

感作家兎作成における, 抗原の種類と気道反応性の相違

昭和大学医学部第二生理学教室

井上和明 坂井 泰 本間生夫

家兎を出生直後よりアルテルナリア, 又はブタクサで感作することにより, 実験的喘息モデルの作成を行った。感作を施行した2群の家兎と対照群(C群)の家兎より気管平滑筋を摘出して, その収縮反応の特徴を比較検討した。acetylcholine (ACh) に対する反応は, アルテルナリア感作群(A群)では, 閾値が左へシフトし, EC_{50} 値は他の2群よりも有意に小さく, 最大反応も他の2群よりも有意に増大していた。ブタクサ感作群(R群)では閾値の左へのシフトのみが認められた。電気刺激に対する収縮反応は両群ともに増強していたが, A群での増強はR群と比しても有意に大きかった。KClの用量反応曲線よりA群では平滑筋の脱分極による収縮に, AChの受容体を介した収縮の加重が全濃度で認められたが, R群では20mM以下で認められた。A群ではR群よりも平滑筋側の収縮が増強しているのみならず, 平滑筋壁内神経叢の反応の亢進も認められた。以上より, アルテルナリアで感作を行う方が, 気道の平滑筋と神経系の変化を研究する上でより良いモデルを作成できる可能性が示唆された。

Key words: airway reactivity — *Ambrosia elatior* — *Alternaria tenuis* — immunization — intramural nerve plexus

緒言

実験喘息モデルを作成するには感作の対象となる動物の選択と感作のスケジュール, 抗原の選択といった要因が, そのモデルの性格を決定する上で重要な要素となる。我々は感作の対象として家兎を選択した。家兎は出生直後より感作するとIgEの優先的産生が生ずることが知られている¹⁾。また, 気道の収縮が主としてacetylcholine (ACh)系によって行われており, 中枢気道はhistamineに対する感受性を殆んど持たない²⁾。そのため, 感作によって生じた迷走神経系の活動の変化を評価しやすいという利点がある。抗原には, ともにI型アレルギーを惹起することが知られている, アルテルナリア (*Alternaria tenuis*)³⁾とブタクサ (*Ambrosia elatior*)⁴⁾を用い, これらの抗原で感作した家兎より気管平滑筋を摘出し, その収縮反応の変化を薬理学的に検討した。

方法

a) 感作方法

白色日本家兎を対象として出生直後よりアルテルナリア (210ng protein/ml) 0.25ml またはブタクサのAntigen E (315unit/ml) 0.25ml とアルミゲル (10mg/ml) 0.25ml の混合液を腹腔内投与して感作を開始し, 以後1, 2, 3, 5, 7, 9週目に抗原液0.25mlを腹腔内投与し, 11週目に抗原液1mlとアルミゲル1mlの混合液を皮下注射することにより感作を終了した。

b) 実験方法

溶媒 (生理食塩水) のみの投与を行った Littermate の対照群(C群) (n=8), アルテルナリア感作群(A群) (n=6), 及びブタクサ感作群(R群) (n=6) の3群に分けた, それぞれ16-20週齢の家兎を, Pentbarbital sodium (20mg/kg) 麻酔下に放血致死させ, 速やかに気管を摘出して95%O₂ + 5%CO₂の混合ガスで通気した, 氷冷下の Krebs-Henseleit 液 (K-H 液) 中で, 気管軟骨を平滑筋付着部位の反対側で縦に切開し, 周囲の脂肪組織や結合組織を十分に除去した。そして気管軟骨2コ分の幅の条片標本を作成し, 両端に絹糸を結紮して Force-displacement transducer (日本光電 SB1-T) とホルダに連結した。それらを, 混合ガスで飽和された37℃の K-H 液を満たした10ml の organ bath 中に1gの負荷をかけて懸垂し, 1時間の平衡後

Received: August 2, 1990

Accepted: October 31, 1990

Abbreviations: ACh acetylcholine; PCA passive cutaneous anaphylaxis; EC_{50} 50% effective concentration; KH Krebs-Henseleit

に実験に供した。平滑筋内の神経叢は双極白金電極板にて(電極間距離5mm), 刺激発生装置(日本光電 SEN-3201)からの矩形波で、水平方向に刺激した。刺激の条件は、頻度5-40Hz, パルス幅2ms, 電圧10V, 刺激時間は45秒とした。

