

被動感作モルモットの抗原吸入誘発気道反応における 抗アレルギー剤Ibudilastの好酸球浸潤抑制効果および 気道粘膜上皮損傷と好酸球微細構造変化との相関

天下井正弘・大橋裕二・本島新司・福田 健・牧野荘平*

Inhibitory effect of an anti-allergic drug (Ibudilast) on eosinophil infiltration, changes of epithelial tissue and eosinophil microstructure in antigen-induced airway responses of passively sensitized guinea pigs

We evaluated whether or not eosinophil infiltration induced by an antigen (ovalbumin) inhalation caused the damage of the bronchial epithelium. The inhibitory effects of the anti-allergic drug, Ibudilast (Ibd), on eosinophil infiltration, eosinophil activation and epithelial tissue damage were also examined. Fourteen days pretreatment of Ibd inhibited eosinophil infiltration in the epithelial and subepithelial tissue 6, 24 hours after an antigen inhalation. A significant correlation was noted between change of the electron densities of the eosinophil specific granules and the damage of tracheal epithelium 6 hours after an antigen inhalation. Changes of the electron densities of the eosinophil specific granules suggest the activation of the cells.

The observation in this study shows that infiltrated eosinophils were activated and contributed to the damage of the bronchial epithelium by releasing toxic granules proteins and may explain the mechanism that Ibd exerts bronchial hypersensitivity.

Masahiro Amagai・Yuji Ohashi・Shinji Motojima・
Takeshi Fukuda・Sohei Makino*

key words: airway hyperresponsiveness,
anti-allergic drug, bronchial asthma,
eosinophil, guinea pig

アトピー型気管支喘息においては、抗原吸入後、15～30分を中心とする即時性反応、3～8時間にみられる遅発性喘息反応、さらに1～2週間にわたって気道過敏性を示す後遅発性喘息反応が認められる^{1,2)}。遅発性反応に一致して気道での好酸球浸潤、活性化形態の変化が認められ³⁾、好酸球浸潤が、おそらく platelet activating factor (PAF) や leukotriene C₄ (LTC₄) の産生を介して

遅発性気道収縮を起こし、浸潤した好酸球は、気道上皮の破壊を介して気道過敏性亢進が起ると考えられる^{1,4-7)}。

モルモット実験喘息においては、抗原反復吸入による感作動物は、抗原吸入による好酸球浸潤が持続し、気道上皮損傷と気道過敏性亢進が認められている^{1,8,9)}。一方、被動感作モルモットでは、抗原曝露により、曝露後6時間をピークとする好酸球浸潤を認めるが、遅発性気道収縮、後遅発性気道反応性亢進の程度が低いため、好酸球浸潤と気道粘膜の微細構造の変化の関連は、十分に検討されていない¹⁰⁾。

Ibudilast (Ibd) は、アレルギー性喘息の症状抑制に有効なことが報告されている¹¹⁾。実験的にLT産生の抑制、LTC₄/D₄の作用拮抗、アナフィラキシー反応の抑制が示されている^{12,13)}。

本研究の目的は、Ibdが被動感作モルモットでの抗原吸入による好酸球浸潤に関与するか、また、抗原吸入による好酸球浸潤と活性化がどの程度気道上皮の損傷に関係するかどうかを知ることである。

方 法

(1) 被動感作および Ibd 投与法

Hartley 系雄モルモット (300 g) に ovalbumin (OA) 1 μ g とアルミゲル 5 mg を月1回腹腔内投与により感作し、3回感作1週間後に耳朶採血し、48時間 PCA titer 640倍以上のモルモットから全採血し、血清分離後 -80°C に保存した。つぎにこうして得られた同種 OA 血清を、体重約 200 g の Hartley 系雄モルモットに、2 mg/kg 静脈内投与し被動感作し、その48時間後に OA 吸入曝露し、アナフィラキシー反応後の経時的肺組織所見について検討を行った¹⁰⁾。Ibd 投与群は、1日1回 Ibd 3 mg/kg, 10 mg/kg をポリエチレ

* Department of Medicine and Clinical Immunology, Dokkyo University School of Medicine, 880 Kitakobayashi, Mibu, Tochigi 321-02 獨協医科大学アレルギー内科学教室

