

固相化した *Candida* 抗原と IgG 抗体による 末梢血好酸球からの EPX の遊離

国立相模原病院臨床研究部

池田泰子 三田晴久 工藤 誠
長谷川真紀 秋山一男

気管支喘息の病態における *Candida* などの常在真菌抗原に対する IgG 抗体の関与については不明な点が多い。マイクロプレートのウエルに *Candida* 粗抗原を固相化した後、*Candida* に対する IgG 抗体が検出された喘息患者血清を反応させて IgG 抗体を固相化した。このウエルで好酸球を 15 時間培養すると脱顆粒が起こり培養上清中に EPX が遊離された。この遊離は IgG 分画を除去した血清では全く認められなかった。抗 Fcγ RII 抗体 (anti-CD32) や anti-CD18 は遊離を有意に抑制したが、抗 Fcε RII 抗体 (anti-CD23) では抑制されなかった。また、*Candida* 粗抗原と患者血清を反応させた IgG-免疫複合体による刺激でも遊離が認められた。*Candida* の精製抗原である mannan A では粗抗原と同様に EPX の遊離が起こったが、血清中に IgG 抗体が少ない acid protease では遊離を認めなかった。以上の結果から、固相化された *Candida* 抗原と血清中の IgG 抗体が Fcγ RII を介して好酸球の脱顆粒を誘導し、mannan A がこの反応に関係していることが明らかになった。

Key words : *Candida albicans* — degranulation — eosinophil — IgG antibody

はじめに

気道局所に浸潤した好酸球による炎症反応が気管支喘息の病態に大きな影響を与えていることは多くの報告から明らかである。特に、好酸球の脱顆粒による組織傷害性蛋白の遊離は気道上皮を傷害して気道過敏性の亢進、喘息の増悪をきたすことが示されている¹⁾が、好酸球の活性化と脱顆粒の機序についてはなお不明の点が多い。好酸球表面には組織構成的に IgG や IgA に対する受容体である Fcγ RII (CD32) や Fcα R が発現しており、IgG, IgA あるいは sIgA を結合させた Sepharose 4 B beads の刺激によって脱顆粒を起こすことが知られている²⁾。ブタクサ抗原と IgG 1 抗体を介して脱顆粒が誘導されたという報告³⁾もあり、IgG や IgA が好酸球の脱顆粒に関わる可能性が示唆される。また、最近の知見では、脱顆粒や superoxide 産生などの好酸球機能に接着分子が重要な役割を果たして

いることも明らかになっている^{4) - 6)}。

小児喘息ではそのほとんどがアレルギーと IgE 抗体が関与するいわゆるアトピー型喘息であるが、成人気管支喘息は明確にアトピー型喘息と分類できる症例の数は多くはない。全体の約 1/3 は血清総 IgE 値が低く IgE 抗体が認められない内因型あるいは非アトピー型喘息で、特に成人発症型喘息においてその頻度が高い⁷⁾。これらの非アトピー型喘息には慢性の難治性喘息の多いことが知られているが、その病態や発症機序については明らかになっていない。非アトピー型喘息では血清中に *Candida* やダニなどに対する IgE 抗体は認められないが、IgG 抗体が高率に認められる。また、*Candida* はヒトの消化管粘膜や口腔内における常在真菌として知られており、アトピー型喘息のアレルゲンとしての役割^{8) - 10)}とともに、細胞性免疫や IgG 抗体等が関連する反応において常時抗原刺激を行っていると考えられる。

本研究では、非アトピー型喘息の病態におけるヒト常在真菌抗原としての *Candida albicans* (*C. albicans*) と IgG 抗体の関わりを知るために、*Candida* 抗原に対する IgG 抗体を介した好酸球の脱顆粒反応について検討した。

Received : October 7, 1998

Accepted : March 2, 1999

Abbreviations : CAAP *Candida albicans* acid protease ; EPX eosinophil protein X ; Mn A mannan A

方 法

1. 試薬

Purified human myeloma IgG 1 κ , IgG 3 κ , IgG 4 κ (Sigma, USA), FITC anti-human CD32 (clone 2003, mouse IgG2b, PharMingen, USA), FITC anti-human CD64 (clone 32.2, mouse IgG 1, Medarex, Inc., USA), FITC mouse IgG2b (clone R 12-3, rat IgG2a, PharMingen, USA), FITC mouse IgG1 (clone X 40, Beckton-Dickinson, USA), anti-human CD32 F(ab')₂ (clone IV. 3, mouse IgG2b, Medarex, INC., USA), anti-human CD23 (clone 11/4, mouse IgG 1, Yamasa, Japan), anti-human CD18 F(ab')₂ (clone MHM 23, mouse IgG1, DAKO, Denmark), Protein G カラム (Mab Trap GII, Pharmacia Biotech, Sweden).

