鼻アレルギー患者血清中のアリルスルファターゼ B の活性

北海道大学医学部耳鼻咽喉科学教室

高木 摂夫, 間口 四郎, 都香 智子, 吉村 理, 福田 諭

ACTIVITY OF SERUM ARYLSULFATASE B IN NASAL ALLERGY PATIENTS

SETSUO TAKAGI, M.D., SHIROH MAGUTI, M.D., TOMOKO TSUGA
TADASHI YOSHIMURA, M.D. and SATOSHI FUKUDA, M.D.

Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine, Hokkaido University, Sapporo

Although the arylsulfatase B has been reported to inactivate slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) in vitro there has not been studied about the relation between this enzyme and nasal allergy in vivo. The present study was done to examine the serum level of arylsulfatase B in 73 nasal allergy patients and 13 normal controls.

Serum arylsulfatase activity was quantified by measurement of the hydrolysis product (p-nitrocatechol) generated by the interaction of this enzyme and a substrate (p-nitrocatechol sulfate, Sigma).

The results are summarised as follows; 1. Arylsulfatase B activity is significantly elevated in sera of nasal allergy patients than in that of normal subjects. 2. There are no correlation between the enzyme activity and the number of peripheral blood eosinophiles. 3. There is tendency the severe the nasal obstruction, the lower the level of the enzyme activity.

Key words: Arylsulfatase B, 鼻アレルギー, 血清, 好酸球A92-1021-32841

I はじめに

アリルスルファターゼは芳香族硫酸エステルを加水分解する酵素であり至適 pH, 基質特異性, 細胞内分布, 無機イオンによる阻害反応などのちがいにより, 表1のごとくアリルスルファターゼ A, B, C, と分類されている。

このうち好酸球中に多量に含まれているアリルスルファターゼ B¹⁾²⁾ は実験的に SRS-A (slow reacting substance of anaphylaxis) を不活性化すると報告³⁾⁴⁾ があり即時型アレルギーを抑制する可能性が示唆されているが, in vivo においてアリルスルファターゼ B を測定した報告は極めて少なく, 実際に鼻アレルギー患者で測られた報告は見当たらない。

今回我々は鼻アレルギー患者血清中の本酵素活性の測定を試み, 健常人との間に有意の差が認められたの

で報告する。

II 対象及び方法

対象は当科アレルギー外来を受診した患者の中で臨床症状, 鼻腔所見, 末梢血好酸球数, 皮内テスト, IgE RIST・RAST, 鼻汁好酸球, 誘発試験等より鼻アレルギーの診断基準を満たした未治療の患者, 72名の血清を使用した。また, 比較の対象としてアレルギー疾患を否定された健常人13名の血清を用いた。

アリルスルファターゼ B の酵素活性は人工基質である p-ニトロカテコール硫酸 (Sigma 社) を用いて行った⁵⁾。具体的には図1のごとく, p-ニトロカテコール硫酸を 0.05M の濃度になるように溶解した, アリルスルファターゼ A の活性を阻害する 0.01M の酢酸バリウムを含む 0.5M 酢酸緩衝液, pH6.0 を基質溶液とし

表 1 アリルスルファターゼの生化学的分類

	至適 pH	特異基質	局在
arylsulfatase A	5.0	cerebroside sulfate ascorbic acid 2-sulfate	microsomal membrane
arylsulfatase B	5.6—6.0	chondroitin 4-sulfate dermatan sulfate UDP-GalNAc4-sulfate	lysosome
arylsulfatase C	7.5	estrogen sulfate	lysosome

図 1

図 2 血清中アリルスルファターゼ B の活性値

た。酵素活性に対する電解質の影響を少なくするため試料(血清)を脱イオン水にて5倍希釈し、エッペン

図 3 アリルスルファターゼ B と好酸球数

図 4 アリルスルファターゼ B と IgE

ドルフチューブ中で基質溶液と混ぜたあと37°Cで2時間インキュベーションを行った。

対照として、基質溶液と混じるまえに boil し、酵素活性を死滅したものを用いた。

インキュベーション後、100°C、5 分間、boil し、反応を停止させ、10,000rpm、5 分間遠心 (KUBOTA KM-15200) し、沈澱物を取り除き、1N NaOH にて発色させ、515nm の吸光度を測定した。対照との差を

図5 アリルスルファターゼ B と臨床症状

図6 アリルスルファターゼ B と臨床症状

図6 アリルスルファターゼ B と臨床症状

求め、1時間あたり1nmolのp-ニトロカテコールを遊離させる酵素量をunitとした。

測定はすべてduplicateで行い結果はt検定を用いて有意差を検討した。

さらに、奥田の分類⁵⁾を用いて“くしゃみ”、“鼻汁”、“鼻閉”の程度を分類し臨床症状との関係についても検討した。

III 結 果

図2のごとく、健康人13名の平均酵素活性値は20.4unitsであるのに対し、鼻アレルギー患者72名の平均酵素活性値はやや広い範囲に分布していたが平均32.8unitsで、t検定にて1%の危険率で有意の差がみられた。

