

気管支喘息児の末梢血単核細胞における IgE 産生ならびに Interleukin 4 Messenger RNA, Interferon- γ Messenger RNA 発現の検討

同愛記念病院小児科

向山徳子 市川邦男 馬場 実

埼玉医大小児科

野間 剛

気管支喘息児の末梢血単核細胞(PBMC)における IgE 産生ならびに interleukin 4(IL-4) messenger RNA (mRNA), interferon γ (IFN- γ) mRNA 発現につき検討した。

喘息児の *Dermatophagoides farinae* (Df) 刺激 PBMC における IgE 産生は IFN- γ の添加により抑制され, 用量依存性が認められた。鶏卵アレルギーを伴う喘息児 ovalbumin (OVA) 刺激 PBMC における IgE 産生は IFN- γ の添加により抑制され, 用量依存性が認められた。

抗原刺激 PBMC における IFN- γ の IgE 産生抑制効果は anti IFN- γ mAb により阻止された。

PBMC における IgE 産生は抗原刺激により活性化されたのち, IFN- γ を添加することにより抑制された。

喘息児の PBMC においては無刺激の状態でも IL-4 mRNA の発現が認められた。喘息児の Df 刺激 PBMC における IFN- γ mRNA の発現は IFN- γ の添加により増強が認められた。喘息児の抗原刺激 PBMC における IgE 産生は IFN- γ 添加により抑制が認められ, かつ IL-4 mRNA 発現の抑制ならびに IFN- γ mRNA 発現の増強が認められた。

Key words: bronchial asthma — IgE — interleukin-4 — interferon- γ — messenger RNA

緒 言

IgE の産生は種々のサイトカインなどの影響をうけ調節されている。その抑制に関しては, IFN- α , IFN- γ , prostaglandin E₂, disodium cromoglycate, platelet activating factor, transforming growth factor- β , vasoactive intestinal peptide, somatostatin などにより産生が抑制されることが報告されている^{1)~5)}。

著者らは気管支喘息小児(以下喘息児)の末梢血リンパ球における自律的 IgE 産生は非アトピーの健康小児に比し増強しており, かつ IFN- γ によりその産生が抑制されることを報告した⁶⁾。

今回は, 喘息児の末梢血単核細胞における IgE 産生ならびに, IL-4 mRNA, IFN- γ mRNA の発現につき検討を加え, 若干の知見をえたので報告する。

対象と方法

1. 対象

喘息児15例と鶏卵アレルギーを伴う喘息児5例につき検討した。喘息児の年齢は7歳から15歳, 全例アトピー型で血清中のコナヒョウヒダニ(*Dermatophagoides farinae*, Df)に対するCAP RASTスコア4以上の症例である。鶏卵アレルギーを伴う症例は5例ともアトピー性皮膚炎を合併し, 血清中の卵白特異的IgE抗体はCAP RASTスコア2以上の症例である。経口抗アレルギー薬ならびに副腎皮質ステロイド薬を2週間以内に使用していない症例につき検討した。

Received: September 9, 1994

Accepted: January 19, 1995

Abbreviations: Df *Dermatophagoides farinae*; IL interleukin; IFN interferon; m-RNA messenger RNA; OVA ovalbumin; PBMC peripheral blood mononuclear cell

対照は非アトピー健康小児 5 例につき行った (年齢 7 歳~15 歳)。

2. 方法

1) 末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cell: PBMC) の分離・調整

ヘパリン加末梢静脈血を Ficoll-Paque (比重 1.077) 液に静かに重層し, 室温にて $250 \times g$, 30 分間遠心し, 中間層から単核細胞を分離した。

分離単核細胞を phosphate buffered saline (PBS) にて 3 回洗浄した。PBMC を 10% 非働化 (56°C, 30 分) ウシ胎児血清 (fetal calf serum, FCS) 加 RPMI1640 培養液を用いて細胞数 2×10^6 個/ml に調整した。

5% CO₂ 培養器内においてコナヒョウヒダニ (Df, 鳥居) 10 μ g/ml あるいは ovalbumin (OVA, Sigma) 20 μ g/ml を添加し刺激後, 24 時間後に PBS を用いて 3 回洗浄した。その後 human leukocyte interferon- γ (IFN- γ , JCR Pharmaceutical Co.) 200 U/ml を添加しさらに 3 日間培養した。

培養液を 4°C, $350 \times g$ にて 10 分間遠心し培養上清を採取した。培養上清ならびに細胞は IgE ならびに mRNA 測定まで -80°C にて保存した。

2) 培養上清中 IgE の測定⁷⁾

培養上清中の IgE の測定は 2 ステップサンドイッチ法を利用した全自動 EIA 装置 IMx (ダイナボット) により行った。最小検出感度は 0.05 IU/ml, CV は 7% である。

