

モルモットを用いての実験的スギ花粉症及び花粉喘息モデルの 作成と Homocytotropic Antibody の解析

獨協医科大学アレルギー内科

湯川龍雄 小泉一弘 池森亨介 牧野荘平

Key words: cedar asthma — cedar pollinosis — experimental model —
homocytotropic antibodies — passive sensitization

(受付: 7月3日, 1984)

緒言

スギ花粉症は1964年日光地方において発見報告¹⁾されて以来、特にここ数年増加傾向にあり、スギ (*Cryptomeria japonica*, Japanese cedar) の分布が北海道と沖縄県を除く日本全域と広く、花粉飛散量もきわめて多いことから、量も重要な花粉症として注目され²⁾、臨床研究、抗原分析などについて多くの報告³⁾⁻⁶⁾がなされてきたが、動物実験(動物モデルの作成)となると殆んど行われていないのが現状である⁷⁾。

今回、我々は、スギ花粉精製抗原を用いてモルモットを感作し、実験的スギ花粉症及び花粉喘息モデルの作成に成功し、その homocytotropic antibody の解析も行ったので、若干の考察を加えて報告する。

方法

1. スギ花粉精製抗原の作成:

Fig. 1のごとく、安枝の方法³⁾に準じて、スギ花粉アレルギーの精製を行った。

a) 抽出

スギ花粉100g (1980年の飛散期に日光地方で採取したものを使用時まで-20℃に保存した) を2倍量のエーテルで5回処理して脱脂した後、2000mlの0.125 M NH_4HCO_3 を加え、室温で攪拌しながら24時間抽出した。遠心(10000×g, 30分)により上清と沈渣に分け、全上清を Seamless Cellulose Tubing 36/32 (Visking Company 社製) に入れ4℃下で濃縮した。

Abbreviations: PCA passive cutaneous anaphylaxis; ED₅₀ the effective dose that produce 50% maximum relaxation

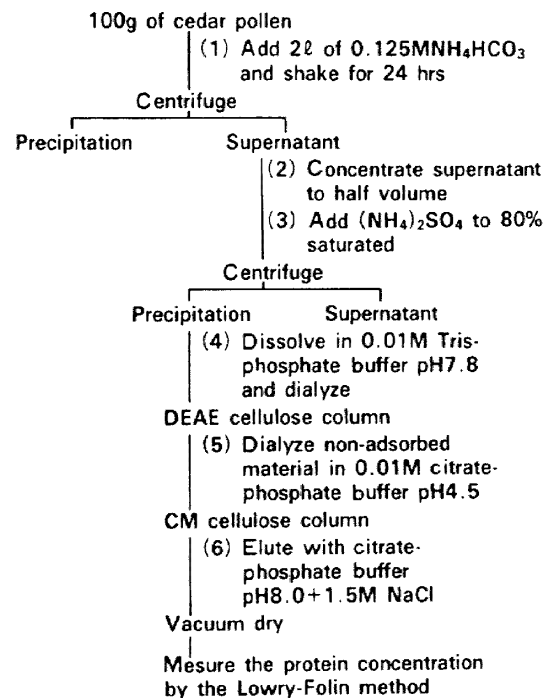


Fig. 1. The purification procedure of cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen antigen.

b) 硫酸塩析

a)で得られた濃縮液を80%になるように固体硫酸を加え、4℃下で一昼夜攪拌後、遠心(10000×g, 30分)により80%硫酸上清(以下80%sup)と80%硫酸沈殿(以下80%ppt)に分けた。

c) DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィー

80% pptを200mlの0.01M Tris-phosphate buffer pH 7.8に溶解し、同bufferで透析した。同bufferで平衡化したDEAE-セルロースカラム(Pharmacia 社製カラム K 16/40, イオン交換セルロースは Whatman 社製 DE-23)に試料を流し、カラムに吸着されない蛋

白成分を集めて、これを粗精製のスギ花粉抗原とした。

d) CM-セルロースイオン交換クロマトグラフィー

c) の粗精製抗原を0.01M citrate-phosphate buffer pH 4.5で透析後、同 buffer で平衡化した CM-セルロースカラム (Pharmacia 社製カラム K 16/40, イオン交換セルロースは Whatman 社製 CM-23) に滴下し、未吸着成分を同 buffer で洗い流した後、吸着された蛋白成分を0.01M citrate-phosphate buffer pH 8.0+1.5M NaCl で溶出した。

溶出液は、凍結乾燥し、Lowry-Folin 法により蛋白定量し、精製抗原として凍結保存した。

2. スギ花粉精製抗原による感作：

Hartley 系雄モルモット (ドーゲンより購入) を用いて実験した。抗体産生は Leveine らの方法⁹⁾ に準じて、スギ精製抗原1 μ g 又は10 μ g を Leveine と Vaz の方法⁹⁾ で作製した水酸化アルミニウムゲル (和光純薬工業製 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ と NaOH を使用して作製し、20mg/ml に調整)5mg とともに、体重約350g のモルモット腹腔内に1 μ g 群10匹、10 μ g 群10匹の計20匹、月1回注射した。

