

能動感作モルモットを用いた抗原チャレンジ後の気道 反応性亢進モデル作成に関する基礎的検討

群馬大学医学部第一内科学教室

青木 栄 塚越秀男 黒沢元博

能動感作モルモットにヒスタミンを静注し、呼吸抵抗の増加量と動肺コンプライアンスの低下量を測定することにより、能動感作による気道反応性の変化を検討した。あわせて、抗原チャレンジ前後の気道反応性の変化に関し、基礎的検討をおこなった。

1) 能動感作により、 $7.2\mu\text{g/kg}$ ヒスタミン静注による呼吸抵抗の増加量が有意に増大した。1.8および $3.6\mu\text{g/kg}$ ヒスタミン静注では有意な変化を認めなかった。一方、動肺コンプライアンスの低下量は変化しなかった。

2) 抗原チャレンジ後、ヒスタミンを静注した際の呼吸抵抗の増加量は有意に増大した。動肺コンプライアンスの低下量は増大傾向を示した。すなわち、抗原チャレンジ後に気道反応性の亢進を示す能動感作モルモットを作成し得た。

Key words: active sensitization — bronchial asthma — bronchial hyperresponsiveness — guinea pig — histamine

はじめに

材料および方法

好酸球を中心とした炎症反応、遅発型喘息反応、気道反応性の亢進は、気管支喘息の病態生理として、注目されつつある¹⁾²⁾。気道が種々の刺激に対して反応性を亢進した状態は、アレルギー反応、化学物質、ウイルスの上気道感染など種々の因子により成立すると考えられているが、気管支喘息の最も特徴的な病態生理のひとつである。したがって、気管支喘息の病態解明のため、種々の動物モデルが作成されている³⁾。最も汎用されている動物モデルは、受動あるいは能動感作モルモットに抗原を静注あるいは吸入により投与するものである⁴⁾⁻¹¹⁾。

今回、筆者らは、能動感作モルモットにヒスタミンを静注し、呼吸抵抗の増加量と動肺コンプライアンスの低下量を測定することにより、能動感作がヒスタミン静注に対する気道反応性に变化を及ぼすか否かについて検討した。また、併せて抗原チャレンジ前後のヒスタミン静注に対する気道反応性の変化に関し、基礎的検討をおこなった。

1) 能動感作モルモットの作製

Hartley 系雄性モルモット(250~300g, 今井実験動物, 埼玉)の能動感作は、卵白アルブミン(シグマ製)にて行った。すなわち、感作を始める1日前に 100mg/kg シクロホスファミド(シグマ製)を腹腔内に投与した。 $100\mu\text{g}$ 卵白アルブミン、 2mg 水酸化アルミニウム(和光純薬)を 0.5ml 生理的食塩水に混和し、 0.5ml の百日咳菌液($20\times 10^9/\text{ml}$, 百日咳東浜 I 相株, 千葉県血清研究所)と共に腹腔内に投与して初回感作した。初回感作1週と2週後に、初回感作と同様に卵白アルブミンを腹腔内投与し、2回ブーストをかけた。その後、最終ブーストから2~4週間後に抗原チャレンジを行った。

2) 抗原および薬物の投与

抗原としての卵白アルブミンおよびヒスタミン(シグマ製)は、生理的食塩水に溶解して各種濃度を作製した。これら溶液を、頸静脈に挿入したカテーテルから静注した。薬物の投与時以外には、インフュージョン・ポンプにて生理的食塩水を 10ml/kg/h で静注し、血管を確保した。

