

喘息動物モデルにおけるエンケファリナーゼ活性の検討

筑波大学臨床医学系呼吸器内科

大瀬寛高	野村明広	遠藤健夫	野口佳子
早乙女幹朗	二宮浩樹	濱田雅史	渡辺 東
杜 盾	橋本健一	内田義之	長谷川鎮雄

エンケファリナーゼは、気道系において、上皮細胞、平滑筋、腺組織、神経線維等に存在し、タキキニン類などの気道収縮物質を水解していることが知られている。今回我々は、二相性反応を呈する喘息モデルをモルモットにおいて作成し、誘発前、IAR 時、LAR 時の 3 群に分け各々の気管、肺のホモジネート、および BALF 中のエンケファリナーゼ活性を測定した。その結果、IAR 時、LAR 時のエンケファリナーゼ活性は、気管では、各々誘発前の 79.7%、73.4%、肺では各々誘発前の 74.3%、55.7%と低下し、特に LAR 時に強く抑制される傾向を示した。また摘出気管平滑筋を用いた薬理的張力測定においても LAR 時に採取した標本は、NKA に対する反応が強く、その用量反応曲線は対照群と比較すると左方移動し、ホスホラミドンを追加した場合のものに近づいた。今回の結果より特に LAR 時には気道中のエンケファリナーゼ活性が抑制されることが示唆された。このエンケファリナーゼ活性の低下が LAR の病態に関与している可能性が推察された。

Key words: bronchoconstriction — enkephalinase — immediate asthmatic response — late asthmatic response — tachykinin

緒 言

気管支喘息患者の病因抗原吸入暴露後の気道反応は、抗原吸入直後に発症する即時型反応 (immediate asthmatic response, 以下 IAR) と抗原吸入後 4~12 時間後徐々に出現し持続の長い遅発型反応 (late asthmatic response, 以下 LAR) に大別される¹⁾²⁾。

IAR は、主に I 型アレルギーによって発症すると考えられ、肥満細胞より遊離される化学伝達物質が関与していると考えられている。LAR は、临床上、持続時間が長く、 β 刺激剤に低反応であり、副腎皮質ホルモン薬が奏効するなどの特徴を有し³⁾、また、病態の重症度や気道反応性亢進との関連も示唆され⁴⁾、気管支喘息の病態解析の上でも重要と考えられている。その発症には好酸球⁵⁾や血小板⁶⁾などの関与が報告されている

が、詳細はいまだに不明である。

一方、エンケファリナーゼは、タキキニン類やエンケファリンなどの神経ペプチドを中性の条件下に効率よく水解することが知られており^{7)~10)}、気道、血管、神経組織などで神経ペプチドによる種々の反応を調節していることが知られている^{11)~15)}。

今回我々は、IAR、LAR の両者を呈する二相性のモルモット喘息モデルにおけるエンケファリナーゼ活性の動態について検討した。更に、IAR 時、LAR 時のモルモット摘出気管平滑筋を用いて薬理的張力測定を行い、タタキニン類の一種であるニューロキニン A (NKA) に対する反応性について検討した。

方 法

1. 感作方法および抗原吸入暴露

体重約 200~300g の Hartley 系雌性モルモットを用いて感作を開始した。Andersson ら¹⁶⁾の方法を一部変更してモデルを作成した (Fig. 1)。初日に cyclophosphamide (Aldrich Chemical 社) 30mg/kg 腹腔内投与し、2 日後 {粗製卵白アルブミン (以下 OA, 和光純薬工業社) 1000 μ g + Al(OH)₃ 100mg} を腹腔内投与し

Received: June 26, 1992

Accepted: October 8, 1992

Abbreviations: AMeCou amino methylcoumarin; BALF bronchoalveolar lavage fluid; IAR immediate asthmatic response; LAR late asthmatic response; LT leukotriene; NKA neurokinin A; OA ovalbumin; sGaw specific airway conductance

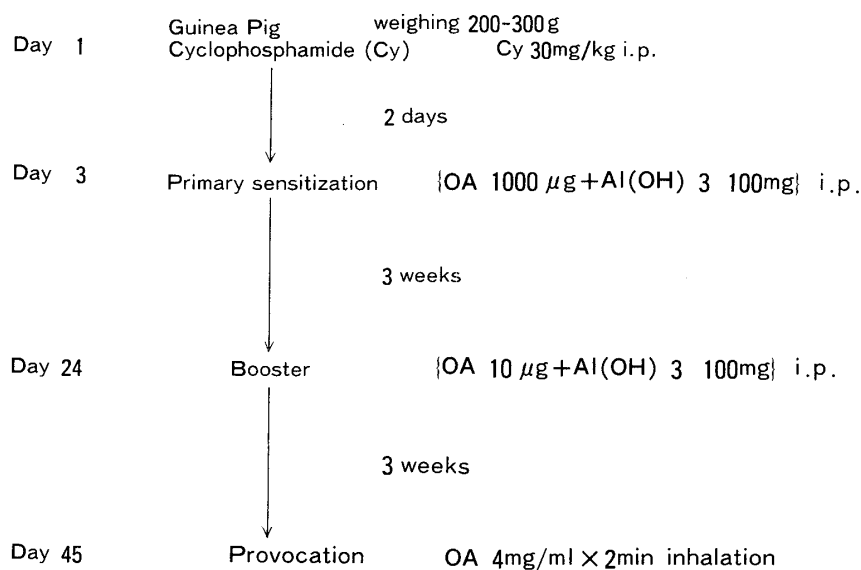


Fig. 1. Sensitizing procedures.