3回感作後より、1週後に耳朶より採血し、Ovary の方法¹⁰⁾ に準じて、抗血清希釈系列を体重約250g の雄モルモット背部に0.1ml ずつ皮内注射し、48時間後に、スギ精製抗原10 μ g と0.5% Evans Blue 液1ml を静注し PCA 反応を施行した。PCA 反応の判定は、30分後に、直径8mm 以上青色化したものを陽性とし、PCA titer 80倍以上のモルモットより全採血し、血清分離後-80℃ に保存した。

3. homocytotropic antibody の解析：

48時間 PCA titer 80倍以上の血清について、4時間、48時間、7日後と latent time を変えて PCA 反応を行った。PCA 反応の判定は、2. と同様に行い、56℃ 4時間熱処理を加えた血清についても、同様の time schedule で PCA 反応を行った。

4. 気管筋収縮反応：

2. で得られた抗スギ花粉血清1ml を体重約350g の未感作雄モルモットに静注し、受身感作した。48時間後、頭部打撲致死させ気管を摘出し、Takagi らの方法¹¹⁾ に準じて気管鎖を作成した。すなわち、気管を非筋肉部分で縦に切開後、幅約1-2mm の12個の横切切片に分割、次に、元の位置関係をそのままにして、1つおきに6個の横切切片の輪状軟骨部分を糸で連結して1匹から2本の対照的な気管鎖標本を作成した。

気管鎖は、Fig. 2に示すように95% O_2 + 5% CO_2 で飽和する Krebs 修正液で満たされた37℃ 20ml organ bath 中に懸垂した。Krebs 修正液の組成 (mM) は、NaCl 120, KCl 4.7, CaCl_2 2.5, MgCl_2 1.2, NaHCO_3 25, KH_2PO_4 1.2, glucose 14である。

気管鎖にあらかじめかける負荷を0.5g とし、収縮・弛緩反応は等張性トランスデューサー (日本光電製、TD 112S) を用いて測定し、ポリグラフ (日本光電製、増幅器 RMP 6004M を Recticorder RJG-4028に連結) 上に記録した。

気管鎖の histamine に対する反応性を ED_{50} で表し、気管鎖が、 4×10^{-7} - 4×10^{-4} M histamine で収縮していくときの用量・反応曲線より求めた。実験順序は、先に得られた2本の気管鎖の histamine の ED_{50} に差

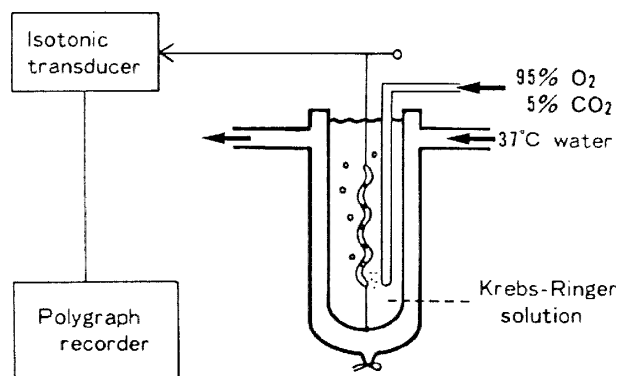


Fig. 2. Schematic illustration of the experimental apparatus for recording the responses of guinea pig tracheal muscle.

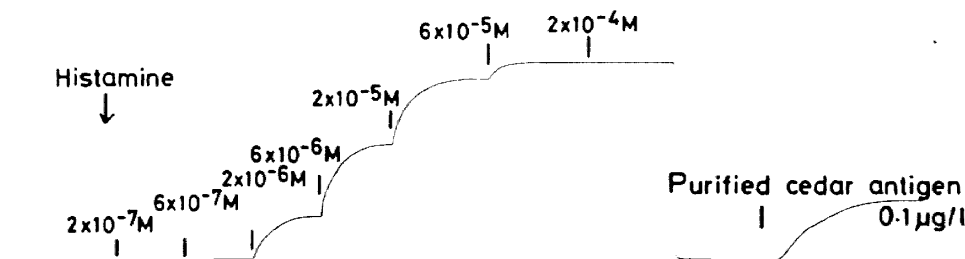


Fig. 3. One example of the tracheal constriction induced by histamine and cedar antigen in guinea pigs passively sensitized with antiserum in vitro.

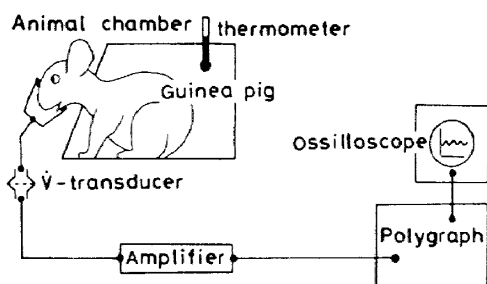


Fig. 4. Schematic illustration of the experimental apparatus for recording the flow pattern of guinea pigs.

