鼻アレルギーにおけるサイトカインの動態

— 鼻粘膜でのサイトカイン遺伝子の発現 —

白 鳥 浩 二

Cytokine Expression in Nasal Allergy

— Gene Expression of Cytokine in Human Nasal Mucosa —

Koji Shirotori

(Akita University School of Medicine)

Human nasal mucosal samples exposed *in vitro* to substance P (SP) or specific antigen were tested for the presence of mRNA for interleukin (IL)- 1β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, tumor necrosis factor α , and interferon γ by employing specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays. Following the administration of 10^{-4} to 10^{-12} M SP, the enhanced expression of all of these cytokines, except for IL-2 and IL-4, was observed in all mucosal samples from allergic patients and in half of non-allergic patients. The expression of IL-2 and IL-4 was low.

The administration of specific antigen similarly enhanced the expression of these cytokines in the nasal mucosa of allergic patients, to an even greater extent than SP. However, no enhancement was observed in nasal mucosae from non-allergic patients.

The administration of 10^{-8} M of Dexamethasone with specific antigen inhibited expression of these cytokines, but 4 μ g/ml of Azelastin did not. In the clinical *in vivo* study, SP administration to the nasal mucosa of allergic patients induced neither the allergic symptoms nor local histamine release. However, in the challenging test with specific antigen, allergic symptoms were significantly augmented after the consecutive application of SP. These augmented allergic symptoms may be due to the contribution of cytokines induced by SP.

Key words : nasal allergy, cytokines, substance P, specific antigen, reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays

はじめに

近年、アレルギー疾患においては“炎症”の性格が大きくクローズアップされ、さらには神経・免疫ネットワークの概念も確立され²⁾³⁾アレルギー疾患での神経系の関与が注目されている。一方、種々の細胞間の相互作用に関与するサイトカインの構造、生物学的活性などが明らかにされるにつれて^{4)~6)}、サイトカインは生体の恒常性、維持に必要不可欠であるが、その反面、種々の疾患の病態形成にも関与していることが解明されてきてお

り⁷⁾⁸⁾、サイトカインの動態をより詳しく検討することは疾患の発症ならびに病態を解明するてがかりとなり、ひいては新しい治療法にもつながる可能性が示唆されている。今回、ヒト鼻粘膜での特異抗原および神経ペプチドの1つである substance P (以下 SP) 刺激後の種々のサイトカイン遺伝子の発現を感度、特異性に優れた逆転写ポリメラーゼチェーンリアクション (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, 以下 RT-PCR) 法にて検討し、次に、従来の代表的治療薬である抗アレルギー

剤およびステロイド剤のこれらサイトカイン発現に及ぼす影響について検討を行った。また、ヒト花粉症患者に非季節期に *in vivo* で SP の鼻内投与を行って、SP 投与前後における鼻腔洗浄液中のヒスタミン濃度および臨床症状の発現についても検討し若干の結果を得たので報告する。

方 法

1. 実験材料および抗原、薬剤の投与

鼻アレルギー患者(ダニアレルギー 7 例, カモガヤ花粉症 1 例) 8 例および非アレルギー者(正常者, 肥厚性鼻炎患者を含む) 4 例より手術にて採取した下鼻甲介粘膜(以下, 鼻粘膜)を実験に用いた。

鼻アレルギーの診断は現病歴, 血中特異的 IgE 抗体測定, 皮内反応および誘発検査により行った。また, 実験に際しては患者に十分な説明を行い同意を得た。

採取した鼻粘膜を, 細菌および真菌の感染を防ぐためペニシリン 100 IU/ml, ストレプトマイシン 100 μ g/ml, アンホテリシン B 1 μ g/ml を含む Hanks' balanced salt solution (HBSS) 10 ml で 3 回洗浄後, 粘膜面が必ず残るように長軸方向に対して直角に輪切りにして, 一辺が約 5 mm の小片を作製した。ついで, それぞれの特異抗原(ダニまたはカモガヤ: 鳥居薬品) 10 μ g あるいは 10^{-4} ~ 10^{-12} M の SP (ペプチド研究所) を投与して 15 分間反応後, minimal essential medium (MEM: GIBCO) を用いて洗浄後, ペニシリン 100 IU/ml, ストレプトマイシン 100 μ g/ml, L-グルタミン 20 mM/ml を含む MEM にて 37°C, 5% CO₂ 下に培養した。3 時間後にこれらの鼻粘膜小片を凍結乾燥後細切し, Chomczynski ら⁹⁾ の方法に従って solution D を用いて RNA を抽出した。一部の鼻粘膜小片では, 特異抗原と同時に 10^{-6} ~ 10^{-8} M のデキサメサゾン (SIGMA) あるいは 4 μ g/ml のアゼラスチン(エーザイ)を投与した。また, SP の拮抗剤である D-Pro², D-Trp^{7,9}-SP (ペプチド研究所) を 10^{-5} M 投与し, 5 分後に SP の投与を行った。いずれも 3 時間培養後に RNA の抽出を行った(図 1)。これらの RNA を用いて RT-PCR 法によりサイトカイン遺伝子の検出を行った。RT-PCR の方法, 特異性については既報の方法により行った¹⁰⁾¹¹⁾。