た。ブースターとして、3週後に{OA 10 μ g + Al(OH)₃ 100mg} を腹腔内に投与して感作を成立させた。

ブースターより3週後、感作開始から6週後に OA 4mg/ml を2分間吸入させて誘発した。この時点で Ovary らの方法に従い求めた PCA titer は、4時間および48時間のいずれも160倍以上を示した。吸入誘発は、小動物用体プレチスモグラフ内にて無麻酔、自発呼吸下にて行った(Fig. 2)。Agrawal¹⁷⁾の方法に従い、ボックス内ボリュームの変化、および流速をモニターして specific airway conductance (sGaw) を求めた。

ネブライザー (オムロン NE-U11), 差圧トランスデューサー (TP-602T, 日本光電), 呼吸気流計 (TV-241T, 日本光電), XY レコーダー (VQ-065A, ナショナル) を使用した。

2. モルモット気管, 肺, BALF 中のエンケファリナーゼ活性の測定

OA 吸入誘発前群(コントロール群), IAR 時, LAR 時の各々について、検体を作製した。IAR 時の検体は、吸入誘発5分後, LAR 時の検体は, IAR 回復後, sGaw が、再び吸入誘発前の75%以下に低下し、30分以上継

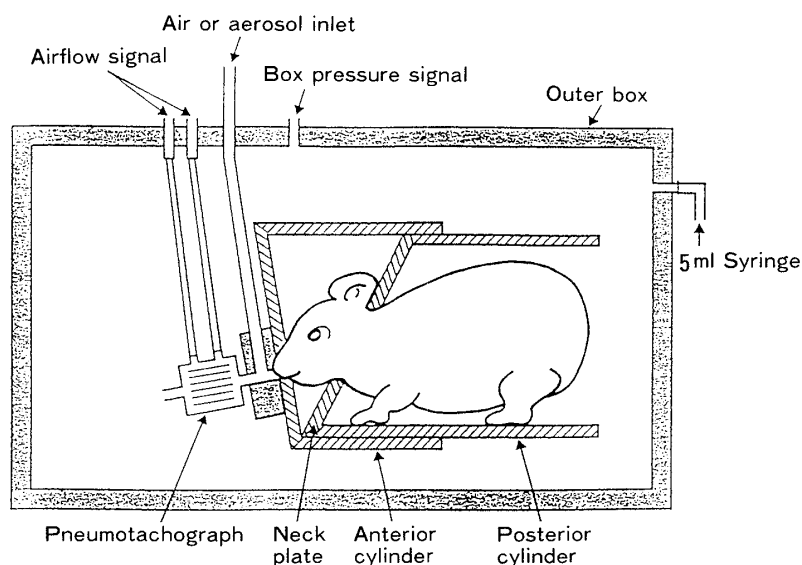


Fig. 2. Total assembly of the body plethysmograph.

続した時点で採取した。

モルモットをペントバルビタール(ダイナボット社) 50mg/kg 腹腔内投与麻酔後、正中切開にて開胸し、気管を露出して、カニューレを挿入し、生食20ml×3回 BAL を施行した。回収した BALF を400×g, 20分間(4℃)遠心し、その上清を BALF の検体とした。ついで気管、および肺を摘出し、気管分岐部で気管と肺に分けてホモジネートし、50mM octyl β -D-glucopyranoside (Oc β Glcp, 和光純薬)を含む50mM 2- {[tris (hydroxymethyl) methyl] amino} -ethanesulfonate (TES, 和光純薬) buffer (pH 7.5) 中に浮遊させ、100000×g, 60分間(4℃)遠心し、得られた上清を気管、および肺の検体とした。

エンケファリナーゼ活性は Zimmerman¹⁸⁾⁻²⁰⁾らの方法に従い、基質に Suc-Ala-Ala-Phe-AMeCou (7-amino-4-methylcoumarin, BAC-HEM)を用いて測定した。AMeCou 部がエンケファリナーゼの作用で切断遊離されることを利用し、この基質に検体を反応させて生じる AMeCou(ペプチド研究所)の量を測定した。

検体0.5mlを上記基質を含む溶液 {Suc-Ala-Ala-Phe AMeCou 0.2mM, 50mM Tes buffer, 5% dimethylsulfoxide, leucine aminopeptidase (5 μ g/ml), zinc acetate(50 μ M), calcium chloride(10mM)} 0.5ml と25℃で30分間反応させ、産生される AMeCou 量を分光蛍光光度計(F2000形, 日立社)にて、励起波長383nm, 蛍光波長455nmの条件下で測定した。測定時の際の溶液の pH は7.0程度の中性に保たれていることを確認した。エンケファリナーゼ活性は、含有蛋白量(バイオラッド法にて測定)で補正し、1分間に産生される AMeCou 量にて表現した。

