

Thromboxane A₂受容体拮抗薬 BAY u 3405の

モルモット遅発型喘息反応に対する効果

東北大学医学部第一内科学教室

井上洋西 谷 典生 飯島秀弥
五十嵐敦 岡田信司 瀧島 任

選択的 TxA₂受容体拮抗薬である BAY u 3405が、遅発型喘息反応 (LAR) 時の呼吸抵抗 (respiratory resistance; Rrs) および気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage; BAL) に与える影響を、*Ascaris suum* 抗原感作モルモットを用いて検討した。呼吸抵抗 (Rrs) は、30Hz オッシレーション法にて無麻酔下に測定し、抗原吸入前の Rrs に対する増加率 (%Rrs) で評価した。抗原吸入 2 時間後、BAY u 3405 10mg/kg または溶媒の 0.5% メチルセルロースのみを経口投与した。抗原吸入 4 および 5 時間後の %Rrs は、BAY 群ではそれぞれ 32.5±6.2%, 23.5±5.0% であったのに対し、対照群ではそれぞれ 101.4±27.5%, 77.5±19.9% で 4 および 5 時間後とも BAY 群が対照群より有意に低値を示した ($p<0.05$)。抗原吸入 4 時間後の BAL では対照群と BAY 群との間に有意な差は認められなかったが、吸入 6 時間後の BAL 中総細胞数、好酸球数およびリンパ球数は、BAY 群ではそれぞれ 274.9±70.5, 62.5±13.1, 11.3±3.3 (×10⁵ cells) であったのに対し、対照群ではそれぞれ 491.9±55.1, 198.6±43.9, 32.1±7.3 (×10⁵ cells) で、いずれも BAY 群は対照群より有意に (おのおの $p<0.05$) 少なかった。抗原吸入 4 時間後の BAL 液中の histamine (ng/ml), TxB₂ (pg/ml) および PGD₂ (pg/ml) は増加傾向を示したが、両群間に有意差はなく、LTC₄ は、両群とも測定限界 (20pg/ml) 以下であった。

以上より、選択的 TxA₂受容体拮抗薬である BAY u 3405 は、LAR 時の呼吸抵抗の上昇と気道への炎症細胞浸潤を抑制したものと考えられ、TxA₂ が LAR の発現に重要な役割をしていることが示唆された。

Key words : *Ascaris suum* — BAY u 3405 — bronchoalveolar lavage — late asthmatic response — thromboxane A₂

緒 言

thromboxane (Tx) A₂ は強い気管支収縮作用¹⁾を持ち、気道反応性を亢進させること²⁾が知られている。また、prostaglandin (PG) D₂ や PGF_{2α} などによる気道収縮反応が、一部には気道組織上の TxA₂ 受容体を介し発現すること³⁾や、leukotriene (LT) D₄ が TxA₂ の産生を亢進させることにより、一部の生理活性を示すこと⁴⁾も示唆されている。気管支喘息は気道炎症と気道過敏症の亢進をその特徴的所見としているが、炎症

に伴い気道に浸潤してくる好中球、好酸球、および resident cell であるマクロファージや肥満細胞より、TxA₂ が放出されることから、気管支喘息の病態における TxA₂ の役割に興味をもたれている。

気管支喘息患者に抗原吸入試験を施行すると、抗原吸入直後より生じる即時型喘息反応 (IAR) に引き続き、6 ないし 12 時間後に再び発作 (遅発型喘息反応; LAR) を生じること^{5,6)}がある。LAR は、IAR よりも持続が長く、概して β-刺激剤は症状の緩解に有効でなく、IAR には効果の少ないステロイド剤が奏功するという特徴を有す。更に、LAR を起こした症例にのみ抗原吸入誘発試験後に気道反応性の亢進が認められ、その亢進程度は LAR の大きさに相関するとの報告がある⁷⁾。組織学的にも、LAR 時には気道平滑筋の収縮の他、気道壁および気道内腔への炎症細胞の浸潤、気道粘膜浮腫、気道内分泌物の貯留が認められ、気管支喘息の病態の慢性化、難治化に LAR が関わっているこ

Received: July 27, 1992

Accepted: November 17, 1992

Abbreviations: BAL bronchoalveolar lavage; IAR immediate asthmatic response; LAR late asthmatic response; LT leukotriene; PG prostaglandin; PAF platelet-activating factor; TxA₂ thromboxane A₂

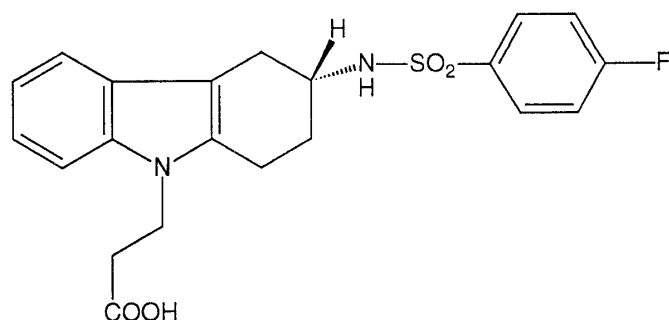


Fig. 1. The chemical structure of BAY u 3405.

