

Broncasma Berna[®] の気道組織に対する組織・免疫学的影響

秋田大学 耳鼻咽喉科

白鳥 浩二, 岡本 美孝, 工藤 和夫,
伊藤 永子, 戸川 清

はじめに

Broncasma Berna[®] (以下 B.B.) は, 上気道常在菌 8 種を含む多種菌体抗原で, 近年, 慢性副鼻腔炎・アレルギー性鼻炎に対し鼻腔局所投与による有効性が注目されている。しかし, その作用機序についてはいまだ不明瞭な点が多く, 一方, B.B. の局所投与により気道組織, 特に肺組織に対するアナフィラキシーの危惧も指摘されている。今回, 我々は B.B. の Jet 型ネブライザー吸入が気道に及ぼす影響について, *in vivo* および *in vitro* で検討を行ったので報告する。

方法

実験動物はメス Hartley 系 SPF モルモットを用い, B.B. 2.0ml に PBS 2.0ml を加えたものを Jet 型ネブライザーで 10 分間, 連日 7 日間投与後, 7 日間休止とし, さらに連日 7 日間投与後, 7 日間休止とし, 14 日目に血液, 28 日目に血液, 肺, 気管傍リンパ節, 気管・肺胞洗浄液を採取した。コントロールとして, B.B. の安

定剤である 0.4% フェノール吸入, および無処置を用いた (図 1)。曝露装置は, 径約 40 cm のプラスチック箱をクリーンベンチ内に設置し, Jet 型ネブライザーと連結したものを使用した。

B.B. 吸入後のモルモットの血清の抗 B.B. IgG, IgM 抗体と気管・肺胞洗浄液中の抗 B.B. IgA, IgM 抗体をマイクロプレート ELISA 法にて検討した。気管・肺胞洗浄液は 37°C, Ca²⁺・Mg²⁺-free HBSS 4 ml で 5 回洗浄し, 総量約 20 ml を 1800rpm, 10 分間の遠心後, その上清を用いた。IgG 測定には, 第 1 抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗モルモット IgG 抗体を, IgA, IgM 測定には, 第 1 抗体としてラビット抗モルモット IgA または IgM 抗体を, 第 2 抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ラビット IgG 抗体を用い, 492nm で比色した。血清中のアナフィラキシー抗体である抗 B.B. IgE および IgG 1 抗体は, 受身皮膚アナフィラキシー (PCA) 法にて測定した。これは正常白色モルモットに 4 倍希釈の血清を 0.1ml ずつ皮内注射し, 4 時間後あるいは 7 日後に 1% Evans blue を

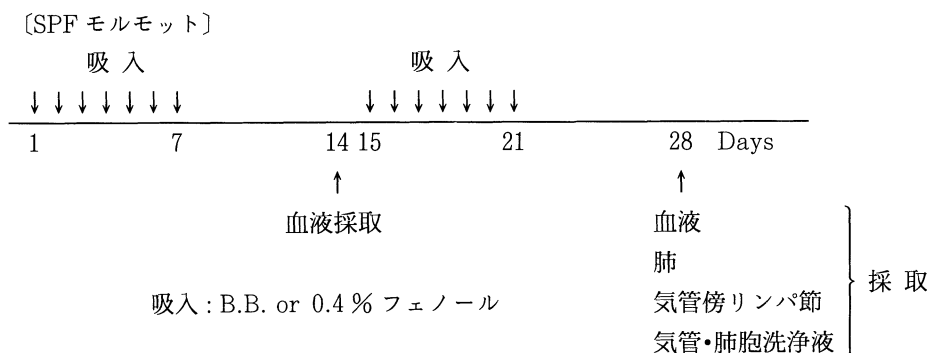


図 1 投与方法

含むB.B.を静注し、30分後に皮膚の青斑の有無を確認した。一方、気管傍リンパ節を細切り、RPMIで3回洗浄後、96穴マイクロプレートに 1×10^5 /mlずつ分注し、B.B.および100倍希釈したPHAを各20 μ l加え、ついで24時間後に40倍希釈のトリチウム-thymidine 10 μ lを加えた。その17時間後にリンパ球をHarvestし、リンパ球のトリチウムの取り込みを測定し、気管傍リンパ節細胞のPHAおよびB.B.に対する反応を検討した。さらに、気管・肺胞洗浄液中のマクロファージを 1×10^6 /mlずつ24穴プレートに分注し、24時間培養後、その培養上清をモルモットの線維芽細胞株であるJ.H. 4 Cellを培養した96穴マイクロプレートに各30 μ l分注し、ついで24時間後に80倍希釈のトリチウム-thymidine 20 μ lを加え、その後、J.H. 4 CellをHarvestして、そのトリチウムの取り込みを測定し、気管・肺胞洗浄液中マクロファージの線維芽細胞の増殖能を検討した(表1)。また、右肺をH.E.染色し、組織学的検討を行った。

