鼻アレルギー患者の下甲介粘膜における 好酸球の免疫組織学的検討

長崎大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：限上秀伯教授）

高 村 博 光

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF INFERIOR TURBINATE OF NASAL ALLERGY WITH REFERENCE TO EOSINOPHILS

HIROMITSU TAKAMURA, M.D.

Department of Otolaryngology, Nagasaki University of Medicine, Nagasaki

The number and distribution of EG1 positive cells, EG2 positive cells, MBP positive cells and EPO positive cells of the nasal mucosa were studied in nasal allergy.

The correlation between the EG2 positive cells and subjective symptoms, the number of eosinophils in serum, the number of eosinophils in nasal secretion, the serum IgE level and the RAST score was studied.

Subjects for EG2 were 13 males and 7 females ranging from 10 to 43 years of age, for EG1 they were 2 males and 3 females ranging from 18 to 43 years of age, and for MBP and EPO they were 3 males and 2 females ranging from 10 to 43 years of age.

The specimens from inferior turbinates were frozen at -70°C and sliced at a thickness of $4\mu\text{m}$ by cryostat. Monoclonal antibodies and peroxidase-antiperoxidase staining (DAKO) were used to detect these cells.

EG1 positive cells, EG2 positive cells, MBP positive cells and EPO positive cells were found mainly in the superficial layer, with some in the epithelial layer. However, damage to the epithelium was not related to the infiltration of EG2. No damage to the basement membrane was found.

The number and distribution of EG1 positive cells and EG2 positive cells were almost the same. This means that eosinophils seen in the nasal mucosa have been activated. The number of EG2 positive cells was well correlated with the degree of nasal obstruction and serum IgE level. From the results, activated eosinophils were thought to be related to the late phase response of nasal allergy.

Key words: 鼻アレルギー, 好酸球, Eosinophil cationic protein,
Major basic protein, Eosinophil peroxidase

A97-0061-32861

I はじめに

好酸球は寄生虫, アレルギー性疾患において増加することが知られており, エオジノステインで, 赤く染色される特異顆粒中に含まれる蛋白である Eosinophil cationic protein (ECP), Eosinophil-derived

neutrotoxin (EDN), Eosinophil peroxidase (EPO), Major basic protein (MBP) などは, 存在部位, 作用, 分子量などがわかるようになってきた¹⁾²⁾³⁾. これら顆粒蛋白は組織障害性に働くことから, 1型アレルギーにおける好酸球の関与が強く示唆されている. しか

しながら, in vivo における好酸球の組織障害作用については検討が進んでいない。また, 好酸球の細胞膜表面には免疫グロブリン, 補体, 化学伝達物質, サイトカインに対するレセプター等が存在することが明らかになってきており⁴⁾ 興味もたれている。今回長崎大学耳鼻咽喉科を受診した鼻アレルギー患者から下甲介粘膜を切除し, 好酸球顆粒蛋白 ECP に対するマウス抗ヒトモノクローナル抗体である EG1, EG2(PHARMACIA 製), MBP に対するマウス抗ヒトモノクローナル抗体 BMK-13, および EPO に対するマウス抗ヒトモノクローナル抗体 Anti-EP (ニチレイ) を用い, 好酸球の活性化や in vivo における組織障害作用について免疫組織学的に検討し, 下甲介粘膜における活性化好酸球の数, 分布, 活性化の程度, さらに好酸球の活性化と臨床症状, 検査所見との相関関係についても検討したので報告する。

II 対象と方法

1) 対象 (表 1)

