

新規抗アレルギー薬 KW-4679の実験的
アレルギー性鼻炎に対する効果

協和発酵工業(株)医薬研究所

貝瀬俊彦 真部治彦 大森健守

抗アレルギー薬 KW-4679のモルモット実験的アレルギー性鼻炎に対する効果を検討し、以下の成績を得た。1) 感作モルモットに抗原を鼻腔内投与した後に生ずるくしゃみ反応および鼻搔き行動に対して、KW-4679は用量依存的な抑制作用を示した。有意な抑制作用はそれぞれ0.03mg/kg (p.o.)、および1mg/kg (p.o.) の用量で認められた。2) 感作モルモットに抗原を鼻腔内投与した後に生ずる鼻粘膜血管透過性亢進に対して、KW-4679は用量依存的な抑制作用を示した。有意な抑制作用は1mg/kg (p.o.) の用量より認められた。以上の成績より、KW-4679は実験的アレルギー性鼻炎に対して抑制作用を示すことが明らかとなった。

Key words: guinea pig — KW-4679 — nasal rubbing — nasal vascular permeability — sneeze response

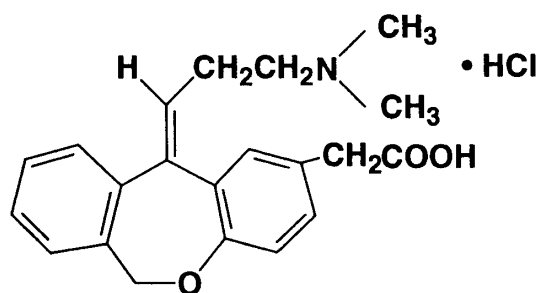
緒 言

KW-4679 (Fig. 1) は協和発酵工業(株)において開発されたジベンゾオキセピン誘導体に属する抗アレルギー薬¹⁾で、通年性アレルギー性鼻炎、気管支喘息、慢性蕁麻疹などのアトピー性疾患の予防および治療に有効であることが報告されている²⁾。本薬物が、IgE 抗体関与のラット受身皮膚アナフィラキシー (passive cutaneous anaphylaxis: PCA) を低用量から抑制すること (ED₅₀: 0.04mg/kg, p.o.)、能動感作モルモット

に抗原を吸入した時に出現する即時型および遅発型喘息反応や気道過敏性反応を抑制すること、抗原誘発時の気管支肺胞洗浄液中への好酸球浸潤を1mg/kg 経口投与により抑制することも報告されている³⁾⁻⁵⁾。

KW-4679は選択的な H₁-拮抗作用を有するとともに、ラット腹腔浸出細胞からのヒスタミン遊離、モルモット好酸球のロイコトリエン C₄ 産生、ヒト好中球の血小板活性化因子産生などを抑制する⁶⁾。摘出モルモット気管標本において、フィールド電気刺激によるペプチド作動性神経関与の収縮反応を KW-4679 (1~100 μM) は前シナプスに作用して抑制することも見いだされている⁷⁾。

アレルギー性鼻炎はくしゃみ、鼻漏、鼻閉、および鼻搔痒感を主症状とするアレルギー疾患である。本研究においては、モルモットのアレルギー性鼻炎モデルを用いて、KW-4679のくしゃみ、鼻漏および鼻搔痒感に対する作用について検討した。くしゃみは無麻酔下でのくしゃみ反応⁸⁾⁻¹⁰⁾を指標として、鼻搔痒感は無麻酔下での鼻搔き行動⁸⁾⁹⁾を指標として、鼻漏は麻酔下での鼻粘膜血管透過性亢進¹¹⁾⁻¹³⁾を指標としてそれぞれ評価した。



C₂₁H₂₃NO₃ • HCl MW : 373.88

Fig. 1. Chemical structure of KW-4679.

