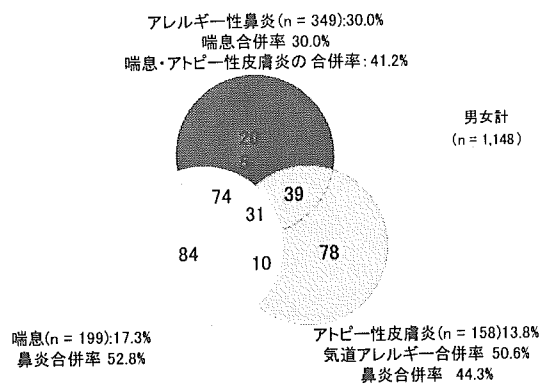


図4 3歳児調査 (ISAAC準拠) でのアレルギー疾患の合併率



扁桃の小児アレルギー性鼻炎に及ぼす影響および新規治療法の検討

分担研究者：堀口 茂俊 千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 助手
研究協力者：留守 卓也 千葉大学医学部附属病院耳鼻咽喉・頭頸部外科 助手
田中 ゆり子 千葉大学大学院医学研究院免疫発生学 産学官連携研究員
内田 哲朗 千葉大学医学薬学府 大学院生
工藤 典代 千葉県こども病院耳鼻咽喉科 科長

研究要旨

主に上気道閉塞を理由に扁桃摘出を受けた小児のアレルギー性鼻炎に摘出が及ぼす影響を追跡調査したところ、早期に鼻症状の改善が40～50%のアレルギー性鼻炎の患児にみられ、術後5年以上改善効果は継続してみられた。扁桃摘出後に発熱回数、かぜ罹患数、学校欠席数などの上気道感染によると考えられる症状が60～80%の小児でみられており、アレルギー性鼻炎の症状の改善は扁桃摘出による上気道感染の減少に起因すると考えられる。一方、小児アレルギー性鼻炎に対する新規治療として舌下減感作療法、乳酸菌を代表とするプロバイオテクスを利用した方法について、臨床効果、安全性、作用機序についての検討を継続した。舌下減感作療法は小児においても高い安全性が期待され、作用機序として抗原特異的 T 細胞クローンサイズの影響が示唆され、解析を進めている。乳酸菌摂食についても一定の臨床効果が期待される結果が得られた。

A. 研究目的

鼻腔に隣接して存在する扁桃は、気道の代表的粘膜リンパ組織であり、その生体防御能が注目されてきたが、ヒトにおける役割はいまだ明らかにはなっていない。特に小児期に活発に増殖するが、過度の肥大や反復性感染のため扁桃摘出手術を受ける小児も少なくない。今回、扁桃の小児アレルギー性鼻炎に対する影響を明らかにすることを目的に、アレルギー性鼻炎を合併した小児で扁桃摘出後の鼻症状の変化を追跡調査した。

また、小児アレルギー性鼻炎の新規治療の一つとして舌下減感作療法に注目し、ハウスダスト、あるいはスギ花粉エキスをを用いた臨床試験を継続している。舌下減感作療法の作用機序、バイオマーカーを明らかにするために抗原特異的 T 細胞の解析を行った。また、各種サイトカイン遺伝子の発現検討のため real-time PCR 法の確立をはかった。さらに、食品として小児でも摂取しやすく、強力な Th1 細胞誘導、Th2 細胞の抑制が *in vitro* あるいは動物実験で報告されている乳酸菌を用いてその有効性の評価を行った。

B. 研究方法

- 1) 扁桃摘出後5年、及び1年が経過した小児それぞれ268名、104名について扁桃摘出前と比較した最近の上気道炎の症状や罹患の程度、いびきや学校、保育園への欠席状況、喘息やアレルギー性鼻炎を合併している場合にはそれらの症状の変化についてアンケート調査を行った。
- 2) ハウスダストあるいはスギ花粉エキスをを用いた小児舌下減感作療法をオープン試験として60名の参加にて開始した。開始前、開始4ヶ月後の末梢血中の抗原特異的 IL-4、IL-5 産生 T 細胞の解析を一部の症例で行った。また、より詳細な有効性、作用機序の解明を目的に60名のスギ花粉症の成人を対象にプラセボを用いた二重盲検試験を開始した。
- 3) KW 乳酸菌の通年性アレルギー性鼻炎に対する効果を *inactive placebo* を対象とした二重盲検試験により100名の同意を得た成人を対象に実施した。
- 4) 各種治療のバイオマーカーの検討の一環としてサイトカイン遺伝子発現の評価に real time PCR 法の開発を行った。

倫理面への配慮

本研究の実施にあたり、千葉大学大学院医学研究

院の倫理委員会への申請を行い、すべて許可を受けている。扁桃摘出の影響の調査では保護者への説明と参加への同意を得て行われた。舌下減感作療法ならびに乳酸菌摂取によるアレルギー性鼻炎症状の影響についての検討についても、小児では保護者、成人では本人の同意を文書により得て行われている。

C. 研究結果

- 1) アンケート回収した 233 名中喘息合併児は 86 名、アレルギー性鼻炎の合併は 121 名に認められた。術後 1 年の検討で、発熱回数の減少、かぜ罹患の減少、学校欠席日の減少といった上気道炎の改善は 70%以上にみられ、いびき改善も約 70%に認められた。一方、喘息は 1 年以内に 80%で改善、アレルギー性鼻炎合併児ではくしゃみ、鼻汁、鼻づまりといった症状が 40~50%で 1 年以内に認められた (図 1)。
- 2) 小児期舌下減感作療法開始後 6 例で口内痛、じんま疹などの症状の出現がみられたが、治療との因果関係は不明であり、かつその後も治療継続が可能な程度で脱落例はない。検討した 4 例では舌下減感作療法後に抗原特異的 IL-4、IL-5 産生細胞の治療前と比較して減少していた (図 2)。
- 3) KW 乳酸菌を用いた 8 週間投与の二重盲検試験が、同意を得た 100 名の通年性アレルギー性鼻炎患者の参加により行われた (12 月終了予定)。
- 4) サイトカイン遺伝子発現量の比較法として **real time PCR** 法を確立した。

D. 考察

アレルギー性鼻炎合併の小児では扁桃摘出より 1 年以内にその約 40%の小児でアレルギー性鼻炎の症状の改善がみられた。5 年経過した小児でも 30%前後に改善がみられた。小児アレルギー性鼻炎の自然寛解、自然改善は少ないためこれら症状の改善は扁桃摘出に負うところが大きい。喘息合併児では 1 年以内 80%が改善している。機序として上気道炎症状の改善が 70%に認められており、上気道炎罹患の減少が喘息やアレルギー性鼻炎の症状改善に働いていると推測される。

小児舌下減感作療法も継続しているが、**gladc 2** 以上の副作用はみられない。バイオマーカーとして抗原特異的 T 細胞クローン数、各種サイトカイン遺伝子発現について検討を進めたい。また、並行して行われている成人スギ花粉症患者に対する舌下減感作

療法の 2 重盲検試験での有効性、バイオマーカーについての検討についての結果も利用したい、また、乳酸菌は安全な食品でかつ小児も摂取しやすい。乳酸菌のうち最も Th1 誘導能が高いとされる KW 株について 2 重盲検試験からプラセボに比較して一定の臨床上的有効性が確認された。作用機序も含め解析を進めたい。

E. 結論

- ・扁桃摘出は小児アレルギー性鼻炎の症状改善に作用する。
- ・小児でも舌下減感作療法の安全性は高い。バイオマーカーとして抗原特異的 Th2 細胞の減少が期待される。
- ・KW 乳酸菌のアレルギー性鼻炎に対する有効性の検討が進行している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

堀口茂俊：急性感染症が上気道・下気道の慢性炎症に及ぼす影響. アレルギー科 21:135-139, 2006

國井直樹, 留守卓也：上気道感染とアレルギー性鼻炎 医学のあゆみ 216:401-405, 2006

留守卓也, 堀口茂俊：上気道感染から見た下気道アレルギー. Topics in Atopy 4:9-13, 2005

2. 学会発表

留守卓也, 堀口茂俊, 工藤典代, 岡本美孝：扁桃摘出が気道アレルギーに及ぼす影響について. 第 18 回日本口腔咽頭学会 (2005 年 9 月, 旭川)

堀口茂俊, 岡本美孝, 留守卓也, 工藤典代：急性感染症が上気道/下気道の慢性炎症に及ぼす影響. 第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (シンポジウム) (2005 年 6 月, 岡山)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし
 3.その他
 なし

図1 鼻アレルギー児の鼻症状の術後変化

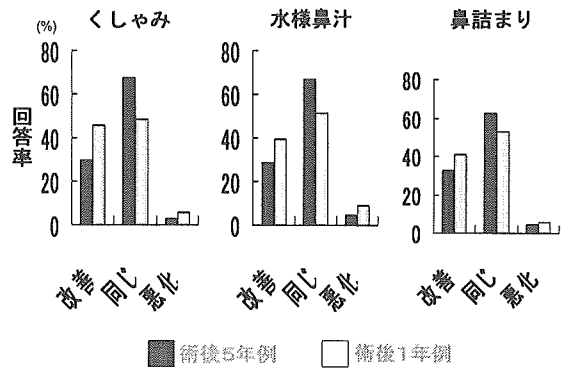
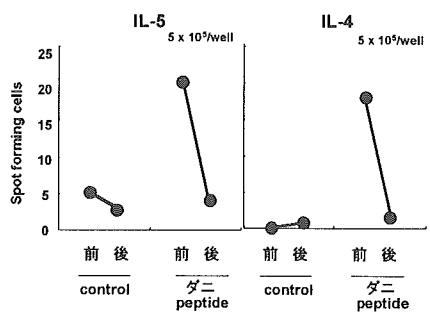