平成 2 年から平成 4 年までに長崎大学医学部附属病院耳鼻咽喉科を受診し, 通年性鼻アレルギーと診断された男性 13 名, 女性 7 名, 計 20 名で重複抗原を有するものも含めた。年齢は 10 歳から 43 歳までであった。(ただし EG1: 男性 2 名, 女性 3 名, 年齢 18 歳～43 歳, MBP: 男性 3 名, 女性 2 名, 年齢 10 歳～43 歳, EPO: 男性 3 名, 女性 2 名, 年齢 10 歳～43 歳) 鼻アレルギーの診断として皮内反応あるいは RAST 値, 鼻粘膜誘発反応, 鼻汁中好酸球のうち少なくとも 2 つ以上が陽性となったものを鼻アレルギーと診断し, 重症度の判定には奥田の基準⁵⁾ を用いた。鼻粘膜の切除は初診時あるいは少なくとも 2 週間以上アレルギーに対して投薬等加療を行っていない時点で行っている。

2) 方法

表 1

症例	年齢	性	臨床症状			鼻汁		血中		血清		鼻粘膜	
			くしゃみ	鼻汁	鼻閉	好酸球数	好酸球数	IgE 値	RAST	EG 2 陽性細胞数			
1	10	♂	3+	3+	2+	2+					3(0)	24	
2	11	♂	1+	3+	3+	1+	24				2(0)	90	
3	11	♂	2+	1+	2+	2+	8	1000			3(0)	51	
4	12	♂	1+	2+	2+	3+	8				3(0)	74	
5	12	♂	1+	2+	2+	2+					3(0)	44	
6	12	♀	2+	3+	2+	2+	10	316			2(2)	43	
7	17	♂	1+	2+	3+	2+	7	589			3(0)	43	
8	18	♂	1+	2+	1+	3+	1	10			0(0)	25	
9	19	♀	1+	1+	1+	1+	2	1232			3(0)	27	
10	20	♂	1+	1+	1+	1+		79				35	
11	20	♂	1+	1+	1+	1+	9	292				35	
12	21	♂	1+	1+	1+	1+	3	81				20	
13	21	♂	2+	1+	2+	1+	8	68			2(1)	35	
14	22	♀	2+	3+	2+	2+	6	1979			3(2)	65	
15	23	♂	1+	2+	3+	3+						67	
16	23	♂	1+	1+	1+	1+	8	113				38	
17	24	♀	2+	3+	1+	1+					3(3)	41	
18	27	♀	1+	2+	2+	2+	22					53	
19	35	♀	1+	2+	2+	1+						41	
20	43	♀	2+	3+	3+	2+	12	186			0(0)	25	

注 1: 血中好酸球数は白血球百分率で示す。

注 2: RAST の単位は IU/ml であり, ハウスダスト(スギ)の値を示す。

注 3: EG 2 陽性細胞数は粘膜固有層浅層に認められた陽性細胞を 200 倍で 3 回観察し, その平均を四捨五入した値である。(単位は個)

表 2

年齢, 性	陽性細胞数(個)	
	EG 1	EG 2
1 43歳女性	13.3	10.7
2 24歳女性	16.7	18.6
3 18歳男性	17.3	13.3
4 27歳女性	27.7	30.7
5 21歳男性	32.0	28.3

(×200)

患者より承諾を得た後、下甲介粘膜前端部を4%キシロカインにより表面麻酔を行った後切除した。アセトンドライアイスにて-70℃に凍結保存、クリオスタットにて4μの凍結切片を作製し、室温乾燥、4℃アセトンで10分間固定、3%過酸化水素にて、内因性 peroxidase 除去、正常ヤギ血清にて非特異的反応を阻止した後、一次抗体にモノクローナル抗体(マウス)EG1, EG2, BMK-13, Anti-EP (37℃30分間反応)、二次抗体にヤギ抗マウス免疫グロブリン血清 (37℃30分間反応)、標識抗体にペルオキシダーゼ標識マウス免疫グロブリン (37℃30分間反応) を使用し、酵素抗体法である PAP 法 (DAKO 社) を使って発色させ、マイヤーのヘマトキシリンにより核染色を行い AQUATEX (メルク社製) にて封入、顕微鏡下に観察した。(EG1 陽性細胞, EG2 陽性細胞のカウントは粘膜上皮および粘膜固有層浅層に出現した細胞を200倍の倍率で同一標本3視野について行い、その平均値を採用した。)陰性コントロールとしては一次抗体の代わりにマウス腹水を用い、染色されないことを確認した。洗い出しには TBS (tris buffer saline, pH: 7.6) を使用した。なお, EG1 は、貯蔵型及び分泌型の ECP に対する抗体であり, EG2 は分泌型 ECP のみに反応する抗体である。従って, EG1 陽性細胞は, 下甲介粘膜中のすべての好酸球を表す, EG2 陽性細胞は, Tai ら⁶⁾ が作製した抗体で effector 機能を持った細胞のみ陽性になると考えられる。また, BMK-13 はヒト休止好酸球および活性化好酸球の MBP, 10KD, Anti-EP はヒト EPO, 78KD と特異的に反応する。