使用した薬物は、acetylcholine chloride (第一製薬), potassium chloride, atropine sulfate(和光純薬), tetrodotoxin(Sigma)で、感作に用いた2種の抗原は、Greer Laboratories (NC, USA) より購入した。これらの薬物及び抗原は全て生理食塩水に溶解した。

c) passive cutaneous anaphylaxis (PCA)

抗原特異的 IgE 抗体は家兎を用いて、IgG 抗体はモルモットを用いて PCA を行い、それぞれ72時間後と4時間後に判定した。

d) 統計

実験データはすべて Mean $\pm$ SEM で表現し、統計学的検討は、unpaired Student's t-test で行った。

結 果

ACh に対する収縮反応を3群の用量反応曲線より比較すると、感作を行った2群ではC群より閾値が3倍左へシフトしていたが、EC₅₀値を比較すると、A群においてのみ他の2群より有意に大きかった。最大張力はA群でのみ有意に増強しており、C群及びR群の約1.5倍となっていた(Fig. 1)。電気刺激により発生した張力のピーク値を各標本の10⁻⁶MのAChによる収縮を100%として表現すると、A群ではC群に比して全ての周波数で収縮反応が増強していた。R群ではC群に比して5Hz以外の周波数で収縮反応が有意に増強していた。A群とR群の比較では、5Hz以外でA群の収縮反応がR群より有意に増強していた(Fig. 2)。また各群の発生張力を絶対値(g)で比較すると、その差違はより明確であり、EFS 40Hzにおいてはcontrol群0.68 $\pm$ 0.08g (n=8), A群3.45 $\pm$ 0.21g (n=8), R群1.02 $\pm$ 0.02g (n=8)であり、それぞれC群の約4倍と約2倍に、発生張力は有意に増強した。更に、これらの収縮反応は10⁻⁷MのAtropineの存在下で全て消失し、同様に10⁻⁷g/mlのTetrodotoxin存在下でも、全て消失した。またこれらの3群において、KClによる収縮反応に対する用量反応曲線を比較すると、感作を行ったA群とR群においては閾値が10mM左にシフトしており、EC₅₀値もこの2群ではC群に比して有

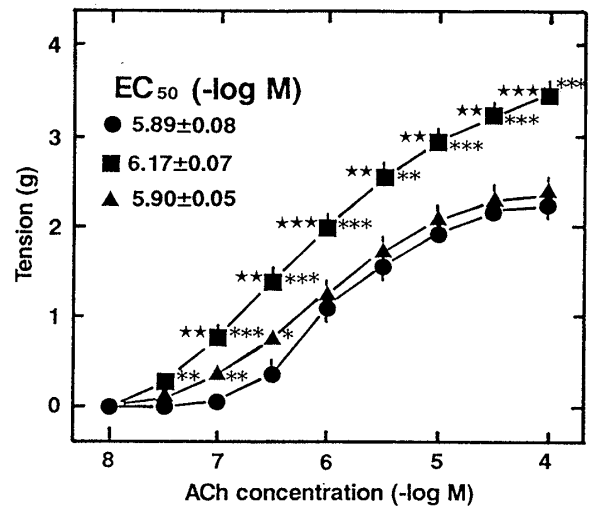


Fig. 1. Cumulative dose-response curves for the acetylcholine (ACh)-induced contraction of rabbit tracheal smooth muscle from control (●) (n=6), ragweed sensitized (▲) (n=6) and alternaria sensitized (■) (n=6) groups.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Significantly different from control.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Significantly different from ragweed sensitized.

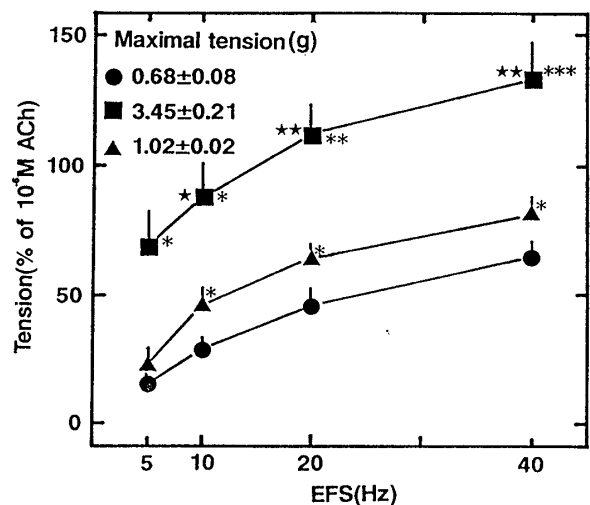


Fig. 2. Frequency-response curves of rabbit tracheal smooth muscle from control (●) (n=8), ragweed sensitized (▲) (n=8), alternaria sensitized (■) (n=8) groups.