図2 小児舌下減感作の前と維持量後3ヶ月の特異的Th2細胞数の変化



小児アレルギー性鼻炎における免疫療法の治療的、予防的効果に関する研究

分担研究者 大久保公裕 日本医科大学耳鼻咽喉科助教授
後藤 穰 日本医科大学耳鼻咽喉科講師

研究要旨

小児アレルギー性鼻炎の治療は成人でのアレルギー性鼻炎に準じるが、小児専用の薬剤が少ないことなどから適正な治療ができない場合がある。また成人発症の花粉症を含むアレルギー性鼻炎と比べ、自然緩快が少ないことから罹患年数が長くなり、種々のアレルギー疾患を誘発することが知られている。今回、我々は小児でのアレルギー性鼻炎の自然経過を修飾するであろう免疫療法がどのように修飾したかをアンケートによって調査した。その結果、治療抗原として用いたハウスダストでの症状の緩和と発症していなかった花粉症への進展は免疫療法期間が長くなると減少する傾向が認められた。しかし、海外での報告のように喘息への発症を抑制することはできなかった。

小児のアレルギー性鼻炎をはじめとするアレルギー疾患の増加が衛生仮説で説明されている現在、プロバイオティクスの効果を知ることは重要である。我々はある種の乳酸菌がマウスのスギ花粉誘発アレルギー反応を抑制することを明らかにした。今後の発症予防としてのプロバイオティクスの検討がさらに重要である。

A. 研究目的

アレルギー疾患において現在唯一の根治的治療法は抗原特異的免疫療法（減感作療法）であることが鼻アレルギー診療ガイドラインに記載されている。しかしアナフィラキシーなどの副作用の問題から日本ではあまり一般的には行われていないのが現状である。この副作用の報告の中では特に15歳以下の小児に副作用がより生じやすいことも報告されている（大西ほか、耳鼻 37: 1073-1078, 1991）ため、小児での施行率はより低いのが現状と考えられる。しかしPAT study (Moller C et al, JACI 109: 251-256, 2002) により特に小児において免疫療法のアレルギー疾患の広がり抑制効果があることが証明された。小児花粉症患者への花粉抗原での抗原特異的免疫療法が喘息への進行を抑制したという報告である。今回の検討では昨年の検討からさらに症例を増加させ、今まで行われた免疫療法が小児にどのような長期的効果をもたらせたのか、さらに予防的観点から他のアレルギーへの進展がなかったかどうかレトロスペクティブに検証する。また衛生仮説の点から近年注目されているプロバイオティクスの基礎的研究を行った。現在、小児の衛生が良くなったためにアレルギー疾患の有病率が増加したとする報告が散在される。細菌への接触の減少がアレルギー疾患の増加に繋がるのであれば、アレルギー発症前に菌との接触を増加させることは小児アレルギー性鼻炎の増加、ひいては小児アレルギー疾患の増加を減少させることが可能かも知れない。このプロバイオティクスのひとつの証明としてある種の乳酸菌は生体の免疫シ

ステムを刺激する活性を有する事が報告されている。その1つとして、マクロファージなどの抗原提示細胞からIL-12 (p70)の産生を誘導し、未熟T細胞からTh1細胞への分化を誘導する効果がある。このような機能を有する乳酸菌はアレルギーを予防または改善する効果が特に小児アレルギー疾患に期待できる。

B. 方法

検討①小児に対して免疫療法が予防的な有効性を持ったかどうかを検討した。1996年から2000年に当科でアレルギー検査を行った15歳以下の小児でハウスダスト抗原のみ陽性であった喘息のない症例(n=152)に対して質問票により鼻以外のアレルギーが発症したかどうかについて以下の千葉大学岡本教授作成の質問を郵送法により行った。

1. 減感作療法はいつからいつまで行っていましたか？
__歳から__年間（ハウスダスト、スギ、両方：該当するものを○で囲んで下さい）
2. 減感作治療の効果はありましたか？
() なかった () とてもあった () 少しあった
3. 効果を認めた方で再発はありましたか？
() なかった () あった : 開始__後から
4. この1年間にくしゃみ、鼻汁、鼻づまりといった鼻の症状はありますか？
() ほとんどない () 1年中ある () 特定の季節のみ : 春 夏 秋 冬
(○で囲んでください)
5. あるとされた方にお伺いします。平均するとど

の程度の強さですか？

1日のくしゃみ回数：() 5回以下 () 5-10回 () 11回以上

1日の鼻をかむ回数：() 5回以下 () 5-10回 () 11回以上

鼻づまりの程度：() ほとんどない () 時に鼻がつまり口で呼吸する

() ほぼ1日中口で呼吸する

6. 鼻の症状の有無に関わらず目がかゆくなるのがよくありますか？

() ない () 1年中ある () 時々ある () 月頃

7. いままで運動をしたときも含めて胸がゼーゼー、またはヒューヒューといったことがありますか？

() ない () あった：

8. 最近1年間に運動をしたときも含めて胸がゼーゼー、またはヒューヒューといったことがありますか？

() ない () ある

9. アトピー性皮膚炎といわれたことがありますか？

() ない () ある：何歳頃ですか？__歳頃

10. 最近1年間にアトピー性皮膚炎の症状は

() ない () ある

11. 現在、医師からアレルギーの治療をうけていますか？

() いる (喘息、鼻炎、結膜炎：○で囲んで下さい)

() いない

12. 検査にきていただけますか？

() はい () いいえ

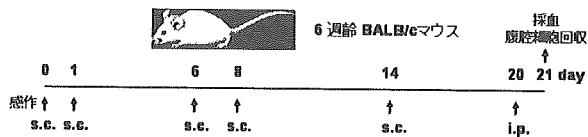
この質問から免疫療法が小児において他の部位のアレルギーやスギ花粉症への進展阻止に寄与したかを検討した。

検討②BALB/c マウスにスギ花粉抽出抗原液 (合計Cry j 1 0.4 μg/ml 含有) を皮下に投与し、抗原感作を行った。20日目にスギ花粉抽出抗原液 (Cry j 0.04 μg 含有) を腹腔内投与して腹腔内への好酸球遊走を誘発した。各群に水 (対照) またはある種の乳酸菌を21日間毎日、強制胃内投与した。最終の21日目に腹腔内の洗浄細胞を回収しその中の好酸球数を計測した。

【背景および目的】

- ・ある種の乳酸菌株はアレルギーモデル動物への経口投与でIgEを抑制する。
 - ・アレルギーの症状には好酸球が関与していることが報告されている。
- ↓
- ・乳酸菌の好酸球増多抑制効果を評価する。

【方法】 スギ花粉抗原による好酸球増多モデル



【感作】スギ花粉抽出抗原液 (Cry j 1を0.2 μg/ml含む) を0.2 mlずつ投与した。

【測定】Day 21に腹腔細胞を回収し、好酸球数を測定した。

【被験物】乳酸菌はMRS培地で18時間培養し、75℃で60分間加熱処理したものを0, 0.5, 1, 2 mg/bodyの投与量で21日間強制胃内投与した。

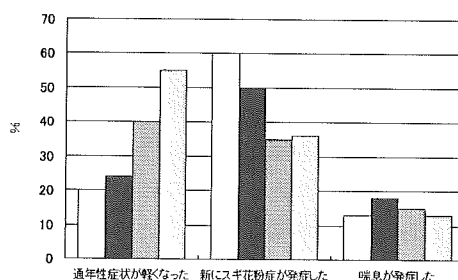


C. 結果

検討①郵送した152症例のうち63症例の返送があり、A群(免疫療法非施行)15症例、B群(1年未満の免疫療法)17例、C群(1年以上2年未満の免疫療法)20症例、D群(2年以上の免疫療法)11症例であった。そのデータから通年性アレルギー性鼻炎の寛解率はA群20%、B群24%、C群40%、D群55%だった。スギ発症率はA群60%、B群50%、C群35%、D群36%であった。喘息発症はA群13%、B群18%、C群15%、D群18%であり、喘息発症における免疫療法の有用性はハウスダスト寛解効果やスギ発症抑制効果より少なかった。

免疫療法による早期介入

■ 非免疫療法 ■ 免疫療法(1年未満) □ 免疫療法(1年~2年) □ 免疫療法(2年以上)



検討②スギ花粉抽出抗原液を感作・誘発させることで、陰性対照群と比較して腹腔回収液中の総細胞濃度、好酸球濃度および好酸球比率 (好酸球数/総細胞数) は有意に ($p < 0.01$) 増加していた。乳酸菌を投与した群ではどの投与量においても対照群と比較して好酸球比率は有意に ($p < 0.05$ または 0.01) 抑制された。好酸球増多抑制率は約44%であった。

乳酸菌のある種の株の好酸球増多抑制効果

群	総細胞濃度 { × 10 ⁵ cell/ml }	好酸球濃度 { × 10 ⁵ cell/ml }	好酸球比率 { % }	好酸球抑制率 { % }
対照群	16.7 ± 2.1	4.30 ± 0.70	25.5 ± 1.6	0.0 ± 17.0
陰性対照群	8.5 ± 1.2	0.18 ± 0.05	1.9 ± 0.3	100.0 ± 1.2
0.5 mg群	18.7 ± 2.1	3.29 ± 0.54	17.2 ± 2.0**	24.7 ± 13.2
1.0 mg群	19.4 ± 1.6	3.35 ± 0.35	17.6 ± 1.9*	23.2 ± 8.5
2.0 mg群	15.8 ± 1.7	2.49 ± 0.35*	16.2 ± 1.6**	44.3 ± 8.6*