III 結 果

EG1 陽性細胞について

EG1 陽性細胞は、粘膜固有層の深層よりむしろ比較的小さい部分に多数観察された(図1)。分布は、比較的小さいで血管周囲をはじめ特定の部位に集まっている傾向はなかった。

EG2 陽性細胞について

EG1 陽性細胞と同様, EG2 陽性細胞は粘膜固有層の比較的小さい部分を中心に多数認められたが, 深層には少なかった (図2)。

また粘膜上皮層にも観察され, 上皮細胞間へ浸潤しているものもあった。好酸球周囲への顆粒の放出像も観察された。しかし, 必ずしも粘膜上皮の剥離の認められた部位や剥離の程度と EG2 陽性細胞や ECP の沈着との間に相関はなかった。また, 基底膜への ECP の

図4 EG2 陽性細胞数とくしゃみとの関係

図5 EG2 陽性細胞数と鼻汁との関係

図6 EG2陽性細胞数と鼻閉との関係

図7 EG2陽性細胞数と血清IgE値との関係

沈着や断裂は認められなかった。

EG1陽性細胞とEG2陽性細胞の関係について

両者の分布は、連続切片において観察すると非常に類似していることがよくわかる(図3)(上段がEG2陽性細胞, 下段がEG1陽性細胞)。また、実際に両者の数を連続切片の同じ範囲(粘膜上皮, 粘膜固有層を含めて)で、3カ所カウントし平均を求めたが、両者間で陽性細胞数にほとんど差がなかった(表2)。これは、

下甲介粘膜に出現した好酸球がすでにほとんど活性化していることを示唆する結果だと考えられる。

EG2陽性細胞数と臨床症状、検査値の検討(表1)

下甲介粘膜中のEG2陽性細胞数と自覚症状、血清IgE値、RAST値との相関について相関表を用いて検討した。なお、自覚症状は奥田の基準⁵⁾に従い、1+, 2+, 3+とスコア化して行った。自覚症状とEG2陽性細胞との関係について、それぞれの相関係数はくしゃみ0.20, 鼻汁0.31, 鼻閉0.52であった。0.40以上を有意と考えると、鼻閉のみが比較的EG2陽性細胞数と相関していた(図4, 5, 6)。血清IgE値、RAST値との相関係数はそれぞれ0.69, 0.32であり、血清IgE値が有意な相関を示した(図7)。

下甲介粘膜中のMBP, EPOについて

両者に関しても好酸球に一致して染色され、EG2陽性細胞と同様の分布を示した。一部には、細胞外にMBP, EPOが認められたが、粘膜上皮の剥離部や基底膜への沈着所見等は少なく、組織障害を証明する所見は、認められなかった(図8)。

IV 考 察

ECPは、好酸球の特異顆粒中のmatrixに含まれ、脱顆粒とともに遊離し、細胞血球凝集、繊維素溶解阻害、細胞性免疫、肥満細胞、好塩基球の脱顆粒等が知られている⁷⁾⁸⁾。EG1は、好酸球顆粒蛋白の貯蔵型及び分泌型ECPと、EG2は分泌型ECPと結合するモノクローナル抗体で、好酸球の活性化についての有用な指標になると考えられる。MBPは、特異顆粒のcrystalloid coreに存在する蛋白で気道粘膜上皮障害、気道過敏性の亢進が実験的に証明⁹⁾⁹⁾されており、また、EPOはmatrix中に含まれ、気道粘膜上皮障害、肥満細胞からのヒスタミン遊離等の作用が報告¹⁰⁾されている。

