

気管支喘息患児リンパ球のダニ抗原特異的 Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin 4 (IL-4) 産生に対する TYB-2285及びその代謝物の効果

¹⁾埼玉医科大学小児科, ²⁾毛呂病院第3光の家, ³⁾埼玉医科大学医動物学, ⁴⁾北里大学医学部小児科

黄 国輝¹⁾ 林 雅晴²⁾ 中島 忠¹⁾³⁾ 吉沢いづみ²⁾

川野 豊¹⁾⁴⁾ 敷島康史⁴⁾ 野間 剛¹⁾⁴⁾

ダニ抗原 (*Dermatophagoides farinae*, Df) で誘導される気管支喘息患児末梢血リンパ球の免疫応答に与える TYB-2285及びその代謝物の効果について検討した。

TYB-2285及びその代謝物には、高濃度の場合、軽度のリンパ球の芽球化反応を誘導する作用が認められたが、薬理学的濃度ではダニ抗原で誘導される気管支喘息患児リンパ球の芽球化反応に対する抑制作用が認められた。また TYB-2285及びその代謝物は、Con A (concanavalin A) で誘導されるリンパ球の芽球化反応には、ほとんど影響を与えなかった。以上より、TYB-2285及びその代謝物は Con A による芽球化反応を抑制するほどには強力ではないが、ダニ抗原刺激で誘導される芽球化反応を抑制する程度の作用をもつと考えられた。interferon- γ (IFN- γ) の産生の検討では、気管支喘息患児リンパ球をダニ抗原で刺激すると、TYB-2285及びその代謝物はダニ抗原刺激で低下を示した患児の IFN- γ 産生を健康者レベルを越えて濃度依存性に増強した。また interleukin 4 (IL-4) 産生の検討では、気管支喘息患児リンパ球をダニ抗原で刺激すると有意な IL-4産生細胞の増加を認めたが、この増加は TYB-2285の添加培養で有意に抑制された。以上から TYB-2285及びその代謝物は、薬理学的濃度では、ダニ抗原で誘導される増殖反応を抑制し、ダニ抗原刺激で低下した IFN- γ の産生を回復増強させ、また IL-4産生細胞を抑制することにより、IgE 産生系などの免疫応答を調節している可能性が示唆された。

Key words: bronchial asthma — Df-induced lymphocyte proliferation — IFN- γ production — IL-4 producing-cells(IL-4 production) — TYB-2285: 3,5-bis(acetoxyacetyl amino)-4-chlorobenzonitrile: C₁₅H₁₄N₃O₆Cl

緒 言

小児期の気管支喘息は、ダニ抗原で誘発されるものが多い。我々はこれまで、気管支喘息患児リンパ球をダニ抗原で刺激すると interferon- γ (IFN- γ) の産生が低下するが、健康者リンパ球においてはそのような現象は認められず¹⁾、気管支喘息寛解期の患児ではむしろ健康者レベルを越えて IFN- γ の産生の亢進を認め、これらの現象は小児気管支喘息の治癒起点となってい

る可能性のあることを報告した²⁾³⁾。また interleukin 4 (IL-4) は主に IgE 産生誘導因子として重要なサイトカインであり、IFN- γ の antagonist として作用することが知られている。気管支喘息患児リンパ球ではダニ抗原刺激より IL-4産生が増強されるが、寛解期の患児では IL-4産生が誘導されないことが報告されている³⁾。

一方、TYB-2285 (3,5-bis(acetoxyacetyl amino)-4-chlorobenzonitrile: C₁₅H₁₄N₃O₆Cl; 分子量 367.75: 東洋紡績) は合成化合物で (Fig. 1) 動物モデルにおいて抗炎症作用が認められており、ヒトのアレルギー性疾患においても抗アレルギー剤として有効性が期待されている⁴⁾⁻⁶⁾。

TYB-2285は経口投与により速やかに代謝され、TYB-2285及びその代謝物(TC-286, TC-326, TC-566)とこれらの抱合体が生体に作用して、抗炎症作用を発

Received: May 25, 1995

Accepted: May 13, 1997

Abbreviations: Con A concanavalin A; Df *Dermatophagoides farinae*; IFN- γ interferon- γ ; IL-4 interleukin 4; PBMC peripheral blood mononuclear cells; ³H-TdR ³H-thymidine

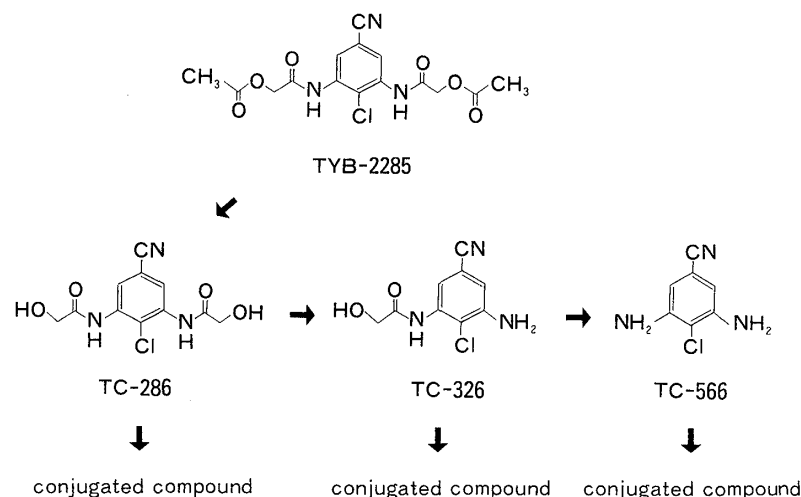


Fig. 1. A possible metabolic pathway of TYB-2285 in human beings.

