

# モルモット蒸留水吸入誘発気管支収縮モデルの作製 とヒスタミンおよびタキキニンの関与

|       |                                                                                             |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2017-10-04<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者:<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/2297/9259">http://hdl.handle.net/2297/9259</a>               |

## モルモット蒸留水吸入誘発気管支収縮モデルの作製と ヒスタミンおよびタキキニンの関与

金沢大学医学部医学科内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

雨 宮 徳 直

喘息患者に超音波ネブライザーによって蒸留水を吸入負荷すると、喘息発作を生じることはよく知られている。しかし、健常者では蒸留水吸入負荷によって気管支収縮は起こらず、この現象は喘息患者に特異的であり、喘息の病態解明に重要な役割を果たすものと考えられている。しかし、その機序はまだ完全に解明されていない。本研究では、蒸留水吸入誘発気管支収縮の機序を解明するために、モルモット超音波ネブライザーによる蒸留水吸入誘発気管支収縮 (ultrasonically nebulized distilled water-induced bronchoconstriction, UNDW-IB) モデルの作製を試み、この反応における自律神経系、ヒスタミンおよびタキキニンの関与を検討した。受動感作したモルモットを麻酔し、人工換気下に抗原を吸入負荷して即時型気管支収縮を惹起した。抗原吸入20分後に超音波ネブライザーによって蒸留水を吸入負荷すると、著明な気管支収縮反応が生じることを見いだした。一方無感作モルモットに抗原吸入の20分後に蒸留水を吸入した場合や、感作モルモットに抗原の代わりに生理食塩水を吸入した20分後に蒸留水を吸入しても、気管支収縮は生じなかった。抗原吸入15分後にアトロピン 10mg/kg を静脈内投与したが、UNDW-IB は抑制されなかった。サルブタモール 5mg/kg を抗原吸入15分後に静脈内投与すると、UNDW-IB は完全に抑制された。本モデルにおけるヒスタミンの関与を明らかにするために、抗ヒスタミン薬であるジフェンヒドラミン (10, 1.0および 0.1mg/kg) およびクロルフェニラミン (1.0, 0.1および 0.01mg/kg) を抗原吸入15分後に静脈内に投与した。両薬剤とも用量依存的に蒸留水吸入 1 および 2 分後の気管支収縮反応を有意に抑制した。タキキニンの関与に関する検討では、NK<sub>1</sub> および NK<sub>2</sub> 受容体拮抗薬である FK224 (10および 1.0mg/kg) を抗原吸入15分後に静脈内投与すると、UNDW-IB は用量依存的に有意に抑制された。また、選択的 NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬である FK888 (10および 1.0mg/kg) を抗原吸入15分後に静脈内投与すると、UNDW-IB は用量依存的に有意に抑制された。以上の結果は、アレルギー反応によって蒸留水吸入に対する気道反応性が獲得されうること、ヒスタミンやタキキニンが UNDW-IB の一部に関与していることを示唆する。

**Key words** ultrasonically nebulized distilled water-induced bronchoconstriction (UNDW-IB), histamine, tachykinin, guinea pigs

霧の出た日に、気管支喘息患者ではその病型を問わず高頻度に喘息発作が誘発される<sup>1)</sup>ことから端を発し、気道過敏性測定の一つとして超音波ネブライザーによる蒸留水の吸入負荷が行われるようになった。今日では、超音波ネブライザーによる蒸留水の吸入負荷は、気管支喘息の患者で気管支収縮を引き起こすことは広く知られている。またこの現象は喘息患者に特異的な反応であり、健常人では気管支収縮を引き起こさない<sup>2)</sup>。したがって、超音波ネブライザーによる蒸留水吸入誘発気管支収縮 (ultrasonically nebulized distilled water-induced bronchoconstriction, UNDW-IB) は健常人と喘息患者の本質的な気道反応性の違いを表していると考えられ、この機序解明は喘息の機序解明に重大な役割を果たすと考えられる。これまでに機序解明のために多くの臨床的検討が報告されているものの、その機序については明らかでない。UNDW-IB の動物モデルの作製は、この UNDW-IB の機序解明に有用と考えられるが、これまでにこの動物モデルに関する報告はみられない。そこで

今回、UNDW-IB の機序解明を目的として、モルモットの UNDW-IB モデルの作製を試み、各種自律神経作動薬の UNDW-IB 抑制効果を検討した。さらに本モデルにおけるヒスタミンおよびタキキニンの関与についても検討した。

### 対象および方法

#### I. 実験動物

体重 350-450g のハートレー系雄性モルモット (三共ラボ、東京) 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%) で一週間以上飼育し、肉眼的観察により健常と判断した動物を実験に使用した。

#### II. モルモットの抗卵白アルブミン (ovalbumin, OA) 血清の作製

Santives ら<sup>3)</sup>の方法に従って抗 OA 血清を作製した。すなわち総量 500μg の OA を完全フロインドアジュバント (complete Freund's adjuvant, CFA) にてエマルジョンの状態にし、モル

平成8年11月27日受付, 平成8年12月27日受理

Abbreviations: CFA, Complete Freund's adjuvant; CP, chlorpheniramine maleate; DH, diphenhydramine hydrochloride; DMSO, dimethyl sulfoxide; DW, distilled water; i. v., intravenous administration; NKA, neurokinin A; NKB, neurokinin B; NS, nedocromil sodium; OA, ovalbumin; Pao, pressure at the airway opening; SCG, sodium

モットの両側鼠径部、両側腋窩部、項部の5ヶ所に分けて皮内注射した。2週間後同様の処置によりブースターを行なった。さらに2週間後採血し、血清を分離し同一容器に集めて均一化した後、小スピッツに分注して $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。作製した抗OA血清の4時間、24時間、および7日後の受身皮膚アナフィラキシー反応 (passive cutaneous anaphylaxis, PCA) による抗体価はそれぞれ12800倍、6400倍、および512倍であった。受動感作は実験の5ないし7日前に、抗OA血清1ml/kgを腹腔内投与することにより行なった。

### Ⅲ. 実験動物および測定項目

実験は、既報<sup>9)</sup>の実験装置および方法を用いて行なった(図1)。すなわちペントバルビタール (75mg/kg) の腹腔内投与に

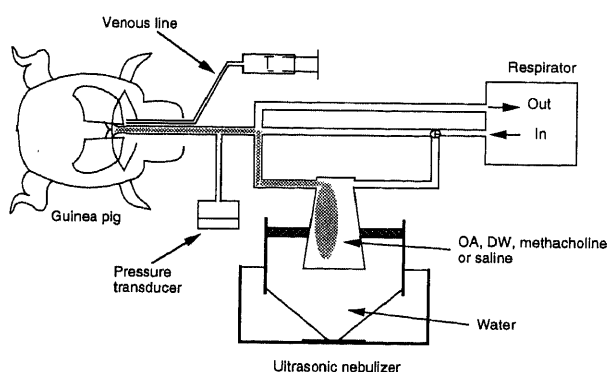


Fig. 1. Design of the experimental system. An anesthetized guinea pig was placed in a supine position and the trachea was cannulated with polyethylene tube. The animal was artificially ventilated by a small animal respirator and nebulized with ovalbumin (OA), distilled water (DW), methacholine or saline. Pressure at the airway opening (Pao) was continuously recorded to estimate the overall index of bronchial response by an X-Y recorder.

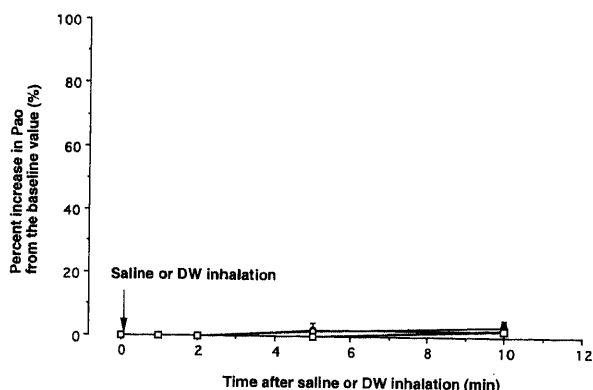


Fig. 2. Bronchial response to saline or distilled water (DW) inhalation in sensitized or non-sensitized guinea pigs. Each point indicates mean value ( $\pm$ SEM).  $\square$ , DW inhalation in sensitized animals ( $n=6$ );  $\circ$ , saline inhalation in sensitized animals ( $n=6$ );  $\blacksquare$ , DW inhalation in non-sensitized animals ( $n=6$ );  $\bullet$ , saline inhalation in non-sensitized animals ( $n=6$ ).

