平成8年スギ花粉シーズンにおける 血清および鼻粘膜スギ花粉特異的 IgE 値の変動について

獨協医科大学耳鼻咽喉科学教室

清水 宏明

Change of Specific IgE Levels in Serum and Nasal Mucosa during the Cedar Pollen Season in 1996

Hiroaki Shimizu, M.D.

Department of Otolaryngology, Dokkyo University School of Medicine

Abstract

During the season of cedar pollen dispersion in 1996, specific IgE and IL-4 levels in serum and nasal mucosa were determined with time in volunteers who have cedar pollen allergy. In comparison with the serum IgE level determined on January 24 as the baseline value, both values determined during and two months after the cedar pollen season decreased significantly. This was further supported by simultaneously changed IL-4 levels, though the rate of change was relatively small. However, the fact that the determination was performed in a year of small amount of dispersed pollen might have influenced the result. Since changes in IgE and IL-4 levels before and after induction for 6 consecutive days during the nondispersion period showed an increasing trend especially in the nasal mucosa, a possibility was suggested that IgE antibody began to be produced on January 24 when a small amount of cedar pollen had already been dispersed. Since IgE levels in the nasal mucosa decreased during the dispersion period and recovered around two months after dispersion, a possible relation of production to consumption was indicated. Though the mucosal IgE and IL-4 levels were determined in a minimal sample of a mucosal abrasion fragment, these values correlated well with serum IgE levels. Thus this method of determination seemed to be of value for future application.

Key words : IgE antibody production, IL-4, cedar pollen allergy, abrasion of nasal mucosa

1. 緒 言

アレルギー性鼻炎は鼻粘膜の I 型アレルギー反応によって惹起されるが、抗原との接触によって特異的 IgE 抗体が産生されるのが、第 1 段階の反応と考えられている。

抗体産生細胞である B リンパ球に IgE 抗体産生を誘導するには、抗原刺激により活性化された Th2 リンパ球が産生する Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-13 (IL-13) などのサイトカインの存在下で、Th2 リンパ球表面

に発現した CD40 リガンドが B リンパ球上の CD40 と結合して、活性化シグナルを B リンパ球に伝えることが必要とされる¹⁻⁵⁾。

この抗体産生がどこで行われているのかは明らかではないが、IgE 抗体産生細胞が、骨髄、脾臓などには極めて少ないことから、局所で IgE 抗体が産生されていると推測されている⁶⁾。しかし、鼻粘膜固有層には抗体産生細胞である B リンパ球は少ないことから、咽頭扁桃や口蓋扁桃が NALT (nose associated lymphoid tissue) として

主要なIgE抗体産生部位であると推測がなされている⁷⁾。一方、鼻粘膜にもリンパ濾胞の形成がみられる症例の報告もあり⁸⁾、鼻粘膜での抗体産生の可能性も否定できない。

スギ花粉症では、抗原と接触する時期が限られており、この時期に血中特異的IgE抗体が上昇するとの報告がある^{9,10)}。また、スギ花粉は約30 μm と比較的大きな吸入抗原であることから、粘膜への付着は鼻粘膜およびその周辺のみに限られ、下気道にはほとんど進入しないことが分かっている¹¹⁾。

そこで本研究では、スギ花粉飛散期およびその前後の特異的IgE抗体を経時的に測定することを試みた。特異的IgE抗体測定は血中に加えて鼻粘膜擦過片についても、その変化の経過を観察するとともに、抗体産生に関与するサイトカインであるIL-4も測定した。次に、非飛散期のスギ花粉症患者の鼻粘膜に連続6日間抗原負荷を行い、その前後における血中、粘膜の特異的IgE抗体、IL-4を測定しモデル実験とした。

これらの結果を報告するとともに、その成績からスギ花粉飛散に起因する血中および局所の特異的IgE抗体の変化、また両者の関係から粘膜局所におけるIgE抗体産生についての考察を試みた。

2. 対象と方法

(1) 飛散期における研究

対象はスギ花粉症有症者でCAP-RAST (CAP-Radio allergosorbent test) クラス2以上のボランティア20名で、年齢は19歳から46歳までの平均年齢23.4歳の女性である。

