

気管支喘息患者における末梢血白血球の Leukotriene C₄ およびB₄ 産生遊離能の検討

吉川 佐和子

信州大学医学部第1内科学教室

(主任: 関口 守衛教授)

Releasability of Leukotriene C₄ and B₄ from Peripheral Leukocytes in Patients with Bronchial Asthma

Sawako YOSHIKAWA

Department of Internal Medicine, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Morie SEKIGUCHI)

The releasability of LTC₄ and LTB₄ from mononuclear leukocytes (M), neutrophils (N), and eosinophils (E) was studied in 46 patients with bronchial asthma, of whom 33 were non-steroid-treated and 13 steroid-treated, and in 17 healthy subjects as controls. M, N, and E were isolated from peripheral blood by density gradient centrifugation and incubated with 1 μg/ml of calcium ionophore A23187 for 20 min. The releasability of LTC₄ in asthmatics was significantly higher than that in controls (M: 7.1±4.4 vs. 4.4±2.5 ng/10⁶ cells; p<0.01, N: 3.5±2.4 vs. 2.3±1.1 ng/10⁶ cells; p<0.05, and E: 54.5±50.4 vs. 25.0±16.9 ng/10⁶ cells; p<0.01, respectively, mean±SD), although no significant difference was observed between steroid-treated asthmatics and controls. Moreover, the releasability of LTC₄ in patients with an attack was significantly higher than that in patients with no symptoms, except for M in steroid-treated asthmatics. On the other hand, the releasability of LTB₄ showed no significant difference between asthmatics and controls. These results suggest that the releasability of LTC₄ from peripheral leukocytes is related to the asthma attack and plays an important role in the pathophysiology of bronchial asthma. *Shinshu Med. J.*, 37 : 583-595, 1989

(Received for publication July 7, 1989)

Key words : bronchial asthma, leukotriene C₄ (LTC₄), leukotriene B₄ (LTB₄), leukocyte, releasability

気管支喘息, ロイコトリエン C₄, ロイコトリエン B₄, 白血球, 遊離能

I 緒 言

気管支喘息の病因は、感作アレルゲンの吸入曝露によるI型アレルギー反応が要因と考えられているが、抗原を明らかにし得ないもの、感染を発症要因とするもの、さらに心因または自律神経の異常の関与が大きいと考えられるものなど多様であり、まだ、十分に解明されていない。しかしながら、その共通する病態の

特徴は、気管支平滑筋の可逆性収縮、気道における粘液産生の亢進、気道粘膜の浮腫、気道過敏性ならびに反応性の亢進などであると考えられている。そしてこれらの病態に対して肺の肥満細胞、マクロファージおよび白血球等から遊離される種々の chemical mediator が重要な役割を果たしていると考えられている¹⁾。

これら chemical mediator のうち最近特に注目されているのは、アラキドン酸の5-lipoxygenase 代謝

産物である leukotriene (LT) である。このなかで LTC₄ は、その代謝産物である LTD₄, LTE₄ とともに slow-reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) を構成し、気管支喘息患者の気管支組織片よりアレルギー刺激によって遊離されること²⁾、ヒスタミンの 100~1,000 倍強い平滑筋収縮活性を有し³⁾⁴⁾、さらに気管支粘液分泌亢進作用を有すること⁵⁾⁶⁾ など、気管支喘息の病態と深い関わりを持っていると推定されている⁷⁾⁸⁾。一方、同じく 5-lipoxygenase の代謝産物である LTB₄ は、強い白血球遊走活性を有し⁹⁾、炎症惹起物質として注目されており、これによって気道の炎症が惹起され、さらに気管支喘息の気道過敏性亢進にも強く関与していることが示唆されている¹⁰⁾¹¹⁾。

この LT は種々の刺激により肺の肥満細胞¹²⁾、肺胞マクロファージ¹³⁾ および気道上皮細胞¹⁴⁾ などから産生されることが報告されている。一方、気管支喘息の発作時には、気管支壁や気道内腔に好酸球、好中球などの白血球の浸潤が認められ^{15)~17)}、また、動物の喘息モデルにおいて白血球、特に好酸球が LT 等の chemical mediator を介して実験喘息の病態に関与していることが示唆されていること¹⁸⁾ から、白血球由来の LT が喘息の病態に関わりを持っていることが推定される。

また、気管支喘息患者では気道の過敏性ならびに反応性の亢進が存在することは周知の事実であるが、末梢血白血球の細胞レベルにおいても chemical mediator 遊離能が亢進していることが示唆されている¹⁹⁾²⁰⁾。

そこで今回、著者は気管支喘息患者の末梢血白血球を比重遠心法により単核球、好中球および好酸球に分離し、それぞれの細胞分画について LTC₄ および LTB₄ 産生遊離能の亢進の有無を検討し、さらにそれらと気管支喘息の病態との関連についても検討したので報告する。

II 対 象

信州大学附属病院第 1 内科にて加療中の気管支喘息患者 46 名 (男 26 名, 女 20 名, 年齢 16~62 歳, 平均 45.2 ± 13.3 歳) を対象にした。気管支喘息の診断は、病歴、理学的所見、胸部 X 線写真、末梢血液像、血清 IgE radioimmunosorbent test (RIST) および radioallergosorbent test (RAST)、呼吸機能検査、皮膚テストなどを総合して行い、アトピー型は病歴、皮膚テスト、RAST などによってアレルギーを明らかにし得たものとし、それ以外の患者を非アトピー型とした。

気管支喘息患者 46 名の内訳を Table 1 に示す。治療として副腎皮質ステロイドホルモン (以下、ステロイドと略す) 投与を受けたことがないか、あるいは、受けたことがあってもその時点より 1 カ月以上経過しており、採血時にステロイドの影響がないと思われる患者を非ステロイド投与群 (n=33) とし、定期的にステロイドの投与を受けている、いわゆるステロイド依存性の患者をステロイド投与群 (n=13) とした。ステロイド投与群のうち、prednisolone 10~15mg の連日経口投与例 2 名を除く他の全例は、triamcinolone acetonide 40mg の筋肉内注射を 1 カ月に 1 回受けていた。なお、非ステロイド投与群ではアトピー型 13 名、非アトピー型は 20 名、ステロイド投与群はすべて非アトピー型であった。非ステロイド投与群を日本アレルギー学会の重症度分類別にみると重症 6 名、中等症 13 名、軽症 14 名であった。ステロイド投与群は重症に分類されたが、ステロイドで比較的良好にコントロールされており、時に小発作がみられるのみであった。発作中に採血した例のうち非ステロイド投与群は 15 名でその程度は、中発作が 6 名、小発作が 9 名であり、一方ステロイド投与群は 7 名で、すべて小発作であった。

なお、対照群は、既往歴にアレルギー疾患のない健

Table 1 Characteristics of study subjects

Group	Number (Male, Female)	Age (yr.)	Attack(+)
Controls	17 (12, 5)	41.3 ± 16.4	—
Asthmatics	46 (26, 20)	45.2 ± 13.3	22
Non-steroid-treated	33 (18, 15)	42.8 ± 14.1	15
Atopic	13 (8, 5)	30.7 ± 10.7	5
Non-atopic	20 (10, 10)	50.7 ± 10.0	10
Steroid-treated (Non-atopic)	13 (8, 5)	51.2 ± 8.7	7

