

# 実験的アレルギー性鼻炎病態モデルラット に対する Baicalein 鼻吸入の基礎的検討

真正会病院・アレルギー科  
滋賀医科大学・麻酔学教室

西澤芳男

## 緒言

和漢薬の一種である黄芩の主成分 Baical-  
ein 6 phosphate trisodium (Ba-P-Na<sub>3</sub>)はラ  
ット腹腔由来 mast cells の Compound 48/80  
で刺激する系において Compound 48/80 で  
mast cells を刺激する以前に添加した場合脱顆  
粒現象、即ち chemical mediator(s) の遊離を  
抑制することより chemical mediator(s) の遊  
離抑制に予防的な効果を有することが示唆され  
た<sup>1)</sup>。Ba-P-Na<sub>3</sub>の有する本作用はラット好塩  
基球性白血病細胞(未発表)、感作ラット腹腔  
mast cells の感作抗原刺激(未発表)、allergic  
rhinitis 患者鼻汁由来 metachromatic cells の  
感作抗原刺激による脱顆粒現象を in vitro 生染  
色法で抑制すること<sup>2)</sup>、allergic rhinitis experi-  
mental disease model rats の allergic rhini-  
tis 諸症状を感作抗原吸入前に尾静脈内投与し  
た場合 dose dependency に種々 allergic rhini-  
tis 症状を抑制することを明らかにした<sup>3)</sup>。

一方、臨床的に Ba-P-Na<sub>3</sub> を使用する場合  
吸入療法を用いることは有用な allergic rhinitis  
の一予防的手段として有用であると考えられる。  
そこで、今回、前報同様の方法で allergic rhini-  
tis experimental disease model rats を作製  
し<sup>3)</sup>、同ラットに抗原抽出液を吸入させる前20  
分より20分後迄の種々時間に Ba-P-Na<sub>3</sub> を種  
種濃度吸入させ Ba-P-Na<sub>3</sub> の allergic rhini-  
tis 予防効果に関し検討を加えたのでこれを報  
告する。

## 方法

1) 動物：Wister 雄系ラット(静岡動物)(体

重 200～250g)を一群あたり10匹づつ用いた。

2) 抗原抽出法：前報同様、日本杉花粉抗原  
(PCJ)、自家塵抽出抗原(HD)、豚回虫抗原  
(As)の精製はそれぞれ安枝ら<sup>4)</sup>、西澤<sup>3)</sup>、Kishi-  
moto と Nishizawa ら<sup>5)</sup>の方法によった。

3) 感作ラットの作製：Tada, Okumura の  
方法<sup>6)</sup>により PCJ・As、もしくは HD・As。  
対照として生理食塩水を用いて免疫し48時間後  
PCA titer で 1：1024 となったラットを用い  
て能動感作下に実験を行なった。

4) 実験手技：感作 allergic rhinitis experi-  
mental model rats に感作抗原を吸入させ all-  
ergic rhinitis 症状を作製する系は前報同様行  
なった。同ラットを16時間水分のみを自由に与  
え絶食させ pentbarbital 30 mg/kg を腹腔内麻  
酔し、背位で固定、頸部を正中切開、呼吸能維  
持のため気管を切開 Cannule を挿入、食道を結  
紮し、気管切開部より鼻腔内に polyethylene  
tube を挿入 perfusion tube を用し 37℃ の生理  
食塩水を 0.25 ml/分の流速で灌流、口腔内に灌  
流液流出防止のため glycerinatlol cotton を詰  
め、生理食塩水をあらかじめ40分間灌流、鼻腔  
内に挿入した tube より鼻汁を採取、4% brilli-  
ant blue 0.05 ml/kg を尾静脈より注入、同様  
20分間灌流採取後口腔部分を plastic 製 mask  
で完全に覆い、同 mask を介して PCJ もしく  
は HD 抗原(1 μg～1 mg of protein)を吸入、対  
照として生理食塩水を10分間吸入させ、抗原吸  
入開始後5分より20分前から20分後まで Ba -

P-Na<sub>3</sub> を鼻汁中 0.1 ~ 100 mg/ml となるよう に吸入させた<sup>3)</sup>。(実験手技を Fig 1 にしめす)

