Effect of Prednisolone on the Anaphylaxis of Guinea Pig

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7727

モルモットのアナフィラキシー反応における プレドニゾロンの効果

金沢大学医学部内科学第三講座（主任：服部絢一教授）
金　森　一　紀

(昭和59年3月19日受付)

感作モルモットから摘出した気管に抗原を投与すると，収縮反応がおきる．この反応は，気管摘出の6時間前にプレドニゾロンをモルモット腹腔内にあらかじめ投与することにより，抑制された．また，感作モルモットより得た気管標本をin vitroでプレドニゾロンとインキュベートしても，抗原による気管収縮反応は抑制された．抗原投与によっておきる感作モルモット肺組織標本からのヒスタミン遊離，および肺組織ヒスタミン含量は，6時間前にプレドニゾロンをモルモット腹腔内に投与することにより，減少した．また，非感作モルモット気管標本のヒスタミンおよびアセチルコリンによる収縮は，プレドニゾロンと1時間インキュベートすることにより抑制された．このようなプレドニゾロンの抗アナフィラキシー作用は，時間に関して2相性であった．すなわち，プレドニゾロン投与後短時間でおこる初期のプレドニゾロンの作用は，気管収縮への直接の抑制であると考えられる．また，数時間後にみられるプレドニゾロンの後期の効果は，ヒスタミン産生・遊離の抑制の結果であると考えられる．この場合，おそらくプレドニゾロンの受容体を介する機序が関与していると思われる．

Key words　anaphylaxis, prednisolone, guinea pig, histamine

気管支喘息の治療にはプレドニゾロンなどのグルココルチコイドは重要であり，とりわけ発作重積状態には不可決な薬剤である．気管支喘息に対するグルココルチコイドの作用機序としては，血管収縮やリソゾーム安定化などの抗炎症作用，抗体産生抑制作用，ケミカルメジエーターの産生または遊離の抑制作用，カテコールアミンの効果増強作用，気道平滑筋に対する直接弛緩作用，ケミカルメジエーターによる気道収縮の抑制作用などが知られている[1)2)]．しかしながら，これらについても未だ議論のあるところであり，一定した見解のないのが現状である．

従来，気管支喘息発作に対してグルココルチコイドの効果が得られるには，数日間にわたる投与が必要であるとされており，グルココルチコイドの1回単独投与では効果が得られないという報告もある[3)4)]．しかし，Ellul-Micallefらは，慢性型の気管支喘息患者にプレドニゾロンを1回投与して呼吸機能を経時的に測定し，経口投与では投与後3時間より，静注では投与後1時間より，気道収縮の改善をみたと報告している[5)6)]．筆者の経験からも，慢性型の気管支喘息患者にプレドニゾロンを経口投与すると，投与後4～6時間で症状の改善をみることがある．

そこで，気管支喘息に対するグルココルチコイドの急性効果と，その時間的経過を調べる目的で，モルモットのアナフィラキシー反応における気道収縮を実験モデルとして，これに対するプレドニゾロンの効果を経時的に検討した．さらに，気管支喘息に対するプレドニゾロンの作用機序を解明するために，アナフィラキシー反応時に肺から遊離されるヒスタミン量と肺ヒスタミン含量，およびヒスタミンの気道平滑筋収縮作用に対するプレドニゾロンの効果を検討した．

材料および方法

1．動　物

Effect of Prednisolone on the Anaphylaxis of Guinea Pig. **Kazunori Kanamori**, Depertment of Internal Medicine (III) (Director ; Prof. Kenichi Hattori), School of Medicine, Kanazawa University.

体重250g前後のハートレー系雄モルモットを使用した.

1．試　薬

卵白アルブミン（Sigma），二塩酸ヒスタミン（東京化成），アセチルコリン（第一製薬，オビソート），オルトフタールアルデヒド(o-phthal aldehyde，以下OPTと略)（和光純薬），プレドニゾロン・ソジウム・ヘミサクシネート（pendnisolone sodium hemisuccinate，以下Psと略）(Sigma)．他の試薬は，すべて和光純薬特級を用いた.

3．モルモットの感作およびPs投与

卵白アルブミンを生理食塩水に溶解して20%溶液を作製した．この溶液0.5mlをモルモット腹腔内に，1日おきに3回注入して，能動感作した.

感作終了後4～6週に，モルモットを次の5群にわけた．I群(対照群)：Psを投与せずに撲殺し，気管および心肺を摘出した．II群（Ps 1時間前投与群)：Ps 20 mg/kgを腹腔内に注入し，1時間後に撲殺摘出した．III群(Ps 2時間前投与群)：Ps 20 mg/kg腹腔内注入後2時間に撲殺摘出した．IV群（Ps 6時間前投与群)：Ps 20 mg/kg腹腔内注入後6時間に撲殺摘出した．V群(Ps 5日間投与群)：Ps 20 mg/kgを5日間毎日腹腔内に注入し，最終投与より24時間後に撲殺摘出した．I群は10匹，II～V群は各々8匹について，実験を行った.

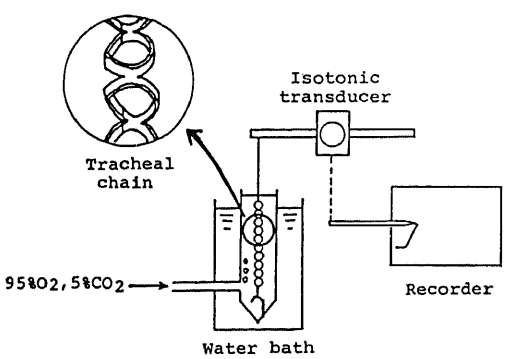

Fig. 1. Scheme of the bioassay system for measurement of the responses of tracheal chains to antigen, histamine or acetylcholine. One end of the tracheal chain is fixed to the bottom of Magnus tube in the water bath maintained at 37°C. Krebs-Henseleit solution in Magnus tube is saturated with mixed gas composed of 95 % O_2 and 5% CO_2. The other end of the tracheal chain is attached to isotonic transducer and the tension of the tracheal chain is recorded on the poly-recorder.

4．気管鎖の卵白アルブミン添加に対する収縮反応の測定

摘出した気管をKrebs-Henseleit液[7]中におき，Timmermanらの方法[8]に従って，気管鎖を作製した．すなわち，1つの輪が1つの気管軟骨を含むように気管を切り，10個の輪を連結したものを1本の鎖とした（Fig. 1)．モルモット1匹より1本の気管鎖を作製した.

この気管鎖の一端を，10 mlのマグヌス管の管底にとりつけ，これにKrebs-Henseleit液9 mlを入れ，95%O_2，5%CO_2の混合ガスで飽和させた．マグヌス管は，37°Cの恒温槽にひたした．気管鎖の他端は，アイソトニック・トランスデューサー（MEコマーシャル社）にとりつけ，気管鎖の反応はポリレコーダー（日本光電RM-5）に記録した（tissue bioassay system, Fig. 1)．初期張力は0.6 gとした．なお，500 mgの錘をとりつけて，キャリブレーションの際の単位とした.

各群のモルモットから摘出した気管鎖を1時間静置して，張力が安定したところで卵白アルブミンを添加した．すなわち，卵白アルブミンをKrebs-Henseleit液に溶解して500 μg/mlとした溶液1 mlをマグヌス管に加え（卵白アルブミンのマグヌス管内最終濃度を50 μg/mlとして)，気管鎖の収縮を記録した.

