

〔速報〕

ヒスタミン加マウス γ -グロブリンのアレルゲン
誘発好酸球増多の抑制作用

- 1) 日本臓器製薬株式会社生物活性科学研究所
 2) 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター, 臨床遺伝部門
 3) 国立相模原病院臨床研究部, 4) 東京大学医学部物療内科

吉井春夫¹⁾ 深田有理子¹⁾ 山本一彦²⁾ 家後 壽¹⁾
 末廣誠之¹⁾ 柳原行義³⁾ 奥平博一⁴⁾

ヒスタミン加ヒト γ -グロブリン (HG) は古くから非特異的薬物療法剤として喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患に使用されている。その作用機序としてはヒスタミン固定能の増強やヒスタミン遊離抑制作用が知られている。一方, HG はアレルギー患者の末梢血または鼻汁中の好酸球数を低下させることが認められている。今回, HG が好酸球の増多を積極的に抑制する可能性を考え, アレルゲン誘発の好酸球増多に及ぼす影響を検討した。BALB/c マウスにおけるブタクサ花粉エキ스로誘発した腹腔内好酸球増多に対して, ヒスタミン加マウス γ -グロブリン (マウス HG) は臨床投与方法で著明な抑制作用を示した。その抑制作用は陽性対照として用いた cyclosporin A (CsA) に匹敵し, また興味あることに, 構成成分であるヒスタミンまたはマウス γ -グロブリン単独投与では抑制作用は観察されなかった。以上の結果から, HG は好酸球増多の抑制を介して, 慢性のアレルギー性炎症を抑制することが推測される。

Key words: accumulation — allergen — eosinophil — histaglobin — histamine

はじめに

ヒスタミン加ヒト γ -グロブリン (ヒスタグロビン[®], HG) はアレルギー患者で低下しているヒスタミン固定能を増強する製剤として Parrot, Laborde¹⁾により創製され, 日本では喘息, アレルギー性鼻炎およびアトピー性皮膚炎を適応症として広く使用されている。また, 最近ではヒスタミン遊離に対する抑制作用^{2) 4)}も見出されているが, その作用機序はいまだ不明な点が多い。

一方, 最近になって気管支喘息やアレルギー性鼻炎などのアレルギー疾患では 2 型のヘルパー T 細胞 (Th2) や好酸球が炎症の慢性化に主要な役割を果たすことが明らかにされてきた。Th2 から遊離される

interleukin 5 (IL-5) や種々の細胞から放出される platelet-activating factor (PAF) などにより, 好酸球は炎症局所に誘引され活性化を受け, 種々の細胞障害分子を遊離し組織障害を引き起こす。現在では好酸球はアレルギー炎症において最も重要な奏効細胞として認識されている^{5) 6)}。我々は好酸球に着目し, HG の臨床成績をレトロスペクティブに調査した結果, HG の治療でアレルギー患者の末梢血や鼻汁中の好酸球数が減少していることを認めた^{7) 9)}。そこで, HG が好酸球の浸潤を積極的に抑制している可能性を考え, アレルゲン誘発の好酸球増多モデルを用いその影響を検討した。

実験材料及び実験方法

1. 実験動物: 6～8 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本チャールズリバー株式会社から購入した。
2. 使用薬物: マウス γ -グロブリン (γ G) 及びヒスタミン・二塩酸塩はシグマ社より, CsA はサンド社より, またブタクサ花粉エキス (1:100wt/vol) は鳥居

Received: February 3, 1995

Accepted: April 10, 1995

Abbreviations: CsA cyclosporin A; γ G γ -globulin; HG histamine-added human γ -globulin; IL-5 interleukin 5; Mouse HG histamine-added mouse γ -globulin; PAF platelet-activating factor

薬品より購入した。

3. マウス HG の調製：マウス γ G を生理食塩水に溶解し、ヒスタミン・二塩酸塩を添加 (12mg のマウス γ G : 0.15 μ g ヒスタミン・二塩酸塩) し、室温で 2 時間攪拌後、凍結乾燥した。投与時に蒸留水を所定量添加し、その 0.2ml をマウス背部皮下に投与した。

