

〔速報〕

モルモット実験喘息モデルにおける遅発型喘息反応の発現と
気道反応性亢進の Cyclosporin A による抑制

獨協医科大学アレルギー内科

福田 健 阿久津郁夫 沼尾利郎 本島新司 牧野荘平

著者らは、T細胞に選択的な免疫抑制剤である Cyclosporin A (CyA) は、モルモット喘息モデルにおける抗原吸入24時間後をピークとする持続性の気道粘膜内好酸球浸潤を抑制することを既に報告している。本研究では、CyAによる前処置が、遅発型喘息反応およびそれに続く気道反応性の亢進にどのような影響を与えるか検討した。吸入感作モルモットを内因性コーチゾル阻害剤および抗ヒスタミン剤で前処置して、大量の抗原を吸入させると、高率(80%)にLARが起り、抗原吸入24時間後のアセチルコリンに対する気道反応性も亢進した。一方、モルモットを感作開始時より CyA で処置すると、LARの発現は抑制された。24時間後の気道反応性は CyA 処置群でも亢進したが、変化の度合いは無処置群に比べ有意に小さく($p < 0.05$)、気道反応性の亢進も部分的にであるが抑制されることが示された。CyA はモルモットにおいても、T細胞の活性化を抑制し、リンホカインの産生を抑制することが知られているので、これらの結果は、LARの発現やそれに続く気道反応性の亢進においてT細胞由来の因子が何らかの役割を果たしていることを示唆する。

Key words: bronchial asthma — bronchial hyperresponsiveness — Cyclosporin A — guinea pig — LAR

緒言

て、この可能性を検討した。

好酸球は、LTC₄やPAFの産生細胞であること、また、その顆粒蛋白は気道粘膜を傷害することから、最近、気道粘膜内好酸球浸潤は遅発型喘息反応 (late asthmatic response, 以下LAR) やそれに続く気道過敏性亢進の一因として挙げられている¹⁾。したがって、気道粘膜への好酸球浸潤の抑制は、LARや気道過敏性亢進の抑制につながる可能性がある。一方、著者らは、T細胞に選択的な免疫抑制剤である Cyclosporin A (CyA) は、モルモット喘息モデルにおける、抗原吸入後24時間をピークとする持続性の好酸球浸潤を抑制することを見出し報告した²⁾。この結果は、CyAがLARおよびそれに続く気道反応性の亢進を抑制する可能性を示唆する。そこで本研究ではLARや気道反応性の亢進が起こり易い吸入感作モルモットを用い

方法

(1) 吸入感作モルモットの作成

吸入感作は寺師ら³⁾の方法に準じて行った。同時に10匹、ほぼ均一の抗原吸入曝露が可能であるプラスチック製抗原吸入装置に、体重約300gのHartley系雄モルモットを入れた後、10mg/mlのovalbumin(OA)を超音波ネブライザー (NE-U 10B, Omron社製) でエロゾル化して送り込み、1日に10分間、連続10日間、吸入曝露させ感作を成立させた。

(2) Cyclosporin A による前処置

CyAの効果発現には長期抗与が必要であるため⁴⁾、感作初日より抗原吸入チャレンジの前日まで、隔日に、50mg/kg/dayを経口投与した。コントロール群にはCyAの溶解液であるオリーブ油を同様の方法で投与した。CyA処置群とコントロール群の動物匹数は各々13匹、15匹であった。

(3) 実験スケジュール

実験期間はday 1~day 5の5日間とし、抗原吸入

Received: February 27, 1990

Accepted: May 10, 1990

Abbreviations: Ach acetylcholine; CyA Cyclosporin A; IAR immediate asthmatic response; LAR late asthmatic response; OA ovalbumin; PC provocative concentration

チャレンジを day 2でおこなった。LAR の出現をみるため、チャレンジ前、1, 3, 6, 9, 12時間後で呼吸抵抗を測定した。また、チャレンジ前後での気道反応性の変化をみるため、day 1, 3, 5で acetylcholine (Ach) に対する気道反応性を測定した。以上の実験の終了後、モルモットを脱血死させて気管・肺を摘出し、ホルマリン固定・保存した。