さらに，in vitroでPsとインキュベートした場合の効果をみるために，18匹の感作モルモットを6匹ずつ3群にわけ，気管鎖を作製してbioassay systemにとりつけた．各群を各々Ps 100 μg/ml，500 μg/ml，1 mg/ml溶液9 mlとインキュベートし，1時間後に500 μg/mlの卵白アルブミン溶液1 mlを加えて気管鎖の収縮を測定した．収縮のピーク時の張力(mg)を，その反応の大きさとした.

5．抗原添加による感作肺組織からのヒスタミン遊離の測定

各群のモルモットから摘出した心肺をKrebs-Henseleit液中に入れ，右心室から肺動脈にカテーテルを挿入してKrebs-Henseleit液でゆっくり灌流し，血液を洗い流した．その後，肺末梢部を切り出し，これを1～2 mmの小片になるよう細切した．Krebs-Henseleit液中でよく洗滌したあと濾過し，肺組織片100 mgずつを秤量して，あらかじめ5 mlのKrebs-Henseleit液を入れた試験管14本にとった．37°Cで10分間振盪したあと，2本を1組とし，各組に0，1，10，100，500，1,000，2,000 μg/mlの卵白アルブミン溶液1 mlを加えた．卵白アルブミンを加えて正確に15分後に濾過して，肺組織と濾液に分離し，各々に30%トリクロール酢酸溶液0.5 mlを加えて反応を停止させた.

肺組織および濾液中のヒスタミン量は，Shoreらの原法[9]を一部修正した蛍光法で測定した（Table 1）．OPTは，1gを石油エーテル100mlに完全に溶解させてグラスフィルターで濾過し，濾液をシャーレにとって石油エーテルを蒸発させ再結晶させたものを，デシケーター内に冷却保存して用いた．OPTとの反応温度および反応時間は，鈴木の報告[10]にもとづき，0°C，45分間とした．蛍光強度は，0.1N塩酸に溶解して10 μg/mlとした塩酸キニーネの蛍光を100とし，これに対する比較蛍光強度（relative fluorescence intensity）で表現した．サンプルとともに，外標準曲線および内標準曲線も測定した．Fig. 2にそれらの実例を示した．

遊離したヒスタミンは，ヒスタミン遊離量とヒスタミン遊離率で示した．すなわち，

ヒスタミン遊離量＝（濾液中のヒスタミン量）－（卵白アルブミンを加えないときの濾液中のヒスタミン量）

Table 1. Method for histamine measurement.

Filtrate		Lung Fragment	
Filtrate	4.0 ml	Fragment	100 mg
30%TCA	0.5 ml	30%TCA	0.5 ml
centrifuge		homogenate	
		add K-H solution	9.5 ml
		centrifuge	
Supernatant	4.0 ml	Supernatant	4.0 ml
to each supernatant add			
5N NaOH	0.5 ml		
NaCl	1.5 g		
n-Butanol	10.0 ml		
mix for 10 min			
centrifuge			
Butanol phase			
Salt-saturated 0.1N NaOH	5.0 ml		
mix for 10 min			
centrifuge			
Butanol phase			
0.1N HCl	2.5 ml		
n-Heptane	15.0 ml		
mix for 10 min			
centrifuge			
HCl phase	2.0 ml		
1N NaOH	0.4 ml		
1% OPT	0.1 ml		
incubate for 45 min in ice-water			
add			
3N HCl	0.2 ml		
aq. water	1.0 ml		
Spectrophotometer			
activation	360 mμ		
fluorescence	450 mμ		

K-H solution, Krebs-Henseleit solution; centrifuge, centrifuge at 3,000 rpm for 10 min.

肺組織ヒスタミン含量＝(濾液中のヒスタミン量)＋(肺組織に残存するヒスタミン量)

ヒスタミン遊離率＝

$$\frac{\text{ヒスタミン遊離量}}{\text{肺組織ヒスタミン含量}} \times 100$$

6．気管鎖のヒスタミン，アセチルコリンによる収縮反応におよぼすPsの効果の測定

Krebs-Henseleit液で溶解希釈して，100 ng/ml，1 μg/ml，10 μg/mlのヒスタミンおよびアセチルコリン溶液を準備した．

10匹の未感作モルモットを用いて気管鎖を作製し，tissue bioassay systemにセットした．マグヌス管にKrebs-Henseleit液9 mlを入れて1時間静置後，マグヌス管底より液をぬきとり，灌流液を37°Cの新しいKrebs-Henseleit液9 mlに変更した．これにヒスタミン100 ng/ml溶液1 mlを加えて，収縮反応を調べた．反応が最大になったところで溶液をぬきとり，Krebs-Henseleit液9 mlで3回洗滌して，張力がもとのレベルに戻ったところで，もう一度ヒスタミン100 ng/ml液1 mlを加えて収縮を測定した．このあと同様にして，ヒスタミン1 μg/ml，10 μg/ml，アセチルコリン100 ng/ml，1 μg/ml，10 μg/ml液を加えたときの反応を2回ずつ測定した．ついで，灌流液をPs 10 μg/ml，100 μg/ml，500 μg/ml，1 mg/ml溶液にかえて，同様の測定を行った．結果は，最大収縮時の張力の大きさをmgで表わし，2回の測定の平均値をとった．

7．統計学的処理

統計学的処理は，Mann-whitneyのUテスト，または分散分析を用い，危険率5％以下を有意とした．

成　績

1．感作モルモット気管鎖の抗原に対する反応

Fig. 3は，I群（Ps非投与群）から得た気管鎖をin vitroでPsとインキュベートした場合と，そうでない場合の，気管鎖の卵白アルブミン50 μg/mlに対する反応を示したものである．上段はPs 1 mg/mlと，中段はPs 500 μg/mlと各々1時間インキュベートした場合，下段はPs非存在下の場合である．上方へのふれが収縮反応を示している．各々の反応の最大収縮時の張力は，0，112 mg，569 mgである．これらの結果は，感作モルモット気管鎖が抗原の添加によって収縮し，この収縮がPsとのインキュベートによって抑制されることを示している．

各群からとった気管鎖の卵白アルブミン50 μg/mlに対する収縮の大きさを，Fig. 4左図に示した．I群（Ps非投与群，n＝10）に比較して，IV群（Ps 6時間前投与群，n＝8）で有意に収縮が減少した（U＝16，$p<0.05$）．これに対し，II群（Ps 1時間前投与群，n＝8），III群（Ps 2時間前投与群，n＝8），V群（Ps 5日間投与群，n＝8）では，I群と有意差を認めなかった．（各々，U＝17，36，35）．Fig. 4右図は，I群から

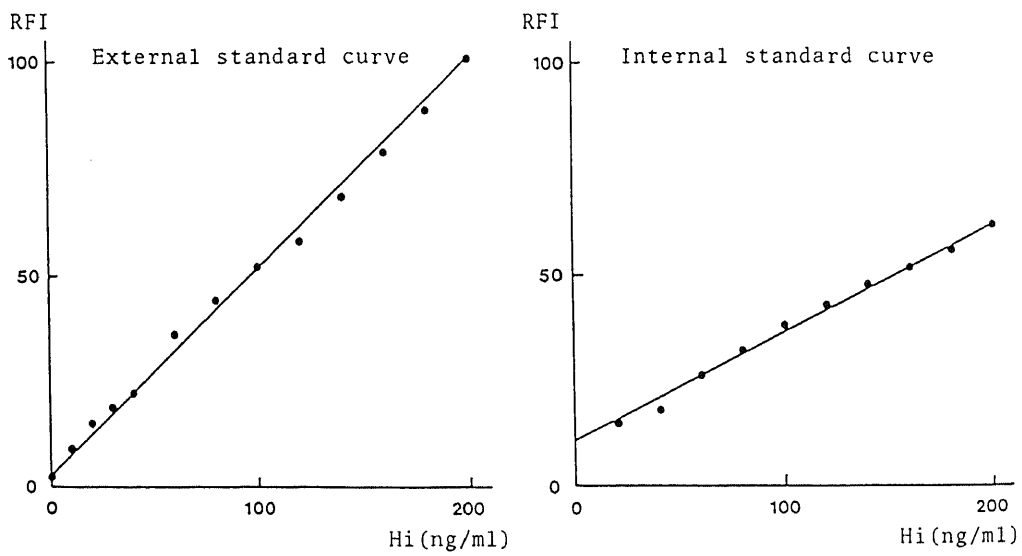

Fig. 2. The external and internal standard curves of histamine. The relation between RFI and histamine concentration was almost linear in the extent of histamine concentration used in this study. RFI, relative fluorescence intensity; Hi, histamine.

