

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

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

河 田 一 郎

(平成 2 年 3 月 27 日受稿)

Key words : Bronchial asthma, Eosinophil, Eosinophil chemotactic factor (ECF),
Flow cytometry

緒 言

気管支喘息における特徴的な肺の病理学的所見のひとつに気管支壁および気管支腔内への好酸球浸潤があり、この好酸球浸潤と喘息発作との間には密接な関連が認められている。すなわち、発作中ないし発作後間もない時期の気管支壁には発作寛解期に比べてより高度の好酸球浸潤が認められ¹⁾、また抗原吸入誘発試験 (Bronchial provocation test : BPT) における遅発型気道反応 (Late asthmatic response : LAR) の気道では、即時型気道反応 (Immediate asthmatic response : IAR) に比し著明な組織の好酸球増加が認められる²⁾。かかるアレルギー性炎症反応の場への好酸球の浸潤には種々の好酸球遊走因子 (Eosinophil chemotactic factor : ECF) が関与するという多数の報告³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾があり、BPT により誘発される気道反応においても ECF が関与しているものと推測される。

そこで、気管支喘息における好酸球の集積機序を解明するために、著者は modified Boyden chamber method⁷⁾ を応用して各種気道反応の際の血清中 ECF 活性の変化を、好中球遊走因子 (Neutrophil chemotactic factor : NCF) 活性の変化とともに経時的に測定した。なお、ECF 活性の測定には従来から比重遠沈法⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾によ

り分離された好酸球が用いられてきたが、より正常な好酸球機能を反映すると考えられる健康人の好酸球を用いることが良策と考え、今回は好酸球顆粒の自家蛍光現象を利用する Flow cytometry (FCM) 法を応用して高純度の好酸球を分離し¹²⁾ ECF 活性測定に供することを試み、さらにかかる方法で得られる好酸球の各種遊走物質に対する遊走能についての基礎的検討も同時に行なったので、その結果についても報告する。

対 象

FCM により分離される好酸球の遊走能の検討には、岡山大学第 2 内科外来通院中及び入院中の好酸球増多症 4 例 (男 3 例, 女 1 例, 21~70 歳, うち気管支喘息患者 2 例, 肺癌 1 例, アトピー性皮膚炎 1 例) および好酸球増多のない健康人 1 例を対象に選び、また BPT における ECF 活性の検討には、気管支喘息患者 4 例 (男 4 例, 33~45 歳) を選んだ。

方 法

1) 末梢血好酸球の分離 :

まずヘパリン加末梢血 5 ml に 6% デキストラン 1 ml を加えて室温で 30 分間静置することにより buffy coat を得、混入赤血球を除くために

hypotonic shock 法を用いた。すなわち Phosphate buffer saline (PBS) 10mlを加えて4℃, 250gで5分間洗浄し、その沈渣に蒸留水1mlを加えて30秒間ピペティングする事により溶血させた後、1.8%生理食塩水1mlを加えて等張に戻した。さらに、PBSを加えて遠沈した細胞層をPBS 2mlに浮遊し、FCM (FACS-tar: Becton-Dickinson)にて好酸球の分離を行なった。好酸球はサイトグラム上で多核白血球群のなかの蛍光強度の強い部分に存在するため¹²⁾、その部分を分取するように機械を設定した。このようにして得られた好酸球をPBSで洗浄したのちに、Hanks' balanced salt solution (HBSS: GIBCO)で 2×10^4 個/100 μ lに再調整し、ECF活性の検討に用いた。なお、trypan blue染色にて細胞のviabilityを、また純度については、好塩基球・好酸球同時直接算定用染色液で染色して好酸球比率を算出した。

2) 末梢血好中球の分離:

前述の好酸球分離と同様の手順で、末梢血からbuffy coatを分離し、3mlのHistopaque 1077 (GIBCO)に重層して室温、450gで30分間遠沈したのち、混入する赤血球を前述のhypotonic shock法にて除去し、HBSSで 2×10^4 個/100 μ lに再調整してNCF活性測定に用いた。

3) ECF活性、NCF活性の測定法:

Multiwell microchemotaxis chamber (Neuroprobe)と、孔径5 μ mのpolycarbonate filter (Nucleopore)を用いたmodified Boyden chamber methodにてECF活性、NCF活性を測定した。chamber下室にはplatelet activating factor (PAF: Sigma)や、血清をHBSSで20%に希釈したものを入れてchamber上室との間を仕切るようにfilterをのせた。chamber上室には同一健常人より分離しHBSSで調整した 2×10^4 個の好酸球あるいは好中球を入れて、37℃のCO₂インキュベーター内で30分間反応させたのち、filterを取り出してメタノールで5秒間固定し、2分間eosin染色(エオジノステイン: 鳥居薬品)を行なった。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10視野鏡検し、filterの下室側まで遊走した細