つぎに本酵素活性と末梢血好酸球数との相関をみると図3 ($R=0.18$)のごとくで両者の間には相関は見られなかった。

また血清IgE値との相関も図4 ($R=0.13$)のごとく

相関性はなかった。

臨床症状との関係(図5, 6, 7)についてはまず“くしゃみ”については(-)群でやや低い傾向を示したが、全体として大きな差はなく有意の差は認められなかった。

“鼻汁”についても同様の傾向で全体として大きな差はなかった。しかし“鼻閉”では、症状が重くなるにしたがって本酵素活性値が下がる傾向がみられ(-)群と(++)群では2.5%の危険率で、(-)群と(+++)群では5%の危険率で統計学的に有意の差がみられた。

IV 考 察

I型アレルギーの末梢血に好酸球増多がみられ、組織局所にも好酸球が選択的に集積することはよく知られた現象であるが、さらに好酸球は、種々の表面レセプターの刺激を介し活性化され、生物学的活性物質を遊離させることが知られている⁷⁾⁸⁾。

1960年にTanaka¹⁾らがヒト好酸球には多量のアリルスルファターゼが含まれ、その活性は好塩基球の4倍、好中球の8倍であることを報告し、当時、アレルギーの病態において注目されていた好酸球に最も多く含まれている点からその生物学的作用が注目された。

その後Orange³⁾らは軟体動物由来のアリルスルファターゼ(limpet arylsulfatase)がin vitroでSRS-Aを不活性化することを証明し即時型アレルギーを制御する可能性があることを報告し、Bach⁵⁾はモルモット肺由来のECF-A(eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis)の活性をアリルスルファターゼ、チロジナーゼ、ロイシン・アミノペプチダーゼ、が不活性化すると報告した。

また Wasserman ら²⁾は、ヒト好酸球からアリルスルファターゼを精製しその化学的性状よりそれがアリルスルファターゼ B であることを証明すると共にヒト好酸球に澱粉粒子を貪食させることによって含まれているアリルスルファターゼの25%が遊離してくることを報告した。さらに Zinger ら⁹⁾は好酸球のザイモザン貪食によるヒスタミナーゼ、アリルスルファターゼの細胞外遊離について実験し、アリルスルファターゼとヒスタミナーゼとは異なった遊離の仕方をしめすことを報告した。

しかし1970年代後半になって SRS-A の化学構造が解明されはじめ、その本体が、スルフィドペプチド・ロイコトリエンであることが判明すると、構造的にアリルスルファターゼの作用する構造がないという矛盾が生じた。

事実、Weller ら⁷⁾は合成ロイコトリエン (LTC₄) とアリルスルファターゼ B を *in vitro* において反応させ、不活性化されないことを報告した。

しかし従来の報告にのっとり、精製アリルスルファターゼ B を感作ラット腹腔由来の SRS-A と反応させると不活性化されると言う事実により、熊谷ら⁴⁾はヒト胎盤よりアリルスルファターゼ B を精製し、それをういてラットの SRS-A を分解しその化学構造を検討した結果、ロイコトリエンにはスルフィドペプチド・ロイコトリエンのほかに C 末端から 6 位の位置にグルタチオンがスルフィン結合している“ロイコトリエン・スルフィン”が存在することを証明した。

このロイコトリエン・スルフィン は Denis ら⁸⁾によって合成されスルフィドペプチド・ロイコトリエンとほぼ同等の生物学的活性を持っていることが確かめられた。

従って *in vitro* においては依然として、SRS-A がアリルスルファターゼ B によって分解されると言う生物学的特性がなりたつわけである。

しかしこれらの一連の *in vitro* の実験に比較して *in vivo* においては不明点が多く、ロイコトリエン・スルフィンは *in vivo* においてはいまだ確認されておらず、またアリルスルファターゼの存在に関しても *in vivo* における報告⁹⁾はきわめて少ない。

これらの観点から我々は *in vivo* におけるアリルスルファターゼ B の存在について知るべく即時型アレルギーの典型例である鼻アレルギー患者の血清を用いて、アリルスルファターゼ B の活性の測定を試みた。

一般に血清中の酵素活性の測定は多量の血清蛋白の

存在により、測定の再現性、安定性に欠けることが多いが、我々は、今回血清を脱イオン水による希釈と、反応後の boil による蛋白の沈澱除去を行うことによって、再現性、安定性がえられ、測定可能となった。

そしてその結果、健康人血清中に比べて鼻アレルギー患者血清中ではアリルスルファターゼ B の活性値が有意に高いことがわかり、実際に即時型アレルギーの病態においても本酵素が関係していることが示唆された。