2. *Candida* 粗抗原および精製抗原

当院入院患者より採取した *C. albicans* を長期間培養した後、培養上清を透析して凍結乾燥末にしたものを *Candida* 粗抗原とした。精製抗原は *C. albicans* 由来の酸性プロテアーゼ (CAAP)⁸⁾⁹⁾ およびマンナン A (Mn A)¹⁰⁾ を使用した。

3. 血清

IgE 抗体価が測定限界以下で *Candida* 粗抗原に対する IgG 抗体価が異なる喘息患者血清 5 例と、粗抗原および 2 種類の精製抗原に対する IgG 抗体が検出できた喘息患者血清 18 例を使用した。血清中の IgG および IgE 抗体の測定は液相アレルゲンを用いた EIA 法 (AlaSTAT 法) で行った¹¹⁾。

4. 好酸球の分離

既に報告した方法¹²⁾に従い喘息患者から末梢血好酸球を分離した。すなわち、比重 1.082 g/ml と 1.094 g/ml に調整した Percoll (Pharmacia, Sweden) 不連続比重勾配遠心法と、抗 CD16 モノクローナル抗体 (clone MG 38, mouse IgG 1, ニチレイ, Japan) および Dynabeads M-450 (sheep anti-mouse IgG, Dynal, Norway) を用いた negative selection によって純度 97% 以上の好酸球を得た。

5. 好酸球の脱顆粒

マイクロプレート (96 wells, flat bottom, Corning, USA) に phosphate buffered saline (PBS) で 100 μ g/ml に溶解した *Candida* 粗抗原あるいは精製抗原を 0.1 ml/well 加えて 37°C, 2 時間インキュベートした。抗原液を除去した後、非特異的なタンパクの結合を阻止する目的で PBS で 2.5% に溶解したヒト血清アル

ブミン (HSA) を 0.1 ml/well 加えて 37°C, 1 時間インキュベートし、PBS 0.1 ml/well で 1 回洗浄した。次に、0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3% の濃度に PBS で希釈した患者血清を 0.1 ml/well 加えて 37°C, 2 時間インキュベートし、PBS 0.1 ml/well で 2 回洗浄して以下の実験に使用した。

マイクロプレートに 10% FCS, L-glutamine, penicillin-streptomycin 含 RPMI-1640 で調整した好酸球浮遊液を 5×10^4 cells/0.2 ml/well 加え 5% CO₂ インキュベーターで 37°C, 15 時間培養した後、培養上清を回収して上清中に含まれる EPX 濃度を EPX-RIA kit (ファルマシア・アップジョン, Japan) を用いて測定した。結果は測定値から HSA のみを固相化した well で好酸球を培養した時に遊離された EPX 濃度 (EPX の自然遊離量) を差し引き、0.5% Nonidet P-40 で好酸球を溶解した時の EPX 濃度 (全 EPX 量) に対する EPX の遊離率 (%) で表した⁴⁾。なお、EPX の自然遊離量は 10.44 ± 3.28 pg/ml となり、全 EPX 量の 973.92 ± 180.35 pg/ml の約 1.07% であった (n=10)。

6. フローサイトメトリー

Epics 752 (Coulter, USA) を使用してサイトグラム上の好酸球集団にゲートをかけ、ゲート内の細胞数 10000 個の蛍光強度を測定した。解析は測定結果から陽性細胞率 (%) を求めて行った。

7. 統計学的検討

Mann-Whitney 検定と Wilcoxon signed-rank 検定にて統計処理を行い、実験結果は全て平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。

結 果

1. *Candida* 粗抗原と喘息患者血清による EPX 遊離

Candida 粗抗原と IgG 抗体価の異なる 4 例の患者血清を用いて好酸球からの EPX 遊離を比較した結果、すべての血清で希釈濃度、すなわち血清中に含まれる IgG 抗体の濃度に依存した EPX の遊離がみられた。一方、抗原のみを固相化し血清を加えていない well では遊離がみられなかった。Fig. 1 に 5 人の異なるドナーから分離した好酸球を用いて、血清の希釈濃度と EPX の最大遊離率との関係を検討した代表的な 1 例の結果を示した。IgG 抗体価が 10300 U/ml の血清では 0.1% の濃度で最大遊離率 ($29.13 \pm 12.13\%$, n=5) を示し、6400 IgG U/ml の血清は 0.3% の濃度で最大遊離率

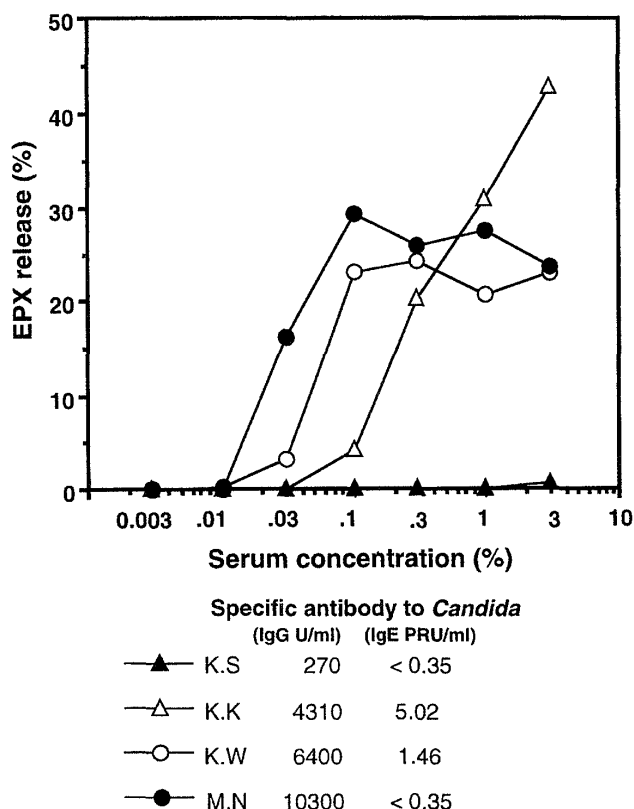


Fig. 1. Relationship between EPX release and serum concentration in four sera. Dependence of EPX release on concentration of IgG antibody in serum.