These contractions were expressed in percentage of tension induced by 10⁻⁶M acetylcholine.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Significantly different from control.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Significantly different from ragweed sensitized.

意に小さかった。最大張力はA群において他の2群よりも有意に増強していたが、C群とR群の間では有意差がなかった。Atropine感受性成分はR群では10mM

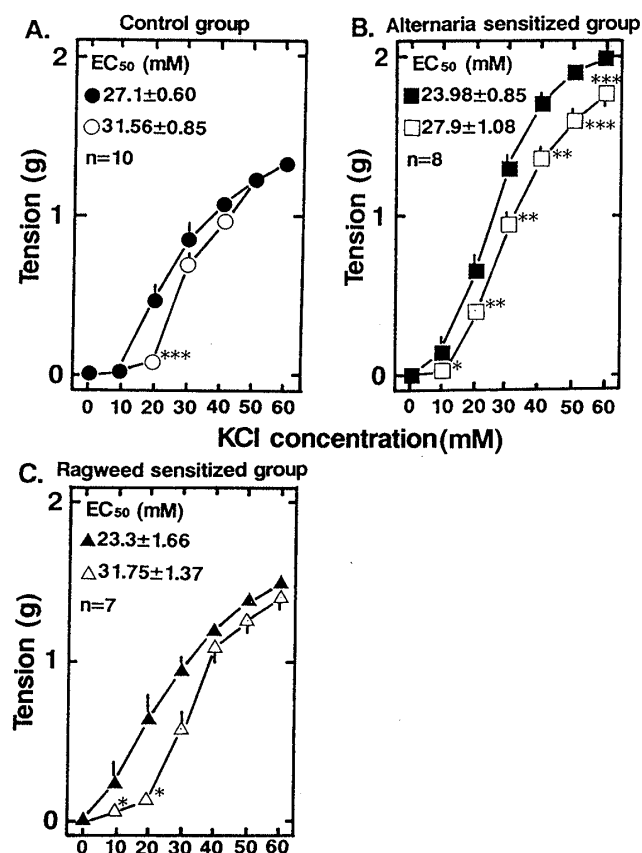


Fig. 3. Cumulative dose-response curves for the KCl-induced contraction of rabbit tracheal smooth muscle. Closed marks are in the absence of Atropine and open marks are in the presence of 10^{-7} M atropine.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Significantly different from in the absence of atropine.

と20mMで存在し、C群では20mMで存在しただけであるが、A群では10mMから60mMまでの全ての濃度で存在が認められた (Fig. 3A, B, C). PCAの結果は、IgEについては、A群で16~128倍であり、R群では16~64倍であった。IgGについては、両群ともPCAでの検出閾値以下であった (Table 1)。また感作を施行した2群の家兎は、それぞれで、Schulze-Dale反応が陽性であることを確認した。

考案

今日まで多くの気道過敏性モデルがアレルギー性気管支喘息のモデルとして使われてきた。その主たるモデル動物はモルモットであった。その理由としては気道平滑筋の発達がよく、各種 agonist に対する感受性が高く、同種抗体を容易に産生し、かつアナフィラキシーの最大標的器官が肺だからである。しかし抗体の種類や治療薬の感受性の面では、人との相違の指摘も少なくなかった。一方、家兎は呼吸機能の測定はモルモットよりも容易であるが、感作しにくく気道の反応性に乏しいなどの難点があった。また、喘息における化学伝達物質の研究の面からも家兎の気道上皮細胞はアラキドン酸代謝が不活発であるために適切なモデルとはなり得なかった⁵⁾。しかし、家兎においては、気道のToneの維持や呼吸リズムの形成においても迷走神経系が呼吸器系の生理機能の維持に大切な役割を担っているという特色がある⁶⁾。これらの理由より、喘息の病因の一つとして考えられている迷走神経系の異常を評価するためには家兎を用いるのも有用なことでありうと考えられる。感作のスケジュールとしては、出生