とった気管鎖を，種々の濃度の Ps と 1 時間インキュベートしたあとに，卵白アルブミン 50 μg/ml を加えた時の気管鎖の収縮を示したものである．この結果は，500 μg/ml および 1 mg/ml とインキュベートした群（各々n＝6）では，Ps とインキュベートしない群（n＝10）に比べて，有意に気管鎖の収縮が低下することを示している（各々，U＝2，$p<0.05$；U＝0，$p<0.05$）．特に，in vitro で Ps 1 mg/ml とインキュベートした群では，全例で抗原に対する気管鎖の収縮を全く認めなかった．これに対し，Ps 100 μg/ml とインキュベートした群（n＝6）では，Ps 非投与群と有意差は認めなかった（U＝14）．以上の結果より，Ps は感作モルモット気管鎖の抗原による収縮反応を抑制するといえる．この抑制効果は，Ps を in vitro で投与した場合には，Ps 投与後 6 時間で認められた．V群（5 日間投与群）では抑制効果が認められなかったが，この群では Ps 最終投与後 24 時間で抗原添加を行なっており，換言すれば，Ps 投与後 24 時間には Ps の抑制効果が消失しているといえる．一方，摘出気管鎖に in vitro で Ps を投与すると，1 時間後には抗原による気管鎖収縮の抑制効果が認められた．

2．感作モルモット肺組織からのヒスタミン遊離

対照の I 群（Ps 非投与群，n＝10）における卵白アルブミン添加量と肺組織からのヒスタミン遊離の関係を Fig. 5 に示した．この結果は，添加する卵白アルブミン濃度が増加するにつれて，肺組織からのヒスタミン遊離量も増加することを示している．ヒスタミン遊離量に比べヒスタミン遊離率の方がばらつきが少ないため，以後はヒスタミン遊離率で比較検討した．

Fig. 6 は，各群における肺組織からのヒスタミン遊離率を示している．対照の I 群（Ps 非投与群，n＝10）に比し，IV群（Ps 6 時間前投与群，n＝8）の卵白アルブミン濃度 1,000 μg/ml および 2,000 μg/ml に対するヒスタミン遊離率が有意に減少した（各々，U＝15，$p<0.05$；U＝10，$p<0.05$）．これに対し，IV群の卵白アルブミン濃度 500 μg/ml 以下では I 群と有意差は

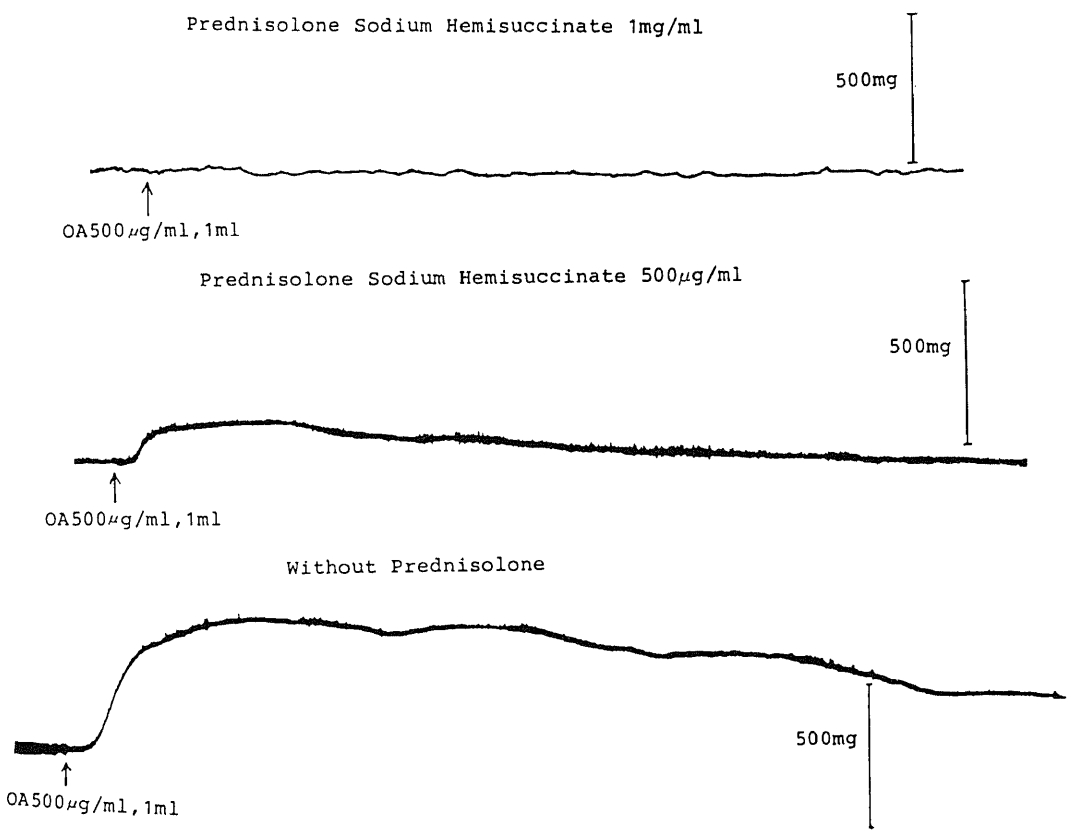

Fig. 3. Effect of prednisolone on tracheal chain contraction to antigen. The arrows represent the time at which 1 ml of 500μg/ml ovalbumin solution was added. The length of the vertical lines correspond the contraction of tracheal chains by the weight of 500 mg used for carribration.

