

〔速報〕

モルモット喘息モデルでの2相性好酸球浸潤に対する

PAF拮抗剤とCyclosporin Aの効果

獨協医科大学アレルギー内科

福田 健	阿久津郁夫	天下井正弘
沼尾利郎	本島新司	牧野荘平

好酸球が気道粘膜に集積するメカニズムを明らかにするため、腹腔能動感作および受身感作モルモットにおける、抗原吸入後の気道粘膜内好酸球浸潤の時間経過について比較検討した。好酸球浸潤の観察は気管組織で行い、好酸球数と組織の面積を測定し、単位面積に浸潤した好酸球数を求めた。腹腔能動感作モルモットの好酸球浸潤は2相性で、抗原吸入後6時間をピークとする著明な浸潤と24時間をピークとし数日間持続する浸潤が認められた。著者らは便宜上、前者をearly-phase、後者をdelayed-phaseの好酸球浸潤とした。受身感作モルモットの好酸球浸潤は1相性でdelayed-phaseにあたる浸潤はみられなかった。これら2相性の浸潤に対する薬剤の影響を検討してみると、PAF拮抗剤のCV-6209はearly-phaseの好酸球浸潤のみを、T細胞に選択的な免疫抑制剤であるCyclosporin Aはdelayed-phaseの好酸球浸潤のみを有意に抑制した。

以上の結果より、early-phaseの浸潤にはPAFが、delayed-phaseの浸潤にはT細胞由来の因子が関与している可能性が示唆された。

Key words: bronchial asthma — Cyclosporin A — eosinophil infiltration — guinea pig — PAF antagonist

緒言

気管支喘息の特徴的な病理学的所見の一つは、気管支粘膜内の好酸球浸潤である。最近、多くの研究により、好酸球はLTC₄やPAFなどの炎症性メディエーターの産生細胞であること、また、その顆粒内の蛋白には気道粘膜上皮傷害作用があることが示されており、好酸球浸潤は喘息の病態、とくに、その慢性化機序に深く関わっていると考えられている¹⁾。したがって、好酸球が気道組織に集積するメカニズムを解明することは極めて重要であるが、詳細な研究は数少ない。著者らは、能動感作と受身感作モルモットを用いた実験喘息の研究過程で、抗原吸入後6時間の気道粘膜内好酸球浸潤は感作法の違いによらず著明に認められるが、抗原吸入24時間以降の浸潤には大きな違いがあることに気付いた。この違いについて調べることは好酸

球浸潤のメカニズム解明の糸口になると考え、本研究では能動腹腔感作および受身感作モルモットにおける抗原吸入後の気道粘膜内好酸球浸潤の時間経過について比較検討した。更に、能動感作モルモットの好酸球浸潤に対するPAF拮抗剤のCV-6209、T細胞に選択的な免疫抑制剤Cyclosporin A (CyA)の効果についても検討した。

方法

1) 感作モルモットの作成

腹腔能動感作モルモットは、体重300g前後のHartley系雄モルモットの腹腔内にovalbumin (OA) 1μgを5mgのAl(OH)₃とともに2週間隔で3回注射して作成した。受身感作モルモットは、体重400g前後の正常モルモットに48時間PCA値640倍の同種抗OA血清を2ml/kg静脈内投与して作成した。

(2) 抗原吸入チャレンジ

腹腔能動感作モルモットでは最後の感作の約1週間後に、受身感作モルモットでは同種抗OA血清静脈内

Received: February 27, 1990

Accepted: May 16, 1990

Abbreviations: CyA Cyclosporin A; OA ovalbumin; PAF Platelet-activating factor; PCA passive cutaneous anaphylaxis

投与48時間後に行った。抗原吸入前後での呼吸抵抗の測定が可能なように、oscillatorと接続してあるフェニマルボックス内にモルモットを入れ、頭部のみを外に突出させて固定した。抗原チャレンジの際はその頭部をDevilbiss 646ネブライザーと連結したエアロチャンバーで被い、エロゾル化したOAを各濃度1分間ずつ吸入させた。OA吸入は0.4mg/mlの低濃度より開始して、呼吸抵抗を測定しながら、濃度を倍々に増し、呼吸抵抗値が前値の2倍に達するまで続けた。呼吸抵抗は、既に報告してある方法²⁾で行った。

