

アレルギー疾患にみられる好酸球活性化・好塩基球IgE結合状態のフローサイトメトリー法による臨床的評価(I) アレルギー疾患における好酸球活性化と表面抗原 CD11b, CD69の発現

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9176

アレルギー疾患にみられる好酸球活性化・好塩基球 IgE 結合状態の フローサイトメトリー法による臨床的評価

I. アレルギー疾患における好酸球活性化と表面抗原 CD11b, CD69 の発現

金沢大学医学部医学科小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

東 馬 智 子

種々のアレルギー疾患において末梢血中での好酸球の増加, あるいは標的組織における好酸球の浸潤が認められる。最近, これら好酸球がアレルギー反応における炎症惹起細胞として重要な役割を担っていることが明らかにされてきた。種々のサイトカインやケモカインにより炎症の局所へ遊走し活性化をうけた好酸球は, 形態的にも機能的にも正常末梢血好酸球とは異なる特徴を有しており, その活性化を定量的に評価するために様々な試みがなされてきた。本研究では, 好酸球の接着分子である CD11b 抗原と活性化抗原である CD69 抗原をフローサイトメトリーを用いて同時に測定し, その抗原発現の臨床的意義を検討した。EDTA 加末梢全血をフルオレッセン・イソチオシアン酸 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識抗 CD16 単クローン抗体 (monoclonal antibody, mAb) およびフィコエリスリン (phycoerythrin, PE) 標識抗 CD11b mAb あるいは PE 標識抗 CD69 mAb で二重染色し, 顆粒球分画のうち CD16 抗原陰性細胞として得られる好酸球表面の PE 蛍光強度を測定した。末梢血全血に組み換え型ヒト顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, rGM-CSF) あるいは組み換え型ヒトインターロイキン 5 (recombinant human interleukin-5, rIL-5) を添加し培養したところ, 好酸球表面にすみやかに CD69 抗原が誘導され, CD11b 抗原の発現が増強した。次に, 好酸球表面抗原の臨床的意義を明らかにするために, アレルギー疾患群27名と非アレルギー対照群26名におけるこれらの抗原発現を比較検討した。末梢血好酸球表面の CD11b 抗原発現は, 正常対照群に比しアレルギー群においてあきらかに増強していた ($p < 0.001$)。CD69 抗原は, 正常対照群あるいはアレルギー群の末梢血好酸球表面には発現しないが, アレルギー性鼻炎や好酸球性心外膜炎症例などでは炎症局所に浸潤した好酸球表面には強く発現していた。また, 好酸球増多症の末梢血好酸球の一部にも強い CD69 抗原発現が観察され, 形態的検討によりこれらの好酸球が生体内で強く活性化された状態にあることが示唆された。以上の結果より, フローサイトメトリーを用いた好酸球表面抗原発現の解析は, 好酸球の活性化とアレルギー性炎症の病態を評価する上で, 鋭敏で有用な指標となると考えられた。

Key words allergy, eosinophil, activation, CD11b, CD69

寄生虫疾患や種々のアレルギー性疾患において末梢血中や標的組織に好酸球が増加, 浸潤することは古くからよく知られている。また, 気管支喘息や好酸球性肺炎患者においては, アレルギー性炎症の局所組織における好酸球浸潤を反映して気管支肺胞洗浄液や胸水中に好酸球が多数認められることから, 好酸球がアレルギー性疾患の病態形成に重要な役割を果たしていることが従来より示唆されてきたが, その機能の詳細に関しては不明のことが多かった。最近, 好酸球が種々のサイトカインやケモカインにより炎症の局所へ遊走集積し, 活性化好酸球としての機能が誘導される機序が明らかにされてきている^{1)~3)}。さらに好酸球の特異顆粒蛋白が強い組織傷害性を有することより, 好酸球はアレルギー反応の局所において炎症惹起細胞の主役として重要な働きをされると考えられている^{4)~9)}。

末梢血中の好酸球数の測定は簡単で繰り返し行えるため, 各種アレルギー疾患において好酸球の変動をみるために日常的に測定されているが, 必ずしも病態や局所組織に浸潤した好酸球数を反映してはいない。炎症局所に浸潤した好酸球は好酸球活性化に関与するサイトカインとして知られるインターロイキン 3 (interleukin-3, IL-3), インターロイキン 5 (interleukin-5, IL-5), 顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) の影響下で脱顆粒し, 低比重化していると考えられている¹⁰⁾¹¹⁾。このため, 好酸球活性化の指標として末梢血中や炎症局所における低比重好酸球の定量や, 末梢血液中の好酸球顆粒蛋白およびサイトカインの定量などが試みられている^{12)~15)}。しかしそれらは, 大量の検体を要したり煩雑な手法を必要とする場合が多く, また必

平成7年11月20日受付, 平成7年12月25日受理

Abbreviations: FITC, fluorescein isothiocyanate; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IL-3, interleukin-3; IL-5, interleukin-5; mAb, monoclonal antibody; PBS, phosphate-buffered saline; PE, phycoerythrin; rGM-CSF, recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; rIL-5, recombinant human interleukin-5

ずしも再現性が明らかでないことより、特定の疾患では有用であっても一般的なアレルギー疾患の病態を評価する指標とはなりにくい。また炎症局所組織を直接採取したり、気管支肺泡洗浄液や喀痰などを用いる検討は、侵襲的であり、繰り返し検討することは困難なことから、特に小児においては臨床応用には不適當であると考えられる。

一方、好酸球表面には種々の活性化に関連した抗原が発現することが明らかになってきており¹⁰、フローサイトメトリーを用いたこのような好酸球表面抗原発現の検討は、少量の検体で解析可能であり、定量性にもすぐれていると考えられる。さらに、経時的に検討できることから、生体内における好酸球の活性化を評価する有用な手段となりうる。なかでも CD11b 抗原は元来好酸球表面に構成的に発現しているが、血小板活性化因子や種々の好酸球活性化サイトカインの影響によりその発現が増強することが知られており¹¹、さらに好酸球の血管内皮への接着に重要な役割を果たすことが示唆されている^{21,22}。また、リンパ球の初期活性化抗原として知られている CD69 抗原は通常末梢血好酸球には発現していないが、アレルギー炎症の局所に浸潤する好酸球においてその発現が強く誘導されることが報告されている²⁰⁻²⁴。本研究では、種々のアレルギー性疾患や好酸球増多症の症例において好酸球表面抗原、特に接着分子である CD11b 抗原と活性化抗原である CD69 抗原をフローサイトメトリーを用いて同時に測定し、その臨床的意義について検討した。

対象および方法

I. 対 象

対象は金沢大学医学部附属病院小児科および関連病院に通院または入院中の 0 才から 36 才 (平均 9 才) までの患者 53 名である。これらの患者を病歴、臨床所見から気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、食物アレルギーなどの診断のなされた患者 (アレルギー群) 27 名 (男 21 名, 女 6 名) と、臨床症状および 2 親等以内の家族歴にアレルギー症状やアレルギー疾患を認めず、末梢血中の好酸球比率が 5% 以内の患者 (非アレルギー対照群, 以下正常対照群) 26 名 (男 14 名, 女 12 名) に分けて比較検討した。これらの患者より EDTA 加静脈全血約 1ml を採取し検体として用いた。また、当科アレルギー外来通院中のアトピー性皮膚炎および気管支喘息患者延べ 113 名において末梢血好酸球数を測定し、対照群と比較した (同一患者の経時採血を含む)。さらに気管支喘息患者においては、その発作中の好酸球数についても測定し、非発作時と比較した。

