

ラット鼻アレルギーモデルに対する抗細胞接着分子抗体投与の試み

札幌医科大学耳鼻咽喉科

斉藤博子 朝倉光司 形浦昭克

鼻アレルギーにおける細胞接着分子の役割を調べるため、卵白アルブミン(OA)感作ラット鼻アレルギーモデルに対し、抗ICAM-1モノクローナル抗体(1A29)、および抗LFA-1モノクローナル抗体(WT-1)の全身投与の影響を検討した。抗原点鼻直後のくしゃみ、鼻かき回数いずれも抗体投与によって有意に抑制された(抗体非投与群 vs 抗体投与群; くしゃみ, 20.5 ± 5.0 vs 7.0 ± 2.9 回/15分, $p < 0.01$, 鼻かき回数, 56.8 ± 7.1 vs 26.8 ± 2.9 回/15分, $p < 0.01$)。

抗原点鼻24時間後の鼻粘膜中浸潤好酸球数も有意に抑制された(抗体非投与群 vs 抗体投与群 108.8 ± 27.3 vs 13.8 ± 6.9 個, $p < 0.01$)。

本検討より、鼻アレルギーの病態における細胞接着分子の関与が示唆された。

Key words: eosinophil — ICAM-1 — LFA-1 — intercellular adhesion molecule — rat allergic model

はじめに

近年、リンパ球や好酸球の活性化や病変局所への浸潤と細胞接着分子との関連性があきらかになるとともに、各種アレルギー疾患や自己免疫疾患の発症における細胞接着分子の役割が注目されている。モデル動物を用いた研究においては、細胞接着分子特にICAM-1やLFA-1に対する特異的抗体のvivo投与によって喘息¹⁾、EAU (experimental autoimmune uveitis)²⁾、慢性関節リウマチ³⁾⁴⁾、GVHD (graft-versus-host disease)⁵⁾が抑制され、同種移植腎⁶⁾や移植心臓⁷⁾の生着率が向上するとの報告がなされている。

先に我々は、鼻アレルギー患者および非アレルギー性の鼻副鼻腔炎患者を対象として、ヒト鼻粘膜における細胞接着分子とくにICAM-1の発現とT-cellを中心としたリンパ球浸潤⁸⁾⁹⁾、さらに活性化好酸球の指標としてのEG2陽性細胞¹⁰⁾の関連性につき検討を行った。その結果、鼻アレルギー粘膜において、ICAM-1の鼻粘膜局所での発現度とCD4陽性細胞数、CD45RO陽性細胞数および活性化好酸球数との間に強い正の相関関係を持つことが明らかとなり、鼻アレルギーの病態において、局所への免疫細胞浸潤という面を中心に、

細胞接着分子が重要な役割を担っている可能性が示唆され、そこで、今回、ラットを用いて鼻アレルギーモデルを作成し、細胞接着分子ICAM-1およびLFA-1に対する特異的モノクローナル抗体をvivo投与することによって、鼻症状および局所好酸球浸潤に対する抑制効果を検討した。

研究方法

Wister系ラット(雄, 6~7週齢, 200~300g)に以下のような方法で卵白アルブミン(ovalbumin: OA)による全身、局所の能動感作を行い、鼻アレルギーモデルラットを作成した。その際、抗細胞接着分子抗体投与を行って、抗原チャレンジ後の鼻症状、鼻粘膜内好酸球浸潤およびPCA抗体価に対する影響を検討した。

1) 動物感作方法

まず全身感作として、Mancinoらの方法¹¹⁾に準じてOA $10\mu\text{g}/\text{body}$ およびalum(水酸化アルミニウムゲル) $1\text{mg}/\text{body}$ を腹腔内投与した。腹腔内投与は感作第1日、第5日、第21日目の3回行い、その後、鼻の局所感作として第28日目より両鼻内にOA ($25\text{mg}/\text{ml}$, $200\mu\text{l}$)の点鼻を第35日まで連日行った。このほか第1日目には多田らの方法¹²⁾に基づき百日咳菌死菌懸濁液(和光純薬, 菌数 $1 \times 10^{10}/\text{body}$)をfoot padに皮内注射した。

Received: November 11, 1993

Accepted: January 31, 1994

Abbreviations: ICAM-1 intercellular adhesion molecule-1; LFA-1 leukocyte function associated antigen-1; OA ovalbumin