3) PBMC 中 mRNA の検出⁸⁾

検体より AGPC 法にて total RNA の抽出を行い, 吸光度測定後, total RNA 5 μ g を AMV reverse transcriptase により cDNA に合成した。次に, cDNA 1/20 volume (total RNA 250 ng 相当) を鋳型とし, DNA Thermal Cycler™ (GeneAmp™ PCR System 9600: Perkin-Elmer) を用いて, PCR 法により目的遺伝子 (IL-4, IFN- γ および β -actin) を増幅した。PCR products は 3% アガロースゲルで電気泳動後 (100 V, 3 hrs), Nylon 膜へ Southern transfer し, UV クロスリンカー (Stratagene 社) で DNA を固定 (120,000 μ J 照射) 後, Hybridize を行った。Hybridization には, ³²P 標識した internal probe を使用した。Hybridization 後, membrane filter を洗浄し, Autoradiography を行った。PCR products 量は, デンシトメーター解析により測定した。

mRNA 測定に用いたプローブは以下のごとくである。

IL-4 sense primer (23mer)

5'-ATG/GGT/CTC/ACC/TCC/CAA/CTG/CT-3'

IL-4 anti-sense primer (27mer)

5'-CGA/ACA/CTT/TGA/ATA/TTT/CTC/TCT/CAT-3'

IL-4 probe (24mer)

5'-AGC/CCT/GCA/GAA/GGT/TTC/CTT/CTC-3'

IFN- γ sense primer (29mer)

5'-ATG/AAA/TAT/ACA/AGT/TAT/ATC/TTG/GCT/TT-3'

IFN- γ anti-sense primer (26mer)

5'-GAT/GCT/CTT/CGA/CCT/CGA/AAC/AGC/AT-3'

IFN- γ probe (30mer)

5'-TCT/GGT/CAT/CTT/TAA/AGT/TTT/TAA/AAA/GTT-3'

結 果

1) 抗原刺激 PBMC の IgE 産生における IFN- γ の効果

喘息児の抗原刺激 PBMC における IgE 産生への IFN- γ の効果につき, その成績を Table に示す。

鶏卵アレルギーを伴わない喘息児 15 例の PBMC における IgE 産生については, 自律的 IgE 産生は 1.27 ± 0.28 IU/ml (Mean $\pm$ SE), IFN- γ 200 U/ml を添加した場合の IgE は 1.14 ± 0.29 IU/ml と軽度抑制された ($p < 0.01$)。

Df 10 μ g/ml を添加した場合の PBMC における IgE は 1.02 ± 0.27 IU/ml と自律的 IgE に比し軽度抑制され ($p < 0.01$), Df 刺激 PBMC に IFN- γ 200 U/ml を添加した場合の IgE は 0.89 ± 0.23 IU/ml とさらに IgE 産生の抑制が認められた (Fig. 1) ($p < 0.001$)。

一方 OVA を 20 μ g/ml 添加した場合の IgE は 1.22 ± 0.26 IU/ml であり, OVA 刺激後 IFN- γ を 200 U/ml 添加した場合の IgE は 1.27 ± 0.33 IU/ml と無刺激 PBMC の IgE 産生と差は認められなかった。鶏卵アレルギーを伴わない喘息児の PBMC における IgE 産生については, Df 刺激 PBMC に IFN- γ を添加した場合に IgE 産生の抑制が認められたが, OVA 刺激 PBMC においては IFN- γ 添加による抑制は認められなかった。

Table IgE production by antigen stimulated PBMC after which addition of IFN- γ

	None	IFN- γ (200U/ml)	Df (10 μ g/ml)	Df+ IFN- γ	OVA (20 μ g/ml)	OVA+ IFN- γ
Bronchial asthma without hen egg allergy (n=15)	1.27 $\pm$ 0.28	1.14 $\pm$ 0.29**	1.02 $\pm$ 0.27**	0.89 $\pm$ 0.23***	1.22 $\pm$ 0.26	1.27 $\pm$ 0.30
Bronchial asthma with hen egg allergy (n=5)	1.61 $\pm$ 0.91	0.95 $\pm$ 0.46*	1.23 $\pm$ 0.68*	0.85 $\pm$ 0.50*	1.19 $\pm$ 0.60*	1.00 $\pm$ 0.52*
Non atopy (n=5)	0.10 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.04	0.10 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.03

The value of IgE is revealed by (Mean $\pm$ SE) IU/ml.

* p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001 (versus spontaneous IgE production)

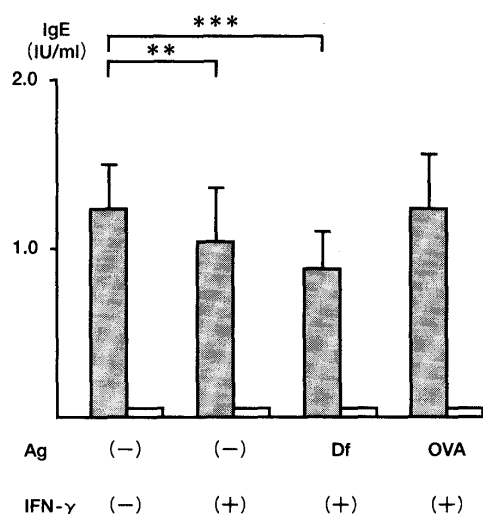


Fig. 1. Effect of IFN- γ on antigen stimulated PBMC IgE production in asthmatic children.

