鼻 Inverted papilloma 腫瘍細胞のサイトカイン産生とその分布

日本医科大学耳鼻咽喉科学教室（主任：八木聡明教授）

横 島 一 彦, 大 西 正 樹, 滝 沢 竜 太, パワンカール ルビー

大久保 公 裕, 奥 田 稔

CYTOKINES OF NASAL INVERTED PAPILLOMA: QUANTIFICATION AND DISTRIBUTION

KAZUHIKO YOKOSHIMA, M.D., MASAKI OHNISHI, M.D., RYUTA TAKIZAWA, M.D.

RUBY PAWANKAR, M.D., KIMIHIRO OKUBO, M.D. and MINORU OKUDA, M.D.

Department of Otolaryngology, Nippon Medical School, Tokyo

We previously found that an increased number of mucosal mast cells accumulated in the tumor site of nasal inverted papilloma as well as in the epithelial layer of the allergic nasal mucosa. However, the mechanism of accumulation of mucosal mast cells has not yet been clarified.

The purpose of this study was to evaluate the cytokines produced by inverted papilloma cells, which would be important for the accumulation of mucosal mast cells.

We found that the supernatant of the monolayer of cultured inverted papilloma cells contained GM-CSF, IL-6 and IL-8. IL-2, IL-3, IL-4 and IL-5 were not detected. Contrary to the quantities of cytokines detected in the supernatant of cultured allergic nasal epithelial cells, the quantities of IL-6 and IL-8 were greater in the supernatant of cultured inverted papilloma, whereas that of GM-CSF was less.

Immunohistochemical study revealed the distribution of cytokines: GM-CSF was detected near the basement membrane of the tumor site, while IL-6 and IL-8 were detected in the superficial layer of nasal inverted papilloma. Interestingly, the tumor site near the basement membrane is also the site of accumulation of mucosal mast cells, suggesting that GM-CSF produced by nasal inverted papilloma cells may be one of the most important factors in the accumulation of mucosal mast cells.

Key words: 鼻 Inverted papilloma, サイトカイン, 組織培養
免疫組織化学, 鼻アレルギー

A 98-0066-30821

はじめに

鼻粘膜上皮細胞の腫瘍性増殖を認める鼻 Inverted papilloma の腫瘍内には鼻アレルギー患者の鼻粘膜上皮層同様、粘膜型肥満細胞の集積が認められ、特に増殖の著しい基底膜近傍の腫瘍層に著明な集積が認められる¹⁾²⁾³⁾。しかし、その集積のメカニズムは不明である。

鼻アレルギー患者の鼻粘膜における粘膜型肥満細胞集積のメカニズムにも不明な点が多いが、鼻粘膜上皮層の微小環境が粘膜型肥満細胞の集積に重要であるこ

とは知られている⁴⁾⁵⁾。我々はいままで、粘膜型肥満細胞の集積に鼻粘膜上皮細胞の産生するサイトカインが重要な役割を果たしている可能性を報告してきた⁶⁾⁷⁾⁸⁾。鼻 Inverted papilloma は鼻粘膜上皮細胞由来の良性腫瘍であり、鼻アレルギーとは病態が異なるが粘膜型肥満細胞が同様なメカニズムで集積する可能性が考えられる。

今回の研究は、鼻 Inverted papilloma 腫瘍細胞から産生される粘膜型肥満細胞の集積に関与する因子を明らかにするために腫瘍細胞を培養し、その培養上清中

に含まれるサイトカインについて検討を行った。また、免疫組織学的手法を用いて、培養上清中に検出されたサイトカインの腫瘍内での分布を明らかにしようとするものである。

対 象

病理組織学的検査で鼻 Inverted papilloma と診断された患者の根治手術時に採取した組織を用いた。

培養実験には5症例（平均55.4歳、すべて男性）の鼻 Inverted papilloma を用い、対照としてハウスダスト鼻アレルギー患者4例（平均42.5歳、男性3症例、女性1症例）の、下鼻甲介切除時に得られた下鼻甲介粘膜を用いた。

