 中のヒスタミンが上昇したが LAR では認められなかったとしている。一方 Durham²²⁾らは、喘息患者の IAR 及び LAR 双方で血中のヒスタミンが上昇すると報告しており、また Diaz²³⁾は喘息患者を IAR のみ呈する群と IAR と LAR の両者 (DAR) が出現する 2 群に分け、抗原吸入 6 時間後の BALF 中のヒスタミンを比較したところ、IAR のみの群ではコントロールに比し上昇は認められなかったが、DAR 7 例中 5 例はコントロールに比し上昇傾向にあったと報告している。以上の如く、ヒトにおいても IAR のみばかりではなく DAR でもヒスタミン上昇の可能性が示唆されている。この点に関して難波¹⁰⁾は、気管支喘息患者に house dust による抗原吸入試験を行うと、LAR 時に好塩基球・肥満細胞系の増加が認められるとしており、従って今回 8 日間吸入群の DAR モルモット BALF 中にヒスタミンの上昇が認められたことは、抗原吸入を重ねるに従い好塩基球・肥満細胞系が局所で増加、活性化された可能性が推測される。ヒスタミン含有細胞には好塩基球・肥満細胞系があり、IgE に強い親和性のあるレセプターと、メタクロマジンを示す顆粒を有する骨髄由来の細胞という点で共通している。肥満細胞が未分化細胞のまま骨髄から遊出し組織に固着した後、組織で分化、増殖を示すのに対し、好塩基球は骨髄で完全に分化、成熟した後、血液中出现する。以前は機能的にほぼ同じと考えられていたが、好塩基球がトリプターゼ染色に対して陰性であること、PGD₂が肥満細胞では放出されるが好塩基球では放出されない等、機能的にも何らかの異なった役割を担っていることが判明してきた。

Jarjour²⁴⁾は喘息患者に BAL を行い、ヒスタミンの上昇と気道閉塞に相関を認めたが、トリプターゼは上昇していなかったことから好塩基球の関与を示唆している。一方 Liu²⁵⁾らは軽症の喘息患者に BAL を行い、PGD₂とヒスタミンの上昇を報告し、肥満細胞の関与を想定してい

る。さらに Schleimer²⁶⁾らは、アレルギー性鼻炎患者の抗原誘発後にみられる即時型及び遅発型反応の際に、鼻洗浄を行い、その液中の化学伝達物質を測定し、抗原誘発直後には PGD₂が含まれているが遅発型反応時には含まれていないことより、遅発型反応では肥満細胞よりむしろ好塩基球が関与することを示唆している。今回の実験で、抗原吸入 1 日目の IAR 時におけるヒスタミンの上昇と 8 日間吸入群の DAR 時におけるそれとでは、ヒスタミンの由来する細胞が異なる可能性もあると考えられた。また DAR では好酸球、好中球、単球など浸潤細胞由来の化学伝達物質を介する非特異的的刺激での肥満細胞脱顆粒の可能性もあり、DAR でのヒスタミンの上昇は、IAR とはその由来細胞のみならず脱顆粒機序が異なる可能性も考えられた。近年、喘息病態はアレルギー性炎症としてとらえられ、まず肥満細胞が引き金をひき、さらに複雑な細胞反応が誘導された結果、連鎖反応により好塩基球も誘導され、複雑でより重篤な LAR の場でヒスタミン等の化学伝達物質を放出することによって複雑な細胞反応連鎖を誘導する重要な役割を担っているものと考えられる。現時点では LAR における好塩基球・肥満細胞の役割はなお不明な点も多いが、今後 CTMC (connective tissue mast cell)、MMC (mucosal mast cell) の区別も含めてさらに検討すべき課題と考えられた。

結 論

重症、難治性喘息の機序を解明するため、LAR 動物モデルを用いて抗原吸入を繰り返すことにより慢性喘息モデルを作製し、その末梢血及び BALF 中の化学伝達物質や IgG、細胞反応並びに肺の組織学的検討を行った。

1) 吸入前に比し 8 日間吸入群では末梢血中の抗原特異的 IgG ($P < 0.05$) 及び IgG₁ 抗体の増加が認められた。

2) 末梢血好酸球数は、1 日吸入群に比し 8 日間吸入群で減少を示し ($P < 0.01$)、BAL 及び肺組織の好酸球は逆に増加した ($P < 0.05$)。

3) 末梢血中の LTC₄濃度は、1 日吸入群に比し 8 日間吸入群で有意に減少が認められた

($P < 0.01$),

4) BALF 中の LTB_4 濃度は, 1 日吸入群に比し 8 日間吸入群で有意に減少が認められた ($P < 0.05$).