II. 免疫蛍光染色

EDTA 加静脈血を遠心し得られた血球成分をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) で 2 回洗浄後、得られた血球成分にフルオレッセン・イソチオシアン酸 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識 OKNK (抗 CD16) 単クローン抗体 (monoclonal antibody, mAb) (Ortho Diagnostic Systems, 東京) およびフィコエリスリン (phycoerythrin, PE) 標識抗 Leu-15 (抗 CD11b) あるいは抗 Leu-23 (抗 CD69) mAb (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, USA) を添加後 4℃ で 20 分間反応させた。0.83% 塩化アンモニウム溶液にて溶血後、細胞を PBS に再浮遊しフローサイトメーター Cyturon Absolute (Ortho Diagnostic Systems) を用いて表面抗原の発現を解析した。

III. セルソーターによる好酸球の分離

好中球は CD16 抗原である IgGf_c III レセプターは陽性であるが、好酸球は CD16 抗原陰性であることから、顆粒球分画において好中球と好酸球を区別することが可能である²⁵。フローサイトメトリー法により、II で得られた顆粒球分画を抗 CD16mAb を用いて蛍光染色し、セルソーター Epics Elite (Coulter Electronics Inc., Hialeah, FL, USA) を用いて CD16 抗原陽性細胞群と CD16 抗原陰性細胞群に分離した。CD16 抗原陽性および陰性細胞のサイトスピン標本をメイ・ギムザ染色後鏡検し、好中球と好酸球の比率を求めた。

IV. フローサイトメトリー法による好酸球表面抗原発現の解析

顆粒球分画の CD16 抗原陰性細胞として得られる好酸球表面の CD11b 抗原および CD69 抗原発現を、PE 平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity) と自家蛍光強度との差 Δ 平均蛍光強度 (Δ mean fluorescence intensity) で表した。

V. サイトカイン刺激による好酸球表面抗原発現の誘導および増強

正常対照 3 例より得られた EDTA 加静脈血に 10, 100, 1000, 10000pg/ml とそれぞれ濃度の異なる組み換え型ヒト顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, rGM-CSF) (Genzyme Corporation, Boston, MA, USA) あるいは組み換え型ヒトインターロイキン 5 (recombinant human interleukin-5, rIL-5) (サントリー株式会社より供与) を添加し、37℃ で 4 時間培養した。培養終了後 PBS で洗浄し、好酸球表面における CD11b および CD69 抗原の発現をフローサイトメトリーにより検討した。またこれらの EDTA 加静脈血に rIL-5 を 10000pg/ml の濃度にて添加し 37℃ で培養後、好酸球表面における両抗原発現の時間的推移についても検討した。

VI. 活性化好酸球における表面抗原発現の解析

犬蛔虫症による好酸球性心外膜炎患者の心外膜液中の好酸球、あるいはアレルギー性鼻炎患者の鼻汁中の好酸球を用いて、炎症局所に浸潤した好酸球表面における CD69 抗原発現を検討した。また、好酸球増多症の 2 例の末梢血好酸球についても、表面抗原発現を解析し、さらに電子顕微鏡により CD69 抗原陽性細胞の形態的特徴を CD69 抗原陰性細胞と比較検討した。すなわち、好酸球増多症の患者より得られた好酸球を、セルソーターにより CD69 抗原陽性および陰性細胞群に分離し、それぞれを 1500 回転、5 分間遠心した。その遠心ペレットに 2% グルタルアルデヒドを重畳し 24 時間固定し、さらにオスミウム酸にて 2 時間二重固定を施した。固定後の遠心ペレットを試験管より遊離させ、一般の電顕試料作成法に従い、アルコール脱水、エポキシ樹脂包埋、ミクロトームによる薄切、鉛およびウランによる電子染色と処理し、透過型電子顕微鏡 H-600 (日立製作所, 東京) にて観察した。一部の症例では、単離した細胞を 1% 非働化ウン胎児血清 (Nipro, 大阪) 加 PBS に再浮遊の後サイトスピン標本を作成、メイ・ギムザ染色を施行し光学顕微鏡下でその形態的特徴を観察した。

VII. 統計学的検討

各測定値は平均土標準偏差で表し、2 群間の平均値の比較検定には Student の対応のない標本の t 検定を用い、危険率 5% 未満をもって有意差ありと判定した。また、2 つの変数間の相関については Pearson の相関係数で表し、危険率 5% 未満を

もって有意差ありと判定した。

成 績

I. アレルギー疾患と末梢血好酸球数

当科アレルギー外来通院中のアトピー性皮膚炎および気管支喘息患者の末梢血好酸球数を正常対照群と比較検討した。アト

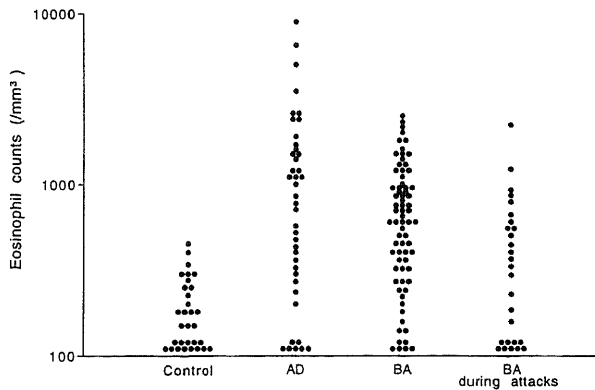


Fig. 1. Peripheral blood eosinophil counts in various allergic disorders. The numbers were compared among normal controls (Control), patients with atopic dermatitis (AD), patients with bronchial asthma in stable clinical condition (BA) or during acute wheezing attack (BA during attacks).

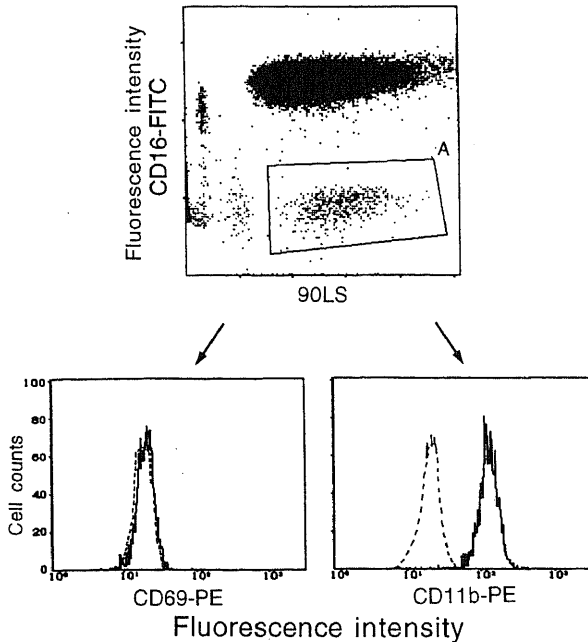


Fig. 2. Flowcytometric analysis of eosinophil surface antigens, CD11b and CD69. Peripheral whole blood samples were stained with FITC-conjugated anti-CD16 mAb, together with PE-conjugated anti-CD69 or PE-conjugated anti-CD11b mAbs. Among leukocytes with larger 90 angle light scatters (90LS), CD16-negative cells (region A) were gated and the intensity of PE fluorescence was measured for CD69 and CD11b expression. Dotted lines indicate the autofluorescence of eosinophils without added antibody. Solid lines indicate PE fluorescence after the staining with anti-CD69 mAb or anti-CD11b mAb.

