鼻アレルギーに対するメチレンブルーの影響

川本 浩子¹⁾・渡部 浩²⁾・夜陣 紘治³⁾・高路 修⁴⁾

Effects of Methylene Blue on Human Nasal Allergy

Hiroko Kawamoto

(Miyoshi Central Hospital)

Hiroshi Watanabe

(Chugoku Rosai General Hospital)

Koji Yajin and Osamu Kouro

(Hiroshima University School of Medicine)

Recently, the relationship between nitric oxide (NO) and allergies has been reported. The majority of NO effects appear to be mediated by activation of guanylate cyclase (GC). Methylene blue (MB) inhibits the activity of GC when applied to the nasal mucosa of allergic rhinitis volunteers. MB inhibited the nasal provocation reaction to specific allergens. We also investigated the effect of MB on antigen induced release of histamine and leukotrienes (LTs) from human nasal polyps *in vitro*. MB inhibited the release of LTB₄ while it did not inhibit the release of histamine and LTC₄/D₄/E₄. MB potentially inhibits not only the release of chemical mediators, but also non specific nasal hypersensitivity.

Key words : methylene blue, nasal allergy, histamine, leukotriene

はじめに

近年、呼気中に排出される一酸化窒素 (NO) の大部分は、鼻・副鼻腔にて産生されるものであることが、明らかにされている¹⁾。また、季節性鼻アレルギー患者における、花粉飛散期の鼻腔内 NO 濃度の上昇²⁾など、鼻アレルギーと NO との関連も示唆されている。しかし、NO が、鼻アレルギーにおいて、どのような作用をもつかはいまだ明らかになっていない。NO は、主に、グアニル酸シクラーゼ (GC) を活性化し、cGMP を生成する経路を経て、その作用を発現する³⁾。今回我々は、GC を阻害する作用をもつメチレンブルー⁴⁾を用いて、その鼻アレルギー過敏性に対する影響を、鼻アレルギー患者における鼻誘発反応 (*in vivo*)、および摘出鼻ポリ-

ブにおけるケミカルメディエーター遊離実験 (*in vitro*) にて検討した。

対象と方法

1. 鼻誘発反応に対するメチレンブルーの影響 (*in vivo* study)

成人の通年性鼻アレルギーボランティア 9 名 (男性 6 名, 女性 3 名) に対して、抗原特異的鼻誘発反応に対するメチレンブルーの影響を検討した。 chests社製鼻腔通気度計にて anterior 法により鼻腔抵抗を測定した後、0.2 mg/ml のメチレンブルー 1 ml を鼻腔内にネブライザーにて 5 分間投与した。再度鼻腔通気度を測定した後、トリイ製ハウスダストアレルゲンディスクを両側下鼻甲

1) 公立三次中央病院耳鼻咽喉科
3) 広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室

2) 中国労災病院耳鼻咽喉科
4) 広島大学医学部附属病院皮膚科

介に1個ずつ附着させ, その後10分間におけるくしゃみ回数, 鼻汁重量および10分後の鼻腔通気度を測定した. コントロールとしては, メチレンブルーのかわりに生理食塩水1 mlを使用した.

2. ケミカルメディエーター遊離に対するメチレンブルーの影響 (*in vitro* study)

検体として, 副鼻腔炎患者に対する鼻内内視鏡手術, 鼻茸切除術において切除した鼻ポリープを用いた. 採取した鼻ポリープは細切し, 10%ダニ特異的IgEを含む血清で, 37°Cにて90分間受動感作を行った. 血清は, ダニに対して強い感受性(CAP-RASTにてダニ特異的IgE値が100 U/ml以上)をもつ鼻アレルギー患者あるいはアトピー性皮膚炎患者から採取した. 受動感作後, 組織を0.02~2 µg/mlのメチレンブルーを含む1 mlのTyrode緩衝液で37°Cにて5分間のpre incubationを行った. コントロールとして1 mlのTyrode緩衝液を用いた. その後, 10 µg/mlのダニ抗原(鳥居薬品より提供)を加え, 37°Cにて20分間のincubationを行った. 遠心操作の後, 反応上清を得た. 残りの鼻ポリープ組織片を含む下層をTyrode緩衝液中で煮沸し, 再び遠心操作の後, 沈渣上清を得た. 反応上清および沈渣上清中のヒスタミン濃度をradioimmunoassayにて測定し, ヒスタミン遊離率を算定した. また, 反応上清中のロイコトリエン(LTB₄, LTC₄/D₄/E₄)濃度を, enzymeimmunoas-

