抗原誘発後における鼻粘膜好塩基性細胞の活性化

—鼻腔洗浄液中トリプテースの測定から—

寺田 修久¹⁾・今野 昭義²⁾・白鳥 浩二¹⁾
戸川 清¹⁾・山下 哲次³⁾・栗本 文彦³⁾

Activation of Basophilic Cells in Nasal Mucosa after Antigen Challenge

—From the Changes in the Amount of Tryptase in Nasal Lavage Fluid—

Nobuhisa Terada, Koji Shirotori and Kiyoshi Togawa
(Akita University School of Medicine)

Akiyoshi Konno
(Chiba University)

Tetsuji Yamashita and Humihiko Kurimoto
(Mitsubishi Yuka Bio-Clinical Laboratories, Inc.)

The activation of basophils and mast cells both in the early and late phases was estimated by analyzing nasal lavage fluid. On 9 volunteers with Japanese cedar pollinosis, nasal lavages and determinations of nasal airway resistance (NAR) were carried out periodically for twelve hours after an antigen challenge using antigen disks. The amounts of histamine and tryptase in each of the nasal lavage fluid samples were determined. To evaluate the role of eosinophils, the amount of ECP in each nasal lavage fluid was also determined. Biphasic increases in NAR were observed both in the early and late phases. The amount of histamine and tryptase significantly increased in the early phase. In some cases the amount of histamine increased again in the late phase. On the other hand the amount of tryptase did not increase in any case. The amount of ECP significantly increased in both phases, but more markedly in the late phase.

The numbers of both basophilic cells and eosinophils increased in both phases. The increases were prominent in the late phase.

The correlation coefficient between the change in NAR and the numbers of eosinophils was significant. Other correlation coefficients were not significant.

Considering the fact that during the pollen-free season there are only a few basophilic cells in both the nasal lavage fluid and nasal mucosa, challenged antigen is assumed to enter the nasal mucosa and react with sensitized mast cells in the subepithelium. Histamine and tryptase released from the mast cells appeared in the nasal lavage fluids within 10 minutes.

The accumulation of eosinophils is assumed to be the most important cause of the onset of late phase reactions. In some cases basophils are contributed to the late phase reactions, but considering that only mast cells release tryptase, the role of mast cells in the late phase reactions must be minimum.

Key words: mast cell, basophil, tryptase, histamine, nasal lavage fluid

1) 秋田大学医学部耳鼻咽喉科学教室

2) 千葉大学医学部耳鼻咽喉科学教室

3) 三菱油化 BCL 研究開発部

はじめに

著者らは、単回の抗原誘発によって生じる即時相や遅発相における鼻腔洗浄液中の炎症細胞やケミカルメディエーターを解析することにより、いくつかの知見を得てきた。同時に解決すべき新たな疑問点も生じた^{1)~3)}。

一つは、即時相における誘発症状や鼻腔洗浄液中ヒスタミン量の上昇はどの炎症細胞に起因するのかである。著者らが対象としているスギ花粉症患者の鼻粘膜上皮層や鼻汁中における好塩基性細胞は、季節外には非常に少ない⁴⁾。しかし、季節外でもスギ花粉ディスク4枚ではば5分後には誘発症状が出現する。即時相における鼻腔洗浄液中ヒスタミンは鼻粘膜に存在する肥満細胞由来と考えられるが確認されていない。

もう一つは、遅発相の発現にどの程度好塩基性細胞が関与しているのか、好塩基球なのか、それとも肥満細胞なのかという疑問である。遅発相において鼻腔洗浄液中好塩基性細胞が増加するが、著者らの方法ではこれらが好塩基球なのか肥満細胞なのかの鑑別は困難である。

近年、トリプテースの測定が可能となった。ヒスタミンは好塩基球、肥満細胞の双方に含有されている。一方、トリプテースは粘膜炎型肥満細胞、結合組織肥満細胞ではそれぞれ10, 35 pg/cell であるのに対し、好塩基球では0.04 pg/cell と少なく、肥満細胞優位である⁵⁾⁶⁾。著者らは上述の疑問点を解決するため、鼻腔洗浄液中のヒスタミン、ECP に加えてトリプテースを測定し検討を加えた。