抗原吸入後、30分、3、6、9、12、24、48、120時間でモルモットを脱血死させ、気管と肺を摘出した。

(3) 組織学的検討

摘出標本はホルマリン固定後、パラフィン包埋し、2 μ mに薄切した後、H-E、Giemsa、Hansel染色を行い鏡検した。初期の検討で、好酸球浸潤の時間的経過は気管壁と気管支壁で大差がないことが明らかになったため、好酸球浸潤の定量的観察には気管を用いた。気管壁内に浸潤した好酸球の数を算定した後、画像描記装置（オリンパス）にて軟骨を除く気管壁の

outlineをトレースし、その面積をコンピューター（NEC 2次元デジタル化プログラム）を用いて測定し、平面組織1mm²あたりの好酸球数として表現した。なお、本方法による定量化が気管全体の好酸球浸潤を適確に反映しているかどうかをみるため、一部の気管標本において、離れた数カ所部分の薄切標本を作成し、単位面積あたりの好酸球数を比較してみたが、大差は認められなかった。よって、本方法は気管組織への好酸球浸潤を検討するうえで妥当な方法と思われた。

(4) 薬剤による前処置

PAF拮抗剤のCV-6209 (0.3, 1.3mg/kg)は、抗原吸入チャレンジ10分前および12時間後に静脈内投与した。この場合のコントロールはPAF溶解液の生理食塩水を同様の方法で与えたものとした。CyAの効果発現には、長期投与が必要であることが知られているので³⁾、CyA 50mg/kg/dayは感作初日より抗原チャレンジ前日までの毎日、経口投与した。この場合のコントロールはCyA溶解剤のオリーブ油を全く同様な方法で投与した動物とした。

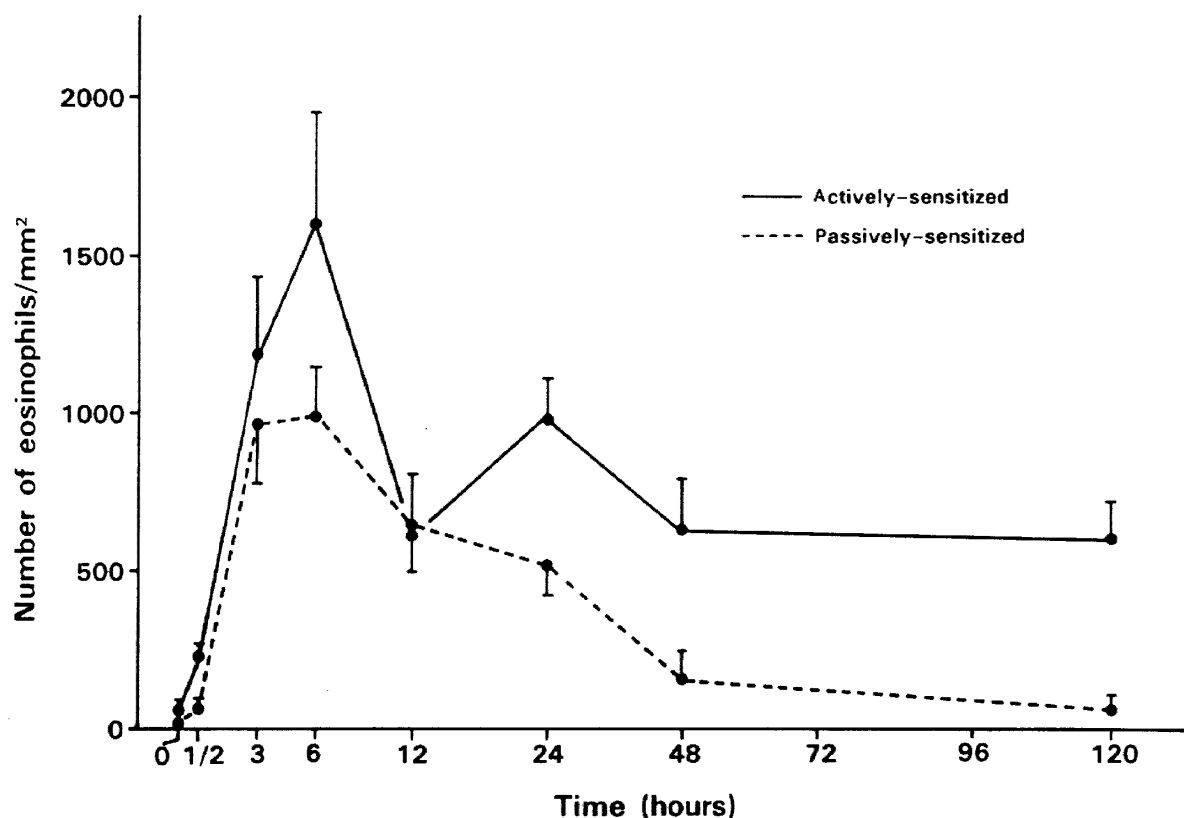


Fig. 1. Infiltration of eosinophils in the tracheal wall following antigen inhalation challenge in passively-sensitized and actively-sensitized guinea pigs.

