

モルモット実験喘息モデルにおける遅発型反応と 気道過敏性亢進に及ぼす WEB2086 の影響

獨協医科大学病院アレルギー内科

✓ 有馬雅史 ✓ 湯川龍雄 ✓ 寺師義典
✓ 相良博典 ✓ 牧野荘平

我々は、すでに卵白アルブミン (OA) 反復吸入能動感作モルモットで抗原曝露後、50%以上の動物に遅発型発作 (LAR) の出現と、さらに24時間から5日後に気道反応性の亢進が認められることを報告している。今回、血小板活性化因子 (PAF) の関与を検討する目的で、特異的 PAF 拮抗薬である WEB2086 の影響をこれらのモデルを用いて検討した。OA の反復吸入曝露によって感作したモルモットの呼吸抵抗は、oscillation 法によって行い、気道過敏性は、histamine の aerosol 吸入にて呼吸抵抗が baseline の200%に増加する濃度 (PC₂₀₀Hist.) を以って評価した。OA 10mg/ml を5分間、感作モルモットに吸入曝露し、曝露の30分前および3時間後に投与した WEB2086 (3mg/kg × 2, i.v.) は、曝露24時間と5日後における気道過敏性の亢進を有意に抑制した。また、diphenhydramine hydrochloride (60mg/kg, i.p.) を15分前に処置した感作モルモットに OA の20mg/ml を10分間吸入曝露させた場合の即時型の呼吸抵抗の亢進 (IAR) およびその後の LAR において、曝露30分前および3時間後の WEB2086 (3mg/kg × 2, i.v.) の投与は、IAR には影響を及ぼさなかったが、LAR の出現を明らかに抑制した。以上より気管支喘息患者の LAR 及び気道過敏性の亢進の発現には、PAF の関与が示唆された。

Key words: airway hyperresponsiveness — bronchial asthma — experimental model — late asthmatic response — PAF

緒言

気管支喘息症例の抗原曝露後の、即時型反応に引き続いて3時間から9時間後に認められる遅発型反応 (LAR) は、临床上、気道反応性亢進、 β 刺激剤効果の低下、気道粘膜上皮と炎症と破壊など慢性難治性喘息に類似しており、その病態の究明は極めて重要である。我々は、既にモルモット遅発型発作出現モデルを用いて抗原曝露6時間及び24時間から5日後の気管支粘膜の好酸球の浸潤がみられ、24時間から5日後に気道反応性が亢進することを報告¹⁾した。一方、脂質メディエーターの1つである血小板活性化因子 (PAF) は、血小板凝集、血管透過性亢進、好酸球、好中球の遊走活性化、気管支収縮作用を有しており、近年 LAR と気道反応性亢進に深く関与していると考えられている。最近、抗 PAF 作用薬が注目されており、既に、いくつ

かの PAF 受容体拮抗薬について報告されている。これらの薬剤の中で Triazolodiazepine 誘導体の1つである WEB2086 は、in vitro, in vivo において強力で、特異性の高い PAF 受容体拮抗剤として注目されており、molar base で PAF 受容体に対し、同濃度の PAF とほぼ1:1で抑制することが報告²⁾されている。今回我々は、既に報告した喘息モデルを用いて、気道反応性、及び LAR に対する影響を特異的な PAF 受容体の拮抗剤である WEB2086 を用いて検討した。

材料および方法

1. 感作モルモットの作成

体重約300g の Hartley 系雄モルモット (ドーケンより購入) を既に我々が発表した方法³⁾に従って、OA (Sigma Grade V) で吸入感作した。すなわち、我々の作成したプラスチック製抗原吸入装置 (直径55cm, 高さ8cm の円筒形、モルモットの鼻口が中心に向かって抗原希釈 nebulizer 液の流入が行え、aspirator で outflow を同一に設定してあり、同時に10匹、ほぼ均一

Received: June 10, 1990

Accepted: November 8, 1990

Abbreviations: IAR immediate asthmatic response; LAR late asthmatic response; OA ovalbumin; PAF platelet-activating factor

