

モルモットを用いた遅発型喘息モデルにおける
好酸球の関与と長時間作用型 β_2 刺激剤の効果

杉山 温人

論文題目

モルモットを用いた遅発型喘息モデルにおける
好酸球の関与と長時間作用型 β_2 刺激剤の効果

杉山温人

緒言

気管支喘息患者に適当な抗原による吸入誘発試験を行なうと、様々な喘息反応が出現することが知られている。抗原の吸入直後には即時型喘息反応 (Immediate asthmatic response : IAR) がみられ、この反応は速やかに回復するが、一部の患者では吸入誘発 4-6 時間後に再び喘息症状が出現することがあり、遅発型喘息反応 (Late asthmatic response : LAR) と呼ばれている¹。このLARの出現に一致して、非特異的気道過敏性の亢進と気道への炎症性細胞浸潤がみられることが知られている^{2, 3}。気道過敏性と気道の炎症はどちらも気管支喘息の本質的な特徴であると考えられているために、気管支喘息の研究者たちは、LARに注目してきた。そこで、LARの発症機序を解明するために、さまざまな動物モデルが考案されている^{4, 7}。

気管支喘息患者の気道に浸潤している炎症細胞の中で最も重要な細胞の一つは好酸球である。例えば、好酸球は重要な化学伝達物質であるロイコトリエンC4 (LTC4) や血小板活性化因子 (Platelet activating factor : PAF) を産生することが知られている^{8, 9}。また、好酸球の分泌する顆粒蛋白 (例えば、Major basic protein、Eosinophil cationic proteinなど) や活性化酸素は組織障害性を持っており、気道粘膜の障害に関与している可能性がある¹⁰。しかし、抗原誘発後のLARや気道過敏性の亢進に、好酸球がどれほど関与しているかはまだ十分に解明されていない。この点に関しては、すでに報告されているモルモットを用いたLARモデルにおいても同様である^{6, 7}。そこで、本研究においては、気道における好酸球の動態 (気道への浸潤と

その活性化)の解明と言う観点から、モルモットを用いたLARモデルの再評価を試みた。

交感神経 β_2 刺激剤の吸入は、気管支喘息患者の日常臨床の場において繁用されており、喘息発作の際の第一選択の薬剤である。 β_2 刺激剤は気管支拡張作用と共に肥満細胞からの化学伝達物質の放出を抑制する作用を持っており¹¹、こうした作用によって抗原吸入誘発後のIARが抑制されると考えられている。一方、今までの研究によれば、 β_2 刺激剤には抗原誘発後のLARや気道過敏性亢進を抑制する作用はないとされてきた^{12, 13}。しかし、これらの研究に用いられた β_2 刺激剤はいずれも短時間作用型であり、LARが出現する以前にその効力は消失していたかもしれない。もし、十分に作用時間の長い β_2 刺激剤が使われていたなら、抗原誘発後のLARと気道過敏性亢進の両者とも抑制された可能性も考えられる。また、近年、 β_2 刺激剤吸入を連用(いわゆるレギュラーユース)していると、気道過敏性が亢進して喘息のコントロールがむしろ悪くなるという報告がなされている¹⁴。こうした報告を受けて、“喘息の診断と管理のための国際委員会報告(1992年)”では¹⁵、短時間作用型 β_2 刺激剤の連用や過度な使用を制限している。一方、長時間作用型 β_2 刺激剤に関して、同報告は中等症以上の症例に使用することを勧告しているが、その臨床的有用性や理論的背景が確立している訳ではない。そこで、本研究において検討したLARモデルの一応用例として、最近開発された長時間作用型 β_2 刺激剤(formoterol)の効果を検討した。

対象と方法

動物と感作

対象としてハートレー系雄性モルモット（体重350-450g）を用いた。感作方法として、エアゾル化した卵白アルブミン（Ovalbumin：OA、生理食塩水で2%に希釈）の吸入（5分間）を1週間おきに2度行なった。吸入の間、動物は図1に示すボディボックス（Model P、Buxco社）内に留置した。エアゾルは超音波ネブライザー（Model 65、DeVilbiss社）を使って発生させた。2回目の感作の1週間後に抗原吸入誘発試験を行なった。この実験は、クレイトン大学医学部動物研究委員会の承認を得て行なわれた。

薬剤投与と抗原吸入誘発

抗原吸入誘発の30分前に、致死のアナフィラキシーショックを抑制するために、抗ヒスタミン剤であるpyrilamine maleate（10 mg / kg）を腹腔内投与した。抗原吸入誘発の15分前に、薬剤の吸入投与を行なった。短時間作用型 β_2 刺激剤としてisoproterenol（Iso：1 mg / ml、生食で希釈）、長時間作用型 β_2 刺激剤としてformoterol（Form：10 μ g / ml、生食で希釈）を用い、対照として生食を、それぞれ2分間吸入させた。モルモットをボックス内に留置して5分間、呼吸機能の基礎値を測定した後、1%OAあるいは生食5分間の吸入による誘発試験を行なった。

呼吸機能の測定

無麻酔下のモルモットの呼吸機能の測定は、以前に著者らが報告したボックス（図1）を用いた体プレチスモグラフィ法によった¹⁶。このボックス

は頸部で2つに分割され、2つのボックスはスプリングの留め具で連結されている。モルモット固定用のL字型プラスチック板に動物の頸部を挿入し、頸部の周囲をラテックス製ネックカラーで密閉した後、ボックス内に留置した。それぞれのボックスにはニューモタコグラフと差圧トランスデューサー (Model DP-103、Validyne社) が接続され、これらからのシグナルはアナライザーと増幅器 (Model 6およびModel LS-14、Buxco社) を通してパソコンに入力され、数値化される。特異的気道コンダクタンス (Specific airway conductance : SGaw) はPennockらの方法に従い¹⁷、以下の方式により算出された。

$$\tan \theta = W \times R \times C$$

この場合、 θ = 頭部と胸腹部のボックスの間の位相差、 $W = 2 \pi \times$ 呼吸数、 $R =$ 肺抵抗、 $C = V / (\text{Patm} - 47\text{mm Hg}) \times 1.36$ (ただし、 V は胸部ガス容量 = 機能的残気量 + 1 回換気量、 Patm は大気圧、 47mm Hg は水蒸気分圧、 1.36 は mm Hg を $\text{cm H}_2\text{O}$ に変換する係数)。従って、

$$\text{SGaw} = 1 / R \times V = W / (\text{Patm} - 47\text{mm Hg}) \times 1.36 \times \tan \theta$$

肺機能のパラメーター (頭部ボックス内圧、胸腹部ボックス内圧、1 回換気量、呼吸数と SGaw) は 5 秒間毎の平均値として表示され、5 分間モニターされた。定常状態にある SGaw の平均値を、その測定時点での代表値とした。SGaw は吸入前値に対するパーセンテージで表示した。モルモットは各測定時点で肺機能を測定した後、ボックスの外に出した。

なお、この測定方法の信頼性については、Pennockら¹⁷およびGerlachら¹⁸に

よって証明されている。

気道過敏性の測定

ヒスタミンに対する気道過敏性を吸入誘発前、24時間後、72時間後に行なった。用いたヒスタミン希釈液の濃度は6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の5種類である。動物をボックス内に留置し、ヒスタミン希釈液（最低濃度から開始）のエアゾルを1分間吸入させる。その後、直ちにエアゾルを吸引除去し、肺機能を3分間測定する。SGawが少なくとも50%減少するまで、ヒスタミン液の濃度を上げて吸入を繰り返す。SGawを50%低下させるヒスタミンの濃度（PC50）を用量反応曲線から求めた。

