

Thesis

ロイコトリエン D₄ が好酸球の血管内皮細胞間隙遊走と
活性酸素産生に及ぼす作用

埼玉医科大学第2内科学教室（呼吸器科）

（指導：西村 重敬教授）

齋藤 圭子

Effects of Leukotriene D₄ on Transendothelial Migration and Respiratory Burst of Eosinophils

Keiko Saito (Pulmonary Division, Second Department of Internal Medicine, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

Cysteinyl leukotrienes (CysLTs) may contribute to the development of eosinophil accumulation in the bronchial tissue of asthma. For example, inhalation of leukotriene (LT) D₄ or LTE₄ increases eosinophil accumulation in the asthmatic airway. The objective of this study was to evaluate whether LTD₄ directly induces the transendothelial migration (TEM) and respiratory burst of eosinophils. Eosinophils were isolated from peripheral blood of healthy subjects. The effects of LTD₄ on eosinophil TEM across human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and generation of superoxide anion were then evaluated. LTD₄ significantly induced TEM of eosinophils across the resting HUVEC (%migration : 3.4 ± 0.5 by medium control *vs.* 10.0 ± 1.7 by $1 \mu\text{M}$; $P < 0.005$; $n = 6$). The TEM induced by LTD₄ was blocked by pranlukast, a CysLT1 receptor antagonist. An anti- β_2 -integrin antibody, but not anti- α_4 -integrin antibody, significantly inhibited the TEM of eosinophils induced by LTD₄. LTD₄ significantly induced the generation of superoxide anion from eosinophils, and this activation was blocked by pranlukast. These results suggest that LTD₄ can directly induce TEM and respiratory burst of eosinophils via CysLT1 receptor. These proinflammatory effects of LTD₄ may contribute to the development of airway inflammation of asthma.

Keywords: leukotriene D₄, eosinophils, transendothelial migration, respiratory burst

緒言

今日、気管支喘息の基礎病態は、気道へのTリンパ球、肥満細胞あるいは好酸球などの浸潤を主体とする慢性的気道炎症であるものと理解されている^{1,2)}。好酸球は喘息の気道炎症における重要な炎症細胞と考えられている。好酸球が喘息気道に集積し、その病態に寄与するためには、末梢循環血中の本細胞が血管内皮細胞上の接着分子群と接着したのちに血管内皮細胞間隙遊走を介して組織内に流入し、その後種々のエフェクター機能が発現される必要があると考えられる。これらの諸段階の調節因子として、種々のサイトカインあるいは脂質メディエーターの関与が想定されている。

ロイコトリエン (leukotriene, 以下 LT) はアラキドン

酸のリポキシゲナーゼ系の代謝産物であり、とりわけシスチニル・ロイコトリエン (cysteinyl leukotrienes, 以下 CysLT; LTC₄, LTD₄, LTE₄) は強力な気道平滑筋収縮作用、また気道分泌促進作用や血管透過性亢進作用を有することから、気管支喘息の病態に寄与することが推測されてきた。

アレルギー性炎症の形成における CysLT の作用に関して、特に喘息患者への経気道投与により好酸球集積が誘導されるか否か、また *in vitro* での好酸球走化性についてそれぞれ相反する報告がなされ、未だ意見の一致をみない³⁻⁷⁾。今回我々は CysLT、特に LTD₄ が好酸球の血管内皮細胞間隙遊走を誘導するか否か、また好酸球のエフェクター機能のひとつである活性酸素の産生を誘導するか否かについて検討した。

材料と方法

1. 材料

- 1) 細胞培養液及び緩衝液: HuMEDIA. EG は倉敷紡績株式会社 (大阪, 日本) から, ブレッドキット EGM は Clonetics Corporation (Palo Alto, CA, USA) から, Hanks' Balanced Salt Solution (以下 HBSS) は GIBCO BRL (Grand island, NY, USA) から, 非働化牛胎児血清 (fetal bovine serum, 以下 FBS) は ICN Biomedicals Inc. (Aurora, Ohio, USA) から入手した.
- 2) 血管内皮細胞: 人臍帯静脈由来血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells, 以下 HUVEC) は倉敷紡績株式会社から入手した.
- 3) 薬剤: CysLT1 受容体拮抗薬である pranlukast hydrate (ONO-1078) は小野薬品から, 抗 Platelet activating factor (以下 PAF) 薬 WEB2086 は Böehringer Ingelheim (Ridgefield, Conn. Germany) から各々供与を受けた.
- 4) 好酸球刺激物質: Eotaxin は R & D Systems (Minneapolis, MN, USA) から, PAF は Sigma (St. Louis, MO, USA) から, LTD₄ は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) から入手した.
- 5) 抗体: 抗 α_4 インテグリン抗体 (クローン HP2/1) はコスモバイオ (株) (東京, 日本) から, 抗 β_2 インテグリン抗体 (クローン L130) は Becton Dickinson (Frankline Lakes, NJ, USA) から, マウス IgG1 は ICN Biomedicals, Inc. (Aurora, Ohio, USA) から, 抗 PSGL-1 (CD162) 抗体 (クローン PL-1) は Immunotech A Coulter Company (Marseille, France) から, 抗 P-selectin (anti-CD62p) 抗体 (クローン G1-4) は Ancell Corporation (Bayport, MN, USA) から入手した.
- 6) その他: Dextran T500 は Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden) から, CD16 Microbeads は Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) から, Recombinant human P-selectin (以下 P-selectin) は R & D Systems から, superoxide dismutase (以下 SOD), Cytochrome C, O-phenylenediamine (以下 OPD), Gelatin は Sigma から入手した.

