アレルギー性炎症と鼻粘膜過敏性

—鼻アレルギーモルモットにおける検討—

今野 昭義・伊藤 永子*・寺田 修久*

Nasal Hyperreactivity and Allergic Inflammation in Nasal Allergy

Akiyoshi Konno

(Chiba University)

Eiko Ito and Nobuhisa Terada

(Akita University School of Medicine)

An animal experiment was performed to elucidate the effects of systemic antigen sensitization followed by repeated nasal antigen challenges on nasal reactivity to histamine and its histopathological and immunopharmacological backgrounds. One hundred and eleven Hartley strain guinea pigs were sensitized with ovalbumin intraperitoneally 7 times every 2 weeks, followed by nasal antigen challenges once daily for 7 days. Nasal reactivity to histamine and to antigen was evaluated by recording the respiratory noises. 1 week after repeated antigen challenges, single antigen challenge was performed. After recording of the respiratory noises, the animals were decapitated consecutively. The nasal mucosa of the left nasal cavity was removed immediately and the contents of LTC₄ in the nasal mucosa were measured by radioimmunoassay combined with HPLC. The right nasal cavity including the nasal septum was cut vertically at a fixed level and the numbers of eosinophils and neutrophils in the nasal mucosa of an entire vertical section of the nasal cavity were calculated.

During the 12 weeks of systemic sensitization, no change was observed in nasal reactivity to histamine. However it increased dramatically during the 1 week of repeated antigen challenge. The numbers of eosinophils and neutrophils increased significantly after a single antigen challenge, reaching a peak at the 12th and 3rd hour, respectively. Both LTC₄ and LTD₄ increased significantly in 15 minutes and lasted for 3 hours after the antigen challenge. However second peak corresponding to the peak of eosinophil infiltration in the nasal mucosa could not be observed. Increase of respiratory noise could not be observed at the time of maximum eosinophil infiltration. The present study revealed a close association between the development of nasal hyperreactivity and that of allergic inflammation in the nasal mucosa. However lack of findings to show degranulation of markedly infiltrated eosinophils in late phase indicated the possible participation of other factors besides degranulation of eosinophils in the late phase.

Key words: nasal allergy, nasal hyperreactivity, eosinophil, LTC₄, guinea pig

千葉大学医学部耳鼻咽喉科学教室

* 秋田大学医学部耳鼻咽喉科学教室

はじめに

気道アレルギーにみられる気道過敏症状の発現には、原因か結果かの議論はあるものの、気道過敏性亢進状態が必要である。しかしその発現機序は明らかでなく、好酸球から放出される塩基性蛋白による上皮損傷によるとする報告^{1)~5)}、血小板活性化因子 (PAF) ペプチドロイコトリエン (LTs) などの chemical mediator の関与⁶⁾ さらに素因の関与を示唆する報告⁷⁾ がある。今回は鼻アレルギーにおける鼻粘膜過敏性の発現に、抗原による感作と抗原誘発後の鼻粘膜にみられるアレルギー性炎症の進行がどのように関与するのかを明らかにする目的で動物実験を行った。

実験動物および方法

Hartley 系雄性モルモット (体重 250~300 g) 110匹を用いて、これらを3群に分けた。

I 群31匹では卵白アルブミン (以下 OA と略) 20 μ g を抗原とし、水酸化アルミニウム 10 mg をアジュバントとして生理的食塩水 1 ml に溶解し、2週間隔で7回腹腔内感作した。さらに感作終了日から1% OA 10 μ l $\times$ 3 をマイクロピペットを用いて左右の鼻腔に1日1回、7日間滴下して抗原誘発を反復した。感作経過中は2週間毎に採血し、血清 IgE 抗体および γ_1 抗体値を Ovary らの方法⁸⁾ に従った PCA 反応によって測定した。