3. ケンケファリナーゼ分画の検討

測定したエンケファリナーゼが、ホスホラミドンに感受性を示す分画か否かについて、BALF 検体を用いて確認した。

BALF 検体、(BALF 検体+基質を含む溶液)、更にこれにエンケファリナーゼ阻害剤であるホスホラミドン(ペプチド研究社) 10⁻⁶M 加えたものを各々、30分間 incubation した。その後383nmの励起波長でスキャンし、蛍光波長のスペクトラムを観察した。

4. NKA 誘発摘出気管切片収縮の検討

感作モルモットを OA 吸入で誘発し、前記2. と同様に IAR, LAR を生じた時点でペントバルビタール 50mg/kg 腹腔内投与麻酔後、正中切開にて開胸し、気管、心肺を一塊として摘出した。気管を周囲組織を鈍

的に剥離して摘出し、軟骨部で剖面を入れ縦切開し、2~3mm ずつの切片を横切開して作った。この切片を3個連結して気管平滑筋標本を作成し、modified Krebs-Ringer 液 (NaCl 112mM; KCl 4.8mM; CaCl₂ 2.8mM; KH₂PO₄ 1.2mM; MgSO₄ 1.2mM; NaHCO₃ 25mM; glucose 5.5mM) 5ml で満たしたマグナス管内に懸垂し、一端は固定し、他端は張力トランスデューサー (TB-611T, 日本光電) に接続して等尺性に張力変化を観察した。標本に1gの張力をかけ、1~2時間静置し平衡に達した後、塩化カリウム 50mM を加え、この収縮反応を100%として各反応を表示した。modified Krebs-Ringer 液で十分洗い、ホスホラミドン 10⁻⁶M, あるいは対照として生食を添加し、約30分間 incubation 後、NKA(ペプチド研究所)を濃度蓄積的に10⁻¹¹M より10⁻⁶M まで加え、用量反応曲線を作製した。マグナス管内の modified Krebs-Ringer 液は37℃に保ち、95%O₂と5%CO₂の混合気にて飽和させた。

5. 評価

実験データは、mean $\pm$ S.E. で表現し、統計学的検定には、unpaired t-test を用い、p value は、<0.05を有意と考えた。

結 果

1. 抗原吸入暴露後の sGaw の変化

Fig. 3 に感作モルモットの抗原吸入暴露後の sGaw の時間経過による推移を示す。IAR は吸入誘発直後より認められ、sGaw は、吸入誘発前の20.7 $\pm$ 3.1%まで低下し、1.12 $\pm$ 0.28hr で前値の75%以上までに回復した。LAR は吸入誘発後、4.89 $\pm$ 0.56hr より出現し、1.14 $\pm$ 0.35hr 継続し、この間 sGaw は61.6 $\pm$ 4.0%まで減少した。

2. エンケファリナーゼ活性の測定

Fig. 4 に BALF 中の総細胞数、細胞分画を示す。総細胞数は LAR 時で最も多く、次いで IAR, コントロール群の順であり、M ϕ は逆の傾向を示した。コントロール群, IAR 時, LAR 時の BALF の回収率は各々、91.0 $\pm$ 0.9%, 82.0 $\pm$ 1.8%, 85.3 $\pm$ 1.6%であった。

Fig. 5 にエンケファリナーゼ活性をコントロール群, IAR 群, LAR 群に分けて示す。気管は誘発前 24.1 $\pm$ 0.5 (nmol AMeCou/min/mg protein) に対し、IAR 時19.2 $\pm$ 0.8 (p <0.01), LAR 時17.7 $\pm$ 0.4 (p <

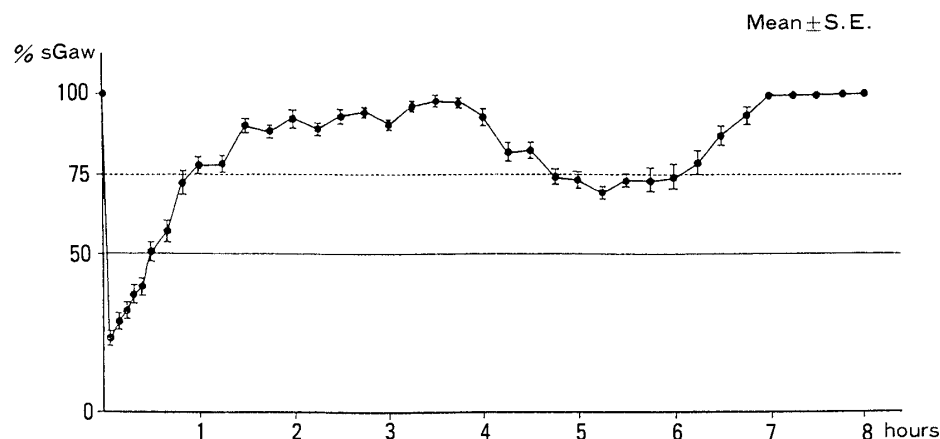


Fig. 3. Time related changes in sGaw after OA challenge.