気管支肺胞洗浄（Bronchoalveolar lavage：BAL）

BALは吸入誘発前、30分後、6時間後、24時間後、72時間後に施行した。ペントバルビタール（nembutal：50 mg / kg）の腹腔内投与によって麻酔をかけた後、心臓からの脱血により死亡させた。気管を露出させ、18Gのカニューレチューブを挿入固定した後、一回量10mlのHBSS液（Hank's balanced salt solution）をゆっくりと注入し、手動的に回収する作業を5回繰り返した。得られたBAL液（通常回収率は85-90%である）はガーゼによって分泌液を除去した後、遠心分離操作（200 g、10分間、4°C）を行なった。さらに1回洗浄した後、最終的にはHBSS 1 mlに細胞を浮遊させた。総細胞数はTurk染色を用いて計測した。細胞分画に関しては、作成したサイトスピン標本をライトギムザ染色した後、少なくとも500個の細胞を観察し、その形態学的特徴からマクロファージ、好酸球、好中球、リンパ球に分類した。

BAL中好酸球の分離

BAL中好酸球およびマクロファージは不連続密度勾配法によって分離された。Percoll ($d=1.130$) と Histopaque ($d=1.077$) を用いて比重密度 1.096 と 1.081 の溶液を作製した。15ml のチューブにまず密度 1.096、次に 1.081 の溶液をそれぞれ 2ml ずつ静かに重層させ、その上に細胞浮遊液を重層させた後、遠心分離操作 (1600 g、20 分間、 22°C) を行なった。遠心分離後、1 つの細胞ペレットと 2 つの細胞浮遊帯が得られた。以下の定義に従って、3 つの分画を定めた。分画 1 : 比重 ≥ 1.096 、分画 2 : $1.096 >$ 比重 ≥ 1.081 、分画 3 : $1.081 >$ 比重、と定義した。それぞれの分画は回収され、洗浄後、最終的に $1 \times 10^6 / \text{ml}$ に調整された。分画 1 と 2 はほとんど好酸球 (純度 95% 以上) であり、分画 3 は主としてマクロファージ (純度 93% 以上、一部リンパ球と好中球が混じる) であった。トリパンブルー染色による細胞の生存率はどの分画においても 95% 以上であった。

スーパーオキシドの測定

好酸球、マクロファージの活性化の指標として、チトクローム還元法によるスーパーオキシド産生能について検討した¹⁹。分画 1 の好酸球は絶対数が少なく、測定に十分な細胞数が得られなかったため、分画 2 の好酸球と分画 3 のマクロファージを用いた。96 穴のプレートを用いて、各穴に分離した好酸球あるいはマクロファージの細胞浮遊液 (0.1 ml 、 $1 \times 10^5 / \text{穴}$) とチトクローム C ($100 \mu\text{M}$) を入れ、さらに刺激物質として、PAF (最終濃度: $1 \mu\text{M}$)、phorbol myristate acetate (PMA、最終濃度: 1 ng/ml) を加

えて最終反応溶液量を0.2 mlとし、37°Cで最高60分間培養した。この培養期間中、マイクロプレートリーダー (Model 3550、Bio-Rad社) を使って、550 nmの吸光度を測定した。スーパーオキシド産生能は細胞 5×10^5 個当たりの還元化されたチトクロームCの量によって表現した。この場合、換算係数として、 $21.1 \times 10^3 \text{ M cm}^{-1} \text{ L}^{-1}$ を用いた。なお、陰性対照としては、Superoxide dismutase (SOD、 $20 \mu\text{g} / \text{ml}$) を用いた。

用いた化学物質

Pyrilamine、OA、histamine dihydrochloride、L-isoproterenol、Percoll、Histopaque、horse-heart ferricytochrome C (TypeIII)、SOD、PMAはシグマ社から購入した。C16-PAFはピーチャム社から、nembutalはアボット社から、HBSSはギブコ社から購入した。Formoterolはチバガイギー社から入手した。

統計学的処理

すべての値は平均値±標準誤差 (SEM) で表示した。統計学的解析は analysis of variance (ANOVA) と Student's t test を用いて行なった。すなわち、F値で示されるANOVAによって統計学的有意差が推定される時、さらに個々の値の間の有意差を Student's t test を用いて検討した。p 値が0.05未満をもって、統計学的有意差があると推定した。

結果

LARと気道過敏性

SGawの測定は吸入誘発96時間後まで行なった。吸入誘発前のSGawの基礎値は、生食吸入群および抗原吸入群でそれぞれ 0.95 ± 0.19 、 $0.88 \pm 0.14 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であり、両群に差は見られなかった。なお、抗ヒスタミン剤であるpyrilamine maleate腹腔内投与前後において、SGawの有意な変動は認められなかった。図2に示すように抗原吸入直後にSGawは著明に減少（基礎値の $13.9 \pm 3.9\%$ ）した後、ゆっくりと回復し、4時間後に前値に戻った。その後、SGawは再び減少し、%SGawは6時間後には $52.7 \pm 7.7\%$ 、8時間後には $65.7 \pm 8.1\%$ （どちらも $p < 0.02$ ）であり、この減少は約2-4時間継続した。動物モデルにおけるLARの定義は必ずしも明確ではないが、この測定方法における測定誤差を考慮した上で、便宜的にLARを抗原吸入6-8時間後にSGawが25%以上低下したものと定義した場合、抗原吸入誘発群では全例にLARが認められた。それに比べて、生食吸入誘発群ではSGawの有意な変動は見られなかった。

ヒスタミンに対する気道過敏性は抗原吸入誘発24時間後に亢進し、72時間後に吸入前値に回復した（表1）。抗原吸入群における24時間後のPC50値（ $49 \pm 5.8 \mu\text{g/ml}$ ）は吸入前値、72時間後の値および生食吸入群の24時間値（それぞれ 74.8 ± 12.4 、 74 ± 11.8 、 $71.1 \pm 8.7 \mu\text{g/ml}$ ）と比べて、有意に低い値であった。なお、生食吸入群ではヒスタミンに対する気道過敏性に有意な変化は見られなかった。

抗原吸入後のBAL中への好酸球の増加とその活性化

抗原吸入誘発後、経時的にBALを施行した。図3に示すように、BALE総細胞数は6時間後 ($18.6 \pm 1.4 \times 10^6$) より著明に増加し、24時間後 ($28.9 \pm 3.8 \times 10^6$) にピークに達した後、72時間後 ($23.2 \pm 4.4 \times 10^6$) においても吸入前値に比べて増加していた。このBAL細胞のほとんどはマクロファージと好酸球であり、どちらも吸入24時間後に増加のピークを迎えた(図4)。マクロファージは 5.4 ± 0.7 から 15.4 ± 1.8 ($\times 10^6$) へ、好酸球は 1.4 ± 0.3 から 11.7 ± 2.9 ($\times 10^6$) へと著明な増加が見られた。その他の細胞ではリンパ球も吸入24時間後に増加のピークを迎え、 0.19 ± 0.04 から 0.49 ± 0.06 ($\times 10^6$) へと増加した。好中球は他の細胞と比べてより早期から増加し、吸入6時間後に増加のピークを迎えた (0.07 ± 0.03 から $1.7 \pm 0.3 \times 10^6$)。なお、生食吸入群ではBAL細胞の有意な増加は見られなかった。