よってモルモットを麻酔した後、仰臥位にて胸骨上縁より一横指頭側で気管切開を行なって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 Co, Inc, South Natic, USA) にて陽圧呼吸を行なった。気管カニューレはポリエチレン製で外径2.5mm、内径2.1mmである。1回換気量は10ml/kg、換気回数は毎分60回とした。気管支収縮反応の指標として気管カニューレの側圧 (pressure at the airway opening, Pao) を差圧トランスデューサー TP-603T (日本光電、東京) を用いて測定した。Pao は実験中はX-Yレコーダーに連続的に記録し、実験終了後1分間隔で値を読み取った。Pao は気管支収縮反応を中枢側から末梢側までの総和として反映する指標である<sup>9)</sup>。気管支収縮反応は抗原およびその対照としての生理食塩水吸入負荷直前のPao値を基礎値として、この基礎値に対する増加率として表した。薬物の吸入投与は、南ら<sup>10)</sup>が開発した超音波吸入器を改良した小動物用吸入負荷装置を使用し、呼吸状態を変化させることなく安静換気下で行なった。なお、モルモットに各種薬剤の溶液および対照としての生理食塩水または溶媒のみを静脈内投与する際は、容量負荷を一定にするため1ml/kgの投与量とした。

### Ⅳ. 実験方法

#### 1. UNDW-IB モデルの作製

まず初めに、人工換気を15分間行いPaoの安定を確認した後、無感作モルモット6匹に蒸留水、6匹に生理食塩水を30秒間吸入し、Paoの変化を観察した。同様に、あらかじめ受動感作を行なったモルモット6匹に蒸留水、6匹に生理食塩水を30秒間吸入し、Paoの変化を観察した。次に、無感作モルモット16匹に抗原吸入負荷を行なった。吸入抗原液はOAを生理食塩水に溶解して0.1mg/mlの濃度に調整したものを使用した。抗原吸入20分後に、8匹に蒸留水を、8匹に生理食塩水を30秒間吸入し、Paoの変化を観察した。同様に、あらかじめ受動感作を行なったモルモット23匹に抗原吸入負荷を行なった20分後に、14匹に蒸留水を、9匹に生理食塩水を30秒間吸入し、Paoの変化を観察した。

#### 2. メサコリン吸入気管支収縮時の蒸留水吸入負荷

気管支収縮そのものによってUNDW-IBが誘導されるかどうかを検討するため、メサコリン (0.1mg/kg) の吸入によって気管支収縮を惹起し、その5および20分後に蒸留水または生理食塩水の吸入負荷を行なった。

#### 3. 自律神経作動薬のUNDW-IB抑制効果

##### 1) 副交感神経遮断薬の効果

本モデルにおける副交感神経系の関与を明らかにするために、あらかじめ受動感作したモルモットに、代表的な非選択的副交感神経遮断薬であるアトロピン (10mg/kg) ( $n=7$ ) または生理食塩水 ( $n=7$ ) を抗原吸入の15分後、すなわち蒸留水吸入の5分前に静脈内投与し、その後のUNDW-IBに及ぼす効果を検討した。

##### 2) 交感神経刺激薬の効果

交感神経刺激薬のUNDW-IB抑制効果を検討する目的で、あらかじめ受動感作したモルモットに、選択的 $\beta_2$ 刺激薬であり臨床で気管支拡張薬として使用されているサルブタモール (5mg/kg) ( $n=9$ ) または生理食塩水 ( $n=9$ ) を抗原吸入の15分

後、すなわち蒸留水吸入の5分前に静脈内投与し、その後の UNDW-IB に及ぼす効果を検討した。

#### 4. UNDW-IB におけるヒスタミンの関与

ヒスタミンの UNDW-IB への関与を明らかにするために、UNDW-IB に対する抗ヒスタミン薬の影響を検討した。抗ヒスタミン作用以外の薬剤特異的作用の関与を否定するために、ジフェンヒドラミン (diphenhydramine hydrochloride, DH) とクロルフェニラミン (chlorpheniramine maleate, CP) の異なる二種類の抗ヒスタミン薬を使用した。

##### 1) DH の影響

あらかじめ受動感作したモルモットに、生理食塩水にて希釈した10 (n=9), 1.0 (n=8) あるいは 0.1mg/kg (n=9) の DH または生理食塩水 (n=10) を抗原吸入の15分後、すなわち蒸留水吸入の5分前に静脈内投与し、その後の UNDW-IB に及ぼす効果を検討した。

##### 2) CP の影響

あらかじめ受動感作したモルモットに、生理食塩水にて希釈した1.0 (n=10), 0.1 (n=10) あるいは 0.01mg/kg (n=7) の CP または生理食塩水 (n=10) を抗原吸入の15分後、すなわち蒸留水吸入の5分前に静脈内投与し、その後の UNDW-IB に及ぼす効果を検討した。

#### 5. UNDW-IB におけるタキキニンの関与

タキキニンの UNDW-IB への関与を検討するため、NK<sub>1</sub> および NK<sub>2</sub> 受容体拮抗薬である FK-224, 選択的 NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬である FK-888 の UNDW-IB に対する影響を検討した。

##### 1) FK-224 の影響

FK-224 は非水溶性のため、溶媒にジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO) を使用した。あらかじめ受動感作したモルモットに、DMSO にて希釈した10 (n=11) あるいは 1.0mg/kg (n=13) の FK-224 または DMSO (n=11) を抗原吸入の15分後、すなわち蒸留水の吸入5分前に静脈内投与し、その

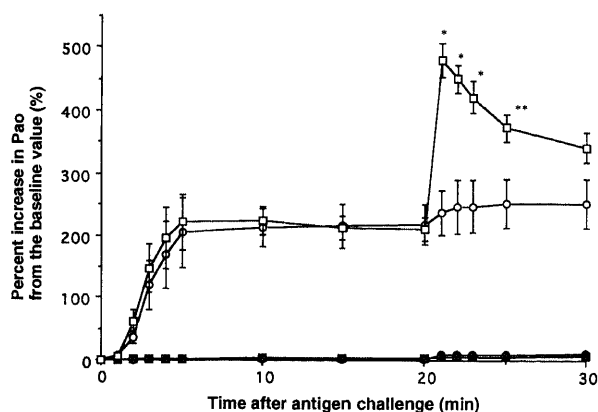


Fig. 3. Time course of percent increase in Pao after ovalbumin (OA) challenge followed by inhalation of distilled water (DW) or saline in passively sensitized or non-sensitized guinea pigs. Each point indicates mean value ( $\pm$ SEM).  $\square$ , DW inhalation 20 min after OA provocation in passively sensitized animals (n=14);  $\circ$ , saline inhalation 20 min after OA provocation in passively sensitized animals (n=9);  $\blacksquare$ , DW inhalation 20 min after OA provocation in non-sensitized animals (n=8);  $\bullet$ , saline inhalation 20 min after OA provocation in non-sensitized animals (n=8). \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$  compared with passive sensitization and saline inhalation group analyzed by Mann-Whitney's U test.