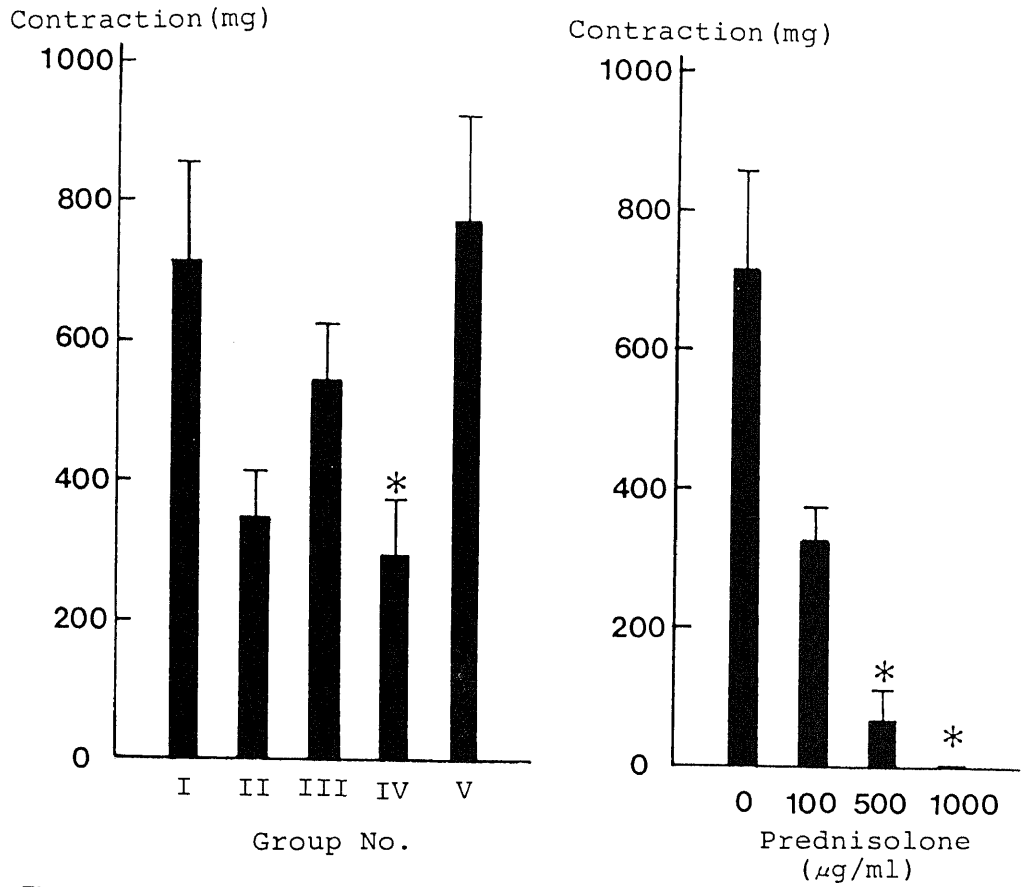

Fig. 4. Effects of prednisolone on the responses of sensitized guinea pig tracheas to antigen.
On the left of the figure, the response of each group (I, II, III, IV and V) was depicted. Group I show the group without prednisolone administration. Group II, III, IV and V show the groups administered prednisolone 20 mg/kg intraperitoneally 1 hour, 2 hours, 6 hours and every 5 days before excision respectively. To the excised tracheal chains, ovalbumin 50μg/ml (final frask concentration) was added and the contractions were measured by tissue bioassay system.
The contractions of the tracheal chains which had been incubated in vitro with prednisolone 0, 100, 500 and 1,000μg/ml for 1 hour and thereafter added ovalbumin 50μg/ml are shown on the right. Each value represents mean ± S. E.. Statistic analyses were performed by Mann-Whitney's U test.
*, $p<0.05$

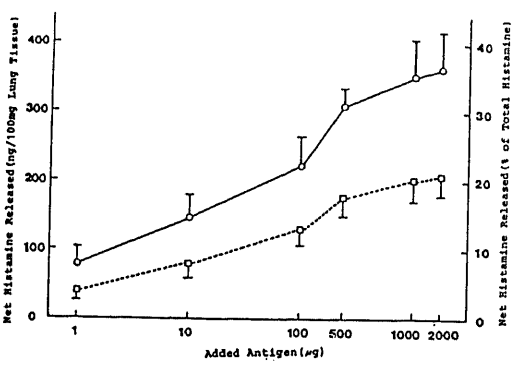

Fig. 5. Effect of antigen concentration on the immunologic histamine release from actively sensitized ginea pig lung. ○—○, released histamine content ; □·····□, % of total histamine. Each value represents mean ± S. E..

なく，II群(Ps 1時間前投与群，n＝8)，III群(Ps 2時間前投与群，n＝8)およびV群(Ps 5日間投与群，n＝8)では，添加した卵白アルブミンのすべての濃度でI群と有意差がなかった．これらの結果は，投与抗原量が多い場合には，抗原添加の6時間前にPsを投与した場合にだけ，感作肺組織からのヒスタミン遊離が抑制されることを示している．

Fig. 7は，各群における肺組織100 mgあたりに含まれるヒスタミン量を比較したものである．対照のI群(Ps非投与群，n＝10)に比し，IV群(Ps 6時間前投与群，n＝8)で有意に減少した($U=16$, $p<0.05$)．これに対し，II群(Ps 1時間前投与群，n＝8)，III群(Ps 2時間前投与群，n＝8)およびV群(Ps 5日間投与群，n＝8)では，I群に対して有意差は認められなかった(各々，$U=26$, 38, 32)．この結果は，感作モルモット肺組織に含まれるヒスタミン量は，Ps投与後6時間で減少することを示している．

3．非感作モルモット気管鎖のヒスタミン，アセチルコリンによる収縮におよぼすPsの効果

Fig. 8(左図)は，非感作モルモットの気管鎖を種々の濃度のヒスタミン溶液中でインキュベートしたときの，気管鎖の収縮に対するPsの効果を示したものである(n＝10)．個々の気管鎖のヒスタミンに対する反応は，Psを加えない状態でのヒスタミン1 μg/ml(最終濃度)による収縮の大きさに対する%で表示した．この結果は，気管鎖のヒスタミンによる収縮はヒスタミン濃度の増加にともなって増大し，Psはこの収縮反応を抑制するが，その抑制効果はPsの濃度の増加とともに大きくなることを示している．さらにTable 2上段に，その分散分析の結果も示した．

Fig 8(右図)は，気管鎖のアセチルコリンによる反応を示したものである(n＝10)．個々の気管鎖の反応は，Psを加えない状態でのアセチルコリン1 μg/mlによる収縮に対する%で表示した．この結果は，ヒスタミンの場合と同様に，気管鎖の収縮はアセチルコリン濃度の増加にともなって増大し，Psは濃度依存性にこの収縮反応を抑制することを示している．またTable 2下段に，その分散分析の結果を示した．

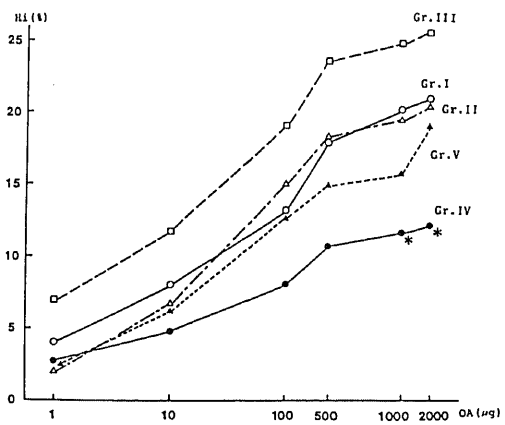

Fig. 6. Effect of prednisolone on the immunologic histamine release from sensitized guinea pig lungs. ○—○, group I; △·····△, group II; □·····□, group III; ●—●, group IV; and ▲·····▲, group V. Group I shows the group without prednisolone administration. Group II, III, IV and V show the groups administered prednisolone 20 mg/kg intraperitoneally 1 hour, 2 hours, 6 hours and every 5 days before excision respectively. Each value represents the mean. Statistic analyses were performed by Mann-Whitney's U test. Hi (%), net histamine released represented by % of total histamine; OA, ovalbumin; Gr., Group.
*, $p<0.05$

