インターロイキン5による好酸球からの ECP 遊離

寺田 修久・今野 昭義*
多田 裕之・戸川 清

The Degranulation Effect of Interleukin 5 on Eosinophils

Nobuhisa Terada, Hiroyuki Tada and Kiyoshi Togawa
(Akita University School of Medicine)

Akiyoshi Konno
(Chiba University)

We evaluated the degranulation effect of interleukin (IL) 5 on eosinophils purified from peripheral blood in the subjects with nasal allergy.

Eosinophils were incubated with IL-5, IL-3 and platelet activating factor (PAF) at 37°C for 1hr. The release of eosinophil cationic protein (ECP) was measured by radio immunoassay as an index of degranulation. High concentrations of IL-5 and IL-3 induced a significant release of ECP from eosinophils, although the amount of ECP was small compared with that in the nasal lavage fluid after antigen challenge. PAF did not have any effect on eosinophil degranulation.

These findings suggest that the roles of IL-5 and IL-3 on eosinophil degranulation are minimum in vivo.

Key words: eosinophil degranulation, interleukin, ECP

はじめに

好酸球の機能や動態を立体的かつ体系的に解析していくことは、アレルギー性疾患や寄生虫疾患の病態形成を明らかにする重要な過程である。近年急速に増加している鼻アレルギーの病態成立においても、好酸球の関与は肥満細胞や好塩基球と同様密接なものであり、好酸球の分化、増殖、遊走、脱顆粒の機序を知ることは新しい抗アレルギー剤の開発にもつながる。

著者らは、好酸球が鼻アレルギーにどのように関与しているかを検討し、主として抗原誘発

後の鼻腔洗浄液を対象として以下の成績を得てきた^{1)~3)}。

すなわち、抗原誘発後、鼻腔洗浄液中好酸球は鼻粘膜腫脹と過敏性亢進を伴う遅発相で著増すること、さらにこの相において好酸球は活性化されていて多量の eosinophilic cationic protein (ECP) を放出していること、活性型好酸球数と鼻腔抵抗の変化は相関すること、ECP の反復点鼻によりヒスタミンに対する鼻粘膜の反応性が亢進することなどである。好酸球や、好酸球由来のケミカルメディエーターや顆粒蛋白

秋田大学医学部耳鼻咽喉科学教室

* 千葉大学医学部耳鼻咽喉科学教室

は鼻粘膜の腫脹や過敏性の亢進に強く関与していることがうかがわれる。好酸球遊走因子として platelet activating factor (PAF), eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A), C5_a などがあり, このうち PAF はさらに好酸球を活性化させる作用を持つ⁴⁾⁵⁾。しかし, 好酸球の脱顆粒因子についての報告は少ない。近年, 主としてリンパ球由来のサイトカインが, 種々の幅広い生理活性を有することで注目されている。そのうち, インターロイキン3 (IL-3), インターロイキン5 (IL-5), granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) は, 好酸球を標的細胞の一つとする点で興味深い。

今回, 著者らはヒト鼻アレルギー症例の末梢血から分離した好酸球を用いて, IL-3, IL-5, PAF の脱顆粒作用の有無について検討したので報告する。

対象および方法

Fukuda ら⁶⁾ の方法に従い, 末梢血から好酸球を分離した。ダニ, ハウスダストに感作されている通年性鼻アレルギー患者8名から静脈血をヘパリン採血し, 6%高分子デキストラン溶液に混和した。室温にて60分間静置し得られた buffy coat を Hanks balanced salt solution (HBSS) に浮遊後 150 g 10分間遠心した。白血球沈渣を比重 1.070 gr/ml の Percoll 溶液に浮遊させ, 比重 1.100, 1.090, 1.085, 1.080 より成る Percoll 比重勾配に重層し, 1000 g, 10°C で20分間遠心した。パスツールピペットにて好酸球層を採取し, 低張生理食塩水にて赤血球を破壊した。May-Grunwald-Giemsa 染色において判定した好酸球の purity は $82.5 \pm 4.9\%$ であり, 主たる混入細胞は好中球であった。

recombinant human (rh) IL-3 は R & D system 社から, PAF は銚子ファナコシから購入した。rhIL-5 は銚子サントリー (生物化学研究所) から供与されたものを用いた。 $5 \times 10^5/\text{ml}$ になるように好酸球数を調整した後, RPMI 1640 (10%FCS, ペニシリン 100IU/ml, ストレプトマイシン 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有) の中で 5% CO₂,