2. 好酸球分離法

好酸球は既報の方法^{8,9)}に従い immunomagnetic beads による negative selection にて分離した. すなわち健康人末梢血をヘパリン処理したものと 4.5% デキストランを 50 ml のポリプロピレンチューブに 4 対 1 の比率で混ぜ, 血漿成分と赤血球とに分離した. この血漿成分を比重 1.085 の Percoll 液を用い比重遠心分離を行い, リンパ球ならびに低比重の顆粒球を除去後, 蒸留水にて赤血球の溶血操作を行った. その後好中球除去を目的として抗 CD16 モノクローナル抗体ビーズを使用した negative selection 法で好酸

球を選択的に分離した. これを, 遊走反応については 5% FBS を含有する HBSS (HBSS/FBS) に浮遊した後, 2.5×10^5 cells/ml に調整して用いた. また, 活性酸素産生反応については 0.1% gelatin を含有する HBSS (HBSS/gel) に浮遊し 1.25×10^6 cells/ml に調節して実験に供した. 好酸球の分離純度は 98% 以上であり, また実験終了直後の cell viability は trypan blue 染色で 95% 以上であった.

3. 好酸球の血管内皮細胞間隙遊走反応 (transendothelial migration, 以下 TEM)

ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) は 2.5×10^5 cells/ml に調節した. 24 穴プレートの上層のトランスウェルに HuMEDIA を 100 μ l ずつ分注した後に, HUVEC 浮遊液を 100 μ l ずつ分注し, confluent となるまで 37°C にて 24 時間培養した. 一部の実験では HUVEC 上の接着分子群の発現を増強する目的で IL-4, TNF- α を用いた¹⁰⁾. IL-4 は最終 30 pM, TNF- α は最終 100 pM になるよう調節し, トランスウェルに加えて 24 時間刺激した.

好酸球 TEM は Boyden chamber 法の変法¹⁰⁾を用いて測定した. すなわち 24 穴培養プレート (Becton Dickinson Labware) を用い, 3 μ m ポアサイズのインサートフィルター (Becton Dickinson Labware) を装着し, ウェル上部を HBSS で一回洗浄後, 好酸球浮遊液を 200 μ l ずつ分注した後, ウェル下部に遊走因子 500 μ l を注入し 37°C で 3 時間インキュベーションした. 上部ウェルを除去した後, 下部ウェル内に遊走した好酸球のペルオキシダーゼ活性を OPD を用いて発色し, IMMUNO-MINI (NJ-2300, 日本インターメッド株式会社, 東京, 日本) を使用し, 波長 490 nm の吸光度を測定した¹⁰⁾.

4. 好酸球活性酸素産生反応

好酸球のスーパージオキシド (O_2^-) 活性は我々が行ってきた 96 穴プレートを用いたチトクローム C 還元法により測定した¹¹⁻¹³⁾. まず SOD コントロール well に SOD (0.2 mg/mL in HBSS/gel) を 20 μ l ずつ加え, 各 well に LTD₄, PAF 等の刺激物質を入れたのち 100 μ l となるよう HBSS/gel を加えた. 好酸球浮遊液とチトクローム C (12 mg/ml) を体積比 4 対 1 で混合し, これを各 well に 100 μ l ずつ加える. ブランクには HBSS/gel 180 μ l とチトクローム C 20 μ l を加えた. 全て加え終わったら直ちに上記測定器を使用し, 550 nm の吸光度を経時的に測定した. 測定の間はプレートを 5% CO₂, 37°C のインキュベーターで保温した. これらの反応は duplicate で行い, SOD を含んだ反応と比較した. O_2^- 産生量は分子吸光度計数 $21.1 \times 10^3 \text{ M/L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ から^{14,15)}, nmoles cytochrome C reduced/ 10^6 cells-SOD control として算出した. LTD₄ とのインキュベーション開始から 240 分後の好酸球生存率は trypan blue 染色にて 95% 以上であった.

5. 統計処理法

統計学的解析はtwo-way analysis of variance (ANOVA)を用い, Fisher 法 (post hoc 検定) にて解析した. 危険率5%未満を有意とみなした.