胞数を無作為に算定して各活性とした。なおnegative controlとしてはHBSSのみを下室に入れたものを用いた。以上の検討はすべてduplicateで行なった。

4) BPTおよび採血:

BPTは、日本アレルギー学会の規定する「気管支喘息における吸入試験の標準化案」に基づいて行なった。なおカンジダ抗原は、カンジダ凍結乾燥末(鳥居薬品)を生理食塩水で溶解し、希釈したものを用いた。また、抗原吸入により誘発される気道反応の判定は、mini-Wright peak flow meter (英国クレメント・クライン)を用い、Peak expiratory flow rate (PEFR)を測定して抗原吸入前の20%以上の低下を陽性とした。なお、吸入直後から1時間以内に誘発される気道反応をIARとし、吸入後3時間から12時間以内の気道反応をLARとした。採血は、抗原吸入前、IAR出現時あるいは吸入後30分、3時間、LAR出現時あるいは6時間、12時間、24時間と経時的に行い、血清を分離してECF活性、NCF活性の測定まで-80℃で凍結保存した。

成 績

1) FCMによる好酸球の分離:

FCMにより分離される好酸球のviabilityは90%以上、回収率は30~40%、純度は90~96%であり、混入する細胞の大部分は好中球であった。得られた好酸球は、May-Giemsa染色標本上、形態の変化、胞体の膨化、脱顆粒など細胞の活性化を示唆する所見は認められなかった。

2) ECF活性測定の基礎的検討:

ECF活性測定について、至適反応時間と至適好酸球数について検討した。まずchamber上室に 2×10^4 個の好酸球を入れて2枚のfilterで隔て、下室に 1×10^{-7} Mの濃度に調整したPAFを入れて37℃のCO₂ incubator内で15分から90分間反応させた。その後、上のfilterの下室側まで遊走した細胞、すなわち遊走細胞数と、下のfilter上の細胞、すなわち落下細胞数を顕微鏡下に算定した。その結果、遊走細胞数は60分でpeakを示したが、この時間では落下細胞数が増加しており(Fig. 1)、 1×10^{-7} Mの濃度のPAFよりも強いECF活性を持つ物質の測定も

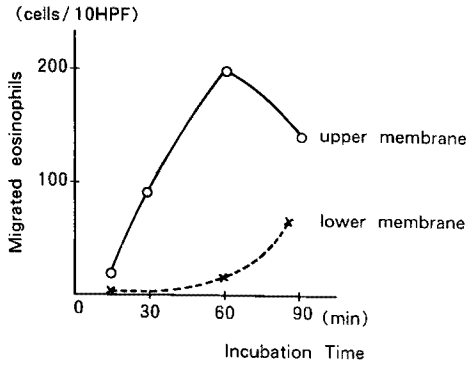


Fig. 1 Time course of eosinophil migration toward PAF. Solid line shows completely migrated eosinophil count of the upper membrane and dotted line shows dropped eosinophil count from the upper membrane to the lower membrane.

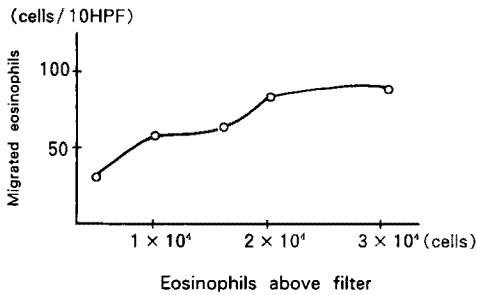


Fig. 2 The relationship between introduced cell count and migrated cell count. Migrated cells reached its plateau when 2×10^4 cells were introduced above the filter.