3) 肺機能の測定

Hartley 系雄性モルモット(350~600g, 今井実験動

Received: June 25, 1990

Accepted: March 6, 1991

Abbreviations: SE standard error; SD standard deviation

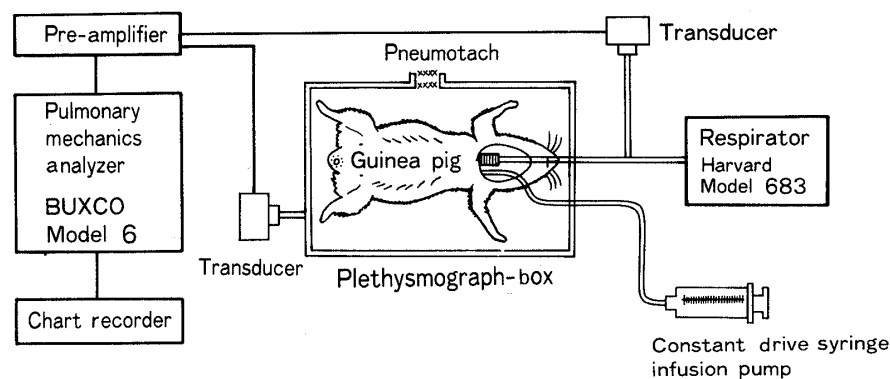


Fig. 1. Diagram of experimental arrangement.

物, 埼玉) の腹腔内に100mg/kg フェノバルビタール (マルコ製薬) および30mg/kg ペントバルビタール (アボット・ラボラトリーズ製) を投与し, 麻酔下で気管を露出させた。気管内に直接カニューレを挿入後, 5 mg/kg 塩化アルクロニウム (エフ・ホフマン・ラ・ロシュ製) を腹腔内へ投与して筋を弛緩させた。Harvard 社 small animal ventilator, Model 683を用いて, 1 回換気量10ml/kg, 分時換気数60, FiO_2 0.21で強制換気した。モルモットは pneumotach 付 plethysmograph box に入れ, フローと気道内圧を直接計測し, Buxco 社 pulmonary mechanics analyzer, Model 6 のプログラム 1 にて呼吸抵抗および動肺コンプライアンスの計算を行った (Fig. 1)。

4) 気道反応性の測定

気道反応性は, ヒスタミンを頸静脈から投与し, 呼吸抵抗および動肺コンプライアンスの変化量を用いて検討した。卵白アルブミンを頸静脈から投与する前に, ヒスタミンの頸静脈内投与による呼吸抵抗の増加量および動肺コンプライアンスの低下量を測定し, 抗原チャレンジ 1 時間後に再び同量のヒスタミンによる変化を測定した。対照として卵白アルブミンの溶媒である生理的食塩水を投与した後の反応性の変化を検討した。

5) 推計学的検討

Student's t-test にて, 危険率が 5 % 以下を有意差ありとした。

結 果

非感作モルモットに1mg/kg 卵白アルブミンを静注, あるいは能動感作モルモットに生理的食塩水を静

注しても, 呼吸抵抗の増加および動脈コンプライアンスの低下は認められなかった。

能動感作モルモットの呼吸抵抗および動肺コンプライアンスのベースラインは, 315 ± 111 (mean $\pm$ SD) $\text{cmH}_2\text{O}/\text{l}/\text{sec}$, $345 \pm 59 \mu\text{l}/\text{cmH}_2\text{O}$ であり, 非感作モルモットの $330 \pm 85 \text{cmH}_2\text{O}/\text{l}/\text{sec}$, $347 \pm 103 \mu\text{l}/\text{cmH}_2\text{O}$ と比して有意差はなかった。

能動感作モルモットにヒスタミン1.8, 3.6および7.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を静注し, それぞれの濃度のヒスタミンによる呼吸抵抗の増加量を求めると 28 ± 2 (mean $\pm$ SE), 135 ± 25 , $945 \pm 131 \text{cmH}_2\text{O}/\text{l}/\text{sec}$ であった。一方, 動肺コンプライアンスの低下量は 29 ± 7 , 61 ± 11 , $211 \pm 22 \mu\text{l}/\text{cmH}_2\text{O}$ であった (Fig. 2)。コントロールとして, 非感作モルモットにヒスタミン1.8, 3.6および7.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を静注し, それぞれの濃度のヒスタミンによる呼吸抵抗の増加量は 40 ± 12 , 178 ± 56 , $513 \pm 88 \text{cmH}_2\text{O}/\text{l}/\text{sec}$ であった。一方, 動脈コンプライアンスの低下量は 27 ± 8 , 52 ± 9 , $189 \pm 39 \mu\text{l}/\text{cmH}_2\text{O}$ であった。非感作モルモットと比べ, 能動感作モルモットでは7.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ヒスタミンの静注による呼吸抵抗の増加量が有意に増大した ($p < 0.05$) (Fig. 2)。

