

ヒト末梢血リンパ球の抗原特異的 Interleukin 2 (IL2) 反応性に与える Azelastine の処理効果

防衛医科大学校小児科

轟伊佐雄

埼玉医科大学小児科

吉沢いづみ 川野 豊 野間 剛

抗アレルギー剤 azelastine (Azeptin®) のヒト末梢血リンパ球における interleukin 2 (IL2) 反応性誘導に対する効果を検討した。気管支喘息患児の末梢血単核細胞に対するダニ抗原特異的 IL2 反応性は azelastine 40ng/ml および 400ng/ml で有意に抑制された。4ng/ml では一部の症例で抑制を認めた。症例によっては 4000ng/ml で IL2 反応性が誘導されたが、これは azelastine による直接の mitogenic effect である可能性が示唆された。これらの抑制効果は抗原呈示細胞（付着細胞）を azelastine 処理した場合に認められたが、非付着細胞を処理した場合は認められなかった。purified protein derivative (PPD) により誘導された健康人末梢血単核細胞の IL 2 反応性も 40ng/ml の濃度の azelastine で抑制された。concanavalin A (Con A) により誘導された健康人末梢血単核細胞の IL2 反応性は 400ng/ml の濃度においても抑制されなかった。以上から azelastine は特異抗原で誘導される IL2 反応性を抑制する軽度の免疫抑制作用を有しており、これは抗原呈示過程に対する抑制作用に由来すると考えられた。

Key words: antigen specific interleukin 2 responsiveness — azelastine — bronchial asthma

緒言

最近種々の抗アレルギー薬が開発されてきた。azelastine [4-(p-chlorobenzyl)-2-(hexahydro-1-methyl-1H-azepine-4-yl)-1(2H)-phthalazinone hydrochloride] (商品名アゼプチン) もそうした薬剤の一つで、leukotriene 産生・遊離抑制作用¹⁾、histamine 拮抗作用²⁾などを有し、主として I 型アレルギーを抑制することで抗アレルギー効果を生ずると考えられており、実際臨床的にもその有用性が報告されている^{3,4)}。

しかし、気管支喘息などのアレルギー疾患では、即時型過敏反応のみならず、遅延型過敏反応の関与が示唆されている⁵⁾。我々は既にアレルギー患児の末梢血単核細胞を抗原で刺激することにより IL2 反応性が誘導されること、この IL2 反応性は抗原特異的でアレルギー疾患の診断や病態の評価、さらに薬剤の作用機

序の解析などに有効であることを報告してきた⁶⁻¹¹⁾。今回気管支喘息患児の末梢血単核細胞に対する azelastine の処理効果について検討したので報告する。

対象及び方法

1. 対象

対象は 2 歳から 5 歳までの気管支喘息患児 8 名の小児で、いずれも臨床的に気管支喘息と診断され皮膚反応および IgE-RAST ではダニ抗原に対して陽性を示した。

2. 方法

患児のヘパリン加末梢血より Ficoll-Hypaque 比重遠心法を用いて得た単核細胞を、10% AB 血清を加えた RPMI 1640 に 1×10^6 /ml の濃度で浮遊させ、azelastine で 12 時間前処置したのちダニ抗原 (*Dermatophagoides farinae* 以下 Df) 10 μ g/ml を添加、37°C 10% CO₂ 培養器で 6 日間培養後、洗浄したのち細胞数を再度 2×10^5 /0.2ml に調製し、recombinant IL2 (味の素) を 40U/0.2ml となるように添加し、再度 3 日

Received: June 4, 1990

Accepted: July 23, 1990

Abbreviations: ConA concanavalin A; Df *Dermatophagoides farinae*; IL2 interleukin 2; PPD pure protein derivatives; RAST radioallergosorbent test; SI stimulation index