常人17名、(男12名,女5名,年齢26~64歳,平均41.3±16.4歳)である。

Ⅲ 方 法

服薬中の症例は、全ての薬剤を12時間以上にわたって中断後、午前9時から11時の間に肘静脈より、対照群は90~100ml,気管支喘息群は30~40mlヘパリン加採血した。なお、投薬中止後に発作が現れた場合には、吸入薬のみの使用例に限って検討した。

A 単核球,好中球および好酸球の分離

採取した血液は200×g,室温で10分間遠心して、血小板を除去後、1/5容量の6%デキストランを加えて混和、室温で30~40分間静置し、その上層の白血球層を採取し、得られた白血球層をFicoll-Paque(比重1.077g/ml:Pharmacia, Piscataway, NJ, USA)に重層し、400×g,20分間遠心して、単核球分画(M)と多形核白血球分画に分離、さらに多形核白血球分画を洗浄後、Percoll(Pharmacia, Uppsala, Sweden)を用いた不連続比重勾配遠心法により好中球と好酸球とに分離した。すなわち、10倍濃度のHanks' balanced salt solution(HBSS)により等浸透圧に調整したPercoll液を1倍濃度のHBSSにて希釈して作成した不連続比重勾配(比重1.080, 1.085, 1.090, 1.095, 1.100, 1.105g/ml)上に重層し、1,600×g,30分間室温で遠心後、比重1.080と1.085との間,および1.100と1.105との間に分離された細胞層を分取し、それぞれを好中球分画(N)および好酸球分画(E)とした。好酸球分画に混在する赤血球は、低張食塩水を用いて溶血除去した。得られた各分画の細胞はDulbecco's phosphate buffered salineで 1×10^6 cells/mlの浮遊液に調整した。なお、trypan blue dye exclusion testによる各分画の細胞のviabilityはいずれも95%以上であった。

B calcium ionophore による細胞刺激

調整した細胞浮遊液は37°Cにて1分間preincubateした後、calcium ionophore A23187(CaI: Calbiochem-Behring, San Diego, CA, USA)を加えて37°Cでincubateした。その後、LTC₄測定用検体に対しては氷冷したLTC₄ radioimmunoassay(RIA) buffer(10mM phosphate buffer中に0.9% NaCl, 0.1% gelatin, 0.001M EDTA, 0.1% NaN₃を含む, pH 7.4)を、また、LTB₄測定用検体に対してはLTB₄ RIA buffer(10mM Tris/HCl buffer中に0.9% NaCl, 0.1% gelatin, 0.1% NaN₃を含む,

pH 8.6)をそれぞれ加えて反応を停止させ、4°C, 2,000×g 5分間遠心し、上清を測定時まで-80°Cで保存した。また、一部の検体は、SEP-PAK C₁₈ カラム(Waters Associates, Milford, MA, USA)および高速液体クロマトグラフィー(high performance liquid chromatography, HPLC)による抽出精製後に測定をするため、そのまま氷冷して反応を停止させ、直ちに遠心し、その上清に4倍量の100%エタノールを加えた。

C LTC₄ および LTB₄ の抽出, 分離

100%エタノールを加えた検体は5,500×g 10分間遠心し、その上清を栗本と桜井²⁾の方法に準じてSEP-PAK C₁₈ カラムを通してLTを抽出後、HPLCに注入し分離を行った。装置はLC-6Aシステム(島津製作所, 京都), カラムはShim pack CLC-ODSカラム(島津), 移動相はアセトニトリル, メタノール, 水および酢酸(volume比300:100:300:0.6, pH 5.6)の混合液を用いた。LTC₄はUV 280 nm, またLTB₄はUV 270 nmでそれぞれ検出し、合成LTC₄およびLTB₄のretention timeと同一の溶出液分画を採取して減圧乾固した後、RIAによる測定時まで-80°Cで保存した。

D LTC₄ および LTB₄ の測定

LTの測定は、[³H] LTC₄ および LTB₄ RIA kit(New England Nuclear, Boston, MA, USA)を用いる、competitive binding法によった。

E 統計学的処理

測定値はmean±SDで示した。測定方法の検討は一次回帰分析を、各群間の比較はWilcoxonの順位和検定を用いた。また、末梢血好酸球数とE分画のLTC₄遊離能との相関はSpearmanの方法を用いた。p<0.05を有意とした。

Ⅳ 結 果

A LT 遊離におよぼす CaI 濃度および incubation 時間の影響

細胞刺激の至適条件を求めするために、まずCaI濃度およびincubation時間がLT遊離におよぼす影響について検討した。incubation時間が20分間における、CaI濃度の影響についての検討では、M, NおよびEの各分画のすべてがCaI濃度1μg/mlで最も高いLT遊離を示した(Fig. 1)。また、CaI濃度1μg/mlにおけるLT遊離の経時的変化は、M, NおよびE分画とも10~20分でplateauに達した(Fig. 2)。以上の結

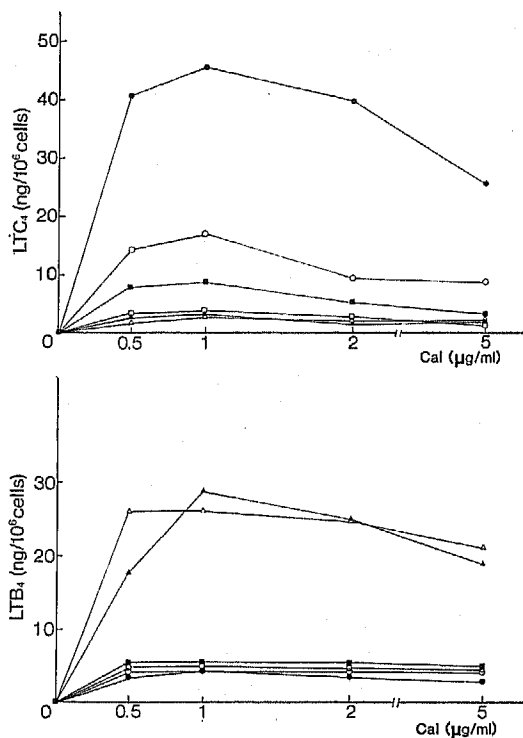


Fig. 1 The effect of CaI concentration on the release of LTC₄ (upper) and LTB₄ (lower) from mononuclear leukocyte (squares), neutrophil (triangles) and eosinophil (circles) fractions (10⁶ cells) in 3 controls (open symbols) and 3 asthmatics (closed symbols). The cells were stimulated with various concentrations of CaI for 20 min at 37° C. Each point represents the mean value.