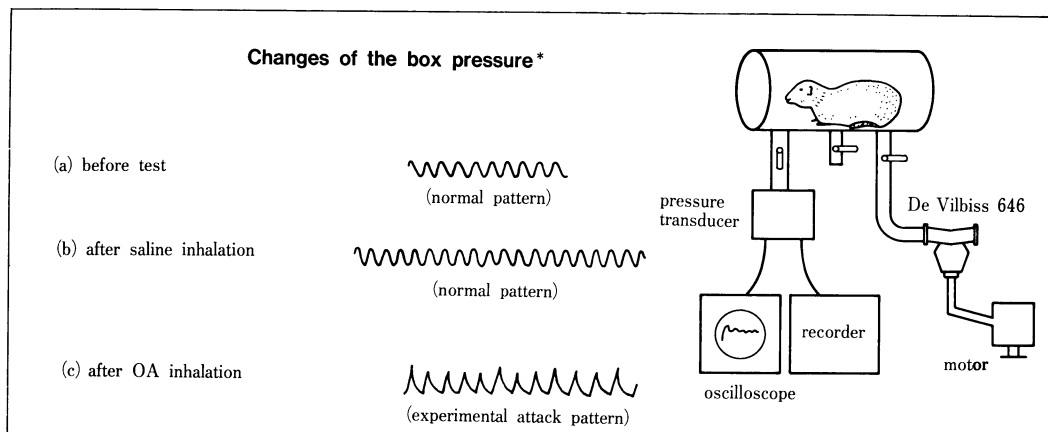


図1 Recording of respiratory pattern in OA inhalation

* The change of the box pressure is reciprocal to that of the alveolar pressure. [Comroe, J.H.: Mechanical factor in breathing, Physiology of Respiration (2d ed.), Year Book Medical Publisher, Chicago, 1975, p 125]

ンチューブより経食道的に胃内に14日間投与し、対照群は同様に、溶解液のみ14日間ポリエチレンチューブを用いて経食道的に投与し、上記のごとく受身感作を行った。

(2) 抗原吸入曝露と組織学的検査

抗原吸入方法は、図1のごとく2 mg/mlのOA溶液(生理食塩水)を、De Vilbiss 646 ネブライザーで、5 l/分の圧搾空気で作成したエアロゾルで満たしたchamber box内で吸入させた。随時boxを密閉してbox内圧の変化を、pressure transducer (Validyne Engineering Corp., Model MP 45-18)により取り出し、増幅器を通してpolygraph(三栄測器製, Surgical Monitor 125)上に描き出し、吸気相、呼気相の比が2以上の強度の発作出現を確認した¹⁴⁾。その後6時間、24時間、48時間に経時的にそれぞれペントバルビタールナトリウム30 mg/kgを腹腔内投与した。麻酔後、開胸、肺組織摘出し、ホルマリン固定をした。パラフィン包埋後2 μ に薄切、HE, Giemsa, Hansel染色を行い、気管粘膜上皮および上皮好酸球を算定した。

予備実験で、10匹1群の動物の気管粘膜上皮および上皮下の測定面積を描画装置を用いて描画し、面積測定プログラムを用いて測定したところ、 $0.57 \pm 0.088(\text{mean} \pm \text{SD}) \text{mm}^2 (\text{N}=10)$ であった。ほぼ同様の体重のモルモットを用いるかぎり、気管粘膜の測定面積はほとんど一定であるため、各標本について測定面積を求めず、各切片の好酸球数で

その切片の浸潤を表現した。

(3) 電子顕微鏡による微細構造の観察

① 標本作成法

微細構造を観察するため、一部の動物において2% glutaraldehydeのpre-fixationを行ったのち、1% osmium tetroxideのpost-fixationを行いalcoholで脱水後Epon 812包埋した。つぎにLKB 4800 ultra microtomeで超薄切片を作成後、uranyl acetateとlead citrateで二重染色し、日本電子JEM-100 B型電子顕微鏡で観察した。

② 気管上皮損傷度の分類

透過型電顕にて上皮組織を写真撮影し、気管上皮の損傷度は、tight junctionおよび上皮細胞破壊がほとんど認められないものをgrade I, 上皮細胞の破壊、上皮細胞間隙開大が軽度認められるものをgrade II, さらに上皮細胞破壊、tight junctionの消失、上皮細胞間隙開大が著明に認められるものをgrade IIIと、3 gradeに分類した(図2)^{4,5)}。

