

モルモット喘息モデルにおける低分子ヘパリンの 抗原暴露後気道収縮反応に対する抑制作用

神戸大学医学部第一内科

前田 均 八幡知之 里内美弥子

竹中和弘 横山光宏

卵白アルブミン感作モルモットに対する抗原暴露による気道収縮反応に及ぼす低分子ヘパリン (LMWH) の効果について検討した。ハートレー系モルモットを用い、卵白アルブミン感作による二相性喘息モデルを作成し、呼吸抵抗を経時的に測定し気道反応性を検討した。また BALF, 組織学的検討を加えた。LMWH 吸入により、抗原暴露後の呼吸抵抗は、生食吸入に比べ、即時型気道反応においては、8 分を除く 1 分から 9 分、また遅発型気道反応においては 4 時間目および 7 時間目以降 24 時間目まで有意な抑制を認めた。また即時型気道反応において、最大収縮に至る時間も 5.3 ± 4.6 分から 9.6 ± 4.3 分へと有意な延長をきたした。LMWH 吸入は、BALF では生食吸入に比べ好酸球の減少 ($8.2 \pm 0.4\% \rightarrow 5.5 \pm 1.2\%$, $p < 0.01$), また組織学的検討でも好酸球数の浸潤の減少 ($155 \pm 15.8 \rightarrow 71.0 \pm 7.3$, $p < 0.01$) を認めた。

以上より、LMWH は抗原暴露後気道収縮反応および好酸球の浸潤を抑制し、気管支喘息に対する防御因子として重要であると考えられた。

Key words: guinea pig — low molecular weight heparin — ovalbumin — sensitization

はじめに

気管支喘息は気道炎症に基づく病態であり、好酸球、好塩基球、肥満細胞、リンパ球などがその主体をなす。特に好酸球は組織障害を引き起こす重要な細胞であり、気管支喘息患者において気道上皮障害を引き起こし、気道過敏性の亢進に強く関与している¹⁾²⁾。この好酸球の組織障害には、好酸球の顆粒蛋白である、major basic protein (MBP) や eosinophil cationic protein (ECP) などのカチオンの性質を有するアミノ酸を多く含む物質が強く関与していることが明らかになってきており、カチオンによる組織障害もその要因として考えられている³⁾。

一方、ヘパリンは気管支喘息の中心的細胞である肥

満細胞に多く含まれるプロテオグリカンであり、ポリアニオンの性質を有し炎症の際に放出されるカチオンを中和する⁴⁾。また従来よりヘパリンには抗アレルギー、抗炎症作用が報告されているが⁵⁾⁶⁾、近年ヘパリンの気管支喘息における好酸球顆粒蛋白に対する組織障害の抑制⁷⁾、あるいは肥満細胞^{8)~10)}やリンパ球¹¹⁾¹²⁾、およびコリン作働性神経¹³⁾¹⁴⁾に対する防御的因子としての報告があり、気管支喘息における制御因子の一つとして見直されてきている。現在まで、気道反応性の亢進に対するヘパリンの抑制作用についての in vivo での研究は、病態生理がよく研究されているモルモットにおいては報告されていない。従って、我々は卵白アルブミン吸入感作によるモルモット二相性気道反応モデルを用い、低分子ヘパリン (low molecular weight heparin; LMWH) の即時型気道反応ならびに遅発型気道反応に及ぼす効果について検討した。

対象と方法

1. 感作方法

体重 250~350g の Hartley 系モルモット (日本エス

Received: May 10, 1995

Accepted: October 17, 1995

Abbreviations: BALF bronchoalveolar lavage fluid; BM basement membrane; ECP eosinophil cationic protein; IAR immediate asthmatic response; LAR late asthmatic response; LMWH low molecular weight heparin; MBP major basic protein; OA ovalbumin; Rrs resistance of respiratory system

エルシー) 15匹を対象に用いた。吸入感作は4匹のモルモットに対して均一に抗原暴露が可能であるアクリル製抗原吸入装置を用い、寺師らの方法¹⁵⁾に従い1% (10mg/ml) OA (Sigma Grade III) を1日1回10分間、超音波ネブライザー (オムロン社製, NE-U12) で連続10日間の抗原吸入暴露を繰り返し、吸入開始後、9~10日目に全てのモルモットに即時型喘息症状を認め、また呼吸抵抗がBaselineの2倍以上に増加したことから感作が成立したものと判断した。