免疫組織染色には1症例（67歳女性）の鼻 Inverted papilloma を用いた。

方 法

1) 腫瘍細胞の培養実験

a) 鼻 Inverted papilloma 腫瘍細胞の分離

以前述べた鼻粘膜上皮細胞の分離法⁶⁾に従った。手術で得られた鼻 Inverted papilloma 腫瘍塊を1% penicillin-streptomycin (GIBCO, Long Island, NY), 5×10^{-3} M 2-mercaptoethanol (ME) を含む McCoy's 5A 培養液 (McCoy's 2+) で2回から3回洗浄し、0.1% protease (type 14, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 含有 McCoy's 2+ 中で16時間4°Cで培養した。培養後、鋭匙で軽く擦過し基底膜上の腫瘍細胞を採取した。ガーゼで濾過した後200×g、10分間遠沈後再び McCoy's 2+ 培養液中に戻した。以上の操作で200から400個の細胞からなる腫瘍細胞塊が得られた。

b) 鼻 Inverted papilloma 腫瘍細胞の培養

以前述べた鼻粘膜上皮細胞の培養法⁶⁾に従った。培養皿は24穴養皿 (Flow Laboratories Inc.) に bovine dermal collagen (Vitrogen 100, Collagen Co., Polo, Alto, Calif.) を流し乾燥後、3.5% NH₄OH に25分間つけた後、水洗、2.5% グルタルアルデヒドに10分間つけた後再び水洗したものを用いた。培養皿に各々 2×10^4 個の腫瘍細胞を入れ37°C、5% CO₂、100%湿度の中で24時間培養し細胞が培養皿に付着するのを待った。McCoy's 2+ 培養液で3回洗浄し浮遊腫瘍細胞を除去した。その後 McCoy's 2+ 培養液に15% FCS を加えた培養液2mlで6日間培養した。上記の方法で培養皿の底に同一細胞からなる一層の腫瘍細胞層を得ること

ができた。培養後、培養上清を採取し、-20°Cで保存した。

対照については同様の方法で培養した鼻アレルギー患者の下鼻甲介粘膜の上皮細胞を用いた。

c) サイトカインの測定

IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF の測定を行った。

IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, GM-CSF の測定は測定キット (Quantikine, R & D systems, Minneapolis, MN) を用いて測定した。IL-5 の測定は大利隆行氏 (東京大学物療内科) に依頼し、測定した。

サイトカインの量はすべて平均±標準偏差で示し、統計学的検討は Wilcoxon 検定を用いた。

2) 免疫組織学的染色

a) 切片の作製

手術時に採取した組織は速やかに OCT compound 内に包埋し、ドライアイス入りの99.5%アセトンに浴し凍結した。凍結標本は-80°Cで保存した。凍結切片はクライオスタットを用いて6μmの切片を作製した。切片作製は免疫染色をする際にその都度行い、室温で十分に乾燥後、99.5%アセトンで固定し免疫染色に用いた。

b) 免疫染色

免疫染色は DAKO 社製 Alkaline Phosphatase Anti-Alkaline Phosphatase (APAAP) KIT System 40 を用いた。一次抗体は抗ヒト GM-CSF マウスモノクロナール抗体 (Endogen, Boston, MA), 抗ヒト IL-6 マウスモノクロナール抗体 (Genzyme, Cambridge, MA), 抗ヒト IL-8 ラビットポリクロナール抗体 (Endogen, Boston, MA) を用いた。抗 GM-CSF 抗体は50倍に希釈し、抗 IL-6 抗体は50倍に希釈して用いた。抗 IL-8 抗体は500倍に希釈し、ポリクロナール抗体であるため二次抗体として400倍希釈の抗ラビットマウス抗体を用いた。

陰性対照には一次抗体を用いず、同量の Tris buffer solution を用いた。

結 果

1. 腫瘍細胞の培養上清中のサイトカイン (図1)

鼻 Inverted papilloma 腫瘍細胞の培養上清に含まれる GM-CSF, IL-6, IL-8 はそれぞれ 568 ± 240 pg/ml, 29900 ± 35324 pg/ml, 298000 ± 276080 pg/ml であった。IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 は測定限界濃度以下であった。

図1 鼻 Inverted papilloma 腫瘍細胞培養上清中の GM-CSF, IL-6, IL-8 の濃度
鼻 Inverted papilloma 培養上清中には対照に比して多量の IL-6 と IL-8, 少量の GM-CSF を認めた。黒は GM-CSF, 白は IL-6, 斜線は IL-8 を示す。
(** : $p < 0.01$ * : $p < 0.05$)