の抗原吸入曝露が可能である)内にモルモットを入れ、メイコー社製 glass nebulizer にて1日1回、10mg/ml の OA を6l/min で10分間、毎日連続反復吸入曝露を繰り返す、吸入開始後、9～10日目にすべてのモルモットに喘息発作症状を認め、成作成立とした。その後インターバルを週に1回とあけて10mg/ml の OA を6l/min で5分間ブースター吸入を行った。成作の成立は、ブースター吸入1週間後、耳朶採血し、PCA 反応によっても確認した。

2. 呼吸抵抗の測定

呼吸抵抗の測定は、Mead ら⁴⁾の oscillation 法を一部改変して行った。すなわち、モルモットの頭部を外に突出させて固定でき、頸部以下を密封させた animal chamber (プラスチック製、円筒部位の内径10cm、長さ18cm、壁の厚さ0.5cm、モルモットの頸部固定部位は、ゴム製ドーナツ状の balloon で作製され密封可能)内モルモットの後部より18Hz の sine wave (Leader Electronics Corp. Model LFG-1300 function oscillator に TRIO integrated power amplifier, Model KA-900を通して Coral Corp. Model 121-70, woofer speaker に持続し、sine 波を発生)の圧力波を加えた。

一方、モルモットの呼吸流量を円錐形プラスチックマスク (円錐の先端に8mm 径の穴をあけ200mesh 鋼製スクリーンを設置)のスクリーンを通して、differential transducer (Validyne Engineering Corp. Model MO45-18)によって取り出し増幅器 (シズメメディカル社製2G46)に描き出し、polygraph (三栄測器製 Surgical Monitor125)に記録し、chamber 内圧と呼吸流量の比より測定した。

3. 抗原曝露後の気道過敏性の評価

吸入感作成立後、週に1回のブースター吸入を2回行い、その1週間後に抗原曝露30分前、3時間後に3 mg/kg の WEB2086 (HCl Buffer に溶解)を iv⁵⁾し、OA 10mg/ml を6l/min で5分間吸入曝露した後、24時間、5日後気道反応性を測定した。気道反応性の測定は、histamine を用いて行った。すなわちモルモットを前述の animal chamber 内に入れ、まず生理的食塩水の aerosol を1分間吸入させ直後の baseline 呼吸抵抗とし、39 μ g/ml から2倍希釈系列で、5,000 μ g/ml まで1分間ごとに順次高濃度を吸入させ、呼吸抵抗が前の baseline 値より2倍以上になったときを閾値とした。縦軸に呼吸抵抗を横軸に対数にて吸入した histamine 濃度をプロットし、その dose-response curve 上で呼吸抵抗が baseline value の2倍となったときの

