

アレルギー性炎症における免疫グロブリンの新知見

分泌型IgAによる好塩基球活性化機構と好酸球の高親和性IgE受容体発現調節

飯倉 元保

アレルギー性炎症における免疫グロブリンの新知見:

分泌型 IgA による好塩基球活性化機構と好酸球の高親和性 IgE 受容体発現調節

飯倉 元保

目次

緒言		3- 4
1. 分泌型 IgA による好塩基球活性化機構		5- 25
2. 好酸球の高親和性 IgE 受容体発現調節		26- 36
結語		37
図表	表 1~5	38- 42
	図 1~29	43- 71
参考文献		72- 82
謝辞		83

緒言

気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患は、先進国で近代社会の発展とともに増加してきた疾病である。これらのアレルギー疾患は、免疫反応による組織傷害機序に基づく Gell & Coombs 分類でのⅠ型アレルギー反応に主に属する。Ⅰ型アレルギー反応では、抗原に対する特異的な IgE 抗体[1]が産生され、それがマスト細胞の高親和性 IgE 受容体(FcεRI)に結合している。抗原によりそのマスト細胞上の IgE 抗体が架橋されると、マスト細胞は短時間(15分以内)で活性化され、ヒスタミン[2, 3]やロイコトリエン(LT)C4、LTD4、LTE4、プロスタグランジン(PG)D2、血小板活性化因子(PAF)をはじめとする多彩なケミカルメディエーターが遊離される。これらのメディエーターは多様な生理活性を有しており、平滑筋収縮、血管透過性亢進、粘液分泌亢進などの組織反応を惹起し、Ⅰ型アレルギー反応の臨床像を形成する。このような triggering molecule としての IgE とマスト細胞由来のメディエーターによる病態として、これまでⅠ型アレルギー反応は考えられてきた。しかしながら、アレルギー疾患ではマスト細胞と IgE だけでは説明のつかない様々な現象が認められる。Ⅰ型アレルギー反応は二相性であることが多い。前述した抗原曝露後数分で出現するマスト細胞と IgE による即時型反応と、それに引き続き数時間後に出現する炎症の再燃を伴う遅発型反応に分けられる[4, 5]。遅発型反応は、特にアレルギー疾患の遷延化、難治化の主因であり、組織に流入した好酸球、好塩基球とそれらに由来するメディエーターが重要な役割を担っていることがわかってきた。

Ⅰ型アレルギー反応の遅発相で重要な好酸球や好塩基球は、骨髄で増殖分化し、流血中に遊出し、循環系から炎症局所に集積する。好酸球は IL-5 により、好塩基球は主に IL-3 による作用を受け増殖分化し、骨髄内から血液中に遊出する。流血中の好酸球や好塩基球は、細胞表面上の integrin を介して血管内皮細胞に接着し、細胞間隙を transmigration する。その後、マスト細胞、Th2 リンパ球、線維芽細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞などの多彩なアレルギー性炎症細胞に由来する種々のケミカルメディエーターの作用を受け、好酸球や好塩基球は組織内へ遊走し、さらにその浸潤過程で活性化される。特に、好酸球や好塩基球に強力な作用を及ぼすケミカルメディエーターとして、Th2 リンパ球由来と考えられる IL-5、IL-3 などの cytokine[6] や eotaxin[7, 8]などの chemokine が重要な役割を果たしていると考えられている。炎症局所に浸潤した好酸球は、IgG や IgA クラスの免疫グロブリン刺激などにより、major basic protein (MBP)、eosinophil peroxidase (EPO)、eosinophil cationic protein (ECP)、eosinophil-derived neurotoxin (EDN)などの細胞傷害性塩基性顆粒蛋白[9]を遊離し、LTC4、PAF などのリン脂質由来メディエーターや活性酸素など

を産生放出することにより、遅発相においてエフェクター機能を発揮する[10]。一方、好塩基球は、細胞膜上に FcεRI を保有しており、IgE を介する刺激でヒスタミンや LTC₄ などを遊離する。また好塩基球は、IgE 産生を誘導する IL-4 の重要な産生細胞であり、発現している CD40 リガンドと協同して、単独で B 細胞に IgE 産生を誘導することも示されている[11, 12]。好酸球も IL-4 を産生する[13]が好塩基球と比較しその産生量は少ない。

このように、好酸球や好塩基球のメディエーター遊離には、種々のアレルギー性炎症細胞、免疫グロブリン、cytokine が関与している。しかしながら、好酸球や好塩基球の活性化機構に関しては、マスト細胞に比べ、未だに解明されていないことが数多く存在する。好塩基球に関しては、IgE 抗体を介する刺激により活性化され脱顆粒が惹起されることは明らかであるが、IgE 以外の免疫グロブリンで強力な好塩基球活性化を誘導するものは知られていない。本研究第一章で、IgE 以外の免疫グロブリンとして、気道内で IgE より豊富に存在する免疫グロブリンである分泌型 IgA(sIgA)に着目し、好塩基球活性化作用を有するかを検討した。本研究第二章では、好酸球に関して IgE 抗体を介する活性化に注目し、高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) の発現制御機構及び機能を検討した。好酸球脱顆粒を惹起する液性因子として、IgA、IgG などの免疫グロブリンが従来より知られている。しかし、アレルギー疾患で増加する IgE 抗体を介する好酸球活性化作用に関しては報告が少なく、特に FcεRI を対象とした報告はわずかである。寄生虫感染症やアレルギー疾患患者の一部では、好酸球上に FcεRI が認められると報告されているが、好酸球上の FcεRI 発現調節機構については全く知られていない。そこで健常人好酸球を用い、FcεRI 発現調節機構及び FcεRI 依存性機能について検討を行った。

1. 分泌型 IgA による好塩基球活性化機構

はじめに

好塩基球は、末梢白血球の 0.5~1%を占めるに過ぎない最少の白血球であり、toluidine blue などの化学色素に対し異染色性(metachromasia)を呈する特徴を持っている。細胞膜上に FcεRI を発現し、その FcεRI に結合している IgE が特異的多価抗原により架橋されると、preformed mediator であるヒスタミンや newly-generated mediator である LTC₄ などのメディエーターが遊離される[14]。平滑筋収縮、血管透過性亢進などの生理活性を持つこれらの炎症性メディエーターを遊離することにより、好塩基球はマスト細胞とともにアレルギー反応において重要な役割を發揮している。好塩基球は、FcεRI の細胞膜上発現、顆粒内ヒスタミンの含有、異染色性などに関してマスト細胞と多くの共通点を持つにもかかわらず、この二種類の細胞は細胞起源から考えると全く別の細胞系列に属している。流血中の好塩基球が組織に遊走し、マスト細胞となるという単球/マクロファージにみられるような形質変換説は魅力的であったが、現在では全く否定されている。奇異に聞こえるが、好塩基球に最も近縁の細胞は好酸球である[6]。組織に固着しているマスト細胞とは異なり、好塩基球はアレルギー性炎症の惹起とともに、炎症局所に流入し、エフェクター機能を發揮するという好酸球と同じ特性を有している。アレルギー患者の鼻腔内や気道内に実験的に抗原をチャレンジし惹起させた遅発相においては、好塩基球の浸潤と好塩基球由来のメディエーターの存在が認められる[15, 16]。気管支喘息の遅発相での気管支肺胞洗浄液(BALF)中には、好酸球とともに好塩基球が認められ、ヒスタミンが検出される[5]。即時相ではヒスタミンと同時に PGD₂ も検出されるため、そのヒスタミンはマスト細胞由来と考えられるが、遅発相では PG は検出されずヒスタミンのみ検出されるため、遅発相の BALF 中のヒスタミンは好塩基球由来のメディエーターと考えられる。また、気管支喘息患者の気道組織では、好塩基球の浸潤を認め[17]、好塩基球数は喘息の炎症の指標となるアセチルコリンの気道過敏性閾値と負の相関関係にあり、アレルギー性炎症での好塩基球の重要性が示唆されている[18]。

IgE を介する刺激は殆ど全ての人の好塩基球から約 20~50%の脱顆粒を誘導することから、好塩基球活性化における IgE 抗体の重要性は確立している。一方、好塩基球がエフェクター機能を發揮するアレルギー性炎症の場である気道や消化管の粘膜組織において量的に最も多い免疫グロブリンは IgA であり、そのほとんどは secretory component (SC)を結合した分泌型 IgA (sIgA)である[19]。sIgA は、分子量約 38 万 kDa の糖蛋白で、二量体の IgA と SC と J 鎖により構成され、SC は IgA の C_μ2 domain に、J 鎖は IgA の C 末端の cysteine に共有結合している(図 1)[20]。二量体 IgA と J 鎖は、粘膜固有層に存在する形質細胞により産生され、上皮細胞の

基底膜側に存在する polymeric Ig receptor (pIgR) に結合し上皮細胞内を通過し、最終的には上皮細胞の粘膜面で、pIgR の一部が酵素的に切断され、sIgA として粘液内に遊離される (図 2) [19]。これまでに sIgA の好塩基球に対する作用は全く知られていない。気管支喘息やアレルギー性鼻炎などの病態において、局所で最も豊富な免疫グロブリンである sIgA がアレルギー性炎症細胞である好塩基球を活性化する機構が存在するのではないかと考え、sIgA による好塩基球活性化機構について検討を行った。

材料と方法

試薬

精製ヒト recombinant (r) IL-3、IL-5、granulocyte-macrophage (GM)-CSF は、キリンビール（東京）、サントリー（大阪）、住友製薬（東京）より提供された。卵白アルブミン(OVA)、フィブリノーゲン、genistein、N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP)、cytochalasin B は、Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)より購入した。血清 IgA、myeloma IgA、slgA などの精製ヒト IgA 抗体は、Cappel-Organon Teknika Corporation (West Chester, PA, USA)より購入した。ヤギ抗ヒト IgE 抗体は、日本生物化学研究所（名古屋）から購入した。*Clostridium ramosum* から抽出した IgA プロテアーゼ[21]により切断された slgA Fab 部分と (Fc)₂-SC 部分は藤澤隆夫先生（国立療養所三重病院小児科、三重）より供与された。初乳からヘパリンセファロースカラムとゲルろ過カラムにより精製した free SC は、茂呂周先生（日本大学歯学部病理、東京）より提供された[22]。ウサギ抗ヒト SC 抗体（ポリクロナール）とコントロールウサギ Ig は DAKO (Glostrup, Denmark)より購入した。百日咳毒素(PTX)は Research Biochemicals (Natick, MA, USA)より、staurosporine は Biomol Research Laboratories (Plymouth Meeting, PA, USA)より、wortmannin は和光純薬（大阪）より、PD98059[23]は New England Biolabs (Beverly, MA, USA)より、SB203580[24]は Calbiochem (La Jolla, CA, USA)より購入した。ヒト CD89 (Fc α RI)に対するモノクロナール抗体(mAb)である A59 (mouse IgG1 κ)は、Dr. H. Kubagawa (Division of Developmental and Clinical Immunology, University of Alabama, Birmingham, AL, USA)より提供された[25]。細胞接着阻害作用を持つ抗 integrin 抗体は下記のものを使用した。抗 CD11a 抗体 (TS1/22; IgG $\gamma_1\kappa$) [26]は、当科富間重人先生より提供された。抗 CD11b 抗体 (D12; IgG $_{2a}\kappa$) [27]、抗 CD11c 抗体 (SHCL-3; IgG $_{2b}\kappa$) [28]、抗 CD18 抗体 (L130; IgG $\gamma_1\kappa$) [29]は、Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)より購入した。抗 CD49d 抗体 (HP2/1; IgG $\gamma_1\kappa$) [30]は Immunotech (Marseille, France)より、抗 CD29 抗体(4B4; IgG $\gamma_1\kappa$) [31]は Coulter Immunology (Hialeah, FL, USA)より購入した。マウス mAb である IgG $\gamma_1\kappa$ 、IgG $_{2a}\kappa$ 、IgG $_{2b}\kappa$ は ICN Pharmaceutical (Aurora, OH, USA)より購入した。ヒトリコンビナント可溶性 ICAM-1 (rsICAM-1) は R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)より購入した。

緩衝液

25 mM PIPES (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.03% ヒト血清アルブミン(HSA) (ミドリ十字、大阪)を含む PIPES A 緩衝

液で pH 7.4 に調整したものを使用した。好塩基球や好酸球の刺激実験には、PIPES A 緩衝液に 2 mM Ca^{2+} と 0.5 mM Mg^{2+} を加えた PIPES ACM 緩衝液を使用した。

蛋白結合セファロースビーズの作製

蛋白結合セファロースビーズは Fujisawa らと同様の方法にて作製した[32]。まず cyanogen bromide により活性化されたセファロース 4B ビーズ(Pharmacia, Uppsala, Sweden)を 1 mM 塩酸にて洗浄後、ホウ酸緩衝液 (0.2 M H_3BO_3 , 0.5 M NaCl, 0.02 M NaOH, pH 8.6)にて 3 回洗浄した。ホウ酸緩衝液に溶解した蛋白をセファロース 4B ビーズ 1 ml に対し 10 mg 量加え、4°Cで一晩攪拌反応させた。翌日、そのビーズを少なくとも 3 回以上ホウ酸緩衝液にて洗い、0.1 M lysine monohydrochloride を加えたホウ酸緩衝液に置換し、室温で 2 時間攪拌反応させた。次に、ビーズをホウ酸緩衝液と 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0)の両液で交互に 3 回ずつ洗浄し、最終的にホウ酸緩衝液に再浮遊し 4°Cで保存した。全洗浄液の吸光度を測定することにより、加えた蛋白の 85%以上はビーズに結合していることを確認した。

細胞の調整

ヒト好塩基球や好酸球は、アレルギー疾患の既往がなく、informed consent が得られたボランティアの末梢血から分離精製した。ほとんどの実験では、Percoll より部分精製した好塩基球を使用した。まず末梢血に 1/9 量の 0.1 M EDTA 溶液を抗凝固剤として加えた。15 ml チューブに比重 1.079 g/ml の Percoll 溶液 5 ml を入れ、その上に比重 1.070 g/ml の Percoll 溶液 5 ml を重層した。二重 Percoll 層の上に EDTA 血 5 ml を重層し、700 x g, 22°C, 15 分間遠心した。その後、重層した Percoll 溶液間に移動した細胞を回収し、PIPES A 緩衝液で洗浄し、これを Percoll 分離好塩基球とした。一部の実験では、既報の如く、negative panning によりさらに好塩基球を精製したものを用いた[33]。Percoll 分離好塩基球をマウス抗 CD2 抗体、抗 CD14 抗体、抗 CD19 抗体 (Becton Dickinson)、抗 CD16 抗体 (Immunotech)で 4°C、60 分間反応させた。あらかじめヤギ抗マウス抗体 (Biosource : Camarillo, CA, USA)を固相化させたプレートに撒き、4°C、60 分間反応させた。好塩基球以外の細胞をプレートに接着させ、浮遊細胞を回収することにより、精製好塩基球を得た。精製度は、Percoll 分離好塩基球群では $24 \pm 11\%$ 、精製好塩基球群では約 $72 \pm 11\%$ であった。両群とも好酸球の混入は全く認められなかった。細胞の生存率は、trypan blue による色素排除法にて測定し、常に 95%以上であった。

好酸球の精製法は既報の如く行った[34]。まず末梢血に 1/9 量の 0.1 M EDTA 溶液を加え、さらに 1/4 量の 5% Dextran (Pharmacia)を含む pH 7.4 Dulbecco R

ン酸緩衝液(PBS)を加えた。室温で 30 分間静置後、赤血球層の上の白血球層を回収した。比重 1.088 g/ml の Percoll 溶液の上に白血球浮遊液を重ね、700 x g, 22℃, 15 分間遠心した。その後 Percoll 溶液層の底の細胞を回収し、蒸留水で 1 分間処理することにより、赤血球を溶血させた。抗 CD16 抗体結合 magnetic microbeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany)と 4℃, 30 分間反応させた後、MACS cell sorter column (第一化学、東京)にて、CD16 陽性細胞である好中球を除去し、精製好酸球を得た。好酸球の純度は 99%以上であった。生存率は、trypan blue にて測定し、常に 95%以上であった。

好塩基球からのメディエーター遊離

細胞浮遊液に希釈した抗 IgE 抗体試薬を加え、37℃, 45 分間反応させることにより、抗 IgE 抗体刺激を行った[35]。OVA、IgA、slgA、SC などを結合させたセファロースビーズによる刺激は以下のように施行した。Alcian blue 染色にて計測した好塩基球数に基づいて決めたビーズ量(図に示すビーズ細胞比)を、細胞浮遊液の入っているそれぞれのチューブに加えた。さらにビーズと細胞の接触を増すために、チューブを 50 x g, 8 分間遠心した。その後、37℃にて、45 分間反応させた。プレート固相化法による好塩基球脱顆粒に関しては次のように行った。PBS に溶解した OVA、IgA、slgA、SC を 100 µl ずつ 96 穴プレート(Maxisorp: Nunc, Roskilde, Denmark)の各穴に加え、4℃、一晚放置することにより、コーティングした。翌日、1% HSA を含む PBS で 37℃, 60 分間 blocking した。次いで、PIPES ACM 200 µl に浮遊させた Percoll 分離好塩基球をプレートに加え、50 x g, 8 分間遠心し、37℃, 120 分間、反応させた。反応終了後、遠心し上清を回収した。ヒスタミン測定用の検体は、除蛋白のため最終濃度 2%の過塩素酸(和光純薬、大阪)を加えた後 4℃で保存した。ヒスタミンは、自動蛍光測定器(Technicon Instruments Co., Tarrytown, NY, USA)を用い測定した。LTC4 は、Bühlmann Laboratories AG (Schönenbuch, Switzerland)の ELISA キットにて測定した。

それぞれの実験において、可溶性刺激では PIPES ACM によるヒスタミン遊離(blank)を、セファロースビーズ結合刺激では OVA 結合セファロースビーズによるヒスタミン遊離を対照遊離としたが、常に全ヒスタミン含有量の 5%以下であった。それぞれの実験は少なくとも duplicate で行った。ヒスタミン遊離率は、次式により求めた。

$$\text{ヒスタミン遊離率(\%)} = (\text{刺激によるヒスタミン遊離量} - \text{対照遊離量}) / (\text{総細胞内含有ヒスタミン量} - \text{対照遊離量}) \times 100$$

Flow cytometry による FcαRI の解析

細胞表面上の Fc α RI の解析に用いた好塩基球は、negative panning により 98.5% 以上に精製した。好塩基球を PIPES ACM 緩衝液に浮遊させ、IL-3 5 ng/ml の濃度で、37°C、30 分間反応させた。IL-3 にて前処置した好塩基球と 99% 以上に精製した好酸球を、それぞれ 3% FCS、0.1% NaN₃ を含む PBS に浮遊させ、A59 mAb もしくはコントロール mAb 5 μ g/ml で 60 分間水中で反応させた。細胞は 2 回 3% FCS、0.1% NaN₃ を含む PBS で洗浄し、7 μ g/ml の濃度の FITC 結合ヤギ抗マウス IgG 抗体 F(ab')₂ 部分 (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA, USA) と 30 分間水中で反応させた。その後、細胞は 2 回洗浄し、細胞の蛍光強度を EPICS XL System II (Coulter, 東京) で測定した。

気管支喘息患者と健康人における *slgA* による好塩基球脱顆粒の比較

informed consent の得られた提供者から採血を行い、好塩基球脱顆粒実験を行った。提供者の背景を表 1 に示す。気管支喘息の診断は、日本アレルギー学会による喘息予防管理ガイドラインに基づき、①発作性の呼吸困難、喘鳴、胸苦しさ、咳などの症状の反復、②少なくとも部分的には見られる可逆性の気流制限、③心肺疾患などの鑑別可能な疾患でないことを基準に決定した。アトピー素因の存在に関しては、RAST 陽性 (score 2 以上) またはプリックテスト陽性者をアトピー型とした。喘息の発作強度は、A: 大発作、B: 中発作、C: 小発作、D1: 喘鳴、D2: 胸苦しい、N: 症状なしに分類し、重症度は、軽症間欠型、軽症持続型、中等症持続型、重症持続型に分類した。末梢血 20 ml より Percoll にて好塩基球を部分精製し、IL-3 で priming する群としない群に分け、それぞれ種々の濃度でプレートに固相化した *slgA*、抗 IgE 抗体、FMLP で刺激し、ヒスタミン遊離を検討した。ヒスタミン遊離に関して、最大ヒスタミン遊離率を reactivity、最大ヒスタミン遊離率の 50% の遊離を惹起する刺激物の濃度を sensitivity として解析した。また、気道閉塞の程度を客観的に捉えるために、採血と同時にミニライトピークフローメーター (Clement Clarke International, London, England) で 3 回測定を行い、最大値をその人のピークフロー (PEF) 値とした。

統計学的分析

データは平均土標準誤差 (SEM) にて表現した。統計学的有意差の検定には、有意水準 5% で Student *t*-test を用いた。ヒスタミン遊離における種々の因子の相関関係は、Spearman 順位相関法を用い、有意水準 5% で相関関係ありとした。

