

気道浸潤した好酸球の喘息病態における生体内役割

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: 石浦, 嘉久 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9311

気道へ浸潤した好酸球の喘息病態における生体内役割

金沢大学医学部医学科内科学第三講座 (主任 松田 保教授)

石 浦 嘉 久

慢性剥離性好酸球性気管支炎と気道過敏性亢進は気管支喘息の基本的病態である。この気道過敏性は気管支肺胞洗浄液中の好酸球数と相関するとした報告がある一方で、気管支粘膜中の好酸球数との相関はなく、またアトピー咳嗽や好酸球性肺炎においては気管支粘膜組織中の好酸球が増加しているにもかかわらず気道過敏性は亢進していない。また気道への化学伝達物質の投与は気道過敏性を亢進させるが、好酸球顆粒内蛋白には化学伝達物質を不活化する物質が含まれていることも知られている。これらの所見は、気道における好酸球の存在と気道過敏性の関係の詳細が明らかではないことを示している。本研究では、気道へ動員された好酸球の喘息病態における生体内役割を解明することを目的として、既報のポリミキシンBによるモルモット慢性好酸球性気管支炎モデルを用いるとともに、好酸球の活性化因子である血小板活性化因子 (platelet activating factor, PAF) によるモルモット慢性好酸球性気管支炎モデルを作製して、気道過敏性と即時型喘息反応 (immediate asthmatic response, IAR) に及ぼす気道への好酸球動員の影響について検討した。さらにIARに対する抗ヒスタミン薬の影響と気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中のヒスタミン値の解析を行なった。気道への好酸球動員は、ポリミキシンB、PAFいずれの場合においても、非感作モルモットのヒスタミンに対する非特異的気道過敏性を用量依存的に有意に抑制したが、受動感作モルモットのIARを用量依存的に有意に増強した。このIAR増強は抗ヒスタミン薬により完全に抑制され、また受動感作モルモットにおけるBALF中のヒスタミン値は、抗原暴露前はいずれの群においても低値であったにもかかわらず、抗原暴露5分後の好酸球動員群において有意に高値だった。これらの成績より、気道へ浸潤した好酸球は、ヒスタミンの分解促進と遊離能増強という相反する作用を介して気管支喘息の病態に密接に関与することが示唆された。

Key words bronchial asthma, eosinophil, histamine, immediate asthmatic response, bronchial hyperresponsiveness

気管支喘息は、日本アレルギー学会気管支喘息治療ガイドラインによると、“広範かつ種々の程度の気道閉塞と気道の炎症により特徴付けられる。気道閉塞は軽度のものから致死的な高度のものまで存在し、自然にまた治療により可逆的である。気道炎症はリンパ球、肥満細胞、好酸球など多くの炎症細胞が関与し、気道粘膜上皮の損傷を示し、種々の刺激に対する気道の反応性亢進を伴う”と定義されている¹⁾。すなわち気管支喘息の基本病態は、慢性の好酸球性気管支炎と気道過敏性亢進である。この気道過敏性は気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage, BAL) 中の好酸球数と相関すると報告されており^{2)~4)}、また気管支喘息において重要な役割を果たしている脂質化学伝達物質であるトロンボキサンA₂ (thromboxane A₂, TXA₂)、ロイコトリエン (leukotriene, LT)、血小板活性化因子 (platelet activating factor, PAF) 等の投与は気道過敏性を亢進する^{5)~7)}。

しかしながら近年の報告では、気道過敏性と気管支粘膜生検組織中の好酸球数との相関は認められていない^{8)~11)}。また、好酸球顆粒にはヒスタミン、LT、PAFを不活化するヒスタミ

ナーゼ (histaminase)、アシルサルファターゼ (arylsulfatase) ホスホリパーゼD (phospholipase-D) 等が含まれており、アレルギー反応鎮静化にも関与する^{12)~18)}。さらに最近藤村ら¹⁹⁾²⁰⁾は、アトピー咳嗽 (咳感受性亢進を伴う非喘息性好酸球性気管支炎) や好酸球性肺炎においては気管支粘膜組織中の好酸球が増加しているにもかかわらず、メサコリン (methacholine) に対する気道過敏性が亢進していないことを報告し、Gibsonら²¹⁾もまた喀痰中の好酸球数と気道過敏性が相関しないことを報告している。すなわち、好酸球性気管支炎の全てが気道過敏性亢進を伴わないことが示唆されるが、このような現状のなかで、気道へ浸潤した好酸球の喘息病態における生体内役割に関する報告はみられない。そこで本研究では、既報のモルモット慢性好酸球性気管支炎モデル²²⁾を用いて、生体内における気道への好酸球動員が即時型喘息反応 (immediate asthmatic response, IAR) および非特異的気道過敏性におよぼす影響について検討した。さらに好酸球の走化および活性化因子であるPAF¹⁰⁾を用いた慢性好酸球性気管支炎モデルを作製して同様の検討を行ない、各々のモデルにお

平成10年5月14日受付, 平成10年6月2日受理

Abbreviations : BAL, bronchoalveolar lavage; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; HRF, histamine-releasing factor; IAR, immediate asthmatic response; LT, leukotriene; MBP, major basic protein; OA, ovalbumin; PAF, platelet activating factor; Pao, pressure at the airway opening; TXA₂, thromboxane A₂

るヒスタミ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200g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施設(室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$)で一週間以上飼育し, 肉眼的観察により健康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²³⁾の方法に従って抗OA血清を作製した。すなわち総量 $500 \mu\text{g}$ のOAを完全フロイントアジュバント (complete Freund's adjuvant) にてエマルジョンの状態にし, モルモットの両側鼠径部, 両側腋窩部, 項部の5箇所に分けて皮内注射した。2週間後同様の処置により追加免疫を行なった。さらに2週間後採血し, 血清を分離して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°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日後の受動皮膚アナフィラキシー反応による抗体価は, 各々12800倍, 6400倍, および512倍であった。受動感作は実験の24時間前に, 抗OA血清 $1\text{ml}/\text{kg}$ を腹腔内投与することにより行なった。

III. 実験装置および測定項目

実験は, 既報の実験装置および方法を用いて行なった²⁴⁾。(図1) すなわち, ペントバルビタール (sodium pentobarbital) (Abbott Laboratories, Chicago, USA) $75\text{mg}/\text{kg}$ の腹腔内投与に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1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) にて陽圧換気を行なった。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 $10\text{ml}/\text{kg}$, 換気回数は毎分60回とした。気管支収縮の指標として気管カニューレの側圧 (pressure at the airway opening, Pao) を圧差トランスデューサー Model 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の変化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²⁴⁾。気管支収縮反応は抗原吸入直前の値を基礎値としたPaoの増加率として表した。薬物の吸入投与は, 南ら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, Paoの安定を15分間確認してから呼吸状態を変化させることなく安静換気下で吸入することにより行なった²⁵⁾。エアゾールの発生量は $15.2 \mu\text{g}/\text{分}$ であり, その 46.4% がモルモットの肺に沈着する²⁵⁾。薬物の腹腔内投与は当教室で開発した腹腔内投与器を用いて確実に投与した。なお, モルモットに各種薬物の溶液またはそれぞれの対照液としての溶媒を静脈内投与する際は, 容量負荷を一定にするために $1\text{ml}/\text{kg}$ の投与量とした。

