潜在型鼻アレルギーについての免疫組織学的検討

—— Tリンパ球と EG 2 陽性細胞を中心に ——

長崎大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：隈上秀伯教授）

高 崎 賢 治, 吉 見 龍一郎, 高 村 博 光, 隈 上 秀 伯

IMMUNOHISTOLOGICAL STUDY OF THE NASAL MUCOSA
IN LATENT ALLERGIC PATIENTSKENJI TAKASAKI, M.D., RYUICHIRO YOSHIMI, M.D., HIROMITSU TAKAMURA, M.D.
and HIDEHAKU KUMAGAMI, M.D.

Department of Otolaryngology, Nagasaki University, Nagasaki

We studied the distribution of T lymphocyte subpopulations and EG2 positive cells in the inferior turbinates of subjects with latent nasal allergy by use of an immunohistochemical procedure. Five patients who had a positive skin test for house dust and one who had a positive skin test for Japanese cedar were studied. The specimens were frozen at -70°C and sliced at 4 μm with a cryostat. The peroxidase-antiperoxidase method with monoclonal antibodies (CD4, CD8, EG2) was used to detect T lymphocyte subpopulations and activated eosinophils. Finally, the specimens were counterstained with Mayer's Hematoxylin.

CD4 positive cells and CD8 positive cells were found mainly in the superficial layer of the lamina propria. In every subject, the number of CD4 positive cells dominated that of CD8 positive cells in the lamina propria. The ratio of CD4 positive cells to CD8 positive cells was 1.93, on average. This ratio was lower than the ratio typical of nasal allergy, but higher than the ratio of non-allergic normal controls.

Though the number of EG2 positive cells was lower than the number typical of nasal allergy, EG2 positive cells were observed in every case.

We speculate that latent nasal allergic reactions may develop in the inferior turbinates.

Key words: 潜在型鼻アレルギー, Tリンパ球, 好酸球, 免疫組織染色法 A97-0213-32831

1. はじめに

鼻アレルギー発作時の下甲介粘膜には、肥満細胞の増加と脱顆粒、好酸球の増加¹⁾、リンパ球の浸潤等の変化が認められる。吉見ら²⁾の検討で、下甲介粘膜に浸潤している好酸球のほとんどは、活性化のマーカーと考えられている抗ヒト分泌型 ECP 抗体 (以下 EG2) 陽性を示し、リンパ球の浸潤の多くは、Tリンパ球で CD4 陽性細胞が優位であると報告している。我々³⁾の検討でも、鼻アレルギー患者の CD4/8 比は非鼻アレルギー

の正常者より高い値を示すことがわかった。一方、日常臨床において、皮内テストや RAST などのアレルギー検査が陽性であるのに、鼻症状を全く示さない症例をしばしば見かける。以前、我々は正常ヒト下鼻甲介粘膜における Tリンパ球サブセットについて報告したが³⁾この際、対象として集まったボランティア学生の中には、鼻症状は認めないものの、アレルギー検査の一つである皮内テストにおいて陽性所見を認めるものがあつた。今回は、これらを正常例と区別して、潜在

型鼻アレルギー症例とし、下鼻甲介粘膜の免疫組織学的所見についてEG2陽性細胞とTリンパ球サブセットを中心に検討し、鼻アレルギー発症のメカニズムについて若干の考察を加えたので報告する。

2. 症例と方法

症例は長崎大学医学部学生で正常ボランティアとして集めた学生のうち、男性4名、女性2名、計6名、年齢は19歳から24歳までである。各症例とも粘膜採取時まで鼻アレルギーの症状は認めず、粘膜採取時の皮内テストにおいて何らかの抗原が陽性を示すものに限った。皮内テストは鳥居社製の市販抗原エキスをを用い、その判定基準は奥田の分類¹⁾に準じた。また誘発試験は、鳥居社製の市販抗原ディスクを(スギに関しては対照ディスクに皮内テスト用10³倍液を飽和するまで滴下し乾燥させる操作を2回繰り返し作製した。)、粘膜採取側と対側の下鼻甲介前端に付着させ行なった。誘発試験は、粘膜の採取後1週間以上の間隔をあけて行なった。鼻汁好酸球検査は綿棒にて鼻汁を採取し、スライドガラスに塗抹し自然乾燥後、鳥居社製の市販エオジノステインを用い染色した。その判定基準は奥田の分類¹⁾に準じた。鼻粘膜の採取部位は下鼻甲介下端部(誘発抗原ディスクを付着させる部位)とした。下鼻甲介下端部に、4%のキシロカインを浸潤させたガーゼで十分な表面麻酔後に截除鉗子にて粘膜摂取を行なった。摂取した標本は、直ちに、アセトンドライアイスにて、-70℃に凍結保存し、クリオスタットにて、4μmの凍結切片を作製した。室温乾燥、アセトン固定後3%過酸化水素水で内因性peroxidaseをブロックし、正常ヤギ血清で標識抗体の非特異的吸着を阻止、一次抗体(抗ヒトモノクローナル抗体:マウス)、二次抗体(抗マウス免疫グロブリン:ヤギ)、標識抗体(peroxidase標識抗マウス免疫グロブリン)を、それぞ

