

〔原 著〕

喘息児と水泳

第4編 Phytohemagglutinin 及び抗原刺激による単核球からの

Neutrophil Chemotactic Activity 遊離の有無の検討

東京慈恵会医科大学小児科

恩田威文

国立小児医療研究センター免疫アレルギー研究部

永倉俊和 飯倉洋治

我々はすでに運動誘発性喘息 (EIA) の際にみられる末梢血中の high molecular weight neutrophil chemotactic activity (HMW-NCA) の上昇が、ほぼ同程度の運動量の水泳では認められないことを報告した。また、この HMW-NCA に関しては抗原吸入および EIA の際の late reaction で二相性に上昇することから、マスト細胞のみならず、それ以外の細胞にも、その起源があることが示唆された。そこで今回は単核球からの NCA の遊離について検討を行った。

ダニ抗原陽性の喘息患者と正常人のヘパリン加静脈血の単核球をリンパ球、単球に分離した。それぞれの細胞に phytohemagglutinin (PHA) およびダニ抗原を添加し、培養上清中の NCA 活性をボイデン法により測定し、分子量をゲル濾過で決定した。

NCA は PHA では培養時間48時間でピークに達し、抗原刺激では濃度依存性であり、 $50\mu\text{g/ml}$ でピークに達した。NCA の分子量はいずれも30000daltons 以下のいわゆる低分子量域に認められたが、従来からいわれている600000daltons の HMW-NCA は認められなかった。

Key words: exercise-induced asthma — high molecular weight neutrophil chemotactic activity — lymphocytes — mononuclear cells — phytohemagglutinin

はじめに

high molecular weight neutrophil chemotactic activity (以下 HMW-NCA と略す) は、1977年に Atkins ら¹⁾によって抗原吸入時の気管支喘息患者の血清中から見いだされた。我々はすでに、喘息児と水泳第3編²⁾の中で、運動誘発性喘息 (exercise-induced asthma; 以下 EIA と略す) の際にみられる末梢血中の HMW-NCA の上昇がほぼ同程度の運動量の水泳

では認められないことを報告したが、この場合の HMW-NCA の起源はマスト細胞と推測されていた。しかし、抗原吸入³⁾及び EIA⁴⁾の際の late reaction で HMW-NCA が二相性に上昇することが見いだされ、マスト細胞のみならず、それ以外の細胞からも HMW-NCA の遊離があることを考える必要が出てきた。

そこで、今回我々は単核球を phytohemagglutinin (以下 PHA と略す) 及びダニ抗原で刺激し、培養上清中の HMW-NCA の遊離の有無について検討した。

Received: December 8, 1986

Accepted: April 16, 1987

Abbreviations: ANAE α -naphthyl acetate esterase, DSCG disodium cromoglycate; EIA exercise-induced asthma, FCS fetal calf serum; HMW-NCA high molecular weight neutrophil chemotactic activity; LMW-NCA low molecular weight neutrophil chemotactic activity; NCA neutrophil chemotactic activity; PBS phosphate buffered saline; PHA phytohemagglutinin

対象及び方法

実験1. PHA 刺激による単核球からの NCA の遊離の検討

正常人5人のヘパリン加静脈血を無菌的に20%容量の3%デキストランと混和した。上清部分の白血球層部を比重1.077の Ficoll-Conray に静かに重層し、

400×g で30分間遠心分離をした。中間層の単核球を RPMI1640+10% fetal calf serum（以下、FCS と略す）で2回洗浄し、細胞数を 1×10^6 個/ml に調整した。これに容量で1%の PHA を添加し、37°C、5%CO₂ の条件で培養した。培養時間は、6、24、48、72時間とし、培養液上清中の neutrophil chemotactic activity（以下 NCA と略す）を後述の方法で測定した。

各培養時間後の培養液を600×g、10分間の遠心分離を行った。上清を phosphate buffered saline (PBS) で4°C、24時間の透析を行った。補体の C_{3a}、C_{3b} が遊走能を有するので、56°C、30分間の非働化を行った。NCA は modified Boyden chamber 法⁵⁾を用いて測定した。

結果は、フィルター中心部の好中球が比較的均等に分布している部分を光学顕微鏡の強拡大（400倍）を使用して無作為に10視野カウントし、合計の好中球数を NCA とした。

