

## アレルギー性気道炎症における性ホルモンおよびリンパ球の役割

小松 聡子, 斉藤 淳郎, 堀田 夏美, 山ノ内美夏, 大和田恵子, 奥山 香織\*,  
高柳 元明, 大野 勲

### The roles of lymphocytes and sex hormones in the pathogenesis of allergic airway inflammation

Satoko KOMATSU, Atsuro SAITO, Natsumi HOTTA, Mika YAMANOUCHI, Keiko OHWADA,  
Kaori OKUYAMA\*, Motoaki TAKAYANAGI, and Isao OHNO

(Received November 22, 2005)

Epidemiological data indicate that the prevalence and severity of asthma is higher among females than males after puberty. The influence of sex on asthma incidence suggests that sex hormones could play a role in the pathogenesis of the condition associated with asthma. However, the mechanisms of the affect of sex are not clear. Therefore, in the current study, we investigated the sex differences in allergic inflammation in terms of lymphocyte function, using a murine model of allergic asthma. In either BALB/c or C57BL/6J mice, the airway inflammation in female mice sensitized with OVA followed by OVA inhalation was more severe than that in male mice. The contents of Th2 cytokines, such as IL-4, IL-5 and IL-13, in bronchoalveolar lavage fluid from female mice were significantly increased compared with male mice. The airway inflammation in female mice after adoptive transfer of splenocyte from sensitized female mice was more severe than that in any other combination of donors and recipients. Furthermore, splenocytes from sensitized female mice produced more Th2 cytokines than those from sensitized male mice, upon stimulation with OVA. The degree of airway inflammation induced by lipopolysaccharide inhalation was not significantly different between male and female mice. Our findings suggest that sex differences in allergic airway inflammation are due to those in not only sex hormones but also lymphocytes function.

Key words — asthma, sex differences, airway inflammation, lymphocytes

## 緒 言

気管支喘息は急性の気管支収縮, 気道壁の腫脹, 慢性的な粘液栓形成, 気道壁のリモデリングからなる4種の形態による気流制限を特徴とする。これらは全て慢性炎症をその原因としているため, 喘息とは慢性炎症性疾患であると定義付けることが出来る。気道炎症には好酸球, 2型ヘルパーT細胞, 肥満細胞など多くの炎症細胞

の浸潤が関与し, 気道粘膜上皮の損傷や気道過敏性の亢進が見られる<sup>1)</sup>。ヘルパーT細胞には, 1型(Th1)と2型(Th2)があり, Th1細胞はインターロイキン(IL)-2, インターフェロン(IFN)- $\gamma$ などを産生し, これらのTh1サイトカインは細胞性免疫反応に関与する<sup>2, 3)</sup>。Th2細胞はIL-4, IL-5, IL-10, IL-13などを産生し, 体液性免疫反応に関与する。アレルギー性炎症は, Th1とTh2のバランスが崩れ, Th2が優位にな

ることにより引き起こされると考えられている。すなわち, Th2 サイトカインにより IgE 産生の増多, 活性化といった喘息特有な炎症像が形成される。

疫学的には, 気管支喘息の有病率は思春期前では男性が高く, 思春期後では女性が高い<sup>4, 5)</sup>。入院率は0歳から10歳で男性は女性の約2倍であるが, 10代でその比は逆転し, 20歳以上では女性が男性の約3倍である<sup>6, 7)</sup>。重症度の目安としての入院日数の長さは20歳以上で女性の方が男性よりも上回っている。また, 女性における喘息増悪の程度は性ホルモンの変化に影響される。女性喘息患者の3分の1が, 月経前に喘息症状が悪化する。さらに, 妊娠中に喘息症状が悪化したり, 更年期の発症時期と喘息の発症時期は一致するという報告がある<sup>6)</sup>。ホルモン補充療法では少量のエストロゲンはヒトにおける喘息症状を改善するが, 過剰のエストロゲンは症状を悪化させるという報告もある<sup>6)</sup>。

このような事実から喘息における性差の原因のひとつとして性ホルモンの影響が示唆されているが, その詳細なメカニズムは不明である。ヘルパーT細胞にはアンドロゲン受容体とエストロゲン受容体, プロゲステロン受容体が存在する事が確認されている<sup>8-10)</sup>。さらに, 性ホルモンによるサイトカイン産生の調節が報告されている。例えばエストロゲンはコンカナヴァリンA (Con-A) 刺激したマウス胸腺細胞, 脾臓リンパ球, 脾臓T細胞におけるIL-2, IFN- $\gamma$ 産生を増大させ, IL-4産生には影響しない<sup>11)</sup>。エストラジオールはCon-A刺激したマウス脾臓リンパ球培養上清中のIFN- $\gamma$ 量を増加させることが示されている<sup>12)</sup>。ヒト絨毛性ゴナドトロピンはフィトヘムアグルチニン刺激を与えたヒト末梢血中のリンパ球及び単球培養上清中のIL-2産生を減少させ<sup>13)</sup>。テストステロンはCD3抗体とCD28抗体で刺激したマウス脾臓細胞におけるIL-10産生を増加させることが報告されている<sup>8)</sup>。また, 卵白アルブミン (OVA) 刺激による喘息モデルマウス実験では雄性マウスへのプロゲステロン投与は気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid (BALF)) 中のIL-5産生と骨髄における好

酸球産生を促進させ, さらに好酸球を活性化させるが, 血清中のIL-4や抗原特異的IgE量には影響を与えない<sup>14)</sup>。OVAで感作した去勢マウスではOVAで刺激した脾臓細胞におけるIL-4 mRNA発現と, OVA吸入後の末梢血好酸球数が非去勢マウスよりも多いことが報告されている<sup>15)</sup>。

一方, *in vitro*でヒトのリンパ球にフィトヘムアグルチニン刺激を与えた場合, 男性由来リンパ球は女性由来リンパ球に比べ培養上清中のIFN- $\gamma$ とIL-2の値は高く, IL-4とIL-10の値は低いという報告がある<sup>16)</sup>。

以上のことから, 喘息における性差の原因として, 性ホルモンという生体内環境とリンパ球機能における違いが考えられる。そこで我々は, 性差の原因を明らかにするために喘息マウスモデルの脾臓細胞移入実験を行い比較検討した。

## 実験材料及び方法

### 抗原感作, 抗原吸入と検体採取・処理

実験は, Kumagaiら<sup>17)</sup>の報告に従って行った。6~8週令のBALB/c系マウス及びC57BL/6J系マウス (日本SLC, 静岡, 日本) を使用した。動物は実験に使用するまで明暗サイクル12時間 (明期9:00~21:00, 暗期21:00~9:00), 室温22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ Cの一定環境下で1週間以上飼育して使用した。なお, 動物には滅菌済みのマウス用固形飼料 (日本クレア, 東京, 日本) 及び滅菌済みの水道水を自由に摂取させた。実験は東北薬科大学動物実験指針に従って行った。抗原として, OVA (SIGMA, St. Louis, MO, USA) を用い, OVA/Alum (OVA 16mg/mL in saline/Al(OH)<sub>3</sub> (和光純薬, 大阪, 日本) 8mg/mL in saline) 500mLの腹腔内投与にて感作した。投与は5日間隔で2回行った。2回目のOVA/Alum投与から12日後, マウスはプラスチックボックス内でOVA (5mg/mL) あるいはsalineを1時間吸入させ4時間後さらに1時間の吸入を行った。OVAの噴霧は, Bennet nebulizer (Sunrise Medical HHG Inc., Somerset, PA, USA) を用い, 流速10 L/minで行った。抗原吸入前, 吸入後1, 3, 5, 7, 14日後に血液とBALF及び肺を採取した (Fig.1)。