IV. 慢性好酸球性気管支炎モデルの作製

1. ポリミキシンBによる慢性好酸球性気管支炎モデルの作製
既報の方法を用いて次のように作製した²²⁾。ポリミキシンB (ファイザー, 東京) を生理食塩水に溶解し, $5\text{mg}/\text{ml}$ のポリミキシンB溶液を作製した。ポリミキシンB溶液 $150 \mu\text{l}/\text{kg}$ をエッペンドルフ・ピペットを用いて, モルモットの右鼻腔内に静かに注入した。3週間にわたって, 合計6回 (実験1, 3, 9, 11, 18, 20日目) 同様の点鼻処置を行なった。各々の処置中, モルモットはジエチルエーテル (和光, 大阪) で軽麻酔した。対照として生理食塩水 $150 \mu\text{l}/\text{kg}$ を同様に注入した。

2. PAFによる慢性好酸球性気管支炎モデルの作製

既報の方法と小川らの方法を次のように一部改変して作製

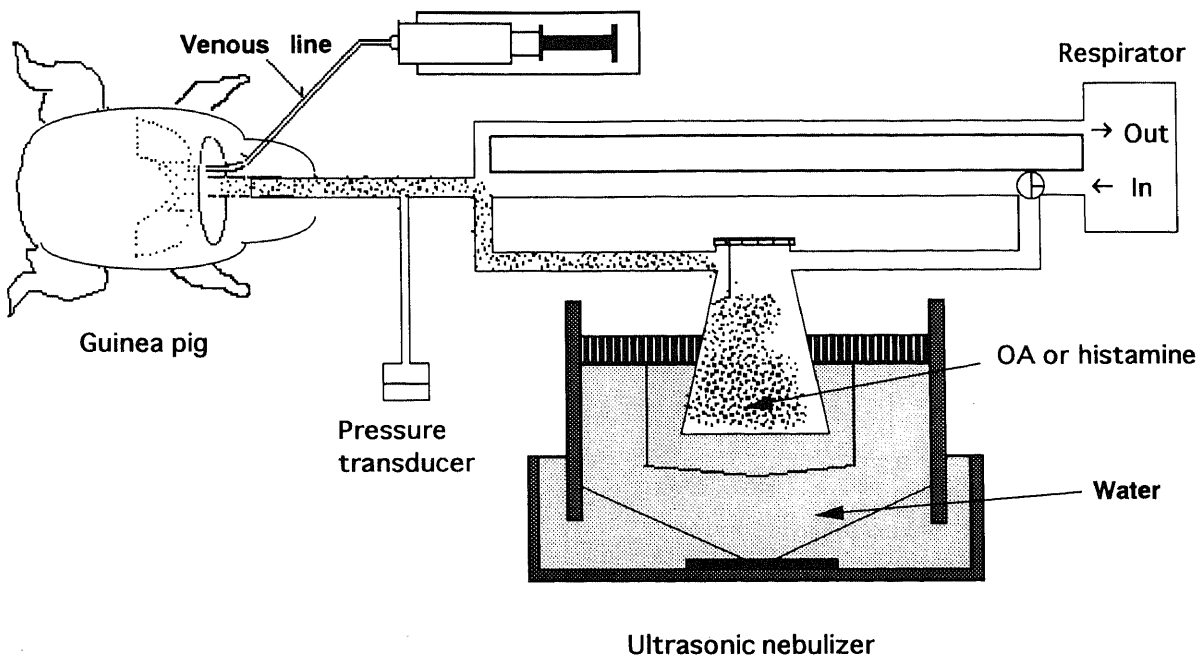


Fig. 1. Design of the experimental system. An anaesthetized guinea pig was placed in the supine position and the trachea was cannulated with polyethylene tube. The animal was artificially ventilated by a small animal respirator and nebulized with histamine or ovalbumin (OA). Pressure at the airway opening (Pao) was continuously recorded as an overall index of bronchial response using a pressure transducer and a X-Y recorder.

した¹⁰⁾²²⁾. PAF (和光) を生理食塩水に溶解し, 1mg/mlおよび0.3mg/mlのPAF溶液を作製した. PAF溶液100 μ l/kgをエッペン・ピペットを用いて, モルモットの右鼻腔内に静かに注入した. 3週間にわたって, 合計6回(実験1, 2, 9, 10, 18, 19日目)同様の点鼻処置を行なった. 各々の処置中, モルモットはジエチルエーテル(和光)の吸入によって軽麻酔した. 対照として生理食塩水100 μ l/kgを同様に注入した.

V. 実験プロトコール

1. ポリミキシンB反復点鼻投与による気道への白血球遊走

16匹の無感作モルモットを8匹づつ2群に分け, 上記の方法で作製したモデルを, 実験21日目(ポリミキシンB最終投与の24時間後)にBALを行ない, その細胞成分を分析した. すなわち, 75mg/kgのペントバルビタールの腹腔内投与による麻酔後に, 気管切開を行ない気管カニューレを挿入し, 室温の無菌生理食塩水10mlを各々2回づつ注入し, 低圧持続吸引して気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)を得た. BALFは回収直後にガーゼで濾過し, 1,000rpmで10分間遠心した後に沈渣をRPMI-1640培養液(Grand Island Biological Co., Grand Island, USA)3mlに再浮遊させ, 上清を小スピッツに分注して-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した. BALF総細胞数は, 細胞浮遊液100 μ lを同量のチュルク染色液に混じて, バーカーチュルク型計算板を用いて算定した. また細胞分画は, 細胞浮遊液100 μ lをサイトスピン2(Shandon Southern Products Ltd., Cheshire, England)を用いて800rpmで8分間遠心して塗抹標本を作製してメイギムザ染色を施し, 光学顕微鏡で気道上皮を除く細胞を300個観察して算定した.

2. ポリミキシンB反復点鼻投与の気道過敏性に対する影響

二塩化ヒスタミン(和光)を生理食塩水で溶解し, 25, 50, 100 μ g/mlのヒスタミン溶液を作製した. 無感作のポリミキシンB反復点鼻モルモット8匹に対し, 低濃度のヒスタミン溶液

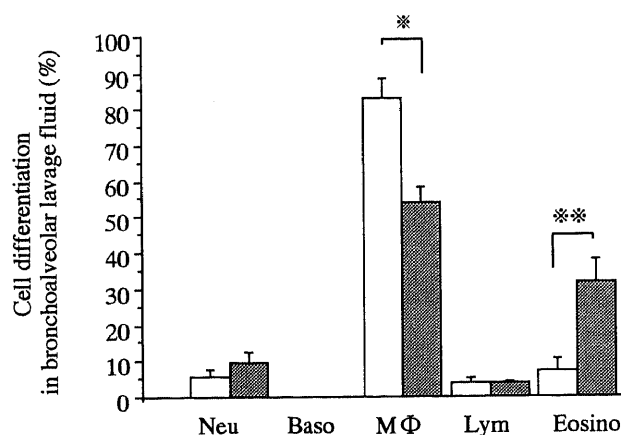


Fig. 2. Effect of repeated intranasal administration of polymyxin-B on leukocyte population in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Guinea pigs were divided to 2 groups, one group treated with 75 μ g/kg polymyxin-B intranasally and other treated with saline. Group: \square , saline (n=8); \blacksquare , polymyxin-B (n=8). Each bar indicates $\bar{x} \pm$ SEM of cell population. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with saline group analyzed by Mann-Whitney's U test. Neu, neutrophil; Baso, basophil; M Φ , macrophage; Lym, lymphocyte; Eosino, eosinophil.

より5分間隔で20秒間吸入負荷し, Paoの変化を観察した. 対照群として無感作の生理食塩水反復点鼻モルモット8匹を使用した.

3. ポリミキシンB反復点鼻投与のIARに対する影響

1) ポリミキシンB反復点鼻投与のヒスタミンを介するIARに及ぼす影響

実験の24時間前に受動感作したポリミキシンB反復点鼻モルモット12匹に対し, 生理食塩水で溶解して1mg/mlの濃度に調整したOA溶液を30秒間吸入負荷し, Paoの変化を20分間観察した. 対照群として同様に受動感作した生理食塩水反復点鼻モルモット12匹を使用した.