結 果

1. 好酸球の TEM に対する LTD₄ の作用

はじめに, resting の状態における HUVEC を用い, LTD₄ の好酸球 TEM に及ぼす作用を検討した. 無刺激での好酸球 TEM (自然遊走, % migration) は 3.4 ± 0.5 であったものが, LTD₄ 0.1 μ M では $7.2 \pm 1.0\%$ ($p < 0.02$ vs. control, N=6), 1 μ M では $10.0 \pm 1.7\%$ ($p < 0.0001$ vs. control, N=6) であり, 統計学的に有意な TEM の誘導が認められた (Fig. 1). 次に IL-4+TNF- α 刺激により接着分子群の発現を増強した HUVEC を用いた場合には, 自然遊走 (% migration) は $4.2 \pm 0.5\%$ であったが, LTD₄ 0.1 μ M では $8.6 \pm 1.0\%$ ($p < 0.005$ vs. control, N=6), 1 μ M では $10.0 \pm 1.5\%$ ($p < 0.0001$ vs. control, N=6) と, 有意な TEM 誘導が観察された. しかしながら, これらの遊走反応と resting HUVEC を用いた遊走反応との間に有意差は認められなかった (Fig. 2).

2. LTD₄ による好酸球 TEM の経時的変化

1 μ M の LTD₄ 刺激下で, resting HUVEC における好酸球の TEM を経時的に観察した. LTD₄ は 15 分の時点から自然遊走と比較して有意な TEM を誘導し, 120 分で反応はプラトーに達した (% migration: 3.9 ± 1.4 by control vs. 16.4 ± 4.9 by 1 μ M; $p < 0.01$; N=5, Fig. 3).

3. LTD₄ に対する CysLT1 拮抗薬の作用

LTD₄ による好酸球の TEM 増強が CysLT1 受容体を介するか否かを確認する目的で, 特異的 CysLT1 拮抗薬である pranlukast の効果を検討した. LTD₄ による好酸球の TEM は 1 μ M の pranlukast により有意に抑制された (% migration: 11.3 ± 1.7 by control vs. 6.5 ± 1.4

by pranlukast; $P < 0.005$; N=5, Fig. 4). 一方自然遊走は pranlukast により修飾されなかった (6.4 ± 1.5 by control vs. 5.4 ± 1.3 by pranlukast; $P = \text{N.S.}$; N=5, Fig. 4). なお, PAF 及び eotaxin で誘導した好酸球 TEM は pranlukast により抑制されなかった (データ未呈示).

4. LTD₄ による血管内皮細胞の PAF 産生および P-selectin 発現の関与の検討

LTD₄ は血管内皮細胞の PAF 産生¹⁶⁾ および P-selectin 発現¹⁷⁾ を誘導することから, LTD₄ による好酸球 TEM はこれらの血管内皮に対する作用を介したものである可能性が想定された. そこでこれらの関与を検討した. PAF 拮抗薬 WEB2086 (20 μ M) は 100 nM PAF による好酸球遊走をブロックしたが (データ未呈示),

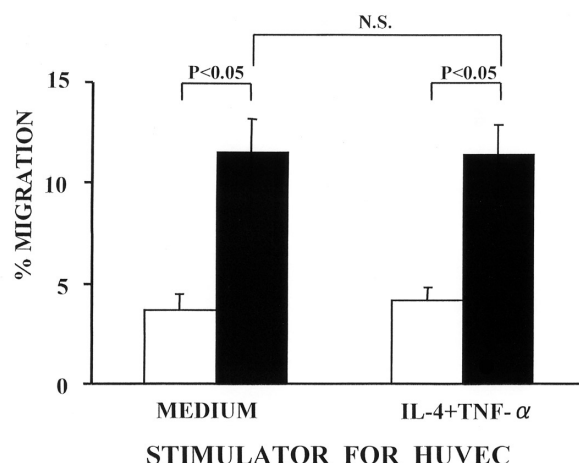


Fig. 2. Effect of endothelial activation on eosinophil transendothelial migration in response to LTD₄ (N=6). Control ($\square$), LTD₄ 1 μ M ($\blacksquare$). Data are expressed as mean $\pm$ S.E. N.S.; not significant.

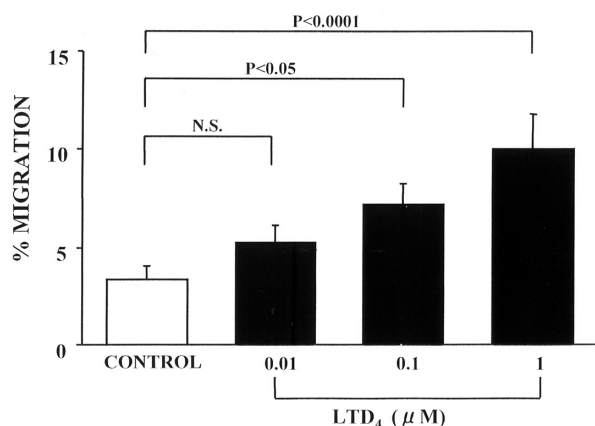


Fig. 1. Effect of LTD₄ on eosinophil transendothelial migration across resting HUVEC (N=6). Data are expressed as mean $\pm$ S.E. N.S.; not significant.