のないことを確認した後、一定量の抗原（1. で得られたスギ花粉抗原）を投与した（1 例を Fig. 3 に示す）。同抗原量を同様に作成した未感作モルモット摘出気管筋にも投与し比較検討した。

また、各段階の PCA titer 抗スギ花粉血清を受身感作し、一定量の抗原投与による収縮程度を各 titer 間で比較することも試みた。

5. スギ花粉及び精製抗原の吸入：

4. と同様に、2. で得られた抗スギ血清 1ml を体重約 350g の未感作雄モルモットに静注し、受身感作した。48 時間後、Mead ら¹²⁾のモルモット呼吸生理機能測定方法を一部改良した Fig. 4 に示すような装置を作成し、呼吸パターンを観察した。

モルモットを入れる気密性の箱（animal chamber）は、プラスチックで作製し、大きさは、円筒部位の内径 10cm、長さ 17cm、壁の厚さ 0.5cm である。呼吸気流を測定するため、モルモットの頭が通るだけの穴のあいたプラスチック製のふたと、円錐形のマスクを作製し、8mm 径の穴をあけ、鼻口からの flow を呼吸流量計 transducer（日本光電製 MFP-1T）によって取り出し、増幅器（日本光電製）を通して、経時的にポリグラフ（三栄測器製 SURGICAL MONITOR 125）に記録し、オシロスコープ（三栄測器製 2G46）に描き出した。

生食ないし抗原の吸入は、100ml/sec の気流量を出す吸入誘発装置（シズメメディカル社製）を用いて一定濃度を吸入可能とした。

生食、スギ花粉及びスギ花粉精製抗原を各々吸入させ、未感作モルモットと比較検討した。

結 果

1. スギ花粉精製抗原による感作：

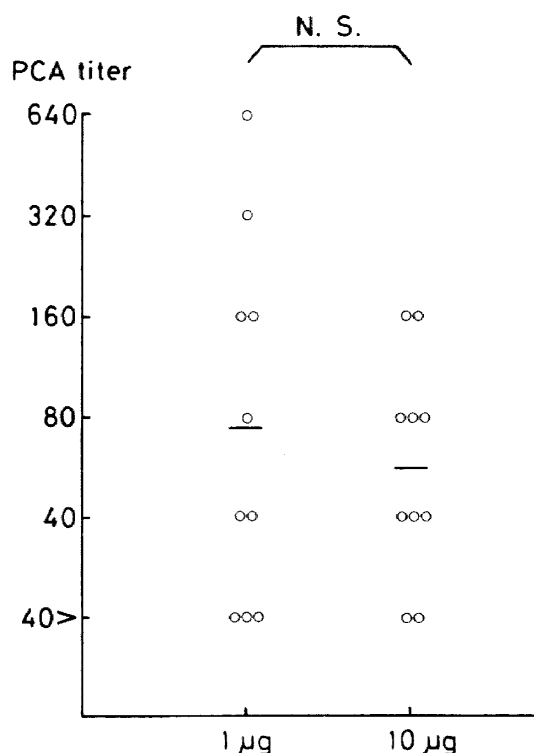


Fig. 5. Comparison of 48hr PCA titer between serum obtained by immunization with 1μg and 10μg of cedar antigen.

精製抗原 1μg 感作群と 10μg 感作群について 5 回感作までの感作成績を比較し、Fig. 5 に示す。48 時間 PCA の結果は、1μg 感作群で、titer 640 倍と高いものが得られる傾向が認められたが、両群間に有意差はなく、ともに抗体の産生が確認できた。

2. homocytotropic antibody

48 時間 PCA titer 80 倍以上の血清について、latent period を変えて、1 血清につき 2 回ずつ PCA 反応を行った結果を Table 1 に示す。大部分については、ほぼ同様の PCA titer が得られたが、一部 7 day PCA titer のみ高いもの（D, H）、4hr 及び 48hr PCA titer のみ高いもの（E, I）も認められた。56℃ 4 時間熱処理した血清では、7day PCA titer はすべて著明に低下した。

3. 気管筋収縮反応：

収縮反応を起こすに要する媒溶液中のスギ精製抗原濃度は、全て 0.1μg/L で十分であったが、この濃度のスギ抗原量では、正常モルモットでは収縮反応は認められなかった（Fig. 6）。

48 時間 PCA titer 40, 160, 640 倍の 3 種類の抗スギ花粉血清を各 6 匹ずつ受身感作し、1 匹より 2 本の気管鎖標本を作成し、1 群計 12 本ずつの気管鎖収縮反応で

Table 1 PCA titers of antiserum obtained from immunized guinea pig by purified cedar antigen
(Experiments were performed in duplicate)