③ 好酸球特異顆粒微小形態変化

好酸球の活性化を示唆すると考えられる特異顆粒の電顕上形態の変化を、大橋らの分類を一部変更してつぎのように5種に分類した¹⁵⁾。a: 正常顆粒, b: 特異顆粒のcoreの電子密度低下, c: 特異顆粒のmatrixの電子密度低下, d: 特異顆粒のmatrixのvacuolation, e: 特異顆粒の細胞外への逸脱(図3)。b・c・d・eのような変化を示した顆粒を特異顆粒の電子密度変化ありとし、全特

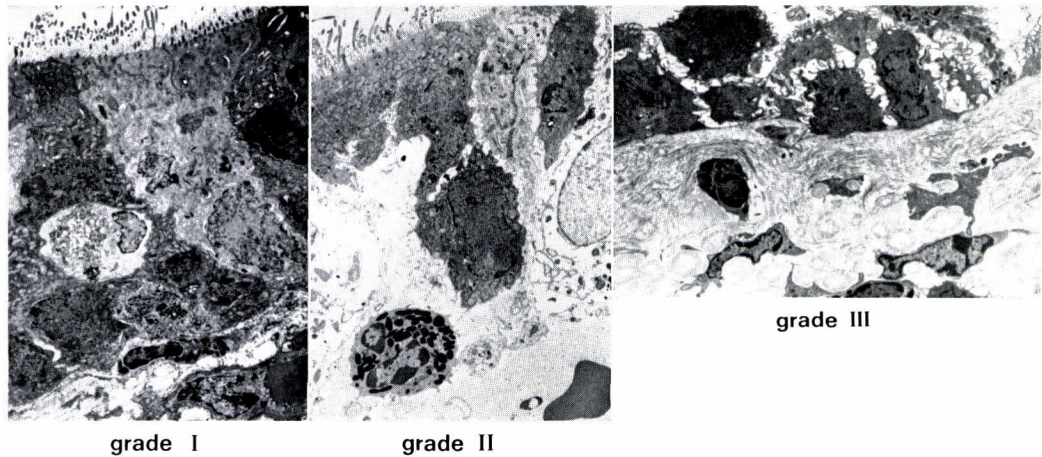


図2 Grading of antigen-induced epithelial damage of tracheal mucosa of passively sensitized guinea pigs

The criteria of the grading is as follows. grade I: the essentially intact epithelium ($\times 4080$). grade II: mild damages of ciliary epithelial cell and mild opening of the tight junction of the epithelial cells ($\times 5100$). grade III: marked damage of ciliary epithelials with lows of the tight junctions and marked opening of the intercellular spaces of the epithelial cells ($\times 4080$)

異顆粒との比をとって変性特異顆粒の出現率とした。

(4) 解析

① 組織変化の判定

処置を知ることによる主観的な判断の偏向を避けるため、single-blind で判定を行った。そのため第三者が、各標本、各電顕写真の個体、処置を示すものをすべてシールしたあとに判定を行った。

② 推計学的分析

数値は、特にことわりのないかぎり $\text{mean} \pm \text{SD}$ で表現した。有意差の検定は、対応のない t 検定を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。2因子間の相関は、Pearson の相関係数(r)で示した。

結果

(1) 気管粘膜内の抗原曝露による好酸球浸潤に対する Ibd 前処置の効果(図4)

Ibd 3 mg/kg 前処置と対照群との比較では、対照群の抗原曝露後 6, 24, 48 時間の好酸球浸潤数は、 609.1 ± 390.6 ($N=6$), 189.3 ± 216.8 ($N=6$), 115.2 ± 140.1 ($N=6$)であり、Ibd 3 mg/kg 前処置群のそれは、 95.7 ± 103.6 ($N=6$), 125.2 ± 111.3 ($N=6$), 60.3 ± 53.7 ($N=6$)であった。抗原曝露後 6 時間で Ibd 3 mg/kg 前処置は、有意に好酸

球浸潤を抑制した(図5)。

Ibd 10 mg/kg 前処置群とその対照群との比較では、抗原曝露 6, 24, 48 時間の好酸球浸潤数は、対照群で 317 ± 93.3 ($N=5$), 449 ± 142.2 ($N=5$), 223.3 ± 64.5 ($N=3$)であり、Ibd 10 mg/kg 前処置のそれは、 192.5 ± 64.1 ($N=6$), 200 ± 129.1 ($N=6$), 114 ± 109.2 ($N=4$)であった。Ibd 10 mg/kg の前処置は、抗原曝露後、6 時間、24 時間で対照にくらべて有意に好酸球浸潤数を抑制した(図6)。