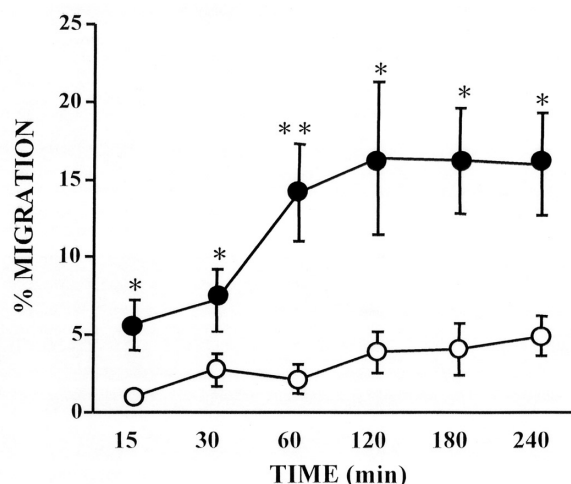


Fig. 3. The kinetics of eosinophil transendothelial migration in response to LTD₄ (N=5). Control ($\circ$), LTD₄ 1 μ M ($\bullet$). Data are expressed as mean $\pm$ S.E. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ vs. control, respectively.

同一の実験条件下で LTD₄ による好酸球 TEM を修飾しなかった (Fig. 5A, N=3). 抗 P-selectin 抗体 (クローン: G1-4) は 10 μ g/ml rh-P-selectin への好酸球接着反応をブロックしたが (未呈示), 同実験条件下で LTD₄ による好酸球の血管内皮細胞間隙遊走を修飾しなかった (Fig. 5B, N=3).

5. LTD₄ による好酸球 TEM における好酸球表面接着分子の関与の検討

LTD₄ による好酸球 TEM における好酸球表面の責任接着分子を検討した. LTD₄ による好酸球 TEM は, 抗 β_2 インテグリン抗体により有意に抑制された (% migration: 15.1 ± 3.9 by control *vs.* 7.2 ± 1.7 by anti- β_2 integrin; $P < 0.05$; N=5, Fig. 6). 一方, 抗 α_4 インテグリン抗体, 抗 PSGL-1 抗体によっては抑制され

なかった (Fig. 6, N=5). なお IL-4+TNF- α 刺激により接着分子発現を増強した系においても, LTD₄ による好酸球の血管内皮細胞間隙遊走は抗 β_2 インテグリン抗体により有意に抑制されたが, 抗 α_4 インテグリン抗体, 抗 PSGL-1 抗体によっては抑制されなかった (データ未呈示).

6. 好酸球からの superoxide anion (O_2^-) 産生に対する LTD₄ の作用の検討

0.1 μ M LTD₄ は好酸球の O_2^- 産生を直接的に誘導し, その反応は 210 分ではほぼプラトーに達した (nmoles/ 10^6 cells; 12.6 ± 2.2 by LTD₄ *vs.* 2.7 ± 1.3 by control; $p < 0.001$; N=6, Fig. 7). この反応は CysLT1 拮抗薬 pranlukast により有意に抑制された (nmol/ 10^6 cells; 12.8 ± 1.6 by control *vs.* 5.6 ± 1.0 by pranlukast; $P < 0.005$; N=7, Fig. 8).

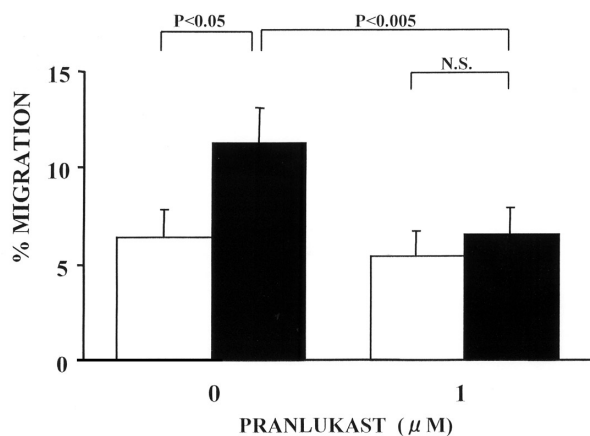


Fig. 4. Effect of pranlukast, a cysLT1 antagonist, on eosinophil transendothelial migration in response to LTD₄ (N=5). Control (□), LTD₄ 1 μ M (■). Data are expressed as mean $\pm$ S.E. N.S.; not significant.