2. 抗原吸入暴露と呼吸抵抗の測定

感作終了7日後より7日毎に、計2回の1%OA吸入を5分間行い、喘息発作を誘発し、2回の追加感作終了後、1週間あけて実験を開始した (Fig. 1)。OA吸入に先立ち、1時間前に生理的食塩水あるいはLMWH (sodium salt from bovine intestinal mucosa, Sigma) を生理的食塩水で希釈し、10mg/mlの濃度調

整を行い、吸入前後で呼吸抵抗の測定を行った。呼吸抵抗はMeadらのオシレーション法を一部改変して測定した¹⁶⁾。すなわち、呼吸抵抗の変化を経時的に観察するために、モルモットの頭部を突出させて固定するため、頸部をドーナツ状のゴム製の輪で固定し、頸部以下を密閉した animal chamber (プラスチック製、円筒部位の内径10cm、長さ20cm、壁の厚さ0.5cm) に入れた。30Hzの sine wave (Kenwood AG-20にTechnics SU-8044 power amplifierを通してFOSTEX, FE127 woofer speakerに接続して sine waveを発生) 圧力波を、animal chamberの後部より加えた。

モルモットの呼吸流量は、円錐形のプラスチックマスク (円錐の先端に8mm径の穴をあけ、200meshの網製スクリーンを設置) を作成し、呼吸流量コントロールボックス (RY 111S, 日本光電) および差圧トランスデューサー (TR-602T, 日本光電) を用い、多用途増

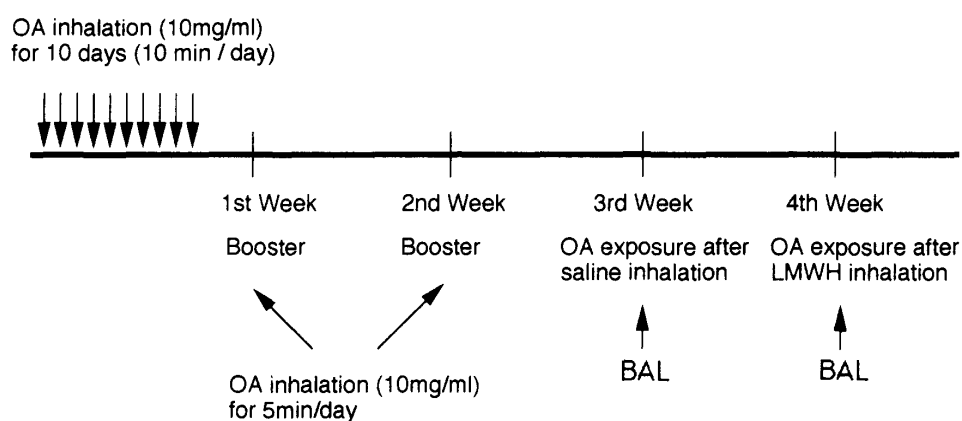


Fig. 1. Experimental protocol for sensitization of ovalbumin (OA) to guinea pigs. LMWH; Low molecular weight heparin.

Schedule for Rrs measurements

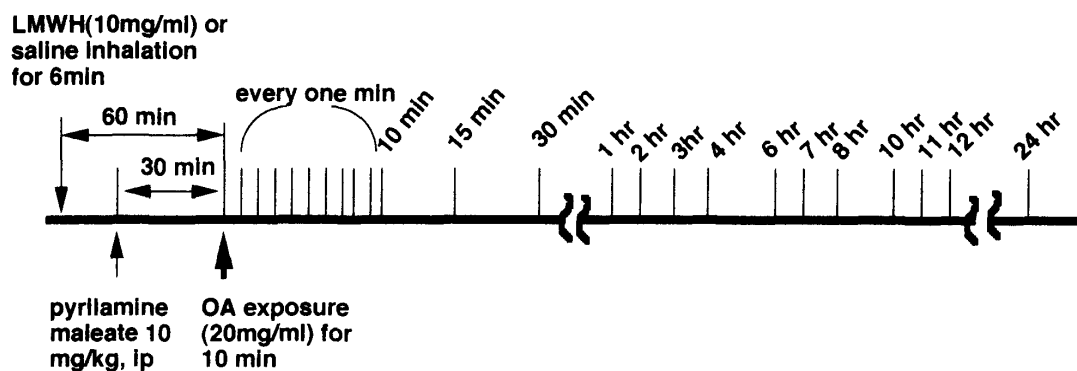


Fig. 2. Experimental protocol for the effect of LMWH inhalation on Rrs after OA exposure to OA-sensitized guinea pigs. Rrs=Resistance of respiratory system. LMWH=Low molecular weight heparin.

