鼻の生体防御機能について

—— 第3報 鼻からの抗原吸収 ——

秋田大学大学院医学研究科第三系専攻耳鼻咽喉科学（主任：戸川 清教授）

岡 本 美 孝

THE STUDY OF HOST DEFENSE MECHANISMS OF THE NOSE
THIRD REPORT: ABSORPTION OF ANTIGEN FROM NASAL MUCOSA

YOSHITAKA OKAMOTO, M. D.

Department of Otorhinolaryngology, Akita University School of Medicine, Akita

Nasal provocation test, by placing the allergen disc on the nasal mucosa of the patient with pollinosis consecutively, brought easily the systemic symptoms such as cough, periorbital edema, and urticaria.

Similarly, the sensitized guinea pigs showed a change upon respiratory examination after the nasal administration of a large doses of the allergen.

On the other hand, an extract of *Bordetella bronchiseptica* induced an anaphylactic reaction in guinea pigs and γ 1 antibody participated in this reaction.

After the nasal administration of radioisotope labeled extract of the bacteria, radioactivity in the blood of guinea pigs sensitized with the extract, was lower than that of non-sensitized guinea pigs.

These facts suggest that the nasal mucosa could absorb a high molecular substance such as an antigen, and that the existence of the antibody in nasal mucosa has a great influence on absorption of the antigen from nasal mucosa.

Key words: 鼻腔, 抗原, 吸収, 抗体

A88—0633—30860

はじめに

鼻は外界と最も接している器官であり、常時各種の抗原にさらされている。当然、それらの抗原の一部は鼻粘膜から吸収されると考えるべきである。

一般に低分子化合物である薬物の易吸収性については種々の報告を見るが¹⁾、高分子である抗原物質のそれについての報告は見ない。故に、抗原物質の鼻からの吸収を解明するため、鼻アレルギー患者、および感作モルモットを用いて以下の実験を行った。

秋田大学医学部耳鼻咽喉科学教室開講10周年記念論文

さらに、鼻粘膜よりの抗原吸収に際して、それに対する特異抗体がどのような影響を与えるかについて、*B. bronchiseptica* の菌抽出液で免疫したモルモットに、アイソトープでラベルした分子量5～7万の菌体画分を用いて検討した。

方 法

1) カモガヤ花粉症患者 10名に市販のカモガヤ抗原ディスク（鳥居薬品、抗原量 250 μ g）を左下鼻甲粘膜上に置いて、鼻粘膜誘発検査を30分間隔にて3～6回連

血清を採取し、同種モルモットを用いて PCA (passive cutaneous anaphylaxis) 反応を実施した。すなわち、剃毛した背部に、希釈した血清の 0.1ml を皮内注射後、 γ_1 抗体を見るためには 6 時間後、IgE 抗体を見るためには 11 日後に 1% evans blue 0.5ml を菌抽出液 0.1mg protein に混入して頸静脈より投与し、30 分後に屠殺して皮を剥ぎ、内面より青色斑の長径を測定し、5mm 以上呈するものを陽性とした¹²⁾。

つぎに、この菌抽出液を DEAE-sepharose に充てんした 1.5×30cm のカラムに 0.3ml (10mg protein) 加え、0.02M および 0.5M phosphate buffer にて linear gradient を作り溶出させた。各 peak を作った Fraction を集め約 0.7mg protein/ml に濃縮後 Diphenylamine 反応、Orcin 反応、 α -Naphтол 反応を行った。また、感作モルモット血清との間で Ouchterlony 反応を行った。さらに Fraction 1 を Sephadex G-100 にて充てんした 1.5×60cm のカラムに加え Gel chromatography を行った。

また、¹⁴C を用いたトレーサー実験を行うため、図 9 に示すような Tryptophan が欠落した半合成培地に ¹⁴C-Tryptophan を添加して *B. bronchiseptica* を培養し、集菌後超音波粉碎して抽出した。この粗抽出を Sephadex G-100 を用いて、Gel chromatography を行い、分子量約 5～7 万の分画を集めて凍結乾燥した。この 0.1 μ Ci を、上記の菌抽出液の再吸入にて喘息様症状を呈したモルモット、および対照モルモットにそれぞれ気管切開後、仰臥位に固定し、ワセリンを含んだ綿球にて口内より上咽頭をタンポン後、鼻内に投与し、頸静脈より経時的に採血し、血中 ¹⁴C の値を Mahin ら¹³⁾ の方法に従い液体シンチレーションで測定した。