近年、in vitroで好酸球の顆粒蛋白による組織障害性が報告されている気管支喘息やアトピー性皮膚炎においては、局所への好酸球浸潤や、EG2陽性細胞の確認がされていることから、局所における好酸球の役割が重要視されている。特に、気管支喘息においては、気管支粘膜を用い、基底膜下への顆粒蛋白の沈着、粘膜上皮障害の証明や、BALF中のECP, MBPなどの塩基性顆粒蛋白の存在が確認¹¹⁾¹²⁾されている。さらに、即時型喘息反応(IAR)に引き続いておこる遅発型喘息反応(LAR)が観察され、LARでの気道狭窄は高度の好酸球浸潤によりおこる可能性が示唆されたことで喘息の慢性化における好酸球の重要性が再認識され

図1 EG1陽性細胞の分布 (×200)
EG1陽性細胞は粘膜固有層の比較的浅い部位を中心に分布している。粘膜上皮中にも認められる。

図2 EG2陽性細胞の分布 (×100)
EG2陽性細胞もEG1陽性細胞と同様、粘膜固有層の浅い部分を中心に分布し、深層にはわずかしが認められなかった。

図3 連続切片におけるEG1陽性細胞とEG2陽性細胞の分布(×200)
連続切片において両者の数、分布が類似している。
(上段がEG2陽性細胞、下段がEG1陽性細胞)

図8 MBP陽性細胞の分布 (×400)
好酸球と一致して染色され、ECPと同様の分布を示した。しかし、粘膜上皮の剥離部や、基底膜への沈着所見はなかった。

てきている¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。

また、津田ら¹⁶⁾は、アトピー性皮膚炎患者血清中の ECP 濃度は健康人に比較して有意に上昇し、特に重症例で高値を示したと述べている。吉田ら¹⁷⁾は、アトピー性皮膚炎病巣部において真皮に EG2 陽性細胞の局在を認め、好酸球の浸潤と脱顆粒が起きており、特に組織欠損部においては、破壊された組織の修復に関与しているのではないかと述べており、さらにダニ抗原塗布試験を行い、経時的に生検標本を作成した結果、6 時間後から細胞浸潤を認め、24 時間後からいくらかの好酸球浸潤と EG2 陽性細胞の出現を確認している。

Bousquet ら¹²⁾は、気管支喘息患者の末梢好酸球数、BALF 中の好酸球数、ECP レベルと重症度 (Aas score, 1 秒率) の間に有意な相関があること、気管支生検組織中の EG1, EG2 陽性細胞数が気管支喘息患者で有意に多く、さらに正常者においては、粘膜下層深層に脱顆粒していない陽性細胞が散見されたのに対し、患者においては粘膜上皮を中心に多数の脱顆粒した陽性細胞が観察され、さらに基底膜への顆粒の沈着、上皮剥離がみられたと報告している。これは、Harlin ら¹⁸⁾が行った気管支喘息患者の副鼻腔粘膜を用いた実験でも同様の結果が得られており、脱顆粒していない好酸球は主に粘膜下層に認められ、上皮内には散見される程度であったと述べている。