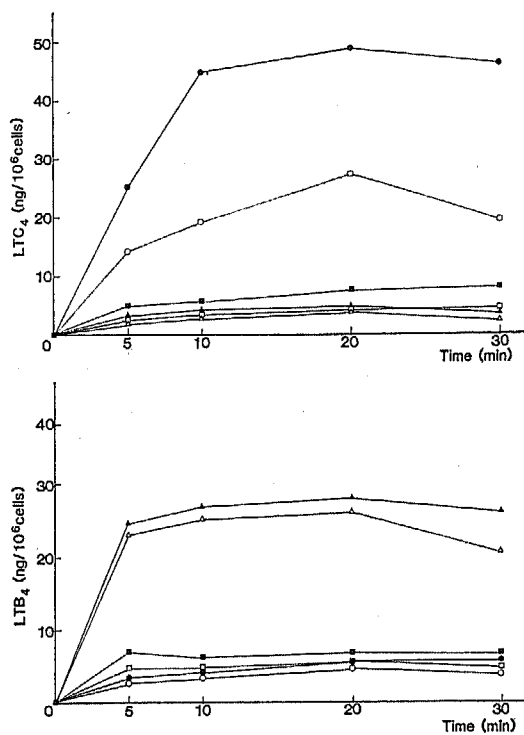


Fig. 2 Time course of the release of LTC₄ and LTB₄ from mononuclear leukocyte, neutrophil and eosinophil fractions (10⁶ cells) in 3 controls and 3 asthmatics after stimulation with 1 μg/ml of CaI. Symbols as in Fig. 1.

果, 細胞刺激条件を CaI 濃度 1μg/ml, incubation 時間20分として, 以後の検討を行った。なお, LTC₄ および LTB₄ の両者ともに CaI 非添加時には spontaneous release は認められなかった。

B direct RIA 法による LT の測定値と抽出分離後の RIA による測定値の関係

Fig. 3 に, 同一検体の LT について SEP-PAK C₁₈ カラムおよび HPLC を用いて抽出分離後に RIA で測定した値と抽出分離の過程を経ずに直接 RIA で測定した値 (direct RIA 法) との相関を示した。なお, ³H ラベル LT を用いての, SEP-PAK C₁₈ カラムおよび HPLC で処理した後に得られた回収率は LTC₄ が 49%, LTB₄ が 69% であり, 抽出分離後の値は回収率で補正したものを示した。

LTC₄ は抽出分離後の値の方が direct RIA 法のそ

れに比し若干低値を示したが, 両者間に有意の相関 ($r=0.92, p<0.001$) が認められた。LTB₄ についても同様に, 有意の相関 ($r=0.95, p<0.001$) が認められ, 両者の値はほぼ一致した。以上の結果より白血球浮遊液上清中の LT は, 抽出分離の過程を経ずに direct RIA 法によっても, 夾雑物の影響はほとんどないことが示唆されたので, 以下の測定は direct RIA 法で行った。

C 各細胞分画の purity の検討

対照群および気管支喘息群から得た M, N および E の各細胞分画の purity を Table 2 に示す。M の純度は対照群 99.8±0.5%, 気管支喘息群 98.9±1.5%, N のそれは対照群 96.9±1.9%, 気管支喘息群 97.0±1.7%, E では対照群 92.3±2.4%, 気管支喘息群 93.0±3.0% であって, 両群間に差はなかった。また気管支喘息の非ステロイド投与群とステロイド投与群との間にも差はなかった。さらに, 発作群と非発作群, アトピー

気管支喘息の末梢白血球の LT 遊離能

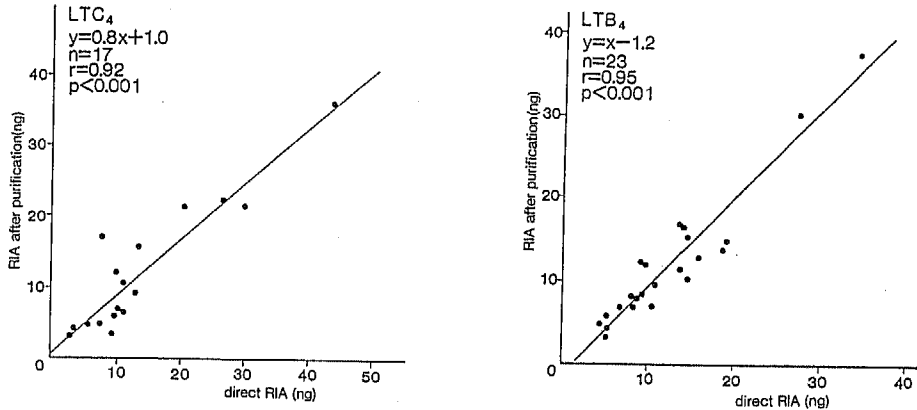


Fig. 3 Correlation between the levels of LTC₄ (Left) and LTB₄ (Right) measured by direct RIA and those measured by RIA after purification through SEP-PAK C₁₈ column and HPLC.

Table 2 Purities of mononuclear leukocyte, neutrophil and eosinophil fractions

Group	Purity(%)		
	Mononuclear leukocyte	Neutrophil	Eosinophil
Controls (n=17)	99.8±0.5	96.9±1.9	92.3±2.4
Asthmatics (n=46)	98.9±1.5	97.0±1.7	93.0±3.0
Non-steroid-treated (n=33)	98.9±1.6	97.0±1.7	93.1±3.1
Steroid-treated (n=13)	98.9±1.5	97.0±1.8	92.7±1.9
Non-steroid-treated with an attack (n=15)	99.5±0.6	96.8±1.5	93.4±3.1
Non-steroid-treated with no symptoms (n=18)	98.5±1.9	97.0±1.9	92.9±3.0
Steroid-treated with an attack (n=6)	99.0±1.5	96.4±1.3	91.3±0.5
Steroid-treated with no symptoms (n=7)	98.6±1.6	97.7±2.1	94.5±4.0
Non-steroid-treated and atopic (n=13)	98.8±2.0	97.0±1.8	93.3±3.4
Non-steroid-treated and nonatopic (n=20)	99.0±1.4	96.9±1.8	93.0±2.9

Values are means±SD.

型と非アトピー型に分けての比較検討でもそれぞれの群間に差はなく、対照群との間にも差を認めなかった。

D 対照群および気管支喘息群における LTC₄ および LTB₄ 遊離能の比較

Table 3 に示すごとく、対照群、気管支喘息群ともに、LTC₄ 遊離能はM、NおよびEの各細胞分画のうちE分画において、また LTB₄ 遊離能はN分画におい

て高値を示した。LTC₄ 遊離能についての対照群と気管支喘息群との比較では、M、NおよびE分画すべてが気管支喘息群で有意に高い遊離能を示した (p<0.01, p<0.05および p<0.01)。一方、LTB₄ 遊離能は両群間に有意差を認めなかった。

E 気管支喘息群の LTC₄ および LTB₄ 遊離能におよぼすステロイド投与の影響

Table 3 LTC₄ and LTB₄ release from peripheral leukocytes in controls and asthmatics

LT	Cell fraction	Controls (n=17)	Asthmatics (n=46)
LTC ₄ (ng/10 ⁶ cells)	M	4.4±2.5	7.1±4.4**
	N	2.3±1.1	3.5±2.4*
	E	25.0±16.9	54.5±50.4**
LTB ₄ (ng/10 ⁶ cells)	M	4.4±2.0	5.4±3.1
	N	23.2±6.8	21.7±6.6
	E	4.2±2.3	4.6±2.6

Values are means±SD. *p<0.05, **p<0.01 compared with controls. M=mono-nuclear leukocyte fraction; N=neutrophil fraction; E=eosinophil fraction.