(2) 気管上皮損傷と好酸球特異顆粒の電顕的变化

気管上皮組織損傷と浸潤好酸球の形態変化の関係について比較した。気管上皮組織は、Ibd 無処置 2 匹(1 匹の気管上皮より 9 気管上皮電顕写真作成、計 18 上皮組織写真)、Ibd 前処置(10 mg/kg) 3 匹(1 匹の気管上皮より 19 気管上皮作成、計 57 上皮組織写真)、両者あわせて 75 上皮組織写真を方法で述べたごとく grade I, II, III と分類した。検討した好酸球数は、Ibd 前処置 57 上皮組織写真上 146, Ibd 無処置 18 上皮組織写真上 36, 両者ともに形態的变化を分類した。

図7は、気管粘膜組織での上皮破壊の程度と、そこでの好酸球の顆粒変化との関連を示したものであり、両者の相関は有意であり、好酸球での特異顆粒形態変化の頻度の高い組織上皮ほど破壊が

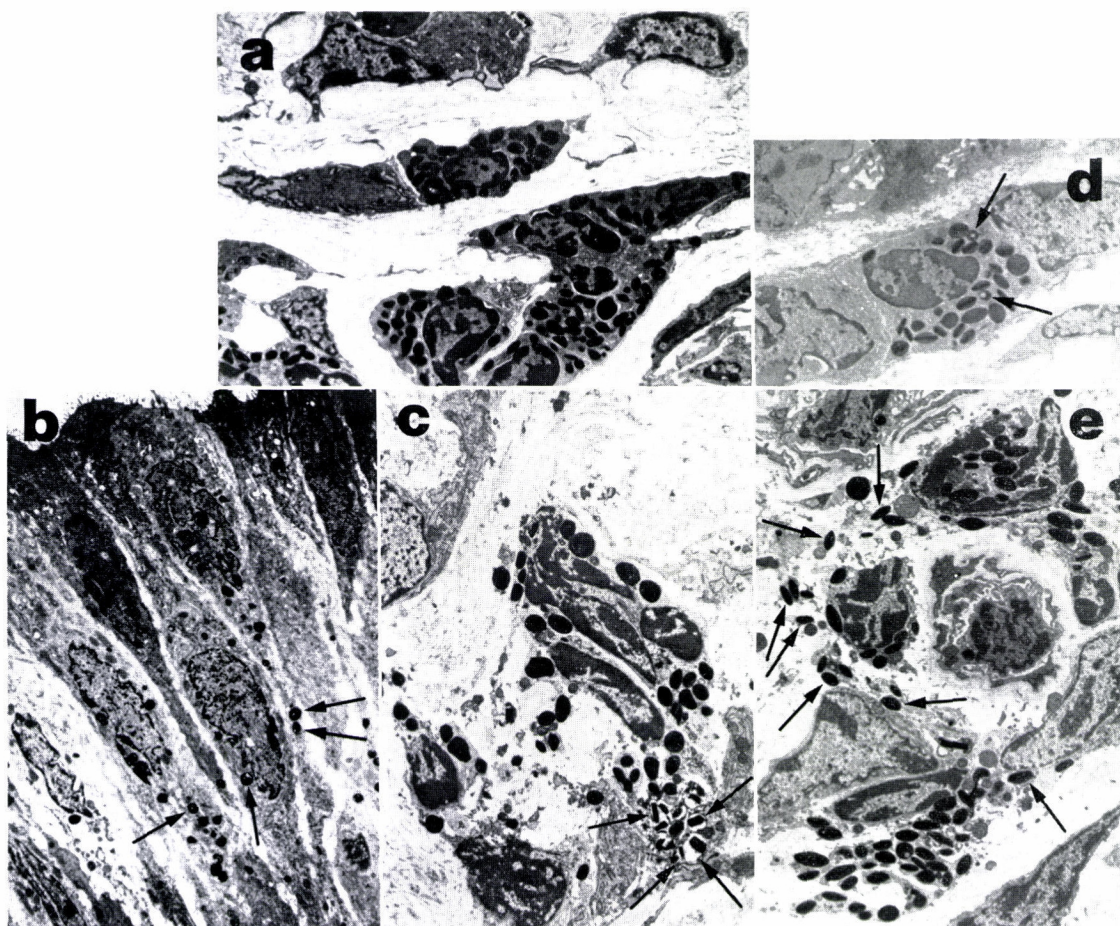


図3 Classification of electron-microscopic morphological changes of specific granules of eosinophils which infiltrated in the tracheal mucosa 6 hours after antigen-challenge in passively sensitized guinea pigs