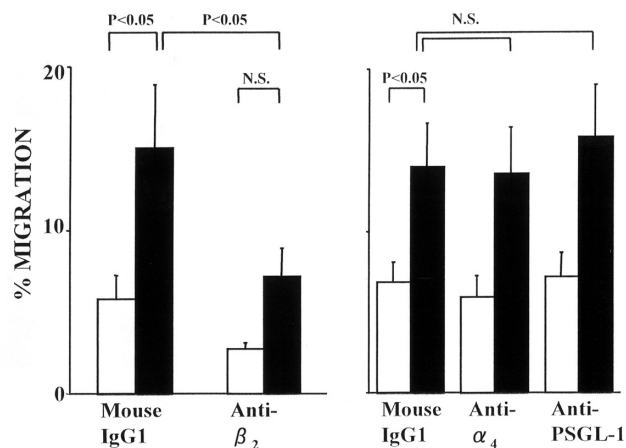


Fig. 6. Effects of anti-adhesion molecule antibodies on LTD₄-induced eosinophil transendothelial migration in response to LTD₄ (N=5). Control (□), LTD₄ 1 μ M (■). Data are expressed as mean $\pm$ S.E. N.S.; not significant.

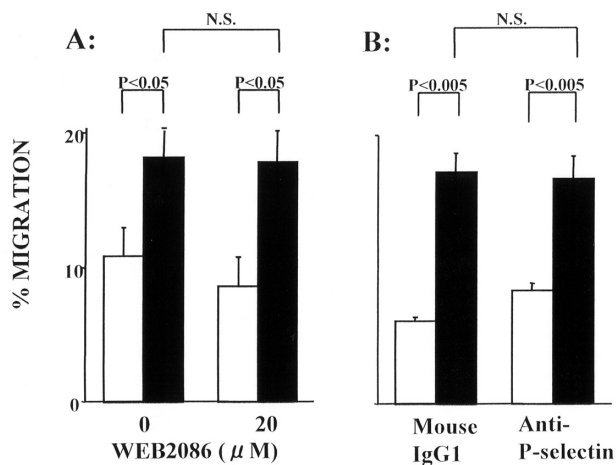


Fig. 5. Effects of WEB2086, a PAF-antagonist (A) or anti-P-selectin antibody (B) on eosinophil transendothelial migration in response to LTD₄ (N=3). Control (□), LTD₄ 1 μ M (■). Data are expressed as mean $\pm$ S.E. N.S.; not significant.

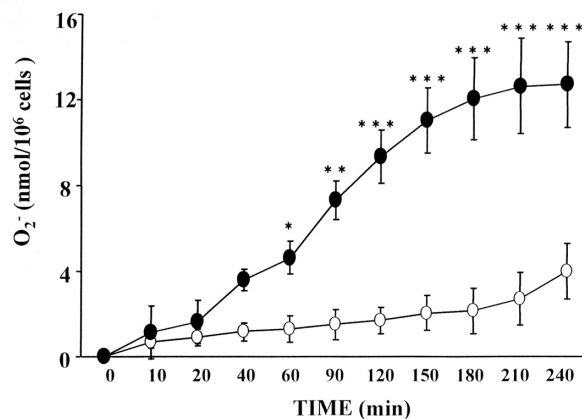


Fig. 7. Effect of LTD₄ on eosinophil O_2^- generation (N=6). Control (○), LTD₄ 0.1 μ M (●). Data are expressed as mean $\pm$ S.E. (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.005$, ***: $p < 0.0005$ *vs.* control)

考 案

LTD₄ が直接的に好酸球の TEM を誘導すること、また活性酸素産生を誘導することが観察された。これらの反応は、CysLT1 拮抗薬によって、いずれも有意に抑制された。これらの成績は、LTD₄ が好酸球表面上の CysLT1 受容体を介して好酸球の組織集積及びエフェクター機能の発現に寄与することを示唆するものである。

LT は、シクロオキシゲナーゼ系、5-リポキシゲナーゼ系の 2 つの代謝経路を持つアラキドン酸カスケードのうち、5-リポキシゲナーゼ系により産生される代謝産物である。システインを含むペプチドを側鎖に持つ LTC₄、LTD₄、LTE₄ は CysLT と総称される。生体内で産生される LTC₄ は速やかに bioconversion を受け LTD₄、次いで LTE₄ に代謝される。CysLT の受容体には 2 種類あり、気道平滑筋や胆嚢などに分布する CysLT1 受容体は主として LTD₄ と結合し、ついで LTC₄、LTE₄ の順に親和性を示し、一方、肺静脈や脾臓などに分布する CysLT2 受容体は LTC₄ と優位に結合する^{18,19)}。近年、好酸球が CysLT1 受容体を発現することが報告された²⁰⁾。このことは LTD₄ を含む CysLT が、CysLT の産生細胞のひとつである好酸球自身に直接作用することにより、その組織集積あるいは機能発現に関与していることを示唆する。事実、近年、Lee ら²¹⁾ は LTC₄ 及び LTD₄ が、好酸球の生存期間を延長することを報告した。また我々²²⁾ は LTD₄ が CysLT1 受容体依存性に好酸球の接着能を増強することを報告した。