揮すると考えられている。

本研究では、TYB-2285及びその代謝物の、気管支喘息患児リンパ球のダニ抗原で誘導される免疫反応に与える効果について検討したので報告する。

対象及び方法

1. 対象

可逆的に反復する呼吸性の呼吸困難及び血清総 IgE 値、ダニ抗原に対する RAST スコアなどの検査所見により気管支喘息と診断され、ステロイド、抗アレルギー剤で治療されていない患児12例（年齢 2～15歳）及びアレルギー症状を示さず、かつまた、その既往のない健康小児及び健康成人を対象とした。

2. 方法

1) 単核細胞の分離

ヘパリン加末梢血より Ficoll-Conray 比重遠心法⁷⁾により単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) を分離した。

2) 抗原刺激によるリンパ球の芽球化反応

PBMC を10%非動化 プール ヒト AB 血清 添加 RPMI 1640培養液を用いて $1 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度に調製し、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のダニ抗原 (*Dermatophagoides farinae*: Df, 鳥居薬品ロット No. K176) とともに5ml 培養チューブ (Falcon) を用いて培養した。培養液を交換して細胞数を $2 \times 10^5/0.2\text{ml}$ に再調製し、 $0.5 \mu\text{Ci}$ のサイミジン (^3H -TdR) を添加して24時間の ^3H -TdRの取り込み量を液体シンチレーションカウンターにて測定

した。

3) 抗原刺激によるリンパ球の IFN- γ の産生

PBMC を 2 %非動化 プール ヒト AB 血清 添加 RPMI 1640培養液を用いて $1 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度に調製し、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のダニ抗原、または $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の concanavalin A (Con A: Sigma) を添加し、5ml 培養チューブ (Falcon) を用いて 37°C 10% CO_2 培養器で5日間培養後、採取した培養上清中の IFN- γ 濃度を測定した。用いたヒト血清中に含まれる IFN- γ 量は1U/ml 以下であったことから、IFN- γ の評価に影響を与えていないと考えられた。

4) IFN- γ の測定

ウサギ抗ヒト IFN- γ 抗体 (PIF-3, 林原生物研究所) で被覆した96穴平底プレート (Limbro) をさらに $300 \mu\text{l}/\text{well}$ の0.25%gelatin (和光純薬) で、蛋白が飽和されていない面をブロックした後、採取した培養上清を 4°C で16時間反応させ、充分に洗浄し、1000倍希釈マウスモノクローナル抗ヒト IFN- γ 抗体 (MIF-3, 林原生物研究所, $50 \mu\text{l}/\text{well}$) を室温で2時間反応させた。更によく洗浄した後、200倍希釈ビオチン化ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Tago, $50 \mu\text{l}/\text{well}$) を 37°C で1時間反応させ、充分洗浄後1000倍希釈ストレプトアビジン結合ペルオキシダーゼ (BRL, $50 \mu\text{l}/\text{well}$) を添加し、室温にて15分間放置したのち、o-phenylenediamine (BRL) を基質としたサンドイッチ ELISA 法にて型通り行った。標準曲線は精製ヒト IFN- γ (Japan Chemical Research) を各濃度に希釈して作製した。本法による IFN- γ 測定の下限界濃度はほぼ1U/ml であった。

5) 抗原刺激によるリンパ球の IL-4産生測定

PBMC を10%非動化プールヒト AB 血清添加 RPMI 1640培養液を用いて 1×10^6 /ml の濃度に調製し、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のダニ抗原、または $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の Con A (Sigma) を添加し、5ml 培養チューブ (Falcon) を用いて、 37°C 10% CO_2 培養器で2日間培養した。マウスモノクローナル抗ヒト IL-4抗体 (380-1, 小野薬品, $30 \mu\text{g}/\text{ml}$) で被覆した96穴平底プレート (Linbro) をさらに $200 \mu\text{l}/\text{well}$ の0.25%gelatin (和光純薬) で、蛋白が飽和されていない面をブロックした後、3%胎児ウシ血清加培養液に浮遊させた採取した抗原刺激培養細胞 1×10^5 cells/well をプレート上で 37°C で16時間反応させた。十分に洗浄し細胞を除去した後、ポリクローナルラビット抗ヒト IL-4抗体 (BL-4, Genzyme, $4 \mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し、室温で2時間反応させた。更によく洗浄した後、1000倍希釈アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ラビット IgG 抗体 (Zymed, $50 \mu\text{l}/\text{well}$) を添加し、室温で2時間反応させた。充分洗浄後、 40°C に保持したアルカリフォスファターゼ基質を含む (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Sigma) を