対象および方法

RAST および皮内テストにてスギ花粉単独感作が確認されたスギ花粉症有志9名(21歳~37歳, 平均24.5歳)を対象に季節外に行った。検査に先立ち本研究の目的、内容を十分に説明し理解を得た。誘発方法、検査スケジュール、鼻腔洗浄液の処理法等は、すでに述べたのと同様である³⁾。誘発前に2回、誘発10, 30, 60分後、2, 4, 6, 8, 12時間後に鼻腔洗浄を行った(図1)。鼻腔洗浄には37°C に加温した生

理食塩水 40 ml(各鼻腔 20 ml)を用いた。各鼻腔洗浄後に posterior 法により鼻腔抵抗を測定し、8回の平均値を求めた。鼻腔抵抗 nasal airway resistance (NAR) の変化率(Δ NAR)は以下のように求めた。

$$\Delta \text{NAR} (\%) = \frac{\text{誘発後 NAR} - \text{誘発前 NAR}}{\text{誘発前 NAR}} \times 100$$

2回目の洗浄後の測定値を誘発前 NAR とした。鼻腔洗浄後の沈渣に含まれる好酸球を Hinkelman 染色、好塩基性細胞を長田、田多井染色し血球計算板上でカウントした。ECP の測定はファルマシア社製 ECP-RIA kit を用いた。トリプテースの測定は、Pharmacia Tryptase RIACT, mast cell tryptase 測定用キット、ヒスタミンの測定は、ヒスタミンキット“栄研”を用い、いずれも RIA 法にて行った。細胞数およびメディエーター量は鼻腔洗浄液 40 ml あたりの数値に換算した。数値は平均値±標準誤差で表現した。

成績

抗原誘発後、 Δ NAR は30分後と8時間後にピークを有する略2相性の増加を呈した(図2)。図3に鼻腔洗浄液中ヒスタミン、トリプテース量の変化を示す。誘発前に行った2回目の鼻腔洗浄液をコントロールとした。ヒスタミン量は、誘発前 58.9 ± 8.1 ng であったが、誘発10分後には 172.7 ± 62.5 ng へと有意に増加した(危険率5%)。30分後には誘発前のレベ

図1 検査スケジュール

図2 鼻腔抵抗変化率の推移

ルに戻った。その後遅発相において増加する傾向を示したが、推計学的有意差はみられなかった。トリプテースは誘発前においては9例とも測定限界以下であった。10分後には 255.4 ± 85.1 ng と有意に増加した(危険率5%)。30分後には 5.3 ± 5.3 ng とほぼ誘発前にもどり60分以後はいずれの症例も測定限界以下であった。

図4に鼻腔洗浄液中 ECP 量の測定結果を示す。誘発前には 35.8 ± 10.5 ng であったが、誘発10分後には 148.6 ± 53.7 ng と増加傾向を示した(危険率10%)。その後減少したが2時間以降再び増加した。6, 10, 12時間後における

図3 鼻腔洗浄液中ヒスタミン、トリプテース量の変化

図4 鼻腔洗浄液中 ECP 量の変化

図5 左: 誘発10分におけるヒスタミン量とトリプテース量との相関
右: ヒスタミン量と ECP 量との相関

ECP 量はそれぞれ 177.9 ± 69.6 ng, 300.5 ± 181.5 ng, 163.2 ± 48.8 ng であり, これらの増加は推計学的にも有意であった (危険率 5%).

図 5 左は誘発10分後におけるヒスタミン量とトリプテース量との相関, 右は ECP 量との相関を示す. 由来細胞が異なるヒスタミン量と, ECP 量との相関はみられないが, ヒスタミン量とトリプテース量とは相関係数 0.94 で有意な相関がみられた.

鼻腔洗浄液中好酸球数, 好塩基性細胞数の推移を図 6 に示す. 共に誘発後有意に増加し, その増加は遅発相において著明であった. 細胞数は好酸球優位であり, 好酸球/好塩基性細胞の比は 8, 10, 12 時間でそれぞれ 41.7, 35.8, 48.3 であった.

