

即時型アレルギー反応における気道粘膜血管透過性： 好中球エラスターゼの役割

東京女子医科大学第一内科

武田祐子 玉置 淳 山脇 功

近藤光子 永井厚志

ovalbumin (OA) 感作モルモットを用い、即時型アレルギー反応における気道血管透過性亢進と好中球エラスターゼの役割を検討した。血管透過性は血管外に漏出した Evans blue の吸光度を測定することにより評価した。OA 吸入は Evans blue の気管粘膜血管外漏出の増加をもたらした。気道血管透過性の亢進が窺われた。またその作用は、好中球エラスターゼ阻害薬 ONO-5046により用量依存的に抑制された。気管支肺胞洗浄液中の好中球数は OA チャレンジにより増加した。さらに好中球エラスターゼ活性の著明な増加が認められ、その効果は ONO-5046の前処置によりほぼ完全に抑制された。好中球エラスターゼの気管内注入は、血管透過性を用量依存的に増加させた。以上の成績より、好中球エラスターゼは即時型アレルギー反応における気道血管透過性の亢進に関与している可能性が示唆された。

Key words: allergic inflammation — elastase inhibitor — neutrophil elastase — vascular permeability

はじめに

喘息における気道炎症の特徴として、気管支壁への好酸球浸潤や喀痰中の好酸球増多が広く知られており、好酸球が気管支収縮や炎症を惹き起こす主要な細胞であると考えられている。一方、好中球に関しては、特異抗原やオゾン、TDI (toluene diisocyanate) などの吸入により気管支肺胞洗浄液中の好中球が増加すること¹⁾、好中球が種々の刺激により活性化されると血小板活性化因子や活性酸素を産生遊離すること、喘息患者の気道粘膜に好中球の浸潤が認められること²⁾などより、喘息病態の成立における本細胞の関与も指摘されている³⁾。

本研究では、活性化好中球より遊離される様々なメディエーターのうち、好中球エラスターゼに注目した。好中球エラスターゼはアズール顆粒に多量に含まれるセリンプロテアーゼであり、その生理作用として、蛋白分解酵素としての効果のみならず、強力な気道分泌促進作用が知られている⁴⁾。さらに、最近、本酵素の阻害薬が抗原誘発による気道収縮反応を抑制したとの報告⁵⁾もあり、好中球エラスターゼと喘息との関連が推

測されている。そこで今回は、気道炎症の1つである気道粘膜血管透過性の亢進に焦点を絞り、モルモットの即時型アレルギー反応における気道血管透過性亢進と、以上の反応における好中球エラスターゼの役割を明らかにすることを目的とし、以下の実験を行った。

方 法

抗原チャレンジと血管透過性の測定

Hartley 系雄性モルモット (体重250~300g) に7% ovalbumin (OA) を7日間隔で計2回腹腔内投与 (70 mg/kg) して感作し、その7日後に実験に供した⁶⁾。

感作モルモットをペントバルビタール (40mg/kg) にて腹腔内麻酔後、気管を切開しレスピレータに接続し人工換気を行った (1回換気量10ml/kg, 呼吸回数60回/分)、3% Evans blue (Sigma 社) を含む生理食塩水を大腿静脈より5秒以上かけて注入し、次いで、7% OA を超音波ネブライザーにて2分間吸入させることにより抗原チャレンジを行った (吸入量0.2ml/分)。OA 吸入の10分後に開胸し、右心耳および左房を切開、さらに左心室から上行大動脈にカテーテルを挿入し120mmHg の圧にてリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 5) を注入し、全身を2分間灌流した。次いで、気管を

Received: February 28, 1997

Accepted: May 13, 1997

Abbreviation: OA ovalbumin

摘出し重量を測定した後、ホルムアミド中に50°Cで18時間浸漬し、組織中の Evans blue を抽出した。溶液中の Evans blue 濃度は分光光度計（励起波長620nm, Ultrospec Plus, Pharmacia LKB, Biochrom 社）を用いて測定し、組織の湿重量1mgあたりの血管外に漏出した Evans blue 量を算定した⁷⁾。

