

抗原吸入負荷にて生ずるモルモット気道攣における
ヒスタミンおよびSlow Reacting Substance of
Anaphylaxis

(SRS-A)の作用に関する研究小動物用の新しい吸入負
荷装置を用いての定量的分析

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/2297/9097

抗原吸入負荷にて生ずるモルモット気道攣縮における ヒスタミンおよび Slow Reacting Substance of Anaphylaxis (SRS-A) の作用に関する研究

小動物用の新しい吸入負荷装置を用いての定量的分析

金沢大学医学部内科第三講座 (主任：服部絢一教授)

南 真 司

(昭和58年12月5日受付)

気管支喘息モデル動物において、ヒスタミンや Slow Reacting Substance of Anaphylaxis (SRS-A) などの内因性化学伝達物質の作用の定量的な評価は、小動物に対して有効な装置がなく困難であった。今回、われわれが新たに開発した小動物用定量的吸入負荷装置を用い化学伝達物質の定量的評価を試みた。同種抗卵白アルブミン血清 (1ml/kg, Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA) 価 6400 倍) で受身感作した成熟雄モルモットを用い、ネンプター麻酔 (75 mg/kg) による調節呼吸下に卵白アルブミン (1 mg/ml) の定量的吸入負荷 (90 秒/kg) を行った。このようにして喘息を惹起せしめた群と、他に抗ヒスタミン剤 (塩酸ジフェンヒドラミン) を投与した群、抗ヒスタミン剤と抗 SRS-A 剤 (FPL55712) を投与した群、受身感作を行わなかった群の 4 群にわけ検討した。生じた気道反応について、気道内圧、胸腔内圧、気流速度、換気量を 60 分間にわたり同時連続記録した。末梢および中枢気道変化の指標を、それぞれ動肺コンプライアンス、肺抵抗を求めた。これら気道内圧、動肺コンプライアンス、肺抵抗などのパラメーターを、4 群間で比較した。ヒスタミンは 3 分を頂値にもつ強力な早期反応を惹起し中枢、末梢気道を同程度に収縮させるが、その後急速に影響を弱めた。SRS-A はヒスタミンに比較してゆっくりした反応を示し、気道内圧効果は小さいがその作用部位は末梢気道に特異的で 10~60 分まで長く持続する反応を示した。また抗ヒスタミン剤・抗 SRS-A 剤使用群と受身感作を行わなかった群に有意差がみられなかった。以上より、気道攣縮においてヒスタミンおよび SRS-A が、重要な役割をなしていることが確認され、その他の化学伝達物質は、単独では気道反応に主たる影響を及ぼしていないことが推定された。

Key words provocation test, bronchoconstriction, histamine, slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A), guinea pig.

アレルギー性気管支喘息において、抗原吸入負荷時気道攣縮が惹起されることは、特徴的所見である。この反応は、主として肥満細胞より放出される各種化学伝達物質によって生ずるが、各物質によって気道系へ及ぼす影響に差異があると言われている¹⁾²⁾。近年、Slow Reacting Substance of Anaphylaxis (以下

SRS-A と略) の本体と考えられるロイコトリエンが発見、同定されて以来^{3)~5)}、外因性化学伝達物質の薬理作用に対する理解が、飛躍的に進歩してきた^{6)~8)}。しかし、内因性化学伝達物質 (ヒスタミン、SRS-A 他) の作用の定量的評価は、in vivo の状態においてはまだ充分になされていない⁹⁾¹⁰⁾。これらの解明のため、われわれ

Studies on Effect of Histamine and Slow Reacting Substance of Anaphylaxis (SRS-A) on Bronchospasm Produced by Antigen Inhalation in Passively Sensitized Guinea Pigs. —Quantitative Analysis by Using a New Inhalation Apparatus for Small Animals. **Shinji Minami**, Department of Internal Medicine, (III), (Director: Prof. K. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University.

れは小動物用定量的吸入負荷装置¹¹⁾を開発し、今まで困難であった喘息の吸入誘発実験を *in vivo* モルモットに行い、各種内因性化学伝達物質の作用の定量的評価を試みた。

対象および方法

1. 実験動物と人工呼吸

ハートレー系雄モルモット 380~550 g を使用した。麻酔はネプタール 75 mg/kg を腹腔内に投与し行った。気管切開後、ハーバード社製小動物用従量型レスピレーターを用いて、室内空気で陽圧調節呼吸を行った。呼吸数 50 回/分とし、1 回換気量は 8.5 ml/kg 前後とした。この状態での気道系・循環器系の基礎データはすでに報告した¹¹⁾。

2. 装置と肺機能測定

1) 実験は、われわれが開発した小動物用定量的吸入負荷装置にて行った。市販の超音波ネブライザー(立石電気, オムロン超音波式吸入器 NE-U10)の薬剤槽を固定し、回路内に直接挿入している。これにより随時定量的吸入負荷が可能であり、吸入霧化量は $15.2 \pm 2.1 \mu\text{l}/\text{min}$ (Mean \pm S.D), 肺沈着量は $7.0 \pm 1.2 \mu\text{l}/\text{min}$, 気管及び肺外気管支の沈着量は $1.4 \pm 0.1 \mu\text{l}/\text{min}$ が得られる(図 1)。

min が得られる(図 1)。

2) 気道内圧 (airway pressure, 以下 P_{aw} と略) は気管内へ挿入したチューブの側枝より、差圧トランスデューサー (日本光電社製, TP-603T) の一端に接続し、他端を大気に開放して測定した。胸腔内圧 (intrapleural pressure, 以下 P_{pl} と略) は仰臥位にしたモルモットの右第 6 肋間中線前後より、内腔をヘパリン加生食水で満たしたポリエチレンチューブ (内径 0.9 mm, 先端 1 cm に 5 個の小孔有り) を胸腔内へ挿入し、圧カトランスデューサー (日本光電製, LPU-0.1) を介して測定した¹²⁾。気道内圧と胸腔内圧の差圧 (以下 P_{aw-pl} と略) は、作図法にて求めた。気流速度 (flow rate, 以下 \dot{V} と略) は、回路内に設置した小動物用 Lilly 型気流抵抗管 (日本光電社製, TV-241T) 及び差圧トランスデューサー (同, TP-602T) を介して、気流用アンプ (同, AR-600G) にて測定した。さらに積分計 (日本光電社製, AQ-600G) にて気流速度を積分し、換気量 (tidal volume, 以下 V と略) を求め、同時連続記録した。以上求めた P_{aw-pl} , \dot{V} , V より、肺抵抗 (pulmonary resistance, 以下 R_L と略), 動肺コンプライアンス (dynamic compliance, 以下 C_{dyn} と略) を作図法にて求めた(図 2)。 R_L は $V_{max} 1/2$ の