抗原吸入誘発後に見られるBAL細胞の増加は主としてマクロファージと好酸球であるが、これらの細胞が実際に活性化しているかどうかをスーパーオキシド産生能で検討した。予備的実験にて抗原吸入誘発24時間後のBALから分離した細胞が最もスーパーオキシド産生能が高かったため、以下の実験は抗原吸入24時間後のBAL細胞を用いた。マクロファージ(分画3)と好酸球(分画2)のPMA (1 ng/ml)あるいはPAF ($1 \mu\text{M}$)刺激によるスーパーオキシド産生能の経時的变化を図5、6に示した。好酸球の場合、PMA、PAFいずれの刺激においても抗原吸入群では無感作群および生食吸入群に比べて、有意なスーパーオキシド産生能の亢進が見ら

れた(図5)。一方、マクロファージの場合、図6に示すように、PMA、PAFいずれの刺激の場合でも、スーパーオキシド産生能の点に関して抗原吸入群と生食吸入群の間に有意な差は見られなかった(ただし、抗原吸入群は無感作群よりはスーパーオキシド産生能が亢進していた)。すなわち、少なくともスーパーオキシド産生能の点に関して言えば、抗原吸入誘発によって活性化されたのは、主として好酸球であり、マクロファージではなかった。

FormoterolによるLARおよびBAL中好酸球活性化の抑制

(1) LARに及ぼす影響

β_2 刺激剤がLARおよび気道好酸球の活性化におよぼす影響を検討するために、抗原吸入誘発15分前にForm、Isoおよび対照として生食を吸入させた。これらの前処置を行なった各群の吸入誘発前のSGawの基礎値はそれぞれ、 0.72 ± 0.14 、 1.04 ± 0.10 、 $0.98 \pm 0.16 \text{ cm H}_2\text{O}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であり、この3群間に差は見られなかった。今回、対照群(生食前吸入群)において、LAR(25%以上のSGawの減少と定義した)は15例中12例に認められた。対照群と比較した場合、Form吸入群ではIARは著明に改善し、2時間後のSGawの低下およびLAR(6-10時間後まで)は完全に抑制された。一方、Iso吸入群ではIARおよび2時間後のSGawの低下は改善されたものの、LARを抑制することはできなかった(図7)。

(2) 気道過敏性に及ぼす影響

抗原吸入誘発後のヒスタミンに対する気道過敏性については、表2に

示した。今回実験に用いたモルモットは、以前のヒスタミン気道過敏性に使用したモルモット（表1）に比べて、全般的に気道過敏性が亢進していた。Form吸入群では、24時間後の気道過敏性は明らかに低下していた。Form吸入群の24時間後のPC50値（ $46.8 \pm 7.1 \mu\text{g/ml}$ ）は同群の吸入前値（ $29.8 \pm 1.8 \mu\text{g/ml}$ 、 $p < 0.05$ ）、対照群の24時間値（ $20.4 \pm 2.6 \mu\text{g/ml}$ 、 $p < 0.01$ ）およびIso吸入群の24時間値（ $24.7 \pm 2.3 \mu\text{g/ml}$ 、 $p < 0.02$ ）に比べて明らかに高い値であった。Iso吸入群では抗原吸入24時間後にPC50値は低下する傾向を示したが、統計学的に有意な低下ではなかった（ $p < 0.07$ ）。

（3）BAL中好酸球浸潤に及ぼす影響

前述したように、BAL総細胞数の増加は抗原吸入誘発24時間後にピークを迎えるため、 β_2 刺激剤の効果は24時間後のBALを用いて検討した。図8に示すように、Form吸入群ではBAL総細胞数の増加は完全に抑制されており、その値は吸入誘発前値とほぼ同等であった。しかし、Iso吸入群ではBAL総細胞数の増加は抑制されなかった。それぞれの細胞分画について見ると、図9に示すように、Form吸入群では抗原吸入誘発後のマクロファージ、好酸球、好中球の増加をほぼ完全に抑制していた。リンパ球に関しても同様に抑制する傾向を示したが、統計学的に有意ではなかった。なお、Iso吸入群では抗原吸入後の各細胞の増加を抑制することができなかった。

（4）BAL中好酸球の活性化におよぼす影響

抗原吸入誘発後のBAL中好酸球およびマクロファージのスーパーオキシド産生能が、 β_2 刺激剤の前吸入によって影響を受けるかどうか検討し

た。予備実験にて、好酸球の場合にスーパーオキシド産生能がピークに達するのは、刺激40分後であり、マクロファージの場合には刺激60分後であることが判明しているので（図5、6）、培養時間はそれぞれ40分、60分とした。BAL好酸球のスーパーオキシド産生能は、Form吸入群ではPMA、PAFいずれの刺激による場合でも明らかに抑制されたが、Iso吸入群では抑制効果が見られなかった（図10）。一方、BALマクロファージのスーパーオキシド産生能に関しては、Form吸入群、Iso吸入群いずれの群においても抑制効果は全く見られなかった。

考察

モルモットは先天的に気道過敏性をもち、喘息反応に関与する化学伝達物質がヒトと類似していることなどから、古くよりヒトの気管支喘息モデルとして用いられてきた²⁰。モルモットは感作方法によってLARを呈することが知られている。例えば、Iijimaらは回虫抗原によって⁶、HutsonらはOAの大量吸入によってモルモットにLARを出現させ得ることを報告している⁷。今回、我々はHutsonらの方法に準拠し、抗原吸入後の即時型アナフィラキシーショックを予防するために、抗ヒスタミン剤を前処置することによって大量のOA抗原を吸入させ、LARを高率に出現させることに成功した。抗原吸入6-8時間後にSGawが吸入前値の25%以上低下したものをLARと定義した場合、抗原吸入誘発した動物の内88%にLARが出現した（抗原吸入群10例中全例、生食前吸入後の抗原吸入群15例中12例）。今回の我々のモデルでは、抗原吸入6-8時間後にLARは見られたものの、10時間以降でのSGawの変化は見られなかった。一方、HutsonらのモデルではLARは抗原吸入13-24時間後に見られると報告されている⁷。このLARの出現時期の違いがなぜ生じるのか詳細は不明であるが、一部には抗原による感作と誘発方法の違いによる可能性が考えられる。我々のモデルにおける呼吸機能の変化は、ヒトに抗原吸入誘発試験を施行した際に見られる二相性喘息反応と類似しており、ヒトのLARを理解する上で、有用なモデルに成りうると考えられる。

今回、我々が用いた体プレチスモグラフィ法で測定した気道コンダクタ

ンスは、上気道と下気道のコンダクタンスの総和であり、厳密な意味では下気道における気道収縮反応のみを表現している訳ではない。Johnsらは体プレチスモグラフィ法で見られたLARの内、気管挿管による直接的肺抵抗測定法で明らかな気道収縮が確認されたのは36%に過ぎないと報告している²¹。しかし、我々の測定法によるSGawの値は、胸腔内にカテーテルを留置して直接測定した値と比べてみても、十分に正確で再現性があることが証明されている¹⁸。また、抗原吸入誘発後のBALの分析によって、LARの出現する時期に一致して、BAL中への炎症性細胞浸潤が見られたことは、我々のモデルにおいて明らかに気管支、肺（すなわち下気道）のレベルでの関与が生じていることを示すものである。従って、我々の方法で測定したSGaw値には下気道だけでなく、上気道での変化も含まれていることを考慮しなければいけないものの、LARモデルとしての有用性までも否定するものではないと考えられる。