II 群25匹ではI群と同じスケジュールに従って腹腔内感作および点鼻抗原誘発を行い、12週間の腹腔内感作期間は2週間隔で、また7日間

の抗原点鼻誘発期間はその前後で鼻粘膜ヒスタミン反応を測定した (図1)。鼻粘膜ヒスタミン反応はマイクロピペットを用いて1%塩酸ヒスタミン生理的食塩水溶液 10 μ l を左右の鼻腔に滴下し、10分後の鼻粘膜腫脹および鼻汁による鼻呼吸音の変化を補聴器 (Philip 4D 421) を改変して作製した高感度音圧計の感度を一定 (最高レベル) とし、そのプローブの先端をモルモットの外鼻孔の2 mm 前方においてサーマルアレイレコーダー (WS-681G, 日本光電) 上に記録した (図2)。10匹のモルモットを用いた予備実験によって Evans blue 10 μ l を両側鼻腔に点鼻し、点鼻10分後に摘出した鼻粘膜気管粘膜上の Evans blue 量を分光光度計にて測定し、左右の鼻腔に点鼻された 10 μ l ずつの Evans blue は気管、気管支に吸収されないことを確認しておいた。また 10 μ l ずつの生理的食塩水を左右の鼻腔に点鼻しても、10分後には、呼吸雑音を生ずることはないことを確認しておいた。ヒスタミン誘発前にはすべてのモルモットで呼吸音は全く記録されないが、誘発後には種々な大きさの呼吸雑音を記録できた (図3)。呼吸音の大きさはモルモットの体位によって影響を

図2 モルモットにおける鼻粘膜過敏性の測定法

図1 卵白アルブミン腹腔内感作・点鼻誘発スケジュール

図3 抗原誘発前後の鼻呼吸雑音

うけ, 鼻粘膜反応が軽度の場合には倒立位で初めて呼吸音を記録できるが, いずれかの体位によって 20 db 以上の大きさの呼吸雑音を記録できた場合, ヒスタミン反応陽性と判定した。

Ⅲ群54匹はⅠ群, Ⅱ群と同じスケジュールに従って腹腔内感作, 7日間連続点鼻抗原誘発を行い, 1週間放置した後に左右の鼻腔で抗原誘発 (1% OA, $10\mu\text{l} \times 3$) を1回行った。次に6匹を1群として抗原誘発前, 15分後, 30分後, 1時間後, 3時間後, 6時間後, 12時間後, 24時間後, 48時間後の9群に分けて経時的に前述の方法を用いて鼻粘膜腫脹, 鼻汁による呼吸雑音の有無を判定し, 測定直後に屠殺して, 直ちに鼻腔を採取した (図4)。正常モルモット6匹をコントロールとした。採取した鼻腔の右側は組織学的観察に用い, また鼻中隔を含む左側

図4 抗原誘発後の鼻粘膜組織内好酸球数の経時的变化観察のスケジュール

図5 鼻粘膜組織内炎症性細胞の測定部位

の鼻粘膜は chemical mediator 測定に用いた。光顕組織は10%ホルマリン固定後脱灰し, 鼻尖から 1 cm の部位で前額断して, パラフィン切片を作製した。標本は HE, PAS, alcian blue, Giemsa 染色を行い, 好酸球は Giemsa 染色, 好中球は PAS 染色で400倍拡大で観察し, 上皮および血管外固有粘膜層 (以下組織内と記す) と血管内に分けて, 図5に示す標本内に認められる全ての好酸球および好中球をカウントした。鼻粘膜内 LTC₄, LTD₄ は採取鼻粘膜を図6の如く処置した後に既報の HPLC-RIA 法⁹⁾を用いて測定した。推計学的分析には t 検定を用いた。

成績

1) 腹腔内感作による血清 IgE 抗体値, γ_1 抗体値の経時的变化

7日間 PCA 反応による血清 IgE 抗体値は経時的に上昇し, 腹腔内感作終了時の12週では 1664 ± 768 倍に達した (図7)。また48時間 PCA

* まれに浮遊物あり
ナイロンメッシュで除去

図6 HPLC-RIA による LTC₄, LTD₄ の測定法と鼻粘膜処理法

反応による γ_1 抗体値は12週では 5632 ± 2508 倍に達した (図8)。

2) 腹腔内感作および点鼻抗原誘発による鼻粘膜ヒスタミン過敏性の変化

鼻粘膜ヒスタミン反応陽性率は感作前には32%であったが、12週後の感作終了時には44%、13週後の点鼻抗原誘発終了時には92%に増加した。

感作前と感作開始12週後のヒスタミン反応陽性率に推計学的有意差はみられないのに対して、12週後と13週後のヒスタミン反応陽性率の違いは推計学的に有意 ($p < 0.01$) であった (図9)。

図7 モルモット卵白アルブミン腹腔内感作による血清 IgE 抗体値の経時的変化

図8 モルモット卵白アルブミン腹腔内感作による血清 γ_1 抗体値の経時的変化

3) 抗原誘発後の鼻症状の経時的变化

抗原誘発15分後および30分後にはすべての動物で呼吸雑音を記録でき、また60分後にも69% (25/36) のモルモットで呼吸雑音を記録できたが、抗原誘発3時間以降に呼吸雑音を記録できたモルモットはいなかった。