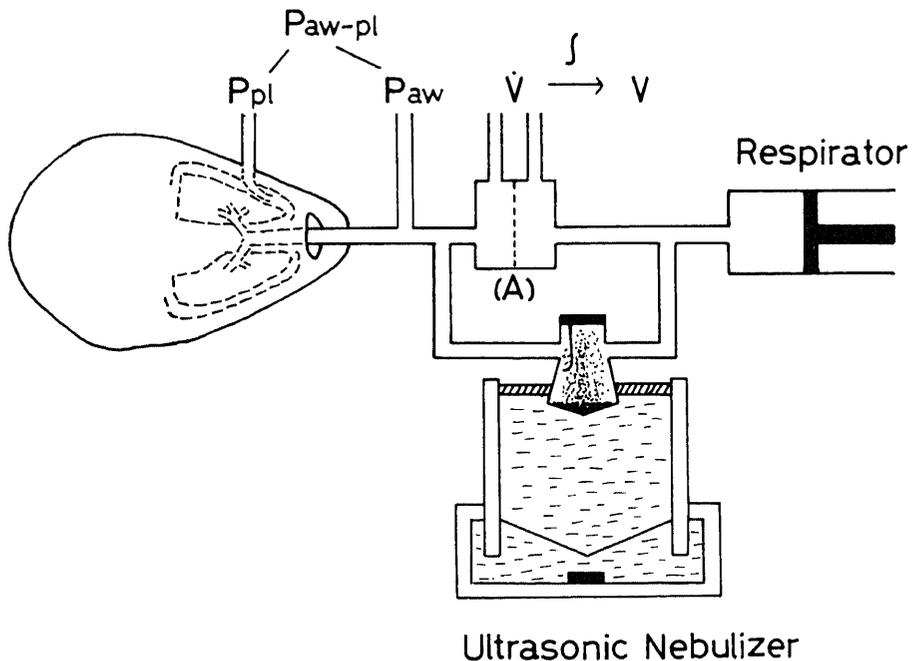


Fig. 1. Schema of quantitative inhalation apparatus for small animals. In provocation the airway resistance assay chamber (A) was closed in order to prevent blocking the mesh in the chamber by aerosol. Airway pressure (P_{aw}), intrapleural pressure (P_{pl}), flow rate (\dot{V}) and tidal volume (V) were simultaneously recorded with X-Y recorder.

点を基準とし、この2点間の ΔP_{aw-pl} を、 \dot{V} で除して求めた。 C_{dyn} は \dot{V} の2点間の ΔV を ΔP_{aw-pl} で除して求めた¹³⁾。なおRLと C_{dyn} は、肺気量に依存するため、RLは体重(kg)を乗じ、 C_{dyn} は体重(kg)で除した値を用いた¹⁾。

3. 同種抗卵白アルブミン血清の製作

Santives¹⁴⁾等の方法にて行った。卵白アルブミン(ovalbumin, 以下OAと略)500 μ gをcomplete Freund's adjuvantにてエマルジョンの状態とし、250~300gのモルモットの両側鼠径部、両側腋窩部、項部の5カ所に皮内注射した。2週間後に同じ処置で増強法を行った。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°Cで凍結保存した。

作製した抗OA血清のpassive cutaneous anaphylaxis (PCA)抗体価は、4時間後で6400倍だった¹⁵⁾。

4. 同種受身感作

製作した抗OA血清1ml/kgを実験開始前12~24時間に腹腔内投与し感作を行った。受身感作は血清が腸管内に入ると無効となるため、腹腔内投与は、18ゲージの外筒で腹壁を浅く穿刺した後、先端が鈍な内筒を腹腔内に挿入し腹水の逆流を確認した上で行った。さらに拮抗剤を投与していない例では抗原吸入にて、また、拮抗剤投与例では、実験終了後充分量の抗原を静注して反応の誘発を試みることによって、全例に感作がなされていたことを確認した。

5. 抗ヒスタミン剤投与

H₁ヒスタミン拮抗剤として、塩酸ジフェンヒドラミンを吸入負荷10分前に腹腔内投与した。用量は60mg/kgとした¹⁶⁾。

6. 抗SRS-A剤投与

SRS-Aの拮抗剤として、FPL 55712を吸入負荷5分前より実験終了時まで投与した。投与方法は、蒸留水で0.5%のFPL 55712溶液を作製し、左内頸静脈より連続注入ポンプ(ハーバード社製)にて持続注入した。投与速度は20mg/kg/hrとした。

7. 抗原吸入負荷

OA液(1mg/ml)1.5mlに、消泡剤の目的で約0.1mlのアレベールを混合した溶液を、われわれの装置の小薬剤槽に入れ、調節呼吸下に90sec/kg吸入させた。尚、吸入の際には、Lilly型気流抵抗管を通すとエロゾルがメッシュにつまって抵抗が変化する恐れがあるので、この抵抗管と並列に超音波ネブライザーを接置した。吸入負荷時、回路を切り換え吸入し、負荷直後にLilly型気流抵抗管を通る回路に戻した。

8. 実験群の分類

1) 発作誘発群: 受身感作を行い、12~24時間後に抗原吸入負荷にて気道攣縮を惹起せしめた群。N=7, 体重は459 \pm 20g, 一回換気量は8.6 \pm 0.7ml/kg。

2) 抗ヒスタミン剤投与群: 受身感作を行い、抗ヒスタミン剤腹腔内投与による前処置後吸入した群。N=7, 体重は436 \pm 23g, 一回換気量は8.9 \pm 0.3ml/kg。