In asthmatic children without hen egg allergy spontaneous IgE production of PBMC showed 1.27 $\pm$ 0.28IU/ml (Mean $\pm$ SE) and Df stimulated PBMC IgE production after which IFN- γ decreased to 0.89 $\pm$ 0.23IU/ml (Mean $\pm$ SE) (p <0.001). OVA stimulated PBMC IgE production after which IFN- γ showed no decrease.

▨ : bronchial asthma without egg allergy, □ : non atopy, ** p <0.01, *** p <0.001

鶏卵アレルギーを伴う喘息児 5 例の PBMC における IgE 産生については、自発的 IgE 産生は 1.61 $\pm$ 0.91 IU/ml に対し、OVA 20 μ g/ml を添加した場合の IgE は 1.19 $\pm$ 0.60IU/ml と軽度抑制され (p <0.05), OVA 刺激 PBMC に IFN- γ を添加した場合の IgE は 1.00 $\pm$ 0.52IU/ml とさらに IgE 産生の抑制が認められた (p <0.05) (Fig. 2).

2) 抗原刺激 PBMC IgE 産生における IFN- γ の効果の用量依存性

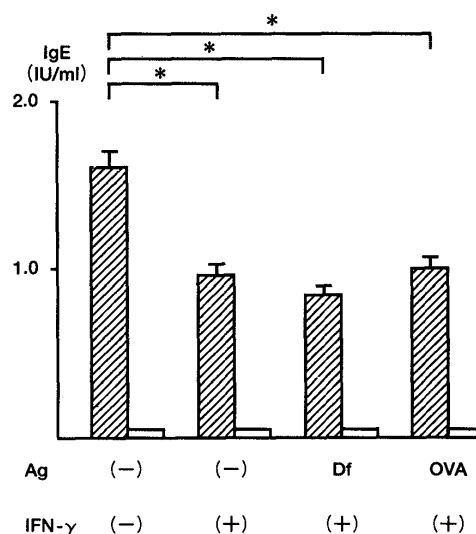


Fig. 2. Effect of IFN- γ on antigen stimulated PBMC IgE production in asthmatic children with hen egg allergy.

In asthmatic children with hen egg allergy, OVA stimulated PBMC IgE production after which IFN- γ decreased to 1.0 $\pm$ 0.52IU/ml (Mean $\pm$ SE). In spontaneous IgE production, it showed 1.61 $\pm$ 0.91 IU/ml (p <0.05).

▨ : bronchial asthma with egg allergy, □ : non atopy, * p <0.05

喘息児の Df 刺激 PBMC における IgE 産生への IFN- γ の効果について IFN- γ の濃度 50, 100, 200U/ml につき検討したところ、用量依存性に IgE 産生の抑制が認められた (Fig. 3). 非アトピー健康小児の Df 刺激 PBMC においてはいずれの濃度の IFN- γ 添加においても IgE 産生は認められなかった。

OVA 刺激 PBMC における IgE 産生への IFN- γ の効果については、鶏卵アレルギーを伴う喘息児については、IFN- γ の濃度 50, 100, 200U/ml につき検討したところ、用量依存性に IgE 産生の抑制が認められた

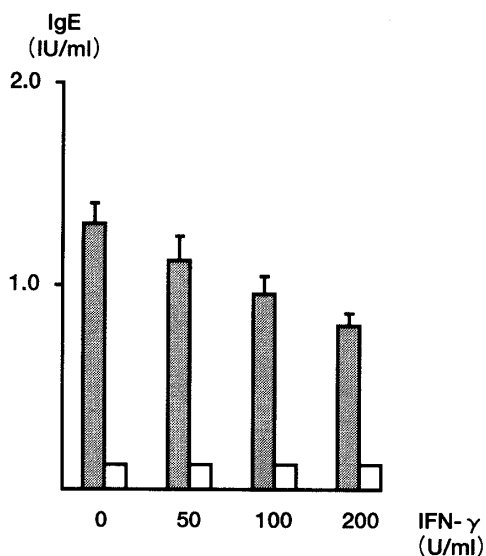


Fig. 3. The level of IgE in Df stimulate d PBMC followed by addition of IFN- γ decreased by concentration of IFN- γ .

