

気管支喘息における 好酸球動態の調節に関する研究

第 2 編

喘息患者末梢血好酸球の遊走能に関する検討

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

高 橋 寿 保

(平成 3 年 3 月 20 日受稿)

Key words : Bronchial asthma, Eosinophil migratory response,
Platelet-activating factor, Interleukin-5, Eosinophil heterogeneity

結 言

気管支喘息病態の特徴の一つに、末梢血好酸球増多および気管支組織中への好酸球の浸潤があり、気道閉塞の程度と末梢血好酸球数の相関¹⁾とか、抗原吸入誘発試験 (Bronchial provocation test : BPT) における遅発型気道反応 (Late asthmatic response : LAR) の気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar lavage fluid : BALF) 中に著明な好酸球増多が認められる²⁾など、喘息発作との間には密接な関係が認められている。好酸球は、従来アレルギー性炎症反応の抑制作用の側面が強調されていたが、近年のめざましい細胞生化学的研究の展開により、好酸球の産生・放出する化学伝達物質がアレルギー性炎症を誘導、増幅することが明らかとなり、現在では喘息発作における重要な effector cell としての役割を担うものと考えられている。かかるアレルギー性炎症反応の局所好酸球浸潤には、Platelet-activating factor (PAF)³⁾⁴⁾や Interleukin-5 (IL-5)⁵⁾ など種々の好酸球遊走因子 (Eosinophil chemotactic factor : ECF) が関与すると考えられており、近年 BPT 後の BALF 中に ECF 活性の増加が認められている⁶⁾。なおかかる物質は、好酸球の各種メディエーターの産生・放出の促進や好酸球の低比重化を促すなど、種々の面で好酸球を活性化することも知られており、

アレルギー性炎症に深く関わりを持つものと考えられている。一方、成人の気管支喘息病態をよく反映していると考えられるカンジダ喘息におけるリンパ球の関与が教室の一連の研究により明らかにされ⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾、さらに第 1 編でかかるリンパ球由来の ECF の主体は IL-5 であることを明らかにした。そこで著者は、IL-5 をはじめとする各種 ECF に対する好酸球の遊走能を測定し、種々の喘息病態における好酸球の動態を、細胞の反応性という側面から検討した。

対象と方法

岡山大学第 2 内科外来通院中及び入院中の気管支喘息患者 24 例を対象とした。病型別内訳は、アトピー型 12 例・非アトピー型 12 例で、①発症年齢 40 未満、②他のアレルギー性疾患の合併、③ IgE RIST 高値 (>500 U/ml)、④ IgE RAST が陽性、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 (表 1)。また日本アレルギー学会の重症度別分類に従うと、軽症は 10 例、中等症 9 例、重症 5 例であった。なお、発作時とは日本アレルギー学会の分類でいう「小発作」或は「中発作」の状態であり、一方非発作時は、何等自覚症状がなく聴診所見上もラ音を認めない状態とした。

方 法

1) 末梢血好酸球の分離精製

喘息患者のヘパリン加末梢血 5 ml に 6% デキストラン 1 ml を加え、室温で 30 分静置し buffy coat を回収した後、これに Phosphate buffer saline (PBS) 10 ml を加え、4°C、250 g で 5 分間洗滌・遠沈した。沈渣に混入した赤血球を除くため、蒸留水 1 ml を加え 30 秒間ピペティングして溶血させ、1.8% 食塩水 1 ml を加えて等張に戻した。さらに PBS で洗滌・遠沈した細胞層を PBS 2 ml に浮遊させた後、教室の河田の方法¹¹⁾に従いフローサイトメーター (FACStar: Becton-Dickinson) を利用して好酸球を分離した。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) 低比重好酸球の分離

Colloidal polyvinylpyrrolidone-coated silica gel (Percoll: Sigma) 原液を HBSS と混合して比重 1.082 の等張 Percoll を作成し試験管の下層に入れ、その上に 1) で得られた HBSS 好酸球浮遊液を静かに重層し、700 g、20 分間遠沈した。沈渣細胞成分を正常比重好酸球 ($d > 1.082$)、中間層に分離された細胞成分を低比重好酸球 ($d < 1.082$) として回収し HBSS で洗滌した後、HBSS で 2×10^4 個/100 μ l の濃度に再調整したものを検体として用いた。

表 1 対象患者背景

病型	アトピー型	非アトピー型
症例数	12	12
現年齢 (歳)	42 (34-54)	51 (35-70)
発症年齢 (歳)	32 (4-50)	42 (25-62)
末血好酸球数 (/ μ l) m \pm SD	512 \pm 407	318 \pm 118
IgE (RIST) (U/ml)	830 (68-1894)	96 (1-176)
RAST 陽性率 (%)	91.7	8.3
即時型皮内反応陽性率 (%) (真菌のみを除く)	100	8.3
他のアレルギー性疾患 合併率 (%)	91.7	16.7