れ室温で30分間反応させ、最後にAEC基質により発色させた。

使用したモノクローナル抗体はCD4(OKT4 [DAKO社]:ヘルパー/インデュエーターT細胞を認識)、CD8(OKT8 [DAKO社]:サブレッサー/サイトトキシクT細胞を認識)、EG2([Pharmacia社]ヒト分泌型ECPを認識)である。

陽性コントロールには口蓋扁桃を用い、CD4陽性細胞、CD8陽性細胞の確認を行った。陰性コントロールに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。核染色には、マイヤーのヘマトキシリンを用い、水溶性封入剤(AQUATEX)により封入、顕微鏡下に観察した。CD4陽性細胞、CD8陽性細胞においては検鏡を200倍で行い、細胞が比較的一様に分布している所を選び、一視野あたりの陽性細胞の数の測定を行った。観察部位は粘膜上皮層、粘膜固有層浅層、腺組織周囲、粘膜固有層深層と4部位に分けて観察した。

CD4陽性細胞数、CD8陽性細胞数の比に関しては、以前検討した³⁾正常者の下鼻甲介粘膜の比と、吉見の報告による⁴⁾スギ花粉症患者の下鼻甲介粘膜におけるCD4陽性細胞数、CD8陽性細胞数の比とを用い、Student-t検定にて比較した。

3. 結 果

1) アレルギー検査について

血中好酸球値・IgE値は、ばらつきが認められ、正常値内の例も高値を示す例もあった。皮内テストにおいては6症例中5症例がハウスダスト抗原に対して陽性を示し、1症例がスギ抗原に対して陽性を示した。各抗原における誘発テストの結果は、誘発を行なった5名すべてが陰性を示した。鼻汁好酸球検査は陽性であったが、群在する例はなかった(表1)。

表1 対象症例一覧

No	Case	Age	Sex	Peripheral Blood Eosinophils	SerumIgE (IU/ml)	Eosinophils in Nasal Secretions	Provocation test	Intraskin test	
1	K T	21	M	13	79	(+)	negative	HD	アルテリナリア
2	T K	21	M	9	292	(+)	negative	HD	ブタクサ
3	H Y	22	M	3	80	(+)	negative	HD	スギ カンジダ
4	T K	19	F	2	1322	(+)	—	HD	スギ
5	R N	24	M	8	113	(+)	negative	HD	スギ カンジダ
6	H E	23	F	—	—	(+)	negative	スギ	カンジダ

図 3 下鼻甲介粘膜におけるEG2陽性細胞

図 2 下鼻甲介粘膜におけるCD8陽性細胞

図 1 下鼻甲介粘膜におけるCD4陽性細胞

表2 Tリンパ球サブセットとEG2陽性細胞

No	Case	Age	Sex	CD4	CD8	CD4/ CD8	EG2 Positive cells
1	K T	21	M	206	112	1.84	(+)
2	T K	21	M	182	79	2.30	(+)
3	H Y	22	M	169	90	1.88	(+)
4	T K	19	F	426	273	1.56	(+)
5	R N	24	M	572	278	2.06	(+)
6	H E	23	F	—	—	—	(+)

図4 CD4/CD8比の比較

2) Tリンパ球について

今回の症例においても、鼻アレルギー患者の粘膜と同様に、多数のCD4陽性細胞が粘膜固有層浅層を中心に存在し、また、粘膜上皮層の中にも少数認めることができた(図1)。腺組織の周囲、粘膜固有層深層になるにつれて、CD4陽性細胞数は減少する傾向が認められた。正常者の下鼻甲介粘膜におけるCD4陽性細胞の分布と比較すると、今回の症例の方が、粘膜固有層浅層を中心に増加していた。CD8陽性細胞の分布は、CD4陽性細胞と同様に粘膜固有層浅層を中心に存在しており、粘膜上皮層の中にも少数認めることができた(図2)。CD8陽性細胞は、浸潤が多い症例や少ない症例があり、浸潤細胞が増加している傾向は認められなかった。粘膜固有層における一視野あたりのCD4陽性細胞数は169個から572個、CD8陽性細胞数は79個から278個でありCD4陽性細胞数/CD8陽性細胞数の比