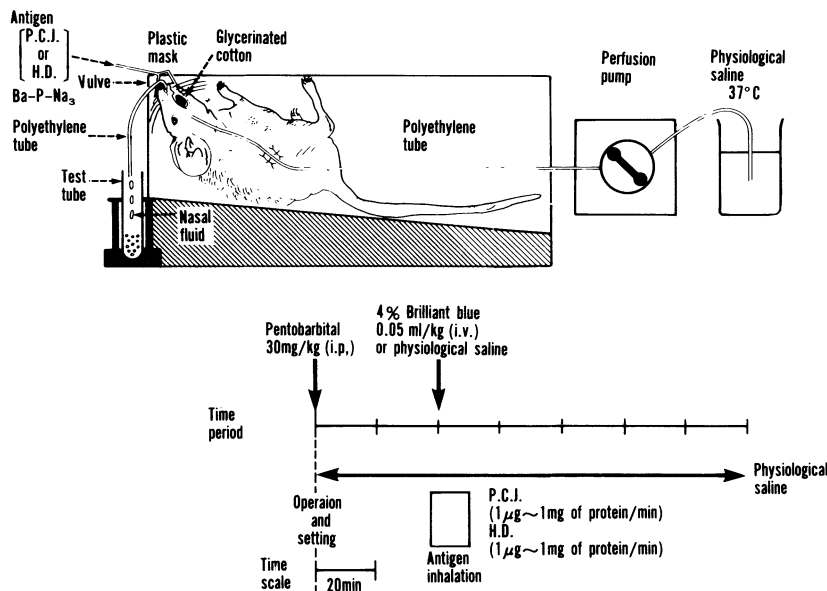


Fig 1 The schema of the experimental protocol

5) Ba-P-Na<sub>3</sub> の分離精製法：黄芩 (Lot. No : 90090400) (津村順天堂：東京)より Ba-P-Na<sub>3</sub> を前報同様の方法で分離精製した<sup>2)</sup>。

#### 6) allergic rhinitis の症状検討

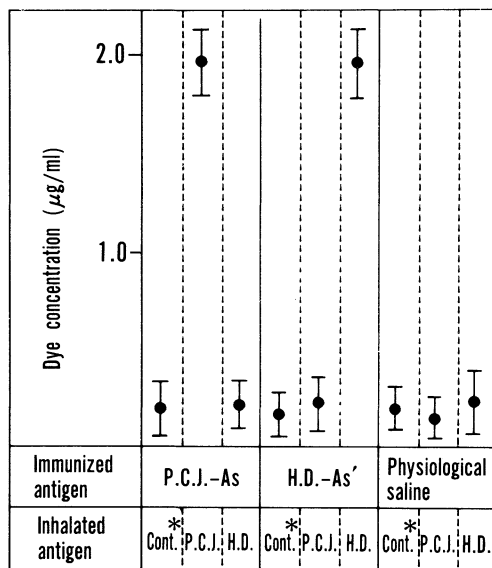
前述手技で述べた如く 4% brilliant blue を尾静脈より注射後、鼻汁漏出液中に出現する色素濃度を 1980 g, 10分間遠心後上清中の色素濃度を 620nm の波長で吸光測定し鼻汁漏出量をもとめた<sup>3)</sup>。また、各分画中の metachromatic cells の脱顆粒率を光学顕微鏡および電子顕微鏡、走査電子顕微鏡で観察した<sup>3)</sup>。さらに、何ら抗原 Ba-P-Na<sub>3</sub> を吸入させずえた鼻汁中 metachromatic cells を truidin blue で生染色し PCJ を添加させ脱顆粒細胞率を光学顕微鏡で観察する系に、PCJ 添加前 20分より 20分後迄 Ba-P-Na<sub>3</sub> を 0.1 ~ 100 mg/ml 添加し metachromatic cells の脱顆粒率が Ba-P-Na<sub>3</sub> の添加でいかに抑制されるかに関して検討を加えた<sup>7)</sup>。尚抗原中蛋白量は Lowry 法により測定した<sup>8)</sup>。