histamine の濃度 PC₂₀₀ を求め対数表示 (log PC₂₀₀ Hist) した。

4. 抗原曝露後の呼吸抵抗の測定

遅発型気道反応の出現率を増加させる為、既に報告⁶⁾したように、抗原曝露直前15分に diphenhy-

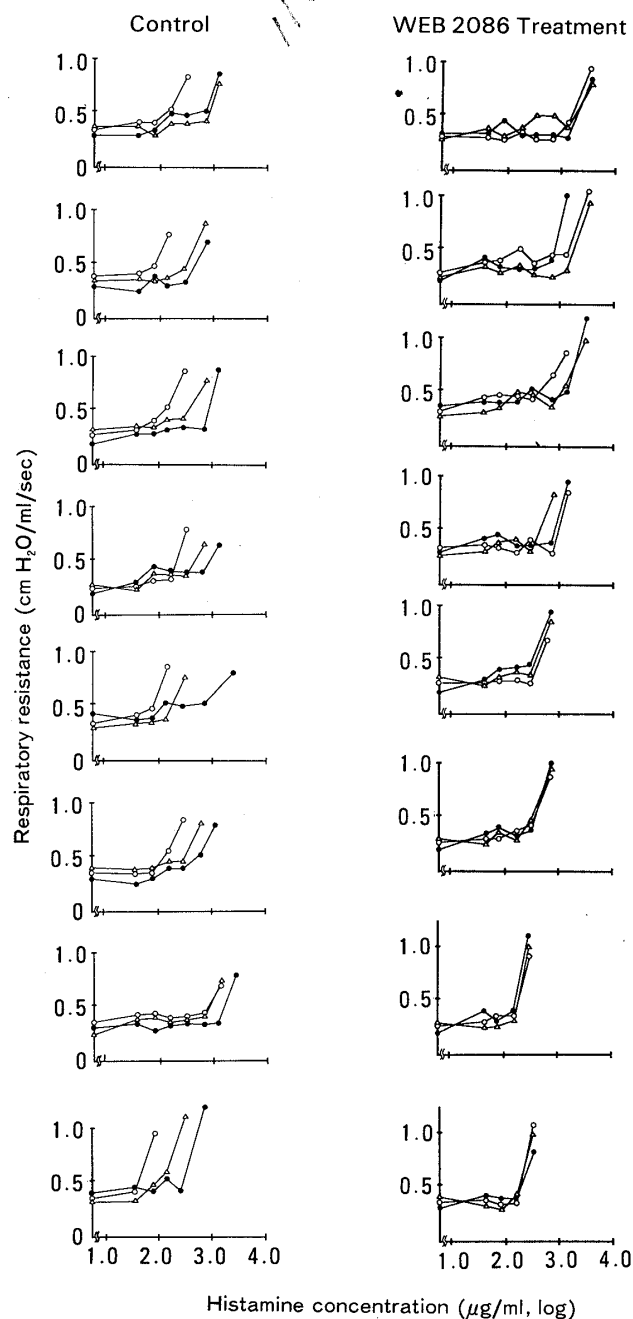


Fig. 1. Effects of antigen exposure on the airway responsiveness to histamine aerosol in control (left) and WEB 2086-treated guinea pigs (right). Airway responsiveness to histamine was measured before (●), 24hours (○) and 5days (△) after the antigen exposure.

dramine hydrochloride (Sigma) を60mg/kg 腹腔内投与し, OA 抗原を20mg/ml, 6l/min で10分間吸入し, その後の呼吸抵抗の変化を経時的に測定した. WEB2086の投与は, 気道過敏性についての検討におけると同様に行った. コントロール群は, WEB2086を溶解するために用いた HCl buffer のみを同容量を投与した.

5. 統計

実験データは, 全て mean $\pm$ SEM で表現し, 各々の実験に使用した動物匹数 (n) は5~20である. 有意差の検定は, student's test を用い, P value は <0.05 を有意と考えた.

結 果

1. 抗原曝露後の気道過敏性の変化

OA 吸入曝露後の, histamine に対する気道反応性の変化を図1に示す. ●—●, ○—○, △—△が各々, 抗原曝露前, 24時間及び5日後の dose response curve で, 左が control 群 (n=8), 右が WEB2086投与群 (n=8) である. control 群の気道反応性 (PC₂₀₀ Hist. log) は, 抗原曝露前 2.80 ± 0.08 から曝露後24時間と5日後で 2.51 ± 0.10 及び 2.60 ± 0.08 と共に有意に亢進したのに対して, WEB2086投与群のそれは, 曝露前が 2.82 ± 0.09 , 24時間後と5日後が各々 2.80 ± 0.07 , 2.75 ± 0.09 と変化が認められず, 抗原曝露による気道過敏性亢進が control 群に比較し, 有意に抑制された.

なお, 無処置感作モルモットの呼吸抵抗に及ぼす WEB2086の影響は, 同量の3mg/kg の投与で投与前が 0.20 ± 0.10 cmH₂O/ml/sec, 投与後が 0.21 ± 0.02 cmH₂O/ml/sec で有意差なく, baseline の気道反応性に対して, 投与前が 2.73 ± 0.09 , 投与後が 2.79 ± 0.10 と有意差なく, WEB2086そのものが気管支拡張作用や baseline の気道反応性に影響を及ぼさないことが示唆された.

2. 抗原曝露後の呼吸抵抗の変化

OA 吸入曝露後の呼吸抵抗の推移をパーセント変化として図2に示す. 図の左 (A) が control 群 (n=5), 右 (B) が WEB2086処置群 (n=6) である. 抗原曝露直後の即時型反応は, control 群 $60.3\pm9.2\%$, WEB2086投与群が $65.3\pm12.2\%$ 増加と両群間で有意差は認められなかったが, 4~9時間後遅発相での呼吸抵抗の再上昇は WEB2086投与群で明らかに抑制された.