鼻アレルギーにおいては組織を用いた組織障害性の報告は少なく、今回のわれわれの実験から、下甲介粘膜に存在する好酸球のほとんどが活性化しており、好酸球が局所において活性化されるのではなく、すでに活性化された好酸球のみが選択的に種々の遊走因子により集められ、アレルギー反応に関与していることが推定された。好酸球による免疫、アレルギーの組織障害には、好酸球の病巣局所への遊走、集積が重要であり、primary step はまず血管内皮細胞への付着と考えられ、内皮細胞上の adhesion molecules である ICAM-1 等の発現が最近注目を集めている¹⁹⁾。また、好酸球は各種のサイトカインおよび mediator により活性化され、遊走活性物質により、病巣局所(鼻粘膜)へ遊走するものと考えられる。さて、好酸球の活性化される場所については、もし好酸球が鼻粘膜(局所)において活性化されるのであれば、血管周囲において活性化されていない好酸球が存在しているはずだが、今回の結果からは、浅層、深層を問わず、ほとんどの好酸球は活性化されていた。よって、少なくとも好酸球の活性化は局所においては行われないとわれわれは

考えている。

また、最近の研究においては鼻アレルギーにおける遅発相と好酸球の活性化について論じられており、寺田ら²⁰⁾は抗原誘発後の鼻腔洗浄液中の EG2 陽性率、EG2 陽性の活性化好酸球数、ECP 量が遅発相において有意に増加し、また鼻腔抵抗と活性化好酸球数の相関が遅発相においてより高かったと述べている。今回の我々の結果からも鼻アレルギーにおいて即時相としてのくしゃみ、鼻汁ではなく、遅発相に出現する鼻閉の程度と EG2 陽性細胞数が比較的相関したことから好酸球の分泌型 ECP が鼻アレルギーの遅発相に深く関与していることが示唆された。さらに EG2 陽性細胞数と血清 IgE 値が相関したことは、好酸球の活性化と好酸球の IgE-Fc 受容体である CD24 (FcεRII) 発現との間になんらかの関係があることを裏付けることができる。

さて、気管支喘息における ECP, MBP, EPO の粘膜上皮への浸潤、剥離、基底膜への沈着等が報告¹²⁾されているにもかかわらず、今回のわれわれの結果からは、確かに鼻アレルギーにおいても粘膜固有層に浸潤した好酸球が活性化し、気管支喘息患者の気管支粘膜や副鼻腔粘膜中の活性化好酸球と分布は比較的類似しているものの、上皮の障害の程度や部位と浸潤好酸球の間に有意の相関を見いだすことはできず、MBP, EPO の粘膜上皮、基底膜への沈着も著明でなかった。このことから、鼻アレルギーにおいて好酸球の作用は気管支喘息で報告されているほど著明ではない可能性があると考えられた。鼻粘膜は繊毛上皮で被われているが非常に剥離しやすい。キシロカインによる表面麻酔、粘膜切除、標本作成、免疫染色それぞれの行程で上皮が障害される可能性がある。従って上皮の剥離が認められた場合でもそれがアーチファクトであるかどうかの鑑別が難しい。また、好酸球は粘膜固有層から鼻汁中に遊走しており、ある時点の組織において組織障害を起こした好酸球あるいは好酸球顆粒蛋白はすでに標本内には存在しない可能性もある。つまり、時間的な経過も考慮に置いておく必要があり上皮の剥離部位に ECP, MBP, EPO が証明されてもそれを直ちに上皮障害と結びつけてよいかどうかの問題もある。現時点で、in vivo における上皮障害と浸潤好酸球の関係を証明することは非常に困難であると感じられた。今後は好酸球の活性化とサイトカイン、遊走と adhesion molecules, 好酸球の脱顆粒、組織障害性等に関して検討していきたい。

V ま と め

鼻アレルギー患者の下甲介粘膜を用いて免疫組織学的に検討し、以下の結果を得た。

1. 下甲介粘膜中に多数の EG1, EG2 陽性細胞が認められ、両者の分布、数は非常に類似していたことから、下甲介粘膜に出現した好酸球は活性化していると考えられた。

2. EG2 陽性細胞数と鼻閉の程度、血清 IgE 値との間に相関関係が認められたことから、好酸球がアレルギー反応の遅発相に深く関与していることが示唆された。

3. 下甲介粘膜中の EG2 陽性細胞数, ECP, MBP, EPO 沈着と粘膜上皮剥離の部位、程度との相関はなく、また基底膜への MBP, EPO 沈着の所見はみられなかったことから、好酸球の組織障害作用について証明することはできなかった。