Latent period	4hr		PCA titer 48hr				7 days			
Heating of serum	56°C 4hr		None		56°C 4hr		None		56°C 4hr	
Guinea pigs	A	80 40	640 640	40 40	320 320	20> 20>	20> 20>	20> 20>	20> 20>	20> 20>
	B	160 80	160 320	80 160	80 80	20> 20>	20> 20>	20> 20>	20> 20>	20> 20>
	C	320 160	160 160	320 320	160 80	20> 20>	20> 20>	20> 20>	20> 20>	20> 20>
	D*	40 40	160 160	160 160	320 80	20> 20>	20> 20>	20> 20>	20> 20>	20> 20>
	E**	160 80	160 80	80 80	40> 40>	20> 20>	20> 20>	20> 20>	20> 20>	20> 20>
	F	80 80	160 160	160 80	80 40	20> 20>	20> 20>	20> 20>	20> 20>	20> 20>
	G	160 80	320 320	160 40	320 320	20> 20>	20> 20>	20> 20>	20> 20>	20> 20>
	H*	40± 40±	80 160	40± 40±	160 40	20> 20>	20> 20>	20> 20>	20> 20>	20> 20>
	I**	80 40	40 80	80 80	40> 40>	20> 20>	20> 20>	20> 20>	20> 20>	20> 20>
	J	80 40	160 80	80 40±	40± 40±	20> 20>	20> 20>	20> 20>	20> 20>	20> 20>

* : High titer serum of 7 days PCA reactions.

** : High titer serum of 4hr and 48hr PCA reactions.

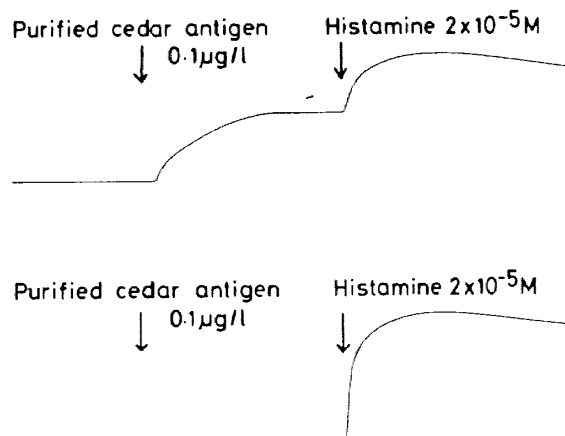


Fig. 6. Antigen-induced constrictions of guinea pig tracheal muscle strips passively sensitized (above) and not sensitized (below).

比較検討した, histamine $4 \times 10^{-4} \text{M}$ で得られた気管筋最大収縮に対する, スギ精製抗原量 $0.1 \mu\text{g/L}$ で得られた収縮程度を%表示すると, Fig. 7に示すように, 収縮程度の $\text{mean} \pm \text{SD}$ は 20.78 ± 9.04 , 67.08 ± 15.84 , 78.48 ± 6.10 と PCA titer が 40, 160, 640 倍と高くなるにつれて有意に増加した.

なお, 1匹のモルモットより作成した2本の気管鎖標本間には histamine 及び抗原投与による収縮反応に有意差は認められなかった.

4. スギ花粉及び精製抗原の吸入:

スギ花粉精製抗原 $5 \mu\text{g/ml}$ 生理食塩水溶解液を3分間吸入させると, 吸入直後で, 鼻汁, 流涙, くしゃみなどの花粉症様症状に加え, Fig. 8左に示すように, 呼

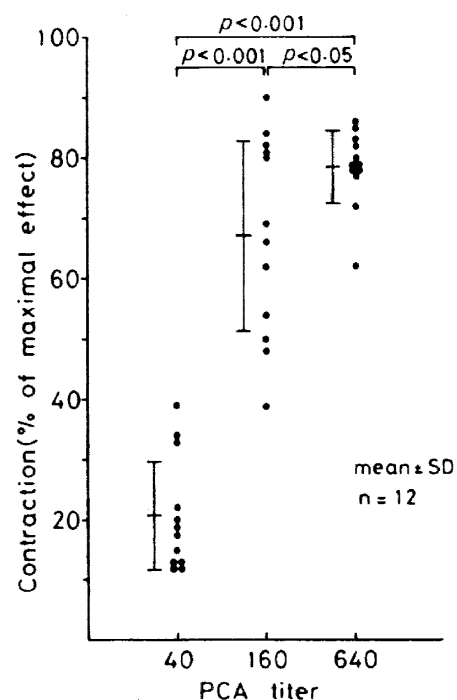


Fig. 7. Relationship between PCA titers and the degrees of constriction of tracheal smooth muscle in passively sensitized guinea pigs.

気の著明な延長が認められ, 呼吸数も $120/\text{min}$ から $240/\text{min}$ 前後に増加した. しかし, 抗原溶解液の代わりに, 抗原を溶解した生理食塩水の3分間吸入では, 呼吸パターン, 呼吸数, 症状に何ら変動は認められなかった. また, 抗スギ花粉血清の代わりに, 正常のモルモット血清 1ml 静注したモルモットでは, 生食及び

Flow pattern of guinea pigs

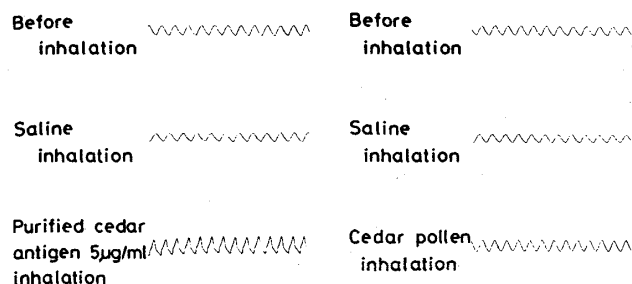


Fig. 8. Flow patterns of passively sensitized guinea pigs after inhalation of purified cedar antigen and cedar pollen.