気管支喘息患者を非ステロイド投与群 (n=33) とステロイド投与群 (n=13) に分けて CaI 刺激による LTC₄ 遊離能および LTB₄ 遊離能を比較検討した。Fig. 4 に示すごとく、LTC₄ 遊離能の検討では、非ステロイド投与群は対照群に比し、M、NおよびE分画のいずれも有意に高値を示したが (p<0.01, p<0.05 および p<0.01)、ステロイド投与群は対照群との間に有意差を認めず、また、ステロイド投与群のE分画の LTC₄ 遊離能は、非ステロイド投与群に比し有意に低値を示した (p<0.01)。

次に LTB₄ 遊離能は、Fig. 5 に示すごとく、M、N および E 分画のいずれも各群間に有意差はなかった。

F 気管支喘息発作と LTC₄ および LTB₄ 遊離能との関係

非ステロイド投与群およびステロイド投与群のそれぞれを、喘息発作の有無によって分けて、M、NおよびEの各分画の LTC₄ および LTB₄ 遊離能を検討した。LTC₄ 遊離能は、Fig. 6 に示すごとく非ステロイド投与群では、M、NおよびEの各分画すべてにおいて発作群は非発作群に比し有意に高値を示した (p<0.01, p<0.05 および p<0.01)。ステロイド投与群では、N、E分画で発作群は非発作群に比し有意に高値を示した (p<0.05) が、対照群との間には有意差を認めなかった。

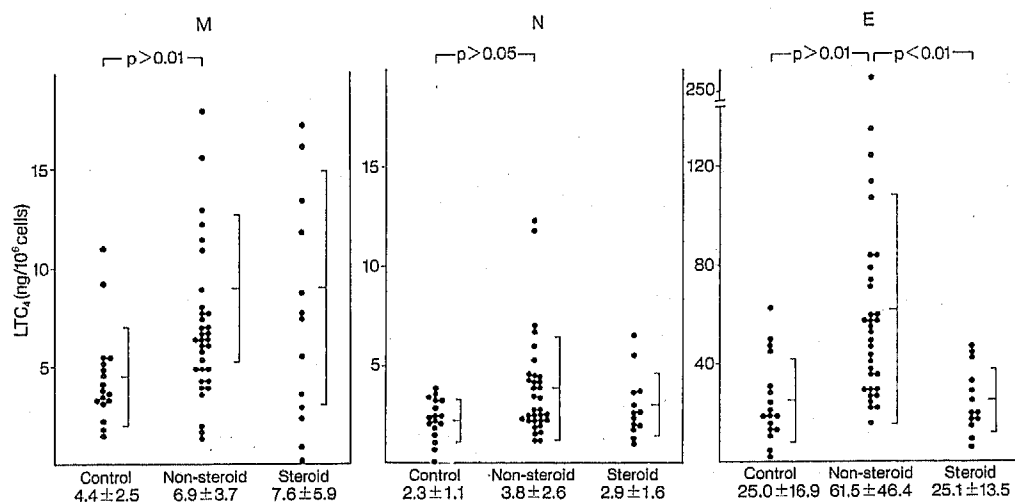


Fig. 4 LTC₄ release (ng/10⁶ cells) from mononuclear leukocyte (M), neutrophil (N) and eosinophil (E) fractions in controls (n=17), non-steroid-treated asthmatics (n=33) and steroid-treated asthmatics (n=13). Values and line bars represent mean±SD.

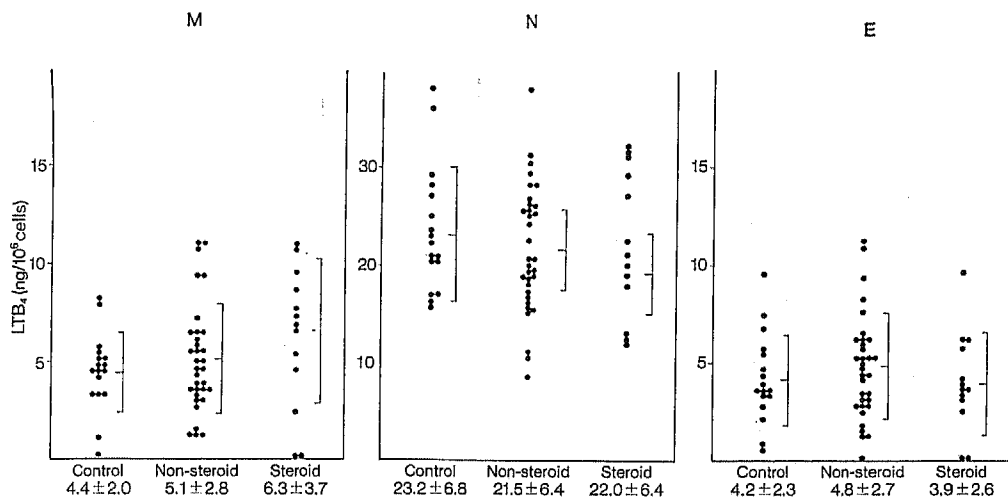


Fig. 5 LTB₄ release (ng/10⁶ cells) from mononuclear leukocyte (M), neutrophil (N) and eosinophil (E) fractions in controls (n=17), non-steroid-treated asthmatics (n=33) and steroid-treated asthmatics (n=13). Values and line bars represent mean ± SD.

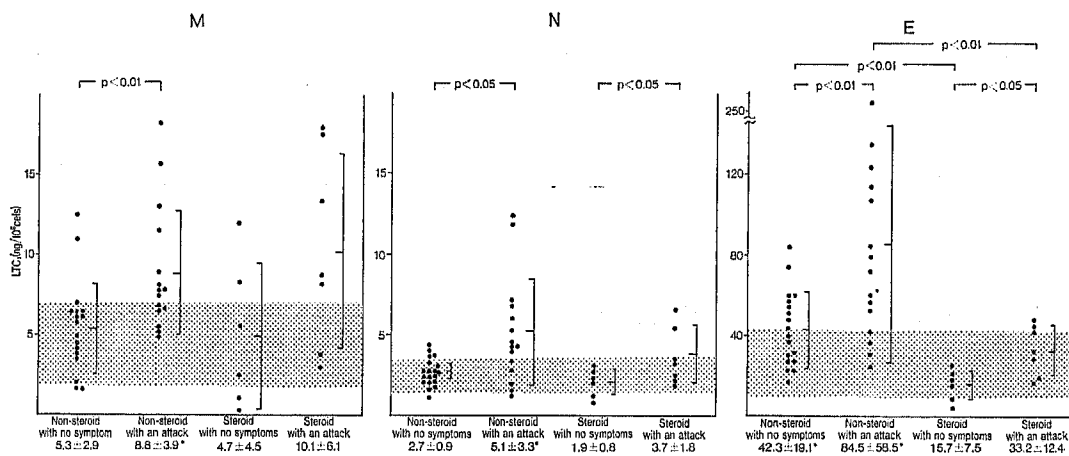


Fig. 6 LTC₄ release (ng/10⁶ cells) from mononuclear leukocyte (M), neutrophil (N) and eosinophil (E) fractions in non-steroid-treated asthmatics with no symptoms (n=18), non-steroid-treated asthmatics with an attack (n=15), steroid-treated asthmatics with no symptoms (n=6) and steroid-treated asthmatics with an attack (n=7). Values and line bars represent mean ± SD. Stippled areas indicate mean ± SD of LTC₄ release in controls. *p < 0.01 compared with controls.