結果

1-1 固相化 sIgA による好塩基球脱顆粒

IL-3 にて priming した好塩基球からの sIgA 依存性ヒスタミン遊離

まず、sIgA が好塩基球を活性化し得るかを検討するために、セファロースビーズに固相化した sIgA を用いて好塩基球への影響を検討した。IL-3 などの好塩基球増殖因子が好塩基球の脱顆粒を増強するという Hirai らの報告[36]に基づき、Percoll 分離好塩基球を IL-3 (5ng/ml) にて、37°C、30 分間前処置する群としない群に分け、それぞれ 45 分間、種々の濃度のビーズ細胞比で sIgA 結合セファロースビーズと反応させた。図 3 に示すように、IL-3 で前処置しない好塩基球からは全てのビーズ細胞比で、有意なヒスタミン遊離は認められなかった。一方、IL-3 前処置好塩基球では、固相化 sIgA により明らかなヒスタミン遊離が誘導され、ビーズ細胞比に依存し遊離率の増加を認めた。高濃度（ビーズ細胞比 1:10）の sIgA 刺激で約 15% のヒスタミン遊離が認められ、ビーズ細胞比 1:20-40 の sIgA 刺激では、5-10% のヒスタミン遊離が認められた。一方、ビーズに固相化せず可溶性 sIgA にても直接好塩基球刺激を試みたが、高濃度の sIgA でも全くヒスタミン遊離は認められず、sIgA による好塩基球脱顆粒には sIgA の固相化が重要であることが明らかになった。

以上の実験は Percoll による非連続密度勾配法によって約 15% に部分精製した好塩基球を用いた。Percoll 分離好塩基球中には、リンパ球、単球、好中球などの白血球の混入が 70~90% ほど認められる。そこで、好塩基球以外の混入白血球が好塩基球に与える間接的な影響を除外するために、negative selection にて好塩基球をさらに高純度に精製し同様の実験を行った。図 4 に示すように高純度に精製した好塩基球でも Percoll 分離好塩基球と同程度のヒスタミン遊離が認められた。この結果から、IL-3 及び sIgA は、好塩基球以外の白血球に作用して間接的に好塩基球を刺激するのではなく、両者とも直接好塩基球に作用しヒスタミン遊離を誘導することが確認された。また IL-3 で処置後に sIgA で刺激する通常の過程とは逆に、好塩基球を sIgA で 45 分間反応させた後に IL-3 を添加してもほとんどヒスタミン遊離が認められない(図 5)ことから、sIgA によるヒスタミン遊離には sIgA 刺激前に IL-3 で前処置することが必須であると考えられた。

図 6 に sIgA による好塩基球ヒスタミン遊離の time course を示す。sIgA による好塩基球の脱顆粒は比較的早い反応であり、5 分間の sIgA 刺激にて有意なヒスタミン遊離（~5%）が認められ、ヒスタミン遊離はほぼ 45 分以内に plateau に達した。

Hirai らは数 pM の IL-3 が好塩基球脱顆粒の priming に十分であると報告している[36]。sIgA による好塩基球脱顆粒でも同様の現象が確認された。IL-3 は低濃度（5-

50 pg/ml) でも好塩基球に対して有意な priming 効果を示し、slgA による有意な脱顆粒を誘導した。IL-3 の濃度依存性に slgA 依存性ヒスタミン遊離は増加し、5000 pg/ml の IL-3 では、約 15-20% のヒスタミン遊離に達した(図 7)。受容体のβ鎖が共通である IL-5 や GM-CSF も IL-3 と同様に好塩基球の活性化作用を持っていることが知られている[36, 37]。slgA 刺激においても同様で、IL-3 の代わりに IL-5 や GM-CSF による前処置にて明らかなヒスタミン遊離が誘導された(図 7)。

slgA による好塩基球からの LTC₄ 遊離

IgE を介する刺激では、好塩基球は脱顆粒を起こし、preformed mediator であるヒスタミンを遊離するのみならず、newly synthesized mediator である LTC₄ も産生、遊離する[38, 39]。slgA 刺激によっても newly synthesized mediator の産生が誘導されるかを検討するために、好塩基球からの LTC₄ 遊離実験を施行した。図 8 に示すように、セファロースビーズに固相化した slgA は、IL-3 で priming した好塩基球から有意な LTC₄ 遊離を誘導した。その LTC₄ 遊離量は、IL-3 により priming された好塩基球が抗 IgE 抗体に反応して遊離する量の約半分であった。IL-3 により priming された好塩基球からの LTC₄ 遊離は全員に認められたが、数人(9 人中 4 人)の priming していない好塩基球からも少量の LTC₄ 遊離が認められた。このことから、slgA による LTC₄ 遊離には、全員ではないが、一部の者では、IL-3 による priming が必須ではないということが示唆された。

好塩基球ヒスタミン遊離における slgA の(Fc)₂SC 部分の重要性

slgA は 2 量体の IgA に J 鎖と SC が結合した構造をとっている(図 1)。slgA のいかなる部分が好塩基球活性化に関与しているのかを解明するために、正常血清 IgA、myeloma IgA、slgA の Fab 部分、slgA の(Fc)₂SC 部分について好塩基球の脱顆粒作用を検討した(図 9)。正常血清 IgA、myeloma IgA、また slgA の Fab 部分による刺激では全く好塩基球ヒスタミン遊離は認められなかった。一方、slgA の(Fc)₂SC 部分による刺激では slgA 刺激とほぼ同等のヒスタミン遊離が認められた。

slgA の(Fc)₂SC 部分が重要であることが判明したため、IgA の Fc 部分の受容体である FcαRI(CD89)が好塩基球の細胞表面上に発現しているかを抗 CD89 抗体を使用し、flow cytometry にて検討した。同時に施行した好酸球では、既知の報告[40]どおりに明らかな CD89 発現が認められた。一方、好塩基球上に CD89 発現は認められないとする P. Valent らの報告[41]と同様に、IL-3 で 30 分間 priming した好塩基球でも CD89 の発現は全く認められなかった(図 10)。

プレート固相化法による slgA 依存性好塩基球脱顆粒

以上の実験は固相化担体としてセファロースビーズを用いてきた。より強力な作用を惹起するために、slgA を 96 穴 ELISA プレートにコーティングし、好塩基球脱顆粒を検討した。図 11 に示すように、セファロースビーズ固相化法の結果と同様に、プレート固相化 IgA 刺激や myeloma 細胞由来の二量体 IgA2 (日大病理の茂呂先生より供与) [42] 刺激では全くヒスタミン遊離は認められなかった。一方、プレート固相化 slgA 刺激は約 50% という IgE 刺激に匹敵する強力なヒスタミン遊離を誘導した。同一人の好塩基球からの slgA によるヒスタミン遊離を担体間で比較したところ、ビーズ固相化法では $19.6 \pm 7\%$ 、プレート固相化法では $58.8 \pm 20\%$ とプレート固相化法で有意に強力な ($p < 0.02$) ヒスタミン遊離が認められた (図 12)。図 13 にプレート固相化法による time kinetics を示すが、約 120 分後に slgA 刺激によるヒスタミン遊離は最大となり、その後はほぼ plateau であった。次に IL-3 による priming 時間を変えることにより slgA 依存性好塩基球ヒスタミン遊離を検討したところ、priming 時間が 5 分で最大の遊離となった (図 14)。この結果は、IL-3 による priming は 30 分以内に生じるという既知の報告 [36] と同じであった。

次に、初乳より精製した SC を直接プレートに固相化して、好塩基球のヒスタミン遊離を検討した。1 ロットの SC でヒスタミン遊離が認められたが、その SC には、少量であるが IgA または slgA の混入が ELISA にて認められ、他の全てのロットでは全くヒスタミン遊離は認められなかった。さらに、slgA をプレートに固相化後、ポリクロナール抗 SC 抗体でそのプレートを前処置し、IL-3 で priming した好塩基球をプレートに入れ刺激する実験を施行した。図 15 に示すように、抗 SC 抗体 30 $\mu\text{g/ml}$ の濃度の前処置にて、slgA による好塩基球ヒスタミン遊離は約 24% に抑制された。

1-2 slgA による好塩基球脱顆粒機構

slgA による好塩基球脱顆粒の細胞内シグナル伝達機構を明らかにする目的で、細胞外 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} イオンの影響、百日咳毒素、各種キナーゼ阻害剤による影響を検討した。

slgA による好塩基球ヒスタミン遊離における細胞外 Ca^{2+} イオンと Mg^{2+} イオンの必要性

slgA による好塩基球脱顆粒が細胞外 Ca^{2+} イオンと Mg^{2+} イオンに依存しているかを明らかにするために、両イオンの存在下非存在下 (Ca^{2+} -/ Mg^{2+} -, Ca^{2+} -/ Mg^{2+} +, Ca^{2+} +/ Mg^{2+} -, Ca^{2+} +/ Mg^{2+} +) で好塩基球を slgA で刺激した(図 16)。 Ca^{2+} -/ Mg^{2+} -では、slgA 刺激でも抗 IgE 抗体刺激でも全くヒスタミン遊離は誘導されなかった。既報[43]の如く、抗 IgE 抗体刺激によるヒスタミン遊離は Ca^{2+} +/ Mg^{2+} -でも変化なく、細胞外 Ca^{2+} イオンのみに依存していることが確認された。一方、slgA 刺激では、両イオン一方の存在下でも、有意なヒスタミン遊離抑制 (Ca^{2+} +/ Mg^{2+} +での最大ヒスタミン遊離量の~35%) を認めた。このことから、slgA によるヒスタミン遊離には細胞外 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 両イオンに依存していることが示唆された。

百日咳毒素による slgA 依存性好塩基球脱顆粒の抑制

GTP 結合蛋白 (G 蛋白) が slgA 依存性脱顆粒の細胞内シグナル伝達機構に関与しているかを検討した。G 蛋白のサブユニットを ADP リボシル化する作用を持つ百日咳毒素 (PTX) [44] で好塩基球を 37℃、2 時間前処置し、slgA、抗 IgE 抗体、FMLP によるヒスタミン遊離を検討した。図 17 に示すように、G 蛋白非結合受容体である FcεRI を介する抗 IgE 抗体刺激は PTX で全く抑制されなかった。一方、slgA 刺激では、PTX の濃度依存性にヒスタミン遊離の抑制が認められ、その濃度依存曲線は、PTX 感受性 G 蛋白共役受容体を介する FMLP[45]刺激とほぼ同様であった。slgA 刺激による好塩基球脱顆粒のシグナル伝達機構には、PTX 感受性の G_i クラスの G 蛋白が関与していることが示唆された。

各種キナーゼ阻害薬による slgA 依存性好塩基球脱顆粒の抑制

好塩基球活性化には、種々のキナーゼが働いていることが報告されている[46-49]。好塩基球の slgA 受容体を介するシグナル伝達機構におけるキナーゼの関与を明らかにするために、各種キナーゼ阻害剤を使用してヒスタミン遊離を検討した(表 2)。phosphatidylinositol (PI) 3-kinase 阻害薬の wortmannin、MEK-1 阻害薬の PD98059、p38MAP kinase 阻害薬の SB203580、protein kinase (PK) C 阻害薬の staurosporine、protein tyrosine kinase (PTK) 阻害薬の genistein で好塩基球

を前処置し、slgA によるヒスタミン遊離を行い、抗 IgE 抗体刺激と比較した。阻害薬なし時のヒスタミン遊離を 100%とした表である(表 2)。抗 IgE 抗体によるヒスタミン遊離は staurosporine、wortmannin で抑制された。一方、slgA による遊離は PD98059、SB203580 では部分的にしか抑制されず、wortmannin では完全に抑制が認められた。

1-3 slgA 依存性好塩基球脱顆粒における細胞接着の重要性

slgA 依存性好塩基球脱顆粒における $\beta 2$ integrin の役割

slgA による好塩基球脱顆粒は slgA を固相化しないと誘導されない。また、細胞内の microtubule の集合阻害作用を持つ cytochalasin B[50]にて好塩基球を前処置すると、抗 IgE 抗体によるヒスタミン遊離は既知の報告どおり増強したが、slgA による遊離は完全に抑制された(図 18)。これらのことから、slgA による好塩基球脱顆粒には細胞接着が関与していると考えられ、接着分子の役割を検討した。好塩基球の細胞表面上には、接着分子として、LFA-1 (CD11a/18)、MAC-1 (CD11b/18)、gp95, 150 (CD11c/18)の 3 種類の $\beta 2$ integrin、VLA-4 (CD49d/29)、VLA-5 (CD49e/29)、VLA-6 (CD49f/29)の 3 種類の $\beta 1$ integrin が発現していることが報告されている[41, 51-53]。そこで、slgA による好塩基球脱顆粒における各種 integrin の影響を検討した。 $\beta 2$ integrin である CD11a、CD11b、CD11c、CD18 に対する mAb、また $\beta 1$ integrin である CD49d、CD29 に対する mAb で好塩基球を前処置して、固相化 slgA 刺激によるヒスタミン遊離を検討した。図 19 に示すように、抗 CD11a、CD11b、CD11c、CD49d、CD29 抗体による前処置は、全く slgA による好塩基球脱顆粒に影響を及ぼさなかった。一方、抗 CD18 抗体による前処置では、明らかにヒスタミン遊離の抑制が認められ、slgA による好塩基球脱顆粒には $\beta 2$ integrin が関与していることが示唆された。次に、直接 $\beta 2$ integrin を介した刺激により好塩基球脱顆粒が誘導されるかを明らかにするために、 $\beta 2$ integrin のリガンドである sICAM-1 やフィブリノーゲンを直接 96 穴プレートに固相化して、IL-3 で priming した好塩基球を反応させたが、全くヒスタミン遊離は認められなかった(図 20)。

1-4 喘息患者と健常人における sIgA による好塩基球脱顆粒の比較

気管支喘息患者における sIgA 依存性好塩基球脱顆粒の重要性

表 1 に示すように、アトピー型喘息 8 人、非アトピー型喘息 2 人、アレルギー疾患を持たない健常人 10 人について、sIgA による好塩基球ヒスタミン遊離について検討を行った。その結果を表 3 に示す。どの項目に関しても喘息患者群と健常人群とで有意差は認められなかった。

喘息患者 10 人中 4 人で、IL-3 による priming なしで、sIgA 刺激にて明らかな好塩基球ヒスタミン遊離が認められた(図 21)。その中の一人は IL-3 priming なしでも約 11% のヒスタミン遊離が誘導された。本症例はアスピリン喘息患者で非アトピー性喘息であった。

年齢、罹病期間、PEF(%), 好塩基球数、好塩基球比率、好酸球数、好酸球比率、sIgA 刺激(IL-3 priming+), 抗 IgE 抗体刺激(IL-3 priming-), FMLP 刺激(IL-3 priming-) の sensitivity, reactivity などの種々の因子に関して、相関関係が認められるかを検討した。表 4 に有意水準 5% で相関関係が認められたものを示すが、喘息患者 10 人のみに絞った検討で、喘息患者の罹病期間と sIgA 刺激の sensitivity に正相関が認められた。なお、症例数が少ないため、喘息患者の重症度や発作強度との関連に関しては検討できなかった。

考察

気道や消化管などの粘膜組織の表面は、種々の微生物の侵入に対する特異的な感染防御機構として、粘膜バリアーと呼ばれる粘液層に覆われている。粘液層を構成する分泌液中に最も多く含まれる免疫グロブリンは IgA であり、その大部分は slgA の形をとる[54]。粘膜組織の IgA、主に slgA は、微生物などの侵入に対する生体防御機構に関わっている[19, 55]。IgA、特に slgA は、粘膜免疫において、細菌由来の毒素、酵素やウイルスに対する中和作用や、細菌の粘膜面への接着阻害作用などを介して、微生物の侵入を阻止していると考えられている。IgA 欠損症患者では、健常人では見られないタイプの感染をしばしば繰り返すことが知られている[55]。試験管内の実験では、好中球やマクロファージが IgA と細菌の複合体を除去し得ることや微生物や毒素に対して FcαR を介した抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)や貪食活性を示すことも証明されている。さらに、最近の報告では、slgA は HIV に対しても中和活性や ADCC 活性などを有することも明らかになった[56, 57]。このように IgA、slgA を介した感染防御を担っている粘膜組織は、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、食物アレルギーなどのアレルギー性炎症の場でもある。IgA や slgA も、細菌やウイルスに対する感染防御だけではなく、アレルギー性炎症の病態形成に関わっていることが報告されている。喘息患者の喀痰中 IgA は健常人と比較し有意に多い[58]。また、アレルギー性鼻炎患者の鼻腔洗浄液中や喘息患者の肺胞洗浄液中の IgA は、アレルギー疾患でない者より高値をとる[54]。抗原特異的 IgA に関しても、ダニ抗原に感受性を持つ喘息患者の喀痰中ダニ特異的 IgA は、ダニ抗原に感受性を持たない喘息患者のものより上昇していることが示されている[59]。またブタクサに感受性を持つアレルギー性鼻炎患者では、ブタクサの飛散時期に、鼻汁中のブタクサ特異的 IgA 値と好酸球数や EDN が同時に上昇する[60]。さらに喘息患者の生理食塩水による誘発喀痰中の ECP 値と IgA 値には有意な正相関が認められ、生体内でも slgA が好酸球活性化に関連していることも報告されている[58, 61]。

IgE 抗体がレアギンとして好塩基球脱顆粒に免疫グロブリンとして関わっていることは明らかである[1]。また IgG4 抗体も好塩基球脱顆粒を誘導し得るという報告も認められる[62]。一方、好塩基球活性化における slgA の役割に関する報告はこれまでなかった。本研究で初めて固相化 slgA がヒト好塩基球からのメディエーター遊離を誘導することが明らかにされた。アレルギー性炎症の場である粘膜組織で slgA は最も豊富な免疫グロブリンであり、slgA による好塩基球活性化機構は、生体内においても重要な役割を果たしているものと考えられる。

slgA による好塩基球脱顆粒には IL-3 による priming が必須であった(図 3)。IL-3 はもともとマウス mast 細胞において増殖、分化を誘導する因子として同定され

た[63]。しかしながら、ヒトにおいて、IL-3 は、マスト細胞の増殖には関与せず、好塩基球に対する増殖、分化因子として働いていることが明らかになった[6]。一般的に増殖因子は、前駆細胞に対する分化増殖作用と成熟細胞に対する生物活性増強作用の二つの生理活性を有している。これはヒト好塩基球にも適合することで、ヒト好塩基球増殖因子である IL-3 はヒト好塩基球活性化因子として作用することが判明している[64]。IL-3 は、好塩基球の遊走作用[33]、内皮細胞への接着作用[51]、生存延長作用[65]以外にも、好塩基球のメディエーター遊離を増強する作用[36, 66]も有している。IL-3 は、一部のアレルギー患者の好塩基球に対しては直接ヒスタミン遊離を惹起するが、健常人やアレルギー患者のほとんどに対しては直接の脱顆粒作用は持たず、刺激によるメディエーター遊離を増強する priming 作用を有している。本研究においても IL-3 による priming なしで固相化 slgA により刺激しても、好塩基球の脱顆粒は全く誘導されなかった。しかしながら、短時間 IL-3 で priming することにより slgA 刺激で明らかな好塩基球脱顆粒が認められた。一般的に好塩基球の priming に要する時間は短時間で十分であり、IL-3 で 15 分間好塩基球を前処置することで抗 IgE 抗体刺激による好塩基球ヒスタミン遊離が増強される[36]。slgA による好塩基球脱顆粒も同様であり、IL-3 で 5 分間 priming するだけで強力なヒスタミン遊離が認められた(図 14)。また、IL-3 の次に slgA を添加するという順序が、slgA による好塩基球ヒスタミン遊離には重要であり、IL-3 が priming 作用を持ち、slgA が脱顆粒作用を持つことが確認された(図 5)。slgA の場合と同様に、IL-3 による priming が好塩基球脱顆粒を惹起するために必須であるという現象は C3a[66]や PAF[67]などの因子でも認められる。slgA による好塩基球活性化に要する IL-3 は pM という低濃度で十分であり、IL-3 は好塩基球上の高親和性 IL-3 受容体(IL-3R)に結合して作用を及ぼしていると考えられた。IL-3R を介するシグナル伝達には IL-3R のβ鎖が関わっていると考えられている。IL-5 や GM-CSF も受容体のβ鎖が IL-3R β鎖と同一であり、β鎖を介するシグナル伝達が重要であることが報告されている[68]。IL-5 や GM-CSF による priming でも slgA による好塩基球脱顆粒は誘導された(図 7)。このことから slgA による好塩基球脱顆粒の priming に関連する細胞内シグナル伝達は IL-3R のβ鎖を介するものが重要であると考えられた。これらの好塩基球活性化作用を持つ cytokine は主にアレルギー性炎症局所で活性化された Th2 細胞や上皮細胞により産生される。生体内では、組織に遊走した好塩基球がこれらの cytokine で priming されることは十分に考えられ、本研究で認められた slgA による好塩基球脱顆粒は、生体内のアレルギー性炎症局所でも生じていると考えられる。