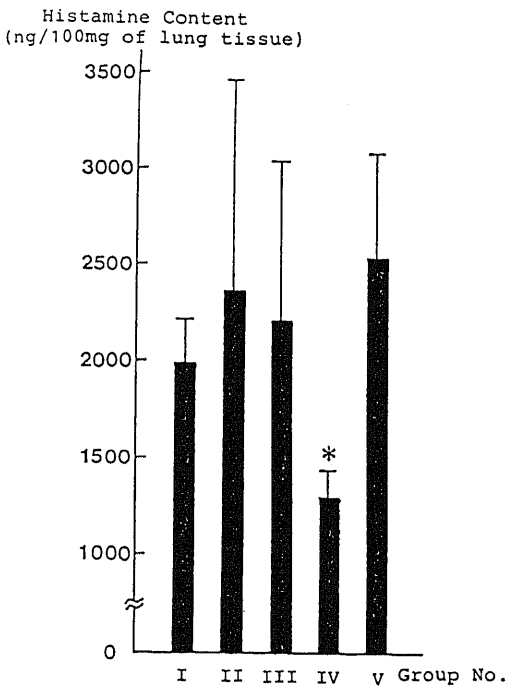

Fig. 7. Influence of prednisolone on histamine content of 100 mg of lung tissue. Group I, the group without prednisolone administration; Group II, III, IV and V, the groups administered prednisolone 20 mg/kg intraperitoneally 1 hour, 2 hours, 6 hours and every 5 days before excision respectively. Each value represents the mean ± S. E.. Statistic analyses were performed by Mann-Whitmey's U test.
*, $p<0.05$

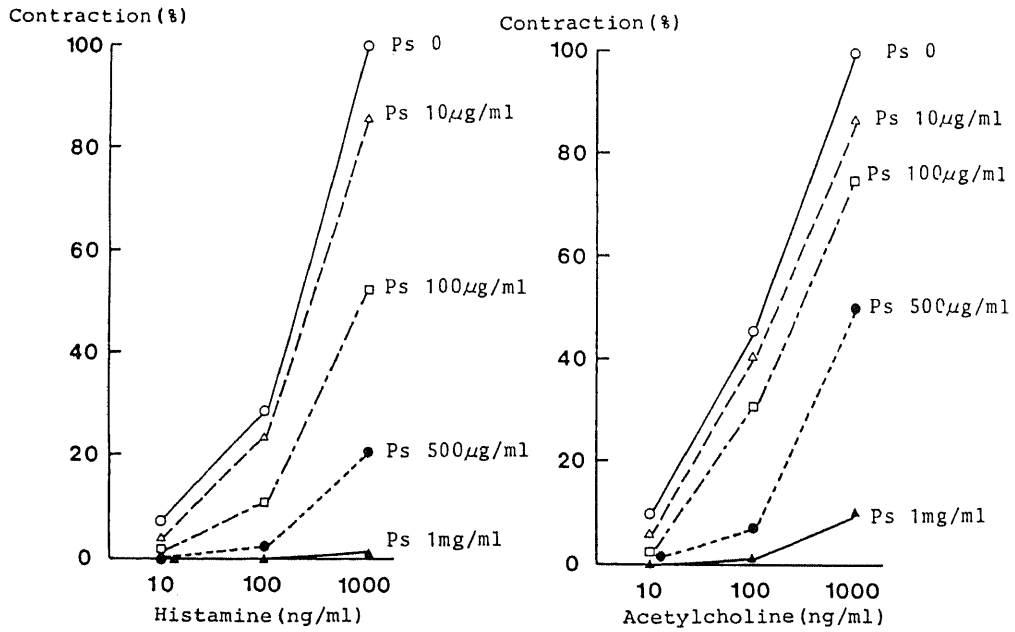

Fig. 8. Influence of prednisolone (Ps) on histamine- (left) and acetylcholine- (right) induced contractions of the tracheal chains obtained from non-sensitized guinea pigs. Each value represents percentage to the contraction by histamine 1 μg/ml or acetylcholine 1 μg/ml without prednisolone respectively. ○——○, control (without prednisolone); △·····△ prednisolone 10 μg/ml; □-·-·-□, prednisolone 100 μg/ml; ●·····●, prednisolone 500 μg/ml; ▲——▲, prednisolone 1 mg/ml.

Table 2. Summary of analysis of variance. Effect of prednisolone on histamine- and acetylcholine- induced tracheal contraction.

Source of variance	SS	df	MS	F
Prednisolone (A)	43632.6	4	10908.2	164.2
Histamine (B)	68165.9	2	34083.0	513.1
Interaction (AxB)	33352.7	8	4169.1	62.8
Error	8968.5	135	66.4	
Total	154119.8	149		

Source of variance	SS	df	MS	F
Prednisolone (A)	45630.6	4	11407.7	175.2
Acetylcholine (B)	94342.8	2	47171.4	724.3
Interaction (AxB)	21610.7	8	2701.3	41.5
Error	8792.0	135	65.1	
Total	170376.1	149		

SS, sum of squares; df, degree of freedom; MS, mean squares; F, F ratios.

考　　察

従来，動物実験でPsなどのグルココルチコイドの抗アナフィラキシー作用は，投与より効果発現までに数時間～数日を要するとされている[11)~17)]．しかし少数ながら，抗アナフィラキシー作用を認めないとする報告もある[18)~21)]．このように相反する見解があったり，投与より効果発現までに要する時間に相違が生ずる理由として．1）実験動物の種差，2）感作方法の相違，3）使用したグルココルチコイドの種類・投与量・投与方法の相違，4）実験対象とする作用機序の相違をあげることができる．

著者が実験動物としてモルモットを選んだのは，小動物であり，種々の操作が容易であること，ラットなどに比べて気管支喘息モデルを作製しやすく，ケミカルメジエーターとしてヒスタミンの関与が大きいことなどの実験上の理由に加えて，ステロイドに対する感受性が，ラットやマウスよりもヒトに似ているとされているためである[22)]．感作方法として能動感作を用いたが，この場合のアナフィラキシー反応にはIgG_1が関与しているとされており，主としてIgEが関与するヒトⅠ型アレルギー反応とは，ステロイドの作用も質的・量的に若干異なる可能性はある．

著者の用いたPs 20 mg/ml腹腔内投与は，他の報告の使用量と大きな差はないが，通常臨床で経口的に用いる量に比してかなり大量で，いわゆるパルス療法の量に匹敵する．Yanagibashiら[23)]は，マウス腹腔内にプレドニゾロン・ヘミサクシネート1 mg/kgを投与すると，体内で効率よく加水分解され，血中遊離プレドニゾロン濃度は投与30分後に476±81 ng/mlと最高になり，その後速やかに低下して2時間後には1/10の濃度になったと報告している．プレドニゾロン・エステルの水解・代謝の種差の問題は不明であるが，この報告から類推するに，著者のin vivo投与の条件では活性型である遊離プレドニゾロンの血中濃度は数μg/mlに達していたと予想される．一方，in vitroで気管鎖とインキュベートしたPsの濃度は10～1,000 μg/mlで，これはin vivo投与で予想される血中濃度よりも高い．しかし，試験管内ではエステル型であるPsの一部しか水解されないために，遊離プレドニゾロン濃度はPs濃度よりいくらか低くなっていると考えられる．

グルココルチコイドの抗アナフィラキシー作用の評価の方法として，感作動物に抗原を曝露したときの死亡率や症状で評価する方法では，有効性は証明できなかったとする報告が多い[18)~20)]．これに対し，Churchら[16)]，Delehuntら[17)]は，感作動物の気道内圧・気流速度を測定して，抗原投与による気道収縮はグルココルチコイド投与後3～4時間で抑制されたとしている．このような結果の相違は，惹起されたアナフィラキシー反応の部位と程度によるものと思われ，全身的で致死的な反応に対しては，グルココルチコイドの抑制効果は認めがたいものと考えられる．一方，感作動物の気管平滑筋をin vitroでグルココルチコイドとインキュベートし，抗原投与による平滑筋収縮に対する効果をみた実験では，15分間のインキュベートで収縮の抑制が認められたという報告[24)]と，45分間インキュベートしても収縮抑制が認められなかったという報告[25)]がある．このような報告からも，グルココルチコイドの抗アナフィラキシー効果には，投与より効果発現までの時間が異なる複数の作用機序があると推定される．