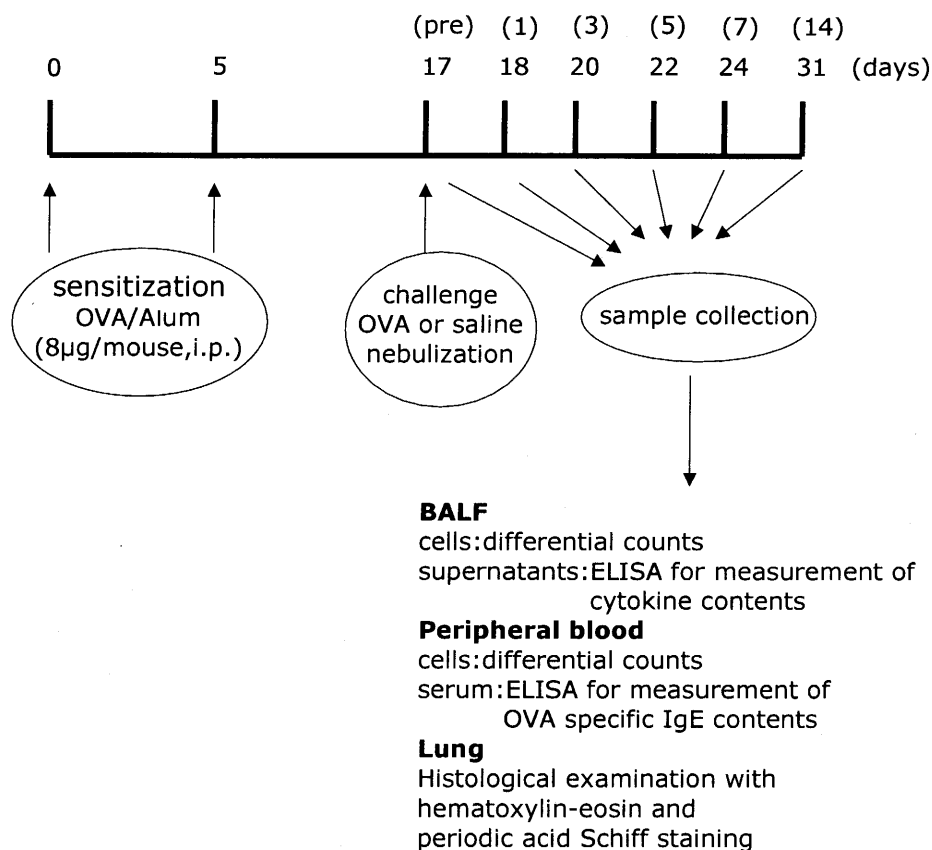


Fig. 1. Diagrammatic representation of the protocols for sensitization and challenge for experiments.

Diethylether (和光純薬) 麻酔下でマウスの眼窩よりヘパリン処理したキャピラリーで採血し血液スミアを作成し, Diff-Quik (D-Q) 染色液 (国際試薬, 神戸, 日本) で染色後, 細胞分画を算定した (倍率1000倍で総細胞数200個以上観察). また, 血液20µLに赤血球溶解緩衝液 (3%氷酢酸, 3% D-Q II液) 400µLを加え, 30秒搅拌後, 総白血球数を算定した.

パスツールピペットを用いて採血後マウスの胸部を開き, 気管にカニューレを挿入, 固定後気管及び肺を摘出した. カニューレよりphosphate-buffered saline (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 8.1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.47 mM 含, pH 7.4) (和光純薬) 0.25mLを注入し2回洗浄した. 回収したBALFは200 × g, 4°Cで3分間遠心後, 上清の量を測定し, チューブに移し-80°Cで保存した. BALFはenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によるサイトカ

イン測定に用いた. 左肺は10%ホルマリン液にて固定後, パラフィン包埋しヘマトキシリン-エオシン (H-E) 染色及び過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色に用いた. 血液は室温にて1時間放置後, 2500 × g, 4°Cで20分間遠心し, 上清を採取しOVA特異的IgE量の測定まで-80°Cで保存した.

上清回収後の細胞残渣は, 0.1% fetal bovine serum (FBS) (ICN, Costa Mesa, CA, USA) 含PBS 0.2mLで再浮遊し, 0.04mLを0.1% trypan blue 0.04mLに加え, 総白血球数を算定した. 残りの0.16mLは, 300rpm, 2分間サイトスピン (Thermo Shandon, Runcorn, UK) にかけて, 乾燥後D-Q染色液で染色し, 細胞分画を算定した (倍率1000倍で総細胞数200個以上観察).

#### 気管支周囲の好酸球数の測定

パラフィン包埋した肺から4mmの厚さの切片を切り出し, 脱パラフィン操作後にエオシン液

(和光純薬) 及びヘマトキシリン液 (和光純薬) で染色し, 脱水, 透徹, 封入操作後観察した. 気管支壁周囲の面積  $0.002925\text{mm}^2$  中に存在する好酸球数を, 倍率 1000 倍で 1 つの気管支あたり 5 箇所測定した. 1 つの肺あたり 5 つの気管支を測定し, その平均を  $\text{cells}/\text{mm}^2$  に換算してマウス 1 匹あたりのデータとした. また, 顕微鏡下 1000 倍の倍率で気道好酸球の写真撮影を行い, 観察した.

### 気道粘液の観察

パラフィン包埋した肺から 4mm の厚さで切片を切り出し, 脱パラフィン操作後, 0.5% 過ヨウ素酸水溶液で酸化し, Cold Schiff 液 (和光純薬) で染色した. 次にヘマトキシリン液にて核染色し, 脱水後, 透徹, 封入操作を行い観察した. 顕微鏡下 400 倍の倍率で気道粘液の写真撮影を行い, 観察した.

### サイトカインの測定

BALF 中の IL-4, IL-5, IL-13, TGF- $\beta_1$  及び脾臓細胞培養上清中の IL-4, IL-5 は, それぞれ ELISA kit (AN 'ALYZA (TECHNE Corporation, Minneapolis, MN, USA)) を用いて, 付属プロトコールに従い測定した. なお, それぞれの測定範囲は IL-4 が  $2\text{-}500\text{pg}/\text{mL}$ , IL-5 が  $7\text{-}1000\text{pg}/\text{mL}$ , IL-13 が  $1.5\text{-}1000\text{pg}/\text{mL}$ , TGF- $\beta_1$  が  $2.9\text{-}500\text{pg}/\text{mL}$  である.

### 脾臓細胞の分離及び培養

脾臓の分離は Wise ら<sup>18)</sup> の方法によって行った. C57BL/6J 系雄性雌性マウスを感作 12 日後, マウスを脱血死させ脾臓細胞を分離した. 洗浄した脾臓細胞を RPMI 1640 (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) (不活性化した 10% FBS,  $55\ \mu\text{M}$  2-mercaptoethanol (和光純薬), 50 U/mL penicillin G (明治製菓 (株), 東京, 日本),  $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin sulfate (明治製菓) 及び  $2\ \mu\text{M}$  L-glutamine (和光純薬) を含む) を用いて  $5 \times 10^6\text{cells}/\text{mL}$  に懸濁した. これに  $200\ \mu\text{g}/\text{mL}$  となるように OVA を添加し, 24 穴プレートに 1 well 当たり 2 mL 播種し, 5%  $\text{CO}_2$  存在下  $37^\circ\text{C}$  で

培養した. その 5 日後に培養上清を採取し, IL-4 及び IL-5 の測定に用いた. また培養 3 日後の細胞を移入実験に使用した (Fig. 2).