Received: April 28, 1995

Accepted: September 4, 1995

Abbreviations: OVA ovalbumin; PCA pas-
sive cutaneous anaphylaxis

実験方法

1. 使用動物

Hartley 系 雄性 モルモット (日本 SLC) を 体重 250~300g で 入荷 し, 室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$ の 環境 下の 動物 室 に て 自動 給水 および 固形 飼料 を 自由 摂取 さ せて 予備 飼育 し た 後 実験 に 供し た。

2. 使用薬物

被験薬物として用いた KW-4679 (協和発酵) は, 注射用蒸留水に溶解し, 5ml/kg 体重の割合で経口投与した。その他, 実験に使用した薬物は, ovalbumin (OVA, SIGMA), carbamic acid ethylester (ウレタン, 東京化成), pontamine sky blue (東京化成), 硫酸アルミニウム (和光純薬) および 1 規定水酸化ナトリウム溶液 (和光純薬) である。

3. くしゃみ, 鼻掻き反応

1) 動物の感作方法

OVA を感作抗原として用いた。水酸化アルミニウムゲルは, 5% の硫酸アルミニウム生理食塩溶液と 5% の水酸化ナトリウム生理食塩溶液を 5:2 の比で混合し, 生成した沈殿を生理食塩液で数回洗浄した後生理食塩液で 20mg/ml の濃度に調製して作成した。10 μg の OVA と 1mg の水酸化アルミニウムゲルを含む生理食塩液 0.5ml をモルモットの背部に皮下投与した。3 週間後にも同様の皮下投与を行った。その 1 週間後に全採血を行い, 血清を分離した。この抗 OVA 血清原液を 1ml/kg 体重の割合で非感作モルモットに静脈内投与し, 8 日後に実験に供した。受動感作に用いた抗血清の 8 日間 homologous PCA の力価は 1:128 であった。なお, 56°C , 2 時間熱処理により, 抗血清の力価は 1:32 に減弱した。

2) 実験方法

1% の OVA 生理食塩溶液 50 μl をモルモットの右側鼻腔内に滴下して反応を惹起し, その後 30 分間に出現したくしゃみの回数 (くしゃみそのものの回数) および鼻掻き行動の回数 (鼻掻き運動動作の回数) を記録した。薬物およびその溶媒である蒸留水は反応惹起の 1 時間前に経口投与した。抗原液の代わりに生理食塩液を鼻腔内投与した群を陰性対照群とした。

4. 鼻粘膜血管透過性亢進¹¹⁾⁻¹³⁾

1) 動物の感作方法

10 μg の OVA と 1mg の水酸化アルミニウムゲルを含む生理食塩液 0.5ml をモルモットの背部に皮下投与した。3 週間後に同様の皮下投与を行い, その 1 週間

後より実験に供した。実験に用いたモルモットより採取した血清の 8 日間 homologous PCA の力価は 1:32~1:128 であった。

2) 実験方法

感作したモルモットをウレタン麻酔 (1.2g/kg i.p.) 後, 背位に固定して頸部を正中線に沿って切開した。気管を切開し, 呼吸維持のためカニューレを挿入した。これとは別に気管切開部より鼻腔内にカニューレを挿入し, 灌流ポンプに接続して 0.25ml/分の流速にて鼻腔内灌流を行った。2% の pontamine sky blue 生理食塩液を 2ml/kg 体重の割合で静脈内投与して直ちに 10 分間 (period 1 とする) 生理食塩液を灌流し, 灌流液を回収した。この後, 灌流を中断して抗原液 (1% OVA 生理食塩溶液) を 20 μl ずつ両側の外鼻孔より点鼻し, 10 分間静置して反応を惹起した。続いて生理食塩液を 10 分間 (period 2 とする) 灌流し, 回収した。回収した灌流液 (period 1, 2) を 3000rpm で 10 分間遠心した後, 上清中の色素濃度を測定した。色素濃度は波長 620nm における吸光度を測定して求めた。period 2 の色素濃度から period 1 の色素濃度を差し引いた値を漏出色素濃度とした。薬物およびその溶媒である蒸留水は反応惹起の 1 時間前に経口投与した。抗原液の代わりに生理食塩液を鼻腔内投与した群を陰性対照群とした。

5. 統計処理

数値は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。2 群間 (陰性対照群と対照群間) の検定には Wilcoxon 検定法を, 多群間 (対照群と KW-4679 投与群間) の検定には LSD 検定法を用いた。