我々のモデルでは抗原吸入誘発後にLARと非特異的気道過敏性の亢進が見られた。また、これらの現象はBAL中への炎症性細胞浸潤を伴っていた。この炎症細胞浸潤は主として好酸球とマクロファージであり、抗原吸入6時間後より増加し、24時間でピークを迎え、72時間後においても吸入前値より増加した状態であった。予備実験において検討した際、抗原吸入24時間後のモルモット気管支の病理所見の特徴の一つは、粘膜上皮および粘膜固有層における著明な好酸球の浸潤であった。また、Dunnらは抗原吸入後のモルモットBAL中への好酸球増加は気管支壁への好酸球浸潤と関連す

ると報告している²²。従って、BAL中への好酸球浸潤はかなりの程度、気道への好酸球浸潤を反映していると考えても差しつかえないと言えよう。抗原吸入後の気道炎症にどの細胞が関与するかは、使う動物の種、抗原、感作方法などによって違ってくると考えられている。de Monchyらはヒトにハウスダスト-ダニを吸入させ、LARの時期に施行したBALで好酸球が著増していたと報告した²³。Metzgerらはヒトに抗原（主としてアルテルナリア）を吸入させ、48時間後にBALを行なったところ、好酸球、好中球とリンパ球の増加が見られたと報告した²⁴。Murphyらは薬剤で好中球を減少させることによって、ウサギにおけるLARと気道過敏性亢進が抑制されることから、このモデルにおいては好中球が関与しているのではないかと推測している²⁵。OAで感作したモルモットにおいては、前述したHutsonら⁷やDunnら²²が報告しているように、気道の炎症には特に好酸球が関与している可能性が高く、今回の我々の報告とも一致する。

気管支喘息患者の末梢血中には、低比重好酸球が増加していることが知られている²⁶。この低比重好酸球は抗原吸入誘発によってLARが見られた時や²⁷、*in vitro*の実験で各種の刺激を受けた時などに出現する²⁸。低比重好酸球は正比重好酸球と比べて、細胞障害活性やスーパーオキシド、ロイコトリエン産生能が高く、いわば活性化された細胞である²⁹⁻³¹。今回の実験では、抗原吸入後のBAL中に低比重好酸球が増加したかどうかは不明であるが、抗原吸入後に気道好酸球のスーパーオキシド産生能が亢進することを証明することができた。同様に抗原吸入誘発後に増加したマクロファ

ージには、スーパーオキシド産生能亢進は見られず、この点に関して言えば、好酸球のみが特異的に活性化されたと言えよう。抗原暴露による好酸球の活性化、被刺激性亢進が抗原吸入後の気道過敏性亢進の発症機序に関与している可能性が考えられる。

抗原吸入誘発後のLARと気道過敏性の亢進は、Disodium cromoglycate (DS CG) やステロイドによって抑制されるが、短時間作用型 β_2 刺激剤では抑制されないことが知られている^{12, 13}。長い間、 β_2 刺激剤は単に気管支喘息の症状を緩和するだけで、喘息の背景にある気道の炎症には影響を与えないと信じられてきた。確かに短時間作用型 β_2 刺激剤であるisoproterenolは、LARおよび抗原誘発気道過敏性亢進を抑制することはできなかった。しかし、本研究で用いた長時間作用型 β_2 刺激剤であるformoterolは、LARと抗原吸入24時間後の気道過敏性亢進を抑制し、さらに吸入6時間目以降に始まる気道の炎症も完全に抑制した。すなわち、formoterolは気道への好酸球を始めとする炎症細胞浸潤だけでなく、スーパーオキシド産生能の亢進に見られるような気道好酸球の活性化をも抑制したのである。

Formoterolは近年開発された β_2 選択性の極めて高い、長時間作用型の薬剤である。Formoterolの吸入はsalbutamolに比べて5-15倍も効力があり、その作用時間は少なくとも8-12時間続くとされる³²⁻³⁴。また、formoterolは吸入12時間後においてもメサコリンに対する気道過敏性を低下させ、長期の吸入によって気道過敏性が改善されることが報告されている^{35, 36}。最近、formoterolと同様に長時間作用型 β_2 刺激剤であるsalmeterolの前吸入によっ

て、抗原吸入誘発後のLARと気道過敏性亢進がヒトでも抑制されることが報告された³⁷。これらの報告と本研究での結果を踏まえて考察する時、LARや気道過敏性亢進を抑制する効果が従来の短時間作用型 β_2 刺激剤にはなく、最近開発されたformoterolやsalmeterolといった長時間作用型 β_2 刺激剤だけに存在するという結果は大変興味深い。

そこで次に問題となるのは、この長時間作用型 β_2 刺激剤の抑制効果は単に作用時間が長いことに由来するのか、また、この効果はすべて β_2 受容体を介する反応であるのか、といった点である。もし、抗原暴露後、数時間の間、肥満細胞の活性化が続き、放出された化学伝達物質によって継続的に気道への炎症細胞浸潤が生じている³⁸と仮定すれば、formoterolが長時間にわたって化学伝達物質放出を抑制することによって、LARおよび気道炎症を抑制している可能性が考えられる。実際、抗原の吸入前および後に、短時間作用型 β_2 刺激剤の吸入をその最大効果を維持できる頻度（すなわち2-3時間毎）で行なった場合、LARが幾分抑制されるという報告がある³⁹。しかし、この場合でも抗原吸入後のLARが完全に抑制された訳ではない。また、formoterolの作用時間（8-12時間）を考えた時、抗原吸入24時間後の気道過敏性の亢進や気道好酸球の活性化、24-72時間後の気道への炎症細胞浸潤の抑制が全てformoterolの長い作用時間によるものだと考えるのには無理がある。従って、formoterolには、その作用時間の長い気管支拡張作用以外に、気道の炎症に直接作用する、いわば抗炎症作用（あるいは抗アレルギー作用）が備わっている可能性が考えられる。例えば、salmeterolは β 受

容体遮断剤の存在下でも、活性化した気道マクロファージからの化学伝達物質（トロンボキサン）放出を抑制するとの報告がある⁴⁰。我々の研究でも、末梢血好酸球の活性化（機能として遊走活性とEosinophil cationic protein遊離能を検討した）はformoterolによって抑制されるが、salbutamolでは抑制されないこと、また、この抑制効果は β 受容体遮断剤の存在下でも認められたことが明らかになっている⁴¹。これらの報告は、長時間作用型 β 2刺激剤が、 β 2受容体を介する反応以外の経路によって、気道炎症を制御している可能性を示唆するものである。

本研究においては β 受容体遮断剤を使っていないため、formoterolの抑制効果が β 2受容体以外の反応経路によるものかどうかは不明である。しかし、formoterolは抗原吸入後に生じる気道炎症を制御し、中でも好酸球の活性化を抑制することが明らかになった。気道における好酸球活性化の制御を通じて、抗原吸入後のLARや気道過敏性亢進が抑制される機序の一端が解明されたと言えよう。

まとめ

(1) 今回、我々はモルモットに大量のOAを反復吸入させることによって、遅発型喘息反応(LAR)を高率に生じる喘息モデルを確立した。このモデルには、抗原吸入後の非特異的気道過敏性亢進と気道への炎症細胞浸潤が認められた。中でも、好酸球の浸潤とその活性化(スーパーオキシド産生能亢進)が特徴的であったことから、LARと気道過敏性亢進の発症機序に好酸球が深く関与している可能性が示唆される。

(2) 長時間作用型 β_2 刺激剤であるformoterolは、この喘息モデルにおけるLAR、非特異的気道過敏性亢進および気道への炎症細胞浸潤を抑制した。さらに、formoterolは気道好酸球の活性化(スーパーオキシド産生能亢進)も抑制した。一方、短時間作用型 β_2 刺激剤であるisoproterenolは全く抑制効果を示さなかった。長時間作用型 β_2 刺激剤は、従来の β_2 刺激剤の持つ気管支拡張作用以外に、気管支喘息の背景にある好酸球を中心とした気道炎症に対する抗炎症作用を持つ可能性が示唆された。