幅器 (RMP-6008, 日本光電) から駆動圧波形と同一の 30Hz の成分の振幅のみを取り出し, ブラウン管モニター (VC-640G, 日本光電) に描き出し, Polygraph (RGB-4128, 日本光電) に記録し, Chamber 内圧と呼吸流量より呼吸抵抗を測定した。

呼吸抵抗測定の時間経過を Fig. 2 に示す。抗原暴露 30 分前に致死的气道狭窄を防ぐため, histamine H1 receptor antagonist である pyrilamine maleate (Sigma) を 10mg/kg を腹腔内投与した。初期呼吸抵抗を測定した後, 超音波ネブライザーで 2%OA (20mg/ml) を 5 分間吸入暴露し, 呼吸抵抗を 10 分までは 1 分毎に, その後 30 分間では 10 分毎に測定し, 以後 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12 および 24 時間まで測定した。IAR は暴露前の呼吸抵抗を基準とし, その 2 倍以上の上昇を, LAR は白築らの報告¹⁷⁾と同様に, コントロール動物では LAR において 30% 以上の呼吸抵抗の上昇が求められなかったので, Baseline より 30% 以上の再上昇をもって陽性と判定した。

LMWH 吸入による呼吸抵抗の反応性の変化は, 先のプロトコル終了 7 日後において, 抗原暴露 60 分前に, 生理的食塩水の代わりに LMWH 10mg/ml を 6 分間吸入させ, pyrilamine maleate (Sigma) の腹腔内投与後, 抗原暴露, 呼吸抵抗の測定を同一の時間経過で行った。なお, 吸入順序については, ヘパリン吸入による全身的效果が人では, 約 2 週間残存するとの Janssen らの報告¹⁸⁾があり, LMWH 吸入による検討を生理的食塩水吸入の後に行った。

3. モルモット気管支洗浄液 (BAL) および組織学的検討

BAL は LAR の計測終了後, モルモットの頭部の dislocation を行った後, 頸部気管を暴露し, テフロン針をカニューレションした後, 気管上部とカニューレションされた一側気管支を結紮し, 各 5ml の生理的食塩水で 5 回洗浄し気管支洗浄液を回収した。回収標本は 1500 回転 10 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。塗抹標本を作成し, May-Grundwald-Giemsa 染色を施した後, 細胞分画の算出を 1 検体につき 500 個以上の細胞をもって行った。

組織学的検討は, BAL 施行後の標本を用い, en block としてモルモットより取り出し, 25cmH₂O の圧力で緩衝ホルマリン固定後, パラフィン包埋した後, 6μm の切片を作成し, HE 染色後観察に用いた。

組織好酸球数は上皮から外膜までを測定し, 基底

膜長はプランメーター (X-Plan 360C, 牛方商会, 東京) で測定し, 基底膜の長さに対する好酸球数の比で補正した。

4. 統計

データは全て mean ± SEM で表現した。有意差検定は unpaired t test および paired t test で行い, $p < 0.05$ をもって有意とした。

結 果

今回の実験系においては全例に IAR の出現が観察されたが, LAR は 15 匹中 10 匹に認められた。Fig. 3 に示すように, LMWH 吸入前処置では生理的食塩水吸入前処置に比べて Baseline Rrs には有意差がなかった。Fig. 4 に抗原暴露後の LMWH の吸入前処置による IAR (Fig. 4 の挿入図) および LAR の時間経過に伴う変化を示すが, いずれの時相においても呼吸抵抗の上昇は LMWH の前処置により抑制作用を示した。Fig. 4 の挿入図で LMWH の吸入前処置後の IAR の変化の詳細を示しているが, 1 分後から 7 分後および 9 分後のいずれの時点においては気道収縮反応の有意な抑制が認められた。また, LAR においては 4 時間目以降 24 時間に及ぶまで, 6 時間目を除いて気道反応の