実験結果

1. くしゃみ・鼻掻き反応

抗原の鼻腔内投与の数分後より, くしゃみおよび前肢で鼻をこする行動 (鼻掻き行動) が出現した。30 分間のくしゃみの回数は 12.3 ± 3.5 回 (Fig. 2), 鼻掻き行動の回数は 62.0 ± 21.9 回 (Fig. 3) であった。くしゃみ, 鼻掻き行動とも, 抗原投与 30 分後にはほぼ消失した。抗原の代わりに生理食塩液を鼻腔内投与した陰性対照群 (sham 群) においては, くしゃみおよび鼻掻き行動はほとんど出現しなかった (Fig. 2, 3)。

KW-4679 は 0.01~1mg/kg, p.o. においてほぼ用量依存的にくしゃみを抑制した (Fig. 2)。0.03mg/kg 以上で抑制作用は有意であり, 1mg/kg における抑制率

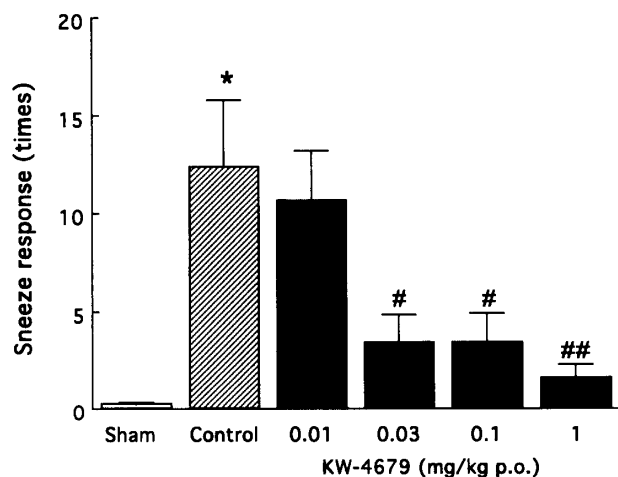


Fig. 2. Effect of KW-4679 on sneeze response after the antigen challenge. Results are mean $\pm$ S.E. of 9 animals. Guinea pigs were passively sensitized by intravenous administration of the anti-OVA antiserum. After 8 days, 50 μ l of the antigen solution was instilled into the unilateral nostril. Saline was instilled instead of the antigen solution in sham group. Drug was given orally 1 hour before the antigen challenge. * p < 0.001 as compared with sham group, and # p < 0.05, ## p < 0.01 as compared with control group.

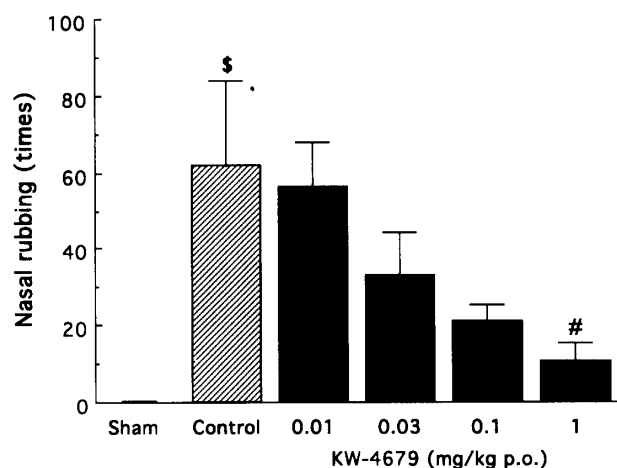


Fig. 3. Effect of KW-4679 on nasal rubbing after the antigen challenge. Results are mean $\pm$ S.E. of 9 animals. Guinea pigs were passively sensitized by intravenous administration of the anti-OVA antiserum. After 8 days, 50 μ l of the antigen solution was instilled into the unilateral nostril. Saline was instilled instead of the antigen solution in sham group. Drug was given orally 1 hour before the antigen challenge. \$ p < 0.01 as compared with sham group, and # p < 0.05 as compared with control group.

