

〔速報〕

同種細胞親和性抗体の動員による Late Asthmatic Response の発現

金沢大学医学部第三内科

齊藤元泰 藤村政樹 三宅 靖
坂本さゆり 安井正英 松田 保

これまで遅発型喘息の動物実験モデルの報告は数多いが、それらはほとんどが能動感作モデルであり、一般に受動感作では遅発型気道反応は起こしえないと理解されている。また遅発型気道反応の発現のメカニズムは気道の過敏性、気道の炎症、種々のケミカルメディエーターとの関連で論じられることが多いが、遅発相における気道収縮の直接の引き金は明らかではない。今回我々は能動感作モデルにおいて本来抗体産生細胞により産生され、流血中に存在するはずの抗体を外来性に静脈内投与することにより、抗原吸入から4～8時間後に起こる気道収縮を観察した。この際気管支肺胞洗浄液においては正常血清を静脈内投与した群に比しマクロファージが有意に低下し、好中球が有意に増加していた。このことは本実験モデルにおける遅発型気道収縮には気道の炎症は必ずしも必要ではなくむしろ炎症は気道における抗原抗体反応の結果である可能性、また同種細胞親和性抗体の血中から気道局所への動員が遅発型の気道収縮の直接の引き金として重要な役割を果たしている可能性を示唆する。

Key words: guinea pig — homocytotropic antibody — late asthmatic response —
neutrophil — ovalalbumin

はじめに

近年気管支喘息の臨床において遅発型喘息の重要性が注目されている¹⁾が、その発現の正確なメカニズムは未だ明らかではない。また喘息の動物実験にはモルモットが用いられることが多いが、モルモットの実験モデルにおいて一般的には受動感作では遅発型気道収縮は起こし得ないと考えられている。我々は遅発型気道収縮の直接の引き金として同種細胞親和性抗体の血中から気道局所への動員を仮定し、モルモットの受動感作モデルを用いて遅発型喘息の実験を進めてきたが今回新たな知見を得たので報告する。

材料および方法

1) 実験動物

ハートレー系雄モルモット(三共ラボ)体重350～450gを購入し、金沢大学動物実験施設内の空調飼育室(室

温 23 ± 2 ℃、湿度 55 ± 5 %)で1週間以上飼育し肉眼的観察により異常のないものを用いた。

2) 抗原および抗血清

抗原として卵白アルブミン(Sigma Chemical, St. Luis, MO)を用いた。抗血清作成に際し、モルモット1匹当たり卵白アルブミン0.5mgを生理食塩水0.625mlに溶解し、更に0.625mlのFreund's complete adjuvant(Difco Laboratories, Detroit, MI)とemulsionの状態にしたものを5カ所に分け皮内注射した。2週間後に同様の処置によりboosterをかけ、更に2週間後にnembutal sodium solution(Abbott Laboratories, North Chicago, IL)75mg/kgの腹腔内投与にて麻酔後、内頸動脈より採血した。この抗血清の4時間および7日間PCA titerは各々12800倍と512倍であった。なお無感作モルモットより同様の方法で得た正常血清をコントロールとして用いた。

3) 実験装置および測定項目

既報²⁾の実験装置および方法を用いて行った。すなわちnembutal sodium solution 75mg/kgを腹腔内投与して麻酔を行った後、胸骨上縁より1横指頭側で気管切開を行い、気管カニューレを装着し、小動物用従量式レスピレーター(Model 1680, Harvard Apparatus Co. Inc., South Natick, MA)にて強制換気を行っ

Received: July 19, 1990

Accepted: November 26, 1990

Abbreviations: BAL bronchoalveolar lavage;
BALF bronchoalveolar lavage fluid

た。1回換気量は10ml/kg, 換気回数は毎分60回とした。気管収縮反応の指標として気管カニューレの側圧(Pao; pressure at the airway opening)を測定した(日本光電社製 Model TP-603T)。気道反応は抗原吸入直前の Pao 値を基準値とし、この基準値に対する増加率として表した。抗原の吸入投与は南ら³⁾が開発した小動物用吸入負荷装置を用いた。

