

抗原吸入によるラット気道の血管透過性亢進作用に対する 新規抗アレルギー薬 KW-4679の影響

協和発酵工業(株)医薬研究所

大森健守 石井秀衛 佐々木康夫

新規抗アレルギー薬 KW-4679のラット気道における抗原誘発血管透過性亢進反応に及ぼす影響をケトチフェンおよびターフェナジンの作用と対比して検討した。マウスモノクローナル IgE 抗体で受身感作したラットに抗原を吸入させると、その気管と主気管支で、血管透過性亢進作用の指標である漏出色素量が著明に増加した。KW-4679 0.3~10mg/kg 経口投与は本反応を有意に抑制した。気管での EC40 は4.9mg/kg、主気管支での EC40は0.47mg/kg であった。ケトチフェンも両部位で抑制作用を発現し、その ED40は気管で13.4mg/kg、主気管支で10.8mg/kg であった。ターフェナジンも両部位で抑制作用を発現し、その ED40値は気管で66.4mg/kg、主気管支で51.7mg/kg であった。以上の成績から、KW-4679は IgE 抗体が関与する気道における血管透過性亢進反応を抑制すること、その抑制作用はケトチフェンおよびターフェナジンに比べ低用量から発現することが明らかとなった。

Key words: bronchial asthma — KW-4679 — microvascular leakage — monoclonal IgE antibody

緒 言

気管支喘息患者の気道においては、気道上皮の剝離、気道分泌物の貯留、粘液腺過形成、気道平滑筋の収縮、基底膜肥厚、炎症細胞浸潤、血管拡張、粘膜浮腫などの病理所見が観察される。特に、血管透過性亢進作用に基づく浮腫は気道抵抗の増加や気道過敏性形成に影響を及ぼすことが明らかにされてきた¹⁾。したがって、気道における血管透過性亢進作用を抑制することは気管支喘息の予防や治療に貢献するものと考えられる。

KW-4679 { (Z)-11-[3-(dimethylamino) propylidene]-6, 11-dihydrodibenz [b, e] oxepin-2-acetic acid monohydrochloride } は²⁾気管支喘息、通年性アレルギー性鼻炎および慢性蕁麻疹などのアレルギー性疾患の予防および治療に有効な薬物である。我々は KW-4679が選択的なヒスタミン H₁受容体拮抗

作用、ラット腹腔肥満細胞からのメディエーター遊離抑制作用、フィールド電気刺激時のタキキニン誘発モルモット気管支平滑筋収縮反応の抑制作用³⁾と、ヒト好中球のロイコトリエン産生や血小板活性化因子産生の抑制作用⁴⁾などを有することを報告してきた。さらに、KW-4679がラット passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 抑制作用⁵⁾、感作モルモットにおける抗原誘発遅発型喘息反応や気道過敏性の形成を抑制する⁶⁾などの幅広い活性を有する薬物であることも報告してきた。しかし、気道抵抗の増加や気道過敏性形成に密接に関係する気道粘膜浮腫に及ぼす本薬物の影響は明らかではない。そこで今回、マウスのモノクローナル IgE 抗体で受身感作したラットに抗原を吸入させた時に発現する気道での血管透過性亢進作用に及ぼす KW-4679の効果について検討した。なお、抗アレルギー薬として繁用されているケトチフェンおよびターフェナジンを比較対照薬として用いた。

実験方法

1. 使用動物

Balb/c 系雄性マウス（日本チャールズリバー（株）、7 週齢）およびドンリユウ系雌性ラット（日本ラット

Received: November 13, 1995

Accepted: February 16, 1996

Abbreviations: BSA bovine serum albumin; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay; IgE immunoglobulin E; PCA passive cutaneous anaphylaxis; TNP 2,4,6-trinitrobenzene-1-sulfonic acid sodium salt; TNP-BSA trinitrophenyl-conjugated bovine serum albumin

(株), 体重220~240g)を購入し, 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後, 実験に供した。