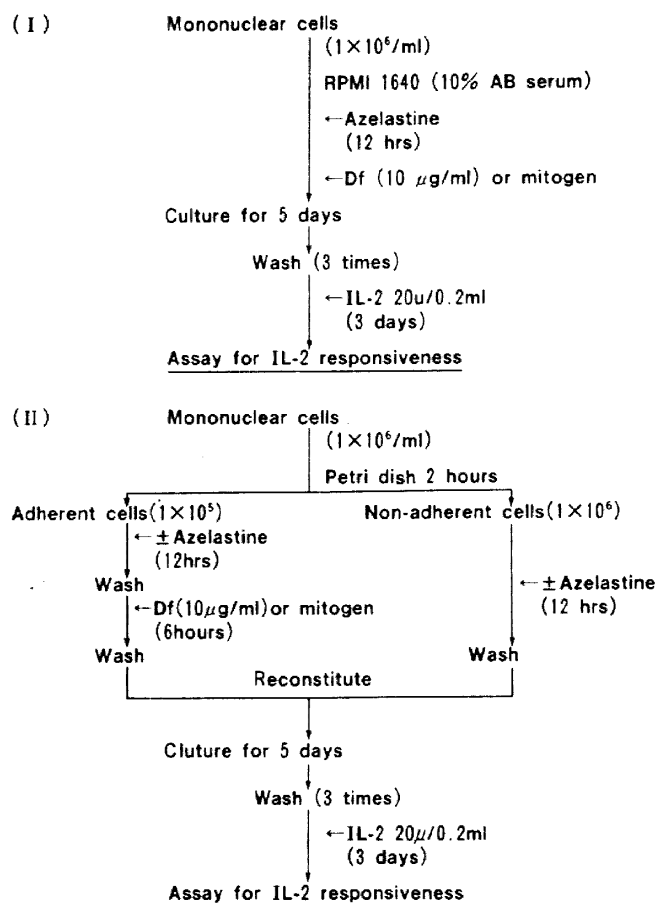


Fig. 1. Methods for evaluation of effect of azelastine on induction of IL2 responsiveness of lymphocytes.

間培養したのちトリパンブルーを用い生細胞数を算定し、IL2非添加群との比 stimulation index (SI) をもって IL2 反応性を評価した (Fig. 1-I).

$$\text{IL2 反応性} = \frac{\text{IL2 添加群の生細胞数}}{\text{IL2 非添加群の生細胞数}}$$

また、薬剤の作用部位を明らかにするため、末梢血単核細胞を付着細胞と非付着細胞とに分離し、薬剤処理を行った後に再び組み合わせ、同様に IL2 反応性を検討した (Fig. 1-II)。すなわち、末梢血単核細胞をペトリ皿に2時間付着させ、付着細胞と非付着細胞に分離し、付着細胞 (1×10^5 個) に Df 抗原を6時間作用させたのち、良く洗浄し、非付着細胞 (1×10^6 個) と組み合わせ、同様に5日間培養し、IL2 反応性を評価した。一方薬剤処理群としては、予め azelastine 処理した後 Df を添加し、良く洗浄した後非付着細胞と組み合わせることで付着細胞に対する azelastine の効果を評価した。同様に Df 刺激を受けた付着細胞に azelastine 処理された非付着細胞を組み合わせ、非付着細胞

に対する azelastine の効果を検討した。

また同様に pure protein derivatives (PPD) 及び, concanavalin A (Con A) の健康成人末梢血単核細胞刺激に対する azelastine の抑制効果の有無を検討するため、同様に得た健康成人の単核細胞 1×10^6 個に PPD 及び Con A を加え、同様に5日間培養して IL2 反応性を評価した。

この実験に使用した azelastine は pH 7.4 の RPMI1640 培養液で 4 ng/ml, 40 ng/ml, 400 ng/ml, 4000 ng/dl の各濃度に希釈して用いた。

結果

1. Df 特異的 IL2 反応性に対する azelastine の効果

気管支喘息患児の末梢血単核球に各濃度の azelastine を添加し、Df にて誘導された IL2 反応性による抑制作用について検討した結果を Fig. 2 に示す。縦軸は azelastine の濃度、横軸に IL2 反応性を stimulation index (SI) として示した。azelastine を添加しなかった場合誘導された IL2 反応性は、azelastine 濃度が 40 ng/dl, 400 ng/dl で全例に有意な抑制が認められた。4 ng/ml の濃度では症例により抑制を認める場合 (Pt. 2) と認めない場合 (Pt. 1, 3, 4) があつた。