▨ : bronchial asthma, □ : non atopy

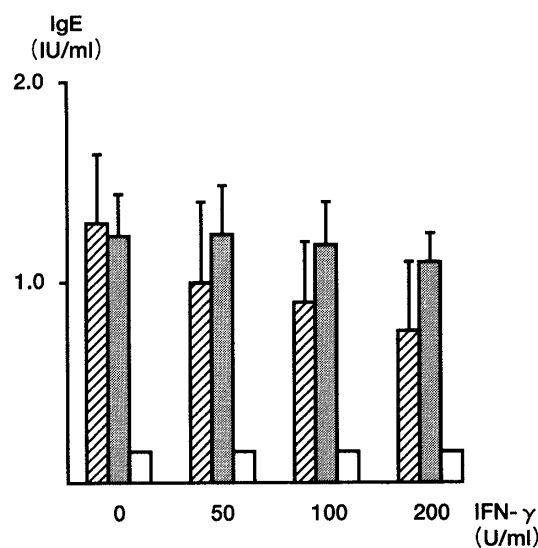


Fig. 4. The level of IgE in OVA stimulated PBMC followed by addition of IFN- γ decreased by concentration of IFN- γ .

▨ : bronchial asthma with egg allergy, ▩ : bronchial asthma without egg allergy, □ : non atopy

(Fig. 4). 一方、鶏卵アレルギーを伴わない喘息児の OVA 刺激 PBMC の IgE 産生における IFN- γ の効果については、各濃度の IFN- γ 添加においても IgE 産生の抑制は認められなかった。非アトピー健康小児の OVA 刺激 PBMC においてはいずれの濃度の IFN- γ

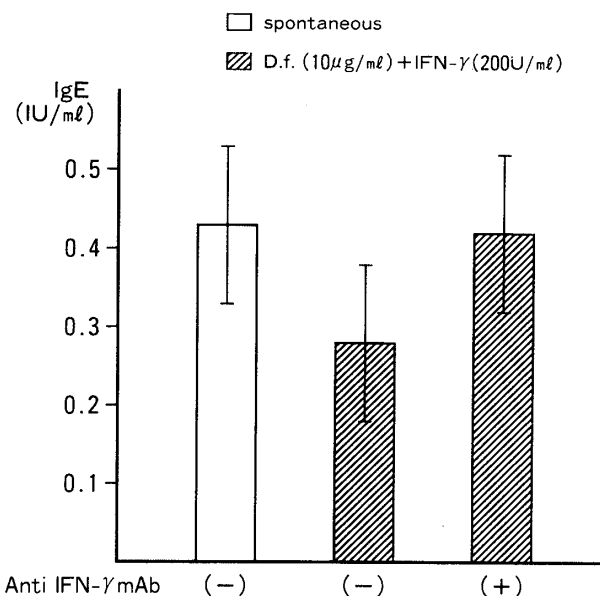


Fig. 5. Anti IFN- γ mAb neutralizes inhibitory effect of IgE production in Df stimulated PBMC.

添加においても IgE 産生は認められなかった。

3) 抗原刺激 PBMC IgE 産生における anti IFN- γ monoclonal antibody (mAb) の効果

PBMC に anti IFN- γ mAb (Hayashibara) を 10 μ l/ml 添加し 4 $^{\circ}$ C30 分間静置した。その後 Df 10 μ g/ml あるいは、OVA 20 μ g/ml と IFN- γ 200 U/ml を添加し 4 日間培養し IgE を測定した。

鶏卵アレルギーを伴わない喘息児において、PBMC を Df 10 μ g/ml にて刺激し、IFN- γ を添加し 4 日間培養した場合の培養上清中 IgE は 0.28 ± 0.06 IU/ml であり、無刺激の PBMC における IgE 値 0.43 ± 0.05 IU/ml に比し有意に低値を示していた ($p < 0.05$)。PBMC に anti IFN- γ mAb を 10 μ l/ml 添加し 4 $^{\circ}$ C30 分間静置し、その後 Df 10 μ g/ml ならびに IFN- γ 200 U/ml を添加し同様に 4 日間培養し IgE を測定した。IgE 値は 0.42 ± 0.06 IU/ml とその抑制は阻止された。喘息児の Df 刺激 PBMC における IgE 産生への IFN- γ の抑制効果は anti IFN- γ mAb の前処置により阻止された (Fig. 5)。

一方、鶏卵アレルギーを伴う喘息児において、PBMC を OVA 20 μ g/ml にて刺激し、IFN- γ を添加し 4 日間培養した場合の培養上清中 IgE は 0.45 ± 0.09 IU/ml であり、無刺激の PBMC における IgE 値 0.81 ± 0.19 IU/ml に比し有意に低値を示していた ($p < 0.05$)。PBMC に anti IFN- γ mAb を 10 μ l/ml 添加し 4 $^{\circ}$ C30 分間静置し、その後 OVA 20 μ g/ml ならび

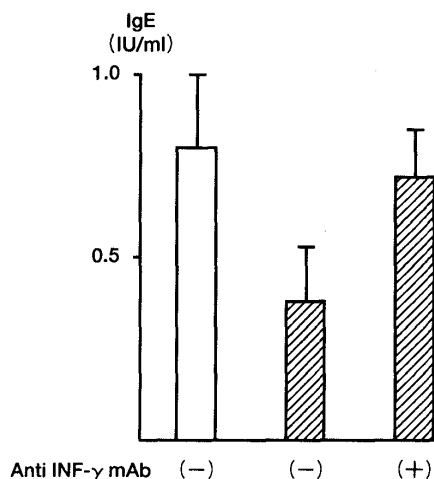
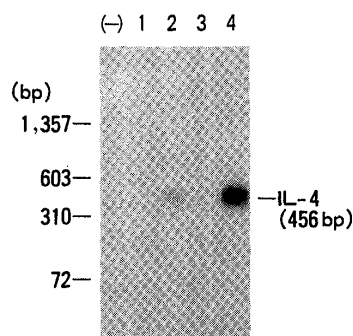


Fig. 6. Anti IFN- γ mAb neutralizes inhibitory effect of IgE production in OVA stimulated PBMC.