なお、intra-assay 及び inter-assay of variation は 19.5% 及び 35% であった⁶⁾。

培養液は、XM300（Amicon 社製）により限外濾過し、上清を20倍に濃縮した。

実験2. adherent cell と non adherent cell の分離と PHA 刺激による NCA の遊離の検討

喘息児3人のヘパリン加静脈血を実験1と同様の方法で単核球を分離し、細胞数を 1×10^6 個/ml に調整した。この細胞を RPMI1640+10% FCS に浮遊させた。細胞浮遊液を熊谷ら⁷⁾の方法に準じて直径10cm のガラス製滅菌シャーレに注入し、37°C、5%CO₂ の条件で3時間培養を行った。培養後、培養液中に浮遊している non adherent cell とシャーレガラス表面に吸着している adherent cell の2群に分けた。両細胞を RPMI で2回洗浄し、細胞数を 1×10^6 個/ml に調整した。容量で1%の PHA を添加し、37°C、5%CO₂ の条件で48時間培養を行った。

これらの培養液上清を透析、非働化後上清中の NCA を実験1と同様の方法で測定した。

正常人2人のヘパリン加静脈血から得られた単核球についても同様の操作を行い NCA を測定した。

実験3. 抗原刺激による単核球からの NCA の遊離の検討

ダニ抗原に対して IgE RAST スコア 3 以上、皮膚テスト（ブリックテスト、皮内テスト）が強陽性の喘息児3例のヘパリン加静脈血について実験1と同様の方法で単核球を分離した。なお、減感作療法、及び、

ステロイド剤の投与を受けていない患児を対象とした。また、採血前12時間以上は disodium cromoglycate (DSCG) などの抗アレルギー剤や気管支拡張剤の使用は中止した。細胞数を 1×10^6 個/ml に調整し、鳥居薬品社製アレルギーエキス・ダニ（K001）を窒素タンパク量として1、10、50、100μg/ml を添加した。37°C、5%CO₂ の条件で RPMI 内で30分間培養を行った。この培養液上清中の NCA を実験1と同様の方法で測定した。

実験4. 各実験の NCA の分子量の決定

実験1、2、3のそれぞれの実験で NCA の上昇が認められた培養液上清を Pharmacia 社製の Sephacryl S-400 を充填したカラム（0.8×80cm、流速4ml/ml、0.8 ml/fraction）を用いてゲル濾過を行い、得られたフラクションについて NCA を測定した。

結 果

実験1. PHA 刺激による単核球からの NCA の遊離の検討

正常人5人のヘパリン加静脈血で実験を行ったが、すべて同様の結果であったので、その代表例を Fig. 1 に示した。6時間培養で NCA は活性が上昇し始め、48時間でピークに達し、72時間で低下した。コントロールにおいても NCA 活性の上昇が認められたが、PHA 刺激群より低値を示した。

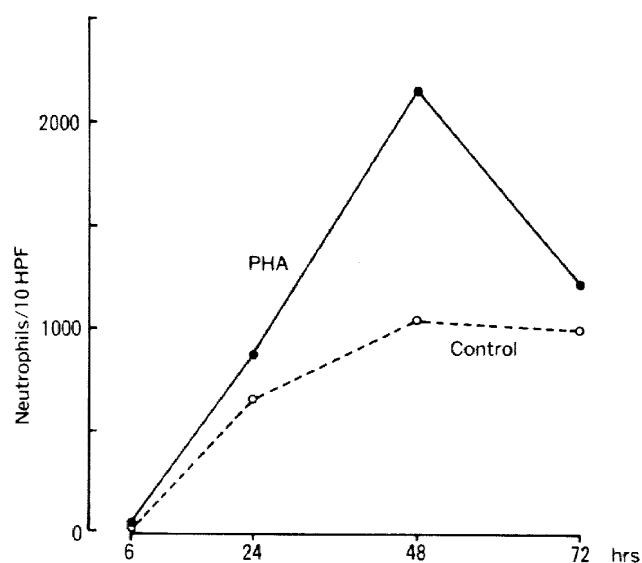


Fig. 1. NCA in supernatant of cultured mononuclear cells challenged with PHA (●—●) without PHA (○—○: control)(n=5).