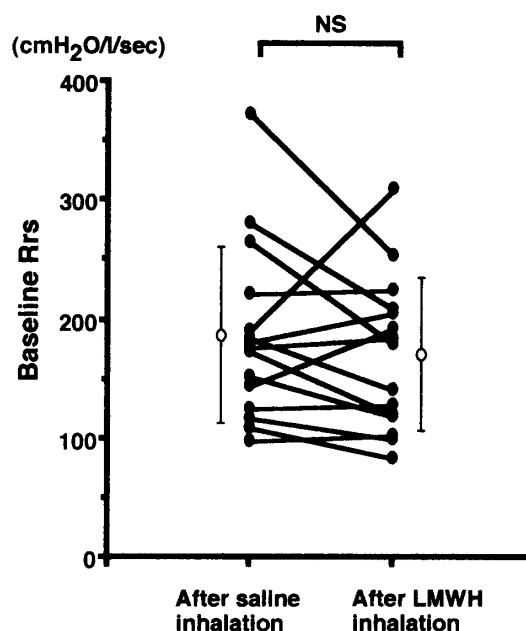


Fig. 3. Effects of LMWH on the baseline Rrs in OA-sensitized guinea pigs. LMWH=Low molecular weight heparin. Rrs=Resistance of respiratory system.

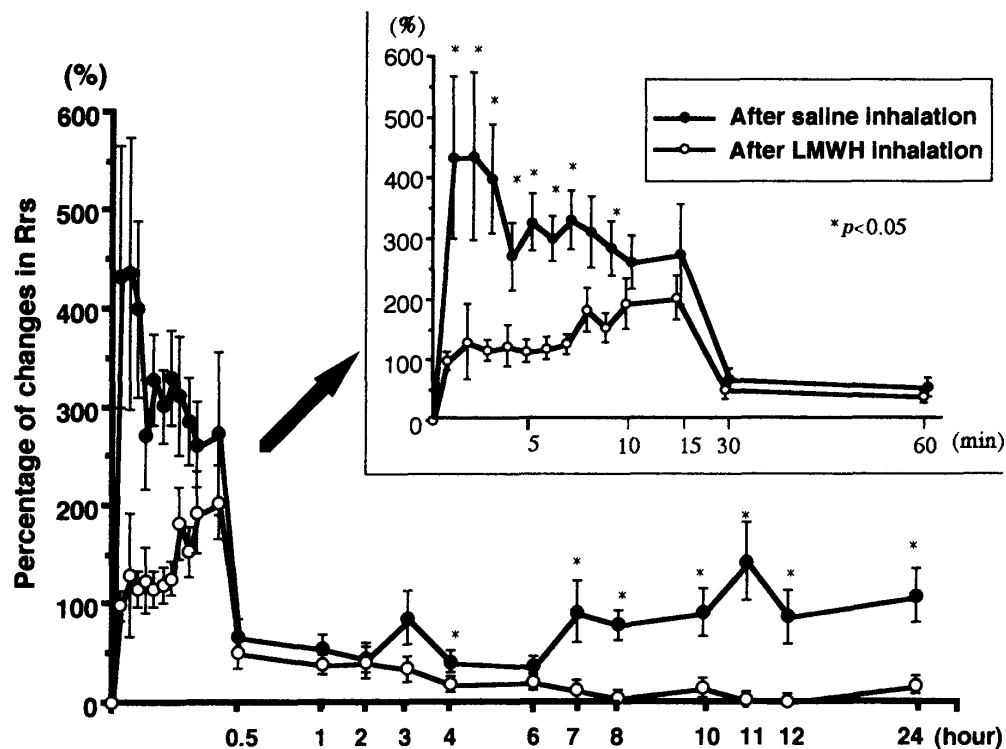


Fig. 4. Serial changes of Rrs after antigen exposure to OA-sensitized guinea pigs treated with LMWH (○) and with saline (●). Inserted figure shows percentage changes in Rrs up to 60 minutes after antigen exposure. LMWH=Low molecular weight heparin. Rrs=Resistance of respiratory system.

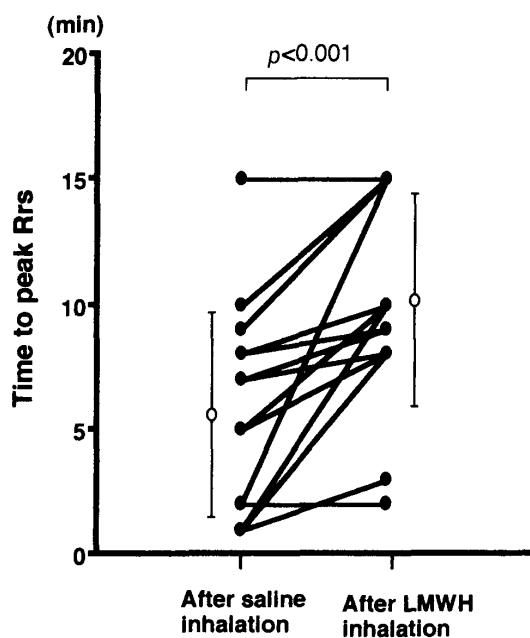


Fig. 5. Effects of LMWH inhalation on the time from antigen exposure to reach peak Rrs in OA-sensitized guinea pigs. LMWH=Low molecular weight heparin. Rrs=Resistance of respiratory system.