とが推察されている⁸⁾。

今回、LAR における TxA_2 の役割を検討する目的で、能動感作モルモットを用い、選択的 TxA_2 受容体拮抗薬である BAY u 3405⁹⁾¹⁰⁾；(3R)-3-(4-fluorophenylsulfonamido)-1,2,3,4-tetrahydro-9-carbazolepropanoic acid (Fig. 1) が、LAR 時の呼吸抵抗 (respiratory resistance; Rrs) およびその際に施行した気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage; BAL) 液中の細胞数に与える影響を検討したので報告する。

材料および方法

1. 材料

実験に用いた Hartley 系雄モルモットは船橋農場より購入し、恒温 ($24 \pm 2.5^\circ\text{C}$) および恒湿 ($60 \pm 10\%$) の条件下にて飼育した。

Ascaris suum 抗原液はフナコシ薬品 (株) より、Silica 末は Sigma 社より、メチルセルロースは和光純薬 (株) よりそれぞれ購入した。また、BAY u 3405 はバイエル薬品 (株) より提供を受けた。

2. 方法

1) 感作法

2 週齢、体重 $212.5 \pm 2.7\text{g}$ の雄モルモット 48 匹に、*Ascaris suum* 抗原 $100\mu\text{g}$ およびシリカ 20mg を 1ml の生理的食塩水にて懸濁液としたものを腹腔内に注射し、更に 2 週後、ブースターとして同抗原 $20\mu\text{g}$ およびシリカ 20mg を同様に腹腔内投与した。更に 1 週後、吸入感作目的にて、超音波ネブライザー (オムロン社; NE-U06) に $600\text{ml}/\text{min}$ の定常気流を流し、モルモットのマスクを通じて *Ascaris suum* 抗原液 $10\text{mg}/\text{ml}$ を 2 分間吸入させた。

2) 抗原吸入チャレンジ

感作開始から 4 週間後、5 匹のモルモットを無作為的に抽出し (“感作のみ” 群)、残りの 43 匹のモルモットに対し、抗原吸入感作と同じ装置を用い、岡田ら¹¹⁾の方法にて抗原チャレンジを行った。すなわち、モルモットを無麻酔下にアクリル製のボディーボックスに入れ、首から前をボディーボックスの外に出し、モルモットの顔面に、一端を 400-mesh screen で覆ったマスクをかぶせ、マスク内外圧差より呼吸の気流速度を測定した。スピーカーを用い、体表から振幅 $2\text{cmH}_2\text{O}$ 、 30Hz の正弦波を与え、モルモットの自発呼吸に superimpose してくる 30Hz 成分をロックインアンプにより抽出し、その振幅 (ΔV) および駆動圧波との位相差 (θ) を求め、駆動圧の振幅 (ΔP) と合わせて、演算回路にて以下のように呼吸抵抗 (Rrs) を計算した。

$$\text{Rrs} = \Delta P \cdot \Delta V^{-1} \cdot \cos \theta$$

抗原吸入 15 分までは連続して Rrs を測定し、30 分後の測定の後、1 時間後より 4 ないし 6 時間後までは 1 時間間隔で Rrs を測定した。測定結果は、抗原吸入前の Rrs に対する増加率 (%Rrs) で評価した。

抗原吸入 2 時間後、Rrs 測定直後に、無作為的に抽出した 22 匹のモルモットに BAY u 3405 $10\text{mg}/\text{kg}$ の 0.5% メチルセルロース懸濁液 $5\text{ml}/\text{kg}$ を、残りの 21 匹に 0.5% メチルセルロース $5\text{ml}/\text{kg}$ のみを経口投与した。

“感作のみ” 群については抗原チャレンジを行わず、以下の気管支肺胞洗浄のみを施行した。

3) 気管支肺胞洗浄 (BAL)

抗原吸入チャレンジより 4 時間後に、薬剤投与群より 7 匹 (BAY 4 時間群)、対照群より 7 匹 (対照 4 時間群) を無作為的に抽出し、BAL を施行した。また、チャレンジより 6 時間後の Rrs 測定終了直後に、薬剤投与群より 7 匹 (BAY 6 時間群)、対照群より 7 匹 (対照 6 時間群) を無作為的に抽出し、BAL を施行した。なお、先述の “感作のみ” 群についても BAL を施行した。

BAL は以下のように行った。すなわち、モルモットを $50\text{mg}/\text{kg}$ i.p. のペントバルビタールにて到死後、開胸し、気管内に挿入したカニューレを通して、生理的食塩水 10ml にて 3 回、BAL を行った。回収された BAL 液は滅菌ガーゼを通して粘液を除去した後、 $200 \times g$ にて 5 分間遠心した。抗原チャレンジ 4 時間後に BAL を施行した 14 匹および “感作のみ” 群 5 匹については、上清をケミカルメディエーター (histamine, LTC_4 , PGD_2 , TxB_2) 定量のため -20°C にて保存した。

沈渣は、これに生理的食塩水を加えて4ml とした後、よく混合し、その一部を hemocytometer にとり、BAL 液中の総細胞数を求めた。残液を再度遠心し、得られた沈渣を cytospin (Shandon 社製) にて塗抹標本を作成した。これを Wright-Giemsa 染色し、光顕下に細胞分画を検討した。尚、上清中のケミカルメディエーターの定量は、三菱油化ビーシーエルに委託し、radioimmunoassay により行った。

4) 統計

総ての測定値は、平均値±標準偏差(S.E.)にて表示し、Welch 型, unpaired t-test を用いて比較した。有意水準は両側検定にて 5% とした。