Fig. 3 に, 能動感作モルモットに卵白アルブミンを矢印に示すタイミングで静注し, 一過性に呼吸抵抗の上昇および動肺コンプライアンスの低下が認められた例を示した。10あるいは100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の少量の抗原投与では30秒以内に急速な呼吸抵抗の上昇および急速な動肺コンプライアンスの低下を示し, 70秒以内にピークに達する一過性の反応が認められ, 抗原量を増加させるとその反応は増大した (Fig. 3)。さらに抗原量を1 mg/kg まで増加させると, 一部のモルモットは死亡したが, 死亡しないものは少量の場合と同様に30秒以内に呼吸抵抗の上昇および動肺コンプライアンスの低下

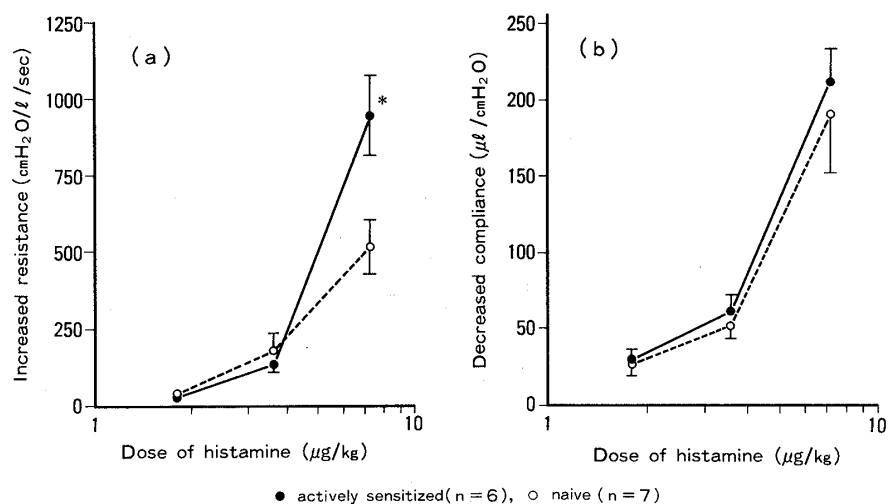
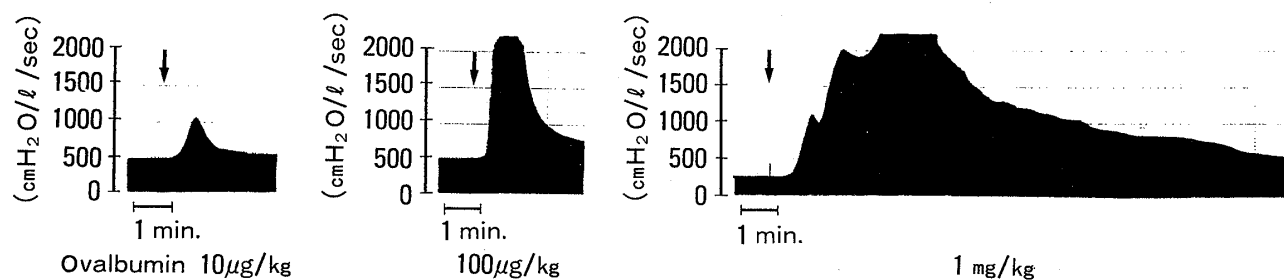


Fig. 2. Changes of the response to histamine in actively sensitized guinea pigs compared with naive ones (mean $\pm$ SE, * p <0.05). (a) respiratory resistance. (b) dynamic compliance