2) 抗細胞接着分子抗体投与方法

抗ラット ICAM-1 モノクローナル抗体としては 1A29¹³⁾, 抗ラット LFA-1モノクローナル抗体としては WT-1¹⁴⁾を用いた。抗体投与は、局所点鼻感作の40分前に行うこととし、1A29(1mg/body)は連日、WT-1(1 mg/body)は隔日で腹腔内に投与した。また、対照群(抗体非投与群)には陰性コントロール抗体として、ヒト adult T-cell leukemia に対するモノクローナル抗体 Y-1¹⁵⁾を連日1mg/bodyで投与した(1A29, WT-1共に東京都臨床研 宮坂昌之氏より供与、Y-1は札幌医科大第一病理学教室より供与)。

3) 鼻症状、鼻粘膜内好酸球数、血清中 PCA 抗体価の測定

1A29投与群、1A29および WT-1投与群、抗体非投与群の3群15匹(各群 N=5)に分けて、OA 点鼻後の鼻症状、鼻粘膜内好酸球数および PCA 抗体価比較検討を行った。すなわち、全身感作開始日より35日目、局所点鼻感作最終日(点鼻開始より7日目)に、各群のラットの両鼻内に OA 25mg/ml, 200 μ l を点鼻し、点鼻後15分間のくしゃみ回数および前足による鼻かき回数を計測して鼻症状の指標とした。また、点鼻24時間後にネブタール麻酔後心腔穿刺にて脱血死させ、直ちに鼻組織を採取し、脱灰・ホルマリン固定を行った。パラフィン包埋の後、鼻尖より10mmの部位での厚さ4 μ mの冠状断切片を作成し、脱パラフィン後、ルナ染色を施行した。光学顕微鏡(オリンパス製)にて鼻中隔軟骨上端から下端までの両側鼻中隔粘膜内に浸潤したすべての好酸球数をブラインドでカウントした。

PCA 抗体価としては、従来方法に準じて8日間 PCA 抗体価を測定した。

なお統計学的検定は student の T 検定を用い、数値はすべて mean $\pm$ SEM として表した。

研究結果

1) 抗原点鼻後の鼻症状について

各群のラットに OA を点鼻すると、ヒトのアレルギー発作と同様のくしゃみ発作と、鼻のそう痒感のための鼻かき動作を両前足で行うのが観察された。

くしゃみ回数に関しては、抗体非投与群で20.5 $\pm$ 5.0回/15分なのに対して、1A29+WT-1投与群では7.0 $\pm$ 2.9回/15分($p<0.01$)と有意な抑制効果を認めた(1A29のみ投与群, N.D.) (Fig. 1)。

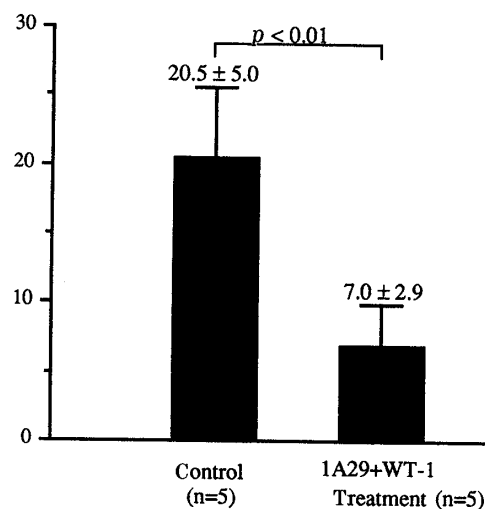
Sneezing
(times/15min)

Fig. 1. Sneezing after OA challenge. Each value represents a mean $\pm$ SEM.

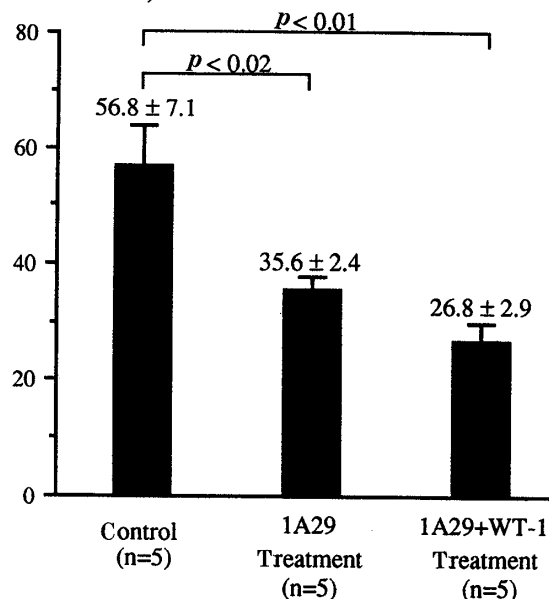
Nasal rubbing
(times/15min)

Fig. 2. Nasal rubbing after OA challenge. Each value represents a mean $\pm$ SEM.