後の UNDW-IB に及ぼす効果を検討した。

##### 2) FK-888 の影響

FK-888 は非水溶性のため、溶媒に DMSO を使用した。あらかじめ受動感作したモルモットに、DMSO にて希釈した10 (n=7) あるいは 1.0mg/kg (n=7) の FK-888 または DMSO (n=9) を抗原吸入の15分後、すなわち蒸留水の吸入5分前に静脈内投与し、その後の UNDW-IB に及ぼす効果を検討した。

#### V. 使用薬物

使用した薬物は以下のとおりである。すなわち OA (Sigma, Basel, Switzerland), CFA (Difco Laboratories, New York, USA), ペントバルビタール (pentobarbiturate) (ネプタール®注射液, Abbott Laboratories, Chicago, USA), メサコリン (methacholine) (和光純薬工業, 大阪), アトロピン (atropine sulfate monohydrochloride) (和光純薬工業), サルブタモール (salbutamol sulfate) (ベネトリン®吸入液, 三共, 東京), DH (Sigma), CP (Sigma), FK-224 (藤沢薬品工業, 大阪より提供), FK-888 (藤沢薬品工業), DMSO (和光純薬工業)。

#### VI. 統計学的解析

成績はすべて平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。抗原または生理食塩水吸入前の Pao の基礎値からの任意の時点の Pao の増加率または Pao の最大増加率の差の検定および蒸留水吸入時の Pao からの蒸留水吸入後の Pao の増加率の差の検定には、3 群以上の場合は Kruskal-Wallis 検定を、2 群の場合は Mann-Whitney のU検定を用いた。各実験における抗原吸入後の Pao の基礎値からの増加率または蒸留水吸入時の Pao からの蒸留水吸入後の Pao の増加率の経時的変化に関する差の検定には、繰り返し測定のある ANOVA を用いた。両側検定で危険率 5 % 以下を有意差ありと判定した。

#### 成 績

##### I. UNDW-IB モデルの作成

無感作モルモットに蒸留水または生理食塩水を吸入した群の、吸入前の Pao の値はそれぞれ  $9.2 \pm 0.3$ ,  $9.0 \pm 0.0$  cmH<sub>2</sub>O であった。感作モルモットに蒸留水または生理食塩水を吸入した群の、吸入前の Pao の値はそれぞれ  $9.0 \pm 0.3$ ,  $9.2 \pm 0.4$  cmH<sub>2</sub>O であった。これら蒸留水または生理食塩水吸入前の Pao の基礎

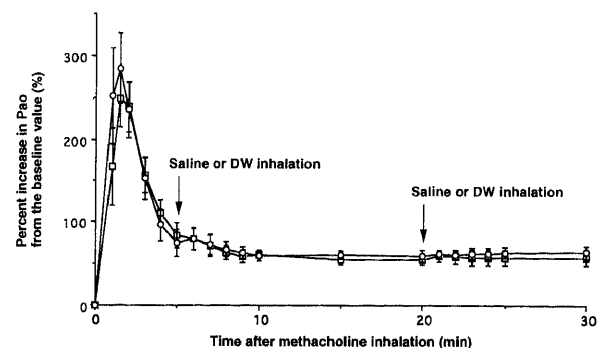


Fig. 4. Time course of percent increase in Pao from the premethacholine value after inhalation of distilled water (DW) (n=9) or saline (n=9) 5 and 20 min after aerosolized provocation with 0.1 mg/ml of methacholine in non-sensitized guinea pigs. Each point indicates mean value ( $\pm$ SEM).  $\circ$ , saline inhalation;  $\square$ , DW inhalation.

値は4群間に有意差を認めなかった。図2にPaoの基礎値に対する増加率の時間経過を示した。4群間で、蒸留水または生理食塩水吸入後のPaoの増加率に有意差はなかった。

無感作モルモットに抗原を吸入し、その20分後に蒸留水または生理食塩水を吸入した群の抗原吸入前のPaoの値は、それぞれ $9.1 \pm 0.2$ ,  $9.1 \pm 0.2 \text{ cmH}_2\text{O}$ であった。感作モルモットに抗原を吸入し、その20分後に蒸留水または生理食塩水を吸入した群の抗原吸入前のPaoの値は、それぞれ $9.4 \pm 0.2$ ,  $9.3 \pm 0.3 \text{ cmH}_2\text{O}$ であった。これらPaoの基礎値は4群間に有意差を認めなかった。図3に各群のPaoの基礎値に対する増加率の時間経過を示した。無感作モルモットでは、抗原吸入後に有意なPaoの増加はみられず、抗原吸入の20分後に蒸留水あるいは生理食塩水吸入を行なったときも有意なPaoの増加はみられなかった。感作モルモットでは、抗原吸入後のPaoの増加率の最大値は、蒸留水吸入群および生理食塩水吸入群で、それぞれ $223.5 \pm 22.7$ ,  $218.1 \pm 32.9\%$ であった。この値に有意差は認めなかった。蒸留水あるいは生理食塩水吸入直前のPaoの増加率は、それぞれ $210.8 \pm 19.5$ ,  $218.1 \pm 32.9\%$ であった。この値に有意差は認めなかった。蒸留水吸入時すなわち抗原吸入20分後のPaoの増加率の経時的変化は2群間で有意差を認めた ( $p < 0.01$ )。各時間毎にPaoの増加率を比較すると、蒸留水吸入群のPaoの増加率は、蒸留水吸入の1, 2および3分後は  $p < 0.01$  の危険率で、5分後は  $p < 0.05$  の危険率で、生理食塩水吸入群のPaoの増加率と比較して有意に大きかった。

## II. メサコリン吸入気管支収縮時の蒸留水吸入負荷

メサコリン ( $0.1 \text{ mg/kg}$ ) 吸入による気管支収縮の5および20分後に蒸留水または生理食塩水を吸入したときのPaoの基礎値に対する増加率の時間経過を図4に示す。蒸留水と生理食塩水の吸入後のPaoの増加率に有意な差は認められなかった。

## III. 自律神経作動薬のUNDW-IB抑制効果

### 1. 副交感神経遮断薬の効果

抗原吸入前のPaoの基礎値は、抗原吸入15分後に  $10 \text{ mg/kg}$  のアトロピンまたは生理食塩水を静脈内投与した各群において、それぞれ $9.4 \pm 0.4$ ,  $9.2 \pm 0.1 \text{ cmH}_2\text{O}$ であり、2群間に有意差を認めなかった。2群におけるPaoの増加率の時間経過を図5に示す。抗原吸入後のPaoの増加率の最大値は、抗原吸入15

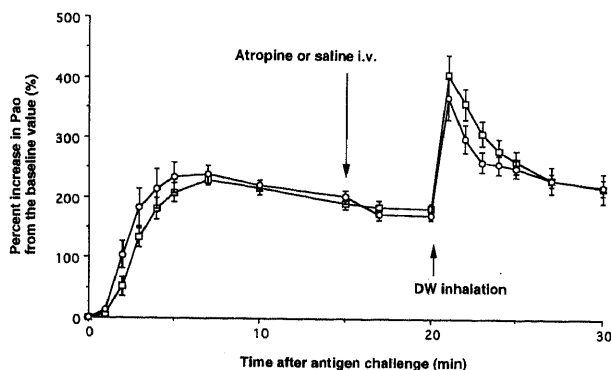


Fig. 5. Time course of percent increase in Pao from the pre-ovalbumin (OA) provocation value after inhalation of distilled water (DW) following OA challenge in passively sensitized guinea pigs treated intravenously with saline ( $n=7$ ) or  $10 \text{ mg/kg}$  of atropine sulfate ( $n=7$ ). Each point indicates mean value ( $\pm \text{SEM}$ ).  $\circ$ , atropine treatment;  $\square$ , saline treatment. i.v., intravenous administration

分後にアトロピンまたは生理食塩水を静脈内投与した各群において、それぞれ $239.5 \pm 15.1$ ,  $229.5 \pm 7.8\%$ であり、2群間に有意差を認めなかった。蒸留水吸入後のPaoの増加率の経時的変化にも2群間に有意差を認めなかった。蒸留水吸入後のPaoの最大増加率は、アトロピンまたは生理食塩水を静脈内投与した各群において $367.3 \pm 35.1$ ,  $405.2 \pm 34.2\%$ であり、2群間に有意差を認めなかった。

### 2. 交感神経刺激薬の効果

抗原吸入前のPaoの基礎値は、抗原吸入15分後に  $10 \text{ mg/kg}$  のサルブタモールまたは生理食塩水を静脈内投与した各群において、それぞれ $9.0 \pm 0.3$ ,  $9.1 \pm 0.1 \text{ cmH}_2\text{O}$ であり、2群間に有意差を認めなかった。2群におけるPaoの増加率の時間経過を図6に示す。抗原吸入後のPaoの増加率の最大値は、抗原吸入15分後にサルブタモールまたは生理食塩水を静脈内投与した各

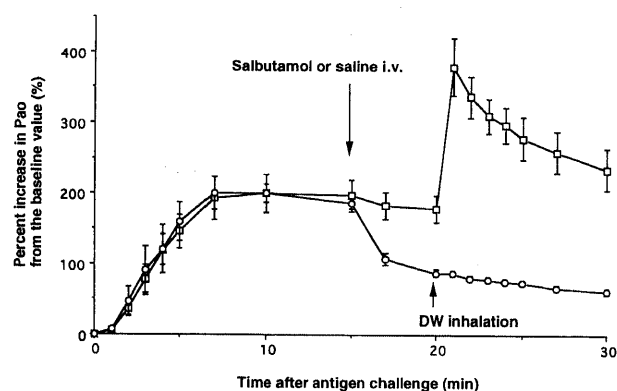


Fig. 6. Time course of percent increase in Pao from the pre-ovalbumin (OA) provocation value after inhalation of distilled water (DW) following OA challenge in passively sensitized guinea pigs treated intravenously with saline ( $n=9$ ) or  $5 \text{ mg/kg}$  of salbutamol ( $n=9$ ). Each point indicates mean value ( $\pm \text{SEM}$ ).  $\circ$ , salbutamol treatment;  $\square$ , saline treatment.