有意な抑制が認められた。

IARにおいては、最大収縮に至る時間が生理的食塩水吸入時の 5.3 ± 4.6 分からLMWH吸入後には 9.6 ± 4.3 分へと有意な遅延を示しており (Fig. 5), LMWHの吸入はIAR, LARのいずれの時期においても気道反応性および収縮反応に至るまでの時間を抑制することが示された。

BALFでは、LMWHの吸入前処置は、生理的食塩水吸入時の $8.2 \pm 0.4\%$ から $5.5 \pm 1.2\%$ へと、有意な好酸球数の割合の減少が認められた ($p < 0.01$)。また、組織学的検討では、感作動物の杯細胞は増加していたが、単位基底膜長に対する組織好酸球数は、 155 ± 15.8 から 71.0 ± 7.3 と、 $p < 0.01$ の有意差をもって著減していた (Table 1)。生理的食塩水吸入とLMWHの吸入による上皮細胞の杯細胞の割合には変化がなく、単回のLMWHの吸入のみでは感作動物の上皮の杯細胞化への抑制には効果がなかった。

Table 1 Changes of eosinophil counts in bronchoalveolar lavage fluid and in histological analysis

Treatment	N	Percentage of eosinophils in total BALF cells(%)	Infiltrated eosinophils in airway tissues (/mm BM)
Control	4	2.8±1.5	17.7±1.8
Saline	6	8.2±0.4†	155±15.8†
LMWH	6	5.5±1.2*	*71.0±7.31*

The data represent mean±SE. LMWH: Low molecular weight heparin. BM: Basement membrane.

* $p<0.01$ when compared with saline.

† $p<0.01$ when compared with control.

考 察

我々は今回の研究で、卵白アルブミン感作によるモルモット二相性気道反応モデルにおいて、プロテオグリカンであり、かつ陰性荷電物質であるヘパリンの前吸入が、即時型気道反応および遅発型気道反応のいずれをも抑制することを認め、さらに気道洗浄液内および気道組織内好酸球数の減少を認めた。

気管支喘息における気道収縮反応には、気道壁に存在する肥満細胞から遊離される炎症性ケミカルメディエーターやヒスタミンの作用、気道炎症、迷走神経反射の亢進、気道平滑筋の受容体の変化など、多くの要因から成り立っている。特に即時型気道反応には、肥満細胞からのケミカルメディエーターやヒスタミンが強く関係しているが、肥満細胞にはヘパリンやコンドロイチン硫酸などの陰性荷電を有するプロテオグリカンが含まれており、細胞内に存在するときこれらのケミカルメディエーターの活性化を抑制している¹⁹⁾。また、細胞外にも、細胞外マトリックスとして多くのプロテオグリカンが存在している。プロテオグリカンの気管支喘息における作用については未だ十分とはいえないが、ヘパリンは陽性荷電を示す抗原の中和作用⁵⁾を示したり、アナフィラキシー反応で遊離されたヒスタミンを中和したり⁶⁾、また肥満細胞の IP₃ receptor の拮抗作用⁹⁾やヒスタミンの遊離抑制¹⁰⁾を有することが認められ、人の気管支喘息においてもヘパリンの吸入により即時型気道時反応²⁰⁾や運動誘発喘息²¹⁾の抑制作用をもつ事が報告されている。近年、モルモットでの卵白アルブミン腹腔内感作モデルにおいて、M₂ムスカリン受容体の機能障害が起こり、気道過敏性亢進に関与していることが明らかになった¹³⁾が、ヘパリンにはウイルス感染によっても生じる M₂ムスカリン

受容体の機能障害の抑制あるいは改善する作用も認められる¹⁴⁾。今回の我々の研究で、LMWH の吸入前処置では即時型気道反応の時期の気道反応性亢進を明らかに抑制し、また最大気道収縮反応に要する時間の延長を認めた。ヘパリンの作用のなかでどのメカニズムが直接に関与しているのか明らかではないが、LMWH 吸入前処置では生理的食塩水吸入前処置に比べて Baseline Rrs には有意差がなく、LMWH の気道収縮反応に対する抑制効果は LMWH に特異的な反応であると考えられた。