鼻かき回数でも、抗体非投与群で56.8 $\pm$ 7.1回/15分に対して、1A29のみ投与群35.6 $\pm$ 2.4回/15分($p<0.02$)、さらに1A29+WT-1投与群26.8 $\pm$ 2.9回/15分($p<0.01$)と有意な抑制効果を認めた (Fig. 2)。

2) 抗原点鼻後の鼻粘膜内好酸球浸潤について

鼻アレルギーモデルラット鼻粘膜においても、ヒト鼻粘膜と同様に、粘膜固有層浅層を中心に好酸球浸潤が著明に認められた。抗原チャレンジ24時間後のラッ

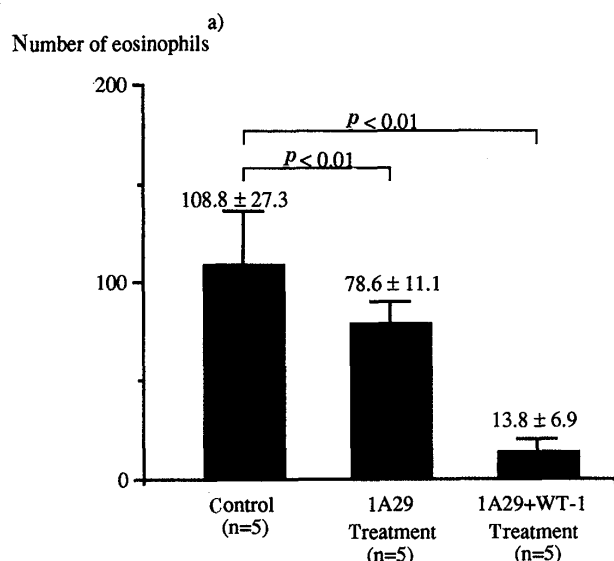


Fig. 3. The number of eosinophils in nasal mucosa 24 hours after OA challenge.

Each value represents a mean ± SEM.

a); eosinophil numbers of bilateral nasal septal mucosa.

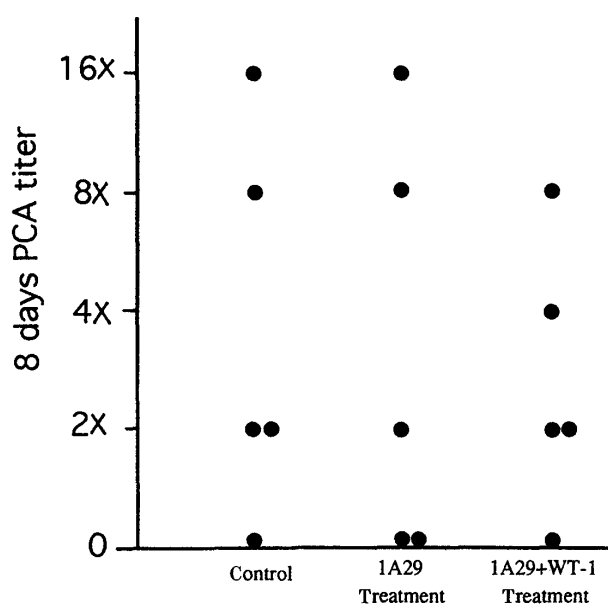


Fig. 4.

ト鼻粘膜中への浸潤好酸球数でみると、抗体非投与群では108.8 ± 27.3個であるのに対し、1A29のみ投与群では78.6 ± 11.1個 ($p < 0.01$), 1A29+WT-1投与群では13.8 ± 6.9個 ($p < 0.01$) と、有意な抑制が認められた (Fig. 3)。なお全身感作のみで局所点鼻感作を行わなかったラットに抗原点鼻を行った場合、0.2 ± 0.2個とほとんど好酸球浸潤は認められなかった。