一方 4000 ng/ml の濃度では Fig. 2 に示すように 8 例中 2 例に IL2 反応性が誘導された。これは azelastine 自身に高濃度において mitogenic 作用の可能性があることが示唆された。

末梢単核細胞を付着細胞と非付着細胞とに分離し、各々に azelastine を処理した後 Df にて誘導される IL2 反応性の結果を Fig. 3 に示す。付着細胞を 40 ng/ml の濃度の azelastine で前処理した場合は、Df による IL2 反応性の誘導が有意に抑制されたが、4 ng/dl の場合ではそのような抑制は認められなかった。また、同様に非付着細胞に対する抑制作用を検討したが、これらの azelastine の濃度ではほとんど影響は認められなかった。

2. PPD 刺激により誘導された健康成人末梢血単核球の IL2 反応性に対する azelastine の処理効果

PPD の刺激により誘導される IL2 反応性に対する azelastine の処理効果を検討したところ、Df で誘導される IL2 反応性を抑制する azelastine の濃度 40 ng/ml でリンパ球を前処理すると、PPD 刺激に対して誘導さ

IL-2 responsiveness (S.I)

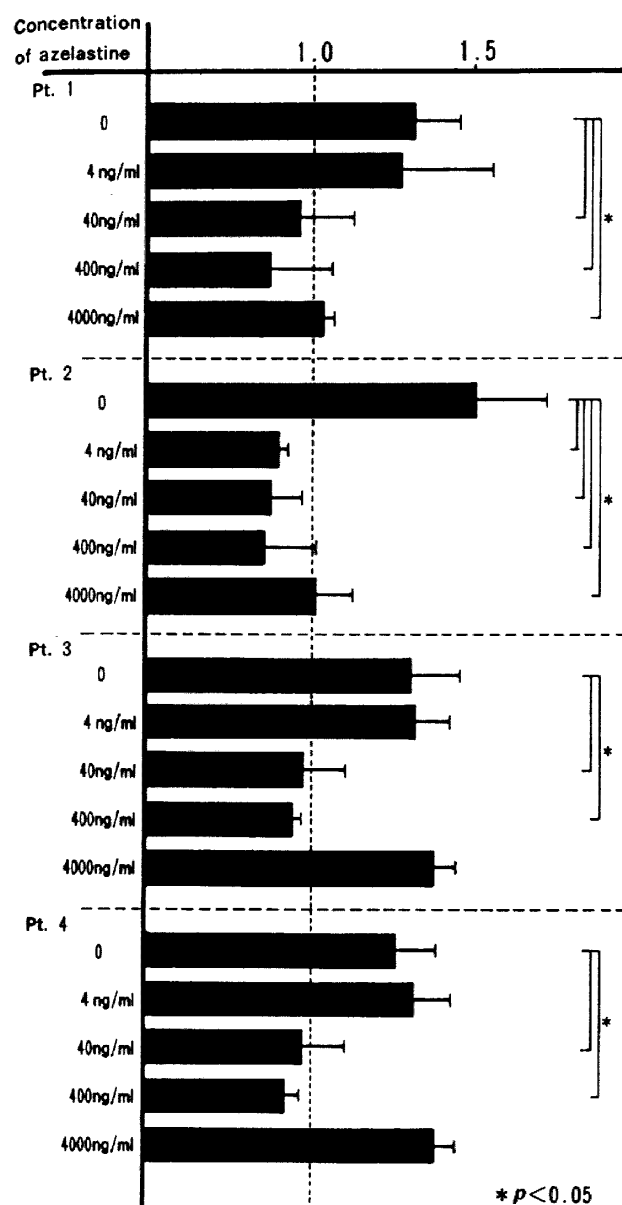


Fig. 2. Relationship between the concentration of azelastine and its effect on the IL2 responsiveness of lymphocytes induced by Df antigen.

れる IL2 反応性は全例が有意に抑制された (Fig. 4).