ピー性皮膚炎患者群においては明らかに、正常対照群に比し末梢血好酸球数は高値を示した。気管支喘息患者群においても、多くの例で好酸球は高値を示したが、正常値を示す例が一部認められた。さらに、喘息発作中の患者群では好酸球数が正常値を示す例が多く、症例によるばらつきが顕著となった。また、気管支喘息発作の状態、他のアレルギー症状合併の有無などにより末梢血好酸球数は大きく影響される可能性が示唆された(図1)。

II. フローサイトメトリーを用いた好酸球の単離

顆粒球分画をセルソーターを用いて CD16 抗原陽性細胞群と CD16 抗原陰性細胞群に単離しメイ・ギムザ染色によりその形態を検討したところ、CD16 抗原陽性細胞群は97%以上が好中球であり、一方 CD16 抗原陰性細胞群の95%以上は好酸球であることが確かめられた。したがって以下の検討ではすべて、顆粒球分画のうち CD16 抗原陰性細胞群を好酸球として区域設定し解析した。正常対照群の末梢血を用いた検討では、好酸球表面には CD11b 抗原の構成的発現を認め、これに対して CD69 抗原の発現は全く認められなかった(図2)。

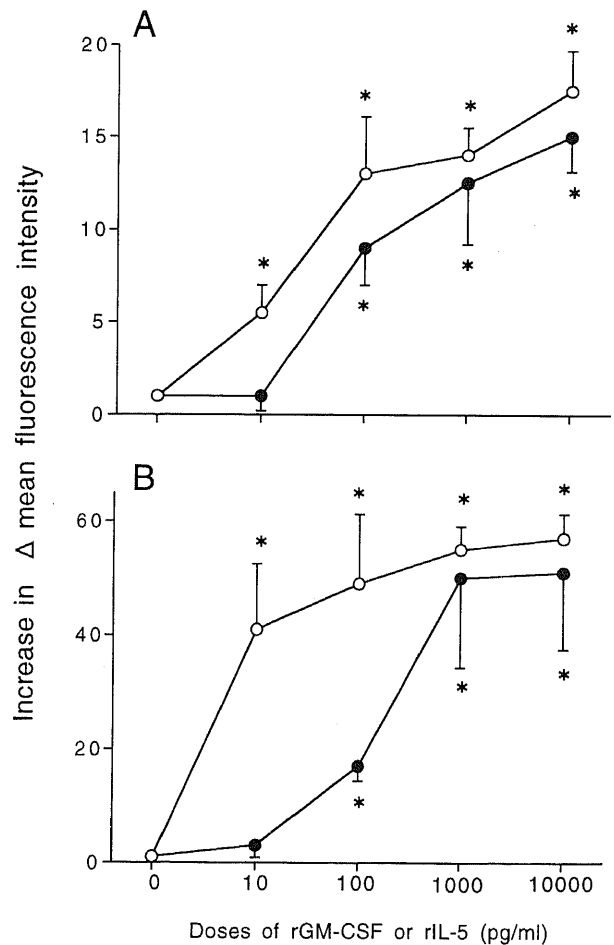


Fig. 3. Upregulation of CD11b and induction of CD69 on eosinophils upon stimulation with rGM-CSF and rIL-5. Whole blood samples were cultured for 4 hr at 37 °C with rGM-CSF (○) or with rIL-5 (●) at indicated doses. The cells were stained with anti-CD11b (A) or anti-CD69 (B) mAbs. The data indicate $\bar{x} \pm SD$ of three separate experiments. * $p < 0.001$, as compared with the values before stimulation.

Ⅲ. サイトカイン刺激による好酸球表面抗原の誘導および増強

1. サイトカイン濃度と好酸球表面抗原の発現

EDTA 加末梢全血に種々の濃度の rGM-CSF あるいは rIL-5 を添加し37℃で4時間培養し、CD11b 抗原と CD69 抗原の発現を検討した。CD11b 抗原の発現は rGM-CSF あるいは rIL-5 の添加により濃度依存的に増強した。両サイトカインとも約 100pg/ml の濃度で明らかな CD11b 抗原発現増強効果を示した (図 3-A)。

CD69 抗原も同様に、rGM-CSF あるいは rIL-5 の添加により濃度依存的にその発現が認められた。特に、rGM-CSF は 10pg/ml の低濃度で好酸球表面に CD69 抗原を強く誘導したのに対して、rIL-5 による CD69 抗原の誘導には約 1000pg/ml と、rGM-CSF の100倍の濃度を必要とした (図 3-B)。

2. 表面抗原発現増強の経時的变化

EDTA 加末梢全血に rIL-5 を 10000pg/ml の濃度で加え37℃で培養し、好酸球表面の CD11b 抗原および CD69 抗原発現の

変化を経時的に測定した。培養開始後30分以内の極めて早期に CD11b 抗原の発現増強が観察され、以後ほぼ一定の値を示した。これと対照的に培養開始後 CD69 抗原の発現誘導が最大となるのに2時間以上を要した (図 4)。

Ⅳ. アレルギー群と正常対照群における末梢血好酸球表面抗原発現の比較

末梢血好酸球表面の CD11b 抗原発現をアレルギー群と正常対照群で比較した。CD11b 抗原はいずれの群にも発現を認めたが、その Δ mean fluorescence intensity は正常対照群で 63.8 ± 8.1 、アレルギー群では 75.6 ± 8.0 とアレルギー群で有意に ($p < 0.001$) 増強していた (図 5-A)。

一方、CD69 抗原はアレルギー群、正常対照群のいずれにおいても末梢血好酸球表面には発現を認めなかった (図 5-B)。

Ⅴ. 末梢好酸球数と好酸球表面 CD11b 抗原発現

正常対照群においては、アレルギー群と比較して明らかに好酸球表面の CD11b 抗原発現は低く、末梢血好酸球数も少なかった。しかし一般的に CD11b 発現強度は末梢血好酸球数に

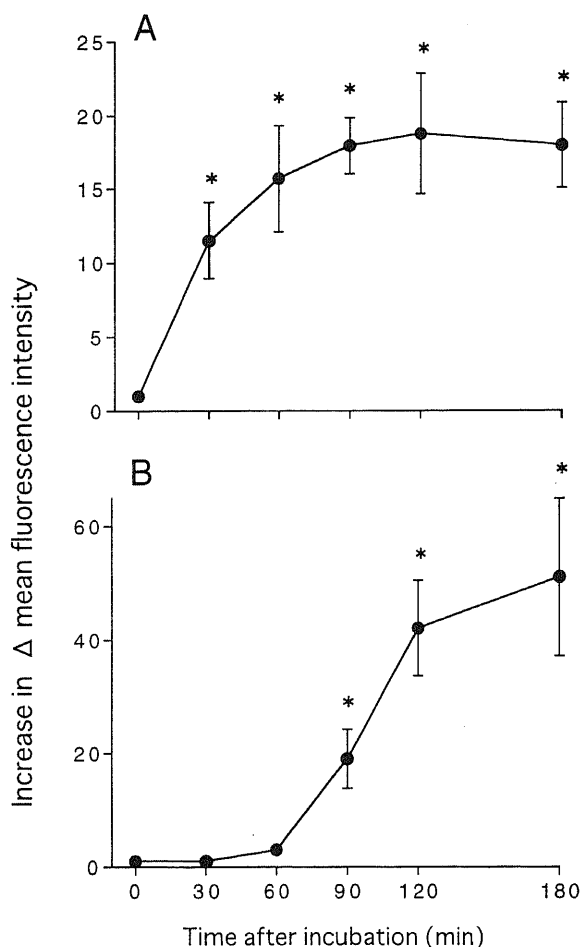


Fig. 4. Kinetics of cytokine effects on eosinophil surface antigens. Whole blood samples were cultured in the presence of 10,000 pg/ml of rIL-5 for varying times. Surface expressions of CD11b (A) and CD69 (B) were examined after the culture. The data indicate $\bar{x} \pm SD$ of three separate experiments. * $p < 0.001$, as compared with the values before stimulation.

