

WP - 871の気管支喘息モデルモルモットにおける bronchioalveolar lavage fluid 中細胞の産生する 好酸球活性酸素促進因子遊離の抑制に関する検討

西澤芳男^{1,2)} 秦 義 則¹⁾ 山本美也子¹⁾
山田まゆみ¹⁾ 西澤 恭 子^{1,3)}

西沢クリニック¹⁾
滋賀医科大学麻酔学教室²⁾
大阪大学医学部病態病理³⁾

Summary

In this paper, guinea pig was sensitized with ovalbumin (OA) and was induced bronchial asthma. Cells were collected from bronchioalveolar lavage fluid and these cells were cultured with OA or without OA for 24hr at 37°C. Supernatant was used eosinophils active oxygen enhancing factor. These factor was added to heparinized normal human eosinophil and incubation was done for 30min at 37°C. A23187 included chemiluminescence (CL) was measured. Active sensitized group (OA sensitization) showed high CL titer compared with non sensitized group. CL production was dependent on sensitized antigen dose. Eosinophils in BALF were increased in bronchial cell (provocation < IAR < LAR). WP-871 suppressed CL production from these cells in dose dependent manner. These data suggested that WP-871 suppressed eosinophil activation and pathological change in asthma state in these guinea pigs.

緒 言

卵白アルブミン (以下OAと略す) で感作した気管支喘息モデルモルモットは気管支喘息のモデルとしてよく用いられている¹⁾。ヒトの気管支喘息において抗原吸入直後に生じる即時型反応 (IAR) と抗原吸入後 4~8 時間後に生じる遅発型反応 (LAR) が出現することが知られている。我々は先にアレルギー性鼻炎においてIARとLARを発症するモデルラットを作製した²⁾。本モデルによりアレルギー性鼻炎のLAR発生機序を解明しようと考えている。一方、気管支喘息においても本モデルを用い、LARの発症機序を実験的に裏付けたいと考えている。今回気管支喘息病態モデル動物を作製し、本モ

デルを用いて遅発相反応発症機序解明の一方法として遅発型に関与すると考えられている好酸球にスポットを当て、感作された気管支喘息モデルモルモットより bronchioalveolar lavage fluid (以下BALFと略す) 中の細胞を培養し、この培養血清中の好酸球に対する作用を活性酸素生産能を指標とし検討した。

方 法

1) 動物と免疫方法, BALF接種

日本クラレ (静岡) より Hartley 系モルモット (male 300~750 gr) を購入, cyclophosphamide 30mg/kg, ovalbumin (OA) 10 μ g または 1000 μ g, Al (OH)₃ 100mg を腹腔内に注射し, 3 週後

にOA 10 μg の booster injection を行い感作し、さらに4週後に body plethysmograph を用いOA吸入誘発テストを行ない、 V_T 、 V_T を気道収縮の指標として気管支喘息の成立していることを確認した。この後20ml/kgの生理食塩水で bronchioalveolar lavage (以下BALと略す)を施行した。

2) BALF細胞の好酸球活性化因子BAL細胞を無刺激およびOA 10mg/mlの添加刺激中で37°C 24時間培養し、培養上清を遠心分離により得た^{3,4)}。

3) 健常人末梢血好酸球の活性化酸素活性測定法
健常人末梢血をヘパリン加採血しメトリサマイド溶液重層遠沈にてヒト末梢血好酸球を分離、培養上清(50%)で好酸球を37°C、30分間処理したのち^{3,4)}、A23187に対するルミナル依存性 chemiluminescence (以下CLと略す)を検討した (Fig 1 に experimental protocol を示す)。

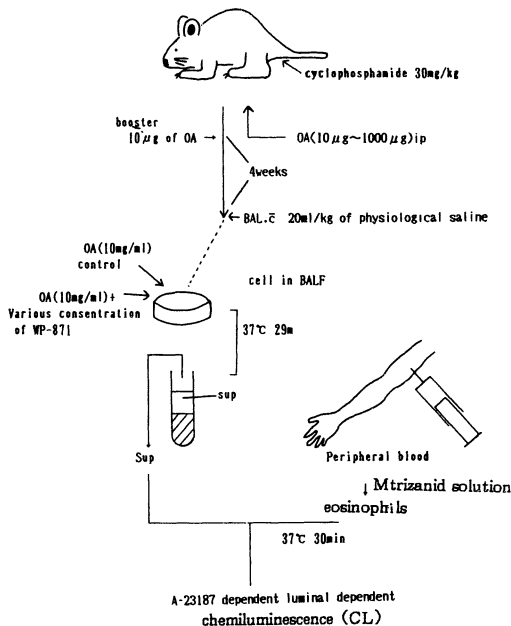


Fig 1 The experimental protocol

4) BALF中細胞数の変化

一部実験でMay Gimso 染色によりBALF中好酸球、細胞数をOA吸入前、IAR、LAR時に測定し、一部組織的にも探索した⁴⁾。

5) WP-871吸入による抑制効果

抗アレルギー剤としてのWP-871(わかもと製薬、東京)を、本ラットにOA吸入直前に各種濃度で吸入させ、その抗アレルギー効果を検討した。

6) 各実験は50匹のラットを用い、得られた値より平均値±標準偏差を求めた。

結果

1) 感作量差による好酸球CLの産生差

OA感作10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群感作時に比較し、1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群では好酸球CL増強作用は強かった (Fig 2)。