### 脾臓細胞の移入

上記のごとく 3 日間培養した脾臓細胞を採取し, 滅菌済生理食塩水で洗浄後  $2 \times 10^7\text{cells}/\text{mL}$  で懸濁させた. この懸濁液  $500\ \mu\text{L}$  ( $1 \times 10^7\text{cells}$ ) を C57BL/6J マウスに腹腔投与した. その 3 日後, 上記のごとく OVA を吸入させ, 5 日後に BALF を採取した. 採取した BALF は, 前述のごとく処理した (Fig. 2).

### OVA 特異的 IgE 測定

96 穴プレート (Nalge Nunc International, Neerijse, Belgium) に bicarbonate buffer (0.05M, pH 9.7) で希釈した OVA  $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$  を  $100\ \mu\text{L}/\text{well}$  ずつ注入し  $4^\circ\text{C}$  で一晩インキュベートした. その後 0.5% Tween 20 (ICN) /PBS で 5 回洗浄し, 1% bovine serum albumin (SIGMA) /PBS  $200\ \mu\text{L}$  でブロッキングした. 室温で 1.5 時間放置後, 0.5% Tween20/PBS で 3 回洗浄し, 5 倍に希釈した血清あるいは標準血清を  $100\ \mu\text{L}/\text{well}$  添加した.  $37^\circ\text{C}$  で 2 時間インキュベートし, 0.5% Tween 20/PBS で 5 回洗浄後, 10,000 倍希釈した horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgE antibody (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) を  $100\ \mu\text{L}/\text{well}$  加え, 室温で 1.5 時間放置した. 5 回洗浄後 tetramethylbenzidine (BioFX Laboratories, Owing Mills, MD, USA) を  $100\ \mu\text{L}/\text{well}$  添加 30 分後 1 N HCl  $100\ \mu\text{L}/\text{well}$  で反応を停止させ, 450nm の吸光度を測定した. OVA で感作した BALB/c 系雌性マウスプール血清を標準血清として, 標準血清中に含まれる OVA 特異的 IgE 量を 1000U とし検量線を作成した. この検量線を用いて検体中の OVA 特異的 IgE 量を決定した.

### Lipopolysaccharide (LPS) 吸入

8 週齢の C57BL/6J 系雄性雌性マウスに LPS (O127:B8, SIGMA)  $3\text{mg}/\text{mL}$  をプラスチックボックス内で 10 分間吸入させた. 24 時間後に BALF

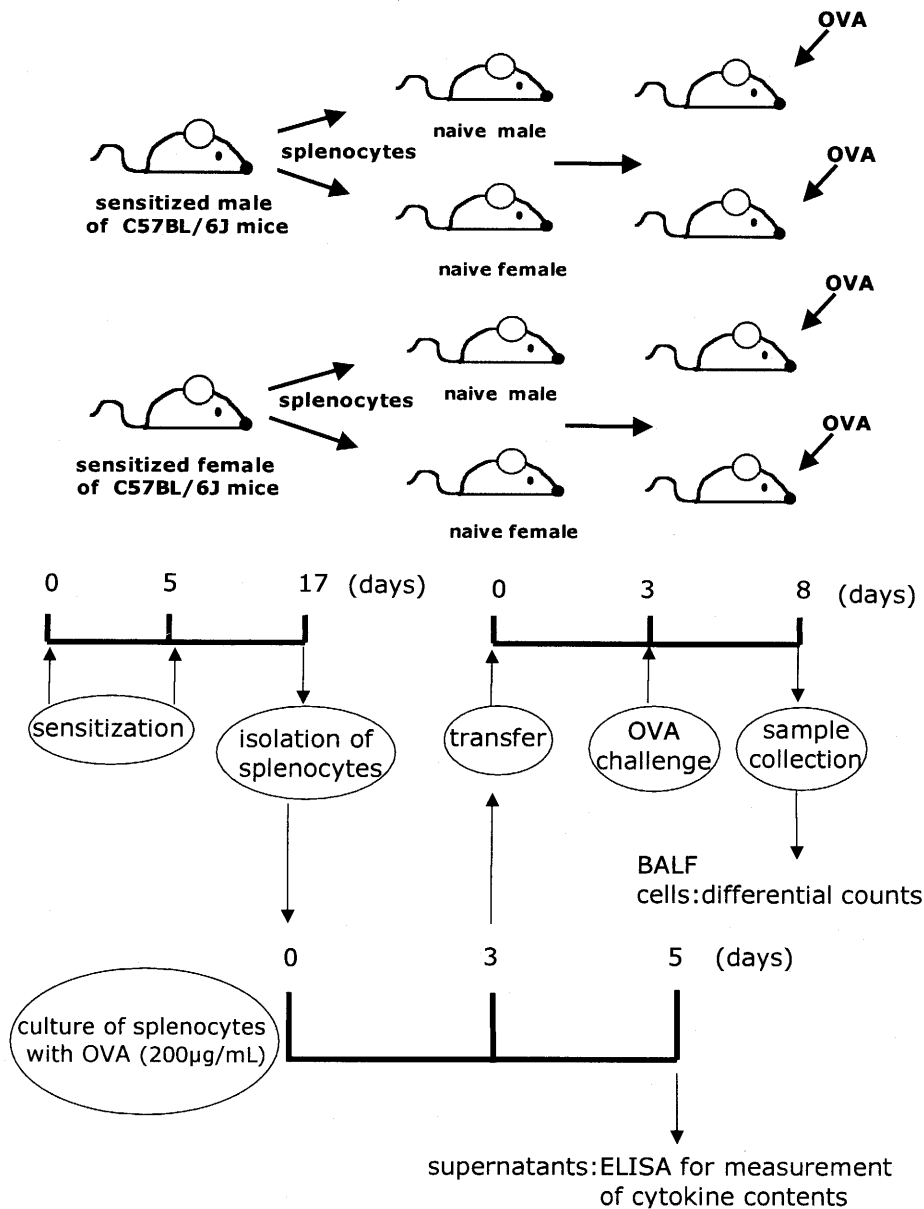


Fig. 2. Diagrammatic representation of the protocols for sensitization, and adoptive transfer and culture of splenocytes.

を採取し、前述のごとく処理して各白血球数を算定した。

### 統計処理

棄却検定はスミルノフの棄却検定を用いた。データはmean ± S.D.で表した。Mann-WhitneyのU検定で統計処理し、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。多群間の有意差は一元配置分散分析法のDunnnett法により統計処理し、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

### 結 果

#### OVA誘発性気道炎症反応における性差に対するマウスの系統の影響

BALB/c系雄性マウスでは、総細胞数、好酸球数、好中球数、リンパ球数は抗原吸入前と比較して抗原吸入後5及び7日目に有意に増加した(Fig.3-a)。BALB/c系雌性マウスでは、総細胞数、好酸球数、リンパ球数は抗原吸入後5及び7日目に、また好中球数は抗原吸入後7日目に有意

に増加した (Fig.3-b). 各分画ごとに雌雄間を比較すると, 好酸球数は抗原吸入後3, 5及び7日目に雄と比較して雌が有意に高値を示した (Fig.4-c).

