鼻粘膜のフィブロネクチンと好酸球の検討

高村 博光・高崎 賢治・弦本 日芳

Immunohistochemical Study of the Human Nasal Mucosa for Fibronectin and Eosinophils

Hiromitsu Takamura, Kenji Takasaki and Hiyoshi Tsurumoto

(Nagasaki University School of Medicine)

The distribution of fibronectin, an extracellular matrix component, was examined in patients with nasal allergy and in non-allergic patients. The distribution and the number of EG2 positive cells in the nasal mucosa was investigated with respect to the clinical effects of anti-allergic agents.

We investigated 11 patients with nasal allergy (5 males and 6 females, age 19 to 57 years) and 8 non allergic patients (6 males and 2 females, age 16 to 72 years). Biopsy specimens were obtained from the inferior turbinate under general or local anesthesia, and then frozen at -70°C . The samples were then sectioned to a thickness of $4\text{ }\mu\text{m}$ using a cryostat. The presence of fibronectin, EG2 positive cells and macrophages was then identified using each monoclonal antibodies and streptavidin-biotin peroxidase complex staining method (DAKO).

In this study, we found that fibronectin was distributed mainly around the basement membrane and vessel walls, and its distribution was similar between patients with nasal allergy and non-allergic patients. The clinical effects of anti-allergic agents correlated well with the number of EG2 positive cells in the superficial layer, but not with the distribution of fibronectin in the nasal mucosa.

Key words : fibronectin, eosinophil, nasal allergy

はじめに

アレルギー性炎症において、種々の細胞が局所で重要な役割を演じていることは数多く論じられており、最近では血管内皮細胞や細胞外マトリックスと白血球との接着においてインテグリンファミリー、Ig スーパーファミリー、セレクトインファミリー等の接着分子の関与が明らかにされ、これらを介した組織への接着、浸潤、さらには組織内での作用等が注目を集めている¹⁾。今回、われわれは鼻アレルギー患者および非アレルギー患者の下鼻甲介粘膜を用い、リンパ球や好酸球等の細胞に発現するVLA-4やVLA-5などインテグリンファミリーに属する接着分子に対するリガンドとされる細胞外マトリックスであるフィブロネクチンに注目し、その局在を中心

に免疫組織学的(LSAB法)に検討した。また、抗アレルギー剤である塩酸アゼラスチン投与前後におけるフィブロネクチンおよび活性化好酸球であるEG2陽性細胞数についてその影響をみるとともに濾胞を形成した部分については抗フィブロネクチン抗体に加え、マクロファージを認識する抗CD11c抗体を用い検討した。

対象と方法

1) 対 象

平成6年および平成7年に長崎大学医学部耳鼻咽喉科、長崎原爆病院耳鼻咽喉科、長崎三菱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5名、女性6名、年齢は19歳から57歳まで(このうち薬剤投与の検

討は男性 2 名, 女性 3 名, 年齢 19 歳から 27 歳まで (表 1)), 非アレルギーと診断された入院患者 (全て慢性副鼻腔炎) で男性 6 名, 女性 2 名, 年齢は 16 歳から 72 歳までであった. アレルギーの診断として鼻症状があり, 鼻汁中好酸球陽性かつ抗原が同定できたもの (全例 HD 陽性であった) をアレルギーと診断し, 非アレルギーの診断は皮内反応あるいは RAST, 鼻粘膜誘発反応, 鼻汁中好酸球等のアレルギー検査がすべて陰性であることとした. なお, 鼻アレルギー患者 (薬剤投与前含む) については鼻粘膜切除は初診時あるいは少なくとも 2 週間以上鼻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. 薬剤投与前では薬物投与前および塩酸アゼラスチン 1 mg 錠 1 日 2 回投与 4 週間後にそれぞれ下鼻甲介粘膜切除を施行した.

