

# A Guinea Pig Model of Pranolol-induced Bronchoconstriction(PIB) after Allergic Immediate Asthmatic Reaction and the Role of Thromboxane A2, and 5-lipoxygenase Products

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8552">http://hdl.handle.net/2297/8552</a>

# モルモット抗原吸入即時型気管支収縮反応後の プロプラノロール誘発気管支収縮モデルの作製と トロンボキサン A<sub>2</sub> および 5-リポキシゲナーゼ 代謝産物の関与

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

水 橋 啓 一

喘息患者に  $\beta$  交感神経遮断薬 ( $\beta$  遮断薬) を投与すると、重篤な喘息発作を生ずることはよく知られている。しかし、健常者では  $\beta$  遮断薬投与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。本研究は、 $\beta$  遮断薬誘発気管支収縮の機序を解明するため、モルモットの抗原吸入誘発喘息モデルを用いて、プロプラノロール誘発気管支収縮 (propranolol-induced bronchoconstriction, PIB) モデルを作製し、この反応における自律神経系および化学伝達物質の関与を検討した。あらかじめ受身感作したモルモットに、腹腔内麻酔を行い、人工換気下に抗原を吸入すると、即時型気管支収縮が惹起された。抗原吸入20分後さらに濃度 10mg/ml のプロプラノロールを吸入すると、著明な気管支収縮反応を生ずることを見出した。一方無感作モルモットに抗原吸入後プロプラノロールを吸入した場合や、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プロプラノロールを吸入しても、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 5mg/kg を静脈内投与したが、PIB は抑制されなかった。ヒスタミン惹起気管支収縮を約50%抑制する量のサルブタモール 1 $\mu$ g/kg またはアミノフィリン 25mg/kg を抗原吸入15分後に静脈内投与すると、サルブタモール投与では PIB は抑制されず、アミノフィリン投与では PIB は完全に抑制された。化学伝達物質に関する検討では、抗原吸入15分後に、トロンボキサン A<sub>2</sub> (thromboxane A<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>) の特異的受容体拮抗薬である S-1452 の0.01および0.1mg/kg を静脈内投与すると、PIB は用量依存的に有意に抑制された。また同じく TXA<sub>2</sub> の特異的受容体拮抗薬である ONO-NT 126 の1.0および10 $\mu$ g/kg を静脈内投与すると、PIB は用量依存的に有意に抑制された。また同様に、抗原吸入15分後に、特異的5-リポキシゲナーゼ阻害薬である AL-3264 の0.01および0.1mg/kg を静脈内投与すると、PIB は用量依存的に有意に抑制された。以上の結果は、TXA<sub>2</sub> や5-リポキシゲナーゼ代謝産物などの化学伝達物質が、喘息の特異的病態である PIB の発現機序に重要な役割を果たしていることを示唆する。

**Key words** propranolol-induced bronchoconstriction, chemical mediator, thromboxane A<sub>2</sub>, 5-lipoxygenase products, guinea pigs

喘息患者に  $\beta$  遮断薬を投与すると、気管支収縮が生ずることは、よく知られている<sup>1)~3)</sup>。臨床的には、 $\beta$  遮断薬は循環器系疾患の治療に用いられることが多く、心血管系の合併症をもつ喘息患者に降圧薬などとして投与された場合、重篤な喘息発作を惹起する可能性がある。また緑内障に対する  $\beta$  遮断薬の点眼によっても致死的な喘息発作の生ずることが報告されており<sup>4)</sup>、臨床的に重要な現象である。しかし、健常者では  $\beta$  遮断薬投与によっても気管支収縮は起こらず<sup>5)6)</sup>、この現象は、喘息患者に特異的である。しかしその機序はいまだほとんど解明されておらず、本現象の機序解明は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。喘息患者に  $\beta$  遮断薬であるプロプラノロールを吸入投与するとプロプラノロール誘発気管支収縮 (propranolol-induced bronchoconstriction, PIB) が生ずる<sup>7)8)</sup>。そ

の機序として一部コリン作働性神経の関与が示唆されている<sup>9)</sup>が、異論<sup>10)</sup>もあり定説はない。ヒトの肺に存在する肥満細胞は細胞表面に  $\beta$  受容体をもっており、 $\beta$  刺激薬はアナフィラキシー反応の際のヒスタミン、アナフィラキシー性遅発反応物質 (slow-reacting substances of anaphylaxis, SRS-A) であるロイコトリエン C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, および E<sub>4</sub>, さらにトロンボキサン A<sub>2</sub> (thromboxane A<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>) の放出を抑制する<sup>11)</sup>ことが知られている。これまでの報告ではプロプラノロール誘発気管支収縮はプロプラノロール曝露後10分以内に生じ<sup>12)13)</sup>、かなり強力な、時としてその回復が遅延し重篤となる。これらの事実は PIB における自律神経系以外の化学伝達物質の関与を示唆する。そこで今回、PIB の機序の解明のため、モルモットを用いて、PIB モデルの作製を試み、さらに各種自律神経作働薬、アミノフィリン

平成6年2月2日受付, 平成6年3月9日受理

Abbreviations: DPH, diphenhydramine hydrochloride; OA, ovalbumin; Pao, pressure at the airway opening; PIB, propranolol-induced bronchoconstriction; SRS-A, slow-reacting substances of anaphylaxis; TXA<sub>2</sub>, thromboxane A<sub>2</sub>

の PIB 抑制効果, また化学伝達物質であるトロンボキサン A<sub>2</sub> および 5-リポキシングナーゼ代謝産物の関与を検討した。

対象および方法

I. 実験動物

体重 350~450g のハートレー系雌性モルモット (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>13)</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ブースターを行った。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℃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) による抗体価は各々 12800 倍, 6400 倍, および 512 倍であった。受身感作は実験の 5 日から 7 日前に, 抗 OA 血清を 1ml/kg 腹腔内投与することにより行った。

III. 実験装置および測定項目

既報の実験装置および方法を用いて行った<sup>14)</sup> (図 1)。すなわち, ペントバルビタール (75mg/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, U. S. A.) にて陽圧呼吸を行った。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。人工換気開始後, 内因性のヒスタミンの作用を除去するため, ジフェインヒドラミン (diphenhydramine hydrochloride, DPH) 60mg/kg を腹腔内投与した。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

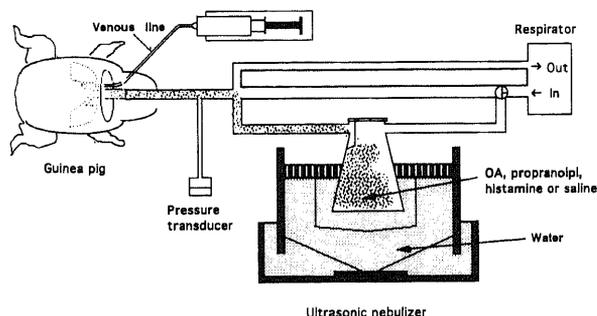


Fig. 1. Design of the experimental system. An anesthetized guinea pig was placed in a supine position and the trachea was cannulated with polyethylene tube. The animal was artificially ventilated by a small animal respirator and nebulized with ovalbumin (OA), propranolol, histamine or saline. Pressure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

(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 分間隔で値を讀取った。Pao は気管支収縮反応を中樞側から末梢側までの総和として反応する指標である<sup>14)</sup>。気管支収縮反応は抗原およびその対照としての生理的食塩水吸入直前の 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>15)</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で 30 秒間吸入することにより行った。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定量的に投与した。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, 容量負荷を一定するため 1ml/kg の投与量とした。

IV. 実験方法

1. プロプラノロール誘発気管支収縮 (PIB) モデルの作製

実験方法を図 2 に示す。DPH 60mg/kg を腹腔内投与後 15 分間, Pao の安定を確認した後, あらかじめ受身感作を行ったモルモット 32 匹と無感作もモルモット 8 匹に抗原吸入負荷を行っ

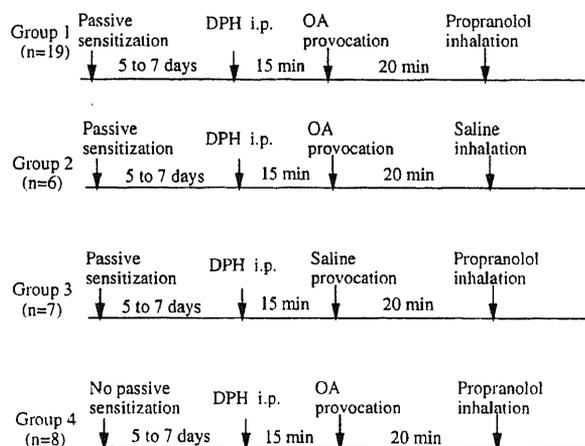


Fig. 2. Chart of experimental study design for a model of propranolol-induced bronchoconstriction (PIB). Pao was recorded after OA (1 mg/ml) or saline provocation followed by inhalation of propranolol (10 mg/ml) or saline in guinea pigs with or without passive sensitization. Group 1 (n=19), propranolol inhalation 20 min after OA provocation in passively sensitized animals; group 2 (n=6), saline inhalation 20 min after OA provocation in passively sensitized animals; group 3 (n=7), propranolol inhalation 20 min after saline provocation in passively sensitized animals; group 4 (n=8), propranolol inhalation 20 min after OA provocation in non-sensitized animals. i.p., intraperitoneal administration.