C57BL/6J系雄性マウスでは, 総細胞数, 好酸球数, リンパ球数は抗原吸入前と比較して抗原吸入後5及び7日目に, また好中球数は抗原吸入後5日目に有意に増加した (Fig.5-a). C57BL/6J系雌性マウスでは, 総細胞数, 好酸球数, リンパ球数は抗原吸入後5及び7日目に有意に増加した (Fig.5-b). 各分画ごとに雌雄間を比較すると, 総細胞数は抗原吸入後5及び7日目 (Fig.6-a), 好酸球数は抗原吸入後1, 3, 5及び7日目に (Fig.6-c), またリンパ球数は抗原吸入後3, 5及び7日目に雌が有意に高値を示した (Fig.6-d).

#### C57BL/6J系マウスにおけるOVA誘発性炎症反応の性差

気道壁の好酸球は, 抗原吸入前と比較して抗

原吸入後5日目で最も多く, かつ雌の方が雄よりも好酸球が多い傾向が見られた (Fig.7-a). 好酸球数を定量化し雌雄間で比較すると, 抗原吸入後5及び7日目に雌は有意に高値を示した (Fig.7-b).

気道粘液の量には, 雌雄間において明らかな差は見られなかった (Fig.8).

血清中のOVA特異的IgE量の測定では, 雄に比べて雌で増加傾向を示したが, 有意な差は見られなかった (Fig.9).

末梢血中の白血球数は, 雄では単球数は抗原吸入前と比較して抗原吸入後3日目に有意に増加した (Fig.10-a). 雌では好酸球数は抗原吸入後5及び7日目に有意に増加し, 好中球数は抗原吸入後1, 3, 5, 7及び14日目に有意に増加した (Fig.10-b). 各分画ごとに雌雄間を比較すると, 総細胞数とリンパ球数は抗原吸入後3日目に, 単球数と好酸球数は抗原吸入後1日目に雄が有意に高値を示した (Fig.11).

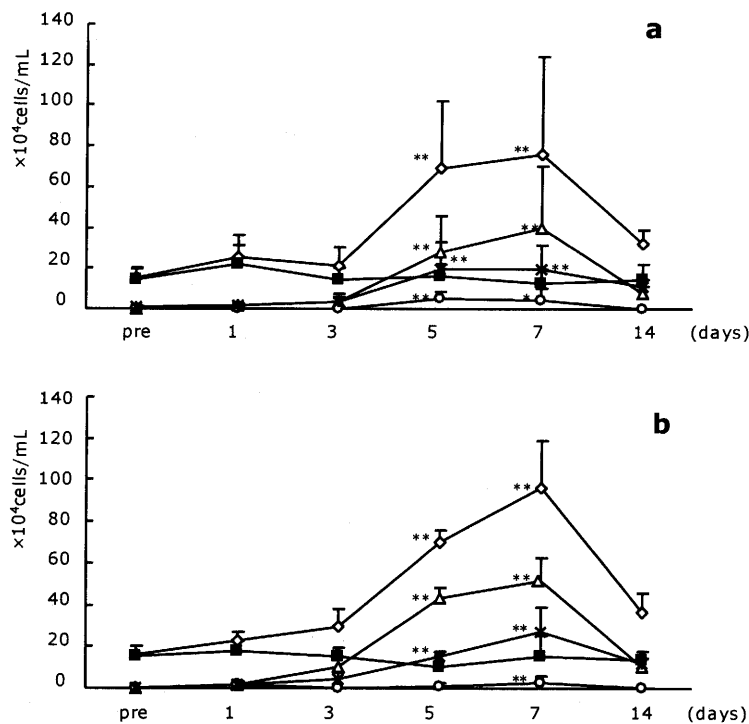


Fig. 3. Time course of cell numbers in BALF of BALB/c mice. Sensitized BALB/c mice were exposed to nebulized OVA. Cell numbers in BALF obtained at time points indicated in male (a) or female (b) were counted as described in materials and methods. ◇;total cells, ■;macrophages, △;eosinophils, ○;neutrophils, ×;lymphocytes. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=6-12). \*p<0.05, \*\*p<0.01: compared with before exposure (pre)

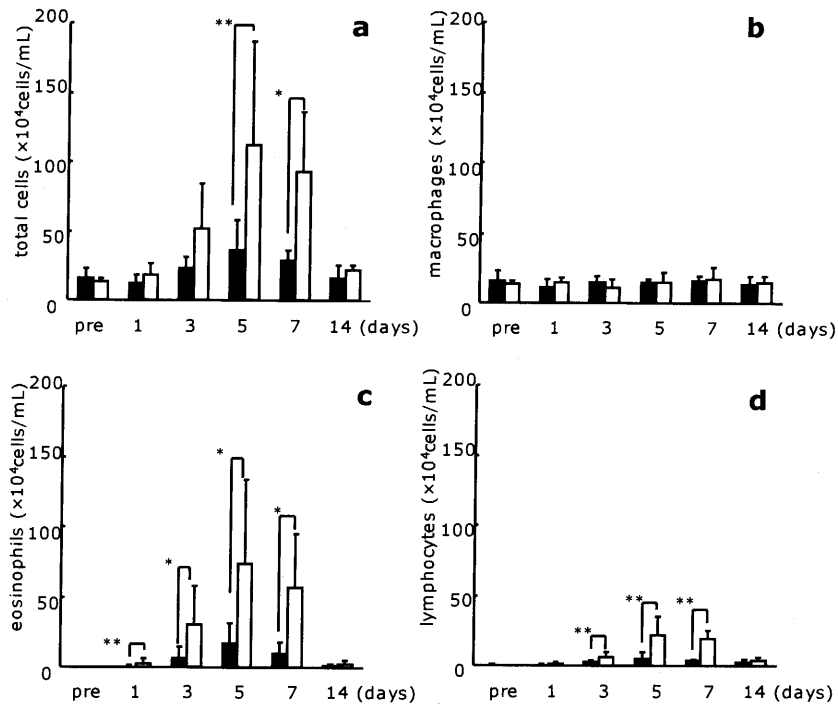


Fig. 4. Sex differences in cell numbers in BALF of BALB/c mice. Sensitized BALB/c mice were exposed to nebulized OVA. The numbers of total cells (a), macrophages (b), eosinophils (c) and lymphocytes (d) in BALF obtained at time points indicated were counted as described in materials and methods. Closed columns represent data of male mice, and opened columns female mice. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=6-12). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

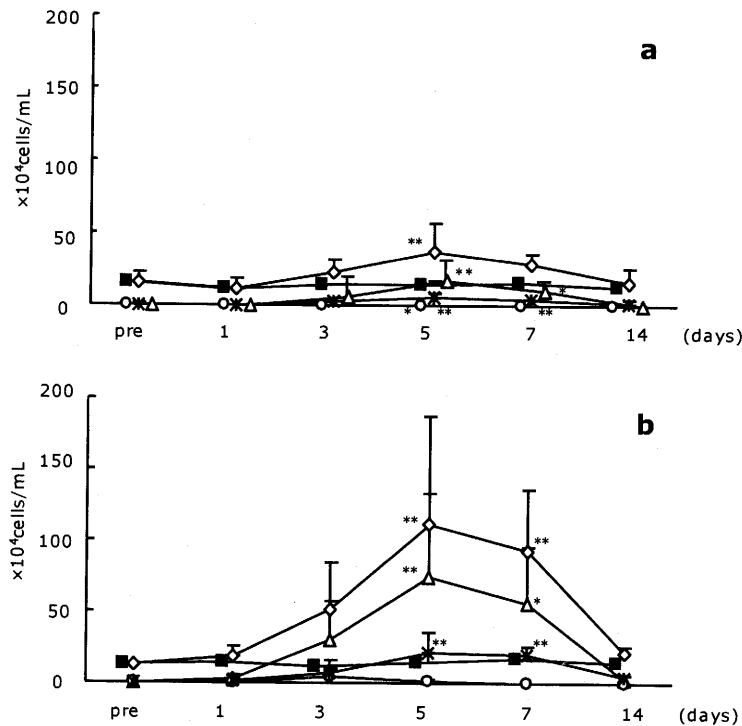


Fig. 5. Time course of cell numbers in BALF of C57BL/6J mice. Sensitized C57BL/6J mice were exposed to nebulized OVA. Cell numbers in BALF obtained at time points indicated in male (a) or female (b) were counted as described in materials and methods.  $\diamond$ ; total cells,  $\blacksquare$ ; macrophages,  $\triangle$ ; eosinophils,  $\circ$ ; neutrophils,  $\times$ ; lymphocytes. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=6-12). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : compared with before exposure (pre)