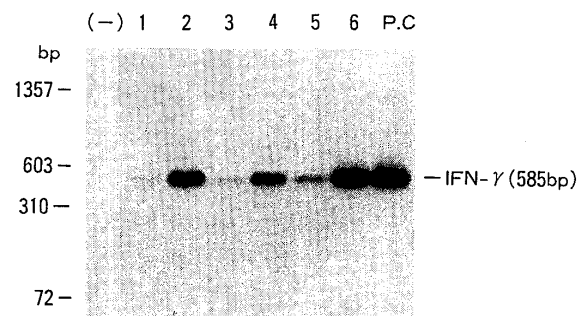
□: spontaneous, ▨: OVA (20 μ g/ml) + IFN- γ (200U/ml)



No.	Case	Volume
1	T. M. (healthy) spontaneous	-1.39
2	M. O. (Asthma) spontaneous	210.0
3	M. O. (Asthma) D.f. $\rightarrow$ IFN- γ	74.0
4	IL-4 positive control	2654

Fig. 7. IL-4 mRNA expression of PBMC. IL-4 mRNA was expressed in spontaneous PBMC in asthmatic child, but not in healthy non atopic child. IL-4 mRNA expression of PBMC was suppressed in Df stimulated PBMC followed by IFN- γ in asthmatic child.

に IFN- γ 200U/ml を添加し同様に 4 日間培養し IgE を測定した. IgE 値は 0.73 ± 0.20 IU/ml とその抑制は阻止された. 鶏卵アレルギーを伴う喘息児の OVA 刺激 PBMC における IgE 産生への IFN- γ の抑制効果は anti IFN- γ mAb の前処置により阻止された (Fig. 6).



No.	Case	Volume	PBMC IgE (IU/ml)
1	A. S. spontaneous	138	3.93
2	A. S. D.f. $\rightarrow$ IFN- γ	2941	1.67
3	K. I. spontaneous	349	1.19
4	K. I. D.f. $\rightarrow$ IFN- γ	1850	0.97
5	J. G. spontaneous	819	1.45
6	J. G. D.f. $\rightarrow$ IFN- γ	4754	1.01
P.C	Positive control	5317	

Fig. 8. IFN- γ mRNA expression of PBMC. In asthmatic children IFN- γ mRNA were expressed in Df stimulated PBMC after which IFN- γ . Simultaneously IgE production were suppressed in Df stimulated PBMC after which addition of IFN- γ .

4) 喘息児の PBMC における IL-4 mRNA の発現

喘息児 PBMC においては無刺激の状態でも IL-4 mRNA の発現が認められた (Fig. 7). 喘息児の Df 刺激 PBMC における IL-4 mRNA の発現は IFN- γ 添加により抑制が認められた. 一方非アトピー健康小児の PBMC においては, IL-4 mRNA の発現は認められなかった.

5) 喘息児の PBMC における IFN- γ mRNA の発現

喘息児 3 例について PBMC における IFN- γ mRNA の発現を測定した. 無刺激の場合と Df 刺激 PBMC に IFN- γ 200U/ml を添加し 4 日間培養後の IFN- γ mRNA 発現と, 同時に培養上清中の IgE を測定しその結果を Fig. 8 に示す.

No. 1 は症例 A.S. の無刺激 PBMC の IFN- γ mRNA 発現を示す. デンシトメーターの volume は 138, 同時に測定した PBMC の IgE 値は 3.93 IU/ml であった. No. 2 は同じ症例 A.S. につき, Df 刺激 PBMC に IFN- γ 200U/ml を添加し, 4 日間培養後の IFN- γ mRNA 発現を示す. デンシトメーターの volume は 2941 と著明に発現が増強し, 同時に測定した PBMC

の IgE 値は 1.67IU/ml と低下していた。

No. 3 は症例 K.I. の無刺激 PBMC の IFN- γ mRNA 発現を示す。デンスitomーターの volume は 349, 同時に測定した PBMC の IgE 値は 1.19IU/ml であった。No. 4 は同じ症例 K.I. につき, Df 刺激 PBMC に IFN- γ 200U/ml を添加し, 4 日間培養後の IFN- γ mRNA 発現を示す。デンスitomーターの volume は 1850 と著明に発現が増強し, 同時に測定した PBMC の IgE 値は 0.97IU/ml と低下していた。