The data are displayed as mean±S.E. (n=8)

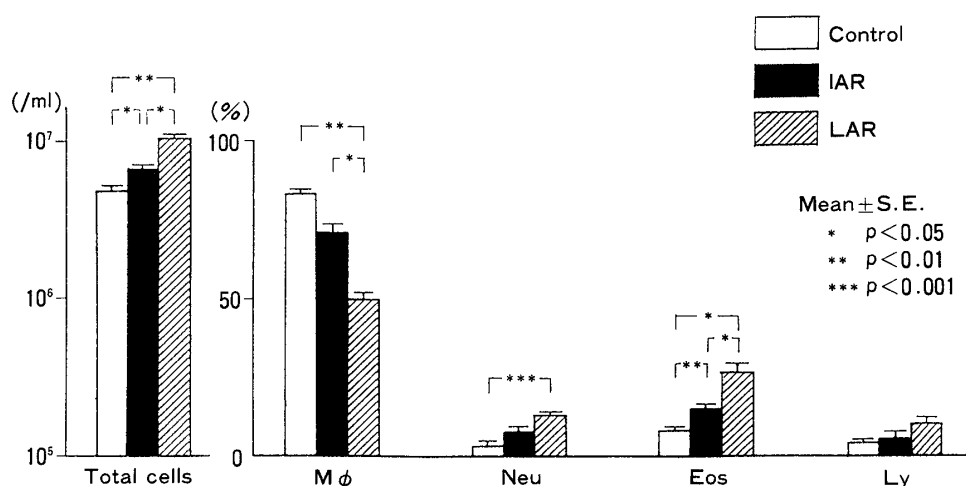


Fig. 4. Cells in BALF after challenge.

The data are displayed as mean±S.E.

Control (open columns, n=6), IAR (solid columns, n=5), LAR (striped columns, n=5).

0.001) であり、肺は誘発前 7.0 ± 0.7 に対し、IAR 時 5.2 ± 0.6 、LAR 時 3.9 ± 0.4 ($p < 0.001$) と LAR 時に強く抑制される傾向を示した。BALF では、誘発前 5.9 ± 0.9 に対し、IAR 時 3.3 ± 0.6 ($p < 0.05$)、LAR 時 2.2 ± 0.2 ($p < 0.05$) と同様の傾向を示した。

BALF 中の総細胞数、細胞分画とエンケファリナーゼ活性との間には、有意な相関は認めなかった。

3. エンケファリナーゼ分画の検討

Fig. 6 に BALF 検体、(BALF 検体+基質を含む溶液)、更にこれにホスホラミドンを 10^{-6} M 加えたものを30分間 incubation した蛍光波長のスペクトラムを、383nm の励起波長でスキャンした際の代表的なトレースの結果を示す。455nm の蛍光波長で検出される

AMECou のは、 10^{-6} M のホスホラミドンの添加で95%以上抑制され、測定したエンケファリナーゼはホスホラミドン感受性がある分画であることを確認した。また、in vitro では、ホスホラミドンは、 10^{-6} M でエンケファリナーゼ活性をほぼ抑制することを確認した。

4. NKA 誘発摘出気管切片収縮の検討

薬理的張力測定の結果を Fig. 7 に示す。コントロール群、IAR 群は、ホスホラミドン 10^{-6} M 添加した場合、その用量反応曲線は左方に移動し、NKA 10^{-6} M における収縮反応も有意差を認めたが、LAR 群は、両者の解離が小さくなり、NKA 10^{-6} M における収縮反応にも有意差を認めなかった。なお、各群ともホスホラミドン 10^{-6} M 添加した場合の NKA 10^{-6} M にお

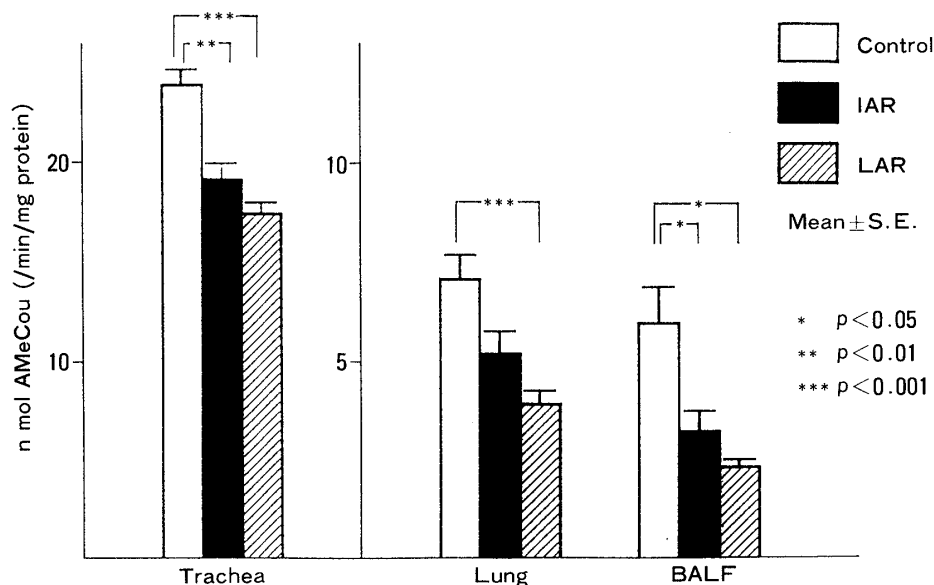


Fig. 5. Enkephalinase activities of guinea pig's trachea, lung and BALF. The activity was monitored by measuring the release of AMeCou in a spectrofluorometer with an excitation of 383nm and emission at 455nm wavelengths.