0.02% Triton X-405 (BDH), 5.0mM MgCl_2 $1 \text{mg}/\text{ml}$ 加 0.1M 2-amino-2-methyl-1-propanol に溶解し作製した) 0.6%アガロース (Electlan) を添加した。 37°C で4時間静置したのち、出現する青色スポットを倒立顕微鏡で算定することにより、IL-4産生細胞数を測定した。

6) TYB-2285及びその代謝物 (TC-286, 326)

TYB-2285及びその代謝物 (TC-286, 326) (東洋紡) を pH 7.4 に調製した RPMI 1640培養液にて各濃度に希釈し、PBMC 1×10^6 /ml に添加培養して ^3H -TdR 取り込み、IFN- γ 産生及び IL-4産生細胞に与える影響を検討した。

7) 統計学的処理

Student two-tailed test を用いて統計学的解析を行い、危険率 5%以下を統計学的有意とした。

結 果

1. リンパ球の芽球化反応に与える TYB-2285及びそ

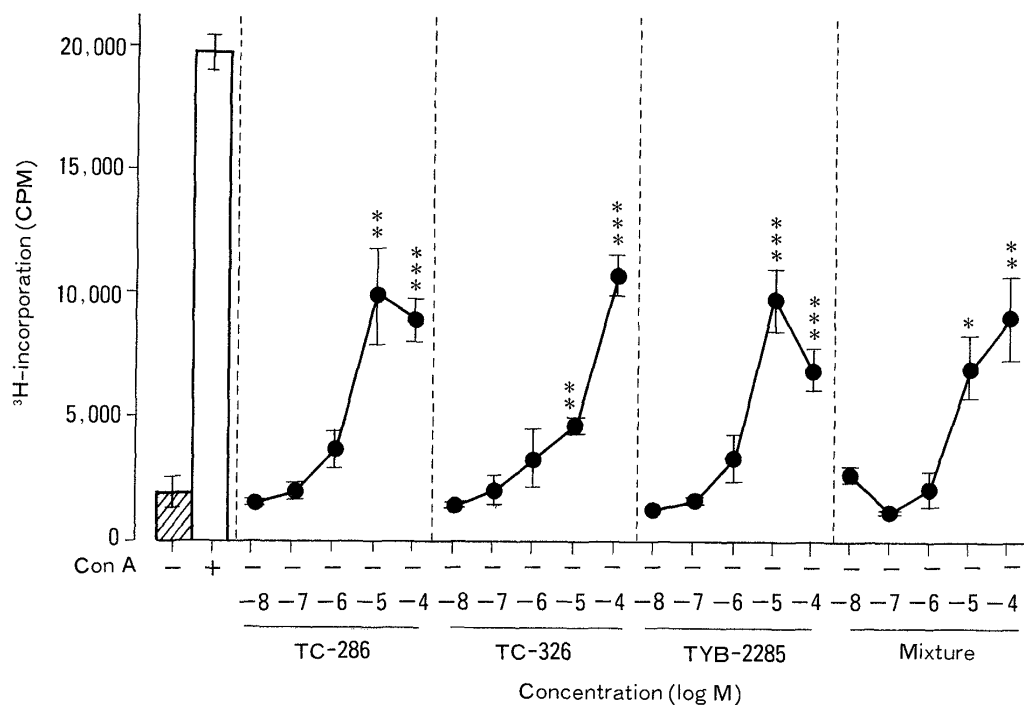


Fig. 2. a. Dose-dependent enhancement of PBMC proliferation induced by TYB-2285 and its metabolites. Representative data of four independent experiments was shown. ($n=4$)

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.02$, *** : $p < 0.01$. Asterisks indicate the significant difference compared to the corresponding values of unstimulated lymphocytes. Results showed Mean $\pm$ SE.