($25.24 \pm 13.85\%$) を示した。さらに、270 IgG U/ml の血清では 3% の濃度まで遊離が起こらなかった。なお、抗原を固相化せずに最大濃度である 3% の患者血清のみを固相化した well における EPX の遊離率は $0.42 \pm 0.90\%$ であった。

2. 特異的 IgG 抗体の EPX 遊離への関与

EPX の遊離が IgG 抗体を介して起こることを確認するために、患者血清 (10300 IgG U/ml) を Protein G カラムを用いて IgG を除去した分画とカラムから溶出された IgG 分画に分離し、各分画と原血清による EPX の遊離率を比較した (Fig. 2)。原血清は 0.1% の濃度で最大遊離率 ($34.33 \pm 15.76\%$, $n=3$) を示し、Fig. 1 と同様の結果が得られたが、原血清から IgG を除去すると遊離は全く認められなくなった。一方、IgG 分画では原血清とほぼ同程度の遊離 (0.01, 0.1, 1% の各分画濃度における遊離率は各々 $36.10 \pm 15.26\%$, $37.14 \pm 10.98\%$, $36.73 \pm 11.83\%$) がみられた。

3. FcγR を介した EPX 遊離への関与

ヒトの末梢血好酸球は IgG Fc リセプターを発現していることが知られている¹³⁾¹⁴⁾が、Fig. 3 に示すよう

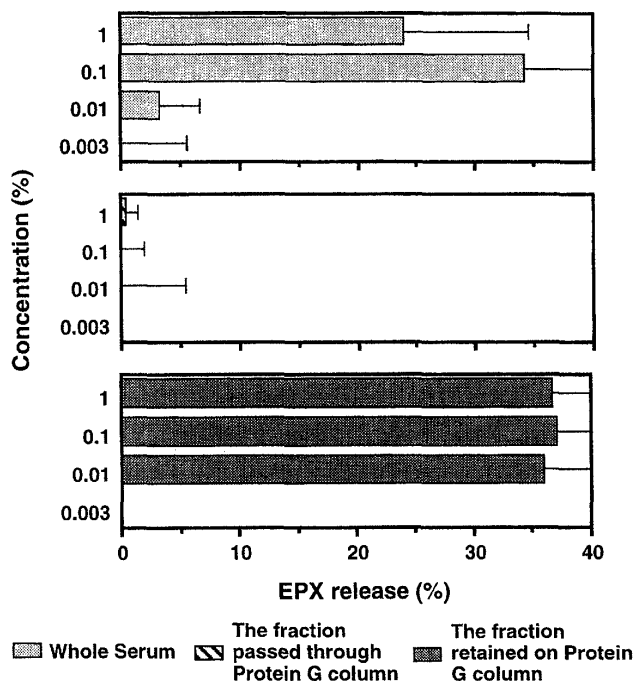


Fig. 2. Effect of IgG depletion from serum on EPX release induced with *Candida* antigen. After the serum containing 10300 U/ml of IgG to *Candida* antigen was loaded on Protein G column, the fraction passed through the column was used as IgG-depleted serum. The fraction retained on the column was used as IgG-rich serum.

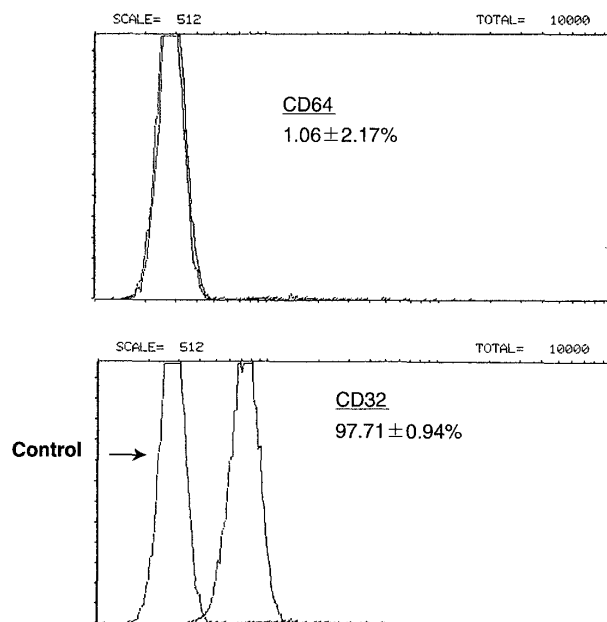


Fig. 3. Expression of Fcγ RII (CD32) and Fcγ RI (CD64) on eosinophils from asthmatics.

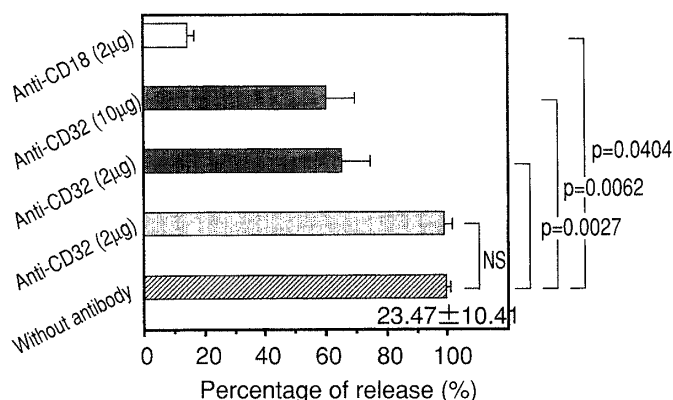


Fig. 4. Effect of antibodies against CD18, CD32 and CD23 on eosinophil degranulation. Eosinophils were preincubated with each antibody or without antibody for 30 min at 4°C, and then the cells were cultured in the wells, which had been coated with *Candida* extract, followed by treatment with 0.1% serum containing 10,300 U/ml of IgG to *Candida* antigen for 15 h at 37°C. The results shows the data from six different eosinophil preparations.