2) 方 法

鼻アレルギー患者については下鼻甲介粘膜前端部を 4 %キシロカインにより表面麻酔を行った後切除, 非アレルギー患者については局所麻酔, 全身麻酔下の鼻, 副鼻腔手術の際に同部を切除した. 尚, 粘膜切除については事前に患者に十分説明を行い承諾を得た後施行している. アセトンドライアイスにて -70°C に凍結保存, クリオスタットにて $4\ \mu\text{m}$ の凍結切片を作成し, 室温乾燥, 4°C アセトンで 10 分間固定, 3 %過酸化水素にて内因性ペルオキシダーゼ除去, 正常ヤギ血清にて非特異的反応を阻止した後, 一次抗体としてモノクローナル抗体である抗フィブロネクチン抗体 (アフィニティーリサーチプロダクト社, FG-6010) EG₂ 抗体 (pharmacia) および抗 CD11c 抗体 (セイガクコーポレーション) (それぞれ 37°C 20 分間反応), 二次抗体にビオチン標識抗マウス免疫グロブリン・ヤギ抗体 (37°C 10 分), 酵素試薬にペルオ

キシダーゼ標識ストレプトアビジン (37°C 10 分) を使用し, 発色基質に 3 % AEC 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. また, 陰性コントロールとして一次抗体のかわりにウサギ正常血清を用い染色されないことを確認した. 洗い出しには TBS (pH : 7.6) を使用した. また, EG₂ 陽性細胞数のカウントは粘膜固有層浅層を上皮下の固有層, 粘膜固有層深層をさらに深い部位で細胞浸潤が比較的均一な部位とし, 400 倍で 3 カ所カウントし, その平均を採用した. なお, マクロファージについては鼻アレルギー下甲介粘膜において抗 CD11c 抗体と抗 CD68 抗体を用い検討を行ったが今回, 濾胞の認められた切片については抗 CD11c 抗体を一次抗体として使用した.

結 果

1) 鼻アレルギー患者下甲介粘膜におけるフィブロネクチンの分布について

フィブロネクチンは下甲介粘膜において上皮層では肥厚した基底膜に強く陽性を示したが, 上皮細胞ではすべての症例でほとんど染色されなかった (図 1). また, 円形細胞周辺に強く陽性を示す部位もあった. 粘膜固有層では, 血管内皮およびその周囲に特に強く陽性を示し (図 2), 間質でも染色されたが固有層浅層と深層で差は認められず, 腺細胞ではほとんど染色されなかった (図 3). また濾胞を形成した部分にもフィブロネクチンが比較的大型の細胞に陽性を示し, 樹枝状の形態をとり (図 4) 同一の濾胞におけるマクロファージと分布, 数が非常に類似していた (図 5).

2) 非アレルギー患者の下甲介粘膜におけるフィブロ

表 1 抗アレルギー剤投与の影響

症例	年齢/性	EG ₂ 陽性細胞数(個)(×400)				臨床症状	局所所見
		薬剤投与前		薬剤投与後			
		浅層	深層	浅層	深層		
1	21 女	16.7	2.7	10.7	5.7	改善	軽度改善
2	19 女	40.7	1.3	20.0	5.7	改善	軽度改善
3	25 男	40.7	1.7	39.3	2.3	不変	不変
4	27 男	52.7	1.3	48.7	14.0	増悪	やや増悪
5	21 女	49.3	47.3	36.7	8.3	軽度改善	軽度改善

図1 基底膜におけるフィブロネクチンの分布(×400) (LSAB法)
フィブロネクチンが基底膜に陽性を示した(矢印)。

図4 濾胞部位におけるフィブロネクチンの分布(×400) (LSAB法)
濾胞内にフィブロネクチン(矢印)が陽性を示した。

図2 粘膜固有層におけるフィブロネクチンの分布(×100) (LSAB法)

図5 濾胞部位におけるマクロファージの分布(×400) (LSAB法)
濾胞内にマクロファージ(矢印)が認められ、フィブロネクチンと分布数が類似していた。

図3 血管周囲、腺細胞におけるフィブロネクチンの分布(×400) (LSAB法)
血管およびその周囲ではフィブロネクチンは強く陽性を示すが腺細胞(矢印)では染色されない。