2) ポリミキシンB反復点鼻投与の抗ヒスタミン薬投与後のIARに及ぼす影響

実験の24時間前に受動感作したポリミキシンB反復点鼻モルモット30匹に対し, ヒスタミンに対する反応を完全に除外するために, ジフェンヒドラミン(diphenhydramine)60mg/kgを腹腔内投与した. その15分後に²⁴⁾, 生理食塩水で溶解して1mg/mlの濃度に調整したOA溶液を30秒間吸入負荷し, Paoの変化を20分間観察した. 対照群として同様に前処置した生理食塩水反復点鼻モルモット30匹を使用した.

4. PAF反復点鼻投与による気道への白血球遊走

上記IV-2.の方法で作製したモデルを, 実験21日目(PAF最終投与の48時間後)にBALを行ない, V-1.と同様の方法でその細胞成分を分析した.

5. PAF反復点鼻投与の気道過敏性に対する影響

二塩化ヒスタミンを生理食塩水で溶解し, 25, 50, 100 μ g/mlのヒスタミン溶液を作製した. 無感作のPAF反復点鼻モルモット(30 μ g/kg, n=8; 100 μ g/kg, n=8)に対し, 低濃度のヒスタミン溶液より5分間隔で20秒間吸入負荷し, Paoの変化を観察した. 対照群として無感作の生理食塩水反復点鼻モルモット8匹を使用した.

6. PAF反復点鼻投与のIARに対する影響

1) PAF反復点鼻投与のヒスタミンを介するIARに及ぼす影響

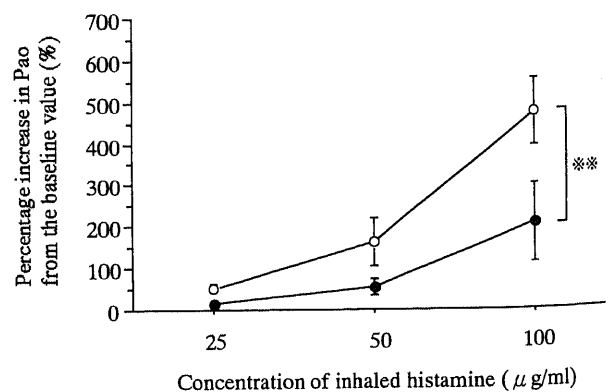


Fig. 3. Effect of repeated intranasal administration of polymyxin-B on percentage increase in Pao caused by inhaled histamine in non-sensitized guinea pigs. Group: \circ , treated with saline (n=8); \bullet , treated with repeated intranasal administration of 75 μ g/kg polymyxin-B (n=8). Each point indicates $\bar{x} \pm$ SEM. ** $p < 0.01$ compared with saline treatment group analyzed by repeated measure analysis of variance (ANOVA).

実験の24時間前に受動感作したPAF反復点鼻モルモット ($30\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=8$; $100\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=8$) に対し, 生理食塩水で溶解して $1\text{mg}/\text{ml}$ の濃度に調整したOA溶液を30秒間吸入負荷し, Pao の変化を20分間観察した. 対照群として同様に受動感作した生理食塩水反復点鼻モルモット8匹を使用した.

2) PAF反復点鼻投与の抗ヒスタミン薬投与後のIARに及ぼす影響

実験の24時間前に受動感作したPAF反復点鼻モルモット ($30\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=8$; $100\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=8$) に対し, ヒスタミンに対する反応を完全に除外するためにジフェンヒドラミン (diphenhydramine) $60\text{mg}/\text{kg}$ を腹腔内投与した15分後に²⁴⁾, 生理食塩水で溶解して $1\text{mg}/\text{ml}$ の濃度に調整したOA溶液を30秒間吸入負荷し, Pao の変化を20分間観察した. 対照群として同様に前処置した生理食塩水反復点鼻モルモット8匹を使用した.

7. PAF反復点鼻投与モルモットにおけるIAR前後のBALF中ヒスタミン濃度

実験の24時間前に受動感作したPAF反復点鼻モルモット ($30\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=8$; $100\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=8$) および生理食塩水反復点鼻モルモット ($n=8$) に対し, 生理食塩水で溶解して $1\text{mg}/\text{ml}$ の濃度に調整したOA溶液を30秒間吸入負荷した. 気管支収縮によるBALF回収量のばらつきを除くために, OA吸入3分後にサルブタモール $10\mu\text{g}/\text{kg}$ を静脈内に投与し, その2分後に前述の方法でBALを行なった. また対照として, 同様に受動感作した抗原非暴露のPAF反復点鼻モルモット ($30\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=8$; $100\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=8$) および生理食塩水反復点鼻モルモット ($n=8$) に対してBALを行なった. 得られたBALFを -80°C で凍結保存し, 日を改めてヒスタミン¹²⁵Iキット (栄研化学, 東京) によるRIA法を用いてBALF中ヒスタミン濃度を測定した. すなわち, 試験管にそれぞれのBALF上清を $100\mu\text{l}$ ずつ秤取し, アシル化試薬 $25\mu\text{l}$ とアシル化緩衝液 $25\mu\text{l}$ を加えて攪拌した後, ヒスタミン抗体チューブに二重測定で $50\mu\text{l}$ ずつ秤取した. さらに¹²⁵I標識ヒスタミンを $500\mu\text{l}$ ずつ加えて攪拌し, 4°C で16時間静置した後に試験管内の溶液を 4°C に保持しながら吸引除去し, ウェル型シンチレーションカウンターを用いて各チュ

ープの放射能を測定した. それぞれの測定値を総放射能で除した値を計算して, 既知の濃度のヒスタミンで作製した標準曲線にあてはめ, 各検体中のヒスタミン濃度を求めた.

VI. 統計学的解析

成績はすべて平均値±標準誤差で表した. 抗原吸入前の Pao の基礎値, Pao の基礎値からの任意の時点の増加率, および Pao の最大増加率の差の検定と, BALF中の細胞数, 細胞分画比率およびヒスタミン濃度の差の検定には, 3群以上の場合にはKruskal-Wallis検定を, 2群の場合には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の経時の変化に関する差の検定には, 繰り返し測定のある分散分析 (analysis of variance, 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

1. ポリミキシンB反復点鼻投与による気道への白血球遊走

ポリミキシンB反復点鼻投与群および生理食塩水反復点鼻投与群におけるBALF回収量は, 各々 $12.5 \pm 0.69\text{ml}$ および $13.5 \pm 0.59\text{ml}$ で有意差を認めなかった. BALF中の総細胞数に関しても, それぞれ $12.1 \pm 1.9 \times 10^5$ 細胞/ml および $11.6 \pm 1.3 \times 10^5$ 細胞/ml であり, 有意差はなかった. 細胞分画では, 好酸球比率がポリミキシンB反復点鼻投与群 ($31.9 \pm 6.4\%$) が生理食塩水反復点鼻投与群 ($7.1 \pm 3.5\%$) に比して有意に増加し ($p < 0.01$), マクロファージはポリミキシンB反復点鼻投与群 ($53.9 \pm 4.3\%$) が生理食塩水反復点鼻投与群 ($83.2 \pm 5.2\%$) に比して有意に減少していた ($p < 0.05$). (図2)