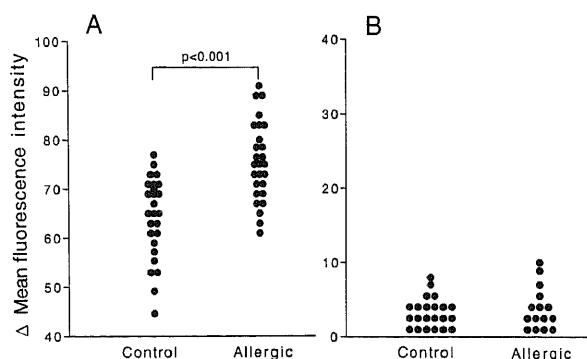


Fig. 5. Comparison of CD11b and CD69 expression on eosinophils between normal controls and allergics. The expression of CD11b (A) and CD69 (B) on eosinophil surface was compared between normal controls and allergics.

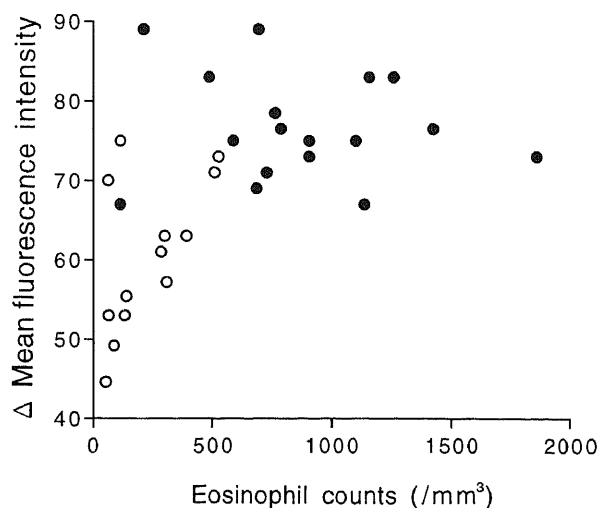


Fig. 6. Correlation between peripheral blood eosinophil counts and surface CD11b expression. Eosinophil counts in the peripheral blood and surface expression of CD11b were compared in normal controls (○) and allergics (●).

比例する傾向を示した ($r=0.559$). 一方, アレルギー群では末梢血好酸球数が増加している症例が多く, また CD11b 抗原発現も有意に増強していた ($p<0.001$). さらに注目すべきことに, 症例は少ないながら末梢血好酸球数が正常, あるいは低下している例においても, CD11b 抗原発現は正常対照群に比し高値を示した (図 6).

VI. 炎症局所に浸潤した好酸球における CD69 抗原発現の検討

1. 好酸球性心外膜炎の心外膜液中好酸球による検討

著明な心外膜液の貯留を伴った犬蛔虫症による心外膜炎の症例における末梢血ならびに心外膜液中の好酸球の CD69 抗原発現を検討した. 末梢血好酸球増多は百分比, 絶対数ともに軽度で, 表面 CD69 抗原発現は全く検出されなかった (図 7-A). 一方, 心外膜液中には多量の細胞浸潤が認められ, そのほとんどが好酸球と異型性の強い単核細胞で占められ, 好中球は数パーセントしか認められなかった. 末梢血好酸球と対照的に, 心外

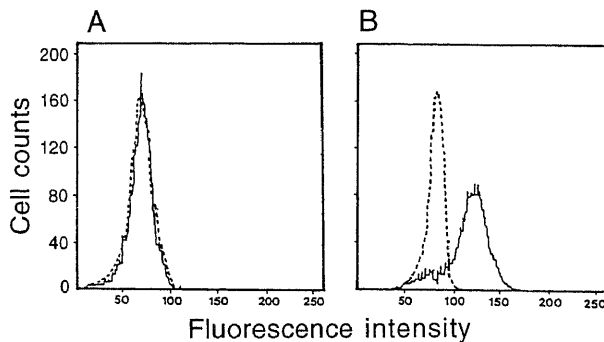


Fig. 7. CD69 expression on eosinophils within pericardial effusion. Peripheral blood and pericardial effusion were obtained from a patient with acute pericarditis due to *Toxocara canis* infection. CD69 expression on eosinophils from peripheral blood (A) and pericardial effusion (B) was examined by a flow cytometry. Dotted lines indicate the autofluorescence of eosinophils without added antibody. Solid lines indicate PE fluorescence after the staining with anti-CD69 mAb.

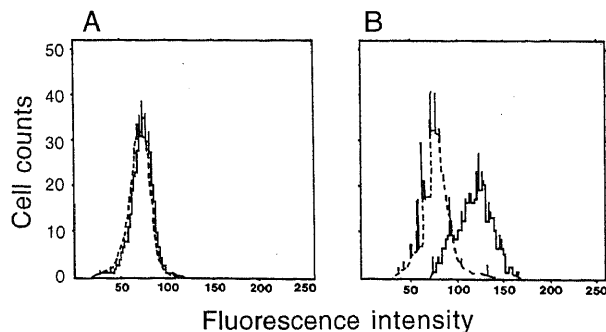


Fig. 8. CD69 expression on eosinophils within nasal secretion. Nasal secretion was obtained from patients with acute allergic rhinitis. CD69 expression on eosinophils from peripheral blood (A) and nasal secretion (B) was examined by a flow cytometry. Dotted lines indicate the autofluorescence of eosinophils without added antibody. Solid lines indicate PE fluorescence after the staining with anti-CD69 mAb. Figure shows the typical profiles from one of three separate patients.

膜液中の好酸球は, そのほとんどすべてに CD69 抗原が強く発現していた (図 7-B).

2. 鼻汁好酸球による検討

アレルギー性鼻炎の急性増悪例 3 例の鼻汁中好酸球の CD69 抗原発現を検討した. これらの患者の末梢血好酸球ならびに鼻汁中好酸球の, PE 自家蛍光強度 (control) および CD69 mAb にて染色後の PE 平均蛍光強度 (CD69) を表 1 に示した. また, 図 8 に典型的な症例の末梢血ならびに鼻汁中好酸球の CD69 抗原発現パターンを示した. 3 例とも末梢血好酸球表面には CD69 抗原発現は全く認められず, 対照的に鼻汁中好酸球のほとんどが CD69 抗原を強く発現していた.