図3 鼻 Inverted papilloma 組織中の IL-6 の分布
腫瘍最表層に染色された。

図2 鼻 Inverted papilloma 組織中の GM-CSF の分布
腫瘍層の基底膜に近い部分に強く染色された。

対照の鼻アレルギー患者の下鼻甲介上皮細胞の培養上皮中に含まれる GM-CSF, IL-6, IL-8 はそれぞれ $2000 \pm 475 \text{ pg/ml}$, $2338 \pm 649 \text{ pg/ml}$, $6973 \pm 378 \text{ pg/ml}$ であった。対照においても IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 は測定限界濃度以下であった。

鼻 Inverted papilloma と鼻アレルギー下鼻甲介を比較すると GM-CSF は鼻 Inverted papilloma で少なく ($p < 0.01$), IL-6 と IL-8 は鼻 Inverted papilloma で多かった ($p < 0.05$)。

2. GM-CSF, IL-6, IL-8 の分布

陰性対照では染色された部位は認めず, 非特異的な反応はないと判断することができた。

GM-CSF は基底膜, 腫瘍細胞, リンパ球様細胞に染色された。腫瘍層では特に基底膜に近い腫瘍細胞でより強く染色された (図2)。

IL-6 と IL-8 は, 同様の分布であった。ともに腫瘍細胞とリンパ球様細胞に染色された。腫瘍層は, 最表層の腫瘍細胞により強く染色された (図3, 図4)。

考 察

鼻アレルギー患者の鼻粘膜上皮層に集積している粘

図4 鼻 Inverted papilloma 組織中の IL-8 の分布
IL-6 と同様に、腫瘍最表層に染色された。

膜型肥満細胞の集積に鼻粘膜上皮層の微小環境が重要な役割を果たしていることは以前から指摘されている^{4,6)}。我々は以前、鼻粘膜上皮細胞が増殖時に肥満細胞の分化、集積に関与する因子を産生する可能性を *in vitro* の実験で報告した⁴⁾。さらに、鼻アレルギー患者の鼻粘膜上皮細胞や鼻茸上皮細胞は、増殖時に GM-CSF と IL-6 をより多く産生することを示した⁷⁾。一方鼻 Inverted papilloma 組織内にも鼻アレルギー患者の鼻粘膜上皮層同様、多数の粘膜型肥満細胞が分布している¹⁾²⁾³⁾。鼻 Inverted papilloma は鼻粘膜上皮細胞が腫瘍性に増殖した状態であり、腫瘍細胞が増殖する時に産生するサイトカインが肥満細胞の集積に関与している可能性が考えられる。事実、腫瘍内で増殖が著しい基底膜近傍に著明な粘膜型肥満細胞の集積を認めている¹⁾²⁾³⁾。

本研究で、鼻 Inverted papilloma 腫瘍細胞の培養上清中には GM-CSF, IL-6, IL-8 が存在することが明らかになった。本研究に用いた培養系は腫瘍細胞のみの培養であり、培養上清中のサイトカインは鼻 Inverted

papilloma 腫瘍細胞で産生、分泌されたものと考えられる。つまり、鼻 Inverted papilloma 腫瘍細胞は、腫瘍でありながらサイトカインを産生する上皮細胞の性質を有している。培養系でのサイトカイン産生量を鼻アレルギー患者の下鼻甲介上皮細胞と比較すると、IL-6 と IL-8 は有意に多く、GM-CSF は有意に少ないことが分かった。しかし、これらの産生量の差が正常細胞と腫瘍細胞の差によるものかは明らかでない。

今回さらに、GM-CSF, IL-6, IL-8 の分布を免疫組織学的手法で検討した結果、GM-CSF は基底膜近傍の腫瘍層に多く存在し、その分布が鼻 Inverted papilloma 組織中での肥満細胞の分布と類似していた。鼻 Inverted papilloma 培養上清中には好塩基性細胞好酸球コロニー刺激活性が存在し⁹⁾、また抗 GM-CSF 抗体添加で鼻 Inverted papilloma 培養上清中の好塩基性細胞好酸球コロニー刺激活性が抑制される報告¹⁰⁾のあることを考え合わせると、粘膜型肥満細胞の分化、集積には GM-CSF が強く関与している可能性がある。

GM-CSF の分布とは対照的に、IL-6 と IL-8 は腫瘍層の最表層に多く分布していた。IL-8 は、細菌感染やウイルス感染に対して好中球や T リンパ球の遊走能の亢進に関与していると言われている¹¹⁾¹²⁾。鼻 Inverted papilloma はその多くにヒトパピローマウイルスの感染が証明されており¹³⁾¹⁴⁾、また腫瘍の周囲に細菌感染を合併することはしばしば認められる。IL-8 が腫瘍層の最表層に存在することも、これらの感染に対するものとして存在すると考えられた。