考慮して、至適反応時間を30分に設定した。次に、下室に $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ の濃度に調整した PAF を入れ、上室に入れる好酸球の数を 1×10^4 個から 3×10^4 個まで変えることにより至適細胞数の検討を行なった。その結果、 2×10^4 個未満では遊走細胞数が急激に減少するため、上室に入れる好酸球数は 2×10^4 個とした。(Fig. 2)

3) 好酸球の遊走活性に関する検討:

得られた好酸球の PAF, Leukotriene B₄ (LTB₄; Sigma) に対する遊走活性を、各々の

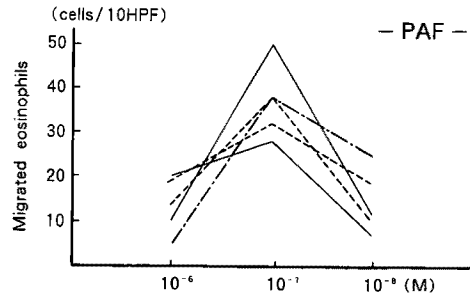
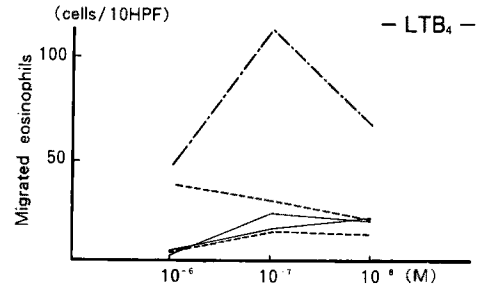


Fig. 3 Chemotactic activity of the FCM sorted eosinophils toward PAF and LTB₄. $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ seems to induce maximal chemotaxis of the eosinophils.

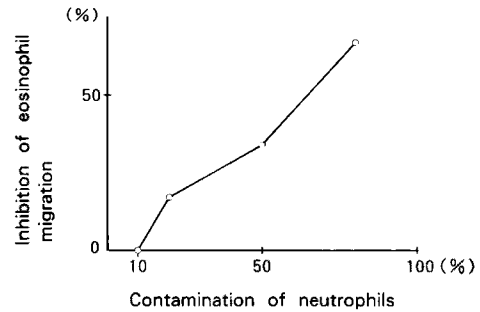


Fig. 4 Effect of contaminating neutrophils to the eosinophil chemotaxis. More than 10% neutrophils seems to suppress eosinophil chemotaxis extensively.

$1 \times 10^{-6} \text{ M}$ から $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 濃度について検討した。その結果、両物質とも $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ で最も強い遊走活性を示す傾向が認められたが、ある程度の個人差が認められた。(Fig. 3) なお好酸球の遊走能は同一人での再現性が高いため、同一の実験系には同一健康人の好酸球を用いた。次

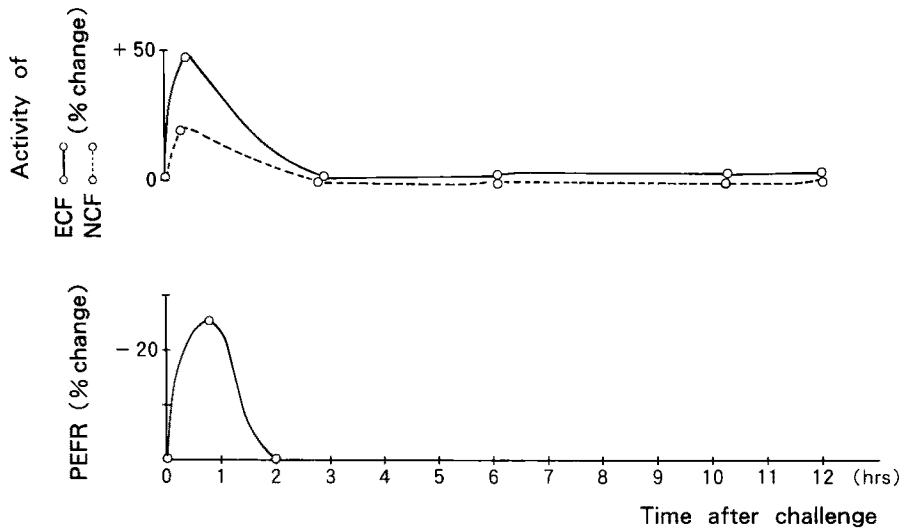


Fig. 5 ECF and NCF activity found in the sera from patient having miscanthus antigen induced IAR. PEFR change from baseline are also indicated.