Ⅶ. 好酸球増多症患者の末梢血における表面抗原発現の検討

通常, 末梢血好酸球表面には CD69 抗原の発現は認められないが, 好酸球増多症患者の末梢血好酸球の一部に CD69 抗原を強く発現している細胞群が認められた. そこで, CD69 抗原陽性細胞群と CD69 抗原陰性細胞群をセルソーターにより分離し, 両群の形態学的違いを電子顕微鏡ならびに光学顕微鏡で検討した. 両群とも胞体内顆粒はやや小さく低比重好酸球であると思われたが, CD69 抗原陽性好酸球は胞体内顆粒の減少や顆

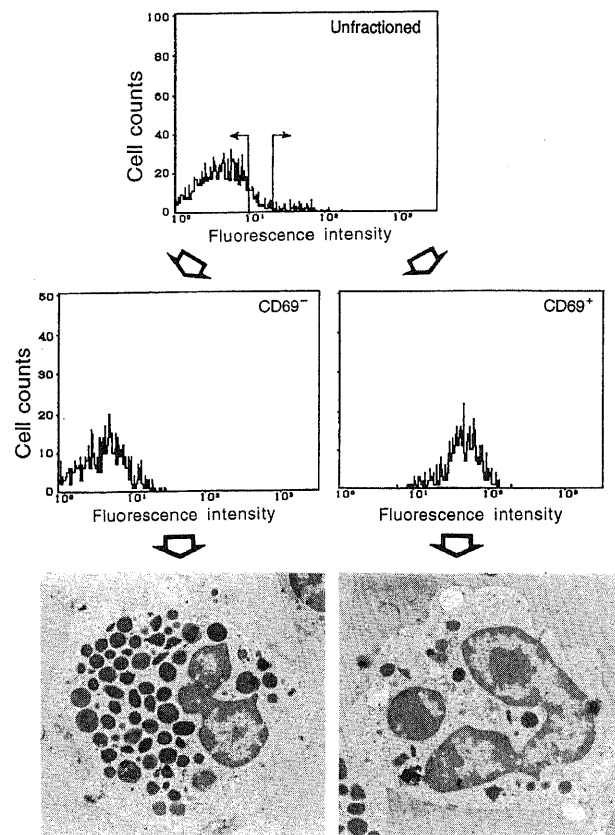


Fig. 9. Morphological characterization of CD69⁺ and CD69⁻ eosinophils by an electron microscope. Eosinophils from a patient with hypereosinophilic syndrome was separated into CD69⁺ and CD69⁻ cells by a cell sorter. The arrows indicate the gate settings for the cell sorting. The cells within the right and left gates were sorted as CD69⁺ and CD69⁻ cells, respectively. Fluorescence profiles show that the eosinophils are effectively separated into CD69⁻ and CD69⁺ populations.

Table 1. Expression of CD69 on eosinophils in nasal secretion

Case number	Mean fluorescence intensity			
	Peripheral blood		Nasal secretion	
	Control	CD69	Control	CD69
1	75.9	76.1	73.3	105.0
2	82.7	84.4	90.3	125.3
3	76.1	76.7	74.2	116.9

Nasal secretion and peripheral blood from three separate patients with allergic rhinitis were processed and stained with anti-CD69 mAb. Mean fluorescence intensity for autofluorescence of eosinophils without added antibody (control) and PE fluorescence after the staining with anti-CD69 mAb (CD69) are shown in the table.

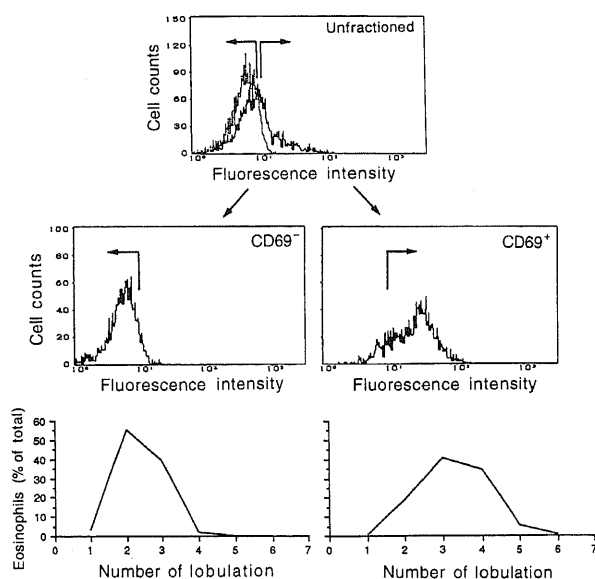


Fig. 10. Comparison of lobulation between CD69⁺ and CD69⁻ eosinophils. Eosinophils from the second patients with prominent hyperlobulation of eosinophils were separated into CD69⁺ and CD69⁻ cells by a cell sorter. The arrows indicate the gate settings for the cells sorting. The cells within the right and left gates were sorted as CD69⁺ and CD69⁻ cells, respectively. May-Giemsa staining of the cytospin preparations were examined under a light microscope. At least 500 eosinophils were examined for each fraction and the number of lobulations were counted morphologically.

粒サイズの縮小, 中心板構造の消失が著明であり, また, 脱顆粒に伴う空胞形成も認められた (図 9)。さらに別の症例における検討では, CD69 抗原陽性好酸球は, 活性化好酸球の特徴に加え核分葉の亢進が著明に認められた。すなわち, CD69 抗原陰性の好酸球が 2 核を中心に構成されているのに対し, CD69 抗原陽性好酸球は 3 ないし 4 核よりなる過分葉好酸球が多数を占めていた (図 10)。

考 察

種々のアレルギー疾患においては, 末梢血中の好酸球の増加

がしばしば認められるが, その絶対数は必ずしも病態を反映してはいない。今回の検討でもアレルギー群においては末梢血好酸球数の増加を認める例が多かったが, 正常対照群との重なりも大きく, 特に気管支喘息発作時においては炎症局所への好酸球浸潤を反映するためか, かえって末梢血好酸球数は減少する傾向がみられた。アレルギー炎症の場において, 好酸球はまず血管内皮細胞に接着し血管外へ遊出する。その後, 炎症組織に遊走浸潤し, さらに活性化をうけた好酸球は様々なメディエーターを遊離しエフェクター機能を発現している¹⁾。活性化された好酸球は, 正常者末梢血好酸球とは形態的, 機能的に異なる多くの特徴を持つことが明らかにされており, このような特徴に着目して好酸球の活性化を定量的に評価するために様々な試みがなされてきた¹²⁾。Fukuda らはパーコールを使って末梢血好酸球の比重分布を詳細に検討し, 好酸球増多症ではそのほとんどが比重 1.082g/ml 以下の低比重好酸球で占められること, 気管支喘息患者においても低比重好酸球の割合が増加することを報告した¹³⁾。しかしこのような方法は特定の好酸球増多症における好酸球の活性化を定量的に示すにはすぐれていると考えられるが, 大量の検体を要することや操作が煩雑なことから日常の臨床検体の解析には不相当であると考えられる。

近年, このような活性化好酸球が, 種々の特異顆粒蛋白を放出 (脱顆粒) したり, ロイコトリエン C₄ などの活性物質やサイトカインを産生することも明らかになってきた¹⁶⁻²⁰⁾。これにより, 炎症局所や血清中に遊離する好酸球顆粒蛋白を定量したり, IL-5 に代表される好酸球活性化因子そのものを定量しようとする試みもなされている¹⁴⁾¹⁵⁾²³⁾。しかし, 血清中の顆粒蛋白の定量は採血後の検体処理方法の影響を受けやすく, その濃度が末梢血好酸球数とそれほど解離しないことが明らかにされており, その測定の意義はあまり大きくないと考えられる。一方, IL-5 などの好酸球活性化因子は通常のアレルギー疾患の末梢血中に検出されることはなく, 気管支喘息やアトピー性皮膚炎の病態評価の指標としての意義は不明である。さらに, 気管支喘息の症例では気管支肺胞洗浄液中の細胞分布の解析やサイトカイン濃度の定量, 好酸球表面抗原の解析や顆粒蛋白の定量なども試みられている¹⁵⁾²⁴⁾。しかし, 気管支肺胞洗浄液中の好酸球の解析は, 少なくとも小児においては侵襲的であり, 経時的に繰り返し行える方法ではない。