好塩基球の遊離するアレルギー性炎症で重要なメディエーターとして、preformed mediator であるヒスタミン、early generated mediator である LTC4、delayed

generated mediator である IL-4[12, 69]や IL-13[70, 71] などの Th2 タイプの cytokine が挙げられる。slgA による好塩基球活性化として、preformed mediator であるヒスタミンと early generated mediator である LTC₄ 遊離が認められることを確認した (図 8)。slgA 刺激によって、IL-4 や IL-13 が産生され得るかどうかは重要な課題であり、現在検討中である。

slgA は、前述の通り二量体の IgA と J 鎖と SC により構成されている。IgA には、IgA1 と IgA2 の二種類のサブクラスが存在する。血清 IgA は IgA1 の占める割合が多く、slgA は IgA2 が占める割合が多い[72]が、単量体の IgA1、二量体の IgA2 を固相化しても全く好塩基球からヒスタミン遊離は認められなかった。また、10% は IgA2 を含有していると考えられる血清 IgA の高濃度刺激においても全く好塩基球脱顆粒を認めなかった。このことから IgA と slgA による好塩基球脱顆粒作用の違いは IgA のサブクラスの相違に起因するものではないと考えられた。我々の結果から slgA の好塩基球脱顆粒には、Fab 部分ではなく、(Fc)₂SC 部分が重要であると判明した (図 9) が、好塩基球上の slgA 結合部位は下記の理由から FcαRI(CD89)とは異なると想定される。好中球、好酸球などの白血球では FcαRI の発現が報告されている[40, 73]が、他の報告[41]や我々の検討でも flow cytometry による解析では好塩基球上に CD89 は全く認められない (図 10)。また、競合実験の検討では、固相化 slgA によるヒスタミン遊離は、250μg/ml という高濃度の可溶性血清 IgA 存在下においても全く抑制されなかった。これらの結果や、固相化単量体 IgA は脱顆粒作用を持たないという事実から、slgA により惹起される好塩基球脱顆粒に CD89 は関与していないと考えられる。最近の報告で、好酸球上に splicing variant の FcαR が報告された[74, 75]。この FcαR は FcαRI の第二細胞外 domain が欠損しており、slgA や二量体 IgA はこの FcαR に結合できるが、単量体 IgA は結合できないとされている。好塩基球上にもこのような variant の FcαR が発現しているのかは不明である。しかしながら、myeloma 細胞由来の固相化二量体 IgA2 でも全く好塩基球ヒスタミン遊離が誘導されなかったことから、このような variant の FcαR も slgA による好塩基球脱顆粒に関与しているとは考え難い。

一方、同じアレルギー性炎症細胞である好酸球は CD89 を発現し[40]、IgA も slgA も FcαRI を有する好酸球に対する強力な脱顆粒作用[32, 76]、活性酸素産生作用[29]を持っている。しかしながら、slgA による好酸球脱顆粒は FcαRI を介する経路だけではない。Abu-Ghazaleh らの報告では、slgA は常に IgA より強力な好酸球 EDN 遊離を誘導する[76]。さらに IgA による活性酸素産生は抗 FcαRI 抗体による前処置で完全に抑制されるのに対して、slgA による好酸球からの活性酸素産生は、抗 FcαRI 抗体による前処置で部分的にしか抑制されないと報告されている[77]。これらの結果から slgA による好酸球のシグナル伝達には、FcαRI と未同定の slgA 結合部位の

2種類が関わっていると考えられる。好酸球では Fc α RI 以外の sIgA 結合部位のリガンドとして、SC が想定されている。我々の検討では、固相化 SC により IL-3 前処置好塩基球から有意な脱顆粒は誘導されなかった。大量の高純度の好塩基球を手に入れることは困難なため、これまでに直接 SC が好塩基球に結合することは証明できていない。sIgA と好塩基球との結合部位は、sIgA の (Fc) α SC 部分であることは明らかであるが、(Fc) α SC 部分の中で SC が直接好塩基球に結合するかどうかは現在検討中である。一方、好酸球では SC の結合部位/受容体の存在が報告されている。Lamkhieuoued らは、15 kDa 蛋白が好酸球上の SC 結合部位であり[78]、Scatchard 解析にて細胞あたり 1.1×10^5 個の受容体が存在し解離定数 $K_a = 2.76 \times 10^8 / M$ であると報告している[79]。また、Motegi らは、SC が直接好酸球に結合し、EDN 遊離を誘導することを証明している[29]。Lamkhieuoued らは、SC により好酸球から EPO 遊離が誘導されることを示している[78]。また、固相化 SC は IL-5 との共存で活性酸素も産生させる[29]。これらの報告での SC による好酸球活性化は、Fc α RI 以外を介する sIgA の生物学的活性の一端を示している。

重要なことは、好酸球上の SC 結合部位が機能的に $\beta 2$ integrin に関連しているという点である。Motegi らは SC による好酸球の活性酸素産生が抗 CD18 抗体により完全に抑制されたと報告している[29]が、直接 SC が $\beta 2$ integrin に結合しているかは不明である。 $\beta 2$ integrin はヒト好酸球の脱顆粒において必須の役割を果たしていることが明らかになっている。アルブミンは $\beta 2$ integrin のリガンドであるが、アルブミンを固相化したプレート上の好酸球に、可溶性刺激として PAF を加えると脱顆粒が誘導される[80]。このような可溶性刺激による好酸球脱顆粒は、非接着好酸球では認められず、 $\beta 2$ integrin は直接細胞に脱顆粒シグナルを送るわけではないが、PAF 依存性脱顆粒に必須の補助的な受容体として働いていると考えられる。この接着依存性好酸球脱顆粒は、抗 CD18 抗体により完全に、抗 CD11b 抗体により部分的に抑制される。さらに、CD11b/18 は、固相化 IgG 刺激による好酸球脱顆粒にも重要である[81]。このケースでも $\beta 2$ integrin である CD11b/18 は、基本的には補助的なシグナルを送っていると考えられる。一方、好酸球と比較し、好塩基球脱顆粒に関する $\beta 2$ integrin の役割はほとんど知られていない。しかしながら、 $\beta 2$ integrin が好塩基球活性化に関しても重要な役割を担っていることが報告されている。zymosan は補体の alternative pathway を活性化し、C3b/i 結合 zymosan は CD11b/18 を介して、細胞内にシグナルを伝えることが知られているが、活性化 zymosan は IgE を介した好塩基球ヒスタミン遊離を増強することが示されている[82]。さらに、entry receptor として $\beta 2$ integrin を使用する rhinovirus 感染では、抗原曝露後の血漿ヒスタミン値が上昇しているとの報告も認められる[83]。このことから好塩基球の生理的機能を活性化するシグナルを誘導するために $\beta 2$ integrin

への結合は重要な役割を果たしていると考えられる。

固相化した slgA 刺激と比較して、固相化していない slgA 刺激では全く好塩基球脱顆粒は誘導されなかった。IL-3 で priming した好塩基球を可溶性 slgA と反応し、さらにポリクロナール抗 IgA 抗体や抗 slgA 抗体を加えても好塩基球脱顆粒は誘導されなかった。また、凝集させた slgA を可溶性刺激として使っても、好塩基球脱顆粒は生じなかった(data not shown)。また、細胞接着阻害作用を持つ cytochalasin B による前処置で、slgA による脱顆粒は完全に抑制された(図 18)。これらの結果から、細胞接着が slgA による好塩基球脱顆粒機構には重要であることが示唆された。また、 $\beta 2$ integrin を介する接着には、細胞外 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} イオンに依存していることが知られている[84]。 Ca^{2+} イオンのみに依存している IgE を介するメディエーター遊離に対し、slgA による好塩基球脱顆粒には、細胞外 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} イオンの両者に依存していた(図 16)。さらに好塩基球は、元々 $\beta 2$ integrin を細胞表面に発現しているが、IL-3 で処置するとその発現が増加することが知られている[51]。好酸球の場合と同様に、IL-3 で priming した好塩基球を抗 CD18 抗体で前処置すると、slgA による脱顆粒が抑制された(図 19)。 $\beta 2$ integrin が重要な働きをしていることはほぼ間違いないが、下記の理由から SC/slga の結合部位は $\beta 2$ integrin とは異なっていると考えられる。第一に、 $\beta 2$ integrin のリガンドである sICAM-1 やフィブリノーゲンを固相化して刺激しても、IL-3 で priming した好塩基球から全く脱顆粒は認められなかった(図 20)。第二に、flow cytometry による検討で、IL-3 で priming した好塩基球を slgA と反応させても $\beta 2$ integrin の発現は全く変化しなかった(data not shown)。第三に、 $\beta 2$ integrin のシグナル伝達には、PTX 感受性 G 蛋白は関与していない。従って、これらの結果から slgA の受容体は $\beta 2$ integrin とは異なり、 $\beta 2$ integrin は、slgA を介する好塩基球脱顆粒に関して必須ではあるが、補助的なシグナルを送っているものと考えられた。

slgA による好塩基球脱顆粒に関するシグナル伝達機構を明らかにするために、種々の阻害剤を用いてその脱顆粒を検討した。slgA を介するシグナル伝達は根本的に IgE を介するものとは全く異なり、むしろ FMLP に似た G 蛋白共役受容体が関与していた。 G_i クラスの PTX 感受性 G 蛋白は slgA を介する好塩基球脱顆粒には非常に重要な役割を果たしていると考えられた。また、好中球や U937 cell line では G 蛋白の $\beta\gamma$ サブユニットからのシグナルが直接 PI 3-kinase の $p110\gamma$ サブユニットを活性化すると報告されている[85-87]。nM 濃度の wortmannin は直接 PI 3-kinase の $p110$ サブユニットを抑制する[88]が、slgA によるヒスタミン遊離は wortmannin により完全に抑制され(表 2)、slgA を介する好塩基球脱顆粒には PI 3-kinase の $p110$ が重要であることが示唆された。種々の MAP kinase が G 蛋白共役受容体を介するシグナルにより活性化され[89]、PI 3-kinase の $p110\gamma$ が G 蛋白 $\beta\gamma$ サブユニットに依

存した MAP kinase の調節に関与していることが報告されている[90]。MEK-1 阻害薬の PD98059 や p38MAP kinase 阻害薬の SB203580 は slgA による好塩基球脱顆粒を部分的に抑制したことから、MEK-1 や p38MAP kinase も slgA を介する好塩基球脱顆粒に一部関与しているものと考えられた。低濃度の staurosporine は選択的に PKC を阻害する[91]が、そのような低濃度(0.1-10 nM)の staurosporine では、slgA によるヒスタミン遊離は抑制されなかった。直接それぞれの阻害剤の基質を測定してはいないが、これらの結果から、slgA を介する好塩基球脱顆粒のシグナル伝達には、PTX 感受性 G 蛋白、PI 3-kinase、MAP kinase が関与していることが示唆された。

slgA による好塩基球脱顆粒の気管支喘息患者と健康者との相違については、現在例数が少ないため正確な結果とはいえないが、喘息患者の一部の者は、好塩基球を IL-3 で priming しなくても、slgA 刺激にて明らかなヒスタミン遊離が惹起された(図 21)。おそらく喘息患者の一部では、Th2 細胞が活性化されていて、Th2 細胞由来の IL-3、IL-5 などにより常に好塩基球が priming されている状態にあり、ヒスタミン遊離が起こりやすい状態にあると考えられた。喘息患者 10 人のみに絞った検討で、喘息患者の罹病期間と slgA 刺激の sensitivity に正相関が認められた(表 4)ことから、臨床的にも slgA 依存性好塩基球脱顆粒が重要であることが示唆された。今後、症例数を増やし、喘息患者の重症度や発作強度との関連に関しても検討して行きたい。

試験管内の実験での slgA による好塩基球からのメディエーター遊離は、生体内における slgA による好塩基球活性化機序の存在を示唆している。末梢血中の好塩基球は slgA に対する反応性を持たないが、IL-3 や IL-5 などの好塩基球活性化サイトカインにより priming されることで、slgA 刺激で好塩基球脱顆粒が誘導される。生体内では、これらのサイトカインは進行中のアレルギー性炎症の場に浸潤した Th2 リンパ球によって局所で産生され、その炎症組織に遊走した好塩基球を priming する。プレート固相化 slgA 刺激では約 50%の強力なヒスタミン遊離が誘導され、slgA 依存性好塩基球脱顆粒は、抗 IgE 抗体刺激に匹敵する強力なものであった。抗原-slgA 免疫複合体は生体内における固相化 slgA の生理的な形と考えられる。生体内のアレルギー炎症局所では、IgE 抗体より slgA 抗体の方が豊富に存在しているため、slgA による好塩基球脱顆粒は、今までに想定されていない好塩基球活性化機序として非常に重要な役割を担っているものと考えられる。

おわりに

本研究にて、気道などの粘膜組織で最も豊富に存在する sIgA が I 型アレルギー反応遅発相で重要な好塩基球からのメディエーター遊離を IgE と同様に強力に誘導することを初めて報告した。図 22 に sIgA による好塩基球脱顆粒の模式図を示す。sIgA による好塩基球脱顆粒には好塩基球活性化因子である IL-3 による priming が必須であった。また、sIgA を介する好塩基球脱顆粒のシグナル伝達には、PTX 感受性 G 蛋白、PI 3-kinase が重要な役割を果たしていることが確認された。また、喘息患者の一部の者では、IL-3 による priming なしでも sIgA による好塩基球脱顆粒が誘導された。sIgA は粘膜分泌液中で最も豊富な免疫グロブリンであり、アレルギー性炎症の場で選択的に産生される IL-3 などの cytokine で priming された好塩基球から sIgA が脱顆粒を惹起するという好塩基球活性化機構は、気道や消化管などの粘膜でのアレルギー性炎症の遷延化において重要な役割を果たしているものと考えられる。

2. 好酸球の高親和性 IgE 受容体発現調節

はじめに

アレルギー疾患や寄生虫感染症において、血液中の好酸球や IgE の増加は特徴的に認められる所見である[92, 93]。流血中より炎症局所に遊走し活性化された好酸球は、MBP、EPO、ECP、EDN などの細胞傷害性顆粒蛋白を遊離したり[9]、LTC₄、PAF などのリン脂質由来メディエーターや活性酸素などを産生放出する[6]ことにより、炎症局所でエフェクター細胞として働くと考えられている。アレルギー疾患の一つである気管支喘息では、炎症局所の気道における好酸球増加と好酸球由来の顆粒蛋白が認められ、これらは喘息の重症度と相関していると報告されている[94]。さらに寄生虫感染症でも、寄生虫の周囲に好酸球由来の MBP の沈着が認められている[95]。好酸球が機能を発揮するには各種メディエーター遊離が重要であるが、体内における好酸球活性化機構は未だ充分には解明されていない。

一方、IgE は健康人において血清中濃度が 10-200 ng/ml と最も低値の免疫グロブリンである。しかし、アトピー型気管支喘息、アトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患や寄生虫感染症の際には著明に上昇する。成熟 B 細胞における抗原特異的 IgE 抗体の産生誘導に関しては IL-4 や IL-13 などの cytokine と CD40 からのシグナルが重要である[96]。Th2 細胞だけでなく、マスト細胞、好塩基球などから産生されることも近年報告されている IL-4 や IL-13[70, 71, 96]は、B 細胞上の IL-4R や IL-13R に結合する。B 細胞は T 細胞やマスト細胞に発現する CD40 リガンドとの cognate interaction により刺激され、IgE 産生が誘導される。産生された IgE はマスト細胞や好塩基球に存在する FcεRI (図 23) に結合する。さらに多価抗原が細胞表面の IgE に結合し、FcεRI が架橋されることにより、マスト細胞や好塩基球が活性化される[97]ことにより抗原依存性 I 型アレルギーが惹起されると考えられている。

ヒトにおいてマスト細胞や好塩基球が FcεRI を発現することは従来より知られているが、最近では Langerhans 細胞[98, 99]、単球[100]、樹状細胞[101]、巨核球/血小板[102, 103]にも機能的な FcεRI の発現が報告されている。さらに近年の研究からヒト好酸球も FcεRI を発現し得ることが明らかとなっている[95, 104-108]。健康人の好酸球には FcεRI の細胞表面発現は認められないが、アレルギー疾患患者[105]や好酸球増多症患者[95]では少量の FcεRI が細胞表面に発現されていることが報告されている。1994 年に Gounni らは、好酸球増多症患者において細胞表面に FcεRI が発現していることを flow cytometry で証明し、その FcεRI を架橋することにより細胞内に活性化シグナルが伝達され、IgE 依存性 ADCC やメディエーター遊離が生じることを報告している[95]。この実験事実は、ヒト好酸球がある条件下では細胞表面に機能的 FcεRI を発現し得ることを示している。しかしながら、

好酸球の細胞表面 FcεRI 発現の調節機構に関しては未だに解明されていない。さらに健常人由来の好酸球が細胞表面に FcεRI を発現し得るかについても不明である。一方、マウスのマスト細胞[109]、およびヒト好塩基球[110, 111]、ヒト臍帯血由来培養マスト細胞[112, 113]では、FcεRI の表面発現が IL-4 と IgE により増強されることが最近報告されている[114]。この報告に基づいて、マスト細胞や好塩基球とともにアレルギー性炎症に関与する好酸球においても同様の機序で FcεRI の発現が調節され得るとの仮説の下、健常人好酸球を用いて IL-4 と IgE により FcεRI の発現が誘導調節され得るかを検討した。

材料と方法

試薬

ヒト myeloma IgE は Biodesign (Kennebunk, ME, USA) から、ヒト rIL-4 は Peprotech (London, イギリス) よりそれぞれ購入した。ヒト rIL-5 は サントリー (大阪) より提供された。FcεRI 発現の測定には、IgE と競合することなくヒト FcεRIα鎖を認識するマウス mAb である CRA-1 (順天堂大学の羅智靖先生より提供) [96] を使用した。isotype の一致したマウスコントロール抗体として IgG2bκ (MOPC 141) を ICN Pharmaceutical (Aurora, OH, USA) より購入した。リコンビナント可溶性ヒト FcεRIα鎖(rsFcεRIα)[115, 116] も羅智靖先生より提供された。Ionophore A23187 は Calbiochem (La Jolla, CA, USA) より購入した。

細胞調整と培養

アレルギー疾患の既往がないボランティアから、informed consent を得て採血した末梢血から好酸球を分離精製した。前述の方法で、Percoll による非連続密度勾配法後、抗 CD16 mAb 結合 magnetic microbeads で negative selection し、精製好酸球を得た[34]。好酸球の純度は 99% 以上、生存率は 95% 以上であった。精製好酸球は 3 回洗浄後、10% FCS (大日本製薬、大阪)、rIL-5 (10 ng/ml、培養期間中の好酸球維持のため添加)、L-glutamine (2 mM) (GIBCO, Grand Island, NY, USA、以下同様)、抗生物質として penicillin (100 U/ml)、streptomycin (100 µg/ml)、amphotericin B (0.4 µg/ml) を含む RPMI 1640 medium に浮遊させ、12 穴もしくは 24 穴プレート(岩城硝子、千葉)で IL-4、IgE の存在下、非存在下にて 37°C、7 日間培養した。

Flow cytometry による FcεRI の解析

培養後回収した好酸球は、3% FCS、0.1% NaN₃ を含む PBS で 2 回洗浄し、5 µg/ml の CRA-1 もしくはコントロール mAb (IgG2bκ) で 60 分間氷中で反応させた。1 回洗浄後、細胞を FITC 結合ヤギ抗マウス IgG 抗体 F(ab')₂ (7 µg/ml) (Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA, USA) と 30 分間氷中で反応させた。その後、細胞を 2 回洗浄し、細胞の蛍光強度を EPICS XL System II (Coulter, 東京) を用いて測定した。好酸球の蛍光強度の中央値は FITC 標準粒子、すなわち Quantum 25 microbeads (Flow Cytometry Standards Co., San Juan, PR, USA) を使い、molecules of equivalent soluble fluorochromes (MESF) 値に換算して計測した[112]。図 24 に MESF 値換算の一例を示す。

メディエーター遊離の解析

メディエーター遊離には、0.1% HSA を含む RPMI 1640 medium を使用した。7 日間培養後、好酸球を myeloma IgE (1 μ g/ml) で 37°C、2 時間感作し、その後 2 回洗浄し、CRA-1、コントロールマウス IgG2b もしくは ionophore A23187 で 37°C、4 時間反応させた。反応後の上清中の EDN は、RIA キット(Pharmacia, Uppsala, Sweden)にて測定した。EDN 遊離率は全細胞内 EDN 含有量に対する百分率で示した。上清中の LTC4 は EIA キット(Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA)にて測定した。全ての実験は少なくとも duplicate で測定した。

分光蛍光光度計による細胞内 Ca^{2+} 流入の測定

培養後の好酸球を洗浄し、2% BSA を含む Hanks' Balanced Salt Solution (GIBCO BRL)にて 2×10^6 cells/ml の濃度で浮遊させた。その後、2 μ M Fura 2-AM (同仁堂、熊本)で 37°C、20 分間処理した。細胞を洗浄後、PIPES 緩衝液(25 mM PIPES、119 mM NaCl、5 mM KCl、1 mM $CaCl_2$ 、1 mM $MgCl_2$ 、0.03% HSA)に 1.6×10^6 cells/ml の濃度で浮遊させた。細胞浮遊液(600 μ l)をキュベットに入れ、予め 37°C に温めたのち、CRA-1、コントロールマウス IgG2b もしくは ionophore A23187 を添加し、細胞内 Ca^{2+} 流入を F-2500 形分光蛍光光度計(日立、東京)にて測定した。