次に LTB₄ 遊離能は、Fig. 7 に示すごとく、M、N および E 分画すべてが 4 群間に有意差なく、対照群との間にもいずれも有意差を認めなかった。

G 発作強度別による LTC₄ 遊離能の検討

非ステロイド投与群中の発作群15例について、その発作強度により小発作群 (n=9) および中発作群 (n

=6) に分けて LTC₄ 遊離能を検討したが、3 分画とも発作強度による LTC₄ 遊離能の相違は認められなかった (Table 4)。

H アトピー型および非アトピー型喘息における LTC₄ および LTB₄ 遊離能

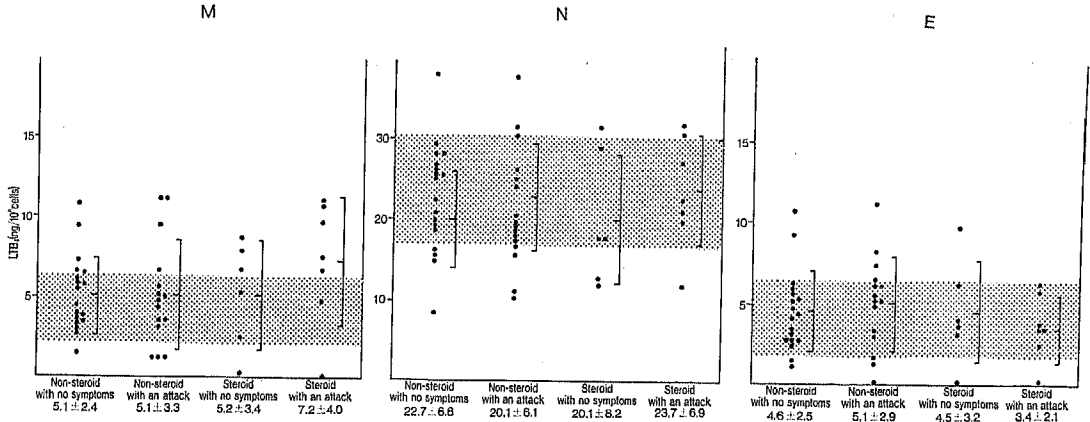


Fig. 7 LTB₄ release (ng/10⁶ cells) from mononuclear leukocyte (M), neutrophil (N) and eosinophil (E) fractions in non-steroid-treated asthmatics with no symptoms (n=18), non-steroid-treated asthmatics with an attack (n=15), steroid-treated asthmatics with no symptoms (n=6) and steroid-treated asthmatics with an attack (n=7). Values and line bars represent mean±SD. Stippled areas indicate mean±SD of LTB₄ release in controls.

Table 4 LTC₄ release from peripheral leukocytes in non-steroid-treated asthmatics with mild and moderate attack

LT	Cell fraction	Mild (n=9)	Moderate (n=6)
LTC ₄ (ng/10 ⁶ cells)	M	8.2±4.3	6.9±1.3
	N	4.9±3.0	5.4±4.0
	E	88.3±74.0	78.7±27.6

Values are means±SD. Abbreviations as Table 3.

Table 5 LTC₄ and LTB₄ release from peripheral leukocytes in atopic and non-atopic asthmatics not treated with steroids

LT	Cell fraction	Atopic (n=13)	Non-atopic (n=20)
LTC ₄ (ng/10 ⁶ cells)	M	7.6±4.1	6.4±3.5
	N	3.6±1.9	3.9±3.0
	E	66.3±37.2	58.3±52.2
LTB ₄ (ng/10 ⁶ cells)	M	6.2±3.2	4.4±2.3
	N	21.4±7.1	21.6±6.1
	E	4.7±2.8	4.9±2.6

Values are means±SD. Abbreviations as Table 3.

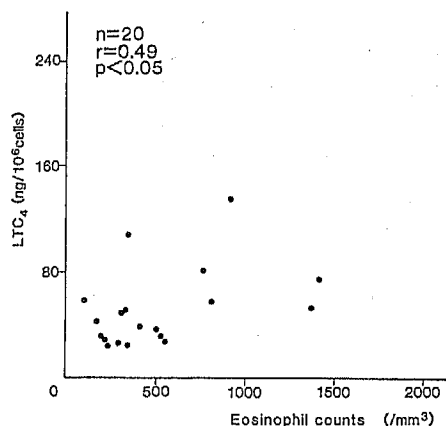


Fig. 8 Correlation between LTC₄ release from eosinophil fraction and eosinophil counts of peripheral blood.

非ステロイド投与群をアトピー型および非アトピー型喘息に分けて、LTC₄ および LTB₄ 遊離能を検討したが、それぞれの間に有意差はなかった (Table 5)。

I E分画の LTC₄ 遊離能と末梢血好酸球数との関係

非ステロイド投与気管支喘息患者20名におけるE分画の LTC₄ 遊離能と末梢血好酸球数との関係はFig. 8のごとく、好酸球数の多いものほど LTC₄ 遊離能が高く、両者の間には有意な相関が認められた ($p < 0.05$)。

V 考 察

末梢白血球から遊離される chemical mediator, 特に LT は気管支喘息の病態に重要な役割を果たしていると考えられているが、まだ十分に解明されていない。そこで著者は、気管支喘息患者46名および対照の健康者17名の末梢白血球を、M、NおよびE分画に分けて、それぞれの LTC₄ および LTB₄ 産生遊離能を非特異的的刺激剤である CaI を用いて測定し、喘息の病態との関連を検討した。その結果、末梢白血球の LTC₄ 遊離能は気管支喘息群では対照群に比しM、NおよびEのすべての細胞分画で有意の亢進を認め、特にE分画で著明であった。また、アトピーおよび非アトピーの病型別にみた LTC₄ 遊離能は3分画の間に有意差はなかったが、しかし、病態との関係において発作群では非発作群に比し有意の高値を示した。ステロイド治療との関係においては、ステロイド投与群では LTC₄ 遊離能の亢進はみられず、対照群との間に差はなかった。一方、LTB₄ 遊離能については気管支