血管透過性亢進における好中球エラストラーゼの役割

OA チャレンジ5分前に ONO-5046 (小野薬品) を大腿静脈より投与し (3, 10, 30mg/kg), Evans blue の注入後, OA チャレンジを行い, 血管透過性の測定を前述と同一の時間経過で行った。また, 外因性に投与した好中球エラストラーゼが血管透過性亢進作用を有するか否かについても検討した。モルモットを麻酔し気管を露出し, Evans blue を大腿静脈より投与した。種々の濃度 (10, 30, 60, 100 μ M) の好中球エラストラーゼ (Sigma 社) 0.2ml を気管内注入し, 10分後に全身を灌流した後気管を摘出し, ホルムアミドにて Evans blue を同様に抽出した。さらに, 好中球エラストラーゼ (100 μ M) の注入5分前に ONO-5046 (30mg/kg) を大腿静脈より投与し, 好中球エラストラーゼ阻害効果を確認した。なお基礎実験において, ONO-5046は, 本研究で用いた投与量ではそれ自体が血管透過性に影響を及ぼさないことをあらかじめ確認した。

気管支肺胞洗浄液の解析

モルモットを麻酔後, 気管を切開し気管カニユーレを介して生理食塩水15ml で気管支肺胞洗浄を行い, 同操作を3回繰り返すことにより洗浄液を回収した。回収した洗浄液は1200回転5分間で遠沈後上清を除去し, PBS で2回洗浄後, 総細胞数を算定した。また塗抹標本に May-Grundwald-Giemsa 染色を施し, 細胞分画を算出した。

また, コントロール (非感作), 感作後生理食塩水を吸入 (sham challenge), OA チャレンジ, OA チャレンジ+ONO-5046 (30mg/kg) の4群について, methoxysuccinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-propyl-L-valyl-*p*-nitroanilide を基質とした酵素分解法⁸⁾を用い, 気管支肺胞洗浄液中の好中球エラストラーゼ活性を測定しエラストラーゼ濃度に換算した。

統計

すべてのデータは平均値 $\pm$ 標準誤差で表記した。統計学的解析には ANOVA あるいは Newman Keuls

multiple comparison test を用い, $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結 果

気管粘膜血管透過性

Fig. 1 に OA チャレンジにより惹起される即時型アレルギー反応における気管粘膜血管透過性亢進およびそれに対する ONO-5046 の効果を示した。Evans blue の血管外漏出は, 感作モルモットに生理食塩水の吸入を行った sham challenge 群と無処置のコントロール群の間で有意差は認められなかったが, OA チャレンジにより著明に増加し ($7.4 \pm 2.0 \rightarrow 44.8 \pm 7.0$ ng/mg tissue, $p < 0.001$, $n=7$), 血管透過性の亢進が示唆された。また, 以上の効果は ONO-5046 の前投与により用量依存的に抑制され, 投与量30mg/kg で30%の抑制率であった ($p < 0.05$, $n=7$)。一方, Fig. 2 に示すように, 好中球エラストラーゼも血管透過性を用量依存的に亢進させ, 100 μ M エラストラーゼの気管内注入で

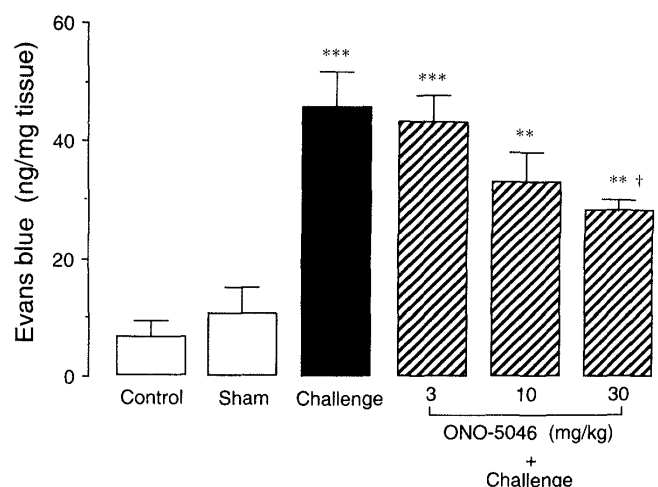


Fig. 1. Dose-dependent effect of ONO-5046 on allergen-induced microvascular leakage in the guinea pig trachea. Guinea pigs received no treatment (Control), inhaled saline (Sham) or ovalbumin (Challenge). Some animals were treated with intravenous ONO-5046, and then challenged with ovalbumin. Vascular permeability was expressed as the extravasation of Evans blue dye. Data are means $\pm$ SE; $n=7$ for each column. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significantly different from the control values. † $p < 0.05$, significantly different from the response to challenge alone.