4) 実験手順

ネブタールを体重1kg 当たり75mg 腹腔内注射することにより麻酔した後気管切開し、気管カニューレを装着し前述の条件にて換気を行った。また内頸静脈ラインを確保しここより正常モルモット血清または、抗卵白アルブミン血清を体重1kg 当たり3ml 静脈内投与し15分後に生理食塩水に溶解した1%w/vol 卵白アルブミンを30秒間吸入させ、以後8時間にわたって Pao を測定した。8時間後に生理食塩水10ml にて2回気管支肺胞洗浄(以下 BAL)を行い、得られた気管支肺胞洗浄液(以下 BALF)中の細胞成分を検討した。モルモットは血清投与の方法により、正常血清を投与された7匹のコントロール群と、抗血清を投与された7匹の静注群の2群に分けられた。

5) BALF 中の細胞成分の検討

BALF 中の細胞成分は BALF を1500回転で10分間遠心したあと RPMI 液に浮遊し総細胞数を算定し、cytospin にて処理した後ギムザ染色を行って細胞分画の算定を行った。得られた結果についてコントロール群と抗血清静注群との比較は、ノンパラメトリック法(Mann-Whitney の U-test)を用いて行い、両側検定で $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結 果

Fig. 1 に抗原吸入後1時間ごとの Pao の推移および%Pao の最高値を示す。コントロール群および抗血清静注群の両者とも時間の経過とともに Pao の上昇傾向を認めるが、抗血清静注群では1時間後よりすでにコントロール群に比し上昇傾向を認め、3時間以降より推計学的に有意の差を認めた。その危険率は3時間から5時間の間が0.02、ピーク値を含め6時間から8時間後までが0.01であった。8時間後の Pao の増加率はコントロール群で $58 \pm 5\%$ 、抗血清静注群で $123 \pm 13\%$ であった。また Pao の推移では7例中5例に可逆性の気道収縮を表す明瞭なピークの形成をみたが、そ

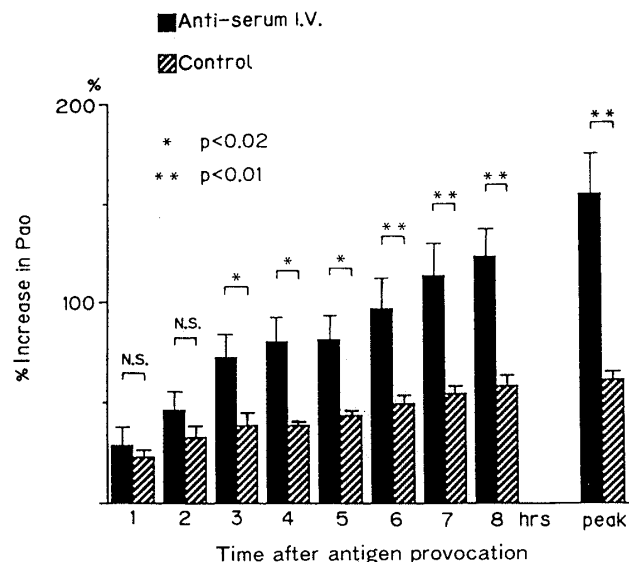


Fig. 1. Time course and peak value of Pao of the anti-serum I.V. (n=7) and control group (n=7). Each bars represent the mean $\pm$ S.E.

の出現時間は抗原吸入後およそ4時間から8時間の間であった。次に BAL 液中の細胞成分についてであるが、Fig. 2 にしめすように推計学的に有意差をもって抗血清静注群においてマクロファージの低下と好中球の増加を認めた。すなわちマクロファージに関してはコントロール群 $70.7 \pm 4.5\%$ に対して抗血清静注群 $46.5 \pm 10.1\%$ であり危険率は0.02、好中球に関してはコントロール群の $8.8 \pm 1.8\%$ に対して抗血清静注群では $35.4 \pm 10.8\%$ であり危険率は0.05であった。リンパ球、好酸球については有意差は認めなかった。