2. ヒト鼻腔内への SP 投与による鼻症状の検討

抗原が飛散していない時期の花粉症患者(スギ花粉 4 例, カモガヤ 2 例) 6 例(成人ボランティア)を対象とし

図 1 ヒト鼻粘膜への抗原・薬剤の投与

一部の鼻粘膜小片では, 特異抗原と同時に 10^{-6} ~ 10^{-8} M のデキサメサゾンあるいは 4 μ g/ml のアゼラスチンを投与した。また, SP 投与 5 分前に SP の拮抗剤である D-Pro², D-Trp^{7,9}-SP の投与も一部の鼻粘膜小片で行った。

た。

37°C の生理食塩水 5 ml で鼻腔を 3 回洗浄後, 4 回目の洗浄液を回収した。また 10^{-6} M SP 0.1 ml を mechanical nasal pump スプレーで 1 回, 各鼻腔内に噴霧し 5 分後に同様に洗浄し, 洗浄液を回収した。そして fluorometric 法¹²⁾にて SP 投与前後の鼻腔洗浄液中のヒスタミン濃度を測定した。

また, SP 投与前および SP をスプレーで連日 1 回, 各鼻腔に 7 日間噴霧した後に誘発検査を施行し, 鼻閉, 鼻汁, くしゃみなどの臨床症状を比較検討した。誘発検査にはスギ花粉またはカモガヤ花粉 250 μ g を含有する径約 3 mm のディスク(鳥居薬品)を用いた。

3. デキサメサゾン, アゼラスチンによるヒト末梢血単核球 (PBMC) のサイトカイン産生に及ぼす影響
成人ボランティア 5 例よりヘパリン加末梢血 10 ml を採取し, HBSS を加えて 30 ml, pH 7.2 とした。これに Ficoll Hypaque® (Pharmacia) を同量積層し, 400 G, 20°C で 30 分間遠心し, 中間層に浮遊している PBMC を

回収した。分離した PBMC を HBSS 10 ml で 2 回洗浄後、2-メルカプトエタノール 2.5×10^{-5} M、ペニシリン 100 IU/ml、ストレプトマイシン 100 μ g/ml、L-グルタミン 20 mM、HEPES buffer 5 mM を含む RPMI 1640 で培養した。この PBMC 液を 1×10^6 /ml に調整後、 10^{-8} M のデキサメサゾンまたは 4 μ g/ml のアゼラスチンを投与し、24 穴マルチプレート (住友ベークライト) の各 well に 2.0 ml ずつ分注し、さらに 50 μ g/ml の lipopolysaccharide (LPS : LIST BIOLOGICAL LABORATORIES) または 10 倍希釈の phytohemagglutinin (PHA : DIFCO LABORATORIES) 20 μ l を加え、5 % CO_2 下、37°C で 24 時間培養後、培養上清中の種々のサイトカイン (IL-1 β , IL-4, TNF α) を ELISA (IL-1 β , IL-4 : BIOTRAK ELISA system : Amersham, TNF α : TNF- α -EASIA : MEDGENIX) にて測定した。なお、IL-4 の測定には培養上清を Centricon 10 (グレースジャパン) にて 10 倍に濃縮したものをを用いた。

4. 推計学的検討

有意差検定には対応する 2 組の平均値の差の検定を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表現した。

結 果

1. *in vitro* でのヒト鼻粘膜への抗原投与後のサイトカイン遺伝子発現

特異抗原投与前にすでにヒト鼻粘膜中の IL-1 β , IL-3, IL-5, IL-6, TNF α および IFN γ の各サイトカイン遺伝子の発現が鼻アレルギー患者および非アレルギー者のいずれの群でも認められた。IL-2 と IL-4 の遺伝子発現は明らかでなかった。