2. 使用薬物

被験薬物として用いた KW-4679およびフマル酸ケトチフェンは協和発酵工業(株)医薬研究所において合成し, いずれも注射用蒸留水に溶解し, 5ml/kg 体重の割合で経口投与した。ターフェナジン (Merrell Dow) は0.3%の carboxymethyl cellulose Na 溶液に懸濁して経口投与した。その他, 実験に使用した薬物はエバンスブルー(和光純薬), ウシ血清アルブミン(以下 BSA と略, 和光純薬), 2,4,6-trinitrobenzene-1-sulfonic acid sodium salt (以下 TNP と略, 東京化成), pristane (東京化成) およびペントバルビタール(ネプタール注射液, 大日本製薬)である。抗原には幅と浜岡の方法⁷⁾にしたがい BSA と TNP 基を結合させた TNP-BSA を用いた。

3. TNP 特異的マウスのモノクローナル IgE 抗体の作製

TNP-BSA で感作したマウス脾細胞とマウスミエローマ細胞の細胞融合で作成した TNP-specific マウス IgE 産生ハイブリドーマである TIB142細胞を ATTC 社から購入した。免疫抑制薬の pristane を前投与したマウスの腹腔内に TIB142細胞 (16×10^6 個)を移植し, その7日後, マウスの腹水を採取し, Rudolph らの方法⁸⁾にしたがい IgE 抗体を精製した。なお, anti-mouse-IgE-peroxydase を用いた ELISA 法で検討した結果, monoclonal TNP-specific mouse IgE 抗体の濃度依存性に吸光度の上昇が認められた。ラットを用いた48時間 heterologous PCA における本抗体の力価は $1:2^{16}$ であった。

4. ラットの気道における血管透過性亢進反応

一群9匹のラットを用いた。マウスモノクローナル IgE 抗体を生理食塩液で128倍に希釈後, 5ml/kg 体重の割合でラットの尾静脈内に投与し受身感作した。18~24時間後にエバンスブルー溶液 (50mg/kg) を静脈内投与したのち, ラットをプラスチック製観察箱(縦18cm×横22cm×高さ12cm)に入れ, 0.1%の TNP-BSA (1mg/ml) を日商式吸入用コンプレッサー(日本商事製)および日商式ガラスネブライザー(日本商事製)で吸入暴露した。20分後, ペントバルビタール (50mg/kg) を腹腔内投与して麻酔し, 腹部下行大動脈から放血致死後, 右心室から 37°C に加温した生理食塩液10mlを注入し肺を灌流した⁹⁾。気管と主気管支を摘出

し, 生理食塩液で洗ったのち, ガーゼで水分をふきとり, それぞれの重量を測定した。血管透過性亢進反応の指標とした漏出色素量は Katayama らの方法¹⁰⁾に準じて抽出し, 定量した。すなわち, 各組織を3Nの KOH 0.5ml に加え, 37°C で24時間加温した。その後, 12Nの HCl 0.2ml を加え攪拌し組織が溶解したことを確認したのち, 0.6Nのリン酸とアセトンの混合(5:13)液4.5mlを加えて色素を抽出し, 波長620nmで比色定量した。漏出色素量は単位重量 (mg) あたりで表記した。被験薬物は抗原吸入暴露の1時間前に経口投与した。感作ラットに抗原吸入暴露した群を対照群, 抗原吸入暴露の代わりに生理食塩液を吸入暴露させた群を陰性対照群とした。薬物投与時の抑制率は次式にて求めた。なお, 今回検討した投与量の範囲では各薬物の最大抑制率は40~60%台に留まったので, 40%抑制用量 (ED40) を抑制率の回帰直線から算出した。

抑制率 (%) =

$$\left(1 - \frac{\text{薬物投与群の色素量} - \text{陰性対照群の色素量}}{\text{対照群の色素量} - \text{陰性対照群の色素量}}\right) \times 100$$

5. 統計処理

数値は平均値±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 Unpaired t-test を, 多群間(対照群と薬物投与群間)の検定には Scheffe の多重比較検定を用いた。 $p < 0.05$ をもって有意とした。