4. ブタクサ花粉エキスの好酸球増多モデル：Kaneko et al の方法¹⁰⁾に従い、BALB/c マウスを用いて好酸球増多モデルを作成した。ブタクサ花粉エキス (1 : 100, wt/vol) を生理食塩水で 1000 倍希釈し、その 0.1ml を day 0, 1 に、更に 0.2ml を day 6, 8, 14 に皮下注射した。好酸球増多の誘発は 1000 倍希釈のブタクサ花粉エキス 0.2ml を day 20 に腹腔内に注射した。誘発 24 時間後に、1.0% ウシ胎児血清及び 5.0U/ml のヘパリンを含有する磷酸緩衝生理食塩水を用いて腹腔細胞を回収し、総細胞数をセルカウンターで計測後、サイトスピンを用いて塗抹し、常法に従ってギムザ染色した。

5. 統計処理：結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で現し、群間差の検定は ANOVA-Bonferroni—多重比較検定法を用いて解析した。

実験結果及び考察

ブタクサ花粉エキスを day 0 から day 14 まで BALB/c マウス皮下に反復感作し、day 20 に腹腔内に同抗原を注入し、好酸球増多を誘発した。150mg/kg/day のマウス HG を day 0, 4, 7, 11, 14, 18 に皮下投与し、また同量のマウス HG または 100mg/kg/day の CsA を day 18, 19, 20 に皮下投与し、好酸球増多に及ぼす影響を検討した。に示すように、マウス HG は 3 週間の投与で CsA に匹敵する強い好酸球増多抑制作用を示した。また、誘発前 3 日前の投与でも明らかな抑制作用が観察された。本モデルにおける好酸球増多は感作 T 細胞からの IL-5 に依存していることが証明されているので、マウス HG は感作 T 細胞の誘導又は IL-5 の遊離を抑制している可能性が考えられる¹⁰⁾¹¹⁾。一方、予備検討の結果ではマウス HG は PAF による好酸球増多に対しても本モデル系と同等の強い抑制作用を示しているため、好酸球やその前駆細胞又は血管内皮細胞に作用し、好酸球の炎症部位への遊走を抑制している可能性も考えられる。更に、IgE 抗体産生の抑制又は肥満細胞からの好酸球遊走性メディエー

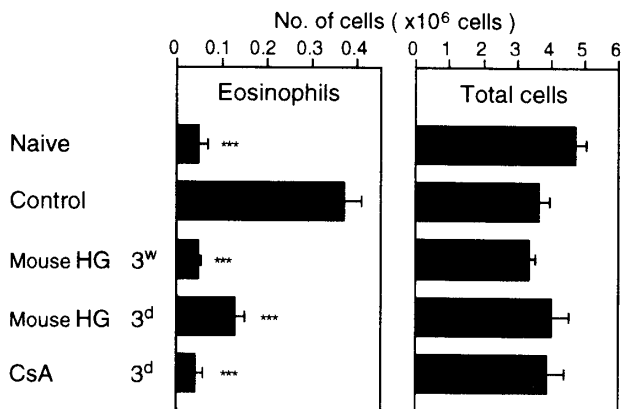


Fig. 1. Effect of mouse HG and CsA on eosinophil accumulation induced by allergen in BALB/c mice. Mice were sensitized s.c. with ragweed pollen extract on days 0, 1, 6, 8 and 14, and were challenged i.p. with the same allergen on day 20. Peritoneal cells from the sensitized mice or naive mice were collected 24 hr after challenge. Histamine-added mouse γ -globulin (mouse HG) at 150mg/kg/day or saline (control) was administered s.c. on days 0, 4, 7, 11, 14 and 18 (3^w) or on days 18, 19 and 20 (3^d). Cyclosporin A (CsA) at 100mg/kg/day was administered s.c. on days 18, 19 and 20 (3^d). Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 6 animals except for naive group (n=5). *** p < 0.001 as compared with control.