結 果

1. %Rrs の経時的变化

Fig. 2 に対照 6 時間群 14 匹および BAY 6 時間群 15 匹の %Rrs の推移を示す。抗原チャレンジ後、全モットにおいて Rrs の急激な上昇が認められ (IAR), 15 分以内にピークに達した。%Rrs のピーク値には、対

照群と薬剤投与群との間に有意な差は認められなかった。両群とも %Rrs はチャレンジ 2 時間後までは下降を続けたが、その後再上昇し (LAR), 3 時間後をピークに、以後下降した。チャレンジ 4 時間後あるいは 5 時間後の Rrs 増加率は、対照群ではそれぞれ $101.4 \pm 27.5\%$, $77.5 \pm 19.9\%$ であったのに対し、薬剤投与群ではそれぞれ $32.5 \pm 6.2\%$, $23.5 \pm 5.0\%$ で、4 時間後、5 時間後とも薬剤投与群の %Rrs は対照群と比較し、有意に低値を示した ($p < 0.05$) (Fig. 2)。なお、抗原チャレンジ 4 時間後に BAL を施行した、対照群および薬剤投与群の各 7 匹についても %Rrs は Fig. 2 と同様の推移を示し、IAR の大きさは群間に有意差を認めなかった。また抗原チャレンジ 4 時間後の %Rrs は、薬剤投与群は対照群に比較し、有意ではないが低値を示した。

2. 気管支肺胞洗浄

BAL 液の回収率は、“感作のみ”群、対照 4 時間群、対照 6 時間群、BAY 4 時間群、BAY 6 時間群でそれぞれ $82.0 \pm 2.6\%$, $81.4 \pm 3.9\%$, $86.4 \pm 1.4\%$, $83.6 \pm 2.6\%$, $84.3 \pm 2.3\%$ であり、どの群間にも有意差は認められなかった。

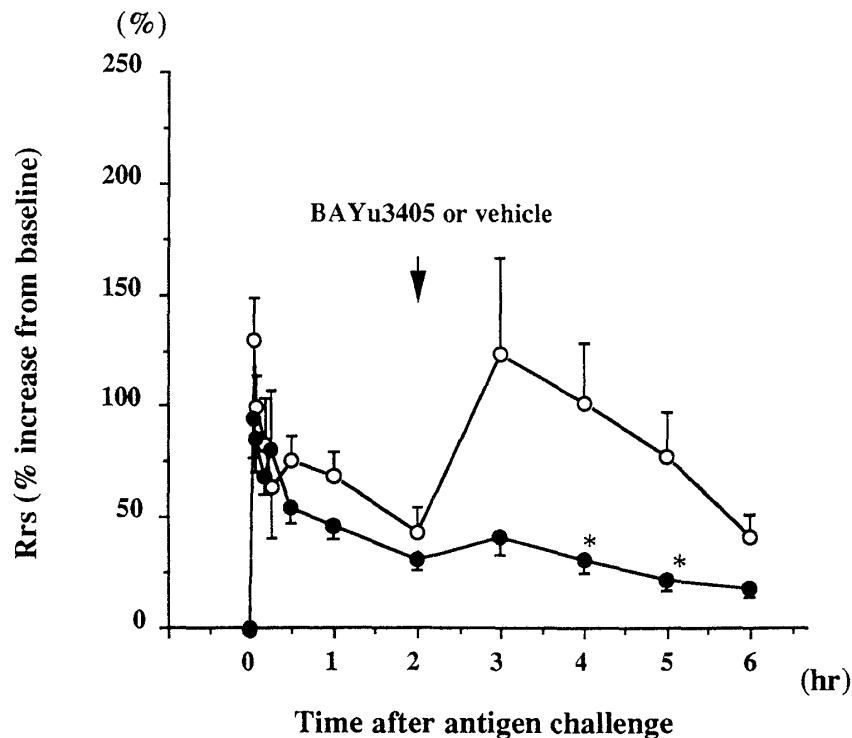


Fig. 2. Effect of BAY u 3405 on antigen-induced LAR in guinea pigs; Control (○, n=14); BAY u 3405 10mg/kg (●, n=15): Values are mean±S.E. of percentage increase of baseline in Rrs. BAY u 3405 or vehicle administered orally 2 hrs after antigen challenge. *; $p < 0.05$, statistical difference from control.

