

気管支喘息における β -Adrenergic Receptor に関する研究(その1) 実験的モルモットコンニャク喘息における肺 β -Adrenergic Receptor の検討

群馬大学医学部第一内科学教室

須永吉信

Key words: β -adrenergic receptor — bronchial asthma —
experimental asthma — Konjac — radioreceptor assay

(受付: 10月2日, 1984)

緒言

気管支喘息の成因にはアレルギー説をはじめ自律神経失調説, 内分泌異常説など種々の説が知られているが, 気道過敏性さらにはアレルギーとの関連において議論, 注目されているのは Szentivanyi¹⁾の提唱した β -adrenergic blockade 説である. Szentivanyi は1968年, 気管支喘息においては気管支拡張作用をもたらす交感神経系の β -adrenergic receptor の機能が低下しているため種々の刺激に対し容易に気道収縮を起こし, 喘息発作が発症するとの仮説をたてた. 事実, 気管支喘息における呼吸困難発作が高度で重症になる程気管支拡張作用を有する β -刺激薬の効果は減少し, 喘息累積状態では β -刺激薬は無効になることも知られている.

一方, アレルギーと気管支喘息も密接な関係にある. 気管支喘息例の多くのものは室内塵, ダニ, 種々の植物の花粉, 真菌またコンニャク舞粉などの職場での粉塵などにより感作され, これらの起因抗原を吸入することによりアレルギー反応を起こし喘息の発症に至る. 最近, アラキドン酸から leukotriene C₄, D₄, E₄などのいわゆる SRS-A への生合成過程の解明, さらにアレルギー反応との関連も明らかにされつつあり, 気管支喘息におけるアレルギーの果たす役割について

の研究は著しい進歩がみられる. しかしながらアレルギー説と β -blockade 説との相互関連についての研究報告は必ずしも多くない.

Shelhamer ら²⁾は喘息のみならずアレルギー性鼻炎や皮膚反応陽性を示す無症状例でも β -blockade が存在すると報告し, フトピーと β -blockade との関連を示唆した. 近年 radioligand を用い種々組織の β -receptor 測定が可能となり, Barnes ら³⁾はモルモットを卵白アルブミンで感作すると肺の β -receptor 数が減少すると報告し注目され, 最近松本⁴⁾もコンニャク舞粉吸入感作モルモットを用い, 抗原の気道への吸入感作が肺の β -receptor 数に減少をもたらすこと, さらに β -receptor の減少度が著しい個体ほど抗原に再暴露されると重症の喘息発作を起こしやすいことを報告し, 抗原による感作が β -receptor 数の減少をもたらすことを支持した.

著者は, モルモットにおいて, コンニャク舞粉による吸入感作と経皮感作では肺 β -receptor の変動に差があるのか, β -receptor 数の減少には感作が必須の条件なのか, さらに粉末の吸入そのものは β -receptor に変動を与えないかについて検討することを目的として実験を行った.

材料および方法

実験動物: 本実験には Hartley 系オスのモルモット (300-350g) を約20℃の室温下で7日間飼育した後, Fig. 1 に示すごとく7群に分け, 下記のごとく用いた.

実験1. コンニャク舞粉吸入群: コンニャク舞粉(舞粉)の吸入群をさらに3群に分けたが, そのひとつ (group 1a) は舞粉吸入感作成立と β -receptor との関

Abbreviations: Bmax maximum binding capacity; CFA complete Freund's adjuvant; cyclic AMP cyclic adenosine monophosphate; DHA dihydroalprenolol; Kd dissociation constant; PCA passive cutaneous anaphylaxis; SRS-A slow-reacting substance of anaphylaxis; IgG S-T S short-term sensitizing anaphylactic IgG antibody

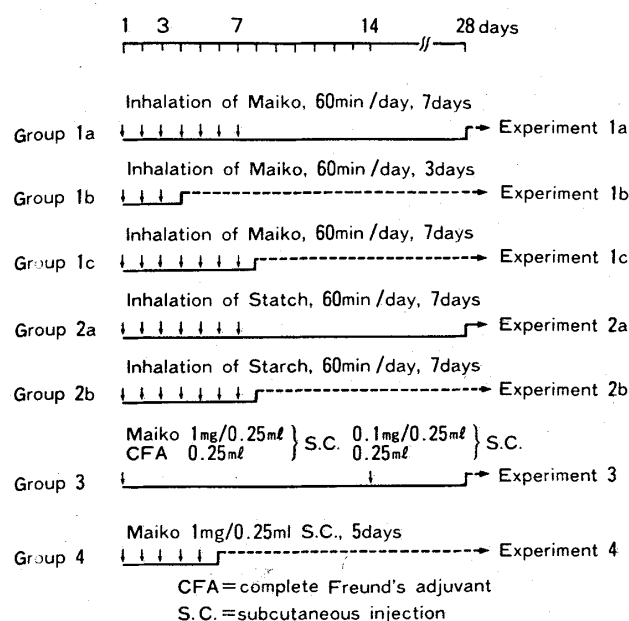


Fig. 1. Experimental group.

連を把握するため行った実験群である。舞粉による感作は田中の方法⁵⁾に従って行った。すなわち30×50×20cmの箱にモルモットを入れ、送気装置を用いて1日60分間、連続7日間舞粉を吸入させ、その後21日間無処置で飼育し、断頭後肺を摘出し実験に用いた。次に舞粉吸入による経時的变化を観察する目的で3日間吸入群 (group 1b), 7日間吸入群 (group 1c) を作製し、これらの2群は吸入終了翌日肺を摘出した。なお上記3群 (1a, 1b, 1c) のそれぞれに対応し、各群同期間、同様の方法で生理的食塩水 (生食) を吸入させた群を作製した。

実験2. バレイショデンプン吸入群: 粉末吸入そのものの影響を検討する目的で、バレイショデンプン (デンプン) 吸入モルモットについて検討した。すなわち舞粉と同様の方法でデンプンを吸入させ、7日間吸入後21日間無処置群 (group 2a), 7日間吸入群 (group 2b) を作製した。group 2bについては、実験1の group 1c と同時に検討し、その生食吸入対照群も group 1c と同一のものとした。また、group 2aについては新たに同期間同様の方法で生食を吸入させた対照群を作製した。