3. Con A 刺激により誘導される健康成人末梢血単核細胞の IL2 反応性に対する azelastine の処理効果

T 細胞の mitogen である Con A により誘導される IL2 反応性に対する azelastine の処理効果を検討したところ, Con A 刺激に対しては, Df により誘導される IL2 反応性が抑制される最大濃度である 400 ng/ml でも反応の抑制が認められなかった (Fig. 5).

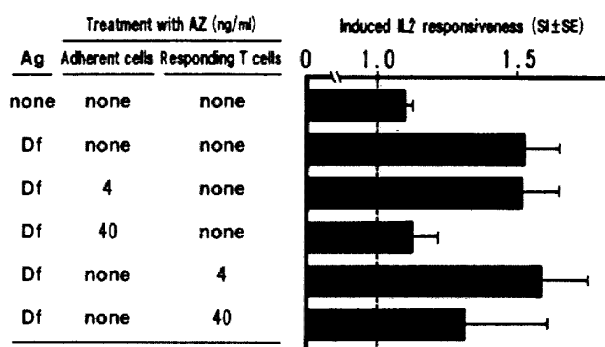


Fig. 3. Patients adherent cells pretreated with azelastine failed to present Df antigen to responding T cells in induction of IL2 responsiveness, but not T cell. * $p < 0.05$.

IL-2 responsiveness (S.I)

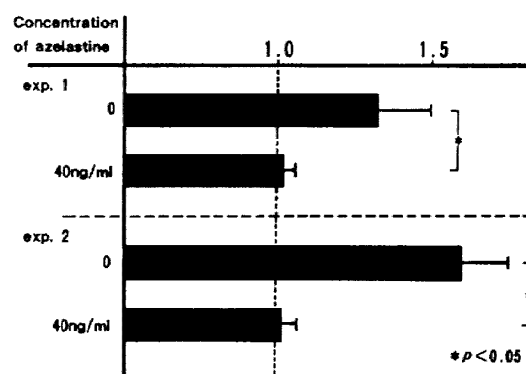


Fig. 4. Effect of azelastine on the IL2 responsiveness of lymphocytes induced by PPD.

IL-2 responsiveness (S.I)

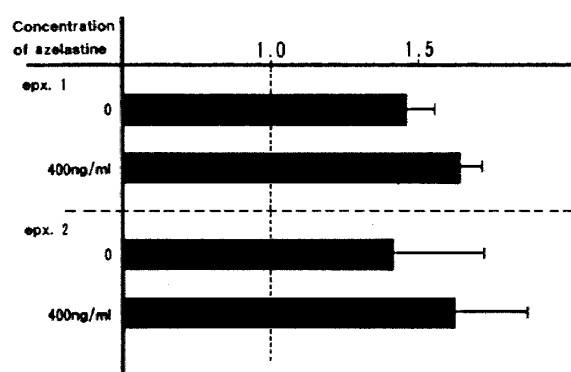


Fig. 5. Effect of azelastine on the IL2 responsiveness of lymphocytes induced by Con A.

考 察

我々はアレルギー患者の末梢血単核細胞を病因抗原

で刺激したのち IL2 を添加するとリンパ球の増殖反応が認められることを報告した⁶⁾⁻¹¹⁾。この反応の誘導は、例えばダニ抗原のみに対するアレルギーを有している患児はダニ抗原で刺激された時に IL2 反応性が誘導されるが、卵白抗原などの他の抗原で刺激しても IL2 反応性は誘導されなかった。逆に卵白に対するアレルギーのみを有する患児の単核細胞は、卵白抗原で刺激された時にのみ IL2 反応性が誘導されたが、ダニや他の抗原では誘導されなかった。以上からこれらの反応の誘導は各々の抗原に対して特異的であると考えられた。このように抗原特異的 IL2 反応性の誘導は、従来より用いられた皮膚反応や血清 IgE 値と同様アレルギーの診断や病態の評価に非常に有用と考えられる。このような in vitro での実験系は薬剤などの有効性や作用機序の検討に有用であると考えられる。今回試験管内で抗原とマクロファージ・樹状細胞及びリンパ球の組み合わせを設定し、各段階での azelastine の効果を検討した。