にフローサイトメトリーによる測定で、喘息患者の好酸球ではFcγRII (CD 32) は $97.71 \pm 0.94\%$, FcγRI (CD 64) は $1.06 \pm 2.17\%$ の陽性率で発現が確認された ($n=3$). そこで、好酸球表面に発現しているこれらの受容体とEPX遊離との関係を抗FcR抗体を用いて検討した。FcγRIIの中和抗体であるanti-human CD32 F(ab')₂あるいはFcεRIIの抗体であるanti-human CD23を 10^6 個の好酸球に2μgまたは10μg加えて4°C, 30分間反応させた後、*Candida* 粗抗原と0.1%の濃度の患者血清 (10300 IgG U/ml) を反応させたwellに加えて培養した。抗FcR抗体で処理しなかった細胞のEPXの遊離率 ($23.47 \pm 10.41\%$, $n=5$) を100%として比較すると、Fig. 4に示した様に2μgおよび10μgのanti-CD32で処理した好酸球からの遊離の割合はそれぞれ $65.53 \pm 9.24\%$ ($p=0.0027$), $60.22 \pm 9.37\%$ ($p=0.0062$) で有意な抑制がみられた。

一方、anti-human CD23はEPXの遊離に全く影響を与えなかった ($99.03 \pm 12.26\%$, NS). また、anti-CD18 F(ab')₂で処理した場合には遊離が著しく抑制 ($14.81 \pm 2.12\%$, $p=0.0404$, $n=2$) されたことから、この実験系では好酸球のCD18を介した接着が大きく関与していることが示唆された (Fig. 4).

4. IgG サブクラスによる EPX 遊離

IgG サブクラスによるEPXの遊離率の違いを比較した。マイクロプレートに0.05 M carbonate-

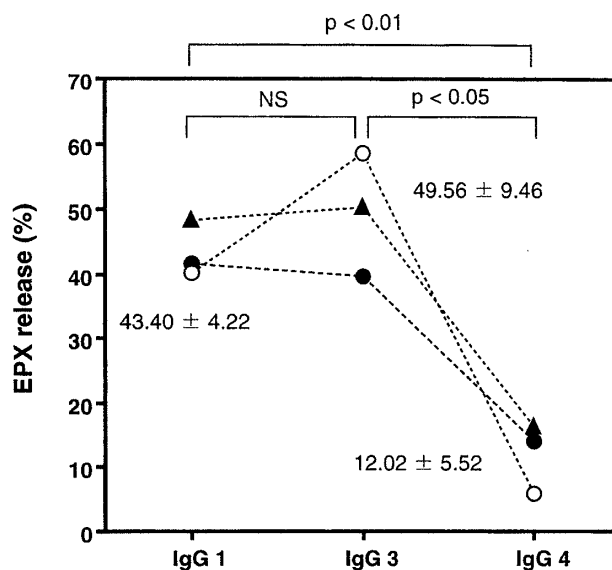


Fig. 5. EPX release by immobilized IgG1, IgG3 and IgG4. Each symbol shows the results by eosinophils from different donors.

bicarbonate buffer (pH=9.6) で50 μg/mlに溶解したhuman IgG 1, IgG 3あるいはIgG 4を0.1 ml/well加え、37°C, 2時間インキュベートして各IgGを固相化した後、好酸球を加えて培養した。その結果、Fig. 5に示したようにIgG 1およびIgG 3で高いEPXの遊離 (IgG 1: $43.40 \pm 4.22\%$, IgG 3: $49.56 \pm 9.46\%$, $n=3$) がみられた。これに対して、IgG 4による遊離 ($12.02 \pm 5.52\%$) はIgG 1 ($p<0.01$) やIgG 3 ($p<0.05$) に比べて有意に低値を示した。IgG 1とIgG 3の遊離率の間には有意な差は認められなかった。

5. 免疫複合体による EPX 遊離

IgGの免疫複合体によるEPXの遊離を検討した。*Candida* 粗抗原 (5, 50または500 μg/0.05 ml) と10倍に希釈した患者血清 (11100 IgG U/ml; 0.05 ml) をwellに加えて37°C, 1時間インキュベートした後、好酸球を加えて培養した。コントロールとして、抗原のみを0.5, 50, 500 μg/0.2 ml/well加えて細胞と培養した場合の遊離率は各々 $0.61 \pm 0.78\%$, $0.59 \pm 1.02\%$, $5.07 \pm 5.73\%$, 10倍に希釈した患者血清のみを加えた場合の遊離率は $0.67 \pm 0.95\%$ であった。これに対して、抗原と患者血清を加えて反応させたwellでは明らかなEPXの遊離 (500 μg/0.2 ml: $28.14 \pm 6.68\%$, 50 μg/0.2 ml: $6.19 \pm 5.53\%$, 0.5 μg/0.2 ml: $6.17 \pm 6.11\%$) が認められた。なお、患者血清を非働化処理 (56°C, 30分間) して行った同様の実験でも同じような結果が得られた (data not shown). また、anti-CD18 F(ab')₂はこの