Table 1 PCA titers
Serum specific IgE and IgG levels in immunized rabbits

A) Anti-alternaria PCA titer			B) Anti-ragweed PCA titer		
Number of rabbit	IgE antibody (72hr)	IgG antibody (4hr)	Number of rabbit	IgE antibody (72hr)	IgG antibody (4hr)
1	128	—	1	64	—
2	64	—	2	64	—
3	64	—	3	64	—
4	32	—	4	32	—
5	32	—	5	32	—
6	16	—	6	16	—

Specific IgE levels were determined by homologous PCA titers and specific IgG levels were determined by heterologous PCA titers.

直後より感作を開始して11週齢まで計8回行っているが、その目的としてはIgEの優先的な産生を促すのみならず、今日免疫系と神経系の関連が指摘されているように、成長発達過程での感作が平滑筋の壁内神経叢を含めた神経系の生理的活動に何らかの影響を及ぼし、その結果おこる気道の反応性の変化を評価する為である。抗原としてアルテルナリア及びブタクサを用いた理由はともにアジュバントとの感作でIgEを産生しうるからである⁷⁾⁸⁾。また、アルテルナリアはこれまでの報告からも最も抗原性の強い真菌抗原であり、skin testと吸入誘発試験の一致率も高いことが知られている⁹⁾。一方、ブタクサは代表的な花粉抗原であり、花粉喘息や花粉症を引き起こすが、この両者では気道過敏性に差が無いという報告もあり⁴⁾ IgEの産生と気道過敏性獲得の相関を見る上でもこの2種の抗原による感作での気道反応性の比較は意義があると考えられた。今回の我々の実験結果から考えられることは、AChの反応については、A群R群共にC群に比して閾値が左にシフトしていた。EC₅₀値はR群とC群では有意差は無いが、A群においてのみ他の2群よりも有意に大きかった。最大反応はA群でのみ他の2群よりも有意に増大しており、これらの結果より、アルテルナリアで感作した場合のみ気管平滑筋はAChに対して過敏で過大な収縮反応を示した。また、電気刺激により生じた収縮を各標本の10⁻⁶MのAChで惹起される収縮を100%として表現すると、C群及びR群ともに、EFS 40Hzにより生じる収縮は10⁻⁶MのAChによって生じる収縮の約50-60%であったが、A群においては約140%にまで増強されており、これらの全ての反応はTTX、とAtrに感受性があつた。これらの結果より、A群において最も著明に気管平滑筋の壁内神経叢の反応性が亢進していることが示唆された。更に壁内神経叢より、AChの放出を促進する因子としては、電気刺激により神経末端より放出される様々な神経伝達物質のうちでも、substance P¹⁰⁾⁻¹¹⁾や5-HT¹²⁾⁻¹³⁾が、その候補として報告されている。A群においても気管平滑筋の壁内神経叢の反応性の亢進に、AChの放出に加えてこのような他の神経伝達物質の放出が関与する可能性が考えられる。更に各群のKClの用量反応曲線を比較すると、A群においては、最大反応が増強し、感受性が増加しているのみならず、Art感受性の成分はA群でのみ全ての濃度でみとめられた。このような現象が生じる理由としては、KClによる脱分極刺激で神経末端よりおこるAChの放出が電

気刺激の場合と同様に亢進していることと、更にそれを受容する側である平滑筋のAChに対する反応性が亢進しているという2つの理由が考えられる。そのために、他の2群よりも亢進したKClによる筋の脱分極性収縮にAChの受容体を介した収縮の加算が全ての濃度で生じている可能性が考えられた。以上の結果より、同様のスケジュールで感作を行っても、抗原の相違により気管平滑筋の反応性の異なったモデル動物を作成できる可能性が示唆された。

結 語

家兎を出生直後より2種の抗原で感作することによりIgEの産生を促し、それらの気管平滑筋の反応性に及ぼす影響を検討した。

IgEの力価は両群で有意差は無いものの、A群においてより明確に、気管平滑筋の受容体異常及び壁内神経叢からの神経伝達物質の放出異常が生じることが示唆された。感作過程のどの段階でいかなるメカニズムによって、このような異常状態が惹起されるかについては、今後の検討が必要であると考えられる。アルテルナリアで出生直後より感作した家兎は、気道の平滑筋と神経系の変化を研究する上で有用なモデルとなる可能性があると考えられる。