## 結果

1) allergic rhinitis experimental disease model rats の抗原特異性

PCJ-As で免疫した rats に PCJ を吸入させた場合、鼻汁中色素漏出量は有意に増加傾向を示したが、非感作抗原である HD を吸入させた場合、生理食塩水を吸入させた対照と同じく色素漏出量は殆ど認められなかった。逆に HD-As で免疫した rats に HD を吸入させた場合、鼻汁中色素漏出量は著しく増加を示めしたが、非感作抗原である PCJ を吸入させた場合、生理食塩水を吸入させた場合と同様、色素漏出量は殆ど認められなかった。これらに対して生理食塩水で免疫した場合には何ら有意の色素漏出量の変化は認められなかった。以上の結果より、本 allergic rhinitis experimental disease animal model rats は感作抗原特異的に同一抗原吸入より allergic rhinitis 症状を発症するラットであることが示唆された。(Fig 2)

2) 色素漏出量よりみた Ba-P-Na<sub>3</sub> の効果



\* Cont : Control : Physiological saline

Fig 2 The typical allergic rhinitis finding (dye concentration in nasal fluid) from the experimental disease model rats with allergic rhinitis inhaled with sensitized allergen. The data showed that these allergic rhinitis symptoms were not detectable in these rats inhaled with non sensitized allergen.

Allergen : PCJ and HD (50 µ/ml)

The data was shown by the mean value ± S.D.

The detailed method was described in the text.

吸入PCJ抗原量を増加させた場合PCJ濃度依存的に鼻汁中色素漏出量は増加したが、非感作抗原であるHDを吸入させた場合、鼻汁中色素漏出量は何ら有意の増加を示さなかった。一方、鼻汁中10 mg/mlとなるようBa-P-Na<sub>3</sub>を吸入させると色素漏出量の有意の抑制が認められた。さらに、Ba-P-Na<sub>3</sub>によるPCJ吸入における色素漏出量は吸入鼻汁中Ba-P-Na<sub>3</sub>量に濃度依存的に抑制が認められた。一方、Ba-P-Na<sub>3</sub>はPCJ吸入前に吸入させた場合、鼻汁漏出量を抑制した。なお、Ba-P-Na<sub>3</sub>吸入がPCJ吸入前10分前に施行された場合、最も高い抑制が示めされた。逆に、PCJ吸入後Ba-P-Na<sub>3</sub>を吸入させた場合本抑制は認められなかった。(Fig 3)

tic cells 脱顆粒率抑制効果

色素漏出法と同様PCJ吸入抗原量濃度依存的に鼻汁中metachromatic cellsの脱顆粒率の増加が認められたが、非感作抗原であるHD吸入時には脱顆粒率の増加は認められなかった。一方、PCJを吸入させた場合にもPCJ吸入10分前にBa-P-Na<sub>3</sub>10mg/ml鼻汁量を吸入させた場合、脱顆粒率の抑制効果が認められた。このBa-P-Na<sub>3</sub>のmetachromatic cellsの抑制効果は吸入Ba-P-Na<sub>3</sub>量に濃度依存的であった。また、Ba-P-Na<sub>3</sub>がPCJ吸入前に吸入させた場合のみmetachromatic cellsの脱顆粒率抑制が認められたが、PCJ吸入後Ba-P-Na<sub>3</sub>を吸入させても抑制は認められなかった。(Fig 4)