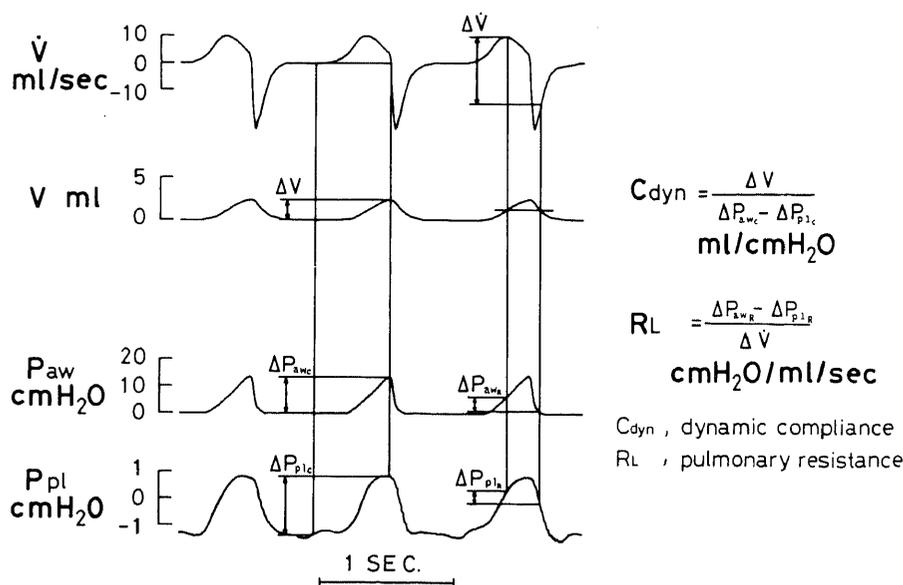


Fig. 2. Method of measuring dynamic compliance and pulmonary resistance.

3) 抗ヒスタミン剤・抗SRS-A 剤投与群：受身感作を行い、抗ヒスタミン剤腹腔内投与による前処置と抗SRS-A 剤持続静注の処置をほどこし、抗原吸入した群。N = 5, 体重は 468 ± 43 g, 一回換気量は 8.4 ± 0.4 ml/kg.

4) 無感作群：受身感作を行わず、抗ヒスタミン剤を腹腔内投与した後、抗原吸入を行った群。N = 6, 体重は 494 ± 32 g, 一回換気量は 8.2 ± 0.3 ml/kg.

9. 測定値の表示法

各実験群間での前処置や手技の違いによると考えられる前値のバラツキの補正と、経過の比較を簡単にするため、%変化を用いた。Paw, Cdyn, RL それぞれの前値を100%とし、以後の値を前値に対する100分率(%変化)とした。

10. 使用薬剤

使用した薬物は以下の通りである。卵白アルブミン(シグマ)、塩酸ジフェンヒドラミン(diphenhydramine HCl, シグマ)、FPL 55712(Fison社 Dr. Sheardより譲渡)、ネンプタール(nembutal, Abbotto Laboratories), complete Freund's adjuvant(Difco Laboratories), アレバール(日本商事), ヘパリン(小玉)

11. 統計学的処理

成績は平均土標準偏差で表した。Paw, Cdyn, RL の

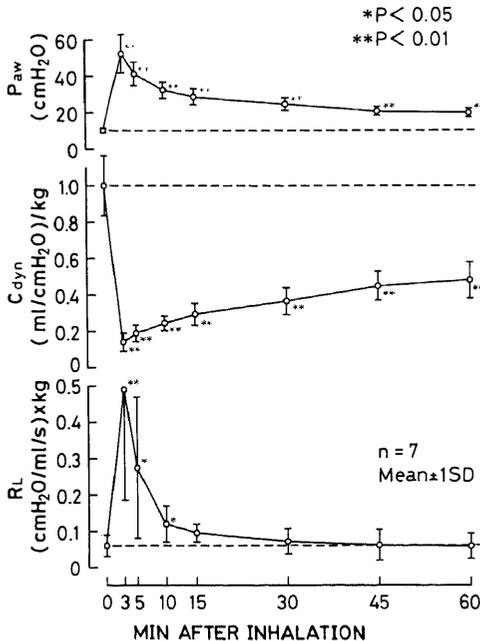


Fig. 3. Sequential change of pulmonary function after ovalbumin inhalation challenge in passively sensitized guinea pigs. (positive control group)

時間経過の比較は、吸入開始前値に対する各時間値を Student paired t test を用い有意差検定を行った。

4 群間の比較は分散分析法 (F-test) を用いて反応曲線を全体として検定し、さらに各時間での 4 群間の比較は Mann-Whitney の U-test を用いて行った。危険率 ($p < 0.05$) を統計学的に有意であるとした。

成 績

1. 各実験群での Paw, Cdyn, RL の時間経過

1) 発作誘発群：吸入開始後 30 秒より気道攣縮が始まり、3 指標とも 2.5~3 分程度で反応はピークとなり、以後低下した。RL は急速に下降し、前値との間に有意差がみられなくなったが、Paw, Cdyn 共に 60 分後まで前値への回復はみられなかった (図 3)。

2) 抗ヒスタミン剤投与群：発作誘発群のような強い初期気道攣縮はみられず、Paw はゆるやかに上昇し、10~15 分でほぼピークに達し、その後 60 分にわたるまで持続した。RL は 10 分でやや上昇の傾向を示したが有意ではなく、Cdyn は常に低下し、ことに 10 分以後有意に低下した (図 4)。

3) 抗ヒスタミン剤・抗SRS-A 剤投与群：気道反応

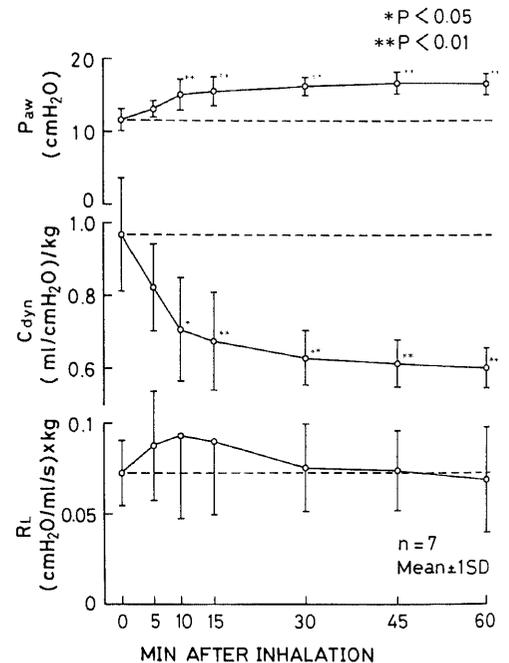


Fig. 4. Sequential change of pulmonary function after ovalbumin inhalation challenge in passively sensitized guinea pigs treated with antihistaminics (diphenhydramine HCl). (antihistaminics group)

は、前2者よりもよりゆるやかであり、時間経過と共に直線的に変化した。Pawは30分で有意の変化を示した後もほぼ直線的に上昇した。Cdynは45分で有意の変化を示した後もほぼ直線的に下降した。しかし、RLには有意な変化はみられなかった(図5)。