Each point represents the mean $\pm$ SEM of 6 separate experiments for passively-sensitized and of 8 separate experiments for actively-sensitized animals.

(5) 統計学的評価

実験結果は全て Mean $\pm$ SEM で表現した。有意差の検定は、Student's t-test を用い、 $p<0.05$ の場合を有意とした。

結 果

(1) 気管支壁内好酸球浸潤の時間経過

腹腔能動感作および受身感作モルモットにおける、抗原吸入チャレンジ後の気管壁内好酸球浸潤の時間経過を Fig. 1 に示す。腹腔能動感作群では抗原吸入前が $48\pm22/\text{mm}^2$ 、抗原吸入 3, 6 時間後が各々 $1180\pm258/\text{mm}^2$, $1585\pm354/\text{mm}^2$ と抗原吸入 6 時間後でピークに達し、12 時間後では $613\pm132/\text{mm}^2$ と減少した。しかし、24 時間後では $979\pm114/\text{mm}^2$ と再び増加、その後減少したものの 120 時間後でも $592\pm120/\text{mm}^2$ と明らかな好酸球浸潤が認められた。すなわち、腹腔能動感作モルモットでは抗原吸入チャレンジ後 6 時間と 24 時間

にピークを示す 2 相性の好酸球浸潤が観察された。以下、便宜上、前者を early-phase、後者を delayed-phase の好酸球浸潤と呼ぶことにする。一方、受身感作群では抗原吸入後 6 時間にピークに達した後は時間の経過と共に減少し、能動感作群の early-phase にあたる好酸球浸潤のみが観察された。

(2) 2 相性の好酸球浸潤に対する CV-6209, Cyclosporin A の効果

early-phase および delayed-phase の好酸球浸潤に対する CV-6209, CyA の効果をみるため、これらの薬剤で前処置した場合の、抗原吸入 6 時間後と 24 時間後の組織を観察した (Fig. 2)。抗原吸入前 10 分と吸入後 12 時間後に 3mg/kg の CV-6209 を静脈内投与すると、6 時間後の好酸球浸潤は有意に抑制された。しかし、24 時間後の浸潤は抑制されなかった。図には示していないが、抗原吸入後 18 時間まで 6 時間ごとに CV-6209 の静脈内投与を行っても 24 時間後の浸潤は有意には抑制されなかった。