Table 1 Effect of ONO-5046 on cell differentials in bronchoalveolar lavage fluid after antigen challenge

	Control	Challenge	ONO-5046(30mg/kg) + Challenge
Total cells, $\times 10^5/\text{ml}$	6.7 ± 0.7	$17.9 \pm 1.2^{***}$	$19.1 \pm 0.6^{***}$
Macrophage, %	92.7 ± 0.4	$74.3 \pm 1.2^{***}$	$81.9 \pm 1.1^{***}$
Lymphocyte, %	2.8 ± 0.7	$4.2 \pm 0.6^*$	$5.9 \pm 0.7^{***}$
Neutrophil, %	2.7 ± 0.7	$14.2 \pm 1.2^{***}$	$10.0 \pm 0.8^{***\dagger}$
Eosinophil, %	0.7 ± 0.2	$3.1 \pm 0.6^{***}$	$1.1 \pm 0.2^{***\dagger\dagger}$
Epithelium, %	1.2 ± 0.3	$4.1 \pm 0.4^{***}$	$1.1 \pm 0.3^{\dagger\dagger\dagger}$

Data are expressed as means $\pm$ SE; $n=7$.

* $p<0.05$, *** $p<0.001$ (vs. Control); $\dagger p<0.05$, $\dagger\dagger p<0.001$ (vs. Challenge)

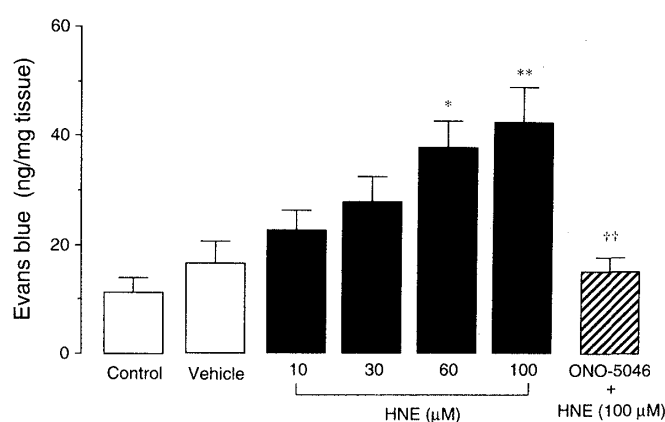


Fig. 2. Effect of human neutrophil elastase (HNE) on microvascular permeability of the guinea pig trachea. After tracheal instillation of various concentrations of HNE or the vehicle (saline) at 0.2ml, extravasation of Evans blue dye was assessed. Some animals were treated with intravenous ONO-5046 (30mg/kg), and then HNE (100 μ M) was given. Data are means $\pm$ SE; $n=7$ for each column. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, significantly different from the control values. $\dagger\dagger p<0.01$, significantly different from the response to 100 μ M HNE.

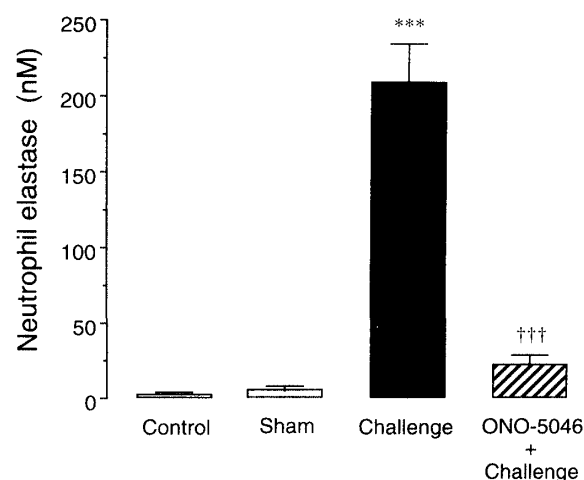


Fig. 3. Effect of ONO-5046 on allergen-induced increase in neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid. Guinea pigs received no treatment (Control), inhaled saline (Sham) or ovalbumin (Challenge). Some animals were treated with intravenous ONO-5046 (30mg/kg), and then challenged with ovalbumin. Data are means $\pm$ SE; $n=7$ for each column. *** $p<0.001$, significantly different from the control values. $\dagger\dagger\dagger p<0.001$, significantly different from the response to challenge alone.