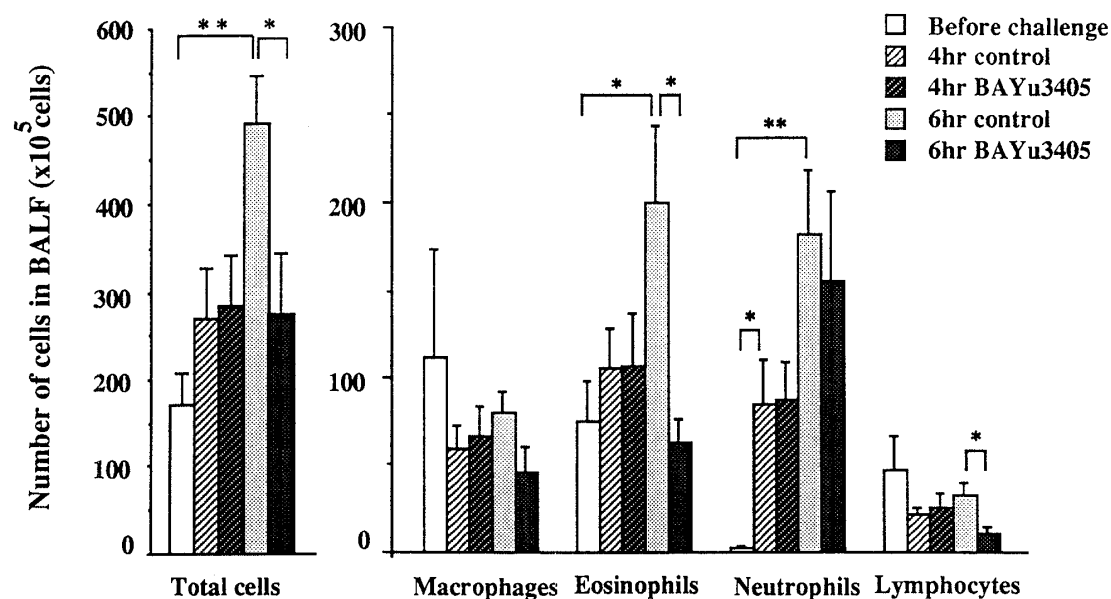


Fig. 3. Effect of BAY u 3405 on total cell count and differential cells in BAL fluid at before, 4hrs and 6hrs after antigen challenge of *Ascaris suum.*; Values are mean $\pm$ S.E. of number of cells. BAY u 3405 10mg/kg administered orally 2 hrs after the challenge. 0.5% methyl-cellulose was alone administered in a similar manner to guinea pigs as the control. * and ** significant differences from control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

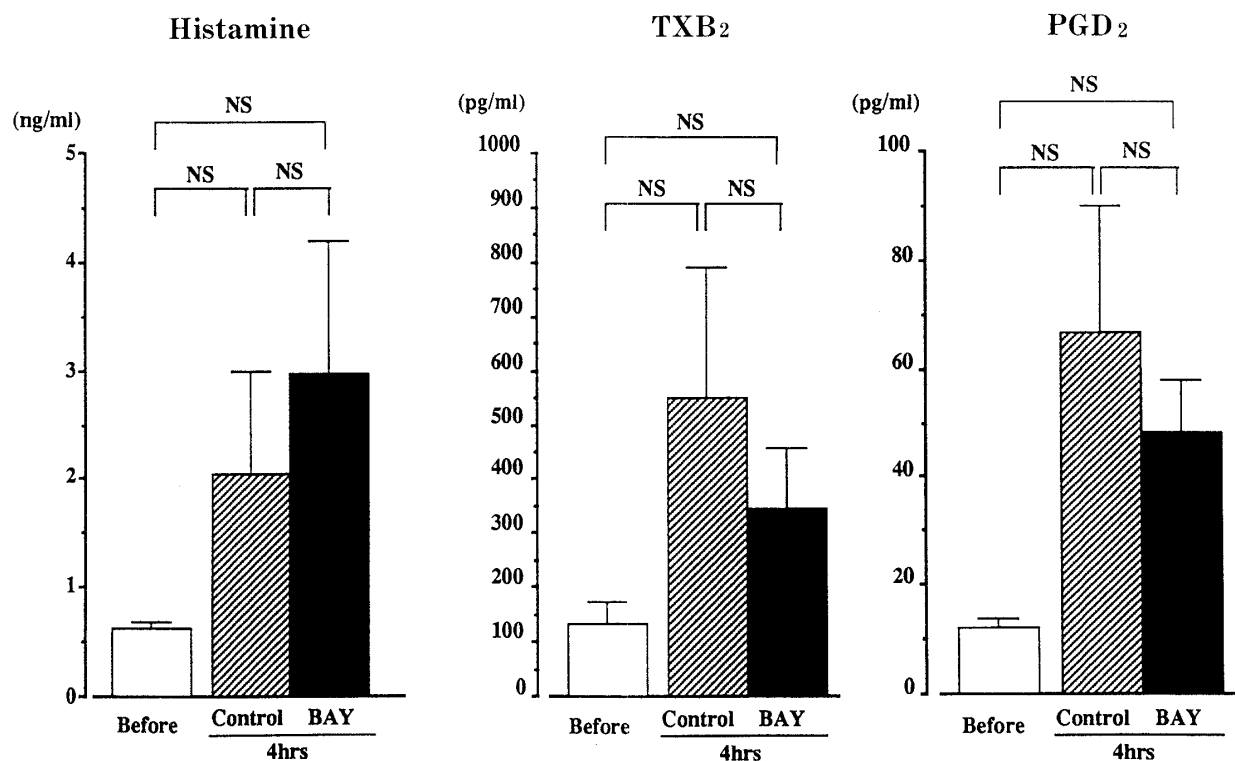


Fig. 4. Effect of BAY u 3405 on histamine, TXB₂ and PGD₂ in BAL fluid at before and 4 hrs after antigen challenge of *Ascaris suum.*; Values are mean $\pm$ S.E. of concentration of mediator. BAY u 3405 10mg/kg administered orally 2 hrs after the challenge. 0.5% methyl-cellulose was alone administered in similar manner to guinea pigs as the control.