4) 無感作群: 抗ヒスタミン剤・抗SRS-A剤投与群とほぼ同様の経過がみられた。Pawは30分で有意の変化を示した後も、ほぼ直線的に上昇した。Cdynは30分で有意の変化を示した後もほぼ直線的に下降した。しかし、RLには有意の変化はみられなかった(図6)。

2. 4群間の気道内圧の比較

黒丸点線が発作誘発群である。前値は、 10.9 ± 1.1 cm H₂Oであった。白抜き丸実線が抗ヒスタミン剤投与群で、前値は、 11.6 ± 1.5 cm H₂O。黒丸実線が抗ヒスタミン剤・抗SRS-A剤投与群で、前値は、 12.4 ± 1.0 cm H₂O。白抜き丸点線が無感作群で、前値は、 10.3 ± 0.7 cm H₂O。このグラフにても4群間の変化の傾向を読みとることは可能であるが、前値のバラツキが、経過の比較を困難にしている(図7)。そのため、以後前値に対する%変化にて比較した。

3. %変化による4群間の比較

1) 気道内圧 (Paw) (図8)

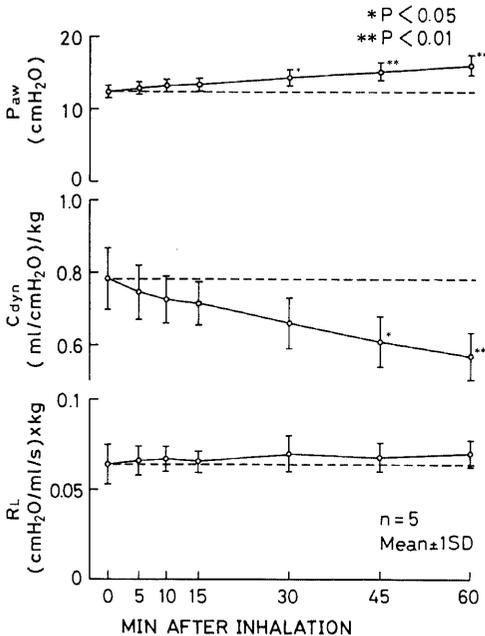


Fig. 5. Sequential change of pulmonary function after ovalbumin inhalation challenge in passively sensitized guinea pigs treated with antihistaminics and SRS-A antagonist (FPL 55712). (antihistaminics and SRS-A antagonist group)

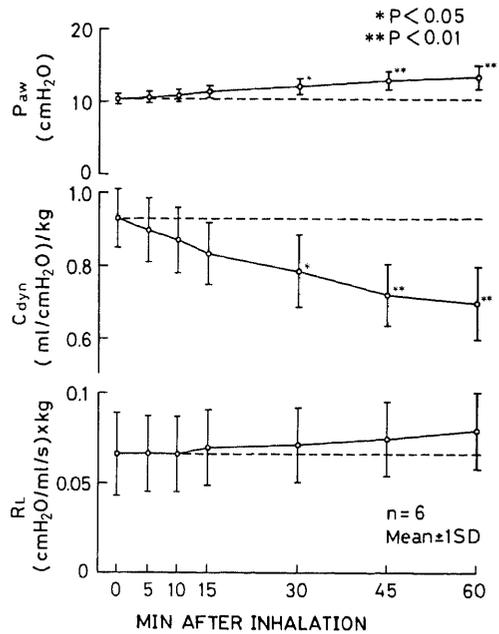


Fig. 6. Sequential change of pulmonary function after ovalbumin inhalation challenge in non-sensitized guinea pigs treated with antihistaminics. (non-sensitized group)

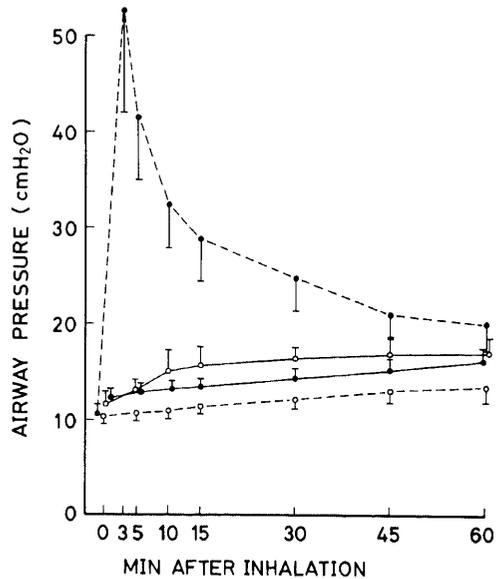


Fig. 7. Sequential change of airway pressure after ovalbumin inhalation challenge.
 ····●···, positive control group; -○-, antihistaminics group; —●—, antihistaminics and SRS-A antagonist group; ···○···, non-sensitized group. Each value indicates mean ± S.D.

Paw 実測値比較より、抗ヒスタミン剤投与群が他群より一層明確に分離され、また、実測値では差があるようにみえた抗ヒスタミン剤・抗 SRS-A 剤投与群と無感作群が、ほぼ一線上となった。

群間比較の F-test で、発作誘発群は、抗ヒスタミン剤投与群、抗ヒスタミン剤・抗 SRS-A 剤投与群と無感作群のいずれにも $p < 0.01$ と有意差を認めた。抗ヒスタミン剤投与群は、抗ヒスタミン剤・抗 SRS-A 剤投与群と無感作群の両者に $p < 0.01$ と有意差を認めた。抗ヒスタミン剤・抗 SRS-A 剤投与群と無感作群の間に有意差を認めなかった。

各時間毎の比較は U-test で行った。発作誘発群と抗ヒスタミン剤投与群との比較では、60 分以外のすべてで、前者が有意 ($p < 0.01$) に高値を示した。抗ヒスタミン剤投与群は、抗ヒスタミン剤・SRS-A 剤投与群に対して、10 分 $p < 0.05$, 15 分 $p < 0.02$, 30 分 $p < 0.005$, 45 分 $p < 0.005$, 60 分 $p < 0.001$ と有意に高値を示し、また無感作群に対しては、10 分 $p < 0.02$, 15 分 $p < 0.01$, 30 分 $p < 0.001$, 45 分 $p < 0.001$, 60