No. 5 は症例 J.G. の無刺激 PBMC の IFN- γ mRNA 発現を示す。デンスitomーターの volume は 819, 同時に測定した PBMC の IgE 値は 1.45IU/ml であった。No. 6 は同じ症例 J.G. につき, Df 刺激 PBMC に IFN- γ 200U/ml を添加し, 4 日間培養後の IFN- γ mRNA 発現を示す。デンスitomーターの volume は 4754 と著明に発現が増強し, 同時に測定した PBMC の IgE 値は 1.01IU/ml と低下していた。

喘息児の Df 刺激 PBMC における IFN- γ mRNA の発現は IFN- γ により増強が認められた。同時に測定した喘息児の Df 刺激 PBMC における IgE 産生は IFN- γ の添加により抑制が認められた。

考 察

アトピー性疾患患者の PBMC においては, 自律的 IgE 抗体産生の亢進が認められている⁶⁾⁹⁾。IgE 産生の誘導とその抑制は種々のサイトカインによって調節されていることが明らかになってきた。ヒトの IgE 産生の誘導にあたっては, 各種のサイトカインが germline あるいは分泌型の IgE mRNA の発現を調節することによって IgE 産生の調節に関与している¹⁰⁾¹¹⁾。

IgE 産生の抑制に関与するサイトカインとしては IL-8¹²⁾, IL-12¹³⁾, TGF- β ⁴⁾, および一部の可溶性 CD23 (sCD23)¹⁴⁾ ならびに, IFN (α , γ)^{1)15)–20)} などがあげられる。IFN- γ は IL-4 依存性の IgE 産生を抑制することが知られている。

IFN- γ は IL-4 による IgE 産生に拮抗的に働く²¹⁾。B cell における IgE 産生は T cell からの IL-4 の量に比例し, IFN- γ の量に反比例する²²⁾。しかし, 一方では慢性喘息の患者において IgE 上昇は IL-4 の過剰産生とは関連するが, IFN- γ 産生の低下とは関連がなかったとする報告もある²³⁾。

IFN- γ と IFN- α は IL-4 により誘導される IgE 産生

を抑制し, また IL-4 により誘導される Fc ϵ RII の発現を抑制することが報告されている²⁴⁾。IFN- γ は IL-4 依存性の B cell 上の Fc ϵ RII/CD23 誘導を阻止するが²⁵⁾。単球上のそれは阻止しない²⁶⁾。

IFN- γ は IL-4 と lipopolysaccharide により刺激されたマウス B cell において ϵ germ-line 発現を抑制する。しかし, 一方で IL-4 で刺激されたヒト B cell においては抑制は観察されていない²⁷⁾。また, ヒトにおいて IFN- γ の標的細胞は B 細胞以外の別の細胞である可能性が示唆されている。

PBMC における IL-4 mRNA の発現に関してはアトピー性疾患患者につき血清 IgE 濃度依存性にその検出が認められている²⁸⁾。PBMC における IFN- γ mRNA の発現は IL-4 により抑制されることが観察されている²⁹⁾。IgE の産生には IL-4 による増強効果のみならず内因性の IFN- γ による抑制効果も重要と思われる。

しかし, IgE 産生における IFN- γ の抑制効果の機序に関しては不明な点が多い。

Cardell ら³⁰⁾は抗原で一次刺激をした CD4⁺細胞にさらに IFN- γ で二次的に刺激を加えると IFN- γ の産生が増強されることを in situ hybridization の方法を用いて報告している。また, Di Marzio ら³¹⁾はマウスの腹腔マクロファージを用い IFN- γ 添加により著明な IFN- γ mRNA の発現がみられ, かつ IFN- γ の分泌がみられたことを報告し, IFN- γ が autocrine mechanism を介して免疫反応の調節に関わっているものとしている。

今回著者らの成績においては, IgE 産生の抑制に関して抗原刺激 PBMC に IFN- γ を添加することにより抑制効果は増強されることが観察された。つまり, Df に感作された個体においては Df 刺激 PBMC に IFN- γ を添加した場合 IgE 産生は抑制されたが, OVA 刺激 PBMC に IFN- γ を添加しても IgE 産生の抑制は観察されなかった。一方, 鶏卵アレルギーを伴う個体においては, OVA 刺激 PBMC に IFN- γ を添加した場合 IgE 産生の抑制が観察された。アトピー性疾患の患者においては, IgE 産生の抑制機構にサイトカインに反応する抗原特異性の反応が存在することが推察される。その際 Df 刺激 PBMC に IFN- γ を添加した場合 IFN- γ mRNA は増強を認めた。抗原刺激により活性化された PBMC が IFN- γ の添加によりさらに内因性の IFN- γ が増強し, IgE 産生の抑制効果を発揮したものと考えられる。

Matsushita ら³²⁾はマウスにおいて IFN- γ による B 細胞の IgE 産生抑制には遺伝性のあることを認めている。しかし、IFN- γ による IgE 産生抑制と IFN- γ mRNA の発現には関連はみとめられず、B 細胞における IFN- γ に対する反応性には多様性が認められるとしている。