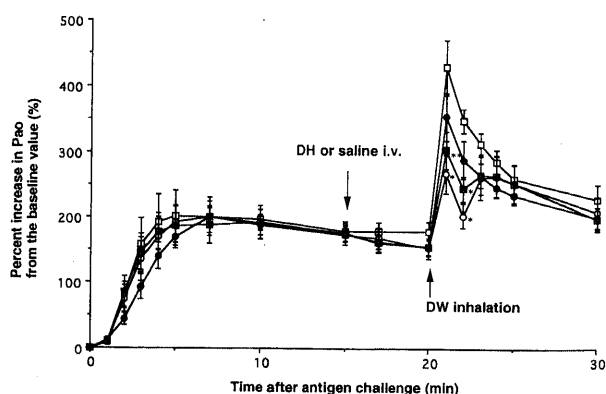


Fig. 7. Time course of percent increase in Pao from the pre-ovalbumin (OA) provocation value after inhalation of distilled water (DW) following OA challenge in passively sensitized guinea pigs treated intravenously with diphenhydramine hydrochloride (DH) or vehicle (saline) 5 min before the DW inhalation (15 min after the OA challenge). Each point indicates mean value ( $\pm \text{SEM}$ ).  $\circ$ , treated with  $10 \text{ mg/kg}$  of DH ( $n=9$ );  $\blacksquare$ , treated with  $1.0 \text{ mg/kg}$  of DH ( $n=8$ );  $\bullet$ , treated with  $0.1 \text{ mg/kg}$  of DH ( $n=9$ );  $\square$ , treated with vehicle ( $n=10$ ). \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$  compared with vehicle treatment group analyzed by Mann-Whitney's U test.

群において、それぞれ $201.0 \pm 13.2$ ,  $200.3 \pm 27.5\%$ であり、2群間に有意差を認めなかった。サルブタモール投与後より Pao の増加率が経時的に低下し、蒸留水吸入を行なっても Pao の増加率に上昇はみられず、サルブタモールは UNDW-IB を完全に抑制した。

#### IV. UNDW-IB におけるヒスタミンの関与

##### 1. DH の影響

抗原吸入前の Pao の値は、抗原吸入15分後に10, 1.0あるいは0.1mg/kg の DH または生理食塩水を静脈内投与した各群において、それぞれ $8.4 \pm 0.3$ ,  $8.5 \pm 0.3$ ,  $8.7 \pm 0.2$ ,  $8.5 \pm 0.3 \text{ cmH}_2\text{O}$ であり、4群間に有意差を認めなかった。4群における Pao の増加率の時間経過を図7に示す。抗原吸入後の Pao の最大増加率は、10, 1.0あるいは0.1mg/kg の DH または生理食塩水を静脈内投与した各群において、それぞれ $200.2 \pm 24.4$ ,  $192.7 \pm 25.4$ ,  $200.6 \pm 12.8$ ,  $200.8 \pm 39.4\%$ であり、4群間に有意差を認めなかった。蒸留水の吸入直前、すなわち抗原吸入20分後の Pao の増加率は、10, 1.0あるいは0.1mg/kg の DH または生理食塩水を静脈内投与した各群において、それぞれ $152.4 \pm 16.4$ ,  $154.5 \pm 14.3$ ,  $154.1 \pm 12.1$ ,  $179.1 \pm 14.6\%$ であり、4群間に有意差を認めなかった。蒸留水吸入後の Pao の増加率の経時変化は、4群間に有意差を認めなかった。しかし、蒸留水吸入1分後の Pao の増加率は、10, 1.0あるいは0.1mg/kg の DH または生理食塩水を静脈内投与した各群において、それぞれ $267.7 \pm 29.6$ ,  $303.9 \pm 28.4$ ,  $354.1 \pm 36.6$ ,  $429.8 \pm 42.0\%$ であり、4群間に有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。蒸留水吸入1分後の Pao の増加率は、生理食塩水投与群と比較して、10mg/kg の DH 投与群では  $p < 0.01$  の危険率で、1.0mg/kg の DH 投与群では  $p < 0.05$  の危険率で有意に低値を示した。また、蒸留水吸入2分後の Pao の増加率は、10, 1.0あるいは0.1mg/kg の DH または生理食塩水を静脈内投与した各群において、それぞれ $203.4 \pm 18.9$ ,  $244.9 \pm 18.7$ ,  $289.7 \pm 28.7$ ,  $348.5 \pm 18.5\%$

であり、4群間に有意差を認めた ( $p < 0.01$ )。蒸留水吸入2分後の Pao の増加率は、生理食塩水投与群と比較して、10mg/kg, 1.0mg/kg の DH 投与群ともに  $p < 0.01$  の危険率で有意に低値を示した。

##### 2. CP の影響

抗原吸入前の Pao の値は、抗原吸入15分後に1.0, 0.1あるいは0.01mg/kg の CP または生理食塩水を静脈内投与した各群において、それぞれ $9.0 \pm 0.2$ ,  $8.4 \pm 0.2$ ,  $8.9 \pm 0.3$ ,  $9.1 \pm 0.3 \text{ cmH}_2\text{O}$ であり、4群間に有意差を認めなかった。4群における Pao の増加率の時間経過を図8に示す。抗原吸入後の Pao の最大増加率は、1.0, 0.1あるいは0.01mg/kg の CP または生理食塩水を静脈内投与した各群において、それぞれ $207.1 \pm 11.0$ ,  $202.0 \pm 18.5$ ,  $221.1 \pm 19.5$ ,  $206.6 \pm 22.0\%$ であり、4群間に有意差を認めなかった。蒸留水の吸入直前、すなわち抗原吸入20分後の Pao の増加率は、1.0, 0.1あるいは0.01mg/kg の CP または生理食塩水を静脈内投与した各群において、それぞれ $167.5 \pm 12.4$ ,  $179.8 \pm 16.1$ ,  $177.4 \pm 13.6$ ,  $184.8 \pm 16.0\%$ であり、4群間に有意差を認めなかった。蒸留水吸入後の Pao の増加率の経時変化は、4群間に有意差を認めなかった。しかし、蒸留水吸入1分後の Pao の増加率は、1.0, 0.1あるいは0.01mg/kg の CP または生理食塩水を静脈内投与した各群において、それぞれ $277.5 \pm 19.6$ ,  $316.2 \pm 36.4$ ,  $354.6 \pm 36.2$ ,  $408.2 \pm 37.1\%$ であり、4群間に有意差を認めなかったもの ( $p = 0.068$ )、生理食塩水投与群と比較して、1.0mg/kg の CP 群では  $p < 0.01$  の危険率で有意に低値を示した。また、蒸留水吸入2分後の Pao の増加率は、1.0, 0.1あるいは0.01mg/kg の CP または生理食塩水を静脈内投与した各群において、それぞれ $222.3 \pm 19.6$ ,  $251.5 \pm 23.0$ ,  $291.5 \pm 18.7$ ,  $357.1 \pm 35.2\%$ であり、4群間に有意差を認めた ( $p < 0.01$ )。蒸留水吸入2分後の Pao の増加率は、生理食塩水投与群と比較して、1.0mg/kg の CP 投与群では  $p < 0.01$  の危険率で、0.1mg/kg の CP 投与群では  $p < 0.05$  の危険率で有意に低値を示した。