我々は以前、鼻アレルギー患者の鼻粘膜上皮層においても同様にサイトカインの分布を検討したが、鼻粘膜上皮層はほぼ単層であり、上皮層内での偏在を明らかにすることはできなかった。鼻 Inverted papilloma は上皮細胞由来の腫瘍層が増殖、肥厚しており、サイトカインの分布の違いを明らかにすることができた。

ま と め

1. 鼻 Inverted papilloma 腫瘍細胞は GM-CSF, IL-6, IL-8 を産生していた。
2. GM-CSF は鼻 Inverted papilloma 腫瘍細胞、特に基底膜近傍に多く存在していた。
3. IL-6, IL-8 は鼻 Inverted papilloma 腫瘍細胞、特に最表層に多く存在していた。
4. 鼻 Inverted papilloma 腫瘍内の GM-CSF の分布は鼻 Inverted papilloma 組織内での粘膜型肥満細胞の分布に類似しており、この集積に GM-CSF が強

く関与している可能性が示唆された。

文 献

- 1) 横島一彦, 大西正樹: 鼻 Inverted papilloma 組織中の肥満細胞, 好酸球の分布について. 日耳鼻 96: 774-779, 1993.
- 2) Yokoshima K, Ohnishi M, Takizawa R et al: Distribution of mast cells in inverted papilloma and squamous cell carcinoma of the nose. AJ Rhinol in printing
- 3) 横島一彦, 大西正樹, 奥田 稔, 大久保公裕: 鼻 Inverted papilloma 組織中の肥満細胞と好酸球の超微細構造. 日耳鼻 97: 2219-2225, 1994.
- 4) Okuda M, Sakaguchi H, Suzuki F et al: Ultrastructural heterogeneity of the basophilic cells in the allergic nasal mucosa. Ann Allergy 54: 152-157, 1985.
- 5) Kobayashi T, Nakano T, Nakahata T et al: Formation of mast cell colonies in methylcellulose by mouse peritoneal cells and differentiation of these cloned cells in both the skin and the gastric mucosa of W/W^v mice: evidence that a common precursor can give rise to both "connective tissue-type" and "mucosal" mast cells. J Immunol 136: 1378-1384, 1986.
- 6) Ohnishi M, Ruhno J, Bienenstock J et al: Hematopoietic growth factor production by cultured cells of human nasal polyp epithelial scrapings: kinetics, cell source, and relationship to clinical status. J Allergy Clin Immunol 83: 1091-1100, 1989.
- 7) 滝沢竜太, 大西正樹, 大久保公裕, 横島一彦, 奥田 稔 他: 鼻粘膜培養上清中のサイトカイン. 耳鼻免疫アレルギー 11: 122-123, 1993.
- 8) 大西正樹, 滝沢竜太, 横島一彦, 大久保公裕, 奥田 稔: 鼻粘膜上皮細胞の Tumor Necrosis Factor- α 産生と Fluticasone propionate による産生抑制. アレルギー投稿中.
- 9) 大西正樹, 横島一彦, 肖 水芳, 池田雅一, 藤倉輝道 他: 鼻 Inverted papilloma 細胞培養上清中の好塩基細胞/好酸球分化増殖因子. アレルギー 42: 94-100, 1993.
- 10) 大西正樹, 横島一彦, 大久保公裕, 滝沢竜太, 奥田 稔 他: 抗 GM-CSF 抗体の鼻 Inverted papilloma 培養上清中のコロニー刺激活性への影響. 耳鼻免疫アレルギー 12: 23-27, 1994.
- 11) Matsushima K, Baldwin ET, Mukaida N: Interleukin-8 and MCAF; novel leukocyte recruitment and activating cytokines. Chem Immunol 51: 236-265, 1992.
- 12) Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N et al: Properties of the novel proinflammatory supergene "interleukins" cytokine family. Annu Rev Immunol 9: 617-648, 1991.
- 13) Judd R, Zaki SR, Coffield LM et al: Sinonasal papillomas and human papillomavirus. Human Pathol 22: 550-556, 1991.
- 14) Skyldberg B, Kalantari M, Karki M et al: Detection of human papillomavirus infection in tissue blocks by in situ hybridization as compared with a polymerase chain reaction procedure. Human Pathol 22: 578-582, 1991.
- 15) Lamas AM, Mulroney CM, Schleimer RP: Studies on the adhesive interaction between purified human eosinophils and cultured vascular endothelial cells. J Immunol 140: 1500-1505, 1988.