2. ポリミキシンB反復点鼻投与の気道過敏性に対する影響

ヒスタミン吸入直前の Pao の値は, ポリミキシンB反復点鼻投与群 $10.9 \pm 0.4\text{cmH}_2\text{O}$, 対照群 $11.1 \pm 0.5\text{cmH}_2\text{O}$ であり, 両群間に差を認めなかった. ヒスタミン吸入後の Pao の増加率の用量-反応曲線を図3に示した. ポリミキシンB反復点鼻投与はヒスタミン吸入負荷による Pao の増加率を有意に抑制した ($p < 0.01$). すなわち対照群においてはヒスタミン $25\mu\text{g}/\text{ml}$, $50\mu\text{g}/\text{ml}$ および $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 吸入負荷による Pao の増加率は $52.4 \pm 10.4\%$, $163.3 \pm 56.6\%$ および $475.9 \pm 80.8\%$ であつたの

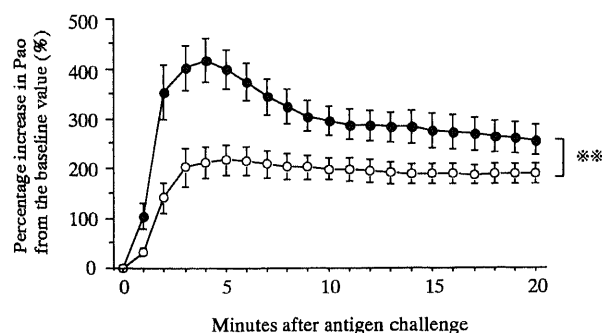


Fig. 4. Effect of repeated intranasal administration of polymyxin-B on percentage increases in Pao after inhalation of antigen (OA, $1\text{mg}/\text{ml}$) in passively sensitized guinea pigs. Group: ○, treated with saline ($n=12$); ●, treated with repeated intranasal administration of $75\mu\text{g}/\text{kg}$ polymyxin-B ($n=12$). Each point indicates $\bar{x} \pm \text{SEM}$. ** $p < 0.01$ compared with saline treatment group analyzed by repeated measure ANOVA.

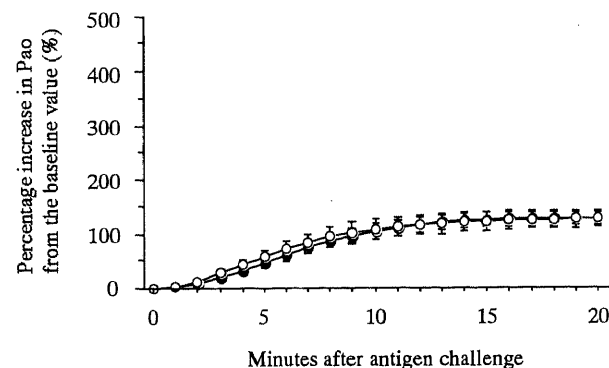


Fig. 5. Effect of repeated intranasal administration of polymyxin-B on percentage increases in Pao after inhalation of antigen (OA, $1\text{mg}/\text{ml}$) in passively sensitized guinea pigs pretreated with diphenhydramine ($60\text{mg}/\text{kg}$). Group: ○, treated with saline ($n=30$); ●, treated with repeated intranasal administration of $75\mu\text{g}/\text{kg}$ polymyxin-B ($n=30$). Each point indicates $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

に対し、ポリミキシンB反復点鼻投与群では各々 $16.2 \pm 2.8\%$ 、 $55.3 \pm 18.2\%$ および $207.5 \pm 93.3\%$ であった。

3. ポリミキシンB反復点鼻投与のIARに対する影響

1) ポリミキシンB反復点鼻投与のヒスタミンを介するIARに及ぼす影響

抗原吸入直前のPaoの値は、ポリミキシンB反復点鼻投与群 $9.7 \pm 0.2\text{cmH}_2\text{O}$ 、対照群 $10.1 \pm 0.3\text{cmH}_2\text{O}$ であり、両群間に差を認めなかった。抗原吸入後のPaoの増加率の時間経過を図4に示した。抗原吸入後のPaoの最大増加率は、ポリミキシンB反復点鼻投与群および対照群で各々 $418.1 \pm 43.9\%$ および $230.2 \pm 30.1\%$ であり、ポリミキシンB反復点鼻投与群が対照群より有意に高値であった($p < 0.01$)。

2) ポリミキシンB反復点鼻投与の抗ヒスタミン薬投与後のIARに及ぼす影響

抗原吸入直前のPaoの値は、ポリミキシンB反復点鼻投与群 $9.9 \pm 0.2\text{cmH}_2\text{O}$ 、対照群 $10.2 \pm 0.2\text{cmH}_2\text{O}$ であり、両群間に差を認めなかった。抗原吸入後のPaoの増加率の時間経過を図5に示した。抗原吸入後のPaoの最大増加率はポリミキシンB反復点鼻投与群および対照群で各々 $131.2 \pm 19.3\%$ および $129.4 \pm 19.3\%$ であり、両群間に有意差を認めなかった。

4. PAF反復点鼻投与による気道への白血球遊走

$30 \mu\text{g/kg}$ または $100 \mu\text{g/kg}$ のPAFまたは生理食塩水を反復点鼻投与した各群におけるBALF回収量は、各々 $15.8 \pm 0.6\text{ml}$ 、 $15.8 \pm 0.7\text{ml}$ 、 $15.6 \pm 0.5\text{ml}$ であり、有意差を認めなかった。BALF中の総細胞数に関しても、それぞれ $19.7 \pm 3.2 \times 10^5$ 細胞/ml、 $17.2 \pm 2.5 \times 10^5$ 細胞/ml、 $15.4 \pm 1.4 \times 10^5$ 細胞/mlであり有意差はなかった。細胞分画では、好酸球比率はPAF $100 \mu\text{g/kg}$ 反復点鼻投与群($16.9 \pm 3.5\%$)が生理食塩水反復点鼻投与群($7.8 \pm 1.7\%$)に比して有意に増加していた($p < 0.05$)が、好中球を含む他の細胞分画には有意差を認めなかった。(図6)

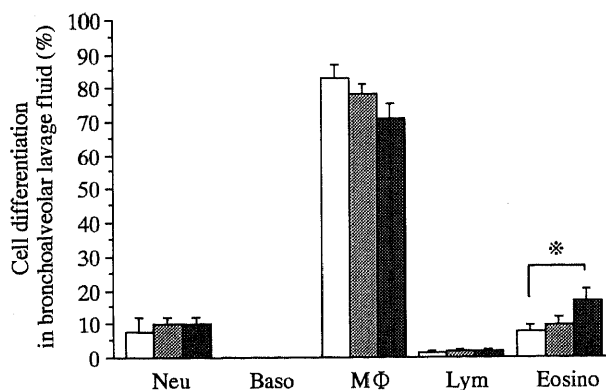


Fig. 6. Effect of repeated intranasal administration of platelet activating factor (PAF) on leukocyte population in BALF. Guinea pigs were divided to 3 groups, one group treated with $30 \mu\text{g/kg}$ PAF intranasally, one with $100 \mu\text{g/kg}$ PAF, and other with saline. Group: \square , saline (n=8); \blacksquare , $30 \mu\text{g/kg}$ PAF (n=8); \blacksquare , $100 \mu\text{g/kg}$ PAF (n=8). Each bar indicates $\bar{x} \pm \text{SEM}$ of cell population. * $p < 0.05$ compared with saline treatment group analyzed by Mann-Whitney's U test. Neu, neutrophil; Baso, basophil; MΦ, macrophage; Lym, lymphocyte; Eosino, eosinophil.

