

## 鼻過敏性とニューロペプチド

三重大学耳鼻咽喉科

間島 雄一 原田 輝彦 郭 永清  
趙 重生 坂倉 康夫

## Nasal Hyperresponsiveness and Neuropeptide

Yuichi Majima, Teruhiko Harada, Guo Yong Ching,  
Cho Joong Saeng, and Yasuo Sakakura

Department of Otorhinolaryngology, Mie University School of Medicine, Tsu.

Immunohistochemical staining combined with electron microscopy was employed to investigate the distribution of substance P-immunoreactive (SP-IR) nerve fibers in the tracheal submucosal glands of cats. All the intraglandular varicosities were observed to be in close spatial contact with serous cells, mucous cells and myoepithelial cells. These findings suggested that SP-induced mucus secretion by airway submucosal glands may be caused not only by glandular contraction, but by direct stimulation of both serous and mucous cells.

The distribution of nonadrenergic noncholinergic (NANC) neuropeptides in serous and mucous glands of the nasal mucosa were quantitatively determined in patients with allergic rhinitis (AR) and in patients with hypertrophic rhinitis (HR) as a control. The distribution of SP-IR nerve fibers in the serous glands was significantly higher in AR than in HR. The distribution of calcitonin gene-related polypeptide (CGRP) -IR nerve fibers was also significantly higher in both serous and mucous glands in AR. These findings suggest that transmission of nociceptive sensations by NANC neuropeptides may be enhanced in patients with AR, and this could reflect nasal hyperresponsiveness in AR.

In the thiorphan pre-treated normal human nose, the topical application of SP significantly decreased histamine concentrations, the initial cause of sneezing, when compared with topical saline administration.

The results obtained in these studies suggest that NANC neuropeptides could contribute to nasal hyperresponsiveness via orthodromic and/or antidromic effects.

---

**Key words** : hyperresponsiveness, neuropeptide, allergic rhinitis, substance P

---

### I はじめに

気道過敏性の亢進とは種々の刺激に対し、気道粘膜

が反応しやすい状態をいう。下気道では過敏性の亢進は喘息の発症に重要な因子となり、また重症度や発作の頻度にも関与しているといわれている<sup>1)</sup>。鼻アレルギー

ギーにおいても鼻粘膜の過敏性亢進はその発症に不可欠な因子である。花粉症患者では花粉飛散季節時と非季節時に一定量のヒスタミンやアセチルコリンに対する鼻粘膜の反応をみると、くしゃみ発作の頻度、鼻汁量、鼻粘膜腫脹のいずれも季節時が非季節時に比し有意に亢進しており<sup>2)</sup> 鼻過敏症が鼻アレルギーの発症と密接な関係を有していることが推測される。

気道過敏性の亢進のメカニズムについては十分に解明されていないのが現状であるが、本研究では鼻粘膜過敏症（以下鼻過敏性）の亢進に果たす非アドレナリン、非コリン作動性(nonadrenergic, noncholinergic: 以下 NANC) 神経ペプチドの役割を検討した。

## II 対象と方法

### 1. サブスタンス P (以下 SP) の腺への分布についての検討<sup>3)</sup>

5匹の成熟ネコを用いた。ペントバルビタール麻酔下に Zamboni 液にて経心灌流固定後、気管を摘出した。摘出した標本は Zamboni 液にて 4°C, 24 時間固定し、10%, 20% ショ糖加リン酸緩衝液にて 24 時間保存後 6~8  $\mu$ m の凍結切片を作成した。ABC 法を用いて間接酵素抗体法を行った。一次抗体とウサギ SP 抗体 (Chemicon 社製) を用いた。この後、1% オスミウム酸で後固定し、エタノール脱水後エポキシ樹脂に包埋した。超薄切切片は電子顕微鏡 (JEM-100S, JEOL) にて観察した。