特異抗原を投与すると、鼻アレルギー患者より採取した鼻粘膜では投与前と比べ IL-1 β , IL-3, IL-5, IL-6, TNF α および IFN γ の各サイトカイン遺伝子の発現量は著明に増強されたが、IL-2 と IL-4 の遺伝子発現は弱く、500 ng の RNA をサンプルとして使用して初めて発現が確認された。一方、非アレルギー者より採取した鼻粘膜では抗原投与によってもこれら各サイトカインの遺伝子発現量の増強は認められなかった (表 1, 2)。

2. *in vitro* でのヒト鼻粘膜への SP 投与後のサイトカイン遺伝子発現

SP 投与により、鼻アレルギー患者より採取した鼻粘膜全例と非アレルギー者より採取した鼻粘膜 4 例中 2 例

において、IL-1 β , IL-3, IL-5, IL-6, TNF α および IFN γ の各サイトカイン遺伝子の発現量が増強され、 10^{-6} ~ 10^{-9} M の濃度の SP により最大発現量を認めたが、抗原刺激による増加に比べると低い傾向にあり、また、IL-2 と IL-4 の遺伝子発現量は 500 ng の RNA を用いても極くわずかであった (表 1, 2)。非アレルギー者より採取した鼻粘膜 4 例中 2 例では、これら各サイトカインの遺伝子発現量の増強は認められなかった。

また、SP の拮抗剤である D-Pro², D-Trp^{7,9}-SP を 10^{-5} M 投与すると、SP によるサイトカイン遺伝子発現量の増強は抑制された。

3. *in vivo* でのヒト鼻腔内への SP 投与前後における鼻汁中ヒスタミン濃度およびアレルギー症状の発現

SP の鼻腔内投与にても、くしゃみ、鼻漏などの臨床症状は全く認められなかった。また、SP 投与前の花粉症患者の鼻汁中のヒスタミン濃度は 14.1 ± 7.5 mg/dl、SP 投与後 5 分では 18.9 ± 7.4 mg/dl で、SP 投与前後の鼻腔洗浄液中のヒスタミン濃度に有意な差は認められなかった。一方、SP の 1 週間連続投与前後における抗原による誘発検査での臨床症状は SP 投与後に強く出現し、くしゃみ回数でみると、SP 投与前は 0.17 ± 0.41 、SP 連続投与後は 1.83 ± 0.75 ($P < 0.01$) で有意に高値を呈した。

4. デキサメサゾン、アゼラスチンのサイトカイン発現に及ぼす影響

鼻アレルギー患者より採取した鼻粘膜への抗原投与時に、 10^{-6} ~ 10^{-8} M のデキサメサゾンを投与すると、特異抗原単独投与にて増強された各サイトカインの遺伝子発現量はいずれの濃度においても著明に抑制された。一方、4 μ g/ml のアゼラスチンを投与した場合は、抗原単独投与の場合と比べ各サイトカイン遺伝子の発現量に変化は認められなかった (図 2)。

さらに、LPS または PHA で刺激した PBMC の 24 時間培養上清中、および、それに 10^{-8} M のデキサメサゾンあるいは 4 μ g/ml のアゼラスチンを投与した場合の 24 時間培養上清中の IL-1 β , IL-4, TNF α の各濃度について検討すると、デキサメサゾンは PBMC の IL-1 β ($P < 0.01$), IL-4 ($P < 0.01$), TNF α ($P < 0.05$) の産生を有意に抑制した。一方、アゼラスチンは TNF α ($P < 0.05$) で有意に抑制したが、IL-1 β , IL-4 では有意差は明らかではなかった ($P > 0.05$) (表 3)。

表1 RT-PCR 法による各種サイトカイン遺伝子の発現(鼻アレルギー例)

	C	A	SP-1	SP-2	SP-3	SP-4
IL-1 β	+	+++	++	++	++	++
IL-2	—	±	—	±	±	—
IL-3	+	++	++	++	++	++
IL-4	—	±	—	±	±	—
IL-5	+	+++	++	++	++	++
IL-6	+	+++	++	++	++	++
TNF α	+	+++	++	++	++	++
IFN γ	+	+++	++	++	++	++

IL-1 β , IL-3, IL-5, IL-6, TNF α および IFN γ は 50 ng の RNA より cDNA を合成し, IL-2, IL-4 は 500 ng の RNA より cDNA を合成して RT-PCR 法を施行した.