研究は平成8年のスギ花粉シーズンに行い、花粉飛散前(1月24日)、飛散ピーク前(3月11日)、飛散終了直後(4月22日)、飛散終了2カ月後(7月1日)に、採血および鼻粘膜の採取を行った。これらの検査施行日が、平成8年の花粉飛散状況の中でどのような時期であるか、またその時期の症状程度を知るため、無治療のボランティア10名の日記からスコア化した症状経過と飛散状況を図1に示した。初観測日1月3日、飛散開始2月15日であった。1月24日は連続飛散前にあたり、症状が出始めた時、3月11日は飛散ピークの前にあたり、症状は軽度ながら継続的に出現している時、4月22日は飛散が終了し、症状が消失しつつある時期であった。また、7月1日は飛散終了後2カ月時であった。

鼻粘膜採取は下鼻甲粘膜を阪大式両端鋭匙で擦過し、50 μl の生食水に入れ、ホモジェナイゼーション後遠心し、上清を -80°C 凍結保存し、測定時に溶解した。

図1 平成8年スギシーズンにおけるスギ花粉飛散と鼻症状との関係

血清および鼻粘膜抽出液のスギ花粉特異的IgE抗体の測定はCAP-RAST法により、IL-4はCSPDを発光基質としたCLEIA (chemiluminescent enzyme immunoassay) 法で行った。

尚、鼻粘膜の測定値については、擦過量が一定でないことも考えられるため、Lowry法により測定した蛋白量による補正を行ったが、個々の変動には差がなかった。

また、擦過粘膜の構成細胞を知るため、免疫組織染色を行った。抗CD4抗体(ニチレイ社)および抗CD40 Ligand抗体(genzyme社)を用いたSAB (Streptavidin-Biotin) 法による染色である。

(2) 非飛散期における研究

対象はスギ花粉症を持つボランティア23名で、年齢は19歳から23歳までの平均年齢20.8歳の女性である。スギ花粉の非飛散期である平成7年9月及び11月に、スギ花粉抗原ディスク(国立相模原病院の提供による)。両側下鼻甲粘膜に1枚づつ添付する抗原負荷を、1日1回6日間連続して行った。

初日と最終日の抗原負荷20分後に採血および鼻粘膜採取を行い、スギ花粉特異的IgE抗体、IL-4の測定を行った。方法は前項と同様であった。

これらの測定値は個人差が大きいため、各個の初回測定値を1とした比をもって変動の指標とした。

統計解析はpaired-t検定により、 $p < 0.01$ を有意差あり、 $p < 0.05$ を傾向差とした。

3. 結果

(1) 飛散期におけるIgE抗体の変動

血清、粘膜の特異的IgE抗体の変動を図2に示した。3月11日には血清、粘膜ともに有意な減少を示し、血清では4月22日に復元、7月1日に再び有意に減少した。粘膜では減少後上昇傾向を示し、7月1日には平均値は

図2 平成8年スギシーズンにおける血清・粘膜スギ花粉特異的IgE抗体の変動

図3 血中と鼻粘膜におけるスギ花粉特異的IgE抗体の相関関係

低いものの、統計上は有意差なく1月24日のレベルに復元した。

尚、血清と粘膜IgE抗体との相関係数を図3に示したが、 $r=0.749$ と比較的良好であった。

(2) 飛散期におけるIL-4の変動

血清、粘膜IL-4の変動を図4に示した。血清ではシーズン中には変動を示さず、飛散終了2ヵ月後の7月1日には有意に減少した。粘膜では、3月11日に減少、4月22日には有意差はないものの上昇し、7月1日には血清と同様、有意に低下した。