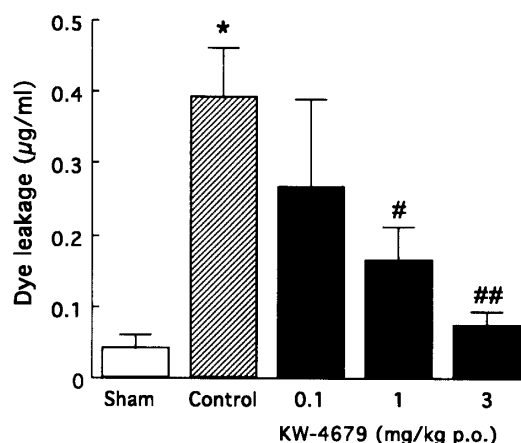


Fig. 4. Effect of KW-4679 on the dye leakage after the antigen challenge. Results are mean $\pm$ S.E. of 9-14 animals. Guinea pigs were actively sensitized with OVA and 20 μ l of the antigen solution was instilled into bilateral nostrils. Saline was instilled instead of the antigen solution in sham group. Drug was given orally 1 hour before the antigen challenge. * p < 0.001 as compared with sham group, and # p < 0.05, ## p < 0.01 as compared with control group.

は88.4%であった。KW-4679鼻掻き行動に対しても0.01~1mg/kg, p.o.において用量依存的な抑制効果を示した。1mg/kgにおける抑制は有意であり、抑制率は83.2%であった (Fig. 3)。

2. 鼻粘膜血管透過性亢進

抗原投与群の漏出色素濃度は $0.391 \pm 0.071 \mu\text{g/ml}$ であり、抗原の代わりに生理食塩水を鼻腔内投与した陰性対照群 (sham 群) の色素濃度 $0.041 \pm 0.019 \mu\text{g/ml}$ と比較して有意な増加が認められた (Fig. 4)。

KW-4679は0.1, 1および3mg/kg, p.o.において用量依存的な抑制作用を示した。各用量における抑制率は、35.7%, 64.9%および90.6%であり、1mg/kg以上で抑制作用は有意であった (Fig. 4)。

考 察

モルモットのアレルギー性鼻炎モデルを用いて、KW-4679のくしゃみ、鼻漏および鼻掻痒感に対する作用について検討した。

くしゃみおよび鼻掻痒感の評価には無麻酔下におけるモルモットのくしゃみ反応、鼻掻き行動を用いた。KW-4679は低用量から抗原投与後のくしゃみ反応を

抑制した。また、鼻搔き行動に対しても抑制作用を示したことから、鼻搔痒感に対する抑制効果をもつことが示唆された。

くしゃみおよび鼻搔き行動の機序については、抗原抗体反応時、鼻粘膜肥満細胞より放出されるヒスタミンを中心とする刺激性のケミカルメディエーターが、三叉神経の知覚性 C-fiber 末端を刺激したことによる搔痒感の表現が鼻搔き行動であり、この知覚刺激による呼吸反射がくしゃみであると考えられている⁸⁾⁹⁾。モルモットのくしゃみおよび鼻搔き行動はヒスタミンを主体とする反応である可能性が高く⁸⁾、KW-4679のくしゃみ、鼻搔き行動の抑制作用の機序として、選択的なヒスタミン拮抗作用¹⁾およびヒスタミン遊離抑制作用が考えられた。さらに、モルモットを用いたくしゃみの検討において神経ペプチド、特に Substance P がくしゃみ発現に重要な役割をもつことが報告されている¹⁰⁾。C-fiber 末端への刺激は順行性に中枢に伝わりくしゃみや鼻搔痒感を起こすとともに、逆行性に伝播して神経終末より Substance P などのタキキニンを放出させ、反応を増悪させる。KW-4679は知覚神経終末からの神経ペプチドの放出を前シナプス側に作用して抑制する作用が見い出されており⁷⁾、KW-4679のくしゃみおよび鼻搔き行動に対する抑制作用には、ヒスタミン拮抗作用やヒスタミン遊離阻害作用のみならず神経ペプチドの放出抑制作用も関与する可能性があるものと考えられる。

本実験において、鎮咳作用をもつリン酸コデイン(20 mg/kg p.o.) はくしゃみ回数に対して全く影響を示さなかった(データは示していない)。従って、観察されたくしゃみ反応に咳反応の混在はないものと考えられる。