実験3. 舞粉経皮感作群: 舞粉による経皮感作の影響をみるための実験群である。舞粉を5g/dlの割合で脱イオン水で溶かし、24時間冷室内で攪拌した後4℃、16000×gで30分間遠沈し、その上清を抗原として用いた。モルモットにまず上記抗原 1mg protein/0.25ml と complete Freund's adjuvant (CFA) 0.25ml の混合液

をほぼ半量ずつ両鼠径部に皮下注射し、14日後に同抗原100μg protein/0.25ml と CFA 0.25ml の混合液を同様に皮下注射し、さらに14日後に肺を摘出し実験に用いた (group 3)。対照として生食で2倍希釈した CFA 0.5ml または生食0.5ml を同様に皮下注射した群を作製した。

実験4. 舞粉抗原皮下注射群: 舞粉抗原皮下注射による影響をみるため、前記のごとく作製した舞粉抗原液 1mg protein/0.25ml を1日1回、連続5日間背部に皮下注射し、翌日肺を摘出した (group 4)。

肺膜成分分離法: 断頭後ただちに肺を摘出し、氷冷下で大血管および大気管支をできるかぎり除き、-70℃で保存し、後日肺 1g あたり10ml の0.25M sucrose, 1mM MgCl₂, 5mM Tris-HCl, pH7.4よりなる buffer で解凍後ハサミで適当な切片に切断し、wart-tissue grinder で細断した後、teflon-tipped pestel で10 strokes ホモジナイズした。この液を2層のガーゼで濾過後270×gで10分間遠沈し、さらにその上清を48000×gで15分間遠沈し、その沈渣を25mM MgCl₂, 0.08mM ascorbic acid, 75mM Tris-HCl, pH7.5よりなる incubation buffer で再懸濁し、蛋白量を2mg/ml に調整後、-70℃で保存した。本法により肺重量1g あたり約15mg 前後の蛋白成分が得られた。Fig. 2は48000×g pellet の電子顕微鏡所見であるが、膜様構造物が多数認められ、本成分は microsome 分画が主体をなすと考えられた。

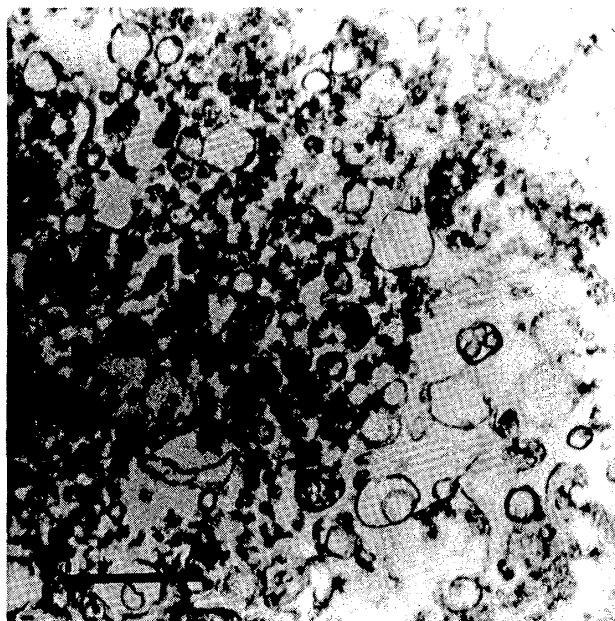


Fig. 2. Electron microscopic finding of 48000×g pellet of guinea-pig lung membranes.

binding assay 法: Williams ら⁶⁾の方法に準じ filtration assay 法を用い, duplicate で測定した. すなわち 2mg/ml に調整した肺膜成分 0.1ml (200 μ g) に incubation buffer で希釈した [^{3} H]-dihydroalprenolol ([^{3} H]-DHA)を加えて計 0.25ml とし, 23 $^{\circ}$ C で 30 分間 インキュベートした後 Whatman glass fiber filter (GF/C) で濾過し, この filter を 0.3ml の 4 $^{\circ}$ C incubation buffer で 5 回洗浄し, 乾燥後 2ml の toluene-spectrofluor scintillation fluid (Econofluor) を加え, 液体シンチレーションカウンターで測定した. [^{3} H]-DHA 濃度は 0.25nM から 8nM までの 6 点とし, また non-specific binding は 10^{-5} M *d,l*-propranolol 存在時の count とし, propranolol 非存在時の total binding よりこの non-specific binding を引いたものを specific binding とした. 本法における specific binding は大方 total binding の 85-90% であり, また duplicate 間の差はほぼ 15% 以下であった.

本法により Fig. 3 の結果が得られ, Scatchard analysis⁷⁾より dissociation constant (K_d) と maximum binding capacity (B_{max}) が算出された. 他の検体についてもほぼ同様の Scatchard plots が得られた.

各種 competitor に対する apparent K_d : $K_d = EC_{50} / 1 + \frac{S}{K_d(DHA)}$ の式を用いて算出した.

EC_{50} ; specific binding を 50% 阻害する competitor 濃度

S; radioligand 濃度

K_d (DHA); DHA に対する K_d

気管平滑筋反応: 断頭時得られた気管より気管螺旋

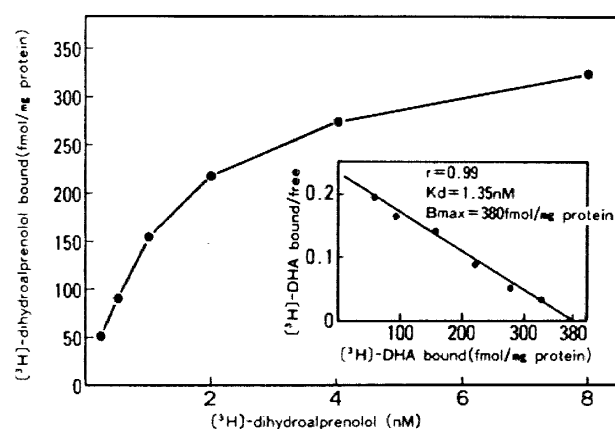


Fig. 3. Specific [^{3} H]-dihydroalprenolol binding to guinea-pig lung membranes. Inset, Scatchard plots of the same data.

を作製し, 通気中の Tyrode 液中で舞粉抽出抗原液作用時の気管平滑筋反応を観察した.

passive cutaneous anaphylaxis: 同種モルモットを recipient とし, 2 倍数希釈した被験血清 0.1ml を腹壁に皮内注射し, IgG 抗体検出には 4 時間後, また IgE 抗体検出には 7 日後に, 抗原 2mg/0.5ml と 1% エバンスブルー 0.5ml を静脈注射し, 30 分後に判定し, 直径 5mm 以上の青色斑を示すものを陽性として陽性反応を示す最高希釈濃度を PCA titer とした.