統計学的分析

データは平均±標準誤差(SEM)にて示した。統計学的有意差の検定には Student t-test を用い、 $p < 0.05$ で有意差ありとした。

結果

2-1 IL-4 と IgE の共存下における健常人好酸球の FcεRI 表面発現誘導

アレルギー疾患を持たない健常人から得た好酸球上に FcεRI の発現が認められるかをまず flow cytometry にて解析した。しかしながら、検討した4人の好酸球上には有意な FcεRI 発現は認められなかった。一方、ヒト臍帯血由来培養マスト細胞では、IgE が FcεRI 発現を増加させ、IL-4 は IgE と協調して細胞表面への FcεRI 発現をさらに増強すると報告されている[112, 117]。また、IL-4 がヒトマスト細胞や好酸球での FcεRIα mRNA 発現を増強することも報告されている[113, 118]。これらの知見に基づき、好酸球を IgE (1 μg/ml)、IL-4 (10 ng/ml) の存在下、非存在下に於て7日間培養し、細胞表面への FcεRI 発現を flow cytometry にて検討した。図 25A に示すように、6人中2人においては、IL-4 と IgE の非存在下や IL-4 のみ或いは IgE のみの存在下では、好酸球上に有意な FcεRI 発現は認められなかった。これに対して、6人中4人の好酸球上には IL-4 単独存在下でわずかながら有意な FcεRI 発現が認められた(図 25B)。一方、6人全員において IL-4 と IgE の共存下では7日間培養で好酸球上に明らかな FcεRI 発現が認められた(図 25)。しかしながら、ヒト培養マスト細胞と比較すると、好酸球上に発現した FcεRI は MESF 値として 1000 程度でありマスト細胞の FcεRI 発現量の 1%以下と非常に少量であった。

CRA-1 mAb が好酸球上に発現した FcεRI を特異的に認識しているかを確認するために、rsFcεRIαによって好酸球への CRA-1 結合を抑制できるかを検討した。IL-4 と IgE の存在下で7日間培養後、好酸球を回収し2回洗浄した。その後、種々の濃度の rsFcεRIαを加えた後に CRA-1 抗体を添加し、好酸球に結合した CRA-1 抗体を flow cytometry で解析した。図 26 に示すように、5 μg/ml 以上の濃度の rsFcεRIαの存在下で、好酸球への CRA-1 結合はほぼ完全に抑制された。なお、FcεRI を高発現している好塩基球への CRA-1 抗体の結合も、5 μg/ml 以上の濃度の rsFcεRIα存在下でほぼ完全に抑制された。これらの結果から、IL-4 と IgE の存在下で7日間培養した好酸球へ CRA-1 抗体が結合することは、好酸球の細胞表面に FcεRI が発現されていることを反映しているものと考えられた。

2-2 好酸球上の FcεRI 発現誘導における IL-4 と IgE の重要性

Yamaguchi らは既にヒト培養マスト細胞において、健常人血清に認められうる低濃度 (50 ng/ml) の IgE が in vitro で細胞表面の FcεRI 発現を増強することを報告している[112]。同様の現象が好酸球においても認められた。IL-4 (10 ng/ml) 存在下の培養による好酸球上の FcεRI 発現量は、培養液に添加する IgE の濃度依存性に増加し、50 ng/ml 以上の濃度の IgE 存在下で7日間培養すると有意な FcεRI 発現が

好酸球表面にも認められた(図 27)。0.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度の IgE 存在下にて、最強の Fc ϵ RI 発現が認められた。なお、前述のように IL-4 非存在下では、IgE は好酸球に対して有意な Fc ϵ RI 発現を誘導しなかった。

次に、好酸球の Fc ϵ RI 発現に対する各種濃度の IL-4 の影響を、IgE (1 $\mu\text{g/ml}$) の存在下、非存在下で検討した(図 28)。IgE 非存在下では、IL-4 (10~100 ng/ml) 存在下培養での好酸球の MESF 値は、IL-4 非添加培養時よりもわずかながら高値を示した。これに対して、IgE (1 $\mu\text{g/ml}$) 存在下では、IL-4 (0.1~100 ng/ml) 存在下培養で、好酸球上に有意な Fc ϵ RI 発現が認められた。最大の Fc ϵ RI 発現誘導には、IgE (1 $\mu\text{g/ml}$) に加えて、1~100 ng/ml の濃度の IL-4 の存在が必要であった。

好酸球の Fc ϵ RI 発現に対する IL-4、IgE の影響を時間を追って検討した。図 29 に示すように、IL-4 (10 ng/ml)、IgE (1 $\mu\text{g/ml}$) の存在下培養で 2 日目には明らかな Fc ϵ RI 発現が認められた。その後は培養日数が増えるのに従い徐々に Fc ϵ RI 発現量は増加した。しかしながら、図には示さないが、14 日間培養と 7 日間培養で比較したところ Fc ϵ RI 発現量はほぼ同じであり、最大の Fc ϵ RI 発現誘導には 7 日間培養で充分であることが確認された。なお、14 日間培養では生存する好酸球数が 7 日間培養と比較し著減したため、他の実験では培養期間を 7 日間までとした。IL-4 単独存在下では、培養 2 日目に明らかな Fc ϵ RI 発現が認められたが、さらに培養を続けると Fc ϵ RI 発現量は徐々に減少した。IgE 単独存在下培養では、ほとんど Fc ϵ RI 発現は認められなかった。他の健常人から得た好酸球でも同様の結果であった。

2-3 好酸球上の Fc ϵ RI の機能解析

好酸球上に発現した Fc ϵ RI の機能を調べるために、まず、IL-4 (10 ng/ml)、IgE (1 $\mu\text{g/ml}$) のそれぞれの存在下、非存在下にて 7 日間培養した好酸球を使い、メディアーター遊離を検討した。しかしながら、どの条件下の好酸球も CRA-1 mAb 刺激に対して(表 5)、また表には示さないがポリクロナール抗 IgE 抗体刺激に対しても、全く EDN 遊離が認められなかった。一方、非特異刺激である Ca ionophore A23187 では、培養好酸球から明らかな EDN 遊離が認められた(表 5)。LTC4 遊離に関しても、CRA-1 刺激では全く認められなかったが、ionophore A23187 刺激では明らかな遊離が認められた。さらに CRA-1 mAb によって、好酸球の細胞表面の Fc ϵ RI を架橋することにより、細胞内 Ca^{2+} 流入が生じるかを検討したが、有意な Ca^{2+} 流入は認められなかった。

考察

健康人末梢血の好酸球は細胞表面に FcεRI を発現していないが、IL-4 と IgE の存在下で数日培養すると少量ながら明らかに細胞表面に FcεRI を発現することが確認された。IL-4 と IgE の存在下培養後の好酸球への CRA-1 結合が rsFcεRIα によって抑制されたことは、好酸球上に FcεRI が発現されていることを示している(図 26)。興味深いことは、IL-4 単独や IgE 単独ではなく、IL-4 と IgE の共存下にて初めて有意な FcεRI 発現が認められた点である。つまり、IL-4 と IgE は、好酸球の細胞表面への FcεRI 発現誘導に関して協調的に作用していると考えられる。1999 年 6 月に Seminario らが IL-4 と IgE の共存下で好酸球を培養しても好酸球上に FcεRI の発現は認められなかったと報告している[119]。この報告と本研究の結果は全く相反しているように見えるが、細胞の蛍光強度を半定量化するという本研究の手法によって、好酸球上に非常に少量しか発現されていない FcεRI の検出を可能にしたと考えられる。

好酸球に対し、IL-4 と IgE がそれぞれいかなる機序で FcεRI 発現を誘導したのかは、健康人より得られる好酸球数が制限されること、FcεRI 発現量が僅かであることから解析が困難である。しかしながら、FcεRI を高発現するマスト細胞を用いた研究により、次のことが明らかとなっている。マウス骨髓由来培養マスト細胞に対し IgE (5 μg/ml) を添加すると、わずか 3 時間後には表面 FcεRI 発現量は 3~4 倍に増加し、以後も急速に FcεRI 発現量は増加し続ける[109]。また、蛋白合成阻害剤 cycloheximide を用いても、IgE 添加後 3 時間で既に認められる FcεRI 発現量増加は抑制されない[109]。このことから、IgE による FcεRI 発現量増加は、mRNA 発現変化を介した transcriptional level で主に起こっているとは考えにくい[97]。ラットのマスト細胞株(RBL)を用いた検討で、IgE が結合すると FcεRI の stability が高まり膜表面からの internalization が抑制される結果、表面 FcεRI 発現量が約 2 倍に増加するとの報告がなされており[120, 121]、この結果は、前述の IgE による急速な FcεRI 発現量増加と合致する。おそらく好酸球においても表面に発現された FcεRI に対し IgE は stability を高める結果 FcεRI 発現量を増加させたものと推測される。一方、IL-4 は、ヒトおよびマウスマスト細胞に対し FcεRI 発現量を増加させることが報告されている[113]。しかしながら、IgE との比較では、IL-4 単独の FcεRI 発現量増加作用は弱いようである。IL-4 がヒト培養マスト細胞[113]およびアレルギー性鼻炎患者の末梢血好酸球[118]において FcεRIα mRNA 発現を亢進させることから、おそらく本研究で用いた健康人好酸球においても IL-4 は transcriptional level での制御を介して FcεRI 発現量調節を行っていると推測される(なお、後述する通り、基礎検討

により健常人好酸球の FcεRIα mRNA 発現を、IL-4+IgE の存在下、非存在下培養後に RT-PCR にて検討したが、mRNA 発現量が非常に少なく、一定の差を見出すに到っていない。従って、IL-4 と IgE は、おそらく異なる機序により協調的に好酸球の FcεRI 発現調節に関与するものと推測される。

図には示していないが、IL-4 と IgE の共存下培養の好酸球を用いて RT-PCR を試みたところ、極僅かな FcεRIα mRNA の発現と、明らかな FcεRIγ mRNA の発現を認めた。しかしながら、FcεRIβ mRNA の発現は認められなかった。この結果に基づくと、健常人の好酸球上に発現誘導される FcεRI は、おそらく αβγ2 の heterotetramer ではなく、αγ2 の heterotrimer の形を取っていると考えられた。FcεRI の架橋シグナルは FcεRIγ 鎖を介して伝達されるが、αβγ2 型は αγ2 型に比べて 5~7 倍もの強力な細胞内刺激を惹起し、β鎖が amplifier として機能すると Kinet らは報告している[122]。IL-4 と IgE の共存下培養の好酸球の表面 FcεRI には β鎖が欠損しているために、刺激により惹起されるシグナル伝達が弱いと推測される。

IL-4 と IgE による FcεRI 発現は、全ての健常人から得られた好酸球で認められた。FcεRI の最大発現量は各個人である程度違いが認められたが、好酸球上に発現する FcεRI 量は非常に少量であることには変わりなかった。これらの結果から、以前より報告されているアレルギー疾患患者や好酸球増多症患者の好酸球上の FcεRI 発現[95, 105]には、IL-4 や IgE が強く関わっていると想定された。患者好酸球で FcεRI 発現を認めたとするこれらの報告では血清中の IL-4 や IgE の濃度は述べられていないが、アレルギー疾患や寄生虫感染症では IL-4 や IgE が病態に深く関与すると考えられ、これらの因子により好酸球上に FcεRI の発現が誘導されたものと想定される。また、発現された FcεRI は、アレルギー性炎症の病態形成におけるエフェクター作用や、寄生虫に対する生体防御機構を高める働きに繋がると考えられる。

しかしながら、本研究において、IL-4 と IgE の共存下培養で FcεRI を発現させた好酸球に対して、CRA-1 mAb や抗 IgE 抗体で FcεRI を介する刺激を加えても、脱顆粒や LTC4 遊離や細胞内 Ca²⁺流入は全く認められなかった。FcεRI 依存性機能が全く認められなかったという本実験の結果は、Gounni らの結果とは異なる。彼らの報告は好酸球増多症患者を対象とし、好酸球表面に FcεRI の発現が認められ、しかも FcεRI を介してメディエーター遊離や ADCC などの機能を発揮したとしている[95]。推測ではあるが、本研究の結果と彼らの報告との相違は、次のような点に起因すると思われる。第一に、我々の用いた好酸球では細胞表面に発現した FcεRI 量はあまりにも少ないために FcεRI を介する刺激が細胞内に入らなかった可能性がある。flow cytometry にて、ヒト培養マスト細胞では 10⁵~10⁶ MESF 値の FcεRI 発現量が認められる[112]のに対して、好酸球では多くても 10³ MESF 値の FcεRI 発現量しか認

められず、マスト細胞の 1%以下しか FcεRI を発現していない。このように少量しか FcεRI を発現していないため、好酸球の機能を発現するのに必要なシグナルが入らないものと考えられた。第二に、好酸球における FcεRI 依存性機能の発現には、FcεRIβ鎖の存在が関わっていると想定される。FcεRIβ鎖は FcεRIγを介する活性化シグナルを増強する作用を持つことが報告されている[122, 123]。Gounni らの報告[95]では好酸球は FcεRI α、β、γ mRNA を発現すると述べているのに対し、我々の RT-PCR 解析では、培養後においても好酸球に FcεRIβ mRNA の発現は認められず、FcεRIβ鎖が欠如しているために、FcεRI 依存性刺激が好酸球を活性化するには到らないと考えられた。第一、第二の推測と関連するが、患者群においては IL-4 や IgE 以外の何らかの因子が関与することにより、FcεRI 発現量の増強や FcεRIβ mRNA 発現誘導、或いは好酸球機能の亢進が生じている可能性も考えられる。従って、今後、末梢血好酸球において FcεRI 発現を認めるようなアレルギー患者を対象とした解析を行い、健常人好酸球を用いた本研究の結果と比較することにより FcεRI の発現と機能の制御機構をさらに明らかとしていきたい。

おわりに

FcεRIを高発現するマスト細胞や好塩基球では、IL-4 或いは IgE が FcεRI 表面発現量を増加させること、および FcεRI 発現量増加は IgE-FcεRI 依存性反応の増強をもたらすことが知られている。従って、FcεRI 発現量調節機構を明らかにすることは、細胞機能制御の観点からも重要である。しかしながら、マスト細胞や好塩基球以外の FcεRI 発現細胞における FcεRI 発現制御機構はほとんど解明されていない。本研究において明らかとなった実験事実、すなわち IL-4 と IgE による健常人好酸球の表面 FcεRI 発現誘導は、マスト細胞や好塩基球と類似した機構により好酸球の FcεRI 発現が制御されていることを示している。本研究の手法を、樹状細胞、マクロファージや血小板などの好酸球以外の FcεRI 発現細胞にも適用し、これらの細胞においても同様の機構が FcεRI 発現に関与しているのかを明らかにすることは今後の課題である。FcεRI を発現する種々の細胞における FcεRI 発現制御機構を解明することは、アレルギー疾患の病態解明、および FcεRI をターゲットとした新しい視点からのアレルギー治療戦略に繋がるものと期待される。

結語

アレルギー疾患の慢性化には、種々のアレルギー性炎症細胞、免疫グロブリン、cytokine が関与している。特に好塩基球や好酸球は I 型アレルギー反応遅発相においてエフェクター機能を発揮している重要なアレルギー性炎症細胞であり、その活性化と制御機構の解明は新たな治療法の開発に直結する重要な課題である。

本研究第一章にて、IgE 依存性遊離に匹敵する強力な好塩基球活性化が sIgA により惹起されたという新しい知見を報告した。IgE を介する刺激に匹敵する強力な好塩基球メディエーター遊離という *in vitro* の結果と同様の機構が、アレルギー疾患患者の生体内でも働いていることが想定される。sIgA は粘膜において最も豊富に存在する免疫グロブリンであり、好塩基球もアレルギー性炎症の遅発相において粘膜上に動員されることから、sIgA 刺激による好塩基球脱顆粒は、アレルギー性炎症の病態形成において重要な役割を担っていると考えられた。局所の抗原特異的 sIgA 抗体の定量などの研究を通じて、近年増加傾向にあるアレルギー疾患患者の management と monitoring に新しい視点から大いに寄与すると考えられる。この新しい免疫グロブリン依存性の好塩基球活性化機構の解明は、アレルギー疾患にとどまらず、sIgA を主要な抗体としている粘膜免疫機構の理解にも結びつく可能性がある。

本研究第二章にて、IL-4 と IgE により健常人好酸球上にも FcεRI が発現されることを報告した。マスト細胞や好塩基球の場合と同じ因子が好酸球において FcεRI 発現調節を行っているという知見は、これらの細胞における表面 FcεRI 発現量が同様の機序により制御されていることを示唆している。今後、樹状細胞、単球/マクロファージ、巨核球/血小板などにおいても表面 FcεRI 発現制御機構が解明されることにより、ヒトにおける各種細胞の FcεRI 発現量が一元的に制御されるのかが明らかとなるであろう。FcεRI を発現する好酸球は、I 型アレルギー反応に基づくアレルギー疾患において、IgE 依存性のエフェクター機能を発揮することで病態形成に深く関与しうると考えられる。本研究において、健常人好酸球に対し、FcεRI 発現を誘導したものの、FcεRI 依存性活性化は観察されなかった。しかしながら、患者好酸球を用いた FcεRI 依存性活性化の報告に基づく、本研究では明らかにされなかった何らかの機構が、好酸球の FcεRI に対し機能を付与すると考えられる。今後、好酸球の発現する FcεRI の機能制御を解析することは、アレルギー疾患における好酸球活性化機構の解明に大きく寄与すると期待される。

sIgA による好塩基球活性化や IgE による好酸球活性化といった、従来の観点にとられない新しい視点からアレルギー性炎症を捉えることにより、アレルギー疾患の更なる病態解明、新しい治療法の発見に繋がるものと期待される。

表 1

気管支喘息患者と健常人の背景

	喘息患者	健常人
人数(人)	10	10
アトピー型	8	
非アトピー型	2	
年齢	47.4 ± 13.0	39.3 ± 15.2
男女比	8 : 2	4 : 6
罹病期間 (年)	18.6 ± 8.5	
PEF(%)*	83.0 ± 27.3	106.3 ± 10.1
好塩基球数 (/μl)	107.6 ± 77.2	57.9 ± 40.2
好塩基球比率 (%)	1.6 ± 1.1	0.9 ± 0.8
好酸球数 (/μl) *	397.1 ± 242.0	184.8 ± 147.1
好酸球比率 (%)	5.9 ± 3.8	3.3 ± 3.0

データは平均±標準偏差で示した。PEF(%)は年齢と身長から予測される PEF 値に対する割合で示した。患者の発作強度は N または D2 で、重症度は、軽症間欠型が 8 人、重症持続型が 2 人であった。また、経口ステロイドの使用はなく、吸入ステロイド(beclomethasone dipropionate) 0~1600 μg/日の使用を認めた。*患者群と健常人群との間で、有意水準 5%で有意差を認めた。

表 2

slgA、抗 IgE 抗体刺激による好塩基球ヒスタミン遊離における
種々のキナーゼ阻害剤の影響

inhibitor(kinase)		concentration	slgA	anti-IgE
wortmannin	(PI 3-kinase)	1 nM	95.7 ± 7.4 %	82.1 ± 7.5 %
		10 nM	78.9 ± 6.5 %*	39.4 ± 6.7 %**
		100 nM	47.5 ± 10.6 %*	3.0 ± 3.6 %**
		1000 nM	7.6 ± 2.9 %**	3.9 ± 2.3 %**
PD98059	(MEK)	2 μM	75.9 ± 13.4 %	100.1 ± 6.6 %
		10 μM	61.6 ± 14.0 %	97.1 ± 5.3 %
		50 μM	43.8 ± 9.9 %*	80.1 ± 4.8 %*
SB203580	(p38 MAP kinase)	0.1 μM	73.4 ± 11.9 %	78.9 ± 4.4 %
		1 μM	68.3 ± 14.1 %	60.6 ± 9.0 %
		10 μM	41.1 ± 10.5 %*	49.3 ± 4.9 %**
staurosporine	(protein kinase C)	0.1 nM	83.2 ± 4.5 %	84.6 ± 7.9 %
		1 nM	92.2 ± 4.6 %	84.3 ± 6.9 %
		10 nM	72.0 ± 3.3 %*	63.8 ± 0.8 %*
		100 nM	60.3 ± 4.5 %*	13.7 ± 1.5 %*
genistein	(protein tyrosine kinase)	0.4 μM	84.9 ± 10.8 %	100.3 ± 12.4 %
		4 μM	79.4 ± 8.2 %	95.9 ± 10.5 %
		40 μM	63.7 ± 9.1 %*	87.3 ± 6.3 %*