azelastine は histamine 遊離抑制作用に加え、leukotriene の産生及び遊離抑制作用を有する phthalazinone 誘導体である。azelastine の薬理作用としては、カルシウムイオノフォアによるヒト好中球の leukotriene C_4 , D_4 産生・遊離の抑制¹⁾、カルシウムイオノフォアによるラット腹腔肥満細胞からの leukotriene C_4 , D_4 の遊離抑制¹²⁾、leukotriene C_4 , D_4 によるモルモットの摘出回腸の収縮の抑制、ラット腹腔肥満細胞のカルシウムイオノフォアによる histamine 遊離抑制効果¹³⁾などの報告がある。また実験的アレルギー反応についても、モルモットの実験喘息の抑制¹⁴⁾、ラット及びモルモットの受身皮膚アナフィラキシー反応の抑制¹⁵⁾、モルモットのアルサス反応の抑制¹⁶⁾など有意な抑制効果を示すことが報告されている。これらの抑制作用を発現する azelastine の濃度としては 10^{-6} M から 10^{-4} M という報告が多くみられた。

我々の行った azelastine の濃度はそれぞれ 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M で行ったが、これは健康人での azelastine の血中濃度が、2mg を服用したとき最高 1.1ng/ml 程であること、ラットに ^{14} C でラベルした azelastine を与えたとき血液中より肺で高濃度に分布し、その濃度は血中の 30~40 倍であることより妥当であると考えたからである。実際の実験では、症例によっては 10^{-8} から抑制がみとめられ、 10^{-7} では全例に抑制が認められた。この濃度は従来の研究で抑制が認められた濃度より低値であり、より生理的濃度であると考え

えられた。

我々は末梢血単核球をペトリ皿で 2 時間静置することで付着細胞（抗原提示細胞濃縮細胞群）と非付着細胞（T 細胞濃縮細胞群）に分離し、その各々に対し azelastine を作用させたのち抗原提示細胞に抗原を pulse し、再び 1 : 10 の割合で組み合わせ、IL2 反応性を測定した。薬剤を作用させなかった細胞を組み合わせた場合、患者では IL2 反応性の誘導が認められた。非付着細胞を azelastine で前処理したのち、抗原で刺激を受けた付着細胞に組み合わせたときは正常の反応を示したことから、azelastine は非付着細胞に対して抑制作用を有さないと考えられた。一方、付着細胞を薬剤で処理すると抗原で刺激しても IL2 反応性は誘導されなかった。このことより azelastine は付着細胞に作用し、抗原認識ないしは抗原呈示過程を抑制し、その結果として IL2 反応性の誘導を抑制すると考えられた。

azelastine の示す多彩な抗アレルギー効果の機序としては、 Ca^{++} 流入抑制¹⁷⁾、leukotriene 産生酵素の阻害¹⁾、細胞内 c-AMP 生成増加作用¹⁸⁾、膜安定化作用¹⁹⁾などが推定されている。赤木らは azelastine のような薬剤はリン脂質二重層に対し膜安定化作用を有しており、その結果膜の透過性は低下し、種々の酵素反応が阻害され、情報の伝達が抑制されることを報告している¹⁸⁾。また洲崎らは赤血球の構造と機能に対する azelastine の効果を報告しているが、そのなかで azelastine が濃度依存的に赤血球形態を変形させることを示し、これが脂質二重層に azelastine が組み込まれるためにおこった膜安定化作用による可能性を示唆している¹⁹⁾。また、同様に多形核白血球の刺激応答性の特徴から、反応の極初期である細胞膜レベルを安定化することで抗アレルギー作用を発現していることも示唆している²⁰⁾。また、血小板に azelastine を作用させることで、PAF による血小板凝集を濃度依存的に抑制することも報告されている²¹⁾。このように膜安定化作用は多形核白血球のみならず、赤血球や血小板でも報告されてきており、azelastine の多彩な薬理作用を一元的に説明できる可能性を持っている。