### 2. 鼻アレルギー患者における SP, CGRP 神経ペプチドの分布についての検討<sup>4)</sup>

臨床症状、鼻内所見、誘発検査、血液中 IgE 抗体で通年性鼻アレルギーと診断され、局所麻酔下で得られた 5 症例 (15~41 歳, 平均年齢 24.8 歳) の下鼻甲介粘膜を用いた。対照として肥厚性鼻炎患者 (21~33 歳, 27.4 歳) 5 症例を用いた。

下鼻甲介前端部より約 1cm 後方の粘膜を採取後、通常の方法に従って 8  $\mu$ m の凍結切片を作製し、ABC 法を用いて間接酵素抗体法による免疫組織標本作製した<sup>4)</sup>。一次抗体として SP 抗体 (Amersham 社製), CGRP 抗体 (Amersham 社製) を用い、ABC 法は Vector 社製の ABC キットによった。対比染色としてメチルグリーンを用い、漿液腺と粘液腺の区別を行った。定量的測定は画像分析装置 (オリンパス社製 SP-500) を使用し、一定面積に占める漿液腺房と粘液腺房の占有面積を測定した。また SP, カルシトニン遺伝

子関連ペプチド (以下 CGRP) 陽性神経繊維が分布する腺房面積を各々測定し、漿液腺、粘液腺それぞれの腺房面積に対する各神経ペプチド陽性腺房の割合を算出した。なおヒト鼻腺は混合腺であり、漿液腺細胞と粘液腺細胞が一腺房内に混在しているため、ここでいう漿液腺房、粘液腺房はそれぞれ漿液腺細胞が粘液腺細胞に比して多いもの、粘液腺細胞が漿液腺細胞に比して多いものとした。

### 3. SP の鼻過敏性に及ぼす影響の検討

健康成人男性 7 名 (27 歳~50 歳, 34.7 歳) を対照とした。全例、鼻疾患を有しない非喫煙者であった。本研究は三重大学医学部研究等に関する倫理委員会の承認を得たものであり、対象となったボランティアは全員研究の趣旨および内容の説明を受けた上、研究対象として同意したものである。

チオルファン (Sigma, T6031) 5mg/ml, 0.5 ml をジェットネブライザー (永島) を用いて左右の鼻腔に付加圧 0.5 kg/cm<sup>2</sup> にて同時に投与した。チオルファン投与後 10 分後に SP (ペプチド研究所, 4014-V) 64  $\times$  10<sup>-8</sup> M, 0.5 ml を同様に鼻腔内に投与した。対照として生理的食塩水 0.5 ml を同様に投与した。

塩酸ヒスタミン (Sigma H7250) を生理的食塩水に溶解し、10  $\mu$ g/ml, 10<sup>2</sup>  $\mu$ g/ml, 10<sup>3</sup>  $\mu$ g/ml, 10<sup>4</sup>  $\mu$ g/ml, 10<sup>5</sup>  $\mu$ g/ml, の 5 段階のヒスタミン希釈液を作製し、各鼻腔粘膜に 10  $\mu$ l づつ、両側鼻腔に計 20  $\mu$ l 滴下した。10  $\mu$ g/ml より投与を開始し、10 分間隔で順次濃度の濃いヒスタミン希釈液を投与した。本測定は SP 又は生理的食塩水投与後 10 分後より開始した。ヒスタミン投与により、はじめてくしゃみ発作または明らかな水様性鼻漏が誘発される最低ヒスタミン濃度をヒスタミン閾値とした。

Acoustic rhinometer<sup>5)</sup> により鼻腔最小断面積と鼻入口部より 2.0~7.8cm における鼻腔容積を測定した。測定はチオルファン投与前、SP または生理的食塩水投与後、各濃度のヒスタミン投与後に施行した。

### 4. 統計学的解析

対応のある、または対応のない Wilcoxon 検定によった。文中の値は 2 の検討では平均  $\pm$  1SE, 3 の検討では平均  $\pm$  1SD にて表現した。