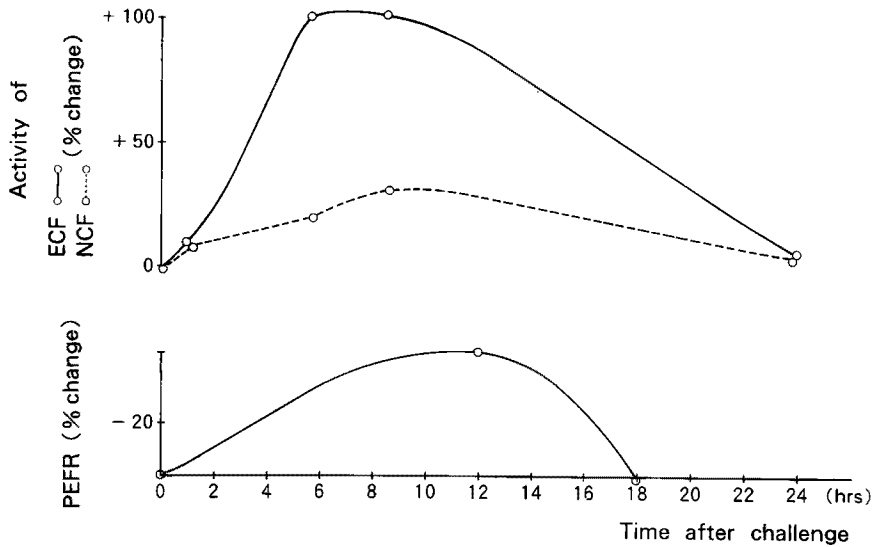


Fig. 6 ECF and NCF activity found in the sera from patient having Candida antigen induced LAR. PEFR change from baseline are also indicated.

に、上室に入れる好酸球分画に混入する好中球の影響を検討する目的で、chamberの上室に入れる好酸球と好中球の比率を変え、PAFに対する遊走活性について検討した。その結果、好中球が約10%以上混入すると、好酸球の遊走が20%以上抑制される傾向が認められた。(Fig. 4)

4) 抗原吸入試験による各種気道反応と血清中 ECF 活性について：

Fig. 5はカモガヤ抗原吸入により IARのみ認められた症例である。IARに一致した ECF 活性、NCF 活性の上昇が認められたが、その後これらの活性は吸入前値に復し、再上昇は認められなかった。

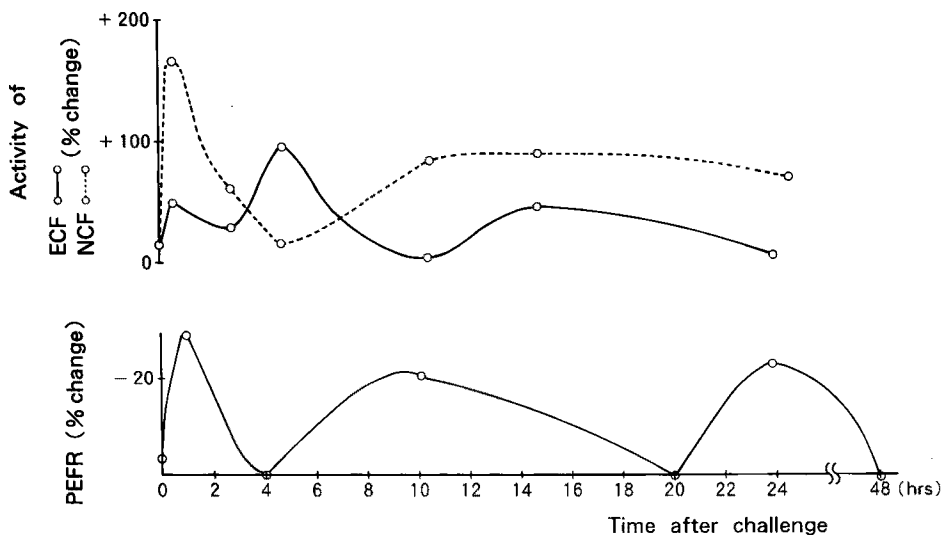


Fig. 7 ECF and NCF activity found in the sera from patient having Candida antigen induced IAR and LAR. PEFR change from baseline are also indicated.