3) PCA 抗体価について

8日間PCA抗体価については抗体投与、非投与の各群間で差は認められなかった (Fig. 4)。

考 察

アレルギー局所の好酸球浸潤には、肥満細胞由来の各種好酸球遊走因子、浸潤リンパ球特にCD4陽性T細胞や肥満細胞由来の各種サイトカインが重要な役割を果たしていることはよく知られている。しかし、反応局所への好酸球の選択的浸潤に関しては、局所の血管内皮細胞と好酸球表面の細胞接着分子が重要であると考えられる。Dobrina らは *in vitro* の実験系において、サイトカインで刺激された培養ヒト血管内皮細胞とヒト好酸球の接着には、血管内皮側の ICAM-1, VCAM-1および好酸球側の LFA-1, VLA-4が重要であると報告している¹⁶⁾。また、Kyan-Aung らは刺激した血管内皮への好酸球の接着に ELAM-1と ICAM-1の両者が関連し、また抗原によって惹起されたヒトのアレルギー性の皮膚炎症部位の血管内皮上に ICAM-1と ELAM-1の発現が増強すると報告している¹⁷⁾。Wegner らはサル喘息モデルに抗 ICAM-1抗体の *in vivo* 投与を行った結果、抗原暴露後の気管洗浄液中の好酸球の浸潤が抑制されたと¹⁾報告している。今回は、鼻アレルギーモデルラットに対して、抗 ICAM-1および抗 LFA-1抗体の *in vivo* 投与を行った結果、抗原点鼻24時間後の鼻粘膜内好酸球浸潤が著明に抑制された。今回、抗体投与量の設定は抗接着分子抗体を *in vivo* 投与した既出の報告¹⁾⁻⁷⁾を参考に設定した。以前我々は、ヒト鼻アレルギー鼻粘膜における検討の結果、ICAM-1の発現度と固有層浅層の EG2陽性の活性型好酸球数が正の相関関係にあることを報告した¹⁰⁾。これらのことから、アレルギー鼻粘膜において好酸球の浸潤あるいは活性化によって、遅延相をふくめて、ICAM-1と LFA-1がなんらかの役割を担っていることが推測される。ただし、今回は抗原暴露24時間後の好酸球浸潤を検討しており、この間 CD4陽性のリンパ球の浸潤も生じていると考えられ、さらにサイトカインを介した細胞接着分子の発現および好酸球の浸潤が生じている可能性も否定できない。したがって、抗原暴露後のリンパ球をはじめとする各種浸潤細胞およびサイトカインの動向、そして各種細胞接着分子の発現を中心とした更なる検討が必要であると考えられる。

今回の検討では、抗原点鼻後の局所好酸球浸潤のみならず、点鼻直後のくしゃみ、鼻かきといった即時相の鼻症状も抑制されることが明らかとなった。

鼻アレルギーにおける抗原チャレンジ後の即時相の鼻症状は、肥満細胞から放出された各種 chemical mediator の直接作用によるものと三叉神経 C-fiber を介した神経反射によるものとが複合したものであることはよく知られている。これらのなかで今回の検討の対象とした鼻症状に関しては、ヒスタミンを中心とした刺激性の chemical mediator が三叉神経の知覚性 C-fiber を刺激したことによる itching の表現が鼻かき動作であり、この知覚刺激による呼吸反射がくしゃみである。したがって今回抗細胞接着分子抗体の慢性投与の結果認めた鼻症状の抑制の機序としては、(1) IgE 抗体産生の抑制、(2) 肥満細胞の質的あるいは量的変化、さらに、(3) 非特異的過敏性の変化が推察される。ただし、各群間で 8 日間 PCA 抗体価に差異は認められなかったことから、今回の実験系においては抗原特異的 IgE の産生量に影響を与えたために即時相の鼻症状を抑制したとは考えにくい。P. Valent らは、ヒト培養肥満細胞が CD44, ICAM-1 といった細胞接着分子を発現しており、さらに肥満細胞の分化因子とされている¹⁸⁾¹⁹⁾IL-4により肥満細胞上の ICAM-1 抗原と ICAM-1 の mRNA の発現を誘導すると報告している²⁰⁾。したがって、細胞接着分子が肥満細胞の活性化と何らかの関連を有している可能性もあり、この点さらなる検討が必要と考えられる。