また、モルモット鼻腔洗浄液中の *B. bronchiseptica* に対する抗体価を受身赤血球凝集反応 (PH test) にて測定した。なお、鼻腔洗浄液の採集方法、PH test の方法は、第 1 報で述べた通りである。

結 果

カモガヤ花粉症患者に、カモガヤ抗原ディスクを用いて鼻内誘発検査を実施すると、1 回目の検査にて全例に、くしゃみ、多量の水様性鼻汁、鼻粘膜腫脹が出現した。この抗原投与を繰り返し、連続して行った結果は次のようであった。

症例 1 M. A. ♀ 5 回誘発後左眼瞼腫脹、ついで両眼瞼腫脹出現。同時に咳が出現し増強した。

症例 2 N. S. ♂ 5 回誘発にて左眼の痒痒感が出現した。

症例 3 S. S. ♀ 2 回誘発にて両眼の痒痒感、ついで眼瞼腫脹が出現。3 回誘発にて咳著明となり胸部苦悶を訴えた。

症例 4 H. K. ♂ 2 回誘発にて眼瞼腫脹出現。4 回誘発にて左奥歯、および後頸部の痒痒感が出現した。

症例 5 I. K. ♀ 4 回誘発にて鼻症状以外なし。

症例 6 A. K. ♀ 2 回誘発にて眼痒痒感が出現。4 回誘発にて咽喉頭の痒痒感が出現した。5 回誘発にて頭全体の痒痒感と全身発疹が出現した。

症例 7 O. I. ♂ 3 回誘発にて左眼瞼腫脹と痒痒感が出現した。

症例 8 Y. O. ♀ 5 回誘発にて鼻症状以外なし。

症例 9 O. S. ♂ 2 回誘発にて眼瞼腫脹が出現。3 回誘発にて左眼瞼腫脹が出現した。

症例 10 O. K. ♂ 2 回誘発にて両眼痒痒感、咽喉頭の痒痒感が出現した。

以上の結果を要約して表 1 に示す。また、症例 3 の眼瞼腫脹および誘発前後の FV 曲線を図 2、3 に示す。

表 1 症状のまとめ

症 例	眼痒 痒感	眼瞼 腫脹	顔面 紅潮	咳 発作	発 疹	咽喉頭 痒感
1 M. A. 女	+	+	+	+		
2 N. S. 女	+					
3 S. S. 女	+	+	+	+		
4 H. K. 男	+	+				+
5 I. K. 女						
6 A. K. 男	+		+		+	+
7 O. I. 男	+	+				
8 Y. O. 女						
9 O. S. 男	+	+				+
10 O. K. 男	+					+

感作モルモットへの鼻粘膜抗原投与実験で、肺気流抵抗の増大を認めたものは TDI 誘発の 4 匹中 0 匹、 α -amylase 誘発の 6 匹中 1 匹であった (図 4)。FV 曲線では $\dot{V}$ peak, $\dot{V}$ 50, $\dot{V}$ 25 を指標として 10% 以上の減少を陽性とする、TDI 誘発の 8 匹中 3 匹、 α -amylase 誘発の 10 匹中 6 匹が陽性であり、再誘発陽性を加えると、それぞれ 5 匹、7 匹となった (表 2)。FV 曲線の変化は 5 分以内に生じ、多くは 30～60 分にて回復した (図 5)。

つぎに *B. bronchiseptica* 抽出液噴霧曝露後、再曝露を実施したモルモットは、チアノーゼ、呼吸困難、なかには失禁等全身ショック症状を呈するものを認めた。八倉らのモルモット喘息重症度分類¹⁴⁾に従って分類すると 10匹中 $\leq 1^\circ$: 2匹, 2° : 3匹, 3° : 2匹, 4° : 3匹

図 2 症例 3 の誘発後の眼瞼腫脹

となり、このうち 2 匹は強い呼吸困難により死亡した。

この菌抽出液を用いた、同種 PCA 反応では、 γ_1 抗体は 10 例中全例に陽性で平均 titer は 128 倍、IgE 抗体は 10 例全例が陰性であった。