## III 結果

### 1. SP の腺への分布についての検討<sup>3)</sup>

ネコ気管腺は粘液腺細胞と漿液腺細胞を有する混合

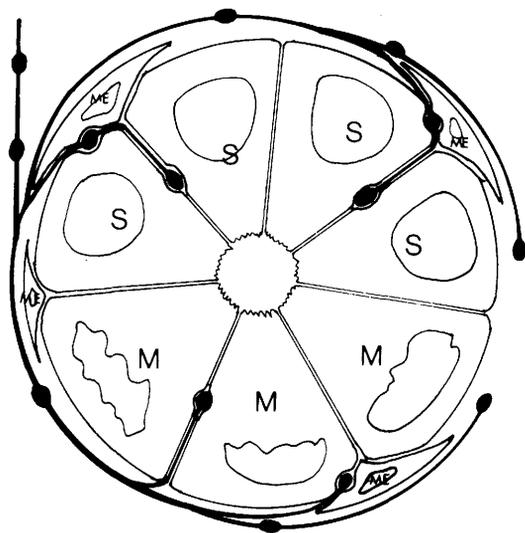


図1 SP陽性神経繊維の腺への分布  
S：漿液腺細胞，M：粘液腺細胞  
ME：筋上皮細胞  
—●— は神経終末

腺で粘液腺細胞と漿液腺細胞の比は1：3であった。筋上皮細胞は分泌細胞の基底部と腺房の基底膜の間に存在した。

SP陽性神経繊維は腺房周囲、腺房基底膜内に多くみとめられた。また一部のSP陽性神経繊維は腺細胞間にもみとめられた。SP陽性神経終末はその細胞質がSP陽性であるばかりでなく、強いSP陽性を示すcored vesicleを有している。このような特徴を有するSP陽性神経終末は気管腺の漿液腺細胞と漿液腺細胞間、粘液腺細胞と粘液腺細胞間、これらの細胞と筋上皮細胞との間にみとめられた。

2. 鼻アレルギー患者におけるSP, CGRP神経ペプチドの分布についての検討<sup>(4)</sup>

鼻粘膜固有層における1cm<sup>2</sup>面積当たりの腺房面積は鼻アレルギーで漿液腺7.6±1.1mm<sup>2</sup>、粘液腺2.6±0.6mm<sup>2</sup>であった。また肥厚性鼻炎のそれは漿液腺5.6±1.3mm<sup>2</sup>、粘液腺3.8±1.5mm<sup>2</sup>であった。漿液腺房面積、粘液腺房面積ともに鼻アレルギーと肥厚性鼻炎とで差はみとめられなかった。

全漿液腺房および全粘液腺房面積に占めるSP陽性腺房面積の割合は鼻アレルギーで漿液腺27.2±0.4%、粘液腺17.7±2.5%、肥厚性鼻炎で漿液腺10.9±1.1%、

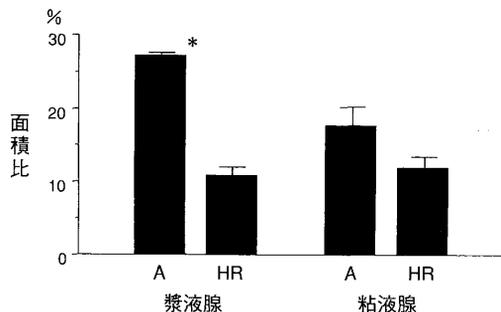


図2 全腺房に占めるSP陽性腺房の割合  
A：鼻アレルギー，HR：肥厚性鼻炎  
\* HRに比して有意に高値 (P<0.001)