考 察

今回, モルモット実験喘息モデルを用いて抗原吸入曝露後の遅発型反応の出現と気道過敏性に対して, 物異的 PAF 受容体拮抗剤 WEB2086の影響を検討したところ, 抗原曝露前15分, 後3時間の WEB2086(3mg/kg) の静脈内2回投与により, 両反応とも有意に抑制されることが示された. また, WEB2086の投与そのものでは, baseline の呼吸抵抗や, 気道過敏性には影響

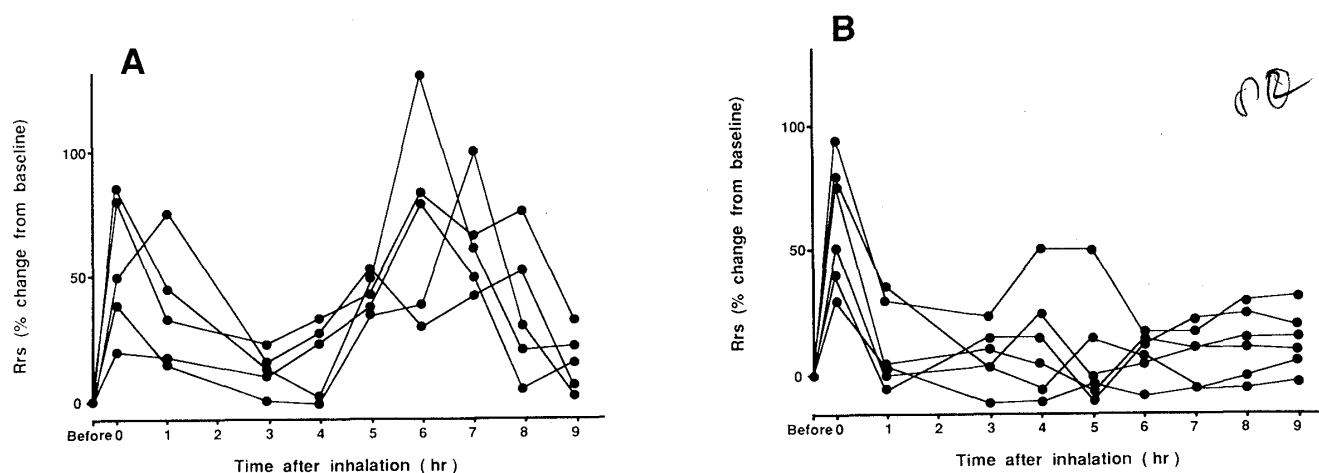


Fig. 2. Percent changes in respiratory resistance (Rrs) from baseline after ovalbumin antigen exposure in control (A) and WEB2086-treated guinea pigs (B).