Morphological changes of eosinophils granules are as follows. a: none ($\times 5100$). b: decrease of electron-microscopic density of the core ($\times 5100$). c: decrease of electron-microscopic density of the matrix ($\times 8500$). d: vacuolation of the matrix ($\times 8160$). e: shedding of the specific granules out of eosinophils ($\times 8500$)

いちじるしい傾向を示していた。Ibd 前処置群を(●), 無処置群を(○)であらわしているが, grade I, II において, Ibd 前処置群が多数認められ, Ibd による抑制の可能性が示唆された。

考 察

筆者らは, OA 被動感作モルモットを用い, 抗原吸入後 6 時間および 24 時間に気道上皮および上皮下の好酸球浸潤を, Ibd の 14 日間前投与が抑制することを認めた。Ibd 投与量については, 能動感作モルモットにおける抗原吸入による気道収縮反応を抑制した 10 mg/kg, およびそれ以下の 3

mg/kg を投与した¹²⁾。さらに被動感作モルモットの抗原吸入後 6 時間における気道粘膜上皮損傷と好酸球活性化と考えられる好酸球特異顆粒変化の間に上皮損傷がつよいものほど好酸球特異顆粒変化の割合が高いという相関が認められた。

ヒト気管支喘息において好酸球の気道局所への浸潤は, 抗原曝露後数時間にみられる遅発性気道収縮, また, その後 1~2 週間にわたってみられる後遅発性の気道過敏性の機序として重要なことが示されている。すなわち, 遅発性喘息反応を起こした患者の BAL 液中では, 起こさなかった患者のそれにくらべて著明な好酸球増多がみられ,