1) 総細胞数および細胞分画

BAL 液中の総細胞数 ($\times 10^5$ cells) は, “感作のみ” 群, 対照 4 時間群, 対照 6 時間群, BAY 4 時間群, BAY 6 時間群でそれぞれ 155.8 ± 41.6 , 270.0 ± 58.0 , 491.9 ± 55.1 , 285.3 ± 57.6 , 274.9 ± 70.5 であった (Fig. 3). すなわち, 抗原チャレンジ 4 時間後の BAL では, 対照群と薬剤投与群との間に有意差は認められず, 両群とも “感作のみ” 群に比較し, 総細胞数は多い傾向にあったが, その差は有意ではなかった. 抗原チャレンジ 6 時間後の BAL では, “感作のみ” 群および薬剤投与群が対照群に比較し, 総細胞数が有意に低かった ($p < 0.01$, $p < 0.05$). BAY 6 時間群は, “感作のみ” 群, 対照 4 時間群, および BAY 4 時間群のどれとも, 総細胞数に有意差は認められなかった.

細胞分画の結果を Fig. 3 に示す. neutrophils は, “感作のみ” 群と比較し, 対照 4 時間群, 6 時間群および BAY 4 時間群, 6 時間群ともに有意に高値であった ($p < 0.05$, $p < 0.01$). eosinophils は同様に, 対照 6 時間群で “感作のみ” 群と比べ有意に高値 ($p < 0.05$) であったが, BAY 6 時間群は, 対照 6 時間群と比べ有意に低値 ($p < 0.05$) であった. 一方, macrophages においては, 対照群, BAY 群とも “感作のみ” 群に比し高値の傾向は認められなかった. なおリンパ球数は, BAY 6 時間群では対照 6 時間群と比べ有意に低値 ($p < 0.05$) であった.

2) ケミカルメディエーター

BAL 液中の histamine (ng/ml), TxB_2 (pg/ml), および PGD_2 (pg/ml) は, “感作のみ” 群では各々 0.60 ± 0.05 , 136.60 ± 48.57 , 11.68 ± 1.87 , 対照群では各々 2.06 ± 0.83 , 549.00 ± 244.16 , 66.80 ± 23.13 , 薬剤投与群では各々 2.98 ± 1.22 , 346.43 ± 112.16 , 48.20 ± 9.56 であった. 対照 4 時間群および BAY 4 時間群は, “感作のみ” 群に比べ, 上記 3 つのケミカルメディエーターとも, 有意ではないが高値を示した. なお, 対照群と薬剤投与群との間には有意差は認められなかった (Fig. 4). LTC_4 については, いずれの群とも測定限界 (20 pg/ml) 以下であった.

考 察

Coombs I 型アレルギー反応にて活性化された肥満細胞が即時型喘息発作発症に深く関わっていることについては, これまでに数多くの研究結果より明らかと

されているが, それに引き続いて起こる気道の炎症がより気管支喘息の病態を反映し, 発作の蔓延化, 重症化をまねくものとして近年注目されている.

気管支喘息患者に抗原吸入誘発試験を施行すると, 即時型喘息反応に続いて肥満細胞より放出された化学伝達物質のうち, LTB_4 , PAF, NCF-A, ECF-A など好中球および好酸球を気道に遊走させる. 気道に浸潤したこれら炎症細胞は活性化され, さらに種々の化学伝達物質を放出する. この結果, 気管支平滑筋の収縮, 気道粘膜下浮腫, 気道内分泌物の貯留が生じ, 遅発型喘息反応が発症するとされている¹²⁾⁻¹⁶⁾. また interleukin (IL)-1 等のメディエーターがリンパ球を活性化し, これらリンパ球およびマクロファージより放出されるサイトカインが, 気道に浸潤した好中球や好酸球をさらに活性化して, 炎症を増悪させ, 病態を複雑にしていくものと考えられている¹⁷⁾.

Iijima ら¹⁸⁾ は, モルモットの遅発型喘息反応時の組織変化を検討し, 気管支内腔には好中球, 気道壁内には好酸球の浸潤を認めている. また, de Monchy ら¹⁹⁾ は, ヒトの LAR 時の BAL 液中に好酸球と ECP が増加することから, 活性化した好酸球が LAR 発現に重要な役割を果たしている可能性を示唆している.

一方, 動物モデルを用いた LAR の発現に Tx や LTs などの化学伝達物質が関与していることが指摘され²⁰⁾²¹⁾, ヒトにおいても抗原吸入後の即時型喘息反応および遅発型喘息反応において, TxA_2 が血漿および BAL 液中に増加していることが報告されている²²⁾⁻²⁵⁾.

Iwamoto ら²²⁾ は, Tx 合成酵素阻害薬である OKY-046 を用いてその前投与がヒト即時型喘息反応, ならびに引き続いて起こる遅発型喘息反応とともに抑制することを報告した. この場合, IAR を抑制したことが LAR の発現を抑制した可能性も否定できない. そこで今回の研究では, 抗原吸入チャレンジではば一定の大きさの IAR を惹起させた後に特異的 Tx 受容体拮抗薬である BAY u 3405⁹⁾¹⁰⁾ を投与し, LAR が抑制されるか否かを検討した.

同薬の同量については Francis ら²⁶⁾ が, モルモットに TxA_2 , mimetics である U-46619 を静注し, これにより生じた気道収縮に対する BAY u 3405 の経口投与 ($0.1 \sim 10 \text{ mg/kg}$) の抑制効果を検討し, 10 mg/kg 投与にて有意な抑制効果を認めていることより, 10 mg/kg の経口投与とした. これは LAR 時に十分な薬効を期待しうる量と考えた.