5. PAF反復点鼻投与の気道過敏性に対する影響

ヒスタミン吸入直前のPaoの値は、 $30 \mu\text{g/kg}$ または $100 \mu\text{g/kg}$ のPAFまたは生理食塩水を反復点鼻投与した各群で各々 $8.0 \pm 0.2\text{cmH}_2\text{O}$ 、 $8.5 \pm 0.5\text{cmH}_2\text{O}$ 、 $8.6 \pm 0.4\text{cmH}_2\text{O}$ であり、各群間に差を認めなかった。ヒスタミン吸入後のPaoの増加率の用量-反応曲線を図7に示した。PAF反復点鼻投与はヒスタミン吸入負荷によるPaoの増加率を有意に抑制した($p < 0.05$)。すなわち、対照群においてはヒスタミン $25 \mu\text{g/ml}$ 、 $50 \mu\text{g/ml}$ および $100 \mu\text{g/ml}$ 吸入負荷によるPaoの増加率は $17.8 \pm 3.2\%$ 、 $113.8 \pm 30.0\%$ および $504.4 \pm 126.8\%$ であったのに対し、 $30 \mu\text{g/kg}$ のPAF反復点鼻投与群では各濃度のヒスタミン吸入負荷によるPaoの増加率は $14.8 \pm 2.9\%$ 、 $73.7 \pm 20.8\%$ および $264.4 \pm 82.3\%$ であり、 $100 \mu\text{g/kg}$ のPAF反復

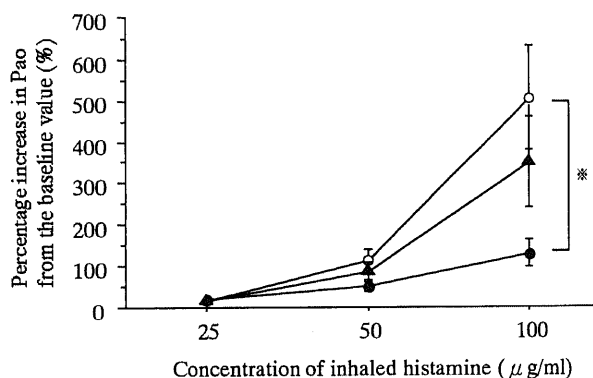


Fig. 7. Effect of repeated intranasal administration of PAF on percentage increases in Pao caused by inhaled histamine in non-sensitized guinea pigs. Group: \circ , treated with saline (n=8); \blacktriangle , treated with repeated intranasal administration of $30 \mu\text{g/kg}$ PAF (n=8); \bullet , treated with repeated intranasal administration of $100 \mu\text{g/kg}$ PAF (n=8). Each point indicates $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $p < 0.05$ compared with saline treatment group analyzed by repeated measure ANOVA.

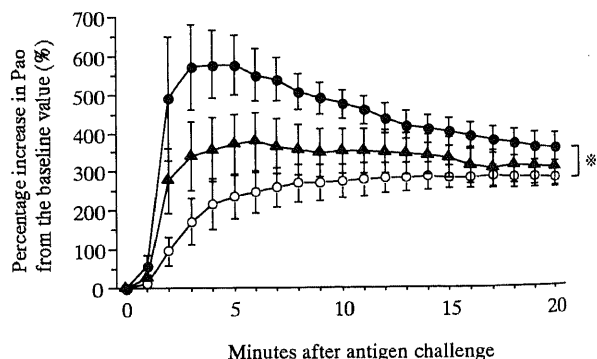


Fig. 8. Effect of repeated intranasal administration of PAF on percentage increases in Pao after inhalation of antigen (OA, 1 mg/ml) in passively sensitized guinea pigs. Group: \circ , treated with saline (n=8); \blacktriangle , treated with repeated intranasal administration of $30 \mu\text{g/kg}$ PAF (n=8); \bullet , treated with repeated intranasal administration of $100 \mu\text{g/kg}$ PAF (n=8). Each point indicates $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $p < 0.05$ compared with saline treatment group analyzed by repeated measure ANOVA.

点鼻投与群では各々 $18.1 \pm 4.6\%$ 、 $50.2 \pm 12.7\%$ および $129.6 \pm 34.3\%$ であった。

6. PAF 反復点鼻投与の IAR に対する影響

1) PAF 反復点鼻投与のヒスタミンを介する IAR に及ぼす影響

抗原吸入直前の Pao の値は、 $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ または $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ の PAF または生理食塩水を反復点鼻投与した各群で各々 $8.3 \pm 4.3\text{cmH}_2\text{O}$ 、 $7.3 \pm 0.4\text{cmH}_2\text{O}$ 、 $7.9 \pm 0.2\text{cmH}_2\text{O}$ であり、各群間に差を認めなかった。

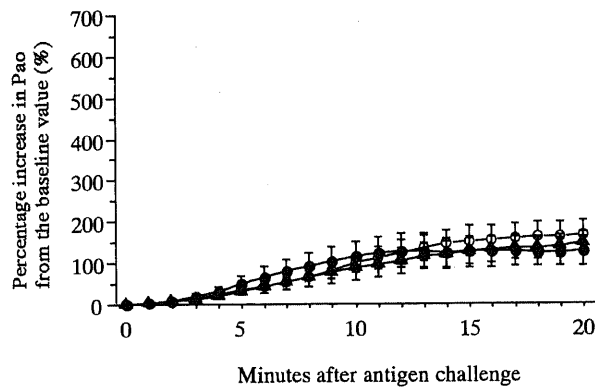


Fig. 9. Effect of repeated intranasal administration of PAF on percentage increases in Pao after inhalation of antigen (OA, 1 mg/ml) in passively sensitized guinea pigs pretreated with diphenhydramine (60 mg/kg). Group: ○, treated with saline (n=8); ▲, treated with repeated intranasal administration of $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ PAF (n=8); ●, pretreat with repeated intranasal administration of $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ PAF (n=8). Each point indicates $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

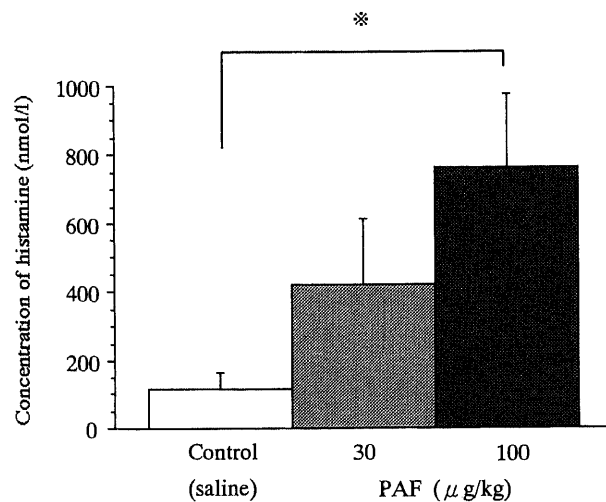


Fig. 10. Concentration of histamine in BALF obtained 5 min after antigen challenge in passively sensitized guinea pigs. Animals were divided to 3 groups, one group treated with $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ PAF intranasally, one treated with $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ PAF, and other treated with saline. Group: □, saline (n=8); ▨, $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ PAF (n=8); ▩, $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ PAF (n=8). Each bar indicates $\bar{x} \pm \text{SEM}$ of concentration of histamine. * $p < 0.05$ compared with saline treatment group analyzed by Mann-Whitney's U test.