IL-3 で priming した好塩基球を種々のキナーゼ阻害剤で 37℃、5 分間処理した後、プレート固相化 slgA(10 μg/ml)で 120 分間、或いは抗 IgE 抗体(1/3000)で 45 分間刺激した。データは阻害剤で未処理の好塩基球によるコントロールのヒスタミン遊離に対する百分率で示した。slgA、抗 IgE 抗体によるコントロールの遊離は、それぞれ 37.2%、46.3%であった。コントロールの遊離と比較して、*p < 0.05、**p < 0.01 で有意差ありとした(n=4)。

表 3
気管支喘息患者と健康人における
slgA 依存性好塩基球ヒスタミン遊離の比較

	喘息患者	健康人
IL-3 priming (-)		
slgA		
50%HR の濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	8.67*	
最大ヒスタミン遊離率 (%)	8.0*	
抗 IgE 抗体		
50%HR の濃度 (希釈倍率)	11077	7796
最大ヒスタミン遊離率 (%)	40.0	26.3
FMLP ($0.5\mu\text{M}$) での遊離率 (%)	36.7	28.0
IL-3 priming (+)		
slgA		
50%HR の濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	2.05	2.15
最大ヒスタミン遊離率 (%)	48.8	53.9
抗 IgE 抗体		
50%HR の濃度 (希釈倍率)	12033	10791
最大ヒスタミン遊離率 (%)	60.4	52.3
FMLP ($0.5\mu\text{M}$) での遊離率 (%)	62.2	42.6

ヒスタミン遊離率は平均値で示した。slgA 濃度は個々の対数の平均値から、抗 IgE 抗体の希釈濃度は個々の希釈倍率の逆数の平均値から求めた。

喘息患者群と健康人群との間でどの項目に関しても有意差なし。

*気管支喘息患者 10 人中ヒスタミン遊離の認められた 4 人のみ解析

表4

好塩基球ヒスタミン遊離における種々の因子の相関関係

喘息患者10人+健常人10人

slgA刺激のsensitivity	p=0.0327で逆相関
抗IgE抗体刺激のsensitivity	
slgA刺激のreleasability	p=0.0256で逆相関
年齢	
slgA刺激のreleasability	p=0.0494で正相関
FMLP刺激のreleasability	

喘息患者10人

%PEF	p=0.0158で逆相関
年齢	
slgA刺激のsensitivity	p=0.0459で正相関
罹病期間	
slgA刺激のsensitivity	p=0.0332で逆相関
好塩基球数	
slgA刺激のsensitivity	p=0.0418で逆相関
好酸球数	

健常人10人

slgA刺激のsensitivity	p=0.03で逆相関
抗IgE抗体刺激のsensitivity	

*Spearman順位相関係数の検定で検討した。

表 5

CRA-1 抗体または ionophore A23187 で刺激した好酸球からの EDN 遊離

Stimulus	Culture condition			
	None	IL-4	IgE	IgE + IL-4
control mouse IgG2b	12.1 \pm 2.0	9.5 \pm 1.8	15.2 \pm 2.4	9.7 \pm 1.4
CRA-1	7.8 \pm 1.0	6.7 \pm 1.0	10.9 \pm 1.6	7.0 \pm 0.7
ionophore A23187	22.8 \pm 0.9	22.6 \pm 2.4	24.1 \pm 2.2	19.6 \pm 0.8

精製好酸球を IL-4 (10 ng/ml)、IgE (1 μ g/ml)の存在下、非存在下で 37℃、7 日間培養した。その後、細胞を IgE (1 μ g/ml)で 37℃、2 時間感作し、CRA-1 (10 μ g/ml)、コントロールマウス IgG2b (10 μ g/ml)または ionophore A23187 (1 μ g/ml)で 37℃、4 時間刺激し、上清中の EDN を測定した。データは、好酸球の含有する EDN 総量に対する遊離率(%)で表し、平均 \pm 標準誤差で示した (n=3)。

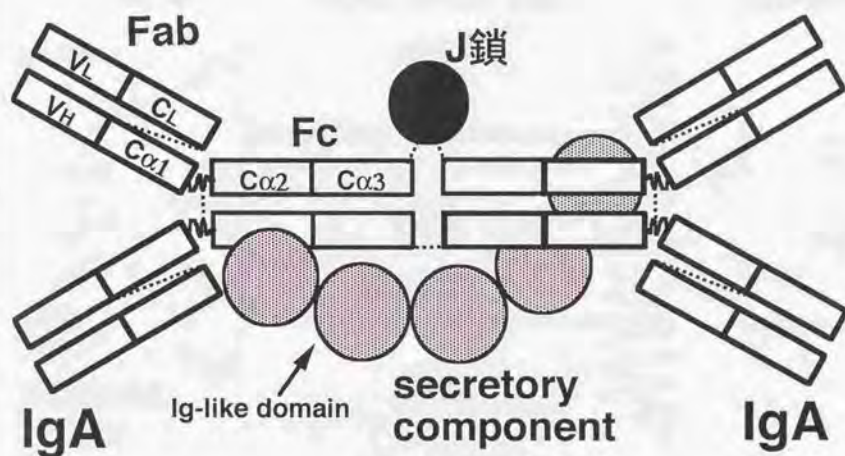


図1 分泌型IgA (sIgA) の構造

sIgAは二量体IgAにJ鎖とsecretory componentが結合している。

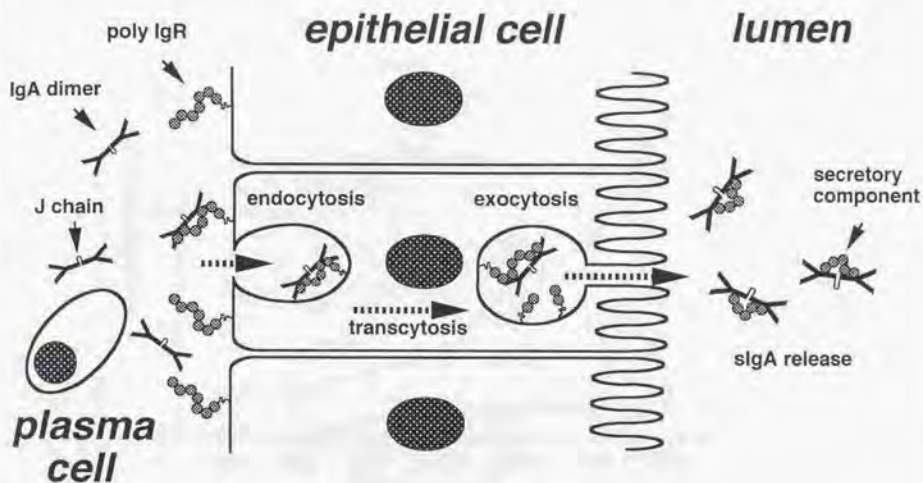


図2 sIgAの産生過程

局所に浸潤したIgA+形質細胞により二量体IgAとJ鎖が産生される。二量体IgAは上皮細胞の基底膜側のpolymeric Ig receptor (pIgR)に結合し、上皮細胞内を輸送され、最終的には粘液層にsIgAとして分泌される。

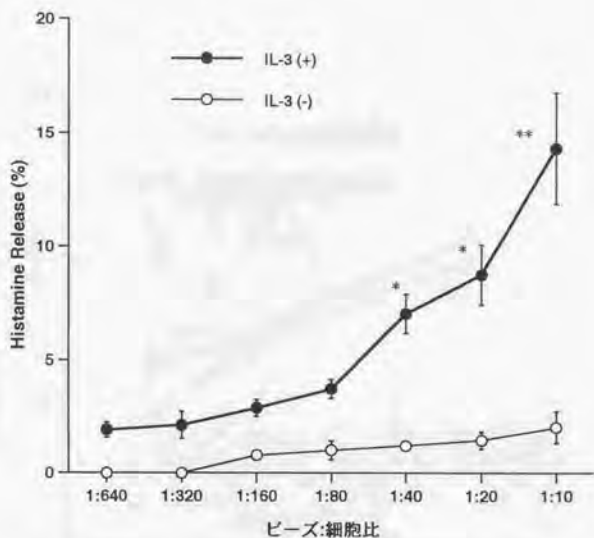


図3 slgA結合セファロースビーズによる好塩基球からのヒスタミン遊離

Percoll分離好塩基球をIL-3(5ng/ml)で37℃、30分間primingする群としない群に分け、さらに37℃、45分間、種々の濃度のビーズ細胞比(セファロースビーズの好塩基球数に対する比率)でslgA結合セファロースビーズと反応させた。反応後、上清は回収し、上清中のヒスタミン値を測定した。ヒスタミン遊離率は、全細胞内含有ヒスタミン量からOVAビーズによるコントロール遊離量を差し引いたものを100%として計算した。各データは平均±標準誤差にて示した(n=5)。OVAビーズによるコントロール遊離と比較し、*p<0.05、**p<0.01で有意差ありとした。

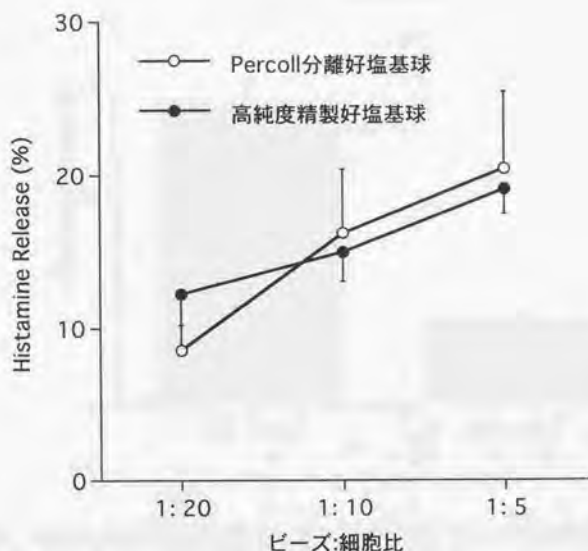


図4 Percoll分離好塩基球と高純度精製好塩基球とにおけるslgA依存性ヒスタミン遊離の比較

同一の健常人から採血し、好塩基球をPercollによる非連続密度勾配法で粗精製したもの(○)と、更にnegative panning selection にて高純度に精製したもの(●)を使用した。好塩基球はIL-3(5ng/mlで30分間)で前処置後、slgA結合ビーズにて45分間刺激した。好塩基球の純度は、 $16 \pm 8\%$ (Percoll分離好塩基球)、 $72 \pm 12\%$ (高純度精製好塩基球)であった。各データは平均 \pm 標準誤差を示す(n=4)。2群間に有意差は認められなかった。

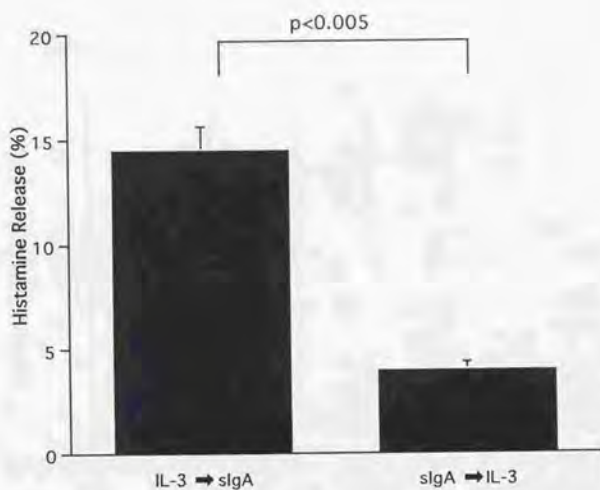


図5 slgAによる好塩基球ヒスタミン遊離におけるIL-3前処置の必要性

好塩基球をIL-3で30分間前処置後にビーズ細胞比1:10のslgAビーズで37℃、45分間反応させたものを左棒グラフに示す。一方、好塩基球をslgAで45分間反応後にIL-3で30分間処置したものを右棒グラフに示す。データは平均±標準誤差で示した(n=4)。p<0.005で、両群間に有意差を認めた。

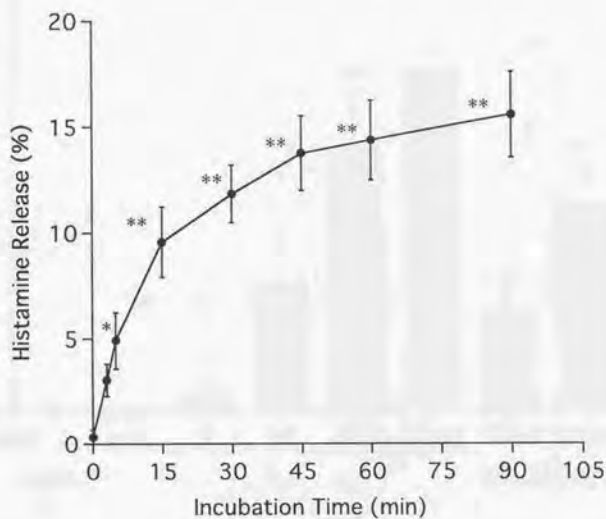


図6 sIgAによる好塩基球ヒスタミン遊離の時間経過

IL-3でprimingした好塩基球をビーズ細胞比1:10のsIgAビーズで種々の時間反応させた。データは平均±標準誤差で示す(n=5)。0分時のヒスタミン遊離率と比較し、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ で有意差ありとした。

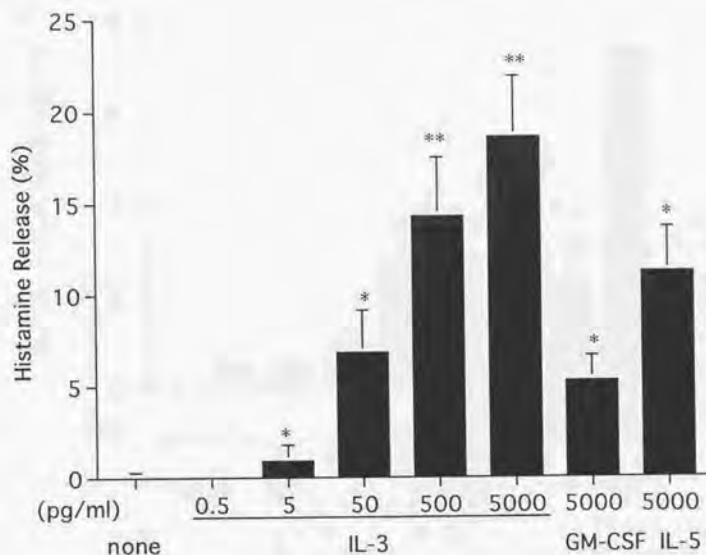


図7 IL-3、IL-5、GM-CSFによる好塩基球priming効果の比較

好塩基球を上記の濃度のIL-3、IL-5、GM-CSFで37℃、30分間前処置し、ピーズ細胞比1:10の濃度のslgAピーズで45分間反応させた。IL-3、IL-5、GM-CSFで前処置しただけでは、5%未満のヒスタミン遊離しか認めなかった。データは平均±標準誤差で示した(n=5)。primingせずにslgA刺激した際のヒスタミン遊離(none)と比較し、* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ で有意差ありとした。

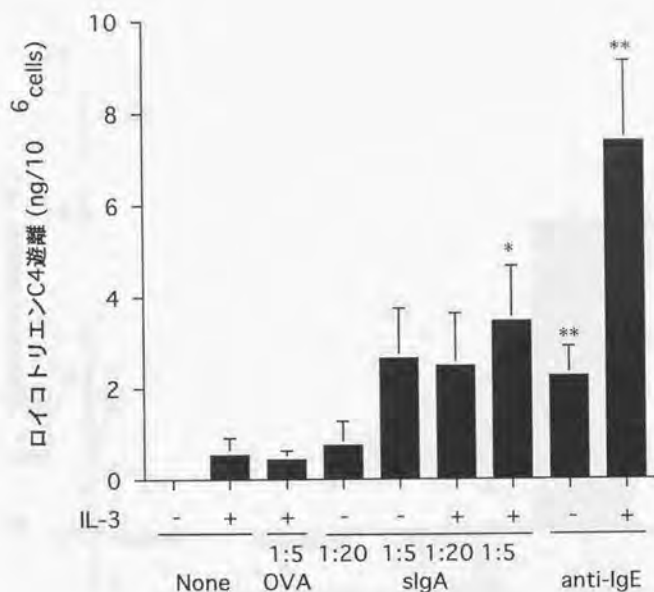


図8 slgAおよび抗IgE抗体刺激による好塩基球からのロイコトリエンC4遊離

Percoll分離好塩基球は、IL-3 (5 ng/ml)で37°C30分間前処置した後、あるいは未処置のまま、slgA刺激(ビーズ細胞比1:20または1:5)或いは抗IgE刺激(1/3000)で37°C45分間反応させた。データは平均±標準誤差で示す(n=9)。slgA刺激に対してはOVAによるヒスタミン遊離と比較し、抗IgE刺激に対しては緩衝液のみの際の遊離(None)と比較し、*p<0.05、**p<0.01で有意差ありとした。

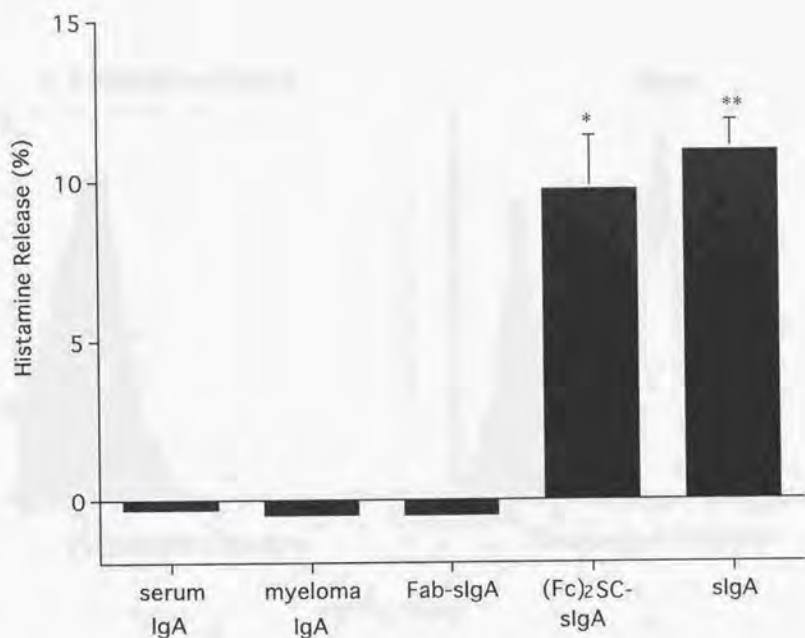
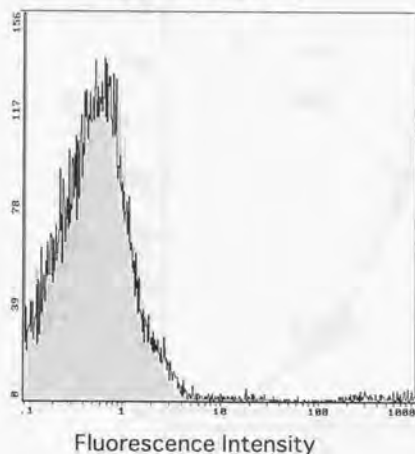


図9 種々のsIgAの構成成分によるIL-3でprimingした好塩基球からのヒスタミン遊離

IL-3でprimingした好塩基球を、ビーズ細胞比 1:10で種々のsIgAの構成成分 (serum IgA、myeloma IgA、sIgA、Fab部分、(Fc)₂SC部分)で37°C、45分間反応させた。データは平均±標準誤差で示す(n=4)。OVAによるヒスタミン遊離と比較し、*p<0.05、**p<0.01で有意差ありとした。

IL-3で前処置した好塩基球



好酸球

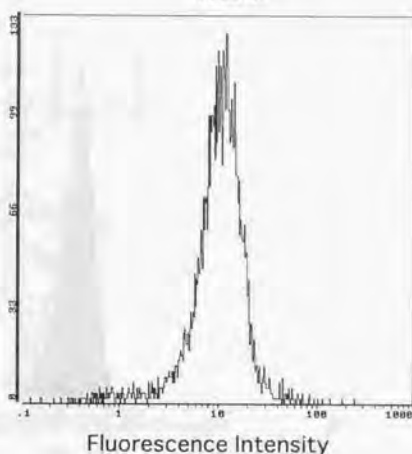


図10 IL-3で前処置した好塩基球と好酸球の細胞表面上Fc α RI (CD89)の発現

98.5%以上に精製した好塩基球をIL-3 (5 ng/ml)で37℃、30分間前処置した。IL-3で前処置した好塩基球や99%以上に精製した好酸球は、抗CD89モノクローナル抗体であるA59 (実線)、もしくはコントロール抗体であるIgG1 κ (灰色部分)で4℃、60分間反応させた。その後、FITC結合ヤギ抗マウスIgG抗体F(ab')₂で染色し、その蛍光をフローサイトメトリーにて測定した。