Values are displayed as mean ± S.E. (nmol AMeCou/min/mg protein). Compared with control values (open columns, n=10), IAR values (solid columns, n=8) and LAR values (striped columns, n=10) are inhibited significantly. (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)

る収縮反応は、 $166.9 \pm 5.5\%$, $167.7 \pm 9.8\%$, $153.0 \pm 13.1\%$ と有意差はなかった。

ホスホラミドン非添加群について、コントロール群、IAR 群、LAR 群間で、NKA $10^{-6}M$ における収縮反応 (E_{max})、および、50mM KCl による最大収縮反応の 80% の収縮を惹起する NKA 濃度の $-\log(pEC_{80})$ をまとめて示す (Table 1)。LAR 群は、コントロール群と比較して、 E_{max} , pEC_{80} とも有意に増強した。IAR 群も同様の傾向を示したが、有意差は認められなかった。

考 察

今回の実験で我々は、二相性反応モデルにおけるエンケファリナーゼ活性の動態について検討した。気管、肺におけるエンケファリナーゼ活性は、IAR, LAR 時ともに抑制されたが、LAR 時には特にその傾向が強くなり、また、薬理的張力測定においても LAR 時に採取した標本は、NKA に対する反応が強く、その用量反応曲線はホスホラミドンを添加した場合のものに近い

た。今回の結果から気道組織中のエンケファリナーゼ活性の低下が、IAR および LAR の発症機序、あるいは、その後に生じる気道過敏性亢進の病態などに関連する可能性が示唆された。

Fig. 5 に示すように IAR, LAR 時には、含有蛋白にて補正したエンケファリナーゼ活性は有意に低下した。気管、肺に関しては蛋白補正前のエンケファリナーゼ活性も IAR, LAR 時には低かったのに対し、回収された BALF 中の総活性は、IAR (96.4 ± 8.5 nmol AMeCou/min) > LAR (69.9 ± 5.2) > コントロール (61.1 ± 4.9) の順であり、BALF 中に放出されるエンケファリナーゼは、誘発後かなりの量になるものと思われる。この気道系からの逸脱がエンケファリナーゼ活性が低下する機序のひとつと考えられる。エンケファリナーゼは気道系では、平滑筋、分泌腺組織、神経線維などにも存在するが²¹⁾²²⁾、その多くは上皮細胞中に存在すると考えられ²³⁾、誘発後の気道上皮細胞の剝離、障害に伴いエンケファリナーゼが減少するものと考えられる。また、急性期には、タキキニン等のエンケファリナーゼの基質になる物質が増加し、これを分解するため消耗性に減少する可能性も考えられる。

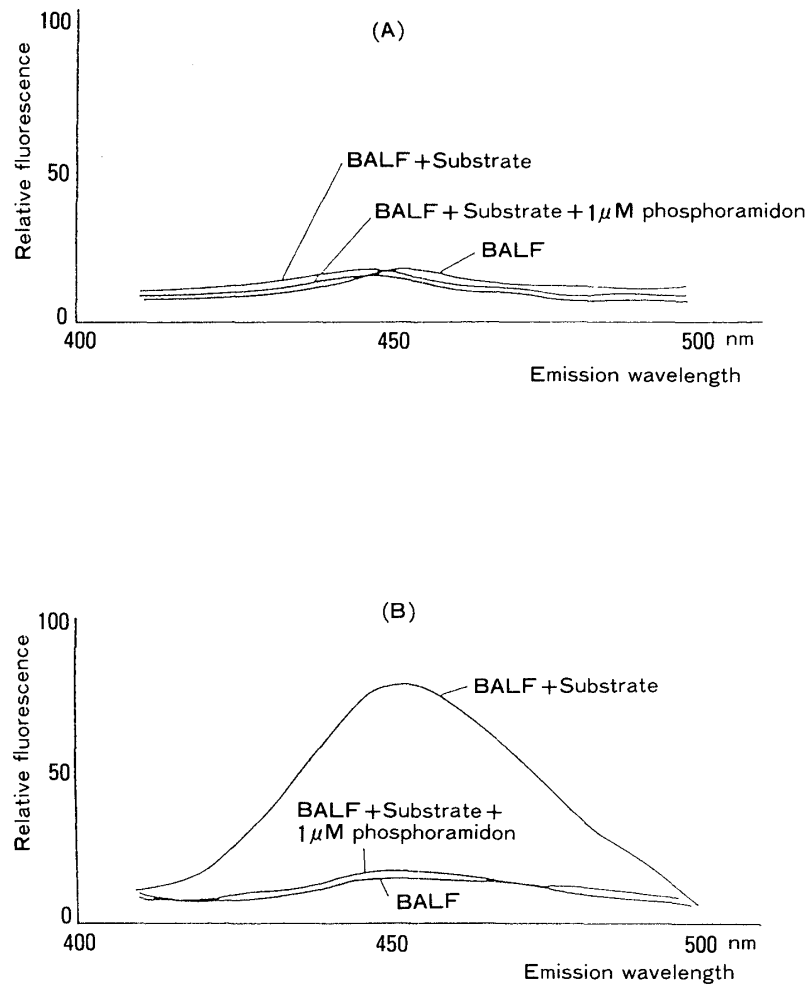


Fig. 6. Effect of phosphoramidon on the enkephalinase activity. The scan was performed in a spectrofluorometer with an excitation of 383nm wavelengths.