ネクチンの分布について

非アレルギー患者においても鼻アレルギー患者と同様に基底膜、血管およびその周囲、腺周囲に陽性を示したが(図6)鼻アレルギーの有無においてもまた非アレルギー症例の各症例間にも差は認められなかった。さらに上皮細胞直下において上皮剥離とフィブロネクチンの発現にも一定の傾向はなかった。

3) 抗アレルギー剤投与の影響について

フィブロネクチンの分布については投与前後において基底膜、血管およびその周囲、腺周囲等で明らかな発現の変化は認められなかった(図7)。EG2陽性細胞については上皮層、粘膜固有層浅層を中心に陽性細胞を認め

図6 非アレルギー患者におけるフィブロネクチンの分布(×100) (LSAB 法)

図8 鼻アレルギー患者下甲介粘膜中の EG2 陽性細胞(×200) (LSAB 法)

下甲介粘膜浅層を中心に EG2 陽性細胞が認められた。

図7 抗アレルギー剤投与前後におけるフィブロネクチン(血管周囲)の分布(左:投与前, 右:投与後)(×400) (LSAB 法)

(図8), 浅層においては5例中3例で減少傾向, 2例はほぼ不変, 深層では減少1例, 増加3例, 不変1例で深層については一定の傾向は認められなかった. 臨床症状, 局所所見の変化と比較すると浅層において EG2 陽性細胞数減少を認めた症例でいずれも改善傾向が認められた(表1).

考 察

フィブロネクチンは VLA-3, 4, 5 や $\beta 3$ インテグリンに属する接着分子に対するリガンドである²⁾. フィブロネクチンは主に血液中存在するが細胞外マトリックスにも存在する糖蛋白で, 主要な生理活性を示すと 1)細胞接着, 伸展の促進, 2)細胞移動の促進, 3)細胞分化の調節, 4)組織修復などがあり³⁾, またフィブロネク

チンはオプソニンとしてマクロファージの貪食作用を促進し、組織崩壊物の除去にも関与している⁴⁾。アレルギー疾患においては、最近では血液中から組織中に侵入した好酸球が VLA-4 を介してフィブロネクチンと接着し機能を発揮し、結果的に好酸球の生存延長にも関与している⁵⁾などの報告やフィブロネクチンとの接着により LTC4 の産生促進が起こるとの報告もあり⁶⁾注目されている。過去慢性副鼻腔炎の副鼻腔粘膜における検討では血管周囲でのフィブロネクチン発現が認められている⁷⁾が未だその報告は多いとはいえず今後他の鼻疾患においても検討が必要と思われる。またマスト細胞においては FcεRI を介したマスト細胞の活性化が VLA-4、VLA-5 といったインテグリン分子を介したフィブロネクチンへの接着により増強することが明らかになっており、一般に粘膜や皮下組織など細胞外マトリックスに富む環境に存在するマスト細胞が低濃度で抗原に反応できることにこれらインテグリンのシグナルの関与が重要であると考えられている⁸⁾。

さらにフィブロネクチンは線維芽細胞や血管内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージから分泌されることが知られており⁹⁾、正常血管壁内膜での存在も観察されている。今回われわれが下甲介粘膜を用いた結果、フィブロネクチンが血管周囲や基底膜に強く発現していたことはこれらの事実と関連していると考えられ、さらに VLA-4 等を介した好酸球等の炎症細胞の集積、浸潤への関与も今後興味をもたれると思われる。また、濾胞内でフィブロネクチンが散在性に陽性を示した部位でフィブロネクチンレセプターをもつ CD11c 陽性細胞であるマクロファージと相関が認められたことは分泌されたフィブロネクチン自体がレセプター部位に一致して存在したフィブロネクチンが観察されたのではないかと考えている。

角膜においては上皮欠損において欠損部の実質表面に強くフィブロネクチンが観察されている¹⁰⁾が、今回の切除粘膜における上皮剥離部位でフィブロネクチンの分布に一定の傾向がなかったことは粘膜切除あるいは切片作成の際に上皮が剥離した可能性もあるため今後上皮、基底膜の部位にも注目しながら検討していきたい。