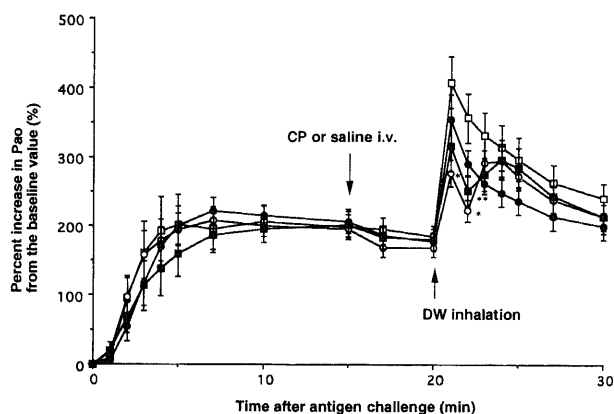


Fig. 8. Time course of percent increase in Pao from the pre-ovalbumin (OA) provocation value after inhalation of distilled water (DW) following OA challenge in passively sensitized guinea pigs treated intravenously with chlorpheniramine maleate (CP) or vehicle (saline) 5 min before the DW inhalation (15 min after the OA challenge). Each point indicates mean value ( $\pm$ SEM).  $\circ$ , treated with 1.0 mg/kg of CP ( $n=10$ );  $\blacksquare$ , treated with 0.1 mg/kg of CP ( $n=10$ );  $\bullet$ , treated with 0.01 mg/kg of CP ( $n=7$ );  $\square$ , treated with vehicle ( $n=10$ ). \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$  compared with vehicle treatment group analyzed by Mann-Whitney's U test.

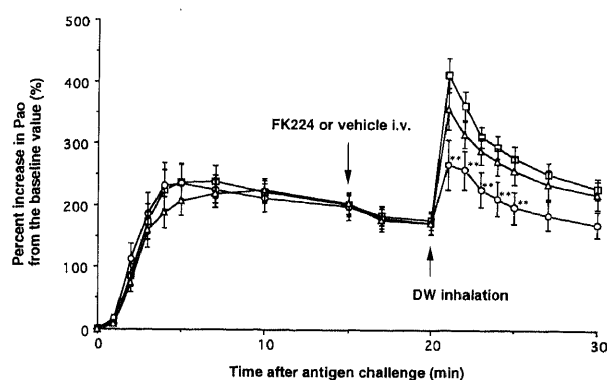


Fig. 9. Time course of percent increase in Pao from the pre-ovalbumin (OA) provocation value after inhalation of distilled water (DW) following OA challenge in passively sensitized guinea pigs treated intravenously with FK224 or vehicle (dimethylsulfoxide, DMSO) 5 min before the DW inhalation (15 min after the OA challenge). Each point indicates mean value ( $\pm$ SEM).  $\circ$ , treated with 10 mg/kg of FK224 ( $n=11$ );  $\triangle$ , treated with 1.0 mg/kg of FK224 ( $n=13$ );  $\square$ , treated with vehicle ( $n=11$ ). \*\*  $p < 0.05$  compared with vehicle treatment group analyzed by Mann-Whitney's U test.

## V. UNDW-IB におけるタキキニンの関与

### 1. FK224 の影響

抗原吸入前の Pao の値は、抗原吸入の15分後に10あるいは1.0mg/kg の FK224 または溶媒のみを静脈内投与した各群において、それぞれ $9.0 \pm 0.2$ ,  $9.0 \pm 0.2$ ,  $9.0 \pm 0.1 \text{ cmH}_2\text{O}$  であり、3群間に有意差を認めなかった。3群における Pao の増加率の時間経過を図9に示す。抗原吸入後の Pao の最大増加率は、10あるいは1.0mg/kg の FK224 または溶媒のみを静脈内投与した各群において、それぞれ $234.5 \pm 32.0$ ,  $224.2 \pm 18.5$ ,  $237.8 \pm 25.7\%$  であり、3群間に有意差を認めなかった。蒸留水の吸入直前、すなわち抗原吸入20分後の Pao の増加率は、10あるいは1.0mg/kg の FK224 または溶媒のみを静脈内投与した各群において、それぞれ $170.7 \pm 17.1$ ,  $170.8 \pm 18.8$ ,  $176.2 \pm 15.5\%$  であり、3群間に有意差を認めなかった。蒸留水吸入後の Pao の増加率の経時的変化は、3群間に有意差を認めなかった。しかし、蒸留水吸入1分後の Pao の増加率は、10あるいは1.0mg/kg の FK224 または溶媒のみを静脈内投与した各群において、それぞれ $267.4 \pm 17.1$ ,  $358.0 \pm 33.7$ ,  $412.4 \pm 27.6\%$  であり、3群間に有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。また、蒸留水吸入2分後の Pao の増加率は、10あるいは1.0mg/kg の FK224 または溶媒のみを静脈内投与した各群において、それぞれ $257.9 \pm 31.3$ ,  $316.1 \pm 22.4$ ,  $361.8 \pm 23.8\%$  であり、3群間に有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。溶媒投与群と比較したとき、蒸留水吸入1から5分後の各時間における10mg/kg の FK224 投与群の Pao の増加率は有意に低値であった ( $p < 0.05$ )。

### 2. FK888 の影響

抗原吸入前の Pao の値は、抗原吸入の15分後に10あるいは1.0mg/kg の FK888 または溶媒のみを静脈内投与した各群において、それぞれ $9.0 \pm 0.4$ ,  $9.1 \pm 0.3$ ,  $9.3 \pm 0.3 \text{ cmH}_2\text{O}$  であり、3群間に有意差を認めなかった。3群における Pao の増加率の時間経過を図10に示す。抗原吸入後の Pao の最大増加率は、10あるいは1.0mg/kg の FK888 または溶媒のみを静脈内投与した各群において、それぞれ $225.1 \pm 23.1$ ,  $194.5 \pm 24.4$ ,  $197.9 \pm 13.4\%$

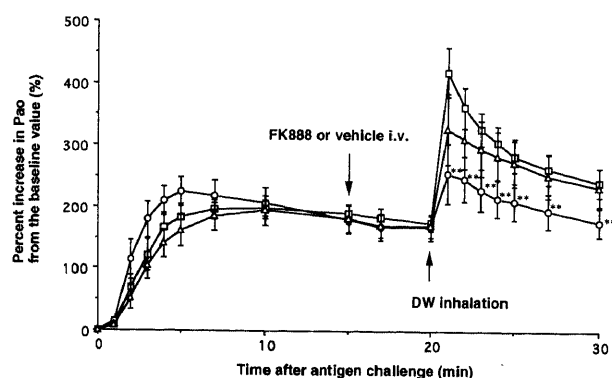


Fig. 10. Time course of percent increase in Pao from the pre-ovalbumin (OA) provocation value after inhalation of distilled water (DW) following OA challenge in passively sensitized guinea pigs treated intravenously with FK888 or vehicle (dimethylsulfoxide, DMSO) 5 min before the DW inhalation (15 min after the OA challenge). Each point indicates mean value ( $\pm$ SEM).  $\circ$ , treated with 10 mg/kg of FK888 ( $n=7$ );  $\triangle$ , treated with 1.0 mg/kg of FK888 ( $n=7$ );  $\square$ , treated with vehicle ( $n=9$ ). \*\*  $p < 0.05$  compared with vehicle treatment group analyzed by Mann-Whitney's U test.