(A) Samples soon after incubation at 25°C

(B) Samples after incubation at 25°C for 30min.

When incubation was done in (BALF+Substrate), AMeCou was released but when the incubation was performed with phosphoramidon (10^{-6} M) the release of AMeCou was markedly inhibited.

薬理的張力測定の結果は Fig. 7, および Table 1 に示すとおりである。LAR 時に摘出した気管平滑筋標本はコントロール群に比較して NKA に対する収縮反応が増強し、また、ホスホラミドン 10^{-6} M 添加したものと用量反応曲線の解離が小さくなったことから、in vitro においても LAR 時には、エンケファリナーゼ活性が低下している可能性が推察される。IAR 時にも同様の傾向を認めたが、Emax, pEC₅₀ はコントロール群と比較して有意差は認めなかった。

エンケファリナーゼは、タキニン類の他、エンドセリンなどの気道収縮物質を分解することが知られている²³⁾⁻²⁶⁾。その活性の低下により、これらの気道収縮

物質に対して過剰な反応を示したり、咳嗽が誘発されやすくなることが報告されている²⁷⁾。また、その活性は、感染²⁸⁾²⁹⁾や喫煙³⁰⁾で抑制されることが報告されている。アレルギー反応との関連では、in vitro の系において、OA 感作後のモルモット摘出気管を OA チャレンジした際、ホスホラミドンを投与することで収縮反応が長く継続することから、免疫反応で気管収縮が惹起される場合にタキニン様の物質が放出され、この際エンケファリナーゼが重要な役割を演じている可能性が報告され、ロイコトリエン C₄ (LTC₄) が、タキニン様の物質を放出する可能性のある物質としてあげられている³¹⁾。

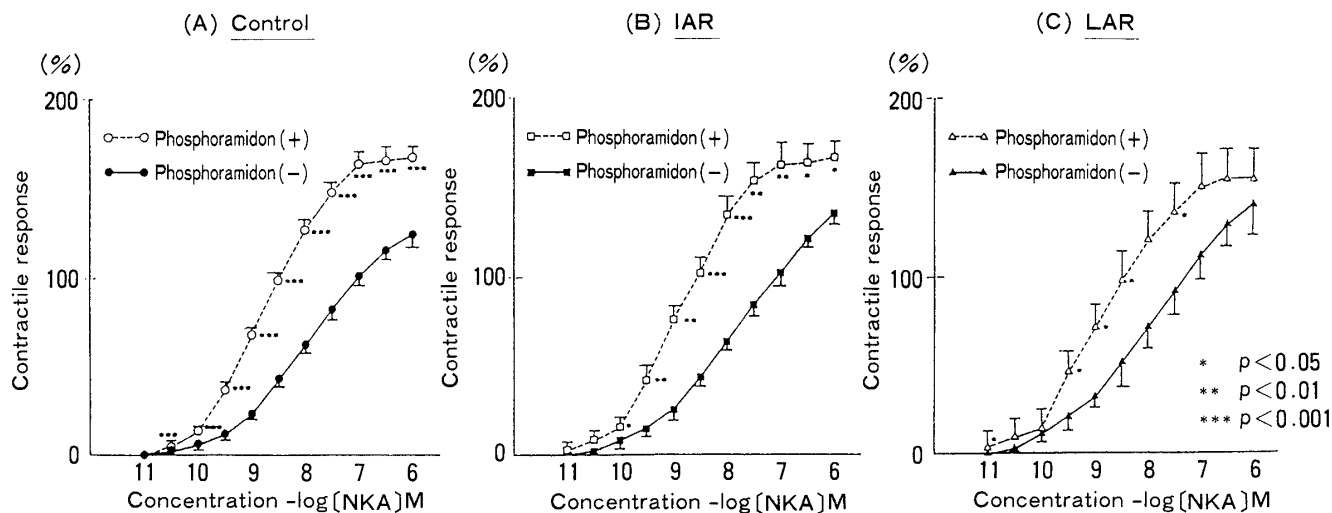


Fig. 7. Dose-response curve for NKA with or without phosphoramidon 10^{-6} M. The contractile responses were expressed as a percentage of maximal response induced by 50mM of KCl. The data are displayed as mean $\pm$ S.E.

(A) control (n=8), (B) IAR (n=6), (C) LAR (n=6).

Table 1 The potency (pEC_{80}) and efficiency (E_{max}) of NKA in the control, IAR and LAR groups

	Control	IAR	LAR
pEC_{80}	7.45 ± 0.10	7.47 ± 0.08	$7.90 \pm 0.18^*$
E_{max}	123.4 ± 5.4	135.3 ± 3.4	$146.6 \pm 9.8^*$

pEC_{80} : -log molar concentration of NKA for producing 80% contraction of the KCl(50mM)-induced maximum contraction.

E_{max} : % of the KCl-induced maximum.