喘息における CysLT の好酸球組織集積作用について、Laitinen ら³⁾ は LTC₄ の安定代謝産物である LTE₄ を喘息

患者に吸入投与することにより、気道への好酸球浸潤が認められたことを報告した。Diamant ら⁵⁾ も喘息患者に LTD₄ を吸入させると、気道の好酸球が増加することを認めた。一方、Mulder ら⁴⁾ は喘息患者に LTD₄ を吸入させると一秒率の低下を認めたが、喀痰中の好酸球は増加しなかったとしている。CysLT 拮抗薬の投与が好酸球集積を修飾するかどうかについて、Pizzichini ら²³⁾ は CysLT1 受容体拮抗薬 montelukast 投与により喀痰中好酸球が減少することを報告した。また、Yoshida ら²⁴⁾ も pranlukast 投与により、末梢血及び喀痰中の好酸球が減少したと報告した。これらは気管支喘息における CysLT の好酸球集積への寄与を支持する成績と考えられる。

気管支喘息の治療における CysLT 拮抗薬の有用性は、多くの二重盲検比較試験によって確認されている。例えば本研究で用いた pranlukast は、成人²⁵⁾ 及び小児²⁶⁾ の慢性喘息で臨床症状を改善させること、成人では吸入ステロイド薬の減量効果を有すること²⁷⁾ が示されている。CysLT 拮抗薬はまた、喘息の特殊な病態である消炎鎮痛薬誘発喘息²⁸⁾ や運動誘発喘息²⁹⁾ に対する抑制効果を有することが確認されている。

In vitro の報告では、これまでに CysLT の好酸球 TEM に対する作用についての報告はないが、単純化学遊走 (chemotaxis) についての検討が散見される。Nagy ら⁶⁾ は LTC₄、LTD₄ が好酸球の遊走を起こさなかったと報告したが、一方、Spada ら⁷⁾ は LTD₄ が健常ヒト好酸球の遊走を起こすと報告し、この点に関しては相反する結果で一致をみていない。今回の検討成績は、LTD₄ が好酸球の TEM を誘導することを観察し得た初めてのものである。かかる反応は好酸球の CysLT1 受容体に依存性であり、かつ好酸球表面接着分子である β_2 インテグリンを介するものと考えられた。同時に、この作用は LTD₄ の血管内皮細胞に対する作用、すなわち PAF 産生あるいは P-selectin の発現を介したものであるという可能性は否定し得ると考えられた。以上の事は、CysLT が CysLT1 受容体を介して β_2 インテグリンの活性化を誘導し、その結果として喘息気道などの炎症部位における好酸球集積に関与し得ることを支持する成績である。

加うるに、LTD₄ は好酸球の O₂⁻ 産生をも誘導した。かかる活性化も少なくとも部分的には CysLT1 受容体を介したものと考えられた。この成績は CysLT が好酸球のエフェクター機能の一つである活性酸素種の産生を誘導し得ることを示した成績である。活性酸素種は従来から知られる組織傷害活性や血管透過性亢進作用に加え、近年は炎症反応の調節分子としての作用が指摘されている。好酸球について、我々は活性酸素種 H₂O₂ が好酸球の接着能を増強させ、ICAM-1 への接着反応を増強することを見出している³⁰⁾。従って、LTD₄ による活性酸素産生は autocrine な機序により好酸球

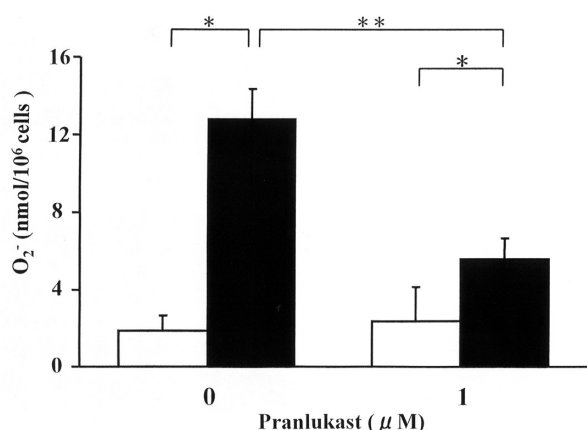


Fig. 8. Effect of pranlukast, a cysLT1 antagonist on LTD₄ - induced O₂⁻ generation from eosinophils (N=7). Control (□), LTD₄ 0.1 μM (■). Data are expressed as mean ± S.E. (*: p < 0.005, **: p < 0.0005 vs. control).