は Evans blue 漏出量は 11.0 ± 2.4 から $43.5 \pm 6.8 \text{ ng/mg tissue}$ に増加した ($p<0.01$, $n=6$)。また、以上の効果は ONO-5046 (30mg/kg) の前投与によりほぼ完全に抑制された ($p<0.01$, $n=6$)。

気管支肺胞洗浄液の解析

Table 1 に、OA チャレンジを行ったモルモットの気管支肺胞洗浄液の細胞分画を示した。コントロール群に比較し、OA チャレンジ群では好酸球、好中球および脱落した気道上皮細胞の分画が増加し (いずれも

$p<0.001$, $n=7$)、リンパ球の増加も認められた ($p<0.05$, $n=7$)。また、リンパ球の増加以外の反応は ONO-5046 (30mg/kg) の投与により著明に抑制された (好中球: $p<0.05$, 好酸球および上皮細胞: $p<0.001$, いずれも $n=7$)。気管支肺胞洗浄液中の好中球エラスターゼ濃度は OA チャレンジにより増加したが ($31 \pm 2.0 \rightarrow 210.5 \pm 26.2 \text{ nM}$, $p<0.001$, $n=7$)、ONO-5046 (30 mg/kg) の前処置により著明に抑制された ($p<0.001$, $n=7$, Fig. 3)。

考 察

本研究では、モルモット気管粘膜における Evans blue の血管外漏出が抗原チャレンジにより増加し、気道血管透過性の亢進が示唆された。また、上記の反応は好中球エラスターゼ阻害薬である ONO-5046 の前処置により有意に抑制されたこと、さらに抗原チャレンジにより気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞のうち好酸球のみならず好中球の増加も観察されたことより、即時型アレルギー反応における気道粘膜血管透過性の亢進に好中球エラスターゼが関与している可能性が推察された。

従来より、好中球は急性肺傷害の病態発現に重要な役割を果たすことが知られており、肺循環血液中に存在する好中球が活性化されると好中球エラスターゼ、lysozomal enzyme, myeloperoxidase, 活性酸素などが放出され、肺微小循環のバリアの破壊が惹起される⁹⁾。とくに、好中球エラスターゼは好中球から分泌される分子量29kDa のプロテアーゼであり、好中球以外にも好塩基球、肥満細胞から産生される¹⁰⁾。近年、ARDS 患者の気管支肺胞洗浄液中の好中球エラスターゼ活性が著しく上昇していることから¹¹⁾、本酵素活性と ARDS あるいは多臓器不全との関連が指摘されている¹²⁾。また、かかる病態では、好中球に由来する HOCl やクロロミンなどの活性酸素により抗プロテアーゼ活性が低下し、肺内の好中球エラスターゼ活性が相対的に増加するというメカニズムも考えられている⁹⁾。さらに、最近、このような背景を踏まえ、急性肺傷害に対して好中球エラスターゼの選択的阻害薬を用いた検討が進められており、ヒツジの敗血症モデル¹⁷⁾、モルモットや家兎の肺傷害モデル¹⁴⁾¹⁵⁾に対する好中球エラスターゼ阻害薬の抑制効果が報告されている。本研究で用いた ONO-5046 は、従来の SC-37658 あるいは SC-39026 などの阻害薬に比してより特異的であり、かつ低分子量 (MW: 456) で静脈内投与が可能な薬剤である¹⁶⁾。今回の即時型アレルギーのモデルでは、抗原チャレンジによるモルモット気管粘膜における血管透過性の亢進を ONO-5046 が用量依存的に抑制したことから、好中球エラスターゼの役割が示唆された。これは、エンドトキシン誘起性肺傷害モデルにおいて、血管から肺胞腔内へのアルブミンの漏出が ONO-5046 により抑制されたという報告¹⁵⁾や、ONO-5046 が好中球エラスターゼにより惹起されるハムスター皮膚の血管透過性亢進作用を抑制したという報告¹⁶⁾に合致するも