抗アレルギー剤の投与の影響については症例が 5 例と少なかったものの今回の結果のみから考察すると抗アレルギー剤投与により粘膜固有層深層の活性化好酸球浸潤にあまり変化はみられず浅層において EG₂ 陽性細胞数が減少していたことから組織内での好酸球活性化抑制に

おける抗アレルギー剤の関与が考えられた。しかしながら組織に浸潤した好酸球はかなりの割合ですでに活性化している可能性もあり、活性化好酸球の組織内浸潤、粘膜固有層浅層への組織内移動に対する抗アレルギー剤の関与も考えられると思う。

また抗アレルギー剤投与においてフィブロネクチンの分布には明らかな変化が認められなかったことからフィブロネクチン発現の強さと好酸球の組織内における局在との関与を明らかにするのは困難であった。

今後症例を増やすと共にフィブロネクチンレセプター等の局在、鼻茸その他の鼻疾患においても同様に検討していきたいと思う。

まとめ

1. 鼻アレルギー患者および非アレルギー患者の下鼻甲介粘膜を用い、細胞外マトリックスであるフィブロネクチンの分布について免疫組織学的に検討した。さらに抗アレルギー剤の投与によるフィブロネクチンの分布、活性化好酸球への影響についても考察した。

2. 鼻アレルギー患者においてはフィブロネクチンは基底膜、血管内皮およびその周囲に強く陽性を示した。非アレルギー患者においても同様の傾向を示し、アレルギーの有無において明らかな差異は認められなかった。

3. 抗アレルギー剤投与前後においてフィブロネクチンの発現に差は認められなかったが活性化好酸球数は投与後で粘膜固有層浅層において減少傾向が認められた。

本論文の要旨は第34回日本鼻科学会(平成7年10月)、第45回日本アレルギー学会(平成7年10月)において口演した。

参考文献

- 1) 八木田秀雄: アレルギーと接着分子. アレルギーの領域(宮本昭正, 石川 哮, 飯倉洋治編). 668~674頁, 医薬ジャーナル社, 大阪, 1994.
- 2) 寺木祐一, 塩原哲夫: 皮膚と接着分子. アレルギーの領域(宮本昭正, 石川 哮, 飯倉洋治編). 700~706頁, 医薬ジャーナル社, 大阪, 1994.
- 3) 林 正男: 細胞外マトリックス蛋白質. 接着分子(宮坂昌之編). 1~11頁, 中外医薬社, 東京, 1993.
- 4) Bevilacqua MP, Amrani D, Mosesson MW, et al: Receptors for cold-insoluble globulin (plasma fibronectin) on human monocytes. *J Exp Med* 153: 42~60, 1981.
- 5) Anwar ARF, Moqbel R, Walsh GM, et al: Adhesion to

- fibronectin prolongs eosinophil survival. *J Exp Med* **177** : 839~843, 1993.
- 6) Neeley SP, Hanman KJ, Dowling TL, et al : Augmentation of stimulated eosinophil degranulation by VLA-4 (CD49d)-mediated adhesion to fibronectin. *Am J Respir Cell Mol Biol* **11** : 206~213, 1994.
- 7) Ishida M, Matsunaga T and Uda H : An immunohistological study of nasal and paranasal mucosa of patients with relapsing chronic sinusitis. *Rhinology* **22** : 115~118, 1984.
- 8) 安田勝彦, 八木田秀雄 : マスト細胞の活性化と接着分子. *臨床免疫* **26** : 124~132, 1994.
- 9) 関口清俊, 市原啓子 : フィブロネクチンマトリックスの形成機構. *実験医学* **11** : 119~126, 1993.
- 10) 西田輝夫 : 上皮創傷治癒における細胞外マトリックスの役割. *実験医学* **11** : 151~155, 1993.

(原稿受付 : 平成 7 年 12 月 4 日
原稿採択 : 平成 8 年 2 月 28 日
別刷請求先 : 高村博光
〒852 長崎市坂本町7-1
長崎大学医学部耳鼻咽喉科学教室)