5) BALF 中のヒスタミン濃度は IAR, DAR のいずれでも増加が認められた.

以上, 成人喘息病態に類似した慢性喘息動物モデルを用いて, その肺局所での化学伝達物質や細胞反応の複雑な相互関連の一端を明らかに

した.

稿を終えるにあたり御指導, 御校閲を賜りました恩師木村郁郎教授に深謝するとともに, 終始懇切な御指導と助言を頂きました高橋 清講師に深謝いたします.

尚, 本論文の要旨は, 第33回日本胸部疾患学会総会 (平成 5 年 4 月 8 日) において発表した.

文 献

- 1) 木村郁郎: 喘息の病態とその本質論—中高年発症型難治性喘息の独立性—. 日胸疾患誌 (1983) 21, 181—182.
- 2) 高橋 清, 宗田 良, 清水一紀, 難波一弘, 辻 光明, 難波康夫, 小栗栖和郎, 武田勝行, 猪木篤弘, 菅野尚, 木村郁郎: Candida 抗原による遅発型気道反応の機序に関する検討—気管支肺胞洗浄所見を中心に—. アレルギー (1992) 41, 563—570.
- 3) 沖 和彦: 気管支喘息の重症難治化要因に関する研究. 第 2 編 遅発型気道反応動物モデルにおける抗原再吸入の影響. 岡山医誌 (1990) 102, 1197—1205.
- 4) Iijima H, Ishii M, Yamauchi K, Chao CL, Kimura K, Shimura S, Shindoh Y, Inoue H, Mue S and Takishima T: Bronchoalveolar lavage and histologic characterization of late asthmatic response in guinea pigs. Am Rev Respir Dis (1987) 136, 922—929.
- 5) 沖 和彦: 気管支喘息の重症難治化要因に関する研究. 第 1 編 喘息動物モデルによる遅発型気道反応の機序に関する検討. 岡山医誌 (1990) 102, 1187—1196.
- 6) 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, 富岡玖夫編, デーエムベージャパン, 東京 (1985) pp23—40.
- 7) 谷崎勝朗, 駒越春樹, 周藤真康, 貴谷 光, 中山堅吾, 多田慎也, 高橋 清, 木村郁郎: 気管支喘息におけるカンジダ抗原の特徴—統計的観察. 日胸疾患誌 (1986) 24, 150—155.
- 8) 小栗栖和郎, 高橋 清, 多田慎也, 宗田 良, 難波一弘, 高田 稔, 難波康夫, 金広有彦, 谷本 安, 木村五郎, 高橋寿保, 木村郁郎, 谷崎勝朗: 成人喘息における IgG サブクラス抗体に関する研究. 第 1 報 血清中抗原特異的 IgG サブクラス抗体と遅発型気道反応の関連について. アレルギー (1991) 40, 506—515.
- 9) Yamauchi N, Ito K, Suko M, Ishii A and Miyamoto T: IgG₂ antibodies block IgE antibody-induced asthma in guinea pigs. Int Archs Allergy Appl Immunol (1986) 80, 76—80.
- 10) 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.
- 11) 湯川龍雄, 寺師義典, 福田 健, 牧野莊平, 細野克彦, 副島和彦: モルモット気道アレルギーにおける組織学的検討 I. 同種抗体受身感作モデルにおける単回抗原暴露後の好酸球浸潤と気道形態変化. アレルギー (1987) 36, 227—237.
- 12) 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.
- 13) Young DJ, Peterson CGB, Venge P and Cohn ZA: Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. Nature (1986) 321, 613—616.