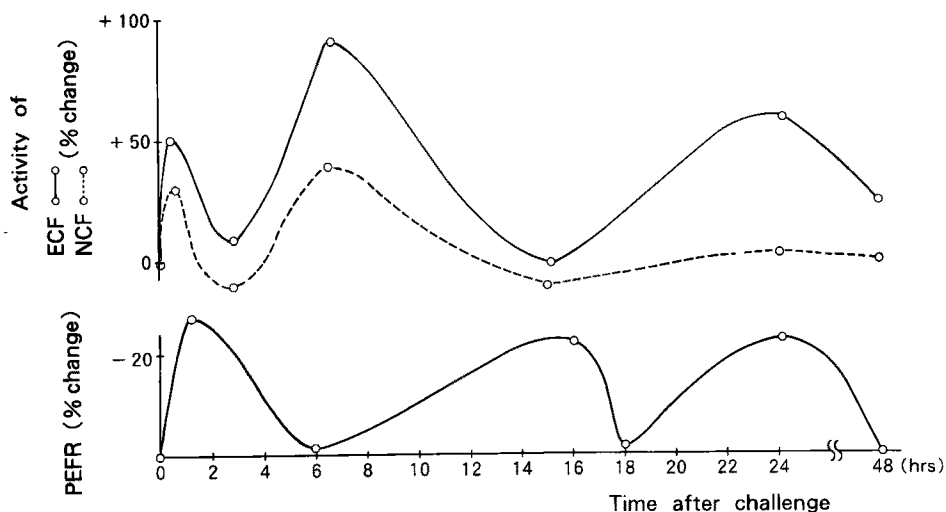


Fig. 8 ECF and NCF activity found in the sera from patient having Candida antigen induced IAR and LAR. PEFR change from baseline are also indicated.

Fig. 6は、カンジダ抗原吸入によりLARのみ認められた症例である。抗原吸入直後のECF活性、NCF活性上昇は認められなかったが、その後これらの活性は徐々に上昇し、それに引き続きLARが認められた。

Fig. 7, 8は、カンジダ抗原吸入によりIAR, LAR, 遅延型気道反応 (Delayed asthmatic response: DeAR)が認められた症例である。まずIARの時期に一致したECF活性、NCF活性の上昇が認められ、その後一旦これらの活性

が低下した後に LAR に先行して再上昇が認められた。なお DeAR 時に上昇の認められる症例もあった。

以上、IAR 発現時には発作と同時に血清中の ECF 活性の上昇が認められたが、LAR 発現時には発作に先行してこれらの活性の上昇が認められた。さらに DeAR 時にこれらの活性が上昇する症例も認められた。すなわち、IAR 発現時の ECF 活性、NCF 活性と、LAR、DeAR 発現時に認められるそれらとは、その由来および気道反応出現に対する役割が異なるものと思われる。

考 案

気管支喘息の発症機序における好酸球の役割は、従来からの炎症修復の機転から、近年ではむしろ炎症惹起の要因としてとらえられつつある¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。さらに、気管支喘息患者の抗原吸入後にみられる気道局所の高度な好酸球の集積²⁾は、喘息発作の病態において重要な要因をなしているものと思われる。そこで著者は、かかる病態の機序を解明する目的で、各種気道反応時の血清中 ECF 活性、NCF 活性について検討した。なお ECF 活性測定に先立ち、高純度の好酸球を回収する目的で自家蛍光を応用した FCM 法¹²⁾により、健康人末梢血より90%以上の純度と viability を持つ好酸球を約30%の回収率で得ることができた。かかる好酸球は、PAF、LTB₄ に対して 1×10^7 M で peak を示す遊走能を持ち、また光顕レベルでの形態変化は認められなかった。さらに抗原吸入後の血清中 ECF 活性を測定した結果、IAR に一致した ECF 活性の上昇と、LAR および DeAR に先行する ECF 活性にの上昇を認め、また同時に測定した血清中 NCF 活性にもほぼ同様の変動が認められた。

ECF の測定法に関する研究は多いが、いずれも好酸球増多症の症例から比重遠沈で分離した好酸球¹⁶⁾とか、比重遠沈に等張でない Metrizamid を用いるために比重が変化した好酸球¹⁷⁾などを用いているために、正常な好酸球機能が反映されていない可能性があった。なお近年、健康人から比重遠沈法を用いて高純度に好酸球を分離したという報告もあるが¹¹⁾、かなりの熟練