本研究では、抗原チャレンジにて全モルモットに IAR が生じ、%Rrs のピーク値は対照群と薬剤投与群との間で有意な差は認められなかった。チャレンジ 2 時間後、薬剤投与群には BAY u 3405 10mg/kg を経口投与したところ、Fig. 2 にみられるように、抗原チャレンジ 4 時間後および 5 時間後の %Rrs が対照群に比べ、有意に低値であった。これは、BAY u 3405 が LAR における Rrs の上昇を抑制したと解釈することができ、Tx が LAR 時の重要な気道閉塞惹起物質の一つであることが推察される。しかしながら、今回定量した LAR 時の TxB_2 量は増加傾向であったものの、統計的な有意差は得られなかった。測定値のバラツキが大きかったためと考えられるが、一方で同様に増加傾向を示した PGD_2 の LAR への関与も見逃せない。 PGD_2 はモルモットおよびヒト気管支平滑筋ならびに肺切片を収縮させる。この PGD_2 の作用は TxA_2 receptor を介して作動しているといわれ、BAY u 3405 前処置で完全に拮抗される。

また、強力に気道収縮を惹起させる LTC_4 も、今回の定量で明らかな増加を認めなかったものの、これらの一部は好中球などの細胞を刺激して TxA_2 を産生するといわれている。したがって、BAY u 3405 の LAR の抑制はこれらメディエーターの作用を総合的に阻害した結果と理解できる。ただし、BAY u 3405 の投与でも呼吸抵抗が baseline にまで戻らなかったことから、今回増加傾向の認められた histamine を含む他のメディエーターの関与も推察された。

抗原チャレンジ 4 時間後の BAL は、対照群と BAY 群とで総細胞数および各細胞分画に有意な差は認められなかった。両群とも“感作のみ”群と比べると、好中球のみ有意に高値であり、それ以外の細胞分画には有意な差は認められなかった。抗原チャレンジ 6 時間後の BAL では、対照群は“感作のみ”群に比べ、総細胞数、好酸球数および好中球数が有意に高値であったが、BAY 群は抗原チャレンジ 4 時間後の対照群および BAY 群の BAL 所見とほぼ同じであった。また、対照 6 時間群と BAY 6 時間群との比較では、総細胞数、好酸球数およびリンパ球数が BAY 群で有意に低値であった。

以上の結果より、 TxA_2 受容体特異的拮抗薬は、LAR 初期の細胞浸潤は抑制しないが、その後の細胞浸潤を抑制すると推察された。Lötvall ら²⁷⁾は TxA_2 の mimetics である U46619 がモルモットの気道に microvascular leakage を濃度依存性に起こし、これが

TxA_2 受容体拮抗薬である ICI-192605 で抑制されることを報告している。 TxA_2 に細胞遊走活性は報告されていないことを考慮に入れると、今回の BAY u 3405 の気道内細胞浸潤抑制効果は、airway microvascular leakage による細胞浸潤促進を抑制した可能性も否定できない。

今回の研究結果からは、 TxA_2 のソースを同定することはできないが、LAR がほぼピークとなる抗原チャレンジ 4 時間後の BAL 中に有意に増えているのが好中球のみであるため、まずは好中球が重要なソースである可能性が指摘しうる。

Iijima ら¹⁸⁾は、LAR の出現したモルモットの抗原チャレンジ 6 時間後の肺の組織学的検討および BAL を行い、BAL 中に好酸球がそれほど増加していなくとも、組織には好酸球の浸潤が著明であることを観察し、気道壁への細胞浸潤とそれらの気道腔内への出現とには時間的ズレがあることを推察している。抗原チャレンジ 6 時間後の BAL で、対照群のみで好酸球が増えており、BAY 群でリンパ球が少なかったが、この所見は、%Rrs がピークであった時期の気道壁内の細胞浸潤の様子を反映している可能性もある。好酸球は LTC_4 、 D_4 、PAF、活性酸素等の気道収縮および粘膜浮腫惹起物質を放出しうる^{28)–31)}こと、およびリンパ球が IL-3、IL-5、granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) 等のリンホカインを放出して好酸球を priming 化および活性化させること³²⁾が知られている。こうしたことから、BAY u 3405 が LAR 時の気道閉塞症状を抑制した機序として気道平滑筋収縮および気道粘膜浮腫の抑制作用以外にも、気道炎症を増悪させる炎症細胞の浸潤自体を血管透過性亢進を阻止することにより抑制するという間接的作用も考えられた。このうちどちらがより重要であるかについては今回の研究結果のみからは判断は困難である。

結 論

1. TxA_2 受容体特異的拮抗薬である BAY u 3405 はモルモットの遅発型喘息反応において、呼吸抵抗の上昇と気道への炎症細胞浸潤を抑制した。
2. このことより、遅発型喘息反応の発現において TxA_2 が重要な役割を果たしていることが示唆された。
3. 肺胞気管支洗浄液中の histamine、 TxB_2 、 PGD_2

は、抗原吸入チャレンジ4時間後に有意ではないが増加傾向を示し、BAY u 3405の前投与による影響をうけなかった。また、LTC₄については、いずれの群とも測定限界(20pg/ml)以下であった。