蛋白定量: Lowry の方法⁸⁾を用いた.

使用薬剤: [^{3} H]-DHA (specific activity, 41.8Ci/mmol); New England Nuclear Corp, *d,l*-alprenolol; 藤沢薬品工業株式会社, *d,l*-salbutamol; 三共株式会社, 他のカテコールアミンはシグマ社, バレイショデンプン; 和光純薬工業株式会社, 舞粉は群馬県下仁田町のコンニャク製粉工業製のものである.

統計学的処理: 平均値は mean $\pm$ S.E.M. で示し, 有意差は Student's *t*-test によって検討した.

成績

実験 1: 1) 舞粉吸入感作モルモット (Group Ia) 肺の β -receptor の生食吸入対照モルモットとの比較成績は Table 1 に示したごとくである. すなわち, 舞粉吸入群 (No. 1-7) では B_{max} 416 $\pm$ 22 fmol/mg protein, K_d 1.70 $\pm$ 0.13 nM, 生食吸入対照群 (No. 8-13) では B_{max} 645 $\pm$ 59 fmol/mg protein, K_d 1.56 $\pm$ 0.08 nM であり, 前者は後者と比較し, B_{max} は統計学的に有意 ($p < 0.01$) の低下が認められた. しかし K_d については両群に有意の群は認められなかった. なお本群の感作は摘出気管平滑筋に対する舞粉抗原の反応により確認した.

2) 各種 β -agonist および antagonist に対する K_d ; 前述の Table 1 の No. 2 (舞粉吸入モルモット) と No. 10 (生食吸入モルモット) の肺の [^{3} H]-DHA binding (1nM) の各種 β -agonist および antagonist による displacement curve は Fig. 4 に, またこれより計算した apparent K_d は Table 2 に示した. 両者はほぼ同様の displacement curve が得られ, affinity の強さは *l*-isoproterenol, *l*-epinephrine, *l*-norepinephrine の順で, β_2 -receptor が主体をなし, また光学異性体の差も *l* 体が *d* 体の 20 倍から 229 倍の強さを示し生理的であった.

Table 1 Bmax and Kd of guinea-pig lung beta-adrenergic receptors sensitized by Konjac Maiko inhalation

No.		Beta-adrenergic receptor	
		Bmax (fmol/mg protein)	Kd (nM)
Maiko inhalation	1.	375	1.56
	2.	428	1.40
	3.	404	1.86
	4.	395	2.33
	5.	540	1.82
	6.	387	1.55
	7.	382	1.36
	Mean±S.E.M.	416±22*	1.70±0.13
Control	8.	500	1.44
	9.	736	1.77
	10.	698	1.49
	11.	433	1.27
	12.	702	1.71
	13.	800	1.65
	Mean±S.E.M.	645±59	1.56±0.08

* $p < 0.01$.

3) 舞粉吸入の経時的影響をみるため, group 1b, 1c について肺 β -receptor を各々の対照群と比較検討した。その結果, 3日間吸入群 (group 1b, $n=4$) およびその生食吸入対照群 ($n=4$) の Bmax は 317 ± 19 fmol/mg protein, 391 ± 21 fmol/mg protein, Kd は 1.78 ± 0.08 nM, 1.89 ± 0.10 nM, また 7日間吸入群 (group 1c, $n=4$) およびその生食吸入対照群 ($n=4$) の Bmax は 332 ± 31 fmol/mg protein, 339 ± 23 fmol/mg

Table 2 Apparent dissociation constants of beta-adrenergic compounds

Compound	Dissociation constant (Kd)	
	Maiko inhalation	Control
<i>l</i> -isoproterenol	1.87×10^{-7} M	2.23×10^{-7} M
<i>d</i> -isoproterenol	2.04×10^{-5}	5.11×10^{-5}
<i>l</i> -epinephrine	1.28×10^{-6}	1.85×10^{-6}
<i>l</i> -norepinephrine	1.05×10^{-5}	1.42×10^{-5}
<i>l</i> -alprenolol	4.08×10^{-9}	2.68×10^{-9}
<i>d</i> -alprenolol	8.17×10^{-8}	6.39×10^{-8}
<i>d, l</i> -propranolol	1.52×10^{-7}	1.41×10^{-7}
<i>d, l</i> -salbutamol	8.75×10^{-7}	1.59×10^{-6}

[^{3} H]-dihydroalprenolol; 1nM.

mg protein, Kd は 1.86 ± 0.10 nM, 1.90 ± 0.10 nM であった。 β -receptor assay は実験条件により変動しやすいため, 群間の比較はそれぞれの生食吸入対照群の平均値を100%とし, それに対する変化率を指標として用いると, group 1a の成績と併わせ Fig. 5 に示したごとく, Bmax は group 1b で $81.0 \pm 4.9\%$, group 1c で $83.2 \pm 7.8\%$ と, 3日間吸入群で平均19% ($p < 0.05$), 7日間吸入群で平均17%の減少が認められた。しかし Kd についてはそれぞれ有意の差は認められなかった。

実験2: 粉末吸入の肺 β -receptor の変動に及ぼす影響をみるため行ったデンプン吸入群での成績では, 7日間吸入群 (group 2b, $n=4$) およびその生食吸入対照群 ($n=4$) の Bmax は 436 ± 21 fmol/mg protein, 399 ± 23 fmol/mg protein, Kd は 1.99 ± 0.14 nM, $1.90 \pm$

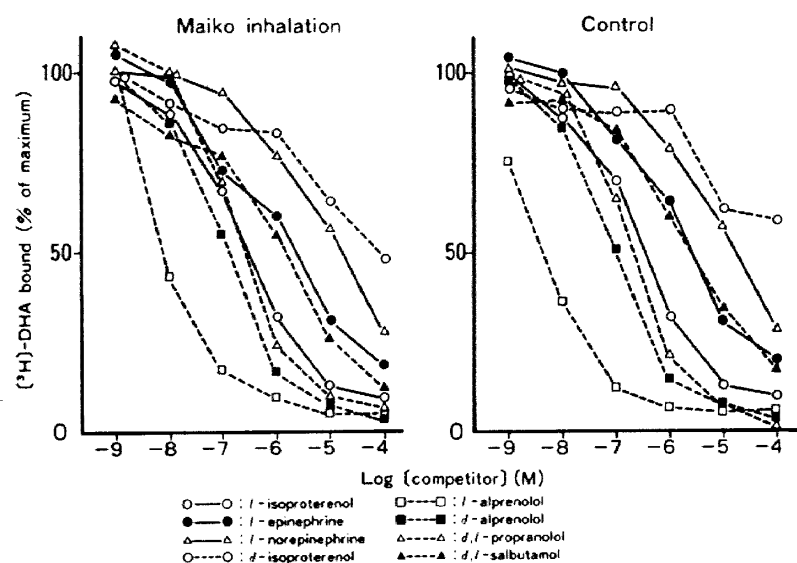


Fig. 4. Effects of beta-adrenergic compounds on [^{3} H]-dihydroalprenolol binding to guinea-pig lung membranes.