は1.56から2.30で平均すると1.93であった(表2)。

3) EG2陽性細胞について

今回の症例の下鼻甲介粘膜には、少数ながらEG2陽性細胞を認めた(図3)。その多くは粘膜固有層浅層に認めたが、EG2陽性細胞数は、鼻アレルギー患者と比較すると少なかった。検討症例数が少なかったため、EG2陽性細胞数と粘膜各部位との相関や、CD4陽性細胞数/CD8陽性細胞数の比との相関は認められなかった。

4) CD4陽性細胞数、CD8陽性細胞数の比について

CD4陽性細胞数、CD8陽性細胞数の比に関しては、正常者群と潜在性群、正常者群とアレルギー群には有意差を認めたが、潜在性群とアレルギー群には有意差を認めなかった(図4)。

4. 考 察

鼻アレルギーの発症の機序に関しては鶏飼ら⁵⁾が、小児喘息患者で鼻症状を訴えないものを潜在型鼻アレルギー症例とし、鼻内粘液纖毛機能、ヒスタミン鼻粘膜過敏性閾値、鼻汁中ヒスタミン量、鼻粘膜好塩基性細胞数等について検討を行い、鼻内粘液纖毛機能を示すサッカリン時間は、正常範囲にあり、ヒスタミン鼻粘膜過敏性閾値は潜在型鼻アレルギー群が鼻アレルギー群に比べ高値を示し、鼻汁中ヒスタミン量は、鼻アレルギー群が高値を示し、鼻粘膜好塩基性細胞数は潜在型鼻アレルギー群、鼻アレルギー群ともに、正常群より、著明に増加していたため、鼻アレルギーの発症には、鼻粘膜過敏性および鼻粘膜好塩基性細胞からのヒスタミン放出量が関与している、としている。相原ら⁶⁾は、スギ抗原に対するRAST、皮内反応陽性でも季節性の症状を持たないものを潜在型スギ花粉症とし、感作と発症について検討を行い、潜在型スギ花粉症患者はスギのRASTまたは皮内反応陽性例の約49%であり、潜在型スギ花粉症患者数の分布は10歳代にピークを認め、また男性に多く認め、RASTスコアは症状を持つスギ花粉症患者が高く、潜在性患者では低い傾向が認められ、感作から発症までの期間に一定の傾向は得られなかった、としている。

今回は潜在型鼻アレルギーの定義を、アレルギー検査の皮内テスト、RAST、誘発反応、鼻汁好酸球検査のうち2項目が陽性で、鼻アレルギー症状を有さない症例を潜在型鼻アレルギー症例とし、この症例について下鼻甲介粘膜におけるリンパ球サブセットと好酸球を中心に免疫組織学的に検討を行った。

鼻アレルギーの診断の一つに皮内テストがある。皮内テストは、肥満細胞の細胞膜に固着した IgE が抗原と反応することにより、肥満細胞から遊離される化学伝達物質により惹起される膨疹と紅斑の発現をマーカーとした生体反応である¹⁷⁾。IgE 抗体による感作の程度が強ければ紅斑あるいは膨疹が大きく出現し、膨疹の擬足発現はきわめて強い感作状態にあると考えられている。また、RAST による値と皮内テストによる閾値は相関することが知られている³⁾。このようにある抗原に対する皮内テストが陽性であれば、その症例は抗原によって感作されていると考えられる。

ただし今回の検討ではすべての症例において鼻誘発試験が陰性を示した。鼻誘発試験は鼻アレルギー患者の鼻粘膜内の肥満細胞の IgE 抗体感作の検査として用いられている。皮膚反応は陽性であるのに、鼻誘発試験は陰性であるという一見矛盾した結果を今回は示した。今後この矛盾点を解決するために、このような症例の鼻粘膜内の肥満細胞数、肥満細胞上の IgE の分子数、鼻粘膜の過敏性、及び抗原ディスクの抗原性等を考慮し、今後の検討点としたい。