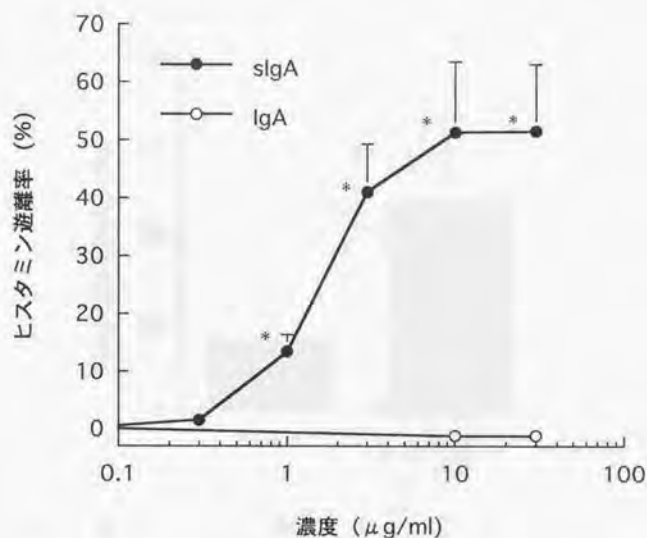


図11 プレート固相化法によるsIgAおよびIgA刺激によるIL-3前処置好塩基球からのヒスタミン遊離

Percoll分離好塩基球を5ng/mlのIL-3で37℃、15分間前処置後、予め種々の濃度でプレート上に固相化したsIgAまたはIgAで刺激し、37℃、120分間反応を行った。ヒスタミン遊離率は、全細胞内ヒスタミン含有量からOVAによる遊離量を差し引いたものを100%として計算した。データは平均±標準誤差で示す(n=4)。OVAによる遊離と比較し、*p<0.05で有意差ありとした。

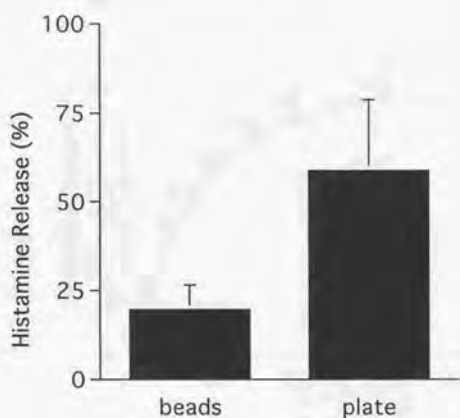


図12 slgAによる好塩基球ヒスタミン遊離のセファロースビーズ固相化法とプレート固相化法との比較

5ng/mlのIL-3でprimingされた好塩基球は、ビーズ細胞比1:10のslgAビーズもしくは10 μ g/mlの濃度でプレートに固相化したslgAで反応を行った。データは平均 \pm 標準誤差で示す(n=4)。両群間には、 $p<0.02$ で有意差を認めた。

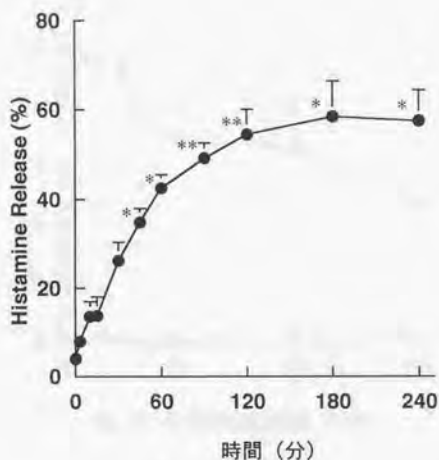


図13 プレート固相化法によるslgA依存性好塩基球ヒスタミン遊離の時間経過

Percoll分離好塩基球は、5ng/mlのIL-3で15分間priming後、プレート固相化slgA (10 μ g/ml)で刺激し、上記の種々の時間反応を行った。各データは、平均 \pm 標準誤差で示す(n=4)。0分時のヒスタミン遊離率と比較し、*p<0.05、**p<0.01で有意差ありとした。

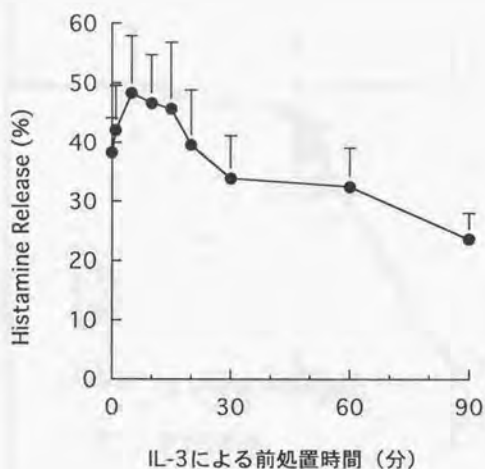


図14 種々のIL-3前処置時間によるsIgA依存性好塩基球ヒスタミン遊離

Percoll分離好塩基球は、5ng/mlのIL-3で上記の種々の時間前処置し、プレート固相化sIgA刺激(10 μ g/ml)で37 $^{\circ}$ C、120分間反応させた。各データは、平均 \pm 標準誤差を示す(n=4)。

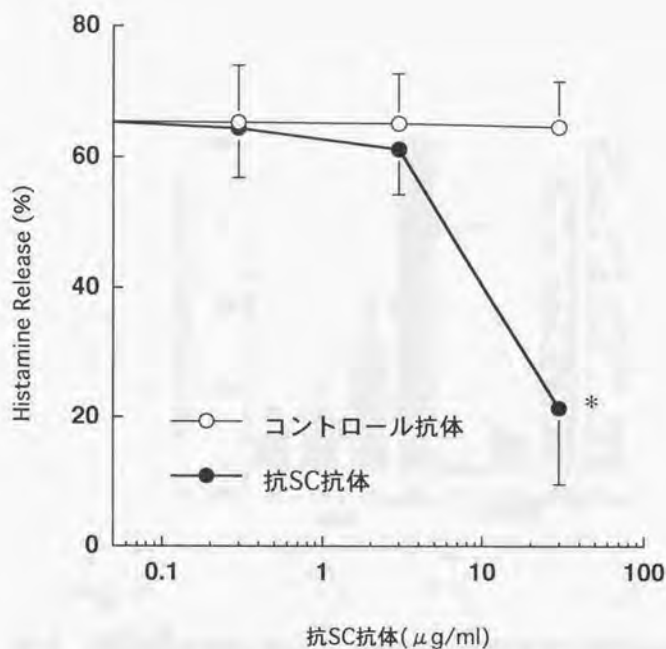


図15 ポリクロナール抗SC抗体前処置によるsIgA依存性好塩基球ヒスタミン遊離

sIgA(10 μg/ml)を固相化したプレートを経々の濃度のポリクロナール抗SC抗体或いはコントロール抗体にて室温で3時間前処置し、その後3回プレートを洗浄した。そのプレートに IL-3でprimingした好塩基球を入れ、37℃、120分間反応させた。ヒスタミン遊離率を平均±標準誤差で示した(n=4)。コントロール抗体のヒスタミン遊離率と比較し*P<0.05で有意差ありとした。

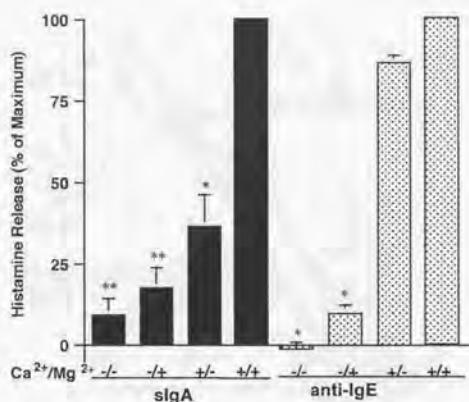


図16 細胞外Caイオン、Mgイオンの存在下、非存在下におけるslgAピーズまたは抗IgE抗体による好塩基球からのヒスタミン遊離の比較

IL-3でprimingした好塩基球を、PIPES A緩衝液、Caイオン(2mM)を含むPIPES A緩衝液、Mgイオン(0.5mM)を含むPIPES A緩衝液もしくは両イオンを含むPIPES A緩衝液(PIPES ACM)中で、slgAピーズ刺激(ピーズ細胞比1:10)反応を行った(左棒グラフ)。同様の4条件の緩衝液中で、好塩基球をIL-3で前処置せずに抗IgE抗体(1/3000)で45分間刺激した(右棒グラフ)。データはPIPES ACM緩衝液中での最大ヒスタミン遊離率を100%とした百分率で示した。各棒グラフは、平均±標準誤差で表し(n=4)。PIPES ACM緩衝液中での最大ヒスタミン遊離率と比較して、*p<0.05、**p<0.01で有意差ありとした。

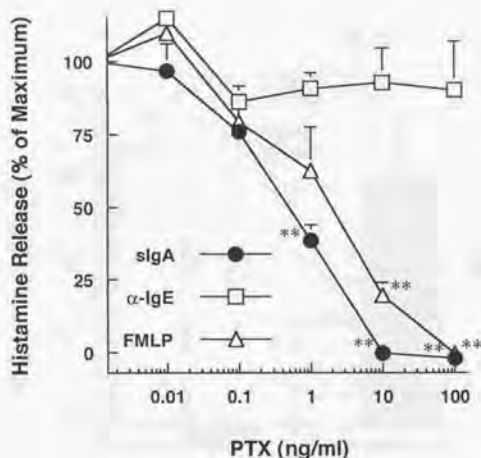


図17 slgA、FMLPまたは抗IgE抗体刺激による好塩基球ヒスタミン遊離に対する百日咳毒素の効果

Percoll分離好塩基球は、IL-3で前処置後、種々の濃度の百日咳毒素(PTX)で120分間、37℃で処理を行った。その後、プレート固相化slgA(10 μ g/ml)で120分間、またはFMLP(1 μ M)、抗IgE抗体(1/3000)で45分間の3条件で好塩基球を刺激し、上清中のヒスタミンを測定した。データは、PTXで処理していない好塩基球によるヒスタミン遊離を100%とした百分率で表した。slgA、FMLP、抗IgE抗体のPTX未処置好塩基球からのヒスタミン遊離率は、それぞれ45.1%、71.7%、32.5%であった。Barは標準誤差を示す(n=4)。PTX未処置好塩基球による遊離率と比較し、**p<0.01で有意差ありとした。

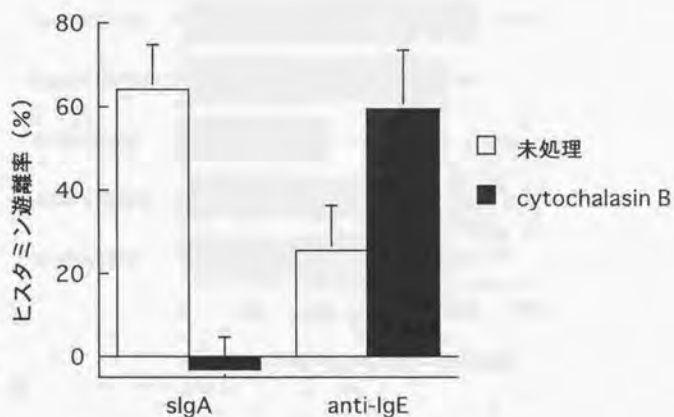


図18 slgA、抗IgE抗体刺激による好塩基球ヒスタミン遊離の cytochalasin B処理による影響

IL-3でprimingした好塩基球を cytochalasin B($5\mu\text{g/ml}$)で 37°C . 5分間前処置後、slgA($10\mu\text{g/ml}$)、あるいは抗IgE抗体(1/3000)で刺激した。データは平均 \pm 標準誤差で示した($n=4$)。

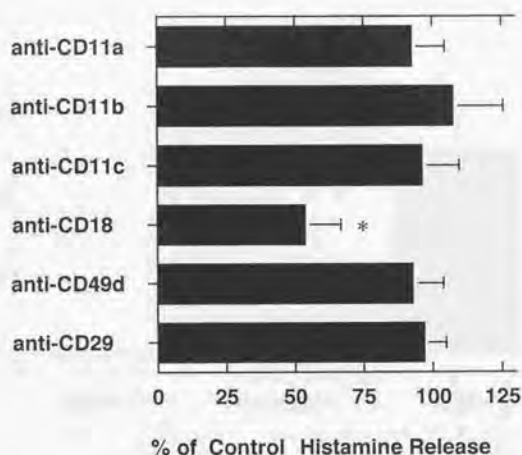


図19 slgAによる好塩基球ヒスタミン遊離に対する種々の抗インテグリン抗体による影響

Percoll分離好塩基球はIL-3でpriming後、種々の抗インテグリンmAb (5 μ g/ml)で4℃、30分間処理し固相化slgA(10 μ g/ml)で刺激した。マウスmAbのIgG1、IgG2a、IgG2b処理によるコントロール遊離は、それぞれ29.5%、31.2%、31.3%であった。データは平均±標準誤差で示した(n=4)。コントロール遊離と比較し、* $p<0.05$ で有意差ありとした。

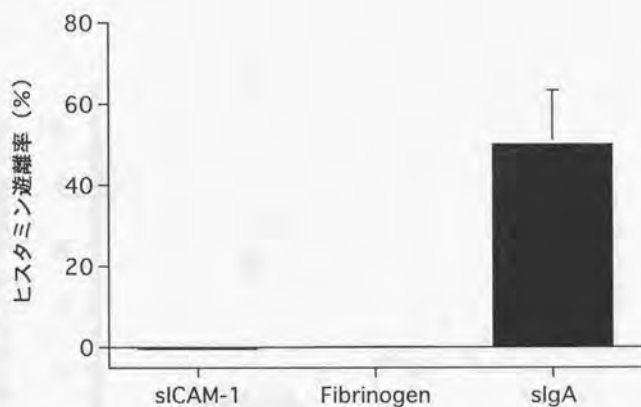


図20 プレートに固相化したsICAM-1、フィブリノーゲン、sIgAによる好塩基球ヒスタミン遊離

IL-3にてprimingした好塩基球を、プレートに $10\mu\text{g/ml}$ の濃度で固相化したsICAM-1、フィブリノーゲン、sIgAで 37°C 、120分間刺激した。データは平均 \pm 標準誤差で示した($n=4$)。

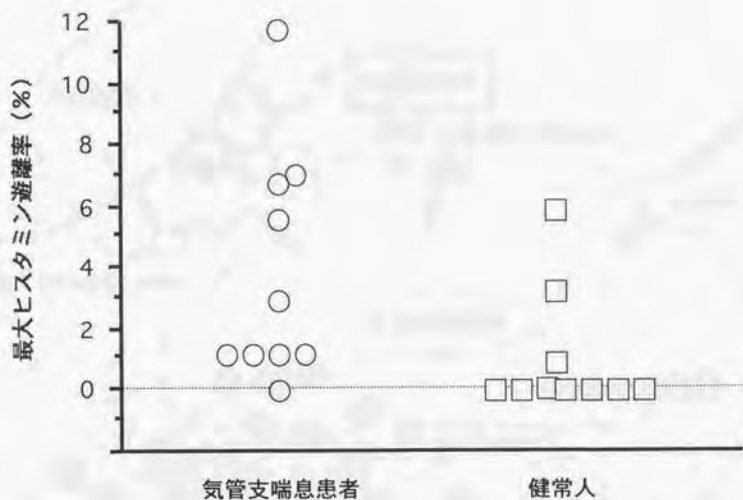


図21 気管支喘息患者と健常人におけるslgA刺激(IL-3 primingなし)による好塩基球の最大ヒスタミン遊離率

Percoll 分離好塩基球を種々の濃度のプレート固相化slgAで37℃、120分間刺激し、得られた最大のヒスタミン遊離率を両群で比較した。

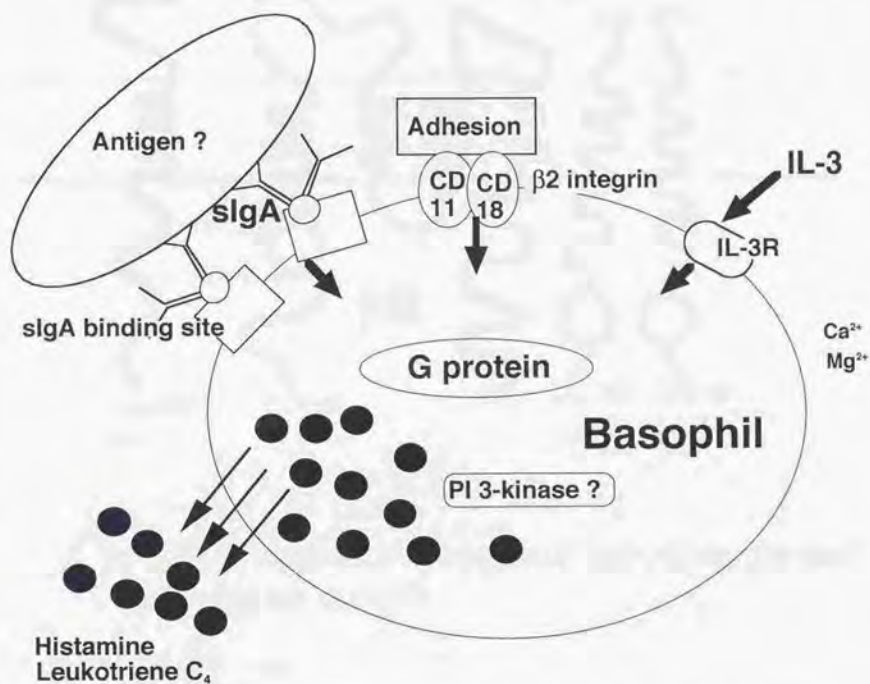
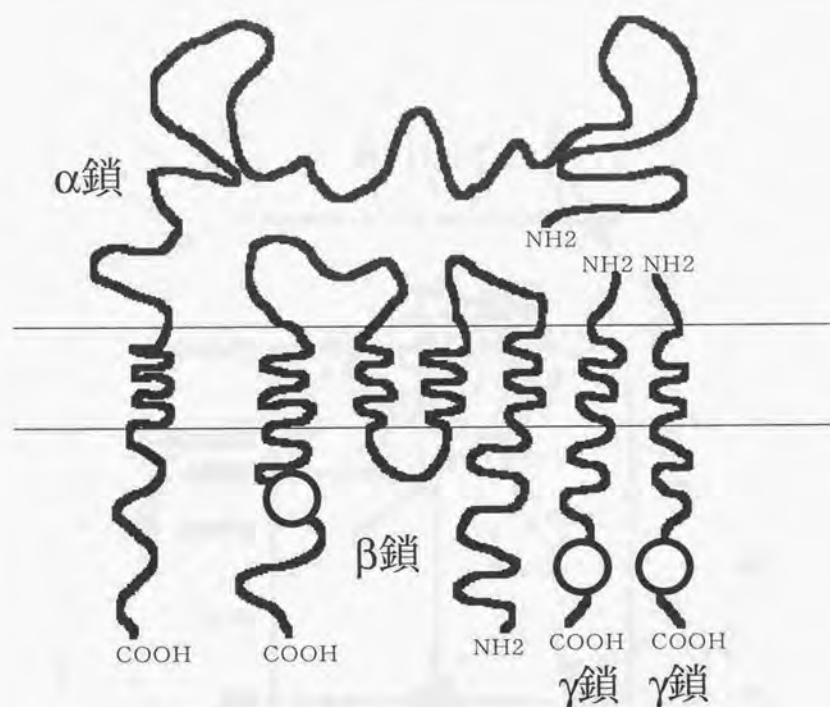


図22 sIgAによる好塩基球活性化



○: ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif)

図23 Fc ε RIの構造

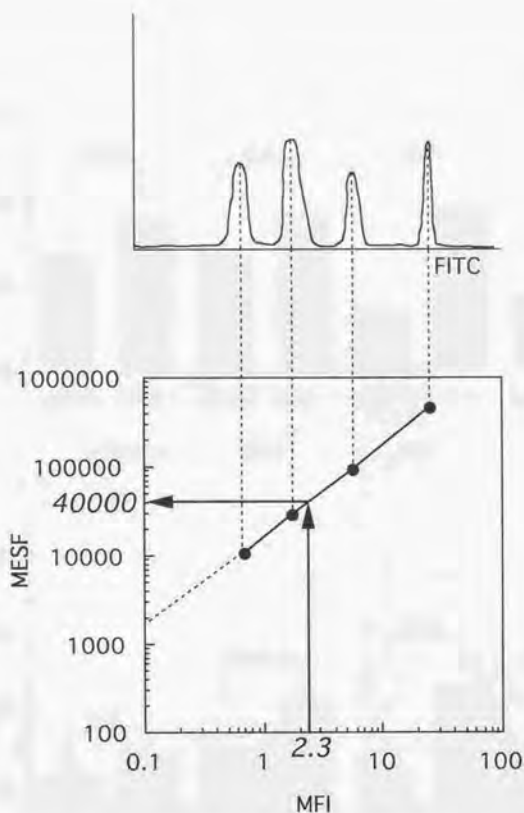


図24 MESF換算の一例

4種類の既知数のFITC分子が結合しているビーズ (10485, 23653, 91729, 450607のMESF値) の蛍光をflow cytometryで測定し、FITCのmean fluorescence intensity (MFI)を下図のようにMESFに換算するグラフを作製する。実際の検体のMFIが2.3であれば、MESFは40000となる。