平均値±標準誤差。対照群のみn=9, その他はn=10。*, **: p<0.05, 0.01 (Dunnett検定, vs 対照群)
細胞濃度は腹腔回収液中の濃度を示す。陰性対照群は生理食塩水で感作を行い、20日目はスギ花粉抗原抽出液の腹腔内投与を行った群。



D. 考察

鼻アレルギー診療ガイドラインから小児アレルギー性鼻炎ではなるべく医師の手が離れる期間を多くすることが治療の目標として掲げられている。患児が医師の手から離れられれば治療は成功と考えて良い。

現在までアレルギー疾患を治癒させる可能性があるのはこの抗原特異的免疫療法のみである。その治療のメカニズムから疾患ではその抗原特異性が高いものほど効果も高いと考えられる。小児における免疫療法はその後にも引き続く、抗原特異的な症状の抑制はもとより、他の抗原（スギ花粉）によるアレルギー性鼻炎の発症を抑えることが明らかになった。小児では特に抗原特異性が高く、その免疫療法の効果は疾患が他の環境因子などで修飾された成人よりも高いことが考えられる。

しかし今回の検討からはPAT studyのような喘息への進展の阻止作用は明らかではなかった。今回の調査はレトロスペクティブな見当であり、PAT スタディのようなプロスペクティブな検討を行い、小児に対する免疫療法が治療的・予防的効果を持つことをさらに明らかにしなければならない。

また基礎的実験として行ったスギ花粉誘発を用いたマウスアレルギーモデルでは、腹腔内の好酸球がスギ花粉特異的に増加することが示された。この腹腔内への好酸球浸潤は乳酸菌を連続に経口投与することにより用量依存的に抑制した。実際にスギ花粉症に効果があることを確認する必要があるとともに、小児におけるアレルギーの発症抑制に関わるか、今後実際のプロバイオティクスとして使用できるかどうかさらに臨床研究が必要である。

E. 結論

小児においてはハウスダストによる抗原特異的免疫療法の効果はスギ花粉症へ移行する率も低率であ

った。特に罹病期間の長くなる小児アレルギー疾患では抗原特異的免疫療法が重要であることを示している。また乳酸菌によるプロバイオティクスも今後期待が持てる結果が得られた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

一般論文

- Gotoh M, Okubo K: Sublingual immunotherapy for Japanese cedar pollinosis. *Allergy International* 54: 167-171, 2005.
- Okuda M, Okubo K, Goto M, Okamoto Y, Konno A, Baba K, Ogino S, Enomoto M, Imai T, So N, Ishikawa Y, Takenaka Y, Mandai T, Crawford B: Comparative study of two Japanese rhinoconjunctivitis quality-of-life questionnaires. *Acta Oto-Laryngologica* 125: 10. 736-744, 2005
- Gotoh M, Okubo K, Okuda M: Inhibitory effects of facemasks and eyeglasses on invasion of pollen particles in the nose and eye: clinical study. *Rhinology* 43, 8: 266-270, 2005.
- 大久保公裕: アレルギー性鼻炎のQOLについて—抗ロイコトリエン剤の有効性—. *日気食会報* 56. 2(4月): 194-196, 2005.
- 大久保公裕: ARIA と PG-MARJ2005. *Prog Med* 25.10: 2741-2747, 2005.
- 奥田稔、大久保公裕、後藤穰: 鼻正常者の鼻症状. *アレルギー* 54.6: 551-554, 2005.
- 奥田稔、大久保公裕、後藤穰、石田祐子: 空中スギ花粉の着衣、皮膚への付着. *アレルギー* 54.6: 555-558, 2005.
- 奥田稔、大久保公裕、後藤穰、石田祐子: 季節前スギ花粉症の高率発症への疑問—鼻内スギ花粉数の測定から. *アレルギー* 54.7: 636-640, 2005.

総説

- 大久保公裕: スギ花粉症の舌下免疫療法. *感染症免疫* 35.2: 162-163, 2006.
- 大久保公裕: スギ花粉症の薬物療法のポイント. *PTM2* 12.1, 2006.
- 大久保公裕: 花粉症に対する抗 IgE 抗体療法.

Medical Science Digest31.13: 527-529, 2005

4. 大久保公裕、奥田稔：花粉症を含むアレルギー性鼻炎の疫学. アレルギーの臨床 26.1: 23-26, 2006.
5. 大久保公裕：アレルギー性鼻炎の近未来の治療戦略. Q&A でわかるアレルギー疾患 1(3). 10: 238- 239, 2005.
6. 大久保公裕：アレルギー性鼻炎の QOL. 東京都医師会雑誌 59.3: 11-16, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 抗原暴露室システム
国際出願番号 PCT/JP2005/017865 9月28日
2. 抗原暴露室の抗原供給装置
国際出願番号 PCT/JP2005/017866 9月28日
3. 抗原暴露室およびその洗浄・乾燥方法
国際出願番号 PCT/JP2005/017867 9月28日

減感作療法（抗原特異的免疫療法）のメモリーT細胞レベルにおける作用機序

に関する研究

分担研究者 増山敬祐 山梨大学大学院医学工学総合研究部耳鼻咽喉科頭頸部外科教授
研究協力者 松崎全成 山梨大学大学院医学工学総合研究部耳鼻咽喉科頭頸部外科講師
松岡伴和 山梨大学大学院医学工学総合研究部耳鼻咽喉科頭頸部外科助手
遠藤周一郎 山梨大学医学部耳鼻咽喉科頭頸部外科助手

研究要旨

減感作治療はアレルギー性鼻炎で現在唯一治癒が期待できる治療法である。また、喘息など他のアレルギー疾患の発症を予防できる可能性もある。今回の研究では、アレルギー性鼻炎で減感作治療を行った症例の抗原特異的メモリーT細胞の、短期的および長期的変動について検討した。短期的効果では、同一症例の検討において、IL-4、IL-5メモリーT細胞の頻度は低下し、IL-10メモリーT細胞の頻度は増加した。長期的効果では、治療群と無治療群の群間比較において、治療群でIL-4、IL-5メモリーT細胞の頻度は有意に低下したが、IL-10メモリーT細胞の頻度には明らかな差を認めなかった。減感作治療の短期および長期的作用機序として、IL-4、IL-5メモリーT細胞の減少の関与が示唆された。

A 研究目的

アレルギー性鼻炎の小児から成人への移行を阻止するには、小児期での有効で長期効果が望める治療法が必要である。本研究においては、有効な治療法として特異的免疫療法に注目し検討を行った。特異的免疫療法は、WHOの評価にもあるように、その効果については認められている。しかし、その作用機序や効果を評価するバイオマーカーに関しては明らかでなく、新たな評価法が必要と考えられる。そこで、特異的免疫療法による抗原特異的メモリーT細胞の数の変動に着目し、治療効果について検討を行った。

B 方法

アレルギー性鼻炎では、T細胞、特にTh2細胞が重要な役割を演じるが、実際の臨床の指標としてはRASTをはじめとする抗原特異的IgEの検出などB細胞中心の検査法しかない。一方、抗原特異的T細胞の評価法はあるが、長時間の培養時間がかかるものがほとんどで再現性に乏しい。そこで、我々は可及的に短時間の培養で直接抗原特異的T細胞の検出ができる新たな検査法を検討してきた。抗原特異的メモリーT細胞が活性化されるには、タンパクレベルの抗原を抗原提示細胞によりペプチドレベルに分解し抗原提示を受ける必要があり、活性化したT細胞は、IFN- γ ・IL-4・IL-5・IL-10といった様々なサイトカインを産生する。そこで、樹状細胞を体外で誘導し、タンパクレベルのダニ抗原 (Der f 1, Der f 2) をプロセ

ッシングさせ、抗原提示させる方法を用い、抗原特異的サイトカイン産生メモリーT細胞の頻度について、ELISPOT法にて検討した。

本研究は、山梨大学医学部の生命倫理審査委員会にて人権擁護の面を含め倫理性につき十分な検討の後に承認を受け、文書にて同意の得られた方から採血をさせていただき検討を行った。また、個人情報の取り扱いにも細心の注意を払った。

C 結果

通年性のハウスダスト・ダニアレルギー性鼻炎患者に対する従来の皮下注射による特異的免疫療法の短期間の効果について、抗原特異的メモリーT細胞の検討を行った。特異的免疫療法前と特異的免疫療法維持量到達時の末梢血を採血できた2例について検討したところ、両者とも特異的免疫療法維持量到達時（治療開始後約6ヶ月間）で、治療前に比べダニ抗原特異的IL-4・IL-5産生メモリーT細胞の頻度は低下し、IL-10産生メモリーT細胞の頻度は増加していた。

次に、3年以上特異的免疫療法を継続し著効を示している「特異的免疫療法群」6例と、未治療で実際にアレルギー性鼻炎症状があり皮内テスト陽性で誘発テストも陽性のハウスダスト・ダニアレルギー性鼻炎「有症状者群」8例と、皮内テストは陽性だが誘発テストは陰性で症状のない「無症状者群」10例の3群を比較検討した。IL-5産生メモリーT細胞の頻度は、「特異的免疫療法群」において「有症状者群」や「無症状者群」と比較して有意に低値で

あった。また、IL-4 産生メモリーT 細胞の頻度は「特異的免疫療法群」で「有症状者群」に比べ有意に低値であった。IL-10 産生メモリーT 細胞の頻度には明らかな有意差は認められなかった。