また、この実験で ^3H -サイミジン吸収試験を施行した。48時間培養の ^3H -サイミジンの取り込みはPHAを加えていないコントロールに対して約100倍の差が認められて、単核球はPHAに刺激されて、幼若化が起きたことが示された。

実験2. adherent cell と non adherent cell の分離とPHA刺激によるNCAの遊離の検討 (Table 1)

実験1の結果より培養時間は48時間とした。喘息児3例のヘパリン加静脈血について行ったが、Table 1に示すように、adherent cell non adherent cell 培養液上清中のNCAは、両群共にPHAを添加していないコントロールに比べて大きく上昇していた。

各群の細胞の回収率をみるためANAE (α -naphthyl acetate esterase) 染色⁸⁾を行った。ANAE染色はリンパ球および単球の判別にも使われ、染色の特徴により単球、Tリンパ球、Bリンパ球に区別できるものである。我々の回収率は、adherent cell の中でTリンパ球は $11.8 \pm 2.1\%$ (MEAN $\pm$ SEM), Bリンパ球は $26.6 \pm 1.3\%$, 単球は $62.4 \pm 2.0\%$, non adherent cell の中でTリンパ球は $76.0 \pm 2.0\%$, Bリンパ球は

Table 1 NCA release from adherent cells and non adherent cells (PHA challenged)

Group \ Study No.	1	2	3
Control	34	12	17
Non adherent cells	314	211	211
Adherent cells	308	207	224

(NCA: Neutrophils/10HPF)

$20.0 \pm 1.5\%$, 単球は $4.0 \pm 0.7\%$ であった。

実験3. ダニ抗原刺激による単核球からのNCAの遊離の検討

喘息児3例のヘパリン加静脈血について実験を行ったがすべて同様の傾向が得られたので、その代表例をFig. 2に示した。ダニ抗原刺激により単核球からNCAの遊離が認められた。NCAの上昇はダニ抗原濃度に依存性であり、その至適濃度は $50 \mu\text{g/ml}$ であった。

実験4. 各実験のNCAの分子量の決定

実験1について (Fig. 3)

48時間で培養液上清中のNCAが最大値を示した。

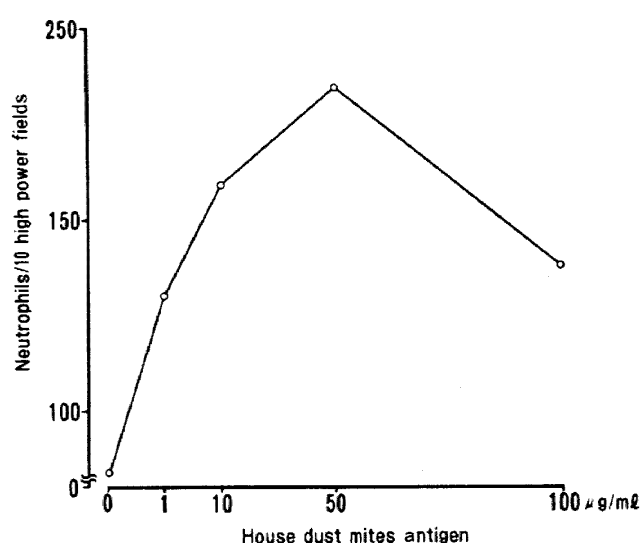


Fig. 2. NCA in supernatant of cultured mononuclear cells challenged with house dust mites antigen (n=3)(cultured for 30 min).