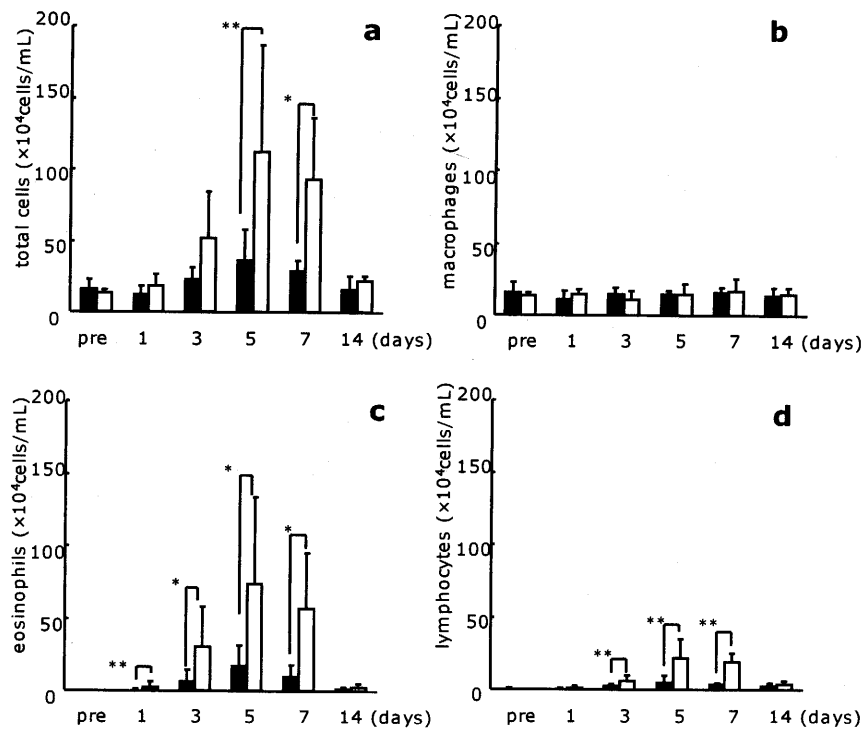


Fig. 6. Sex differences in cell numbers in BALF of C57BL/6J mice. Sensitized C57BL/6J mice were exposed to nebulized OVA. The numbers of total cells (a), macrophages (b), eosinophils (c) and lymphocytes (d) obtained at time points indicated were counted as described in materials and methods. Closed columns represent data of male mice, and opened columns female mice. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=6-12). \*p<0.05 \*\*p<0.01

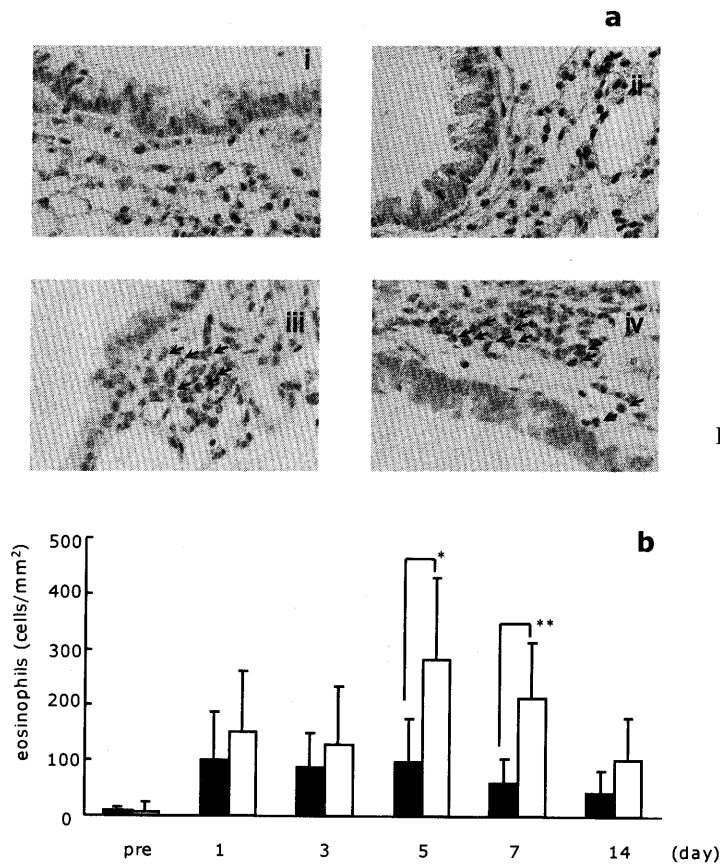


Fig. 7. Sex differences in the number of eosinophils around airways of C57BL/6J mice. (a) Pictures are representatives of lung tissues obtained from sensitized male (i, iii) or female (ii, iv), before (i, ii) and 5 days after (iii, iv) OVA nebulization. x1000. Hematoxylin and eosin staining. (b) The number of eosinophils around airways obtained at time points indicated were counted as described in materials and methods. Closed columns represent data of male mice, and opened columns female mice. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=5-10). \*p<0.05, \*\*p<0.01



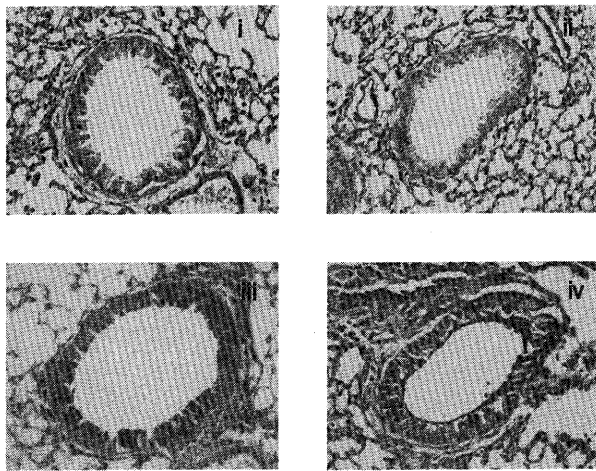


Fig. 8. The staining of airway mucus of C57BL/6J mice. The pictures are representatives of lung tissues from sensitized male (i, iii) or female (ii, iv), before (i, ii) and 5 days after (iii, iv) OVA nebulization.  $\times 400$ . Periodic acid Schiff staining.

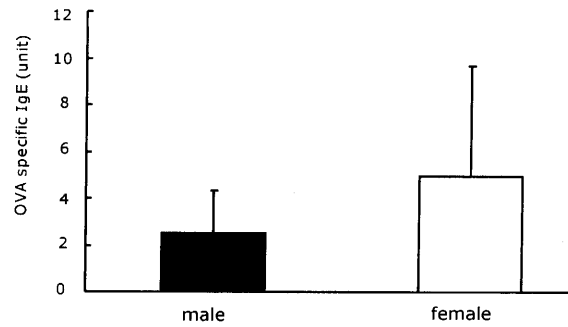


Fig. 9. Sex differences in OVA specific IgE level in serum from sensitized C57BL/6J mice. OVA specific IgE level in serum from sensitized male and female C57BL/6J mice was measured. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=6).