実験結果

感作ラットに抗原を吸入暴露した対照群では, 生理食塩液を吸入暴露させた陰性対照群に比べ, 漏出色素量は気管で4.2倍に, 主気管支で3.6倍に増加した (Table 1)。KW-4679 0.3~10mg/kg 経口投与群では, 対照群に比べ気管および主気管支で漏出色素量が減少した。気管では1および10mg/kg 投与群で有意な作用が認められ, ED40は4.9mg/kgであった。主気管支では1, 3および10mg/kg 投与群で有意な作用が認められた。ED40は0.47mg/kgであり, 気管での ED40に比べ低用量であった。ケトチフェンも両部位で抑制作用を発現し, ED40は気管で13.4mg/kg, 主気管支で10.8mg/kgであった。ターフェナジンも両部位で抑制作用を発現し, その ED40は気管で66.4mg/kg, 主気管支で51.7mg/kgであった。両部位での三薬物の効果を比較すると, KW-4679が最も低用量から有効であっ

Table 1 Effect of KW-4679, ketotifen and terfenadine on antigen-induced Evans blue(EB) dye extravasation (ng mg⁻¹ tissue) in passively sensitized rat airways

Treatment	Dose (mg/kg, po)	EB dye extravasation (ng mg ⁻¹ tissue)	
		Trachea	Main bronchus
Unchallenged	...	49.0 ± 2.3	79.4 ± 5.8
Control	...	205.1 ± 8.0#	287.3 ± 9.9#
KW-4679	0.3	190.3 ± 13.9 (9.5)	225.7 ± 14.6 (29.6)
	1	129.1 ± 11.3* (48.7)	155.1 ± 7.2* (63.6)
	3	173.8 ± 11.9 (20.1)	206.3 ± 12.9* (39.0)
	10	128.9 ± 22.7* (48.8)	153.3 ± 10.9* (64.5)
Ketotifen	1	202.5 ± 16.6 (1.7)	263.5 ± 12.9 (11.4)
	3	210.7 ± 17.4 (-3.6)	244.0 ± 12.0 (20.8)
	10	129.2 ± 19.8* (48.6)	178.3 ± 11.0* (52.4)
	30	126.2 ± 11.2* (50.5)	195.4 ± 10.4* (44.2)
Terfenadine	10	223.3 ± 18.4 (-11.7)	256.7 ± 23.1 (14.7)
	30	162.9 ± 18.0 (27.0)	190.8 ± 18.9* (46.4)
	100	131.7 ± 15.3* (47.0)	201.1 ± 10.9* (41.5)

Rats were passively sensitized with monoclonal anti-TNP-BSA IgE antibody and were challenged with inhalation of aerosol antigen for 10min. Drugs were administered orally one hour before antigen challenge. Each value represents the mean ± S.E. of nine rats. Numbers in parentheses indicate inhibition percent vs the control. # indicates significant difference at $p < 0.01$ from unchallenged group (Unpaired *t*-test). * indicates significant difference at $p < 0.05$ from control group (Scheffe's multiple-range test).

た。

考 察

マウスモノクローナル IgE 抗体で受身感作したラットに抗原を吸入させると、その気管と主気管支で、血管透過性亢進作用の指標である漏出色素量が著明に増加することが認められた。これまで、抗アレルギー薬の血管透過性亢進抑制作用の評価には動物の背部皮膚や耳介を用いた PCA 反応が繁用されてきたが、今回作成した実験モデルは疾患の原発部位でその作用を評価するものであり、また、抗原吸入で反応を惹起できることから抗喘息薬の評価モデルとしての利点を有するものと考えられた。感作モルモットに抗原を静脈内投与した時⁹⁾や抗原を吸入させた時¹¹⁾にも気管および主気管支で血管透過性亢進反応が発現したことが報告されている。しかし、反応惹起に関与する抗体の種類については記載されていない。ただ、モルモットの感作法などから IgG が主として関与していたものと推測される。したがって、I 型アレルギー発症に密接