であり、3群間に有意差を認めなかった。蒸留水の吸入直前、すなわち抗原吸入20分後の Pao の増加率は、10あるいは1.0mg/kg の FK888 または溶媒のみを静脈内投与した各群において、それぞれ $167.1 \pm 21.6$ ,  $168.8 \pm 17.7$ ,  $174.7 \pm 13.9\%$  であり、3群間に有意差を認めなかった。蒸留水吸入後の Pao の増加率の経時的変化は、3群間に有意差を認めなかった。また、蒸留水吸入1から10分後の各時間における Pao の増加率は3群間に有意差を認めなかった。しかし、溶媒投与群と比較したとき、蒸留水吸入1から10分後の各時間における10mg/kg の FK888 投与群の Pao の増加率は、有意に低値であった ( $p < 0.05$ )。

## 考 察

気管支喘息は慢性炎症性気道疾患であり、可逆的な気管支収縮と気道反応性亢進 (気道過敏性) を特徴とする。気道反応性の亢進、すなわち気道過敏性の存在は気管支喘息の本態をなすものであるが、その機序は完全には解明されていない。気道過敏性の測定には、現在メサコリン、アセチルコリンそしてヒスタミンなどの気管支収縮薬の吸入試験が用いられているが、これらの物質は高濃度では健常者にもある程度の気管支収縮を引き起こし、喘息患者と健常者の差はその易収縮性の程度の差でしかない。しかし、本研究で取り上げた UNDW-IB は喘息患者でのみ認められるが健常者では認められず<sup>11-13</sup>、喘息患者と健常者の気道反応性の本質的な差異を表していると考えられる。

本研究では、受動感作モルモットに抗原誘発気管支収縮を起こし、その20分後に超音波ネブライザーによって蒸留水を吸入することによって UNDW-IB モデルの作製を試み、さらに自律神経系作動薬、抗ヒスタミン薬、タキキニン受容体拮抗薬を用いて、UNDW-IB の発現機序を検討した。まず、OA を抗原として作製した抗 OA 血清にて受動感作したモルモットに抗原を吸入負荷して即時型気管支収縮反応を惹起し、その20分後に蒸留水を吸入すると著明な気管支収縮が惹起されることを観察した。しかし、無感作モルモットに抗原吸入後に蒸留水を吸入した場合や、感作モルモットに抗原の代わりに生理食塩水を吸入した後に蒸留水を吸入しても、気管支収縮は生じなかった。著者が検索し得た限りでは、UNDW-IB の動物モデルの作製に成功したのは、本研究が初めてである。さらに、非特異的気管支収縮薬であるメサコリンによる気管支収縮の5分後および20分後に蒸留水を吸入したとき、気管支収縮は誘発されなかった。以上のことから、気管支収縮以外の気道のアレルギー反応や炎症が UNDW-IB に関与していることが示唆された。

次に、非選択的副交感神経遮断薬であるアトロピンの十分量を静脈内投与しても、本モデルの UNDW-IB は抑制されなかった。喘息患者において、蒸留水による気道過敏性測定の60分前に抗コリン薬であるイプラトロピウム ( $80 \mu\text{g}$ ) を吸入していても UNDW-IB は抑制されなかったという臨床研究の報告<sup>14</sup>以来、アトロピンの吸入前処置<sup>15</sup>も UNDW-IB を抑制しなかったという報告がある。一方、Sheppard ら<sup>16</sup>はアトロピン吸入前処置によって蒸留水吸入による咳嗽は抑制されなかったが気道収縮は抑制されたと報告し、イプラトロピウムの吸入前処置によって UNDW-IB が抑制されたという報告<sup>17,18</sup>もあり、喘息患者の UNDW-IB におけるコリン作動性神経の関与については一定の見解は得られていない。本動物モデルにおいては、UNDW-IB におけるコリン作動性神経の関与は否定的であった。

次に、この UNDW-IB は  $\beta_2$  刺激薬であるサルブタモールの

十分量を静脈内投与することによって、完全に消失した。サルブタモールは生体内や抽出した細胞レベルでヒスタミンの放出を抑制することが知られている<sup>13,14</sup>。またFujimuraら<sup>15</sup>はモルモットにおける抗原誘発気管支収縮時のトロンボキサン  $A_2$  (thromboxane  $A_2$ ,  $TXA_2$ ) の遊離を  $\beta_2$  交感神経刺激薬が抑制することを示している。以上のことから、本モデルにおけるサルブタモールの UNDW-IB 抑制効果が化学伝達物質の遊離抑制による可能性もあるが、UNDW-IB が完全に消失したことより、その抑制効果はサルブタモールの気管支拡張効果によるところが大きいと考えられる。

フロセミド (furosemide) の吸入により喘息患者の UNDW-IB が抑制されるという報告がある<sup>16,17</sup>。Shimizu ら<sup>18</sup>は、蒸留水吸入による気道線毛上皮上層の浸透圧変化が気道上皮のイオントランスポートに影響を及ぼし、気道上皮細胞の浮腫を起こしうること、さらに、細気管支内への分泌の増加が気流閉塞の機転となる可能性を報告している。本モデルにおける Pao の増加は、蒸留水吸入による気道内への分泌物の増加や気道上皮の浮腫によって生じた可能性も否定はできないが、気管支拡張薬であるサルブタモールの前処置によって、UNDW-IB が完全に抑制されたことから、気道の浮腫や分泌物の増加あるいは肺間質の弾性収縮圧の増加などによって生じたと考ええるよりは、気道収縮 (気管支平滑筋収縮) によって生じたと考えるのが妥当である。

喘息患者における UNDW-IB のメカニズムは明らかではないが、一部には肥満細胞から遊離された化学伝達物質の関与が示唆されている。実際、喘息患者において蒸留水の吸入後に肥満細胞に由来する化学伝達物質 (たとえばヒスタミンや好中球遊走因子) の血中濃度が増加したと報告されている<sup>19</sup>。また、抽出された肥満細胞に蒸留水を投与することでヒスタミンが放出されることも報告されている<sup>20</sup>。臨床的研究では、抗ヒスタミン薬 ( $H_1$  ブロッカー) を用いてヒスタミンの UNDW-IB への関与について検討した報告がある。Azevedo ら<sup>21</sup>は、ターフェナジン (terfenadine) の前投与によって蒸留水を吸入したときの  $FEV_{10}$  の低下が有意に減弱したと報告している。Allegra ら<sup>22</sup>は、ケトチフェン (ketotifen) によって経皮的酸素分圧、経皮的二酸化炭素分圧の変動の大きさおよび持続時間が段階的に改善したと報告している。また、クロモグリク酸ナトリウム (sodium cromoglycate, SCG) は喘息治療の予防薬としてよく使用されるが、この薬剤の主な作用機序の一つとして肥満細胞からの化学伝達物質の遊離抑制がある<sup>23</sup>。ネドクロミルナトリウム (nedocromil sodium, NS) もまた肥満細胞からの化学伝達物質の遊離を抑制する<sup>24</sup>。SCG および NS ともに UNDW-IB に抑制効果を持つことが報告されている<sup>1,21,25,26</sup>。したがって、UNDW-IB には肥満細胞からのヒスタミンなどの化学伝達物質の遊離が部分的に関与している可能性が示唆される。今回の動物モデルを用いた検討では、抗ヒスタミン薬である DH および CP の投与により、UNDW-IB は蒸留水吸入の 1 および 2 分後に有意に抑制された。またその抑制は蒸留水吸入 2 分後で最も強力であった。二種類の抗ヒスタミン薬によって UNDW-IB が同様に抑制されたことから、この抑制効果はそれぞれの抗ヒスタミン薬の抗ヒスタミン作用以外の薬剤特異的薬理作用の効果によるのではなく、二薬剤に共通の抗ヒスタミン作用によるものと判断できる。この結果はこれまでのヒトでの臨床的研究の結果と矛盾しない。しかし臨床的研究でも  $H_1$  ブロッカーが UNDW-IB を完全に抑制しないこと、本研究の動物実験でも部分的

にしか抑制しなかったことから、ヒスタミンは UNDW-IB に部分的に関与するものの、他の化学伝達物質 ( $TXA_2$  やペプチドロイコトリエンなど) やタキキニン [サブスタンス P (substance P, SP) やニューロキニン A (neurokinin A, NKA) など] が関与する可能性を示唆している。

そこで、UNDW-IB におけるタキキニンの関与について、 $NK_1$  および  $NK_2$  受容体拮抗薬である FK-224 および選択的  $NK_1$  受容体拮抗薬である FK-888 を使用して検討した。タキキニンは共通の前駆物質であるプレプロタキニン (preprotachykinin) から合成されるペプチドである SP, NKA およびニューロキニン B (neurokinin B, NKB) の総称である。ほ乳類のタキキニンである SP や NKA は、中枢および末梢神経系の神経伝達物質と考えられており<sup>27</sup>、多様な刺激により感覚神経から分泌され平滑筋の収縮、血管拡張、血管透過性や唾液腺分泌の亢進を引き起こす<sup>28-30</sup>。免疫組織化学的に SP および NKA は気道に存在することが示されており<sup>31,32</sup>、喘息の典型的臨床症状である気道収縮、血漿漏出、粘液分泌を引き起こす<sup>33,34</sup>。これらのことより、気管支喘息の病因にタキキニンが関与している可能性が考えられる<sup>35,36</sup>。