4. 特異的 TxA₂受容体拮抗薬である BAY u 3405 は慢性難治性喘息患者の治療薬として有用である可能性が示唆された。

文 献

- 1) Svensson, J., Strandberg, K., Tuvemo, T. and Hamberg, M.: Thromboxane A₂: Effect on airway and vascular smooth muscle. *Prostaglandins* 14, 425-436, 1977.
- 2) O'Byrne, P.M. and Fuller, R.W.: The role of thromboxane A₂ in the pathogenesis of airway hyperresponsiveness. *Eur. Respir. J.* 2, 782-786, 1989.
- 3) Featherstone, R.L., Robinson, C., Holgate, S.T. and Church, M.K.: Evidence for thromboxane receptor mediated contraction of guinea-pigs and human airways in vitro by prostaglandin (PG)D₂, 9α, 11β-PGF₂ and PGF_{2α}. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 341, 439-443, 1990.
- 4) Creese, B.R., Bach, M.K., Fitzpatrick, F.A. and Bothwell, W.M.: Leukotriene-induced contraction and thromboxane production in guinea-pig lung parenchymal strips. *Eur. J. Pharmacol.* 102, 197-204, 1984.
- 5) Booi-Noord, H., Orie, N.G.M. and de Vries, K.: Immediate and late bronchial obstructive reactions to inhalation of house dust and protective effects of disodium cromoglycate and prednisolone. *J. Allergy Clin. Immunol.* 48, 344-354, 1971.
- 6) Robertson, D.G., Kerigan, A.T., Hargreave, F. E., Chalmers, R. and Dolovich, J.: Late asthmatic responses induced by ragweed pollen allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 54, 244-254, 1974.
- 7) Cartier, A., Thomson, N.C., Frith, P.A., Roberts, R., Tech, M. and Hargreave, F.E.: Allergen-induced increase in bronchial responsiveness to histamine: Relationship to the late asthmatic response and challenge in airway caliber. *J. Allergy Clin. Immunol.* 70, 170-177, 1982.
- 8) O'Byrne, P.M., Dolovich, J. and Hargreave, F. E.: Late asthmatic responses. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136, 740-751, 1987.
- 9) Darius, H., Michael-Hepp, J. and Meyer, J.: Receptor binding properties of the new and specific thromboxane receptor antagonist BAY u3405. *Agents Actions* (Suppl. 37), 157-161, 1992.
- 10) Theis, J.G.W., Dellweg, H., Perzbon, E. and Gross, R.: pH-dependent binding of the TxA₂/PGH₂ receptor of human platelet membranes to various ligands. *Agents Actions* (Suppl. 37), 222-227, 1992.
- 11) 岡田信司, 飯島秀弥, 木村啓二, 井上洋西, 瀧島任: 遅発型喘息反応モデル—モルモットを用いた検討. “気道過敏性研究の新展開”(瀧島 任, 宮本昭正 編), 文光堂, 東京, pp.203-212, 1989.
- 12) Kajita, T., Yui, Y., Mita, H., Taniguchi, N., Saito, H., et al.: Release of leukotriene C₄ from human eosinophils and its relation to the cell density. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 78, 406-410, 1985.
- 13) Drazen, J.M., Austen, K.F., Lewis, R.A., Clark, D.A., Goto, G., et al.: Comparative airway and vascular activities of leukotrienes C-1 and D in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4354-4358, 1980.
- 14) Dahlen, S.E., Bjork, J., Hedqvist, P., Arfors, K. E., Hammarstrom, S., et al.: Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: In vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3887-3891, 1981.
- 15) Barnes, P.J., Chung, K.F. and Page, C.P.: Platelet-activating factor as a mediator of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 81, 919-934, 1988.
- 16) Lagente, V., Desquand, S., Hadvery, P., Cirino, M., Lellouch-Tubiana, A., et al.: Interference of the Paf antagonist Ro19-3704 with Paf and antigen-induced bronchoconstriction in the guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.* 94, 27-36, 1988.
- 17) 宮川秀文, 難波一弘, 白石高昌, 名部 誠, 榎本晃, 他: 重症難治性喘息におけるIV型アレルギーの関与について—カンジダ抗原によるIL₂産生能と好中球遊走活性—, アレルギー 37, 12-18, 1988.
- 18) Iijima, H., Ishii, M., Yamauchi, K., Chao, C.-L., Kimura, K., et al.: Bronchoalveolar lavage and histologic characterization of late asthmatic response in guinea pigs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136, 922-929, 1987.
- 19) de Monchy, J.G.R., Kauffman, H.F., Venge, P., Koeter, G.H., Jansen, H.M., et al.: Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am. Rev.*