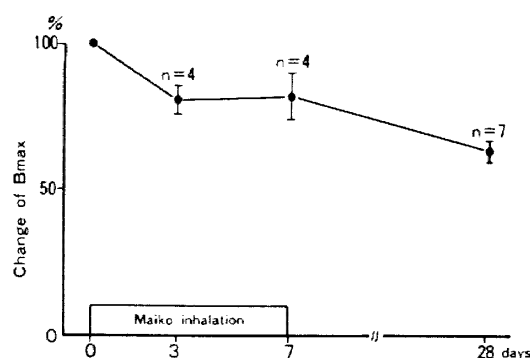


Fig. 5. Changes of Bmax in guinea-pig lung beta-adrenergic receptors treated by Konjac Maiko inhalation. Significant differences from saline control were $p < 0.05$, $p < 0.01$ at 3 and 28 days after the inhalation respectively.

Table 3 Bmax and Kd of beta-adrenergic receptors of subcutaneously sensitized guinea-pig lung membranes by Konjac Maiko with complete Freund's adjuvant

	No.	Beta-adrenergic receptor	
		Bmax (fmol/mg protein)	Kd (nM)
Sensitized	1.	297	1.19
	2.	188	0.96
	3.	285	1.01
	4.	278	1.08
	5.	230	1.08
	Mean $\pm$ S.E.M.	256 $\pm$ 20	1.06 $\pm$ 0.04
Control (CFA)	1.	308	0.99
	2.	355	1.13
	3.	397	1.00
	4.	477	1.02
	5.	370	1.01
	Mean $\pm$ S.E.M.	381 $\pm$ 28	1.03 $\pm$ 0.03
Control (saline)	1.	397	1.03
	2.	396	1.16
	3.	397	1.10
	4.	341	1.03
	5.	299	1.19
	Mean $\pm$ S.E.M.	366 $\pm$ 20	1.10 $\pm$ 0.03

CFA = complete Freund's adjuvant.

Data between sensitized and control groups (CFA and saline) were significant at $p < 0.01$ respectively.

0.10nM, また7日間吸入後21日間無処置群 (group 2a, $n=4$) およびその生食吸入対照群 ($n=4$) の Bmax は 467 ± 55 fmol/mg protein, 453 ± 21 fmol/mg protein, Kd は 1.97 ± 0.20 nM, 1.80 ± 0.13 nM であり, group 2a および group 2b はそれぞれの対照群と比較し Bmax,

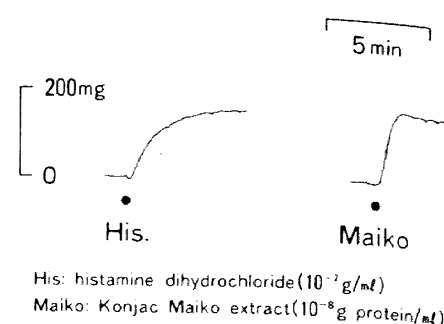


Fig. 6. Antigen-antibody induced contraction of subcutaneously sensitized guinea-pig tracheal smooth muscle by Konjac Maiko with complete Freund's adjuvant.

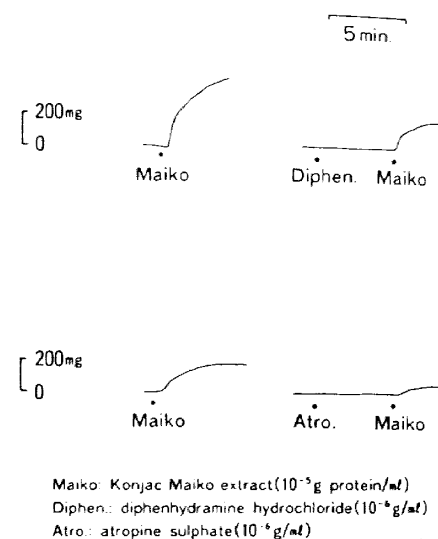


Fig. 7. Effects of diphenhydramine hydrochloride and atropine sulphate on Konjac Maiko extract-induced contraction of guinea-pig tracheal smooth muscle.

Kd に有意の差は認められなかった。

実験3: 舞粉経皮感作の影響をみるため行った群での成績は Table 3 のごとくであった。すなわち Bmax および Kd は経皮感作群で 256 ± 20 fmol/mg protein, 1.06 ± 0.04 nM ($n=5$), CFA のみの皮下注射群で 381 ± 28 fmol/mg protein, 1.03 ± 0.03 nM, 生食皮下注射群で 366 ± 20 fmol/mg protein, 1.10 ± 0.03 nM であり, 経皮感作群の Bmax は CFA 皮下注射群および生食皮下注射群のそれに比し有意 ($p < 0.01$) の低下が認められた。しかし Kd については各群に有意の差は認められなかった。なお本群の感作はモルモットより摘出した気管平滑筋に抗原-抗体反応に基づく収縮がみられたことより確認した (Fig. 6)。また断頭時得られた血清の抗舞粉 IgG 抗体の PCA titer は 32-64 倍を示したが, IgE 抗体に対する PCA は全て陰性であった。

実験4：舞粉抗原を連続5日間皮下注射したモルモット (group 4) 肺の β -receptor の検討を行った。Bmax および Kd は抗原皮下注射群で $315 \pm 43 \text{ fmol/mg protein}$, $1.26 \pm 0.10 \text{ nM}$ ($n=4$), 生食皮下注射対照群で $314 \pm 33 \text{ fmol/mg protein}$, $1.24 \pm 0.14 \text{ nM}$ であり両群に差は認められなかった。なお舞粉皮下注射群モルモットより摘出した気管平滑筋では抗原-抗体反応に基づく収縮は認められず、また血清の PCA も全て陰性であった。