鼻アレルギー患者の鼻粘膜全例において同様の結果を得た.

遺伝子発現量を—~+++の6段階に分類した.

C: 非刺激 A: 特異抗原 10 μ g 投与

SP-1: 10⁻⁴ M SP 投与 SP-2: 10⁻⁶ M SP 投与 SP-3: 10⁻⁹ M SP 投与

SP-4: 10⁻¹² M SP 投与

表2 RT-PCR 法による各種サイトカイン遺伝子の発現(非アレルギー例)

	C	A	SP-1	SP-2	SP-3	SP-4
IL-1 β	+	+	++*	+++*	+++*	+++*
IL-2	—	—	—	±*	±*	—
IL-3	+	+	++*	+++*	+++*	+++*
IL-4	—	—	—	±*	±*	—
IL-5	+	+	++*	+++*	+++*	+++*
IL-6	+	+	++*	+++*	+++*	+++*
TNF α	+	+	++*	+++*	+++*	+++*
IFN γ	+	+	++*	+++*	+++*	+++*

表1と同様に各サイトカインの RT-PCR 法を施行した.

*: 非アレルギー患者4例中2例において SP 投与により各サイトカイン遺伝子の発現量が増強された.

考 察

鼻アレルギーは即時型アレルギー反応の代表的疾患の1つとして考えられていたが, 近年, 好酸球をはじめ好中球や単球などの出現, およびこれら各細胞の相互作用による炎症反応との関連が深いと考えられる遅発相の存在が明らかにされつつある¹³⁾¹⁴⁾. また最近では, 神経ペプチドが気道にも存在することが報告され¹⁵⁾, このペプチドが種々の炎症細胞, 血管および分泌腺などに対して多様な作用を示すことが明らかにされ^{16)~18)}, さらに, いわゆる神経・免疫ネットワークの概念, 存在が近年注目されるに及んで²⁾³⁾, 神経系はアレルギー反応自体に

も関与していることが推察される. このように鼻アレルギーは, 炎症反応さらには神経系が互いに密接に関係し複雑な病態を形成しており, ヒト鼻粘膜への抗原および神経ペプチド投与後のサイトカインの発現動態を検討することは, アレルギー反応の発症機序, 病態の解明に必要不可欠であると考えられる.

血清中や培養上清中のサイトカインの測定法の1つとしてイムノアッセイがよく用いられているが, 鼻粘膜あるいは鼻汁中に含まれるサイトカインの測定を通常のイムノアッセイを用いて行うことは必ずしも容易ではない. 目的とするサイトカインに対する抗体の特異性や他のサ

図2 ヒト鼻粘膜へのデキサメサゾンおよびアゼラスチン投与によるサイトカイン遺伝子発現に及ぼす影響(RT-PCR法)

鼻アレルギー患者の鼻粘膜5症例をIL-5 (193bp) について検討した。

デキサメサゾン投与により, IL-5 の遺伝子発現が著明に抑制されている。

Lane M: $\phi \times 174$ Hae III cut size-marker

Lane 1~5: 特異抗原 $10 \mu\text{g}$ + アゼラスチン $4 \mu\text{g}/\text{ml}$

Lane A~E: 特異抗原 $10 \mu\text{g}$ + デキサメサゾン 10^{-8} M

Lane β : β -actin (202 bp)

1 and A: 症例1   2 and B: 症例2   3 and C: 症例3   4 and D: 症例4

5 and E: 症例5

表3 ヒト PBMC 4 へのデキサメサゾンおよびアゼラスチン投与による培養上清中の各種サイトカインの測定

	IL-1 β		TNF α	
LPS	232 $\pm$ 41	* N. S.	1953 $\pm$ 73	** **
LPS+Dex	141 $\pm$ 41		1167 $\pm$ 103	
LPS+Aze	212 $\pm$ 68		1157 $\pm$ 432	
IL-4				
PHA	7 $\pm$ 2	* N. S.		
PHA+Dex	検出可能値以下			
PHA+Aze	5 $\pm$ 1			
(pg/ml)				

(pg/ml)