say system (Amersham, Japan)にて測定した.

結 果

1. 鼻誘発反応に対するメチレンブルーの影響 (*in vivo* study)

抗原誘発によるくしゃみ回数は, 0.2 mg/mlメチレンブルー投与後において, 生理食塩水投与後に比べ少なく, ウィルコクソン検定にて5%以下の危険率で有意差を認めた. 鼻汁重量もやはりメチレンブルー投与後において少なく, ウィルコクソン検定にて1%以下の危険率で有意差を認めた(図1). 鼻閉に関しては, 誘発前後の鼻腔抵抗の増加率を計算し, 生理食塩水投与後とメチレンブルー投与後において比較した. メチレンブルー投与後においてやや鼻腔抵抗の増加率は低かったが, 有意差は認められなかった(図2).

2. ケミカルメディエーター遊離に対するメチレンブルーの影響 (*in vitro* study)

4検体において, 抗原誘発によるヒスタミン遊離について検討を行った. コントロールにおけるヒスタミン遊離率は4.7~12.2%(平均7.0%)であった. メチレンブルー処置によるヒスタミン遊離率の変化は認められなかった(図3).

6検体において, 抗原誘発によるLTB₄の遊離について検討した. コントロールにおけるLTB₄の遊離は,

図1 鼻誘発反応におけるくしゃみ回数, 鼻汁重量に対する, メチレンブルーの影響

図2 抗原誘発による鼻腔抵抗の増加率に対する、メチレンブルーの影響

図3 抗原誘発によるヒト鼻ポリープからのヒスタミン遊離に対する、メチレンブルーの影響

0.63~6.85 pg/mg wet tissue (平均 2.59 pg/mg wet tissue) であり、メチレンブルー処置により、 LTB_4 遊離の抑制が認められた。0.2 $\mu\text{g/ml}$ にて最も強い抑制がみられた(図4)。

1 検体において、抗原誘発による $LTC_4/D_4/E_4$ の遊離について検討した。コントロールにおいて $LTC_4/D_4/$

E_4 の遊離は、10.1 pg/mg wet tissue であり、メチレンブルー処置による抑制は認められなかった(図5)。

考 察

従来より、細胞内の cGMP 濃度の上昇は、肥満細胞からの化学伝達物質遊離を促進することが知られてお

図4 抗原誘発によるヒト鼻ポリープからの LTB₄ 遊離に対する、メチレンブルーの影響

図5 抗原誘発によるヒト鼻ポリープからの LTC₄/D₄/E₄ 遊離に対する、メチレンブルーの影響

り⁵⁾, 鼻アレルギーにおいても, 鼻汁中の cGMP 濃度が上昇し, 重症例ほど高濃度であることが報告されている⁶⁾. 肺組織中の cGMP 濃度を上昇させる伝達物質として, 従来はアセチルコリンが考えられていた⁵⁾. しかし, ラットの気管において, カルバコールによる組織中 cGMP の上昇が NO 合成酵素阻害薬である N^G-nitro-L-

arginine によって消失するという報告もあり⁷⁾, アセチルコリンによる cGMP 濃度の上昇も NO を介することが考えられる. 今回, 鼻アレルギーと NO-cGMP 系の関連性について検討するために, GC を阻害し, cGMP 生成を抑制する作用をもつメチレンブルーを用いて, その影響を検討した. メチレンブルーは, 通年性鼻アレルギー