3) 好酸球遊走能の測定

Multiwell microchemotaxis chamber (Neuroprobe) と孔径 5 μ m の polycarbonate filter (Nucleopore) を用いた modified Boyden chamber 法にて好酸球遊走能を測定した。chamber 下室には各濃度の Platelet-activating factor (PAF: Sigma) およびリコンビナントヒト interleukin-5 (rhIL-5: サントリー)¹²⁾ を入れ、chamber 上室との間を仕切るように filter をのせた。さらに chamber 上室に 1) や 2) で得られた好酸球を入れ、37°C の CO₂ インキュベーター内で 30 分間反応させた後、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 分間行った。その後、キシレンに 1 分間浸してスライドガラスに固定して 400 倍で無作為に 10 視野鏡検し、filter の下室側まで遊走した細胞数を算

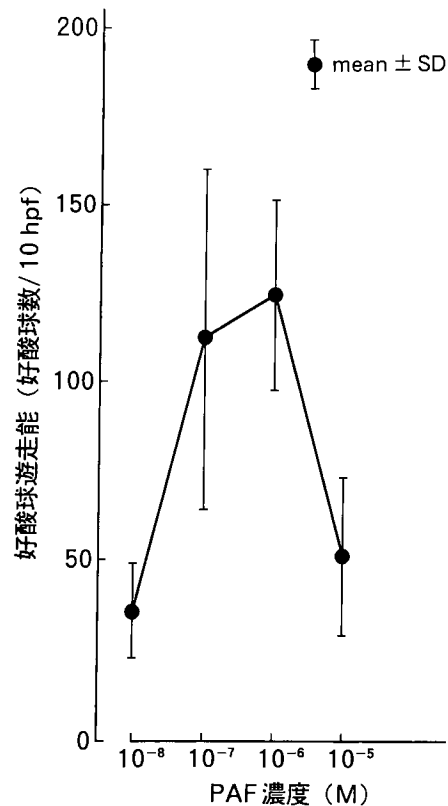


図 1 PAF に対する喘息患者好酸球の遊走能 10⁻⁷~10⁻⁶ M にピークが認められた。

定して遊走能とした。なお、用いた好酸球は採血後2時間半前後に統一し、測定は duplicate で行った。

4) 血清中 Eosinophil cationic protein (ECP) の測定

好酸球分離用と同時に採血した喘息患者末梢血から、採血60分後に遠心分離した血清を用い、ECP RIA キット (Pharmacia) にて測定した。

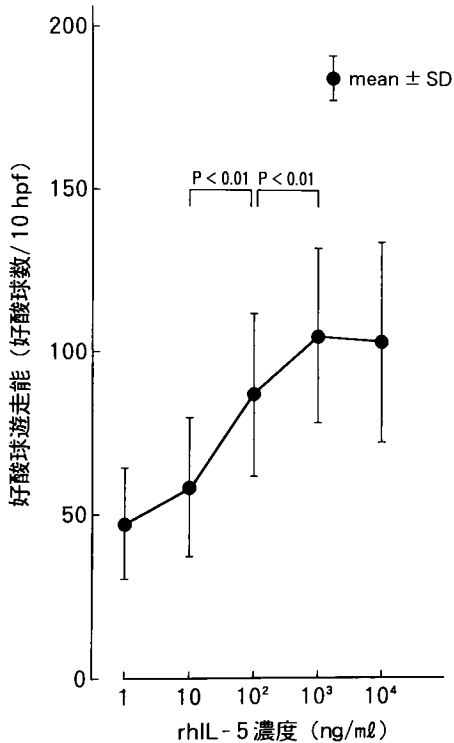


図2 rhIL-5 に対する喘息患者好酸球の遊走能濃度依存性に増加し、1 μg/ml でほぼ plateau となった。

図3 rhIL-5 の Checkerboard assay chemokinetic および chemotactic effect が認められた。

	上室 IL-5濃度 (ng/ml)		
	0	10	100
下室 IL-5濃度	0	5	34
	10	75	36
	100	129	65

血清は測定に供するまで -20°C で保存した。

成 績

1) 各濃度の PAF 及び rhIL-5 に対する喘息患者好酸球の遊走能

喘息患者好酸球の遊走能は、PAF に対しては 10⁻⁷ ~ 10⁻⁶ M にピークを認め (図1), rhIL-5 に対しては 1 ng/ml ~ 1 μg/ml で濃度依存性に増加し、1 μg/ml で plateau となる傾向を認めた (図2)。なお、checkerboard assay により、IL-5 には chemotactic および chemokinetic effect があることが示された (図3)。したがって以下の検討には、遊走反応がピークを示す前の濃度での比較が妥当と考え、PAF は 10⁻⁷ M, rhIL-5 は 100ng/ml を用いた。