ないことより、これらの抑制効果が WEB2086 の直接的な気管支拡張効果やヒスタミン気道反応性減弱によるものではないことが示唆された。我々は、既に同喘息モデルにおける遅発型反応の出現と、気道過敏性の亢進に好酸球の浸潤と活性化が深く関与している可能性を報告³⁾⁶⁾してきた。好酸球は、effector cell としてその重要性が注目されているが、その理由として抗原曝露後の活性化された好酸球から LTC₄ が豊富に産出される事や、cytotoxic eosinophil granule proteins (major basic protein, eosinophil peroxidase, eosinophil cationic protein) の放出、cytotoxic oxygen free radicals (O₂·, H₂O₂, OH·, IO₂· etc) の産出による組織障害作用、及び組織破壊による epithelial deriving relaxating factor の損失、irritant receptor, C-fiber の露出が気道反応性の亢進に関与していると考えられる。近年、種々の標的臓器、細胞に対する PAF の生理活性が明らかとなり、遅発型反応に対する役割が注目されている。PAF は、1972 年感作されたウサギ buffy-coat 白血球より抗原曝露により遊離し、血小板を凝集活性化する物質として発見され、1979 年 1-0-alkyl 1-2-acetyl-sn-glycerol 1-3-phosphorylcholine (AGEPC) と、構造決定された分子量 553 のリン脂質であるが、近年 in vivo, in vitro における強い遊走活性 LTC₄ や oxygen free radicals の産出⁷⁾、schistosomula に対する cytotoxicity の増強⁸⁾、血管内皮細胞の adhesion の増強⁹⁾、細胞内 Ca²⁺ mobilization¹⁰⁾、EPO 及び ECP の遊離¹¹⁾ と低比重化¹²⁾ モルモット cilia に対する cytotoxicity の増強¹³⁾ など好酸球との細胞表面上受容体を介した interaction¹⁴⁾ が報告され、同細胞における最も強力な natural mediator の 1 つと考えられている。本実験における PAF のアレルギー反応における産生は、まだ不明な部分が多いが、おそらく I 型アレルギー反応によって、肥満細胞、マクロファージ、好塩基細胞、血管内皮細胞などから産生されると考えられる。WEB2086 と PAF の分子量比及び PAF レセプターに対する親和性は、いずれもほぼ 1 : 1 であることから WEB2086 は、特異性の高い PAF 受容体拮抗剤²⁾ である。したがって、本実験で抗原曝露後の気道過敏性及び遅発型反応の出現が WEB2086 の投与によりほぼ 100% 抑制されたことは、これら両反応の出現のメカニズムに PAF の薬理作用が重要であることを示唆するものであるが、PAF 以外の LTC₄, LTD₄, PGD₂, TxA₂ などのメディエーターについて今後、検討が必要である。in vivo における WEB2086 の生物学的半減

期が約 5 時間¹⁵⁾ であることから、今回の実験で WEB2086 を抗原チャレンジ 30 分前、3 時間後に投与することによって、PAF の薬理作用は十分に抑制されると考えられる。したがって、今回 WEB2086 の前処理により即時型気道収縮の程度に影響することなく、6 時間及び 24 時間後の好酸球浸潤を抑制し、今回、組織写真は示していないが気道粘膜上皮の傷害を軽減 (第 30 回日本胸部疾患学会で報告¹⁶⁾) したことは、同実験モルモットモデルにおいて PAF は、I 型気道収縮の mediator としては関与が薄く、遅発相での好酸球浸潤や活性化、更にそれに関連すると思われる遅発型気道収縮や、気道過敏性亢進に重要な役割を果たしているものと考えられる。今後、その機序の詳細を追及する為には好酸球の活性化と関連して、LTC₄ の遊離活性化酸素産生脱顆粒の有無、気管支粘膜上皮の微細構造など WEB2086 のこれらに対する影響を検討する必要があると考えられる。また、最近 PAF には好酸球以外の炎症性細胞、血小板¹⁷⁾、好中球¹⁸⁾、マクロファージ¹⁹⁾、単球²⁰⁾、リンパ球²¹⁾ に対する interaction や、また、血管内皮細胞²²⁾ や気道粘膜上皮との interaction も報告²³⁾ され、これらの細胞を刺激し、生じた液性因子 (cytokines) が、second messenger として、あるいは化学伝達物質との priming agent として effector cell (好酸球) を activate して気道の炎症を増強させ、一連の反応を生じている可能性がある。我々は、最近、T-細胞 (主として helper T-cell) の強力な機能抑制薬剤であるサイクロスポリン A の前処置によっても、程度こそ差はあれ、類以の遅発型気道収縮の発現と気道過敏性亢進の抑制が認められることを報告²⁴⁾ しているが、この結果は、抗原曝露によって activate された T-細胞からの液性因子 (IL-5, IL-3, GM-CSF などの cytokines) も好酸球の遊離や、活性化に関連している可能性を示唆するものであり、遅発相での気道の炎症には、I 型アレルギー反応によって生じた PAF などの chemical mediator が単一的に作用するのではなく、種々の液性因子が複雑に関与して成立するものと考えられる。

結 語

WEB2086 を用いることにより、モルモット実験喘息において、PAF が遅発型反応と気道過敏性の出現に関与している可能性が示唆され、PAF 拮抗薬は特に、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。

我々は、WEB2086の提供にあたり、日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社に深く陳謝する。

