

抗アレルギー剤（WP-871）のヒト気管支喘息 に対する効果

西沢クリニック アレルギー科
滋賀医科大学 麻酔学教室

西澤 芳 男

大阪府立成人病センター 実験病理

西澤 恭 子

滋賀医科大学 麻酔学教室

天 方 義 邦

Summary

Inhalation of one (WP-871) of the anti-allergic drugs is effective on asthma bronchitis of human and guinea pig. In this study, we investigated why the inhalation of WP-871 was effective on asthma bronchitis.

Results were following

- 1) WP-871 suppressed O_2^- production by eosinophil that destracted bronchial epithelial cells in vivo.
- 2) WP-871 suppressed cytotoxicity against bronchial epithelial cells by killing of PAF activated eosinophil.
- 3) The inhalation of WP-871 (0.03 %) suppressed attack of bronchial asthma.

These data showed the inhalation of WP-871 improved signs and symptoms of bronchial asthma better than that of disodium cromoglycate.

緒 言

WP-871 は新たな抗アレルギー剤として開発された。本剤は sodium cromoglycate 同様生体内に吸収されることなく、吸入薬として抗アレルギー効果を有し、sodium cromoglycate より低用量で有効であり、かつ抗アレルギー作用が有意に強い¹⁾。

近年、気管支喘息重症化の一つの因子として好酸球の気管支上皮障害が重要視されている²⁾。また、活性酸素による障害も重要な因子の一つである³⁾。

一方、最近抗アレルギー剤に好中球、好酸球の活性酸素の産生抑制効果があることが明らかにされた^{4,5)}。

今回、吸入抗アレルギー剤としての可能性がある⁶⁾ WP-871 が好酸球の活性酸素産生を抑制するか、このことを介して好酸球の気管支上皮細胞障害を抑制するか、繊毛運動を抑制しないか等について検討を加えた。即ち、WP-871 が好酸球の作用を抑制することで重症気管支喘息に有用な吸入抗アレルギー剤となりえるか否かに関して基礎的な検討をおこなったので報告する。

対 象

健常人 20 名および性、年齢の一致した 10 % 以上の好酸球増多の観察される気管支喘息症例 20 例を対象とした。症例の内訳は、健常人群

は26～64歳，平均年齢41.6歳，男：女＝11：9，気管支喘息群は26～65歳，平均年齢40.8歳，男：女＝11：9であった。

方法

1) 好酸球の分離採取

好酸球の分離採取は Vadas らの方法⁷⁾，Robert らの方法⁸⁾に準じて施行した⁹⁾(図1)。

即ち，これら両者の方法を混合改変修正し，6%高分子デキストラン溶液をヘパリン加静脈

血に混和し，得られた buffy coat を遠心後，沈査細胞を Eagle's MEM に浮遊させ， $3 \times 10^{-7}M$ の N-formyl-methionil-leucyl-phenylalanine (f-MLP) を添加，10～15 分間 37°C の water bath で shaking しながら，その後直ちに洗浄した。同細胞を Eagle's MEM に再浮遊し，20% Metrizamide 溶液に重層し，1200 g，30分間遠心後，沈査を hypotonic saline にて red cell を lysis し，eosinophil rich fraction を得た。これらの eosinophil rich fraction を cytocentrifuge した。May-Gruenwald-Giemsa 染色を施行し，85%以上の好酸球からなる分画を得，これを用いた。

2) 好酸球のルミナル依存性

前述の方法で得た好酸球を，phenol red を含まない Hanks balanced salt solution (HBSS) に浮遊後，至適血中濃度である WP-871 0.33%～0.1% を主として処理した。即ち water bath 37°C 30分間 shaking 処理をした。細胞数は最終的に $2 \times 10^6/ml$ とし，対照として HBSS のみを加え同様に処理した。好酸球を以上のように処理したのち，好酸球を $50 \mu l$ ，ルミナル $3 \times 10^{-3}M$ ， $50 \mu l$ に Ca ionophore A23187 $15 \mu g/ml$ を $50 \mu g$ 加え，A23187 刺激大でその活性酸素産生能を TD-400 (ラボサイエンス社，東京) で 600sec 測定し，その peak 値，積分値を求めた。