3) Ba-P-Na<sub>3</sub>の鼻汁分画中metachroma-

4) Ba-P-Na<sub>3</sub>添加による鼻汁中metach-

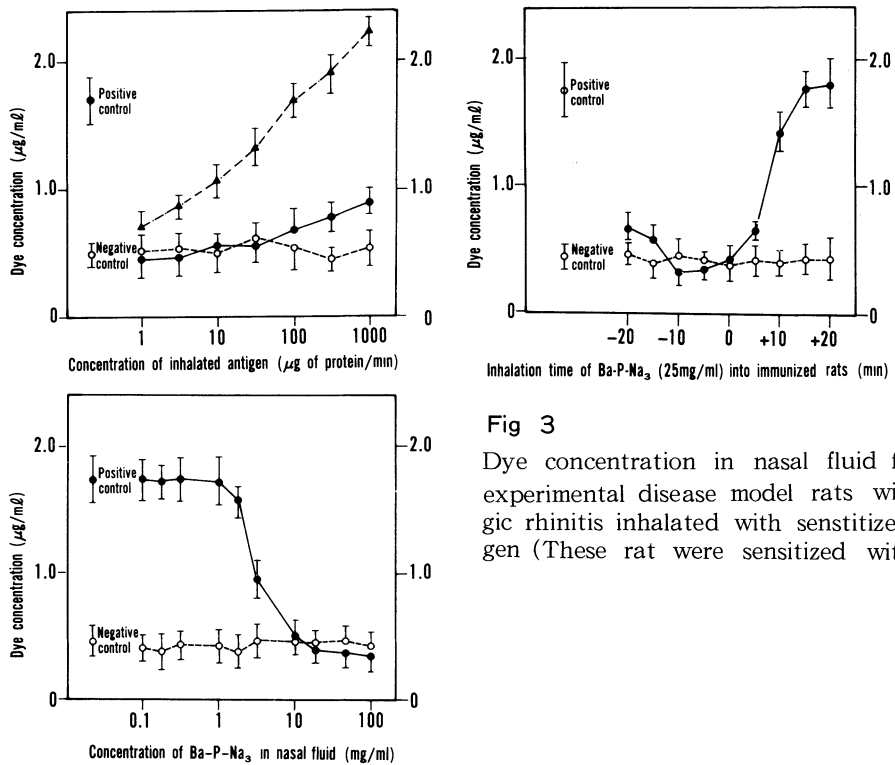


Fig 3

Dye concentration in nasal fluid from the experimental disease model rats with allergic rhinitis inhaled with sensitized antigen (These rat were sensitized with PCJ)

Upper figure : The dose responsive curve of inhaled antigen (PCJ)

- : Inhaled with PCJ antigen
- ▲---▲ : Inhaled with PCJ antigen and Ba-P-Na<sub>3</sub> (25 mg/ml in nasal fluid)
- : Inhaled with HD antigen (control:Non sensitized antigen)

Lower figure : The dose responsive curve of inhaled Ba-P-Na<sub>3</sub>

- : Inhaled with PCJ (50µg/ml) antigen with various dose of Ba-P-Na<sub>3</sub>
  - : Inhaled with HD (50µg/ml) antigen (control)
- Right figure : The adding time of Ba-P-Na<sub>3</sub> (25mg/ml in nasal fluid)
- : Inhaled with PCJ (50µg/ml) antigen with Ba-P-Na<sub>3</sub>
  - : Inhaled with HD (50µg/ml) antigen (control)

Positive control : Inhaled with PCJ (50µg/ml) antigen

Negative control : Antigen (-) : Physiological saline

The data showed the mean Value ± S.D. in 10 rats

The detailed method was described in the text.

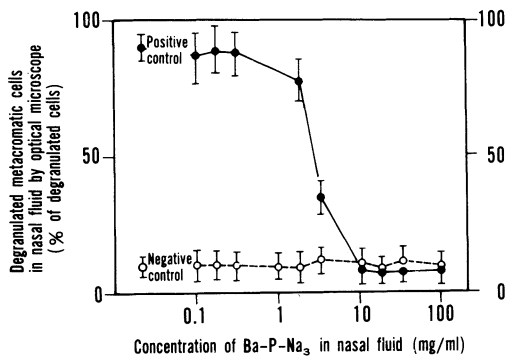
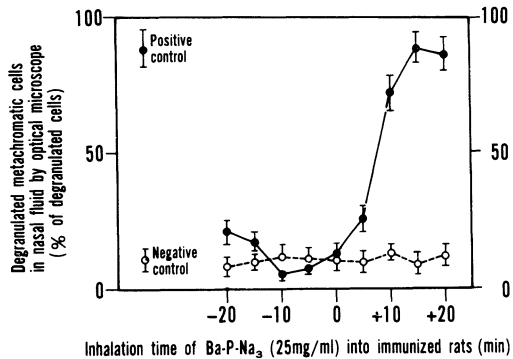
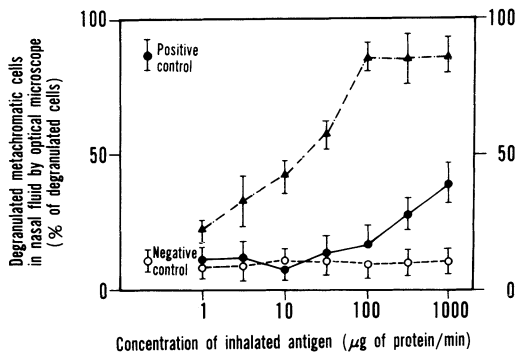