4) 抗原誘発後の鼻粘膜組織内好酸球、好中球数の経時的变化

血管内の好酸球は抗原誘発30分後に増加し始め、3時間でピークに達し、以後徐々に減少するものの12時間後までは有意な高値を維持した。血管内の好酸球数は抗原誘発後30分で一度有意な減少を示した後に、徐々に増加し、12時間後にピークを示し、48時間後にも有意な高値を維持した (図10)。

好中球は抗原誘発後まもなく鼻粘膜血管内に集

図9 卵白アルブミン感作鼻アレルギーモルモットにおける抗原反復誘発が鼻粘膜ヒスタミン過敏症に与える影響

図10 抗原誘発後の鼻粘膜組織内好酸球数の経時的变化

積し, 1 時間後にピークに達し, その後急激に減少した. 血管外の好中球数は誘発後 3 時間でピークを示し, その後, 徐々に減少するものの, 48 時間後にも有意な高値を維持した (図11).

図11 抗原誘発後の鼻粘膜組織内好中球数の経時的变化

図12 抗原誘発後の鼻粘膜組織内 LTC₄ の経時的变化

図13 抗原誘発後の鼻粘膜組織内 LTD₄ の経時的变化

ピーク時における血管外の好酸球と好中球の数の比は 2 : 1 であった.

5) 抗原誘発後の鼻粘膜組織内 LTC₄, および LTD₄ 値の経時的变化

鼻粘膜組織内 LTC₄, LTD₄ 値の経時的变化を示す. いずれも抗原誘発後15分から60分の即時型反応の時期に著明なピークを作った後に徐々に減少したが, LTC₄, LTD₄ 値ともに抗原誘発 3 時間後までは有意な増加を維持した. しかし鼻粘膜組織内好酸球数がピークを示す遅発型反応の時期に第 2 のピークを認めることはなかった (図12, 13).

考 察

花粉症症例にみられる鼻粘膜過敏性は花粉飛散期に亢進し, 花粉非飛散期には正常レベルまで低下する¹⁰⁾, 花粉非飛散期の花粉症症例を対象として一回の鼻粘膜抗原誘発後に鼻腔洗浄を行い, 鼻腔洗浄液中の炎症細胞数および chemical mediator の濃度変化を経時的に観察すると, 抗原誘発 6~12 時間後に好酸球, 好塩基性細胞, 好中球を中心とする著明な炎症細胞の遊走と, LTC₄, LTD₄, LTE₄ などのペプチドロイコトリエン (LTs), PAF その他の chemical mediator の上昇を認める^{11)~13)}. EG₂ マーカーを指標として好酸球活性化の変化をみると好酸球活性化率はこの遅発反応の時期に亢進し, また活性化好酸球から放出される鼻洗浄液中 ECP 濃度の上昇もこの時期に著明である^{14)~16)}. さらに遅発反応の時期に認められる鼻腔通気抵抗上昇の程度は鼻洗浄中の活性化好酸球の数と有意の相関を示す¹⁵⁾. この時期に増加する LTC₄ の由来は明らかではないが, 活性化好酸球の脱顆粒によるものである可能性が考えられる¹⁷⁾. 気管支喘息および鼻アレルギーにおける気道過敏性亢進は遅発反応, 特にこの時期に増加する活性化好酸球に由来する ECP, MBP などの塩基性蛋白による組織傷害と密接に関係するとの報告が少なくない^{1)~5)18)}. しかし一方では鼻粘膜過敏性亢進における活性化好酸球の関与を疑問視する報告もあり¹⁹⁾, さらに LTD₄, PAF な

どの chemical mediator が気道過敏性の亢進に関与するとの報告もある⁶⁾。

今回我々が用いた OA 感作鼻アレルギーモルモットにおいては、一回の鼻粘膜抗原誘発後の好酸球、好中球の血管内集積から組織内遊走に至るアレルギー性炎症の進行の時間的経過と遅発反応の時期に一致した著明な好酸球、好中球の鼻粘膜浸潤を組織学的に確認することができた。しかしこの時期に鼻粘膜組織内 LTC₄、LTD₄ 濃度が上昇することではなく、また炎症細胞から放出された chemical mediator に対する鼻粘膜反応の亢進を示す呼吸雑音を認めることもなかった。