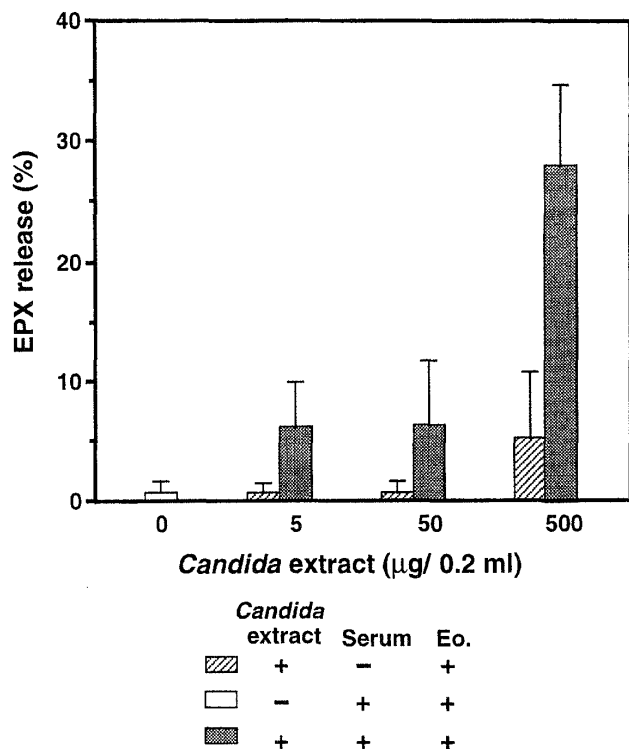


Fig. 6. EPX release from eosinophils after incubation with crude *Candida* antigens and a patient's serum containing IgG antibodies in liquid phase.

Different concentrations (0, 5, 50, 500 mg/50 ml) of *Candida* antigens were preincubated with 50 ml of 10 % serum containing 11,100 U/ml of IgG to *Candida* antigen for 60 min at 37°C, and then eosinophils were cultured with the mixture for 15 h at 37°C. The results shows the data from five different eosinophil preparations.

IgG-免疫複合体による EPX の遊離を Fig. 4 に示した結果とほぼ同程度に抑制した (data not shown).

6. 精製抗原による EPX 遊離と血清中の特異的 IgG 抗体量との関係

2 種類の精製抗原 Mn A および CAAP と各抗原に対する IgG 抗体を定量することができた 18 例の患者血清を用いて EPX 遊離を比較した. Fig. 7 に示した代表的な 4 例の結果から, Mn A では粗抗原と同様に血清の濃度に依存した明らかな遊離が認められた. また, IgG 抗体価が高い血清ではより低濃度で遊離の起こることが確かめられた. 一方, CAAP では全く遊離が起こらなかった. なお, *Candida* 粗抗原において, IgG 抗体価が 65.9 U/ml の血清では濃度依存性の遊離を示さなかった. この原因は不明だが, 後述するように血清中の何らかの因子の影響が考えられる.

EPX 遊離と血清中の IgG 抗体量との関係を見るた

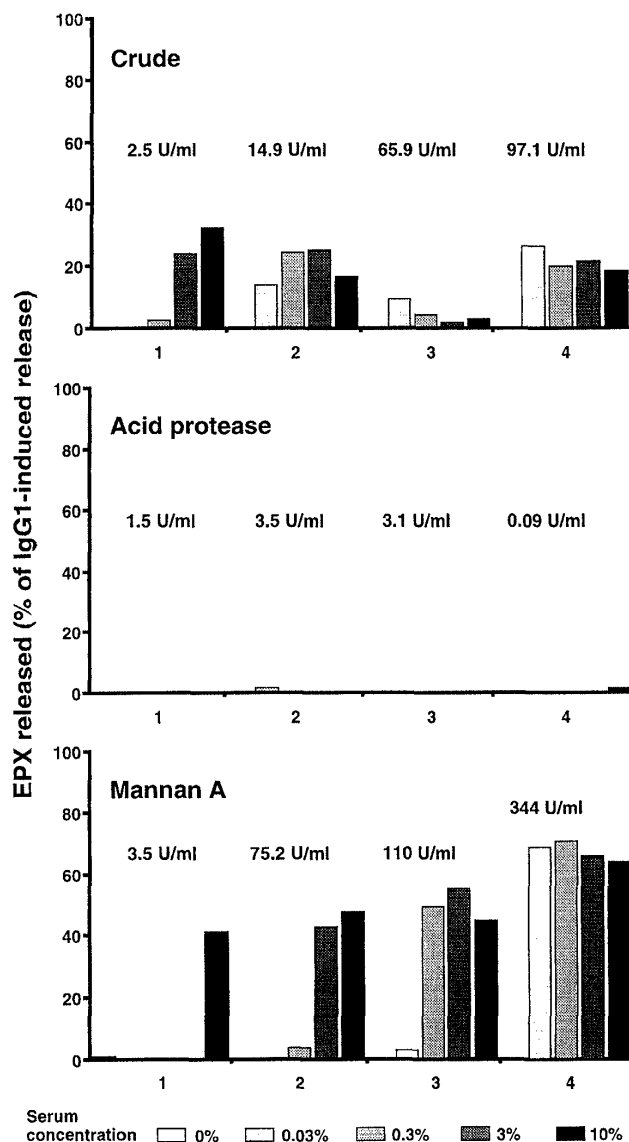


Fig. 7. EPX release induced by crude *Candida* extract (upper), acid protease (lower) or mannan A (middle) in four sera containing different concentrations of IgG to each antigen.