自身の接着能を増強し、炎症を更に増幅する可能性が考えられる。

LTD₄ による好酸球の TEM, あるいは活性酸素産生に関与する細胞内シグナル伝達機構は未解明である。代表的な好酸球活性化サイトカインである IL-5 は TEM 誘導能を有さないが活性酸素産生増強作用を有し、これにはチロシンキナーゼを介した phosphatidylinositol 3-kinase の活性化が関与すると報告されている³¹⁾。LTD₄ による好酸球活性化についても本 kinase が関与する可能性が想定されるが、この点については今後の検討課題である。

喘息気道組織における CysLT の正確な濃度は不明確であるが、好酸球自身が CysLT の供給源たりえること、また喘息患者での誘発喀痰中には 20~50 nM 程度の CysLT が検出されることから^{32,33)}、本研究で得られた LTD₄ による好酸球の TEM ならびに O₂⁻ 産生の誘導は、実際の喘息気道においても生じ得ると想定される。加うるに、これらは CysLT1 拮抗薬の抗喘息作用の少なくとも一部を説明し得るものと考えられる。今後は好酸球の他の機能である特異顆粒蛋白の放出、あるいはサイトカイン産生に対する CysLT の作用が解明される必要があるものと考ええる。

結 論

気管支喘息においては、気道平滑筋の攣縮や血管透過性亢進による粘膜浮腫、気道分泌亢進、粘性増加による気道の気流制限が特徴的にみられるが、これらの一部は CysLT の作用であると考えられてきた。今回、我々は LTD₄ が直接好酸球に作用しその血管内皮細胞間隙遊走あるいは活性酸素の産生を誘導することを確認した。またこれらの作用が CysLT1 受容体拮抗薬ならびに抗 β_2 インテグリン抗体により抑制されたことから、この反応は CysLT1 受容体及び β_2 インテグリンを介しての作用と考えられた。以上の検討から気管支喘息などのアレルギー性炎症疾患においては、好酸球や他の炎症細胞より産生される CysLT, なかでも LTD₄ が、気道収縮や血管透過性亢進に作用することのみならず、好酸球に直接的に作用し、炎症調節因子として、その組織への流入やエフェクター機能の発現に寄与していることが示唆された。

謝 辞

稿を終わるにあたり、御指導、御校閲を賜りました西村重敬教授、坂本芳雄助教授に深甚なる謝意を捧げますと共に、直接御指導いただきました永田真助教授に深謝いたします。そして実験にご協力頂いた明治製菓株式会社薬品総合研究所の土屋浩司博士、ならびに当研究室横手明美実験助手に感謝いたします。

文 献

- 1) National Heart, Lung and Blood Institute and World Health Organization. Global initiative for asthma. National Institutes of Health pub No 95-3659, Bethesda, MD, 1995.
- 2) National Asthma Education and Prevention Program, Expert Panel Report 2 : Guidelines for the diagnosis and management of asthma. National Institutes of Health pub No 97-4051, Bethesda, MD, 1997.
- 3) Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T, Vikka V, Spur BW, Lee TH. Leukotriene E₄ and granulocytic infiltration into asthmatic airways. *Lancet* 1993;341: 989-90.
- 4) Mulder A, Gauvreau GM, Watson RM, O'Byrne PM. Effect of inhaled leukotriene D₄ on airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1562-7.
- 5) Diamant Z, Hiltermann JT, Rensen EL, Callenbach PM, Carvat MV, Veen H, et al. The effect of inhaled leukotriene D₄ and methacholine on sputum cell differentials in asthma. *Am J Resp Critic Care Med* 1997;155:1247-53.
- 6) Nagy L, Lee TH, Kay B. Complement receptor enhancement and chemotaxis of human neutrophils and eosinophils by leukotrienes and other lipoxygenase products. *Clin exp Immunol* 1982;47:541-7.
- 7) Spada CS, Nieves AL, Krauss AH, Woodward DF. Comparison of leukotriene B₄ and D₄ effects on human eosinophil and neutrophil motility in vitro. *J Leukoc Biol* 1994;55:183-91.
- 8) Nagata M, Yamamoto H, Tabe K, Sakamoto Y, Matsuo H. Eosinophil-adhesion-inducing activity produced by antigen stimulated mononuclear cells involves GM-CSF. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;122 Suppl 1:15-9.
- 9) Nagata M, Yamamoto H, Shibasaki M, Sakamoto Y, Matsuo H. Hydrogen peroxide augments eosinophil adhesion via β_2 integrin. *Immunology* 2000;101:412-8.
- 10) Nagata M, Yamamoto H, Tabe K, Sakamoto Y. Eosinophil transmigration across VCAM-1-expressing endothelial cells is upregulated by antigen-stimulated mononuclear cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;125 Suppl 1:7-11.
- 11) Nagata M, Sedgwick JB, Bates ME, Kita H, Busse WW. Eosinophil adhesion to vascular cell adhesion molecule-1 activates superoxide anion generation. *J Immunol* 1995;155:2194-202.