スギ精製抗原溶液吸入に対しても何ら変化は認められなかった。

一方、スギ花粉そのものを吸入させた場合、精製抗原溶解液吸入の際と同様、鼻汁、流涙、くしゃみなどの花粉症様症状は認められたが、呼吸パターン、呼吸数に変動は認められなかった (Fig. 8右)。

考 察

これまでに、花粉アレルギーの実験的研究としては、ブタクサなどを用いての報告^{13)~18)}が多くなされてきたが、我国で最も問題になりつつあるスギ花粉アレルギーの実験報告は、1967年の斉藤らの報告¹⁾以外諸外国にも例をみない。

斉藤らの報告は、モルモットをスギ花粉そのもので経鼻腔的に毎日2週間吸入感作し、一定の潜伏期において再び経鼻腔的にスギ花粉を適用すると、モルモットに不安、立毛、流涙、くしゃみ、咳嗽、呼吸困難、失禁などのショック症状を呈したものである。

花粉実験モデルで、homocytotropic antibody を解析した報告は少なく、スギ花粉を用いたモデルでの解析は今回の我々がはじめてである。1977年 Ado, A.D. らは、モルモットを ragweed 精製抗原液の吸入で感作し、24時間 PCA を施行したところ、最終的には antibody titer は 4.7 ± 0.3 (in log 2) まで上昇したが、56°C 4時間熱処理を加えたところ、PCA titer は全て著明に低下したと報告し、IgE 抗体の産生を示唆した結果を報告している。今回、我々の結果は、感作により産生された抗体が4時間 PCA で熱処理を加えても titer の変動がなかったこと、7日間 PCA で熱処理により titer が著明に低下したことで、前者は r_1 抗体の

産生、後者は reagin の産生¹⁹⁾を示唆するものであり、単に感作抗原の種類の違い他に、 r_1 抗体が産生された点で、Ado, A.D. の報告とは異なるものと考え。

感作抗原量の差、すなわち、スギ精製抗原 $1\mu\text{g}$ と $10\mu\text{g}$ では有意差は認められなかったが、やや $1\mu\text{g}$ の方が感作成績の良い傾向が認められた。Levine らは、 $0.1\mu\text{g}$ 及び $1.0\mu\text{g}$ の BPO₂₅ BGG でモルモットを感作したところ、reagin の産生に関しては抗原量は微量の方が良好であると報告している⁸⁾⁹⁾。我々の実験でも、スギ精製抗原 $1\mu\text{g}$ 感作群の中に、48時間 PCA titer 640倍、320倍と高 titer のものが存在したが、これらの血清の homocytotropic antibody は、4時間 PCA は低く、7日間 PCA が高く、更に熱処理により低 titer になったことより IgE 抗体の産生が主要であると考えられ、感作抗原が BPO₂₅ BGG とスギ精製抗原という差はあるが、あるいは、スギ精製抗原の場合も $1\mu\text{g}$ 感作の方が reagin 産生に関しては良好なのかもしれない。

気管筋収縮反応の程度を判定する場合、本来なら、各々の気管筋の最大収縮に対するある一定の収縮を得る為の抗原量 (例えば histamine ED₅₀)、あるいは収縮をおこしうる最小抗原量として表現すべきである²⁰⁾²¹⁾が、得られた血清が量的に十分ではなかったことと、抗原投与による収縮は濃度依存性ではないという難点があるため、今回、スギ精製抗原 $0.1\mu\text{g}/\text{L}$ の投与は、収縮反応を起こすに十分な抗原量であり、かつ histamine で得られる最大収縮には至らない抗原量であることをあらかじめ予備実験で確認し、3段階の異なる titer の血清を用いて受身感作し、その摘出気管筋に一定量の抗原 $0.1\mu\text{g}/\text{L}$ を投与し収縮程度を比較検討したものである。結果は、抗スギ血清受身感作モルモットの気管筋収縮反応の程度は、PCA titer に比例して有意に大きくなった。能動感作の場合²²⁾²³⁾でも、受身感作の場合²⁴⁾でも、それぞれ個体によって感作されやすさが違うという報告があるが、十分な同種抗体活性を保有している血清であれば、どの個体からも一様に受身感作されるというヒトやサルでの報告²⁵⁾や、また、モルモットの気道でも、感作後の日数が同一であれば高い再現性が得られるという報告²¹⁾を総合すると、今回の我々の実験結果も同一 titer 血清による受身感作48時間後気管鎖収縮程度は、再現性が高いものと思われる。