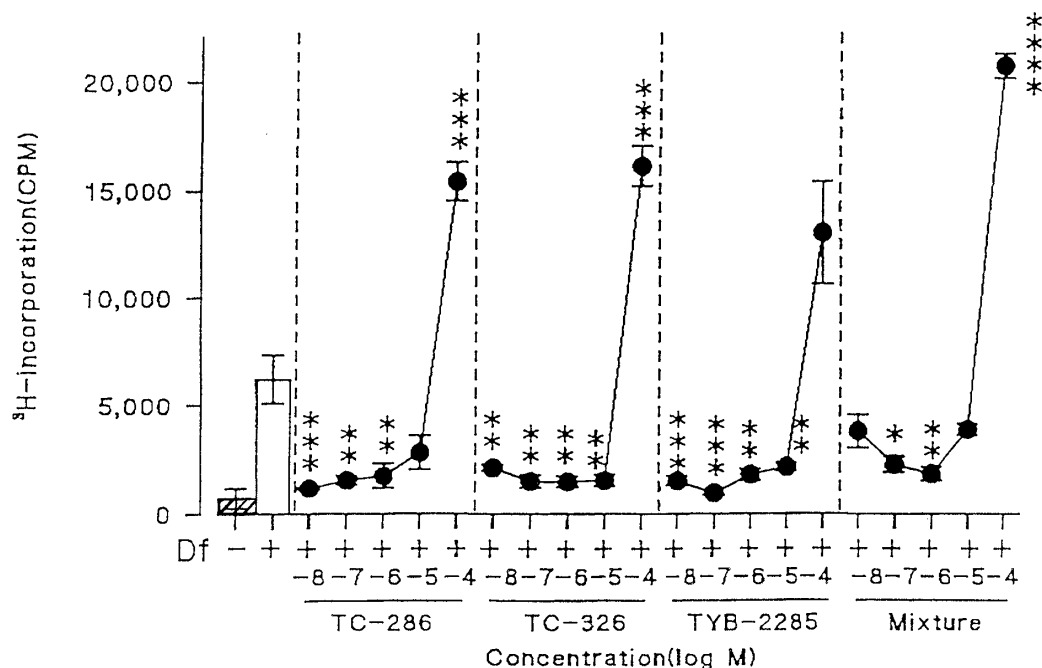


Fig. 2. b. Effect of TYB-2285 and its metabolites on the Df-induced proliferation of patients' PBMC. Representative data of three independent experiments was shown. (n=3)

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.02$, *** : $p < 0.01$, **** : $p < 0.001$. Asterisks indicate the significant difference compared to the corresponding values of Df-stimulated lymphocytes. Results showed Mean $\pm$ SE.

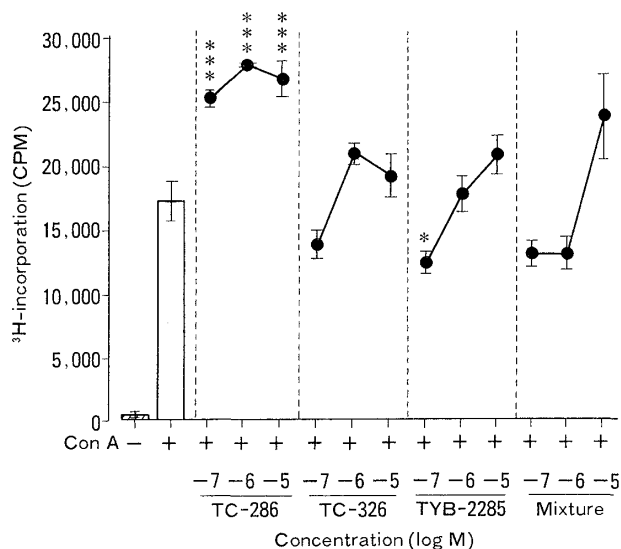


Fig. 2. c. Effect of TYB-2285 and its metabolites on the Con A-induced proliferation of patients' PBMC. Representative data of three independent experiments was shown. (n=3)

* : $p < 0.05$, *** : $p < 0.01$. Asterisks indicate the significant difference compared to the corresponding values of Con A-stimulated lymphocytes. Results showed Mean $\pm$ SE.

の代謝物の効果

$1 \times 10^{-5} \sim 10^{-4} \text{M}$ 濃度の TYB-2285 及びその代謝物により、リンパ球の芽球化反応の有意な増強が認められたことから、高濃度の TYB-2285 及びその代謝物はリンパ球の芽球化反応を誘導する作用をもつと考えられた (Fig. 2a). また TYB-2285 及びその代謝物の処理によるリンパ球の ^3H -TdR の取り込み量は Con A で誘導される芽球化反応と比較して弱かったことから TYB-2285 の芽球化反応は軽度なものであると考えられた (Fig. 2a).

次にダニ抗原刺激によるリンパ球の芽球化反応に与える TYB-2285 の効果について検討した. $< 10^{-5} \text{M}$ 濃度の TYB-2285 及びその代謝物の処理によりダニ抗原で誘導されるリンパ球の ^3H -TdR 取り込みは有意に抑制されたが、 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ の濃度では有意なリンパ球の芽球化反応の増強が認められた. これは比較的高濃度の場合には、TYB-2285 及びその代謝物には芽球化反応を誘導する作用があるためと考えられた (Fig. 2b).

次に Con A 刺激によるリンパ球の芽球化反応に与える TYB-2285 の効果を検討した. 代謝産物 TC-286 では増強作用を認めたが TYB-2285 及びその代謝物 TC-