なお、本論文の内容は以下の雑誌において発表されている。

- (1) J Allergy Clin Immunol 1992; 89: 858-866
- (2) J Asthma 1995; 32: 37-45
- (3) Am J Respir Cell Mol Biol 1993; 8: 509-517

文献

1. O'Byrne PM, Dolovich J, Hargreave FE. State of art: late asthmatic responses. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:740-51.
2. Cockcroft DW, Ruffin RE, Dolovich J, Hargreave FE. Allergen-induced increase in nonallergic bronchial reactivity. *Clin Allergy* 1977;7: 503-13.
3. Cartier A, Thomson NC, Frith PA, Roberts R, Hargreave FE. Allergen-induced increase in bronchial responsiveness to histamine: relationship to the late asthmatic response and change in airway caliber. *J Allergy Clin Immunol* 1982;70:170-7.
4. Shampain MP, Behrens BL, Larsen GL, Henson PM. An animal model of late pulmonary responses to *Alternaria* challenge. *Am Rev Respir Dis* 1982;126: 493-8.
5. Abraham WM, Delehunt JC, Yerger L, Marchette B. Characterization of a late-phase pulmonary response after antigen challenge in allergic sheep. *Am Rev Respir Dis* 1983;128:839-44.
6. Iijima H, Ishii M, Yamauchi K, et al. Bronchoalveolar lavage and histologic characterization of late asthmatic response in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:922-9.
7. Hutson PA, Church MK, Clay TP, Miller P, Holgate ST. Early and late-phase bronchoconstriction after allergen challenge of nonanesthetized guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:548-57.

8. Tamura N, Agrawal DK, Townley RG. Leukotriene C4 production from eosinophils in vitro: Role of eosinophil chemotactic factors on eosinophil activation. *J Immunol* 1988;141:4291-7.
9. Lee TC, Lenihan DJ, Malone B, Roddy LL, Wasserman SI. Increased biosynthesis of platelet-activating factor in activated human eosinophils. *J Biol Chem* 1984;259:5526-30.
10. Gleich GL. The eosinophil and bronchial asthma : Current understanding. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85:422-36.
11. Church MK, Hiroi J. Inhibition of IgE-dependent histamine release from human dispersed lung mast cells by anti-allergic drugs and salbutamol. *Br J Pharmacol* 1987;90:421-9.
12. Cockcroft DW, Murdock KY. Comparative effects of inhaled salbutamol, sodium cromoglycate, and beclomethasone dipropionate on allergen-induced early asthmatic responses, late asthmatic responses, and increased bronchial responsiveness to histamine. *J Allergy Clin Immunol* 1987;79:734-40.
13. Hutson PA, Holgate ST, Church MK. The effect of cromolyn sodium and albuterol on early and late-phase bronchoconstriction and airway leukocyte infiltration after allergen challenge of nonanesthetized guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 1988;138:1157-63.
14. Sears MR, Taylor DR, Print CG, et al. Regular inhaled beta-agonist treatment in bronchial asthma . *Lancet* 1990;336:1391-6.

15. International consensus report on diagnosis and management of asthma. Publication No. 92-3091, June 1992.
16. Sugiyama H, Gang W, Bergren VA, et al. Attenuation of antigen-induced bronchoconstriction in guinea pigs by a new xanthine derivative (HWA448). *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991;96:206-10.
17. Pennock BE, Cox CP, Rogers RM, Cain WA, Wells JH. A noninvasive technique for measurement of changes in specific airway resistance. *J Appl Physiol* 1979;46:399-406.
18. Gerlach RF, Medinsky MA, Hobbs CH, et al. Effects of four-week repeated inhalation exposure to unconjugated azodicarbonamide on specific and non-specific airway sensitivity of the guinea pigs. *J Appl Toxicol* 1989;9:145-53.
19. Sedgwick JB, Vrtis RF, Gourley MF, Busse WW. Stimulus-dependent differences in superoxide anion generation by normal human eosinophils and neutrophils. *J Allergy Clin Immunol* 1988;81:876-83.
20. Kallos P, Kallos L. Experimental asthma in guinea pigs revisited. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1984;73:77-85.
21. Johns K, Sorkness R, Graziano F, Castleman W, Lemanske RF. Contribution of upper airways to antigen-induced late airway obstruction responses in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:138-42.
22. Dunn CJ, Elliot GA, Oostveen JA, Richards IM. Development of a prolonged eosinophil-rich inflammatory leukocytes infiltration in the guinea-pigs

asthmatic response to ovalbumin inhalation. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:541-7.

23. de Monchy JGR, Kauffman HF, Venge P, et al. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis* 1985;131:373-6.

24. Metzger WJ, Richerson HB, Worden K, Monick M, Hunninghake GW. Bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic patients following allergen bronchoprovocation. *Chest* 1986;89:477-83.

25. Murphy KR, Wilson MC, Irvin CG, et al. The requirement for polymorphonuclear leukocytes in the late asthmatic response and heightened airway reactivity in an animal model. *Am Rev Respir Dis* 1986;134:62-8.

26. Fukuda T, Dunnette SL, Reed CE, Ackerman SJ, Peters MS, Gleich GL. Increased numbers of hypodense eosinophils in the blood of patients with bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis* 1985;132:981-5.

27. Frick WE, Sedgwick JB, Busse WW. The appearance of hypodense eosinophils in antigen-dependent late phase asthma. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:1401-6.

28. Klopogge E, de Leeuw AJ, de Monchy JGR, Kauffman HF. Hypodense eosinophilic granulocytes in normal individuals and patients with asthma: Generation of hypodense cell populations in vitro. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:393-400.

29. Prin L, Capron M, Tonnel AB, Bletry O, Capron A. Heterogeneity of

human peripheral blood eosinophils: Variability in cell density and cytotoxic ability in relation to the level and the origin of hypereosinophilia. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1983;72:336-46.

30. Sedgwick JB, Geiger KM, Busse WW. Superoxide generation by hypodense eosinophils from patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:120-5.

31. Kauffman HF, Van der Belt B, de Monchy JGR, Boelens H, Koeter GH, de Vries K. Leukotriene C4 production by normal-density and low-density eosinophils of atopic individuals and other patients with eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 1987;79:611-9.

32. Lofdahl CG, Svedmyr N. Formoterol fumarate, a new β 2-adrenoceptor agonist. *Allergy* 1989;44:264-71.

33. Graff-Lonnevig V, Browaldh L. Twelve hours' bronchodilating effect of inhaled formoterol in children with asthma: a double-blind cross-over study versus salbutamol. *Clin Exp Allergy* 1990;20:429-32.

34. Maesen FPV, Smeets JJ, Gubblemans HLL, Zweers PGMA. Bronchodilator effect of inhaled formoterol vs salbutamol over 12 hours. *Chest* 1990;97:590-4.

35. Becker AB, Simons FER, McMillan JL, Faridy T. Formoterol, a new long-acting selective β 2-adrenergic receptor agonist: double-blind comparison with salbutamol and placebo in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol*

1989;84:891-5.

36. Von Berg A, Berdel D. Efficacy of formoterol-metered aerosol in children. *Lung* 1990;168(S):90-8.

37. Twentyman OP, Finnerty JP, Harris A, Palmer J, Holgate ST. Protection against allergen-induced asthma by salmeterol. *Lancet* 1990;336:1338-42.