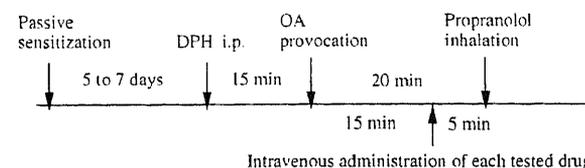


Fig. 3. Chart for study design for examining effects of atropine, salbutamol, aminophylline, and chemical mediator inhibitors on the PIB. Each drug was injected intravenously 5 min before the propranolol inhalation (15 min after the OA provocation).

た。吸入抗原液は OA を生理食塩水に溶解し 1mg/ml の濃度に調節したものを使用した。抗原吸入 20 分後、19 匹 (グループ 1) にプロプラノロール (10mg/ml) を 30 秒間吸入し、6 匹 (グループ 2) には生理食塩水を 30 秒間吸入し、Pao の変化を観察した。別に、感作モルモット 7 匹 (グループ 3) に抗原の代わりに生理食塩水を吸入し、その 20 分後にプロプラノロール (10mg/ml) を 30 秒間吸入した。さらに、無感作モルモット 8 匹 (グループ 4) に抗原を吸入し、20 分後にプロプラノロール (10mg/ml) を吸入した。

## 2. 自律神経作働薬の PIB 抑制効果 (図 3)

### 1) 副交感神経遮断薬の PIB 抑制効果

副交感神経遮断薬の PIB 抑制効果を検討する目的で、代表的な非選択的副交感神経遮断薬であるアトロピン (5mg/kg) (n=8) または生理食塩水 (n=6) を抗原吸入 15 分後、すなわちプロプラノロール吸入 5 分前に静脈内投与した。

### 2) 交感神経遮断薬の PIB 抑制効果

交感神経遮断薬の PIB 抑制効果を検討する目的で、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 (n=6) または生理食塩水 (n=6) を抗原吸入 15 分後、すなわちプロプラノロール (10mg/ml) 吸入 5 分前に静脈内投与した。

なお、あらかじめ、サルブタモールの至適投与量決定のため、当実験システムでのサルブタモール静脈内前投与によるヒスタミン吸入誘発気管支収縮抑制効果に関する用量反応曲線を作製し、その 50% 抑制量を求めた。すなわち、無感作のモルモットをペントバルビタール (75mg/kg) 腹腔投与にて麻酔し、気管切開のうえ、人工換気し、各種濃度 (5000, 120, 60, 30 および 1 $\mu$ g/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。その 10 分後より、生理食塩水に溶解し 25, 50, 100 および 200 $\mu$ g/ml の濃度に調整したヒスタミンを低濃度より順次 5 分間隔で 20 秒間吸入負荷し、Pao の変化を観察した。

### 3. アミノフィリンの PIB 抑制効果 (図 3)

アミノフィリンの PIB 抑制効果を検討する目的で、臨床で気管支拡張薬として使用されているアミノフィリン (n=14) または生理食塩水 (n=6) を抗原吸入 15 分後、すなわちプロプラノロール (10mg/ml) 吸入 5 分前に静脈内投与した。上記 2. 2) の実験と同様、あらかじめ、アミノフィリンの至適投与量決定のため、当実験システムでのアミノフィリン静脈内前投与によるヒスタミン吸入誘発気管支収縮抑制効果に関する用量反応曲線を求め、その 50% 抑制量を採用した。すなわち、25.0 あるいは 12.5mg/kg のアミノフィリンまたは生理食塩水を静脈内投与し、その 10 分後より、ヒスタミンを低濃度より順次 5 分間隔で 20 秒間吸入負荷し、Pao の変化を観察した。

## 4. 化学伝達物質の PIB への関与 (図 3)

1) トロンボキサン  $A_2$  受容体拮抗薬 (S-1452 および ONO NT-126) の PIB に対する効果

トロンボキサン  $A_2$  の PIB への関与を検討するため、選択的トロンボキサン  $A_2$  受容体拮抗薬の PIB 抑制効果を検討した。トロンボキサン  $A_2$  受容体拮抗作用以外の、非特異的作用の関与を否定するため、2 種のトロンボキサン  $A_2$  受容体拮抗薬 S-1452<sup>19)</sup> と ONO NT-126<sup>17)</sup> を使用した。

### i. S-1452 の PIB 抑制効果

生理食塩水にて希釈した 0.01 (n=6) あるいは 0.1mg/kg (n=5) の S-1452 または生理食塩水 (n=6) を、抗原吸入の 15 分

後、すなわちプロプラノロール (10mg/ml) 吸入の 5 分前に静脈内投与した。

### ii. ONO NT-126 の PIB 抑制効果

ONO NT-126 は非水溶性のため、まず 0.5ml のエタノールに溶解し、次に 0.5ml のトウイーン 80 に溶解し、最後に生理食塩水にて目的とする濃度まで希釈し使用した。

生理食塩水にて希釈した 1.0 (n=9) あるいは 10 $\mu$ g/kg (n=9) の ONO NT-126 または溶媒のみ (n=10) を、抗原吸入の 15 分後、すなわちプロプラノロール (10mg/ml) 吸入の 5 分前に静脈内投与した。

## 2) 5-リボキシングナーゼ阻害薬 (AL-3264) の PIB 抑制効果

5-リボキシングナーゼ代謝産物の PIB への関与を検討するため、5-リボキシングナーゼ阻害薬 AL-3264<sup>18)</sup> の PIB 抑制効果を検討した。上記 4. 1) の実験と同様、生理食塩水に溶解した 0.01 (n=8) あるいは 0.1mg/kg (n=8) の AL-3264 または生理食塩水 (N=8) を、抗原吸入の 15 分後、すなわちプロプラノロール (10mg/ml) 吸入の 5 分前に静脈内投与した。

## 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), 完全フロインドアジュバント (complete Freund's adjuvant, CFA) (Difco Laboratories, New York, U. S. A.), ペントバルビタール (pentobarbiturate) (ネンブタール<sup>®</sup> 注射液, Abott Laboratories, Chicago, U. S. A.), プロプラノロール (DL-propranolol hydrochloride) (Sigma), アトロピン (atropine sulfate monohydrate) (和光純薬工業, 大阪), サルブタモール (salbutamol sulfate) (ベネトリン<sup>®</sup> 吸入液, 三共, 東京), ヒスタミン (histamine dihydrochloride) (和光純薬工業), アミノフィリン (aminophylline) (ネオフィリン<sup>®</sup> 注, エーザイ, 東京), S-1452 (塩野義製薬, 大阪より提供), ONO NT-126 (小野薬品工業, 大阪より提供), AL-3264 (大日本薬品工業, 大阪より提供), トウイーン 80 (polyoxyethylene sorbitan monooleate) (Sigma)

## VI. 統計学的解析

成績はすべて平均値士標準誤差で表した。抗原または生理食塩水吸入前の Pao の基礎値および Pao の基礎値からの任意の時点の増加率または Pao の最大増加率の差の検定には、3 群以上の場合は Kruskal-Wallis 検定を用い、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. P I B

感作モルモットに抗原を吸入し、その 20 分後に、プロプラノロールを吸入した群 (グループ 1), プロプラノロールの代わりに生理食塩水を吸入した群 (グループ 2) では、抗原吸入前の Pao の値は、それぞれ 10.1 $\pm$ 0.2, 10.8 $\pm$ 0.2cmH<sub>2</sub>O であった。感作モルモットに抗原の代わりに生理食塩水を吸入し、プロプラノロールを吸入した群 (グループ 3) では、抗原吸入前の Pao は 10.7 $\pm$ 0.3cmH<sub>2</sub>O であった。無感作モルモットに抗原を吸入し、プロプラノロールを吸入した群 (グループ 4) では、抗原吸入前の Pao は 10.3 $\pm$ 0.2cmH<sub>2</sub>O であった。これら抗原吸入前の Pao の基礎値は、4 群間に有意差を認めなかった。図 4 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。グループ 1 とグループ 2 の間では、抗原吸入後の Pao 増加率に有意差はなかったが、グループ 1 では、プロプラノロール吸入によって Pao は著明に上昇したのに対し、グループ 2 では生理食塩水吸

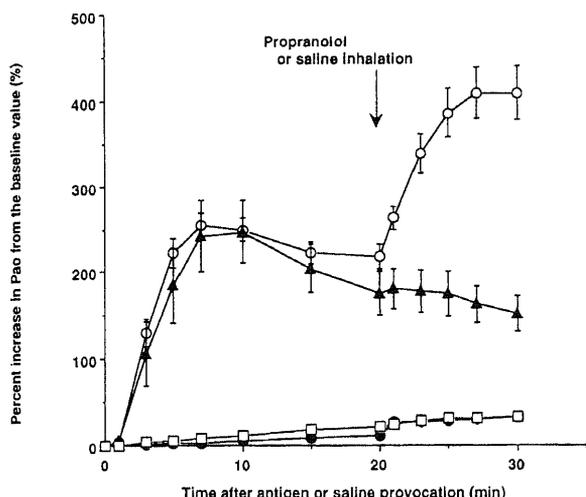


Fig. 4. Time course of percent increase in Pao from the pre-OA provocation value. Propranolol (10 mg/ml) or saline was inhaled 20 min after OA (1 mg/ml) or saline provocation in guinea pigs with or without passive sensitization. ○, propranolol inhalation 20 min after OA provocation in passively sensitized animals (group 1, n=19); ▲, saline inhalation 20 min after OA provocation in passively sensitized animals (group 2, n=6); ●, propranolol inhalation 20 min after saline provocation in passively sensitized animals (group 3, n=7); □, propranolol inhalation 20 min after OA provocation in non-sensitized animals (group 4, n=8). Each point indicates mean value ( $\pm$ SEM).