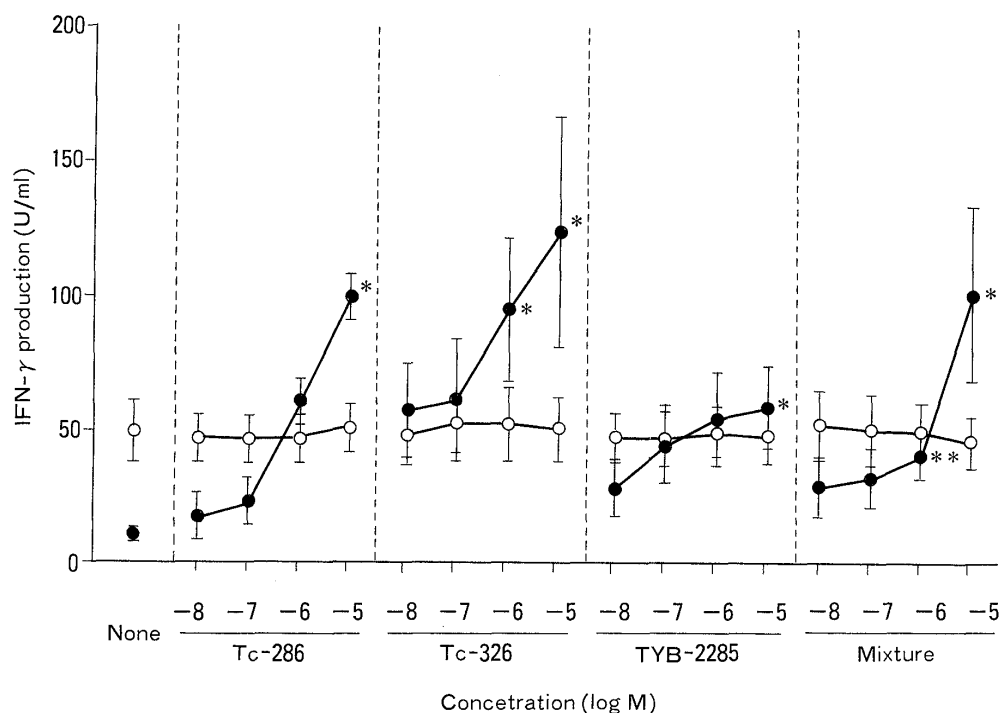


Fig. 3. a. Effect of TYB-2285 and its metabolites on IFN- γ production by patients' lymphocytes.

○ : unstimulated lymphocytes (n=3), ● : Df-stimulated lymphocytes (n=6), * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.02$. Asterisks indicate the significant difference compared to the corresponding values of Df-stimulated lymphocytes. Results showed Mean $\pm$ SE.

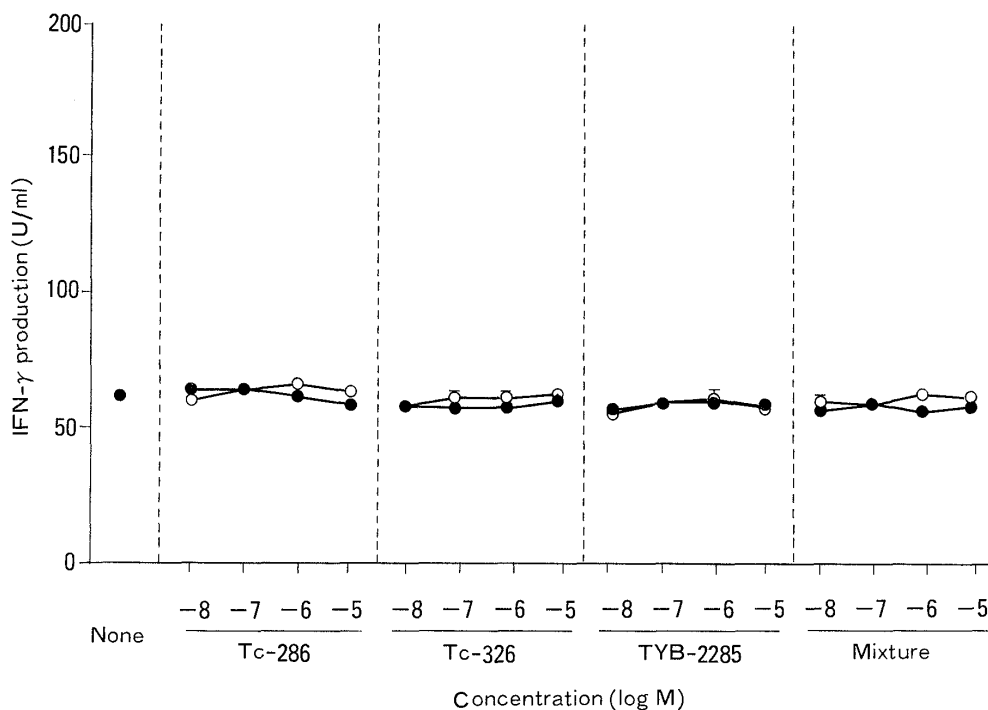


Fig. 3. b. Effect of TYB-2285 and its metabolites on IFN- γ production from normal lymphocytes. Representative data of three independent experiments was shown. (n=3)

○ : unstimulated lymphocytes, ● : Df-stimulated lymphocytes. Results showed Mean $\pm$ SE.

326はほとんど影響を与えなかった (Fig. 2c). これらの反応系において $1 \times 10^{-12} \sim 10^{-4} \text{M}$ の濃度の TYB-2285 及びその代謝物で処理された培養細胞の細胞生存率を検討したところ, トリパンプルー染色法にていずれも生細胞は95%以上保たれていた (データは示していない).

以上より TYB-2285 及びその代謝物は高濃度においては, それ自体リンパ球の芽球化反応を誘導する作用をもつが, 通常量を服用した場合の血中濃度に近い濃度, 薬理学的濃度 (最高血中濃度: 10^{-6}M) においてはダニ抗原で誘導されるリンパ球の芽球化反応を抑制する作用をもつと考えられた.