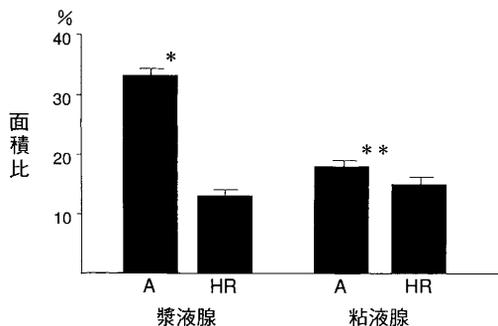


図3 全腺房に占めるCGRP陽性腺房の割合  
A：鼻アレルギー，HR：肥厚性鼻炎  
\* HRに比して有意に高値 (P<0.001)  
\*\* HRに比して有意に高値 (P<0.05)

粘液腺12.0±1.5%であり、鼻アレルギーでは肥厚性鼻炎に比し漿液腺のSP陽性率が有意に高値を示した (P<0.05) (図2)。

同様にCGRP陽性腺房面積の割合は鼻アレルギーで漿液腺34.0±1.1%、粘液腺18.2±1.1%、肥厚性鼻炎で漿液腺13.0±1.1%、粘液腺14.0±1.0%と鼻アレルギーにおいて肥厚性鼻炎に比し漿液腺 (P<0.001)、粘液腺 (P<0.05) とともにCGRP陽性率が有意に高値を示した (図3)。

3. SPの鼻過敏性に及ぼす影響の検討

チオルファン投与後SPを投与した場合と、チオルファン投与後生理的食塩水を投与した場合で鼻症状について検討した。いずれの場合もくしゃみ、鼻漏の出現はみとめられなかった。また鼻腔最小断面積、鼻腔容積ともに生理的食塩水投与とSP投与で差をみとめ

表1 くしゃみ発作を生ずるヒスタミン閾値

対象	ヒスタミン閾値	
	生食	SP
1	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
2	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
3	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>
4	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>
5	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
6	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>
7	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>

なかった。

生理的食塩水投与後のくしゃみまたは鼻漏によるヒスタミン閾値は被検者により異なり、そのヒスタミン濃度は10<sup>2</sup>μg/mlから10<sup>4</sup>μg/mlと個人差が認められた。今回検討した7名の被験者では全例くしゃみ発作が水溶性鼻漏よりも低い、または同じヒスタミン濃度で出現したため、ここではくしゃみを初めて訴えたヒスタミンの濃度をヒスタミン閾値とした。SP投与後のヒスタミン閾値は投与後に閾値の低下したもの（生理的食塩水投与時に比べくしゃみを生ずるヒスタミン濃度が低下したもの）5例、不変2例であった。生理的食塩水投与後のヒスタミン閾値に比し、SP投与後のヒスタミン閾値は有意に低値を示した（ $P < 0.05$ ）（表1）。

生理的食塩水投与後またはSP投与後に10μg/mlから10<sup>4</sup>μg/mlまで順次濃度の濃いヒスタミンを鼻腔内に投与した場合の鼻腔最小断面積、鼻腔容積とも各ヒスタミン濃度において生理的食塩水投与時とSP投与時とで両者間に有意差をみとめなかった。

#### IV 考 察

気道の知覚神経はその知覚神経終末で知覚情報を受けとり順行性にその求心情報を中枢に伝えるが、この情報伝達にSP, CGRP, ニューロキニンA（以下NKA）などのNANC作動性神経ペプチドの関与が知られている。一方、知覚神経終末よりNANC作動性神経ペプチドが逆行性に遊離されるメカニズムは軸索反射と呼ばれ皮膚においてはその存在が確認されており、気道においても存在の可能性が示唆されている<sup>(6)</sup>。すなわち、知覚神経終末で受容された知覚刺激は軸索にそって順行性に伝えられるが、一部は軸索反射によ