3) 好酸球の気管支上皮細胞に対する natural cytotoxicity の検討

前述の方法にて得た好酸球を FRK (Flow-laboratories Corp, USA) 10% FCS 加に $2 \times 10^6/ml$ に調整し effector cell とし用いた。その気管支上皮細胞に対する natural cytotoxicity を検討した。target cell は肺に何ら病理的变化のない患者より，家族の十分なインフォームド・コンセントを得た上で採取した。上皮細胞を collagenase $10 \mu g/ml$ 等の蛋白分解酵素その他で分離し 10% FCS 加 FRK で培養した。sub-confluent の状態にて 3H -uridine (Amersham, England) 最終濃度 $25 \mu Ci/ml$ の条件下で 24 時間添加培養し，上皮細胞を RNA ラベルし， 3H -uridine でラベルした上皮細胞 monolayer を

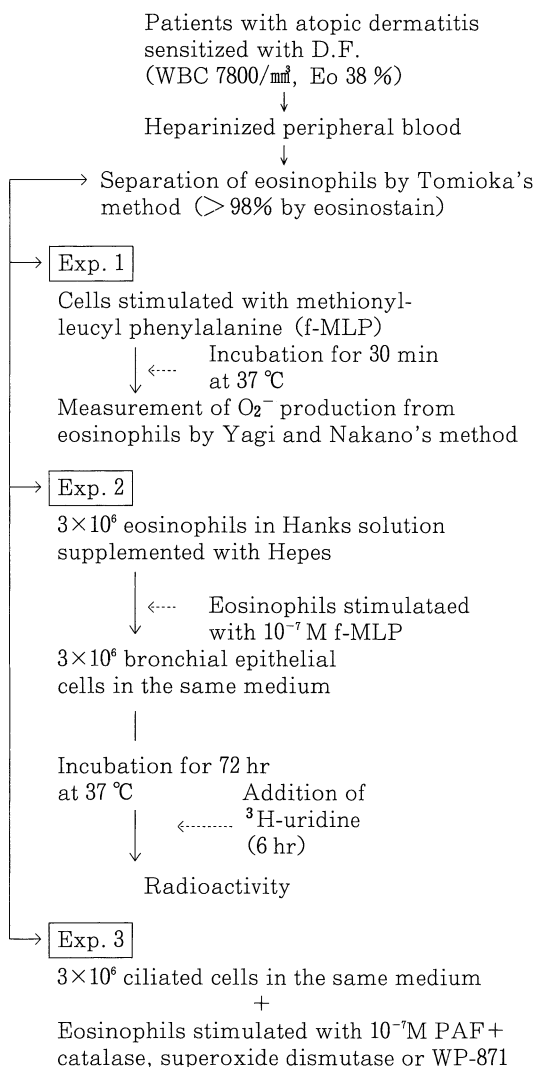


図1 Experimental protocol

0.55%トリプシン, 0.02% EDTA 加 phosphate buffered saline (PBS) 溶液に剥離採取し十分ピペティング後 FRK で 3 回洗浄遠心をし, $5 \times 10^4/\text{ml}$ に FRK (10% FCS 加) にて調整して target cell として以下に用いた。Effector cell, target cell をそれぞれ $100 \mu\text{l}$ ずつ Falcon 3047 24穴 (Becton Dickinson) の各 well に添加, FRK (10% FCS 加) $700 \mu\text{l}$ と WP-871 溶液を (最終濃度 0.33–0.1%) 加えた系と FRK (10% FCS 加) のみ $800 \mu\text{l}$ を加えた系を作成し E/T=40 : 1, 37°C, 5% CO₂ 下 24 時間培養した。

24 hr 後 plate を 1500 rpm で 10 分間遠心し上清 0.7ml を摂取し, ³H-uridine 量を液体シンチレーションカウンターにて測定した。maximum release は 0.1% Triton X の条件で総細胞を死滅した系の上清を, spontaneous release は effector cell を加えない系の上清を用い, cytotoxicity を算出した。すべての実験は計 10 回行った。