D 考察

特異的免疫療法の短期間の効果としては、ダニ抗原特異的 IL-4・IL-5 産生メモリーT 細胞の頻度の低下と IL-10 産生メモリーT 細胞の頻度の軽度増加が示唆された。また、長期間の効果としては、ダニ抗原特異的 IL-4・IL-5 産生メモリーT 細胞の頻度の低下は同様に認められるものの、IL-10 産生メモリーT 細胞の頻度の増加は明らかでなかった。近年、特異的免疫療法の機序として調節性 T 細胞の関与を示唆する報告が増えている。今回の検討でも、短期間では IL-10 産生メモリーT 細胞の頻度の増加が見られており、特異免疫療法の短期間での効果発現には IL-10 産生細胞をはじめとする調節性 T 細胞の関与が示唆された。さらに、特異的免疫療法の短期間ならびに長期間の効果としては、ダニ抗原特異的 IL-4・IL-5 産生メモリーT 細胞の頻度の低下が認められており、免疫療法による効果発現機序のひとつと考えられた。

E 結論

特異的免疫療法の長期的効果発現には、抗原特異的 IL-4・IL-5 産生メモリーT 細胞の頻度の低下があると考えられた。その機序は、短期的には抗原特異的 IL-10 産生メモリーT 細胞の頻度の増加が認められ、調節性 T 細胞の誘導によるものかもしれない。ただし、長期的にはこの反応は明らかでなかった。長期効果の機序のひとつとして、抗原特異的 IL-4・IL-5 産生メモリーT 細胞数の減少の持続が考えられた。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1. 論文発表

増山敬祐：小児アレルギー性副鼻腔炎の病態、診断と治療。日本耳鼻咽喉科学会専門医通信 82: 8-9, 2005.

松崎全成、増山敬祐：鼻アレルギーの発症・増悪因子としての環境因子。アレルギー・免疫 12: 18-22, 2005.

増山敬祐：病態に則した診断へのアプローチ 2. アレルギー性鼻炎。日本内科学会雑誌 93: 12-18, 2004.

2. 学会発表

松崎全成、高橋吾郎、遠藤周一郎、松岡伴和、増山敬祐、他：花粉症疫学調査における病診連携について—山梨県での取り組み—。第 23 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2005

松岡伴和、堀口茂俊、岡本美孝、松崎全成、増山敬祐：ダニアレルギー性鼻炎患者の抗原特異的細胞の検討。第 106 回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会、2005

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

メモリーTh2細胞研究

分担研究者：中山俊憲 千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学 教授

研究要旨

I型アレルギーの発症はTh1/Th2のバランスによって制御されていることがわかってきた。花粉症は、慢性気道炎症を特徴とする喘息などのアレルギー疾患と違って、1型アレルギーの典型的な病態である。従ってTh1/Th2のバランスの制御による免疫治療によって病態の改善がもっとも期待できる対象疾患である。これまで、減感作療法はある程度の治療効果を発揮してきたが、著効例においても数年は杉花粉特異的なIgEなどは高値を示したままである。これは、杉花粉特異的なメモリー細胞の寿命がかなり長いために、数年にわたって杉花粉特異的なIgE産生が続くためであると考えられる。アレルゲン特異的なメモリーTh2細胞の制御なしに根治治療の樹立は期待できない。しかし、メモリーTh2細胞の成立や生存、機能維持に関する研究は、ほとんど行われていない。そこで、マウスおよびヒトの細胞で、アレルゲン特異的なメモリーTh2細胞の形成と機能維持に関わる分子レベルでの解析を行う。また、杉花粉症の患者で、シーズンと非シーズンに分けた花粉抗原特異的なTh1/Th2細胞のクローンサイズの定量的検討を行う。この研究によって、花粉症患者でのアレルゲン特異的なメモリーTh2細胞の形成と機能維持に関する機序が明らかになり、エビデンスに基づいた花粉症の免疫治療の樹立に貢献すると考えられる。

A.研究目的

アレルギー発症の要の細胞であるメモリーTh2細胞の成立、生存、機能維持に関する分子レベルでの検討を行い、アレルギーをターゲットにした免疫療法の開発研究に貢献することを目的とする。

B. 研究方法

IL-4, IL-5, IL-13などのTh2サイトカインを産

生するTh2細胞の、分化制御機構は次第に明らかになってきたが、加齢とともにどのように分化能が変化するかに関してはほとんど不明である。そこで、6週 of 若年マウスと8-12ヶ月の老齢マウス（ヒトでは60才台に相当）を用いて実験を行った。卵アレルギーの主要アレルゲンであるOVA特異的なナイーブCD4 T細胞を、in vitroで抗原とIL-4またはIL-12を用いて培養することでTh1/Th2細胞を分化誘導し分化能を評価した。

また、マウス喘息モデルを用いて生体レベルでの解析を行った。

(倫理面への配慮)

今年度の研究では、ヒト由来のサンプルは使用していない。

動物実験は千葉大学実験動物委員会の指針を遵守して行う。

C. 研究結果

次の3点の結果が得られた。老齢マウスでは、**1.** TCR 下流の ERK/MAPK 系の活性化が選択的に抑制されていること。サイトカインレセプターの下流のシグナルは正常であること。**2.** Th2 細胞分化が選択的に障害されていること。**3.** OVA で誘導される好酸球性の気道炎症の程度が低いことがわかった。(Hasegawa et al. *J. Immunol.* In press)。

D. 考察

加齢と共に Th2 細胞への分化能が低下することがわかった。平成16年度に樹立したメモリーT細胞の形成を評価する動物実験系を用いて、加齢マウスのメモリーT細胞の形成に関しても検討中である。新生マウスでの Th1/Th2 細胞分化、メモリーT細胞の形成に関しても実験を行い、年(週)齢と Th1/Th2 分化の関係について検討する予定である。アレルギー性鼻炎発症に重要な Th2 細胞の分化能に注目して、子供から成人へのアレルギー性鼻炎の移行に関する分子・細胞制御機構の解明を目指した研究を行う。

E. 結論

年齢依存性の Th2 細胞分化能の調節機構の存在が明らかになった。この調節機構の制御を目指す。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. Kimura, Y. M., Hosokawa, H., Yamashita, M., Watarai, H., Hasegawa, A., Iwamura, C., Taniguchi, M., Takagi, T., Ishii, S., and Nakayama, T.: Regulation of Th2 cell differentiation by murine Schnurri-2. *J. Exp. Med.* 201:397-408 (2005).
2. Ishikawa, A., Motohashi, S., Ishikawa, E., Fuchida, H., Higashino, K., Otsuji, M., Iizasa, T., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Fujisawa, T.: A phase I study α -galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin. Can. Res.* 11:1910-1917 (2005).
3. Nishikawa, H., Kato, T., Tawara, I., Takemitsu, T., Saito, K., Wang, L., Ikarashi, Y., Wakasugi, H., Nakayama, T., Taniguchi, M., Kuribayashi, K., Old, L. J., and Shiku, H.: Accelerated chemically-induced tumor development mediated by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in wild-type hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:9253-9257 (2005).
4. Miyamoto, T., Kaneko, T., Yamashita, M., Tenda, Y., Inami, M., Suzuki, A., Ishii, S., Kimura, M., Hashimoto, K., Shimada, H., Yahata, H., Ochiai, T., Saito, I., DeGregori, J., and Nakayama, T.: Prolonged skin allograft survival by *IL-10* gene-introduced CD4 T cell administration. *Int. Immunol.* 17:759-768 (2005).
5. Ishikawa, E., Motohashi, S., Ishikawa, A., Ito, T., Uchida, T., Kaneko, T., Tanaka, Y., Horiguchi, S., Okamoto, Y., Fujisawa, T., Tsuboi, K., Taniguchi, M., Matsumura, A., and Nakayama, T.: Dendritic cell maturation by CD11c⁺ T cells and V α 24⁺ NKT cell activation by α -Galactosylceramide. *Int. J. Cancer* 117:265-273 (2005).
6. Yamashita, M., Shinnakasu, R., Asou, H., Kimura, M., Hasegawa, A., Hashimoto, K., Hatano, N., Ogata, M., and Nakayama, T.: Ras-ERK MAPK cascade regulates GATA3 stability and Th2