参 考 文 献

- 1) Olsson I, Venge P, Spitznagel KJ et al: Arginine-rich cationic proteins of human eosinophil granules. *Lab Invest* 36: 493-500, 1977.
- 2) Carlson MGCh, Peterson CGB, Venge P: Human eosinophil peroxidase. Purification and characterization. *J Immunol* 134: 1875-1879, 1985.
- 3) Peters MS, Rodriguez M, Gleich GJ: Localization of human eosinophil granule major basic protein, eosinophil cationic protein, and eosinophil-derived neurotoxin by immunoelectron microscopy. *Lab Invest* 574: 656-662, 1986.
- 4) 石川 孝: 好酸球反応と液性免疫, 牧野荘平, 石川 孝 編: 好酸球. 国際医学出版, 1991, 72-79頁.
- 5) 奥田 稔: 鼻アレルギー診療の実際. 新臨床医学文庫, 金原出版, 1979, 186-187頁.
- 6) Tai PC, Spry CJF, Peterson C et al: Monoclonal antibodies distinguish between storage and secreted forms of eosinophil cationic protein. *Nature* 309: 182-184, 1984.
- 7) Venge P, Dahl R, Fredens K et al: Immunobiology of the eosinophil. Elsevier Science Publishing Co Inc: 163-179, 1983.
- 8) Young JDE, Peterson C, Venge P et al: Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature* 321: 613-616, 1986.
- 9) Frigas E, Loegering DA, Greich GJ: Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. *Lab Invest* 42: 35-43, 1980.
- 10) Henderson WR, Chi EY, Klebanoff SJ: Eosinophil peroxidase-induced mast cell secretion. *J Exp Med* 152: 265-279, 1980.
- 11) Filley WV, Holley KE, Kephart GM et al: Identification by immunofluorescence of eosinophil granule major basic protein in lung tissues of patients with bronchial asthma. *The Lancet* July 3: 11-16, 1982.
- 12) Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY et al: Eosinophil inflammation in asthma. *The New England Journal of Medicine*. October 11: 1033-1039, 1990.
- 13) 難波一弘, 高橋 清, 多田慎也, 清水一紀, 中藤研一他: House dust による気管支喘息患者遅発型気道反応の発症機序に関する検討—気管支肺胞洗浄法を中心に—アレルギー 37: 67-74, 1988.
- 14) Monchy JGR, Kauffman HF, Venge P et al: Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reaction. *Am Rev Respir Dis* 131: 373-376, 1985.
- 15) Metzger WJ, Zavala D, Richerson HB et al: Local allergen challenge and bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic lungs. *Am Rev Respir Dis* 135: 433-440, 1987.
- 16) 津田眞五, 宮里 稔, 名嘉真武国: 好酸球の heterogeneity (含む分離法), 牧野荘平, 石川 孝 編: 好酸球. 国際医学出版, 1991, 98-108頁.
- 17) 吉田彦太郎: 皮膚における好酸球浸潤の意義. *Medical Tribune*: 21-24, 1989.
- 18) Harlin SL, Ansel DG, Lane SR et al: A clinical and pathologic study of chronic sinusitis. The role of the eosinophil. *J Allergy Clin Immunol* 81: 867-875, 1988.
- 19) 茆原順一, 山本高広, 倉知 大, 中島重徳: 好酸球の遊走と adhesion molecules. *臨床免疫*: 523-531, 1992.
- 20) 寺田修久, 伊藤永子, 杉山達朗, 戸川 清: 鼻アレルギー症例の遅発相における鼻粘膜好酸球浸潤と活性化—鼻腔洗浄液による検討—アレルギー: 181-190, 1991.

(1993年3月19日受稿 1993年8月5日受理)

別刷請求先 〒817 長崎県下県郡厳原町

大字厳原東里字野良303-1

対馬いづはら病院耳鼻咽喉科 高村博光