先にも述べたように各種細胞接着分子が T リンパ球、好酸球といった炎症細胞のアレルギー局所への浸潤を導くという報告は数多くなされている。ことに T リンパ球は、サイトカインを介したアレルギーの病態への強い関与が示唆されている。その局所への浸潤に際し、ICAM-1, LFA-1 を介した機序が推定されている。Dustin らは in vitro でのヒト皮膚の fibroblast とリンパ球をもちいた実験系において、これらの細胞の接着が ICAM-1 を介したものであると報告している²¹⁾。また Lewis らはヒトにおいて皮膚の T リンパ球の炎症浸潤のモデルとしての DNCB (dinitrochlorobenzene) による皮膚遅延型反応において、ICAM-1 発現と T 細胞浸潤との関連につき報告している²²⁾。われわれのヒト鼻粘膜の免疫組織学的検討の結果においても、アレルギー鼻粘膜でのみ、CD4 陽性 T 細胞数と細胞接着分子 ICAM-1 の発現との間に強い相関関係が認められた⁸⁾⁹⁾。抗接着分子抗体 1A29, WT-1 によりリン

パ球の浸潤が抑制され、そのため各種のサイトカインによる肥満細胞の分化、増殖が阻害された可能性も考えられる。

Wegner らは、サル喘息モデルに抗 ICAM-1 抗体を投与した結果、BAL 中好酸球の減少と同時に気道過敏性の抑制を認めたと報告している。今回のラットの鼻アレルギーモデルでも、鼻粘膜中の好酸球浸潤が抗 ICAM-1, 抗 LFA-1 抗体投与で抑制されていることから、アレルギー性炎症が抑制された結果、即時相の準備状態としての過敏性自体が抑制されている可能性も推測される。このように即時相における細胞接着分子の役割を検討するうえで、いまだ未解な問題も多く残されており、今後更なる詳細な検討が必要と思われる。

今回のラットを用いた検討から、ヒトにおいても鼻アレルギーの病態に細胞接着分子が深く関わっていることが強く示唆された。しかし、アレルギーの中心的役割をになっている肥満細胞をとってみても、その分化、増殖に対するサイトカインの作用、神経ペプチドに対する反応性等につき、ヒトと動物との差異が指摘されている。したがって細胞接着分子に関しても動物の種差を考慮にいれた慎重な検討も必要と考えられる。

稿を終えるにあたり、貴重な抗体の供与を頂きました東京都臨床医学総合研究所免疫研究部門宮坂昌之室長、札幌医科大学第一病理学教室(菊池浩吉教授主宰)、ならびに研究に際しまして貴重な御助言、御教示をいただいた北海道大学免疫科学研究所免疫病態部門上出利光教授に深謝致します。

文 献

- 1) Wegner, C.D., Gundel, R.H., Reilly, P., Haynes, N., Letts, L.G. and Rothlein, R.: Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science* 247, 456-459, 1990.
- 2) Whitcup, S.M., DeBarge, L.R., Caspi, R.R., Harning, R., Nussenblatt, R.B. and Chan, C.: Monoclonal antibodies against ICAM-1 (CD54) and LFA-1 (CD11a/CD18) inhibit experimental autoimmune uveitis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 67, 143-150, 1993.
- 3) Allen, A.C., Highton, J. and Palmer, G.D.: Increased expression of p150, 95 and CR3 leuko-