フローサイトメトリー法は, 簡便で再現性に富み, かつ少量の検体で解析が可能であることより, 小児において経時的にデータを検討するには極めて有用な方法である。好酸球はその活性化により細胞表面抗原の発現が一部増強することが知られているが, 本研究では, 好酸球の表面抗原発現をフローサイトメトリー法で解析することにより, 末梢血好酸球の活性化を評価することができることを示した。末梢血中の顆粒球分画は CD16 抗原発現の有無により, CD16 抗原陽性の好中球と, CD16 抗原陰性の好酸球に区別することが可能である。したがって, 抗 CD16 mAb と他の抗体を組み合わせることにより, 選択的に好酸球表面の抗原発現を解析することが可能であると考えられた。

従来, CD11b 抗原は補体成分である C3bi の受容体として知られており, 種々の細胞表面に発現しているが²⁵⁾, 特に好酸球表面では IL-5 などの好酸球活性化サイトカインによりその発現が増強され, その結果好酸球の血管内皮への付着能が亢進することから, いわゆる接着分子としての機能が報告されてい

る^{18)~19)}。好酸球が炎症局所へ遊走、集積するためには血管内皮細胞に付着して内皮細胞を通過することが必要であり、この過程に好酸球表面および血管内皮細胞表面における接着分子の発現が深く関与していると考えられている^{25)~29)}。好酸球表面のCD11b発現に関しては、以前より試験管内の実験系でELISA法やフローサイトメトリーによる測定がなされているが¹⁷⁾¹⁸⁾、実際の臨床例での検討は少なく、その意義は不明である。

一方、CD69抗原は当初活性化T細胞や活性化ナチュラルキラー細胞などでの発現が報告され、リンパ球初期活性化抗原として知られているが、最近リンパ球に限らず広く細胞活性化の初期に重要な役割を果たしている可能性が考えられている^{22)~24)}。リンパ球の試験管内刺激実験において、刺激後早期にその発現が強く誘導されるが、生体内でCD69抗原が確認されるとの報告は極めて少ない。Nishikawaらは炎症局所に浸潤した好酸球にCD69抗原が強く発現することを報告しており、活性化好酸球の指標としてCD69抗原発現が有用であることを示した²³⁾。しかし、彼らの報告でも、CD69抗原は局所に浸潤した好酸球にのみ認められ、末梢血中の好酸球ではほとんど発現していなかった。したがって、好酸球表面抗原の測定は、生体内で好酸球が種々のサイトカインの刺激により活性化した状態を鋭敏に反映する可能性が示唆された。

今回我々は末梢血好酸球表面のCD11b抗原とCD69抗原をフローサイトメトリーを用いて同時に測定し、その臨床的意義を検討した。好酸球の活性化にともない、CD11b抗原は接着分子としてその発現が増強し、一方CD69抗原は活性化抗原として好酸球表面に新たに誘導されることが知られている。臨床例での検討を始める前に、まずEDTA加全血を用いて、種々の血清因子や他の細胞が混在した状態におけるサイトカイン刺激による好酸球表面の抗原発現を検討した。単離した好酸球の培養の報告と同様に、代表的好酸球活性化サイトカインであるGM-CSFやIL-5の添加により、好酸球表面にCD69抗原が誘導され、CD11b抗原の発現が増強した。この結果より、血清存在下でもこれらのサイトカインが好酸球を活性化することが示され、生体内においても十分なサイトカイン存在下では好酸球表面のCD11b抗原発現の増強や、CD69抗原発現の誘導が起こることが示唆された。しかし、サイトカインによる両抗原発現の経時的検討では、サイトカイン刺激後30分以内という極めて早期にCD11b抗原の発現増強がみられたのに対して、CD69抗原の発現誘導が最大になるまでには2時間以上を要した。このことは、それぞれの抗原が好酸球活性化の異なる過程に関連して発現し、異なる発現調節機構を有することを示唆していると考えられた。特に、CD69抗原の発現誘導には新たな蛋白合成が必要である可能性が示唆されるが、本研究では詳細な検討を行っていない。一方、CD11b抗原の発現増強が極めて短時間で観察されたことは、この表面抗原が好酸球活性化と血管内皮への付着、組織移行など、一連の好酸球浸潤過程に極めて重要な役割を果たすことを示唆していると考えられる。

臨床例の検討では、末梢血好酸球表面のCD11b抗原は、アレルギー群において明らかに発現の増強を認め、好酸球の一般的な活性化の指標となることが示唆された。しかも、末梢血好酸球数に関係なくアレルギー群においてはCD11b抗原の発現は増強しており、好酸球の減少している例におけるCD11b発現測定の意義が示された。しかし、アレルギー群のΔ平均蛍光強度は対照群との重なりが大きく、個々の症例において一回の

測定のみで好酸球の活性化状況を正確に評価するのは困難であると考えられた。したがって、特定の疾患群内において好酸球活性化を定量的に比較したり、個々の症例においてはその発現量を経時的に観察し、比較検討することにより臨床的に有用な情報が得られる場合が多いと考えられた。

一方、CD69抗原は、通常のアレルギー疾患においては末梢血好酸球にその発現は全く認められなかったが、好酸球性心外膜炎患者の心外膜液中好酸球やアレルギー性鼻炎患者の鼻汁好酸球においては強く発現しており、炎症局所におけるサイトカイン刺激によりCD69抗原発現が誘導されたと考えられた。また、我々は好酸球増多症の2例において、一部の末梢血好酸球表面に明らかなCD69抗原発現を確認した。さらに、セルソーターを用いてCD69抗原陽性細胞を単離し、形態的特徴を検討したところ、脱顆粒像や核の過分葉化などの活性化好酸球の特徴が認められた。本研究では、フローサイトメトリーを用いた検討により、末梢血好酸球をCD69抗原発現の有無により異なる形態的特徴を有する活性化好酸球亜群として分画、測定しうることを初めて示した。しかし、通常のアレルギー疾患では、末梢血好酸球表面にCD69抗原発現を認めることはなく、その臨床的意義は少ないと考えられる。一方、好酸球増多症のような極めて特異な症例においてはその病態評価の指標として有用であると考えられた。すなわち、これらの症例においては、生体内において著明な好酸球活性化サイトカイン(GM-CSF, IL-5など)の産生と、それによる好酸球の強い活性化が存在し、末梢血好酸球表面のCD69抗原発現に反映されていると考えられる。好酸球増多症は、末梢血好酸球の著明な増加を認めるのみの症例から、血管神経浮腫を伴う症例、さらに広範な臓器障害を伴い致死的な症例まで、その臨床像が多彩であることが知られている⁴⁾。末梢血好酸球におけるCD69抗原発現の検討は、生体内の好酸球活性化の程度を客観的に評価し、このような症例の病態を把握する指標として有用であると考えられる。

以上より、フローサイトメトリー法による好酸球表面抗原の測定は簡便で、かつ好酸球の活性化状況を鋭敏に反映することが示された。特に、CD11b抗原とCD69抗原発現を同時に検討することは、種々のアレルギー疾患や好酸球増多症における好酸球の活性化の程度を推定するのに、また個々の症例においては経時的にその病態を評価する指標として有用であると考えられた。