- differentiation through ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 280:29409-29419 (2005).
7. Kojo, S., Seino, K., Harada, M., Watarai, H., Wakao, H., Uchida, T., **Nakayama, T.**, and Taniguchi, M.: Induction of regulatory properties in dendritic cells by V α 14 NKT cells. *J. Immunol.* 175:3648-3655 (2005).
 8. Kimura, Y. M., and **Nakayama, T.**: Differentiation of NK1 and NK2 cells. *Crit. Rev. Imm.* 25:361-374 (2005).
 9. Hiroshima, K., Abe, S., Ebihara, Y., Ogura, S., Kikui, M., Kodama, T., Komatsu, H., Saito, Y., Sagawa, M., Sato, M., Tagawa, Y., Nakamura, S., **Nakayama, T.**, Baba, M., Hanazawa, S., Hirano, T., and Horai, T.: Cytological characteristics of pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. *Lung Cancer* 48:331-337 (2005).
 10. **Nakayama, T.**, Yamashita, M., Kimura, M., Hasegawa, A., Omori, M., Inami, M., Motohashi, S., Kitajima, M., Hashimoto, K., Hosokawa, H., and Shinnakasu, R.: Chromatin remodeling of the Th2 cytokine gene loci. *International Congress Series 1285* 137-144 (2005).
 11. Koda, M., Okada, S., **Nakayama, T.**, Koshizuka, S., Kamada, T., Nishio, Y., Someya, Y., Yoshinaga, K., Okawa, A., Moriya, H., and Yamazaki, M.: Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice. *Neuroreport* 16:1763-1767 (2005)
 12. Toyofuku, A., Yasunami, Y., Nabeyama, K., Nakano, M., Satoh, M., Matsuoka, N., Ono, J., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., Tanaka, M., and Ikeda, S.: Natural killer T-cells participate in rejection of islet allografts in the liver of mice. *Diabetes* 55:34-39 (2006).
 13. Watarai, H., Hinohara, A., Nagafune, J., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., and Yamaguchi, Y.: Plasma membrane-focused proteomics: Dramatic changes in surface expression during the maturation of human dendritic cells. *Proteomics* in press.
 14. Hasegawa, A., Miki, T., Hosokawa, H., Hossain, M. B., Shimizu, C., Hashimoto, K., Kimura, Y. M., Yamashita, M., and **Nakayama, T.**: Impaired GATA3-dependent chromatin remodeling and Th2 cell differentiation leading to attenuated allergic airway inflammation in aging mice. *J. Immunol.* in press.
 15. Nigo, I. Y., Yamashita, M., Hirahara, K., Shinnakasu, R., Inami, M., Kimura, M., Hasegawa, A., Kohno, Y., and **Nakayama, T.**: Regulation of allergic airway inflammation through Toll like receptor 4-mediated modification of mast cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* in press.
 16. Meyer, E., Goya, S., Akbari, O., Berry, G., Savage, P., Kronenberg, M., **Nakayama, T.**, and DeKruyff, R.: Glycolipid mediated activation of iNKT cells is sufficient to induce airway hyperreactivity independent of conventional CD4⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* in press

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okamoto.Y., Matsuzaki.Z., Matsuoka.T., Chazono.H., Hanazawa.T	Influence of viral infection on the development of nasal hypersensitivity.	Clin Exp Allergy	35	679-684	2005
Horiguchi.S., Okamoto.Y., Chazono.H., Sakurai.D., Kobayashi.K.	Expression of membrane-bound CD23 in nasal mucosal B cells from patients with perennial allergic rhinitis.	Ann Allergy Asthma Immunol	94	286-291	2005
Horiguchi.S., Okamoto.Y.	Role of T cells in allergic rhinitis	Clin Exp All Rev	5	64-67	2005
Ohtsuka.Y., Arima M., Fujimura L., Li.H., Sakamoto.A., Okamoto.Y., Tokuhisa.T.	BC16 regulates Th2 type cytokine productions by mast cells activated by Fc epsilon R1/IgE cross-linking.	Mol Immunol	42	1453-1459	2005
Okuda M, Ohkubo K, Goto M, Okamoto Y, Konno A, Baba K, Ogino S, Enomoto M, Imai T, So N, Ishikawa Y, Takenaka Y, Manndai T, Crawford B	Comparative study of two Japanese rhinoconjunctivitis quality-of-life questionnaires.	Acta Oto-Laryngologica	125	736-744	2005
Ishikawa, E., Motohashi, S., Ishikawa, A., Ito, T., Uchida, T., Kaneko, T., Tanaka, Y., Horiguchi, S., Okamoto, Y., Fujisawa, T., Tsuboi, K., Taniguchi, M., Matsumura, A., and Nakayama, T	Dendritic cell maturation by CD11c ⁺ T cells and Vα24 ⁺ NKT cell activation by α-Galactosylceramide.	Int. J. Cancer	117	265-273	2005
Yamashita, M., Shinnakasu, R., Asou, H., Kimura, M., Hasegawa, A., Hashimoto, K., Hatano, N., Ogata, M., and Nakayama, T.	Ras-ERK MAPK cascade regulates GATA3 stability and Th2 differentiation through ubiquitin-proteasome pathway.	J. Biol. Chem	280	29409-29419	2005
Kimura, Y. M., Hosokawa, H., Yamashita, M., Watarai, H., Hasegawa, A., Iwamura, C., Taniguchi, M., Takagi, T., Ishii, S., and Nakayama, T.	Regulation of Th2 cell differentiation by murine Schnurri-2.	J. Exp. Med	201	397-408	2005
Kimura, Y. M., and Nakayama, T.	Differentiation of NK1 and NK2 cells.	Crit. Rev. Imm.	25	361-374	2005
Gotoh M, Okubo K.	Sublingual immunotherapy for Japanese cedar pollinosis.	Allergology International	54	167-171	2005
岡本美孝	アレルギー性鼻炎の疫学-2005年の調査から-	医学のあゆみ	216	329-333	2006
國井直樹, 留守卓也	上気道感染とアレルギー性鼻炎	医学のあゆみ	216	401-405	2006
岡本美孝	鼻アレルギー	日本臨床	63 suppl 5	96-101	2005
大久保公裕	花粉症	日本臨床	63 suppl 5	145-150	2005
堀口茂俊	アレルギー性鼻炎の病態形成因子-T細胞から-	アレルギーの臨床	25	438-443	2005
増山敬祐	小児アレルギー性副鼻腔炎の病態、診断と治療	日本耳鼻咽喉科学会専門医通信	82	8-9	2005

Influence of viral infection on the development of nasal hypersensitivity

Y. Okamoto*, Z. Matsuzaki†, T. Matsuoka†, S. Endo†, H. Yamamoto*, H. Chazono*, S. Horiguchi* and T. Hanazawa*

*Department of Otolaryngology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan and †Department of Otolaryngology, Yamanashi Medical University, Yamanashi, Japan

Summary

Background The underlying relationship between viral infections and allergic diseases of the upper respiratory tract has not been well clarified.

Methods In order to clarify the relationship between viral infection and nasal hypersensitivity, mice were sensitized with ovalbumin (OVA) and then infected intranasally with respiratory syncytial virus (RSV), after which their nasal sensitivity to histamine or antigen was examined.

Results Non-sensitized mice showed transient mild nasal hypersensitivity following nasal administration of histamine after intranasal RSV inoculation. In mice sensitized with OVA, RSV infection significantly exaggerated their nasal hypersensitivity to histamine and OVA. Treatment of these mice with a neurokinin (NK)-1/NK-2 receptor antagonist, but not with anti-IL-5 antibodies, reduced their hypersensitivity. The infiltration of nasal mucosa with eosinophils was temporarily associated with accelerated rate of RSV elimination in these animals.

Conclusion RSV infection induced transient nasal hypersensitivity. Several mechanisms, including impairment of nasal epithelial cells are thought to mediate this effect. In allergen-sensitized mice, RSV inoculation strongly enhanced nasal hypersensitivity.

Keywords histamine, nasal hypersensitivity, RSV

Submitted 15 April 2004; revised 24 September 2004; accepted 23 November 2004

Introduction

Recent epidemiological evidence has suggested that acute respiratory viral infections exacerbate the symptoms of pre-existing reactive airway diseases and is the most important trigger of acute asthmatic attacks [1–4]. Viruses, rather than bacteria, cause most acute respiratory tract infections, and asthma attacks in children are often preceded by viral infection [5–7].

The nasal cavity is often the first target of invading viruses, because it is the point of entry into the respiratory tract. The common cold is the most widespread viral infectious condition and is usually caused by viruses such as rhinoviruses, parainfluenza viruses, influenza viruses, adenoviruses and respiratory syncytial virus (RSV) [8, 9]. However, the relationship between viral infections and allergic diseases in the upper respiratory tract has not been well defined. The results from studies that have examined the influence of atopy on the development of the symptom after viral infections are controversial [10–13]. Bardin et al. [11] observed more severe cold symptoms in atopic subjects than in non-atopic subjects after experimental rhinovirus infection. However, in another study, augmented nasal allergic inflammation induced by

antigen provocation before viral inoculation did not result in a worsening of cold symptoms [12]. The effects of the common cold on nasal hypersensitivity or allergic rhinitis have not been clearly established.

Nasal responses to viral infection are thought to differ depending on the viral species. Although rhinoviruses causes little damage to epithelial cells in the respiratory tract, RSV induces marked cytopathic effects [13]. RSV is an RNA virus infection which usually results in common cold symptoms, although progression to lower respiratory tract symptoms, the most common being bronchiolitis, frequently occurs in infants. RSV causes about 60% of the bronchitis cases in children [14, 15]. In prospective studies, as many as 75–90% of infants with a clinical diagnosis of bronchiolitis subsequently developed recurrent episodes of wheezing suggestive of childhood asthma and experienced airway histamine or methacholine hypersensitivity which persisted for several years [16–22].

In the present study, we have shown that RSV infection contributes to the exacerbation of nasal hypersensitivity in an allergic rhinitis mouse model.

Materials and Methods

Animals

Eight-week-old male C57BL/6 mice (Nippon Clea, Shizuoka, Japan) that were raised on ovalbumin (OVA)-free chow were

Correspondence: Yoshitaka Okamoto, Department of Otolaryngology, Graduate School of Medicine, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan.
E-mail: yoka-chiba@k4.dion.ne.jp

used in this study. Hartley strain guinea-pigs (Nippon Clea) were also used to measure passive cutaneous anaphylaxis (PCA). The use of these laboratory animals was approved by the local Animal Ethics Committee (Yamanashi Medical University) and the experiments were conducted in conformity with the guidelines of the committee.