タキキニンの受容体は  $NK_1$ ,  $NK_2$ ,  $NK_3$  の 3 種類が知られており、順に SP, NKA, NKB に最も強い親和性を示す。また、モルモット気道平滑筋には  $NK_1$  および  $NK_2$  受容体の存在が確認されている<sup>37</sup>。FK224 および FK888 は、モルモット遊離気管における SP ( $10^{-6}$  M) および NKA ( $10^{-6}$  M) による気管収縮を用量依存的に抑制し、FK224 の 50% 抑制濃度は SP および NKA に関してそれぞれ  $2.6 \times 10^{-6}$  M および  $1.3 \times 10^{-7}$  M であり、FK888 の 50% 抑制濃度はそれぞれ  $3.2 \times 10^{-6}$  M および  $4.2 \times 10^{-6}$  M であった<sup>38,39</sup>。また、麻酔下人工換気モルモットの検討で、SP ( $13.5 \mu\text{g/kg}$ ) および NKA ( $1.1 \mu\text{g/kg}$ ) の静脈内投与による気道収縮を FK224 はそれぞれ  $0.39\text{mg/kg}$ ,  $0.36\text{mg/kg}$  の投与量で 50% 抑制した<sup>39</sup>。FK888 は SP による気道収縮を  $0.40\text{mg/kg}$  で 50% 抑制するが、NKA による気道収縮を  $1.0\text{mg/kg}$  でも抑制しない<sup>39</sup>。本モデルにおける FK224 および FK888 の投与量は  $1.0$  および  $10\text{mg/kg}$  であり、上記報告に比べ 10 倍以上の投与量を使用した。その結果 FK224 および FK888 ともに用量依存的に、UNDW-IB を抑制したことより、SP の UNDW-IB への関与が示唆されたが、大量の FK888 を投与しており NKA の関与も否定できないと考えられる。

モルモットの遊離灌流肺に経気管的に SP を投与すると、用量依存的に肺洗浄液中のヒスタミン濃度が増加するが、この反応は特異的  $NK_1$  拮抗薬および特異的  $NK_2$  拮抗薬を灌流液中に投与することによって抑制される<sup>40</sup>。このことは、SP が  $NK_1$  および  $NK_2$  受容体を活性化してモルモット肺からヒスタミンを遊離させる可能性を示唆している。本モデルにおけるタキキニンおよびヒスタミンの関与に関して、DH および CP は蒸留水吸入 2 分後を最も強力に抑制したが 3 分後以降を抑制しなかったこと、FK224 および FK888 は蒸留水吸入 1 分後を最も強力に抑制しその後の反応をも経時的に抑制したこと、蒸留水吸入によって SP が放出され、その SP によりヒスタミンの遊離が二次的に生じた可能性も考えられる。

以上述べてきたように、本研究で作製に成功したモルモットの UNDW-IB モデルでは、副交感神経系の関与は比較的少なく、むしろ化学伝達物質であるヒスタミンやタキキニンが重要な役割を担っている可能性が示唆された。今後本モデルを用いて、

ヒスタミンとタキキニンの相互作用の有無や、喘息の化学伝達物質としてよく知られているプロスタノイドやロイコトリエンなどについてさらに追究する必要がある。

## 結 論

1. 抗卵白アルブミン同種血清による受動感作モルモットに抗原を吸入して即時型気管支収縮を起こし、抗原吸入20分後に超音波ネブライザーによって蒸留水を吸入することにより、UNDW-IB モデルの作製に成功した。

2. メサコリン吸入気道収縮時に蒸留水を吸入しても気管支収縮は生じなかった。このことより、本モデルにおいては気管支収縮そのものではなく、抗原吸入による気道のアレルギー反応や炎症がUNDW-IBの発現に関与していると考えられた。

3. アトロピン (10mg/kg) の静脈内投与によってUNDW-IBは抑制されなかったことより、本モデルのUNDW-IBにおける迷走神経系の関与は少ないと考えられた。

4. 交感神経刺激薬であるサルブタモール (5mg/kg) の静脈内投与によってUNDW-IBは完全に抑制されたことより、本モデルにおけるPaoの増加は気管支収縮によるところが大きいと考えられた。

5. 古典的抗ヒスタミン薬であるDHおよびCPの静脈内投与によって、UNDW-IBは用量依存的に部分的に抑制された。したがって、本モデルのUNDW-IBにヒスタミンが部分的に関与することが示唆された。

6. NK<sub>1</sub> および NK<sub>2</sub> 受容体拮抗薬であるFK224 および特異的NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬であるFK888の静脈内投与によって、UNDW-IBは用量依存的に抑制された。したがって、NK<sub>1</sub> およびSPが本モデルのUNDW-IBに関与することが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会と御校閲を賜った松田 保教授ならびに、御指導、御校閲をいただいた、藤村政樹講師に深甚なる謝意を表します。同時に御指導、御協力をいただきました当教室呼吸器グループの諸先生に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Allegra L, Bianco S. Non-specific broncho-reactivity obtained with an ultrasonic aerosol of distilled water. *Eur J Respir Dis (Suppl)* 106: 41-49, 1980
- 2) Anderson SD, Schoeffel RE, Finney M. Evaluation of ultrasonically nebulised solutions for provocation testing in patients with asthma. *Thorax* 38: 284-291, 1983
- 3) Galdès-Sebaldt M, McLaughlin FJ, Levison H. Comparison of cold air, ultrasonic mist, and methacholine inhalations as tests of bronchial reactivity in normal and asthmatic children. *J Pediatr* 107: 526-530, 1985
- 4) Bascom R, Bleecker ER. Bronchoconstriction induced by distilled water. Sensitivity in asthmatics and relationship to exercise-induced bronchospasm. *Am Rev Respir Dis* 134: 248-253, 1986
- 5) Higenbottam T, Stokes TC, Jamieson S, Hill L. Bronchial reactivity in asthmatic adults with normal spirometric values. *Br Med J Clin Res Ed* 286: 1012-1014, 1983
- 6) Schoeffel RE, Anderson SD, Altounyan REC. Bronchial

hyperreactivity in response to inhalation of ultrasonically nebulised solutions of distilled water and saline. *Br Med J Clin Res Ed* 283: 1285-1287, 1981

7) Santives T, Roska AK, Hensley GT, Moore VL, Fink JN, Abramoff P. Immunologically induced lung disease in guinea pig. *J Allergy Clin Immunol* 57: 582-594, 1976

8) 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

9) 南 真司, 岡藤和博, 佐賀 務, 藤村政樹, 金森一紀, 宮保進, 服部絢一, 川井 清. モルモットにおける定量吸入装置の開発. *日胸疾患会誌* 21: 252-258, 1983

10) Sheppard D, Rizk NW, Boushey HA, Bethel RA. Mechanism of cough and bronchoconstriction induced by distilled water aerosol. *Am Rev Respir Dis* 127: 691-694, 1983

11) Baba Y, Hayashida M, Yasunami J, Takamatsu I, Adachi K, Toyoshima K. Bronchoconstrictive effect of ultrasonic nebulized distilled water on asthmatic children. *J Asthma* 26: 299-307, 1989

12) Groot CAR, Lammers JWJ, Festen J, van Herwaarden CLA. The protective effects of ipratropium bromide and terbutaline on distilled water-induced bronchoconstriction. *Pulm Pharmacol* 7: 59-63, 1994

13) Fügner A. Inhibition of antigen-induced histamine release by beta-adrenergic stimulants *in vivo*. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 54: 78-87, 1977

14) Butchers PR, Vardey CJ, Skidmore IF, Wheeldon A, Boutal LE. Histamine containing cells from bronchial lavage of macaque monkeys. Time course and inhibition of anaphylactic histamine release. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 62: 205-212, 1980