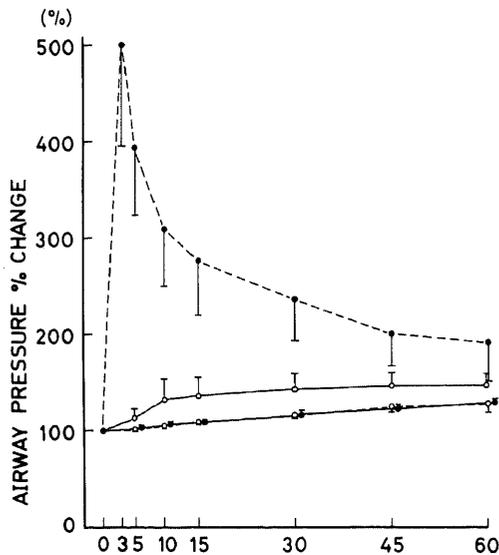


Fig. 8. Sequential change of airway pressure after ovalbumin inhalation challenge. The difference between positive control and antihistaminics group indicates histamine effect and the difference between antihistaminics and antihistaminics—SRS-A antagonist group does SRS-A effect.

$$\% \text{ change} = \frac{\text{Paw after inhalation}}{\text{Paw before inhalation}} \times 100$$

---●---, positive control group; —○—, antihistaminics group; —●—, antihistaminics and SRS-A antagonist group; ---○---, non-sensitized group. Each value indicates mean \pm S.D.

分 $p < 0.05$ と有意に高値を示した。抗ヒスタミン剤・抗 SRS-A 剤投与群と無感作群の間にはまったく有意差を認めなかった。

2) 動肺コンプライアンス (Cdyn) (図 9)

群間比較で、発作誘発群は、抗ヒスタミン剤投与群、抗ヒスタミン剤・抗 SRS-A 剤投与群と無感作群のいずれにも $p < 0.01$ と有意差を認めた。抗ヒスタミン剤投与群は、抗ヒスタミン剤・抗 SRS-A 剤投与群と無感作群の両者に $p < 0.01$ と有意差を認めた。抗ヒスタミン剤・抗 SRS-A 剤投与群と無感作群の間に有意差を認めなかった。

各時間毎比較で、発作誘発群は、抗ヒスタミン剤投与群に対し、15 分まで $p < 0.001$, 30 分 $p < 0.005$, 45 分 $p < 0.02$ と有意に低値を示したが、60 分では有意差を認めなかった。また抗ヒスタミン剤・抗 SRS-A 剤投与群と無感作群に対しては、45 分までは $p < 0.005$, 60 分 $p < 0.05$ と有意に低値を示した。抗ヒスタミン剤投与群は、抗ヒスタミン剤・抗 SRS-A 剤投与群に対し、5 分 $p < 0.05$, 10 分 $p < 0.02$, 15 分, 30 分 $p < 0.005$, 45 分 $p < 0.02$, 60 分 $p < 0.05$ と有意に低値を示した。また、無感作群に対し 5 分 $p < 0.02$, 10 分 15 分 30 分 $p < 0.005$, 45 分 60 分

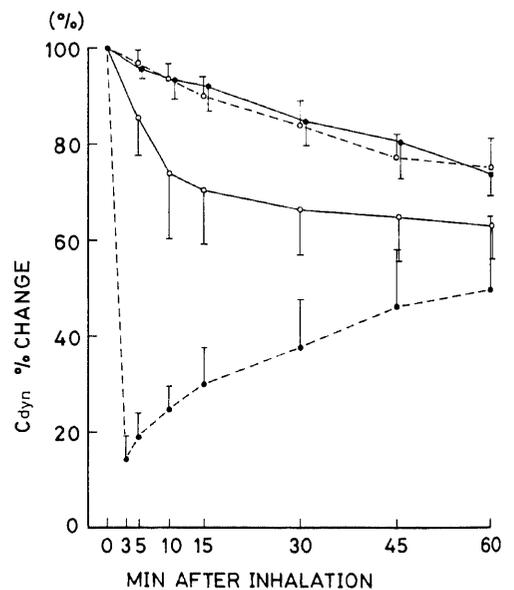


Fig. 9. Sequential change of dynamic compliance after ovalbumin inhalation challenge.

---●---, positive control group; —○—, antihistaminics group; —●—, antihistaminics and SRS-A antagonist group; ---○---, non-sensitized group. Each value indicates mean \pm S.D.

$p < 0.02$ と有意に低値を示した。抗ヒスタミン剤・抗 SRS-A 剤投与群と無感作群の間に有意差を認めなかった。

3) 肺抵抗 (RL) (図 10)

群間比較で、発作誘発群は、抗ヒスタミン剤投与群、抗ヒスタミン剤・抗 SRS-A 剤投与群と無感作群のいずれにも $p < 0.01$ と有意差を認めた。抗ヒスタミン剤投与群、抗ヒスタミン剤・抗 SRS-A 剤投与群と無感作群の 3 者間には有意差を認めなかった。

各時間毎比較で、発作誘発群は、抗ヒスタミン剤投与群に対し、5 分 $p < 0.005$, 10 分 $p < 0.05$ と有意に高値を示したが、以後は有意差を認めなかった。また、抗ヒスタミン剤・抗 SRS-A 剤投与群と無感作群に対し、5 分 10 分 $p < 0.005$, 15 分 $p < 0.02$ と有意に高値を示したが、以後は有意差を認めなかった。抗ヒスタミン剤投与群、抗ヒスタミン剤・抗 SRS-A 剤投与群と無感作群の 3 者間では、いずれの時間でもまったく有意差を認めなかった。

考 察

人間の気管支喘息は、気道過敏性と I 型アレルギー

反応で遊離する種々の化学伝達物質の作用からなっている。近年、肥満細胞や好塩基球の細胞表面に、IgE の Fc 部分に対する受容体があり、これに IgE が特異的に結合している状態にアレルゲンが結合すると、受容体間に架橋状態が生じ、これを引き金に細胞より脱顆粒現象や新たな生合成によって化学伝達物質が遊離することが知られてきた。これが I 型アレルギー反応のしくみであり、脱顆粒現象によってヒスタミンが、新たな生合成によって SRS-A などが遊離され、即時型アレルギー反応を惹起させる¹⁷⁾¹⁸⁾。プロスタグランジンやトロンボキサンなどのヒスタミン、SRS-A 以外の化学伝達物質も、I 型アレルギー反応に関与しているが、主要な役割は果たしていないと考えられている¹⁸⁾¹⁹⁾。また、人間の喘息では、抗ヒスタミン剤が無効であることはよく知られており、さらに Weiss ら⁸⁾が報告しているように、ロイコトリエンで喘息状態が誘発されることを考えれば、SRS-A の重要性が目ざれるところである。このような理由により、喘息発現機序の解明には、SRS-A を含めた化学伝達物質の作用の定量的検討が不可欠となる。まず、著者らが開発した小動物用定量的吸入法を用いた、本実験モデルについて考察する。