* $p < 0.01$ ** $p < 0.05$

LPS: lipopolysaccharide $50 \mu\text{g}/\text{ml}$

PHA: phytohemagglutinin $2 \mu\text{l}/\text{well}$

Dex: デキサメサゾン 10^{-8} M

Aze: アゼラスチン $4 \mu\text{g}/\text{ml}$

イトカインとの交差反応については必ずしも十分には検討されておらず, また, 得られた結果の特異性をみるためのインヒビションアッセイも必須だが, それに使用する抗体の入手は容易ではない。さらに, 分泌液, 特に鼻汁はムチン, 種々の細胞のデブリス, 各種サイトカインレセプター, その他種々のものを含み, その測定には慎重な検討が必要と考えられる。そこで今回, 感度, 特異

性に優れた RT-PCR 法を用いて, 手術によって採取したヒト鼻粘膜中の各サイトカインの遺伝子発現について検討した。RT-PCR 法は細胞内の mRNA の遺伝子発現を示すものであり, 必ずしも細胞外へのサイトカインの産生を意味するものではないが, ヒト末梢血単核球の培養上清中の各サイトカインの濃度と RT-PCR 法によって得られた各サイトカイン遺伝子の発現とは相関してお

り¹⁹⁾、この方法によって鼻粘膜中の各種サイトカインの遺伝子発現量を検討することは、各サイトカインの細胞外への産生を間接的に反映していると示唆される。

*in vitro*にて、無刺激の状態のヒト鼻粘膜中に IL-1 β 、IL-3、IL-5、IL-6、TNF α 、IFN γ の各遺伝子発現が鼻アレルギー患者および非アレルギー者の全例に認められたことは、アレルギー反応の発現とは無関係にこれらの各サイトカインが鼻粘膜中に存在することを示唆する。鼻粘膜は種々のウイルス、細菌、真菌および大気中に含まれる刺激物質などに連日暴露されており、常に何らかの様な刺激を受けて活性化している状態である。鼻腔局所でこれらの刺激を受けて活性化したマクロファージやリンパ球、さらには上皮細胞などが IL-1 β や TNF α をはじめとする種類のサイトカインを常に産生していると考えられる。また、鼻腔粘膜においては粘膜免疫が発達しており、特に鼻汁中には IgA 抗体が多量に含まれ、生体防御線の最前線で免疫応答が活発に働いている²⁰⁾。そのため、特に IgA 産生に密接に関連している IL-5²¹⁾、IL-6²²⁾ も常に発現しているものと思われる。

鼻アレルギー患者より採取した鼻粘膜に抗原を投与すると、これらサイトカインの遺伝子発現量が増強されたことは、抗原投与によって抗原抗体反応が生じ、その結果、種々の免疫担当細胞が働いたことによると考えられる。IL-3、IL-5 は遅発相に深く関与していると考えられる好酸球の産生にも関与し²³⁾²⁴⁾、特に IL-5 は好酸球の産生、分化の最終段階に働き、さらに好酸球の活性化や延命効果にも作用することが知られている²⁵⁾²⁶⁾。活性化された好酸球は種々の傷害性蛋白を産生し、これらがアレルギー反応の遅発相における複雑な病態形態に関与していることが判明している^{27)~30)}。

このように抗原投与にて生じたアレルギー反応においては、3時間以内に種々のサイトカイン遺伝子の発現が増強され、さらに各サイトカインの産生へと推移する時間経過を考えると、これら増強された各サイトカインは遅発相の病態に大きく関与していると考えられる。すなわち、IL-3、IL-5 のみならず、IL-1 β 、IL-6、TNF α など炎症助長作用の強いサイトカインも直接に炎症を形成するのみでなく、血管内皮細胞の活性化を介して接着分子の発現を引き起こし、その結果、好中球や好酸球などの浸潤をまねき遅発相を形成していくものと考えられる。

一方、非アレルギー者より採取した鼻粘膜では抗原投与によってもこれらサイトカインの遺伝子発現量は増強

されなかった。非アレルギー者の鼻汁と気管分泌液中にもダニやスギに対する特異的 IgA および IgG 抗体の存在が報告されているが²⁰⁾³¹⁾、ダニや花粉などの抗原が鼻粘膜に投与されても強い免疫反応は IgA あるいは IgG との間には生じていないものと思われる。