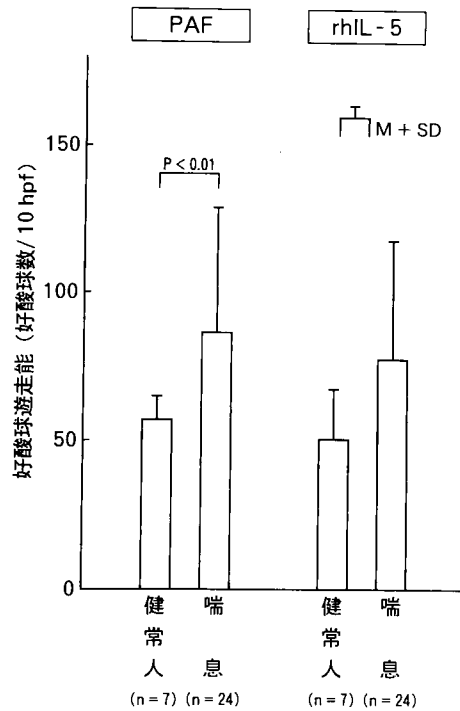


図4 PAF, rhIL-5 に対する健康人と喘息患者の好酸球遊走能の比較

PAF に対する遊走能は健康人より喘息患者で有意に亢進していた (p < 0.01)。IL-5 でも、喘息患者の方が亢進している傾向が認められた。

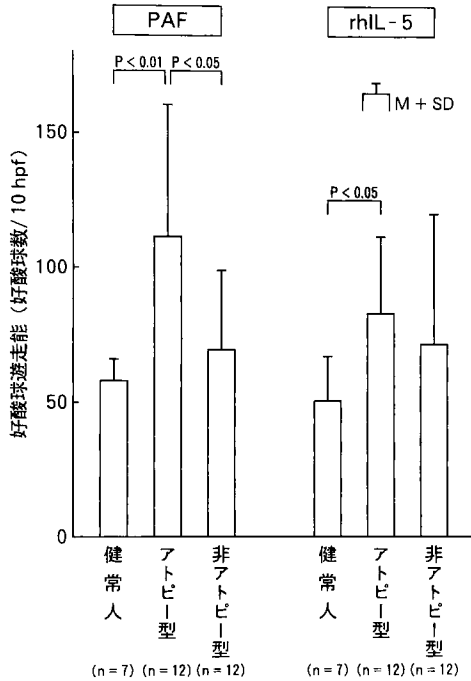


図5 PAF, rhIL-5 に対する喘息病型別の好酸球遊走能の比較

PAF に対する遊走能は、アトピー型で健常人および非アトピー型より有意に亢進していた ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。IL-5 に対しては、アトピー型で健常人より有意に亢進していた ($p < 0.05$)。

2) 健常人と喘息患者間、喘息病型別および重症度別での好酸球遊走能の比較

まず健常人と喘息患者の好酸球遊走能を比較したところ、PAF に対する遊走能は、健常人より喘息患者好酸球が有意に亢進しており ($p < 0.01$)、また rhIL-5 でも、統計的有意差は認められなかったものの、喘息患者の方が亢進していた (図4)。さらに喘息の病型別に分けて比較すると、PAF, rhIL-5 とも健常人よりアトピー型で有意に亢進していた ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。喘息の病型間の比較では、PAF に対する遊走能は、非アトピー型よりアトピー型で有意に高値を示したが ($p < 0.05$)、rhIL-5 では両者間で有意差は認められなかった (図5)。また喘息の重症度別では、PAF, rhIL-5 とも有意差は認められなかった (図6)。