動物モデルでの鼻漏の評価方法としては、ラットあるいはモルモットを麻酔した後、鼻腔内灌流を行い、反応惹起後、あらかじめ静脈内投与しておいた色素が鼻腔内灌流液中に漏出する量を測定する方法¹¹⁾⁻¹³⁾が広く用いられる。本法で用いた色素は血清中のアルブミンと結合するため、色素漏出は鼻粘膜の血管透過性亢進の指標となる。アルブミンは鼻汁の血清成分の代表的なものである¹⁴⁾¹⁵⁾。本研究においてモルモットを能動感作した後、抗原を鼻腔内投与することにより、鼻腔内灌流液中への明らかな色素漏出が認められた。KW-4679はこの色素漏出量を減少させたことから、反応惹起後の鼻粘膜の血管透過性亢進を抑制すると考えられた。鼻粘膜血管透過性亢進のメディエーターとし

てはヒスタミンが最も重要である¹⁵⁾¹⁶⁾が、Substance P も血管透過性亢進作用をもつことが知られている¹⁷⁾。また、モルモットを用いた検討で、ロイコトリエン C₄¹⁸⁾、および血小板活性化因子¹⁹⁾の関与も報告されている。KW-4679はヒスタミン拮抗作用やヒスタミン遊離阻害作用とともに、神経ペプチドの放出抑制作用⁷⁾、ロイコトリエン C₄産生抑制作用、血小板活性化因子産生抑制作用⁶⁾を有していることから、ヒスタミン拮抗作用やヒスタミン遊離阻害作用に加えてこれらの作用が鼻粘膜血管透過性亢進抑制作用の機序として考えられる。

本研究では、鼻粘膜血管透過性亢進に対する KW-4679の薬効評価は能動感作モデルを用いて行ったが、くしゃみ反応および鼻搔き行動に対する薬効評価と同様に、受動感作モデルを用いての検討も必要であると考えられる。また、鼻粘膜血管透過性亢進を鼻漏の指標として用いたが、今後は鼻腺分泌に対する作用も検討し、鼻漏に対する効果をさらに明確にしていきたい。

今回検討したくしゃみ反応、鼻搔き行動および鼻粘膜血管透過性亢進の3つの反応に対する KW-4679の抑制効果を比較すると、くしゃみ反応に対する有意な抑制作用は0.03mg/kg 以上の用量で認められ、鼻搔き行動および鼻粘膜血管透過性亢進に対する有意な抑制作用は1mg/kg 以上で認められた。反応の違いによる KW-4679の薬効差については、今後詳細な検討を行って明らかにしたい。

結論として、KW-4679は感作モルモットへの抗原投与後のくしゃみ反応、鼻搔き行動、鼻粘膜血管透過性亢進を抑制したことから、くしゃみ、鼻搔痒感および鼻漏に対して抑制効果をもつと考えられ、アレルギー性鼻炎の治療薬としての有用性が期待される。

稿を終えるにあたり、本研究に御協力いただいた赤松幸乃さんに深く感謝致します。

文 献

- 1) Ohshima, E., Otaki, S., Sato, H., Kumazawa, T., Obase, H., et al.: Synthesis and antiallergic activity of 11-(aminoalkylidene)-6, 11-dihydrodibenz [b, e] oxepin derivatives. *J. Med. Chem.* 35, 2074-2084, 1992.
- 2) Hamilton, S.A., Duddle, J., Herdman, M.J.,