(4) 抗原吸入チャレンジ

LAR の出現率を高めるため、day 1および day 2の抗原吸入チャレンジ30分前に、内因性コーチゾル合成阻害剤である Metopirone, 10mg/kg 静脈内投与した。更に、大量の抗原負荷に耐えるよう2回目の Metopirone 静注後、抗ヒスタミン剤の Chlorpheniramine maleate を10mg/kg 腹腔内投与した。以上の前処置後、モルモットを呼吸抵抗測定用アニマルボックス内に入れ頭部のみを外に突出させて固定し、その頭部を Devilbiss 646ネブライザーと連結したエアロチャンパーで被った。OA, 10mg/ml を5l/min の気流量にてエロゾル化して1分間吸入させ、呼吸抵抗の値が baseline 値の2倍以上に達した場合はそこで終了とした。2倍以下のときは、20mg/ml, OA を更に1分間吸入させ、なお呼吸抵抗が2倍に達しない動物は実験から除外した。

(5) 呼吸抵抗の測定

呼吸抵抗の測定は、既に報告してある、Mead らの oscillation 法を一部改変した方法で行った。

(6) Ach に対する気道反応性の測定

Baseline の呼吸抵抗を測定後、156 μ g/ml より倍々に5000 μ g/ml まで濃度を増す Ach 溶液のエロゾルを各濃度1分間ずつ吸入させ、呼吸抵抗の値が baseline 値の2倍以上になるまで吸入させた。このようにして求めた Ach 濃度と呼吸抵抗の用量-反応曲線より、呼吸抵抗が baseline 値の2倍になるのに必要な Ach 濃度、PC₂₀₀-Ach を求めた。

(7) データの解析

実験結果は全て Mean $\pm$ SEM で表現した。有意差の検定は、Student's test を用い、 $p < 0.05$ の場合を有意とした。

結 果

(1) コントロール群および CyA 処置群における即時型喘息反応の比較

抗原吸入チャレンジによりコントロール群15匹全例、CyA 処置群13匹中12匹で、呼吸抵抗がチャレンジ前の2倍以上に達した。達しなかった1匹は即時型喘息反応(IAR)が起こらなかったものとして実験から除外した。両群における IAR の強さを、チャレンジ後の呼吸抵抗の変化率(チャレンジ後の呼吸抵抗値/前の呼吸抵抗値 $\times 100\%$)で表してみると、コントロール群、 $300 \pm 23\%$ ($n=15$)、CyA 処置群、 $274 \pm 42\%$ ($n=12$) で有意差はなかった。

(2) CyA による遅発型喘息反応の抑制

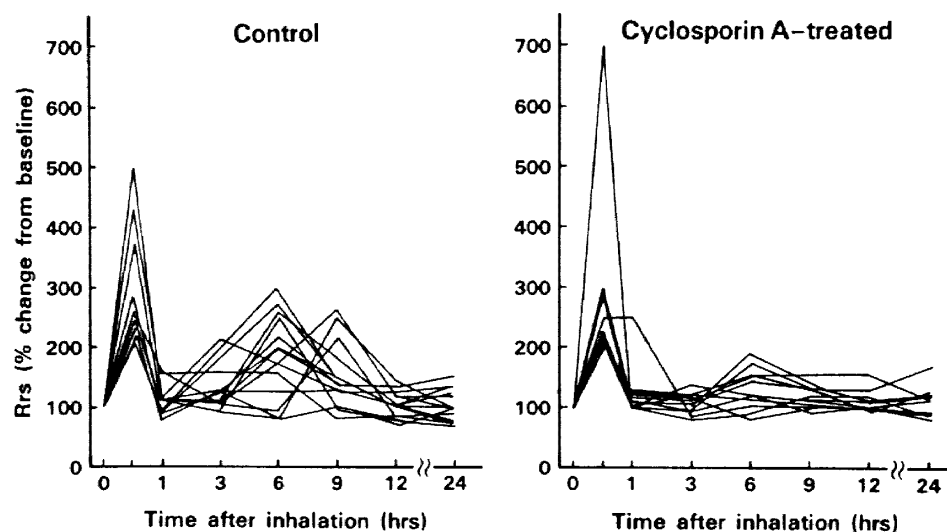


Fig. 1. Effect of cyclosporin A on the development of late asthmatic response in a guinea pig model of asthma. Percent changes in respiratory resistance (Rrs) from baseline after ovalbumin inhalation in each guinea pig are shown.