抗原吸入後の Pao の増加率の時間経過を図 8 に示した。抗原吸入後の Pao の最大増加率は、 $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ または $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ の PAF または生理食塩水を反復点鼻投与した各群で各々 $335.9 \pm 70.6\%$ 、 $576.8 \pm 86.6\%$ 、 $286.5 \pm 33.1\%$ であり、PAF 反復点鼻投与群が対照群に比較して有意に Pao の増加率は高値であった ($p < 0.05$)。

2) PAF 反復点鼻投与の抗ヒスタミン薬投与後の IAR に及ぼす影響

抗原吸入直前の Pao の値は、 $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ または $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ の PAF または生理食塩水を反復点鼻投与した各群で各々 $8.9 \pm 2.8\text{cmH}_2\text{O}$ 、 $8.3 \pm 0.2\text{cmH}_2\text{O}$ 、 $8.8 \pm 0.3\text{cmH}_2\text{O}$ であり、各群間に差を認めなかった。

抗原吸入後の Pao の増加率の時間経過を図 9 に示した。抗原吸入後の Pao の最大増加率は、 $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ または $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ の PAF または生理食塩水を反復点鼻投与した各群で各々 $147.2 \pm 27.6\%$ 、 $129.1 \pm 39.6\%$ 、 $165.4 \pm 35.1\%$ であり、各群間に有意差を認めなかった。

7. PAF 反復点鼻投与モルモットにおける IAR 前後の BALF 中ヒスタミン濃度

$30 \mu\text{g}/\text{kg}$ または $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ の PAF または生理食塩水を反復点鼻投与した各群における BALF 回収量は、抗原吸入前が各々 $17.8 \pm 0.1\text{ml}$ 、 $17.9 \pm 0.1\text{ml}$ 、 $17.6 \pm 0.2\text{ml}$ 、抗原吸入後が各々 $14.3 \pm 0.5\text{ml}$ 、 $13.1 \pm 1.2\text{ml}$ 、 $14.3 \pm 0.7\text{ml}$ であり、それぞれ有意差を認めなかった。

抗原吸入前の BALF 中ヒスタミン濃度は、 $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ または $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ の PAF または生理食塩水を反復点鼻投与した各群で各々 $2.20 \pm 0.35\text{nmol}/\text{l}$ 、 $4.68 \pm 1.08\text{nmol}/\text{l}$ 、 $3.85 \pm 0.89\text{nmol}/\text{l}$ であり、各群間に有意差を認めなかった。抗原吸入 5 分後の BALF 中ヒスタミン濃度の成績を図 10 に示した。抗原吸入後の BALF 中ヒスタミン濃度は、 $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ または $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ の PAF または生理食塩水を反復点鼻投与した各群で各々 $427.8 \pm 161.3\text{nmol}/\text{l}$ 、 $738.1 \pm 228.5\text{nmol}/\text{l}$ 、 $116.0 \pm 45.5\text{nmol}/\text{l}$ であり、 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ の PAF 反復点鼻投与群が対照群に比して有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

考 察

本研究では、ポリミキシン B による気道への好酸球動員は、ヒスタミンに対する気道反応性を有意に抑制する一方で IAR を有意に増強し、この IAR 増強は抗ヒスタミン薬の前処置によって完全に消失した。また、PAF の反復点鼻投与においても全く同様の結果が得られた。PAF の反復点鼻投与は、IAR による BALF 中ヒスタミン濃度増加を有意に増強した。これらの成績は生体内における気道への好酸球の動員が気道過敏性を抑制する一方で、肥満細胞からのヒスタミンの放出または産生能を亢進させることにより、IAR を修飾することを示唆している。

元来、気管支喘息はアレルギー反応と気道過敏性亢進の 2 つの基本病態から構成されている疾患であり、本疾患におけるアレルギー反応には Coombs と Gell の I 型アレルギー反応が関与し²⁶⁾、外来性アレルゲンに対する Ig E 抗体の産生、肥満細胞および好塩基球の細胞表面での Ig E 抗体とアレルゲンの反応による化学伝達物質の遊離、遊離されたヒスタミンや TXA_2 、LT、PAF 等の化学伝達物質による組織反応、という各段階から構成されている。一方、各種の外来性気管支収縮物質に対する気管支平滑筋の易収縮性、すなわち気道過敏性亢進は、刺激受容体

の感受性とは相関がなく独立したものであり²⁷⁾、アレルギーの関与が不明である内因型喘息においても認められる気管支喘息の基本的病態である。すなわち気管支喘息患者では健康者に比較して、アセチルコリンに対して90倍²⁸⁾、ヒスタミンとメサコリンに対して100倍²⁹⁾、生体内気管支平滑筋は敏感に反応する。その機序に関しては、コリン作動性興奮神経、アドレナリン作動性抑制神経および非アドレナリン非コリン作動性神経を介する気管支平滑筋自体の反応性の変化³⁰⁾³¹⁾以外に、平滑筋周囲の環境の変化も重要であると認識されており、各種細胞の浸潤による慢性気道炎症、各種化学伝達物質、気道上皮の損傷、気道上皮の透過性亢進、気道の閉塞、アセチルコリンやヒスタミンそしてタキキニンの代謝酵素の異常等が関与していると考えられているが³²⁾³³⁾、その詳細については完全に解明されているわけではない。

気管支喘息の気道の慢性炎症性疾患としての認識は、喘息死患者の気道粘膜における好酸球の著明な浸潤と気道上皮剥離等の特有の病理所見の報告³⁴⁾に始まったが、今日では慢性の気道上皮剥離性の好酸球性気管支炎と気道過敏性の亢進が気管支喘息の基本病態として認識されるに至っている¹⁾³⁵⁾。好酸球は気道粘膜下組織、気道上皮、粘液栓等に広範に観察され、BALF中の好酸球数と気道過敏性は相関すると報告されている^{2)~4)}。一方、喘息死した患者の気管支組織には、好酸球内特異顆粒の成分である主塩基蛋白 (major basic protein, MBP) の沈着が認められ、それは障害部位に一致していた³⁶⁾。さらに好酸球内特異顆粒の成分であるMBPと気道過敏性の有意な相関も報告されている²⁾。また、気管支喘息の病態形成に重要と考えられるTXA₂、LT、PAFなどの脂質化学伝達物質の投与は気道過敏性を亢進する^{5)~7)}。

しかしながら、近年抗原暴露後の能動感作モルモットを用いた基礎的検討で、BALF中の好酸球増多とMBP値の上昇が逆に気道過敏性の抑制をきたすことが報告され³⁷⁾、また気道過敏性と気管支粘膜生検組織中の好酸球数との相関がないことも報告された^{8)~11)}。さらに好酸球顆粒内には、ヒスタミンを不活化するヒスタミナーゼ、LTを不活化するアリルサルファターゼ、PAFを不活化するホスホリパーゼDなどが存在する^{12)~18)}。最近Kroneveldら³⁸⁾は基礎研究において、好酸球の遊走、活性化作用を有するインターロイキン-5投与モルモットにニューロキニン2受容体拮抗薬を投与した場合、気道過敏性が抑制されたが気道に動員された好酸球数の増加に変化がなかったことを報告し、藤村ら¹⁹⁾²⁰⁾も臨床研究においてアトピー咳嗽 (咳感受性亢進を伴う非喘息性好酸球性気管支炎) や好酸球性肺炎では気管支粘膜組織中の好酸球が増加しているにもかかわらず、メサコリンに対する気道過敏性が亢進していないことを報告した。これらの所見は、好酸球性気管支炎と気道過敏性が1対1の関係にあるわけではないこと、すなわち好酸球性気管支炎がすべて気道過敏性を亢進させないことを示唆している。

このような現状にありながら、好酸球の気道への遊走因子を慢性的に投与し、慢性好酸球性気管支炎の類似状態を作製してその生体内作用を検討した報告はみられない。

そこで本研究は、生体内での気道への好酸球動員がIARおよび非特異的気道過敏性におよぼす影響を明らかにすることを目的とし、まず、既報のポリミキシンBによるモルモット慢性好酸球性気管支炎モデル²²⁾を用いた実験を行なった。このポリミキシンBは肥満細胞脱顆粒物質として知られており³⁹⁾⁴⁰⁾、本モ