考 察

遅発型喘息を最初に報告したのは Blackley で1873年のことであるとされる¹⁾が、これをまとめて研究したのは Herxheimer⁴⁾が最初である。その後遅発型の気道収縮が臨床的に重要な意味があることに気付かれ多くの研究がなされているが、その多くの研究は遅発型の気道反応と気道の炎症で表される気道の過敏性との間の関連を追及するものであった⁵⁾⁻⁷⁾。すなわち IgE を介する抗原抗体反応による即時型の気道収縮の際に肥満細胞から放出される種々の化学伝達物質により血管透過性の亢進、種々の炎症細胞の浸潤、局所の浮腫がおこり、また浸潤してきた炎症細胞から2次的に放出される化学伝達物質によって更にこの過程が促進さ

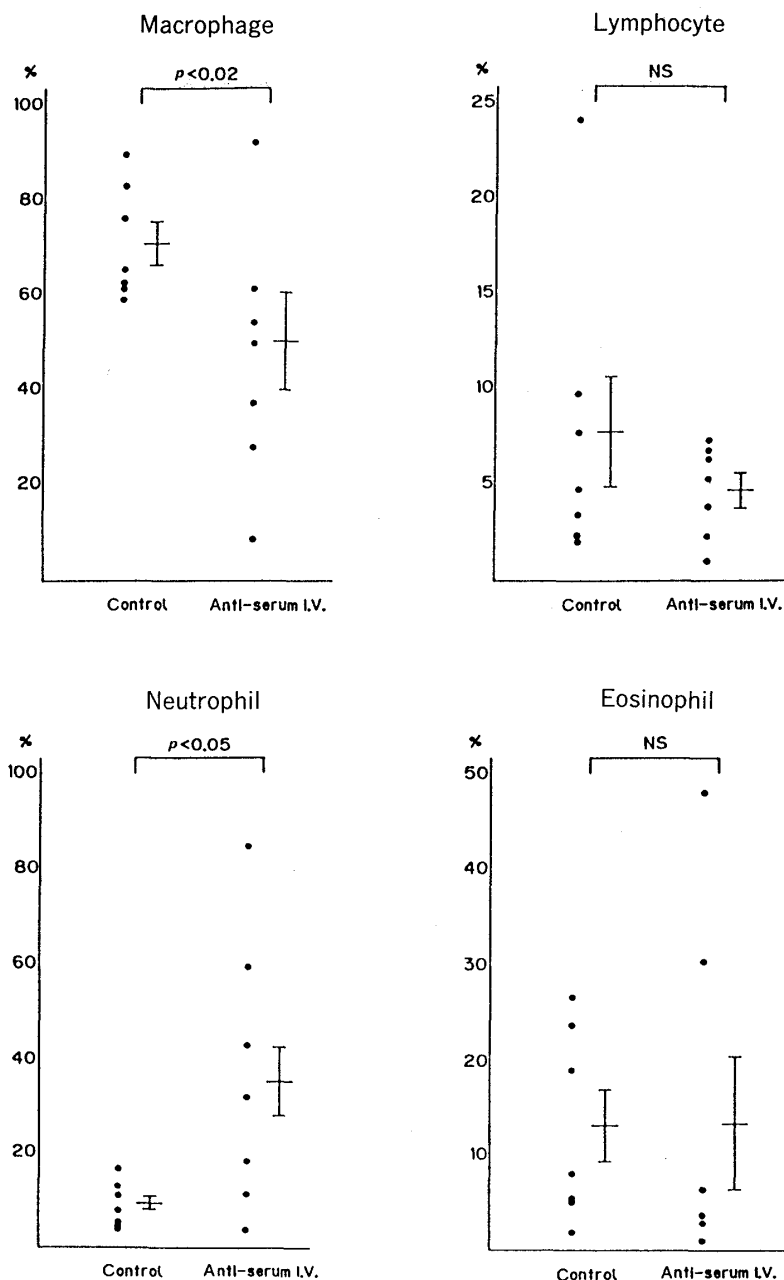


Fig. 2. Cell differentiation in BALF obtained from the anti-serum I.V. ($n=7$) and control group ($n=7$). Each bars represent mean $\pm$ S.E. ($n=7$).