り側枝を介して逆行性に伝わり、末梢枝の神経終末よりNANC作動性ペプチドが放出されるというものである（図4）。

NANC作動性神経ペプチドの一つであるSPのネコ鼻腺における分布をみた今回の我々の検討ではSP陽性神経終末は漿液腺細胞間、粘液腺細胞間に存在した<sup>(3)</sup>。SPは漿液腺細胞からの分泌顆粒の放出を惹起することが報告されていることから<sup>(7)</sup>、我々の得た所見はSPが漿液腺細胞や粘液腺細胞の分泌に深く関与していることを想像させる。また、SPは*in vitro*で強い腺の収縮作用を有しているが、腺の収縮を司る筋上皮細胞に隣接してSP陽性神経終末がみられた我々の結果から、SPは*in vivo*においても腺の収縮に関与し、この結果腺よりの分泌を亢進しているものと考えられる。このような所見はSPが腺の知覚に関与しているというよりもむしろ腺の運動（分泌）に関与している可能性が高く、形態学的にも軸索反射の存在の可能性を強く示唆するものである。

今回の我々の結果では鼻アレルギーと肥厚性鼻炎との間に漿液腺房面積、粘液腺房面積に差をみとめなかった。一方、各腺房面積に占めるSP陽性神経腺房面積、CGRP陽性腺房面積は特に漿液腺房で鼻アレルギーにおいて肥厚性鼻炎に比し有意に高値を示した。これらの結果は鼻アレルギーにおいて鼻腺におけるSPやCGRP陽性神経線維の分布が増加していることを示すものである。この結果はTDI感作モルモットにおいてTDI誘発後鼻粘膜のSPやCGRPのmRNAの発現が増加し、これらの神経ペプチドの産生が亢進している<sup>(9)</sup>結果に類似している。NANC作動性神経ペプチドは鼻腺、血管周囲、上皮内、上皮下に存在しており<sup>(3)(4)</sup>、鼻アレルギー患者では本研究で示された鼻腺のみならず他の部位においてもその分布が亢進している可能性がうかがえる<sup>(10)</sup>。

このような知覚神経線維におけるSPやCGRPの増加は、第一に知覚情報の中枢への順行性伝達を促進し、その結果鼻過敏性の亢進が生ずる可能性が考えられる。第二に軸索反射により、より多くのNANC作動性ニューロペプチドが知覚神経終末より局所に遊離され鼻過敏性が亢進する可能性である。

知覚神経終末より局所に遊離された神経ペプチドの気道過敏性についての影響は、局所に神経ペプチドを投与した後に気道過敏性の変化をみる方法で過去にいくつかの報告がなされている。Abrahamら<sup>(11)</sup>はAs-

表2 鼻腔最小断面積と鼻腔容積

ヒスタミン濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	鼻腔最小断面積 ( $\text{cm}^2$ )		鼻腔容積 ( $\text{cm}^3$ )	
	生食	SP	生食	SP
10	$0.544 \pm 0.217$	$0.522 \pm 0.209$	$7.84 \pm 3.18$	$7.38 \pm 3.51$
$10^2$	$0.487 \pm 0.176$	$0.498 \pm 0.214$	$8.00 \pm 2.71$	$7.70 \pm 2.98$
$10^3$	$0.422 \pm 0.204$	$0.507 \pm 0.207$	$7.01 \pm 3.39$	$7.51 \pm 3.16$
$10^4$	$0.384 \pm 0.195$	$0.419 \pm 0.243$	$6.34 \pm 2.97$	$6.78 \pm 3.55$