ヒトにおける IFN- γ mRNA の発現に関しては、Tang ら³³⁾³⁴⁾は血清 IgE 高値を示すアトピー性皮膚炎の小児の PBMC において、無刺激の状態での発現が認められ、一方 IFN- γ の分泌は低下し病態との関連性を指摘している。

アトピー性疾患の個体における IgE 産生調節機構について、その抗原性による違い、サイトカインに対する反応性の違いなどについては今後さらに検討されるべきものとする。

文 献

- 1) Pène, J., Rousset, F., Brière, F., Chretien, I., Bonnefoy, J.-Y., et al.: IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferon γ and α and prostaglandin E₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6880-6884, 1988.
- 2) Ishizaka, A., Sakiyama, Y., Nakanishi, K., Tomizawa, E., Oshika, E., et al.: The inductive effect of interleukin-4 on IgG4 and IgE synthesis in human peripheral blood lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 79, 392-396, 1990.
- 3) Deryckx, S., Malefyt, R.D.W., Gauchat, J.F., Vivier, E., Thomas, Y. and De Vries, J.E.: Immunoregulatory functions of paf-acether. VIII. Inhibition of IL-4-induced human IgE synthesis in vitro. *J. Immunol.* 148, 1465-1470, 1992.
- 4) Wu, C.Y., Brinkmann, V., Cox, D., Heusser, C. and Delespesse, G.: Modulation of human IgE synthesis by transforming growth factor- β . *Clin. Immunol. Immunopathol.* 62, 277-284, 1992.
- 5) Kimata, H., Yoshida, A., Fujimoto, M. and Mikawa, H.: Effect of vasoactive intestinal peptide, somatostatin, and substance P on spontaneous IgE and IgG4 production in atopic patients. *J. Immunol.* 150, 4630-4640, 1993.
- 6) 向山徳子, 伊藤わか, 市川邦男, 馬場 実, 野間剛: 気管支喘息児リンパ球における IgE 産生の検討. *アレルギー* 43, 474-481, 1994.
- 7) 岩崎栄作, 関根孝哉, 馬場 実, 斉藤保之, 池田旭, 石井 暢: 全自動 EIA 装置 IMx による血中 IgE 測定法の基礎的, 臨床的検討. *小児科臨床* 42, 1361-1375, 1989.
- 8) Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thicyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159, 1987.
- 9) Vollenweider, S., Saurat, J.-H., Röcken, M. and Hauser, C.: Evidence suggesting involvement of interleukin-4(IL-4) production in spontaneous in vitro IgE synthesis in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87, 1088-1095, 1991.
- 10) Vercelli, D. and Geha, R.S.: Regulation of IgE synthesis in humans: A tale of two signals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 88, 285-295, 1991.
- 11) 柳原行義: IgE 産生にかかわるサイトカイン. *臨床免疫* 25, 60-69, 1993.
- 12) Kimata, H., Yoshida, A., Ishioka, C., Lindley, I. and Mikawa, H.: Interleukin 8(IL-8) selectively inhibits immunoglobulin E production induced by IL-4 in human B cells. *J. Exp. Med.* 176, 1227-1231, 1992.
- 13) Kuniwa, M., Gately, M., Gubler, U., Chizzonite, R., Fargeas, C. and Delespesse, G.: Recombinant interleukin-12 suppresses the synthesis of immunoglobulin E by interleukin-4 stimulated human lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 90, 262-266, 1992.
- 14) Sarfati, M., Bettler, B., Letellier, M., Fournier, S., Rubio-Trujillo, M. et al.: Native and recombinant soluble CD23 fragments with IgE suppressive activity. *Immunology* 76, 662-667, 1992.
- 15) Finkelman, F.D., Katona, I.M., Mosmann, T.R. and Coffman, R.L.: IFN- γ regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J. Immunol.* 140, 1022-1027, 1988.
- 16) Finkelman, F.D., Holmes, J., Katona, I.M., Urban, J.F., Beskman, M.P., et al.: Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Ann. Rev. Immunol.* 8, 303-333, 1990.
- 17) Coffman, R.L. and Carty, J.: A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon- γ . *J. Immunol.* 136, 949-954, 1986.
- 18) Rabin, E.M., Mond, J.J., Ohara, J. and Paul, W. E.: Interferon- γ inhibits the action of B cell stimulatory factor (BSF)-1 on resting B cell. *J. Immunol.* 137, 1573-1576, 1986.