のである。

また、本研究では好中球エラスターゼが実際に気道血管透過性を亢進させるか否かについても検討した。その結果、気管内に注入したヒト好中球エラスターゼは Evans blue の漏出を用量依存的に増加させ、以上の効果は ONO-5046 によりほぼ完全に抑制されたことより、ONO-5046 の好中球エラスターゼ阻害作用も確認された。一方、抗原チャレンジにおける ONO-5046 の抑制効果は部分的であり、外因性好中球エラスターゼに対する抑制に比較して弱く、これはアレルギー反応における血管透過性亢進に好中球エラスターゼ以外の要因があることを示す結果と考えられた。

今回の気管支肺胞洗浄液の検討で、OA チャレンジは好酸球のみならず好中球の集積も観察された。これは、血管透過性亢進における好中球の関与を支持する所見である。また、好中球エラスターゼ濃度も OA チャレンジにより増加し、ONO-5046 の前投与により著明に抑制された。しかし、ONO-5046 は好中球の浸潤自体も有意に抑制した。その理由は明らかではないが、他の好中球エラスターゼ阻害薬である L658758 が好中球の血管内皮への粘着と遊走を抑制したとする報告¹⁷⁾があり、ONO-5046 も同様の好中球遊走抑制効果を有する可能性が推測された。したがって、血管透過性亢進の抑制には、好中球エラスターゼ阻害の他、好中球浸潤の抑制も関わっている可能性は否定できない。一方、OA チャレンジで増加した気道上皮細胞の脱落や好酸球浸潤も、ONO-5046 の投与により抑制された。前者は本薬剤の有する抗エラスターゼ作用により好中球エラスターゼの組織傷害が抑制されたためと考えられるが、好中球浸潤自体の抑制に基づく組織傷害性活性酸素種の減少による可能性も推測される。しかし、好酸球浸潤の抑制の機序については不明であり、好酸球遊走因子と好中球エラスターゼの関連を含め今後の検討課題と思われる。

近年、喘息病態の発現に好中球エラスターゼが重要な役割を果たすことが明らかにされつつある。ヒトやイヌの摘出気管支組織で、好中球エラスターゼ阻害薬である ICI200355 が分泌抑制効果をもたらしたとする報告¹⁸⁾や、ヒツジの喘息モデルにおいて ONO-5046 が抗原誘発による気管支収縮を抑制したとする報告⁵⁾もある。今回の実験結果では、喘息における気道炎症の指標の1つであり、かつ気道収縮の増悪因子となりうる気道血管透過性の亢進にも、好中球エラスターゼが関与していることが明らかとなった。しかし、最近、

喘息患者の気道粘膜に好中球の浸潤が報告され本病態における好中球の役割が推測されているものの²⁾、今回の実験結果がヒト気管支の即時型反応に反映されるか否かは、さらに検討を要する点と思われる。