- 14) Henderson WR, Jong EC and Klebanoff SJ : Binding of eosinophil peroxidase to mast cell granules with retention of peroxidatic activity. *J Immunol* (1980) **124**, 1383—1388.
- 15) 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.
- 16) Lee T, Lenihan DJ, Malone B, Roddy LL and Wasserman SI : Increased biosynthesis of platelet-activating factor in activated human eosinophils. *J Biol Chem* (1983) **259**, 5526—5530.
- 17) Gleich GJ and Loegering DA : Immunobiology of eosinophils. *Annu Rev Immunol* (1984) **2**, 429—459.
- 18) Kay AB : Eosinophils as effector cells in immunity and hypersensitivity disorders. *Clin Exp Immunol* (1985) **62**, 1—11.
- 19) Frew AJ, Moqbel R, Azzawi M, Hartnell A, Barkans J, Jeffery PK, Kay AB, Scheper RJ, Varley J, Church MK and Holgate ST : T lymphocytes and eosinophils in allergen-induced late-phase asthmatic reactions in the guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* (1990) **141**, 407—413.
- 20) 木村郁郎 : 気管支喘息における気道洗浄液. *医学のあゆみ* (1982) **123**, 401—411.
- 21) Okayama H, Aikawa T, Ohtsu H, Sasaki H and Takishima T : Leukotrienes C₄ and B₄ in bronchoalveolar lavage fluid during biphasic allergic bronchoconstriction in sheep. *Am Rev Respir Dis* (1989) **139**, 725—731.
- 22) Durham SR, Lee TH, Cromwell O, Shaw RJ, Merrett TG, Merrett J, Cooper P and Kay AB : Immunologic studies in allergen-induced late-phase asthmatic reactions. *J Allergy Clin Immunol* (1984) **74**, 49—60.
- 23) Diaz P, Gonzalez MC, Galleguillos FR, Ancic P, Cromwell O, Shepherd D, Durham SR, Gleich GJ and Kay AB : Leukocytes and mediators in bronchoalveolar lavage during allergen-induced late-phase asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis* (1989) **139**, 1383—1389.
- 24) Jarjour NN, Calhoun WJ, Schwartz LB and Busse WW : Elevated bronchoalveolar lavage fluid histamine levels in allergic asthmatics are associated with increased airway obstruction. *Am Rev Respir Dis* (1991) **144**, 83—87.
- 25) Liu MC, Bleecker ER, Lichtenstein LM, Kagey-Sobotka A, Niv Y, Mclemore TL, Permutt S, Proud D and Hubbard WC : Evidence for elevated levels of histamine prostaglandin D₂ and other bronchoconstricting prostaglandins in the airways of subjects with mild asthma. *Am Rev Respir Dis* (1990) **142**, 126—132.
- 26) Schleimer RP, Fox CC, Naclerio RM, Plaut M, Creticos PS, Togias AG, Warner JA, Kagey-Sobokta A and Lichtenstein LM : Role of human basophils and mast cells in the pathogenesis of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* (1985) **76**, 369—374.

Studies on the cause of intractable asthma using animal model
Part 2. Immunoglobulin G, chemical mediators and cell reactions in BALF
and peripheral blood of chronic asthma model

Hisashi SUGANO

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

To clarify the mechanism of intractable asthma, we examined the cellular content and chemical mediators in BALF and peripheral blood of a chronic asthma model which we had already established by inhalation of *ascaris suum* antigen. The serum levels of antigen specific IgG antibody on the eighth day were significantly higher than those before inhalation. The serum levels of antigen specific IgG₁ antibody increased on the eighth day compared with levels before inhalation. The serum levels of antigen specific IgG₂ antibody as a blocking antibody increased and immediate asthmatic response (IAR) gradually improved until the fourth day. The number of eosinophils after eight days of inhalation was decreased in peripheral blood but was significantly increased in BAL and lung tissue. The serum levels of LTC₄ after eight days of inhalation decreased significantly compared to those after one day of inhalation. LTB₄ concentrations in BAL after eight days of inhalation were significantly lower than those after one day of inhalation. Histamine concentrations were increased in BAL in both the IAR and dual asthmatic response (DAR) animal model. These data suggest that intractable asthma was induced by many kinds of chemical mediators produced by inflammatory cells including eosinophils, mast cell-basophils, neutrophils and lymphocytes.