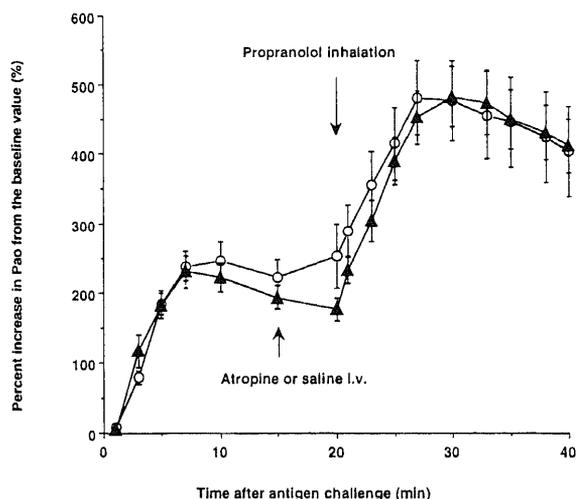


Fig. 5. Time course of percent increase in Pao from the pre-OA provocation value after inhalation of propranolol (10 mg/ml) following OA (1 mg/ml) challenge in passively sensitized guinea pigs pretreated intravenously with atropine or saline 5 min before the propranolol inhalation (15 min after the OA challenge). ○, pretreated with saline (n=6); ▲, pretreated with 5 mg/kg of atropine (n=8). i.v., intravenous administration. Each point indicates mean value ( $\pm$ SEM).

入による Pao の上昇はごくわずかで、2 群間の Pao の増加率の経時変化には、繰り返し測定のある ANOVA にて有意差 ( $p < 0.0001$ ) を認めた。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グループ 3 や、無感作モルモットに抗原を吸入したグループ 4 では、プロプラノロール吸入による、有意な Pao の上昇は認めなかった。

## II. 自律神経作働薬の PIB 抑制効果

### 1. 副交感神経遮断薬の PIB 抑制効果

抗原吸入前の Pao の基礎値は、抗原吸入 15 分後に 5mg/kg 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  $9.9 \pm 0.3$ ,  $9.9 \pm 0.3 \text{ cmH}_2\text{O}$  であり、2 群間には有意差を認めなかった。2 群における、Pao 増加率の時間経過を図 5 に示す。

抗原吸入後の Pao 増加率の最大値は、抗原吸入 15 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  $244 \pm 23$ ,  $254 \pm 28\%$  であり、2 群間には有意差を認めなかった。プロプラノロール吸入直前、すなわち抗原吸入 20 分後の Pao 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、 $176 \pm 18$ ,  $252 \pm 50\%$  であり、2 群間には有意差を認めなかった。プロプラノロール吸入後の Pao 増加率の経時変化にも 2 群間に有意差が認められなかった。プロプラノロール吸入後の 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  $496 \pm 48$ ,  $516 \pm 65\%$  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 PIB 抑制効果

あらかじめ、本実験システムにおける、サルブタモールの至適投与量決定のために行ったサルブタモール静脈内前投与によ

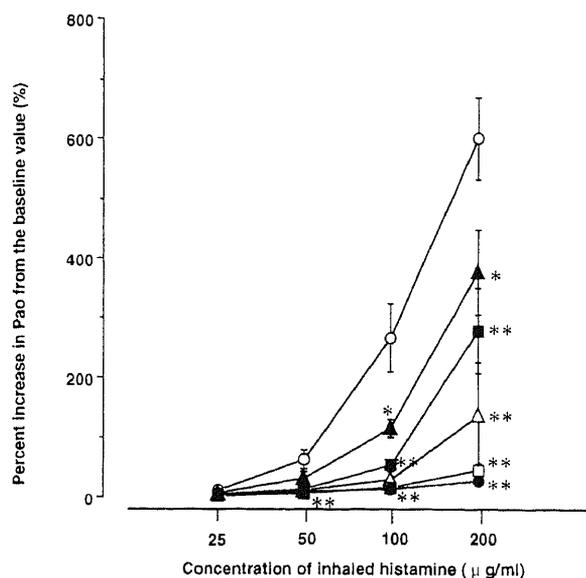


Fig. 6. Bronchoprotective effect of intravenously administered salbutamol on inhaled histamine-induced bronchoconstriction in non-sensitized guinea pigs. ○, pretreated with saline (n=10); ▲, pretreated with 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of salbutamol (n=6); ■, pretreated with 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of salbutamol (n=7); △, pretreated with 60  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of salbutamol (n=7); □, pretreated with 120  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of salbutamol (n=7); ●, pretreated with 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of salbutamol (n=6). Each point indicates mean value ( $\pm$ SEM). \* $p < 0.03$ , \*\* $p < 0.01$  compared with saline pretreated group analyzed by Mann-Whitney's U test.

るヒスタミン吸入誘発気管支収縮抑制効果に関する用量反応曲線を図6に示した。対照とした生理食塩水投与群では、ヒスタミン吸入前値に対する Pao 増加率は、ヒスタミン吸入濃度25, 50, 100および 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  においてそれぞれ $11\pm 2.5$ ,  $65\pm 17$ ,  $266\pm 61$ および $601\pm 72\%$ であった。このヒスタミン吸入による Pao の上昇は、サルブタモール静脈内投与により用量依存的に抑制された。サルブタモール 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群では、ヒスタミン吸入前値に対する Pao 増加率は、ヒスタミン吸入濃度25, 50, 100および 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  においてそれぞれ $6.7\pm 1.5$ ,  $32\pm 12$ ,  $116\pm 17$ および $376\pm 78\%$ であった。ヒスタミン吸入による Pao の上昇は、サルブタモール 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$  静脈内投与によって、ヒスタミン吸入濃度25, 50, 100および 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  吸入時の Pao 増加率を、それぞれ39, 51, 56および37%抑制した。従ってサルブタモールの約50%抑制量としてこの 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$  を採用した。

抗原吸入15分後に 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$  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ける抗原吸入前の Pao の値は、それぞれ  $9.8\pm 0.3$ ,  $10.1\pm 0.1\text{cmH}_2\text{O}$  であり、2群間に有意差を認めなかった。2群における、Pao 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、抗原吸入15分後に、サルブタモールまたは生理食塩水を吸入した各群において、それぞれ $335\pm 22$ ,  $279\pm 29\%$ であり、2群間には有意差を認めなかった。プロプラノロール吸入直前、すなわち抗原吸入20分後の Pao 増加率は、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、 $239\pm 18$ ,  $202\pm 26\%$ であり、2群間には有意差を認めなかった。プロプラノロール吸入後の Pao 増加率の経時的変化は2群間に有意差を認めなかった。プロプラノロール吸入後の Pao の最大増加率は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 $518\pm 60$ ,  $504\pm 44\%$ であり、2群間には有意差を認めなかった。

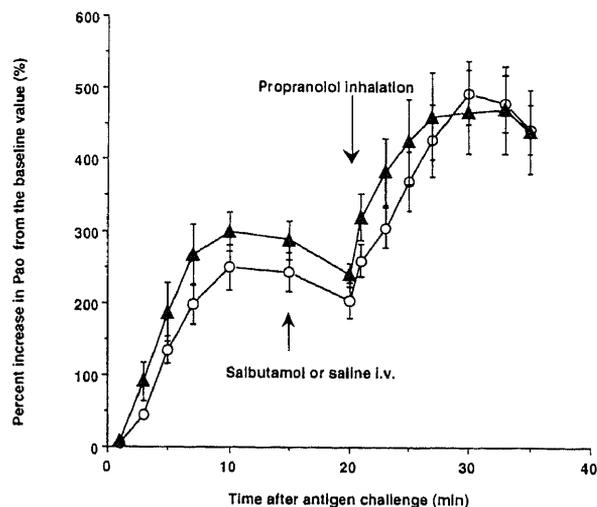


Fig. 7. Time course of percent increase in Pao from the pre-OA provocation value after inhalation of propranolol (10 mg/ml) following ovalbumin (1 mg/ml) challenge in passively sensitized guinea pigs pretreated intravenously with 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of salbutamol or saline 5 min before the propranolol inhalation (15 min after the OA challenge).  $\circ$ , pretreated with saline ( $n=6$ );  $\blacktriangle$ , pretreated with 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of salbutamol ( $n=6$ ). Each point indicates mean value ( $\pm$ SEM).