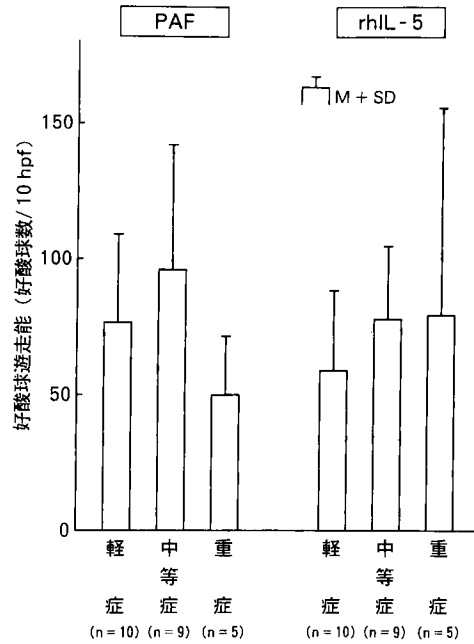


図6 PAF, rhIL-5 に対する喘息重症度別の好酸球遊走能の比較
重症度間で有意差は認められなかった。

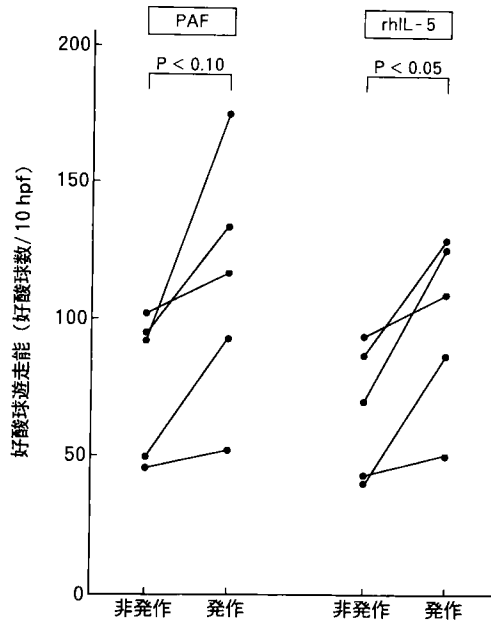


図7 好酸球の遊走能に及ぼす喘息発作の影響
非発作時より発作時で遊走能の亢進が認められた ($p < 0.10$, $p < 0.05$)。

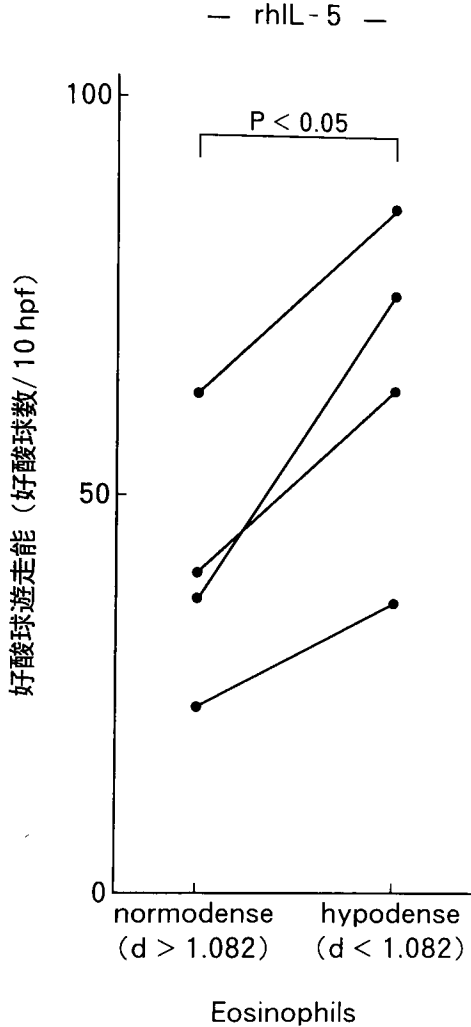


図8 低比重好酸球の遊走能に関する検討
正常比重より低比重好酸球で遊走能の亢進が認められた ($p < 0.05$).

3) 発作状態別の好酸球遊走能の比較

同一症例間での喘息発作時と非発作時における PAF と IL-5 に対する好酸球の遊走能を喘息患者 5 症例について比較したところ、発作時の好酸球には、非発作時のそれに比して PAF, rhIL-5 の両者により有意に高い遊走能が認められた ($p < 0.10$, $p < 0.05$) (図7).

4) 比重別での好酸球遊走能の比較

同一症例での低比重と正常比重好酸球の rhIL-5 に対する遊走能を 4 症例について比較したと

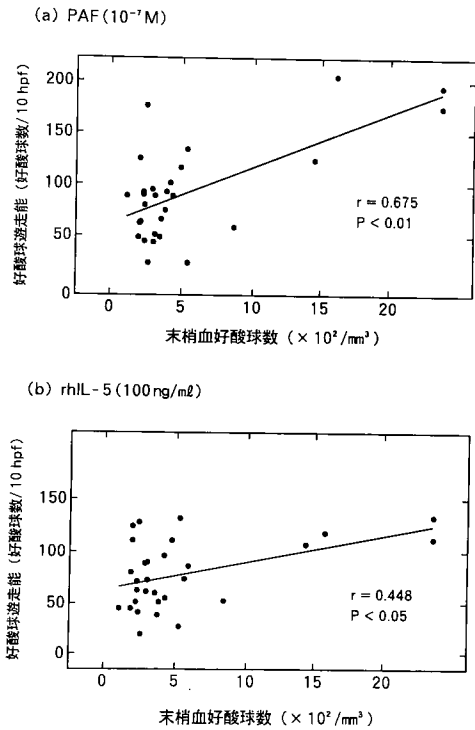


図9 喘息患者好酸球の遊走能と末梢血好酸球数との相関
PAF では $r = 0.675$ ($p < 0.01$), IL-5 では $r = 0.448$ ($p < 0.05$) の相関が認められた。

ころ、正常比重好酸球より低比重好酸球が有意に高い遊走能を示した ($p < 0.05$) (図8).