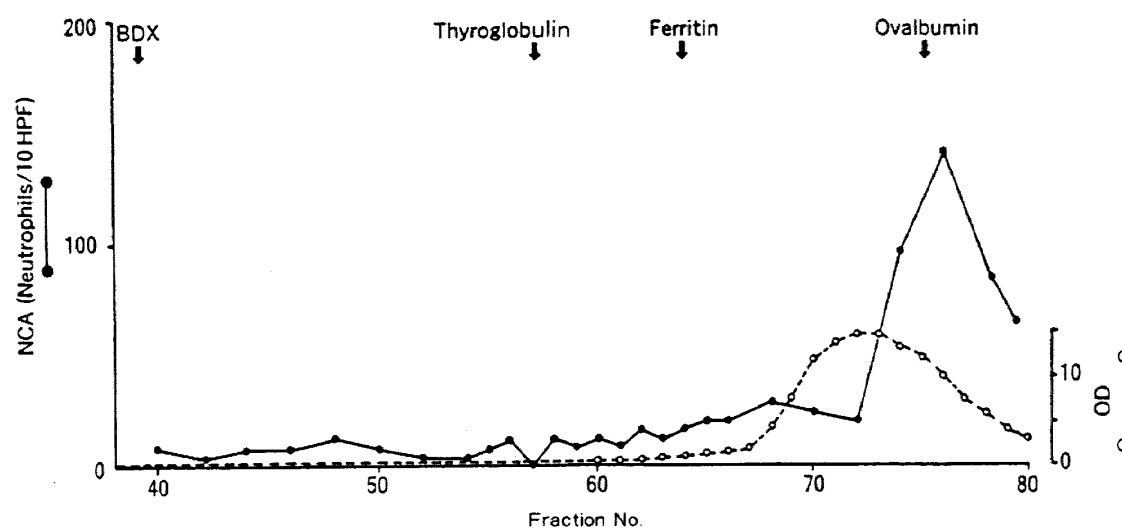


Fig. 3. NCA in supernatant of cultured mononuclear cells challenged with PHA for 48hrs (n=5)(Sephacry S-400 gel filtration chromatography).

この上清をゲル濾過にかけた。5例すべてが同様の傾向を示し、その代表例を Fig. 3 に示した。NCA 及び吸光度はオブアルブミン（30000 daltons）付近に一致して認められた。

喘息児 3 例についても同様の結果が得られ、その代表例を上記正常児の結果と対比して Fig. 4 に示した。

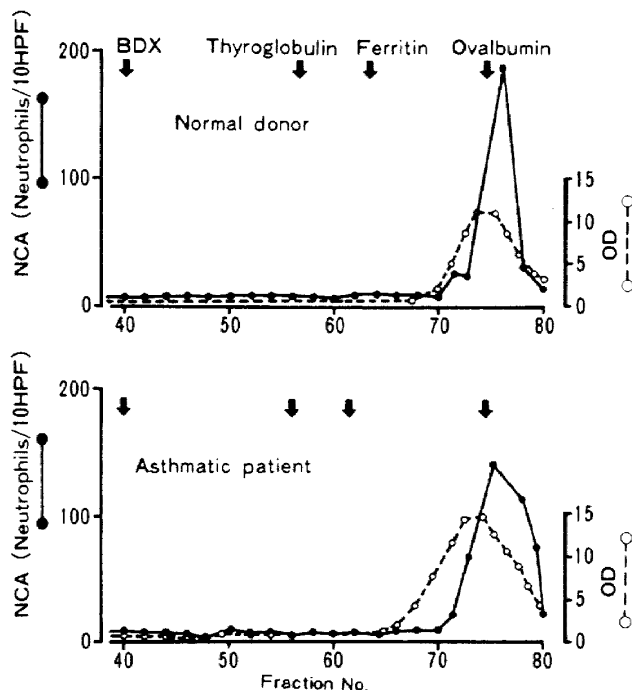


Fig. 4. NCA in supernatant of cultured mononuclear cells challenged with PHA for 48hrs. Normal donor (n=5: upper column) Asthmatic patient (n=3: lower column). (Sephacryl S-400 chromatography)

両者とも低分子量域の NCA の上昇を認めるのみであった。

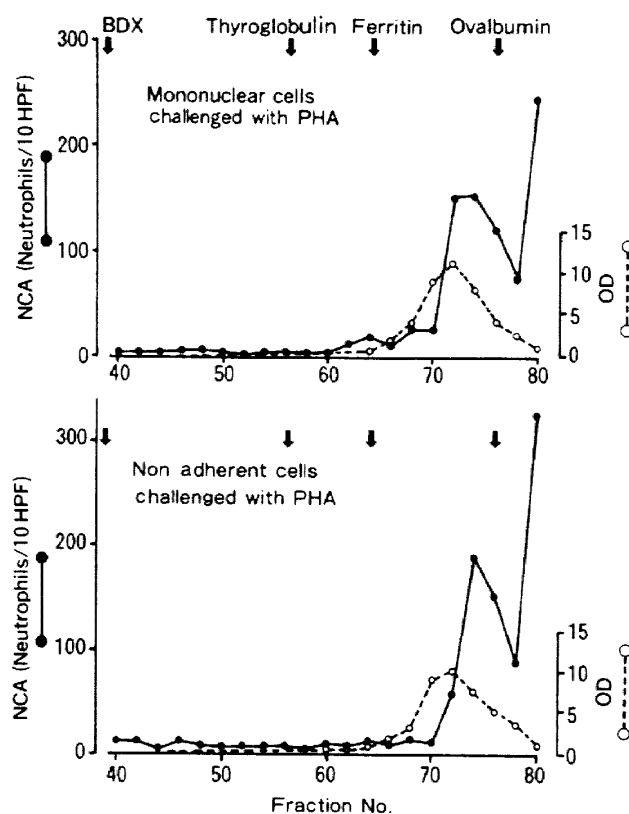


Fig. 5. NCA in supernatant of cultured mononuclear cells challenged with PHA (upper column, n=3).