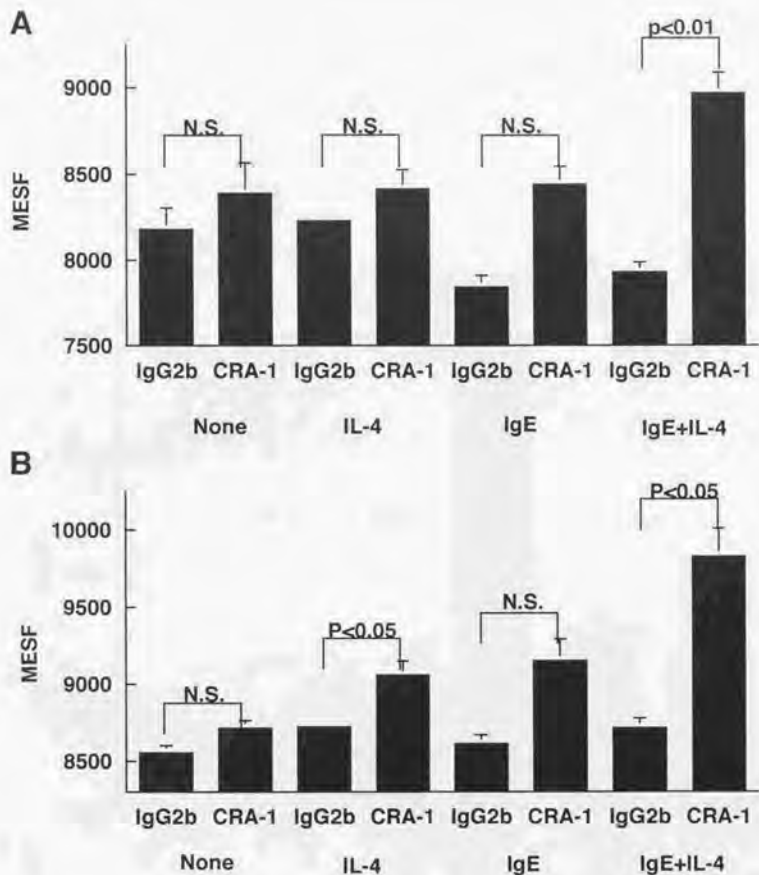


図25 IL-4とIgEの添加培養後の好酸球におけるCRA-1抗体結合能の比較

健康人由来の精製好酸球をIL-4(10ng/ml)、IgE(1 μ g/ml)の存在下、非存在下で37 $^{\circ}$ C、7日間培養した。細胞はCRA-1抗体或いはコントロールmAb(IgG2b)で4 $^{\circ}$ C、60分間反応させ、FITC-ヤギ抗マウスIgG抗体F(ab')₂で30分間反応後、flow cytometryで解析した。好酸球の蛍光強度の中央値はMESF値に変換した。A、Bは6実験中の代表的な2例として示した。実験はtriplicateで行い、各データは平均 \pm 標準誤差で示した。

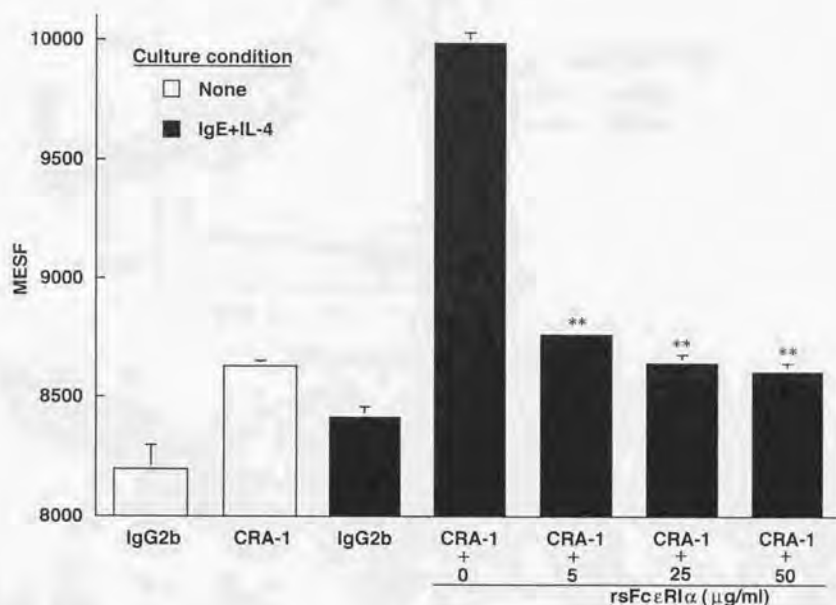


図26 rsFcεRIαによる好酸球へのCRA-1抗体の結合阻害

IL-4とIgEで7日間培養した好酸球（黒棒グラフ）を、CRA-1抗体の添加前に種々の濃度のrsFcεRIαと4℃、10分間反応させた。CRA-1抗体との反応後、細胞は2回洗浄し、通常の過程にて染色し、flow cytometryで解析した。対照として、IL-4もIgEも入れずに培養した好酸球のMESF値を白棒グラフに示す。negative control stainとして、CRA-1の代わりにコントロールマウスIgG2bと反応させた好酸球のMESF値も示す（図中にIgG2bと表示）。triplicateで施行した各データは、平均±標準誤差で示した。IL-4とIgEで7日間培養した好酸球でrsFcεRIαによる前処理をしていないものと比較し、* $p < 0.01$ で有意差ありとした。

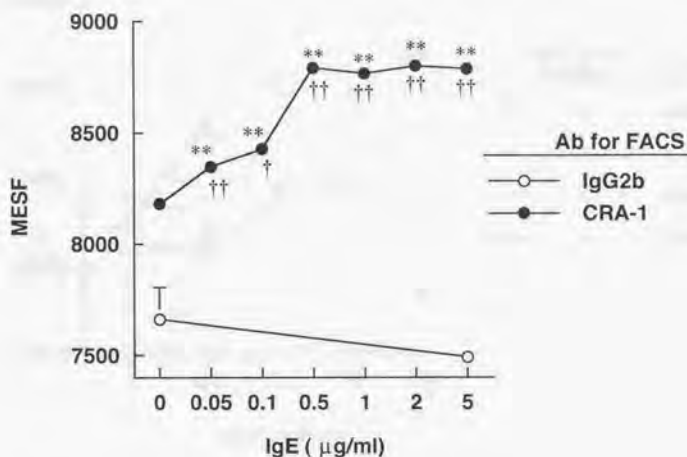


図27 IgE各種 濃度による好酸球上へのFcεRIの発現調節

好酸球を種々の濃度のIgEとIL-4(10ng/ml)、IL-5(10ng/ml)を入れて、37℃、7日間培養し、細胞表面に発現したFcεRIをflow cytometryにて解析した。triplicateで施行した各データは、平均±標準誤差で示した。IgEを添加せずに培養し、コントロールIgG2bで染めた好酸球と比較し、**p<0.01で有意差を認めた。IgEを添加せずに培養し、CRA-1を用いて染めた好酸球と比較し、†p<0.05、††p<0.01で有意差を認めた。

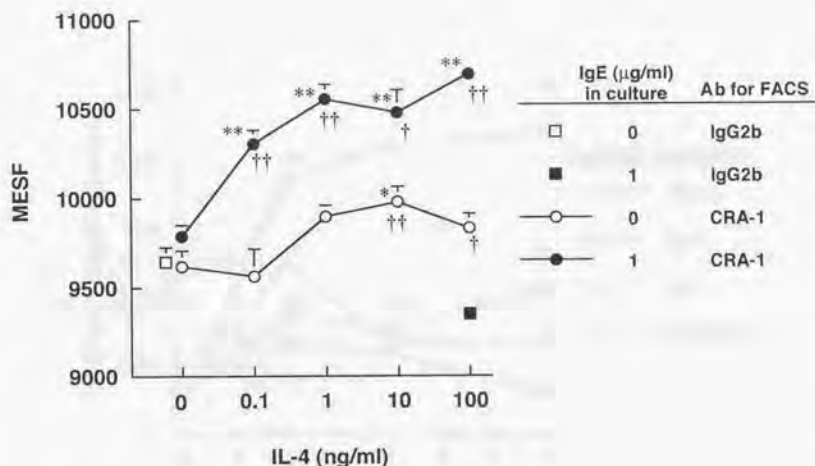


図28 IL-4各種 濃度による好酸球上へのFcεRIの発現調節

好酸球を種々の濃度のIL-4とIgE (0または1 μg/ml)、IL-5(10ng/ml)を入れて、37℃、7日間培養し、細胞表面に発現したFcεRIをflow cytometryにて解析した。triplicateで施行した各データは、平均±標準誤差で示した。コントロールIgG2bで染めた好酸球と比較し、*p<0.05、**p<0.01で有意差ありとした。IL-4を添加せずに培養し、CRA-1で染めた好酸球と比較し、†p<0.05、††p<0.01で有意差ありとした。

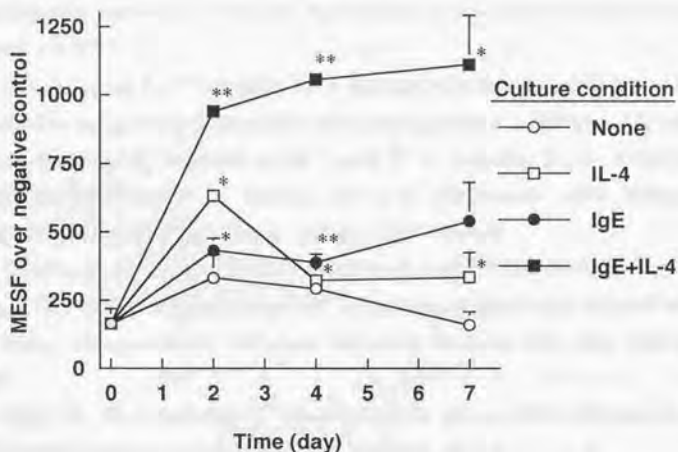


図29 IL-4、IgEの存在下、非存在下培養による好酸球上のFcεRI発現の時間経過

好酸球をIL-4 (10ng/ml)、IgE(1μg/ml)の存在下、非存在下で37℃、7日間まで培養し、細胞表面に発現したFcεRIをflow cytometryにて解析した。CRA-1で染めた好酸球のMESF値とコントロールIgG2bで染めた好酸球のMESF値との差を縦軸にした。triplicateで施行した各データは、平均±標準誤差で示した。day0の好酸球と比較し、*p<0.05、**p<0.01で有意差ありとした。

参考文献

1. Ishizaka, K., T. Ishizaka, and M. M. Hornbrook. 1966. Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with γ -E-globulin antibody. *J. Immunol.* 97:840.
2. DeLisi, C., and R. P. Siraganian. 1979. Receptor cross-linking and histamine release. I. The quantitative dependence of basophil degranulation on the number of receptor doublets. *J. Immunol.* 122:2286.
3. DeLisi, C., and R. P. Siraganian. 1979. Receptor cross-linking and histamine release. II. Interpretation and analysis of anomalous dose response patterns. *J. Immunol.* 122:2293.
4. Naclerio, R. M., D. Proud, A. G. Togias, N. F. Adkinson, Jr., D. A. Meyers, A. Kagey-Sobotka, M. Plaut, P. S. Norman, and L. M. Lichtenstein. 1985. Inflammatory mediators in late antigen-induced rhinitis. *N. Engl. J. Med.* 313:65.
5. Diaz, P., M. C. Gonzalez, F. R. Galleguillos, P. Ancic, O. Cromwell, D. Shepherd, S. R. Durham, G. J. Gleich, and A. B. Kay. 1989. Leukocytes and mediators in bronchoalveolar lavage during allergen-induced late-phase asthmatic reactions. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139:1383.
6. Hirai, K., M. Miyamasu, T. Takaishi, and Y. Morita. 1997. Regulation of the function of eosinophils and basophils. *Crit. Rev. Immunol.* 17:325.
7. Ponath, P. D., S. Qin, T. W. Post, J. Wang, L. Wu, N. P. Gerard, W. Newman, C. Gerard, and C. R. Mackay. 1996. Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils. *J. Exp. Med.* 183:2437.
8. Yamada, H., K. Hirai, M. Miyamasu, M. Iikura, Y. Misaki, S. Shoji, T. Takaishi, T. Kasahara, Y. Morita, and K. Ito. 1997. Eotaxin is a potent chemotaxin for human basophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231:365.
9. Abu-Ghazaleh, R. I., S. L. Dunnette, D. A. Loegering, J. L. Checkel, H. Kita, L. L. Thomas, and G. J. Gleich. 1992. Eosinophil granule proteins in peripheral blood granulocytes. *J. Leuk. Biol.* 52:611.
10. Weller, P. F. 1991. The immunobiology of eosinophils. *N. Engl. J. Med.* 324:1110.
11. Schroeder, J. T., and D. W. MacGlashan, Jr. 1997. New concepts: the basophil. *J. Allergy Clin. Immunol.* 99:429.
12. Schroeder, J. T., B. P. Howard, M. K. Jenkins, A. Kagey-Sobotka, L. M. Lichtenstein, and D. W. MacGlashan, Jr. 1998. IL-4 secretion and histamine release by human basophils are differentially regulated by protein kinase C activation. *J. Leuk. Biol.* 63:692.

13. Nonaka, M., R. Nonaka, K. Woolley, E. Adelroth, K. Miura, Y. Okhawara, M. Glibetic, K. Nakano, P. O'Byrne, J. Dolovich, and et al. 1995. Distinct immunohistochemical localization of IL-4 in human inflamed airway tissues. IL-4 is localized to eosinophils in vivo and is released by peripheral blood eosinophils. *J. Immunol.* 155:3234.
14. Schroeder, J. T., A. Kagey-Sobotka, and L. M. Lichtenstein. 1995. The role of the basophil in allergic inflammation. *Allergy* 50:463.
15. Iliopoulos, O., F. M. Baroody, R. M. Naclerio, B. S. Bochner, A. Kagey-Sobotka, and L. M. Lichtenstein. 1992. Histamine-containing cells obtained from the nose hours after antigen challenge have functional and phenotypic characteristics of basophils. *J. Immunol.* 148:2223.
16. Guo, C. B., M. C. Liu, S. J. Galli, B. S. Bochner, A. Kagey-Sobotka, and L. M. Lichtenstein. 1994. Identification of IgE-bearing cells in the late-phase response to antigen in the lung as basophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 10:384.
17. Koshino, T., S. Teshima, N. Fukushima, T. Takaishi, K. Hirai, Y. Miyamoto, Y. Arai, Y. Sano, K. Ito, and Y. Morita. 1993. Identification of basophils by immunohistochemistry in the airways of post-mortem cases of fatal asthma. *Clin. Exp. Allergy* 23:919.
18. Koshino, T., Y. Arai, Y. Miyamoto, Y. Sano, M. Itami, S. Teshima, K. Hirai, T. Takaishi, K. Ito, and Y. Morita. 1996. Airway basophil and mast cell density in patients with bronchial asthma: relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J. Asthma* 33:89.
19. Mestecky, J., and J. R. McGhee. 1987. Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv. Immunol.* 40:153.
20. Brandtzaeg, P., and H. Prydz. 1984. Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. *Nature* 311:71.
21. Kobayashi, K., Y. Fujiyama, K. Hagiwara, and H. Kondoh. 1987. Resistance of normal serum IgA and secretory IgA to bacterial IgA proteases: evidence for the presence of enzyme-neutralizing antibodies in both serum and secretory IgA, and also in serum IgG. *Microbiol. Immunol.* 31:1097.
22. Kusama, K., T. Takahashi, M. Asano, T. Iwase, T. Saito, Y. Nagasaki, and I. Moro. 1989. Murine monoclonal antibody to secretory component. *Jpn. J. Oral Biol.* 31:471.
23. Pang, L., T. Sawada, S. J. Decker, and A. R. Saltiel. 1995. Inhibition of MAP kinase kinase blocks the differentiation of PC-12 cells induced by nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 270:13585.
24. Cuenda, A., J. Rouse, Y. N. Doza, R. Meier, P. Cohen, T. F. Gallagher, P. R. Young,

- and J. C. Lee. 1995. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* 364:229.
25. Monteiro, R. C., M. D. Cooper, and H. Kubagawa. 1992. Molecular heterogeneity of Fc α receptors detected by receptor-specific monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 148:1764.
26. Sanchez-Madrid, F., A. M. Krensky, C. F. Ware, E. Robbins, J. L. Strominger, S. J. Burakoff, and T. A. Springer. 1982. Three distinct antigens associated with human T-lymphocyte-mediated cytotoxicity: LFA-1, LFA-2, and LFA-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79:7489.
27. Landay, A., G. L. Gartland, and L. T. Clement. 1983. Characterization of a phenotypically distinct subpopulation of Leu-2+ cells that suppresses T cell proliferative responses. *J. Immunol.* 131:2757.
28. Lanier, L. L., M. A. Arnaout, R. Schwarting, N. L. Warner, and G. D. Ross. 1985. p150/95, Third member of the LFA-1/CR3 polypeptide family identified by anti-Leu M5 monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.* 15:713.
29. Motegi, Y., and H. Kita. 1998. Interaction with secretory component stimulates effector functions of human eosinophils but not of neutrophils. *J. Immunol.* 161:4340.
30. Sanchez-Madrid, F., M. O. De Landazuri, G. Morago, M. Cebrian, A. Acevedo, and C. Bernabeu. 1986. VLA-3: a novel polypeptide association within the VLA molecular complex: cell distribution and biochemical characterization. *Eur. J. Immunol.* 16:1343.
31. Morimoto, C., N. L. Letvin, A. W. Boyd, M. Hagan, H. M. Brown, M. M. Kornacki, and S. F. Schlossman. 1985. The isolation and characterization of the human helper inducer T cell subset. *J. Immunol.* 134:3762.
32. Fujisawa, T., R. Abu-Ghazaleh, H. Kita, C. J. Sanderson, and G. J. Gleich. 1990. Regulatory effect of cytokines on eosinophil degranulation. *J. Immunol.* 144:642.
33. Yamaguchi, M., K. Hirai, S. Shoji, T. Takaishi, K. Ohta, Y. Morita, S. Suzuki, and K. Ito. 1992. Haemopoietic growth factors induce human basophil migration in vitro. *Clin. Exp. Allergy* 22:379.
34. Miyamasu, M., K. Hirai, Y. Takahashi, M. Iida, M. Yamaguchi, T. Koshino, T. Takaishi, Y. Morita, K. Ohta, T. Kasahara, and et al. 1995. Chemotactic agonists induce cytokine generation in eosinophils. *J. Immunol.* 154:1339.
35. Hirai, K., M. Miyamasu, M. Yamaguchi, K. Nakajima, T. Ohtoshi, T. Koshino, T. Takaishi, Y. Morita, and K. Ito. 1993. Modulation of human basophil histamine release by insulin-like growth factors. *J. Immunol.* 150:1503.

36. Hirai, K., Y. Morita, Y. Misaki, K. Ohta, T. Takaishi, S. Suzuki, K. Motoyoshi, and T. Miyamoto. 1988. Modulation of human basophil histamine release by hemopoietic growth factors. *J. Immunol.* 141:3958.
37. Hirai, K., M. Yamaguchi, Y. Misaki, T. Takaishi, K. Ohta, Y. Morita, K. Ito, and T. Miyamoto. 1990. Enhancement of human basophil histamine release by interleukin 5. *J. Exp. Med.* 172:1525.
38. Kurimoto, Y., A. L. De Weck, and C. A. Dahinden. 1991. The effect of interleukin 3 upon IgE-dependent and IgE-independent basophil degranulation and leukotriene generation. *Eur. J. Immunol.* 21:361.
39. MacGlashan, D. W., Jr., S. P. Peters, J. Warner, and L. M. Lichtenstein. 1986. Characteristics of human basophil sulfidopeptide leukotriene release: releasability defined as the ability of the basophil to respond to dimeric cross-links. *J. Immunol.* 136:2231.
40. Monteiro, R. C., R. W. Hostoffer, M. D. Cooper, J. R. Bonner, G. L. Gartland, and H. Kubagawa. 1993. Definition of immunoglobulin A receptors on eosinophils and their enhanced expression in allergic individuals. *J. Clin. Invest.* 92:1681.
41. Fureder, W., H. Agis, W. R. Sperr, K. Lechner, and P. Valent. 1994. The surface membrane antigen phenotype of human blood basophils. *Allergy* 49:861.
42. Mestecky, J., W. J. Hammack, R. Kulhavy, G. P. Wright, and M. Tomana. 1977. Properties of IgA myeloma proteins isolated from sera of patients with the hyperviscosity syndrome. *J. Lab. Clin. Med.* 89:919.
43. Tedeschi, A., M. Arquati, M. Palella, N. Milazzo, and A. Miadonna. 1994. Ionic regulation of human basophil releasability. II. Non-releasing basophils are converted into releasing basophils in a low-Na⁺ medium. *Clin. Exp. Allergy* 24:66.
44. Bokoch, G. M., and A. G. Gilman. 1984. Inhibition of receptor-mediated release of arachidonic acid by pertussis toxin. *Cell* 39:301.
45. Thomas, K. M., H. Y. Pyun, and J. Navarro. 1990. Molecular cloning of the fMet-Leu-Phe receptor from neutrophils. *J. Biol. Chem.* 265:20061.
46. Miura, K., and D. W. MacGlashan, Jr. 1998. Expression of protein kinase C isozymes in human basophils: regulation by physiological and nonphysiological stimuli. *Blood* 92:1206.
47. Lavens, S. E., P. T. Peachell, and J. A. Warner. 1992. Role of tyrosine kinases in IgE-mediated signal transduction in human lung mast cells and basophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 7:637.
48. Knol, E. F., L. Koenderman, F. P. Mul, A. J. Verhoeven, and D. Roos. 1991.