5) 末梢血好酸球数と PAF 及び rhIL-5 に対する好酸球の遊走能との関係

喘息患者末梢血好酸球数と PAF ($10^{-7}M$) 及び rhIL-5 (100ng/ml) に対する遊走能との相関を検討すると、PAF では $r = 0.675$ ($p < 0.01$) の良い相関が、また rhIL-5 では $r = 0.448$ ($p < 0.05$) の相関が認められた (図9).

6) 血清 ECP 濃度と好酸球遊走能との関係

喘息患者血清中 ECP 濃度と PAF 及び rhIL-5 に対する好酸球の遊走能との相関を検討すると、PAF では $r = 0.545$ ($p < 0.05$), rhIL-5 では $r = 0.756$ ($p < 0.01$) の強い相関が認められた (図10).

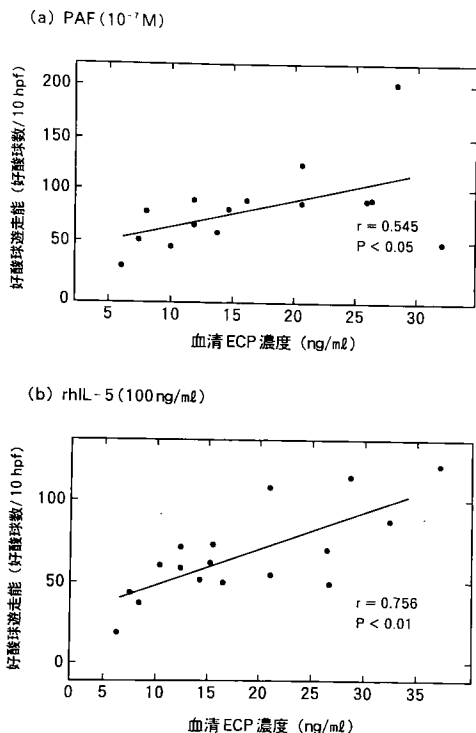


図10 喘息患者好酸球の遊走能と血清 ECP 濃度との相関
PAF では $r = 0.545$ ($p < 0.05$), IL-5 では $r = 0.756$ ($p < 0.01$) の相関が認められた。

考 察

気管支喘息の病態における好酸球の役割は、かつての炎症場における生体防衛の機能から、近年ではむしろ炎症反応を増幅し組織を傷害するものと考えられるに至っており、さらに、喘息発作と肺の好酸球浸潤との間の密接な関係が知られている¹³⁾。このような気道局所への好酸球浸潤を説明する機序の一つとして、教室の一連の研究⁸⁾¹⁰⁾や第1編で報告したごとく、好酸球遊走因子 (ECF) の局所産生が考えられる。そこで本編では、気管支喘息の病態において気道反応局所に集積しアレルギー性炎症反応に関わる好酸球の動態を、その反応性の側面から捉える目的で、PAF および IL-5 に対する各種病態の喘息患者好酸球の遊走能の検討を行った。その結果、喘息患者では健康人に比し、両物質に対

する好酸球遊走能の亢進が認められ、アトピー型喘息でその傾向が著しく、特に PAF に対する遊走能はアトピー型で著明に亢進していた。さらに、発作時の好酸球や低比重好酸球で亢進が認められ、血清 ECP 濃度及び末梢血好酸球数と好酸球遊走能は相関していた。