これまでの鼻アレルギー患者の下鼻甲介粘膜における T リンパ球サブセットの検討では吉見¹⁰⁾は、下鼻甲介粘膜には、多数の T リンパ球が認められ CD4 陽性細胞が CD8 陽性細胞より優位であった、としている。今回の潜在型鼻アレルギー症例においても下鼻甲介粘膜には、多数の T リンパ球が認められ CD4 陽性細胞が CD8 陽性細胞より優位であった。CD4 陽性細胞/CD8 陽性細胞の比で比較すると、以前我々³⁾が検討した正常者の下鼻甲介粘膜での CD4 陽性細胞/CD8 陽性細胞比の平均値 1.66 より優位に高い値、1.93 を示し、吉見の報告による⁴⁾スギ花粉症患者の下鼻甲介粘膜における CD4 陽性細胞数/CD8 陽性細胞数の比の平均値 2.33 とは優位差を示していない。潜在型鼻アレルギー症例においては正常者の下鼻甲介粘膜よりも、CD4 陽性細胞優位の T リンパ球浸潤が推察された。

さて、好酸球の鼻アレルギーにおける関与が注目されている。I 型アレルギー疾患などで好酸球増多のある患者の好酸球は健常者に比して異なった特徴を持つ。形態学的には、核が多分葉し¹¹⁾、細胞内特異顆粒は変化する。物理学的には低比重細胞が増加し¹²⁾、免疫学的には、IgE、IgG、補体に対する Fc レセプターが増加している¹³⁾。他に、細胞内代謝も亢進し superoxide (O₂) 生産や oxygen-glucose の消費が高まっている、といわれている。

今回は、この好酸球の機能を調べるために、活性化された好酸球を同定する指標と考えられている抗ヒト分泌型 ECP 抗体 (EG2) を用いて検討を行った。EG2 は Tai ら¹⁴⁾によって作製されたモノクローナル抗体で好酸球顆粒蛋白のうち分泌型の ECP にのみ反応し、貯留型の ECP には反応しないため、好酸球の活性化のマーカーとして用いられている。鼻アレルギーに関しては、寺田ら¹⁵⁾はスギ花粉症患者における鼻腔洗浄液中の EG2 陽性細胞は即時相、遅発相ともに増加した、としている。吉見ら²⁾はすべての鼻アレルギー患者の下鼻甲介粘膜に EG2 陽性細胞が認めれたとしている。このように活性化された好酸球の指標となる EG2 陽性細胞は、局所におけるアレルギー反応に何らかの関与していることが考えられる。今回の潜在型鼻アレルギー症例においても数は少ないが下鼻甲介粘膜には EG2 陽性細胞を認めた。

CD4 陽性細胞は、好酸球の遊走や活性化を来すサイトカイン IL-3、IL-5、GM-CSF を分泌していること、能動感作モルモットにおいて抗原誘発後の遅発相において T リンパ球と好酸球の気管支粘膜への浸潤の程度がよく相関していること¹⁶⁾、アトピー性皮膚炎や気管支喘息において EG2 陽性細胞と CD4 陽性細胞が増加していることから CD4 陽性細胞が好酸球の活性化と密接な関係があることが考えられている¹⁷⁾¹⁸⁾。また吉見ら²⁾は、鼻粘膜固有層における T リンパ球サブセットと EG2 陽性細胞数の相関について検討を行い、CD4 陽性細胞数と EG2 陽性細胞数の間には相関が認められたが、CD8 陽性細胞数と EG2 陽性細胞数の間には相関が認められなかったことから、CD4 陽性細胞が好酸球の活性化に関係があることを示している。

今回検討した潜在型鼻アレルギー症例においても下鼻甲介粘膜に CD4 陽性細胞優位な T リンパ球が浸潤し、EG2 陽性細胞を認めたことは、鼻症状がなく抗原に感作されている症例においても、鼻アレルギー患者に類似の所見を示し、局所においては CD4 陽性細胞が好酸球の活性化に関与していることが推察された。

しかしながら今回の症例に鼻アレルギー症状が発症しないのは、免疫組織学的には鼻アレルギー患者と類似の所見であっても、今回の症例が抗原の誘発テストにおいてすべて陰性であったことを考慮すると、鼻アレルギー症状の発症には局所におけるアレルギー反応のみでなく過敏性等の関与が必要である、と推察された。

CD4 陽性細胞に関しては、そのサブセットが解析さ

れ¹⁹⁾、CD4⁺CD45RO⁺細胞は抗原感作の成立した“memory”細胞、CD4⁺CD45RA⁺細胞は非感作の“virgin”細胞であるとされている。鼻アレルギー患者、潜在型鼻アレルギー患者、正常者においてもCD4⁺CD45RO⁺細胞等の検討が期待される。