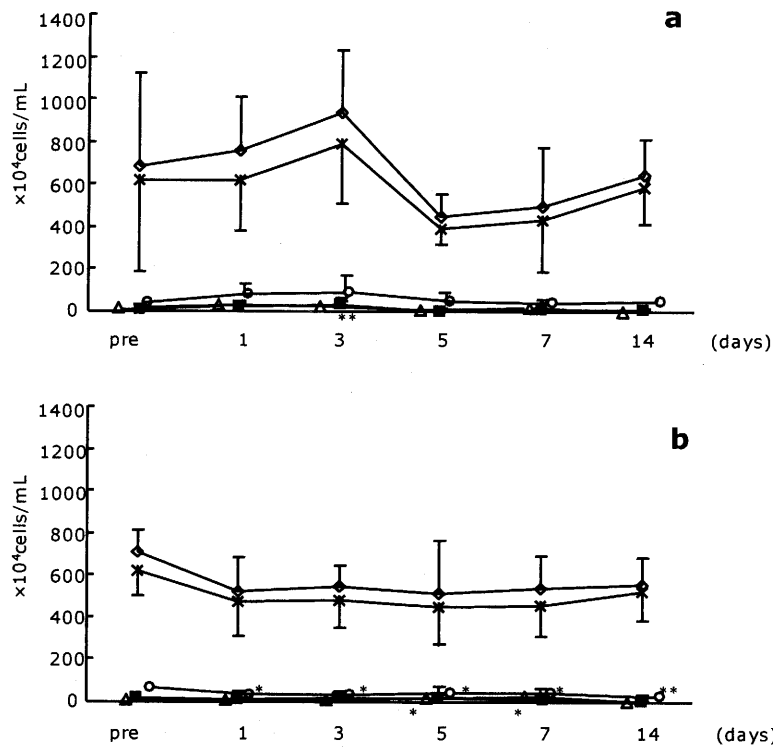


Fig. 10. Time course of white blood cell numbers in peripheral blood of C57BL/6J mice. Sensitized C57BL/6J mice were exposed to nebulized OVA. Cell numbers in peripheral blood obtained at time points indicated in male (a) or female (b) were counted as described in materials and methods.  $\diamond$ ; total cells,  $\blacksquare$ ; monocytes,  $\triangle$ ; eosinophils,  $\circ$ ; neutrophils,  $\times$ ; lymphocytes. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=6-13). \*p<0.05, \*\*p<0.01: compared with before exposure (pre)

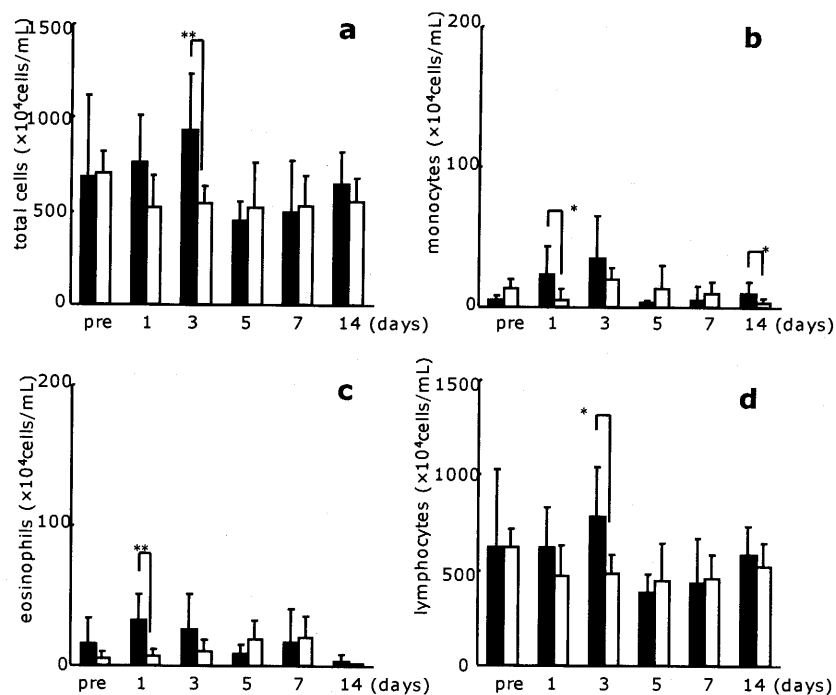


Fig. 11. Sex differences in cell numbers in peripheral blood of C57BL/6J mice. Sensitized C57BL/6J mice were exposed to nebulized OVA. The numbers of total cells (a), monocytes (b), eosinophils (c) and lymphocytes (d) in peripheral blood obtained at time points indicated were counted as described in materials and methods. Closed columns represent data of male mice, and opened columns female mice. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=6-13). \*p<0.05, \*\*p<0.01

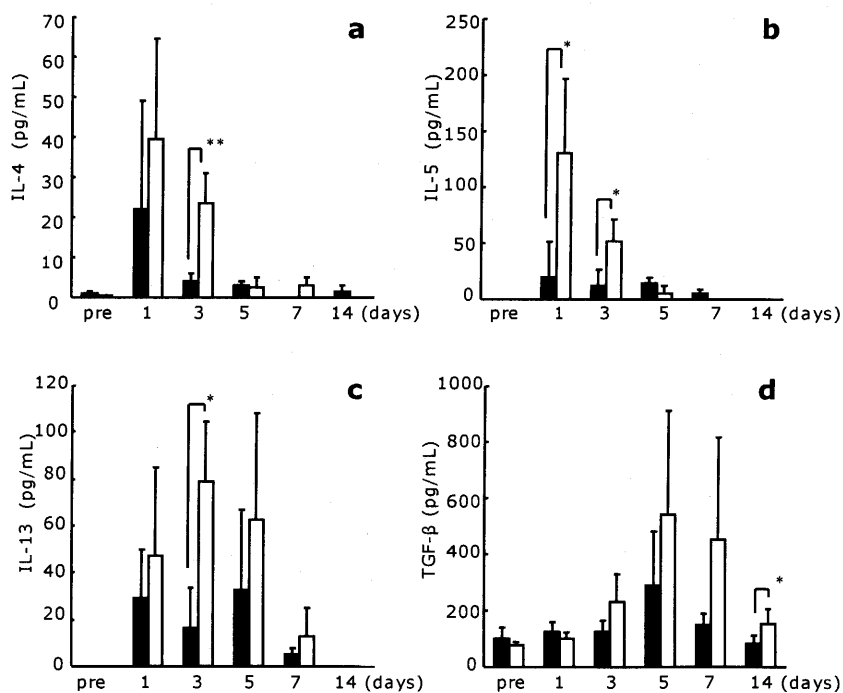


Fig. 12. Sex differences in IL-4, IL-5, IL-13 and TGF- $\beta$ 1 levels in BALF of C57BL/6J mice. Sensitized C57BL/6J mice were exposed to nebulized OVA. The levels of IL-4 (a), IL-5 (b), IL-13 (c) and TGF- $\beta$ 1 (d) in BALF obtained at time points indicated were measured as described in materials and methods. Closed columns represent data of male mice, and opened columns female mice. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=3-8). \*p<0.05, \*\*p<0.01

## BALF中サイトカイン量の性差

BALF中のサイトカイン量を雌雄間で比較すると、IL-4は抗原吸入後3日目に、IL-5は1及び3日目に、IL-13は3日目に、TGF- $\beta_1$ は14日目に雌が有意に高値を示した (Fig.12).