Difference from control group. $^*p < 0.05$.

control(n=8), IAR(n=6), LAR(n=6).

今回の結果と合わせて考えると感作モルモットにおいては吸入誘発後、エンケファリナーゼ活性が低下し、種々の気道収縮物質に対して反応性が亢進する状況が準備され、この状態でタキニン様物質が放出されると気道収縮や気管腺分泌亢進³²⁾など、LARの病態に近い現象が発現してくる可能性が推察される。臨床上LARに有効とされる副腎皮質ホルモンは、エンケファリナーゼ活性を上昇させることが報告されており³³⁾、気管支喘息を含めて種々の呼吸器疾患に有効な機転のひとつに、タキニン類による気道収縮や分泌亢進を抑制して作用を発現している可能性も考えられる。

今回の結果から、二相性反応を呈するモルモット喘息モデルにおいては、IAR, LARとも気道中におけるエンケファリナーゼ活性の低下を認めたが、殊にLAR

においては、その傾向が強く、このことが病態を惹起、修飾している可能性が示唆された。今後、LAR後のエンケファリナーゼの回復の動態などについて更に検討を進めたいと考えている。

文 献

- 1) Pepys, J., Hargreave, F.E., Chan, M. and McCarthy, D.S.: Inhibitory effects of disodium cromoglycate on allergen-inhalation tests. *Lancet* 2, 134-137, 1968.
- 2) 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.
- 3) O'Byrne, P.M., Dolovich, J. and Hargreave, F.E.: Late asthmatic response. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136, 740-751, 1987.
- 4) 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 change in airway caliber. *J. Allergy Clin. Immunol.* 70, 170-177, 1982.
- 5) Rossi, G.A., Crimi, E., Lantero, S., Gianiorio, P., Oddera, S., et al.: Late-phase asthmatic reaction to inhaled allergen is associated with early

- recruitment of eosinophils in the airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144, 379-383, 1991.
- 6) Averill, F.J., Hubbard, W.C., Proud, D., Gleich, G.J. and Liu, M.C.: Platelet activation in the lung after antigen challenge in a model of allergic asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145, 571-576, 1992.
 - 7) Kerr, M.A. and Kenny, A.J.: The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem. J.* 137, 477-488, 1974.
 - 8) Malfroy, B., Swerts, J.P., Guyon, A., Roques, B. P., Schwartz, J.C.: High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature* 276, 523-526, 1978.
 - 9) Matsas, R., Fulcher, I.S., Kenny, A.J. and Turner, A.J.: Substance P and [Leu] enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 311-3115, 1983.
 - 10) Goetzl, E.J., Sreedharan, S.P., Truck, C.W., Bridenbaugh, R. and Malfroy, B.: Preferential cleavage of amino- and carboxyl-terminal oligopeptides from vasoactive intestinal polypeptide by human recombinant enkephalinase (neutral endopeptidase, EC3. 4. 24. 11). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158, 850-854, 1989.
 - 11) 大瀬寛高, 野村明広, 亀山昌明, 二宮浩樹, 早乙女幹朗, 他: NKAの気道収縮作用に対するエンケファリナーゼの影響. 日臨生理誌 6, 387-403, 1992.
 - 12) Stimler-Gerard, N.P.: Neutral endopeptidase-like enzyme controls the contractile activity of substance P in guinea pig lung. *J. Clin. Invest.* 79, 1819-1825, 1987.
 - 13) Borson, D.B., Corrales, R., Varsano, S., Gold, M. and Viro, N.: Enkephalinase inhibitors potentiate substance P-induced secretion of $^{35}\text{SO}_4$ -macromolecules from ferret trachea. *Exp. Lung Res.* 12, 21-36, 1987.
 - 14) Iwamoto, I., Ueki, I.F., Borson, D.B. and Nadel, J.A.: Neutral endopeptidase modulates tachykinin-induced increase in vascular permeability in guinea pig skin. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 88, 288-293, 1989.
 - 15) Roques, B.P., Fournie-Zaluski, M.C., Soroca, E., Lecomte, J.M., Malfroy, B., et al.: The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice. *Nature* 288, 286-288, 1980.
 - 16) Andersson, P.: Antigen-induced bronchial anaphylaxis in actively sensitized guinea pigs: The effect of booster injection and cyclophosphamide treatment. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 64, 249-258, 1981.
 - 17) Agrawal, K.P.: Specific airway conductance in guinea pigs; normal values and histamine induced fall. *Respir. Physiol.* 43, 23-30, 1981.
 - 18) Zimmerman, M., Yurewicz, E. and Patel, G.: A new fluorogenic substrate for chymotrypsin. *Anal. Biochem.* 70, 258-262, 1976.
 - 19) Zimmerman, M., Quigley, J.P., Ashe, B., Dorn, C., Goldfarb, R. and Troll, W.: Direct fluorescent assay of urokinase and plasminogen activators of normal and malignant cells: Kinetics and inhibitor profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 750-753, 1978.
 - 20) Mumford, R.A., Pierzchala, P.A., Strauss, A.W. and Zimmerman, M.: Purification of a membrane-bound metalloendopeptidase from porcine kidney that degrades peptide hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6623-6627, 1981.
 - 21) Borson, D.B., Malfroy, R., Gold, M., Ramachandran, J. and Nadel, J.A.: Tachykinins inhibit enkephalinase activity from trachea and lungs of ferrets. *Physiologist*. 29, 174 (Abstract), 1986.
 - 22) Sekizawa, K., Tamaoki, J., Nadel, J.A. and Borson, D.B.: Enkephalinase inhibitor potentiates substance P- and electrically induced contraction in ferret trachea. *J. Appl. Physiol.* 63, 1401-1405, 1987.
 - 23) Candenas, M.L., Naline, E., Sarria, B. and Advenier, C.: Effect of epithelium removal and of enkephalin inhibition on the bronchoconstrictor response to three endothelins of the human isolated bronchus. *Eur. J. Pharmacol.* 210, 291-297, 1992.
 - 24) Vijayaraghavan, J., Scicli, A.G., Carretero, O. A., Slaughter, C., Moomaw, C. and Hersh, L.B.: The hydrolysis of endothelins by neutral endopeptidase 24. 11 (enkephalinase). *J. Biol. Chem.* 265, 14150-14155, 1990.
 - 25) Sokolovsky, M., Galron, R., Kloog, Y., Bdolah, A., Inding, F.E., et al.: Endothelins are more sensitive than sarafotoxins to neutral endopeptidase: Possible physiological significance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4702-4706, 1990.
 - 26) 大瀬寛高, 野村明広, 亀山昌明, 二宮浩樹, 早乙女幹朗, 他: エンドセリン-1の気道収縮に対するエンケファリナーゼ阻害剤の影響. 日胸疾会誌 30, 1063-1071, 1992.
 - 27) Kohrogi, H., Graf, P.D., Sekizawa, K., Borson, D.B. and Nadel, J.A.: Neutral endopeptidase