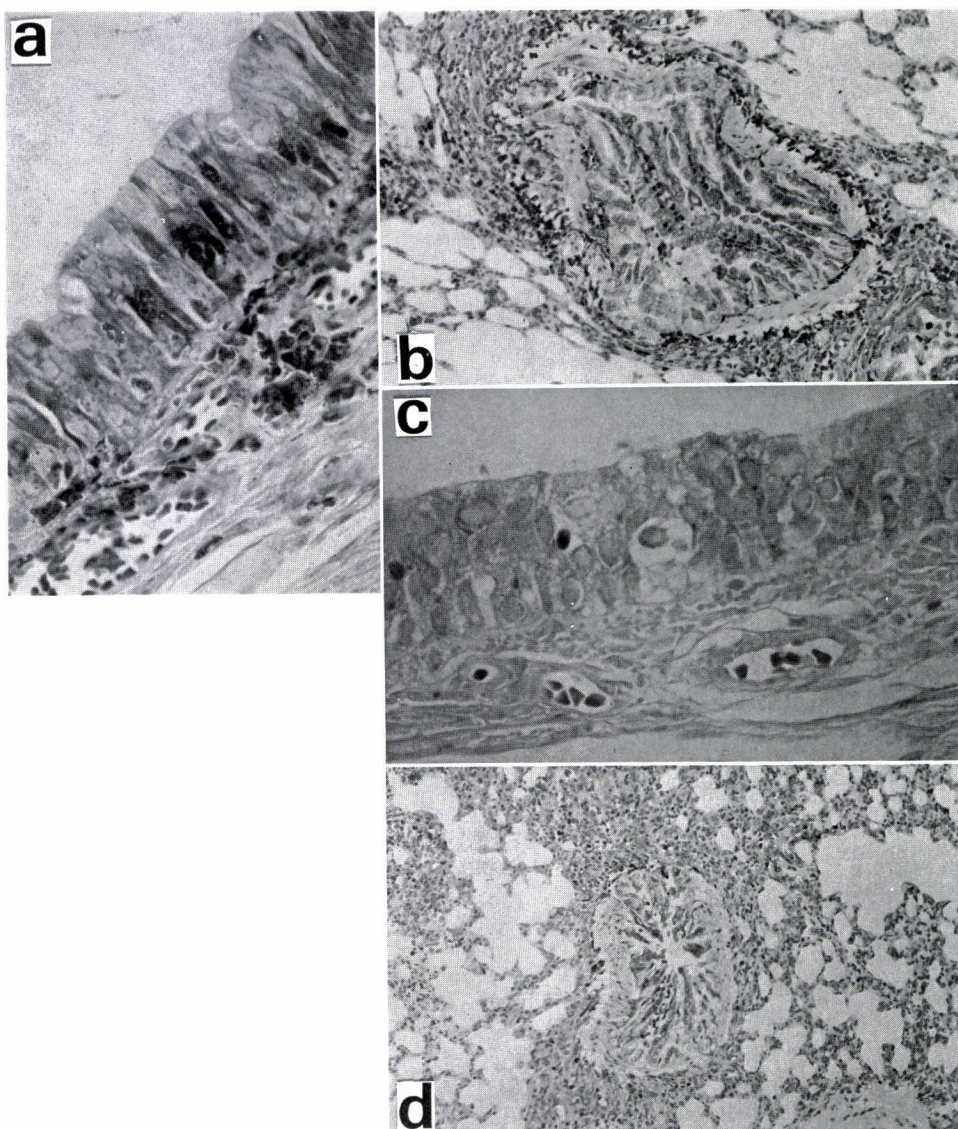


図4 Light microscopic photographs of tracheal walls and bronchi of passively sensitized guinea pigs challenged with the antigen inhalation 6 hours before

a & b are from control guinea pigs and c & d are from animals treated with 3 mg/kg of Ibd for 14 days before the antigen-challenge. Staining was done by using the Giemsa solution.

後遅発性喘息反応(気道過敏)は、遅発性喘息反応陽性者に多いからである。

局所に浸潤した好酸球は、遅発性喘息反応の時期には、PAF、 LTC_4 を産生して気道閉塞に貢献し、後遅発性喘息反応においては、その組織傷害性顆粒蛋白(major basic protein, eosinophil cationic protein, eosinophil peroxidase)を遊離し、気道上皮を損傷することで気道過敏を起こすと

考えられる。事実、 LTC_4/D_4 拮抗薬 ONO 1078 がヒト喘息での抗原誘発遅発性喘息反応を抑制し¹⁶⁾、モルモット実験喘息では、PAF 拮抗薬 WEB 2086 が同時に遅発性気道収縮を抑制した¹⁷⁾。

本研究において Ibd 前処置は、抗原曝露による好酸球遊走を抑制した。その機序は明らかではないが、第1に、遊離ヒト好酸球の PAF に対する *in vitro* 遊走を、Ibd は抑制した¹⁸⁾。第2には、

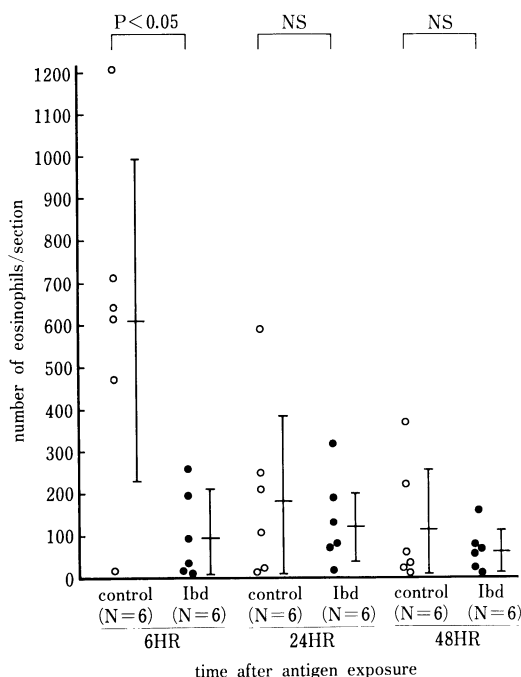


図5 Effect of Ibudilast (3 mg/kg) on eosinophil infiltration in the tracheal wall of passively sensitized guinea pigs after antigen exposure

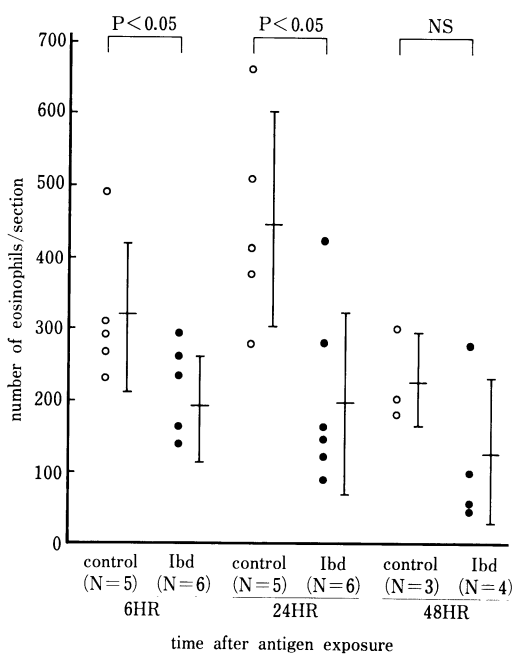


図6 Effect of Ibudilast (10 mg/kg) on eosinophil infiltration in the tracheal wall of passively sensitized guinea pigs after antigen exposure