1. 実験方法について

本来、喘息が経気道的に誘発されることを考えれば、in vivo モデルで吸入誘発実験を行うことが望ましい。モルモットなどの小動物の吸入負荷は、有効な直接吸入負荷装置がなかったため定性的ないし半定量的にしが行えず²⁰⁾²¹⁾、現在まで定量的な経気道負荷方法は確立されていなかった。in vitro では、気管支収縮は測定できるが、Paw Cdyn RL などの機能的な評価がなし得ず、また、抗原静注負荷では、投与経路が非生理的であると共に、全身のアナフィラキシー反応を招来し、気道系より循環系の反応が主となり、十分な検討ができない。われわれはこれらの問題点を考慮し、経気道吸入負荷実験を行った。

第一に対象をハートレー系雄モルモットに限定し、同年令、同体重のものを使用するようにした。モルモットを使用した理由として、1) 気管支喘息の特徴である気道過敏性を有していることと、気道系が抗原抗体反応の標的器官になっていることである。2) 人間の I 型アレルギーは、IgE を介して行われるのに対して、モルモットは IgG が主体となっている。モルモットに IgE モデルを作製することは可能であるが、手技が複雑であり、IgG モデルにおいても IgE モデルと同様にヒスタミンと SRS-A は主要化学伝達物質であることより、人間の I 型アレルギーのモデルとして IgG モデルのモルモットを使用した^{22)~24)}。

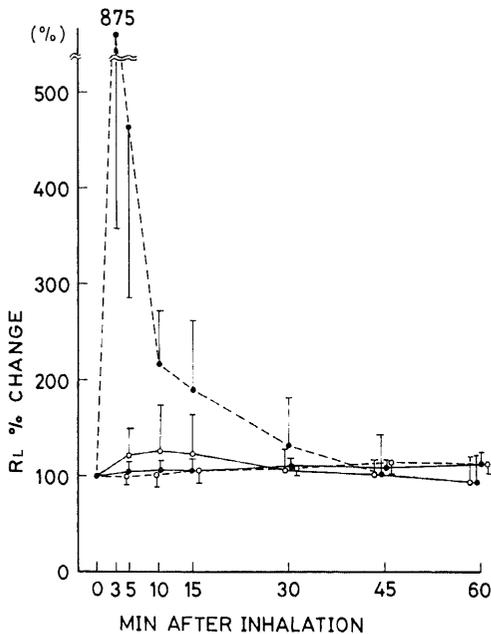


Fig. 10. Sequential change of pulmonary resistance after ovalbumin inhalation challenge. ---●---, positive control group; —○—, antihistaminics group; —●—, antihistaminics and SRS-A antagonist group; ---○---, non-sensitized group. Each value indicates mean \pm S.D.

第2に、感作方法は、同種抗卵白アルブミン血清による受身感作として、被検動物の個体差を少なくするようにつとめた。

第3に、吸入負荷抗原の定量化のため、われわれの開発した吸入負荷装置を用いた。定量的であるためには、エロゾル吸入量が一定であること、気管支、肺に均等に沈着すること、沈着量が一定であることが必要である。本実験で使用した装置は、既報¹¹⁾のように十分に条件を満たしていると考えられ、本実験でもこれを裏付ける成績が得られた。抗原吸入による喘息誘発実験は、すでに Michoud ら¹²⁾も行っているが、彼らの実験のような自発呼吸下では、われわれのような致死的な強い反応を誘発することはできない。実験結果でもわかるように、SRS-A の気道反応はヒスタミンに比較して小さいため、致死的な強い反応を起こさないかぎり、気道反応のほとんどがヒスタミンの反応となり、SRS-A の反応をとらえることはきわめて困難となる。本装置では、定量的吸入を強制呼吸下で行っているのので、SRS-A 関与を検討するのに、十分な反応が得られると考えられる。

第4に、麻酔の影響については、自律神経系が遮断され、気道反応に変化を及ぼすことが考えられる^{25)~27)}。しかし、本実験では、化学伝達物質の気道に対する作用を、各種拮抗剤非投与群と投与群に分け比較検討したことより、麻酔の影響については考慮の必要はないと考えた。

第5に、拮抗剤そのものの気道反応に対する影響も問題になる。抗ヒスタミン剤として使用した塩酸ジフェンヒドラミンは、モルモット気管支鎖の反応をブロックしない²⁸⁾²⁹⁾が、大量に使用した時には、抗アセチルコリン作用があり、気道反応を抑制する方向に作用すると考えられている。抗SRS-A剤としては、FPL 55712を使用した。これは、SRS-A に特異的な拮抗剤と考えられているが³⁰⁾³¹⁾、大量ではプロスタグランジンに拮抗し、ヒスタミン遊離やトロンボキサン合成を阻害する³¹⁾。本実験では、現在まで、一般的に行われてきた発作誘発直前の大量一回投与にかえて、持続静脈内注入法を用いることにより、SRS-A 以外の化学伝達物質をできるだけブロックせず、SRS-A のみを特異的に抑制しようと試み、ほぼ完全にSRS-Aの反応を抑えることができた。これは、in vivo で0.6分と短い半減期であるFPL 55712が、気管支動脈より血流量が上まわる肺静脈によって、SRS-Aの作用部位である末梢気道へ、失活する前に到達するためと考えられた。

2. 実験結果について

ヒスタミンの反応は、発作誘発群と抗ヒスタミン剤投与群間の差であると考えられる。抗ヒスタミン剤投

与群では、PawとRLが有意に低く、Cdynが有意に高かったことより、ヒスタミンは発作誘発時、気道反応に密接に関与していることが確認された。Pawは3分で最高値となり、その後急速に減少するが45分まで有意に上昇していた。CdynおよびRLは共に3分で最高値を示し、RLは15分で有意差がみられなくなるが、Cdynは45分まで有意差を示した。このことより、ヒスタミンは、早期に中枢および末梢気道の両者に強く作用するが、15分以後の反応は末梢気道が主体と考えられた。15分以後45分まで末梢気道反応が残ったこと以外は、これまでの報告とほぼ一致するものである¹¹⁾²⁾。このことは、in vivoにおいては、気道に対するヒスタミンの作用が消失した後も、強い気道攣縮の影響が中枢よりむしろ末梢に長期に残存することを示唆していると考えられる。