鼻アレルギー患者より採取した鼻粘膜に SP を投与すると、IL-1、IL-6、TNF α および IFN γ などの炎症性サイトカインだけでなく、IL-3 や IL-5 の遺伝子発現量も増強された。一方、非アレルギー者より採取した鼻粘膜に SP を投与すると、半数の症例でこれらのサイトカインの遺伝子発現量が増強された。このような鼻アレルギー患者と非アレルギー者の鼻粘膜における SP の感受性の差は、鼻アレルギー患者の鼻粘膜では常にヒスタミンやその他の化学伝達物質の刺激を受け、強い免疫応答をくり返していることで SP に対する感受性を亢進させているためではないかと考えられる。

SP は11個のアミノ酸からなるポリペプチドでタキキニンの代表的物質であり、従来より痛みの伝達物質としてよく知られている¹⁶⁾。さらに、粘液分泌作用、血管拡張作用、血管透過性亢進作用など種々の生物学的活性をもつことが明らかになっているが¹⁷⁾¹⁸⁾、一方、これらの作用は、種特異性、臓器特異性が強く^{32)~35)}、ヒト気道粘膜での作用は不明であった。今回、鼻粘膜への SP 投与により、炎症性サイトカインである IL-1、IL-6、TNF α および IFN γ の他に IL-3 や IL-5 の遺伝子発現量が増強されたことは、SP がアレルギー反応に強く関わっている可能性を示唆する。実際、*in vivo*において、SP を連日1週間投与し、抗原誘発するとアレルギー症状の増悪をきたした。IL-1 と IL-3 はアレルギー患者の好塩基球より、微量ながらもヒスタミンを遊離させ³⁶⁾、また、IL-1、IL-3、IFN γ は抗原、抗 IgE による好塩基球からのヒスタミン遊離を増強させることも推察されている³⁷⁾。Schleimer ら³⁸⁾ は、ヒト好塩基球を IL-3、IFN γ で刺激した培養上清中の最大ヒスタミン遊離量は、無刺激のその2.5倍であると報告している。SP の鼻腔投与による臨床症状の増悪に、SP により誘導されたサイトカインが関与していることも十分推測できる。

アレルギー疾患の治療剤として現在広く用いられている薬剤の1つであるデキサメサゾンと抗原と一緒に投与した場合、鼻アレルギーの鼻粘膜では各サイトカインの遺伝子発現は抑制され、また、ヒト末梢血単核球の培養上清中の IL-1 β 、IL-4、TNF α も有意に抑制された。ス

テロイドは膜安定作用など種々の薬理作用を有するが³⁹⁾, その中の1つである抗炎症作用のなかにはサイトカインの mRNA への転写の抑制, ひいてはサイトカイン産生の阻害作用がその機序としてあるものと思われる. また, 抗アレルギー剤であるアゼラスチンは, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では, 鼻粘膜におけるサイトカインの遺伝子発現を抑制しなかったが, サイトカイン自体の産生そのものは $\text{TNF}\alpha$ で有意な抑制をみた. しかし, $\text{IL-1}\beta$, IL-4 については明らかな抑制はみられなかった. 実際の抗アレルギー剤としての薬効のなかで, 抗サイトカイン作用がどの程度の意味を持つのかは断定できず, 今後, 症例の追加と薬剤濃度について検討を要する.

まとめ

ヒト鼻粘膜への抗原, SP および薬剤の投与によるサイトカインの発現について, 以下の知見を得た.

1. *in vitro* にて, 無刺激の状態のヒト鼻粘膜中にはすでに $\text{IL-1}\beta$, IL-3 , IL-5 , IL-6 , $\text{TNF}\alpha$ および $\text{IFN}\gamma$ の遺伝子発現が, 鼻アレルギー患者および非アレルギー者の全例に認められたが, IL-2 と IL-4 の遺伝子発現は明らかでなかった.

2. *in vitro* にて, 鼻アレルギー患者の鼻粘膜に特異抗原を投与すると, $\text{IL-1}\beta$, IL-3 , IL-5 , IL-6 , $\text{TNF}\alpha$ および $\text{IFN}\gamma$ の遺伝子発現量は投与前と比べ著明に増強されたが, IL-2 , IL-4 の遺伝子発現量の増加は軽度であった. 一方, 非アレルギー者の鼻粘膜では抗原投与によってもこれら各サイトカインの遺伝子発現量の増加は認められなかった.