Experimental infection with respiratory syncytial virus

The long strain of RSV (prototype RSV group A strain) was grown in HEp-2 cells in minimal essential medium (MEM) supplemented with 2% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine and antibiotics. RSV was partially purified by polyethylene glycol precipitation, followed by centrifugation in a 35–65% discontinuous sucrose gradient, as described elsewhere [23]. RSV (1×10^6 plaque-forming units (PFU)) in a volume of 20 μ L was administered intranasally to mice. Uninfected Hep-2 cells were processed similarly and used as controls.

Virus assay

Lungs and nasal tissues were collected and homogenized in MEM containing 2% FCS and were stored at -70°C until they were assayed. RSV was assayed by the plaque method using HEp-2 cells in 24-well microplates. The overlay for the plaque assay consisted of MEM supplemented with 2% FCS, antibiotics and 1% methylcellulose. Plates were incubated for 7 days at 37°C . After the methylcellulose was removed, the plaques were fixed with 10% formaldehyde and stained with 0.1% crystal violet.

Evaluation of sensitivity to histamine in nasal mucosa

One microlitre of various concentrations of histamine, diluted in phosphate-buffered saline (PBS), was administered into each nostril of the experimental mice. The number of nasal rubbing attacks that occurred during the ensuing 10 min was then counted.

Experimental protocol for sensitization with ovalbumin

Mice were immunized with 10 μ g OVA (grade V, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) intraperitoneally with alum once a week for 4 weeks. Heat-killed bordetella pertussis (1×10^8 bacterial units) was used as an adjuvant in the first immunization. Five days after the last immunization, the mice were either inoculated with RSV or sham-infected with sonicated non-RSV-infected HEp-2 cells. Two micrograms OVA in 2 μ L PBS was administered intranasally for 5 consecutive days after the inoculation. Sensitized mice were divided into the following experimental groups and treated as follows. Group 1 consisted of 30 mice treated with a neutralizing IL-5 antibody or a neurokinin (NK)-1/NK-2 antagonist. A rat neutralizing monoclonal antibody (mAb) directed against mouse IL-5 (PharMingen, San Diego, CA, USA) and a control isotype mouse IgG1 mAb (PharMingen) were used. Antibodies were injected intraperitoneally twice a week at a dose of 0.1 mg for 1 week before RSV inoculation, and were administered intranasally for 5 consecutive days after inoculation. Group 2 consisted of 10 OVA-sensitized mice who received 0.04 μ g of the NK-1/NK-2 antagonist [24]

FK224 (Fujisawa Co Ltd, Osaka, Japan) intranasally for 5 consecutive days after RSV inoculation. On the day following the last nasal administration of OVA, the nasal rubbing attacks were counted for 10 min. The sensitivity of the mice to histamine was examined 24 h later in a similar manner.

Treatment of ovalbumin-sensitized mice with a neutralizing anti-interferon- γ monoclonal antibody or with interferon- γ

OVA-sensitized mice received 0.1 mg of anti-IFN- γ neutralizing mAb (PharMingen) or control mAb intraperitoneally twice a week and then intranasally for 5 consecutive days before nasal provocation with OVA. Other OVA-sensitized mice were administered 1 μ g of IFN- γ (PharMingen) intranasally for 5 consecutive days before provocation with OVA.

Detection of ovalbumin-specific immunoglobulin E antibody

OVA-specific IgE antibodies were detected by PCA [25]. Briefly, 100 μ L of undiluted and twofold diluted serum samples were injected intradermally into the dorsal skin of shaved guinea-pigs. Three days later, the animals were challenged intravenously with 1 mg OVA together with 1% Evans blue. A blue lesion of a diameter greater than 5 mm, as determined 30 min after the challenge, was considered to be positive. PCA titres were expressed as the reciprocal of the highest dilution giving a positive reaction.

Histological examination

On the 4th day after RSV inoculation the mice were killed by CO₂ overdose. The heads of the mice were detached along the line between the upper and lower jaws, and they were then fixed in formalin and decalcified. The section of the nasal cavity anterior to the eyeball was examined and processed for paraffin sectioning. Tissue sections were stained with PAS and the number of infiltrating eosinophils in the whole nasal septum mucosa of each section was determined.

Fluorescence-activated cell sorting analysis

Nasal mucosal tissue from the above mice was cut into small pieces, which were then teased gently through a nylon mesh using frost glass slides. The disrupted mucosa was then suspended in RPMI-1640 containing 10% FCS, penicillin (100 units/mL) and streptomycin (100 μ g/mL). After washing twice with medium, CD3⁺ T cells were purified in 0.2 mL of RPMI-1640 using magnetic beads (Dyna, Great Neck, NY, USA). Following purification, the medium was supplemented with 10% FCS. 10^6 nasal CD3⁺ T cells collected from seven RSV-infected OVA-sensitized mice or from non-infected OVA-sensitized mice were stained with fluorescein-conjugated anti-CD4 antibody (PharMingen) and fixed overnight with 4% paraformaldehyde (Sigma Chemical Co). The fixed cells were permeabilized by incubation in PBS with 1% bovine serum albumin and 2% saponin (Sigma Chemical Co) for 10 min. A phycoerythrin-conjugated anti-IFN- γ antibody (PharMingen) or an anti-IL-5 antibody (PharMingen), diluted to 20 μ g/mL in PBS, was then added. After a 30 min incubation, the cells were washed with PBS and were

analyzed using a FACScan (Becton Dickinson, Fullerton, CA, USA).

Statistical analysis

Comparisons between groups were evaluated using Student's *t* test and Wilcoxon's test.

Results

Viral replication and nasal histamine sensitivity

After nasal inoculation with 10^6 PFU of RSV, mild replication of RSV in the respiratory tract was observed with peak levels occurring in the lung on day 4 and the levels then declined until day 7 as shown previously [26]. RSV was recovered from the nasal mucosa for 12 days after inoculation.

Non-specific stimulation of the nasal mucosa of mice also resulted in nasal rubbings. The number of nasal rubbing attacks observed in 20 normal mice following nasal installation of 2 μ L PBS was 9.4 ± 2.9 (mean \pm SD). Thus, the lowest histamine concentration administered intranasally in a volume of 2 μ L that was needed to induce more than 20 nasal rubbing attacks was defined as the threshold level of nasal histamine hypersensitivity. After RSV inoculation, the threshold decreased and reached its lowest on day 4. It returned to normal by day 14 (Fig. 1(a)).

Influence of respiratory syncytial virus infection on ovalbumin-sensitized mice

The threshold of nasal hypersensitivity to histamine decreased in OVA-sensitized mice and RSV infection in OVA-sensitized mice induced a dramatic enhancement of nasal sensitivity to

histamine (Fig. 1(b)). The threshold of nasal hypersensitivity to histamine observed in RSV-infected mice increased gradually after the last nasal administration of OVA and 14 days later, it was the same as that of non-infected mice (data not shown). Fluorescence-activated cell sorting analysis of nasal mucosal T lymphocytes in the RSV-infected OVA-sensitized mice not only revealed an increased expression of IFN- γ , but also of IL-5 (Table 1). Anti-IL-5 treatment of RSV-infected OVA-sensitized mice using neutralizing antibodies reduced the histamine sensitivity in some degree ($P < 0.05$) and the treatment with an NK-1/NK-2 antagonist resulted in a marked reduction ($P < 0.001$) of the sensitivity (Fig. 1(b)).

After OVA nasal provocation the frequency of nasal rubbing attacks dramatically increased in RSV-infected OVA-sensitized mice, compared with non-infected sensitized mice (Fig. 2). However, anti-IL-5 treatment of RSV-infected OVA-sensitized mice did not significantly improve nasal symptoms after OVA administration. On the other hand, an NK-1/NK-2 antagonist resulted in a significant improvement (Fig. 2).

The number of eosinophils in the nasal mucosa was markedly increased in RSV-infected OVA-sensitized mice compared with those in non-infected OVA-sensitized mice (Fig. 3). The PCA titre, on the other hand, was not significantly different between the two groups (mean \pm SD; 21.1 ± 21.0 in infected sensitized mice, 16.6 ± 11.4 in non-infected sensitized mice). Anti-IL-5 treatment of RSV-infected OVA-sensitized mice significantly reduced the number of infiltrated eosinophils, however, the treatment with an NK-1/NK-2 antagonist had no effect on eosinophil infiltration.

The nasal administration of IFN- γ to OVA-sensitized mice increased the number of nasal eosinophils, but had no effect on nasal symptoms (Fig. 4). Treatment with anti-IFN- γ neutralizing antibodies did not affect nasal symptoms or eosinophil infiltration (Fig. 4).