### III. アミノフィリンの PIB 抑制効果

サルブタモールと同様、本実験システムにおける、アミノフィリンの至適投与量決定のために行ったアミノフィリン静脈内前投与によるヒスタミン吸入誘発気管支収縮抑制効果に関する用量反応曲線を図8に示した。対照とした生理食塩水投与群では、ヒスタミン吸入前値に対する Pao 増加率は、ヒスタミン吸入濃度25, 50, 100および 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  においてそれぞれ $6.1\pm 1.8$ ,  $19.0\pm 5.1$ ,  $107\pm 23$ および $603\pm 99\%$ であった。アミノフィリン 12.5mg/kg 投与群では、ヒスタミン吸入前値に対する Pao 増加率は、ヒスタミン吸入濃度25, 50, 100および 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  においてそれぞれ $7.5\pm 1.1$ ,  $32\pm 6.2$ ,  $111\pm 29$ および $570\pm 86\%$ であった。アミノフィリン 25.0mg/kg 投与群では、Pao 増加率は、ヒスタミン吸入濃度25, 50, 100および 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  においてそれぞれ $6.5\pm 1.1$ ,  $20\pm 6.5$ ,  $71\pm 32$ および $263\pm 80\%$ であった。ヒスタミン吸入による Pao の上昇は、アミノフィリン 25.0mg/kg 静脈内前投与によってヒスタミン吸入 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  および 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  吸入時の Pao 増加率を、それぞれ34および56%抑制した。従って、アミノフィリンの50%抑制量としてこの 25.0mg/kg を採用した。

抗原吸入前の Pao の値は、抗原吸入15分後に、12.5および 25.0mg/kg のアミノフィリ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  $10.1\pm 0.3$ ,  $10.5\pm 0.3$ ,  $10.0\pm 0.2\text{cmH}_2\text{O}$  であり、3群間には有意差を認めなかった。3群における、Pao 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、抗原吸入15分後に12.5あるいは 25.0mg/kg のアミノフィリ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 $288\pm 24$ ,  $269\pm 21$ ,  $247\pm 24\%$ であり、3群間には有意差を認めなかった。プロプラノロール吸入直前、すなわち抗原吸入20分後の Pao 増加率は、12.5あるいは 25.0mg/kg のアミノフィリンまたは生理食塩水を静脈内投与した各群におい

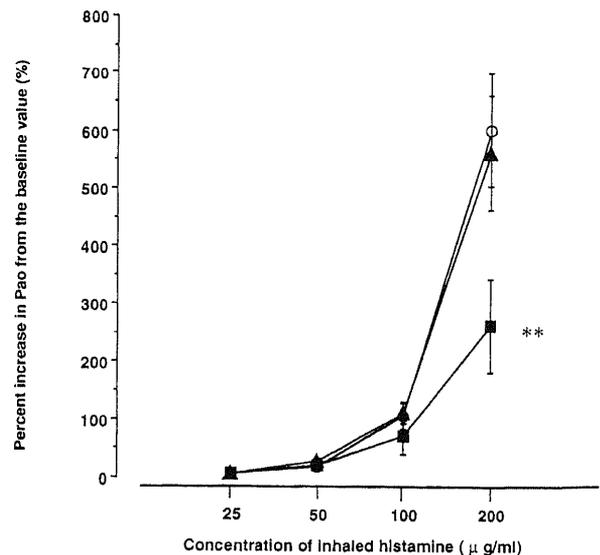


Fig. 8. Bronchoprotective effect of intravenously administered aminophylline on inhaled histamine-induced bronchoconstriction in non-sensitized guinea pigs.  $\circ$ , pretreated with saline ( $n=10$ );  $\blacktriangle$ , pretreated with 12.5 mg/kg of aminophylline ( $n=7$ );  $\blacksquare$ , pretreated with 25.0 mg/kg of aminophylline ( $n=8$ ). Each point indicates mean value ( $\pm$ SEM). \*\* $p<0.02$  compared with saline pretreated group analyzed by Mann-Whitney's U test.

て、 $146 \pm 12$ ,  $148 \pm 14$ ,  $190 \pm 15\%$ であり、アミノフィリンを静脈内投与した2群では生理食塩水投与群に比べ有意差は認めなかったが低値であった。そこで、プロプラノロール吸入直前すなわち抗原吸入20分後のPaoに対するプロプラノロール吸入後のPao増加率を求め、その時間経過を図10に示した。プロプラノロール吸入後のPaoの増加率の経時変化は、3群間に有意差を認めた ( $p < 0.02$ )。このPao増加率はアミノフィリン25.0mg/kg投与群において、プロプラノロール吸入1分後から7分後(すなわち抗原吸入21分後から27分後)までは  $p < 0.05$  の危険率で、それ以後は  $p < 0.01$  の危険率で、生理食塩水投与群に比べて有意に低値であった。

IV. 化学伝達物質の PIB への関与

1. トロンボキサン A<sub>2</sub> 受容体拮抗薬 (S-1452 および ONO NT-126) の PIB に対する効果

1) S-1452 の PIB 抑制効果

抗原吸入前のPaoの値は、抗原吸入15分後に、0.01あるいは0.1mg/kgのS-1452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  $10.3 \pm 0.3$ ,  $10.4 \pm 0.4$ ,  $10.5 \pm 0.3 \text{ cmH}_2\text{O}$  であり、3群間には有意差を認めなかった。3群における、Pao増加率の時間経過を図11に示す。抗原吸入後のPaoの最大増加率は、抗原吸入15分後に、0.01あるいは0.1mg/kgのS-1452または生理食塩水を吸入した各群において、それぞれ  $348 \pm 24$ ,  $328 \pm 24$ ,  $297 \pm 23\%$  であり、3群間には有意差を認めなかった。プロプラノロール吸入直前、すなわち抗原吸入20分後のPaoの増加率は、0.01あるいは0.1mg/kgのS-1452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  $242 \pm 39$ ,  $216 \pm 34$ ,  $213 \pm 29\%$  であり、3群間には有意差を認めなかった。プロプラノロール吸入後の、Pao増加率の経時変化は3

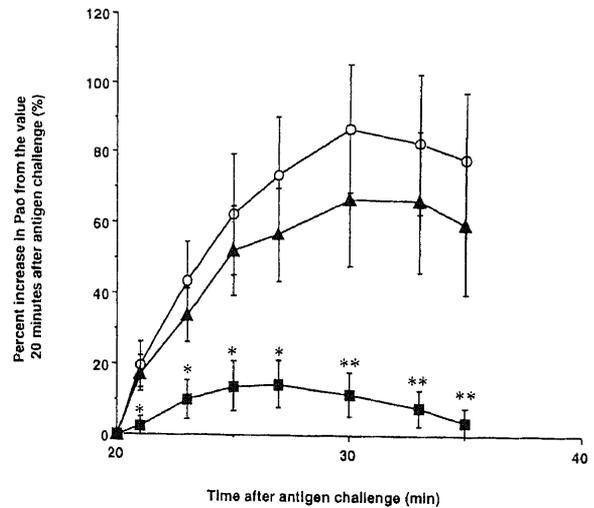


Fig. 10. Time course of percent increase in Pao from the value immediately before inhalation of propranolol (10 mg/ml) following OA (1 mg/ml) challenge in passively sensitized guinea pigs pretreated intravenously with aminophylline or saline 5 minutes before the propranolol inhalation (15 min after the OA challenge). ○, pretreated with saline (n=6); ▲, pretreated with 12.5 mg/kg of aminophylline (n=8); ■, pretreated with 25.0 mg/kg of aminophylline (n=6). Each point indicates mean value ( $\pm$ SEM). \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  compared with saline pretreated group analyzed by Mann-Whitney's U test.