表 1 は 8 から 12 時間における各パラメーター間の相関係数を示す. Δ NAR と有意な相関を

図 6 鼻腔洗浄液中好酸球数, 好塩基性細胞数の推移

表 1 遅発相 (誘発 8~12 時間) における各パラメーターの相関

	Δ NAR	好塩基性細胞	ヒスタミン	トリプテース	好酸球	ECP
Δ NAR	1					
好塩基性細胞	0.21	1				
ヒスタミン	0.14	0.24	1			
トリプテース	—	—	—	1		
好酸球	0.47**	0.32	0.10	—	1	
ECP	0.14	0.04	0.17	—	0.58**	1

**P<0.01

示したのは好酸球数のみであった. ヒスタミン量と Δ NAR, 好塩基性細胞数との間には有意な相関はみられなかった.

今回観察した 9 例のうち, 6 時間以降に鼻腔抵抗が 40% 以上増加した症例は 5 例であった. この 5 例のうち 2 例においてヒスタミン量の再上昇がみられた. トリプテース量は 60 分以降全ての症例で検出限界以下であった. ECP 量は 5 例中 5 例で明かな再上昇がみられた. 遅発相が生じなかった 1 例においても明かな増加がみられたが, 他の 3 例における増加はわずかであった.

考 察

抗原誘発後に生じる鼻粘膜反応には, くしゃみ, 鼻汁分泌, 鼻閉がともに生じ, 30 分以内に症状のピークをみる即時型反応と, 鼻閉が主症状である遅発型反応とがある. 遅発型反応は誘発数時間後に生じるが, 著者らの検討では 8~10 時間後に鼻腔抵抗の第 2 のピークを観察した¹⁾²⁾.

常に抗原に曝露されている通年性鼻アレルギー症例や季節時の花粉症症例においては, 鼻粘膜表層に好塩基球を主とする好塩基性細胞が存在し, IgE を介して速やかに抗原と結合する. ひき続きケミカルメディエーターの遊離がおこり, 抗原の多くはくしゃみや水性鼻汁によって鼻腔から排除され, 粘膜固有層にまで侵入するものは少ない. アレルギー症状が発症した場合に抗原が固有層に侵入しないことは, 125 I でラベルしたブタクサ花粉を用いた奥田らの検討⁷⁾⁸⁾ から実証されている. 同時に奥田らは, 非アレルギー患者, 他の抗原によるアレルギー患者, またはブタクサ花粉症でも減感作療法後の者など, 125 I ラベルのブタクサ抗原で症状が誘発されない患者の鼻粘膜を 5 分後に切除すると, ラベル抗原が固有層に侵入していたことを報告している. 今回の研究に参加したスギ花粉症患者有志は全て, RAST および皮内テストでスギ花粉単独感作が確認されている症例であり, 本研究が行われたスギ花粉非飛散期におい

ては鼻症状は発現していない。抗原誘発に先立ち行われた鼻腔洗浄で得られた洗浄液中の細胞成分は少なく、とりわけ好塩基性細胞は観察されていない。また、奥田らによれば、スギ花粉症における鼻汁中⁴⁾、鼻粘膜擦過片中⁹⁾の好塩基性細胞数は季節外には有意に減少する。

以上を考慮すると、著者らが今回観察したスギ花粉非季節時における即時相の発現機序においては以下の推察が適当と思われる。すなわち、曝露されたスギ抗原は上皮を経て上皮下に達し、そこに存在する肥満細胞に作用し、遊離されたヒスタミン、トリプテースの一部は10分以内に鼻腔洗浄液中に出現するものと考えられる。少数ながら存在する上皮層内の肥満細胞や上皮直下の肥満細胞がどの程度この反応系に関与しているか否かを知るためには鼻腔洗浄液中カイメースの量が参考となるが現時点ではカイメースの測定は困難である。

遅発相の発現には活性型好酸球の関与が重要である。遅発相においては鼻腔洗浄液中 LT₅ が有意に増加する。一方ヒスタミン量の増加は有意ではない。好酸球、好塩基性細胞はともに増加するが好酸球優位であり、また Δ NAR や LT₅ 量と好酸球数は相関するが、好塩基性細胞数との相関は明らかではない¹²⁾。さらに遅発相における好酸球は誘発前や即時相と比較すると有意に活性化されており、活性型好酸球数と Δ NAR は高い相関 ($r=0.665$) を示す³⁾。今回、前回とは別の対象例について新たに検討したが、前回同様 Δ NAR との相関がみられたのは好酸球数のみであった (表1)。ECP 量と Δ NAR の間の相関は有意ではなかった。好酸球からの、ECP をはじめとする顆粒蛋白の遊離と細胞膜由来で鼻粘膜腫脹をおこす PAF や LT₅ の遊離は同時におこらない可能性がある。