今回の検討からアトピー型喘息患者好酸球は、PAF に対する遊走能が亢進していることが判明した。これは、アトピー型喘息の病態の主体が I 型アレルギー反応であり、抗原刺激により肥満細胞・好塩基球系から種々の mediator とともに PAF や ECF-A, アラキドン酸代謝産物などの好酸球遊走因子 (ECF) が放出されて¹⁴⁾気道炎症が引き起こされると考えられており、この反応系での好酸球の集積を説明し得る所見と考えられた。ECF には、lipid mediator として PAF³⁾⁴⁾, LTB₄³⁾⁴⁾, Hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE)¹⁵⁾等が、またペプチド・アミン類として ECF-A¹⁶⁾, Histamine¹⁷⁾, 補体成分である C_{5a}¹⁸⁾, C₅₆₇¹⁹⁾等、さらに lymphokine として IL-5⁵⁾などが知られている。なかでも PAF は、血管透過性亢進や気管支平滑筋収縮作用に加えて²⁰⁾、好酸球に対して様々な生理作用を持ち、強力な ECF 活性を有する³⁾⁴⁾他に、好酸球の LTC₄²¹⁾や活性酸素²²⁾の産生亢進、顆粒蛋白の脱顆粒促進²³⁾、好酸球の低比重化²²⁾、細胞表面の免疫グロブリンや補体に対するレセプターの発現増強²⁴⁾等、一般に活性化と呼ばれる状態をもたらし、さらに好酸球自体からも PAF が産生されて²⁵⁾、アレルギー炎症の増悪における一種の positive feedback 機構が想定されている。このようにこれらの物質は、気管支喘息の気道反応局所において、好酸球に対する作用を中心として重要な役割を担っていることが想定されている。

次に、好酸球には heterogeneity があることが知られており、その比重により低比重および正常比重好酸球に分けられている。低比重好酸球は、より活性化された好酸球と考えられており、補体や免疫グロブリンに対する表面レセプター発現の増強、細胞傷害作用や LTC₄・活性酸素産生の増強などが報告されている²⁶⁾。今回の検討において、Flow cytometry による Sorting

で得られた好酸球を、比重遠沈法で低比重と正常比重の好酸球に分けて、両者の IL-5 に対する遊走能を比較したところ、低比重好酸球でより亢進していた。IL-5 は、骨髄において好酸球を選択的に分化誘導²⁷⁾し、成熟好酸球に対しても選択的に作用して、ECF として知られている。さらに最近、好酸球上に IL-5 レセプターが存在し、それは低比重好酸球により強く発現されているとの報告がなされており²⁸⁾、低比重好酸球の IL-5 に対する遊走能亢進はこのことを反映したものと推察される。一方これとは反対に、Hypereosinophilic syndrome (HES) 患者末梢血の好酸球遊走能は、低比重よりも正常比重好酸球の方が高いという報告もあり²⁹⁾、気管支喘息と HES との末梢血中の低比重好酸球には質的な差異が指摘されている。即ち、HES の低比重好酸球は、細胞内顆粒が小さく MBP 含量も少なく、骨髄における成熟過程での異常が想定されているのに対し、気管支喘息のそれは、細胞膨化や脂質含量増加等によるものと想定され、反応性の亢進したタイプの好酸球であるとされており²⁰⁾、このような質的な差異が遊走能の差異として表れたと推察される。また、今回の著者の方法では、好酸球増多が認められなくとも正常比重と低比重好酸球の両者とも純度90%以上で得ることが可能であったが、従来の報告にあるような不連続勾配比重遠沈法では、著明な好酸球増多がない限り低比重好酸球分画へ相当量の好中球の混入が避けられない。好中球の混入は好酸球遊走能の測定系において抑制的に働くとの報告があることから¹¹⁾、この点においても今回の著者の検討と従来の報告との差異が説明できるかも知れない。

好酸球遊走能は喘息の発作状態により変化し、非発作時に比べ発作時でより亢進しており、さらに末梢血中好酸球数との間にも正の相関を認めた。抗原吸入誘発試験の際にみられる遅発型気道反応時には末梢血中の低比重好酸球が増加しているとか³⁰⁾、末梢血好酸球数と低比重好酸球の比率との間に正の相関を認める³¹⁾等の報告があり、低比重好酸球の比率の増加が全体としての好酸球遊走能の亢進に影響を与えている可能性がある。しかし一方で、寄生虫感染前と感染後

好酸球増多をきたした時との、同一人の正常比重好酸球の遊走能の比較では、感染後で遊走能の亢進を認めたとか³²⁾、異なったドナー由来の正常比重好酸球では、その殺寄生虫作用に差異が認められる³³⁾等の報告があり、正常比重好酸球内でも反応性に heterogeneity が存在するものと考えられる。今回測定された好酸球遊走能は、このような様々な程度に活性化された好酸球の総和としての反応性を反映したものと考えられる。