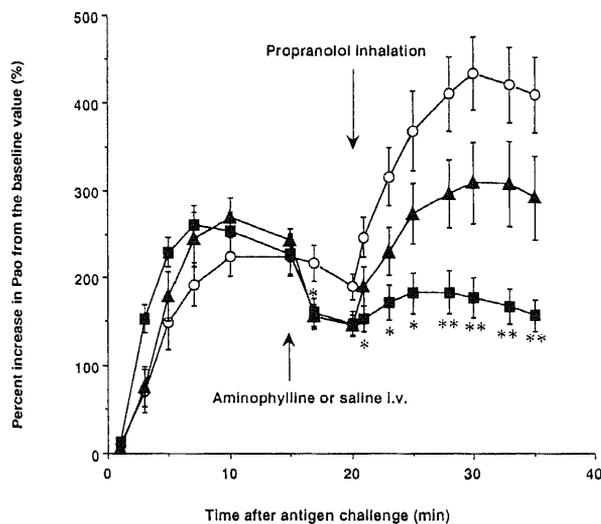


Fig. 9. Time course of percent increase in Pao from the pre-OA provocation value after inhalation of propranolol (10 mg/ml) following OA challenge in passively sensitized guinea pigs pretreated intravenously with aminophylline or saline 5 min before the propranolol inhalation (15 min after the OA challenge). ○, pretreated with saline (n=6); ▲, pretreated with 12.5 mg/kg of aminophylline (n=8); ■, pretreated with 25.0 mg/kg of aminophylline (n=6). Each point indicates mean value ( $\pm$ SEM). \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  compared with saline pretreated group analyzed by Mann-Whitney's U test.

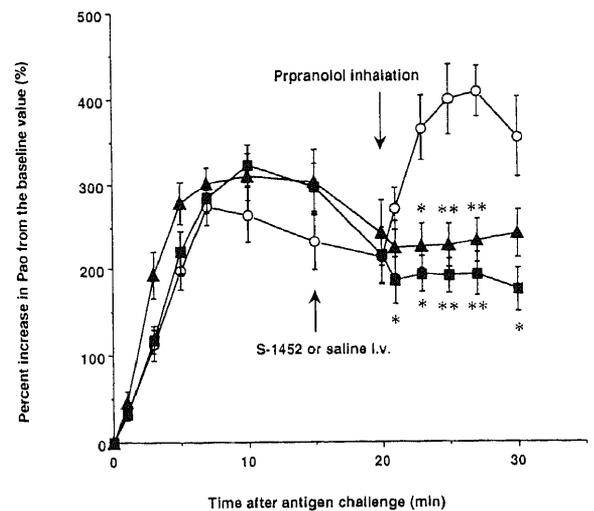


Fig. 11. Time course of percent increase in Pao from the pre-OA provocation value after inhalation of propranolol (10 mg/ml) following OA (1 mg/ml) challenge in passively sensitized guinea pigs pretreated intravenously with S-1452 or saline 5 min before the propranolol inhalation (15 min after the OA challenge). ○, pretreated with saline (n=6); ▲, pretreated with 0.01 mg/kg of S-1452 (n=6); ■, pretreated with 0.1 mg/kg of S-1452 (n=5). Each point indicates mean value ( $\pm$ SEM). \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  compared with saline pretreated group analyzed by Mann-Whitney's U test.

群間に有意差を認めた ( $p < 0.01$ ). プロプラノロール吸入後の Pao の最大増加率は 0.01 あるいは 0.1 mg/kg の S-1452 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  $258 \pm 27$ ,  $214 \pm 25$ ,  $430 \pm 30\%$  であり, S-1452 の 0.1 mg/kg および 0.1 mg/kg 投与群において, 生理食塩水投与群に比べて有意に低値であった (それぞれ  $p < 0.01$ ). この Pao 増加率は S-1452 の 0.1 mg/kg 投与群では, 抗原吸入 21 分後, 23 分後および 30 分後において  $p < 0.05$  の危険率で, 抗原吸入 25 分後と 27 分後においては  $p < 0.01$  の危険率で生理食塩水投与群に比べて有意に低値であった. S-1452 の 0.01 mg/kg 投与群においては, 抗原吸入 23 分後において  $p < 0.05$  の危険率で, 抗原吸入 25 分後と 27 分後においては  $p < 0.01$  の危険率で生理食塩水投与群に比べて有意に低値であった.

## 2) ONO NT-126 の PIB 抑制効果

抗原吸入前の Pao の値は, 抗原吸入 15 分後に 1.0 あるいは  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  の ONO NT-126 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  $10.0 \pm 0.1$ ,  $9.9 \pm 0.1$ ,  $10.0 \pm 0.1 \text{ cmH}_2\text{O}$  であり, 3 群間には有意差を認めなかった. 3 群における Pao 増加率の時間経過を図 12 に示す.

抗原吸入後の Pao の最大増加率は, 抗原吸入 15 分後に 1.0 あるいは  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  の ONO NT-126 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  $269 \pm 21$ ,  $266 \pm 26$ ,  $270 \pm 13\%$  であり, 3 群間には有意差を認めなかった. プロプラノロール吸入直前, すなわち抗原吸入 20 分後の Pao 増加率は,  $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$  あるいは  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  の ONO NT-126 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  $232 \pm 27$ ,  $200 \pm 17$ ,  $207 \pm 12\%$  であり, 3 群間には有意差を認めなかった. プロプラノロール吸入後の Pao 増加率の経時的変化は 3 群間に有意差を認めた

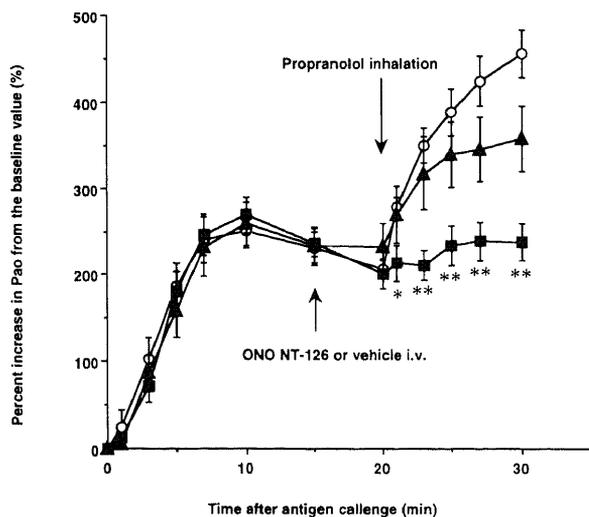


Fig. 12. Time course of percent increase in Pao from the pre-OA provocation value after inhalation of propranolol (10 mg/ml) following OA (1 mg/ml) challenge in passively sensitized guinea pigs pretreated intravenously with ONO NT-126 or vehicle 5 minutes before the propranolol inhalation (15 min after the OA challenge). ○, pretreated with vehicle (n=10); ▲, pretreated with  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  of ONO NT-126 (n=9); ■, pretreated with  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  of ONO NT-126 (n=9). Each point indicates mean value ( $\pm$ SEM). \*\* $p < 0.002$ , \* $p < 0.05$  compared with vehicle pretreated group analyzed by Mann-Whitney's U test.

( $p < 0.01$ ). プロプラノロール吸入後の Pao の最大増加率は, 1.0 あるいは  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  の ONO NT-126 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  $369 \pm 38$ ,  $250 \pm 24$ ,  $458 \pm 28\%$  であり, ONO NT-126 の  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  投与群において, 生理食塩水投与群より有意に Pao 増加率が低値であった ( $p < 0.001$ ). この Pao 増加率は ONO NT-126 の  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  投与群において, 抗原吸入 21 分後は  $p < 0.05$  の危険率で, 23 分以後は  $p < 0.002$  の危険率で, 生理食塩水投与群に比べて有意に低値であった.

## 2. 5-リポキシゲナーゼ阻害薬 (AL-3264) の PIB 抑制効果

抗原吸入前の Pao の値は, 抗原吸入 15 分後に, 0.01 あるいは  $0.1 \text{ mg}/\text{kg}$  の AL-3264 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  $10.4 \pm 0.3$ ,  $10.4 \pm 0.3$ ,  $10.4 \pm 0.2 \text{ cmH}_2\text{O}$  であり, 3 群間には有意差を認めなかった. 3 群における, Pao 増加率の時間経過を図 13 に示す. 抗原吸入後の Pao の最大増加率は, 抗原吸入 15 分後に,  $0.01 \text{ mg}/\text{kg}$  あるいは  $0.1 \text{ mg}/\text{kg}$  の AL-3264 または生理食塩水を吸入した各群において, それぞれ  $381 \pm 46$ ,  $345 \pm 33$ ,  $347 \pm 30\%$  であり, 3 群間には有意差を認めなかった. プロプラノロール吸入直前, すなわち抗原吸入 20 分後の Pao 増加率は,  $0.01$  あるいは  $0.1 \text{ mg}/\text{kg}$  の AL-3264 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  $354 \pm 43$ ,  $368 \pm 27$ ,  $293 \pm 31\%$  であり, 3 群間には有意差を認めなかった. プロプラノロール吸入後の Pao 増加率の経時的変化は 3 群間に有意差を認めた ( $p < 0.002$ ). プロプラノロール吸入後の Pao の最大増加率は  $0.01$  あるいは  $0.1 \text{ mg}/\text{kg}$  の AL-3264 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  $506 \pm 25$ ,  $480 \pm 22$ ,  $587 \pm 23\%$  であり, AL-3264 の  $0.01 \text{ mg}/\text{kg}$  および  $0.1 \text{ mg}/\text{kg}$  投与群において, 生理食塩水投与群に比べ Pao 増