表1 検討方法

- 血清及び気管・肺胞洗浄液中の抗B.B. IgG, IgM, IgA抗体
→ マイクロプレートELISA法
- 血清中抗B.B. IgE及びIgG1抗体
→ 受身皮膚アナフィラキシー(PCA)法
- 気管傍リンパ節細胞のPHA及びB.B.に対する反応
→ 3 H-thymidineの取り込み
- 気管・肺胞洗浄液中マクロファージの線維芽細胞増殖能
→ J.H. 4 cellへの 3 H-thymidineの取り込み

結果

B.B.吸入群において、血中のB.B.に対するIgG, IgM抗体および気管・肺胞洗浄液中のB.B.に対するIgA, IgM抗体は、コントロール群に比べて有意な上昇は認められなかった。また、血中アナフィラキシー抗体もPCA法にて確認されなかった。

培養した気管傍リンパ節細胞をB.B.およびPHAにて刺激した後のトリチウム-thymidineの取り込みは、無刺激のモルモットのリンパ球の値を1としたstimulation indexで表わすと、PHA刺激に対してはフェノール吸入群は12.36

±15.10, B.B.吸入群は51.86±29.82で、B.B.吸入群の気管傍リンパ節はPHA刺激に対して有意に高い反応を示した。一方、B.B.に対してもB.B.吸入群は高い値を示したが、有意ではなかった(表2)。

表2 気管傍リンパ節細胞のPHA, B.B.に対する反応

抗原	stimulation index of 3 H-thymidine up take	
	フェノール吸入群	B.B.吸入群
B.B.	1.57±0.67	2.09±0.65
PHA	12.36±15.10 *	51.86±29.82 *

* P<0.05
Control: H-DPM 1294.7

気管・肺胞マクロファージの培養上清のモルモット線維芽細胞株であるJ.H. 4 Cellに対する反応は、無処置群の気管・肺胞マクロファージ培養上清を加えたときの反応を1としたstimulation indexで表わすと、フェノール吸入群は1.21±0.20, B.B.吸入群は1.94±0.67で、B.B.吸入群から採取した気管・肺胞マクロファージ培養上清の方が線維芽細胞に対して有意に高い増殖刺激能を示した(表3)。

B.B.吸入後の肺組織のH.E.染色では、肉芽形成、炎症細胞浸潤などの気管支炎の所見は認められなかった。

表3 気管・肺胞マクロファージの線維芽細胞に対する反応

	stimulation index of 3 H-thymidine up take
フェノール吸入群	1.21 ± 0.20
B.B.吸入群	1.94 ± 0.67

P<0.02
Control: H-DPM 108.9

考察

近年、慢性副鼻腔炎・アレルギー性鼻炎に対し、B.B.の鼻腔局所投与による有効性が注目されている一方で、気道組織、特に肺組織に対するアナフィラキシーの危惧も指摘されているが、今回の我々の検討では、B.B.のJet型ネブ

ライザー吸入にて下気道にアレルギー反応を含めた病変形成は認められず、また、血液中・局所での液性免疫の発現は認められなかった。このことは、粒子径の大きいJet型ネブライザーを用いたときは、肺への組織学的影響は少なく、また、全身的な免疫学的影響も少ないことを示唆していると思われる。一方、気道所属リンパ節のPHA, B.B. に対する反応性の亢進、気管・肺胞マクロファージの線維芽細胞増殖因子の産生亢進が認められたことは、細胞性免疫の賦活、TNFをはじめとするサイトカイン産生誘導とにかかわっている可能性を示し、B.B. の作用機序との関連も推察され、今後さらに検討を要すると思われる。

— 討 論 —

質問； 荻野（大阪大）

B.B.を構成するどのような細菌が一番影響しているか。

応答； 白鳥（秋田大）

B.B. の8種類のうちのどれが特異的に作用するかは検討していませんが、8種類が相互に関係している可能性が推察されます。

質問； 斎藤（福井医大）

前のdataではB.B. 吸入で出血性変化がみられたと思うが、今回はどうであったか。またその差の理由は何ですか。

応答； 白鳥（秋田大）

前回は、Adjuvant のウサギにウルトラネブライザーを用いたためかと思われます。今回は出血性変化などはみられませんでした。