(a) Respiratory resistance



(b) Dynamic compliance

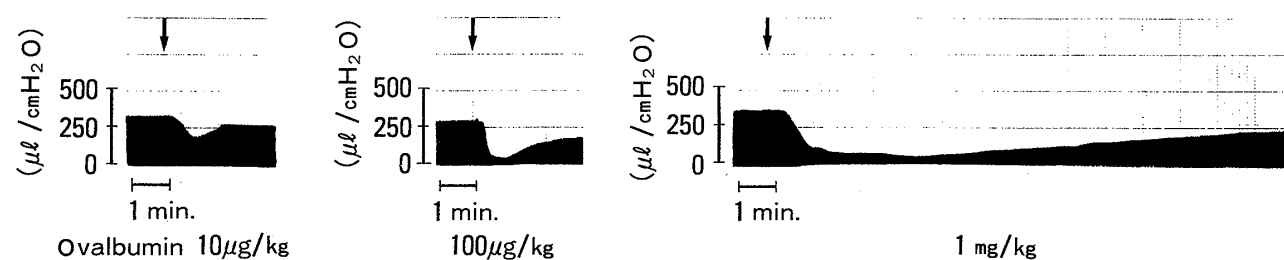


Fig. 3. Effects of antigen challenge on respiratory resistance and dynamic compliance in actively sensitized guinea pigs. The arrow indicates bolus injection of ovalbumin in saline.

が始まり、2分から5分以内にピークに達する反応が認められ、その反応は少量の抗原の場合に比較し増大し遷延化したが、20分から50分で徐々にチャレンジ前のベースラインに戻った (Fig. 3)。

1mg/kg 卵白アルブミンによる呼吸抵抗の増加量の最大値は 2108 ± 181 (mean $\pm$ SE) cmH₂O/l/secで、動

肺コンプライアンスの低下量の最大値は $237 \pm 16 \mu\text{l/cmH}_2\text{O}$ であった (Fig. 4)。

抗原チャレンジ1時間後に1.8および3.6 μg/kg ヒスタミンを静注すると、それぞれの濃度のヒスタミンによる呼吸抵抗の増加量は 156 ± 49 と 452 ± 95 cmH₂O/l/secであった。一方、動肺コンプライアンスの低下量

は 47 ± 19 と $90 \pm 29 \mu\text{l}/\text{cmH}_2\text{O}$ であった。抗原チャレンジ前を100%とすると、抗原チャレンジ後の1.8および $3.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ ヒスタミン静注に対する呼吸抵抗の増加量は 604 ± 197 と $339 \pm 54\%$ であった。一方、動肺コンプライアンスの低下量は 191 ± 73 と $144 \pm 40\%$ であった。抗原非チャレンジのコントロール群では、生理的食塩水の静注1時間後の1.8および $3.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ ヒスタミン静注に対する、呼吸抵抗の増加量は 109 ± 37 と $101 \pm 17\%$ で、動肺コンプライアンスの低下量は 79 ± 27 と $78 \pm 15\%$ であった。抗原チャレンジ後の1.8および $3.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ ヒスタミン静注に対する呼吸抵抗の増加量は、抗原非チャレンジ群と比べ有意に増大した ($p < 0.05$ および $p < 0.01$)。一方、動肺コンプライアンスの低下量では、増大傾向を示した ($p < 0.1$) (Fig. 5)。一部モルモットでは、抗原チャレンジ2時間後にも1.8および $3.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ ヒスタミンによる呼吸抵抗の増加量を指標として反応性を検討したが、反応性は1時間後に比し10から80%低下した。