NCA in supernatant of cultured non adherent cells challenged with PHA (lower column, n=3). (Sephacryl S-400 gel filtration chromatography)

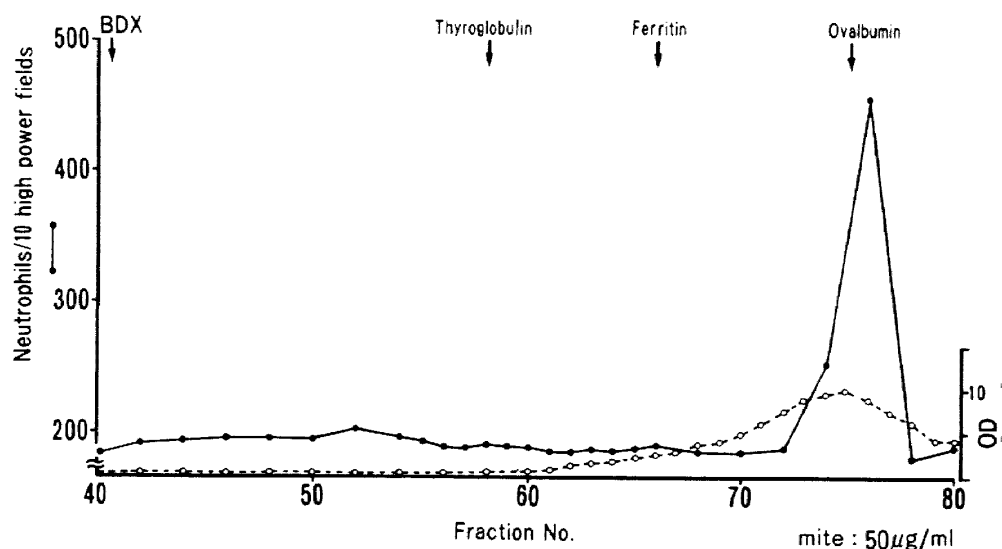


Fig. 6. NCA in supernatant of cultured mononuclear cells challenged with house dust mites for 48 hrs (n=3). (Sephacryl S-400 gel filtration chromatography)

実験2について (Fig. 5)

non adherent cell の培養液上清をゲル濾過にかけた結果、喘息児3例とも同様の結果が得られた。その代表例を Fig. 5 において、下半分に示した。Fig. 5 の上半分には実験1の結果を対比し示した。両者とも NCA 及び吸光度はオブアルブミン30000 daltons 付近に一致して認められた。

実験3について (Fig. 6)

ダニ抗原を単核球に添加したとき、上清中の NCA 活性は添加した抗原量に濃度依存性に上昇した。各々の上清についてゲル濾過を行ったところ、喘息児3例ともすべて同様の傾向を示したのでその代表例を Fig. 6 に示した。実験1, 2と同様に、NCA および吸光度のピークはオブアルブミン付近に一致して認められた。

考 案

NCA は1977年 Atkins ら¹⁾によって抗原吸入時の気管支喘息患者の末梢血中に見いだされた。以後、NCA は各種のアレルギー反応、例えば、抗 IgE を加えたヒト摘出肺組織⁹⁾、運動誘発性喘息¹⁰⁾、食物アレルギー¹¹⁾、寒冷蕁麻疹¹²⁾、抗原吸入時の late reaction³⁾、EIA の late reaction⁴⁾の際にも見いだされた。臨床的にみても EIA の際の末梢血中の NCA 活性の強度が肺機能の低下にはほぼ逆相関しているという点から、HMW-NCA はアレルギー反応の指標として意義があると考えられている。