尚、血清および粘膜IgE抗体とIL-4の間には相関は認められなかった。

(3) 連続抗原負荷によるIgE抗体、IL-4の変化

特異的IgE抗体の誘発前後における変化を図5に示した。血清では変化なく、粘膜においては統計的有意差はないものの平均値は上昇した。

IL-4の誘発前後における変化を図6に示した。粘膜、

図4 平成8年スギシーズンにおける血清・粘膜IL-4の変動

図5 非飛散期(9月, 11月)におけるスギ花粉特異的IgE抗体の6日間連続誘発前後の変動

図6 非飛散期(9月, 11月)におけるIL-4の6日間連続誘発前後の変動

血清ともに平均値は上昇し、粘膜では有意傾向を示した。

(4) 免疫組織染色

4月22日採取の鼻粘膜擦過標本の免疫組織染色の1例を図7に示した。CD4抗体(図7a), CD40リガンド抗体

図 7a 鼻粘膜擦過標本中に CD4 陽性細胞を認める。

図 7b 鼻粘膜擦過標本中に CD40 ligand 陽性細胞を認める。

(図 7b) とともに擦過標本中に存在することが確認された。

4. 考 察

本研究では、スギ花粉飛散によって、特異的 IgE 抗体がどのように変化するかを、血清および局所において検討した。一般的にスギ花粉特異的 IgE 抗体は花粉飛散によって増加すると言われている^{9,10)}。小川らは 2 年間にわたり同一のスギ花粉症患者の血中特異的 IgE 抗体を経時的に測定し、スギ花粉飛散直前に最低値となり、飛散開始と共に増加を初め、飛散開始より 2 から 3 カ月後にピーク値を示し、その後、徐々に減少することを報告している¹⁰⁾。一方、我々の結果では、1 月 24 日に比べて、3 月 11 日、7 月 1 日の血清スギ花粉特異的 IgE 値は減少しており、飛散終了時の 4 月 22 日には 1 月 24 日と同レベルであった。すなわち、花粉飛散によってむしろ特異的 IgE 値が低下する傾向を示している。

この理由としてまず考えなければならないのは、基準とした 1 月 24 日の値が、飛散前期の値ではない可能性である。平成 8 年のスギ花粉初観測日は 1 月 3 日と早く、ごく少量ながら 20 日あまり花粉飛散に暴露されているこ

とになる。非飛散期に行った 6 日間の連続抗原負荷前後における血中特異的 IgE 値は変化しないものの、粘膜局所では平均値の上昇を認め、抗体産生に参与するサイトカインである IL-4 は、特に粘膜局所において上昇傾向を示している。また、結果は示さなかったが、同時に測定した粘膜 IL-13 も平均値の上昇を認めた。わずか 6 日間の、しかも誘発ディスクを 1 日 1 回添付するだけで生じた変化に比べ、少量でも 20 日あまりの抗原負荷は、1 月 24 日の IgE 抗体レベルを増加させた可能性は否定出来ない。

また、平成 8 年が 676 個というごく少量飛散年であったことも関係しているかもしれない。一方、IgE 抗体産生とともに局所における消費についても考慮しなければならないであろう。粘膜局所における IgE 値が、症状の発現している 3 月 11 日、4 月 22 日に低値であったことから、この時期に多量に鼻粘膜に存在する肥満細胞に付着した IgE 抗体が鼻汁によって流出するためかもしれない。しかし、産生と消費については、花粉飛散前よりの測定を含めた、もう少し計画的な研究による結論とすべきであろう。

IgE 抗体産生は、局所で行われると考えるのが一般的であり、アレルギー性鼻炎の場合、鼻粘膜に付着した抗原が繊毛運動により運ばれ、咽頭扁桃におけるラングハンス細胞などの抗原提示細胞に取り込まれ、ヘルパー T 細胞に抗原提示され、抗体産生に続いていくという、NALT が抗体産生部位とする考え方が有力である⁷⁾。しかし、今回の鼻粘膜擦過標本という粘膜のごく表層のみの免疫染色においても、CD4 陽性細胞および CD40 リガンド陽性細胞の存在を認めたことから、鼻粘膜での抗体産生も否定は出来ない。B リンパ球からの IgE 抗体産生には 2 種類のシグナルが必要とされる。第 1 は IL-4 で、B リンパ球に直接作用し、その活性化と IgE へのクラススイッチを特異的に誘導する^{12,13)}。アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜に浸潤している CD4 陽性 T 細胞は、産生するサイトカインの種類から Th2 タイプであるとされる^{14,15)}。Ying は、鼻粘膜誘発 24 時間後の鼻粘膜中 IL-4 mRNA 陽性細胞を調べ、75% が T リンパ球、25% が肥満細胞であったと報告している¹⁶⁾。すなわち、鼻粘膜での IL-4 の大部分は Th2 細胞により産生され则认为てよい。