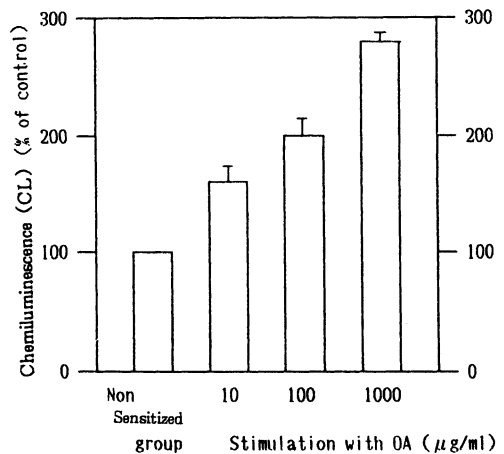


Fig 2 The dose independency of sensitized antigen OA on chemiluminescence activity

2) 非感作群と感作群の比較

感作群では非感作群に比してCL産生は有意に高かった (Fig 3)。

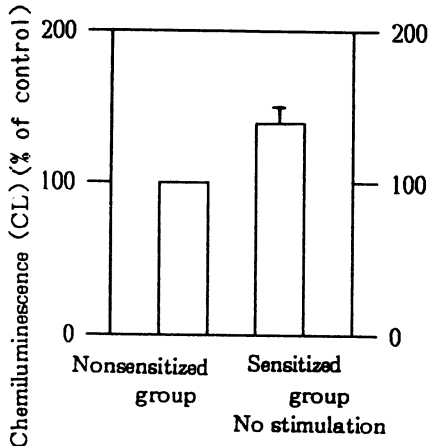


Fig 3 The activity of chemiluminescence using with nonsensitized group or sensitized group

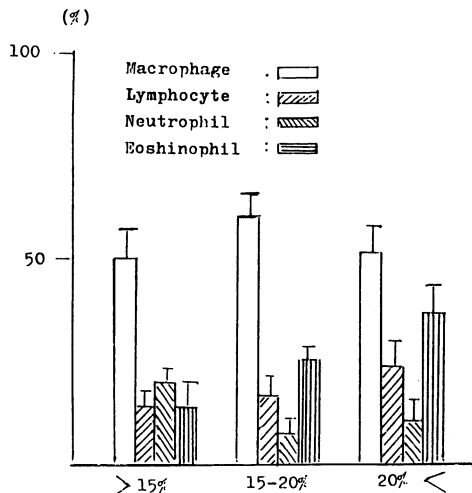


Fig 4 The change of various cells in BALF in the stage of various asthma bronchial

3) OA 刺激 BAL細胞培養上清中の健康人末梢血の好酸球活性化酸素刺激因子

OA 刺激 BAL細胞培養上清中でも同様に非感作群より感作群で好酸球に対するCLの増強効果が認められたが、この際感作量は関係なかった (Fig 3)。

4) 非刺激時における好酸球活性化促進因子の存在

OA感作モルモットのBAL中細胞には非刺激時の状態でも好酸球を活性化する因子の存在が認められた。

5) 好酸球, 細胞数のIAR, LAR時におけるBALF中の変化

OA吸入誘発前, IAR時, LAR時の順で細胞数, 好酸球数が増加し, 組織的にもLAR時に好酸球浸潤が著明であった。このことから, LARと好酸球の密接な関係が示唆された (Table 1)。

6) WP-871の吸入での効果

WP-871吸入はOA吸入に先だて行くと濃度依存的にCL産生, 好酸球の浸潤をおさえた (Fig 6, 7)。

考 察

気管支喘息の遅延化, 重症化には好酸球が大いに関与していると考えられる⁷⁾ (Fig 8)。この好酸球は好中球とともに active oxygen generationを高め肺組織を障害することも示唆されている。中年難治性の気管支喘息をLARの連続とすると好酸球, 好中球の関与を抑制する