を要し、また簡易法では分離の過程で好酸球が活性化されている可能性もある⁸⁾¹⁸⁾ためにそれぞれ問題を残していた。1981年、Weil らにより好酸球の顆粒中に、波長約450nm のレーザー波により励起されて、波長約520nm の自家蛍光を発する物質があり、FCM を応用して好酸球を分離することが報告されたため¹²⁾、著者はこの方法で分離した好酸球を ECF 活性測定に応用した。まず得られた好酸球は、PAF および LTB₄ に対して 1×10^{-8} M 濃度からすでに遊走活性を示し、 1×10^{-7} M の濃度で最高となり 1×10^{-6} M 濃度ではむしろ活性が低下する傾向が認められた。この PAF および LTB₄ の好酸球遊走活性については現在までも同様の結果が多数報告されており¹⁹⁾¹⁹⁾²⁰⁾、今回の検討はこれらの結果を裏付けるものであった。なお、PAF に対する好酸球の遊走能を測定する際に混入する好中球の影響についての検討を行なったところ、好中球が10%以上混入すると好酸球の遊走を強く抑制する現象が認められた。反対に、好中球の遊走能を測定する際にも混入する好酸球により好中球の遊走が抑制されるという報告があるように²¹⁾、これら細胞間には互いに遊走を抑制するような相互作用があるものと考えられた。すなわち、純粋な好酸球の遊走能を見るためには、用いる好酸球の純度は90%以上であることが必要であると考えられた。さらに、好酸球の遊走能の個人差について検討したところ、同じ濃度の PAF および LTB₄ に対しても遊走細胞数が異なる症例も認められ、好酸球表面のレセプターの多寡や親和性に違いがある可能性も想定された¹⁹⁾²⁰⁾。なお、同一の好酸球増多のない健康人より得られた好酸球の遊走活性は採血する時期にかかわらず一定であることが確認された。従って、測定された好酸球遊走活性を比較するためには同一人より分離した好酸球で測定された場合に限られるが、その測定時期については関係なく比較できるようである。以上の基礎的検討により、FCM を用いて末梢血好酸球増多のない健康人より分離した好酸球は、その純度、viability、遊走能に関しても遊走活性測定のための条件を十分満たし、同一人より得られた細胞を用いて測定する ECF は互いに比較しうる最良の方法であ

ると考えられた。

そこで気管支喘息患者において、抗原吸入試験により誘発される気道反応と血清中の ECF 活性の関連性について、カモガヤ抗原を吸入することにより IAR のみの反応を示した 1 症例、カンジダ抗原を吸入することにより LAR のみの反応を示した 1 症例、IAR, LAR の二相性反応を示した 2 症例での検討を行なった。その結果、IAR のみの症例および IAR, LAR の二相性反応を呈した症例のいずれにおいても IAR 時には、血清中 ECF 活性の上昇を認めた。IAR に関与する細胞としては肺の肥満細胞が重要であり、細胞表面の抗原特異的 IgE を介する I 型アレルギー反応が最も強く関与しているが、なかには細胞表面の抗原特異的 STS-IgG を介する反応もあることが想定されている²²⁾。肥満細胞由来のメディエーターのなかで ECF 活性を示すものとしては、histamine²³⁾、hydroxy eicosatetraenoic acids (HETEs)²⁴⁾、ECF-A tetrapeptide⁹⁾、PAF¹⁹⁾などが報告されている。喘息患者の IAR 発現時における末梢血中の ECF 活性としては、肺の肥満細胞由来と考えられる、Mw300~1000と Mw2000~4000 の 2 種類の物質が Metzger により報告され⁹⁾、さらに、抗原刺激により肺胞マクロファージから産生される LTB₄にも ECF 活性が認められている²⁴⁾。また福田⁴⁾は in vitro で、好塩基球由来のメディエーターのなかでは PAF の ECF 活性が最も強く、IAR における I 型アレルギー反応下での ECF 活性として中心的な役割を持つものであろうと想定している。IAR 自体は、肺組織における細胞反応よりもむしろ気管支平滑筋の収縮と粘液の過分泌がその主たる病態であるために、抗原暴露とともに一斉に放出されるメディエーターによる好酸球の局所への遊走は、むしろその後の気道反応に影響を与えるものと考えられる。

LAR に関するアレルギー反応のなかで、III 型アレルギー反応を介するものとして抗原特異的な IgE 抗体、STS-IgG 抗体や沈降抗体²²⁾、抗原特異的 IgG₁抗体²⁵⁾などの関与が推測されている。これらの抗原抗体複合体により、あるいは抗原自体の作用による "alternate" pathway に