15) Fujimura M, Sakamoto S, Nishi K, Saito M, Miyake Y, Matsuda T. Inhibitory effect of inhaled procaterol on anaphylactic bronchoconstriction and thromboxane A<sub>2</sub> production in guinea pigs. *Clin Exp Allergy* 21: 189-194, 1991

16) Robuschi M, Gambaro G, Spagnotto S, Vaghi A, Bianco S. Inhaled furosemide is highly effective in preventing ultrasonically nebulized water bronchoconstriction. *Pulm Pharmacol* 1: 187-191, 1989

17) Foresi A, Pelucchi A, Mastropasqua B, Caviglioli G, Carlesi RM, Marazzini L. Effect of inhaled furosemide and torasemide on bronchial response to ultrasonically nebulized distilled water in asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 146: 364-368, 1992

18) Shimizu T, Mochizuki H, Morikawa A, Kuroume T. Inhaled furosemide prevents ultrasonically nebulized water bronchoconstriction in children with both atopic and nonatopic asthma. *Chest* 104: 1723-1726, 1993

19) Shaw RJ, Anderson SD, Durham SR, Taylor KM, Schoeffel RE, Green W, Torzillo P, Kay AB. Mediators of hypersensitivity and 'fog'-induced asthma. *Allergy* 40: 48-57, 1985

20) Kaliner M, Auseten KF. Cyclic AMP, ATP, and reversed anaphylactic histamine release from rat mast cells. *J Immunol* 112: 664-674, 1974

21) Azevedo M, Torres da Costa J, Fontes P, Moreira da Silva JP, Araujo O. Effect of terfenadine and ipratropium bromide on ultrasonically nebulized distilled water-induced asthma. *J Int Med*

Res 18: 37-49, 1990

- 22) Allegra L, Turco P, Pomari C, Negro RD. Transcutaneous O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> monitoring of bronchial responsiveness in FEV<sub>1</sub> non-responder asthmatics during ketotifen and placebo treatment. *Respiration* 60: 144-148, 1993
- 23) Goose J, Blair AMJN. Passive cutaneous anaphylaxis in the rat, induced with two homologous reagin-like antibodies and its specific inhibition with disodium cromoglycate. *Immunology* 16: 749-760, 1969
- 24) Wells E, Jackson CG, Harper ST, Mann J, Eady RP. Characterization of primate bronchoalveolar mast cells. *J immunol* 137: 3941-3945, 1986
- 25) Robuschi M, Vaghi A, Simone P, Bianco S. Prevention of fog-induced bronchospasm by nedocromil sodium. *Clin Allergy* 17: 69-74, 1987
- 26) del Bufalo C, Fasano L, Patalano F, Gunella G. Inhibition of fog induced bronchoconstriction by nedocromil sodium and sodium cromoglycate in intrinsic asthma: a double-blind, placebo-controlled study. *Respiration* 55: 181-185, 1989
- 27) Gasparovic I, Hadzovic S, Hukovic S, Stern P. Contribution to the theory that substance P has a transmitter role in sensitive pathways. *Med Exp* 10: 303-606, 1964
- 28) Lundberg JM, Saria A. Bronchial smooth muscle contraction induced by stimulation of capsaicin sensitive sensory neurons. *Acta Physiol Scand* 116: 473-476, 1982
- 29) Lundberg JM, Saria A. Capsaicin-sensitive vagal neurons involved in control of vascular permeability in rat trachea. *Acta Physiol Scand* 115: 521-523, 1982
- 30) Lundberg JM, Saria A. Capsaicin-induced desensitization of airway mucosa to cigarette smoke, mechanical and chemical irritants. *Nature* 302: 251-253, 1983
- 31) Hua KY, Theodorsson-Norheim E, Brodin E, Lundberg JM, Hökfelt T. Multiple tachykinins (neurokinin A, neuropeptide K and substance P) in capsaicin-sensitive sensory neurons in the guinea-pig. *Regul Pept* 13: 1-19, 1985
- 32) Lundberg JM, Hökfelt T, Martling CR, Saria A, Cuello C. Substance P-immunoreactive sensory nerves in the lower respiratory tract of various mammals including man. *Cell Tissue Res* 235: 251-261, 1984.
- 33) Martling CR, Theodorsson-Norheim E, Lundberg JM. Occurrence and effects of multiple tachykinins; substance P, neurokinin A and neuropeptide K in human lower airways. *Life Sci* 40: 1633-1643, 1987
- 34) Rogers DF, Aursudkij B, Barnes PJ. Effects of tachykinins on mucus secretion in human bronchi *in vitro*. *Eur J Pharmacol* 174: 283-286, 1989
- 35) Barnes PJ. Asthma as an axon reflex. *Lancet* i: 242-245, 1986
- 36) Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators and asthma. *Pharmacol Rev* 40: 49-84, 1988
- 37) Fujii T, Murai M, Morimoto H, Nishikawa M, Kiyotoh S. Effect of actinomycin D on airway constriction induced by tachykinins and capsaicin in guinea-pigs. *Eur J Pharmacol* 194: 183-188, 1991.
- 38) Murai M, Morimoto H, Maeda Y, Kiyotoh S, Nishikawa M, Fujii T. Effects of FK224, a novel compound NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptor antagonist, on airway constriction and airway edema induced by neurokinins and sensory nerve stimulation in guinea pigs. *J Pharmacol Exp Ther* 262: 403-408, 1992
- 39) Murai M, Maeda Y, Hagiwara D, Miyake H, Ikari N, Matsuo M, Fujii T. Effects of an NK<sub>1</sub> receptor antagonist, FK888, on constriction and plasma extravasation induced in guinea pig airway by neurokinins and capsaicin. *Eur J Pharmacol* 236: 7-13, 1993
- 40) Lilly CM, Hall AE, Rodger IA, Kobzik L, Haley KJ, Drazen JM. Substance P-induced histamine release in tracheally perfused guinea pig lungs. *J Appl Physiol* 78: 1234-1241, 1995

**A Guinea Pig Model of Ultrasonically Nebulized Distilled Water-induced Bronchoconstriction (UNDW-IB) and the Role of Histamine and Tachykinins** Tokunao Amemiya, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., **105**, 855—864 (1996)

**Key words** ultrasonically nebulized distilled water induced bronchoconstriction (UNDW-IB), histamine, tachykinin, guinea pigs

#### Abstract

Ultrasonically nebulized distilled water (UNDW) specifically provokes bronchoconstriction only in patients with asthma, while the exact mechanisms remain unclear. To elucidate the mechanisms would contribute greatly to our understanding of the pathophysiology of asthma. To investigate the mechanisms of UNDW-induced bronchoconstriction (UNDW-IB), a guinea pig model for UNDW-IB was successfully developed. In this guinea pig model, the role of parasympathic nerve activity, histamine and tachykinins were examined. UNDW inhalation caused bronchoconstriction in passively sensitized and artificially ventilated guinea pigs when it was inhaled 20 min after antigen challenge. On the other hand, UNDW inhalation did not produce bronchoconstriction after the antigen provocation in non-sensitized guinea pigs or after saline provocation in sensitized animals. Treatment of the animals with intravenous injection of 10 mg/kg of atropine 15 min after the antigen challenge did not reduce the UNDW-IB. Treatment of the animals with intravenous injection of 5 mg/kg of salbutamol completely inhibited the UNDW-IB. Treatment of the animals with antihistamines, diphenhydramine hydrochloride (DH) in the doses of 10, 1.0 and 0.1 mg/kg and chlorpheniramine maleate (CP) in the doses of 1.0, 0.1 and 0.01 mg/kg, injected intravenously 15 min after the antigen challenge partially reduced the UNDW-IB at 1 and 2 min after UNDW inhalation in a dose-dependent manner. Treatment of the animals with NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> dual receptor antagonist FK224 in the doses of 10 and 1.0 mg/kg and selective NK<sub>1</sub> receptor antagonist FK888 in the doses of 10 and 1.0 mg/kg, injected intravenously 15 min after the antigen challenge, reduced the UNDW-IB in a dose dependent manner. These results suggest that allergic reaction, but not bronchoconstriction itself, induces bronchial hyperresponsiveness to UNDW and that histamine and tachykinins are involved in a part of the UNDW-IB.