5. ま と め

1) 鼻症状がなくアレルギー検査陽性である症例を潜在型鼻アレルギー症例とし、下甲介粘膜を免疫組織学的に検討した。

2) 下甲介粘膜には正常者と比較するとCD4陽性細胞数は多く、CD4陽性細胞/CD8陽性細胞の比は高く認めた。

3) 下甲介粘膜にはすべての症例でEG2陽性細胞を認めた。

4) 鼻アレルギー症状の出現には抗原による全身感作、局所におけるアレルギー反応以外の要素が必要であると推察された。

文 献

- 1) 奥田 稔：鼻アレルギー 金原出版、東京、1988、71-76頁。
- 2) 吉見龍一郎、高村博光、高崎賢治、隈上秀伯：鼻アレルギー患者の下甲介粘膜における免疫組織学的検討（第二報）—Tリンパ球サブセットと活性化好酸球—耳鼻免疫アレルギー 10：54-61、1992。
- 3) 高崎賢治、吉見龍一郎、隈上秀伯：正常ヒト下甲介粘膜におけるBリンパ球及びTリンパ球サブセットについて。耳鼻免疫アレルギー 10：49-53、1992。
- 4) 吉見龍一郎：スギ花粉症患者の下甲介粘膜におけるTリンパ球サブセットについて。耳鼻免疫アレルギー 8：27-32、1990。
- 5) 鶴飼幸太郎、板倉康夫、浜口富美、原田 泉：小児潜在性鼻アレルギーの鼻腔病態—喘息患者を対象にして—。耳喉 55：631-636、1983。
- 6) 相原康孝、目沢朗憲、大塚博邦、奥田 稔：スギ花粉による感作と発症。耳喉頭頸 60：315-319、1988。
- 7) 鳥居新平：皮膚テスト。臨床免疫 20 (Suppl 13)：223-227、1988。
- 8) Miyamoto T, Johansson OGS, Ito K et al: Atopic allergy in Japanese subjects: Studies primarily with radioallergosorbent test. J Allergy Clin Immunol 53: 9-19, 1974。
- 9) 石川 孝：臨床アレルギー学（宮本昭正編著）。南江堂、東京、1992、170-175頁。
- 10) 吉見龍一郎：鼻アレルギー患者の下甲介粘膜における免疫組織学的検討—主にTリンパ球に関して—。日耳鼻 94：641-648、1991。
- 11) Chihara J, Nakajima S: Induction of hypodense eosinophils and nuclear hypersegmentation of eosinophils by various chemotactic factors and lymphokines in vitro. Allergy Proc 10: 27, 1989。
- 12) Frick WE, Sedgwick JB, Busse WW: Hypodense eosinophils in allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol 82: 119, 1988。
- 13) Capron M: Eosinophils: receptors and mediators in hypersensitivity. Clin Exp Allergy 19: 3, 1989。
- 14) Tai P-C, Spry CJE, Peterson C et al: Monoclonal antibody distinguish storage and secreted form of eosinophil cationic protein. Nature 309: 182-184, 1984。
- 15) 寺田修久、伊藤永子、杉山達朗、戸川 清、今野昭義：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 40：181-190、1991。
- 16) Frew AJ, Kay AB: The relationship between infiltrating CD4⁺ lymphocytes, activated eosinophils, and the magnitude of the allergen-induced late phase cutaneous reaction in man. J Immunol 141: 4158-4164, 1988。
- 17) Frew AJ, Kay AB: Eosinophils and T-lymphocytes in late phase allergic reaction. J Allergic Clin Immunol 85: 533-539, 1990。
- 18) Azzawi M, Bradley B, Jeffery KP et al: Identification of Activated T Lymphocytes and Eosinophils in Bronchial Biopsies in Stable Atopic Asthma. Am Rev Respir Dis 142: 1407-1413, 1990。
- 19) Mackay CR: T-cell memory: the connection between function, phenotype and migration pathways. Immunology Today 12: 189-192, 1991。

本論文の要旨は、第10回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会（平成4年3月28日）および第42回日本アレルギー学会総会（平成4年10月30日）において口演した。

（1993年2月3日受稿 1993年8月25日受理）

別刷請求先 〒852 長崎市坂本1-7-1

長崎大学医学部耳鼻咽喉科学教室 高崎賢治