2. 気管支喘息患児末梢血リンパ球のダニ抗原特異的 IFN- γ 産生能に与える TYB-2285 及びその代謝物の効果

気管支喘息非寛解児 PBMC に, ^3H -TdR の取り込みの検討から有効であったと考えられる各濃度 ($1 \times 10^{-8} \sim 10^{-5} \text{M}$) の TYB-2285 及びその代謝物を添加培養しダニ抗原刺激で誘導されるリンパ球の IFN- γ に与える効果について検討した. 患児リンパ球をダニ抗原で刺激した場合, IFN- γ の産生はダニ抗原非刺激時と比較して低下を認めた.

TYB-2285 及びその代謝物 (TC-286, 326) の添加により, ダニ抗原で誘導される IFN- γ 産生は濃度依存性に増強された (Fig. 3a). TC-566 にはそのような作用は認められなかった (データは示していない). この結果より TYB-2285 の最終代謝物である TC-566 には, さほど強い生物活性は認められないと考えられた.

一方, 抗原非刺激で培養された正常者及び気管支喘息患児 PBMC では TYB-2285 及びその代謝物を添加培養しても, 有意な IFN- γ 産生の変動は認められず, ダニ抗原刺激で培養した正常者リンパ球の場合においても同様に IFN- γ 産生の変動は認められなかった (Fig. 3b). また, 気管支喘息寛解児 PBMC に TYB-2285 及びその代謝物を添加培養し, ダニ抗原刺激で誘導されるリンパ球の IFN- γ に与える効果について検討したが, ダニ抗原刺激により増加した IFN- γ の産生をさらに増強するような作用は認められなかった (データは示していない).

3. 気管支喘息患児末梢血リンパ球のダニ抗原特異的 IL-4 産生能に与える TYB-2285 及びその代謝物の効果

IL-4 産生細胞の検討では, 気管支喘息患児においてダニ抗原刺激により有意な IL-4 産生細胞の増加を認めた. この増加は $10^{-10} \sim 10^{-7} \text{M}$ 濃度の TYB-2285 の添

加培養で濃度依存性に抑制された. 10^{-6}M 以上の高濃度の TYB-2285 の添加培養では抑制効果は認められなかった. また TYB-2285 の添加培養は, Con A 刺激により誘導される IL-4 産生細胞の増加を抑制しなかった (Fig. 4).

以上より TYB-2285 及びその代謝物は単独処理により IFN- γ 産生を誘導するような作用はもたないが, ダニ抗原で刺激した患児リンパ球の低下した IFN- γ 産生を増強し, IL-4 産生細胞の増加を抑制する作用をもつと考えられた.

考 察

TYB-2285 は抗炎症作用を示す合成化合物で, ヒトのアレルギー疾患においても有効性が期待されている⁴⁾. 生体内に取り込まれると肝臓で速やかに代謝され, TC-286, TC-326, TC-566 などの産物がつくられ (Fig. 1), その抱合体が形成される. 服用時の最高血中濃度は 10^{-6}M であることから, 今回の実験では, $1 \times$

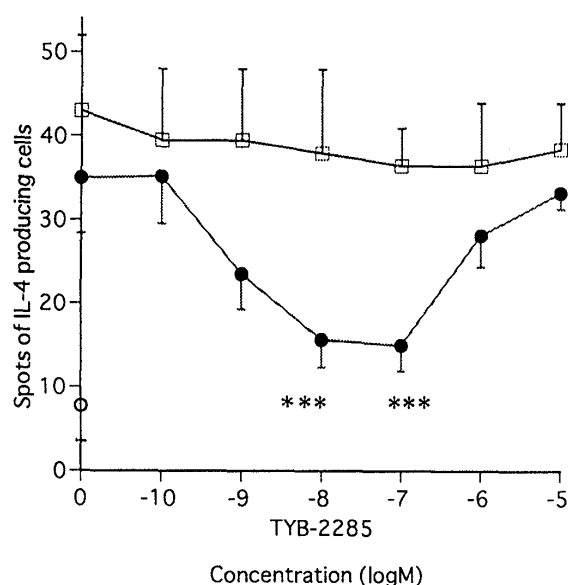


Fig. 4. Effect of TYB-2285 on the numbers of Df-induced IL-4 secreting cells ($/10^5 \text{PBMC}$) in patients with bronchial asthma.

□ : Con A-stimulated lymphocytes, ○ : unstimulated lymphocytes, ● : Df-stimulated lymphocytes ($n=3$).

*** : $p < 0.01$. Asterisks indicate the significant difference compared to the corresponding values of Df-stimulated lymphocytes. Results showed Mean $\pm$ SE.