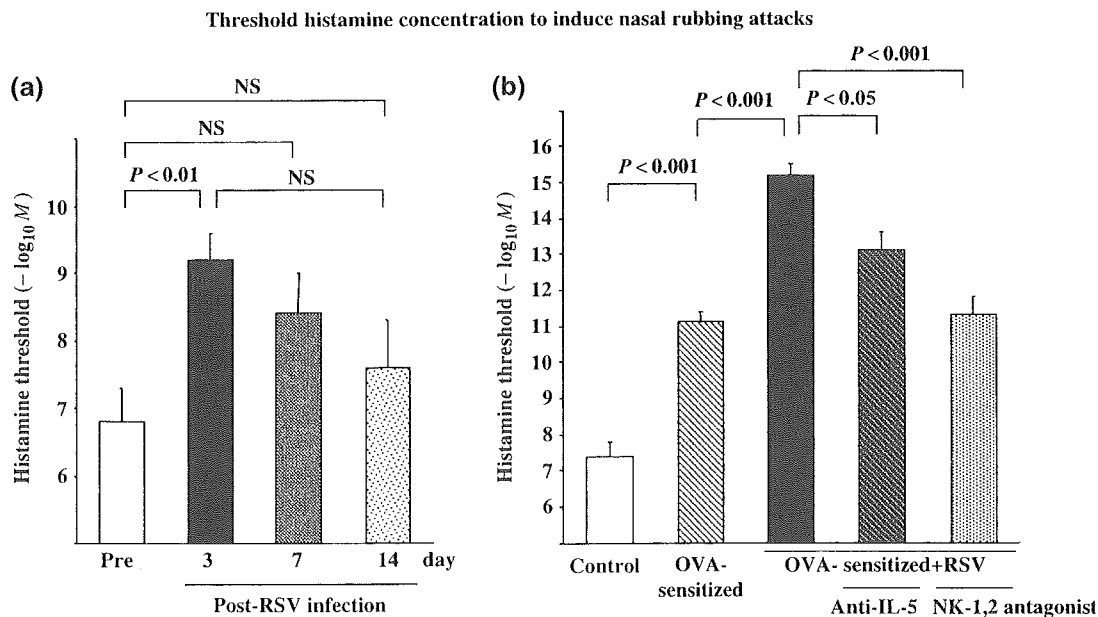


Fig. 1. Threshold histamine concentration needed to induce nasal rubbing attacks in respiratory syncytial virus (RSV)-infected non-sensitized mice (a) and in ovalbumin (OVA)-sensitized mice (b). After RSV inoculation, the threshold decreased transiently and reached its lowest on day 4. Although the threshold decreased in OVA-sensitized mice, RSV infection in OVA-sensitized mice induced a dramatic reduction of the threshold. The treatment with neurokinin (NK)-1/NK-2 receptor antagonist but not with anti-IL-5 neutralizing antibodies improved the reduction. Non-OVA-sensitized mice were used as controls.

Table 1. IL-5 and IFN- γ expression of nasal mucosal T lymphocytes from OVA-sensitized mice*

	RSV-infected mice (%)	Sham-infected mice (%)
IL-5	11.9	6.2
IFN- γ	17.4	11.4

OVA, ovalbumin; RSV, respiratory syncytial virus.

*Mean of two groups, and each group consisted of T lymphocytes collected from nasal mucosa of seven mice.

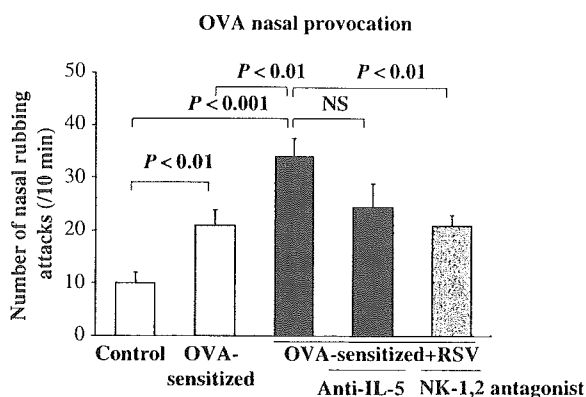


Fig. 2. The number of nasal rubbing attacks in ovalbumin (OVA)-sensitized mice following OVA provocation. Respiratory syncytial virus (RSV) infection in OVA-sensitized mice induced a dramatic enhancement of number of attacks. The anti-IL-5 treatment reduced the enhancement in some degree and the topical administration of the neurokinin (NK)-1/NK-2 receptor antagonist did more.

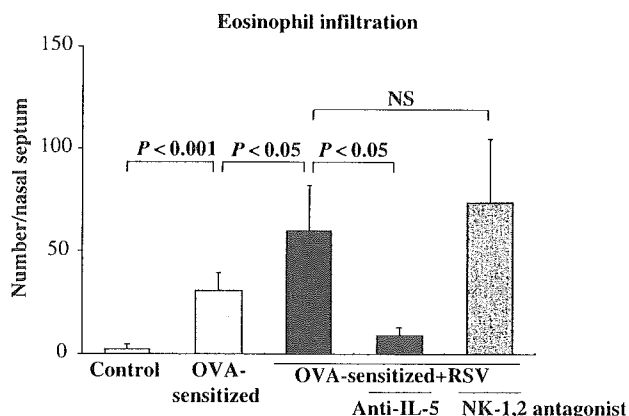


Fig. 3. The number of eosinophils in the nasal mucosa. Respiratory syncytial virus (RSV) infection markedly increased the eosinophil infiltration in ovalbumin (OVA)-sensitized mice. The treatment with anti-IL-5 antibodies reduced the number significantly but not with neurokinin (NK)-1/NK-2 receptor antagonists.

RSV replication on day 4 was significantly reduced in OVA-sensitized mice. However, the use of anti-IL-5 did not exhibit any influence on viral replication and no reduction in viral shedding was observed in anti-IL-5-treated OVA-sensitized mice (Fig. 5).

Discussion

The above studies were designed to examine the mechanism of nasal hypersensitivity observed during viral infections. A

murine RSV infection model was used in which the quantitative analysis of nasal rubbing attacks was evaluated as a measure of nasal hypersensitivity. Sneezes in mice are not clearly distinguishable as in humans and are difficult to quantify precisely. The evaluation of nasal obstruction is also difficult, because mice cannot survive by breathing orally. BALB/c mice are known to be sensitive to allergic reactions [27], particularly in the lower respiratory tract, although their nasal reactivity to histamine and other antigens is quite low (data not shown). While C57BL/6 mice are known to mount a Th1 dominant immune response [28], IgE production is inducible in these animals if the correct adjuvant, such as alum, is used, and nasal hypersensitivity can be observed after the topical administration of histamine or antigens. In light of the above and because RSV replication in the nose of BALB/c mice is tolerated well by these animals, we chose to use C57BL/6 mice in our study.

The observations summarized in this report suggest that experimentally induced infection with RSV results in significant enhancement of nasal sensitivity to OVA and histamine in previously sensitized animals. OVA-sensitized animals also exhibited increased expression of IL-5 and IFN- γ and pronounced accumulation of eosinophils in the nasal mucosa after RSV infection.

The mechanisms underlying the development of hypersensitivity states after viral infections such as RSV have not been clinically defined. It is possible that viral infection-associated mucosal damage; recruitment of mast cells, eosinophils and other cellular mediators of hypersensitivity; and activation of cholinergic, adrenergic or non-adrenergic non-cholinergic neurogenic mechanisms may play an important role in the development of mucosal hypersensitivity states [29–31].

In the present studies, pre-treatment with anti-IL-5 resulted in significant decrease in the accumulation of eosinophils. However, such treatment did not influence the degree of viral induced hypersensitivity. In fact, anti-IL-5 treatment was associated with decreased viral elimination in the nasal cavity, and as a result eosinophils may be associated with accelerated RSV elimination. It has been shown that eosinophil cationic protein and eosinophil-derived neurotoxin may act as rebonuclease-dependent antiviral agents [32]. In the present studies, it is interesting to note that use of IFN- γ was associated with increasing eosinophil counts but did not influence nasal hypersensitivity reactions. Thus, although eosinophils may play an important role in viral induced allergic inflammation [33, 34], eosinophils did not seem to contribute to nasal hypersensitivity to OVA in the current experimental setting. IFN- γ is a classical Th1 cytokine that has been shown to reduce allergic reactions when administered during sensitization [35]. However, treatment of OVA-sensitized animals with anti-IFN- γ neutralizing antibody did not decrease nasal sensitivity to OVA during RSV infection.

The observation of particular interest in the current studies is the significant reduction of nasal hypersensitivity detected after the use of NK-1/NK-2 antagonists, although such treatment did not influence eosinophil counts. Recently, it has been shown that infection with RSV frequently is associated with activation of NK receptor sites [36–38]. Tachykinin family of neuropeptides such as substance P have been shown to exhibit strong binding affinity for NK receptors especially NK-1. Such receptor-neuropeptide interactions are associated

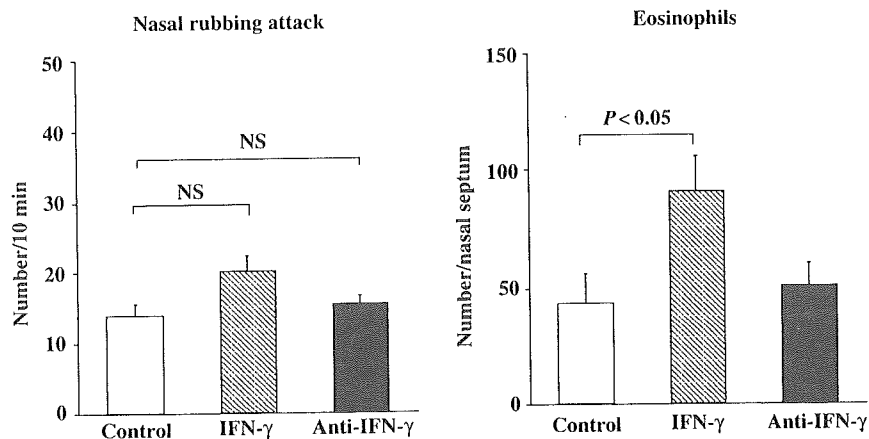
Influence of IFN- γ or of anti-IFN- γ antibodies on OVA-sensitized mice

Fig. 4. Influence of IFN- γ and anti-IFN- γ antibodies on ovalbumin (OVA)-sensitized mice. The nasal administration of IFN- γ increased the number of eosinophils, but did not affect the nasal symptoms. Anti-IFN- γ treatment had no effect on either nasal symptoms or eosinophil numbers.