- 19) Snapper, C.M., Finkelman, F.D. and Paul, W.E.: Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin-4. *J. Exp. Med.* **167**, 183-196, 1988.
- 20) Thyphronitis, G., Tsokos, G.C., June, C.H., Levine, A.D. and Finkelman, F.D.: IgE secretion by Epstein-Barr virus-infected purified human B-lymphocytes is stimulated by interleukin-4 and suppressed by interferon- γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5580-5584, 1989.
- 21) Chre'tien, I., Pène, J., Brière, F., de Waal Malefyt, R., Rousset, F. and de Vries, J.E.: Regulation of human IgE synthesis. I. Human IgE synthesis in vitro is determined by the reciprocal antagonistic effects of IL-4 and IFN- γ . *Eur. J. Immunol.* **20**, 243-251, 1990.
- 22) Prete, G.D., Maggi, E., Parronchi, P., Chre'tien, I., Tiri, A., et al.: IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J. Immunol.* **140**, 4193-4198, 1988.
- 23) Gauchat, J.-F., Gauchat, D., De Weck, A.L. and Stadler, B.M.: Cytokine mRNA levels in antigen-stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Eur. J. Immunol.* **19**, 1079-1085, 1989.
- 24) Delespesse, G., Sarfati, M. and Peleman, R.: Influence of recombinant IL-4, IFN- α , and IFN- γ on the production of human IgE-binding factor (soluble CD23). *J. Immunol.* **142**, 134-138, 1989.
- 25) Defrance, T., Aubry, J.P., Rousset, F., Vanbervliet, B., Bonnefoy, J.Y., et al.: Human recombinant interleukin 4 induces Fc ϵ receptor (CD23) on normal human B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **165**, 1459-1467, 1987.
- 26) Vercelli, D., Jabara, H.H., Lee, B.-W., Woodland, N., Geha, R.S. and Leung, D.Y.M.: Human recombinant interleukin 4 induces Fc ϵ R2/CD23 on normal human monocytes. *J. Exp. Med.* **167**, 1406-1416, 1988.
- 27) Severison, E., Fernandez, C. and Stavnezer, J.: Induction of germline immunoglobulin heavy chain transcripts by mitogens and interleukins prior to switch recombination. *Eur. J. Immunol.* **20**, 1079-1084, 1990.
- 28) Okudaira, H., Mori, A., Akiyoshi, K., Yamamoto, K., Suko, M., et al.: Interleukin-4 gene expression and IgE responsiveness. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **94**, 184-186, 1991.
- 29) Peleman, R., Wu, J., Fargaeas, C., Delespesse, G.: Recombinant interleukin-4 suppresses the production of interferon- γ by mononuclear cells. *J. Exp. Med.* **170**, 1751-1756, 1989.
- 30) Cardell, S., Sander, B. and Mo'ller, G.: Primary stimulation of CD4+ cells in the presence of IL-4 or IFN- γ alters the frequencies of cytokine-producing cells at restimulation. *Scand. J. Immunol.* **36**, 769-777, 1992.
- 31) Di Marzio, P., Puddu, P., Conti, L., Belardelli, F. and Gessani, S.: Interferon γ upregulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophage. *J. Exp. Med.* **179**, 1731-1736, 1994.
- 32) Matsushita, S. and Katz, D.H.: B cell sensitivity to IgE-suppressive activity of IFN- γ is polymorphic and controlled by a non-H-2-linked gene. *Cell. Immunol.* **143**, 212-219, 1992.
- 33) Tang, M.L.K. and Kemp, A.S.: Production and secretion of interferon-gamma (IFN- γ) in children with atopic dermatitis. *Clin. Exp. Immunol.* **95**, 66-72, 1994.
- 34) Tang, M.L.K., Varigos, G. and Kemp, A.S.: Reduced interferon-gamma (IFN- γ) secretion with increased IFN- γ mRNA expression in atopic dermatitis; evidence for a post-transcriptional defect. *Clin. Exp. Immunol.* **97**, 483-490, 1994.

IgE PRODUCTION AND GENE EXPRESSION OF INTERLEUKIN-4 AND
INTERFERON- γ BY PERIPHERAL MONONUCLEAR
CELLS IN ASTHMATIC CHILDREN

Tokuko Mukoyama, Kunio Ichikawa, Minoru Baba and Takeshi Noma*

Department of Pediatrics, Doai Memorial Hospital

**Department of Pediatrics, Saitama Medical University*

In asthmatic children without he egg allergy, spontaneous IgE production of PBMC showed 1.27 ± 0.28 IU/ml (Mean $\pm$ SE) and IgE production of *Dermatophagoides farinae* (Df) stimulated PBMC after which IFN- γ decreased to 0.89 ± 0.23 IU/ml (Mean $\pm$ SE) ($p < 0.001$). IgE production of Ovalbumin (OVA) stimulated PBMC after which IFN- γ showed no decrease.

In asthmatic children with hen egg allergy, IgE production of OVA stimulated PBMC and IFN- γ decreased to 1.0 ± 0.52 IU/ml (Mean $\pm$ SE). In spontaneous IgE production it was 1.61 ± 0.91 IU/ml ($p < 0.05$).

IL-4 mRNA was expressed in spontaneous PBMC in asthmatic children, but not in healthy non atopic children. The expression of IL-4 mRNA was suppressed in Df stimulated PBMC followed by IFN- γ in asthmatic children.

In asthmatic children, IFN- γ mRNA were expressed in Df stimulated PBMC after which IFN- γ . And simultaneously IgE production in Df stimulated PBMC were suppressed by addition of IFN- γ .