Table 1 Effect of Cyclosporin A on antigen-induced bronchial hyper-responsiveness to acetylcholine in guinea pigs

	PC ₂₀₀ -Ach (μg/ml)		
	Before	24 hrs	72 hrs
Control (N=15)	1866 ± 313	553 ± 80	1353 ± 196
Cyclosporin A-treated (N=12)	2473 ± 396	1499 ± 259	1876 ± 323

Control (N=15) vs Cyclosporin A-treated (N=12):
 Before: NS
 24 hrs: ** (Control vs Before), * (Cyclosporin A-treated vs Before), NS (Control vs Cyclosporin A-treated)
 72 hrs: ** (Control vs Before), NS (Cyclosporin A-treated vs Before), NS (Control vs Cyclosporin A-treated)

* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$

抗原吸入チャレンジ後の呼吸抵抗の変化率を Fig. 1 に示した。チャレンジ後 3～12 時間の間に、呼吸抵抗の変化率が再度 200% 以上に達した場合を LAR 陽性とする。コントロール群では 15 匹中 12 匹 (80%) が陽性であったが、CyA 処置群では陽性例は 1 匹もみられなかった。

(3) CyA による気道反応性亢進の抑制

Table 1 に、抗原チャレンジ前、チャレンジ 24、72 時間後の PC₂₀₀-Ach の成績を示した。抗原チャレンジ 24 時間後、PC₂₀₀-Ach はコントロール群、CyA 処置群共に有意に減少し、気道反応性の亢進が認められた。しかし、アセチルコリンに対する気道反応性の変化の度合い (前の PC₂₀₀-Ach/24 時間後の PC₂₀₀-Ach) を両群間で比較してみると、コントロール群、 4.00 ± 0.77 、CyA 処置群、 2.09 ± 0.40 で、CyA 処置群の方が有意に小さく ($p < 0.05$)、CyA 処置により部分的にであるが気道反応性の亢進は抑制されることが示された。一方、チャレンジ 72 時間後になると、PC₂₀₀-Ach は両群とも、24 時間後に比べ増加し、チャレンジ前の値との有意差は消失、気道反応性の亢進は回復の傾向にあることが示された。

考 察

LAR に対する薬剤の影響を検討するためには、高率に LAR を起こす動物モデルが必要である。寺師らは⁵⁾、モルモットにおいて、腹腔感作より吸入感作の方が LAR が起こる確率が高いことを、また、Sasaki らは⁶⁾、イヌにおいて、内因性コチゾル阻害剤の

Metopirone で前処置すると、本来起こりにくい LAR が起こるようになることを報告している。これらのことから、本実験では、吸入感作モルモットを用い、抗原吸入 24 時間前と 30 分前に Metopirone を投与し、更に大量の抗原負荷が可能なように抗ヒスタミン剤も抗与した。その結果、高率 (80%) に LAR が起こり、抗原吸入 24 時間後の気道反応性も亢進するモデルが得られた。

モルモットを感作開始時より CyA で処置すると、LAR の発現は抑制され、気道反応性の亢進も部分的にであるが有意に抑制された。CyA はモルモットにおいても、T 細胞の活性化を抑制し⁷⁾、リンホカインの産生を抑制する⁸⁾ことが知られているので、これらの結果は、LAR の発現やそれに続く気道反応性の亢進に、T 細胞由来の因子が何らかのかたちで関与していることを示唆する。最近、Frew らは⁹⁾、モルモット喘息モデルにおける抗原吸入後の気道の組織学的変化を、リンパ球抗原に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学法にて検討し、LAR の時相に一致して CD₃ 陽性リンパ球が増加すること、そのサブセットはヘルパー/インデューサー T 細胞である可能性が高いことを認め報告した。この結果は LAR と T リンパ球が密に関連することを示唆するものであるが、今回の CyA を用いた著者らの実験成績もこれを支持する。

CyA がなぜ、LAR や気道反応性の亢進を抑制するかは明らかではないが、可能性として、(1) IgE 抗体産生抑制、(2) 好酸球を主体とする炎症細胞浸潤の抑制が考えられる。LAR は IgE 抗体依存性であることが多くの研究によって示されており¹⁰⁾、IgE 抗体産生の減少は LAR の抑制につながると考えられる。しかし、

CyA がモルモットにおいて IgE 抗体産生を抑制するという確実な証拠はなく、また今回、抗ヒスタミン剤の存在下においても、明らかな IAR が認められたので、(1) による抑制は考えにくい。最近、好酸球を主体とした気道粘膜内の炎症細胞浸潤が LAR や気道反応性亢進の一因として挙げられている¹⁾。一方 CyA は抗原チャレンジによる好酸球浸潤を抑制する²⁾¹¹⁾。実際、本実験終了後に摘出した気管・肺組織を観察してみると、まだ preliminary な結果であるが、CyA 処置群では好酸球浸潤の程度が軽い。したがって、LAR や気道反応性亢進の抑制はこれによる可能性がある。しかし、抗原チャレンジ後の気道反応には多様な因子が関与しており、また、T 細胞自体も多様な因子を産生するので、CyA による抑制機序を説明するには更なる実験が必要と思われる。