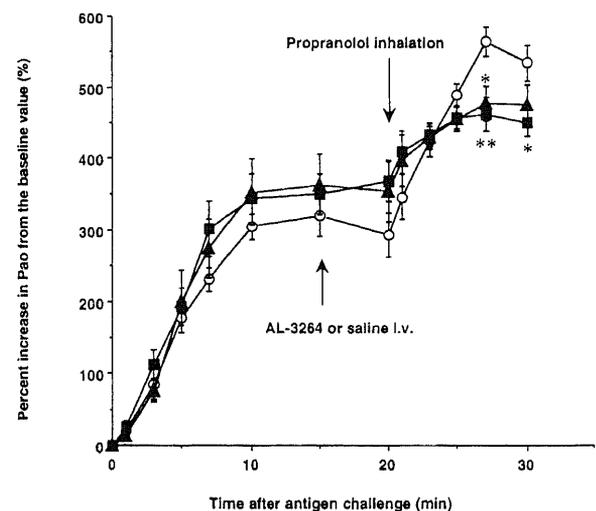


Fig. 13. Time course of percent increase in Pao from the pre-OA provocation value after inhalation of propranolol following OA challenge in passively sensitized guinea pigs intravenously pretreated with AL-3264 or saline 5 min before the propranolol inhalation (15 min after the OA challenge). ○, pretreated with saline (n=8); ▲, pretreated with  $0.01 \text{ mg}/\text{kg}$  of AL-3264 (n=8); ■, pretreated with  $0.1 \text{ mg}/\text{kg}$  of AL-3264 (n=8). Each point indicates mean value ( $\pm$ SEM). \*\* $p < 0.02$ , \* $p < 0.05$  compared with saline pretreated group analyzed by Mann-Whitney's U test.

加率は有意に低値であった(それぞれ  $p < 0.05$ ,  $p < 0.02$ ). この Pao 増加率は AL-3264 の 0.1mg/kg 投与群では, 抗原吸入 27分後と30分後において生理食塩水投与群に比べて有意に低値で(それぞれ  $p < 0.02$ ,  $p < 0.05$ ), AL-3264 の 0.01mg/kg 投与群においては, 27分後において生理食塩水投与群に比べて有意に低値であった ( $p < 0.05$ ). 各群について, プロプラノロール吸入直前, すなわち抗原吸入20分後の Pao 値に対するその後の Pao の増加率を図14に示す. Pao 増加率の経時的変化には, 3群間に有意差が認められた ( $p < 0.005$ ). AL-3264 の 0.1mg/kg 投与群においては, プロプラノロール吸入後7分後と10分後(すなわち抗原吸入27分後と30分後)の Pao 増加率は, 生理食塩水投与群に比べて有意に低値であった ( $p < 0.02$ ).

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の吸入試験が用いられているが, これらの物質は高用量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収縮しやすさの程度の差でしかない. しかし, 本研究で取り上げた PIB は喘息患者でのみ認められ健常者では認められず<sup>20)</sup>, 両者の本質的な差異(特異的気道過敏性)を表していると考えられる. Foresi ら<sup>8)</sup>は, 喘息患者ではメサコリンで測定した気道過敏性とプロプラノロール誘発気管支収縮の過敏性は相関しなかったと報告しており, PIB という現象は, 単にメサコリンやヒスタミンで測定される非特異的気道過

敏性亢進の結果生ずるのではないと考えられる. すなわち, PIB は, 蒸留水や, 乾燥冷気などが喘息患者にのみ気管支収縮を引き起こすのと同様に, 喘息の病態に特異的と考えられる. 従って, PIB の機序の解明は, 喘息患者の特異的気道過敏性や喘息そのものの病態の解明に役立つと考えられる.

本研究では, 受動感作モルモットに抗原吸入誘発気管支収縮をおこし, その20分後にプロプラノロールを吸入することによって PIB モデルの作製を試み, さらに自律神経系作働薬, アミノフィリン, TXA<sub>2</sub> 受容体拮抗薬, 5-リボオキシゲナーゼ阻害薬を用いて, PIB 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 血清にて受身感作をしたモルモットに, 抗原吸入20分後にプロプラノロールを吸入することにより, 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プロプラノロールを吸入した場合や, 感作モルモットに抗原の代りに生理食塩水を吸入した後にプロプラノロールを吸入しても, 気管支収縮は生じなかった. 著者が検索し得た限りでは, 動物実験にて, 定量的に反応の大小が検討可能な PIB モデルを作製したのは, 本報告が初めてである.

次に, この PIB は非選択的副交感神経遮断薬であるアトロピンの十分量の静脈内前投与によって, 全く抑制されなかった. PIB の機序として, 一部でコリン作動性の神経の役割が示唆されている. すなわち, Ind ら<sup>9)</sup>は, 軽症から中等症の喘息患者では, 抗コリン薬(臭化オキントロピウム 200 $\mu$ g)の前吸入によって PIB が抑制され, また, PIB からの回復が速やかだったと報告している. しかし, Latimer ら<sup>10)</sup>は, 臭化イプラトピウム 160 $\mu$ g 吸入前投与によって PIB は抑制されなかったと報告している. また, Okayama ら<sup>19)</sup>は, 43人の喘息患者全員に PIB が生じ, その患者のうち70%はアトロピン吸入によって, その効果には個人個人で程度の差はあるものの回復し, 残り30%ではアトロピン吸入は PIB からの回復に無効だったと報告している. さらに Okayama ら<sup>19)</sup>は, アトロピンが PIB からの回復に有効であった患者群では, アトロピン前吸入により PIB を予防できたと報告し, さらにアトロピンが PIB の予防と回復に効果のなかった患者群は, アトロピンにより改善が得られた患者群より, 臨床的により重症であったと報告している. 今回の PIB モデルでは, 麻酔にペントバルビタールを使用しており, ある程度自律神経系が抑制された状況下での検討のため, 臨床的な PIB の機序のうち, 自律神経系以外の要因の大きい, Okayama ら<sup>19)</sup>の検討患者うちアトロピンが PIB からの回復と PIB の予防に無効だった患者に相当するモデルであると考えられる.

次に,  $\beta_2$  刺激薬であるサルブタモールとテオフィリンの誘導体であるアミノフィリンに関する検討では, ヒスタミン惹起気管支収縮を同程度に抑制するそれぞれの投与量を前投与した場合, サルブタモールは PIB を抑制せず, アミノフィリンは PIB を完全に抑制した. すなわち, 本モデルにおいては  $\beta_2$  刺激薬は PIB に対して予防効果を示さなかった. 臨床的には, Gayraud ら<sup>20)</sup>, Herwaarden<sup>21)</sup>および Tattersfield<sup>22)</sup>が, PIB からの回復には  $\beta_2$  刺激薬は無効であることを報告しており, 本研究の結果と一致する. アミノフィリンは, 臨床的に気管支拡張薬として静脈内投与, 経口投与で頻用されているが, 作用機序は未だ不明の薬剤である. 非選択的フォスホジエステラーゼの阻害作用をもつが, 臨床的な濃度ではその作用はない. 臨床的

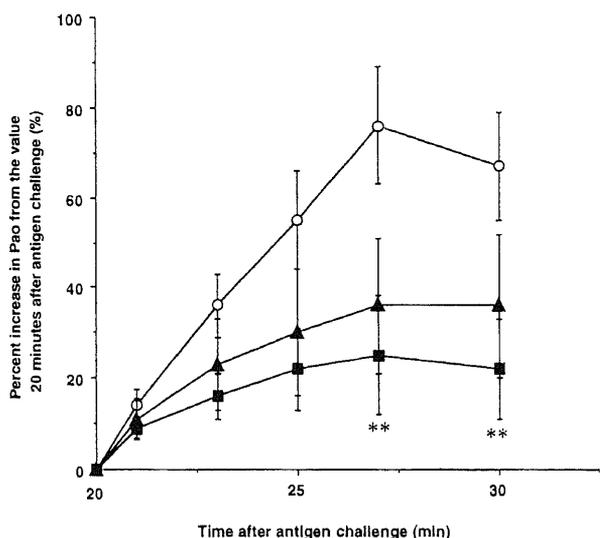


Fig. 14. Time course of percent increase in Pao from the value immediately before inhalation of propranolol following OA challenge in passively sensitized guinea pigs pretreated intravenously AL-3264 or saline 5 min before the propranolol inhalation (15 min after the OA challenge). ○, pretreated with saline (n=8); ▲, pretreated with 0.01 mg/kg of AL-3264 (n=8); ■, pretreated with 0.1 mg/kg of AL-3264 (n=8). Each point indicates mean value (±SEM). \*\* $p < 0.02$ , compared with saline pretreated group analyzed by Mann-Whitney's U test.