Table 1 The change of various cells in nasal mucosal tissue

	Control	Experiments		Experiments+WP871 ($1 \times 10^{-3} \text{g/ml}$)	
		IAR	LAR	IAR	LAR
Macrophage	1 0 0	182.6 ± 10.1	182.5 ± 7.4	101.1 ± 6.4	101.3 ± 7.2
Lymphocyte	1 0 0	162.3 ± 7.2	195.6 ± 15.3	116.8 ± 10.3	121.1 ± 10.4
Neutrophil	1 0 0	96.3 ± 5.1	97.8 ± 7.4	89.2 ± 10.3	97.6 ± 7.8
Eosinophil	1 0 0	297.6 ± 25.4	326.6 ± 16.4	121.3 ± 10.1	118.6 ± 5.7

Control is expressed as 100 %

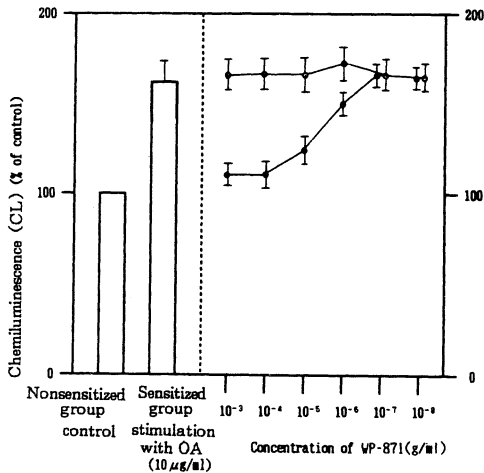


Fig 6 The suppressive effect of WP-871 on cells in BALF producing eosinophils active oxygen producing enhancing factor production

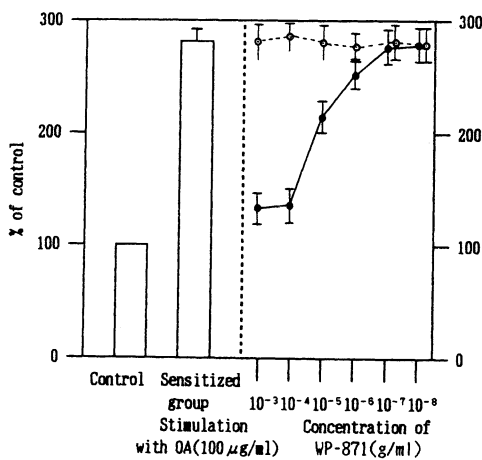


Fig 7 The effect of WP-871 on accumulation of eosinophil in BALF

ことが肝要である⁷⁾。WP-871は新たな抗アレルギー剤であるが⁸⁾、IARにつづくLARの関与をIARの出すLARに働くchemical mediatorを抑制することおよびactive oxygenを抑制することなどにより効果があると考えられる。

このことから遅発型の反応に好酸球が強く関与している可能性が示唆された。即ち、抗原吸

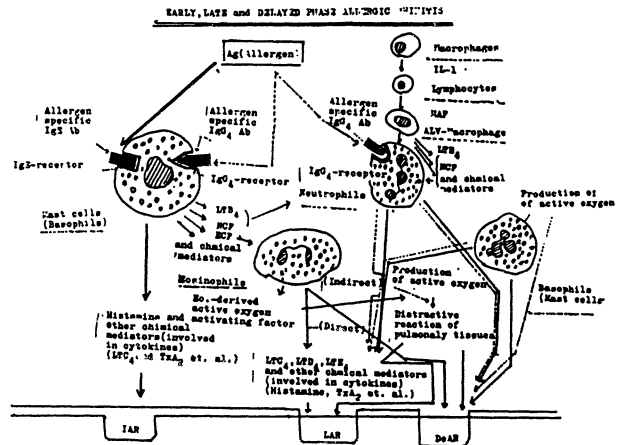


Fig 8 The scheme of the important role of eosinophil on LAR

入により感作動物の気道内に存在するおそらくは好中球を中心とした細胞が、好酸球活性酸素産生促進因子を放出し好酸球を集めるとともにCL産生等 active oxygen generation を活性化させ組織障害をもたらし、かつ同時に集積された好塩基球、肥満細胞からロイコトリエンC₄、D₄が遊出され気管支喘息遅発型の発現が生じると考えられた (Fig 5)。一方、BAL細胞刺激時にWP-871を共存させると濃度依存的に好酸球のCL産生を抑制した (Fig 6)。すなわちWP-871はE_o-SF産生を抑制することで好酸球のCLをはじめとする active oxygen 産生を抑制することで遅発型反応の一部を抑制すると考えられた (Fig 7)。