文 献

- 1) 寺師義典, 湯川龍雄, 寺師 薫, 本島新司, 福田健, 池森享介, 牧野荘平: 感作モルモットにおける遅発型反応の出現とその発症因子に関する研究. “気道過敏性研究の新展開”. (滝島 任, 宮本昭正編), 文光堂, 東京, pp.192-202, 1989.
- 2) Casals-Stenzel, J., Muacevic, G. and Weber, K.-H.: Pharmacological actions of WEB2086, a new specific antagonist of platelet activating factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241, 974-981, 1986.
- 3) 寺師義典, 湯川龍雄, 福田 健, 牧野荘平: 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.
- 4) Mead, J.: Control of respiratory frequency. *L. Appl. Physiol.* 15, 325-336, 1960.
- 5) Lellouch-Tubiana, A., Lefort, J., Simon, M.-T., Pfister, A. and Vargaftig, B.B.: Eosinophil recruitment into guinea pig lungs after PAF-acether and allergen administration. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137, 984-954, 1988.
- 6) 寺師義典, 湯川龍雄, 寺師 薫, 本島新司, 福田健, 池森享介, 牧野荘平: 吸入感作モルモットにおける diphenhydramine HCl 前処置による遅発型気道反応の出現に関する検討. *日胸疾会誌* 243, 27(抄録), 1989.
- 7) Bruynzeel, P.L.B., Koenderman, L., Kok, P.T.M., Hameling, M.L. and Verhagen, J.: Platelet-activating factor (PAF-acether) induced leukotriene C₄ formation and luminol dependent chemiluminescence by human eosinophils. *Pharmacol. Res. Communi C.* 18, 61-69, 1986.
- 8) MacDonald, A.J., Moqbel, R., Wardlaw, A.J. and Kay, A.B.: Platelet-activating factor (PAF-acether) enhances eosinophil cytotoxicity in vitro. *J. Allergy Clin. Immunol.* 77, 227(Abstr.), 1986.
- 9) Kimani, G., Tonnesen, M.G. and Henson, P.M.: Stimulation of eosinophil adherence to human vascular endothelial cells in vitro by platelet-activating factor. *J. Immunol.* 140, 3161-3166, 1988.
- 10) Kroegel, C., Pleass, R., Yukawa, T., Chung, L.F., Westwick, J. and Barnes, P.J.: Characterization of platelet-activating factor induced elevation of cytosolic free calcium concentration in eosinophils. *FEBS Lett.* 243, 41-46, 1989.
- 11) Kroegel, C., Yukawa, T., Dent, G., Venge, P., Chung, K.F. and Barnes, P.J.: Stimulation of degranulation from human eosinophils by platelet-activating factor. *J. Immunol.* 142, 518-526, 1989.
- 12) Yukawa, T., Kroegel, C., Evan, P., Fukuda, T., Chung, K.F. and Barnes, P.J.: Density heterogeneity of eosinophil leucocytes: Induction of hypodense eosinophils by platelet-activating factor. *Immunology* 68, 140-143, 1989.
- 13) Yukawa, T., Read, R.C., Kroegel, C., Rutman, A., Chung, K.F., et al.: The effects of activated eosinophils and neutrophils on guinea pig airway epithelium in vitro. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2, 341-353, 1990.
- 14) Ukena, D., Kroegel, C., Dent, G., Yukawa, T., Sybrecht, G. and Barnes, P.J.: PAF-receptors on eosinophils: Identification with a novel ligand, [³H] WEB2086. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1702-1794, 1989.
- 15) Casals-Stenzel, J., Muacevic, G. and Weber, K. H.: Pharmacological actions of WEB2086, a new specific antagonist of platelet activating factor. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics*, 241, 974, 1987.
- 16) 有馬雅史, 湯川龍雄, 寺師義典, 本島新司, 福田健, 牧野荘平: モルモット喘息モデルにおける遅発型反応 (LAR) と気道過敏症 (AH) に及ぼす WEB2086 の影響. *日胸疾会誌* 28, 128(抄録), 1990.
- 17) Vargaftig, B.B., Chignard, M. and Benveniste, J.: Present concepts on the mechanism of platelet aggregation. *Biochem. Pharmacol.* 30, 267-271, 1981.
- 18) O'Flaherty, J.T., Wykle, R.L., Miller, C.H., Lewis, J.C., Waite, M., et al.: Chatelet. 1-0-alkyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholines: A novel class of neutrophil stimulation. *Am. J. Pathol.* 103, 70-79, 1981.
- 19) Hurtung, H.P., Parnham, M.J., Winkelmann, J., Engelberger, W. and Hadding, U.: Platelet activating factor (PAF) induces the oxidative burst in macrophages. *Int. J. Immunol. Phar-*