この菌抽出液を、DEAE-Sephrose を用いたカラムにかけると 5 つの peak を持つ Fraction を作った (図 6)。各 Fraction を集めてその性状を検討してみると、Fraction 1 および 2 には多糖体が、Fraction 4 には

図 3 症例 3 の FV 曲線の変動

Sample of respiratory tracing

図 4 呼吸曲線変動の 1 例

誘発前

鼻内誘発後

Spontaneous respiration

No. of animals	10
Body wt., gm	280~380
Tidal vol., ml	2.9±1.9
Respirations/min.	80±25
Resistance, CnH_2O	0.17±0.07
	/ml/sec

1例のみ変化

Artificial ventilation

No. of animals	18
Body wt., gm	280~380
$\dot{V}_{\text{max}}$ ml/s	70±15
$\dot{V}_{50}$ ml/s	43±6
$\dot{V}_{25}$ ml/s	28±5

12例に変化

Maximum rate of change
 $\dot{V}_{\text{max}}$ — 25%
 $\dot{V}_{50}$ — 50%
 $\dot{V}_{25}$ — 30%

Minute vol., 150ml
 Respirations 80/min.

表 2 モルモット呼吸曲線のまとめ

RNA, Fraction 5 には DNA が検出された (表 3). これら Fraction と感作モルモット血清との間で Ouchterlony 法を行うと, Fraction 1 および 2 が沈降線を作り, かつ共通抗原の存在を示した (図 7). Fraction 1 および 2 を用いて同種 PCA 反応を行うと, Fraction 1 および 2 ともに抗原性を示した. Fraction 1 を, ゲルカラムクロマトグラフィにかけると, 分子量 7 万弱のところに peak を作った (図 8).

血中 ^{14}C 値は図 10 に示すごとく, 無処置対照モルモットでは投与後の時間と共に上昇傾向を認めたが, 感作モルモットでは上昇を認めなかった. この ^{14}C でラベルした分子量 5~7 万の菌体画分は, 家兎抗 B. bronchiseptica 血清を用いた Ouchterlony 法により明確な沈降線を示し, 抗原性を有することは確認されたものである.

感作モルモット鼻腔洗浄液中の B. bronchiseptica に対する特異抗体は, PH test にて 16~128 倍を呈した.

考 察

近年, 鼻粘膜における薬物の易吸収性について注目されるようになり, 種々の報告が相次いでなされている.

Keenan¹⁵⁾ は, ヒトへの α^{1-18} ACTH を投与後の血中 corticosteroid の増加は, 点鼻投与と筋注投与との間で差がなかったと報告し, Hussain¹⁶⁾ は 10mg の propranolol の点鼻投与後の血中濃度は, 静脈投与に匹敵すると報告している. 今野¹⁷⁾ は, Dibekasin を鼻ネブライザーによりヒトへ投与して, その血中濃度は, 同量を筋注した場合のその 1/5 であることを報告している.

動物を用いた実験としては, Hirai¹⁸⁾ は, salicylic acid や aminopyrine のような脂溶性の弱電解質の吸収

図 5 FV 曲線変動の 1 例

は投与時間と共に増加し, 特に salicylic acid や bucolome のような口腔粘膜からもよく吸収される薬剤は, 筋注と同程度に鼻粘膜からも吸収されること, 更に, 水溶性の phenol red, subbenicillin, cefazolin, polypeptide である insulin などのように口腔粘膜からほとんど吸収されない薬剤でも, 鼻粘膜からはよく吸収されることを報告している.

このように, 鼻粘膜における薬物易吸収性から, 鼻腔は臨床的薬物投与の第 3 のルートとして注目されるようになり, すでに insulin 点鼻投与法が具体化している他, 鎮痛消炎剤の鼻腔内投与も実験段階に入りつつある.