実験5：舞粉の気管平滑筋に対する直接作用を検討する目的で、無処置モルモットの気管を摘出し気管螺旋を作製し、舞粉抽出液による反応を観察した。この結果、Fig. 7 に示したごとく気管平滑筋は 10^{-5} g/ml の舞粉抽出液によって収縮し、この収縮反応は低濃度の diphenhydramine hydrochloride (10^{-6} g/ml) と atropine sulphate (10^{-6} g/ml) によって抑制された。

考 案

気管支喘息は発作性の咳、喘鳴、呼吸困難を臨床症状とし、種々の刺激に対する気道過敏性を特徴として、非限局性の可逆性気道狭窄を示す疾患⁹⁾として理解され、この気道過敏性の成因として種々の自律神経受容体異常が示唆されている¹⁰⁾⁻¹³⁾。

これらのうち β -adrenergic receptor 異常は喘息患者に β 遮断薬である propranolol を静注すると一部に喘息発作が誘発されること¹⁴⁾やブタクサ枯草熱患者に propranolol を静注し、その後ブタクサ抽出液を吸入させると気道閉塞性変化が認められること¹⁵⁾より推察され、続いて1968年、Szentivanyi¹¹⁾は百日咳ワクチン処理マウスおよびラットでは histamine や serotonin などの物質や非特異的刺激に対する気道過敏性の増強、カテコールアミンに対する反応性の低下、抗体産生の増加、好酸球増多がみられ、そしてこれらの変化が薬剤による β -blockade やヒトの喘息にも認められることに着目し、気管支喘息の病因として β -blockade 説を提唱し注目を集めた。

この β -blockade は、喘息患者では正常者に比し epinephrine を静注した際の血糖¹⁶⁾や血漿 cyclic AMP¹⁷⁾上昇率が低下していること、 β_2 -刺激剤負荷時の膵 β -細胞の反応性が低下していること¹⁸⁾、さらに喘息患者より分離したリンパ球に β 刺激剤を加えた時の cyclic AMP の増加が正常者リンパ球と比較して低

下していること¹⁹⁾など全身的な検討によっても支持され、一般にこの β -blockade は喘息の重症度に比例するといわれている¹⁸⁾²⁰⁾²¹⁾。しかし β -刺激剤を連用すると正常人でも β -receptor 機能が低下すること²²⁾や薬剤を投与されていない気管支喘息患者の β -receptor 機能は正常人と比べ差がないことより、喘息患者にみられる β -blockade は治療に用いられた薬剤によるためであろうとする報告²³⁾⁻²⁵⁾も多い。これに対し Busse²⁶⁾や Apold ら¹⁷⁾は薬剤を投与していない喘息患者でも β -receptor 機能低下がみられたと報告している。

一方、radioligand を用いた β -receptor の測定が検討され、リンパ球や多核白血球の β -receptor が β_2 -型であることより⁶⁾²⁷⁾、気管支喘息についてもそれらの β -receptor が検討されるようになり、Kariman ら²⁸⁾は喘息患者のリンパ球の β -receptor 数の減少を報告し、Sano ら²⁹⁾や Brooks ら³⁰⁾も β -刺激剤を使用していない喘息患者のリンパ球の β -receptor 数が正常例より低下していることを報告している。しかし、正常人と β -刺激剤を使用していない喘息患者の多核白血球³¹⁾やアスピリン喘息患者のリンパ球³²⁾の β -receptor 数に変化がみられないという報告もみられ、また β -刺激剤投与により白血球の β -receptor 数の減少がみられることより、喘息患者にみられる β -receptor 数の減少は治療に用いられた β -刺激剤のためであろうとする報告²³⁾³³⁾もある。さらに内因性カテコールアミンもリンパ球の β -receptor に影響を及ぼすことも知られている³⁴⁾。

一方、アレルギーと β -receptor 機能との関連についても検討され、 β -刺激剤を使用していない atopic dermatitis などにも β -blockade が認められ³⁵⁾⁻³⁷⁾、atopic condition と β -blockade との関連も注目されているが、これらの患者の多核白血球³⁸⁾や顆粒球³⁹⁾の β -receptor は正常人と差がみられなかったと報告されている。以上のごとく現在のところ喘息やアレルギー疾患患者の β -receptor 機能や白血球 β -receptor に関しては一定の成績が得られないのが現状である。

気管支喘息の反応の場合は気道であり、 β -receptor の検討も気道平滑筋で行うことが望ましい。最近 Szentivanyi ら⁴⁰⁾はヒト摘出肺とリンパ球の β -receptor を測定し、可逆性気道狭窄を認めた患者群では、肺とリンパ球に β -receptor の減少、 α -receptor の増加が認められたと報告したが、多数の気管支喘息患者の肺について検討することは實際上困難である。この

ため肺 β -receptor の検討は主に動物実験喘息モデルで行われ、Barnes ら³⁾はモルモットを卵白アルブミンで感作すると肺 β -receptor 数の減少と α -receptor 数の増加が起こることを報告している。しかし動物実験喘息モデル肺 β -receptor に関する報告は少なく不明の点も多い。

これらの背景のなかで著者は、本邦における代表的な職業性喘息のひとつであるコンニャク喘息のモデルとして様々な検討⁴¹⁾⁻⁴⁵⁾がなされている実験的モルモットコンニャク喘息を用いて β -receptor とコンニャク喘息の関連について検討を行った。

まず舞粉によるモルモットの吸入感作の影響であるが、感作成立後肺の β -receptor 数は対照群との比較で $64.5 \pm 3.4\%$ と約 35% の減少を示した。松本ら⁴⁾も先に同様の実験を行い舞粉吸入感作モルモット肺の β -receptor 数は平均 17% の減少がみられたと報告しているが、著者の成績ではさらに大きな減少が認められた。一方 DHA に対する K_d については両群に差はなく、また一部の例で検討した各種 β -agonist および β -antagonist に対する K_d の比較でも大きな差は認められなかった。