Fig 4

The degranulated metachromatic cell rats in nasal fluid by optical microscope in the experimental disease model rats with allergic rhinitis in inhaled sensitized antigen

Upper figure : The dose responsive curve of inhaled antigen (PCJ)

- : Inhaled with PCJ antigen
- ▲---▲ : Inhaled with PCJ antigen and Ba-P-Na<sub>3</sub> (25 mg/ml in nasal fluid)
- : Inhaled with HD antigen (control:Non sensitized antigen)

Lower figure : The dose responsive curve of inhaled Ba-P-Na<sub>3</sub>

- : Inhaled with PCJ (50 μg/ml) antigen with various dose of Ba-P-Na<sub>3</sub>
- : Inhaled with (50 μg/ml) of HD antigen (control)

Right figure : The adding time of Ba-P-Na<sub>3</sub>

- : Inhaled with PCJ (50 μg/ml) antigen with Ba-P-Na<sub>3</sub> (25 μg/ml in nasal fluid)
- : Inhaled with HD (50 μg/ml) antigen (control)

Positive control : Inhaled with PCJ (50 μg/ml) antigen

Negative control : Antigen (-) : physiological saline

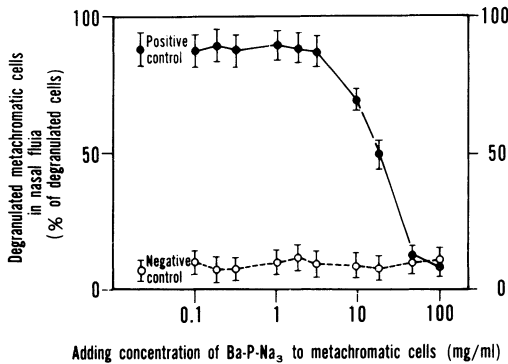
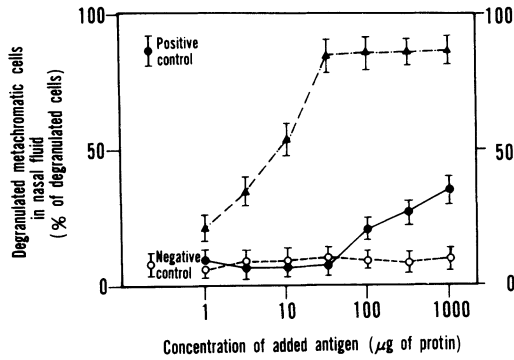
The data showed the mean value ± S,D, in 10rats

The detailed method was described in the text.

romatic cells 生染色法による抗原添加時の脱顆粒率の抑制効果

感作ラットの鼻汁を採取し metachromatic cells を生染色し PCJ を添加すると metachromatic cells の脱顆粒率は PCJ 濃度依存的に有意に高率となったが、非感作抗原である HD

を添加させても脱顆粒率の増加は認められなかった。PCJ 添加 5 分前に Ba-P-Na<sub>3</sub> を添加すると PCJ による metachromatic cells の脱顆粒率は抑制をうけた。添加 Ba-P-Na<sub>3</sub> 濃度依存的に PCJ 添加による metachromatic cells の脱顆粒率の抑制が認められた。Ba-P-Na<sub>3</sub>



は PC J 添加前に添加した場合、脱顆粒率の抑制は最も強く認められた。この場合、5分前に添加された場合最大の抑制率が認められたが、PC J 添加後に Ba-P-Na<sub>3</sub> を添加した場合には脱顆粒率の抑制は認められなかった。(Fig 5)

5) Ba-P-Na<sub>3</sub> 添加による metachromatic cells の脱顆粒抑制の電子顕微鏡、走査電子顕微鏡写真像

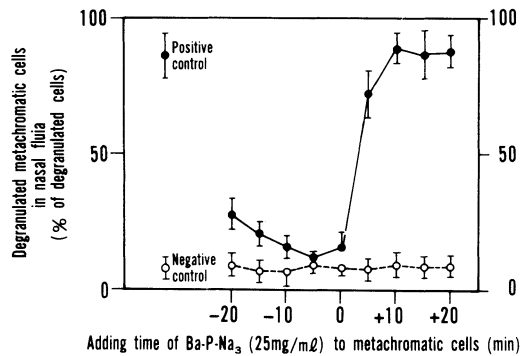


Fig 5 in vitro metachromatic cell degranulated ratio in nasal fluid the experimental disease model rats sensitized with PCJ  
Upper figure : The dose responsive curve of adding of sensitized antigen