めに, 1 人のドナーから分離した好酸球を用いて, 18 例の患者血清 (Mn A に対する IgG 抗体価: 3.5~344.0 IU/ml) のそれぞれの最大遊離率と well 上に存在する抗体量 (予備実験で得られた最大遊離を起こす血清の希釈度に血清中の Mn A に対する IgG 抗体価を乗じた値) との関係と比較した. 両者の間に有意な相関はみられなかった (data not shown) が, 同様の実験を他のドナーから分離した好酸球を用いて行ったところ, これら 2 回の実験で得られた結果は有意な相関 ($p=0.0218$) を示した.

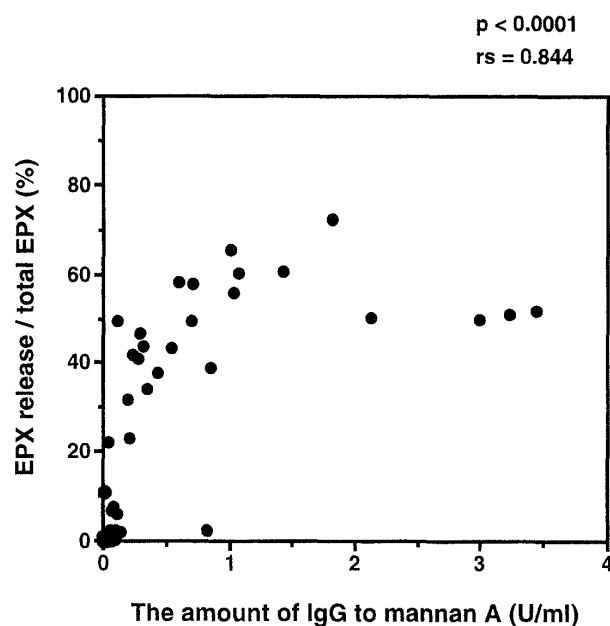


Fig. 8. Relation between maximal release of EPX and the amounts of IgG to mannan A added to the well.

そこで、10/18 例の血清から Protein G カラムを用いて IgG 分画を分離し、1 人のドナーから分離した好酸球を用いて検討した結果、EPX の遊離率と固相化されていると考えられる IgG 抗体量は極めて高い相関 ($p < 0.0001$) を示し、EPX 遊離が IgG の抗体量に依存して起こっていること確認した。また、IgG 抗体以外の他の血清因子が EPX の遊離に影響を及ぼすことが推測された (Fig. 8)。

考 察

成人発症喘息におけるアトピー型：混合型：感染（非アトピー）型の割合はほぼ 1：1：1 で、全体の約 2/3 にアトピー反応の関与しない喘息症状の発現が認められる⁷⁾。アトピー型喘息と非アトピー型喘息は共に表現型としての臨床症状は同じで、気道の組織所見は好酸球浸潤を伴った炎症反応を特徴としているが、非アトピー型喘息には通年性の慢性喘息が多い。また、非アトピー型喘息の成因として環境抗原や常在性の微生物抗原が関与している可能性が示唆されている。例えば、*Candida* はヒトの皮膚や口腔、消化管粘膜の常在真菌で気管支喘息の原因アレルゲンの 1 つである¹⁵⁾ が、成人気管支喘息患者では *Candida* に対する即時型皮膚反応が陽性の場合でも、血清中に *Candida* に対す

る IgE 抗体を認めない場合が多く、IgG 抗体が高率に認められることが知られている。また、気管支喘息患者に限らず健康人でも *Candida* が常在真菌であることから血清中に *Candida* に対する IgG 抗体を認める場合が多い。これらの知見から、*Candida* などの常在菌抗原が IgE 抗体を介さないメカニズムで非アトピー型喘息の病態に関与している可能性について検討した。

今回の研究で、我々は *Candida* 抗原が IgG 抗体を介して好酸球から脱顆粒を引き起こすことを明らかにした。*Candida* 粗抗原と *Candida* に対する IgG 抗体価が異なる患者血清を反応させた well で好酸球を培養した結果、血清中の IgG 濃度に依存した EPX の遊離が認められた。これに対して、抗原のみを固相化した well あるいは患者血清のみを固相化した well では遊離は起こらなかった。さらに、プロテイン G カラムを用いて血清中の IgG 分画を除去したところ、好酸球の EPX 遊離は完全に抑制され、*Candida* 抗原を介した好酸球の脱顆粒には IgG 抗体が関与していることが明らかになった。

ヒトの IgG 抗体のサブクラスである IgG1, IgG3, IgG4 をマイクロプレートに固相化して EPX 遊離を比較したところ、IgG 1 と IgG 3 で高い EPX の遊離がみられたが、IgG 4 による遊離は僅かであった。ヒトの FcγR2 (CD 32) は IgG と低親和性で結合する FcγR で、その結合性は IgG 1 あるいは IgG 3 との結合が最も強く、IgG 4 との結合性は弱いことが知られている¹⁷⁾。Fig. 5 の実験でみられた IgG サブクラスによる EPX 遊離の違いはこの FcγR2 に対する IgG の反応性と一致していた。一方、我々は患者血清中に *Candida* に対する IgG 1, IgG 3, IgG 4 の各抗体が存在することを確認したが、それぞれの抗体価と EPX の最大遊離率との間に明らかな相関は認められず (data not shown)、血清中のブタクサ抗原に対する IgG 1 あるいは IgG 3 の抗体量と EPX 遊離の間に有意な相関を認めたという報告とは一致しなかった³⁾。