我々の実験結果は histamine や leukotriene の産生・遊離の抑制などでは説明が困難であるが、azelastine の膜安定化作用を考慮することで理解が可能である。すなわち、末梢血単核球に azelastine を作用させた後特異抗原で刺激しても IL2 反応性が誘導されなかったのは、薬剤によって膜の反応性が変化したため

であり、我々の実験では抗原呈示細胞に薬剤が作用したときのみに抑制が認められたことから、特に抗原認識ないし抗原呈示過程が抑制されていると考えられた。このことは azelastine が、マクロファージの遊走能・貪食能に対しても抑制的に作用すること²²⁾からも充分考えられよう。

この azelastine の抑制作用は Df や PPD などの特異抗原に対しては有意であったが、Con A による反応は有意に抑制しなかったことより、その抑制効果は比較的弱いと考えられた。

なお、本論文の内容は第16回及び第17回日本臨床免疫学会において発表した。

文 献

- 1) 片山 敏, 角田 創, 佐久間義範, 甲斐広文, 片山 浩一: azelastine のロイコトリエン産生・遊離抑制作用およびロイコトリエン拮抗作用. *Prog. Med.* 6, 1173-1178, 1986.
- 2) Yamanaka, T., Shoji, T., Murakami, M. and Igarashi, T.: Effect of azelastine hydrochloride, a new antiallergic drug, on the gastrointestinal tract. *Arzneim.-Frorsch./Drug. Res.* 31(II), 1203-1206, 1981.
- 3) 馬場 実, 飯倉洋治, 前田和一, 赤坂 徹, 向山 徳子, 他: 小児気管支喘息に対するアゼラスチン® (塩酸アゼラスチン) の臨床評価—至適用量の検討. *小児科臨床* 41, 1395-1410, 1988.
- 4) 牧野莊平, 石崎 達, 長野 準, 富岡玖夫, 信太 隆夫, 他: 気管支喘息に対する Azelastine (E-0659) の臨床的検討—多施設における用量比較試験—. *臨床と研究* 62, 1623-1645, 1985.
- 5) Pepys, J.: Clinical and therapeutic significance of patterns of allergic reactions of the lungs to extrinsic agents. *Am. Rev. Respir. Dis.* 116, 573-588, 1977.
- 6) 野間 剛, 川野 豊, 吉沢いづみ, 矢田純一: IL2 反応性の測定. *臨床免疫* 19(Suppl. 12), 170-177, 1987.
- 7) 川野 豊, 野間 剛, 吉沢いづみ, 馬場 実, 矢田純一: 特異抗原で誘導されるリンパ球のインターロイキン-2 反応性に及ぼすトラニラストの影響についての検討. *アレルギー* 37, 47-52, 1988.
- 8) Noma, T., Yoshizawa, I., Kawano, Y., Itoh, M., Baba, M. and Yata, J.: Allergen-induced IL2 responsiveness in lymphocytes from patients with atopic dermatitis and/or bronchial asthma. *Jpn. J. Allergol.* 36, 1075-1083, 1987.
- 9) Noma, T., Kawano, Y., Yoshizawa, I., Itoh, M., Mukouyama, T., Baba, M. and Yata, J.: Ovalbumin-specific induction of IL2 responsiveness in lymphocytes from patients with hen egg allergy and its regulation by the culture supernatant of normal lymphocytes. *Ann. Allergy* 64, 33-40, 1990.
- 10) Yoshizawa, I., Noma, T., Kawano, Y. and Yata, J.: Allergen specific induction of IL2 responsiveness in lymphocytes from asthmatic children I. Antigen specificity and initial events of the induction. *J. Allergy Clin. Immunol.* 84, 246-253, 1989.
- 11) Noma, T., Yoshizawa, I., Baba, M., Yata, J., Akasaka, T. and Maeda, K.: Effect of Ketotifen on antigen-induced interleukin 2(IL2) responsiveness in lymphocytes from patients with atopic dermatitis and/or bronchial asthma. *Int. J. Immunopharmacol.* 12, 268-277, 1990.
- 12) Diamantis, W., Chand, N., Harrison, J.E., Pillar, J., Perhach, J.L. Jr. and Sofia, R.D.: Inhibition of release of SRS-A and its antagonism by Azelastine (A), an H₁ antagonist-antiallergic agent. *Pharmacologist* 24, 200, 1982.
- 13) Chand, N., Pillar, J., Diamantis, W., Perhach, J. L. Jr. and Sofia, R.D.: Inhibition of calcium ionophore (A23187)-stimulated histamine release from rat peritoneal mast cells by Azelastine: implications for its mode of action. *Eur. J. Pharmacol.* 96, 227-233, 1983.
- 14) Zechel, H.J., Brock, N., Lenke, D. and Achterrath-Tuckerman, U.: Pharmacological and toxicological properties of azelastine, a novel antiallergic agent. *Arzneim.-Frorsch./Drug. Res.* 31(II), 1184-1193, 1981.
- 15) Chand, N., Harrison, J.E., Rooney, S.M., Sofia, R.D. and Diamantis, W.: Inhibition of passive cutaneous anaphylaxis (PCA) by azelastine: Dissociation of its antiallergic activities from antihistaminic and antiserotonin properties. *Int. J. Immunopharmacol.* 7, 833-838, 1985.
- 16) Tanigawa, T., Handa, M. and Miura, K.: Effect of azelastine hydrochloride on vascular permeability in hypersensitivity reaction skin site in guinea pig. *Arzneim.-Frorsch./Drug. Res.* 31(II), 1212-1215, 1981.
- 17) Chand, N., Diamantis, W. and Sofia, R.D.: Modulation of in vitro anaphylaxis of guinea-pig isolated tracheal segments by azelastine,