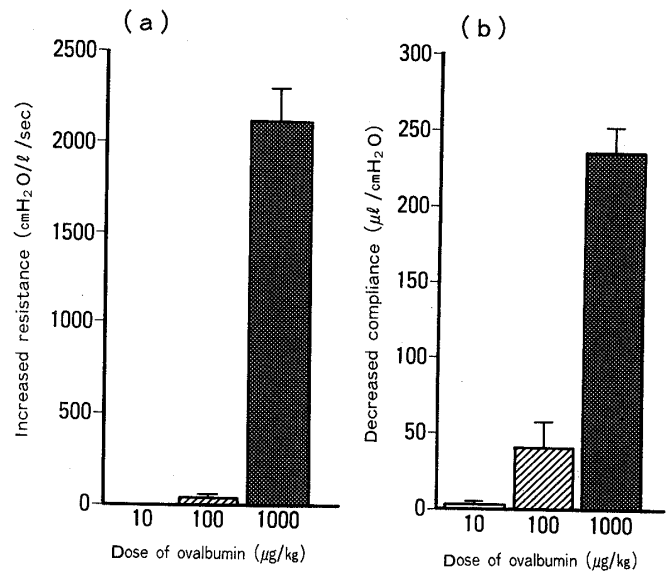


Fig. 4. Airway responses induced by intravenous injection of antigen in actively sensitized guinea pigs (mean $\pm$ SE, $n=4$). (a) respiratory resistance (b) dynamic compliance

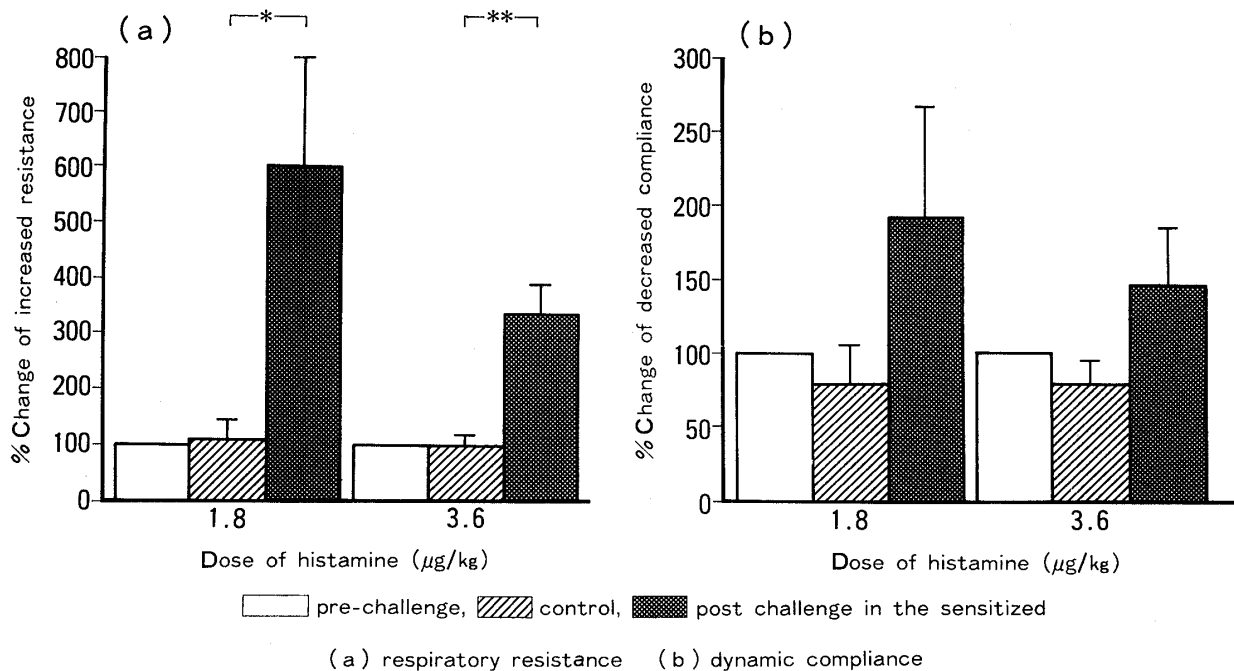


Fig. 5. Increases of the responses of respiratory resistance (a) and dynamic compliance (b) induced by the histamine administration following the antigen challenge in actively sensitized guinea pigs (mean $\pm$ SE, $n=6$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