以前の実験から、遅発型は即時型でつくられたロイコトリエンB₄が好中球に作用するなどして、これがまた好酸球に作用する因子等を出し、好塩基球、好酸球、好中球を集積しロイコトリエンC₄、D₄、active oxygen等を産生し、局所のアレルギー反応の他 active oxygen による局所組織の障害をひきおこし遅発型の反応をおこし (Fig 2~7)、ここで生じる active oxygen による肺組織の障害により、中年以後の難治性気管支喘息をひきおこすのではないかと考えられる (Fig 8)。WP-871は抗アレルギー剤と

して Zymosan 刺激等による active oxygen generation を抑制することも知られているが、これに加えて好中球の産生する好酸球活性酸素産生促進因子遊離抑制を介して好酸球の CL をはじめとする active oxygen generation をも二重に抑制し遅発相の反応を抑制したと考えられた。同時に先に報告した、好中球に作用するロイコトリエン B₄ の肺組織、好塩基球、肥満細胞からの遊離を抑制し、好中球の集積による遅延型反応の抑制、さらには各種サイトカインの抑制を介し好塩基球、肥満細胞、好酸球、好中球等からの chemical substance の遊離を抑制することによって本モデルモルモットの遅発型気管支喘息発作を抑制したのではないかと考えられ、目下この点をも含めて本モデルラットを用いての気管支喘息遅発型反応の発症機序とその抑制治療法を検討中である。

文 献

- 1) 上川雄一郎：モルモット気管支筋の神経性収縮反応におよぼす抗アレルギー剤と β 刺激薬の併用効果，アレルギー，38：86-92，1989。
- 2) Nishizawa, Y.：Early and late response in experimental allergic rhinitis in rate and the influence of WP-871 on it, Jap. J. Rhinol., 27：46, 1988。
- 3) 西豊基他：OA感作モルモットー気管支肺胞洗浄細胞培養上清上の好酸球活性酸素産生能におよぼす影響について，アレルギー，37：346, 1988。
- 4) 福田健他：気管支喘息病態での好酸球活性化とメディエーター，アレルギー，38：566, 1988。
- 5) Allen R. C. et al.：Phagocytic activation of a luminal-deperdent chemiluminescence in rat alveolar and peritoneal macrophages., Biochem. Biophys. Res., commun 69：245-252, 1976。
- 6) 西澤芳男：Minocycline (MINO) 吸入療法におけるび慢性汎細気管支炎 (DPB) 患者気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中のリンパ球サブセットの変化，日本耳鼻咽喉科感染症研究会誌 7：1989 (印刷中)
- 7) 木村郁郎：遅発型アレルギーの発症機序ー細胞反応を中心に，第3回日本免疫薬理シンポジウム議事録：23-40, 1988。
- 8) 木村郁郎：喘息の病型と機序，難治性喘息とLAR気管支喘息シンポジウム議事録：31-45, 1985。

討 論

質問；高坂（東北大）

- 1) 産生促進因子とはどのような細胞由来のどのような mediator を言うのか。
- 2) 好酸球のレセプターを介した現象なのか否か。
- 3) ①・②が明確に論じられておらず，極めて具体性あるいは説得力に欠ける印象を受けた。

応答；西澤（西沢クリニック）

- 1) 予備実験から肥満細胞と多核白血球が産生している可能性が示唆されている。
- 2) 現在本因子を精製中であり，精製された段階で本因子と反応する好酸球の分子（レセプター）を精製し，どのような細胞内過程をへて好酸球が活性酸素産生に到るかを検討する予定である。

質問；久松（山梨医大）

- 1) WP-871 の分子量は。
- 2) 10^{-3} g/ml \sim 10^{-6} g/ml の WP-871 の細胞障害性はないか。それをどのように検討されたか。

応答；西澤（西沢クリニック）

- 1) 分子量は 300 前後である。
- 2) in vitro で 10^{-3} \sim 10^{-8} の WP-871 の添加で cytotoxicity は認められなかった。

質問；海野（旭川医大）

遅発型反応は即時型反応を起こしたモデルに発生するのか。起こればどの位持続するか。

応答；西澤（西沢クリニック）

- 1) 抗原吸入後即時型につづいて遅発型の反応が生じている stage で検討した。
- 2) 1.5時間位つづく。

追記

現在活性酸素産生促進因子は、肥満細胞感作抗原で刺激をうけた場合に、同細胞の産生する ECF により好酸球を遊送させて作用する肥満細胞が産生する極端に local にしか作用しない polypeptide で、分子量 45,000 dalton である。既存の cytokine をはじめとする chemical mediator とは異なり、SDS-PAGE で単一 band あるいは 2 量体あるいは前駆体と考えられる不活化物質（約 90,000 dalton）のものが存在し、eosinophil 表面には同抽出分子 (45,000 dalton) をウサギに免疫した抗体と蛍光抗体法で反応し、同抗体で同促進因子と eosinophil の結合が阻害されることが明らかとなってきた。現在、同分子レセプターとともに gene を解析中である。