38. Durham SR, Lee TH, Cromwell O, et al. Immunologic studies in allergen-induced late-asthmatic reactions. *J Allergy Clin Immunol* 1984;74:49-60.

39. Van Bever HP, Desager KN, Stevens WJ. The effect of inhaled fenoterol, administered during the late asthmatic reaction to house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*). *J Allergy Clin Immunol* 1990;85:700-3.

40. Baker AJ, Fuller RW. Anti-inflammatory effect of salmeterol on human alveolar macrophages (Abstract). *Am Rev Respir Dis* 1990;141:394.

41. Eda R, Sugiyama H, Hopp RJ, Okada C, Bewtra AK, Townley RG. Inhibitory effects of formoterol on platelet-activating factor induced eosinophil chemotaxis and degranulation. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;102:391-8.

表1：抗原吸入誘発後のヒスタミンに対する気道過敏性の変化

	生食吸入群 (n = 8)	抗原吸入群 (n = 8)
吸入前	76.5±12.7	74.8±12.4
24時間後	71.1±8.7	49.0±5.8*
72時間後	73.4±10.2	74.0±11.8

表中の値は、SGawを50%低下させるのに必要なヒスタミンの濃度 (PC50 : $\mu\text{g/ml}$) で表示してある。*は抗原吸入群の吸入前値、72時間値および生食吸入群の24時間値と比べて、 $p < 0.05$ で統計学的に有意な差を認める。

表2：抗原吸入後の気道過敏性亢進に対する β_2 刺激剤の影響

	生食前吸入群	Isoproterenol前吸入群	Formoterol前吸入群
吸入前	26.2±2.6	28.4±2.5	29.8±1.8
24時間後	20.4±2.6*	24.7±2.3	# 46.8±7.1*
72時間後	27.3±3.9	27.9±3.1	37.9±5.3

各群とも $n = 8$ 、表中の値はPC50で表示してある。*は同じ群の吸入前値と比べて、 $p < 0.05$ で有意な差を認める。#は生食前吸入群24時間値と比べて、 $p < 0.01$ で、Isoproterenol前吸入群24時間値と比べて、 $p < 0.02$ で統計学的に有意な差を認める。

図1：測定に用いた体プレチスモグラフ装置

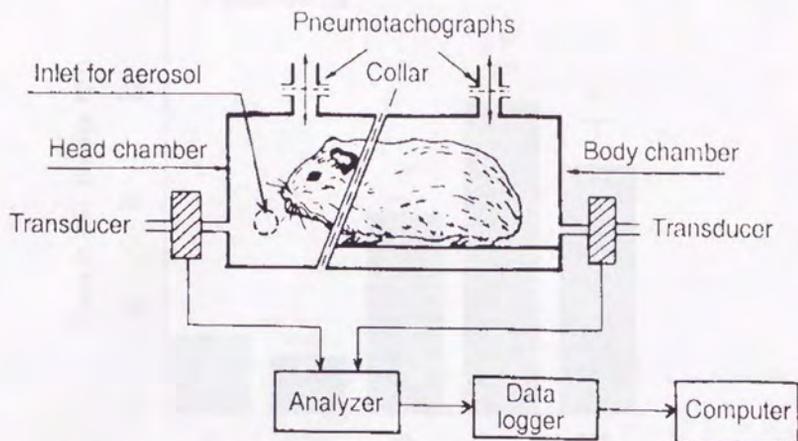


図2：抗原吸入後のSGawの経時的变化

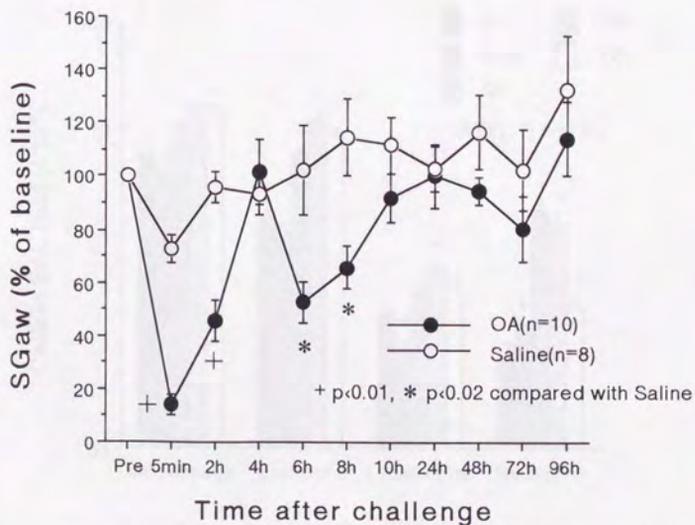


図3：抗原吸入後のBAL総細胞数の経時的变化

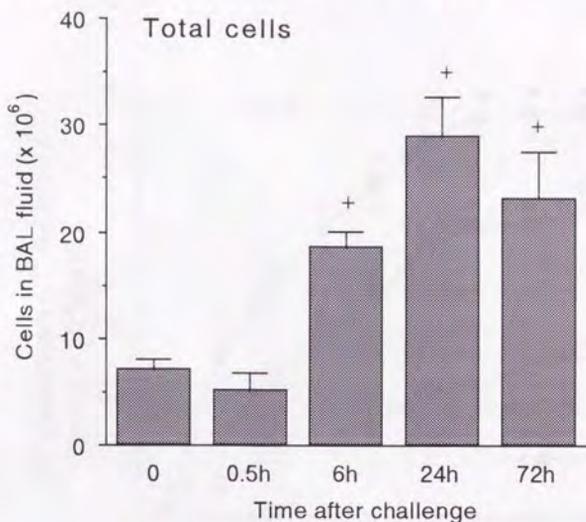
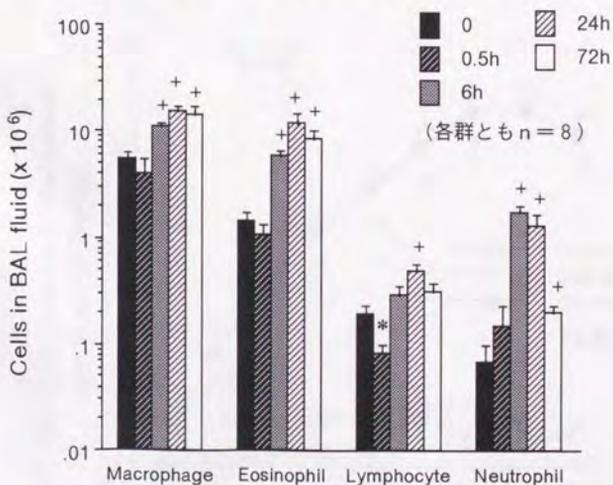
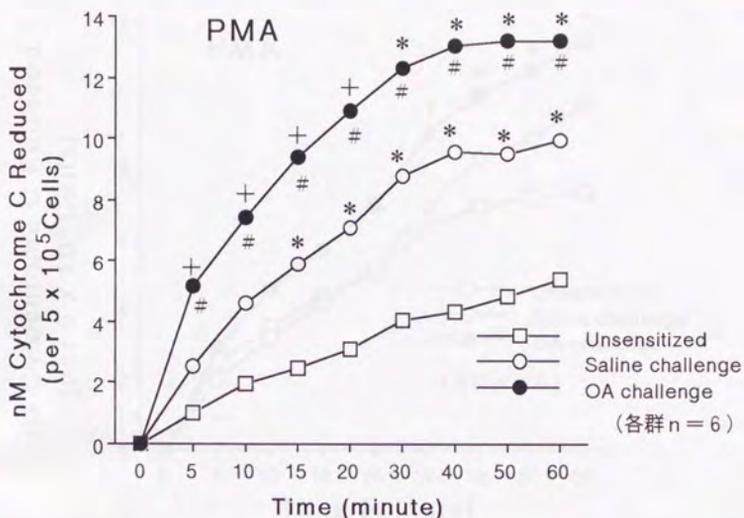


図4：抗原吸入後のBAL中細胞成分の経時的变化



+ $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with Baseline (0).