考 察

気管支喘息の特徴的な病態生理のひとつに気道反応性の亢進があげられる¹⁾⁻³⁾。臨床的にも気管支喘息患

者においてアレルギー反応後に気道反応性が亢進することが認められている¹²⁾¹³⁾。気管支喘息の病態解明のため多くの動物モデルが作成されているが、受動感作を用いた方法は免疫状況が単純であるため、病態に関

与する可能性のある個々の因子の検討には適しているが、ヒトと同様の喘息反応を得難いことがあげられる。一方、能動感作は種々の免疫機序が関与し、安定した結果を得難いことがあげられるが、その複雑な機序のためヒトの気管支喘息に近いモデルとも考えられている⁹⁾。

本研究では、即時型アレルギー反応による気道過敏性の基礎的検討を行った。能動感作モルモットを作成し、ヒスタミンによる呼吸抵抗の増加量と動肺コンプライアンスの低下量を指標とし、気道反応性の検討を行った。

能動感作モルモットでは、非感作群に比べ $7.2\mu\text{g/kg}$ ヒスタミン静注による呼吸抵抗の増加量が有意に増大した。すなわち、能動感作によりヒスタミンに対する反応性が亢進した。一方、 1.8 および $3.6\mu\text{g/kg}$ ヒスタミン静注では反応性の亢進は認められなかった。この点に関し、能動感作することによりアストグラフで見られる場合と同様に、ヒスタミンに対する呼吸抵抗の増加量の用量反応曲線が左方へ移動するとすると、用量反応曲線より、低濃度のヒスタミンの際は増加量の増大を認めることが困難で、ヒスタミン濃度が高まると増加量の増大が著明になるものと考えられる。一方、動肺コンプライアンスの低下量は、能動感作群と非感作群で変化が認められなかった。

吸入による抗原チャレンジは気管支喘息の発作により近いモデルと考えられるが、投与された抗原の正確な量が不明になる。一方、静注は投与量が一定になる。抗原量が 10 あるいは $100\mu\text{g/kg}$ の少量の場合と 1mg/kg の場合の呼吸抵抗の増加を比較すると、抗原静注後立ち上がりまでの時間はほぼ一定であった。しかし、少量の抗原量ではひとつの呼吸抵抗の増加のピークを認めたが、 1mg/kg の場合では数個の小さなピークが出現したのち最大値に達し、抗原投与後ピークに達する時間が遅かった。この反応に数種の化学伝達物質が関与している可能性が示唆されているが¹¹⁾、化学伝達物質の拮抗薬による詳細な検討が必要である。

抗原非チャレンジ群と比べて、抗原チャレンジ 1 時間後には、ヒスタミンによる呼吸抵抗の増加量の有意な増大が認められた。動肺コンプライアンスの低下量は増大傾向が認められたものの有意ではなかった。ヒスタミン静注に対する呼吸抵抗の反応性の亢進が認められた。一部モルモットでは 2 時間後にも反応性を検討したが、反応性は 1 時間後より低下した。

モルモットを感作することにより、メサコリンに対

する気道反応性が亢進したとの報告⁵⁾や感作は気道過敏性を直接に惹起せず、抗原チャレンジ後に気道反応性が亢進したとの報告⁶⁾がある。一方、モルモットを感作したのみではアセチルコリンに対する気道反応性は亢進せず、抗ヒスタミン剤で前処置して抗原チャレンジを繰り返すことにより気道反応性の亢進を示すモデルも作成されている¹⁴⁾。

今回、モルモットは、能動感作することにより気道反応性の亢進を示し、抗ヒスタミン剤で前処置せず抗原チャレンジを行っても気道反応性の亢進を示した。これは抗ヒスタミン剤を使用しないため、ヒトの気管支喘息により近いモデルと考えられる。