に  $\beta_2$  刺激薬との相乗効果が認められることより、自律神経系以外の作用が想定されている。PIB に対するアミノフィリンの効果に関する報告はほとんどないが、既述の Okayama ら<sup>19)</sup> は、PIB からの回復にアトロピン吸入が無効であった群ではアミノフィリンの静脈内投与が有効であったと報告している。

気管支喘息の病態形成には数多くの化学伝達物質の関与が示唆されているが、近年注目を浴びているのは、アラキドン酸から生合成される脂質化学伝達物質である。アラキドン酸からの重要な代謝経路にはシクロオキシゲナーゼ系と 5-リポキシゲナーゼ系の 2 つの代謝経路がある。シクロオキシゲナーゼ系の代謝産物には、気管支拡張作用をもつプロスタグランジン  $E_2$  やプロスタグランジン  $I_2$  と、気管支収縮作用をもつプロスタグランジン  $F_2\alpha$  やプロスタグランジン  $D_2$ 、そして  $TXA_2$  がある<sup>23)</sup>。中でも、 $TXA_2$  はそれ自身の強い気管支収縮作用<sup>24)</sup> と併せて気道過敏性の亢進作用を持ち<sup>25)</sup>、気管支喘息や非特異的気道過敏性の亢進の病態において中心的な役割を果たす化学伝達物質であることが、 $TXA_2$  合成酵素阻害薬や受容体拮抗薬を用いた研究で確認され<sup>25)~28)</sup>、近年注目を集めている。

そこで PIB における  $TXA_2$  の関与について検討した。その結果、 $TXA_2$  の特異的受容体拮抗薬である S-1452 および ONO-NT 126 の経静脈内投与は PIB を用量依存的に抑制した。すなわち、 $TXA_2$  が PIB に重要な役割を果たしていることが示された。Carpentiere ら<sup>29)</sup> はヒスタミン  $H_1$  拮抗薬であるターフェナジンが喘息患者の PIB を抑制することを示し、PIB におけるヒスタミンの関与を示唆した。しかしながら彼らは拮抗薬による PIB 抑制の用量反応については確認していない。また、その結果はヒスタミン以外の化学伝達物質の関与を否定するものではない。著者が検索し得た限りでは、ヒスタミン以外の化学伝達物質の PIB への関与を検討した報告はなく、本研究よりはじめて化学伝達物質の一つである  $TXA_2$  の PIB への関与が明らかにされた。なお、今回作製したモルモットの PIB モデルでは、OA 吸入前にあらかじめ高用量の DPH を前投与することによって内因性のヒスタミンの作用をほぼ完全に抑えてあるため、ヒスタミンと今回検討した化学伝達物質のどちらがより深く PIB に関与しているかは不明である。

$TXA_2$  はアナフィラキシー反応の際にヒトの肺組織より放出される<sup>30)</sup>。当教室では、 $TXA_2$  合成酵素を選択的に阻害する OKY-046 が、病状の安定した内因性喘息患者のメサコリンやアセチルコリンに対する気道過敏性亢進を改善させることを報告してきた<sup>26)27)31)</sup>。また、Beasley ら<sup>32)</sup> は、 $TXA_2$  受容体拮抗薬が、外因性喘息患者において抗原吸入による即時型気管支収縮を抑制したと報告している。さらに、本研究によって、さらに PIB における  $TXA_2$  の関与が明らかになった。一般に、ある疾患に  $TXA_2$  が関与しているか否かを評価するときに、シクロオキシゲナーゼの阻害薬を使用している研究者たちもいるが、その結果は一定しておらず、混乱をもたらしている<sup>33)34)</sup>。それは、シクロオキシゲナーゼの阻害薬を使用した場合、その作用は阻害薬の種類によりシクロオキシゲナーゼ系の種々の代謝産物の割合が異なり、気道系への影響が一定しないからと考えられる<sup>35)</sup>。

一方、当教室では、 $TXA_2$  合成酵素阻害薬である OKY-046 および  $TXA_2$  受容体拮抗薬である S-1452 を使用し、それらが感作モルモットにおける抗原吸入後の、主に SRS-A により惹起される気管支収縮を抑制する<sup>28)</sup> ことを報告してきたが、合成酵

素阻害薬は  $TXA_2$  合成を抑制すると同時に、プロスタグランジン  $I_2$  などの他のプロスタグランジンの合成を促進することが示されている。それゆえ、今回の PIB への  $TXA_2$  の関与に関する検討では、受容体拮抗薬による検討が最善と考え、 $TXA_2$  受容体への高い親和性をもつ強力な S-1452<sup>16)</sup> による PIB への影響を検討した。また、可能性は大変低いですが、S-1452 の  $TXA_2$  受容体拮抗作用以外の非特異的な薬理作用が PIB 抑制作用に関与した可能性を除外するため、さらに、別の  $TXA_2$  受容体拮抗薬である ONO NT-126<sup>17)</sup> を用いた検討も併せて実施した。その結果、S-1452 も ONO NT-126 も同様に PIB を用量依存的に抑制し、PIB への  $TXA_2$  の関与が確認された。

次に、アラキドン酸のもう一方の代謝経路である 5-リポキシゲナーゼ代謝系の PIB への関与を検討した。アラキドン酸の 5-リポキシゲナーゼ系の代謝産物には、ロイコトリエン  $B_4$ 、 $C_4$ 、 $D_4$  および  $E_4$  がある。ロイコトリエン  $C_4$ 、 $D_4$  および  $E_4$  などのスルフィドペプチドロイコトリエンは強力な気管支収縮物質であり、さらにロイコトリエン  $B_4$  は好中球の遊走因子である<sup>36)</sup>。したがって、これらはいずれも気管支喘息の重要な化学伝達物質として研究が進められている<sup>37)</sup>。今回用いた AL-3264<sup>18)</sup> は強力で長時間作用型の抗アレルギー薬で、その作用は、5-リポキシゲナーゼの活性化を抑制して 5-リポキシゲナーゼ代謝産物の生合成を抑制するとともに、ヒスタミンの放出を抑制し、またヒスタミンの  $H_1$  受容体に対する競合的阻害作用を合せもつ。これらの 3 つの作用は、同レベルの AL-3264 の濃度で認められる。AL-3264 はモルモット白血球の 5-リポキシゲナーゼ活性を抑制し、ラットの腹膜に存在する肥満細胞からの抗原誘発によるヒスタミン放出を抑制する。また摘出したモルモット気管平滑筋のヒスタミンによる収縮を抑制する。前述のように、今回のモルモット PIB モデルでは、抗原曝露の 15 分前に十分量の DPH を投与し、あらかじめヒスタミンの作用を完全に抑えてあるので、AL-3264 のもつ抗ヒスタミン作用は無視できる。したがって、今回の検討の結果、AL-3264 が PIB を抑制したことは、PIB に 5-リポキシゲナーゼ代謝産物が重要な役割を果たしていることを示している。

以前より、シクロオキシゲナーゼ代謝産物である  $TXA_2$  と、5-リポキシゲナーゼ代謝産物であるスルフィドペプチドロイコトリエン、特にロイコトリエン  $C_4$  との間には相互作用の存在が示唆されていたが、当教室では、モルモットの気道において、ロイコトリエン  $C_4$  が  $TXA_2$  の生成を活性化するが、逆に  $TXA_2$  は 5-リポキシゲナーゼ代謝系の活性化には影響を与えないことを示してきた<sup>38)</sup>。したがって、PIB においても、5-リポキシゲナーゼ代謝産物の PIB における作用は、一部  $TXA_2$  の合成を介している可能性がある。

以上述べてきたように、モルモットの PIB モデルでは、自律神経系の機序の関与は比較的少なく、むしろ  $TXA_2$  や、5-リポキシゲナーゼ代謝産物などの化学伝達物質が重要な役割を担っていることが示された。今後、5-リポキシゲナーゼ代謝産物であるロイコトリエン  $B_4$ 、 $C_4$ 、 $D_4$ 、 $E_4$  などの化学伝達物質の中で、何がどれほど PIB に関与しているかを明らかにするために、各物質の選択的阻害薬をもちいた検討が必要である。

## 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

プロプラノロールを吸入することにより PIB モデルを作製した。

2. 抗原吸入15分後のアトロピン (5mg/kg) 静脈内前投与によって、PIB は抑制されなかったことより本 PIB モデルにおいては迷走神経系の関与は少ないことが示唆された。

3. モルモットのヒスタミン吸入誘発気管支収縮を同程度に抑制するサルブタモール投与量とアミノフィリン投与量を用いた検討では、サルブタモール静脈内前投与は PIB を抑制しなかったが、アミノフィリン静脈内前投与はほぼ完全に PIB を抑制した。

4. 特異的 TXA<sub>2</sub> 受容体拮抗薬である S-1452 および ONO NT-126 の静脈内前投与によって、PIB は用量依存的に抑制された。

5. 5-リポキシゲナーゼ阻害薬である AL-3264 の静脈内前投与によって、PIB は用量依存的に抑制された。

以上の成績より、PIB の発現機序における化学伝達物質の重要性が示唆された。

#### 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斉藤元泰先生ならびに諸先生に感謝いたします。さらに統計学的検討について貴重なご助言を頂きました金沢大学衛生学教室の橋本和夫教授に深く感謝の意を表します。