れ遅発型の気道収縮に至るとする考えである⁸⁾。

気道の過敏性と遅発型気道反応との間の関連については例えば Cartier⁹⁾らは抗原吸入後の遅発型気道反応はヒスタミンに対する気道の反応性の大きさと反応性亢進の持続時間に関係があると述べている。気道過敏性の臨床的重要性に関しては Platts-Millis ら¹⁰⁾は house dust mite に対して感受性のある通年性喘息患者を抗原から遠避けることにより症状の改善と過敏性の低下を観察しており、また Cockcroft ら¹¹⁾はヒスタミンに対する気道過敏性の程度と喘息発作の頻度及び

強さとの間に相関があると述べている。さらに Juniper ら¹²⁾は気道の反応性と喘息の症状および治療の必要性との間に相関を認めている。このように遅発型喘息と気道の過敏性およびその臨床的重要性に関する報告は数多いが、遅発型の気道収縮の直接の引き金は未だ明らかではない。

遅発型喘息および気道過敏性に関する動物実験モデルも数多いが一般的には能動感作モデルとは異なり受動感作モデルにおいては遅発型気道反応は出現しないと考えられている。受動感作と能動感作の違いは大き

く分けて細胞性免疫の関与の有無及び抗体産生細胞の有無にあるように思われる。我々は抗体産生細胞の有無に着目し受動感作で遅発型の気道反応が出現しない理由は即時型の反応で消費された気道局所の同種細胞親和性抗体が血中から補われない為で、遅発相において気道収縮の直接の引き金になるのはこの血中から気道局所へ動員される同種細胞親和性抗体であろうと考えた。今回の実験で抗原吸入直前に経静脈的に抗血清を投与する目的は本来抗体産生細胞が持続的に血中に分泌しているはずの抗体を外来性に補ってやることにある。そしてこの操作により抗原吸入負荷数時間後に明瞭なピークを形成する可逆性の気道収縮を観察したことは、本実験モデルにおいて我々の仮説が正しかったことを意味している。

従来、遅発型気道反応と気道の炎症との間に密接な関係があることは組織学的にあるいはBALF中の細胞成分によって示されてきた¹³⁾⁻¹⁵⁾。この時に観察される炎症細胞は好中球と好酸球が主であるが、報告によりこれらの細胞の出現が時間経過あるいは割合は様々である¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。この差は用いた動物の種差あるいは抗原の種類によるのかもしれない。我々はBALF中の細胞成分について検討し、抗血清静注群で8時間後に好中球が有意に増加していることを認めたが、この結果はIshiiら¹⁷⁾が*Ascaris suum*を抗原として能動感作したモルモットを用いて行った実験の結果に一致する。しかし我々の用いたモルモットでは特別な前処置は行っていないので実験開始前から気道に炎症が存在していたとは考えられない。すなわち今回の実験結果は遅発型気道反応出現の準備状態として気道の炎症は必ずしも必要としないことを示唆する。

以上我々は喘息の動物モデルにおける能動感作と受動感作の間の違い、遅発型気道反応と気道の炎症との関係について我々の実験結果をもとに若干の考察を行った。今後はこのモデルを用いて遅発相における過敏性の亢進の有無や、遅発型気道反応に関与する免疫グロブリンのサブタイプ等についての検討を続けたいと考える。

まとめ

1. 受動感作モルモットを用い、抗原吸入直前に抗血清を静脈内投与することにより4～8時間後に起こる一過性の気道収縮を観察した。

2. この時気管支肺胞洗浄液中には好中球の有意な増加を認めた。

3. 遅発型の気道収縮には気道の炎症は必ずしも必要ではなく、同種細胞親和性抗体の血中から気道局所への動員が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