- inhibitors potentiate substance P- and capsaicin-induced cough in awake guinea pigs. *J. Clin. Invest.* 82, 2063-2068, 1988.
- 28) Dusser, D.J., Jacoby, D.B., Djokic, T.D., Rubinstein, I., Borson, D.B. and Nadel, J.A.: Virus induces airway hyperresponsiveness to tachykinins: Role of neutral endopeptidase. *J. Appl. Physiol.* 67, 1504-1511, 1989.
- 29) Borson, D.B., Brokaw, J.J., Sekizawa, K., McDonald, D.M. and Nadel, J.A.: Neutral endopeptidase and neurogenic inflammation in rats with respiratory infections. *J. Appl. Physiol.* 66, 2653-2658, 1989.
- 30) Dusser, D.J., Djokic, T.D., Borson, D.B. and Nadel, J.A.: Cigarette smoke induces bronchoconstrictor hyperresponsiveness to substance P and inactivates airway neutral endopeptidase in the guinea pigs. *J. Clin. Invest.* 84, 900-906, 1989.
- 31) Kohrogi, H., Yamaguchi, T., Kawano, O., Honda, I., Ando, M. and Araki, S.: Inhibition of neutral endopeptidase potentiates bronchial contraction induced by immune response in guinea pigs in vitro. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144, 636-641, 1991.
- 32) Baker, A.P., Hillegass, L.M., Holden, D.A. and Smith, W.J.: Effect of kallidin, substance P, and other basic polypeptides on the production of respiratory macromolecules. *Am. Rev. Respir. Dis.* 115, 811-817, 1977.
- 33) Borson, D.B. and Gruenert, D.C.: Glucocorticoids induce neutral endopeptidase in transformed human tracheal epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 260, (Lung Cell Mol. Physiol. 4), L83-L89, 1991.

ENKEPHALINASE ACTIVITY IN THE GUINEA PIG MODEL OF ASTHMA

Hiroataka Ohse, Akihiro Nomura, Takeo Endoh, Yoshiko Noguchi, Mikio Saotome,

Hiroki Ninomiya, Azuma Watanabe, Junn To, Kenichi Hashimoto,

Yoshiyuki Uchida and Shizuo Hasegawa

Division of Pulmonary Medicine, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba

Enkephalinase exists in airway epithelial cells, smooth muscle, and submucosa near glands, and cleaves tachykinins to inactive metabolites, thereby reducing their effects. To study the role of enkephalinase in asthmatic response, we measured its activity in guinea pig model of asthma. When compared with the control values, the enkephalinase activity was reduced during immediate asthmatic response (IAR) and late asthmatic response (LAR). Compared with the control values (100%), each value was 79.7%, 73.4% in the trachea and 74.3%, 55.7% in the lung respectively. Tracheal muscle preparation taken from the control, IAR, and LAR groups were made and mounted in oxygenated modified Krebs-Ringer solution. The response was monitored by isometric transducer. Concentration response curves to NKA with or without phosphoramidon were obtained. The contractile responses of the LAR groups were enhanced in potency and efficiency. Phosphoramidon potentiated the NKA induced contraction of control and the IAR groups but was less potent in enhancing the contractile response in the LAR group, showing less enkephalinase activity in the LAR. These results suggest that the enkephalinase plays an important role in LAR. In LAR, the enkephalinase activity may be inhibited and the responsiveness of the smooth muscle to some bronchoconstrictor, such as tachykinins, may be increased.