文 献

- 1) Seltzer, J., Bigby, B.G., Stulbarg, M., Holtzman, M.J., Nadel, J.A., et al.: O₃-induced change in bronchil reactivity to methacholine and airway inflammation in humans. *J. Appl. Physiol.* **60**, 1321-1326, 1986.
- 2) Lukacs, N.W., Strieter, R.M. and Kunkel, S.L.: Leukocyte infiltration in allergic airway inflammation. *Am. J. Respir. Cell Biol.* **13**, 1-6, 1995.
- 3) Boschetto, P., Mapp, C.E., Picotti, G. and Fab-bri, L.M.: Neutrophils and asthma. *Eur. Re-spir. J.* **6**, 456-459, 1989.
- 4) Sommerhoff, C.P., Nadel, J.A., Basbaum, C.B. and Caughey, G.H.: Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. *J. Clin. Invest.* **85**, 682-689, 1990.
- 5) Fujimoto, K., Kubo, K., Shinozaki, S., Okada, K., Matsuzawa, Y., et al.: Neutrophil elastase inhibitor reduces asthmatic responses in aller-gic sheep. *Respir. Physiol.* **100**, 91-100, 1995.
- 6) Bertrand, C., Geppetti, P. and Weiss, S.J.: Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* **320**, 365-376, 1989.
- 7) Yamawaki, I., Tamaoki, J., Takeda, Y., Chiyotani, A., Sakai, N., et al: Effect of T-kinin on microvascular permeability and its modulation by peptidases in rat airways. *J. Appl. Physiol.* **79**, 1129-1133, 1995.
- 8) Tabachnik, E., Schuster, A., Gold, W.M. and Nadel, J.A.: Role of neutrophil elastase in allergen-induced lysozyme secretion in the dog trachea. *J. Appl. Physiol.* **73**, 695-700, 1992.
- 9) Weiss, S.J.: Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* **320**, 365-376, 1989.
- 10) Hubbard, R.C. and Crystal, R.G.: Anti-protease. In "The Lung" (ed by, R.G. Crystal, and J.B. West), Raven Press, New York, pp.1775-1787, 1991.
- 11) Cochrane, C.G., Spragg, R. and Revak, S.D.: Pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome: Evidence of oxidant activity in bronchoalveolar lavage fluid. *J. Clin. Invest.* **71**, 754-761, 1983.
- 12) Redl, H., Paul, E., Goris, P.J.A., Pacher, R., Woloszczuk, W., et al.: Plasma levels of elas-tase 1 protease inhibitor complex in the monitoring of ARDS and multi-organ failure; A summary of three clinical trials. *Adv. Exp. Med. Biol.* **240**, 457-464, 1988.
- 13) Gossage, J.R., Kuratomi, Y., Davidson, J.M., Lefferts, P.L. and Snapper, J.R.: Neutrophil Elastase inhibitors, SC-37698 and SC-39026, reduce endotoxin-induced lung dysfunction in awake sheep. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**, 1371-1379, 1993.
- 14) Yoshimura, K., Nakagawa, S., Koyama, S., Kobayashi, T. and Homma, T.: Roles of neutrophil elastase and superoxide anion in leukotriene B₄-induced lung injury in rabbit. *J. Appl. Physiol.* **76**, 91-96, 1994.
- 15) Kubo, K., Kobayashi, T., Koizumi, T., Honda, T., Sekiguchi, M., et al.: Effect of ONO-5046, a specific neutrophil elastase inhibitor, on endotoxin- induced lung injury in sheep. *J. Appl. Physiol.* **77**, 1333-1341, 1994.
- 16) Kawabata, K., Suzuki, M., Sugitani, M., Imaki, K., Toda, S., et al.: ONO-5046, a novel in-hibitor of neutrophil elastase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 814-82, 1991.
- 17) Woodman, R.C., Reinhardt, P.H., Kanwar, S., Johnston, F.L. and Kubes, P: Effects of human neutrophil elastase (HNE) on neutrophil func-tion in *in vitro* and in inflamed microvessels. *Blood* **82**, 2188-2195, 1993.
- 18) Schuster, A., Ueki, I. and Nadel, J.A.: Neutro-phil elastase stimulates tracheal submucosal gland secretion that is inhibited by ICI 200355. *Am. J. Physiol.* **262**, L86-L91, 1990.

ROLE OF NEUTROPHIL ELASTASE IN ALLERGEN-INDUCED AIRWAY
MICROVASCULAR LEAKAGE IN SENSITIZED GUINEA PIGS

Yuko Takeda, Jun Tamaoki, Isao Yamawaki, Mitsuko Kondo and Atsushi Nagai
First Department of Medicine, Tokyo Women's Medical College

To determine the role of neutrophil elastase in allergen-induced airway microvascular leakage, we assessed vascular permeability of guinea pig trachea by measuring the extravasation of Evans blue dye in the circulating blood. Inhalation of ovalbumin (OA) to guinea pigs sensitized with OA caused Evans blue extravasation, indicating an increased microvascular permeability. Pretreatment with ONO-5046, a specific inhibitor of neutrophil elastase, inhibited OA-induced vascular leakage in a dose-dependent manner. Tracheal instillation of human neutrophil elastase likewise increased microvascular permeability, and this effect was almost completely abolished by ONO-5046. Challenge with OA increased the number of neutrophils and neutrophil elastase activity in the bronchoalveolar lavage fluid, and these effects were inhibited by ONO-5046. These results suggest that neutrophil accumulation into the airway and the subsequent release of neutrophil elastase may play a role in the airway microvascular leakage produced by antigen challenge.