Eosinophil cationic protein (ECP)³⁴⁾は、Major basic protein (MBP)³⁵⁾、Eosinophil peroxidase (EPO)³⁶⁾、Eosinophil derived neurotoxin (EDN)³⁷⁾と共に好酸球内に含まれる顆粒蛋白の一つであり強い組織傷害性を有しており、血清 ECP 濃度と BPT 時の気道反応性との間には相関が認められている³⁸⁾。今回、血清 ECP 濃度と好酸球遊走能との間に正の相関が認められ、このことは即ち、好酸球の化学伝達物質放出能と遊走能との相関を示すものと考えられる。また、好酸球遊走能と末梢血好酸球数との相関が認められたことから、好酸球の反応性亢進と好酸球産生刺激とが平行した現象であることが示唆され、現時点ではこれらの現象を媒介する物質として、IL-5 が想定される。IL-5 には前述の ECF 活性以外に、低比重化や LTC₄³⁹⁾・活性酸素⁴⁰⁾の産生や脱顆粒の促進⁴¹⁾、表面レセプター発現の増強⁴²⁾、細胞傷害作用³⁹⁾や粘着能⁴³⁾の亢進、生存延長作用³⁹⁾⁴⁰⁾など、様々な面での好酸球活性化作用を有しているものと考えられている。従って IL-5 は、好酸球の産生増加や反応性の増強等を介して、気管支喘息の病態に深く関わっているものと想像され、さらに各種因子との相互関連作用について追求する必要があると考えられた。

結 論

気管支喘息の種々の病態における好酸球の動態を、好酸球の反応性の側面からみる目的で、喘息患者末梢血好酸球の PAF および IL-5 に対する遊走能を検討し、以下の結果を得た。

(1)喘息患者の好酸球には健康人に比してより高い遊走能が認められた。

(2)喘息患者の好酸球遊走能は、PAF に対しては 10^{-7} ~ 10^{-6} M にピークが認められ、IL-5 では 1 ng/ml ~ 1 μ g/ml で濃度依存性に増加し、1 μ g/ml で plateau となった。

(3)喘息の各病型間では、PAF に対しては非アトピー型よりアトピー型で有意に高い遊走能が認められた ($p < 0.05$) が、IL-5 では両病型間に有意差は認められなかった。

(4)喘息の重症度別では有意差が認められなかったが、発作時の好酸球は非発作時に比し遊走能は有意に亢進していた ($p < 0.05$)。

(5)喘息患者の低比重好酸球は、正常比重のものより高い遊走能が認められた。

(6)好酸球遊走能と末梢血好酸球数、および血清 ECP 濃度との間に正の相関が認められた。

以上、喘息患者の好酸球は様々な要因で活性化され、その反応性には heterogeneity があり、しかも好酸球の反応性と好酸球増多は連動しており、かかる気管支喘息の好酸球動態に PAF 以外に IL-5 の関与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致します。

(本論文の要旨は第40回日本アレルギー学会総会で発表した。)

文 献

- 1) Horn BR, Robin ED, Theodore J and van Kessel A : Total eosinophil counts in the management of bronchial asthma. *N Engl J Med* (1975) **292**, 1152-1155.
- 2) 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, 谷崎勝郎 : 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) de Monchy JGR, Postma DS, Kauffman HF, Venge P, Weeke B and Vries K : Pretreatment with inhaled corticosteroids reduces eosinophil chemotaxis of BAL fluid following house dust mite challenge. *Proceedings of the International Congress of Allergology and Clinical Immunology, Montreux, Switzerland* (1988) pp 249.
- 7) 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・ベー・ジャパン, 東京 (1985) pp 23-40.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 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の動態に関する研究—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) 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.
- 13) 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ダイエーターの解析, 第5回免疫薬理シンポジウム議事録, テー・エム・ペー・ジャパン, 東京 (1987) pp 59—72.
 - 14) Schleimer RP, Macglashan DWJr., Peters SP, Pinckard RN, Adkinson NFJr. and Lichtenstein LM : Characterization of inflammatory mediator release from purified human lung mast cells. *Am Rev Respir Dis* (1986) **133**, 614—617.
 - 15) 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.
 - 16) Kay AB, Stechschulte DJ and Austen KF : An eosinophil leukocyte chemotactic factor of anaphylaxis. *J Exp Med* (1971) **133**, 602—619.
 - 17) 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.
 - 18) 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.
 - 19) Lachmann PJ, Kay AB and Thompson RA : The chemotactic activity for neutrophil and eosinophil leukocytes of the trimolecular complex of human complement (C_{567}) prepared in free solution by the 'Reactive lysis' procedure. *Immunology* (1970) **19**, 895—899.
 - 20) Barnes PJ, Fan Chung K and Page CP : Platelet-activating factor as a mediator of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* (1988) **81**, 919—934.
 - 21) Tamura N, Agrawal DK and Townley RG : Leukotriene C_4 production from human eosinophils in vitro : Role of eosinophil chemotactic factors on eosinophil activation. *J Immunol* (1988) **141**, 4291—4297.
 - 22) Klopogge E, de Leeuw AJ, de Monchy JGR and Kauffmann HF : Hypodense eosinophilic granulocytes in normal individuals and patients with asthma. Generation of hypodense cell populations in vitro. *J Allergy Clin Immunol* (1989) **83**, 393—400.
 - 23) Kroegel C, Yukawa T, Dent G, Venge P, Fan Chung K and Barnes PJ : Stimulation of degranulation from human eosinophils by platelet-activating factor. *J Immunol* (1989) **142**, 3518—3526.
 - 24) 須甲松伸 : PAF と好酸球. *最新医学* (1990) **45**, 492—496.
 - 25) Lee TC, Lenihan DJ, Malone B, Roddy LL and Wassermann SI : Increased biosynthesis of platelet-activating factor in activated eosinophils. *J Biol Chem* (1984) **259**, 5526—5532.
 - 26) Fukuda T and Gleich GJ : Heterogeneity of human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* (1989) **83**, 369—373.
 - 27) Yamaguchi Y, Suda T, Suda J, Eguchi M, Miura Y, Harada N, Tominaga A and Takatsu K : Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. *J Exp Med* (1988) **167**, 43—56.
 - 28) Chihara J, Plumas J, Gruart V, Tavernier J, Prin L, Capron A and Capron M : Characterization of a receptor for interleukin 5 on human eosinophils : Variable expression and induction by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* (1990) **172**, 1347—1351.
 - 29) Gosset P, Prin L, Capron M, Auriault C, Tonnel A-B and Capron A : Presence of factors