著者は，感作モルモットにPsをin vivoで腹腔内注入して6時間後に気管を摘出し抗原を投与した場合には，Ps非投与群に比べて気管収縮が有意に抑制されるが，それより短い時間や24時間後には抑制効果が認められないことを見出した．これに対し，気管を摘出してからin vitroで1時間Psとインキュベートすると，抗原投与による気管収縮の抑制が認められた．このことから，Psをin vivoで投与したときとin vitroで投与したときとでは，その抗アナフィラキシー作用の出現までに要する時間に差があることがわかった．この2つの実験の違いは，Psの投与がin vivoかin vitroかということであり，この条件の差は前述したように，気管平滑筋内の遊離プレドニゾロン濃度の差と考えられる．従って，気管鎖をPsと1時間インキュベートした後に認められた気管収縮抑制効果は，高濃度のPsを要し，腹腔内注入後6時間で認められた気管収縮抑制効果は，それよりも低濃度のPsでも生ずるということがいえる．

このようなPsの時間的に2相性の抗アナフィラキシー作用の機序を解明するために，Ⅰ型アレルギー反応の代表的なケミカルメジエーターであるヒスタミンをとりあげ，感作モルモットにin vivoでPsを投与し，摘出肺に抗原を添加したときのヒスタミン遊離および肺内ヒスタミン含量に与える影響と，in vitroで非感作モルモット気道平滑筋をPsとインキュベートしたときのヒスタミンによる収縮反応におよぼす効果を検討した．その結果，前者の実験では，6時間のPs投与によって肺からのヒスタミン遊離および肺内ヒスタミン含量は減少し，後者の実験では，Psとの1時間のインキュベートによってヒスタミンに対する気管収縮が抑制された．以上の成績は，ヒスタミン動態から分析すると，Psの抗アナフィラキシー作用は，早期の

ヒスタミンによる気管平滑筋収縮の抑制作用と，後期のヒスタミン産生・遊離の抑制作用の2相性であることを示している．

Psによる肺内ヒスタミン含量の減少および肺からのヒスタミン遊離の抑制は，肺から血液を洗い流した条件で実験していることから，マスト細胞のヒスタミン産生および遊離の抑制と換言できる．マスト細胞は気管にも存在するので，感作モルモット摘出気管に抗原を投与した場合にも，気管からのヒスタミン遊離に対してPsが抑制作用を果していると推定され，このことが気管収縮が抑制された一つの理由と考えられる．

一方，感作モルモット気管の抗原による収縮がin vitroでPsと1時間インキュベートすることによって抑制されたが，これには，Ps投与後1時間ではマスト細胞からのヒスタミン遊離は抑制されないこと，Psとの1時間のインキュベートによってヒスタミンによる気管収縮が抑制されたことより，Psのヒスタミンによる気管収縮抑制作用が関与していると考えられる．しかも，ヒスタミンのみならず，アセチルコリンによる気管収縮に対してもPsの抑制作用が認められた．北村[26]は，アセチルコリン，プロスタグランディン$F_2\alpha$，ヒスタミン，セロトニン，ブラジキニンのモルモット摘出気管筋に対する収縮作用が，プレドニゾロン5 μg/mlとのインキュベートですべて有意に抑制されたと報告している．これらのことは，このPsの気管収縮抑制作用がケミカルメジエーターの種類をとわず生ずることを示している．

野村ら[27]，石原ら[28]は，モルモットにプレドニゾロンを投与すると，気管平滑筋のcyclic AMPが短時間で増加したと述べている．またLavineら[29]は，ヒトリンパ球および子牛心筋をハイドロコーチゾンと2分間インキュベートしてホスホジエステラーゼ活性の抑制を認め，これはこの酵素に対するハイドロコーチゾンの直接作用であることを証明した．著者の認めたPsの早期の気管収縮抑制作用は，摘出気管標本を用いており，カテコールアミンや迷走神経の関与が除去されること，ケミカルメジエーターの種類に関係なく認められることより，Psにより気管平滑筋内にcyclic AMPが増加したことによるものと考えられ，これにはLavineらの述べているグルココルチコイドによるホスホジエステラーゼの直接の抑制作用が関与していると推定される．

I型アレルギー反応によるヒスタミン遊離に対するグルココルチコイドの抑制作用は，いくつかの文献で報告されている[30)~37)]．Schleimerら[36]は，ヒト好塩基球をデキサメサゾン10^{-7}Mとインキュベートすると，抗IgE抗体を加えたときのヒスタミン遊離が4時間後より24時間後まで抑制されたと述べている．これはin vitroで好塩基球を使った実験系ではあるが，著者の結果とほぼ一致している．また，モルモットやラットにグルココルチコイドを1～数週間投与すると，肺ヒスタミン含量が減少するという報告があるが[15)38)39)]，Shahら[34]は，感作モルモットにデキサメサゾン0.5 mg/kgを皮下注射後24時間で摘出した気管・肺組織のヒスタミン含量の減少を認めている．しかし，それより短時間でグルココルチコイドの投与による肺ヒスタミン含量の低下を認めた報告はない．グルココルチコイドによって組織内ヒスタミン含量が減少する原因として，Beallら[39]はヒスタミン産生にあずかるヒスチジン脱炭酸酵素活性の低下をあげている．

グルココルチコイドはプロスタグランデイン産生も抑制することが示されているが[40)~43)]，Blackwellら[44)45)]は，グルココルチコイドがホスホリパーゼA_2活性を抑制し，その結果アラキドン酸遊離が抑制されるためであると報告している．そして，グルココルチコイドによって細胞内に産生され，ホスホリパーゼA_2抑制作用を有するマクロコーティンというポリペプチドを分離し，これがグルココルチコイド投与後3～4時間で産生されることを示した．

一般にステロイドが効果発現するには，1）ステロイドと細胞質内受容体との結合，2）ステロイド・受容体結合物質の核への移行，3）新たなメッセンジャーRNAの合成，4）リボゾームでの新たな蛋白合成の開始という過程をとり，この間に数時間を要するとされている[46]．著者の示したPsの後期の作用であるヒスタミン産生・遊離の抑制作用は，Ps投与後2時間以内には認められず，6時間後に認められており，投与より効果発現までの時間と考えると，プロスタグランデインでいわれているように，マスト細胞内でプレドニゾロンの受容体を介して，ヒスタミンの産生・遊離を抑制するような物質が作られている可能性が考えられる．

著者の認めたPsの抗アナフィラキシー作用の2相性という現象は興味あるものであり，その発現機序に関する考察をFig. 9に模式的に示した．これにはさらに実験的裏づけが必要であるし，またヒスタミン以外のI型アレルギー反応のケミカルメジエーターであるプロスタグランデインやロイコトリエンとグルココルチコイドとの関係についても明らかにする必要がある．

結　　論

効果を検討するため，モルモットの気管および肺に対するグルココルチコイド製剤であるPsの影響を調べた．その結果，

(1) 感作モルモットにPs 20 mg/kgを投与し，6時間後に摘出作製した気管鎖の抗原投与による収縮は，Ps非投与群より有意に減少した．また感作モルモット摘出気管鎖を，Ps 500 μg/mlおよび1 mg/mlと1時間インキュベートすると，抗原による収縮はPs非投与群より有意に減少した．