図5：BAL好酸球のスーパーオキシド産生



+ $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with Unsensitized
 ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ compared with Saline challenge

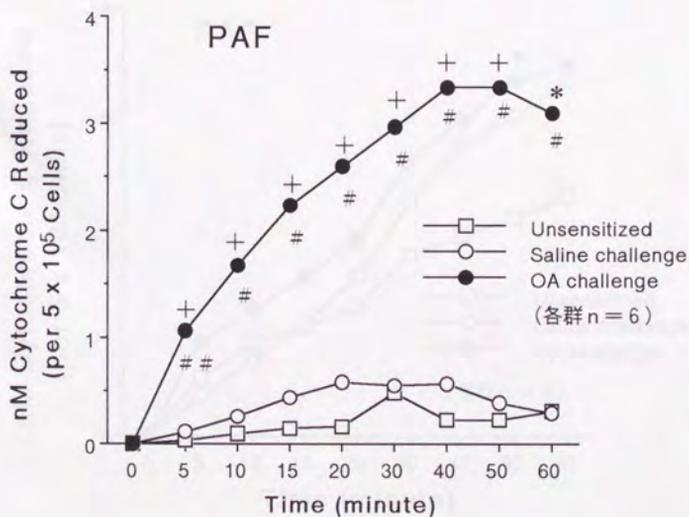
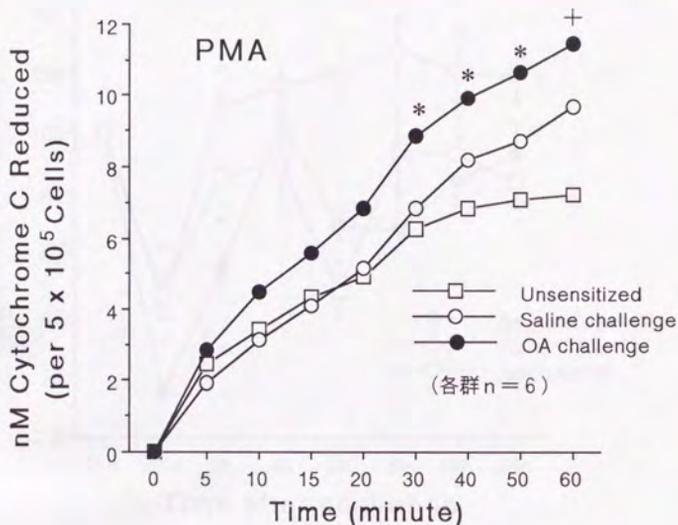


図6：BALマクロファージのスーパーオキシド産生



+ p<0.01, * p<0.05 compared with Unsensitized

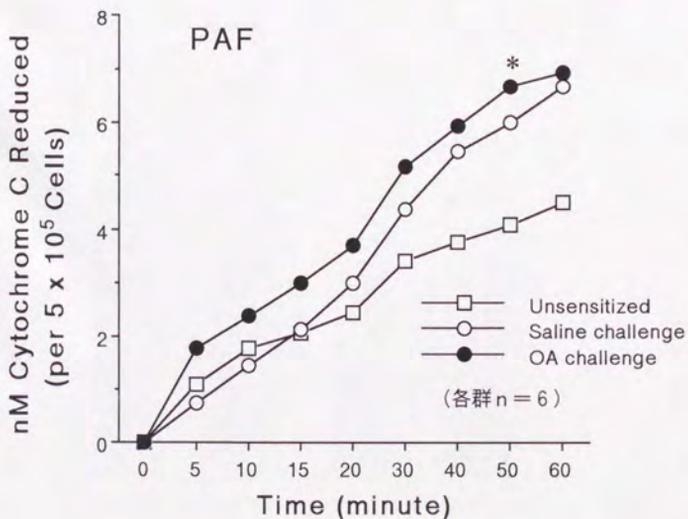
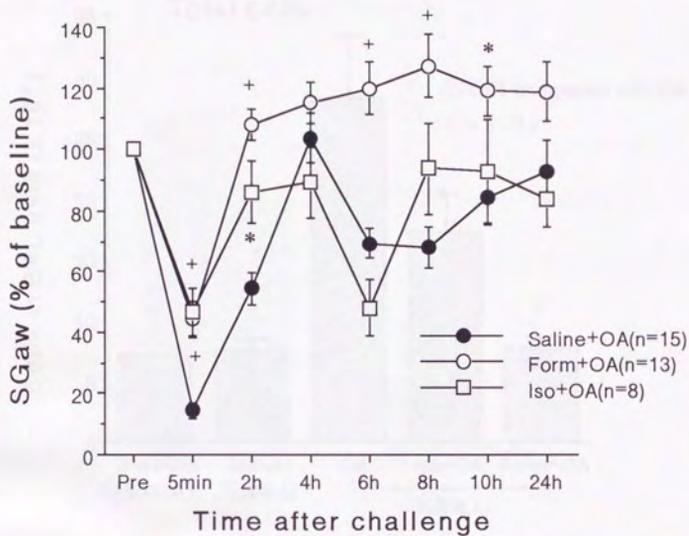