遅発相におけるヒスタミン量と Δ NAR の間には有意な相関はみられなかった。遅発型反応性の5例のうち、2例においてヒスタミン量の再上昇がみられた。一方トリプテースは60分以降すべての症例で検出限界以下であった。ト

リプテースアッセイの感度は 0.5 ng/ml とヒスタミンの 0.06 ng/ml と比較して低いため、検体を凍結乾燥し5倍に濃縮したものを測定したが結果は同様であった。ヒスタミンは好塩基球および肥満細胞の両方から、トリプテースは肥満細胞のみから遊離されることを考慮すると、遅発相が生じている一部の症例においては、その出現に好塩基球が関与している可能性があるが肥満細胞の活性化については否定的と思われる。

Naclerio ら¹⁰⁾ はヒスタミンと、トリプテース同様好塩基性細胞からのみ遊離されるプロスタグランディン D₂ を指標として遅発相における好塩基性細胞の活性化について検討している。ヒスタミンは遅発相において有意に増加していたがプロスタグランディン D₂ の増加はみられなかったことから、遅発相の発現には好塩基球の関与が重要であり肥満細胞の関与については否定的な考えを示している。遅発相の発現に肥満細胞が重要でないことは著者らと一致しているが、ヒスタミンの増加や好塩基球の関与については意見の一致をみない。鼻腔洗浄の方法や洗浄液の処理法の違いに起因すると思われるが、遅発相において鼻腔洗浄液中にヒスタミンが増加するならばなぜ鼻汁分泌やくしゃみ反応が生じないのかという疑問が残る。好酸球については PAF, LT₅。さらに最近では IL-5 が遊走に強く関与し¹¹⁾、分泌型 IgA は脱顆粒因子として作用している可能性¹²⁾ が報告されている。好塩基球が遅発相においてどのような機序で遊走し活性化されるのか今後検討される必要がある。

参考文献

- 1) Terada N, Konno A and Togawa K : Kinetics of peptide leukotrienes and inflammatory cells in nasal lavage fluid after antigen challenge. Proceeding of the XIV World Congress of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery. pp. 1765~1768, Kugler & Ghedini Publications, Amsterdam, Berkeley, Milano 1990.

- 2) 寺田修久, 今野昭義, 寺田美恵, 他: 鼻アレルギーとロイコトリエン (第2報) —抗原誘発後の鼻腔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.
- 3) 寺田修久, 今野昭義, 戸川 清, 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, 1990.
- 4) Okuda M, Kawabori S and Ohtsuka H: Basophilic cells in allergic nasal secretion. Arch Oto laryngol **217**: 283~289, 1977.
- 5) Schwartz LB, Irani AA and Roller K: Quantitation of histamine, tryptase and chymase in dispersed human T and TC mast cells. J Immunol **138**: 2611~2615, 1987.
- 6) Castells MC, Irani AM and Schwartz LB: Evaluation of human peripheral blood leukocytes for mast cell tryptase. J Immunol **138**: 2184~2189, 1987.
- 7) 奥田 稔, 関根啓一, 石川 喙: 鼻アレルギー (病)の発症機序をめぐって. アレルギー **18**: 653~691, 1969.
- 8) Okuda M: Mechanisms and pathogenesis of ragweed pollen nasal allergy. Wakayama Medical Reports **15**: 143~152, 1972.
- 9) 奥田 稔: 鼻アレルギー. 54~71頁, 金原出版, 東京 1988.
- 10) Naclerio RM, Togias A, Proud D, et al: Inflammatory mediators in late antigen-induced rhinitis. N Eng J Med **313**: 65~70, 1985.
- 11) Wang JM, Rambaldi A, Biondi A, et al: Recombinant human interleukin 5 is a selective eosinophil chemoattractant. Eur J Immunol **19**: 701~705, 1989.
- 12) Fujisawa T, Abu-Ghazaleh R, Kita H, et al: Regulatory effect of cytokines on eosinophil degranulation. J Immunol **144**: 642~646, 1990.

(別刷請求先: 寺田修久
〒014 大曲市通町1-30
仙北組合総合病院耳鼻咽喉科)