著者はコンニャク舞粉が特有の淡い臭気をもち、それ自体がある種の刺激を有している可能性もあると考え、舞粉吸入そのものが肺 β -receptor に変化を及ぼすかについて検討した。その結果、舞粉吸入 3 日間で平均 19%、7 日間で平均 17% の肺 β -receptor 数の減少が認められた。この減少はモルモットより得られた血清の PCA が全て陰性を示したことや、予備実験で作製した舞粉 3 日間および 7 日間吸入モルモット群では吸入終了翌日に行った舞粉抽出液暴露により喘息症状が発症しなかったことより、抗原による感作の影響は少なく、舞粉吸入刺激そのものの関与も推察された。

β -receptor はカテコールアミン³⁴⁾やステロイド⁴⁶⁾など様々な因子の影響を受けることが知られている。舞粉吸入時にはモルモットに多大のストレスが与えられることが推察され、このため内因性ホルモンの影響も無視できないと考えられる。ホルモンの測定も有意義と考えられるが、代謝も速く一時点の測定では難がある。そこで著者は舞粉とほぼ同一の粒子を有しているパレイショデンプンをモルモットに吸入させ、粉末吸入の影響についても検討した。その結果、デンプン吸入時の肺 β -receptor は、7 日間吸入群、7 日間吸入後 21 日間無処置群ともに B_{max} , K_d に有意の変動がなく、粉末吸入操作そのものの影響はほとんどないと考

えられた。

最近、モルモットに histamine や acetylcholine を吸入させると肺 β -receptor 数が減少するとの報告⁴⁷⁾がある。従来舞粉中にはコリン物質が含まれるとされ⁴⁸⁾、著者もモルモット気管螺旋を用い舞粉に histamine および choline 様作用があることを確認した。このため舞粉の histamine および choline 様作用により舞粉吸入群で肺 β -receptor 数が減少する可能性も推察される。また Barnes ら⁴⁹⁾は [^3H]-DHA を用いた autoradiography を応用し、肺における β -receptor の局在を検討し、細気管支や気道平滑筋の他に気道上皮や肺胞上皮にも β -receptor が存在すると報告している。著者が舞粉およびデンプン吸入モルモット肺の組織像について検討した結果ではデンプン吸入モルモット肺にはほとんど変化がみられなかったのに反し、舞粉吸入モルモットでは吸入終了直後気道上皮にかなりの障害が認められ、この障害が肺重量あたりの β -receptor 数の減少をもたらす可能性もある。しかし吸入終了約 1 週間後には形態的にほぼ正常に復しており、その後の β -receptor の変動は舞粉による感作そのものによると考えられる。

著者は感作と肺 β -receptor との関連を検討する目的で、CFA を用いた舞粉経皮感作モルモット肺についても検討した。その結果、肺 β -receptor 数は経皮感作群で CFA のみ皮下注射した群と比べ約 33%、また生食のみ皮下注射した群と比べ約 30% の有意 ($p < 0.01$) の減少が認められた。一方舞粉抽出液のみ連続 5 日間皮下注射したモルモット肺の β -receptor には変化がなく、舞粉経皮感作モルモット肺にみられた β -receptor 数の減少は、舞粉の直接作用でなく、感作成立に起因すると考えられた。

Barnes ら³⁾は卵白アルブミン感作モルモット肺の β -receptor 数の減少を報告しているが、彼らの実験では、卵白アルブミンを 4 週間吸入させ、この間モルモットに喘息症状が認められたとしている。このためこの β -receptor の変化は感作の影響とともに喘息発作発現も強く関与していることが推察される。今回の実験では、これらの点も考慮し、舞粉暴露による喘息症状を惹起させず、感作の成立は血清 PCA および摘出気管筋の抗原に対する反応で確認した。しかし舞粉吸入および経皮感作モルモット肺の β -receptor 数は対照と比較し有意の減少が認められ、抗原感作成立によっても肺 β -receptor 数が減少することが示唆された。現在のところこの感作成立による β -receptor 減少の機

序に関しては不明であり、今後の研究課題と考えている。

ヒトコンニャク喘息の発症にはIgE抗体や一部IgG S-TSが関与しているとされている⁵⁰⁾。一方実験的モルモットコンニャク喘息における検討では、その抗体が主にIgG分画に属するため必ずしもヒト喘息の病態とは一致しないと考えられるが、今回著者が行った実験で、抗原感作によっても肺の β -receptor数の減少が認められたことにより、気管支喘息における β -blockadeと肺 β -receptorとの関連がより明らかにされたと考えている。さらに舞粉吸入による直接作用によっても肺 β -receptor数の減少が観察されたことより、今後職業性喘息などの起因物質の検討についてはその抗原性のみでなく、物質吸入の気道receptorに及ぼす影響についても検討が必要と考えている。

結 語

コンニャク舞粉喘息の発症機序を検討する目的で、コンニャク舞粉吸入感作および経皮感作実験モルモットを作製し、 $[^3\text{H}]$ -DHAを用い肺 β -receptorについて検討を行い、以下の結果が得られた。

1. コンニャク舞粉吸入感作モルモット（7日間吸入、21日間無処置）肺の β -receptorは $B_{\text{max}} 416 \pm 22 \text{ fmol/mg protein}$, $K_d 1.70 \pm 0.13 \text{ nM}$ で、生食吸入対照群肺の β -receptorは $B_{\text{max}} 645 \pm 59 \text{ fmol/mg protein}$, $K_d 1.56 \pm 0.08 \text{ nM}$ であり、 B_{max} について前者に平均36%の減少（ $p < 0.01$ ）が認められた。

2. モルモット肺 β -receptorの B_{max} は舞粉吸入開始3日後および7日後にすでに平均19%の減少が認められた。

3. バレイショデンプン吸入モルモット肺の β -receptorは B_{max} , K_d とも経時の変化を認めなかった。

4. CFAを用いた舞粉経皮感作モルモット肺の β -receptorの B_{max} は対照群と比べ、平均30%の減少（ $p < 0.01$ ）が認められた。しかし K_d については差を認めなかった。

以上の結果より、実験的モルモットコンニャク喘息において抗原吸入感作、経皮感作によって肺 β -receptor数の減少が認められることがわかった。また舞粉吸入の直接作用によっても肺 β -receptor数の減少が認められることがわかり、喘息起因物質の検討はその抗原性ととも吸入時の直接作用による気道re-

ceptorの変化を検討することも重要と考えられた。

本稿を終るにあたり、本研究の御指導を賜った第一内科学教室小林節雄教授に深く感謝致します。また、実験に際しては吉江康正博士に、論文作製に際しては根本俊和博士に御教示頂き、組織学的研究には桑原英眞博士に、さらに当教室第二研究室の諸先生にも種々の御協力を頂きここに感謝の意を表します。