- cyte adhesion molecules by mononuclear phagocyte in rheumatoid synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 32, 947-954, 1989.
- 4) 飯郷 裕, 東田朋恵, 高子 徹, 塚田 恒: 接着分子の発現調節による自己免疫疾患の治療—ラット関節炎モデルに対する抗接着子抗体の抑制作用. *実験医学* 9, 336-340, 1991.
 - 5) Ohashi, Y., Tsuchiya, S., Fujie, H., Minegishi, M. and Konno, T.: Anti-LFA-1 antibody treatment of a patient with steroid-resistant severe Graft-Versus-Host Disease. *Tohoku J. Exp. Med.* 167, 297-299, 1992.
 - 6) Cosimi, A.B., Conti, D., Delmonico, F.L., Preffer, F.L., Wee, S., et al.: In vivo effects of monoclonal antibody to ICAM-1 (CD54) in non-human primates with renal allografts. *J. Immunol.* 144, 4604-4612, 1990.
 - 7) 森川雅之, 菊地浩吉: 移植免疫反応の機序. *日本臨床* 48, 17-27, 1990.
 - 8) 斎藤博子, 朝倉光司, 成田慎一郎, 小笠原英樹, 形浦昭克: 鼻アレルギー粘膜における T-cell サブセットと細胞接着分子 ICAM-1 の関与について. *日耳鼻* 95, 1800-1807, 1992.
 - 9) Saito, H., Asakura, K. and Kataura, A.: Study on the profiles of infiltrating T lymphocytes and ICAM-1 expression in allergic nasal mucosa. *Acta Otolaryngol.*(Stockh), 1994 (in press)
 - 10) 斎藤博子, 朝倉光司, 成田慎一郎, 小笠原英樹, 形浦昭克: 鼻アレルギー粘膜における細胞接着分子の免疫組織学的検討. *アレルギー* 41, 1258, 1992.
 - 11) Mancino, D. and Bevilacqua, N.: Persistent and boosterable IgE antibody production in mice injected with low doses of ovalbumin and silica. *Int. Allergy Appl. Immunol.* 57, 155-158, 1978.
 - 12) Tada, T. and Okumura, K.: Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. *J. Immunol.* 106, 1002-1012, 1971.
 - 13) Tamatani, T. and Miyasaka, M.: Identification of monoclonal antibodies reactive with the rat homolog of ICAM-1, and evidence for a differential involvement of ICAM-1 in the adherence of resting versus activated lymphocytes to high endothelial cells. *Int. Immunol.* 2, 165, 1990.
 - 14) Tamatani, T., Kotani, M., Tanaka, T. and Miyasaka, M.: Molecular mechanisms underlying lymphocyte recirculation. II. Differential regulation of LFA-1 in interaction between lymphocytes and high endothelial cells. *Eur. J. Immunol.* 21, 855-858, 1991.
 - 15) Yamaguchi, A., Uede, T., Kokai, U., Ishii, Y. and Kikuchi, K.: A novel antigenic determinant of the T200 glycoprotein expressed exclusively by Jurkat cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 78, 1378-1389, 1987.
 - 16) Dobrina, A., Menegazzi, R., Carlos, T.M., Nardoni, E., Cramer, R., et al.: Mechanisms of eosinophil adherence to cultured vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 88, 20-26, 1991.
 - 17) Kyan-Aung, U., Haskard, D.O., Poston, R.N., Thornhill, M.H. and Lee, T.H.: Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 mediate the adhesion of eosinophils to endothelial cells in vitro and are expressed by endothelium in allergic cutaneous inflammation in vivo. *J. Immunol.* 146, 521-528, 1991.
 - 18) Hamaguchi, Y., Kanakura, Y., Fujita, J., Takeda, S., Nakano, T., et al.: Interleukin-4 as an essential factor for in vitro clonal growth of murine connective tissue-type mast cells. *J. Exp. Med.* 165, 268-273, 1987.
 - 19) Broun, M.A., Pierce, J.H., Watson, C.J., Falco, J., Ihle, J.N. and Paul, W.E.: B cell stimulatory Factor-1/Interleukin-4 mRNA is expressed by normal and transformed mast cells. *Cell* 50, 809-818, 1987.
 - 20) Valent, P., Bevec, D., Maurer, D., Besemer, J., Padova, F.D., et al.: Interleukin 4 promotes expression of mast cell ICAM-1 antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 3339-3342, 1991.
 - 21) Dustin, M.L., Rthlein, R., Bhan, A.K., Cinarello, C.A. and Springer, T.A.: Induction by IL-1 and interferon gamma; tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* 137, 245, 1986.
 - 22) Lewis, R.E., Buchsbaum, M., Whitaker, D. and Murphy, G.F.: Intercellular adhesion molecule-1 in the evolving human cutaneous delayed hypersensitivity reaction. *J. Invest. Dermatol.* 93, 672-677, 1989.

THE IN VIVO EFFECTS OF ANTI-CAM ANTIBODY ON OA SENSITIZED RATS

Hiroko Saitoh, Kohji Asakura and Akikatsu Kataura

Department of Otorhinolaryngology, Sapporo Medical University

To determine the role of cell adhesion molecules, we evaluated the in vivo effects of anti-intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) monoclonal antibody (1A29) and anti-leukocyte function associated molecule-1 (LFA-1) monoclonal antibody (WT-1) on ovalbumin (OA) sensitized rats.

Both sneezing discharges and nasal rubbing movements after nasal OA challenge were significantly inhibited by these monoclonal antibody administrations (control vs treated group; 20.5 ± 5.0 vs 7.0 ± 2.9 times/minutes, $p < 0.01$ and 56.8 ± 7.1 vs 26.9 ± 2.9 times/15 minutes, $p < 0.01$, for sneezing and rubbing, respectively). The number of eosinophils in nasal mucosa 24 hours after the challenge was also inhibited by the treatment (control vs treatment group; 108.8 ± 27.3 vs 13.8 ± 6.9 $p < 0.01$). These results suggest some pathophysiological roles of ICAM-1 and LFA-1 in nasal allergy.