図7：抗原吸入誘発後のLARに及ぼす β 2刺激剤の影響



+ $p < 0.01$, * $p < 0.02$ compared with Saline+OA

図 8 : 抗原吸入24時間後のBAL総細胞数の比較

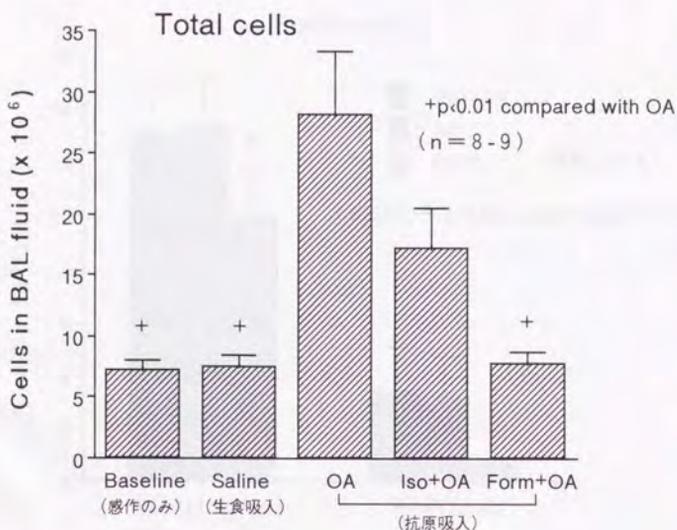


図 9 : 抗原吸入24時間後のBAL細胞成分の比較

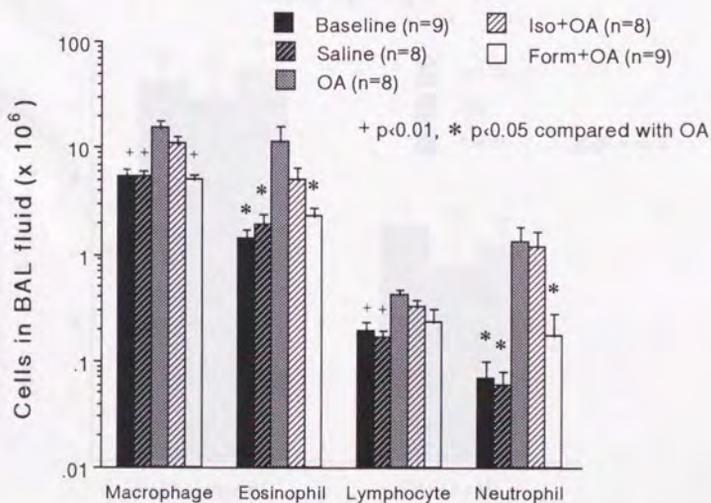
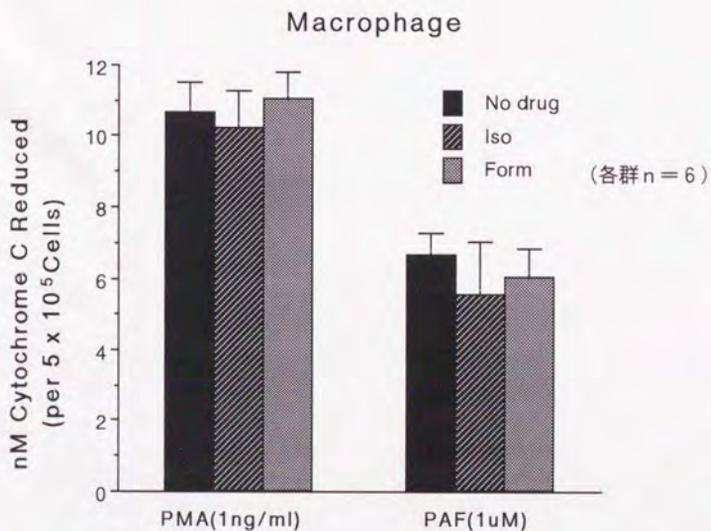
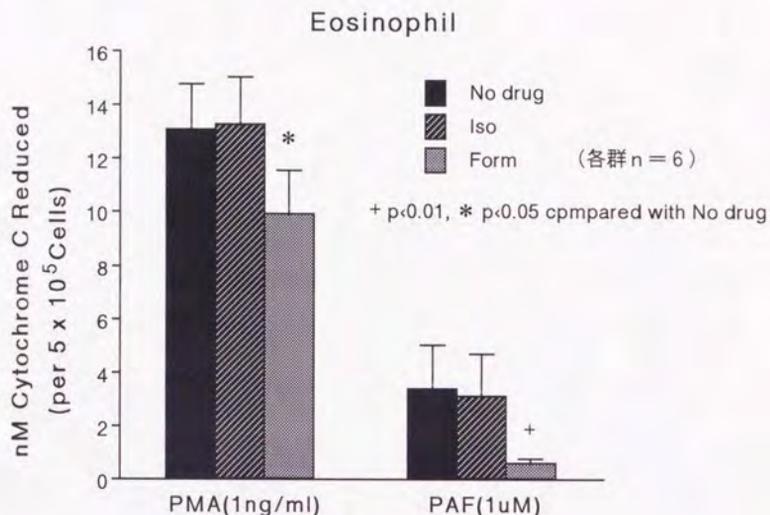
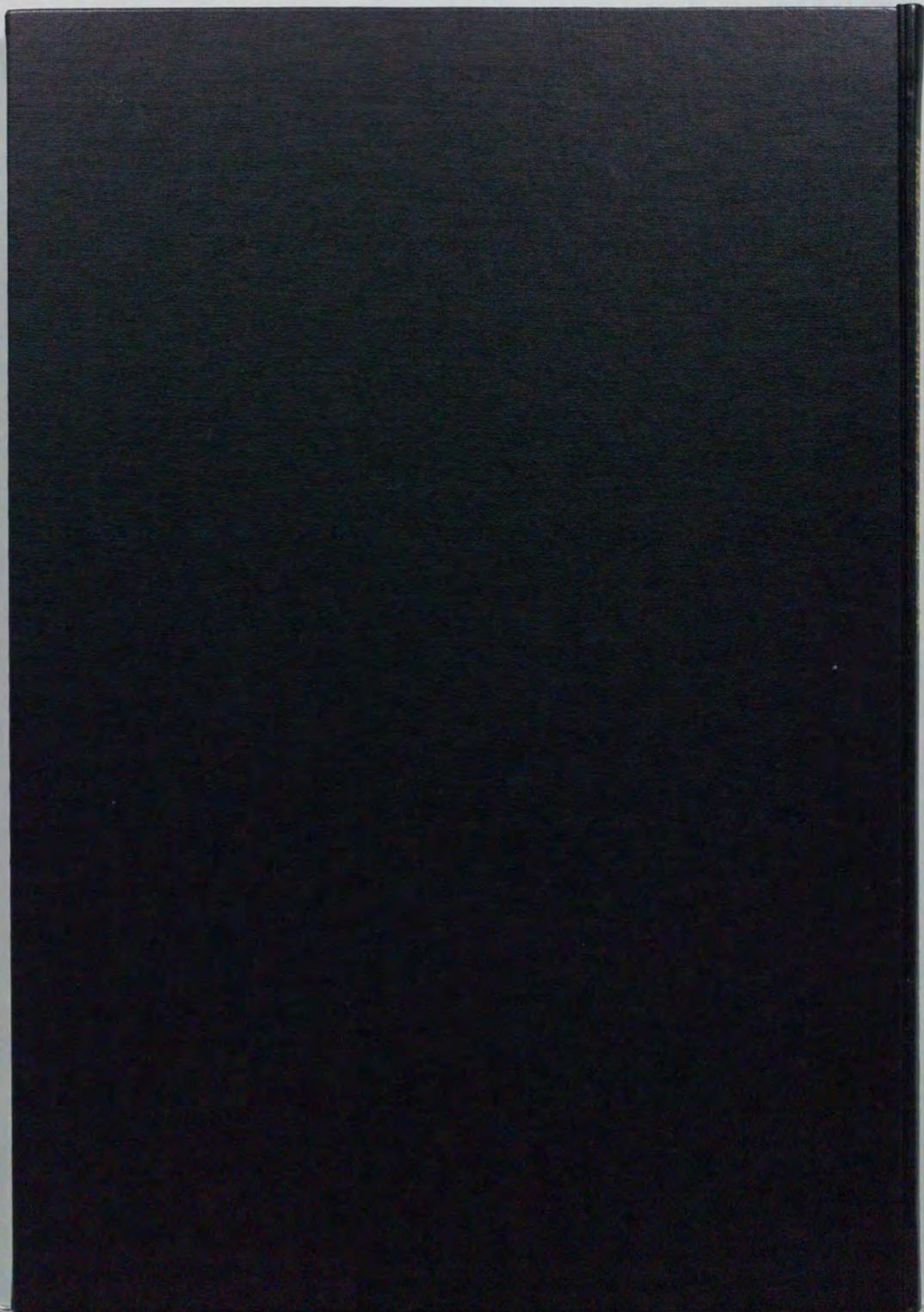
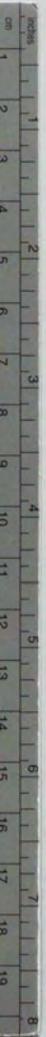


図 10 : BAL好酸球とマクロファージのスーパーオキシド産生に及ぼす β 2刺激剤の影響







Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black
[Blue patch]	[Cyan patch]	[Green patch]	[Yellow patch]	[Red patch]	[Magenta patch]	[White patch]	[3/Color patch]	[Black patch]

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