文 献

- 1) Szentivanyi, A.: The beta-adrenergic theory of the atopic abnormality in bronchial asthma. *J. Allergy* 42, 203-232, 1968.
- 2) Shelhamer, J.H., Metcalfe, D.D., Smith, L.J. and Kaliner, M.: Abnormal beta adrenergic responsiveness in allergic subjects: Analysis of isoproterenol-induced cardiovascular and plasma cyclic adenosine monophosphate responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 66, 52-60, 1980.
- 3) Barnes, P.J., Dollery, C.T. and MacDermot, J.: Increased pulmonary α -adrenergic and reduced β -adrenergic receptors in experimental asthma. *Nature* 285, 569-571, 1980.
- 4) 松本修一, 高木健三, 佐竹辰夫: アレルゲン吸入感作が肺の β -receptorに及ぼす影響に関する研究. *アレルギー* 32, 221-228, 1983.
- 5) 田中今朝昭: 実験的こんにゃく喘息に関する研究. *アレルギー* 7, 542-554, 1959.
- 6) Williams, L.T., Synderman, R. and Lefkowitz, R.J.: Identification of β -adrenergic receptors in human lymphocytes by $(-)$ $[^3\text{H}]$ alprenolol binding. *J. Clin. Invest.* 57, 149-155, 1976.
- 7) Scatchard, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660-672, 1949.
- 8) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.
- 9) American Thoracic Society: Committee on diagnostic standard for non-tuberculous respiratory diseases, chronic bronchitis, asthma and pulmonary emphysema. *Am. Rev. Respir. Dis.* 85, 762-768, 1962.
- 10) 滝野増市: アレルギー発症における自律神経の役割. *アレルギー* 20, 553-558, 1971.
- 11) Nadel, J.A.: Role of vagus nerves and airway epithelial damage in regulation of airway smooth muscle, mucous secretion and breathing. In "Advances in Allergology and Applied Immunology" (ed. by A. Oehling, et al.), Pergamon press, Oxford, pp. 309-314, 1979.
- 12) Kaliner, M.: Abnormal autonomic function in

- allergy and cystic fibrosis. In "Advances in Allergology and Applied Immunology" (ed. by A. Oehling, et al.), Pergamon press, Oxford, pp. 293-300, 1979.
- 13) Irvin, C.G., Boileau, R., Tremblay, J., Martin, R. and Macklem, P.T.: Bronchodilation; non-cholinergic non-adrenergic mediation demonstrated in vivo in the cat. *Science* 207, 791-792, 1980.
- 14) McNeill, R.S. and Ingram, C.G.: Effects of propranolol on ventilatory function. *Am. J. Cardiol.* 18, 473-475, 1966.
- 15) Quелlette, J.J. and Reed, C.E.: The effect of partial beta adrenergic blockade on the bronchial response of hay fever subjects to ragweed aerosol. *J. Allergy* 39, 160-166, 1967.
- 16) Lockey, S.D. Jr., Glennon, J.A. and Reed, C.E.: Comparison of some metabolic responses in normal and asthmatic subjects. *J. Allergy* 40, 349-354, 1967.
- 17) Apold, J. and Aksnes, C.: Comparison between increased bronchial responsiveness to histamine and diminished plasma cyclic adenosine monophosphate response after epinephrine in asthmatic children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 59, 343-347, 1977.
- 18) 黒沢元博, 根本俊和, 小林節雄, 池 愛子, 福田玲子, 山田 衛: 気管支喘息における β_2 刺激剤による血中インスリン値変動と臨床的意義に関する検討(第1報). *アレルギー* 26, 657-662, 1977.
- 19) Parker, C.W. and Smith, J.W.: Alterations in cyclic adenosine monophosphate metabolism in human bronchial asthma. I. Leukocyte responsiveness to β -adrenergic agents. *J. Clin. Invest.* 52, 48-59, 1973.
- 20) Makino, S., Quелlette, J.J., Reed, C.E. and Fishel, C.W.: Comparison between increased response to acetylcholine and diminished metabolic and eosinopenic responses to epinephrine in asthma. *J. Allergy* 46, 178-189, 1970.
- 21) Inoue, S.: Effects of epinephrine in asthmatic children. Effects of epinephrine on blood glucose, pulmonary function and heart rate of children with asthma of varying severity. *J. Allergy* 40, 337-342, 1967.
- 22) Nelson, H.S., Black, J.W. and Branch, L.B.: Subsensitivity to epinephrine following the administration of epinephrine and ephedrine to normal individuals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 55, 299-309, 1975.
- 23) Conolly, M.E. and Greenmacre, J.K.: The lymphocyte β -adrenoreceptor in normal subjects and patients with bronchial asthma. *J. Clin. Invest.* 58, 1307-1316, 1976.
- 24) Morris, H.G., Runska, S.A., Selner, J.C., Barzens, K. and Barnes, J.: Adrenergic desensitization in leukocytes of normal and asthmatic subjects. *J. Cyclic Nucleotides Res.* 3, 439-446, 1977.
- 25) Kalisker, A., Nelson, H.E. and Middleton, E. Jr.: Drug-induced changes of adenylate cyclase activity in cells from asthmatic and nonasthmatic subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 60, 259-265, 1977.
- 26) Busse, W.W.: Decreased granulocyte response to isoproterenol in asthma during upper respiratory infections. *Am. Rev. Respir. Dis.* 115, 783-791, 1977.
- 27) Galant, S.P., Underwood, S., Duriseti, L. and Insel, P.A.: Characterization of high-affinity β_2 -adrenergic receptor binding of (-) ^3H -dihydroalprenolol to human polymorphonuclear cell particulates. *J. Lab. Clin. Med.* 92, 613-618, 1978.
- 28) Kariman, K. and Lefkowitz, R.J.: Beta-adrenergic receptor binding in lymphocytes from patients with bronchial asthma. *Lung* 158, 41-51, 1980.
- 29) Sano, Y., Watt, G. and Townley, R.G.: Decreased mononuclear cell beta-adrenergic receptors in bronchial asthma: Parallel studies of lymphocyte and granulocyte desensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.* 72, 495-503, 1983.
- 30) Brooks, S.M., McGowan, K., Bernstein, I.L., Altenau, P. and Peagler, J.: Relationship between numbers of beta adrenergic receptors in lymphocytes and disease severity in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 63, 401-406, 1979.
- 31) Galant, S.P., Duriseti, L., Underwood, S. and Allred, S.: Beta adrenergic receptors of polymorphonuclear particulates in bronchial asthma. *J. Clin. Invest.* 65, 577-585, 1980.
- 32) Wolfe, R.N., Hui, K.K., Conolly, M.E., Tashkin, D.P. and Fisher, H.K.: A study of beta-adrenergic and prostaglandin receptors in patients with aspirin-induced bronchospasm. *J. Allergy Clin. Immunol.* 69, 46-50, 1982.
- 33) Bruijnzeel, P.L.B., Van Den Berg, W., Hamelink, M.L., Van Den Bogaard, W., Houben, L.A.M.J. and Kreukniet, J.: Desensitization of the β -adrenergic receptor on leukocytes after long-term oral use of a β -sympathomimetic: Its effect on the β -adrenergic blockade hypothesis of Szentivanyi. *Ann. Allergy* 43, 105-109, 1979.
- 34) Fraser, J., Nadeau, J., Robertson, D. and Wood, A.J.: Regulation of human leukocyte beta receptors by endogenous catecholamines; relationship of leukocyte beta receptor density to the cardiac sensitivity to isoproterenol. *J. Clin. Invest.* 67, 1777-1784, 1981.
- 35) Parker, C.W. and Eisen, A.Z.: Altered cyclic AMP metabolism in atopic eczema. *Clin. Respir.* 20, 418-418, 1972.
- 36) Reed, C.E., Busse, W.W. and Lee, T.P.: Adrenergic mechanisms and the adenylyl cyclase system in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 67, 333-338, 1976.