我々はすでに喘息児と水泳—第3編²⁾で、EIA の際にみられる末梢血中の NCA 活性の上昇が、ほぼ同程度の運動量の水泳の際には認められないことを報告した。従来、Atkins¹¹⁾、Soter¹⁴⁾、Lee³⁾¹⁰⁾らの報告にもあるように、NCA は分子量約60万の high molecular weight の NCA について使われている。また、現在のところ NCA の起源については、マスト細胞または好塩基球とされている。特に、Lee ら¹⁰⁾の報告のように、DSCG で NCA の遊離が抑制されることからマスト細胞からの遊離が示唆されていた。しかし、近年、抗原吸入および EIA にみられる late reaction で HMW-NCA が二相性に上昇していることが見いだされ、NCA を遊離する細胞が問題となってきた。単核球、好中球、好酸球、肺泡マクロファージからの NCA の遊離の可能性が考えられている。今回我々は、単核球、リン

パ球からの NCA の遊離を検討した。

単核球、リンパ球、単球を PHA で刺激したが、今回の結果では分子量3万以下の比較的低分子量 (low molecular weight) 域に NCA が認められるのみであり、いわゆる HMW-NCA の遊離は認められなかった。

低分子量 (分子量3万以下) の遊走能刺激物質については、例えば、好酸球遊走因子を例にとっても極めて多数に上り¹⁵⁾、さらに近年その動態が注目されている leukotriene B₄、platelet activating factor なども含めると相当の数に上るため、今回はそれらとの差異などについては論じなかった。

次に、単核球にその患者が感作されている抗原 (ダニ) を添加し、培養上清中の NCA の遊離の有無を検討したところ、LMW-NCA の遊離のみがみられ、HMW-NCA の遊離はみられなかった。

補体 C_{3a}、C_{3b} は好中球の遊走刺激作用があることは古くから知られていた。今回は、化学伝達物質の1つである NCA について検討しているため、すべての検体を非働化し、それらの影響を排除した。したがって、今回の結果の検討については補体の影響を考慮する必要がないといえる¹⁾⁻⁵⁾¹⁰⁾¹³⁾。

今回の我々の実験では、好塩基球の影響が問題になるが、Ficoll-Conray による分離層の、いわゆる中間層細胞中の好塩基球数は、Kovacs の方法を改変した木村ら¹⁶⁾の方法によれば、単核球 1×10^6 個/ml あたり、正常人で 19.1 ± 11.9 個 (mean $\pm$ SEM, n = 5)、喘息児で 4.7 ± 0.7 個 (mean $\pm$ SEM, n = 5) であり、約 0.005-0.02% といえる。

このことから、好塩基球の混在による影響は無視できるといえる。

また、各培養液上清については、限外濾過により約20倍に濃縮し、その NCA を検討したが高分子域には NCA は認められなかった。

以上より、リンパ球および単球を PHA および陽性抗原で刺激した場合、培養上清中にはいわゆる即時型アレルギー反応の際にみられる分子量約60万の HMW-NCA は全く認められず、一方、分子量約3万以下の low molecular weight NCA が認められた。この LMW-NCA については現在検討中である。

本論文の要旨は第35、36回日本アレルギー学会総会において発表した。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました東京慈恵会医科大学小児科学教室前川喜平教授に深謝致します。

また、実験中に御指導頂きました岐阜薬科大学薬理学教室永井博弼助教授、国立相模原病院リウマチアレルギーセンター研究部柳原行義先生、東京慈恵会医科大学小児科正木拓朗先生、斉藤博久先生、国立小児病院アレルギー科関根宏子先生に感謝致します。