Lichtenstein ら²⁶⁾は、ヒスタミン遊離を惹起するに必要な抗原濃度と皮内反応において陽性を示す抗原濃

度とはよく相関することを報告し、Norman ら²⁷⁾も、ヒスタミン遊離を指標とした細胞の感受性は皮内反応および RAST 値とよく相関することを報告し、また、黒沢ら²⁸⁾も、こんにゃく喘息患者末梢白血球を用いて類似した結果を認めている。今回、我々の実験結果で、気管筋収縮がヒスタミン遊離のみで決定されるとは必ずしも断定はできないが、PCA titer と有意な相関が得られたことは、抗体産生量とヒスタミン遊離とは相関するという諸家の報告と一致するものである。また、今回のスギ実験モデルでの皮膚における感作程度 (PCA titer) と気道における感作程度 (tracheal contraction) とが相関していることも示唆するものと考ええる。

一般臨床的には、花粉喘息はきわめて少なく、我妻ら²⁹⁾は、252例の花粉尘 (喘息を含む) の観察で、花粉喘息はわずか4例のみ1.6%と報告し、油井ら³⁰⁾も、スギおよびヨモギ花粉感作例で、花粉飛散期のみに喘息症状を示し、かつ吸入誘発試験で陽性となる例はほとんど存在しないと報告している。その理由として、気管支喘息は、末梢気道の可逆的な狭窄により発生する疾患であるが、末梢気道に到達しうるのは 2μ 以下の粒子であり、一方抗原花粉の鼻粘膜への付着はその粒子の大きさに比例し、 5μ で75%、 10μ で90%、 20μ 以上だとほぼ100%という報告³¹⁾もあるので、スギ花粉の直径が 30μ 前後であることを考え合わせると、スギ花粉症発生頻度に対し、花粉喘息発生例が少ない一因になっている可能性がある。今回、我々の実験でも、スギ花粉そのものの吸入では、眼鼻症状のみで、呼吸パターンに明らかな気管支収縮は認められず、精製抗原エキスの吸入で著明な気管支収縮発作が認められた。Hoehne ら³²⁾のブタクサでの鼻アレルギー反応のみでは、ブタクサ花粉喘息はおこさないという報告と一致した。

しかし、一方Hobday ら³³⁾は、同じくブタクサ花粉で、モルモットの下気道に達することを認めており、François ら³⁴⁾も、ヒトの下気道から花粉が認められると報告しており、また、花粉そのものでなくとも、抗原成分を含んだ植物の破片の吸入や、花粉による上気道や口腔咽頭の刺激、上気道に吸入された抗原成分が吸収されて喘息が発生する³⁵⁾ことも考えられるので、単に、花粉の大きさのみでかたづけられない面もある。更に、ブタクサ花粉エキスの吸入による airway conductance の変化は、花粉症例と花粉喘息例で有意な差はないと Bruce ら³⁶⁾は報告し、Fish ら³⁷⁾も花粉エキスを

吸入による airway conductance は両群で差はなく、FEV₁ を20%低下させるためには、花粉症患者では約8倍の抗原量が必要であることを報告し、花粉症と花粉喘息に絶対的な差のないことを結論づけている。気道の過敏性も含め、今後、検討を要するものと考ええる。

結 語

スギ花粉精製抗原を用いて、実験的スギ花粉症及び花粉喘息の実験モデルの作成を試みた。

1. スギ花粉精製抗原を安枝の方法に準じて作成した。

2. 精製抗原の蛋白量 $1\mu\text{g}$ または $10\mu\text{g}$ をモルモット腹腔内感作し、抗体産生の有無を PCA 反応で確認した。 $1\mu\text{g}$ 群、 $10\mu\text{g}$ 群ともに抗体の産生が確認できたが、前者で、48時間 PCA titer で高いものが得られる傾向が認められた。

3. 48時間 PCA titer 80倍以上の血清について latent period を変えて PCA 反応を行うと、4時間 PCA のみ高い群、7日間 PCA のみ高い群、また、両者とも高い群が存在し、 56°C 4時間の熱処理により7日間 PCA 反応が全て著明に低下したことより、スギ花粉精製抗原により IgE 及び IgG (r_1) 抗体がともに産生されたことが確認できた。

4. 抗スギ花粉血清各1ml による受身感作モルモットの摘出気管筋収縮反応を検討した。収縮反応を起こすに要する媒溶液中のスギ精製抗原濃度は $0.1\mu\text{g}/\text{L}$ で十分であったが、この濃度のスギ抗原量では、正常モルモットでは収縮反応は認められなかった。また、48時間 PCA titer 40, 160, 640倍の抗スギ血清を用いて気管筋収縮反応を比較すると、PCA titer と収縮反応には有意な相関が認められた。

5. 4と同様に抗スギ花粉血清1ml による受身感作モルモットに、スギ精製抗原エキスを吸入させると、明らかな気管支収縮発作と花粉症様症状が出現したが、花粉そのものの吸入では気管支収縮発作は認められなかった。