- Trigg, C.J. and Davis, R.J.: Comparison of a new antihistaminic and antiallergic compound KW4679 with terfenadine and placebo on skin and nasal provocation in atopic individuals. *Clin. Exp. Allergy* **24**, 955-959, 1994.
- 3) Ishii, H., Manabe, H., Sasaki, Y., Satoh, H., Tamura, T., et al.: Pharmacological properties of a new antiallergic agent KW-4679. *Jpn. J. Pharmacol.* **46S**, 284P, 1988.
 - 4) Ohmori, K., Ishii, H., Manabe, H., Sasaki, Y. and Obase, H.: Immunopharmacological properties of a new antiallergic agent, KW-4679. *Allergy Proceedings* **9**, 473, 1988.
 - 5) Ishii, H., Kitamura, S. and Ohmori, K.: Inhibition of antigen-induced late asthmatic response and airway inflammation by KW-4679. *Jpn. J. Pharmacol.* **61**, 228P, 1993.
 - 6) Ikemura, T., Okamura, K., Sasaki, Y., Ishii, H., Kitamura, S., et al.: Effect of KW-4679 on the production of inflammatory lipids in human leukocyte. *Jpn. J. Pharmacol.* **67S1**, 104P, 1995.
 - 7) Ikemura, T., Ishii, H., Sasaki, Y., and Ohmori, K.: Modulation of neurogenic contraction in guinea pig bronchus by KW-4679. *Jpn. J. Pharmacol.* **64S1**, 151P, 1994.
 - 8) 成田慎一郎, 朝倉光司, 白崎英明, 小島 正, 斉藤博子, 形浦昭克: モルモット鼻アレルギーモデルにおける抗 PAF 剤ならびに抗アレルギー剤の効果. *日耳鼻* **95**, 1190-1197, 1992.
 - 9) 斉藤博子, 朝倉光司, 形浦昭克: 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. *アレルギー* **43**, 579-584, 1994.
 - 10) Kokumai, S., Imamura, T., Masuyama, K., Kambara, T. and Ishikawa, T.: Effect of capsaicin as a neuropeptide-releasing substance on sneezing reflex in a type I allergic animal model. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **98**, 256-261, 1992.
 - 11) 小島正三, 堤 直行, 阿部充生, 小松英忠, 氏家新生, 他: ラットの実験的アレルギー性鼻炎モデルとこれに及ぼす Tranilast および抗ヒスタミン剤の影響. *アレルギー* **35**, 180-187, 1986.
 - 12) 栗木 久, 牧 良孝: ラットおよびモルモットの実験的アレルギー性鼻炎に対する Amlexanox (AA-673)の作用. *薬理と治療* **14**, 6845-6852, 1986.
 - 13) 鶴飼幸太郎, 湯田厚司, 野々山勉, 坂倉康夫, 芦田康子: Amlexanox のモルモット実験的鼻アレルギーに対する効果. *アレルギー* **39**, 54-58, 1990.
 - 14) Kliner, M.A.: Human nasal respiratory secretions and host defence. *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**, S52-S56, 1991.
 - 15) 奥田 稔: 鼻アレルギーの発症機序. *アレルギー* **39**, 301-306, 1990.
 - 16) 目沢朗憲: アレルギー性鼻炎における各種ケミカルメディエーターの作用. *日耳鼻* **91**, 1444-1450, 1988.
 - 17) Baraniuk, J.N. and Kaliner, M.A.: Neuropeptides and nasal secretion. *Am. J. Physiol.* **261**, L223-L235, 1991.
 - 18) Shirasaki, H., Asakura, K., Kojima, T., Sohma, S. and Kataura, A.: The roles of histamine, leukotriene C₄ and bradykinin on nasal vascular permeability in experimental nasal allergy of guinea pigs. *Rhinology* **30**, 41-48, 1992.
 - 19) 白崎英明, 朝倉光司: 血小板活性化因子によるモルモット鼻粘膜血管透過性亢進作用および好酸球遊走作用に関する検討. *日耳鼻* **93**, 615-621, 1990.

THE EFFECT OF KW-4679, AN ANTIALLERGIC DRUG, ON EXPERIMENTAL ALLERGIC RHINITIS

Toshihiko Kaise, Haruhiko Manabe and Kenji Ohmori
Pharmaceutical Research Laboratories, Kyowa Hakko Ind. Co.

Effect of KW-4679, an antiallergic agent, on the experimental allergic rhinitis was studied in guinea pigs. 1) KW-4679 inhibited the sneeze response and the nasal rubbing induced after the intranasal administration of antigen in sensitized guinea pigs. The inhibitions were dose-related and significant at 0.03 mg/kg p.o. for sneeze response and 1 mg/kg p.o. for nasal rubbing, respectively. 2) The nasal vascular permeability was increased after the intranasal administration of antigen in sensitized guinea pigs. KW-4679 significantly reduced the increase of the nasal vascular permeability at 1 mg/kg p.o. or higher. From these results, KW-4679 may have inhibitory effects on sneeze, nasal irritation and rhinorrhea in clinical use.