Differential activation of human basophils by anti-IgE and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. Indications for protein kinase C-dependent and -independent activation pathways. *Eur. J. Immunol.* 21:881.

49. Suzuki, M., K. Hirai, S. Kitani, T. Takaishi, H. Kihara, T. Kasahara, K. Ito, and Y. Morita. 1996. Pharmacologic study of basophil histamine release induced by monocyte chemotactic protein-1 with kinase inhibitors. *Int. Arch. AllergyImmunol.* 111:18.

50. Smith, G. F., M. A. Ridler, and J. A. Fauch. 1967. Action of cytochalasin B on cultured human lymphocytes. *Nature* 216:1134.

51. Bochner, B. S., A. A. McKelvey, S. A. Sterbinsky, J. E. Hildreth, C. P. Derse, D. A. Klunk, L. M. Lichtenstein, and R. P. Schleimer. 1990. IL-3 augments adhesiveness for endothelium and CD11b expression in human basophils but not neutrophils. *J. Immunol.* 145:1832.

52. Sperr, W. R., H. Agis, K. Czerwenka, W. Klepetko, E. Kubista, G. Boltz-Nitulescu, K. Lechner, and P. Valent. 1992. Differential expression of cell surface integrins on human mast cells and human basophils. *Ann. Hematol.* 65:10.

53. Lavens, S. E., K. Goldring, L. H. Thomas, and J. A. Warner. 1996. Effects of integrin clustering on human lung mast cells and basophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 14:95.

54. Peebles, R. S., Jr., M. C. Liu, L. M. Lichtenstein, and R. G. Hamilton. 1995. IgA, IgG and IgM quantification in bronchoalveolar lavage fluids from allergic rhinitics, allergic asthmatics, and normal subjects by monoclonal antibody-based immunoenzymetric assays. *J. Immunol. Methods* 179:77.

55. Burrows, P. D., and M. D. Cooper. 1997. IgA deficiency. *Adv. Immunol.* 65:245.

56. Bukawa, H., K. Sekigawa, K. Hamajima, J. Fukushima, Y. Yamada, H. Kiyono, and K. Okuda. 1995. Neutralization of HIV-1 by secretory IgA induced by oral immunization with a new macromolecular multicomponent peptide vaccine candidate. *Nat. Med.* 1:681.

57. Black, K. P., J. E. Cummins, Jr., and S. Jackson. 1996. Serum and secretory IgA from HIV-infected individuals mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 81:182.

58. Nahm, D. H., and H. S. Park. 1997. Correlation between IgA antibody and eosinophil cationic protein levels in induced sputum from asthmatic patients. *Clin. Exp. Allergy* 27:676.

59. Kitani, S., K. Ito, and T. Miyamoto. 1985. IgG, IgA, and IgM antibodies to mite in sera and sputa from asthmatic patients. *Ann. Allergy* 55:612.

60. Reed, C. E., M. Bubak, S. Dunnette, J. Blomgren, M. Pfenning, P. Wentz-Murtha, N. Wallen, M. Keating, and G. J. Gleich. 1991. Ragweed-specific IgA in nasal lavage fluid of

ragweed-sensitive allergic rhinitis patients: increase during the pollen season. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 94:275.

61. Fujisawa, T., Y. Uchida, H. Kamiya, and M. Sakurai. 1990. Allergen-specific IgA and eosinophil in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 85:283.

62. Beauvais, F., C. Hieblot, C. Burtin, and J. Benveniste. 1990. Bimodal IgG4-mediated human basophil activation. Role of eosinophils. *J. Immunol.* 144:3881.

63. Ihle, J. N., J. Keller, S. Oroszlan, L. E. Henderson, T. D. Copeland, F. Fitch, M. B. Prystowsky, E. Goldwasser, J. W. Schrader, E. Palaszynski, M. Dy, and B. Lebel. 1983. Biologic properties of homogeneous interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, p cell-stimulating factor activity, colony-stimulating factor activity, and histamine-producing cell-stimulating factor activity. *J. Immunol.* 131:282.

64. Hirai, K., Y. Morita, and T. Miyamoto. 1992. Hemopoietic growth factors regulate basophil function and viability. *Immunol. Ser.* 57:587.

65. Yamaguchi, M., K. Hirai, Y. Morita, T. Takaishi, K. Ohta, S. Suzuki, K. Motoyoshi, O. Kawanami, and K. Ito. 1992. Hemopoietic growth factors regulate the survival of human basophils in vitro. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 97:322.

66. Bischoff, S. C., A. L. de Weck, and C. A. Dahinden. 1990. Interleukin 3 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor render human basophils responsive to low concentrations of complement component C3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:6813.

67. Brunner, T., A. L. de Weck, and C. A. Dahinden. 1991. Platelet-activating factor induces mediator release by human basophils primed with IL-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, or IL-5. *J. Immunol.* 147:237.

68. Takatsu, K., and A. Tominaga. 1991. Interleukin 5 and its receptor. *Prog. Growth Factor Res.* 3:87.

69. Brunner, T., C. H. Heusser, and C. A. Dahinden. 1993. Human peripheral blood basophils primed by interleukin 3 (IL-3) produce IL-4 in response to immunoglobulin E receptor stimulation. *J. Exp. Med.* 177:605.

70. Redrup, A. C., B. P. Howard, D. W. MacGlashan, Jr., A. Kagey-Sobotka, L. M. Lichtenstein, and J. T. Schroeder. 1998. Differential regulation of IL-4 and IL-13 secretion by human basophils: their relationship to histamine release in mixed leukocyte cultures. *J. Immunol.* 160:1957.

71. Schroeder, J. T., L. M. Lichtenstein, and S. M. MacDonald. 1997. Recombinant histamine-releasing factor enhances IgE-dependent IL-4 and IL-13 secretion by human basophils. *J. Immunol.* 159:447.

72. Delacroix, D. L., C. Dive, J. C. Rambaud, and J. P. Vaerman. 1982. IgA subclasses in various secretions and in serum. *Immunology* 47:383.
73. Morton, H. C., M. van Egmond, and J. G. van de Winkel. 1996. Structure and function of human IgA Fc receptors (Fc α R). *Crit. Rev. Immunol.* 16:423.
74. Pleass, R. J., P. D. Andrews, M. A. Kerr, and J. M. Woof. 1996. Alternative splicing of the human IgA Fc receptor CD89 in neutrophils and eosinophils. *Biochem. J.* 318:771.
75. van Dijk, T. B., M. Bracke, E. Caldenhoven, J. A. Raaijmakers, J. W. Lammers, L. Koenderman, and R. P. de Groot. 1996. Cloning and characterization of Fc α Rb, a novel Fc α receptor (CD89) isoform expressed in eosinophils and neutrophils. *Blood* 88:4229.
76. Abu-Ghazaleh, R. I., T. Fujisawa, J. Mestecky, R. A. Kyle, and G. J. Gleich. 1989. IgA-induced eosinophil degranulation. *J. Immunol.* 142:2393.
77. Motegi, Y., G. Gleich, and H. Kita. 1997. Eosinophils, but not neutrophils, are preferentially activated by secretory IgA (sIgA) compared with serum IgA: potential roles of secretory component (SC). *J. Allergy Clin. Immunol.* 99:120.
78. Lamkhouioued, B., A. S. Gounni, V. Gruart, A. Pierce, A. Capron, and M. Capron. 1995. Human eosinophils express a receptor for secretory component. Role in secretory IgA-dependent activation. *Eur. J. Immunol.* 25:117.
79. Capron, M., V. Gruart, A. Broussolle, and A. Capron. 1991. Binding site for secretory component on human eosinophils. *FASEB J.* 5:640.
80. Horie, S., and H. Kita. 1994. CD11b/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.
81. Kaneko, M., S. Horie, M. Kato, G. J. Gleich, and H. Kita. 1995. A crucial role for β 2 integrin in the activation of eosinophils stimulated by IgG. *J. Immunol.* 155:2631.
82. Thomas, L. L., and L. M. Lichtenstein. 1979. Augmentation of antigen-stimulated histamine release from human basophils by serum-treated zymosan particles. I. Characteristics of enhancement. *J. Immunol.* 123:1462.
83. Calhoun, W. J., C. A. Swenson, E. C. Dick, L. B. Schwartz, R. F. Lemanske, Jr., and W. W. Busse. 1991. Experimental rhinovirus 16 infection potentiates histamine release after antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144:1267.
84. Sheikh, S., and G. B. Nash. 1996. Continuous activation and deactivation of integrin CD11b/CD18 during de novo expression enables rolling neutrophils to immobilize on platelets. *Blood* 87:5040.

85. Stoyanov, B., S. Volinia, T. Hanck, I. Rubio, M. Loubtchenkov, D. Malek, S. Stoyanova, B. Vanhaesebroeck, R. Dhänd, B. Nurnberg, and et al. 1995. Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* 269:690.
86. Stephens, L., A. Smrcka, F. T. Cooke, T. R. Jackson, P. C. Sternweis, and P. T. Hawkins. 1994. A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Cell* 77:83.
87. Leopoldt, D., T. Hanck, T. Exner, U. Maier, R. Wetzker, and B. Nurnberg. 1998. G $\beta\gamma$ stimulates phosphoinositide 3-kinase- γ by direct interaction with two domains of the catalytic p110 subunit. *J. Biol. Chem.* 273:7024.
88. Okada, T., L. Sakuma, Y. Fukui, O. Hazeki, and M. Ui. 1994. Blockage of chemotactic peptide-induced stimulation of neutrophils by wortmannin as a result of selective inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 269:3563.
89. Lopez-Illasaca, M. 1998. Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades. *Biochem. Pharmacol.* 56:269.
90. Lopez-Illasaca, M., P. Crespo, P. G. Pellici, J. S. Gutkind, and R. Wetzker. 1997. Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase. *Science* 275:394.
91. Tamaoki, T., H. Nomoto, I. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto, and F. Tomita. 1986. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺-dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135:397.
92. Kita, H., C. R. Adolphson, and G. J. Gleich. 1998. Biology of eosinophils. In *Allergy: Principles and Practice*, Vol. 1. E. Middleton, Jr., C. E. Reed, E. F. Ellis, N. F. Adkinson, Jr., J. W. Yunginger, and W. W. Busse, eds. Mosby-Year-Book, St. Louis, p. 242.
93. Costa, J. J., P. F. Weller, and S. J. Galli. 1997. The cells of the allergic response: mast cells, basophils, and eosinophils. *JAMA* 278:1815.
94. Fujimoto, K., K. Kubo, Y. Matsuzawa, and M. Sekiguchi. 1997. Eosinophil cationic protein levels in induced sputum correlate with the severity of bronchial asthma. *Chest* 112:1241.
95. Gounni, A. S., B. Lamkhioed, K. Ochiai, Y. Tanaka, E. Delaporte, A. Capron, J. P. Kinet, and M. Capron. 1994. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature* 367:183.
96. Pawankar, R., M. Okuda, H. Yssel, K. Okumura, and C. Ra. 1997. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc ϵ RI, CD40L, IL-4, and IL-

- 13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J. Clin. Invest.* 99:1492.
97. Kinet, J. P. 1999. The high-affinity IgE receptor (FcεRI): from physiology to pathology. *Annu. Rev. Immunol.* 17:931.
98. Wang, B., A. Rieger, O. Kilgus, K. Ochiai, D. Maurer, D. Fodinger, J. P. Kinet, and G. Stingl. 1992. Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via FcεRI. *J. Exp. Med.* 175:1353.
99. Jurgens, M., A. Wollenberg, D. Hanau, H. de la Salle, and T. Bieber. 1995. Activation of human epidermal Langerhans cells by engagement of the high affinity receptor for IgE, FcεRI. *J. Immunol.* 155:5184.
100. Maurer, D., E. Fiebiger, B. Reininger, B. Wolff-Winiski, M. H. Jouvin, O. Kilgus, J. P. Kinet, and G. Stingl. 1994. Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (FcεRI) on monocytes of atopic individuals. *J. Exp. Med.* 179:745.
101. Maurer, D., S. Fiebiger, C. Ebner, B. Reininger, G. F. Fischer, S. Wichlas, M. H. Jouvin, M. Schmitt-Egenolf, D. Kraft, J. P. Kinet, and G. Stingl. 1996. Peripheral blood dendritic cells express FcεRI as a complex composed of FcεRIα- and FcεRIγ-chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. *J. Immunol.* 157:607.
102. Joseph, M., A. S. Gounni, J. P. Kusnierz, H. Vorng, M. Sarfati, J. P. Kinet, A. B. Tonnel, A. Capron, and M. Capron. 1997. Expression and functions of the high-affinity IgE receptor on human platelets and megakaryocyte precursors. *Eur. J. Immunol.* 27:2212.
103. Hasegawa, S., R. Pawankar, K. Suzuki, T. Nakahata, S. Furukawa, K. Okumura, and C. Ra. 1999. Functional expression of the high affinity receptor for IgE (FcεRI) in human platelets and its intracellular expression in human megakaryocytes. *Blood* 93:2543.
104. Tanaka, Y., M. Takenaka, Y. Matsunaga, S. Okada, S. Anan, H. Yoshida, and C. Ra. 1995. High affinity IgE receptor (FcεRI) expression on eosinophils infiltrating the lesions and mite patch tested sites in atopic dermatitis. *Arch. Dermatol. Res.* 287:712.
105. Sihra, B. S., O. M. Kon, J. A. Grant, and A. B. Kay. 1997. Expression of high-affinity IgE receptors (FcεRI) on peripheral blood basophils, monocytes, and eosinophils in atopic and nonatopic subjects: relationship to total serum IgE concentrations. *J. Allergy Clin. Immunol.* 99:699.
106. Barata, L. T., S. Ying, J. A. Grant, M. Humbert, J. Barkans, Q. Meng, S. R. Durham, and A. B. Kay. 1997. Allergen-induced recruitment of FcεRI+ eosinophils in human atopic

skin. *Eur. J. Immunol.* 27:1236.

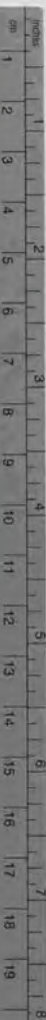
107. Rajakulasingam, K., S. Till, S. Ying, M. Humbert, J. Barkans, M. Sullivan, Q. Meng, C. J. Corrigan, J. Bungre, J. A. Grant, A. B. Kay, and S. R. Durham. 1998. Increased expression of high affinity IgE (FcεRI) receptor-α chain mRNA and protein-bearing eosinophils in human allergen-induced atopic asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158:233.
108. Kita, H., M. Kaneko, K. R. Bartemes, D. A. Weiler, A. W. Schimming, C. E. Reed, and G. J. Gleich. 1999. Does IgE bind to and activate eosinophils from patients with allergy? *J. Immunol.* 162:6901.
109. Yamaguchi, M., C. S. Lantz, H. C. Oettgen, I. M. Katona, T. Fleming, I. Miyajima, J. P. Kinet, and S. J. Galli. 1997. IgE enhances mouse mast cell FcεRI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions. *J. Exp. Med.* 185:663.
110. MacGlashan, D., Jr., L. M. Lichtenstein, J. McKenzie-White, K. Chichester, A. J. Henry, B. J. Sutton, and H. J. Gould. 1999. Upregulation of FcεRI on human basophils by IgE antibody is mediated by interaction of IgE with FcεRI. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104:492.
111. MacGlashan, D., Jr., J. McKenzie-White, K. Chichester, B. S. Bochner, F. M. Davis, J. T. Schroeder, and L. M. Lichtenstein. 1998. In vitro regulation of FcεRIα expression on human basophils by IgE antibody. *Blood* 91:1633.
112. Yamaguchi, M., K. Sayama, K. Yano, C. S. Lantz, N. Noben-Trauth, C. Ra, J. J. Costa, and S. J. Galli. 1999. IgE enhances FcεRI expression and IgE-dependent release of histamine and lipid mediators from human umbilical cord blood-derived mast cells: synergistic effect of IL-4 and IgE on human mast cell FcεRI expression and mediator release. *J. Immunol.* 162:5455.
113. Toru, H., C. Ra, S. Nonoyama, K. Suzuki, J. Yata, and T. Nakahata. 1996. Induction of the high-affinity IgE receptor (FcεRI) on human mast cells by IL-4. *Int. Immunol.* 8:1367.
114. Boesiger, J., M. Tsai, M. Maurer, M. Yamaguchi, L. F. Brown, K. P. Claffey, H. F. Dvorak, and S. J. Galli. 1998. Mast cells can secrete vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of FcεRI expression. *J. Exp. Med.* 188:1135.
115. Yanagihara, Y., K. Kajiwara, K. Ikizawa, T. Koshio, K. Okumura, and C. Ra. 1994.

- Recombinant soluble form of the human high-affinity immunoglobulin E (IgE) receptor inhibits IgE production through its specific binding to IgE-bearing B cells. *J. Clin. Invest.* 94:2162.
116. Ra, C., S. Kuromitsu, T. Hirose, S. Yasuda, K. Furuichi, and K. Okumura. 1993. Soluble human high-affinity receptor for IgE abrogates the IgE-mediated allergic reaction. *Int. Immunol.* 5:47.
117. Yano, K., M. Yamaguchi, F. de Mora, C. S. Lantz, J. H. Butterfield, J. J. Costa, and S. J. Galli. 1997. Production of macrophage inflammatory protein-1 α by human mast cells: increased anti-IgE-dependent secretion after IgE-dependent enhancement of mast cell IgE-binding ability. *Lab. Invest.* 77:185.
118. Terada, N., A. Konno, Y. Terada, S. Fukuda, T. Yamashita, T. Abe, H. Shimada, K. Ishida, K. Yoshimura, Y. Tanaka, and et al. 1995. IL-4 upregulates Fc ϵ RI α -chain messenger RNA in eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 96:1161.
119. Seminario, M. C., S. S. Saini, D. W. MacGlashan, Jr., and B. S. Bochner. 1999. Intracellular expression and release of Fc ϵ RI α by human eosinophils. *J. Immunol.* 162:6893.
120. Furuichi, K., J. Rivera, and C. Isersky. 1985. The receptor for immunoglobulin E on rat basophilic leukemia cells: effect of ligand binding on receptor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82:1522.
121. Quarto, R., J. P. Kinet, and H. Metzger. 1985. Coordinate synthesis and degradation of the α -, β - and γ -subunits of the receptor for immunoglobulin E. *Mol. Immunol.* 22:1045.
122. Lin, S., C. Cicala, A. M. Scharenberg, and J. P. Kinet. 1996. The Fc ϵ RI β subunit functions as an amplifier of Fc ϵ RI γ -mediated cell activation signals. *Cell* 85:985.
123. Dombrowicz, D., S. Lin, V. Flamand, A. T. Brini, B. H. Koller, and J. P. Kinet. 1998. Allergy-associated Fc ϵ R β is a molecular amplifier of IgE- and IgG- mediated in vivo responses. *Immunity* 8:517.

謝辞

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました指導教官の東京大学大学院医学系研究科内科学アレルギーリウマチ学講座前教授の伊藤幸治先生、現教授の山本一彦先生に深甚なる謝意を表します。終始懇切なる御指導、御校閲を頂きました生体防御機能学講座客員助教授の平井浩一先生、アレルギーリウマチ内科の山口正雄先生には、心から厚く御礼申し上げます。呼吸器内科助教授の森田寛先生、新宿高島屋医務室の高石敏昭先生、生体防御機能学の中島敏治先生、日本学術振興会特別研究員の宮増美里先生、アレルギーリウマチ内科の山田浩和先生、国立療養所三重病院小児科の藤澤隆夫先生、日本大学歯学部病理学教授の茂呂周先生、岩瀬孝志先生、順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター助教授の羅智靖先生には、共同研究者として御指導を頂き深く感謝致します。また、斎藤博久先生、草間薫先生、當間重人先生、石井彰先生、土肥眞先生、越野健先生、大利隆行先生、泉信有先生、加藤佳子先生には、大学院での研究や臨床で御指導頂き深謝します。また、長瀬洋之先生、関谷剛先生、小宮明子先生、吉村千登世先生、浅田康子さん、地曳さやかさん、今西雅子さん、菊竹明子さん、竹山祥子さん、林二葉さん、小林トシさんなど周囲の方々の御協力で充実した大学院生活を送ることができました。最後に影ながら応援していた私の家族や親族にも感謝致します。皆様有り難うございました。





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