(2) 感作モルモット肺組織に抗原を加えたときのヒスタミン遊離は，その6時間前にPs 20 mg/kgを投与した群で有意に減少し，また肺組織ヒスタミン含量も減少した．

(3) 非感作モルモット摘出気管鎖のヒスタミン，アセチルコリンに対する収縮は，10 μg/mlから1 mg/mlのPsと1時間インキュベートすることにより，有意に減少した．

以上の成績から，プレドニゾロンの抗アナフィラキシー作用は時間的に2相性であり，プレドニゾロン投与後1時間以内に認められるものは気道平滑筋に対する直接作用と考えられ，また数時間して発現するものは産生細胞の変化が関与する作用であると推定された．

なお，本論文の要旨は，第16回日本胸部疾患学会北陸地方会，第21回日本胸部疾患学会総会，第31回日本アレルギー学会総会において発表した．

稿を終わるにあたり，御指導・御校閲を賜った服部絢一教授に深甚の謝意を表します．また本研究の遂行にあたり，御指導，御教示を賜った宮保進福井医科大学教授に深く感謝いたします．

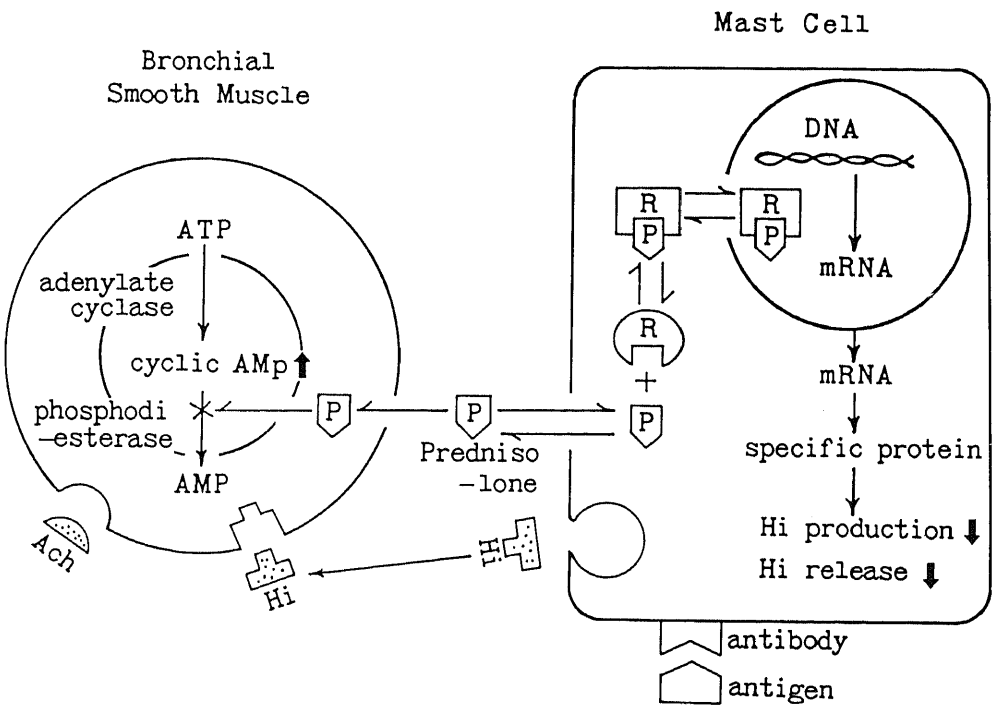

Fig. 9. Mechanism of the anti-anaphylactic action of prednisolone speculated. Prednisolone inhibits phosphodiesterase activity in the bronchial smooth muscle directly, resulting in the increase of cyclic AMP and bronchodilatation. This effect takes place within 1 hour of prednisolone administration.
On the other hand, prednisolone enters the cytoplasm of mast cell, combines with its receptor and forms prednisolone-receptor complex. This complex affects DNA replication in the nucleus and newly synthesized mRNA is transported to ribosome where new specific proteins are produced. These proteins decrease histamine production and histamine release evoked by antigen-antibody reaction. These processes require several hours to reach the final step. P, prednisolone; Hi, histamine; Ach, acetylcholine; R, receptor.

文 献

1) **Aviado, D. M. & Carrillo, L. R.**: Anti-asthmatic action of corticosteroids: A review of the literature on their mechanism of action. J. Clin. Pharmacol., **10**, 3-11 (1970).

2) **Claman, H. N.**: How corticosteroids work? J. Allergy Clin. Immunol., **55**, 145-151 (1975).

3) **McFadden, E. R., Roger, K., William, J., Beverly, H., Ronald, K. & George, V.**: A controlled study of the effects of single doses of hydrocortisone on the resolution of acute attacks of asthma. Am. J. Med., **60**, 52-59 (1976).

4) **Arnaud, A., Verloet, D., Dugue, P., Orehec, J. & Charpin, J.**: Treatment of acute asthma: Effect of intravenous corticosteroids and β_2--adrenergic agonists. Lung, **156**, 43-48 (1979).

5) **Ellul-Micallef, R., Borthwick, R. C. & McHardy, G. J. R.**: The time-course of response to prednisolone in chronic brochial asthma. Clin. Sci. Mol. Med., **47**, 105-117 (1974).

6) **Ellul-Micallef, R. & Fenech, F. F.**: Intravenous prednisolone in chronic bronchial asthma. Thorax, **30**, 312-315 (1975).

7) **Krebs, H. A. & Henseleit, K.**: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. Z. Phys. Chem., **210**, 33-66 (1932).

8) Timmerman, H. & Scheffer, N. G.: A new tracheal strip preparation for the evaluation of β-adrenergic activity. J. Pharm. Pharmac., **30**, 78-79 (1968).

9) **Shore, P. A., Burkhalter, A. & Cohn, V. H.**: A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. J. Pharmacol. Exp. Ther., **127**, 182-186 (1959).

10) **鈴木 修**: 血漿 histamine 測定法-Shore 法の改良について-慶応医学, **50**, 263-270 (1973).

11) **Simonsen, M.**: On the effect of cortisone on allergy and complement titer. Scand. J. Clin. Lab. Invest., **2**, 287-291 (1950).

12) **Humpherey, J. H.**: The effect of cortisone upon some experimental hypersensitivity reaction. Br. J. Exp. Path., **32**, 274-283 (1951).

13) **Feinberg, S. M., Malkiel, S. & McIntire, F. C.**: The effect of stress factors on asthma induced guinea pigs by aerosolized antigens. J. Allergy, **24**, 302-308 (1953).

14) **Ernesto, M.**: Action of prednisone on experimental asthma of the guinea pig. Acta Allergol., **11**, 181-187 (1957).

15) **Carrillo, L. R. & Aviado, D. M.**: Mechanisms for the bronchodilator effects of corticosteroids in the sensitized rabbit. J. Pharmacol. Exp. Ther., **164**, 302-311 (1968).

16) **Church, M. K., Collier, O. J. & James, G. W. L.**: The inhibition by dexamethazone and disodium cromoglycate of anaphylactic bronchoconstriction in the rat. Br. J. Pharmacol., **46**, 56-65 (1972).

17) **Delehunt, J. C., Yerger, L., Ahmed, T. & Abraham, W. M.**: Inhibition of antigen-induced bronchoconstriction by intravenous metyl prednisolone succinate in allergic sheep. J. Allergy Clin. Immunol., **69**, 62 (1982).