また、遅発型気道反応の生じる時期においてもヘパリンの気道反応性亢進の抑制効果が確認された。モルモット15匹中10匹に遅発型気道反応が認められ、ヘパリン吸入により、3匹のモルモットにおいては完全な遅発型気道反応の抑制が、また7匹においても部分的な有意の抑制が観察された。遅発型気道反応には好酸球やリンパ球が関与し、アレルギー性炎症を生じると考えられているが²⁾、今回の感作モデルにおいてヘパリン吸入により好酸球の気道洗浄液中および組織内浸潤の抑制が観察された。ヘパリンは T lymphocyte heparanase 活性を抑制したり¹¹⁾、Virgin T cell から Memory T cell への分化の抑制、局所への遊走の抑制¹²⁾などリンパ球に作用する以外に、好酸球に対する抑制作用⁷⁾を示すことが明らかになっており、遅発型喘息反応の時期においてもヘパリンが関与している可能性が示唆されたが、今後の検討を要する。

しかし、ヘパリン吸入前処置では、炎症細胞浸潤の抑制は認めたが正常までの復帰には至っていなかった。好酸球はアレルギー性炎症に対して好酸球顆粒蛋白により組織障害を引き起こす³⁾が、特に好酸球顆粒蛋白のうち、major basic protein (MBP) は上皮細胞の剥離を引き起こし、気道過敏性の亢進の主体をなしている²⁾。同じ好酸球顆粒蛋白である eosinophil cationic protein (ECP) が脂質二重膜に孔を形成し膜の透過性亢進を引き起こすことにより標的細胞への障害を与えること²²⁾が知られているのに対して、MBP も強い陽性荷電を有する事が知られているものの、MBP の組織障害のメカニズムについては、細胞膜リン脂質に対する障害²³⁾が明らかにされてきたが、未だに十分解明されてはいない。ヒト MBP の cDNA 解析から²⁴⁾、MBP は pro MBP として合成されることが解かっているが、MBP が等電点10.9と塩基性領域を N 末端に持っているのに反し、この proMBP は等電点3.9の pro 領域を有することにより、MBP の強塩基性

文 献

が中和されているために組織障害を起こさず、また pro 領域と同じような酸性アミノ酸により MBP の作用が弱められることも白血病細胞株を用いた組織障性の抑制の系で *in vitro* ではあるが報告されている²⁵⁾。逆に、人工的に合成された poly-cation である poly-L-lysine や poly-L-arginine などの塩基性アミノ酸の気道内注入や吸入は、ラット²⁶⁾やヒツジ²⁷⁾の気道反応亢進をとたすが、これらの反応は陰性荷電を有するヘパリンの吸入により反応性の減弱をみる。また、好中球のカテプシン G や血小板の PF₃などの、炎症の際に放出される cation の性質を有する顆粒蛋白もヘパリンが中和し、炎症反応を修飾する⁷⁾。ヘパリンの MBP 中和作用については、発見当初から指摘されており²⁸⁾、アレルギー性炎症によって生じる多くのカチオンを中和することがヘパリンの生体防御機構の重要な作用とも考えられる。また、近年細胞外マトリックスとしてのヘパリンには、細胞分化、増殖、また細胞接着など、炎症とその修復に強く関与していることが次第に明らかになってきており¹⁹⁾、ヘパリンのアレルギー性炎症における防御的な面での解明が待たれる。

ヒトの呼吸器疾患に対するヘパリンの有用性についてはいくつかの報告²⁰⁾²⁹⁾³⁰⁾がある。本邦においても、木村ら³¹⁾により気管支喘息患者にヘパリン吸入療法を行い有効性が認められ、谷崎ら³²⁾により、喘息発作時あるいは喘鳴を生じ痰切れの悪い時に吸入療法と静脈注射を同時に行い、早期の自覚症状の改善および数日間持続する喀痰排出の改善などが認められ、その有効性が報告されている。今回の実験においては、組織学的には明らかな杯細胞化生の変化は認められなかったが、実験動物の喘鳴が減弱することが観察され、感作暴露後の気道分泌液の減少もうかがわれた。近年、 β_2 刺激剤の規則的吸入により気道過敏性の亢進がもたらされ、致死的な喘息発作を生じることにより喘息死亡者が増加している事に対して、 β_2 刺激剤が肥満細胞の化学伝達物質の遊離に対する安定化を生じるために、肥満細胞に含まれるヘパリンを代表とする防御的役割を持った成分まで、遊離されない事が原因の一つではないかと、Page らにより提唱されている³³⁾。今後、ヘパリンをはじめとする、poly-anion の性質を有する生体構成成分のアレルギー性炎症に対する生体防御機転についての研究を通して、気管支喘息の病態生理の解明および治療に対する“charge interaction”の位置付けを考える必要があると思われる。