## 脾臓細胞培養上清中のサイトカイン量の性差

脾臓細胞培養5日後の上清中のサイトカイン量を雌雄間で比較すると、IL-4では有意な差は見られなかった。IL-5は雌が有意に高値を示した (Table 1)

## 脾臓細胞移入後のC57BL/6J系マウスにおけるBALF中炎症細胞

感作した雄の脾臓を移入した雄 (male-m.s) と雌 (female-m.s) を比較すると、マクロファ-

ージ数では female-m.sの方が有意に高値を示した。一方、好酸球数では有意な差は見られなかった。感作した雌の脾臓を移入した雄 (male-f.s) と雌 (female-f.s) を比較すると、総細胞数と好酸球数で female-f.sの方が有意に高値を示した (Fig.13).

male-m.sとmale-f.sを比較すると、全ての分画で有意な差は見られなかった。female-m.sとfemale-f.sを比較すると、総細胞数と好酸球数、リンパ球数はfemale-f.sの方が有意に高値を示した (Fig.13).

## LPS吸入時のBALF中炎症細胞

雄ではLPS吸入後 (LPS-male) の総細胞数、好中球数はLPS吸入前 (pre-male) より有意に増加した (Fig.14)。雌ではLPS吸入後 (LPS-female) の総細胞数、好中球数、リンパ球数はLPS吸入

Table 1. Sex differences in IL-4 and IL-5 production by splenocytes of C57BL/6J mice.

	male	female
IL-4 (pg/mL)	62.2 $\pm$ 60.22	60 $\pm$ 35.36
IL-5 (pg/mL)	2617.8 $\pm$ 1538.0	9963 $\pm$ 2573.37*

mean  $\pm$  S.D. (n=5-9) \*p<0.05

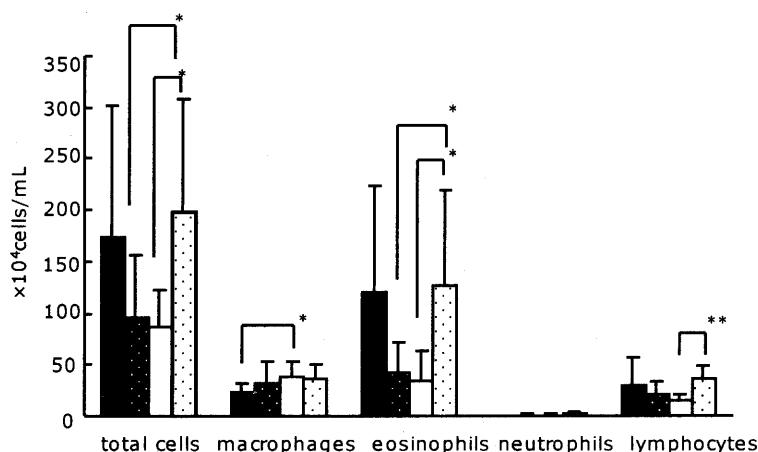


Fig. 13. Cell numbers in BALF of C57BL/6J mice after adoptive transfer. Splenocytes from sensitized mice were cultured in the presence of OVA and transferred to naive recipient mice. The recipients were challenged with OVA and cell numbers were counted as described in materials and methods. Male transferred with splenocytes from sensitized male (closed columns), male transferred with splenocytes from sensitized female (black with white spots columns), female transferred with splenocytes from sensitized male (opened columns) and female transferred with splenocytes from sensitized female (white with black spots columns). Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=7-9). \*p<0.05, \*\*p<0.01

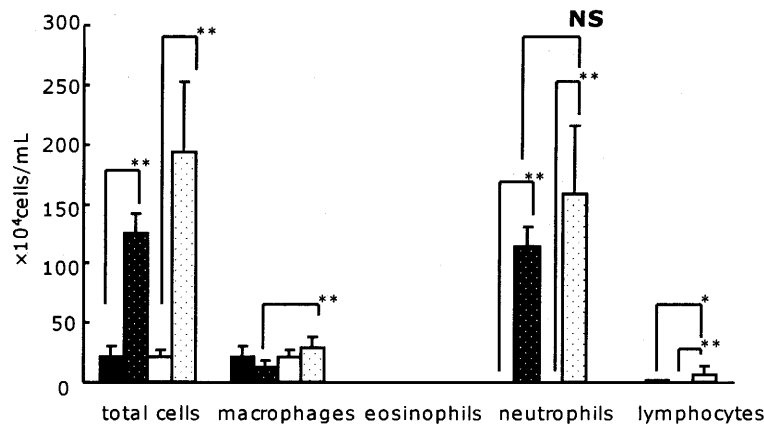


Fig. 14. Sex differences in cell numbers in BALF of C57BL/6J mice after LPS nebulization. C57BL/6J mice were exposed to nebulized LPS. Cell numbers in BALF obtained from male or female before and 24 hours after nebulization were counted. Pre nebulized male (closed columns), pre nebulized female (opened columns), LPS nebulized male (black with white spots columns) and LPS nebulized female (white with black spots columns). Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=5-7). \*p<0.05, \*\*p<0.01

前 (pre-female) より有意に増加した (Fig.14). LPS-maleとLPS-femaleの比較ではマクロファージ数, リンパ球数においてLPS-femaleの方が有意に高値を示したが, 好中球数では有意な差は見られなかった (Fig.14).

## 考 察

アレルギー性気道炎症にはその炎症の程度に性差があることが報告されている. 今回我々は, 雌におけるより強いアレルギー性気道炎症は雌リンパ球と女性ホルモンの組み合わせから成立する事を明らかにした.

性ホルモンという生体内環境の関与は雌の脾臓を入れた雄と雌のマウスの比較で有意差が存在することから示唆される. しかし雄の脾臓を入れた雄と雌の比較で有意差が無い事から, 炎症の原因は性ホルモンだけでは説明できない. またリンパ球の関与は雄と雌の脾臓を入れた雌のマウスの比較で有意差があることから示唆される. しかし雄と雌の脾臓を入れた雄のマウスの比較で有意差がなかったことから, リンパ球のみの関与でもないことが示唆される. 以上の事から, アレルギー性気道炎症においては女性ホルモンと雌のリンパ球双方の組み合わせが重要である事が示唆される.

このことから雌のリンパ球における女性ホルモン受容体の重要性, すなわち雌雄のリンパ球における性ホルモン受容体の発現に差があることが示唆される. しかしヘルパーT細胞に女性ホルモン受容体が存在すること<sup>9, 10</sup>, またin vitroで, ヒトリンパ球より産生されるTh2サイトカインは男性由来よりも女性由来リンパ球の方が高いことが報告されている<sup>16</sup>. しかしながら, リンパ球における性ホルモン受容体発現の性差に関する報告はなく, また性ホルモンの作用点や, リンパ球の機能調節因子の雌雄差を明らかにした報告もない. 今回の脾臓細胞培養上清中のサイトカイン測定結果では, 雌のリンパ球は雄のリンパ球と比較してIL-5産生が有意に高値を示していた. 少なくとも, サイトカイン発現においてはリンパ球機能に性差が存在するのかもしれない.