ターの遊離阻害の可能性も考えられるので、現在、細胞および分子レベルからこれらの可能性を検討中である。

次に、構成成分の作用を検討するために、150mg/kg/day のマウス HG に相当するヒスタミンまたはマウス γ G を単独で週に 2 回、3 週間皮下投与し、好酸球増多に及ぼす影響を検討した。Fig. 2 に示すように、マウス HG は明らかな抑制作用を示したが、ヒスタミンまたはマウス γ G 単独投与では抑制作用は全く観察されなかった。この成績は両成分の混合が抑制作用発現に必須であることを示唆している。我々は生理食塩水中で両成分が一定の割合で結合することを平衡透析法により確認しているため、恐らく HG の調整時に両成分が何らかの相互作用を引き起こし、新しい好酸球増多抑制作用が発現するものと考えられる。

一方、気管支喘息¹²⁾、アレルギー性鼻炎¹³⁾、アレルギー性慢性皮膚疾患¹⁴⁾を対象とした二重盲検試験において、HG は対照薬のヒト γ G に比して有意に高い有用性を示している。また、本論文でもマウス HG がマウス γ G 単独に比して有意に強い好酸球増多抑制作用

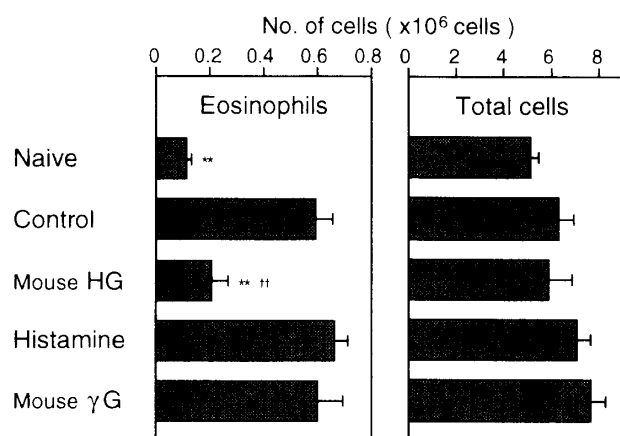


Fig. 2. Effect of mouse HG, histamine and mouse γ G on eosinophil accumulation induced by allergen in BALB/c mice. Procedures for sensitization, challenge and collection of peritoneal cells were the same as in Fig. 1. Mouse HG, histamine or mouse γ -globulin (mouse γ G) was administered s. c. on days 0, 4, 7, 11, 14 and 18. Mouse HG: 150mg/kg/day, and histamine and mouse γ G: equivalent dose to 150mg/kg/day of mouse HG. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 6 animals except for naive group (n = 4). ** p < 0.01 as compared with control. *** p < 0.01 as compared with mouse γ G group.

を示している。このような相関性は HG の好酸球増多抑制作用が本剤の主要な抗アレルギー作用機序の一つであることを示唆している。今後、HG の臨床薬理学的検討を行い、この可能性を更に検討する必要がある。