37°C の条件下で60分間 preincubate した。rhIL-3, rhIL-5 それぞれ 1, 10, 100 ng/ml, PAF 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M となるように加え, さらに60分間 incubate した。氷中にて反応を止め, 3000回転, 10分間遠心後の上清を得た。ECP 測定用の検体は, その後 -80°C に凍結保存した。一方, PAF 測定用の検体は4倍量の冷メタノールに入れた後3000回転, 10分間遠心し上清を -80°C に凍結保存した。ECP の測定は, フェルマーシア社製 ECP-RIA Kit を用い Venge ら⁷⁾ の方法に準じて行なった。PAF は Bligh-Dyer 法にて抽出した後, 山下ら⁸⁾ の方法に従い, アンプレップ NH₂ カラム (アマシャム社製), 高速液体クロマトグラフィーで分離精製した後, アマシャム社製 RIA Kit にて測定した。

数値は平均値±標準偏差で表示し, 推計学的検討は paired t-test にて行った。

成績

1. IL-3, IL-5, PAF による好酸球からの ECP 遊離 (図1)

PBS (0.1% BSA 加) との incubate では ECP の遊離はみられなかった。

IL-3, 1, 10, 100 ng/ml 刺激による好酸球上清中 ECP 濃度はそれぞれ 1.43 ± 0.82 , 0.84 ± 0.36 , 7.54 ± 3.92 ng/ml であり, 100 ng/ml による ECP 濃度は PBS と比較して有意に増加していた (危険率 5%)。

IL-5 1, 10, 100 ng/ml 刺激による好酸球上清中 ECP 濃度はそれぞれ 0.32 ± 0.36 , 1.01 ± 0.69 , 3.84 ± 2.60 ng/ml であり, 100 ng/ml における増加は有意 (危険率 5%) であった。

PAF 10^{-6} , 10^{-5} M 刺激による ECP 濃度はそれぞれ 3.05 ± 1.62 , 2.98 ± 2.02 ng/ml であった。 10^{-7} M 刺激では ECP 濃度は測定限界以下であった。いずれも推計学的に有意ではなかった。

positive control として用いたカルシウムイオノフォア 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 刺激後の上清中 ECP 濃度は 37.9 ± 17.8 ng/ml であった (危険率 1% で

有意)。

2. IL-3, IL-5 による好酸球からの PAF 遊離

好酸球上清中の PAF 濃度の測定は IL-3 100 ng/ml, IL-5 100 ng/ml 刺激後の上清についてのみ行なった。

PBS, IL-3, IL-5 刺激後の PAF 濃度はそれぞれ, 198.4 ± 38.4 , 162.7 ± 74.1 , 177.4 ± 37.6 pg/ml であり有意な変化はみられなかった(図2)。

考 察

IL-5 は, Natural killer 細胞, B細胞, 好酸球, 好塩基球などの細胞に幅広く作用することが報告されている。このうち好酸球に対しては, 分化, 増殖に強く関与する他, 成熟好酸球にも作用することが知られている。これまで生存能の延長, 低比重化, 抗体依存的細胞障害性の亢進, ロイコトリエン (LT) C_4 産生能, O_2^- 産生能の亢進, 貪食能の亢進などの好酸球の活性化, 機能亢進作用が報告されている⁹⁾¹⁰⁾。また, 化学走化性作用も確認されている¹¹⁾。一方, 脱顆粒作用については明らかではなく, Fujisawa ら¹²⁾は Eosinophil derived neurotoxin (EDN) を指標とした実験において, IL-5 刺激によって

好酸球からの EDN 遊離は明らかではなかったと報告している。著者らは ECP を指標として検討したところ 100 ng/ml IL-5 で有意な ECP 遊離がみられた。