Ibd は、ラット腹腔細胞の LTC_4 産生を抑制し¹²⁾、同時に、好酸球遊走活性の持つ LTB_4 、PAF

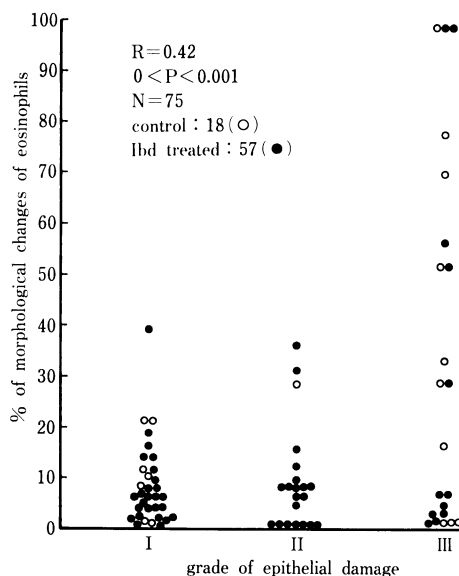


図7 Correlation between epithelial damage and morphological change of eosinophil specific granules in the tissue of tracheal mucosa of passively sensitized guinea pigs which were challenged by antigen 6 hours before

- 1) Tracheal mucosa was taken from 2 control guinea pigs and 3 Ibd treated guinea pigs.
- 2) The number of tissue was 75, 18 from control guinea pigs (○) and 57 from Ibd-treated guinea pigs (●).

産生にて抑制する可能性が高い。第3に、Ibd はモルモット肺において LTD_4 による inositol phosphates 産生を抑制し、細胞内 Ca^{2+} 上昇の抑制の可能性が示されている¹⁹⁾。脱顆粒に Ca^{2+} 依存性がある点から、この系を介して脱顆粒を抑制した可能性がある。

さらに本研究において、抗原曝露6時間後にみられる気道粘膜上皮損傷と好酸球活性化と思われる好酸球特異顆粒構造変化に相関が認められた。Ibd 前処置群と無処置群との間に上皮損傷程度有無について統計上関係は明らかではないが、Ibd 前処置群は、grade I, II の上皮損傷の程度が少なく、さらに好酸球形態上の変化割合が少ないものが多数認められた。

これらの結果は、大橋らの、喘息患者の気道粘膜生検標本の電顕的検索で、好酸球浸潤の多い気道粘膜では、上皮の損傷がより著明で、気道粘膜上皮の損傷のいちじるしい患者のアセチルコリンに対する気道反応性が亢進していること⁵⁾、また、

急性喘息発作で入院した喀痰中の ECP 濃度と好酸球特異顆粒の電子密度変化は、前者は高く、両者に相関が認められ、症状改善とともに正常化することを認めていること¹⁵⁾などを裏づけるものと考えられる。

Ibd は、多施設二重盲検試験を含む多くの研究で気管支喘息への有効性が示されている¹¹⁾。その機序として、すでに抗原曝露による LTC₄/D₄ の産生の抑制、および抗アナフィラキシー作用が示されている¹²⁾。

最近、渡邊らは、直接気管支拡張作用のあることをヒト喘息で示している²⁰⁾。

本研究においては、Ibd が被動感作ホルモットで抗原曝露による遊走を抑制することを示したが、これは、Ibd がヒト喘息アレルギー曝露による気道反応性亢進を抑制しうる可能性を示している。事実、他のいくつかの喘息に有効な抗アレルギー薬が、即時性の気道収縮を抑制するばかりでなく、炎症細胞抑制作用を持つ点と共通しており、今後さらに検討が必要と思われる。