ギーにおける抗原特異的誘発反応, 特にくしゃみ, 鼻汁を著明に抑制した. 鼻閉に対して有意な抑制はみられなかったが, 重症者に関しては, 抑制傾向が認められた. この誘発反応抑制の機序として, 肥満細胞からのケミカルメディエーター遊離抑制が推察される. そこで, *in vitro* において, 摘出ポリープからのヒスタミン, LTB_4 , $\text{LTC}_4/\text{D}_4/\text{E}_4$ の遊離に対するメチレンブルーの影響を検討した. メチレンブルーは, ヒスタミン, $\text{LTC}_4/\text{D}_4/\text{E}_4$ の遊離に影響を与えなかったが, LTB_4 の遊離は有意に抑制した. ヒスタミン, LTC_4/D_4 は, 平滑筋収縮や, 血管透過性亢進, 鼻汁分泌促進作用をもつ. 一方, LTB_4 は, 好中球や好酸球の走化, 運動性亢進作用の他, 活性酸素産生, 血管壁への接着などへの関与が知られている. 活性化好酸球は, 鼻粘膜の過敏性に大きく関与する⁸⁾. しかしながら, この LTB_4 の作用の抑制のみでは, *in vivo* で認められた著明なくしゃみ, 鼻汁の抑制を説明できない. この結果の解離の原因としては, *in vitro* の実験では, 鼻ポリープを使用しているため肥満細胞の性質が異なる可能性や, 受動感作であるため実際のアレルギー病態を反映していない可能性などが考えられる. また, *in vivo* においてメチレンブルーがケミカルメディエーターの効果器側に作用し過敏性を抑制した可能性も考えられる. いずれにしても, 鼻アレルギーにおいて, メチレンブルーは抗原刺激による鼻誘発反応を抑制する作用が認められ, この機序として, 抗原抗体反応によるケミカルメディエーターの遊離抑制や, 非特異的鼻粘膜過敏性を抑制する可能性などが考えられるが, 今後さらに検討が必要である.

参考文献

- 1) Lundberg JON, Weitzberg E, Nordvall SL, et al : Primarily nasal origin of exhaled nitric oxide and absence in Kartagener's syndrome. Eur Respir J 7 : 1501~1504, 1994.
- 2) Martin U, Bryden K, Devoy M, et al : Exhaled nitric oxide levels are increased in association with symptoms of seasonal and perennial allergic rhinitis. Am J Resp Crit Care Med 151 : 128, 1995.
- 3) Moncada S, Parmer RPM, and Higgs EA : Nitric oxide ; physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 43 : 109~142, 1991.
- 4) Gruetter CA, Kadowitz PJ, and Ignarro LJ : Methylene blue inhibits coronary arterial relaxation by nitroglycerin, sodium nitrite, and amyl nitrite. Can J Physiol Pharmacol 59 : 150~162, 1981.
- 5) Kaliner M, Orange RP, and Austen KF : Immunologic release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis from human lung. IV ; enhancement by cholinergic and alpha-adrenergic stimulation. J Exp Med 136 : 556~557, 1972.
- 6) 朝倉光司 : 鼻アレルギーにおける自律神経機能の検索. 日鼻科 22 : 340~345, 1984.
- 7) Jia YL, Xu LJ and Martin JG : Endogenous nitric oxide contributes strain-related differences in airway responsiveness in rats. Am J Resp Crit Care Med 151 : 127, 1995.
- 8) Linder A, Venge P and Deuschi H : Eosinophil cationic protein and myeloperoxidase in nasal secretion as markers of inflammation in allergic rhinitis. Allergy 42 : 583~590, 1987.

(別刷請求先 : 川本浩子
〒728-0023 三次市東酒屋町531
公立三次中央病院耳鼻咽喉科)