結 語

能動感作により気道反応性の亢進を示し、抗ヒスタミン剤で前処置せず抗原チャレンジを行うことにより気道反応性の亢進を示すモルモットモデルを作成し得た。

文 献

- 1) 牧野荘平：気管支喘息。診断・病態・治療の最新の進歩。日本医事新報 3411, 15-20, 1989.
- 2) Hargreave, F.E., Dolovich, J., O'Byrne, P.H., Ramsdale, E.H. and Daniel, E.E.: The origin of airway hyperresponsiveness. *J. Allergy Clin. Immunol.* 78, 825-832, 1986.
- 3) 無江季次：気道過敏性。アレルギー 38, 1129-1135, 1989.
- 4) Broder, I. and Rogers, S.: Model of allergic bronchoconstriction in the guinea pig. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 14, 211-221, 1979.
- 5) Anderson, P. and Bergstrand, H.: Antigen-induced bronchial anaphylaxis in actively sensitized guinea pigs; effect of long-term treatment with sodium cromoglycate and aminophylline. *Br. J. Pharmacol.* 74, 601-609, 1981.
- 6) Popa, V., Douglas, J.S. and Bouhuys, A.: Airway responses to histamine, acetylcholine and propranolol in anaphylactic hypersensitivity in guinea pigs. *J. Allergy Clin. Immunol.* 51, 344-356, 1973.
- 7) 伊藤幸治：実験喘息。臨床免疫 17(Suppl 9), 138-148, 1985.
- 8) 無江季次：気管支喘息一特に動物種差からみて。

- 臨床免疫 18, 1072-1086, 1986.
- 9) 山内信和, 須甲松信, 伊藤幸治, 宮本昭正: モルモットの気管支喘息モデル. アレルギー 32, 1084-1092, 1983.
 - 10) Kallos, P. and Kallos, L.: Experimental asthma in guinea-pigs revisited. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 73, 77-85, 1984.
 - 11) 小林 淳, 星 朗, 北村 諭: 感作モルモットのアナフィラキシー反応における気道攣縮機序に関する研究. 日胸疾会誌 27, 29-33, 1989.
 - 12) Cartier, A., Thomson, N.C., Frith, P.A., Roberts, 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.
 - 13) Boulet, L.P., Latimer, K.M., Roberts, R., Juniper, E.F., Cockcroft, O.W., et al.: The effect of atropine on allergen-induced increases in bronchial responsiveness to histamine. *Am. Rev. Respir. Dis.* 130, 368-372, 1984.
 - 14) Ishida, K., Kelly, L.J., Thomson, R.J., Beattie, L. L. and Schellenberg, R.R.: Repeated antigen challenge induces airway hyperresponsiveness with tissue eosinophilia in guinea pigs. *J. Appl. Physiol.* 67, 1133-1139, 1989.

BRONCHIAL HYPERRESPONSIVENESS TO HISTAMINE FOLLOWING ANTIGEN CHALLENGES IN ACTIVELY SENSITIZED GUINEA PIGS

Sakae Aoki, Hideo Tsukagoshi and Motohiro Kurosawa

First Department of Internal Medicine, Gunma University School of Medicine

Guinea pigs were actively sensitized by intraperitoneally administered ovalbumin and challenged by intravenous injections of ovalbumin. Respiratory resistance and dynamic compliance were measured by pulmonary mechanics analyzer Buxco Model 6. Changes in resistance (ΔR) and compliance (ΔC) induced by intravenously administered histamine were investigated before and after the challenge. Responses to the histamine in sensitized guinea pigs were also compared with those in naive guinea pigs.

The following results were obtained.

- 1) A significant increase in ΔR by histamine administration was observed following the antigen challenge. ΔC by histamine administration showed a tendency to increase after the challenge.
- 2) A significant increase of ΔR by 7.2 $\mu\text{g/kg}$ histamine administration was observed in actively sensitized guinea pigs. However, ΔC by the histamine administration did not change in the sensitized animals.