なお、本論の要旨の一部は第43回日本アレルギー学会総会において発表した。

#### 文 献

- 1) Ruffin, R. E., MacLynette, E. L. M., Latimer, K. M., Ward, H. E., Crockett, A. J. & Alpers, J. H.: Assessment of  $\beta$ -adrenoreceptor antagonist in asthmatic patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 13, 325-335 (1982).
- 2) McNeill, R. S.: Effect of beta-adrenergic-blocking agent, propranolol, on asthmatics. *Lancet*, 11, 1101-1102 (1964).
- 3) Langer, I.: The bronchoconstrictor action of propranolol aerosol in asthmatic subjects. *J. Physiol.*, 190, 41P-42P (1967).
- 4) Fraunfelder, F. T. & Barker, A. F.: Respiratory effects of timolol. *N. Engl. J. Med.*, 41, 311-314 (1984).
- 5) Zaid, G. & Beal, G. N.: Bronchial response to beta-adrenergic blockade. *N. Engl. J. Med.*, 275, 2590-2594 (1966).
- 6) Townley, R. E., McGeady, S. & Bewtra, A.: The effect of beta-adrenergic blockade on bronchial sensitivity to acetyl-beta-methacholine in normal and allergic rhinitis subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 57, 358-366 (1976).
- 7) Chetta, A., Foresi, A., Garavaldi, G., Corbo, G. M., Cuomo, A. & Olivieri, D.: Evaluation of bronchial responsiveness by pharmacological challenges in asthma. *Respiration*, 54 (Suppl. 1), 84-89 (1988).
- 8) Foresi, A., Chetta, A., Corbo, G. M., Cuomo, A. & Olivieri, D.: Provocative dose and dose-response curve to inhaled propranolol in asthmatic patients with bronchial...

hyperresponsiveness to methacholine. *Chest*, 92, 455-459 (1987).

9) Ind, P. W., Dixon, C. M., Fuller, R. W. & Barnes, P. J.: Anticholinergic blockade of beta-blocker-induced bronchoconstriction. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 139, 1390-1394 (1989).

10) Latimer, K. M. & Ruffin, R. E.: The effect of inhaled fenoterol and ipratropium bromide on propranolol induced bronchoconstriction in the asthmatic airways. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 17, 627-635 (1990).

11) Terpstra, G. K., Raajmakers, J. A. & Wassink, G. A.: Propranolol induced bronchoconstriction: A non specific side effect of beta-adrenergic blocking therapy. *Eur. J. Pharmacol.*, 73, 107-108 (1981).

12) McDonald, A. G., Ingram, C. G. & McNeill, R. S.: The effect of propranolol on airway resistance. *Br. J. Anaesth.*, 39, 915-925 (1967).

13) Santives, T., Roska, A., Hensley, G. T., Moore, V. L., Fink, J. N. & Abromoff, P.: Immunologically induced lung disease in guinea pig. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 57, 582-594 (1976).

14) 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).

15) 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的吸入装置の開発. *日胸疾患会誌*, 21, 252-258 (1983).

16) Hanasaki, K. & Arita, H.: Characterization of a new compound, S-145, as a specific TXA<sub>2</sub> receptor antagonist in platelets. *Thromb. Res.*, 50, 365-376 (1988).

17) Nakahata, N., Sato, K., Abe, M. T. & Nakanishi, H.: ONO NT-126 is a potent and selective thromboxane A<sub>2</sub> antagonist in human astrocytoma cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 184, 233-238 (1990).

18) Ishii, K., Yakuo, I., Seto, Y., Kita, A., Nakamura, H. & Nishikawa, Y.: Antiallergic activity and mode of action of N-[4-[4-(diphenylethyl)-1-piperazinyl] butyl]-3 (6-methyl-3-pyridyl) acrylamide in experimental animals. *Drug Res.*, 43, 148-154 (1993).

19) Okayama, M., Yafuso, N., Nogami, H., Lin, Y. N., Horio, S., Hida, W., Inoue, H. & Takishima, T.: A new method of inhalation challenge with propranolol. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 80, 291-299 (1987).

20) Gayraud, P., Orehek, J., Grimaud, C. & Charpin, J.: Beta-adrenergic function in airway of healthy and asthmatic subjects. *Thorax*, 30, 657-662 (1975).

21) Herwaarden, C. L. A.: Beta-adrenoceptor blockade and pulmonary function in patients suffering from chronic obstructive lung disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 5, 46-50 (1983).

22) Tattersfield, A. E.: Beta-adrenocetpator antagonist and respiratory disease. *J. Cardiovasc. Dis.*, 8 (Suppl.), 35-39 (1986).

23) Barnes, P. J., Chung, K. F. & Page, C. P.: Infla-

mmatory mediators and asthma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **40**, 49-84 (1988).

24) **Svensson, J., Strandberg, K., Tuvemo, T. & Hamberg, M.**: Thromboxane  $A_2$ : Effect on airway and vascular smooth muscle. *Prostaglandins*, **14**, 425-436 (1977).

25) **Fujimura, M., Saito, M., Kurashima, K., Miyake, Y., Sakamoto, S. & Matsuda, T.**: Bronchoconstrictive properties and potentiating effect on bronchial responsiveness of inhaled thromboxane  $A_2$  analogue (STA<sub>2</sub>) in guinea pigs. *J. Asthma*, **26**, 237-242 (1989).

26) **Fujimura, M., Sasaki, F., Nakatsumi, Y., Takahashi, Y., Hifumi, S., Taga, K., Mifune, J., Tanaka, T. & Matsuda, T.**: Effects of a thromboxane synthetase inhibitor (OKY-046) and a lipoxygenase inhibitor (AA-861) on bronchial responsiveness to acetylcholine in asthmatic subjects. *Thorax*, **41**, 955-959 (1986).

27) **Fujimura, M., Sakamoto, S. & Matsuda, T.**: Attenuating effect of thromboxane synthetase inhibitor (OKY-046) on bronchial responsiveness to methacholine is specific to bronchial asthma. *Chest*, **98**, 656-660 (1990).

28) 藤村政樹, 越野 健, 西岡真二, 松田 保: Slow-reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) を主体としたモルモットの抗原吸入誘発喘息モデルにおける thromboxane  $A_2$  の関与. *呼吸*, **3**, 1066-1071 (1984).

29) **Carpentiere, G., Castello, F. & Marino, S.**: Effect of oral terfenadine on the bronchoconstrictor response to inhaled propranolol and histamine in asthmatics. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.*, **49**, 503-507 (1991).

30) **Schulman, E. S., Newball, H. H., Demers, L. M., Fitzpatrick, F. A. & Adkinson, N. F.**: Anaphylactic release of thromboxane  $A_2$ , prostoglandin  $D_2$  and prostacyclin from human lung paranchyma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **124**, 402-406 (1981).

31) **Fujimura, M., Nishioka, S., Kumabashiri, I.,**

**Matsuda, T. & Mifune, J.**: Effect of aerosol administration of thromboxane synthetase inhibitor (OKY-046) on bronchial responsiveness to acetylcholine in asthmatic subjects. *Chest*, **98**, 276-279 (1990).

32) **Beasley, R. C. W., Fetherstone, R. L., Church, M. K., Rafferty, P., Vorley, J. G., Harris, A., Robinson, C. & Holgate, S. T.**: Effect of thromboxane receptor antagonist on PGD<sub>2</sub> and allergen-induced bronchoconstriction. *J. Appl. Physiol.*, **66**, 1658-63 (1989).

33) **Curzen, N., Rafferty, P. & Holgate, S. T.**: The effects of a cyclooxygenase inhibitor, flurbiprofen, and an H<sub>1</sub>-histamine receptor antagonist, terfenadine, alone and in combination on allergen induced immediate bronchoconstriction in man. *Thorax*, **42**, 946-952 (1987).

34) **Fish, J. E., Ankin, M. G., Adkinson, N. F. & Peterman, V. I.**: Indomethacin modification of immediate type immunologic airway response in allergic asthmatic and non asthmatic subjects-evidence for altered arachidonic acid metabolism in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **123**, 609-614 (1981).

35) **Littner, M. R., Kazmi, G. M. & Lott, F. D.**: Distribution of cyclooxygenase products with cyclooxygenase inhibition in isolated dog lung. *J. Appl. Physiol.*, **61**, 988-993 (1986).

36) **Lewis, R. A., Austen, K. F. & Saberman, R. J.**: Leukotrienes and other products of 5-lipoxygenase pathway. *N. Engl. J. Med.*, **323**, 645-655 (1990).

37) **Samuelson, B.**: Leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammations. *Science*, **220**, 568-575 (1983).

38) 齊藤元泰: モルモット即時型喘息反応におけるトロンボキサン  $A_2$ , ロイコトリエンおよび血小板活性化因子の関与と相互作用. *十全医会誌*, **101**, 730-739 (1992).