●—● : Adding of PCJ antigen to metachromatic cells  
▲—▲ : Adding of PCJ antigen and Ba-P-Na<sub>3</sub> (25mg/ml in nasal fluid) to metachromatic cells

○---○ : Adding of HD antigen (control:Now sensitized antigen)

Lower figure : The dose responsive curve adding of Ba-P-Na<sub>3</sub>

●—● : Adding of PCJ (50μg/ml) antigen to metachromatic cells

○---○ : Adding of HD (50μg/ml) antigen to metachromatic cells (control)

Right figure : The adding time of Ba-P-Na<sub>3</sub> to metachromatic cells

●—● : Adding of PCJ (50μg/ml) antigen with Ba-P-Na<sub>3</sub> (25mg/ml in nasal fluid) to metachromatic cells

○---○ : Adding of HD (50μg/ml) antigen (control)

Positive control : Adding of HD (50μg/ml) antigen

Negative control : Control (Physiological saline)

The data showed the mean Value ± S.D. in 10 rats

The detailed method was described in the text.

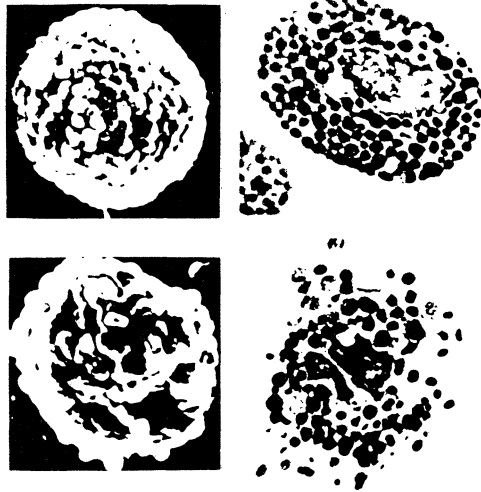


Fig 6 The electrospectral and scanning electrospectral findings of metachromatic cells in nasal fluid from the experimental disease model rats inhaled with sensitized PCJ antigen) Degramilation of metachromatic cells in nasal fluid from these rats that was inhaled with PCJ antigen were showed, but pre-treatment of Ba-P-Na<sub>3</sub> before inhalation with PCJ antigen suppressed degranulation of these cells by electrospectral and scanning electrospectral findings

electromicroscope	Scanning electromicroscope
Antigen (50 μg/ml)	Antigen (50 μg/ml)
.....	.....
Antigen (50 μg/ml) + Ba-P-Na <sub>3</sub> (25 μg/ml)	Antigen (50 μg/ml) + Ba-P-Na <sub>3</sub> (25 μg/ml)

PCJ吸入により生じる鼻汁中 metachromatic cellsの脱顆粒現象は Ba-P-Na<sub>3</sub>のPCJ吸入5分前吸入により、共に抑制された。(典型的所見を Fig 6 にしめす)

考 察

本報告では感作抗原と同一抗原吸入にのみ allergic rhinitis 症状を発症する allergic rhinitis experimental disease model rat<sup>3)</sup>を用いてPCJ吸入による allergic rhinitisの各所見を Ba-P-Na<sub>3</sub> 吸入が抑制するか否かに関して検討を加え、Ba-P-Na<sub>3</sub>が allergic rhinitis患者に臨床的 allergic rhinitis 症状上予防効果として有用か否かに関しての予備的動物実験とした。

( Fig 1, 2 )

先に報告した如く Ba-P-Na<sub>3</sub>はラット好塩基球性白血球病や感作ラット腹腔 mast cellsを感作抗原で刺激した場合生じる脱顆粒現象を抑制すること(未発表)、allergic rhinitis患者、鼻汁中 metachromatic cellsを生染色し、脱顆粒現象を検討する系<sup>7)</sup>においても感作抗原刺激による脱顆粒現象を抑制すること<sup>2)</sup>、この Ba-P-Na<sub>3</sub>の mast cells等よりの脱顆粒現象、即ち、chemical mediator(s)の遊離抑制は Ba-P-Na<sub>3</sub>が Ca<sup>++</sup> ion 流入以前の Ca<sup>++</sup> ion 流入に関与する蛋白を regulateする物質を modifyすることにより生じることを明らかにしてきた。<sup>9)</sup>