最後に、今回の著者らの成績は、CyA のような T 細胞機能抑制剤が喘息の治療に有用である可能性を示唆しており、そのことを確かめるため、同系列の他の薬剤についても現在検討中である。

文 献

- 1) Kay, A.B.: Mediators and inflammatory cells in allergic disease. *Ann. Allergy* 59(Suppl.), 35-42, 1987.
- 2) 阿久津郁夫, 福田 健, 中島宏和, 沼尾利郎, 天下井正弘, 牧野荘平: モルモット気管支喘息モデルの好酸球浸潤に対するサイクロスポリン A の効果. *アレルギー* 38, 934, 1989.
- 3) 寺師義典, 湯川龍雄, 福田 健, 牧野荘平: 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基礎的研究 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.
- 4) Takizawa, H., Suko, M., Kobayashi, N., Shoji, S., Ohta, K., et al.: Experimental hypersensitivity pneumonitis in the mouse: Histologic and immunologic features and their modulation

with cyclosporin A. *J. Allergy Clin. Immunol.* 81, 391-400, 1988.

- 5) 寺師義典, 湯川龍雄, 寺師 薫, 本島新司, 福田健, 池森亨介, 牧野荘平: 感作モルモット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. 同種抗体受身感作モデルおよび抗原反復吸入能動感作モデルおよび腹腔能動感作モデルの比較検討. “気道過敏性研究の新展開”(滝島 任, 宮本昭正 編), 文光堂, 東京, pp.192-202, 1989.
- 6) Sasaki, H., Yanai, M., Shimura, S., Okayama, H., Aikawa, T., Sasaki, T. and Takishima, T.: Late asthmatic response to *Ascaris* antigen challenge in dogs treated with Metyrapone. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136, 1459-1465, 1987.
- 7) Reis, G.A. and Shevach, E.M.: Effect of cyclosporin A on T cell function in vitro: The mechanism of suppression of T cell proliferation depends on the nature of the T cell stimulus as well as the differentiation state of the responding T cell. *J. Immunol.* 129, 2360-2367, 1982.
- 8) Thomson, A.W., Moon, D., Geczy, C. and Nelson, D.S.: Cyclosporin A inhibits lymphokine production but not the responses of macrophages to lymphokines. *Immunology* 48, 291-299, 1983.
- 9) Frew, A.J., Moqbel, R., Azzawi, M., Hartnell, A., Barkans, J., et al.: T lymphocytes and eosinophils in allergen-induced late-phase asthmatic reactions in the guinea pig. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141, 407-413, 1990.
- 10) Lemanske, R.F. and Kaliner, J.M.A.: Late-phase allergic reactions. In “Allergy Principles and Practice” 3rd ed. (ed. by J.E. Middleton, C. E., Reed, E.F., Ellis, J.N.F. Adkinson and J.W. Yunginger), C.V. Mosby Co., St. Louis, pp.224-246, 1988.
- 11) Etienne, A., Shoulard, C., Thonier, F. and Braquet, B.: Modulation by drugs of eosinophil recruitment induced by immune challenge in the rat. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 88, 216-221, 1989.

INHIBITION OF ANTIGEN-INDUCED LATE ASTHMATIC RESPONSE AND BRONCHIAL HYPERRESPONSIVENESS BY CYCLOSPORIN A

Takeshi Fukuda, Ikuo Akutsu, Toshio Numao and Sohei Makino

Department of Medicine and Clinical Immunology, Dokkyo University School of Medicine

We have previously demonstrated that Cyclosporin A (CyA), a T lymphocyte-selective immunosuppressive agent, reduced the delayed-phase bronchial eosinophil infiltration after antigen challenge in a guinea pig model of asthma. In the present study, we studied the effects of CyA on antigen-induced late asthmatic response (LAR) and bronchial hyperresponsiveness following LAR. Guinea pigs immunized by repeated exposure to aerosolized ovalbumin (OA) were intravenously given metopirone, a cortisol synthesis inhibitor, 24 hours before and 30 minutes before antigen challenge, and to prevent death from immediate severe bronchoconstriction, chlorpheniramine maleate was also injected. After antigen challenge with high dose of OA, LAR occurred in twelve of fifteen animals (80%) and the bronchial responsiveness to acetylcholine was significantly increased. However, when guinea pigs were treated with CyA from the beginning of immunization period, the development of LAR was completely inhibited, although similar magnitude of immediate bronchoconstriction was observed, and a subsequent increase in bronchial responsiveness was partially but significantly blocked. Since CyA has been shown to suppress activation of guinea pig T lymphocytes and their production of lymphokines, these results suggest that T cell factor(s) may be important for the elicitation of LAR and the antigen-induced bronchial hyperresponsiveness.