文 献

- 1) Pinckard, R.N., Halonen, M. and Meng, A.L.: Preferential expression of anti-bovine serum albumin IgE homocytotropic antibody synthesis and anaphylactic sensitivity in the neonatal rabbit. *J. Allergy Clin. Immunol.* 49, 301-310, 1972.
- 2) Fujiwara, T., Itoh, T. and Kuriyama, H.: Regional differences in the mechanical properties of rabbit airway smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 94, 389-396, 1988.
- 3) Licorish, K., Novey, H.S., Kozak, P., Fairshier, R.D. and Wilson, A.F.: Role of alternaria and penicillium spores in the pathogenesis of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 76, 819-825, 1985.
- 4) Rosenberg, G.L., Rosenthal, R.R., Norman, P. S.: Inhalation challenge with ragweed pollen in ragweed sensitive asthmatics. *J. Allergy Clin. Immunol.* 71, 302-310, 1983.

- 5) Xu, G.L., Sivarajah, K., Wu, R., Neetsheim, P. and Eling, T.: Biosynthesis of prostaglandins by isolated and cultured airway epithelial cells. *Exp. Lung. Res.* 10, 101-114, 1986.
- 6) Nadel, J.A.: Autonomic regulation of airway smooth muscle. In "Physiology and Pharmacology of the Airway" (ed. by J.A. Nadel), Dekker, New York, pp.217-257, 1980.
- 7) Shampain, M.P., Behrens, B.L., Larsen, G.L. and Henson, P.M.: An animal model of late pulmonary response to alternaria challenge. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126, 493-498, 1982.
- 8) Marsh, W.R., Irwin, C.G., Murphy, K.R., Behrens, B.L. and Larsen, G.L.: Increases in airway reactivity to histamine and inflammatory cells in bronchoalveolar lavage after the late asthmatic response in an animal model. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131, 875-879, 1985.
- 9) 中山善弘: 小児気管支喘息と真菌抗原. *アレルギー* 21, 523-526, 1972.
- 10) Tanaka, D.T. and Grunstein, M.M.: Effect of substance P on neurally mediated contraction of rabbit airway smooth muscle. *J. Appl. Physiol.* 60, 458-463, 1986.
- 11) 相沢久道, 宮崎直樹, 友岡真樹, 重松信昭, 江島剛: substance Pによる迷走神経末端からの acetylcholine 放出促進. *アレルギー* 37, 387-390, 1988.
- 12) Sheller, J.R., Holtzman, M.J., Skoogh, B.E. and Nadel, J.A.: Interaction of serotonin with vagal and ACh-induced bronchoconstriction in canine lungs. *J. Appl. Physiol.* 52, 964-966, 1982.
- 13) Hahn, H.L., Wilson, A.G., Graf, P.D., Fischer, S. P. and Nadel, J.A.: Interaction between serotonin and efferent vagus nerves in dog lungs. *J. Appl. Physiol.* 44, 144-149, 1978.

RABBIT IMMUNIZATION TO INDUCE EXPERIMENTAL ASTHMA

—Relationship Between Antigens and Airway Reactivity—

Kazuaki Inoue, Yasushi Sakai and Ikuo Homma

Department of Physiology, School of Medicine, Showa University

Japanese white rabbits were immunized with either alternaria or ragweed starting at birth to induce experimental asthmatic model. We studied the characteristics of contractile responses of tracheal smooth muscle isolated from these sensitized animals and compared them with non-sensitized control animals. Both sensitivity and reactivity of contraction induced by acetylcholine (ACh) were increased in the alternaria sensitized group, but only sensitivity was increased in the ragweed group. Contractile responses to electrical field stimulation were enhanced in both sensitized groups, and responses in the alternaria group were significantly greater than those in the ragweed group. In the alternaria group, atropine suppressed the contractile response to KCl, indicating that the contraction was mediated partially through a muscarinic mechanism. In the ragweed group, atropine suppressed responses to 20 mM KCl. Stimulation of the intramural nerve plexus facilitated the release of neurotransmitters, especially ACh. This was more obvious in the alternaria group than in the ragweed group. These results suggest that alternaria sensitization of rabbits produces a better model for studying changes in interaction between nerves and smooth muscle in the airway.