3. *in vitro* にて, SP を投与すると, 鼻アレルギー患者の鼻粘膜全例および非アレルギー者の鼻粘膜の半数に $\text{IL-1}\beta$, IL-3 , IL-5 , IL-6 , $\text{TNF}\alpha$ および $\text{IFN}\gamma$ の遺伝子発現量は投与前と比べ増強されたが, 抗原刺激による増加に比べると低い傾向にあり, IL-2 , IL-4 の遺伝子発現量の増加は極く軽度であった. 非アレルギー者の鼻粘膜の半数では, これら各サイトカインの遺伝子発現量の増加は認められなかった.

4. *in vitro* にて, 鼻アレルギー患者の鼻粘膜にデキサメサゾンと特異抗原を同時に投与すると, 特異抗原単独にて増強された各サイトカインの遺伝子発現量は著明に抑制された. また, LPS または PHA で刺激した PBMC にデキサメサゾンを投与すると培養上清中の $\text{IL-1}\beta$, IL-4 , $\text{TNF}\alpha$ の産生を有意に抑制した.

5. *in vitro* にて, 鼻アレルギー患者の鼻粘膜にアゼラスチンと特異抗原を同時に投与しても, 抗原単独投与の場合と比べ各サイトカイン遺伝子の発現量に変化は認められなかった. また, LPS または PHA で刺激した PBMC にアゼラスチンを投与すると培養上清中の $\text{TNF}\alpha$ は有意に抑制されたが, $\text{IL-1}\beta$, IL-4 では有意な抑制は認められなかった.

参考文献

- 1) Naclerio RM, Proud D, Togias AG, et al : Inflammatory mediators in late antigen-induced rhinitis. *N Engl J Med* **313** : 65~70, 1985.
- 2) Payan DG, Mcgillis JB and Goetzl EJ : Neuroimmunology. *Adv Immunol* **39** : 299~323, 1986.
- 3) Bost KL : Hormone and neuropeptide receptors on mononuclear leukocytes. *Prog Allergy* **43** : 68~83, 1988.
- 4) March C, Mosely B, Alf L, et al : Cloning sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* **315** : 641~645, 1985.
- 5) Dinarello CA : Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv Immunol* **44** : 153~205, 1989.
- 6) Sims JE, Acreas RB, Grubin CE, et al : Cloning of the interleukin-1 receptor from human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **86** : 8946~8950, 1989.
- 7) Anastassakos CH, Alexander JJM, Wolstencroft RA, et al : Interleukin-1 and Interleukin-2 activity in chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* **94** : 999~1005, 1988.
- 8) Chu ET, Rosenwasser LJ, Dinarel CA, et al : Immuno-deficiency with defective T-cell response to interleukin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **81** : 4945~4949, 1984.
- 9) Chomczynski P and Sacchi M : Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162** : 156~159, 1987.
- 10) 岡本美孝, 白鳥浩二, 工藤和夫, 他 : Reverse transcriptase polymerase chain reaction 法による RS ウイルスの検出法. *ウイルス* **41** : 95~97, 1991.
- 11) 岡本美孝, 白鳥浩二, 工藤和夫, 他 : 小児渗出性中耳炎への RS ウイルスの関与 : RS ウイルスゲノムの貯留液での検出. *日耳鼻* **94** : 1733~1737, 1991.
- 12) Siraganian R : An automated continuous flow system for the extraction and fluorometric analysis of histamine. *Anal Biochem* **57** : 283~294, 1971.
- 13) Pelikan Z : Late and delayed responses of the nasal mucosa to allergen challenge. *Ann Allergy* **41** : 37~47, 1978.
- 14) 奥田 稔, 広瀬隆雄 : 鼻アレルギーにおける遅発性反応. *アレルギーの臨床* **8** : 189~192, 1988.