第 2 のシグナル伝達は、B リンパ上に発現する CD40 と活性化 T リンパ球上に発現する CD40 リガンドとの結合によって行われる¹⁷⁻²¹⁾。CD40 リガンドは、T 細胞による接触依存性の B 細胞活性化に重要な役割をはたす分子として同定された。この分子が B 細胞上の CD40 と結合

すると活性化シグナルをB細胞に伝え、IL-4, 5, 6, 13などのサイトカインの存在下で、B細胞の増殖、抗体産生、クラススイッチなどが誘導される。高橋らは、アレルギー性鼻炎患者の下鼻甲粘膜におけるCD20陽性細胞(Bリンパ球)の大部分がCD40陽性に染色されたと報告しており⁸⁾、今回の鼻粘膜擦過標本中のCD4陽性細胞およびCD40リガンド陽性細胞の存在を考え合わせると、鼻粘膜局所において、抗原との接触によりIgE抗体が産生される可能性は充分にあると考えてよい。

今回の粘膜でのIgE抗体測定は、擦過片というごく少量の検体で行った。従来、局所でのIgE抗体測定は下鼻甲の切除粘膜で行われており、血中IgE抗体との相関関係があることや、血中IgE抗体よりも鼻アレルギーの症状との関係が強い場合もあるなどの報告がある^{22,23)}。今回の研究では、経時的に繰り返し測定する必要性から、擦過片での測定を試みざるを得なかった。しかし、血清IgE抗体と局所IgE抗体との相関関係は $r=0.749$ と比較的良好ことがわかり、この方法でも局所のIgE抗体を表現しうるものと考えた。一方では、この擦過片内でIgE抗体は、どこに、どの様な形で存在したものを測定したかは推測の域を出ないことも確かである。

この粘膜IgE値の変動をみると、1月24日を基準とすると、花粉が少量飛散して症状が軽度ながら持続的に発現している時期に減少し、本格的な飛散と共に上昇し、7月に復元していることが分かる。また粘膜IL-4の変動は、花粉の本格的な飛散期に上昇し、季節終了後の7月1日に有意に低下している。このことから、局所におけるIgE値は、抗原暴露による産生と、症状発現による消費との関係によって変動するものと推察した。

今回の研究では、1月24日におけるごく少量飛散期のIgE値を基準として、シーズン中およびシーズン後の変動を検討したところシーズン中のIgE値は減少傾向にあるとの結論を得た。しかし、基準とした時点ですでにIgE抗体産生が起きている可能性があり、非季節時における6日間の連続誘発前後の検討が、このことを支持するものであった。したがって、基準とする時期を初観測日より前にすることや、飛散数の多い年に再検討する必要があることなどの課題を残した。一方、局所のIgE抗体測定においては、擦過片を検体として用い得る可能性が示された。

5. 結 語

平成8年のスギ花粉飛散期に、スギ花粉症を持つボランティアを対象として経時的に、血清および鼻粘膜の特異的IgE値、IL-4値を測定した。

- 1) 血清IgE値は、1月24日を基準とした変動を検討すると、飛散期、飛散終了2カ月後ともに有意な低下を示した。変化率は小さいもののIL-4の変動は、これを裏付けるものであった。しかし、飛散数の少ない年での検討であったことが、結果に影響している可能性が考えられた。
- 2) 非飛散期における6日間連続誘発前後のIgE抗体、IL-4の変化は、特に鼻粘膜で増加傾向を示したことから、すでに少量の花粉が飛散していた1月24日にはIgE抗体産生が起こっていた可能性を示唆した。
- 3) 粘膜IgE値は飛散期に減少し、飛散2カ月後には復元したことから、局所における産生と消費との関係によるものと推察した。
- 4) 粘膜IgE抗体、IL-4の測定は粘膜擦過片というごく少量の材料で行ったが、血清IgE抗体との相関も高く、今後も使用しうる方法と考えた。

稿を終えるにあたり、本研究の要旨に賛同の上、ご協力を戴いたボランティアの方に深甚なる謝意を表します。また、助言を戴いた研究員木谷孔保先生、ならびにご指導、ご校閲を賜りました馬場廣太郎教授に深謝いたします。