他方, 外界微生物, 各種の抗原, 有害化合物等が生体に侵入する門戸は主に気道および消化管であるが, その

図 6 DEAE-Sepharose による菌抽出液の分離精製

表 3 各 Fraction の性状

	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5
Diphenyl amine Reaction	—	—	—	—	+
Orcine Reaction	—	—	—	+	—
α -Naphthol Reaction	+	+	—	—	—

S: sera of the sensitized guinea pig

E: crude extract of *B. bronchiseptica*

1, 2, 3, 4, 5, : Fraction number

図 7 Ouchterlony 法による沈降線

中でも鼻腔は直接外界に接した器管であり、常時、これら抗原等にさらされていることになる。

一般に抗原を考える場合、多糖体、蛋白等からなる高

図 8 ゲル・クロマトグラフィーの結果

分子 (M. W. 1 ~ 2 万以上) 物質であることが多いが、そのような高分子物質の鼻粘膜からの吸収についての報告は、まだほとんどない。

鼻の持つ機能については、従来から嗅覚機能の他に、air conditioner 作用、呼吸生理学的面から見た気道防御反射、気量調整器としての作用等が指摘されているが、最も素朴で、かつ、重要な鼻のもつ生体防御機能についての研究、特に高分子物質の吸収についての検討

図 9 ラベル菌抽出画分作製法

図 10 血中 ^{14}C 値

は、はなはだ不十分であったと言うべきである。そこでこの問題の一端を明らかにするために、花粉症患者、および感作モルモットを用いて、種々の検討を行った。

カモガヤ花粉症患者の鼻粘膜に抗原投与を繰り返すと極めて容易に、かつ高率に全身症状を呈した。

感作モルモットへの鼻粘膜抗原投与実験で、肺気流抵抗に変化の認められたものは、 α -amylase 感作モルモットの1匹(1/10)のみであったが、FV曲線では約67%

(12/18)のモルモットが変化を示した。

この成績の差は、検査の鋭敏度の差によるものと考えられ、モルモットでのFV曲線測定法が人間の場合と同じ意味をもつかどうかは別にしても、多量の抗原の鼻粘膜投与により末梢気道に変化が生じることは確かである。気管チューブは気管上部に縫合固定してあり、点鼻投与した抗原の下気道への流入は生じないこと、モルモットの鼻内電気刺激ではFV曲線に変化が生じないことから、この変化は鼻肺反射の関与によるものではなく、鼻粘膜からの抗原吸収によるものと考えられる。ヒト花粉症患者の呈した全身症状についても、全例第1回の抗原投与によって鼻アレルギー症状が出現し、著明な鼻粘膜腫脹を呈するため、第2回目以降に投与したディスク上の抗原が下気道へ吸入されることはまず考えられず、抗原が鼻粘膜より吸収されたために出現したものと思われる。また、鼻アレルギー患者で副交感神経遠心路であるVidian神経切断術を実施し、くしゃみ、鼻汁を消失させた患者にヒスタミンの鼻内投与を行うと、5mgまでは眼瞼腫脹等の全身症状が出現しないこと、鼻汁、鼻粘膜組織でのヒスタミン含有量は $10\mu\text{g/g}$ 湿重量以下であることを考え合わせると¹⁾、多量の抗原の鼻粘膜投与によって生じる全身症状は、抗原侵入局所から遊離したchemical mediatorのみでなく、血中へ吸収された抗原と抗体の反応が関与しているものと考えられる。このように、抗原は分子量の大小にかかわらず、多量の投与によっては比較的容易に鼻粘膜から吸収されるものと考えられる。

一方 *B. bronchiseptica* 菌抽出液曝露後、4週目の再曝露により80%のモルモットは明らかな喘息発作を認めた。アナフィラキシ型反応に關与するhomocytotropic antibodyをモルモットに対するhomologous PCA titerとして測定すると、 γ_1 抗体が著明な増加を示したが、IgE抗体は確認出来なかった。すなわち、菌抽出液を抗原として、モルモットに実験喘息を作ることが出来ることが判明し、この反応には γ_1 抗体が関与している可能性が強い。従来より、細菌感染が喘息症状を悪化させることは周知の事実であり、また、近年、特定の細菌が β -receptorのblocking作用を有するとの報告が相次いでいるが²⁰⁾、ここで得られた成績は、細菌自体が即時型アレルギーとなり得ることを示すものである。かつてHampton²¹⁾は、*Neisseria Catartalis*を使用して喘息患者に吸入試験を実施して、菌が即時型アレルギーとなりうる可能性を示唆したが、著者の実験では、*B.*