10^{-10} ～ 10^{-4} M の濃度の範囲で検討を行った。

T 細胞は通常抗原提示細胞により活性化され、生体内では主に免疫系におけるヘルパー細胞、サプレッサー細胞、細胞障害性細胞、あるいは遅延型過敏反応誘導細胞として働く。I 型アレルギー反応の主体をなす IgE 産生系では、ヘルパー T 細胞 (Th₀ 及び Th₂ 細胞) 及びヘルパー T 細胞から分泌されるリンホカインの作用が重要な因子となっている^{8)~10)}。アレルゲンによってマクロファージなどの抗原提示細胞を介して活性化されたヘルパー T 細胞は、IL-2 を分泌することにより autocrine, paracrine に IL-2 反応 T 細胞の増殖を補助して免疫反応を増幅しながら、さらに IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ などのサイトカインを分泌する。これらのサイトカインのうち IL-4 は一般に IgE 産生を促進し IFN- γ はその産生を抑制することが報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。IFN- γ は活性化された T 細胞や NK 細胞から分泌されるが、本研究では、TYB-2285 のダニ抗原暴露時における気管支喘息患児末梢血リンパ球の芽球化反応及び IgE 産生系の調節因子である IFN- γ の産生及び IL-4 産生に与える影響について検討した。

はじめに TYB-2285 及びその代謝物の細胞増殖に対する処理効果を検討するために、ダニ抗原刺激で活性化したリンパ球の TYB-2285 及びその代謝物処理による ³H-TdR の取り込みを検討した。TYB-2285 及びその代謝物には高濃度の場合、軽度のリンパ球の芽球化反応を誘導する作用が認められ、薬理学的濃度 (最高血中濃度: 10^{-6} M) ではダニ抗原で誘導される気管支喘息患児リンパ球の芽球化反応を抑制する作用が認められた。また TYB-2285 及びその代謝物は Con A で誘導されるリンパ球の芽球化反応には、ほとんど影響を与えなかったことより、ダニ抗原刺激で誘導される芽球化反応に対する抑制作用をもつと考えられた (Fig. 2)。TYB-2285 が低濃度でリンパ球の活性化を抑制し、高濃度で増強する明らかな機序は不明であるが TYB-2285 自身が高濃度では mitogen としての作用をもつ可能性が示唆された。

次に気管支喘息患児のリンパ球のダニ抗原で誘導される IFN- γ 産生に与える影響について検討した。気管支喘息患児リンパ球を非刺激で培養した場合、軽度の IFN- γ の産生を認め、Con A 刺激時には著しい産生の亢進を認めたが、これらの産生は健康者リンパ球と比較して有意な差を認めなかった。この非刺激時の IFN- γ 産生は、生体は常に種々の抗原に暴露されており、これらの刺激に対する免疫反応のひとつとして生体内で

既に IFN- γ 産生細胞が活性化されていることを反映していると考えられる。患児リンパ球をダニ抗原で刺激した場合、IFN- γ の産生は健康者と比較して濃度依存性に低下を認めた¹⁾。その程度は $10\mu\text{g/ml}$ のダニ抗原刺激時に健康者リンパ球と比較して IFN- γ 産生の有意な低下を認めた ($p < 0.01$)¹⁾。一方、健康者リンパ球において産生される IFN- γ の量は、添加したダニ抗原の濃度に関係なくほぼ一定の値を示した¹⁾。

さらに患児でみられるダニ抗原で誘導される IFN- γ 産生の低下は、喘息寛解児では、正常者レベルを越えて著しい亢進を認めた²⁾。また患児リンパ球ではダニ抗原刺激により IL-4 産生が増強されるが、喘息寛解児では IL-4 産生が誘導されない³⁾。気管支喘息寛解児ではダニ抗原暴露により IgE を主体とするアレルギー反応の誘導が抑制されるフィードバック機構が働いていると考えられる。

これらの一連の概念に基づいて、本研究では TYB-2285 のダニ抗原で誘導される免疫アレルギー反応に対する作用機序を解明した。即ちアレルゲンで誘導されるリンパ球の活性化の程度を IFN- γ 産生及び IL-4 産生細胞を指標に評価し、この反応に与える TYB-2285 の処理効果を検討した。Fig. 3a にみられるように、TYB-2285 及びその代謝物である TC-286, 326 は 1×10^{-5} ～ 10^{-6} M 濃度でダニ抗原で誘導される低下した IFN- γ 産生を濃度依存性に増強した。これは成人男子が TYB-2285 を服用した場合、最高血中濃度が 10^{-6} M であることを考慮すると、in vitro の TYB-2285 の作用濃度は TYB-2285 の薬理学的濃度での生物学的活性の存在を反映していると考えられた。一方、健康者リンパ球においては TYB-2285 及びその代謝物を添加したことによる IFN- γ 産生の有意な変動は認められなかった。またこの濃度の範囲内では TYB-2285 は非刺激リンパ球の増殖反応を惹起しなかった (Fig. 2) ことより、薬理学的濃度においては TYB-2285 はそれ自体がリンパ球を芽球化する作用はもたないと考えられた。また気管支喘息患児 PBMC においては健康者 PBMC と比較して、ダニ抗原刺激にて有意な IL-4 産生細胞を認め、この増加は TYB-2285 の添加培養で有意な抑制を認めたが (Fig. 4)、これらの成績からも TYB-2285 は IgE 産生に対し抑制的に作用すると考えられた。

アレルゲン刺激で、低下した IFN- γ 産生が TYB-2285 により回復する詳細な機序は不明であるが、喘息寛解児における現象と同様に、TYB-2285 が、主にヘル

パーT細胞におけるTh1, Th2のインバランスを是正することにより, IFN- γ 産生を増強し, IL-4産生を低下させ, 免疫応答を調節していると考えられた.