ヒトの末梢血好酸球には組織構成的に FcγR や FcαR が発現している。喘息患者では 97% 以上の陽性率で FcγR2 の発現を認めたが、FcγR1 (CD64) の発現は非常に僅かほとんど確認できなかった¹³⁾。また、常に CD11a / CD18 (LFA-1)、CD11b / CD18 (Mac-1)、CD11c / CD18 (gp 150,95) および CD49d / CD29 (VLA-4) などのインテグリンも発現している¹³⁾ が、固相化した human IgG や IgG を結合させた Sepharose 4 B beads の刺激による好酸球の脱顆粒⁵⁾

や HSA を固相化させたプレートでの GM-CSF と TNF- α の刺激による脱顆粒反応⁶⁾では, β_2 インテグリンを介した細胞接着が好酸球の活性化やシグナリングに重要であることが示されている. そこで, anti-CD 32, anti-CD23 および anti-CD18 mAb による遮断実験を行った. anti-human CD32 F(ab')₂ は EPX の遊離を有意に抑制したが, anti-human CD23 では全く抑制されなかった³⁾. さらに, anti-CD18 F(ab')₂ は EPX 遊離を著しく抑制することが確かめられた. これらの結果から, IgG 抗体が Fc γ RII を介してこの実験系に関与することは明らかであるが, 固相化された抗原と IgG 抗体を介して好酸球の脱顆粒が引き起こされるには β_2 インテグリンによる細胞接着がさらに必要であると思われる.

低親和性の IgG 受容体である Fc γ RII は, モノマー IgG との結合性は弱い³⁾, 固相化した IgG や IgG の免疫複合体と結合する¹⁶⁾. そこで, IgG の免疫複合体によって好酸球の EPX 遊離が誘導されるか検討した. Takenaka らの方法¹⁷⁾に従い, *Candida* 粗抗原と IgG 抗体価の高い患者血清を反応させた後, そこに好酸球を加えて培養し上清中に遊離した EPX の濃度を測定した. その結果, 高濃度の *Candida* 粗抗原 (0.5 mg/0.05 ml) と 10 倍に希釈した患者血清 (11,100 IgG U/ml の血清を 0.05 ml) を反応させた場合に明らかな EPX の遊離が認められた. 一方, 抗原あるいは 10 倍希釈した患者血清のみの刺激ではほとんど遊離が起らなかったことから, 固相化された抗原に限らず免疫複合体でも IgG 抗体と Fc γ RII の反応を介して好酸球の活性化が起こる可能性が示唆された. また, この実験系においても anti-CD18 mAb は EPX の遊離を強く抑制し, β_2 インテグリンによる接着を介した好酸球の活性化とそれに続く反応の重要性が示された (data not shown). なお, 同様の実験を患者血清を非働化して比較したが, 未処理の場合と全く変わらない結果が得られたことから, この系での EPX 遊離には補体系の活性化は関与していないものと思われる.

C. albicans は気管支喘息の原因アレルゲンとして主要な抗原成分である CAAP と Mn A が重要であると考えられている. CAAP は *C. albicans* が分泌する酵素で, IgA や secretory component を分解することにより *C. albicans* がヒトの皮膚や粘膜に侵入するのを可能にしている. また, *Candida* によるアトピー性喘息に関与する重要なアレルゲンであることが示されている⁸⁾⁹⁾. これに対して, Mn A は細胞壁を構成する多糖

体で他の真菌アレルゲンと交差反応性をもつ共通抗原で, *C. albicans* に対する IgG 抗体を産生する主要なアレルゲンであることが分っている¹⁰⁾.

この 2 種類の精製抗原を用いて EPX の遊離を比較した結果, Mn A では血清中の IgG 抗体の濃度に依存した明らかな遊離が認められ, Mn A が抗原と IgG 抗体を介した好酸球の脱顆粒に関与する重要な抗原であるが示された. 一方, CAAP による遊離は全く認められなかったが, これは血清中に CAAP に対する IgG 抗体量が少ないためと考えられる. 我々は, *Candida* 粗抗原に対する即時型皮膚反応陽性の気管支喘息患者を対象に *Candida* 粗抗原と CAAP による眼結膜誘発反応を実施した結果, *Candida* 粗抗原に対する反応陽性の内の 75% は CAAP に対する反応が陽性で, これらの症例では末梢血白血球のヒスタミン遊離および吸入誘発反応が陽性であったことから, CAAP が *C. albicans* による粘膜アトピー反応に関与する抗原であることを明らかにしている¹⁸⁾.

患者血清中の Mn A に対する IgG 抗体価は EPX の遊離量と相関しなかった. しかし, 患者血清の IgG 分画を用いて検討した結果から, IgG 抗体以外に血清中の何らかの因子が EPX の遊離に影響を与えている可能性が示唆された.

今回の研究において, 我々は *Candida* 抗原と IgG 抗体を介して in vitro で好酸球の脱顆粒が引き起こされることを明らかにした. *Candida* はヒトの体内に常在する真菌で宿主に対して常に抗原として作用していると考えられることから, このような好酸球の脱顆粒のメカニズムが非アトピー型慢性喘息の発症機序に関わっている可能性が考えられた.