デルにおいて認められる好酸球浸潤の程度および気道上皮剥離の程度は、気管で最も強く、末梢の気管支になるほど軽度であり、肺野領域ではほとんど変化がみられないことが確認されている²²⁾。またポリミキシンBにより気道に動員された好酸球が活性化されていることも報告されている⁴⁰⁾。ただし、活性化の程度の詳細が不明であるという問題点が残されたため、好酸球を活性化することが知られているPAFを用いた気道への好酸球動員についても検討した。

その結果、生体内での気道への好酸球動員は、動員に用いた刺激物質の種類に関係なく、ヒスタミンに対する気道過敏性、すなわち非特異的気道過敏性を有意に抑制した。過去の組織学的検討によって、ポリミキシンB投与により気道過敏性を改善する方向に働く形態学的変化は認められていない²²⁾。したがって、この気道過敏性抑制の機序は、その成立に關与する化学伝達物質が好酸球由来代謝酵素によって代謝され減少したためと考えられる。気管支喘息が吸入抗原に対する気道アナフィラキシーによって惹起される疾患であることを考慮するとき、この生体内での好酸球の作用は合目的な反応であることが示唆され、かつ気管支喘息患者の気管・気管支において多数集簇した好酸球はアレルギー反応を鎮静化するために存在している可能性が考えられる。すなわち、気道への好酸球動員は生体保護的に働いている可能性があり、この点において好酸球を気道より排除することを主たる目的とした従来の治療法や、現在開発途上にある好酸球遊走因子であるインターロイキン-5を始めとする各種サイトカインの抑制薬の生体内での効果は、試験管内でのそれと大きく異なる可能性がある。

次に、気管支喘息の基本病態の一つである即時型アレルギー反応に関する検討を行なった。本反応は、炎症細胞表面における外来性抗原とIg E抗体との反応によるヒスタミン、TXA₂、LT、PAF等の炎症性化学伝達物質遊離を介する反応であり⁴¹⁾⁴²⁾、このIg E抗体は肥満細胞または好塩基球の表面に存在している⁴³⁾。近年になり、Ig Eを介さない肥満細胞の脱顆粒によるヒスタミン遊離が注目されている⁴⁴⁾。これは、運動、飲酒、冷気吸入などのアレルギー反応を介さない気管支喘息発作の機序として重要であり、ヒスタミン遊離因子 (histamine-releasing factor, HRF) の関与が示唆されている。現在のところ、好中球由来HRF⁴⁴⁾、単核球由来HRF⁴⁵⁾、マクロファージ由来HRF⁴⁶⁾の存在が知られているが、好酸球由来のHRFに関する報告はみられない。本研究では、気道への好酸球の動員はIARを増強した。このIAR増強効果における好酸球の役割について、当初はポリミキシンBが肥満細胞脱顆粒物質であることより³⁹⁾⁴⁰⁾、肥満細胞を介した反応の可能性も示唆された。しかしながら肥満細胞を介さないPAFによる気道への好酸球動員においても全く同様の結果が得られたので、この可能性は否定的であり、気道へ動員された好酸球は化学伝達物質の易放出性を招来しうると考えられた。この化学伝達物質がヒスタミンであることは、抗原暴露前の無処置のモルモット気道に存在するヒスタミン濃度がいずれの群においても低値でかつ有意差がなかったにもかかわらず、抗原暴露後のヒスタミン遊離がPAF反復点鼻投与群において有意に増強され、かつIARの増強が抗ヒスタミン薬であるジフェンヒドラミンの前処置により完全に抑制されたことにより示唆された²⁴⁾。

これらの所見は、気道へ動員された好酸球が遊離する何らかの物質が、直接的あるいは間接的に肥満細胞に作用してヒスタ

ミン遊離能を亢進させること、言い換えれば、HRFとして作用しうることを示唆している。本研究はIARと好酸球動員の生体内関係について論じた初めての報告であり、また従来肥満細胞や好塩基球がその主因であるとされてきたI型アレルギー反応に好酸球が積極的に関与している可能性、もしくはI型アレルギー反応を好酸球が修飾しうる可能性を示した点において興味深い。

IARに関する本研究の結果は、気道過敏性の抑制によるアレルギー反応の鎮静化作用とは一見矛盾する。しかしながら、無症状の気管支喘息患者の気道においても好酸球の増加が確認されていることは⁴⁷⁾、好酸球の存在が喘息反応の鎮静化に作用している可能性を示唆しており、また安定期と発作時においては好酸球の役割が異なる可能性を示唆する。自律神経が α_1 , 2 , β_{1-3} と複数の異なる受容体を有し、その各々が異なる器官において、時に相反する効果を提示しながら最終的には生体にとって目的に作用する事例からも判るように、本研究で示された気道への好酸球動員のIARと気道過敏性に対する相反する作用も、今後の研究によりその意義が解明されると期待される。本研究ではヒスタミン受容体とIARの抑制作用との関連については検討しなかったが、ヒスタミン受容体が H_{1-3} と複数存在することは既知の事実であり⁴¹⁾、今後はこの方面からの検討も必要と考えられる。

結 論

気道へ浸潤した好酸球の喘息病態における生体内役割について検討するために、モルモットを用いた基礎的検討を行ない、以下の結果を得た。

1. ポリミキシンBまたはPAFの反復経鼻投与は、モルモットの気道へ好酸球を動員し、好酸球の喘息病態における生体内役割に関する研究に有用な動物モデルとなりうる。

2. 非感作モルモットにおけるヒスタミンに対する非特異的気道過敏性は、気道への好酸球動員により抑制された。この機序として好酸球によるヒスタミン分解酵素の分泌増加が示唆された。すなわち気道における好酸球の存在は生体保護的に作用する。

3. 受動感作モルモットにおけるIARは、気道への好酸球動員によって増強した。この機序としてヒスタミン遊離能の増強作用が関与することが、抗ヒスタミン薬を用いた検討およびBALF中ヒスタミン濃度の測定によって確認された。

気道に浸潤した好酸球は、ヒスタミンの分解促進と遊離能増強といった相反する作用を介して、気管支喘息の病態に複雑に関与することが示唆された。

謝 辞

稿を終るにあたり、本研究の機会と御校閲を賜った松田 保教授ならびに、終始温かく御指導・御鞭撻いただきまし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明 茂治博士ならびに諸先生方に深謝いたします。

本論文の要旨の一部は、第37回日本胸部疾患学会総会、第10回日本アレルギー学会春期臨床大会ならびに第16回国際アレルギー臨床免疫大会において発表した。

文 献

1) 牧野莊平. 喘息の定義, 診断, 病型, 重症度分類. アレルギー疾患治療ガイドライン. 成人喘息の診断と治療. (牧野

莊平編) 95年改訂版, 16-22頁, ライフサイエンスメデイカ社, 東京, 1995

2) Wardlaw AJ, Dunnette S, Gleich GJ, Collins JV, Kay AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. *Am Rev Resir Dis* 137: 62-69, 1988

3) Ferguson AC, Wong FWM. Bronchial hyperresponsiveness in asthmatic children: Correlation with macrophages and eosinophils in bronchial lavage fluid. *Chest* 96: 988-991, 1989

4) Kirby JC, Hargreave FE, Gleich GJ, O'Byrne PM. Bronchoalveolar cell profiles of asthmatic and nonasthmatic subjects. *Am Rev Resir Dis* 136: 379-383, 1987

5) Fujimura M, Saito M, Kurashima K, Miyake Y, Sakamoto S, Matsuda T. Bronchoconstrictive properties and potentiating effect on bronchial responsiveness of inhaled thromboxane A_2 analogu (STA₂) in guinea pigs. *J Asthma* 26: 237-242, 1989