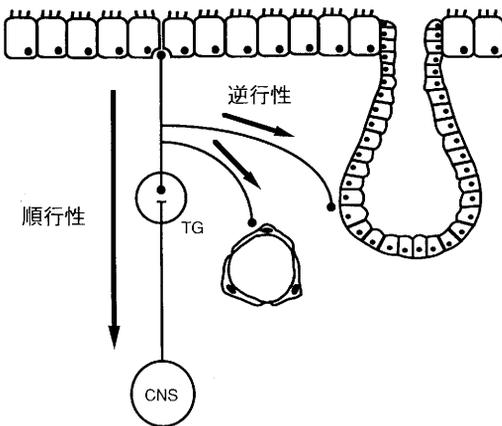


図4 知覚刺激の順行性伝達と逆行性伝達

*caris suum* に対するアレルギーを有するヒツジにおいて NANC 作動性神経ペプチドの一つである NKA 吸入投与が下気道のメサコリンに対する反応 (気管支の収縮) 閾値を投与後 30 分に有意に低下させたとしている。一方, Cheung らは正常ヒト<sup>(12)</sup> および気管支喘息患者<sup>(13)</sup> において NKA 吸入投与は下気道のメサコリンに対する反応閾値を投与後 24 時間では変化させなかったとしている。正常ヒト鼻腔に NKA を投与し, 10 分後よりヒスタミンに対する過敏性をみた著者ら<sup>(14)</sup> の結果でも NKA はヒスタミンに対する鼻過敏性を亢進させなかった。そこで本研究では SP を正常ヒト鼻腔に投与し, 鼻過敏性亢進の有無を検討した。

局所に投与された SP などのタキキニン組織中のニュートラルエンドペプチダーゼ (NEP) により加水分解されて不活性化することが知られている<sup>(15)</sup>。気道における NEP の分布は上皮 (とくに基底細胞), 腺, 神経, 平滑筋に分布し, 逆行性に知覚神経終末より遊離したタキキニンが標的細胞に効果を発揮する前に

NEP により加水分解されて不活性化されてしまっているとされている<sup>(16)</sup>。一方, NEP の酵素活性はチオルファンにより抑制することができる<sup>(12)(16)</sup>。今回の検討では SP 投与 10 分前にチオルファンを投与し NEP の働きを抑制した後に SP を投与した。チオルファン  $2.5 \mu\text{g/ml}$ ,  $0.5 \text{ ml}$  の使用は下気道での NKA の呼吸機能への影響を有意に増強したと報告されているが<sup>(12)</sup>, 今回の検討ではさらに増量して鼻腔に投与し, 鼻症状 (くしゃみ, 鼻漏, AR による鼻閉の程度, 刺激性) を来さない濃度として  $5.0 \mu\text{g/ml}$ ,  $0.5 \text{ ml}$  を採用した。また, SP は  $64 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $0.5 \text{ ml}$  を投与したがこの量は谷川ら<sup>(17)</sup> により報告されている SP の局所投与がヒト鼻粘膜血管の血流量を変化させなかった  $8 \text{ nmol}$  より濃く, 血流量を増加させた  $16 \text{ nmol}$  より薄い濃度である。また, 田中ら<sup>(18)</sup> の SP の局所投与がヒト鼻腔容積を変化させた  $10^{-6} \text{ M}$ ,  $0.5 \text{ ml}$  に比しはるかに低濃度である。

本研究では  $SP64 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $0.5 \text{ ml}$  の投与はヒスタミンに対するくしゃみにおける鼻過敏性を有意に亢進した。SP が鼻過敏性を亢進したメカニズムは明らかではないが, 軸索反射により局所に遊離した神経ペプチドが神経性炎症を引き起こす可能性が示唆されていることから<sup>(6)</sup>, これと同様に局所に投与された SP が局所に炎症を引き起こし, このために鼻過敏性が亢進した可能性が考えられる。一方, ヒスタミンに対する鼻腔最小断面積や鼻腔容積の変化は SP 投与時と非投与時で差がみとめられなかった。これはヒスタミンがくしゃみ発作に主役を成しているのに対し, 鼻閉への関与が少ない<sup>(19)</sup> ことによるためではないかと想像される。

## V ま と め

以上の結果より, 鼻アレルギー患者における鼻過敏性の亢進には知覚神経線維を介した順行性の知覚刺激

伝達の亢進と、軸索反射により局所に遊離された SP などの NANC 作動神経ペプチドの働きが関与しているものと考えられた。

本研究の要旨は第 34 回日本鼻科学会総会, サテライトシンポジウム「鼻疾患とニューロペプチド」(1995 年 10 月 18 日, 札幌市) において発表した。