本論文の要旨は第97回日本耳鼻咽喉科学会総会(1996年5月、福岡市)、第35回日本鼻科学会総会(1996年10月、仙台市)にて発表した。

文 献

- 1) Gascan H, Gauchat JF, Aversa G, et al.: Anti CD40 monoclonal antibodies or CD4⁺ T cell clones and IL-4 induce IgG4 and IgE switching in purified human B cells via different signaling pathways. *J. Immunol.* 147: 8-13, 1991
- 2) Spriggs MK, Armitage RJ, Fanslow WC, et al.: Recombinant Human CD40 ligand Stimulates B Cell Proliferation and Immunoglobulin E Secretion. *J. Exp. Med.* 176: 1543-1550, 1992
- 3) Armitage RJ, Macduff BM, Spriggs MK, et al.: Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines. *J. Immunol.* 150: 3671-3680, 1993
- 4) Clark EA, Ledbetter JA: How B and T cells talk to each other: *Nature.* 367: 425-428, 1994
- 5) Mudde GC, Bheekha R: Consequences of IgE/CD23-mediated antigen presentation in allergy. *Immunology Today* 16: 380-383, 1995

- 6) Tada T, Ishizaka K : Distribution of γ E-forming cell in lymphoid tissues of the Human and monkey. *J Immunol* 104 : 377-387, 1970
- 7) 奥田 稔 : I 型アレルギーとリンパ球. アレルギーと領域 1 : 23-29, 1994
- 8) 高崎賢治 : 鼻アレルギー下鼻甲粘膜の免疫組織学的検討—B リンパ球サブセット (主に CD20 と CD40) について—. *日耳鼻* 99 : 695-699, 1996
- 9) 高山 哲, 長谷川誠, 斉藤洋三・他 : Radioallergosorbent Test (RAST) によるスギ花粉症の検討. III. スギ花粉症における血清 IgE および IgE 抗体の季節変動. *日耳鼻*, 79 : 418-424, 1976
- 10) 小川 保, 石井譲治, 三谷一憲・他 : スギ花粉症患者における血中特異的抗体濃度の経時的変化. *Bull. Inst. Public Health* 41 : 404-406, 1992
- 11) 奥田 稔 : 鼻アレルギー第 2 版. 金原出版, 東京, 1992, 59-63 頁
- 12) Kopf M, Gros GL, Bachmann M, et al. : Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362 : 245-250, 1993
- 13) Schleimer RP, Sterbinsky SA, Bochner BS, et al. : IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. *J. immunol.* 148 : 1086-1092, 1992
- 14) Kapsenberg ML, Wierenga EA, Bos JD, et al. : Functional subsets of allergen-reactive human CD4⁺ T cells : *Immunology Today* 12 : 392-395, 1991
- 15) Durham SR, Ying S, Varney VA, et al. : Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5 and granulocyte/macrophage-colony-stimulation factor in the nasal mucosa after local allergen provocation : relationship to tissue eosinophilia. *J. Immunol.* 148 : 2390-2394, 1992
- 16) Ying S, Durham SR, Jacobson MR, et al. : T lymphocytes and mast cells express messenger RNA for interleukin-4 in the nasal mucosa in allergen-induced rhinitis : *Immunology* 82 : 200-206, 1994
- 17) Noelle RJ, Ledbetter JA, Aruffo A : CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation. *Immunology Today* 13 : 431-433, 1992
- 18) Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, et al. : The CD40 Ligand, gp39, is Defective in Activated T Cells from Patients with X-Linked Hyper-IgM Syndrome : *Cell* 72 : 291-300, 1993
- 19) Nonoyama S, Hollenbaugh D, Aruffo A, et al. : B Cell Activation via CD40 is Required for Specific Antibody Production by Antigen-stimulated Human B Cells : *J. Exp. Med.* 178 : 1097-1102, 1993
- 20) Durie FH, Foy TM, Noelle RJ, et al. : The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. *Immunology Today* 15 : 406-411, 1994
- 21) Grewal IS, Flavell RA : A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4⁺ T-cell responses : *Immunology Today* 17 : 410-414, 1996
- 22) 大橋淑宏, 中井義明, 頭司研作・他 : 組織-RAST による鼻粘膜局在 IgE 抗体の検索. *耳鼻咽喉科* 55 : 327-331, 1983
- 23) 王 主榮, 木谷孔保, 清野 仁・他 : 組織 RAST について. *免疫アレルギー* 5 : 102-103, 1987

(1996年10月30日受稿, 1996年12月19日受理)