- 37) Busse, W.W. and Lee, T.P.: Decreased adrenergic responses in lymphocytes and granulocytes in atopic eczema. *J. Allergy Clin. Immunol.* 58, 586-596, 1976.
- 38) Galant, S.P., Underwood, S., Allred, S. and Hanifin, J.M.: Beta adrenergic receptor binding on polymorphonuclear leukocytes in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 72, 330-333, 1979.
- 39) Ruoho, A.E., Declerque, J.L. and Busse, W.W.: Characterization of granulocyte beta adrenergic receptors in atopic eczema. *J. Allergy Clin. Immunol.* 66, 46-51, 1980.
- 40) Szentivanyi, A., Heim, O. and Schultze, P.: Changes in adrenoreceptor densities in membranes of lung tissue and lymphocytes from patients with atopic diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 332, 295-298, 1979.
- 41) Kondo, T.: On the demonstration of tissue antibody in the trachea and its significance in experimental asthma in the guinea-pig. *Gunma J. Med. Sci.* 12, 247-264, 1963.
- 42) 林しげよ: in vitro 感作に関する研究. コンニャク喘息ならびに養蚕に関連した喘息の抗原と抗体を用いての検討. *アレルギー* 22, 408-417, 1973.
- 43) 下山 冽, 田谷禎増, 小林節雄: モルモットにおける実験的喘息に関する研究. *アレルギー* 20, 386-394, 1971.
- 44) 阪野日出夫, 佐竹辰夫, 龍華一男, 栗屋雅就, 加藤政司, 横山繁樹: 運動負荷時における気道の血漿の cyclic GMP, cyclic AMP および血漿 norepinephrine に及ぼす吸入感作の影響に関する実験的研究. *アレルギー* 29, 157-164, 1980.
- 45) 横山繁樹, 佐竹辰夫: 気管支喘息症例ならびにコンニャク舞粉吸入感作モルモットにおける orci-prenaline 投与後の cyclic nucleotide の変動. *アレルギー* 29, 115-124, 1980.
- 46) Mano, K., Akbarzadeh, A. and Townley, R.G.: Effect of hydrocortisone on beta-adrenergic receptors in lung membranes. *Life Sci.* 25, 1925-1930, 1979.
- 47) 三田晴久, 油井泰雄, 信太隆夫: 喘息と受容体異常. *アレルギー* 32, 817-817 (抄録), 1983.
- 48) 三沢敬義: アレルギー疾患について. *総合医学* 12, 524-535, 1955.
- 49) Barnes, P.J., Basbaum, C.B., Nadel, J.A. and Roberts, J.M.: Localization of β -adrenoreceptors in mammalian lung by light microscopic autoradiography. *Nature* 299, 444-447, 1982.
- 50) 中沢次夫, 豊田武久, 稲沢正士, 古川 充, 笛木隆三, 小林節雄, 外川 信, 牧元弘之: short-term sensitizing anaphylactic IgG antibody (IgG S-T S) に関する研究 (第1報) コンニャク喘息症例における IgG S-T S について. *アレルギー* 26, 827-831, 1977.

β -ADRENERGIC RECEPTOR IN BRONCHIAL ASTHMA

Part 1 Pulmonary β -Adrenergic Receptor in Experimental Konjac Asthma of Guinea-Pig

Yoshinobu Sunaga

First Department of Internal Medicine, Gunma University School of Medicine

β -adrenergic blockade theory has been discussed in the pathogenesis of bronchial asthma. Pulmonary β -adrenergic receptor was investigated in experimental asthma of guinea-pigs. In this study, guinea-pigs were sensitized by Konjac Maiko, an antigen of Konjac asthma which is a representative occupational asthma in Japan, by inhalation (21 days incubation after 60 min exposure in every 7 days) or two times of subcutaneous injection with complete Freund's adjuvant (28 days incubation after the first injection). Control animals were exposed to saline aerosol for inhalative sensitization and were injected with saline or complete Freund's adjuvant for subcutaneous sensitization. Lung membrane homogenate was prepared, and β -receptor assay was carried out by [^{3} H]-dihydroalprenolol binding technique.

The results were as follows; 1) Inhalative sensitization induced a decrease in the number of pulmonary β -adrenergic receptors by 36% ($p < 0.01$), and subcutaneous sensitization induced a decrease of 30% ($p < 0.01$). But there were no differences in dissociation constant compared with controls. 2) The decrease in the number of β -receptors was observed after 3 and 7 days-exposure to Maiko. 3) However β -receptor was not changed by exposure to starch powder instead of Maiko.

These results indicate that inhalative or subcutaneous sensitization using Maiko antigen induces a decrease in the number of pulmonary β -receptors, and moreover Maiko inhalation itself reduces the number of pulmonary β -receptors.