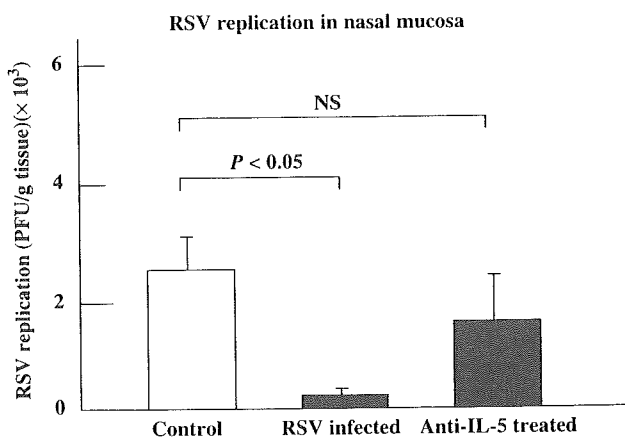


Fig. 5. Respiratory syncytial virus (RSV) replication in the nasal mucosa on day 4 after RSV inoculation. Replication was reduced in ovalbumin (OVA)-sensitized mice, but this reduction was abolished in anti-IL-5-treated OVA-sensitized mice. Non-OVA-sensitized mice were used as controls.

with a wide variety of biologic inflammatory effects, including changes in vascular permeability, mucous secretion, leucocyte chemotaxis and bronchoconstriction [39–41]. It is thus suggested that RSV-associated increase in allergic nasal hypersensitivity to OVA and possibly to other allergens may in part be related to activation of neuropeptide receptors during acute viral infection of the nasal mucosa.

It is possible that increased eosinophil recruitment is mediated by chemokines induced by IFN- γ . Recently induction of eotaxin 3 and IP-10 by IFN- γ in mucosal cell cultures has been demonstrated after experimental RSV infection in *in vivo* settings [42–44]. Based on these reports and the present studies, it is proposed that a possible relationship exists between IFN- γ and induction, recruitment and/or activation of eosinophils in allergic sensitization in the nasal mucosa during viral infections.

Acknowledgements

This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and

Culture, Japan. The authors thank Professor Peary L. Ogra for helpful comments

References

- Green RM, Custovic A, Sanderson G, Hunter J, Johnston SL, Woodcock A. Synergism between allergens and viruses and risk of hospital admission with asthma: case-control study. *BMJ* 2002; 324:1–5.
- Message SD, Johnston SL. Viruses in asthma. *Br Med Bull* 2002; 61:29–43.
- Gern JE. Viral and bacterial infections in the development and progression of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: s497–502.
- Johnston SL, Plattermore PK, Sanderson G et al. The relationship between upper respiratory infections and hospital admissions for asthma: a time-trend analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:654–60.
- Tuffaha A, Gern JE, Lemanske Jr RF. The role of respiratory viruses in acute and chronic asthma. *Clin Chest Med* 2000; 21:289–300.
- Schwarze J, Gelfand EW. The role of viruses in development or exacerbation of atopic asthma. *Clin Chest Med* 2000; 21:279–87.
- Johnston SL, Plattermore PK, Sanderson G et al. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9–11 year old children. *BMJ* 1995; 310:1225–9.
- Makela MJ, Puhakka T, Ruuskanen O et al. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J Clin Microbiol* 1998; 36:539–42.
- Irwin RS, Madison JM. The diagnosis and treatment of cough. *N Engl J Med* 2000; 343:1715–21.
- Doyle WJ, Skoner DP, Fireman P et al. Rhinovirus 39 infection in allergic and non-allergic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89:968–78.
- Bardin PG, Fraenkel DJ, Sanderson G et al. Amplified rhinovirus colds in atopic subjects. *Clin Exp Allergy* 1994; 24:457–64.
- Avila PC, Abisheganaden JA, Wong H et al. Effects of allergic inflammation of the nasal mucosa on the severity of rhinovirus 16 cold. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:923–32.
- Folkerts G, Busse WW, Nikamp FP, Sorkness R, Gern JE. Virus-induced airway hyperresponsiveness and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1708–720.

- 14 Van Schaik SM, Welliver RC, Kimpen JK. Novel pathways in the pathogenesis of respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Pulmonol* 2000; 30:131–8.
- 15 Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980–1999. *JAMA* 1999; 282:1440–6.
- 16 Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1501–7.
- 17 Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B, Bjorksten B. Asthma and immunoglobulin E antibodies after respiratory syncytial virus bronchiolitis: a prospective cohort study with matched controls. *Pediatrics* 1995; 95:500–5.
- 18 Hall CB, Hall WJ, Gala CL, McGill FB, Leddy JP. Long-term prospective study in children after respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr* 1984; 105:358–64.
- 19 Eisen AH, Bacal HL. The relationship of acute bronchiolitis to bronchial asthma—a 4 to 14-year follow up. *Pediatrics* 1963; 31: 859–61.
- 20 Sims DG, Downham MAPS, Gardner PS, Webb JKG, Weighman D. Study of 8-year-old children with a history of respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy. *BMJ* 1978; 1:11–4.
- 21 Welliver RC, Duffy L. The relationship of RSV-specific immunoglobulin E antibody responses in infancy, recurrent wheezing, and pulmonary function at age 7–8 years. *Pediatr Pulmonol* 1993; 15:19–27.
- 22 Pullan CR, Hey EM. Wheezing, asthma, and pulmonary dysfunction 10 years after infection with respiratory syncytial virus in infancy. *Br Med J* 1982; 284:1665–9.
- 23 Ueba O. Respiratory syncytial virus I concentration and purification of the infectious virus. *Acta Med Okayama* 1978; 32:265–72.
- 24 Morimoto H, Murai M, Maeda Y et al. FK224, a novel cyclopeptide substance P antagonist with NK1 and NK2 receptor selectivity. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 262:398–402.
- 25 Mota I, Wong D. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antiserum during the course of immunization. *Life Sci* 1969; 8:813–20.
- 26 Matsuoka T, Okamoto Y, Matsuzaki Z et al. Characteristics of immunity induced by viral antigen or conferred by antibody via different administration routes. *Clin Exp Immunol* 2002; 130: 386–92.
- 27 Sato M, Iwakabe K, Ohta A, Sekimoto M, Kimura S, Nishimura T. Self-priming cell culture system for monitoring genetically controlled spontaneous cytokine-producing ability in mice. *Immunol Lett* 1999; 70:173–8.
- 28 Shankar AH, Titus RG. T cell and non-T cell compartments can independently determine resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med* 1995; 181:845–55.
- 29 Fryer AD, Jacoby DB. Parainfluenza virus infection damages inhibitory M₂ muscarinic receptors on pulmonary parasympathetic nerves in the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 1991; 102:267–71.
- 30 Jacoby DB, Fryer AD. Interaction of viral infections with muscarinic receptors. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 59–64.
- 31 Adamko DJ, Yost BL, Gleich GJ, Fryer AD, Jacoby DB. Ovalbumin sensitization changes the inflammatory responses to subsequent parainfluenza infection: eosinophils mediate airway hyperresponsiveness, M₂ muscarinic receptor dysfunction, and antiviral effects. *J Exp Med* 1999; 190:1465–77.
- 32 Domachowske JB, Dyer KD, Adams AG, Leto TL, Rosenberg HF. Eosinophil cationic protein 1 RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity. *Nucleic Acids Res* 1998; 26:5327–32.
- 33 Kay AB. Modulation of eosinophil function in vitro. *Clin Exp Allergy* 1990; 20:31–4.
- 34 Terada N, Konno A, Tada H, Shirotori K, Ishikawa K, Togawa K. The effect of recombinant human interleukin-5 on eosinophil accumulation and degranulation in human nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90:160–8.
- 35 Young HA, Hardy KJ. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J Leukocyte Biol* 1995; 58:373–81.
- 36 Piedimonte G, Rodriguez MM, King KA, McLean S, Jiang X. Respiratory syncytial virus upregulates expression of the substance P receptor in rat lung. *Am J Physiol* 1999; 277:L831–40.
- 37 King KA, Hu C, Rodriguez MM, Jiang X, Piedimonte G. Exaggerated neurogenic inflammation and substance P receptor upregulation in RSV-infected weanling rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24:101–7.
- 38 Tripp RA, Barskey A, Goss L, Anderson LJ. Substance P receptor expression on lymphocytes is associated with the immune response to respiratory syncytial virus infection. *J Neuroimmunol* 2002; 129:141–53.
- 39 Konno A, Numata T, Terada N, Hanazawa T, Nagata H, Motosugi H. Role of substance P in the vascular response of nasal mucosa in nasal allergy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996; 105:648–53.
- 40 Gungor A, Baroody FM, Naclerio RM, White SR, Corey JP. Decreased neuropeptide release may play a role in the pathogenesis of nasal polyps. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 121: 585–90.
- 41 Okamoto Y, Shirotori K, Kudo K et al. Cytokine expression after the topical administration of substance P to human nasal mucosa. *J Immunol* 1993; 151:4391–8.
- 42 Yamamoto S, Kobayashi I, Tsuji K et al. Upregulation of IL-4R by IFN- γ : enhanced IL-4 induced eotaxin-3 production in airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004.
- 43 Azuma MA, Szczepanik M, Tsuji RF et al. Early delayed-type hypersensitivity eosinophil infiltrates depend on T helper 2 cytokines and interferon- γ via CXCR3 chemokines. *Immunology* 2004; 111:306–17.
- 44 Li H, Chunsong H, Guobin C et al. Highly up-regulated CXCR2 expression on eosinophils in mice infected with *Schistosoma japonicum*. *Immunology* 2004; 111:107–17.