に関係する IgE 抗体を用いた今回のモデルは抗喘息薬の評価法として利点を有するものと考えられた。

本モデルで KW-4679、ケトチフェン、ターフェナジン前投与の影響を検討したところ、いずれの薬物も抑制作用を発現した。前述したモルモットのモデルで抗ロイコトリエン薬の ONO-1078⁹⁾や5-リポキシゲナーゼ阻害薬の A-63162が抑制作用を示した¹¹⁾ことから、ロイコトリエンが血管透過性亢進に重要な役割を演じていると推測されている。一方、NK1タキキニン受容体拮抗薬の CP-96345が抑制作用を示したこと¹²⁾や、タキキニン分解酵素 NEP の阻害薬である thiorphan が抗原誘発による血管透過性亢進を増強したこと¹³⁾が報告されており、タキキニンの関与も示唆されている。KW-4679はアラキドン酸の遊離抑制を介してロイコトリエン産生量を減少させること⁴⁾が見いだされている。さらに、主気管支標本で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タキキニンの遊離抑制作用を介して抑制すること³⁾も見いだされている。したがって、これらの作用が重畳して気道における血管透過性亢進抑制作用に寄与したものと考えられた。特に、KW-4679の抑制作用は主気管支で顕著で

あったが、その部位でのタキキニン遊離抑制作用が寄与したものと推測された。ケトチフェンとターフェナジンもロイコトリエン産生抑制作用を有すること¹⁴⁾が報告されており、両薬の血管透過性亢進抑制作用にその作用が寄与したものと考えられた。ケトチフェンについては主気管支標本のペプチド作動性神経関与の収縮反応の抑制作用とその抑制作用はタキキニン遊離抑制作用に基づくものと推測されることが報告されている¹⁵⁾。ケトチフェンの血管透過性亢進抑制作用にもタキキニン遊離抑制作用が寄与したものと考えられた。最後に今回検討した三薬物が共通に有する抗ヒスタミン作用について考察したい。モルモットにおいて抗ヒスタミン薬メピラミンは抑制作用を示すが、それと同程度の抗ヒスタミン活性を有するアゼラスチンは抑制作用を示さなかった⁹⁾と報告されており、その役割は明確ではない。さらにラットでは気道における抗原抗体反応惹起時の血管透過性亢進反応におけるヒスタミンの役割を否定する報告が多い¹⁶⁾¹⁷⁾。したがって、三薬物のラットの気道における血管透過性亢進抑制作用には抗ヒスタミン作用の寄与は少なかったと推測されるが、より詳細な検討を今後積み重ねたい。また、今回はいわゆる経口抗アレルギー薬の作用のみを検討したが、今後、種々の薬理作用を有する薬物の作用について検討を加え、本モデルの意義をより明らかにしたい。