文 献

- 1) O'Byrne, P.M., Dolovich, J., Hargreave, F.E.: State of art, Late asthmatic response. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136, 740-751, 1987.
- 2) 藤村政樹: in vivo モルモットにおける slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) による気道反応とステロイドの抑制作用. *アレルギー* 32, 365-375, 1983.
- 3) 南 真治, 岡藤和博, 佐賀 努, 藤村政樹, 金森一紀, 他: モルモットにおける定量的吸入負荷装置の開発. *日胸疾会誌* 21, 252-258, 1983.
- 4) Herxheimer, H.: The late bronchial reaction in induced asthma. *Int. Arch. Allergy* 3, 323-328, 1952.
- 5) Cockcroft, D.W., Ruffin, R.E., Dolovich, J., Hargreave, F.E.: Allergen-induced increase in non-allergic bronchial reactivity. *Clin. Allergy* 7, 503-513, 1977.
- 6) Marsh, W.R., Irvin, C.G., Murphy, K.R., Behrens, B.L. and Larsen, G.L.: Increase in airway reactivity to histamine and inflammatory cells in bronchoalveolar lavage after the late asthmatic response in an animal model. *Am. Rev. Respir. Dis.* 13, 875-879, 1985.
- 7) Abraham, W.M.: The importance of lipoxigenase products of arachidonic acid in allergen-induced late response. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135, S49-S53, 1987.
- 8) De Monchy, J.G.R., Kauffman, H.K., Venge, P., Koeter, G.H., Jansen, H.M., Sluiter, H.J. and De Vries, K.: Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131, 373-376, 1985.
- 9) Cartier, A., Thomson, N.C., Frith, P.A., Roberts, B.S.R., Tech, M. and 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.
- 10) Platts-Millis, T.A., et al.: Reduction of bronchial hyperreactivity during prolonged allergen avoidance. *Lancet* 2, 675-678, 1982.

- 11) Cockcroft, D.W., et al.: Bronchial reactivity to inhaled histamine. *Clin. Allergy* 7, 235, 1977.
- 12) Juniper, E.F., Firth, P.A., Hargreave, F.E.: Airway responsiveness to histamine and methacholine; relationship to minimum treatment to control symptoms of asthma. *Thorax* 36, 575-579, 1981.
- 13) Durham, S.R.: Leukocyte activation in allergen induced late-phase asthmatic reactions. *N. Engl. J. Med.* 311, 1398-1401, 1984.
- 14) Delehunt, J.C.: The role of slow-reacting substance of anaphylaxis in the late bronchial response after antigen challenge in allergic sheep. *Am. Rev. Respir. Dis.* 130, 748-754, 1984.
- 15) De Monchy, J.G.R., Kauffman, H.F., Venge, P., Koeter, G.H., Jansen, H.M., Sluiter, H.J. and DeVries, K.: Bronchoalveolar eosinophilia during allergen induced late asthmatic reaction. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131, 373-376, 1985.
- 16) Dunn, C.J., Elliott, G.A., Ostveen, J.A. and Richards, I.M.: Development of a prolonged eosinophil-rich inflammatory leukocyte infiltration in the guinea-pig asthmatic response to ovalalbumin inhalation. *Am Rev. Respir. Dis.* 137, 541-547, 1988.
- 17) Ishii, M., Iijima, H., Yamaguchi, K., Chao, C.-L., Shimura, S., et al.: Bronchoalveolar lavage and histological characterization of late phase pulmonary response in guinea pig (abstract). *Am. Rev. Respir. Dis.* 131(Suppl), A7, 1985.

LATE ASTHMATIC RESPONSE BY RECRUITMENT OF HOMOCYTOTROPIC ANTIBODY FROM CIRCULATING BLOOD TO THE AIRWAY WALL IN GUINEA PIG

Motoyasu Saito, Masaki Fujimura, Yasushi Miyake, Sayuri Sakamoto, Masahide Yasui,
Kazuki Kurashima and Tamotsu Mastuda

The Third Department of Internal Medicine, Kanazawa University, School of Medicine

Many reports have been published about the late asthmatic response (LAR) of animal model. But most of the animals used were sensitized actively and it is considered generally that it is impossible to generate LAR in passively sensitized animals, especially in guinea pig. About the mechanism of LAR, most discussion are focused on airway hyperreactivity, inflammation and chemical mediators. But little is known about the direct initiator of the late phase bronchoconstriction. Instead of the circulating antibody which is generated by antibody producing cells in actively sensitized animals, anti-serum was administered to guinea pigs intravenously as passive sensitization fifteen minutes prior to antigen inhalation. Four to eight hours after antigen inhalation, we investigated bronchoconstriction. Eight hours after antigen challenge, bronchoalveolar lavage (BAL) were performed. In the BAL fluid, macrophages decreased and neutrophils increased significantly. These results suggest that LAR can occur without airway inflammation and the inflammation might be the result of antigen-antibody reaction at the airway wall, and that the direct initiator of late phase bronchoconstriction might be the recruitment of homocytotropic antibody from circulating blood to the airway wall.