SRS-Aの反応は、抗ヒスタミン剤投与群と抗ヒスタミン剤・抗SRS-A剤投与群間の差であると考えられる。抗ヒスタミン剤・抗SRS-A剤投与群では、Pawが有意に低く、Cdynが有意に高いことより、SRS-Aは発作誘発時気道反応に関与していることが確認された。Pawは10分以後60分まで有意に上昇し、Cdynも5分以後60分まで有意に低下したが、RLはまったく有意差をみなかった。このことは、これまでの報告とよく一致し、SRS-Aが末梢気道に特異的に作用することを示していると考えられる^{11)2)6)~8)}。また、ヒスタミンに比較して気道反応は弱い⁶⁾が、長期に続く傾向を示した。抗ヒスタミン剤で多少気道反応が低下している可能性はあるが、in vivoではヒスタミン反応の方がSRS-Aのそれより強力であると思われた。しかし、SRS-Aの反応は、末梢気道に60分以上にわたり持続することより、反応は弱い⁶⁾が、長時間の喘息発作においてヒスタミンと同様ないしより重要な役割をはたしている可能性が示唆された。

ヒスタミン、SRS-A以外の化学伝達物質の反応は、抗ヒスタミン剤・抗SRS-A剤投与群と無感作群間の差であると考えられる。この2群間に有意差を認めないことより、ヒスタミン、SRS-A以外の化学伝達物質は、発作誘発時の気道反応に関与していないと考えられた。各時間毎の検討でもまったく有意差を認めなかった。このことは、抗SRS-A剤によってプロスタグランジンやトロンボキサンなどの化学伝達物質が抑制されたことも考えられるが、in vivoで行いうるレベルの反応においては、ヒスタミンとSRS-A以外の化学伝達物質はそれぞれ単独では気道反応に主たる影響を及ぼしておらず、その作用は間接的なものと考えられた³²⁾³³⁾。

成 績

受身感作モルモットを用いて、抗原吸入誘発による I 型アレルギー反応モデルを作製した。これまで、小動物の *in vivo* 実験では、行い得なかった定量的吸入を、著者らが開発した装置を用いて行い、その反応も定量的に測定した。この反応モデルに抗ヒスタミン剤、抗 SRS-A 剤を投与することによって、内因性化学伝達物質の作用を定量的に検討した。ヒスタミンは強力な早期反応を惹起し、中枢および末梢気道を同程度に収縮させるが、回復は早かった。SRS-A はヒスタミンに比較して反応は弱く、作用の発現時間も遅いが、末梢気道に特異的に作用し長く持続した。ヒスタミン、SRS-A 以外の化学伝達物質は、単独では気道反応を起しえないと考えられた。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った服部絢一教授に謹んで感謝の意を表します。また、御指導、御鞭撻をいただきました福井医科大学宮保進教授と佐賀務助手をはじめ当教室第 5 研究室の諸先生方に深く感謝致します。

本論文の要旨は、第 32 回日本アレルギー学会総会（昭和 56 年）において発表した。

文 献

- 1) Drazen, J. M. & Austen, K. F.: Effects of intravenous administration of slow-reacting substance of anaphylaxis, histamine, bradykinin and prostaglandin F_{2α} on pulmonary mechanics in the guinea pig. *J. Clin. Invest.*, **53**, 1679-1685 (1974).
- 2) Drazen, J. M., Lewis, R. A., Wasserman, S. I., Orange, R. P. & Austen, K. F.: Differential effects of a partially purified preparation of slow-reacting substance of anaphylaxis on guinea pig tracheal spirals and parenchymal strips. *J. Clin. Invest.*, **63**, 1-5 (1979).
- 3) Murphy, R. C., Hammarström, S. & Samuelsson, B.: Leukotriene C; A slow-reacting substance from murine mastcytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 4275-4279 (1979).
- 4) Hammarström, S., Murphy, R. C., Samuelsson, B., Clark, D. A., Mioskowski, C. & Corey, E. J.: Structure of leukotriene C. Identification of the amino acid part. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **91**, 1266-1272 (1979).
- 5) Örnning, L., Hammarström, S. & Samuelsson, B.: Leukotriene D; A slow-reacting substance from basophilic leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 2014-2017 (1980).

Sci., **77**, 2014-2017 (1980).

- 6) Drazen, J. M., Austen, K. F., Lewis, R. A., Clark, D. A., Goto, G., Marfat, A. & Corey, E. J.: Comparative airway and vascular activities of leukotriene C-1 and D *in vivo* and *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 4354-4358 (1980).
- 7) Krell, R. D., Osborn, R., Vickery, L., Falcone, K., O'Donnell, M., Gleason, J., Kinzig, C. & Bryan, D.: Contraction of isolated airway smooth muscle by synthetic leukotrienes C₄ and D₄. *Prostaglandins*, **22**, 387-409 (1981).
- 8) Weiss, J. W., Drazen, J. M. & Coleo, N.: Bronchoconstrictor effects of leukotriene C in humans. *Science*, **216**, 196-198 (1982).
- 9) Sheerd, P., Lee, T. B. & Tattersall, M. L.: Further studies on the SRS-A antagonist FPL55712. *Monogr. Allergy*, **12**, 245-249 (1977).
- 10) Andersson, P.: Effects on inhibitors of anaphylactic mediators in two models of bronchial anaphylaxis in anesthetized guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.*, **77**, 301-307 (1982).
- 11) 南 真司・岡藤和博・佐賀 務・藤村政樹・金森一紀・宮保 進・服部絢一・川井 清: モルモットにおける定量的吸入負荷装置の開発～その基礎的検討～. *日胸疾患誌*, **21**, 252-258 (1983).
- 12) Michoud, M. C., Fraser, R. S., Pare, P. D. & Hogg, J. C.: Effect of indomethacin and atropine in experimental asthma in conscious guinea pigs. *J. Appl. Physiol.*, **40**, 889-894 (1976).
- 13) Amdur, M. O. & Mead, J.: Mechanics of respiration in unanesthetized guinea-pig. *Am. J. Physiol.*, **192**, 364-368 (1958).
- 14) Santives, T., Roska, A. K., 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).
- 15) Watanabe, N. & Ovary, Z.: Antigen and antibody detection by *in vivo* methods; a reevaluation of passive cutaneous anaphylactic reactions. *J. Immunol. Meth.*, **14**, 381-390 (1977).
- 16) 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—抗原および leukotriene C₄ の吸入負荷を用いての検討. *アレルギー*, **32**, 365-375 (1983).
- 17) Ishizaka, K. & Ishizaka, T.: Allergy: Principles and Practice, p52-78. In E. Middleton, Jr., C. E.