4) 気管支上皮細胞繊毛運動数の検討

前述の方法で得たヒト 98% 以上純化の好酸球を platelet aggregation factor (PAF, 半井化学, 京都) で好酸球を刺激し, 経時的, 好酸球の濃度依存的に気道線毛運動周波数 (ciliary beat frequency, CBF) と線毛運動活動域 (%)

ciliation of tracheal circumference) (CTC) を測定した¹⁰⁾。

結 果

1) 好酸球の分離採取

健常人全 20 例中 5 例で好酸球分画が 54.2%, 59.3%, 61.2%, 68.4%, 80.9% と目的とした好酸球数より少ないので対象より除外し, 15 例を実際の対象とした。一方, 気管支喘息患者では 1 例も認められなかったので全例を対象とした。対象の好酸球分画は $95.4 \pm 4.1\%$ であった。(分布は 89.6% ~ 99.7% の範囲であり, 他の構成細胞は殆ど好中球が占めた。(結果省略))

2) 自他覚症状

自他覚症状は WP-871 吸入後改善をみせた (Table 1)。

3) 好酸球のルミノール依存性 chemiluminescence による活性酸素産生に及ぼす WP-871 の影響

A23187 刺激下による好酸球の chemiluminescence で測定した活性酸素産生能はピーク値 97.4 ± 4.2 relative light unit (r. lu) であった。また, 積分値は 1326.4 ± 11.8 rlu であった。WP-871 で同一症例を処理するとピーク値は 47.6 ± 9.2 と低下し, 積分値も 648 ± 14 rlu と有意に低下した (図 2)。

項 目	投 与 前	投 与 後	
労作時息切れ Chugh-Jones	1.7 ± 0.4	0.7 ± 0.2	$P < 0.05$
比 体 重 (%)	94.2 ± 11.1	94.6 ± 10.5	NS
動 脈 ガ ス PaO ₂ (Tory)r	84.6 ± 11.1	94.2 ± 14.1	$P < 0.05$
PaCO ₂ (Tory)r	40.7 ± 5.9	36.6 ± 7.4	$P < 0.5$
A-aDo ₂ (Tory)r	33.8 ± 9.4	38.6 ± 6.2	$P < 0.5$
呼 吸 機 能 %vc (%)	86.3 ± 10.9	86.3 ± 10.6	NS
FEV _{1.0} (%)	54.7 ± 11.6	72.3 ± 14.1	NS
PV/TL (%)	44.3 ± 6.8	38.1 ± 5.9	$P < 0.01$
末 梢 血 好 中 球 (/cmm)	5.322 ± 2.162	5.198 ± 2.362	NS
リンパ球 (/cmm)	1.672 ± 716	1.657 ± 698	NS

Table 1 Comparison of subjective and objective symptoms before and after WP-871 therapy