- chemotactic for granulocytes in hypereosinophilic syndrome sera : relation with alterations in eosinophil migration. *Clin Exp Immunol* (1986) **65**, 654—663.
- 30) Suko M, Okudaira H, Shida T and Miyamoto T : Eosinophils in asthma, Eosinophils in allergy and clinical immunology, Proceedings of a symposium held at the XIII international congress of allergology and clinical immunology, Montreux, Switzerland (1988) pp 55—70.
 - 31) Fukuda T, Dunnette SL, Reed CE, Ackerman SJ, Peters MS and Gleich GJ : Increased numbers of hypodense eosinophils in the blood of patients with bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis* (1985) **132**, 981—985.
 - 32) White CJ, Maxwell CJ and Gallin JI : Changes in the structural and functional properties of human eosinophilia during experimental hookworm infection. *J Infect Dis* (1986) **154**, 778.
 - 33) David JR, Vadas MA, Butterworth AE, Azevedo de Brito, P, Carvalho EM, David RA, Bina JC and Andrade ZA : Enhanced helminthotoxic capacity of eosinophils from patients with eosinophilia. *N Engl J Med* (1980) **303**, 1147—1152.
 - 34) Ding-E Young J, Peterson CGB, Venge P and Cohn ZA : Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature* (1986) **32**, 613—616.
 - 35) Gleich GJ, Frigas E, Loegering DA, Wasson DL and Steinmuller D : Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein. *J Immunol* (1979) **123**, 2925—2927.
 - 36) 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.
 - 37) 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.
 - 38) Venge P, Dahl R and Peterson CGB : Eosinophil granule proteins in serum after allergen challenge of asthmatic patients and the effects of anti-asthmatic medication. *Int Arch Allergy Appl Immunol* (1988) **87**, 306—312.
 - 39) 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.
 - 40) 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.
 - 41) Fujisawa T, Abu-Ghazaleu R, Kita H, Sanderson CJ and Gleich GJ : Regulatory effects of cytokines on eosinophil degranulation. *J Immunol* (1990) **144**, 642—646.
 - 42) 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.
 - 43) Walsh GM, Hartnell A, Wardlaw AJ, Kurihara K, Sanderson CJ and 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 2. Migratory responses of eosinophils from asthmatics**

Hisaho TAKAHASHI

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

Eosinophil infiltration in lung tissue is one of the characteristic features of bronchial asthma. Such cell infiltration seems to be induced by the eosinophil chemotactic factor (ECF). PAF and IL-5 are potent chemoattractants and activators for eosinophils. To evaluate the reactivity of eosinophils in asthmatics under various conditions, the migratory function of eosinophils to PAF and IL-5 was investigated by the modified Boyden chamber method. Eosinophils of asthmatics were highly purified using a flow cytometric method previously reported.

The migratory response of the eosinophils of asthmatics was greater than that of healthy subjects. Eosinophils from atopic asthmatics showed a higher response to PAF than those from non-atopic asthmatics. Eosinophils in the attack stage showed a higher response than those in the non-attack stage. Hypodense eosinophils showed an increased migratory response. The migratory response was correlated to the serum concentration of ECP and blood eosinophil count.

These findings suggest that the reactivity of eosinophils is heterogenous and relates to the degree of eosinophilia, and that IL-5 as well as PAF plays an important role in the pathogenesis of bronchial asthma.