- Read & E. F. Ellis (ed.), Immunology of IgE-mediated hypersensitivity, C. V. Mosby Co., Saint Louis, U. S. A., 1978.
- 18) **Andersson, P.**: Effects of inhibitors of anaphylactic mediators in two models of bronchial anaphylaxis in anesthetized guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.*, **77**, 301-307 (1982).
- 19) **Adams, G. K. & Lichtenstein, L. M.**: Antagonism of antigen-induced contraction of guinea pig and human airways. *Nature*, **270**, 255-257 (1977).
- 20) **Friebel, H. & Basold, A.**: Über das steuerbare Meerschweinchenasthma. *Arch. Exper. Path. U. Pharmakol.*, **217**, 13-20 (1953).
- 21) **Douglas, J. S., Dennis, M. W., Ridgway, P. & Bouhuys, A.**: Airway dilatation and constriction in spontaneously breathing guinea pigs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **180**, 98-109 (1972).
- 22) **Andersson, P.**: Antigen-induced bronchial anaphylaxis in actively sensitized guinea-pigs. Pattern of response in relation to immunization regimen. *Allergy*, **35**, 65-71 (1980).
- 23) **Andersson, P. & Bergstrand, H.**: Antigen-induced bronchial anaphylaxis in actively sensitized guinea-pigs; effect of long-term treatment with sodium cromoglycate and aminophylline. *Br. J. Pharmacol.*, **74**, 601-609 (1981).
- 24) **Forsberg, K. & Sörenby, L.**: The influence of a new corticosteroid, budesonide, on anaphylactic bronchoconstriction and SRS-A release in the guinea-pig. *Agents and Actions*, **11**, 391-395 (1981).
- 25) **Mills, J. E. & Widdicombe, J. G.**: Role of the vagus nerves in anaphylaxis and histamine-induced bronchoconstriction in guinea pigs. *Br. J. Pharmacol.*, **39**, 724-731 (1970).
- 26) **Gold, W. M., Kessler, G. F. & Yu, D. Y. C.**: Role of vagus nerves in experimental asthma in allergic dogs. *J. Appl. Physiol.*, **33**, 719-725 (1972).
- 27) **Collier, H. O. J. & James, G. W. L.**: Humoral factors affecting pulmonary inflation during acute anaphylaxis in the guinea pig in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, **30**, 283-301 (1967).
- 28) **Castillo, J. C.**: The tracheal chain. II. The anaphylactic guinea pig trachea and its response to antihistamine and drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **94**, 412-415 (1948).
- 29) **Joiner, P. D., Wall, M., Davis, L. B. & Hahn, F.**: Role of amines in anaphylactic contraction of guinea pig isolated smooth muscle. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **53**, 261-270 (1974).
- 30) **Augestein, J., Farmer, J. B., Lee, T. B., Sheard, P. & Tattersall, M. L.**: Selective inhibitor of slow reacting substance of anaphylaxis. *Nature new biol.*, **245**, 215-217 (1973).
- 31) **Welten, A. F., Hope, W. C., Tobias, L. D. & Hamilton, J. G.**: Inhibition of antigen-induced histamine release and thromboxane synthase by FPL55712, a specific SRS-A antagonist? *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 1378-1382 (1981).
- 32) **Adams, G. K. & Lichtenstein, L. M.**: Antagonism of antigen-induced contraction of guinea pig and human airways. *Nature*, **270**, 255-257 (1977).
- 33) **Adams, G. K. & Lichtenstein, L. M.**: In vitro studies of antigen-induced bronchospasm; effect of antihistamine and SRS-A antagonist on response of sensitized guinea pig and human airways to antigen. *J. Immunol.*, **122**, 555-562 (1979).

Studies on Effect of Histamine and Slow Reacting Substance of Anaphylaxis (SRS-A) on Bronchospasm Produced by Antigen Inhalation in Passively Sensitized Guinea Pigs. —Quantitative Analysis by Using a New Inhalation Apparatus for Small Animals Shinji Minami, Department of Internal Medicine (III) (Director: Prof. K. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. Jusen Med. Soc., **92**, 811—821 (1983)

Key words: provocation test, bronchoconstriction, histamine, slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A), guinea pig.

Abstract

In order to elucidate the mechanism of histamine and the slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) on bronchospasm produced in experimental animals, we have invented a new inhalation apparatus for small animals. Adult male guinea pigs were used. They were sensitized passively by anti-ovalbumin antibody (1 ml/Kg, passive cutaneous anaphylaxis (PCA) titers 1:6400). According to pretreatments, animals were divided into 4 groups. 1) Ovalbumin (OA)—sensitized animals followed by OA inhalation challenge (positive control group), 2) OA—sensitized animals pretreated with antihistaminics alone (antihistaminics group) and 3) those with antihistaminics and SRS—A antagonist prior to the challenge (antihistaminics and SRS—A antagonist group). 4) Non-sensitized animals with OA inhalation were served as negative control group. The animals were anesthetized with nembutal sodium (75 mg/Kg) and, under artificial respiration by using a new inhalation apparatus, inhalation of ovalbumin solution, 1 mg/ml, in 90 sec/Kg was performed to provoke asthma. Airway pressure (Paw), intrapleural pressure (Ppl), flow rate (\dot{V}) and tidal volume (V) were measured simultaneously at definite intervals for 60 minutes after provocation. Peripheral and central airway responses were estimated with dynamic compliance (C_{dyn}) and pulmonary resistance (RL), respectively. These parameters were compared among 4 groups. Histamine caused a strong early response of both the central and the peripheral airway with a peak at 3 minutes but its effect faded away rapidly thereafter. SRS—A caused a delayed longstanding response (10—60 minutes), as compared with histamine and its action was characteristic in attacking the peripheral airway rather than the central one. There was no significant difference in all parameters between antihistaminics — SRS—A antagonist and nonsensitized group. It was concluded that histamine and SRS—A played an important role in bronchoconstriction but the other mediators did not participate.