稿を終えるにあたり, ご校閲いただいた八木聰明教授に感謝いたします。

本研究の一部は, 第12回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 50th American Academy of Allergy and Immunology, 第5回日韓耳鼻咽喉科学会で発表した。

(1994年6月7日受稿 1994年10月31日受理)

別刷請求先 〒113 東京都文京区千駄木1-1-5

日本医科大学耳鼻咽喉科学教室 横島一彦

A 98—0080—40514

日耳鼻

舌神経内における鼓索神経繊維の計量形態学的研究

——口腔内麻酔による味覚障害を防ぐ基礎として——

渡辺健一・富田 寛 (日大)

村上 敏 (同・第一解剖)

鼓索神経成分は舌神経内において、後外側から浅側に位置していた。また、鼓索神経成分は舌神経固有成分に比べて有意に細かった。さらに、舌神経には2-3本の顆粒膜枝が必ず存在しており、下歯槽神経等に加えて舌神経も麻酔の標的にせざるを得ないことが分かった。以上の結果から、鼓索神経成分に含まれる味覚線維も、下神経固有成分以上に口腔内麻酔の影響を受けやすいことが示唆された。潜在的な医原性味覚神経障害に対する一層の注意を喚起したい。

A 98—0090—60331

日耳鼻

ヒト喉頭室の扁平上皮化生に関する臨床病理学的研究

——喉頭室における発癌母地としての評価——

小川佳伸 (奈良医大)

喉頭室原発の癌の発生母地を解明するために肉眼的に喉頭室に病変を認めない22個のヒト摘出喉頭を用いて臨床病理学的な検討を行い以下の結果を得た。1) 喉頭室のコンピュータグラフィックス化を行いその複雑な形状を示した。2) 著者分類の「浅陥凹型」部分は、喉頭室の中でも特に扁平上皮化生が強く進み、発癌の準備段階として重要であると思われた。3) 「浅陥凹型」部分は喉頭室の前後に分布していた。これは喉頭室原発の癌の臨床的な好発部位とよく一致しており、喉頭室原発の癌の発生母地として重要であると思われた。4) 喉頭室粘膜上皮も症例によっては、かなりの範囲で扁平上皮化生が起こり、喫煙や飲酒の影響で高度に進行することも示された。

A 98—0066—30821

日耳鼻

鼻 Inverted papilloma 腫瘍細胞のサイトカイン産生とその分布

横島一彦・大西正樹・滝沢竜太・バワンカール ルビー

大久保公裕・奥田 稔 (日医大)

鼻 Inverted papilloma 腫瘍内には鼻アレルギー——鼻粘膜上皮層同様に粘膜型肥満細胞が集積している。その集積メカニズムを明らかにするために、鼻 Inverted papilloma 腫瘍細胞から産生されるサイトカインについて研究を行った。

腫瘍細胞の培養上清中には GM-CSF, IL-6, IL-8 が検出された。IL-6 と IL-8 は腫瘍層の最表層に存在するのにに対し、GM-CSF は基底膜近傍に存在していた。GM-CSF の分布は粘膜型肥満細胞の分布と同様で、その集積に GM-CSF が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。この結果は、鼻アレルギー——鼻粘膜上皮層での粘膜型肥満細胞の集積メカニズムを考える上でも重要な意味を持っているものと考えた。

A 98—0071—23010

日耳鼻

鼓室内注入液の浸透圧が蝸牛有毛細胞の形態に及ぼす影響

——走査電顕による基礎的研究——

向井康朗・石山英一 (日大)

従来より内耳障害を引き起こす薬剤は現在までに多く知られている。これらの薬剤は臨床的、基礎実験的に聴器毒性が確認されているものも多い。日常の臨床において慢性中耳炎などに対して、抗生物質などの点耳薬を使用して治療を行うことも決して少なくない。著者は鼓室内に注入する薬物の有する薬理作用のみにより内耳障害が出現することに疑問を持ち、注入する溶液の浸透圧に注目した。鼓室内に注入する溶液の浸透圧が内耳のなかでもとくに脆弱な蝸牛有毛細胞の聴毛に対する影響を聴器毒性を有していないと考えられる溶液を精製し、モルモットを用いて走査型電顕により鼓室内注入液の浸透圧と蝸牛有毛細胞の聴毛との関係を実験的に研究を行い興味ある結果が観察された。