文 献

- Makino, S., Fukuda, T., Motojima, S., Yukawa, T.: Eosinophils and airway hyperresponsiveness. Inflammations and mediators in bronchial asthma. (ed. Agrawal, D.K., Townly, R.G.), CRC Press, 1990, p 115-132.
- Cartier, A., Thomson, N.C., Frith, P.A., Roberts, R., Tech, M., 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.
- de Monchy, J.G.R., Kaufman, H.F., Venge, P., Koëter, G.H., Jansen, H.M., Sluiter, H.J., Vries, K.D.: Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131: 373-376, 1985.
- Ohashi, Y., Motojima, S., Fukuda, T., Makino, S.: Airway hyperresponsiveness increased intracellular spaces of bronchial epithelium, and increased infiltration of eosinophils and lymphocytes in bronchial mucosa in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* (in press).
- 大橋裕二, 本島新司, 福田 健, 牧野莊平: 気管支喘息患者の気管支生検標本における好酸球浸潤と気道上皮細胞間隙開大像およびアセチルコリン閾値との関係. *アレルギー* 39: 1541-1545, 1990.
- 本島新司, 九嶋 敦, 緒方英嗣, 立石欣司, 福田 健, 牧野莊平: 気管支喘息患者における喀痰中 Creola Body の出現と気道過敏性の関係について. *アレルギー* 39: 377-383, 1990.
- 九嶋 敦, 本島新司, 山井孝夫, 牧野莊平: 気管支喘息患者における抗原吸入誘発後の気道過敏性亢進への気道上皮剥離の関与について, 喀痰中 Eosinophil Cationic Protein 濃度の動きも含めて. *アレルギー* 39: 1581-1589, 1990.
- 阿久津郁夫, 福田 健, 沼尾利郎, 牧野莊平: モルモット実験喘息モデルにおける遅発型喘息反応の出現と気道反応性亢進の FK-506 による抑制. *アレルギー* 39: 605-609, 1990.
- 有馬雅史, 湯川龍雄, 寺師義典, 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とヒスタミンに対する気道過敏性亢進に対する cyclosporine A の効果. *日胸疾会誌* 29: 1089-1095, 1991.
- 湯川龍雄, 寺師義典, 福田 健, 牧野莊平: モルモット気道アレルギーにおける組織学的検討 I, 同種抗体受身感作モデルにおける単回抗原暴露後の好酸球浸潤と気道形態変化. *アレルギー* 36: 227-237, 1987.
- 榊原博樹, 末次 勸, 梅田博道: 気管支喘息の気道過敏性に対する KC-404 の効果. *薬理と治療* 13: 7469-7476, 1985.
- 西納啓吾, 大橋光雄, 原 三郎, 鈴木佐枝, 入倉勉: KC-404 のアナフィラキシー性気道反応に対する作用. *日薬理誌* 83: 281-289, 1984.
- 田村 弦, 大津 造, 藤本由美子, 相沢敏也, 無江季次, 滝島 任: Ca-ionophore A 23187 刺激によるヒト末梢白血球からの Leukotriene C₄ ならびに B₄ 遊離に対する KC-404 の抑制作用について. *基礎と臨床* 20: 181-185, 1986.
- 伊藤幸治, 石井 彰, 木谷誠一, 浦田誓夫, 庄司俊輔, 宮本昭正: Mead の装置を使用した抗 IgE 惹起ホルモット喘息の観察と disodium cromoglycate の効果検討への応用. *日胸疾会誌* 24(11): 1240-1245, 1986.
- 大橋裕二, 本島新司, 九嶋 敦, 立石欣司, 福田 健, 牧野莊平: 喀痰中好酸球の電顕所見および喀痰中 Eosinophil Cationic Protein 濃度より検討した気管支喘息急性発作時の肺内好酸球活性化. *アレルギー* 40: 1265-1271, 1991.
- Yamai, T., Watanabe, S., Motojima, S., Fukuda, T., Makino, S.: The significance of leukotriene in antigen-induced late asthmatic response. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139(suppl.): A 462, 1989.
- 有馬雅史, 湯川龍雄, 寺師義典, 相良博典, 牧野莊平: 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に及ぼす WEB 2086 の影響. *アレルギー* 40: 141-146, 1991.
- 沼尾利郎, 福田 健, 福島康次, 永田 真, 阿久津郁夫, 中島宏和, 牧野莊平: 抗アレルギー薬 Ibudilast のヒト好酸球遊走抑制効果. *アレルギー* 39: 991, 1990.
- Etoh, S., Ohashi, M., Baba, A., Iwata, H.: Inhibition by ibudilast of leukotriene D₄-induced formation of inositol phosphates in guinea-pig lung. *Br. J. Pharmacol.* 100: 564-568, 1990.
- 渡邊直人, 湯川龍雄, 本島新司, 福田 健, 牧野莊平: Ibudilast の気管支喘息における急性気管支拡張効果. *アレルギー* 40: 362, 1991.