6) Pretolani M, Ruffie C, Joseph D, Campos MG, Church MK, Lefort J Vargaftig BB. Role of eosinophil activation in the bronchial reactivity of allergic guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 149: 1167-1174, 1994

7) Cuss FM, Dixon CMS, Barnes PJ. Effect of inhaled platelet activating factor on pulmonary function and bronchial responsiveness in man. *Lancet* 2: 189-192, 1986

8) Djukanovic R, Wilson JW, Britten KR, Wilson SJ, Walls AF, Roche WR, Howarth PH, Holgate ST. Quantitation of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry. *Am Rev Resir Dis* 142: 863-871, 1990

9) Sanjar S, Aoki S, Boubekour K, Chapman ID, Smith D, Kings MA, Morley J. Eosinophil accumulation in pulmonary airways of guinea-pigs. *Br J Pharmacol* 99: 267-272, 1990

10) Sanjar S, Aoki S, Kristersson A, Smith D, Morley J. Antigen challenge induces pulmonary airway hyperreactivity in sensitized guinea-pigs: the effect of anti-asthma drugs. *Br J Pharmacol* 99: 679-686, 1990

11) Azzawi M, Bradley B, Jeffery PK, Frew AJ, Wardlaw AJ, Knowles G, Assoufi B, Collins JV, Durham S, Kay AB. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in stable atopic asthma. *Am Rev Resir Dis* 142: 1407-1413, 1990

12) Goetzi EJ, Wasserman SI, Austin KF. Eosinophil polymorphonuclear leukocyte function in immediate hypersensitivity. *Arch Pathol Lab Med* 99: 1-4, 1975

13) Kay AB. Functions of the eosinophil leukocyte. *Br J Haematol* 33: 313-318, 1976

14) Hubscher T. Role of the eosinophil in the allergic reactions. I. An eosinophil-derived inhibitor of histamine release. *J Immunol* 114: 1379-1388, 1975

15) Hubscher T. Role of the eosinophil in the allergic reactions. II. Release of prostaglandines from human eosinophilic leukocytes. *J Immunol* 114: 1399-1410, 1975

16) Wasserman SI, Goetzi EJ, Austin KF. Inactivation of slow reacting substance of anaphylaxis by human eosinophil arylsulphatase. *J Immunol* 114: 645-649, 1975

17) Orange RP, Murphy RC, Austin KF. Inactivation of slow-reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) by arylsulphatase. *J*

Immunol 113: 316-322, 1974

18) Gleich GJ, Adolphson CR. The eosinophilic leukocyte: Structure and function. *Adv Immunol* 39: 177-253, 1986

19) 西 耕一, 明 茂治, 大家他喜雄, 藤村政樹, 松田 保. 慢性咳嗽患者における気管支粘膜生検の検討. *アレルギー* 41: 302, 1992

20) 藤村政樹, 松田 保. 気道炎症の病態への反映—気道炎症と気道過敏性. 炎症性気道疾患としての喘息の病態. (伊藤幸治, 富岡玖夫編), 46-60頁, メディカルトリビューン社, 東京, 1995

21) Gibson PG, Dolovich J, Denburg J, Ramsdell EH. Chronic cough: eosinophilic bronchitis without asthma. *Lancet* 1: 1346-1348, 1989

22) Ogawa H, Fujimura M, Saito M, Matsuda M, Akao N, Kondo K. The effect of neurokinin antagonist FK-224 on the cough response to inhaled capsaicin in a new model of guinea-pig eosinophilic bronchitis induced by intranasal polymyxin B. *Clin Auton Res* 4: 19-27, 1994

23) Santives T, Roska A, Hensley GT, Moore VL, Fink JV, Abromoff P. Immunologically induced lung disease in guinea pig. *J Allergy Clin Immunol* 57: 582-594, 1976

24) 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

25) 南 真司, 岡藤和博, 佐賀 努, 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式噴霧装置の開発. *日胸疾患会誌* 21: 252-258, 1983

26) Coombs RRA, Gell PGH. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. *In* PGH Gell, RRA Coombs, PJ Lachmann (eds), *Clinical Aspects of Immunology*, 3rd ed, p 761-780, Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1975

27) 関沢清久. 気道におけるニューロペプチドの役割—ニューロペプチドと咳. *呼と循* 37: 483-485, 1989

28) 牧野荘平. 気管支喘息における吸入試験の研究 (II) (アセチルコリン吸入試験). *アレルギー* 1: 32-39, 1964

29) 上尾友美恵, 矢伝淳子, 二俣秀夫, 松原秀継, 藤村政樹, 松田 保. メサコリン吸入による気道過敏性試験における深吸気の影響—Partial and maximum expiratory flow-volume curve による解析. *臨床病理* 36: 1447-1453, 1988

30) Barnes PJ. Asthma as an axon reflex. *Lancet* 1: 242-245, 1986

31) Boushey HA, Holtzman MJ, Sheller JR, Nadel JA. Bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 121: 389-413, 1980

32) Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators and asthma. *Pharmacol Rev* 40: 49-84, 1988

33) 関沢清久. 気道平滑筋の過敏性. *日胸疾患会誌* 28: 1275-1281, 1990

34) Ellis AG. The pathological anatomy of bronchial asthma. *Am J Med Sci* 136: 407-429, 1908

35) Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P, Michel F. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 323: 1033-1039, 1990

36) Filley WV, Holley KE, Kephart GM. Identification of immunofluorescence of eosinophil granule major basic protein in lung tissues of patients with bronchial asthma. *Lancet* 2: 11-16, 1982

37) Lefort JL, Nahori MA, Ruffie C, Vargaftig BB, Pretolani M. *In vivo* neutralization of eosinophil-derived major basic protein inhibits antigen-induced bronchial hyperreactivity in sensitized guinea pigs. *J Clin Invest* 97: 1117-1121, 1996

38) Kraneveld AD, Nijkamp FP, Oosterhout AJMV. Role of neurokinin-2 receptor in interleukin-5-induced airway hyperresponsiveness but not eosinophilia in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 367-374, 1997

39) Pincus SH. Production of eosinophil-rich guinea pig peritoneal exudates. *Blood* 52: 127-134, 1978

40) Sun XH, Davis WB, Fukuda Y, Ferrans VJ, Crystal RG. Experimental polymyxin B-induced interstitial lung disease characterized by an accumulation of cytotoxic eosinophils in the alveolar structure. *Am Rev Respir Dis* 131: 103-108, 1985

41) White MV, Slater JE, Kaliner MA. Histamine and asthma. *Am Rev Respir Dis* 135: 1165-1176, 1987

42) Pelikan Z, Pelikan M, Kruis M, Berger MPF. The immediate asthmatic response to allergen challenge. *Ann Allergy* 56: 252-60, 1986

43) Kay AB. Provoked asthma and mast cells. *Am Rev Respir Dis* 135: 1200-1203, 1987

44) White MV, Kaliner MA. Neutrophils and mast cells. I Human neutrophil-derived histamine-releasing activity. *J Immunol* 139: 1624-1630, 1987

45) Kaplan AP, Frenschko H, Fauci A, Dinarello C, Halbert E. A histamine releasing factor from activated human mononuclear cells. *J Immunol* 135: 2027-2032, 1985

46) Schulman ES, Liu MC, Pound D, MacGlaschan DW, Lichtenstein LM, Plaut M. Human lung macrophages induces histamine release from basophils and mast cells. *Am Rev Respir Dis* 131: 230-235, 1985

47) Fukuda T, Numao T, Motojima S. Lymphocyte subsets in bronchial mucosa of symptomatic and asymptomatic asthmatics. *J Allergy Clin Immunol* 87: 302-308, 1991