- inhibitors of arachidonic acid metabolism and selected antiallergic drugs. *Eur. J. Pharmacol.* 96, 227-233, 1983.
- 18) 赤木正明, 見尾光庸, 田坂賢二, 木庭茂治: azelastine の histamine 遊離抑制機序. *応用薬理* 26, 191-198, 1983.
- 19) 洲崎悦子, 洲崎敏伸, 昇 公一, 内海耕健: 赤血球の構造と機能に対する azelastine の作用. *Prog. Med.* 7, 1325-1331, 1987.
- 20) 洲崎悦子, 昇 公一, 小林純郎, 冲増英治, 松野剛, 内海耕健: モルモット多形核白血球の刺激応答反応に対する azelastine の阻害作用. *診断と治療* 75, 2551-2556, 1987.
- 21) 藤森 徹, 原田耕吉: azelastine のヒト血小板における抗 platelet activating factor (PAF) 作用. *診療と薬理* 23, 2251-2253, 1986.
- 22) Honda, M., Miura, K. and Tanigawa, T. et al.: Effect of azelastine hydrochloride on macrophage chemotaxis and phagocytosis in vitro. *Allergy* 37, 41-47, 1982.

SUPPRESSIVE EFFECT OF AZELASTINE ON THE INDUCTION OF Df ANTIGEN
SPECIFIC IL-2 RESPONSIVENESS IN LYMPHOCYTES FROM
PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

Isao Todoroki

Department of Pediatrics, National Defense Medical College

Izumi Yoshizawa, Yutaka Kawano and Takeshi Noma

Department of Pediatrics, Saitama Medical College

Effect of azelastine on the induction of *Dermatophagoides farinae* (Df)-antigen specific IL-2 responsiveness of the lymphocytes was examined.

Azelastine suppressed the induction of IL-2 responsiveness induced by Df antigen in peripheral blood mononuclear cells from patients with bronchial asthma in a dose dependent manner. Azelastine suppressed antigen presenting adherent cells but not non-adherent responder cells (T cell rich fraction). The antigen specific IL-2 responsiveness induced by purified protein derivative (PPD) in healthy adults was also suppressed by this drug, but not by concanavalin A (Con A). These data suggest that Azelastine suppresses the antigen specific lymphocyte reactions, and that these effects are based on the weak suppressive effect on antigen presenting and/or processing pathway.