- 1) Bousquet, J., Chanz, D., Lascoste, J.Y., Barneon, G., Ghavanian, N., et al.: Eosinophilic inflammation in asthma. *N. Engl. J. Med.* **323**, 1033-1039, 1990.
- 2) Gleich, G.J.: The eosinophil and bronchial asthma; current understanding. *J. Allergy Clin. Immunol.* **85**, 422-436, 1990.
- 3) Gundel, R.H., Letts, L.G. and Gleich, G.J.: Human eosinophilic major basic protein induces airway constriction and airway hyperresponsiveness in primates. *J. Clin. Invest.* **87**, 1470-1473, 1991.
- 4) Fredens, K., Dahl, R. and Venge, P.: *In vitro* studies of the interaction between heparin and eosinophil cationic protein. *Allergy* **46**, 27-29, 1991.
- 5) Pagelow, K.O.: Bronchial sensitivity to allergen with and without previous heparin administration. *Acta Allergologica.* **13**, 287, 1968.
- 6) Dragstedt, C.A., Wells, J.A. and Rochae, S.M.: Inhibitory effect of heparin upon histamine release by trypsin, antigen and protease. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **51**, 191, 1942.
- 7) Coyle, A.J., Ackerman, S.J. and Irvin, C.G.: Cationic proteins induce airway hyperresponsiveness dependent on charge interactions. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**, 896-900, 1993.
- 8) Ahmed, T., Syrister, T., Mendelson, R., Sorace, D., Mansour, E., et al.: Heparin prevents antigen-induced airway hyperresponsiveness; interference with IP₃-mediated mast cell degranulation? *J. Appl. Physiol.* **76**, 893-901, 1994.
- 9) Lucio, J., D'Brot, J., Guo, C., Abraham, W.M., Lichtenstein, L.M., et al.: Immunologic mast cell-mediated responses and histamine release are attenuated by heparin. *J. Appl. Physiol.* **73**, 1093-1101, 1992.
- 10) Inase, N., Schreck, R.E. and Lazarus, S.C.: Heparin inhibits histamine release from mast cells. *Am. J. Physiol.* **264** (Lung Cell. Mol. Physiol. 8), L387-L390, 1993.
- 11) Lider, O., Mekori, Y.A., Miller, T., Bar-Tana, R., Vlodavsky, I., et al.: Inhibition of T lymphocyte heparanase by heparin prevents T cell migration and T cell-mediated immunity. *J. Immunol.* **20**, 493-499, 1990.
- 12) Gorski, A., Wasik, M., Nowaczyk, M. and Korczak-Kowalska, G.: Immunomodulating activity of heparin. *FASEB. J.* **5**, 2287-2291, 1991.