しかし, その濃度は 3.84 ± 2.60 ng であり, 一方, ECP 量の増加が著明である遅発相において, 鼻腔洗浄液 (40 ml) 中 IL-5 量は数 ng¹³⁾で

図2 IL-3, IL-5, による好酸球からの PAF 遊離

図1 IL-3, IL-5, PAF による好酸球からの ECP 遊離

あるのにもかかわらず ECP 量は 318 ± 56 ng (7.95 ng/ml) であった。また, 1 ng/ml, 10 ng/ml の IL-5 刺激では ECP の遊離は明らかではなかった。

以上を考慮すると, in vivo において IL-5 が直接好酸球に作用して ECP などの顆粒蛋白を放出させている量はわずかであると考えられる。鼻腔洗浄液中に大量に遊離される ECP は, 特異抗原や, 他のメディエーターによる刺激によると考えた方が理解しやすい。

Abu-Ghazaleh ら¹⁴⁾, Fujisawa ら¹²⁾ は Sepharose beads に結合した分泌型 IgA, IgA によって好酸球から EDN が遊離されることを報告した。著者らもスギ花粉症有志を対象に行った検討で, 分泌型 IgA を点鼻すると鼻腔洗浄液中に ECP が増加することを確認している³⁾。分泌型 IgA や IgA は, 局所免疫に関与するのみならず, 好酸球脱顆粒因子として鼻粘膜過敏性の亢進や鼻粘膜腫脹に重要な役割を果たしているものと考えられる。

PAF も IL-5 同様, 好酸球に対し様々な作用を有する。強い遊走活性に加え, 軽比重化, 活性酸素, LTC₄ 産生能の亢進などの機能亢進作用が報告されている^{15)~17)}。しかし, 著者らの検討では 10^{-5} M の PAF で刺激しても ECP の遊離は 2.98 ng/ml とわずかであった。この結果は EDN を指標とした福田ら¹⁸⁾ の成績と一致する。今回の検討では PAF が好酸球脱顆粒因子であるという積極的な成績は得られなかった。

著者らが今回用いた末梢血好酸球は鼻アレルギー患者のものであるが, 8 名のうち 6 名は軽症であり, このことが IL-5 によって ECP 遊離が明らかでなかったことと関係している可能性もある。Chihara ら¹⁹⁾ によれば, 低比重好酸球における IL-5 受容体の親和性は正比重好酸球のそれと比較して約 5 倍以上の親和性を有している。増山ら²⁰⁾ は, 鼻アレルギー患者の末梢血好酸球は 1.085 g/ml をピークとする比重分布を示し, 正常人と比較して低比重であることを報告している。今回著者らは採取した好酸球の比重は測定していないが, 重症度が高い症例

ほど低比重好酸球の割合が多いと仮定すれば, 中等症以上の症例から採取した好酸球を用いることにより IL-5 による好酸球脱顆粒作用が明らかになる可能性を完全に否定することはできない。しかし, 中等症の患者 2 名から採取した好酸球からの ECP 遊離量は他の 6 名と比較して明らかな差はみられなかった。

今後, 好酸球を正比重, 低比重に分けて IL-5 に対する反応性を検討していく必要があると思われる。

IL-3 も IL-5 同様好酸球に作用し, 生存能の延長, 低比重化, LTC₄ の産生能亢進, 細胞障害性の亢進をおこすことが知られている²¹⁾。今回の検討では 100 ng/ml の刺激において IL-5 と比較して約 2 倍の ECP 産生が認められた。局所における IL-3 産生量や鼻粘膜に対する IL-3 の作用について今後検討していきたい。