以上、本研究において、KW-4679 のラット気道における抗原誘発血管透過性亢進抑制作用が明らかとなった。臨床における抗アレルギー作用が期待される。

稿を終えるにあたり、本研究に御協力いただいた川村雅一氏に深く感謝致します。

文 献

- 1) Boschetto, P., Roberts, N.M., Rogers, D.F. and Barnes, P.J.: Effect of antiasthma drugs on microvascular leakage in guinea pig airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* **139**, 416-421, 1989.
- 2) Oshima, 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.
- 3) Ikemura, T., Okamura, K., Ishii, H., Sasaki, Y. and Ohmori, K.: KW-4679-induced inhibition of tachykininergic contraction in the guinea pig bronchi by prejunctional inhibition of peripheral sensory nerves. *Br. J. Pharmacol.* **117**, 967-973, 1996.
- 4) Ikemura, T., Manabe, H., Sasaki, Y., Ishii, H., Onuma, K., et al.: KW-4679, an antiallergic drug, inhibits the production of inflammatory lipids in human leukocytes and guinea pig eosinophils. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **110**, 57-63, 1996.
- 5) 石井秀衛, 佐々木康夫, 池村俊秀, 北村重人, 大森健守: 抗アレルギー薬 KW-4679 の薬理作用 (第 1 報) 受身皮膚アナフィラキシーおよび実験的喘息に及ぼす影響. *日薬理誌* **106**, 289-298, 1995.
- 6) Ohmori, K., Ishii, H., Sasaki, Y., Ikemura, T., Manabe, H., et al.: Effect of KW-4679, an new orally active antiallergic drug, on antigen-induced bronchial hyperresponsiveness, airway inflammation and immediate and late asthmatic responses in guinea pigs. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **110**, 64-72, 1996.
- 7) 幅 誠二, 浜岡利之: 種々の蛋白, 多糖体と DNP 基との結合物の作製. 免疫実験操作法 (III), 日本免疫学会編, 金沢, pp.865-870, 1974.
- 8) Rudolph, A.K., Burrows, P.D. and Wabl, M.R.: Thirteen hybridomas hapten-specific immunoglobulin E from mice Ig^a or Ig^b heavy chain halotype. *Eur. J. Immunol.* **11**, 527-529, 1981.
- 9) Obata, T., Kobayashi, T., Okada, Y., Nakagawa, N., Terawaki, T., et al.: Effect of a peptide leukotriene antagonist, ONO-1078 on antigen-induced airway microvascular leakage in actively sensitized guinea pigs. *Life Sci.* **51**, 1577-1583, 1992.
- 10) Katayama, S., Sionoya, H. and Ohtake, S.: A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pig and rat. *Microbiol. Immunol.* **22**, 89-101, 1978.
- 11) Hui, K.P., Lotvall, J., Chung, K.F. and Barnes, P.J.: Attenuation of inhaled allergen-induced airway microvascular leakage and airway obstruction in guinea pigs by a 5-lipoxygenase inhibitor (A-63162). *Am. Rev. Respir. Dis.* **143**, 1015-1019, 1991.
- 12) Bertrand, C., Nadel, J.A., Yamawaki, I. and Geppetti, P.: Role of kinins in the vascular extravasation evoked by antigen and mediated by tachykinins in guinea pig trachea. *J. Immunol.* **151**, 4902-4907, 1993.
- 13) Norris, A.A., Leeson, M.E., Jackson, D.M. and Holroyde, M.C.: Modulation of neurogenic

- inflammation in rat trachea. *Pulmonary Pharmacol.* **3**, 180-184, 1994.
- 14) Mita, H. and Shida, T.: Comparison of anti-allergic activities of the histamine H₁ receptor antagonists epinastine, ketotifen and oxatomide in human leukocytes. *Arzneim-Forsch/Drug Res.* **45**, 36-40, 1995.
 - 15) Verleden, G.M., Pype, J.L. and Demedts, M.M.: Ketotifen modulates noncholinergic contraction in guinea pig airways in vitro by a prejunctional nonhistaminic receptor. *J. Allergy Clin. Immunol.* **94**, 207-214, 1994.
 - 16) McDonald, D.M.: Neurogenic inflammation in the rat trachea. 1. Changes in venules, leukocytes, and epithelial cells. *J. Neurocytol.* **17**, 583-603, 1988.
 - 17) Tam, E., Calónico, L.D., Nadel, J.A. and McDonald, D.M.: Globule leukocytes and mast cells in rat trachea; their number, distribution, and response to compound 48/80 and dexamethasone. *Anat. Embryol.* **178**, 107-118, 1988.

EFFECT OF KW-4679, AN ANTIALLERGIC DRUG, ON ANTIGEN-INDUCED AIRWAY MICROVASCULAR LEAKAGE IN RATS PASSIVELY SENSITIZED WITH MOUSE MONOCLONAL IgE ANTIBODY

Kenji Ohmori, Hidee Ishii and Yasuo Sasaki

Pharmaceutical Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. Shizuoka

We studied the effect of KW-4679, an antiallergic drug, on inhaled antigen-induced airway microvascular leakage in rats passively sensitized with mouse monoclonal IgE antibody. Inhaled antigen increased extravasation of Evans blue dye content in tracheal and main bronchus tissues. KW-4679 (0.3-10 mg/kg, p.o.) reduced antigen-induced microvascular leakage in trachea with an ED₄₀ value of 4.9 mg/kg. KW-4679 also reduced antigen-induced microvascular leakage in main bronchus with an ED₄₀ value of 0.47 mg/kg. The inhibitory effect of KW-4679 was more potent than those of ketotifen and terfenadine. These results suggest that KW-4679 clearly reduces airway microvascular leakage mediated by antigen-antibody reaction.