文 献

- 1) Martin, L.B., Kita, H., Leiferman, K.M. and Gleich, G.J.: Eosinophils in Allergy: Role in Disease, Degranulation, and cytokines. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **109**, 207-215, 1996.
- 2) Abu-Ghazaleh, R.I., Fujisawa, T., Mestecky, J., Kyle, R.A. and Gleich, G.J.: IgA-induced eosinophil degranulation. *J. Immunol.* **142**, 2393-2400, 1989.
- 3) Kaneko, M., Swanson, M.C., Gleich, G.J. and Kita, H.: Allergen-specific IgG 1 and IgG 3 through Fc γ RII induce eosinophil degranulation. *J. Clin. Invest.* **95**, 2813-2821, 1995.
- 4) Horie, S. and Kita, H.: CD11 b / CD18 (Mac 1) is

- required for degranulation of human eosinophils induced by human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and platelet-activating factor. *J. Immunol.* **152**, 5457-5467, 1994.
- 5) Kaneko, M., Horie, S., Kato, M., Gleich, G.J. and Kita, H. : A crucial role for β 2 integrin in the activation of eosinophils stimulated by IgG. *J. Immunol.* **155**, 2631-2641, 1995.
 - 6) Horie, S., Okubo, Y., Hossain, T., Momose, T., Suzuki, J., et al. : Intercellular adhesion molecule-1 on eosinophils is involved in eosinophil protein X release induced by cytokines. *Immunology* **90**, 301-307, 1997.
 - 7) 秋山一男, 饗庭三代治, 柳川 洋, 吉良枝郎, 三上理一郎 : 我が国における成人気管支喘息の実態. 日胸疾会誌 **29**, 984-992, 1991.
 - 8) Akiyama, K., Shida, T., Yasueda, H., Mita, H., Yamamoto, T., et al. : Atopic asthma caused by *Candida albicans* acid protease ; case reports. *Allergy* **49**, 778-781, 1994.
 - 9) Akiyama, K., Shida, T., Yasueda, H., Mita, H., Yanagihara, Y., et al. : Allergenicity of acid protease secreted by *Candida albicans*. *Allergy* **51**, 887-892, 1996.
 - 10) Akiyama, K., Shida, T., Yasueda, H., Saito, A., Hasegawa, M., et al. : Assay for detecting IgE and IgG antibodies against *Candida albicans* cell wall mannan. *Allergy* **53**, 173-179, 1998.
 - 11) Shami, A.S. El. and Alaba, O. : Liquid-phase in vitro allergen-specific IgE assay with in situ immobilization. *Adv. Biosci.* **74**, 191-201, 1989.
 - 12) 池田泰子, 三田晴久, 秋山一男 : Interleukin-5 による気管支喘息患者好酸球からの活性酸素産生—フローサイトメトリー法による検討. アレルギー **43**, 1185-1193, 1994.
 - 13) Hartnell, A., Moqbel, R., Walsh, G.M., Bradley, B. and Kay, A.B. : Fc γ and CD11/CD18 receptor expression on normal density and low density human eosinophils. *Immunology* **69**, 264-270, 1990.
 - 14) Hartnell, A., Kay, A.B. and Wardlaw, A.J. : IFN- γ induce expression of Fc γ RIII (CD 16) on human eosinophils. *J. Immunol.* **148**, 1471-1478, 1992.
 - 15) Akiyama, K., Yui, Y., Shida, T. and Miyamoto, T. : Relationship between the results of skin, conjunctival and bronchial tests and RAST with *Candida albicans* in patients with asthma. *Clin. Allergy* **11**, 343-351, 1981.
 - 16) Jan, G.J. van de Winkel and Anderson, C.L. : Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. *J. Leukocyte Biology* **49**, 511-524, 1991.
 - 17) Takenaka, M., Tanaka, Y., Anan, S., Yoshida, H. and Ra, C. : High affinity IgE receptor-mediated prostaglandin E 2 production by monocytes in atopic dermatitis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **108**, 247-253, 1995.
 - 18) 秋山一男, 安枝 浩, 三田晴久, 柳原行義, 山本哲郎, 他 : *Candida albicans* が分泌する Acid Protease に対するアレルギー反応. アレルギー **42**, 1629-1632, 1993.

DEGRANULATION OF EOSINOPHILS BY IgG ANTIBODY TO *CANDIDA* ANTIGEN

Yasuko Ikeda, Haruhisa Mita, Makoto Kudo,

Maki Hasegawa and Kazuo Akiyama

Department of Clinical Research, National Sagami Hospital

The pathophysiological role of IgG antibody to fungi antigen widely distributed in environment such as *Candida albicans* in bronchial asthma has not been clarified. Wells of microtiter plate were coated with the extract of *Candida albicans* and then IgG antibody was immobilized on the wells by incubation with patient's serum. After cultivation of eosinophils on the well, degranulation of eosinophils, as assessed by quantitation of EPX in the supernatant, has been observed. Degranulation was completely abrogated after depletion of IgG in the serum and also decreased by incubation of the cells with anti-CD32 antibody, or anti-CD18 antibody, but not anti-CD23 antibody. Immune complex, which had been prepared by incubation of the extract of *Candida albicans* with patient's serum, also evoked degranulation of eosinophils. We have examined whether degranulation can be induced by two purified antigens of *Candida albicans*, i.e., mannan A and acid protease. IgG antibody to acid protease was detected at no or minimal levels in most sera and the antigen did not induce degranulation. On the other hand, mannan A induced degranulation. This observation may be due to response for the presence of IgG antibody to mannan A in the sera. These results suggest that immobilized IgG induced degranulation of eosinophils through Fc γ RII (CD 32) on eosinophils and mannan A is a major allergen associated with IgG-induced eosinophil degranulation.