以上、スギ花粉精製抗原を用いて動物モデルの作成に成功した。このモデルは、実験的スギ花粉及び喘息モデルとして有用であると考えた。

本研究の一部は、文部省科学研究費 No. 58770493によっ

たものである。

本研究の実施にあたって、御援助、御助言を頂きました東京大学医学部物療内科、鈴木修二講師に感謝の意を表します。また実験を手伝ってくださった獨協医大アレルギー内科柿沼陽子さん、町田はるみさんに感謝します。

なお、本論文の要旨は第31回アレルギー学会総会（宇都宮，1981）において発表した。

文 献

- 1) 堀口申作，齊藤洋三：栃木県日光地方におけるスギ花粉症 Japanese cedar pollinosis の発見。アレルギー 13, 16-18, 1964.
- 2) 山崎 太，水野瑞夫，信太隆夫，清水章治：花粉症起因花粉の研究（第1報）—スギ花粉飛散数の早期予測について。アレルギー 28, 732-737, 1979.
- 3) 安枝 浩，油井泰雄，清水章治，遠藤久子，信太隆夫：スギ花粉アレルゲンの分析。アレルギー 29, 763-772, 1980.
- 4) 古内一郎，馬場広太郎，佐藤克広，池田美恵子，馬場由子，奥沢裕二，栗山一夫：スギ花粉症におけるヒスタミン固定能 (histamine peptic action) について。アレルギー 28, 817-824, 1979.
- 5) 伊藤由紀子：スギ花粉症患者における IgG 抗体に関する研究。I. radioimmunoassay によるスギ花粉抗原に対する IgG 抗体の測定について。アレルギー 31, 1231-1238, 1982.
- 6) 伊藤由紀子：スギ花粉症患者における IgG 抗体に関する研究。II. 減感作療法，花粉の自然暴露による血清および鼻汁中 IgG, IgE 抗体の変動について。アレルギー 32, 985-995, 1983.
- 7) 齊藤洋三，堀口申作，荒田節男，高山 哲，長谷川誠：花粉症の研究（その6）—実験花粉アレルギー。日鼻副鼻腔誌 6, 67-68, 1967.
- 8) Levine, B.B., Chang, H. Jr. and Vaz, N.M.: The production of hapten-specific reaginic antibodies in the guinea-pig. *J. Immunol.* 106, 29-33, 1971.
- 9) Levine, B.B. and Vaz, N.M.: Effect of combination of inbred strain, antigen, and antigen dose on immune responsiveness and reagin production in the mouse. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 39, 156-171, 1970.
- 10) Ovary, Z.: Passive cutaneous anaphylaxis. In "Immunological Methods" 1st ed. (ed. by J.D. Ackroyd). Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 259-283, 1964.
- 11) Takagi, K., Takayanagi, I. and Fujie, K.: Chemicopharmacological studies on antispasmodic action. XV. Non-specific antispasmodication on tracheal muscle. *Chem. Pharm. Bull.* 6, 716-722, 1958.
- 12) Mead, J.: Control of respiratory Frequency. *J. Appl. Physiol.* 15, 325-336, 1960.
- 13) Ado, A.D., Lukmanora, F.F., Alekseeva, T.A. and Avdeeva, T.A.: Model of experimental pollinosis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 84, 1615-1617, 1978.
- 14) Kipervasser, E.M.: Macrophage spreading phenomenon in pollinosis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 84, 1746-1749, 1977.
- 15) Alekseeva, T.A.: T- and B-lymphocytes of guinea pigs sensitized with ragweed pollen. *Bull. Exp. Biol. Med.* 87, 174-176, 1979.
- 16) Yoo, T.J., Spitz, E. and McGerity, J.L.: Conifer pollen allergy; studies of immunogenicity and cross antigenicity of conifer pollens in rabbit and man. *Ann. Allergy* 34, 87-93, 1975.
- 17) Goodman, M.L. and Irwin, J.W.: Disodium cromoglycate in anaphylaxis and pollinosis. *Ann. Allergy* 40, 177-180, 1978.
- 18) Ekramoddoullan, A.K.M., Chakrabarty, S., Kisil, F.T. and Sehon, A.H.: Isolation of purified allergen from Kentucky blue grass pollen. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 63, 220-235, 1980.
- 19) Ovary, Z., Kaplan, B. and Kojima, S.: Characteristics of guinea pig IgE. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 51, 416-428, 1976.
- 20) 鈴木修二：実験喘息の基礎的研究。I. 同種抗体による気管環の試験管内での受身の感作。アレルギー 26, 399-404, 1977.
- 21) 鈴木修二，五十嵐宏，小泉一弘，村中正治：実験喘息の基礎的研究 II. 同種抗体で感作されたモルモットにおける一過性気道狭窄。アレルギー 28, 327-332, 1979.
- 22) Ovary, Z., Kaplan, B. and Kojima, S.: Characteristics of guinea pig IgE. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 51, 416-428, 1976.
- 23) Muranaka, M., Suzuki, S., Koizumi, K., Igarashi, H., Okumura, H., Takeda, K., Tadokoro, K. and Horiuchi, Y.: Benzylpenicillin preparations can evoke a systemic anaphylactic reaction in the guinea pigs. *J. Allergy Clin. Immunol.* 62, 276-282, 1978.
- 24) Levy, D.A. and Osler, A.G.: Studies on the mechanisms of hypersensitivity phenomena. XIV. Passive sensitization in vitro of human leucocytes to ragweed pollen antigen. *J. Immunol.* 97, 203-212, 1966.
- 25) Assem, E.S.K. and Slied, H.O.: Detection of