またこの酵素活性値は、鼻アレルギー患者末梢血において、第一に血清 IgE 値と相関を示さず、第二に末梢血好酸球数とも相関がみられず好酸球増多例が必ずしも酵素活性値が高いわけではないことが判明した。

末梢血好酸球数と相関がみられない点に関して、我々が測定した血清中のアリルスルファターゼ B の活性値が好酸球以外のものからきている可能性についても検討が必要と考えられるが、Tanaka ら¹⁾が報告しているようにアリルスルファターゼ B が好塩基球、好中球、に比べ好酸球に圧倒的に多く含まれている点より、むしろ末梢血において好酸球より本酵素がどの程度放出されているかについてさらに情報を得る必要があると考えている。

臨床症状との関連では、特に鼻閉の程度と末梢血の本酵素活性値が逆の相関を示すという興味ある結果がえられたが、たとえばロイコトリエンによる血管透過性の亢進等の作用が臨床症状と関連するのであれば、アリルスルファターゼ B の活性も鼻粘膜腫脹と何らかの関係を持って存在しているのではないかと推測されるが、今回の実験は、あくまで血清中のアリルスルファターゼ B の酵素活性についてのみ調べたもので、末梢血での活性値が鼻アレルギーの標的臓器である鼻粘膜での反応とどのような関係をもっているかについてはまったく不明である。

従って、本酵素活性が I 型アレルギーの反応の場においてどのような形で産生され、また存在しているのか、さらに *in vivo* におけるロイコトリエン・スルフィンとの関係など今後さらに検討が必要と思われる。

V ま と め

I 型アレルギーの *in vivo* におけるアリルスルファターゼ B の関与について知るべく、鼻アレルギー患者血清中の本酵素活性の測定を試み、以下の結果を得た。

1. 正常人に比して鼻アレルギー患者では、血清中のアリルスルファターゼ B の活性値が有意に高い値

を示した。

2. 鼻アレルギー患者血清中のアリルスルファターゼ B の活性値は、末梢血好酸球数、IgE RIST 値とは相関を示さなかった。

3. 臨床症状との関連について検討した結果、“鼻汁”、“くしゃみ”の程度とは相関を示さなかったが“鼻閉”の程度とは負の相関を示した。

以上の結果より実際の鼻アレルギーの病態においてもアリルスルファターゼ B の関与があると考えられた。

文 献

- 1) Tanaka KR, Valentine WN, Fredricks RE: Human leucocyte arylsulphatase activity. *Brit J Haematol* 8: 86-92, 1962.
- 2) Wasserman SI, Goetzel EJ, Austen KF: Inactivation of slow reacting substance of anaphylaxis by human eosinophil arylsulfatase. *J Immunol* 114: 645-649, 1975.
- 3) Orange RP, Murphy RC, Austen KF: Inactivation of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) by arylsulfatases. *J Immunol* 113: 316-322, 1974.
- 4) Kumagai A, Tomioka H: Purified Human Placental Arylsulfatases. *Method in Enzymology* 86: 17-30, 1982.
- 5) Baum H, Dodgson KS, Spencer B: The assay of arylsulphatases A and B in human urine. *Clin Chim Acta* 4: 453-455, 1959.
- 6) 奥田 稔: 抗アレルギー薬の臨床評価法. 臨床免疫 17 Suppl 9: 388-395, 1985.
- 7) 竹中 徹, 前田次郎, 西原 亨: 好酸球の形態と機能. 代謝 20(1): 13-23, 1983.
- 8) 石川 孝: アレルギーと好酸球. 代謝 20(1): 33-39, 1983.
- 9) Bach MK, Jones DG, Kay A: The effect of enzyme digestions on the activity of eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis. *Immunology* 28: 773-779, 1975.
- 10) Zeiger RS and Colten HR: Histaminase release from human eosinophils. *J Immunol* 118: 540-543, 1977.
- 11) Weller PF, Lewis RA, Corey EJ and Austen KF: The interaction of purified human eosinophil arylsulfatase B with synthetic leukotrienes. *Fed Proc* 40: No 4497, 1981.
- 12) Denis D et al: Synthesis and biological activities of leucotriene F4 and leucotriene F4 sulfone. *Prostaglandins* 24: 801-814, 1982.
- 13) Rubin RH, Austen KF and Goetzel EJ: Studies of immediate hypersensitivity in a patient with *Acanthocheilonema perstans* filarial infection. *J Infect Dis* 131: 98-103, 1975.

本論文の要旨は第88回日本耳鼻咽喉科学会総会(金沢)において口演した。

(原稿受付 1989年1月5日)

別刷請求先 〒060 札幌市北区北15条西7丁目

北海道大学医学部耳鼻咽喉科学教室 高木摂夫