喘息群と対照群との間に各分画すべてにおいて有意差を認めなかった。以上より、末梢血の単核球、好中球および好酸球からの非特異的的刺激に対する LTC₄ 産生遊離能は健康者に比し気管支喘息患者で有意に亢進しており、しかも発作群でより亢進していることが示された。この事実は、臨床的検討であるための制約によって例数が必ずしも十分とは言えないが、気管支喘息の病態解明の上で有意義な所見と考える。

LT などの chemical mediator 遊離能を測定する場合に用いる刺激剤としては、特異抗原、抗 IgG 抗体、抗 IgE 抗体、zymosan および補体などの特異的レセプターを介するもの、ならびに CaI のように細胞内に Ca イオンを流入させることによってレセプターを介さず、非特異的に chemical mediator の産生遊離を惹起させるものがある。成人の気管支喘息の病態は複雑であり、chemical mediator 遊離の trigger が単一でないので、特異的的刺激剤を用いた場合にはその意味づけが困難となること、また、本研究は病因などに左右されない気管支喘息に共通した遊離能の異常の有無の検討を目的としていることなどの理由で、本研究では非特異的的刺激剤である CaI を用いて LT 遊離能の検討を行った。

末梢白血球をM、NおよびEの各分画に分ける際に、本研究では、まず血小板を除去した。これは最近、アラキドン酸の添加によって刺激された血小板から 12-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid (12-HPETE) が遊離され、これが白血球の LTB₄ 遊離を増強するという報告²²⁾、および CaI による刺激でも血小板から遊離される因子が多形核白血球からの LTC₄ 遊離を増強させるとの報告²³⁾ があり、血小板によって末梢白血球からの LTC₄ および LTB₄ 遊離能に影響される可能性を考慮し、血小板の contamination を少なくすることが末梢白血球の LT 遊離能を検討する際に必要である²⁴⁾ と考えたからである。

ついで Ficoll-Paque と不連続 Percoll を用いた比重遠心法により、白血球をM、NおよびEの3分画に分離した。このようにして得られた各細胞分画の purity はMが99%、Nが97%およびEが92~93%であり、対照群と気管支喘息群の間、および気管支喘息群をさらにステロイド投与の有無、発作の有無および病型で分けての検討でも、M、NおよびEの各分画の purity に差がなく、LT 遊離能の比較検討を行う上で十分条件と思われた。

また、本研究では、LT の定量に抽出、精製の過程

を経ずに direct RIA 法を用いて測定した。LT の定量法には bioassay, HPLC および RIA による方法が検討されている。モルモット回腸片を用いる bioassay は SRS-A 測定に利用されているが、操作が煩雑であるうえに感度が低い²⁵⁾。一方 HPLC は特異性および感度が低く、しかも長時間の操作を要し²⁵⁾、また、RIA は操作が簡便で感度が優れているが、交叉反応の存在を完全に否定し得ない。よって、現時点では血中の LT を測定する場合には SEP-PAK C₁₈ カラム, HPLC による部分精製後に RIA で測定するのが最も特異性、感度に優れている方法とされているが、回収率の低さに問題がある。しかし、本研究のように白血球浮遊液上清中の LT を測定する場合には、血液中の LT の測定とは異なり、交叉反応で問題になる夾雑物がほとんどなく、抽出精製の過程を経ずに direct に RIA で測定しようと考えられている²⁶⁾⁻²⁸⁾。今回の検討でも、SEP-PAK C₁₈ カラムと HPLC で抽出精製を行った後の RIA の測定値と、direct RIA の値との間に高度に有意の相関を示したことから、煩雑な抽出精製の過程を経なくても比較検討の上では、direct RIA 法は適切な方法と思われた。

気管支喘息患者の末梢血白血球を本研究のように同時に M, N および E の各細胞分画に分けて、しかもその LTC₄ および LTB₄ 遊離能を同時に検討した報告は今までにない。気管支喘息患者の末梢血白血球からの LTC₄ 遊離能に関する過去の報告では、Taniguchi ら²⁴⁾ は、好酸球からの LTC₄ 遊離能を CaI によって検討しているが、内因性喘息では 23.5±14.8ng/10⁶ cells, 外因性喘息では 24.6±20.6ng/10⁶ cells で両群間に差はみられなかったが、健常者の 8.3±7.7ng/10⁶ cells に比し有意に亢進していたと述べている。Wang ら²⁹⁾ は、気管支喘息患者の末梢血白血球を単核球および多形核白血球に分けて CaI による SRS-A 遊離能を比較検討し、健常者に比して、両細胞からの SRS-A 遊離能が亢進していたと報告している。本研究でもこれらの報告と同様に、M および E 分画の LTC₄ 遊離能は健常者に比し気管支喘息患者で有意に亢進していることが認められ、さらに、N 分画においても同様に LTC₄ 遊離能の亢進を認めた。

一方、気管支喘息患者の末梢血白血球の LTB₄ 遊離能についての検討を行った報告は少なく、Weller ら³⁰⁾ は、気管支喘息患者について約 80% の eosinophil-enriched fraction からの LTB₄ 遊離能を検討しているが、健常者の値が 6.0ng/10⁶ cells であったの

に対し、気管支喘息患者のそれは 0.3ng/10⁶ cells であったと報告している。他方、好中球の LTB₄ 遊離能が健常者に比し気管支喘息患者で亢進していたという報告³¹⁾もある。しかし、この場合には白血球の分離過程で血小板を除去しておらず、LTB₄ を特異性の低い HPLC で定量しており、好中球の LTC₄ 遊離能が LTB₄ 遊離能より高い点など、さらに検討を要するものと考えられる。

chemical mediator の遊離能を検討する場合、治療薬の影響も考慮すべきである。本研究では治療薬の影響を避けるため、服薬を 12 時間以上中止した後遊離能を測定した。しかし、一般にステロイドは、12 時間経てもその効果が残存するとされ、しかも本研究で対象としたステロイド投与群 13 名は、prednisolone の経口投与の 2 名を除いて triamcinolone acetonide 40mg の筋肉注射を約 1 カ月ごとに受けていた。したがって、採血時には当然ステロイドの影響があると考えられたので、ステロイド投与群と非投与群を分けて遊離能を検討した。ステロイドは気管支喘息の有用な治療薬として汎用されているが、その作用の詳細なメカニズムについては不明の点が多い。作用機序の 1 つとして、phospholipase A₂ を阻害してアラキドン酸カスケードの代謝産物の産生を抑制することが報告されている³²⁾。しかし最近の肺胞マクロファージを用いた *in vitro* の実験によると、ステロイドは、TX A₂ および LTB₄ に比べ LTC₄ の産生をより抑制したという報告があり、本剤は、アラキドン酸カスケードのうち phospholipase A₂ 以降の代謝経路にも作用する可能性があることが示唆されている³³⁾。著者の検討でも、非ステロイド投与群の末梢血白血球の LTC₄ 遊離能が有意に亢進していたのに対して、ステロイド投与群の LTC₄ 遊離能は健常者群のそれとの間に差がなかった。とくに、非発作群の E 分画からの LTC₄ 遊離能は、非ステロイド投与群に比し有意に低値を示したのみならず、健常者に比しても低値を示す傾向にあったが、LTB₄ 遊離能はいずれの分画、いずれの群間でもまったく差がなかった。したがって、ステロイドホルモンは 5-lipoxygenase 系のうち、LTC₄ 産生を特に抑制する作用を有する可能性が考えられ、また、このことが、気管支喘息に対する本剤の効果を裏付ける作用機序の 1 つである可能性を示す、興味ある所見と考えられた。