結 論

小児のアレルギー疾患や好酸球増多症において、好酸球の活性化の程度や病態を評価する目的で、好酸球表面のCD11b抗原とCD69抗原発現をフローサイトメトリー法を用いて測定し以下の結論を得た。

1. フローサイトメトリーにより、好酸球は末梢血中の顆粒球分画におけるCD16抗原陰性細胞群として得られ、抗CD16mAbと他の抗体との二重免疫蛍光染色により、選択的に好酸球表面の抗原発現を解析することが可能であった。

2. IL-5やGM-CSFなどの好酸球活性化サイトカインによる全血培養では、末梢血好酸球表面のCD11b抗原発現が極めて早期に増強し、CD69抗原発現が経時的に誘導された。

3. 末梢血好酸球表面のCD11b抗原の発現は、アレルギー群において有意に増強しており、末梢血好酸球総数よりも鋭敏

な病態評価の指標となると考えられた。

4. CD69 抗原は通常のアレルギー疾患では末梢血好酸球表面には発現せず、炎症局所に浸潤した好酸球表面に強い誘導が認められた。好酸球増多症の2例においては、一部の末梢血好酸球表面にも CD69 抗原が強く発現しており、これらの好酸球は形態的に脱顆粒や核の過分葉などを示し、生体内で強い活性化をうけた状態にあることが示唆された。

5. フローサイトメトリーを用いた末梢血好酸球の表面抗原発現の測定は、少量の検体で繰り返し検討が可能であることから、生体内における好酸球活性化を評価する指標として、特に小児において極めて有用であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師谷口 昂教授に深く感謝の意を表します。また、終始直接の御指導と御助言を頂きました谷内江昭宏講師をはじめ、研究に御協力頂きました小児科学教室の諸先生方に心より感謝致します。

なお、本論文の要旨は、第41回日本アレルギー学会総会(1991年、京都)、14th International Congress of Allergy and Clinical Immunology(1991年、Kyoto)、第4回日本アレルギー学会春季臨床集会(1992年、横浜)において発表した。

文 献

- 1) Weller, P. F.: The immunobiology of eosinophils. *N. Engl. J. Med.*, 324, 1110-1118 (1991).
- 2) Moser, R., Fehr, J., Olgiati, L. & Bruijnzeel, P. L.: Migration of primed human eosinophils across cytokine-activated endothelial cell monolayers. *Blood*, 79, 2937-2945 (1992).
- 3) Ebisawa, M., Liu, M. C., Yamada, T., Kato, M., Lichtenstein, L. M., Bochner, B. S. & Schleimer, R. P.: Eosinophil transendothelial migration induced by cytokines. II. Potentiation of eosinophil transendothelial migration by eosinophil-active cytokines. *J. Immunol.*, 152, 4590-4596 (1994).
- 4) Olsson, I. & Venge, P.: Cationic proteins of human granulocytes. II. Separations of the cationic proteins of the granules of leukemic myeloid cells. *Blood*, 44, 235-246 (1974).
- 5) Gleich, G. J., Loegering, D. A., Mann, K. G. & Maldonado, J. E.: Comparative properties of the Charcot-Leyden crystal protein and the major basic protein from human eosinophils. *J. Clin. Invest.*, 57, 633-640 (1976).
- 6) Peterson, C. G. & Venge, P.: Purification and characterization of a new cationic protein-eosinophil protein X (EPX) from granules of human eosinophils. *Immunology*, 50, 19-26 (1983).
- 7) Carlson, M. G., Peterson, C. G. & Venge, P.: Human eosinophil peroxidase: purification and characterization. *J. Immunol.*, 134, 1875-1879 (1985).
- 8) Flavahan, N. A., Slifman, N. R., Gleich, G. J. & Vanhoutte, P. M.: Human eosinophil major basic protein causes hyperreactivity of respiratory smooth muscle. Role of the epithelium. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 138, 685-688 (1988).
- 9) Hisamatsu, K., Ganbo, T., Nakazawa, T., Murakami, Y., Gleich, G. J., Makiyama, K. & Koyama, H.: Cytotoxicity of human eosinophil granule major basic protein to human nasal sinus mucosa in vitro. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 86, 52-63 (1990).
- 10) Rothenberg, M. E., Owen, W. J., Silberstein, D. S., Woods, J., Soberman, R. J., Austen, K. F. & Stevens, R. L.: Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3. *J. Clin. Invest.*, 81, 1986-1992 (1988).
- 11) Fabian, I., Kletter, Y., Mor, S., Geller, B. C., Ben, Y. M., Volovitz, B. & Golde, D. W.: Activation of human eosinophil and neutrophil functions by haematopoietic growth factors: comparisons of IL-1, IL-3, IL-5 and GM-CSF. *Br. J. Haematol.*, 80, 137-143 (1992).
- 12) Winqvist, I., Olofsson, T., Olsson, I., Persson, A. M. & Hallberg, T.: Altered density, metabolism and surface receptors of eosinophils in eosinophilia. *Immunology*, 47, 531-539 (1982).
- 13) Fukuda, T., Dunnette, S. L., Reed, C. E., Ackerman, S. J., Peters, M. S. & Gleich, G. J.: Increased numbers of hypodense eosinophils in the blood of patients with bronchial asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 132, 981-985 (1985).
- 14) Kay, A. B., Ying, S., Varney, V., Gaga, M., Durham, S. R., Moqbel, R., Wardlaw, A. J. & Hamid, Q.: Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin 3 (IL-3), IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J. Exp. Med.*, 173, 775-778 (1991).
- 15) Motojima, S., Akutsu, I., Fukuda, T., Makino, S. & Takatsu, K.: Clinical significance of measuring levels of sputum and serum ECP and serum IL-5 in bronchial asthma. *Allergy*, 48, 98-106 (1993).
- 16) Spry, C. J. F.: Eosinophils, 1st ed., p74-88, Oxford University Press, New York, 1988.
- 17) Thorne, K. J., Richardson, B. A., Mazza, G. & Butterworth, A. E.: A new method for measuring eosinophil activating factors, based on the increased expression of CR3 alpha chain (CD11b) on the surface of activated eosinophils. *J. Immunol. Methods.*, 133, 47-54 (1990).
- 18) Capron, M., Kazatchkine, M. D., Fischer, E., Joseph, M., Butterworth, A. E., Kusnierz, J. P., Prin, L., Papin, J. P. & Capron, A.: Functional role of the alpha-chain of complement receptor type 3 in human eosinophil-dependent antibody-mediated cytotoxicity against schistosomes. *J. Immunol.*, 139, 2059-2065 (1987).
- 19) Walsh, G. M., Hartnell, A., Wardlaw, A. J., Kurihara, K., Sanderson, C. J. & Kay, A. B.: IL-5 enhances the in vitro adhesion of human eosinophils, but not neutrophils, in a leucocyte integrin (CD11/18) dependent manner. *Immunology*, 71, 258-265 (1990).
- 20) Testi, R., Phillips, J. H. & Lanier, L. L.: Constitutive expression of a phosphorylated activation antigen (Leu