- macol.* 5, 115-121, 1983.
- 20) Yasaka, T., Boxer, L.A. and Baehner, R.L.: Monocyte aggregation and superoxide anion response to formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) and platelet activating factor (PAF). *J. Immunol.* 128, 1983-1944, 1982.
 - 21) Wilson, J.W., Lai, C., Djukanovic, R., Holgate, T., et al.: The influence of inhaled platelet-activating factor (PAF) on bronchoalveolar lavage (BAL) and peripheral blood leukocytes (PBL) and platelets. *JACI* 83, 137(Abstract.), 1990.
 - 22) Humphrey, D.M., McManus, L.M., Hanahan, D. J. and Pinckard, R.N.: Morphological basis of increased vascular permeability induced by acetylglycerol ether phosphorylcholine. *Lab. Invest.* 50, 16-22, 1984.
 - 23) Cammussi, G., Pawlowski, I., Tetta, C., Roffirello, C., Alberton, M., Brentjens, J. and Andres, G.: Acute lung inflammation induced in the rabbit by local instillation of 1-0-octadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine or of native platelet activating factor. *Am. J. Pathol.* 112, 78-88, 1983.
 - 24) Arima, M., Yukawa, T., Terashi, Y., Fukuda, T. and Makino, S.: Cyclosporine A inhibits allergen-induced late asthmatic response and increase of airway hyperresponsiveness in guinea pigs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141, A475(Abstract.), 1990.

INVOLVEMENT OF PLATELET ACTIVATING FACTOR (PAF) IN OVALBUMIN
ANTIGEN-INDUCED LATE ASTHMATIC RESPONSE AND INCREASE OF
AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS IN A GUINEA PIG
EXPERIMENTAL MODEL OF ASTHMA

Masafumi Arima, Tatsuo Yukawa, Yoshinori Terashi, Hironori Sagara and Sōhei Makino
Department of Medicine and Clinical Immunology, Dokkyo University School of Medicine

Platelet activating factor, a potent chemical mediator, has been implicated in the pathogenesis of asthma in terms of inflammatory cell recruitment and activation. We have recently demonstrated that repeated antigen (ovalbumin; OA) exposure by inhalation to guinea pigs results in a development of late asthmatic response (LAR) in more than 50% of the animals and significant increase in airway hyperresponsiveness (AH). We have studied the effect of WEB 2086, a specific PAF receptor-antagonist, on this model. Respiratory resistance (Res) of guinea pigs was measured by a oscillation technique and AH was evaluated by the provocative concentration of aerosols of histamine causing 200% increase of Rrs over the baseline Rrs (PC₂₀₀ Hist). Four out of 5 actively sensitized and diphenhydramine-pretreated animals developed LAR 3 to 9 hr after allergen (20 mg/ml OA, 10 min inhalation)-induced immediate bronchoconstriction (LAR). Treatment with WEB 2086 (3 mg/kg intravenously) 30 min before and 3 hr after the exposure suppressed LAR clearly without affecting the IAR. Significant increase in AH from 2.80 ± 0.03 to 2.51 ± 0.01 and 2.60 ± 0.08 ($p < 0.05$, $n=8$) of PC₂₀₀ Hist (mg/ml, log) was observed 24 hr and 5 day after the OA exposure, respectively. The WEB 2086 treatment also prevented the increase of AH after the OA exposure (PC₂₀₀ Hist; 2.82 ± 0.09 before the challenge 2.80 ± 0.07 and 2.75 ± 0.09 24 hr and 5 days after, respectively. $n=8$). Administration of WEB 2086 did not affect baseline Rrs and PC₂₀₀ Hist in normal guinea pigs without any antigen challenge. We conclude that WEB 2086 is capable of preventing the development of LAR and increase in AH, and thus PAF may play an important causal role in LAR and increased AH observed in asthma.