- 15) Carstairs JR and Barnes PJ : Autoradiographic mapping of substance P receptors in lung. *Eur J Pharmacol* **127** : 295~296, 1986.
- 16) Pernow B : Substance P. *Pharmacol Rev* **35** : 85~141, 1983.
- 17) Lundberg JM, Saria A, Brodin E, et al : A substance P antagonist inhibits vagally induced increase in vascular permeability and bronchial smooth muscle contraction in the guinea pig. *Proc Natl Acad Sci USA* **80** : 1120~1124, 1983.
- 18) Gashi AA, Borson DB, Finkbeiner WE, et al : Neuropeptides degranulate serous cells of ferret tracheal glands. *Am J Physiol* **251** : 223~229, 1986.
- 19) Okamoto Y, Kudo K, Shirotori K, et al : Presence of respiratory syncytial virus genomic sequences in middle ear fluid and its relationship to expression of cytokines and cell adhesion molecules. *J Infect Dis* **168** : 1277~1281, 1993.
- 20) 波田野洋一, 今野昭義, 戸川 清, 他 : 鼻アレルギー患者のダニ (*Dermatophagoides farinae*) 特異抗体について. *アレルギー* **37** : 86~93, 1988.
- 21) Yokota T, Coffman RK, Hagiwara H, et al : Isolation and characterization of lymphokine cDNA clones encoding murine and human IgA-enhancing factor and eosinophil colony stimulating factor activities ; relationship to interleukin 5. *Proc Natl Acad Sci USA* **84** : 7388~7392, 1987.
- 22) Beagley KW, Eldridge JH, Lee F, et al : Interleukins and IgA synthesis ; human and murine interleukin 6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells. *J Exp Med* **169** : 2133~2148, 1989.
- 23) Bot FJ, Van Eijk L, Schipper P, et al : Effects of human interleukin-3 on granulocytic colony-forming cells in human bone marrow. *Blood* **73** : 1157, 1989.
- 24) Saito H, Hatake K, Dvorak AM, et al : Selective differentiation and proliferation hematopoietic cells induced by recombinant human interleukins. *Proc Natl Acad Sci USA* **85** : 2288, 1988.
- 25) Clutterbuck EJ, Hirst EMA and Sanderson CJ : Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures ; comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6 and GM-CSF. *Blood* **73** : 1504, 1989.
- 26) Lopez AF, Sanderson CJ, Gamble JR, et al : Recombinant human interleukin-5 is a selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med* **167** : 219, 1988.
- 27) Gleich GJ and Adolphson CR : The eosinophilic leukocyte ; structure and function. *Adv Immunol* **39** : 177, 1986.
- 28) Gleich GJ, Frigas E, Loegering DA, et al : Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein. *J Immunol* **123** : 2925, 1979.
- 29) Olsson I, Venge P, Spitznagel KJ, et al : Arginine-rich cationic proteins from human eosinophil granules. *Lab Invest* **36** : 493~500, 1977.
- 30) Durack DT, Ackerman SJ, Loegering DA, et al : Purification of human eosinophil-derived neurotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* **78** : 5165, 1981.
- 31) Kitani S, Ito K and Miyamoto T : Measurement of IgG, IgA and IgM antibodies to mite (*Dermatophagoides farinae*) in sera and sputa from asthmatic patients by ELISA. *Ann Allergy* **55** : 1~9, 1985.
- 32) Fuller RW, Maxwell DL, Dixon CMS, et al : Effect of substance P on cardio vascular and respiratory function in subjects. *J Appl Physiol* **62** : 1473~1479, 1987.
- 33) Shimura S, Sasaki T, Okayama H, et al : Effect of substance P on mucous secretion of isolated submucosal gland from feline trachea. *J Appl Physiol* **63** : 646, 1987.
- 34) Church MK, EL-Lati S and Caulfield JP : Neuropeptides-induced secretion from human skin mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* **94** : 310~318, 1991.
- 35) Lotz M, Vaughan JM and Corson DA : Effect of neuropeptides on production on inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* **241** : 1218~1221, 1988.
- 36) Alam R, Welter JB, Forsythe PA, et al : Comparative effect of recombinant IL-1, -2, -3, -4 and -6, IFN γ , granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor, tumor necrosis factor α and histamine-releasing factors on the secretion of histamine from basophils. *J Immunol* **142** : 3431, 1989.
- 37) Massey WA, Randall T, MacDonald SM, et al : Recombinant human IL-1 enhances IgE-dependent basophil histamine release. *FASEB J* **2** : 1251a (Abstr.), 1988.
- 38) Schleimer RP, Derse CP, Friedman B, et al : Regulation of human basophil mediator release by cytokines. ; I. Interaction with antiinflammatory steroid. *J Immunol* **143** : 1310~1317, 1989.
- 39) 鶴藤 丞 : ステロイドの抗炎症, 抗アレルギー機序. *治療学* **12** : 307~310, 1989.

(原稿受付 : 平成 9 年 3 月 27 日
原稿採択 : 平成 9 年 6 月 11 日
別刷請求先 : 白鳥浩二
〒010 秋田市本道1-1-1
秋田大学医学部耳鼻咽喉科学教室)