- 23) by CD3^{bright} human thymocytes. *J. Immunol.*, 141, 2557-2563 (1988).
- 21) **Testi, R., Phillips, J. H. & Lanier, L. L.**: Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular [Ca²⁺] and stimulation of protein kinase C. *J. Immunol.*, 142, 1854-1860 (1989).
- 22) **Moretta, A., Poggi, A., Pende, D., Tripodi, G., Orengo, A. M., Pella, N., Augugliaro, R., Bottino, C., Ciccone, E. & Moretta, L.**: CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta. *J. Exp. Med.*, 174, 1393-1398 (1991).
- 23) **Nishikawa, K., Morii, T., Ako, H., Hamada, K., Saito, S. & Narita, N.**: In vivo expression of CD69 on lung eosinophils in eosinophilic pneumonia: CD69 as a possible activation marker for eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 90, 169-174 (1992).
- 24) **Hartnell, A., Robinson, D. S., Kay, A. B. & Wardlaw, A. J.**: CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology*, 80, 281-286 (1993).
- 25) **Hansel, T. T., De Vrise, J. M., Iff, T., Rihs, S., Wandzeiak, M., Betz, S., Blaser, K. & Walker, C.**: An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. *J. Immunol. Method*, 149, 105-110 (1991).
- 26) **Thorne, K. J., Richardson, B. A., Veith, M. C., Tai, P. C., Spry, C. J. & Butterworth, A. E.**: Partial purification and biological properties of an eosinophil-activating factor. *Eur. J. Immunol.*, 15, 1083-1091 (1985).
- 27) **Wong, D. T. W., Elovic, A., Matossian, K., Nagura, N., McBride, J., Chou, M. Y., Gordon, J. R., Rand, T. H., Galli, S. J. & Weller, P. F.**: Human eosinophils express transforming growth factor alpha. *J. Exp. Med.*, 172, 673-681 (1990).
- 28) **Takafuji, S., Bischoff, S. C., De, W. A. & Dahinden, C. A.**: IL-3 and IL-5 prime normal human eosinophils to produce leukotriene C4 in response to soluble agonists. *J. Immunol.*, 147, 3855-3861 (1991).
- 29) **Kita, H., Ohnishi, T., Okubo, Y., Welier, D., Abrams, J. S. & Gleich, G. J.**: Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *J. Exp. Med.*, 174, 745-748 (1991).
- 30) **Moqbel, R., Hamid, Q., Ying, S., Barkans, J., Hartnell, A. & Kay, A. B.**: Expression of mRNA and immunoreactivity for the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in activated human eosinophils. *J. Exp. Med.*, 174, 749-752 (1991).
- 31) **Hamid, Q., Barkans, J., Meng, Q., Kay, A. B. & Moqbel, R.**: Human eosinophils synthesize and secrete interleukin-6, in vitro. *Blood*, 80, 1496-1501 (1992).
- 32) **Braun, R. K., Franchini, M., Erard, F., Rihs, S., De, V. I., Blaser, K., Hansel, T. T. & Walker, C.**: Human peripheral blood eosinophils produce and release interleukin-8 on stimulation with calcium ionophore. *Eur. J. Immunol.*, 23, 956-960 (1993).
- 33) **Virchow, J. J., Kroegel, C., Hage, U., Kortsik, C., Matthys, H. & Werner, P.**: Comparison of sputum-ECP levels in bronchial asthma and chronic bronchitis. *Allergy*, 48, 112-118 (1993).
- 34) **Bousquet, J., Van, V. T., Chanez, P., Enander, I., Michel, F. B. & Godard, P.**: Cells and mediators in bronchoalveolar lavage of asthmatic patients: the example of eosinophilic inflammation. *Allergy*, 48, 70-76 (1993).
- 35) **Luk, J. & Springer, T. A.**: CD11b cluster report. *In* S. F. Schlossman, L. Bousmell, W. Gilks, J. Harlan, T. Kishimoto, C. Morimoto, J. Ritz, S. Shaw, R. Silverstein, T. Springer, T. F. Tedder & R. F. Todd (eds.), *Leukocyte Typing V. White Cell Differentiation Antigens*, 5th ed., p1588-1589, Oxford University Press, New York, 1995.
- 36) **Lamas, A. M., Mulroney, C. M. & Schleimer, R. P.**: Studies on the adhesive interaction between purified human eosinophils and cultured vascular endothelial cells. *J. Immunol.*, 140, 1500-1505 (1988).
- 37) **Wegner, C. D., Gundel, R. H., Reilly, P., Haynes, N., Letts, L. G. & Rothlein, R.**: Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science*, 247, 456-459 (1990).
- 38) **Diamond, M. S., Stunton, D. E., Fougerolles, A. R., Stacker, S. A., Aguilar, J. G., Hibbs, M. L. & Springer, T. A.**: ICAM-1 (CD54): A counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Cell Biol.*, 111, 3129-3139 (1990).
- 39) **Walsh, G. M., Mermod, J. J., Hartnell, A., Kay, A. B. & Wardlaw, A. J.**: Human eosinophil, but not neutrophil, adherence to IL-1-stimulated human umbilical vascular endothelial cells is alpha 4 beta 1 (very late antigen-4) dependent. *J. Immunol.*, 146, 3419-3423 (1991).
- 40) **Walker, C. & Virchow, J. J.**: T-cells and endothelial cells in asthma. *Allergy*, 48, 24-31 (1993).
- 41) **Spry, C. J. F.**: *Eosinophils*, 1st ed., p263-277, Oxford University Press, New York, 1988.

Clinical Assessment by Flowcytometric Method of *in vivo* Activation of Eosinophils and IgE-Binding State on Basophils in Various Allergic Disorders I. Expressibility of CD11b and CD69 Antigens on Eosinophils in Allergic Disorders as Signs of *in vivo* Tomoko Toma, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **104**, 758—767 (1995)

Key words allergy, eosinophil, activation, CD11b, CD69

Abstract

Eosinophils increase in number in the peripheral circulation and accumulate in the target tissue in various allergic disorders. It has been disclosed recently that eosinophils play significant roles as important inflammatory effector cells in allergic reactions. The eosinophils migrating into inflammatory tissue are activated by various cytokines and chemokines and they usually exhibit distinct functional and morphological characteristics. Based on these findings, numerous studies have been performed to quantify the degree of the eosinophil activation *in vivo*. In the present study, the surface expression of an eosinophil adhesion molecule, CD11b, and an activation antigen, CD69 were measured simultaneously using two-color flowcytometry. Peripheral whole blood samples were stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated CD16 monoclonal antibody (mAb), and phycoerythrin (PE)-conjugated CD11b mAb or PE-conjugated CD69. CD16-negative fraction within the granulocyte region of leukocytes were gated as eosinophils, and the intensity of the phycoerythrin fluorescence was measured. When peripheral blood samples from normal controls were cultured in the presence of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rGM-CSF), or recombinant human interleukin-5 (rIL-5), CD69 expression was rapidly induced *de novo*, and CD11b expression was increased promptly on the eosinophil surface. The surface expressions of these antigens on peripheral blood eosinophils were compared between allergics (n=27) and normal controls (n=26) to see the clinical relevance of these surface antigens. CD11b expression was significantly higher among allergics than normal controls ($p<0.001$). CD69 was not expressed on peripheral blood eosinophils from either normal controls or allergics. However, it was expressed at a significant level on tissue infiltrating eosinophils in such conditions as allergic rhinitis and eosinophilic pericarditis. Furthermore, it was intriguing that fractions of peripheral blood eosinophils in hypereosinophilic patients expressed significant levels of CD69 on the cell surface. The morphological studies suggested that the CD69⁺ eosinophils are potently activated *in vivo*. In conclusion, it is clearly shown that the flowcytometric analysis of eosinophil surface antigens is a sensitive and clinically useful indicator of eosinophil activation and allergic inflammation *in vivo*.