図 11 菌抽出液点鼻による呼吸曲線の変動

bronchiseptica がアレルゲンとなり得ることを示し、これには、菌体膜成分の糖蛋白が関与しているものと思われる。しかもこの菌は通常のモルモット気道よりしばしば検出される菌である²²⁾ことを考えると、一般のアレルギー研究が主にモルモットを用いて行われている現在、その結果の判定には大きな問題があるものと思われる。

B. bronchiseptica を Tryptophan の欠落した半合成培地に、 ^{14}C -Tryptophan 添加後培養すると、 ^{14}C を菌体成分に取り込ませることが出来た。この ^{14}C ラベル菌抽出成分のうち、分子量 5～7 万の画分を用いて点鼻を行うと、無処置対照モルモットでは血中 ^{14}C の上昇が認められ、抗原の鼻からの吸収がうかがわせる。勿論、このことから直ちに、この分子量 5～7 万の成分がそのまま鼻粘膜から血中へ吸収されたと断定する直接の証拠はないが、ラベルされた抗原が鼻粘膜に多い食細胞、好中球およびそこからのリゾチームなどにより破壊されて、遊離した ^{14}C のみが吸収されたと考えることにも、必然性を認め得ない。すなわち、血中 ^{14}C の上昇は抗原そのものの吸収を示すと考えるのが、最も妥当であろう。

感作モルモットに対して、 ^{14}C ラベル菌体画分を投与した場合、血中 ^{14}C を確認出来なかったが、この成績は、測定感度の限界を示すものである。感作モルモットを気管切開後、点鼻にてこの菌体抽出成分を投与する

と、肺呼吸曲線に変化が出現することから (図 11) ^{14}C としては検出され得ない少量であっても、鼻粘膜から多少なりとも吸収されているものと思われる。

また、感作モルモットの鼻腔洗浄液中には、Bordetella bronchiseptica に対する特異抗体が確認された。

以上のように感作モルモットと無処置モルモット、すなわち鼻粘膜中の特異抗体の有無の差により、鼻粘膜よりの抗原の吸収に著しい差の認められることは明らかである。この抗原吸収を block する粘膜上の抗体は、多くは分泌型 IgA と考えられ、これらの抗体が抗原と complex をつくることにより鼻粘膜上にとどまりやすくなり、繊毛運動により嚥下排泄されるものと思われる²³⁾。すなわち、鼻粘膜は分子量の大きな抗原成分も比較的容易に吸収することが示されたが、このことは、一見生体にとり不都合に見える。しかし、局所免疫系を考えると、非常に合目的である。局所免疫系、すなわち、粘膜免疫系が成立するためには、粘膜面に付着した抗原成分が抗原性を保ったままの形で生体に取り込まれ、そこで抗体産生前駆 B 細胞が抗原刺激を受けて増殖を開始しなければならぬ。

また、一連の実験から、局所に抗体の存在する場合、抗原成分の吸収が阻害されることも明らかになった。すなわち、鼻粘膜が一旦は抗原成分を吸収することは抗体

産生に必須であるが、一旦抗体が産生されると、次回からの抗原吸収を特異的に block することになるのである。

以上、鼻からの抗原吸収について検討し、鼻粘膜は、分子量の比較的大きな抗原成分も吸収しうることを、しかし、それは局所抗体産生に必要なためであり、一旦産生された局所抗体は、その抗原成分の吸収阻止、排除に働くことを示した。

結 語

鼻の生体防御機能について検討し、

1. 鼻粘膜局所抗体が、細菌を用いた感染実験で、その排除に重要な働きをすること。
  2. 鼻粘膜は薬物のみならず、分子量の大きな抗原成分も吸収しうることを。
  3. しかし、それは局所抗体産生に必要なためであり、一旦産生された局所抗体は、その抗原成分の吸収阻止、排除に働くこと。
  4. 鼻呼吸障害は、それら局所抗体の産生を阻害すること。
  5. 鼻のフィルター作用、空気調整作用等の物理的防御機構は、予想以上に強力なことを。
- を明らかにした。