参考文献

- 1) 寺田修久, 今野昭義, 伊藤永子, 他: 鼻アレルギー症例の遅発相における鼻粘膜好酸球浸潤と活性化 —鼻腔洗浄液による検討—. アレルギー **40**: 181~190, 1991.
- 2) 寺田修久: 鼻粘膜におけるアレルギー反応の経時的変化. 日鼻誌 **27**: 28~29, 1988.
- 3) Terada N, Konno A, Tada H, et al: The effect of rhIL-5 on eosinophil accumulation and degranulation in human nasal mucosa. J Allergy Clin Immunol **90**: 160~168, 1992.
- 4) MacDonald AJ, Moqbel R, Wardlaw AJ, et al: Platelet-activating factor (PAF-acether) enhances eosinophil cytotoxicity in vitro. J Allergy Clin Immunol **77**: 227, 1986.
- 5) Kimani G, Tonnesen MG and Henson PM: Stimulation of eosinophil adherence to human vascular endothelial cells in vitro by platelet activating factor. J Immunol **140**: 3161~3166, 1988.
- 6) Fukuda T, Dunnette SL and Charles ER: Increased numbers of hypodense eosinophils in the blood of patients with bronchial asthma. Am Rev Respir Dis **132**: 981~985, 1985.
- 7) Venge P, Roxin LE and Olsson I: Radioim-

- munoassay of human eosinophil cationic protein. *Br J Haematol* **37** : 331~335, 1977.
- 8) 山下哲次, 栗本文彦, 畠 啓視, 他 : HPLC-RIA 法による血中 PAF 測定法とその応用. *アレルギー* **40** : 1130, 1991.
- 9) Lopez AF, Sanderson CJ, Gamble JR, et al. : Recombinant human interleukin-5 is a selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med* **167** : 219~224, 1988.
- 10) Yamaguchi Y, Hayashi Y, Sugano Y, et al. : Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival ; IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *J Exp Med* **167** : 1737~1741, 1988.
- 11) Wang JM, Rambaldi A, Chen ZG, et al. : Recombinant human interleukin 5 is a selective eosinophil chemoattractant. *Eur J Immunol* **19** : 701~705, 1989.
- 12) Fujisawa T, Abu-Ghazaleh RI, Kita H, et al. : Regulatory effect of cytokines on eosinophil degranulation. *J Immunol* **144** : 642~646, 1990.
- 13) Terada N, Konno A, Shirotori K, et al. : In human nasal mucosa, interleukin-5 accumulates and degranulates eosinophils, as well as increases responsiveness to histamine ; proceeding of the 1991 international congress of rhinology. *Rhinology Suppl* **14** : 57~61, 1992.
- 14) Abu-Ghazaleh RI, Fujisawa T, Mestecky J, et al. : IgA-induced eosinophil degranulation. *J Immunol* **142** : 2393~2400, 1989.
- 15) Wardlaw AJ, Moqbel R and Cromwell O : Platelet activating factor ; a potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. *J Clin Invest* **78** : 1701~1706, 1986.
- 16) Bruynzeel PLB, Kok PTM and Hamelink ML : Exclusive leukotrien C₄ synthesis by purified human eosinophils induced opsonized zymosan. *FEBS* **189** : 350~354, 1985.
- 17) Koprogge E, de Leeuw AJ, de Monchy JGR, et al. : Hypodense eosinophilic granulocytes in normal individuals and patients with asthma. Generation of hypodense cell population in vitro. *J Allergy Clin Immunol* **83** : 393, 1989.
- 18) 福田 健, 沼尾利郎, 阿久根郁夫 : PAF による好酸球遊走の免疫薬理学的解析. 第4回免疫薬理シンポジウム アレルギーと PAF(宮本昭正編). 43~53頁, デーエムページャパン, 東京, 1986.
- 19) Chihara J, Plumas J, Tavanier J, et al. : Characterization of a receptor for interleukin-5 (IL-5) on human eosinophils ; variable expression and induction by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *J Exp Med* **172** : 1347~1351, 1992.
- 20) 増山敬祐, 鮫島靖浩, 石川 哮 : 鼻アレルギー患者における鼻への好酸球浸潤とその意義. 第5回免疫薬理シンポジウム アレルギーの病態と好酸球(牧野莊平編). 141~147頁, デーエムページャパン, 東京, 1986.
- 21) Rothenberg ME, Owen WF, Silberstein DS, et al. : Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3. *J Clin Invest* **81** : 1986~1992, 1988.

(別刷請求先: 寺田修久
〒014 大曲市通町1-30
仙北組合総合病院耳鼻咽喉科)