気管支喘息患者の末梢血白血球の LTC₄ 遊離能についてアトピー型および非アトピー型の病型で分けて

検討したが、2型間に差がなかった。しかし、採血時の発作の有無によって比較検討したところ、発作群で有意に高値を示した。このことは、末梢白血球の LTC₄ 遊離能は病型とは無関係に気管支喘息の共通の病態を反映しており、発作と密接に関連していることを示すものと考えられる。

また、3細胞分画のうち最も高い LTC₄ 遊離能を示したE分画のそれは、発作に相関したのみならず、末梢血好酸球数とも相関がみられた。一般に気管支喘息患者の末梢血では特に発作時に好酸球数増多をみる人が多いが³⁴⁾³⁵⁾、気管支喘息において好酸球数が増加する状態では、単にその数が増加するのみでなく、各好酸球の細胞1個当たりの LTC₄ 遊離能も亢進していると考えられ、好酸球は LTC₄ の遊離を介して気管支喘息の病態とより密接に関連していることが推定された。

気管支喘息患者の末梢白血球の chemical mediator 遊離能が亢進していることが、ただちに気管支喘息でこれらの細胞から chemical mediator が遊離されていることには必ずしもならない。しかしながら、気管支喘息患者の末梢白血球の LTC₄ 遊離能の亢進は、その機序についての詳細は不明ではあるが、発作と関連していることが認められた。このことから、発作時に気道に浸潤した白血球は、種々の刺激によってより多量の LTC₄ を遊離して、気管支喘息の症状の増悪および遷延化を招来している可能性が推定され、また、何らかの刺激で惹起された LTC₄ 遊離能亢進そのものが喘息発作の引金になっている可能性も考えられる。

一方、気管支喘息患者の末梢白血球からの LTC₄ 遊離能が亢進していたにもかかわらず、LTB₄ 遊離能は健常者との間に差がなかった。これは、気管支喘息では、アラキドン酸カスケードの5-lipoxygenase系のうち LTC₄ 産生系が特異的に亢進している可能性を示唆している所見とも推定されるが、この点に関しては、今後、さらに検討が必要と思われる。

気道の過敏性および反応性の亢進が存在すると同様、気管支喘息患者の末梢白血球の細胞レベルの LTC₄ 遊離能の面においても反応性の亢進が認められることは気管支喘息の病態を解明する上で興味ある所見である。両者の関連についても、今後の詳細な検討を期したい。

VI 要 約

1) 気管支喘息患者46名(非ステロイド投与群33名、ステロイド投与群13名)および健常者17名の末梢白血球を比重遠心法により単核球(M)、好中球(N)および好酸球分画(E)に分け、各分画を calcium ionophore A23187 で刺激(1 μ g/ml, 20 min)した際のそれぞれの leukotriene C₄ および B₄ 遊離能を direct RIA 法で測定し、その意義について検討した。

2) 気管支喘息患者の単核球、好中球および好酸球の各分画の LTC₄ 遊離能(M: 7.1 \pm 4.4, N: 3.5 \pm 2.4およびE: 54.5 \pm 50.4 ng/10⁶ cells)は健常者のそれ(M: 4.4 \pm 2.5, N: 2.3 \pm 1.1およびE: 25.0 \pm 16.9ng/10⁶ cells)に比し、有意の亢進を認めた(M: p<0.01, N: p<0.05およびE: p<0.01)。

3) 非ステロイド投与喘息患者の単核球、好中球および好酸球の各分画の LTC₄ 遊離能は健常者に比して亢進していたのに対し(M: p<0.01, N: p<0.05およびE: p<0.01)、ステロイド投与喘息患者の LTC₄ 遊離能は亢進がみられず、健常者のそれとの間に有意差はなかった。

4) 非ステロイド投与患者の単核球、好中球および好酸球分画の LTC₄ 遊離能は病型とは無関係であったが、発作時の患者は非発作時の患者に比し高値を示した(M: p<0.01, N: p<0.05およびE: p<0.01)。ステロイド投与患者の好中球および好酸球分画の LTC₄ 遊離能も発作時の患者でより高値を示した(p<0.05)。

5) 気管支喘息患者の好酸球分画の LTC₄ 遊離能と末梢血好酸球数との間に有意の相関を認めた(p<0.05)。

6) 気管支喘息患者の単核球、好中球および好酸球分画の LTB₄ 遊離能は健常者のそれとの間に有意差はなく、また、病型ならびに発作の有無とも関係がなかった。

7) 以上、気管支喘息患者末梢白血球の LTC₄ 産生遊離能は亢進し、とくに発作と関連していることを認めたが、このことは、気管支喘息の病態を解明する上で重要な所見と考えられた。

本研究の要旨は、第28回日本胸部疾患学会総会(1988年4月、仙台)、13th International Congress of Allergology and Clinical Immunology(1988年10月、Montreu)において発表した。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました

関口守衛教授に深甚なる謝意を表します。同時に本研究に際し、御教示御指導いただいた小林俊夫講師ならびに藤本圭作博士をはじめとする第1内科学教室の諸

兄に深謝致します。また、本研究の実施にあたって御協力いただいた福光久美子技術補に感謝致します。

文 献

- 1) Nadel, J. A. : Inflammation and asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 73 : 651-653, 1984
- 2) Dahlén, S-E., Hansson, G., Hedqvist, P., Björck, T., Granström, E. and Dahlén, B. : Allergen challenge of lung tissue from asthmatics elicits bronchial contraction that correlates with the release of the leukotrienes C₄, D₄, and E₄. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80 : 1712-1716, 1983
- 3) Dahlén, S-E., Hedqvist, P., Hammarström, S. and Samuelsson, B. : Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature*, 288 : 484-486, 1980
- 4) Hanna, C. J., Bach, M.K., Pare, P.D. and Schellenberg, R.R. : Slow-reacting substances (leukotrienes) contract human airways and pulmonary vascular smooth muscle *in vitro*. *Nature*, 290 : 343-344, 1981
- 5) Maron, Z., Shelhamer, J.H., Bach, M.K., Morton, D.R. and Kaliner, M. : Slow-reacting substances, leukotrienes C₄ and D₄, increase the release of mucus from human airways *in vitro*. *Am Rev Respir Dis*, 126 : 449-451, 1982
- 6) Coles, S. J., Neill, K.H., Reid, L.M., Austen, K.F., Nii, Y., Corey, E. J. and Lewis, R.A. : Effects of leukotrienes C₄ and D₄ on glycoprotein and lysozyme secretion by human bronchial mucosa. *Prostaglandins*, 25 : 155-170, 1983
- 7) Holroyde, M.C., Altounyan, R.E.C., Cole, M., Dixon, M. and Elliott, E.V. : Bronchoconstriction produced in man by leukotrienes C and D. *Lancet*, 2 : 17-18, 1981
- 8) Delehunt, J.C., Perruchoud, A.P., Yérger, L., Marchette, B., Stevenson, J.S. and Abraham, W.M. : The role of slow-reacting substance of anaphylaxis in the late bronchial response after antigen challenge in allergic sheep. *Am Rev Respir Dis*, 130 : 748-754, 1984
- 9) Goetzl, E. J. and Pickett, W.C. : The human PMN leukocyte chemotactic activity of complex hydroxy-eicosatetraenoic acids (HETEs). *J Immunol*, 125 : 1789-1791, 1980
- 10) O'Byrne, P.M., Leikauf, G.D., Aizawa, H., Bethel, R.A., Ueki, I.F., Holtzman, M. J. and Nadel, J.A. : Leukotriene B₄ induces airway hyperresponsiveness in dogs. *J Appl Physiol*, 59 : 1941-1946, 1985
- 11) Thorpe, J.E. and Murlas, C.G. : Leukotriene B₄ potentiates airway muscle responsiveness *in vivo* and *in vitro*. *Prostaglandins*, 31 : 899-908, 1986
- 12) MacGlashan, D.W. Jr., Schleimer, R.P., Peters, S.P., Schulman, E.S., Adams, K. III, Newball, H.H. and Lichtenstein, L.M. : Generation of leukotrienes by purified human lung mast cells. *J Clin Invest*, 70 : 747-751, 1982
- 13) Fels, A.O.S., Pawlowski, N.A., Cramer, E.B., King, T.K.C., Cohn, Z.A. and Scott, W.A. : Human alveolar macrophages produce leukotriene B₄. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79 : 7866-7870, 1982
- 14) Holtzman, M. J., Aizawa, H., Nadel, J.A. and Goetzl, E. J. : Selective generation of leukotriene B₄ by tracheal epithelial cells from dogs. *Biochem Biophys Res Commun*, 114 : 1071-1076, 1983
- 15) Huber, H.L. and Koessler, K.K. : The pathology of bronchial asthma. *Arch Intern Med*, 30 : 689-760, 1922
- 16) de Monchy, J.G.R., Kauffman, H.F., Venge, P., Koëter, G.H., Jansen, H.M., Sluiter H. J. and de Vries, K. : Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis*, 131 : 373-376, 1985
- 17) Fabbri, L.M., Boschetto, P., Zocca, E., Milani, G., Pivrotto, F., Plebani, M., Burlina, A.,

- Licata, B. and Mapp, C.E. : Bronchoalveolar neutrophilia during late asthmatic reactions induced by toluene diisocyanate. *Am Rev Respir Dis*, 136 : 36-42, 1987
- 18) Huston, P.A., Church, M.K., Clay, T.P., Miller, P. and Holgate, S.T. : Early and late-phase bronchoconstriction after allergen challenge of nonanesthetized guinea pigs. 1. The association of disordered airway physiology to leukocyte infiltration. *Am Rev Respir Dis*, 137 : 548-557, 1988
- 19) Lichtenstein, L.M. and Conroy, M.C. : The "releasability" of mediators from human basophils and granulocytes. In : Mathov, E., Sindo, T. and Naranjo, P. (ed.), 9th International Congress of Allergology. pp.109-115, Excerpta Medica, Amsterdam, 1977
- 20) Findlay, S.R. and Lichtenstein, L.M. : Basophil "releasability" in patients with asthma. *Am Rev Respir Dis*, 122 : 53-59, 1980
- 21) 栗本文彦, 桜井兵一郎 : アラキドン酸カスケード代謝産物のラジオイムノアッセイ測定法. *医学のあゆみ*, 143 : 323-325, 1987
- 22) Macclouf, J., de Laclous, B.F. and Borgeat, P. : Stimulation of leukotriene biosynthesis in human blood leukocytes by platelet-derived 12-hydroperoxy-icosatetraenoic acid. *Proc Natl Aca dSci USA*, 79 : 6042-6046, 1982
- 23) 谷口 昇, 三田晴久, 斉藤博士, 梶田俊行, 油井泰雄, 信太隆夫 : ヒト末梢多核白血球からの Slow Reacting Substance 遊離に及ぼす血小板の影響. *アレルギー*, 34 : 218-225, 1985
- 24) Taniguchi, N., Mita, H., Saito, H., Yui, Y., Kajita, T. and Shida, T. : Increased generation of leukotriene C₄ from eosinophils in asthmatic patients. *Allergy*, 40 : 571-573, 1985
- 25) Smith, J.B. and Aharony, D. : Measurement of leukotrienes. *Prog Clin Biol Res*, 199 : 29-33, 1985
- 26) Lindgren, J.A., Hammarström, S. and Goetzl, E.J. : A sensitive and specific radioimmunoassay for leukotriene C₄. *FEBS Lett*, 152 : 83-88, 1983
- 27) Aehringhaus, U., Wölbling, R.H., König, W., Patrono, C., Peskar, B.M. and Peskar, B.A. : Release of leukotriene C₄ from human polymorphonuclear leukocytes as determined by radioimmunoassay. *FEBS Lett*, 146 : 111-114, 1982
- 28) Salmon, J.A. : Measurement of leukotriene B₄ *in vitro* and *in vivo* by radioimmunoassay. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res*, 15 : 25-28, 1985
- 29) Wang, S.R., Yang, C.M., Wang, S.S.M., Han, S.H. and Chiang, B.N. : Enhancement of A23187-induced production of the slow-reacting substance on peripheral leukocytes from subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 77 : 465-471, 1986
- 30) Weller, P.F., Lee, C.W., Foster, D.W., Corey, E.J., Austen, K.F. and Lewis, R.A. : Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophils : Predominant production of leukotriene C₄. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80 : 7626-7630, 1983
- 31) 高橋 清, 清水一紀, 難波一弘, 中山堅吾, 岡田千春, 辻 光明, 中藤研一, 多田慎也, 木村郁郎, 周藤真康, 谷崎勝朗 : 重症難治性喘息患者における末梢血好中球分画からのロイコトリエン産生能に関する検討. *アレルギー*, 37 : 322-330, 1988
- 32) Rothhut, B., Russo-Marie, F., Wood, J., DiRosa, M. and Flower, R.J. : Further characterization of the glucocorticoid induced antiphospholipase protein "renocortin". *Biochem Biophys Res Commun*, 117 : 878-884, 1983
- 33) Peters-Golden, M. and Thebert, P. : Inhibition by methylprednisolone of zymosan-induced leukotriene synthesis in alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis*, 135 : 1020-1026, 1987
- 34) Horn, B.R., Robin, E.D., Theodore, J. and Van Kessel, A. : Total eosinophil counts in the management of bronchial asthma. *N Engl J Med*, 292 : 1152-1155, 1975
- 35) Chales, T.J., Williams, S.J., Seaton, A., Bruce, C. and Taylor, W.H. : Histamine, basophils and eosinophils in severe asthma. *Clin Sci*, 57 : 39-45, 1979

(1. 7. 7 受稿)