参 考 文 献

- 1) Freestone DS and Weineberg AL: The administration of drugs and vaccines by the intranasal route. *Br J clin Pharmacol* 3: 827-829, 1976.
- 2) 田中健一 川合 満: TDI によるモルモット喘息惹起の試みについて *アレルギー* 31: 1044-1047, 1982.
- 3) 八倉隆保: 実験的アレルギー性喘息 *最新医学* 27: 1464-1472, 1973.
- 4) Amdur MO and Mead J: Mechanics of respiration in unanesthetized guinea pigs. *Am J Physiol* 192: 364-368, 1958.
- 5) Diamond L and O'Donnel M: Pulmonary mechanics in normal rat. *J Appl Physiol* 43: 942-948, 1977.
- 6) Pare PD and Michoud MC: Pulmonary effects of acute and chronic antigen exposure of immunized guinea pigs. *J Appl Physiol: Respirat Environ Exercise Physiol* 46: 346-353, 1979.
- 7) Holus D and Frank R: A system for rapid measurement of lung function in small animals. *J Appl Physiol: Respirat Environ Exercise Physiol* 46: 394-398, 1979.
- 8) Stein M, Schiavi RC et al: The mechanical properties of the lung in experimental asthma in the guinea pig. *J Allergy* 32: 8-16, 1960.
- 9) Koo KW, Leith DE et al: Respiratory mechanics in normal hamster. *J Appl Physiol* 40: 936-942, 1976.
- 10) Lai YL and Heidebrandt J: Respiratory mechanics in anesthetized rat. *J Appl Physiol: Respirat Environ Exercise Physiol* 45: 255-260, 1978.
- 11) 横山榮二: ラット換気能測定法 *日胸疾会誌* 21: 357-363, 1983.
- 12) Ovary S and Kaplan B: Characteristics of guinea pig IgE. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 51: 416-428, 1976.
- 13) Mahin DT and Lofberg RT: A simplified method of sample preparation for determination of Tritium, Carbon-14, or Sulfur-35 in blood or tissue by liquid scintillation counting. *Analy Biochem* 16: 500-509, 1966.
- 14) 八倉隆保 三宅忠生: 実験的喘息 *臨床科学* 8: 1528-1539, 1973.
- 15) Keenan J, Thompson J et al: Prolonged corticotropic action of a synthetic substituted α^{1-18} ACTH. *Bri Med Journal* 25: 742-743, 1971.
- 16) Hussain A, Foster T et al: Nasal absorption of propranolol in humans. *J Pharma Sci* 69: 1240, 1980.
- 17) 今野昭義: エアゾル療法と鼻・副鼻腔のエアロダイナミックス. *エアゾル研究会誌*: 27-38, 1978.
- 18) Hirai S, Yashiki T et al: Absorption of drugs from the nasal mucosa of rat. *Int J Pharmaceut* 7: 317-325, 1981.
- 19) 今野昭義: 気道過敏性とそのメカニズム上気道の過敏性と自律神経. 第33回日本アレルギー学会総会報告, 千葉, 1983.
- 20) 無江季次: 抗原曝露による気道過敏性の報告 第33回日本アレルギー学会総会報告, 千葉. 1983.

- 21) Hampton SF and Johanson MC: Studies of bacterial hypersensitivity in asthma. J Allergy 34: 63-95, 1963.
- 22) Nakagawa M, Muto T et al: Experimental Bordetella bronchiseptica infection in guinea pigs. Jap J vet Sci 33: 53-60, 1971.
- 23) Stokes CR: Immune exclusion is a function of IgA. Nature 255: 745-746, 1975.

稿を終わるにあたり、終始御懇篤な御指導と適切な御助言をいただいた戸川清教授、今野昭義助教授に深謝致します。直接御指導いただいた機器センターの天野保二

助教授、実験を手伝っていただいた同柴田淑子・小松幸子技官に心から感謝致します。また、小動物換気機能検査の御指導をいただいた国立公衆衛生院横山栄二先生、細菌の寄与と貴重な御助言をいただいた国立予防衛生研究所佐藤勇治先生、中川雅郎先生に深謝致します。なお、本論文の要旨の一部は、第33回日本アレルギー学会総会、及び第23回日本鼻科学会において口演した。

(原稿受付 昭和 59. 10. 29日)

別刷請求先 〒010 秋田市民道 1-1-1

秋田大学医学部耳鼻咽喉科学教室 岡本 美孝