18) **Landau, S. W., Nelson, W. A. & Gay, L. N.**: The effect of adrenocorticotropic hormone (ACTH) and cortisone on histamine reactions and anaphylactic reactions in guinea qigs. Bull. Johns Hopkins Hosp., 88, 395-401 (1951).

19) **Germuth, F. G., Ottinger, B. & Oyama, J.**: Influence of cortisone on experimental hypersensitivity and circulating antibody in the guinea pig. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **80**, 188-191 (1952).

20) **Criep, L. H., Weigler, R. R., Pittsburg & Mayer, L. D.**: Effect of adrenal cortex in allergy. I. Effect on experimental hypersensitivity. Allergy, **23**, 541-549 (1952).

21) **Goadby, P. & Smith, W. G.**: Observations on the antianaphylactic activity of hydrocortisone and related steroids. J. Pharm. Pharmac., **16**, 108-114 (1964).

22) **Claman, H. N.**: Corticosteroids and lymphoid cells. N. Engl. J. Med., **287**, 388-397 (1972).

23) **Yanagibashi, K., Mizuchi, A., Yotsumoto, H. & Miyachi, Y**: Separation of serum prednisolone and prednisolone-21-hemisuccinate by extraction and their concurrent determination by radioimmunoassay. Clin. Chem., **26**, 1301-1303 (1980).

24) **伊藤幸治, 大田 健, 鈴木修二, 宮本昭正, 堀内淑彦**: ステロイドの気管支喘息における作用機序. 日胸疾会誌, **18** (suppl.), 154 (1980).

25) **Patterson, R. & Mich, A. A.**: The tracheal strip: observation on the response of tracheal muscle. J. Allergy, **29**, 165-172 (1958).

26) 北村 諭：肺における vasoactive substance の代謝と作用-第8報，気管支筋作動薬の作用におよぼす glucocorticoid の効果について，日胸疾会誌，**14**, 379-383 (1976).

27) 野村利夫，竜華一男，佐竹辰夫：気道 cyclic-AMP レベルの変動とその意義-とくに気管支拡張剤，ステロイド，ヒスタミン，抗ヒスタミン剤などの効果について-日胸疾会誌，**13**, 699-708 (1975).

28) 石原陽子，北村 諭，小坂樹徳，原沢道美：気管支筋作動薬の作用におよぼす glucocorticoid の効果と気管筋組織中 cyclic nucleotide 値の変動．呼と循，**25**, 1109-1114 (1977).

29) **Lavine, N., Rachelefsky, G. & Kaplan, S. A.**: Inhibition of cyclic-AMP phosphodiesterase in human lymphocytes by physiological concentrations of hydrocortisone. Horm. Metab. Res., **7**, 253-258 (1975).

30) **Greaves, M. W. & Plummer, V. M.**: Glucocorticoid inhibition of antigen-evoked histamine release from human skin. Immunology, **27**, 359-364 (1974).

31) **Schmutzler, W. & Freundt, G. P.**: The effect of glucocorticoids and catecholamines on cyclic AMP and allergic histamine release in guinea pig lung. Int. Archs. Allergy Appl. Immunol., **49**, 209-212 (1975).

32) **Thomas, R. U. & Whittle, B. J. R.**: Prostaglandins and release of histamine from rat peritoneal mast cell. Br. J. Pharmacol., **57**, 474-475 (1976).

33) **Dembińska-Kieć, A., Grodzińska, L., Panczenko, B. & Gryglewski, R. J.**: Effect of corticosteroids on the release of histamine and prostaglandins from fragments of mesentery of immunized guinea pig. Pharmacol. Res. Commun., **10**, 153-160 (1978).

34) **Shah, M. U., Desai, N. K., Dadkar, V. N. & Sheth, U. K.**: Effect of dexamethazone and disodium cromoglycate on anaphylactic release and total content of histamine and 5-HT from sensitized quinea-pig tissues. Ind. J. Med. Res., **71**, 428-432 (1980).

35) **Hofman, J. & Borowska, S. C.**: Antigen-induced histamine release from mast cells and basophils after hydrocortisone and disodium cromoglycate treatment. Agents and Actions, **11**, 107-109 (1981).

36) **Schleimer, R. P., Lichtensuein, L. M. & Gillespie, E.**: Inhibition of basophil histamine release by anti-inflammatory steroids. Nature, **292**, 454-455 (1981).

37) **Kurihara, N. & Shibata, K.**: Effects of corticosteroids on the release of mediators in anaphylaxis of sensitized guinea-pig tissues. Jap. J. Pharmacol., **25**, 181-187 (1975).

38) **Kovacs, E. M.**: Changes in tissue histamine content of guinea-pigs following treatment with cortisone and meyrapone. Br. J. Pharmacol., **24**, 574-578 (1965).

39) **Beall, G. N.**: Decarboxylase inhibitors and histamine in guinea pigs. Biochem. Pharmacol., **14**, 1907-1911 (1965).

40) **Kantrowitz, F., Robinson, D. R. & McGuire, M. B.**: Corticosteroids inhibit prostaglandin production by rheumatoid synovia. Nature, **258**, 737-739 (1975).

41) **Tashjan, A. H., Voelkel, E. F. & McDonough, J.**: Hydrocortisone inhibits prostaglandin production by mouse fibrosarcoma cells. Nature, **258**, 739-741 (1975).

42) **Russo-Marie, F., Paing, M. & Dural, D.**: Involvement of glucocorticoid receptors in steroid-induced inhibition of prostaglandin secretion. J. Biol. Chem., **254**, 8498-8504 (1979).

43) **Hong, S. L. & Levine, L.**: Inhibition of arachidonic acid release from cells as the biochemical action of anti-inflammatory corticosteroids. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **73**, 1730-1734 (1976).

44) **Blackwell, G. J., Flower, R. J., Nijkamp, F. P. & Vane, J. R.**: Phospholipase A_2 activity of guinea-pig isolated perfused lungs; stimulation and inhibition by anti-inflammatory steroids. Br. J. Pharmacol., **62**, 79-89 (1978).

45) **Blackwell, G. J., Carnuccio, R., Rosa, M. D., Flower, R. J., Parente, L. & Persico, P.**: Macrocortin: a polypeptide causing the anti-phospholipase effect of glucocorticoids. Nature, **287**, 147-149 (1980).

46) **O'Malley, B. W.**: Mechanisms of action of steroid hormones. N. Engl. J. Med., **284**, 370-377 (1971).

Effect of Prednisolone on the Anaphylaxis of Guinea Pig Kazunori Kanamori, Department of Internal Medicine (III) (Director: Prof. Kenichi Hattori), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Juzen Med. Soc., **93**, 373–386 (1984)

Key words: anaphylaxis, prednisolone, guinea pig, histamine

Abstract

Antigen-induced contraction of the tracheas of actively sensitized guinea pigs was inhibited by the intraperitoneal administration of prednisolone 6 hours before the experiment. Prednisolone was also effective when the sensitized trachea was incubated in vitro for 1 hour just before the experiment.

Antigen-induced histamine release from the lung tissues and histamine content in the lung tissues from the sensitized animals were reduced when prednisolone was administered 6 hours before antigen challenge. One hour incubation with steroid inhibited histamine– or acetylcholine– induced contraction of the trachea of the non-sensitized animal.

It is speculated that anti-anaphylactic effects of prednisolone are bimodal; initial effect appearing in a short period seems to be due to a direct inhibition of tracheal contraction, and the late effect due to the inhibition of histamine release probably mediated by steroid receptor and requires several hours to take place.