CyA による前処置は感作開始時から行ったため、ア

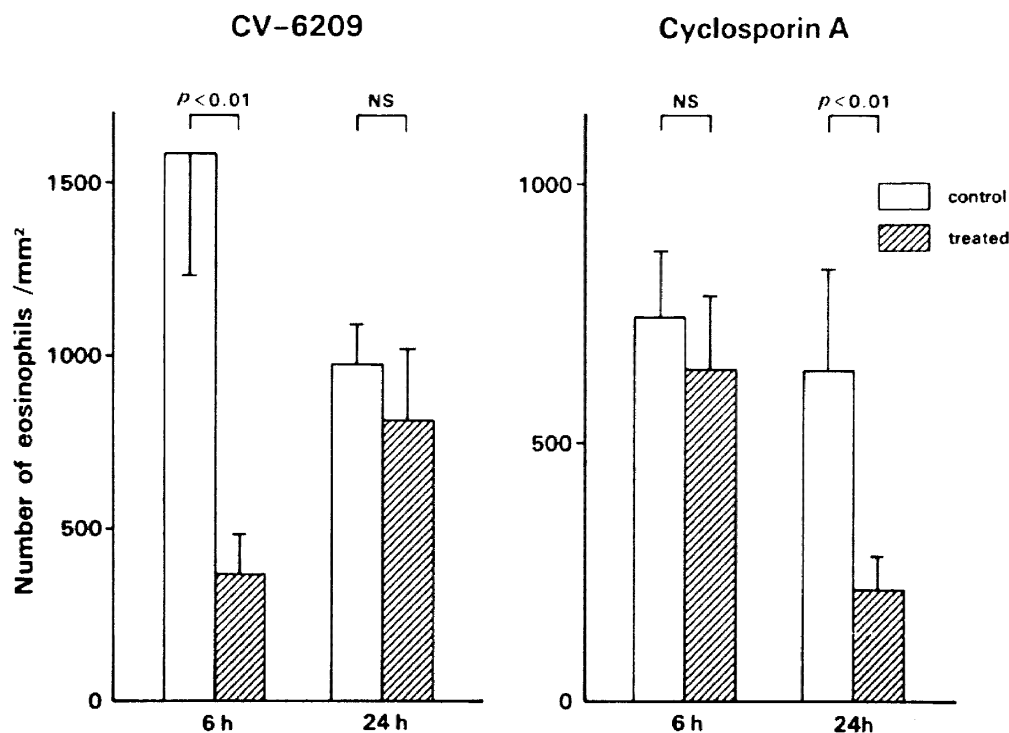


Fig. 2. Effects of CV-6209 and Cyclosporin A on antigen-induced eosinophil accumulation in tracheal walls. CV-6209, 3mg/kg was injected 10 min before and 12 hrs after inhalation challenge of ovalbumin. For the treatment with Cyclosporin A, each guinea pig was administered 50mg/kg of Cyclosporin A through a stomach tube every other day from the 1st day of immunization. Olive oil alone was administered in a similar manner to control guinea pigs. Each histogram is the mean of 8 separate experiments.

ナフィラキシー抗体産生に及ぼす影響も考え、まず、その48時間PCA値を測定してみた。CyA処置群のPCA値は40×~320×で、コントロール群の80×~640×と比べ若干低い傾向にあった。しかし、抗原吸入量を増加することにより、コントロール群と同程度の即時型気道収縮反応を惹起できた。Fig. 2に示すように、CyA 50mg/kg/dayの前処置で抗原吸入チャレンジ24時間の好酸球浸潤は有意に抑制された。しかし、6時間後の好酸球浸潤は抑制されなかった。

考 案

腹腔能動感作モルモットに抗原を吸入させて気道内アナフィラキシー反応を惹起し、気道組織の好酸球反応を経時的に検討したところ、反応は2相性で、3~6時間後をピークとする強い好酸球浸潤と24時間後をピークとし数日間持続する好酸球浸潤が観察された。一方、受身感作モルモットでは、3~6時間後をピークとし、その後、時間の経過と共に減少する1相性の好酸球浸潤のみが認められた。2相性の好酸球反応は、既に平島ら⁴⁾によって抗原誘発皮膚アレルギーの組織で観察されており、各々にearly-phase, delayed-phaseの名称が付けられている。組織は異なるが、時間経過が極めて類似していることより、著者らも第1相をearly-phase, 第2相をdelayed-phaseと呼ぶことにした。

次に著者らはこのような2相性反応の起こるメカニズムに興味をもった。まず、early-phaseの好酸球浸潤であるが、これは受身感作モルモットでも著明に認められることより、即時型アレルギー反応由来のメディエーター群が関与していると想定した。一方、delayed-phaseの好酸球浸潤については、細胞性免疫が関与しない受身感作では起こらないこと、また、その発現時間が遅いことより細胞性免疫の関与を想定した。そこで、最も強力な好酸球遊走活性をもつPAFに対する拮抗剤のCV-6209と、細胞性免疫抑制剤のCyAによる前処置の効果を検討した。その結果、early-phaseの好酸球浸潤はCV-6209によって、delayed-phaseの好酸球浸潤はCyAによって有意に抑制された。WEB-2086やBN-52021など他のPAF拮抗剤も抗原吸入6時間後の好酸球浸潤を抑制することが報告されている⁵⁾。したがって、early-phaseの好酸球浸潤には、PAFが関与している可能性が高く、IgE-mediatedの反応を介した好酸球浸潤の可能性が高い。しかし、

PAFが直接好酸球遊走因子として作用しているか、単にinitiatorにすぎないかは不明であり、今後の研究課題と言えよう。また、PAF拮抗剤による抑制は完全でなかったことより、early-phaseの好酸球浸潤には他のメディエーターの関与も考えられ、その解明のために、種々のメディエーター拮抗剤の影響を検討して見る必要がある。一方、delayed-phaseの好酸球浸潤であるが、これはCV-6209では抑制されず、CyAによる前処置で有意に抑制された。CyAによる好酸球浸潤の抑制は、既に野上らによりマウスの肺好酸球症モデルで観察されており、好酸球浸潤にT細胞が関与する可能性が報告されている⁶⁾。CyAはモルモットにおいても、T細胞の活性化を抑制し⁷⁾、リンホカインの産生を抑制する⁸⁾ことが知られているので、delayed-phaseの浸潤はT細胞由来の因子を介した反応(T cell-mediated)であることが示唆される。平島ら⁹⁾は、皮膚アレルギーにおけるdelayed-phaseの好酸球浸潤が分子量7万の2種類のリンホカインによることを証明しており、肺でも同様な因子の存在が予想される。分離抽出による直接的な証明が今後の課題と思われる。