Ba-P-Na<sub>3</sub>の allergic rhinitis に対する予

防効果において色素漏出 (Fig 3) 光学顕微鏡による metachromatic cells の脱顆粒率においても (Fig 4) Ba-P-Na<sub>3</sub> は濃度依存的に抑制効果をしめした。この結果は同 model rats を用いてラット尾静脈より Ba-P-Na<sub>3</sub> や投与した場合と同様の結果であり<sup>3)</sup>、また、これらに対する抑制率も前報告と同様鼻汁中 Ba-P-Na<sub>3</sub> 濃度と一致した抑制効果をしめした<sup>3)</sup>。

鼻汁中 metachromatic cells に PCJ 抗原を添加し生染色法で脱顆粒率を検討する系においても Ba-P-Na<sub>3</sub> の添加は脱顆粒率抑制をしめした<sup>3)</sup>。(Fig 5)

電子顕微鏡、走査電子顕微鏡所見も Ba-P-Na<sub>3</sub> の前吸入が PCJ 吸入による鼻汁中 metachromatic cells の脱顆粒現象を抑制した。

(Fig 6)

しかも、Ba-P-Na<sub>3</sub> の感作抗原による allergic rhinitis 所見の抑制は Ba-P-Na<sub>3</sub> が PCJ 吸入前に吸入されているか、PCJ 添加前に添加されていた場合のみ認められた (Fig 3~5)。in vitro では PCJ 添加前5分前に添加された場合、最大の脱顆粒細胞抑制率が認められたが、吸入時には10分前吸入で最大の色素漏出量、脱顆粒細胞抑制率が認められた。この時間的差は in vitro と in vivo の差で説明できると考えられる。また、Ba-P-Na<sub>3</sub> は Disodium cromoglycate と異なり脱顆粒誘発剤添加5分前に添加された場合に最も高い抑制率をしめすこともよく一致する<sup>1)</sup>。

Ba-P-Na<sub>3</sub> と disodium cromoglycate はその作用機作が mast cells 等への Ca<sup>++</sup> ion 流入を Ca<sup>++</sup> ion 流入開始前の step で regulate する物質 (mco. 45000 dalton 蛋白) のリン酸化を誘発することで発揮されることが明らかにしたが (未発表、執筆中) disodium cromoglycate が脱顆粒刺激剤と同時に投与させた場合に最大の抑制率をしめすのに対し、Ba-P-Na<sub>3</sub> は5分前添加で最大の抑制率をしめす<sup>1)</sup>。この両者の作用効果の差がいかなる機序にもとづくのかを明らかにして行きたいと考えていると共に、Ba-P-Na<sub>3</sub> は抗原前投与によっても十分な脱顆粒抑制効果をしめすことより、本 model rat を

用いての研究を重ねて行くことでヒト allergic rhinitis 使用への臨床効果の有用性、有効な使用法を検討して行きたいと考えている。

## 文 献

- 1) 坂本守正, 南田幸子, 幡井勉: オウゴン成分 Boicolein の肥満細胞脱顆粒抑制効果 Proc Symp. Wakan Yaku 16; 65, 1983
- 2) 西澤芳男: 黄芩主成分 Balcalein-6-phosphate trisodium (Ba-P-Na<sub>3</sub>) のアレルギー性鼻炎患者中 metachromatic cells の該当アレルギー, Compound 48/80, ヤギ抗ヒト IgE 抗体刺激による脱顆粒現象の抑制効果の検討; 耳鼻臨床 77; 2036, 1984
- 3) 西澤芳男: Baicalein-6-phosphate trisodium のアレルギー性鼻炎病態実験モデル動物に対する効果の検討, 日鼻誌, 34, 1987 (印刷中)
- 4) 安枝浩, 油井泰雄, 清水章治, 遠藤久子, 信太隆夫: スギ花粉アレルギーの解析, アレルギー-29; 763, 1980
- 5) Kishimoto, T. Miyake, T. Nishizawa, Y. Watanabe, T. and Yamamura, Y: Triggering mechanism of Blymphocytes I Effect of anti-Immunoglobulin and enhancing soluble factor on differentiation and proliferation of B cells. J. Immunol. 115; 1179, 1974
- 6) Tada, T. and Okumura, K: Regulation of homocytotropic antibody formation in the rats. J. Immunol 106; 1002, 1971
- 7) 西澤芳男: 新たなアレルギー性鼻炎抗原同定法, 耳鼻臨床, 77; 483-494, 1979
- 8) Lowry, O. H, Rosenbrough, N, J., Ferr, A, L. and Randall, A. L.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol Chem. 193; 265~275, 1951
- 9) 西澤芳男: アレルギー性鼻炎患者下鼻甲介粘膜の in vitro における histamin 遊離に対する黄芩の抑制効果, 耳鼻臨床, 78; 2250, 1985