- Respir. Dis.* 131, 373-376, 1985.
- 20) Abraham, W.M., Stevenson, J.S. and Garrido, R.: A leukotriene and thromboxane inhibitor (Sch 37224) blocks antigen-induced immediate and late responses airway hyperresponsiveness in allergic sheep. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247, 1004-1011, 1988.
 - 21) 岡田信司, 井上洋西, 飯島秀弥, 荒谷秀和, 山田昇, 瀧島 任: モルモット遅発型喘息反応に対する LT 拮抗剤 (ONO-1078) の抑制効果. 呼吸 9, 1399-1402, 1990.
 - 22) Iwamoto, I., Ra, C., Sato, T., Tomioka, H. and Yoshida, S.: Thromboxane A_2 production in allergen-induced immediate and late asthmatic responses. Its possible role in inducing the late response. *J. Asthma* 25, 117-124, 1988.
 - 23) Shephard, E.G., Malan, L., Macfarlane, C.M., Mouton, W. and Jourbert, J.R.: Lung function and plasma levels of thromboxane B_2 , 6-ketoprostaglandin $F_{1\alpha}$ and β -thromboglobulin in antigen-induced asthma before and after indomethacin pretreatment. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 19, 459-470, 1985.
 - 24) Seltzer, J., Bigby, B.G., Stulbarg, M., Holtzman, M.J., Nadel, J.A., et al.: O_3 -induced change in bronchial reactivity to methacholine and airway inflammation in humans. *J. Appl. Physiol.* 60, 1321-1326, 1986.
 - 25) Wenzel, S.E., Westcott, J.Y., Smith, H.R. and Larsen, G.L.: Spectrum of prostaglandin release after bronchoalveolar allergen challenge in atopic asthmatics and in control groups. *Am Rev. Respir. Dis.* 139, 450-457, 1989.
 - 26) Francis, H.P., Greenham, S.J., Patel, U.P., Thompson, A.M. and Gardiner, P.J.: BAY u 3405 an antagonist of thromboxane A_2 - and prostaglandin D_2 -induced bronchoconstriction in the guinea pig. *Br. J. Pharmacol.* 104, 596-602, 1991.
 - 27) Lötvall, J.O., Elwood, W., Tokuyama, K., Barnes, P.J. and Chung, K.F.: A thromboxane-mimetics, U-46619, produces plasma exudation in airways of the guinea pig. *J. Appl. Physiol.* 72, 2415-2419, 1992.
 - 28) Weller, P.F., Lee, C.W., Foster, D.W., Corey, E. J., Austen, K.F. and Lewis, R.A.: Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophils: Predominant production of leukotriene C_4 . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7626-7630, 1983.
 - 29) Lee, T.C., Lenihan, D.J., Malone, B., Roddy, L.L. and Wasserman, S.I.: Increased biosynthesis of platelet-activating factor in activated human eosinophils. *J. Biol. Chem.* 259, 5526-5530, 1984.
 - 30) Frigas, E., Loegering, D.A., Sollery, G.O., Farrow, G.M. and Gleich, G.J.: Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clin. Proc.* 56, 345-353, 1981.
 - 31) Motojima, S., Frigas, E., Loegering, D.A. and Gleich, G.J.: Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium in vitro. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139, 801-805, 1989.
 - 32) Kay, A.B.: Cells in relation to bronchial asthma. Cell-mediated Immunity and Asthma. I: General. “第10回六甲カンファレンス” (小林節雄, 長野 準, 中島重徳, 宮本昭正 編), 日本アトセル・シュプリングー, 東京, pp.141-146, 1990.

EFFECT OF THROMBOXANE RECEPTOR ANTAGONIST, BAY u 3405 ON THE LATE PHASE PULMONARY RESPONSE IN GUINEA PIGS

Hiroshi Inoue, Norio Tani, Hideya Iijima, Atsushi Igarashi, Shinji Okada and Tamotsu Takishima
First Department of Internal Medicine, Tohoku University School of Medicine

The effect of the specific thromboxane (Tx) A_2 receptor antagonist, BAY u 3405 on the late asthmatic response (LAR) was investigated in guinea pigs which are sensitized actively with *Ascaris suum* antigen. Respiratory resistance (Rrs) of awaked guinea pigs was measured by 30 Hz oscillation method for 6 hours after antigen challenge. %Rrs was calculated as the increase rate of Rrs to baseline Rrs (pre-challenge value). Ten mg/kg of BAY u 3405 or vehicle (0.5% methyl cellulose) was administered orally after the end of immediate asthmatic response, i.e., 2 hours after antigen challenge. %Rrs of the control group at 4 and 5 hours after antigen challenge were $101.4 \pm 27.5\%$ and $77.5 \pm 19.9\%$, respectively. Those of the BAY group were $32.5 \pm 6.2\%$ and $23.5 \pm 5.0\%$, respectively. %Rrs of the BAY group were significantly lower than those of the control group at both timings ($p < 0.05$). No significant difference was shown between the BAY group and the control group in the results of the bronchoalveolar lavage (BAL) 4 hours after challenge. Concerning the results of BAL at 6 hours after challenge, the total cell count and its segment, eosinophils count and lymphocytes count in the BAY group were 274.9 ± 70.5 , 62.5 ± 13.1 , 11.3 ± 3.3 ($\times 10^5$ cells), respectively, resulting in significantly smaller numbers (each $p < 0.05$) than those in the control group which were 491.9 ± 55.1 , 198.6 ± 43.9 , 32.1 ± 7.3 ($\times 10^5$ cells), respectively. The concentrations of histamine (ng/ml), TxB_2 (pg/ml) and PGD_2 (pg/ml) in the BAL fluid at 4 hours after challenge were 2.06 ± 0.83 , 549.00 ± 244.16 , and 66.80 ± 23.13 , respectively, in the control group. They were not significantly different from those in the BAY group (2.98 ± 1.22 , 346.43 ± 112.16 and 48.20 ± 9.56 , respectively). LTC_4 could not be detected (less than 20 pg/ml) in the BAL fluid of both groups.

These results suggest that BAY u 3405 inhibited the increase of Rrs and cellular infiltration to airways tissue at LAR, and therefore that TxA_2 may play an important role in the pathogenesis of LAR.