今回, サイトカイン発現の比較や脾臓細胞移入実験ではTh2系優位のBALB/c系マウスではなく, C57BL/6J系マウスを用いている. OVA誘発性炎症反応をBALF中の炎症細胞数で比較した結果より, BALB/c系マウスでは雄でも炎症反応が強く雌雄差が小さいため, 雌雄差が大きいC57BL/6J系マウスを用いて比較した. C57BL/6J系マウスにおけるOVA誘発性炎症反応の性差については, 末梢血中のOVA特異的IgE量では明

確な雌雄差はなかったが、BALF中の炎症細胞数やサイトカイン量、気道壁中の好酸球数のいずれにおいても有意に雌雄差が存在し、アレルギー性気道炎症モデルマウスとしてこれを用いる事は妥当であると判断した。

一方で問題点として、移入した脾臓細胞の総数はそろえてあるがその各リンパ球分画は数えていないため、移入後の炎症反応は移入した細胞中のヘルパーT細胞の割合による影響を受けている可能性がある<sup>18)</sup>。また実験結果から、今回は雌の女性ホルモンに悪化原因があるのではないかと解釈したが、逆に男性ホルモンに関してはHayashiらの研究で、去勢したマウスで炎症が悪化するという報告がある<sup>15)</sup>。しかし我々の実験では男性ホルモンの関与の有無を結論する事は出来なかった。

女性ホルモン及びリンパ球機能による炎症増悪のメカニズムとして、Th2サイトカインの発現増強が確認された。骨髄における好酸球の分化・増殖を亢進すると報告されている<sup>19)</sup> IL-5が、BALF中および脾臓細胞培養上清中ともに雄と比較して雌で有意に高値を示していることから、結果として気道への好酸球浸潤が亢進した可能性がある。また、BALF中のIL-4は雄に比較して雌の方が有意に高値を示していることから、IL-4によるvascular cell adhesion molecule-1の発現増強を介して好酸球の接着が亢進している可能性が示唆される。

LPS吸入後のBALF中の炎症細胞の比較では、LPS吸入前後で雌雄ともに総細胞数及び好中球数が有意に増加しているが、雌雄間の比較では総細胞数と好中球数ともに有意差がなかった。LPS吸入による好中球性気道炎症は、keratinocyte cell-derived chemokineやmacrophage inflammatory protein-2などのケモカインが好中球集積に重要<sup>20,21)</sup>であるが、一方アレルギー性気道炎症は、Th2サイトカインを中心とした好酸球性の炎症である。同じ気道炎症でも発症機序や炎症像が異なる二つの炎症で雌雄差を比較することにより、炎症反応における雌雄差がアレルギー性炎症に特異的、すなわちアレルギー性炎症特異的誘導因子の発現制御に雌雄差が関わっているこ

とが示唆された。

喘息ではこの様に性差が認められているが、喘息以外に性差のある炎症性疾患としては多発性硬化症、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患がある。多発性硬化症、慢性関節リウマチでは有病率の男女比が1:2から1:3、全身性エリテマトーデスでは男女比が1:9である。これらの自己免疫疾患有病率の性差においても、性ホルモンが影響しているとの報告があるが、その詳細は不明である<sup>22)</sup>。この様な性差のある疾患を対象としているのが性差医療という考え方である。性差医療とは、発症率や重症度に明らかな男女差が見られる疾病についての研究を進め、その結果を疾病の診断、治療法、予防措置に応用したものである。欧米では生物学的性差を考慮した医療が進んでいる。一方、日本では性差医療は比較的新しい分野であり、まだまだ医療の現場に浸透しているとは言えない<sup>23)</sup>。そのため、生物学的性差Sexと社会的性差Gender双方の観点からの研究の発展が望まれる。

今回の実験から性差医療という考えを喘息に応用すると、女性喘息患者のホルモン周期に合わせた薬物量の調節が考えられる。また男性喘息患者にテストステロンを投与することで、炎症反応をTh1系に傾け炎症を軽減することもできるかもしれない。喘息における生物学的性差を検討した今回の研究は、今後の性差医療の治療分野における発展に寄与するものと思われる。

## 参 考 文 献

- 1) NHLBI/WHO Workshop report. Global strategy for Asthma Management and prevention. 02-3659 (2002).
- 2) Mosmann TR., Sad S., *Immunol. Today*, **17**, 138-146 (1996).
- 3) Carter LL., Dutton RW., *Curr. Opin. Immunol.*, **8**, 336-342 (1996).
- 4) Ninan TK., Russell G., *B. M. J.*, **304**, 873-875 (1992).

- 5) Zannolli R., Morgese G., *Med. Hypotheses*, **48**, 27-32 (1997).
- 6) Balzano G., Fuschillo S., Melillo G., Bonini S., *Allergy*, **56**, 13-20 (2001).
- 7) Chen Y., Dales R., Stewart P., Johansen H., Scott G., Taylor G., *Pediatr. Pulmonol.*, **36**, 22-26 (2003).
- 8) Liva SM., Voskuhl RR., *J. Immunol.*, **167**, 2060-2067 (2001).
- 9) Chiu L., Nishimura M., Ishii Y., Nieda M., Maeshima M., Takedani Y., Shibata Y., Tadokoro K., Juji T., *Am. J. Reprod. Immunol.*, **35**, 552-557 (1996).
- 10) Yellayi S., Zakroczymski MA., Selvaraj V., Valli VE., Ghanta V., Helferich WG., Cooke PS., *J. Endocrinol.*, **176**, 267-274 (2003).
- 11) Karpuzoglu-Sahin E., Zhi-Jun Y., Lengi A., Sriranganathan N., Ahmed SA., *Cytokine*, **14**, 208-217 (2001).
- 12) Karpuzoglu-Sahin E., Hissong BD., Ahmed SA., *J. Reprod. Immunol.*, **52**, 113-127 (2001).
- 13) Orvieto R., Leites T., Abir R., Bar J., Yoeli R., Feldberg D., Fisch B., *Am. J. Reprod. Immunol.*, **50**, 220-223 (2003).
- 14) Hellings PW., Vandekerckhove P., Claeys R., Billen J., Kasran A., Ceuppens JL., *Clin. Exp. Allergy.*, **33**, 1457-1463 (2003).
- 15) Hayashi T., Adachi Y., Hasegawa K., Morimoto M., *Scand. J. Immunol.*, **57**, 562-567 (2003).
- 16) Giron-Gonzalez JA., Moral FJ., Elvira J., Garcia-Gil D., Guerrero F., Gavilan I., Escobar L., *Eur. J. Endocrinol.*, **143**, 31-36 (2000).
- 17) Kumagai K., Ohno I., Okada S., Ohkawara Y., Suzuki K., Shinya T., Nagase H., Iwata K., Shirato K., *J. Immunol.*, **162**, 4212-4219 (1999).
- 18) Wise JT., Baginski TJ., Mobley JL., *J. Immunol.*, **162**, 5592-5600 (1999).
- 19) Imnam MD., Ellis R., Wattie J., Denburg JA., O'Byrne PM., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **21**, 473-479 (1999).
- 20) Bozic CR., Kolakowski LF., Gerard NP., Garcia-Rodriguez C., von Uexkull-Gulgenband C., Conklyn MJ., Breslow R., Showell HJ., Gerard C., *J. Immunol.*, **154**, 6048-6057 (1995).
- 21) Discoll KE., Hassenbein DG., Howard BW., Isfort RJ., Cody D., Tindal MH., Suchanek M., Carter JM., *J. Leukoc. Biol.*, **58**, 359-364 (1995).
- 22) Whitacre CC., Reingold SC., O'Looney PA., *Science*, **283**, 1277-1278 (1999).
- 23) Amano K., *ファルマシア*, **41**, 547-550 (2005).