- allergy to penicillin and other antigens by in vitro passive sensitization and histamine release from human and monkey lung. *Br. Med. J.* 3, 273-276, 1968.
- 26) Lichtenstein, L.M., Norman, P.S. and Connell, J. T.: Comparison between skin-sensitizing antibody titers and leukocyte sensitivity measurements as an index of the severity of ragweed hay fever. *J. Allergy* 40, 160-167, 1967.
- 27) Norman, P.S., Lichtenstein, L.M. and Ishizaka, K.: Diagnostic tests in ragweed hay fever. A comparison of direct skin tests, IgE antibody measurements, and basophil histamine release. *J. Allergy Clin. Immunol.* 52, 210-224, 1973.
- 28) 黒沢元博, 根本俊和, 田中哲治, 笛木隆三, 小林節雄, 柳原行義, 信太隆夫: こんなにやく喘息患者末梢白血球からのヒスタミン遊離試験と臨床的意義に関する検討. *アレルギー* 30, 151-159, 1981.
- 29) 我妻義則: 花粉症の臨床. "花粉アレルギー: その実態と治療" (石崎 達編), 北隆館, 東京, pp. 92-92, 1979.
- 30) 油井泰雄, 宮本祐一, 信太隆夫: 気管支喘息の原因. 2) 花粉. 免疫と疾患 I, 317-322, 1981.
- 31) 斉藤洋三: 新内科学大系 59巻, *アレルギー性疾患 II*, 中山書店, 東京, pp. 39-55, 1976.
- 32) John, H. and Charles, R.: Where is the allergic reaction in ragweed asthma? *J. Allergy* 47, 108-108, 1971.
- 33) Hobday, J.D. and Townley, R.G.: Deposition of inhaled pollen grains in the lower respiratory tract of the guinea pig. *J. Allergy Clin. Immunol.* 48, 254-256, 1971.
- 34) François, B.M., Jean, P.M., Lyne, Q. and Pierr, C.: Penetration of inhaled pollen into the respiratory tract. *Am. Rev. Respir. Dis.* 115, 609-616, 1977.
- 35) Archie, F.W., Halold, S.N., Edgar, L.S. and Leslie, R.B.: Fate of inhaled whole pollen in asthmatics. *J. Allergy* 47, 107-107, 1971.
- 36) Bruce, C.A., Rosenthal, R.R., Lichtenstein, L.M. and Norman, P.S.: Quantitative inhalation bronchial challenge in ragweed hay fever patients, a comparison with ragweed-allergic asthmatics. *J. Allergy Clin. Immunol.* 56, 331-337, 1975.
- 37) Fish, J.E., Ankin, M.G., Kelly, J.F. and Peterman, V.I.: Comparison of responses to pollen extract in subjects with allergic asthma and nonasthmatic subjects with allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 65, 154-161, 1980.

THE MODEL OF EXPERIMENTAL CEDAR POLLINOSIS AND CEDAR POLLEN ASTHMA AND ITS HOMOCYTOTROPIC ANTIBODIES

Tatsuo Yukawa, Kazuhiro Koizumi, Ryosuke Ikemori and Sohei Makino

Department of Medicine and Clinical Immunology, Dokkyo University School of Medicine

In order to make a experimental model of cedar pollinosis and asthma, guinea pigs were sensitized with a purified cedar pollen antigen. The purified cedar pollen antigen was obtained from cedar pollen by the method of Yasueda and others. Two groups of ten Hartley guinea pigs were immunized with intraperitoneal injections of 1.0 μ g or 10 μ g of the purified cedar pollen antigen with aluminum hydroxide gel. Both of the two groups produced both reaginic and r_1 homocytotropic antibodies. The reagin was distinguished from r_1 antibody by its long persistence in homologous skin sites and its lability to heating at 56°C for 4 hr. The tracheal smooth muscle from guinea pigs, which had been passively sensitized with the homocytotropic antibodies, showed contraction by the challenge of the purified cedar antigen (0.1 μ g/L) in vitro. There was a significant correlation between the degree of the tracheal muscle constriction and the titers of 48 hr PCA reactions ($p < 0.001$).

Guinea pigs, passively sensitized with homocytotropic antibodies, showed symptoms of pollinosis such as rhinorrhea, sneeze and epiphora, observed by the inhalation of not only purified cedar pollen extract but also cedar pollen. However, bronchial constriction was induced only by inhalation of purified extract, but not by that of cedar pollens.

We conclude that guinea pigs sensitized with purified cedar antigen can be a useful experimental model of cedar pollinosis and asthma.