文 献

- 1) Parrot, J.L. and Laborde, C.: The histamine-fixing power of blood serum. Its modification after an injection of normal human serum or azoprotein of histamine. *J. Physiol. (Paris)* **46**, 885-889, 1951.
- 2) Ishikawa, T., Shimada, T., Kessoku, N. and Kiyoi, M.: Inhibition of rat mast cell degranulation and histamine release by histamine-rat gammaglobulin conjugate. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **59**, 403-407, 1979.
- 3) 渡辺啓伍, 大西章元, 瀬戸米藏, 栗本芳行, 清井正好, 他: ヒスタミン加ラット γ グロブリンのラット肥満細胞よりのヒスタミン遊離抑制. *アレルギー* **28**, 666-673, 1979.
- 4) 大西章元, 渡辺啓伍, 中川武正, 森田 寛, 宮本昭正: ヒスタミン加ヒト γ グロブリンのヒト白血球からのヒスタミン遊離抑制. *臨床免疫* **17**, 1145-1150, 1985.
- 5) 奥平博一: アレルギーと IL-4 および IL-5. 別冊・医学のあゆみ, サイトカイン, pp.132-136, 1992.
- 6) 牧野莊平: 好酸球研究のあゆみ, 世界と日本. *日本臨床* **51**, 5-10, 1993.
- 7) 関谷忠雄, 森島雅夫, 維田宗夫: アレルギー性鼻炎に対する Histaglobin の使用経験. *新薬と臨床* **18**, 883-886, 1969.
- 8) 浅野知行: 小児のアレルギー性疾患に対する Histaglobin 療法. *小児科診療* **32**, 781-785, 1969.
- 9) 樋口雄巳, 久徳重徳, 鳥居新平, 前島元信, 金井朗, 他: 小児気管支喘息に対するヒスタグロビン療法について. *小児科臨床* **21**, 1661-1665, 1968.
- 10) Kaneko, M., Hitoshi, Y., Takatsu, K. and Matsumoto, S.: Role of interleukin-5 in local accumulation of eosinophils in mouse allergic peritonitis. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **96**, 41-45, 1991.
- 11) Mori, A., Suko, M., Tsuruoka, N., Etoh, T., Nakagawa, H., et al.: Atopic diseases and eosinophilic inflammation-possible management with agents which downregulate IL-5 gene transcription. *Environ. Dermatol.* **1**, 42-54, 1994.
- 12) 伊藤和彦, 東海ヒスタグロビン研究会: ヒスタグロビンの気管支喘息に対する臨床評価 γ グロブリンを対照とした多施設二重盲検試験法による. *臨床と研究* **56**, 3058-3069, 1979.
- 13) 久松建一, 小山英明, 藤川裕司, 渡辺 誠, 芳賀通郎, 他: 鼻アレルギーに対するヒスタグロビンの二重盲検法による検討. *耳鼻咽喉科展望* **22**(補1), 38-49, 1979.

INHIBITORY EFFECT OF HISTAMINE-ADDED MOUSE γ -GLOBULIN ON EOSINOPHIL ACCUMULATION INDUCED BY ALLERGEN IN BALB/c MICE

Haruo Yoshii¹⁾, Yuriko Fukata¹⁾, Kazuhiko Yamamoto²⁾, Hisashi Yago¹⁾,
Seishi Suehiro¹⁾, Yuki Yoshi Yanagihara³⁾ and Hirokazu Okudaira⁴⁾

¹⁾*Department of Haematology and Immunology, Institute of Bio-Active Science, Nippon Zoki Pharmaceutical Company,* ²⁾*Division of Rheumatology and Molecular Immunology, Institute of Medical Science, St. Marianna University School of Medicine,* ³⁾*Clinical Research Center for Allergy, National Sagami Hospital,* ⁴⁾*Department of Medicine and Physical Therapy, Faculty of Medicine, University of Tokyo*

Histamine-added human γ -globulin (HG) has been clinically used as an anti-allergic drug for asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis. Retrospective analysis of clinical data have indicated that s.c. administration with HG not only improves clinical symptoms but also suppresses the number of eosinophils of nasal secretion or peripheral blood in allergic patients. Thus, the possibility was explored that HG may actively suppress eosinophil accumulation in allergic inflammation. The eosinophil accumulation in peritoneal cavity was induced by i.p. injection with ragweed pollen extract in BALB/c mice which had been repeatedly sensitized with the allergen for three weeks. Histamine-added mouse γ -globulin (Mouse HG) at 150 mg/kg/day markedly inhibited the allergen-induced eosinophil accumulation when administered s.c. two times a week for three weeks. The inhibitory effect was almost the same as that of cyclophosphamide at 100 mg/kg/day. Interestingly, equivalent dose of histamine or mouse γ -globulin alone had no inhibitory effect in the same system. These results suggest that HG suppresses chronic allergic inflammation through the inhibition of eosinophil accumulation.