本稿を終えるにあたり研究に用いたTYB-2285を提供していただいた東洋紡績株式会社医薬研究所に深謝いたします.

文 献

- 1) 黄 国輝, 川野 豊, 吉沢いづみ, 野間 剛: 気管支喘息患者末梢血リンパ球のinterferon- γ 産生能とその調節機構の解析. *アレルギー* 43, 482-491, 1994.
- 2) 野間 剛, 吉沢いづみ, 黄 国輝, 中村 靖, 川野 豊, 他: 気管支喘息寛解児の免疫学的側面とその臨床的意義, グニ抗原で誘導されるリンパ球のIL2反応性, 産生能の低下, 抗原暴露によるIFN- γ 産生能の亢進. *アレルギー* 42, 186-191, 1993.
- 3) Noma, T., Yoshizawa, I., Kou, K., Nakajima, T., Kawano, Y., et al.: Patterns of cytokine production by T cells from adolescents with asthma in remission, after stimulation with *Dermatophagoides farinae* antigen. *Ped. Res.* 38, 187-193, 1995.
- 4) Tominaga, T., Watanabe, A., Hayashi, H., Yanagihara, Y. and Koda, A.: Effect of TYB-2285 on histamine release from human basophils in the presence/absence of IL-3. *Gen. Pharmacol.* 24, 345-348, 1993.
- 5) Watanabe, A., Tominaga, T., Hayashi, H., Yanagihara, Y. and Koda, A.: Effect of TYB-2285 on antigen-induced histamine release from mouse bone marrow-derived persisting cells (P-cells) primed with interleukin-3-containing conditioned medium (IL3-CM). *Gen. Pharmacol.* 24, 1207-1211, 1993.
- 6) Muraki, M., Tohda, Y., Sugihara, R., Nagasaka, Y. and Nakajima, S.: The effect of TYB-2285 on dual phase bronchoconstriction and airway hypersensitivity in guinea-pigs actively sensitized with ovalbumin. *J. Pharmacol.* 46, 883-886, 1994.
- 7) Böyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21, 77-90, 1968.
- 8) Vercelli, D., Jabara, H.H., Arai, K. and Geha, R. S.: Introduction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC antigens. *J. Exp. Med.* 169, 1295-1307, 1989.
- 9) Vercelli, D., Haifa, H.J., Arai, K., Yokota, T. and Geha, R.S.: Endogenous interleukin 6 plays obligatory role in interleukin 4-dependent human IgE synthesis. *Eur. J. Immunol.* 19, 1419-1424, 1989.
- 10) Pene, J., Rousset, F., Briere, F., Chretien, I., Bonnefoy, J.Y., et al.: IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons γ and α and prostaglandin E₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 6880-6884, 1988.
- 11) Finkelman, F.D., Holmen, J., Katona, I.M., Urban, J.F. Jr., Beckmann, M.P., et al.: Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype selection. *Annu. Rev. Immunol.* 8, 303-330, 1990.

IMMUNOMODULATION BY TYB-2285 OF *DERMATOPHAGOIDES FARINAE* (Df)
ANTIGEN-INDUCED IFN- γ AND IL-4 PRODUCTION IN LYMPHOCYTES
FROM CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA

Kuniteru Kou¹⁾, Masaharu Hayashi²⁾, Tadashi Nakajima¹⁾³⁾, Izumi Yoshizawa²⁾,
Yutaka Kawano¹⁾⁴⁾, Yasufumi Shikishima⁴⁾ and Takeshi Noma¹⁾⁴⁾

¹⁾*Department of Pediatrics, Saitama Medical School,* ²⁾*Moro Hospital,*

³⁾*Department of Medical Zoology, Saitama Medical School,*

⁴⁾*Department of Pediatrics, School of Medicine Kitasato University*

Effect of TYB-2285 and its metabolites on immune responses by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from children with bronchial asthma was investigated. TYB-2285 and its metabolites have immunosuppressive activity for the proliferation by Df-stimulated patients' lymphocytes. Concanavalin A (Con A)-activated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from the patients were not affected by the same treatment. The results indicate that TYB-2285 and its metabolites are capable of suppressing antigen-induced ³H-thymidine (³H-TdR) uptake but not the response induced by Con A.

Interferon- γ (IFN- γ) production by Df-stimulated PBMC from patients with active asthma, which was lower than that of normal lymphocytes, were reversed beyond the levels of that in normal subjects. Thus reduced production of IFN- γ by Df-stimulated patients' lymphocytes was increased by TYB-2285 and its metabolites in a dose-dependent manner. This phenomenon was not observed in lymphocytes from normal subjects. Furthermore, TYB-2285 inhibited IL-4 production induced by Df antigen in asthmatic patients' lymphocytes. Taken, together, TYB-2285 could work as a weak immunosuppressant to modify lymphocytes' responses to allergen in patients with bronchial asthma. These data underscore the potential benefit for the patients with bronchial asthma.