- 12) Nagata M, Sedgwick JB, Busse WW. Differential effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on eosinophil and neutrophil superoxide anion generation. *J Immunol* 1995;155:4948-54.
- 13) Nagata M, Sedgwick LB, Kita H, Busse WW. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor augments ICAM-1 and VCAM-1 activation of eosinophil function. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:158-66.
- 14) Sedgwick JB, Vrtis RF, Gourley MF, Busse WW. Stimulus-dependent differences in superoxide anion generation by normal human eosinophils and neutrophils. *J Allergy Clin Immunol* 1988;81:876-83.
- 15) Van Gelder BF, Slater EC. The extinction coefficient of cytochrome C. *Biochim Biophys Acta* 1962;58:593-08.
- 16) McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Leukotrienes C₄ and E₄ stimulate human endothelial cells to synthesize platelet-activating factor and bind neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2204-8.
- 17) Pedersen KE, Bochner BS, Undem BJ. Cysteinyl leukotrienes induce P-selectin expression in human endothelial cells via a non-CysLT1 receptor-mediated mechanism. *J Pharm Exp Therap* 1997;281:655-62.
- 18) Back M, Jonsson EW, Dahlen SE. The cysteinyl-leukotriene receptor antagonist BAYu9773 is a competitive antagonist of leukotriene C₄ in the guinea-pig ileum. *Eur J Pharmacol* 1996;317:107-13.
- 19) Heise CE, O'Dowd BF, Figueroa DJ, Sawyer N, Nguyen T, Im DS, et al. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem* 2000;275:3051-6.
- 20) Figueroa DJ, Breyer RM, Defoe SK, Kargman S, Daugherty BL, Waldburger K, et al. Expression of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in normal human lung and peripheral blood leukocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:226-33.
- 21) Lee E, Robertson T, Smith J, Kilfeather S. Leukotriene receptor antagonists and synthesis inhibitors reverse survival in eosinophils of asthmatic individuals. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1881-6.
- 22) Nagata M, Saito K, Tsuchiya K, Sakamoto Y. Leukotriene D₄ upregulates eosinophil adhesion via the cysteinyl leukotriene 1 receptor. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:676-80.
- 23) Pizzichini E, Left JA, Reiss TF, Hendeles L, Boulet LP, Wei LX, et al. Montelukast reduces airway eosinophilic inflammation in asthma: a randomized, controlled trial. *Eur Respir J* 1999;14:12-8.
- 24) Yoshida S, Ishizaki Y, Shoji T, Onuma K, Nakagawa H, Nakabayashi M, et al. Effect of pranlukast on bronchial inflammation in patients with asthma. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1008-14.
- 25) Barnes NC, Pujet JC. Pranlukast, a novel leukotriene receptor antagonist: results of the first European, placebo controlled, multicentre clinical study in asthma. *Thorax* 1997;52:523-7.
- 26) 三河春樹, 馬場実, 中島光好. 小児気管支喘息に対するロイコトリエン受容体拮抗薬プラフルカスト ドライシロップの臨床評価. オキサトミド ドライシロップを対象とした二重盲検試験. *臨床医学* 1997;13:423-56.
- 27) Tamaoki J, Kondo M, Sasaki N, Nakata J. Takemura H, et al. Leukotriene antagonist prevents exacerbation of asthma during reduction of high-dose inhaled corticosteroid. The Tokyo Joshi-Idai Asthma Research Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1235-40.
- 28) Yamamoto H, Nagata M, Kuramitsu K, Tabe K, Kiuchi H, Sakamoto Y, et al. Inhibition of analgesic-induced asthma by leukotriene receptor antagonist ONO-1078. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:254-7.
- 29) Leff JA, Busse WW, Perlman D, Bronsky EA, Kemp J, Hendeles L, et al. Montelukast, a leukotriene-receptor antagonist, for the treatment of mild asthma and exercise-induced bronchoconstriction. *N Engl J Med* 1998;339:147-52.
- 30) Nagata M, Yamamoto H, Shibasaki M, Sakamoto Y, Matsuo H. Hydrogen peroxide augments eosinophil adhesion via β_2 integrin. *Immunology* 2000;101:412-8.
- 31) Coffey PJ, Schweizer RC, Dubois GR, Maikoe T, Lammer JW, Koenderman L. Analysis of signal transduction pathways in human eosinophils activated by chemoattractants and the T-helper 2-derived cytokines interleukin-4 and interleukin-5. *Blood* 1998;91:2547-57.
- 32) Pavord ID, Ward R, Woltman G, Wardlaw AJ, Sheller JR, Dworski R. Induced sputum eicosanoid concentrations in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1905-09.
- 33) Macfarlane AJ, Dworski R, Sheller JR, Pavord ID, Kay AB, Barnes NC. Sputum cysteinyl leukotrienes increase 24 hours after allergen inhalation in atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1553-8.