文 献

- 1) Atkins, P.C., Norman, M., Weiner, H. and Zweiman, B.: Release of neutrophil chemotactic activity during immediate hypersensitivity reactions in humans. *Ann. Intern. Med.* 86, 415-418, 1977.
- 2) 恩田威文, 永倉俊和, 飯倉洋治: 喘息児と水泳 第3編 NCF (neutrophil chemotactic factor) および FEV_{1.0} 変化率の比較. *アレルギー* 34, 1015-1020, 1985.
- 3) Nagy, L., Lee, T.H. and Kay, A.B.: Neutrophil chemotactic activity in antigen-induced late asthmatic reaction. *N. Engl. J. Med.* 306, 497-501, 1982.
- 4) Lee, T.H., Nagakura, T., Papageorgiou, N., Iikura, Y. and Kay, A.B.: Exercise-induced late asthmatic reactions with neutrophil chemotactic activity. *N. Engl. J. Med.* 308, 1502-1505, 1983.
- 5) Lee, T.H., Nagy, L. and Nagakura, T.: Identification and partial characterization of an exercise-induced neutrophil chemotactic factor in bronchial asthma. *J. Clin. Invest.* 69, 889-899, 1982.
- 6) Nagakura, T., Lee, T.H., Assoufi, K., Newman-Taylor, A.J., Denison, D.M. and Kay, A.B.: Neutrophil chemotactic factor in exercise- and hyperventilation-induced asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128, 294-296, 1983.
- 7) 熊谷勝男, 伊東恭男, 日沼州司, 多田正人: マクロファージの純粋分離法—牛胎児血清シャーレコート法. 免疫学実験操作法 VII (日本免疫学会編), 2473-2480, 1979.
- 8) Horwitz, D.A., Allison, A.C., Ward, P. and Kight, N.: Identification of human mononuclear leucocyte populations by esterase staining. *Clin. Exp. Immunol.* 30, 289-298, 1977.
- 9) O'Driscoll, B.R., Lee, T.H., Cromwell, O. and Kay, A.B.: Immunologic release of neutrophil chemotactic activity from human lung tissue. *J. Allergy Clin. Immunol.* 72, 695-701, 1983.
- 10) Lee, T.H., Brown, M.J., Nagy, L., Causon, R., Walport, M.J. and Kay, A.B.: Exercise-induced release of histamine and neutrophil chemotactic factor in atopic asthmatics. *J. Allergy Clin. Immunol.* 70, 73-81, 1982.
- 11) Papageorgiou, N., Lee, T.H., Nagakura, T., Cromwell, O., Wralith, D.G. and Kay, A.B.: Neutrophil chemotactic activity in milk-induced asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 72, 75-82, 1983.
- 12) Wasserman, S.I., Soter, N.A., Center, D.M., Austen, K.F.: Cold urticaria. Recognition and characterisation of a neutrophil-chemotactic factor, which appears in serum during experimental cold challenge. *J. Clin. Invest.* 60, 189-196, 1977.
- 13) Atkins, P.C., Norman, M., Zweiman, B. and Rosenblum, F.: Further characterization and biologic activity of ragweed antigen induced neutrophil chemotactic activity in man. *J. Allergy Clin. Immunol.* 64, 251-258, 1979.
- 14) Soter, N.A., Wasserman, S.I., Austen, K.F. and McFadden, E.R.: Release of mast cell mediators and alterations in lung function in patients with cholinergic urticaria. *N. Engl. J. Med.* 302, 604-608, 1980.
- 15) 藤村 隆, 鳥巢要道: 好酸球の局所動員と機能. *アレルギーの臨床* 4, 185-190, 1984.
- 16) 木村郁郎, 谷崎勝朗: 好塩基球および好酸球の適切な同時直接算定法の考案と臨床的評価. *医学のあゆみ* 69, 25-28, 1969.

ASTHMATIC CHILDREN AND SWIMMING TRAINING

4. Neutrophil Chemotactic Activity in the Supernatant of Human Lymphocytes and Monocytes Challenged with Phytohemagglutinin and House Dust Mite Allergen

Takebumi Onda

Department of Pediatrics, Tokyo Jikei University School of Medicine

Toshikazu Nagakura and Yoji Iikura

Department of Allergy, National Children's Medical Research Center

We have studied the release of neutrophil chemotactic activity (NCA) from mononuclear cells challenged with phytohemagglutinin (PHA) or house dust mites. Mononuclear cells from atopic asthmatics and normal controls were separated by Ficoll-Conray and adjusted to 1×10^6 cells/ml. Adherent cells were collected on glass petri dishes. Lymphocytes, monocytes, and mononuclear cells were incubated in separate study with PHA for 6, 24, 48, and 72 hr and mononuclear cells were incubated with house dust mites for 30 min. NCA was measured by modified Boyden chamber. Molecular weight of NCA was determined by gel filtration.

In our PHA challenge study, NCA had no rise at 6 hr, however, it showed a mild increase at 24 hr and reached its maximal value at 48 hr in the supernatant of lymphocytes, monocytes, and mononuclear cells.

NCA showed an increase in a dose dependent manner following house dust mite allergen challenge in the supernatant of mononuclear cells. NCA of the each supernatant was not eluted as a high molecular weight but low molecular weight less than 30,000 daltons.

Our results suggest that lymphocytes, and monocytes release low molecular weight NCA but not high molecular weight NCA following PHA and allergen challenge.