The effects of Baicalein 6-phosphate trisodium on symptoms of allergic rhinitis in allergic rhinitis experimental disease model rats immunized with *Cryptomeria Japonica*, D. Don

The department of allergology, Shinseikai Hospital

The department of anesthesiology, Shiga university of medical science

Yoshio Nishizawa

In this paper, antigen-specific experimental disease model-rats with allergic rhinitis immunized with pollens of *Cryptomeria Japonica*, D. Don (PCJ) were established, Inhalation of PCJ induced symptoms of allergic rhinitis, but house dust antigen (HD).

Using this rats, dose dependency of PCJ induced some symptoms of allergic rhinitis, increase of dye concentration in nasal fluid degranulated cells ratio in nasal fluid and degranulated cell ratio in vitro studies. Baicalein 6phosphate trisodium ( $Ba-P-Na_3$ ) showed these symptoms of allergic rhinitis induced with inhaled or adding of PCJ in dose-dependent manner.  $Ba-P-Na_3$  could inhibit these allergic rhinitic symptoms, if  $Ba-P-Na_3$  had been pread-  
ded before PCJ stimulation, but not after PCJ stimulation.

These inhibitory effects of  $Ba-P-Na_3$  on symptoms of allergic rhinitis also showed with electricmicroscopic findings and scanning electromicroscopic findings.

These data suggested that  $Ba-P-Na_3$  was new type preventive allergic rhinitic drug. Clinical application of  $Ba-P-Na_3$  for patients with allergic rhinitis using with this experimental disease animal model rats is now underway.

質問；茂木（大分医大）

- 1) 抄録には抗原としてリンゴ花粉を使用したとあるが、口演ではスギ花粉,HDを使用した。どちらなのか。
- 2) I型アレルギーが成立したと言う証明は？
- 3) 脱顆粒現象の指標は何か

応答；西澤（真正会病院）

- 1) 実際上前回の鼻学会の実験と同一条件で行うためリンゴ花粉よりは日本杉花粉で行った。なお対照は自家塵を用いた。
- 2) 熱処理等でのPassive sensitizationにより確認した他、抗原吸入時のラットの動作や他覚所見によって判定した。
- 3) 鼻液中の metachromatic cell を光学顕微鏡的に対照と比較検討した。

質問；寺田（秋田大）

- 1) 講演中に述べている鼻汁量というのは、一部鼻汁を含んだ灌流液と考えて良いのでしょうか。
- 2) 抗原誘発によって誘発される鼻汁量はどの位でしょうか。
- 3) ヒトにおいて鼻汁分泌の多くは神経反射を介するものです。この系は神経反射を強く抑制した状態で行なうものですから、血管透過性をみるには良いのですが、鼻汁分泌抑制作用を検討するには無理があると思われませんかでしょうか。

応答；西澤（真正会病院）

- 1) 生食の鼻汁量は一定したいが色素注射でてくる色素をみている。また麻酔下での血管からの単なる漏出と鼻粘膜腫脹と色素の漏出との関係の問題は会后検討していきたい。
- 2) perfusion pump で流しており多少の差

（例えばコットンへの吸収や食道への逆流があるため）はあるが、ほぼ2.0 ml位の一定量はとれる。

- 3) 動物実験としてこのようなモデルを作製した場合麻酔という過程を入れねばならずこの問題をどう解決するかは今後の問題であり、検討を更に加えたい。