#### 参考文献

- 1) Juniper EF, Frith RA, Hargreave FE: Airway hyperresponsiveness to histamine and methacholine: relationship to minimum treatment to control symptoms of asthma. *Thorax* 36: 575-579, 1981.
- 2) 鶴飼幸太郎: 鼻過敏症の臨床. 日本医事新報 3670 号: 30-34, 1994.
- 3) Rha KS, Majima Y, Sakakura Y, et al: Distribution of substance P immunoreactive nerve fibers in the tracheal submucosal gland of cats. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 103: 222-226, 1994.
- 4) Takatsu N: A distribution of neuropeptides in human nasal glands —Quantitative study—. *Mie Med J* 43: 185-192, 1993.
- 5) Yamagiwa M, Hilberg O, Pedersen OF, et al: Evaluation of the effect of localized skin cooling on nasal airway volume by acoustic rhinometry. *Am Rev Respir Dis* 141: 1050-1054, 1990.
- 6) Pernow B: Role of tachykinins in neurogenic inflammation. *J Immunol* 135: 812s-815s, 1985.
- 7) Gashi AA, Borson DB, Finkbeiner WE, et al: Neuropeptides degranulate serous cells of ferret tracheal glands. *Am J Physiol* 251: C223-C229, 1986.
- 8) Shimura S, Sasaki T, Okayama H, et al: Effect of substance P on mucus secretion of isolated submucosal gland from feline trachea. *J Appl Physiol* 63: 646-653, 1987.
- 9) Kalubi B, Takeda N, Irifune M, et al: Nasal mucosa sensitization with toluene diisocyanate (TDI) increases preprotachykinin A (PPTA) and prepro CGRP mRNAs in guinea pig trigeminal ganglion neurons. *Brain Res* 576: 287-296, 1992.
- 10) 山本一博, 設楽哲也, 八尾和雄, 他: アレルギー性鼻炎下甲介粘膜における神経ペプチドの分布. *日鼻誌* 34: 177, 1995.
- 11) Abraham WM, Ahmed A, Cortes A, et al: Airway effects of inhaled bradykinin, substance P, and neurokinin A in sheep. *J Allergy Clin Immunol* 87: 557-564, 1991.
- 12) Cheung D, Bel EH, Hartigh JD, et al: The effect of inhaled neutral endopeptidase inhibitor, thiorphan, on airway responses to neurokinin A in normal humans *in vivo*. *Am Rev Respir Dis* 145: 1275-1280, 1992.
- 13) Cheung D, Timmers MC, Zwinderman AH, et al: Neutral endopeptidase activity and airway hyperresponsiveness to neurokinin A in asthmatic subjects *in vivo*. *Am Rev Respir Dis* 148: 1467-1473, 1993.
- 14) 間島雄一, 原田輝彦, 郭永清, 他: ニューロキニン A の鼻粘膜過敏性亢進における役割. 耳展掲載予定.
- 15) Martins MA, Shore SA, Gerard NP, et al: Peptidase modulation of pulmonary effects of tachykinins in tracheal superfused guinea pig lungs. *J Clin Invest* 85: 170-176, 1990.
- 16) Nadel JA: Neutral endopeptidase modulates neurogenic inflammation. *Eur Respir J* 4: 745-754, 1991.
- 17) 谷川博一, 今野昭義, 永田博史, 他: 鼻アレルギー症例における鼻粘膜血管の Substance P に対する反応. *日鼻誌* 32: 202, 1993.
- 18) 田中利善, 善浪弘善, 石尾健一郎, 他: Acoustic rhinometry による知覚神経伝達物質の鼻腔粘膜血管反応. *日鼻誌* 32: 195, 1993.
- 19) 小島 正, 朝倉光司, 形浦昭克: ロイコトリエンと鼻アレルギーの発症. *アレルギーの領域* 2: 771-777, 1995.

(1996 年 1 月 8 日受稿, 1996 年 2 月 3 日受理)