より活性化された補体の作用で、気道組織の浮腫や炎症細胞浸潤が引き起こされることにより LAR が出現すると考えられ、このとき産生される C5a⁹⁾、C₅₆₇²⁶⁾には ECF 活性が認められることから、好酸球の組織浸潤には III 型アレルギー反応も関与しているものと想定される。さらに近年では組織における単核球浸潤、肺局所および末梢血リンパ球のカンジダに対するリンパ球幼若化反応の亢進²⁷⁾、IL-2 産生の亢進²⁸⁾などが報告され、また末梢血リンパ球由来と考えられる ECF 活性に関しては著者が第 2 編において報告する予定であるが、気管支喘息患者におけるリンパ球の ECF 産生の亢進が想定されており、好酸球の組織浸潤に IV 型アレルギー反応も関与していることが想定される。すなわち、LAR においては III 型あるいは IV 型アレルギー反応に伴って産生される ECF が LAR に先行して増加することにより特徴的な組織所見である好酸球の浸潤が引き起こされ、さらに気道局所において好酸球が活性化されて、その顆粒中に含まれる組織障害性の Major basic protein (MBP)²⁹⁾、Eosinophil cationic protein (ECP)³⁰⁾、Eosinophil peroxidase (EPO)³¹⁾などが放出されることにより遷延性で難治性の LAR が引き起こされるものと考えられる。このように、抗原吸入により誘発される気道反応には種々のメディエーターが関与しているが、今回著者の測定した末梢血中の ECF 活性がどのメディエーターであるかについてはまだ十分な検討が行なわれていない。PAF に関してはその代謝速度の速さから、また LTB₄に関してはきわめて酸化されやすいことから、採血及び血清保存の時点での活性の低下が免れていないために、実際の血清中 ECF 活性とは多少異なる可能性はある。おそらくは吸入された抗原が肺局所のマクロファージ、肥満細胞・好塩基球系、リンパ球を刺激した結果放出される種々のメディエーターの総和として捉えられているものと推測されるが、その詳細については今後さらに検討が必要である。

結 語

気管支喘息患者において抗原吸入により誘発

される各種気道反応の機序を解明する目的で、血清中の ECF 活性, NCF 活性について検討を加えた。なお好酸球遊走活性の測定に必要な好酸球を FCM にて分離し、基礎的検討もあわせて行ない、以下の成績を得た。

(1) FCM 法により、約30~40%の回収率で90%以上の純度と viability を持つ好酸球が分離された。かかる好酸球の PAF, LTB₄ に対する遊走能は、いずれも 1×10^{-7} M で peak を示した。なお、同一人での好酸球の遊走能の再現性は高かったが、個人差が認められた。

(2) 90%以下の純度の好酸球では、混入する好中球により ECF 活性が20%以上抑制された。

(3) BPT により惹起される IAR 時には、気道反応に平行する血清中 ECF 活性の上昇が認められたが、この活性は IAR 消失とともに短時間のうちに低下し、その後再上昇は認められな

かった。NCF 活性も同様な変動を示した。

(4) LAR 時には、気道反応に先行して血清中 ECF 活性, NCF 活性が上昇した。さらに DeAR に平行して ECF 活性, NCF 活性が上昇する症例も認められた。

以上の結果より、各気道反応と ECF 活性の関係は、IAR では気道反応に平行して肺局所の細胞から産生されるのに対し、LAR, DeAR では、いずれかの細胞から ECF 活性, NCF 活性が先立って産生される事とその発症要因に関わっているものと推測された。

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いたします。

(本論文の要旨は第39回アレルギー学会総会にて発表した。)

文 献

- 1) 夏井坂敏, 岡本賢三, 小場弘之, 田垣 茂, 菅原好孝, 鈴木 明, 神谷美保: 気管支喘息の内視鏡学的及び組織学的検討—発作の程度との関連性について—. 気管支学 (1981) **3**, 407—411.
- 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** (2), 67—74.
- 3) Kay AB, Stechschulte DJ and Austen KF: An eosinophil leukocyte chemotactic factor of anaphylaxis. *J Exp Med* (1971) **133**, 602—619.
- 4) 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記録集 (1987), 59—72.
- 5) 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.
- 6) Hirashima M, Tashiro K, Hirotsu Y and Hayashi H: The mediation of tissue eosinophilia in hypersensitivity reactions. V. Comparative study of tissue eosinophilia in the skin lesions of local and systemic passive cutaneous anaphylactic reactions. *Immunology* (1983) **50**, 85—91.
- 7) Boyden S: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* (1962) **115**, 453—466.
- 8) Yazdanbakhsh M, Eckmann CM, Koenderman L, Verhoeven AJ and Roos D: Eosinophils do respond to fMLP. *Blood* (1987) **70**, 379—383.
- 9) Metzger WJ, Richerson HB and Wasserman SI: Generation and partial characterization of eosinophil chemotactic activity and neutrophil chemotactic activity during early and late-phase asthmatic response. *J Allergy Clin Immunol* (1986) **78**, 282—290.
- 10) 福田 健: 好酸球の heterogeneity. アレルギーの臨 (1986) **6**, 43—50.