- 13) Fryer, A.D. and Wills-karp, M.: Dysfunction of M₂-muscarinic receptors in antigen-challenged guinea-pigs is restored heparin and poly-l-glutamate. *J. Clin. Invest.* **90**, 2292-2298, 1992.
- 14) Fryer, A.D. and Jacoby, D.B.: Effect of inflammatory cell mediators on M₂ muscarinic receptors in the lung. *Life Science* **52**, 529-536, 1993.
- 15) 寺師義典, 湯川龍男, 福田 健, 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の出現とその発症因子に関する研究 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.
- 16) Mead, J.: Control of respiratory frequency. *J. Appl. Physiol.* **15**, 325-336, 1960.
- 17) 白築夏生: モルモット 2 相性喘息モデルにおける肺組織中ロイコトリエン C4 とその局在. *日胸疾会誌* **30**, 82-90, 1992.
- 18) Janssens, S.P., Thompson, B.T., Spence, C.R. and Hales, C.A.: Polycythemia and vascular remodeling in chronic hypoxic pulmonary hypertension in guinea pigs. *J. Appl. Physiol.* **71**, 2218-2223, 1991.
- 19) Schwartz, L.B. and Huff, T.F.: Mast cells. In "The Lung: Scientific Foundations" (edited by R.G. Crystal, and J.B. West, et al.), Raven Press, New York, pp.601-616, 1991.
- 20) Bowler, S.D., Smith, S.M. and Lavercombe, P. S.: Heparin inhibits the immediate response to antigen in the skin and lungs of allergic subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**, 160-163, 1993.
- 21) Ahmed, T., Garringo, J. and Dante, I.: Preventing bronchoconstriction in exercise-induced asthma with inhaled heparin. *N. Engl. J. Med.* **329**, 90-95, 1993.
- 22) Young, J.D.E., Peterson, C.G.B., Venge, P. and Cohn, Z.A.: Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature* **321**, 613-616, 1986.
- 23) Abu-Ghazaleh, R.I., Gleich, G.J. and Prendergast, F.G.: Interaction of eosinophil granule major basic protein with synthetic lipid bilayers; a mechanism for toxicity. *J. Membr. Biol.* **128**, 153-164, 1992.
- 24) Barker, R.L., Gleich, G.J. and Pease, L.R.: Acidic precursor revealed in human eosinophil granule major basic protein cDNA. *J. Exp. Med.* **168**, 1493-1498, 1988.
- 25) Baker, R.L., Gundel, R.H., Gleich, G.L., Chekel, J.S., Loegering, D.A., et al.: Acidic polyamino acids inhibit human eosinophil granule major basic protein toxicity; evidence of a functional role for proMBP. *J. Clin. Invest.* **88**, 793-805, 1991.
- 36) Uchida, D.A., Ackerman, S.J., Coyle, A.J., Larsen, G.L., Weller, P.F., et al.: The effect of human eosinophil granule major basic protein on airway responsiveness in the rat in vivo. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**, 982-988, 1993.
- 27) Ahmed, T., Abraham, W.N. and D'Brot, J.: Effects of inhaled heparin on immunologic and nonimmunologic bronchoconstrictor response in sheep. *Am. Rev. Respir. Dis.* **145**, 566-570, 1992.
- 28) Gleich, G.J., Loegering, D.A., Kuppers, F., Bajaj, S.P. and Mann, K.G.: Physicochemical and biological properties of the major basic protein from guinea pig eosinophil granules. *J. Exp. Med.* **140**, 313-331, 1974.
- 29) Yongchaiyud, P., Kettel, L.J. and Cugell, D.M.: The effect of heparin aerosols on airway conductance in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* **99**, 449-452, 1969.
- 30) Fine, N.L., Shim, C. and Williams, M.H.: Objective evaluation of heparin in the treatment of asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **98**, 886-887, 1968.
- 31) 木村郁郎, 守谷欣明, 谷崎勝朗, 高橋 清, 斎藤勝剛, 他: 気管支喘息における heparin 吸入療法およびその作用機序について. *アレルギー* **21**, 489-496, 1972.
- 32) 谷崎勝朗, 周藤真康, 小野波津美, 田村尚彦, 塩田雄太郎, 他: 気管支喘息におけるヘパリン療法の臨床的検討. *日胸疾会誌* **21**, 988-992, 1983.
- 33) Page, C.P.: An explanation of the asthma paradox. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**, s29-s32, 1993.

INHIBITORY EFFECT OF LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARIN ON THE
BRONCHOCONSTRICTION IN OVALBUMIN-SENSITIZED GUINEA
PIGS AFTER ANTIGEN EXPOSURE

Hitoshi Maeda, Tomoyuki Yahata, Miyako Satouchi,
Kazuhiro Takenaka and Mitsuhiro Yokoyama

First Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kobe University

To elucidate the effect of low molecular weight heparin (LMWH) on the bronchoconstriction, we examined the serial changes of the resistance of respiratory system (Rrs) in ovalbumin (OA)-sensitized guinea pigs after antigen exposure. After sensitization of guinea pigs with repeated OA inhalation, Rrs was measured at immediate asthmatic response (IAR) and late asthmatic response (LAR) with or without LMWH inhalation. Alteration in the number of inflammatory cells of the lung by LMWH inhalation was examined in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and in the histological sections of airway walls.

Peak Rrs at 1 min up to 9 min, except 8 min, after antigen exposure significantly decreased by the pretreatment with LMWH inhalation as compared with saline inhalation. Peak Rrs at LAR (after 4 hours up to 24 hours, except 6 hours) also showed a significant decrease in the pretreatment with LMWH inhalation. Pretreatment of LMWH exhibited a decrease of eosinophil percentage in BALF ($5.5 \pm 1.2\%$ from $8.2 \pm 0.4\%$ in saline inhalation) and a decrease of infiltrated eosinophil count in airway walls (71.0 ± 7.3 from 155 ± 15.8 in saline inhalation).

These data show LMWH might play an important role as an inhibitory factor to bronchial asthma.