今回、一回抗原誘発後の遅発反応の時期に著明に浸潤した好酸球は脱顆粒の所見を示さないにもかかわらず、7回の鼻粘膜抗原誘発後の鼻粘膜ヒスタミン過敏性は著明に亢進したが、その理由としては、①鼻粘膜過敏性の亢進には遅発反応の時期における活性化好酸球の脱顆粒以外にも関与する大きい因子がある、②モルモット鼻粘膜における好酸球の脱顆粒の程度は鼻粘膜組織内 LTC₄、鼻粘膜反応の有無だけからは判断できない、のいずれかが考えられる。湯川ら²⁰⁾は同種抗 OA 血清の受動感作モルモット気管支喘息モデルを用いて一回の抗原誘発を行い、経時的に気管支粘膜における好酸球浸潤の程度およびその形態的变化を観察して、遅発反応の時期に著明な好酸球浸潤と好酸球特異顆粒の著しい超微形態上の変化を確認したが、この時期に気道抵抗の上昇を認めることは全くなかったと報告している。アレルギー性炎症の進行および好酸球の活性化を示す形態学的所見と粘膜腫脹の存在を示さない機能検査所見の不一致の原因は不明であり、この時期における好酸球活性化の程度の問題によるものかもしれない。また今回用いた鼻アレルギーモルモットの鼻粘膜内には抗原誘発前すでに 418±97 個/断面の好酸球が認められており、抗原誘発後、この好酸球は経時的に有意に減少している。これは7日目の反復抗原誘発に際して増加した好酸球の

名残りであろうが、即時反応の時期に認められた好酸球の減少には抗原抗体反応による好酸球の脱顆粒または鼻粘膜表層の遊走因子による好酸球の鼻粘膜外の遊走が関与したものと考えられる。今回は LTC₄ 以外に好酸球由来の mediator の測定を行っていないために憶測の域を出ないが、連続7日間の抗原誘発を行った場合には、即時反応の時期に好酸球細胞膜上での抗原抗体反応によって好酸球の脱顆粒が起きている可能性も否定できない。好酸球における低親和性 IgE 受容体の存在は確認されている²¹⁾。

本実験は、抗原による感作の成立は鼻粘膜過敏性の程度に有意の影響を与えず、感作成立後の鼻粘膜抗原誘発の反復によった鼻粘膜過敏性は著明に亢進することを示した。これは先に述べた花粉飛散期と非飛散期における花粉症症例のヒスタミン過敏性の変化¹⁰⁾を説明する。また抗原誘発による鼻粘膜過敏性亢進の背景には鼻粘膜組織内に、一回の抗原誘発直後から48時間後まで進行する著明なアレルギー性炎症がおこっている事を示した。これは花粉非飛散期の花粉症症例に抗原誘発した際にみられる鼻洗滌液中の炎症細胞数の経時的变化に一致する^{11)~13)}。組織学的にモルモットの鼻粘膜における炎症細胞の経時的变化を血管内と血管外に分けて観察すると、鼻粘膜血管内への好中球の集積は抗原誘発後から急激に始まり、1時間後にはピークに達し、かなり早い経過で好中球の血管内集積は消失した。一方、鼻粘膜血管内での好酸球の集積は抗原誘発1時間後から明らかとなり、3時間後にピークに達し、その後徐々に減少しながらも、抗原誘発12時間後にも血管内で有意な好酸球増加が持続しており、両者の時間経過に明らかな違いが認められた。これらの細胞の動態の制御には種々の細胞接着因子、インターロイキンが関与することが最近、明らかになってきている。本実験では鼻粘膜内で進行するアレルギー性炎症の特にどの部分が鼻粘膜過敏性亢進に関与したのかを明らかにするこ

とはできなかったが、我々が今回用いた鼻アレルギーモルモットはIgE抗体の他に γ_1 抗体が関与する複雑なモデルであり、よりヒトに近いモデルでの検討が必要と思われる。

ま と め

1) 卵白アルブミン腹腔内感作および鼻粘膜反復抗原点鼻誘発により作製した鼻アレルギーモルモットを用いて、感作および抗原反復誘発の過程における鼻粘膜ヒスタミン過敏性の変化を測定した。また抗原一回誘発後の鼻粘膜組織内における好酸球、好中球の経時的变化を血管内と血管外に分けて検討し、同時に鼻症状と鼻粘膜LTC₄、LTD₄の経時的变化を測定した。

2) 感作成立により鼻粘膜過敏性は有意な変化を示さなかった。しかし抗原反復誘発により鼻粘膜過敏性は急激に亢進した。

3) 鼻粘膜過敏性亢進の背景には鼻粘膜血管の内外で、抗原誘発直後から、48時間後まで続くアレルギー性炎症の進行を観察することができた。鼻粘膜の血管内外における好酸球と好中球の動態には明らかな違いがみられた。

4) 即時反応の時期には明らかな鼻症状と鼻粘膜LTC₄、LTD₄値の著明な上昇を認めたが、遅発反応の時期にはいずれの反応も認められず、いわゆる遅発反応の時期に著明に増加した好酸球が脱顆粒を起こしているとは考えられなかった。