- 11) Tamura N, Agrawal DK, Sulian FA and Townley RG : Effects of platelet activating factor on the chemotaxis of normodense eosinophils from normal subjects. *Biochem Biophys Res Commun* (1987) **142**, 638—644.
- 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) Frigas E, Loegering DA, Solley Go, Farrow GM and Gleich GJ : Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clin Proc* (1981) **56**, 345—353.
- 14) 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.
- 15) Dor PJ, Ackerman SJ and Gleich GJ : Charcot-Leyden Crystal protein and eosinophil granule major basic protein in sputum of patients with respiratory diseases. *Am Rev Resp Dis* (1984) **130**, 1072—1077.
- 16) 福田 健, 沼尾利郎, 山田吾郎, 牧野莊平 : PAF による好酸球遊走の免疫薬理学的解析. 第 4 回免疫薬理シンポジウム記録集 (1986), 43—53.
- 17) Vadas MA, David JR, Butterworth A, Pisani NT and Siongok TA : A new method for the purification of human eosinophils and neutrophils, and a comparison of the ability of these cells to damage *shistosomula* of *shistosoma mansoni*. *J Immunol* (1979) **122**, 1228—1236.
- 18) Roberts RL and Gallin JI : Rapid method for isolation of normal human peripheral blood eosinophils on discontinuous percoll gradients and comparison with neutrophils. *Blood* (1985) **65**, 433—440.
- 19) 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.
- 20) 早川哲夫, 斎藤明美, 石崎美智子, 斎藤博士, 三田晴久, 油井泰雄, 信太郎夫 : PAF の好酸球活性化について. 第 5 回免疫薬理シンポジウム記録集 (1987), 75—83.
- 21) Kay AB, Shin HS and Austen KF : Selective attraction of eosinophils and synergism between eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A) and a fragment cleaved from the fifth component of complement (C_5a). *Immunology* (1973) **24**, 969—976.
- 22) Pepys J and Hutchcroft BJ : Bronchial provocation tests in etiologic diagnosis and analysis of asthma. *Am Rev Respir Dis* (1975) **112**, 829—859.
- 23) 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.
- 24) Gosset P, Tonnel AB, Joseph M, Prin L, Mallart A, Charon J and Capron A : Secretion of a chemotactic factor for neutrophils and eosinophils by alveolar macrophages from asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* (1984) **74**, 827—834.
- 25) 小栗栖和郎, 難波康夫, 猪木篤弘, 高田 稔, 磯島浩二, 難波一弘, 宗田 良, 多田慎也, 高橋 清, 木村郁郎 : 気管支喘息患者における抗原特異的 IgG サブクラスに関する検討. *胸部疾会誌* (1989) **27**, 393.
- 26) 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.
- 27) 木村郁郎, 武田 昌, 多田慎也, 谷崎勝朗, 高橋 清, 塩田雄太郎, 佐藤 恭, 田村尚彦 : 気管支喘息患者の BAL 液中及び末梢血リンパ球の吸入抗原に対する反応性の検討. *アレルギー* (1984) **33**, 812.

- 28) 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)カンジダ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.
- 29) 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.
- 30) Ding-E Young J, Peterson CGB, Venge P and Cohn ZA : Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature* (1986) **32**, 631—616.
- 31) 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.

**Studies on the role of eosinophils
in the pathogenesis of bronchial asthma
Part 1. Evaluation of serum eosinophil chemotactic factor
in asthmatic responses
using eosinophils purified by flow cytometry**

Ichiro KAWADA

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

The serum eosinophil chemotactic factor (ECF) was evaluated by use of the modified Boyden chamber method. Flow cytometry (FCM) was applied to obtain highly purified eosinophils from peripheral blood of normal subjects. The maximal chemotaxis of these eosinophils was shown at 1×10^{-7} M of platelet activating factor and leukotriene B₄. In bronchial asthmatics with immediate asthmatic response (IAR), serum ECF activity showed only an early rise, and that in asthmatics with late asthmatic response (LAR) showed a precedent rise before bronchial reaction. Asthmatic patients with both IAR and LAR showed biphasic elevation in ECF activity. These findings suggest that the function of ECF in the pathogenesis of IAR is different from that in LAR. The eosinophils purified by FCM were very useful for measurement of ECF by the Boyden chamber method.