文 献

- 1) Kay, A.B.: Mediators and inflammatory cells in allergic disease. *Ann. Allergy* 59(Suppl), 35-42, 1987.
- 2) 寺師義典, 湯川龍雄, 福田 健, 牧野莊平: モルモット気道アレルギーにおける遅発型反応の出現とその発症因子に関する基礎的研究. I. 同種抗体受身感作モデル及び抗原反復吸入能動感作モデルの比較検討. *アレルギー* 37, 980-991, 1988.
- 3) Takizawa, H., Suko, M., Kobayashi, N., Shoji, S., Ohta, K., et al.: Experimental hypersensitivity pneumonitis in the mouse; histologic and immunologic features and their modulation with cyclosporin A. *J. Allergy Clin. Immunol.* 81, 391-400, 1988.
- 4) Hirashima, M. and Hayashi, H.: The mediation of tissue eosinophilia in hypersensitivity reaction. I. Isolation of two different chemotactic factors from DNP-ascaris extract-induced skin lesion in guinea-pigs. *Immunology* 30, 203-212, 1976.
- 5) Lellouch-Tubiana, A., Lefort, J., Simon, M.-T., Pfister, A. and Vargatig, B.B.: Eosinophil recruitment into guinea pig lungs after PAF-acether and allergen administration; modula-

- tion by prostacyclin, platelet depletion, and selective antagonists. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137, 948-954, 1988.
- 6) 野上 誠, 須甲松信, 奥平博一, 宮本昭正, 志賀淳治, 粕谷志郎: 肺好酸球症のマウスモデル, 炎症 9, 205-208, 1989.
- 7) Reis, G.A. and Shevach, E.M.: Effect of cyclosporin A on T cell function in vitro: The mechanism of suppression of T cell proliferation depends on the nature of the T cell stimulus as well as the differentiation state of the responding T cell. *J. Immunol.* 129, 2360-2367, 1982.
- 8) Thomson, A.W., Moon, D., Geczy, C. and Nelson, D.S.: Cyclosporin A inhibits lymphokine production but not the responses of macrophages to lymphokines. *Immunology* 48, 291-299, 1983.
- 9) Hirashima, M., Honda, M. and Hayashi, H.: The mediation of tissue eosinophilia in hypersensitivity reaction. II. Separation of a delayed eosinophil chemotactic factor from macrophage chemotactic factors. *Immunology* 31, 263-271, 1976.

ANTIGEN-INDUCED BIPHASIC EOSINOPHIL INFILTRATION IN THE AIRWAYS OF ACTIVELY SENSITIZED GUINEA PIGS AND ITS INHIBITION BY PAF ANTAGONIST AND CYCLOSPORIN A

Takeshi Fukuda, Ikuo Akutsu, Masahiro Amagai, Toshio Numao, Shinji Motojima and Sohei Makino
Department of Medicine and Clinical Immunology, Dokkyo University School of Medicine

Bronchial eosinophilia is a characteristic of asthma. To elucidate the mechanisms of eosinophil accumulation in the airways, the time course of eosinophil infiltration in the airway mucosa after antigen inhalation was examined in actively sensitized and passively sensitized guinea pig models of asthma. The lungs and tracheae were removed at intervals after antigen challenge, fixed and stained. The eosinophil infiltration was quantitated in the tracheal walls by counting the number of cells per square millimeter. Guinea pigs sensitized by intraperitoneal injection of ovalbumin (OA) responded to a single exposure to aerosolized OA with biphasic infiltration of eosinophils in the tracheal walls; a striking early-phase which peaked at 6 hr and a delayed-phase which peaked at 24 hr and persisted for as long as 5 days. These kinetics were different from those observed with passively sensitized animals which showed only early-phase infiltration. Administration of CV-6209, a specific PAF antagonist, before and 12 hrs after antigen challenge significantly ($p < 0.01$) inhibited the early-phase but not the delayed-phase eosinophil infiltration in actively sensitized animals. In contrast, when guinea pigs were treated with Cyclosporin A, a T lymphocyte-selective immunosuppressive agent, throughout the immunization period, the delayed-phase but not the early-phase infiltration was significantly ($p < 0.01$) inhibited. These results suggest that PAF may contribute to early-phase and T cell factor(s) may contribute to delayed-phase eosinophil infiltration of the airways.