5) 本実験は抗原誘発後の鼻粘膜過敏性亢進の背景にはアレルギー性炎症の成立は必須であるが、遅発反応の時期における好酸球の脱顆粒以外にも鼻粘膜過敏性亢進に関与する因子がある可能性を示唆した。

文 献

- 1) Linder A, Venge P and Deuschl H : Eosinophil cationic protein and myeloperoxidase in nasal secretion as makers of inflammation in allergic rhinitis. *Allergy* **42** : 583~590, 1988.
- 2) Frigas E and Gleich J : The eosinophil and the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* **77** : 527~537, 1986.
- 3) Barnes PJ : New concepts in the pathogenesis of bronchial hyperresponsiveness and asthma. *J Allergy Clin Immunol* **83** : 1013~1026, 1989.
- 4) Durham SR and Kay AB : Eosinophils, bronchial hyperreactivity, and late-phase asthmatic reactions. *Clin Allergy* **15** : 411~418, 1985.
- 5) Kay AB, Wardlaw AJ, Collins JV, et al : Eosinophil and major basic protein in bronchoalveolar lavage in asthma ; relationship to nonspecific hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* **77** : 236, 1986.
- 6) Cuss FM, Dixon CMS and Barnes PJ : Effects of inhaled platelet-activating factor on pulmonary function and bronchial responsiveness in man. *Lancet* **2** : 189~192, 1986.
- 7) Townley RC, Guirgis H and Bewtra A : IgE levels and methacoline inhalation responses in monozygous and dizygous twins. *J Allergy Clin Immunol* **57** : 277, 1976.
- 8) Ovary Z and Kaplan B : Characteristics of guinea pig IgE. *Int Archs Allergy appl Immun* **51** : 416~428, 1976.
- 9) 今野昭義, 寺田修久, 伊藤永子 : 抗原誘発後の鼻粘膜 SRS-A 含有量の経時的变化. *耳鼻臨床* **82** : 879~886, 1989.
- 10) Konno A, Togawa K and Nishihira S : Seasonal variation of sensitivity of nasal mucosa in pollinosis. *Arch Otorhinolaryngol* **232** : 253~261, 1981.
- 11) 寺田修久, 安藤英樹, 伊藤永子, 他 : 鼻アレルギーとロイコトリエン(第2報) —抗原誘発後の鼻洗浄液におけるペプチドロイコトリエンおよび炎症性細胞の経時的变化—. *日耳鼻* **92** : 1337~1344, 1989.
- 12) Bascom R, Pipkorn U, Lichtenstein LM, et al : The influx of inflammatory cells into nasal washings during the late response of antigen challenge, effect of systemic steroid pretreatment. *Am Rev Respir Dis* **138** : 406~412, 1988.
- 13) Naclerio RM, Proud D, Togias A, et al : Inflammatory mediators in late antigen-induced rhinitis. *N Engl J Med* **313** : 65~70, 1985.
- 14) Andersson M, Andersson P, Venge P, et al : Eosinophils and eosinophil cationic protein in

- nasal lavages in allergen-induced hyperresponsiveness; effects of topical glucocorticosteroid treatment. *Allergy* **44** : 342~348, 1989.
- 15) 寺田修久, 伊藤永子, 杉山達朗, 他: 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) Bisgaard H, Grønborg H, Mygind H, et al : Allergen-induced increase of eosinophil cationic protein in nasal lavage fluid; Effect of the glucocorticoid budesonide. *J Allergy Clin Immunol* **85** : 891~895, 1990.
- 17) Shaw RJ, Cromwell O, Kay AB, et al : Preferential generation of leukotriene C₄ by human eosinophils. *Clin Exp Immunol* **56** : 716~722, 1984.
- 18) Wardlaw AJ, Dunnette S, Gleich GJ, et al : Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with asthma. *Am Rev Respir Dis* **137** : 62~69, 1988.
- 19) Klementsson H, Andersson M, Baumgarten P, et al : Changes in nonspecific nasal reactivity and eosinophil influx and activation after allergen challenge. *Clin Exp Allergy* **20** : 539~547, 1990.
- 20) 湯川龍雄, 寺師義典, 牧野荘平, 他: モルモット気道アレルギーにおける組織学的検討 I — 同種抗体受身感作モデルにおける単回抗原曝露後の好酸球浸潤と気道形態変化 —. *アレルギー* **36** : 227~237, 1987.
- 21) Capron M, Spiegelberg HL, Prin L, et al : Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils. *J Immunol* **132** : 462~468, 1984.

(別刷請求先: 今野昭義
〒280 千葉市亥鼻1-8-1
千葉大学医学部耳鼻咽喉科学教室)