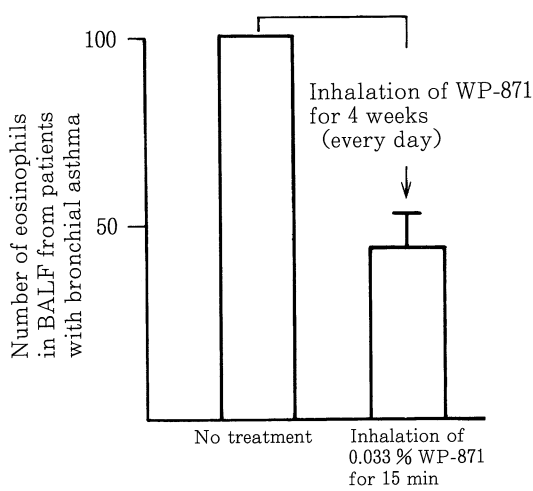


図 - 2 WP-871 添加時の気管支喘息患者 BALF 中好酸球のケルミルミネッセンスの抑制

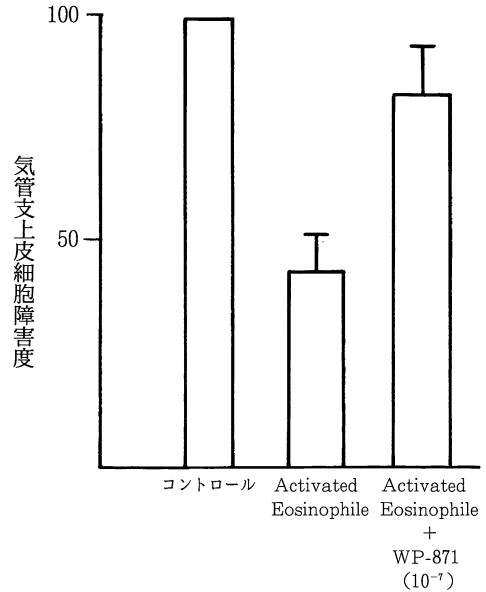


図 - 3 好酸球による気管支上皮細胞障害の WP-871 による阻害

4) 好酸球の気管支上皮細胞に対する natural cytotoxicity と WP-871 の影響

気管支上皮細胞に対する cytotoxicity は WP-871 無添加では障害をうけたけれど、WP-871 添加群では活性化好酸球の気管支上皮細胞への障害作用を抑制している ($p < 0.001$) (図 3)。

5) PAF 活性化好酸球誘導気道繊毛運動周波数および線毛運動活動域

$10^{-7}M$ の PAF で好酸球を刺激した場合 PAF 活性化好酸球誘導気道線毛運動周波数と線毛運動活性域は著しい低下を示す。この際 catalase を加えるとこれらの現象の著しい改善をみとめた (図 4)。また、WP-871 の添加も経過上、かつ濃度依存的にこれらの現象を改善した。

考 察

抗アレルギー剤として WP-871 をはじめとする薬剤は気管支喘息を中心として使われているが、その作用機序には様々なものがある¹¹⁾ (図 5)。

気管支喘息の病態に注目すると、I 型アレルギーが中心であることは否定できないが、I 型アレルギー反応の発症、病態には cell-cell inter-

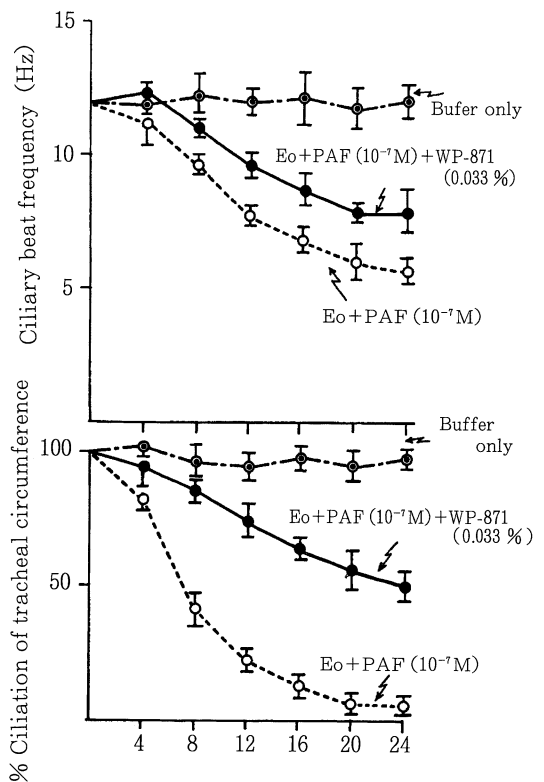


図 - 4 WP-871 による PAF 活性化好酸球の気道上皮細胞運動抑制効果

actionも極めて重要な因子と考えられる。即ち、気管支喘息の病態には cell-cell interaction あるいは mediator-cell interaction を中心に炎症の関与が強く関与している。

気管支喘息においては好酸球が重要な炎症細胞としての役割をになっていることが近年明らかにされている¹³⁾。

好酸球としての炎症反応の判定の一つの方法としてルミノール反応で好酸球が産生する活性酸素産生能を検討すること、気管支上皮細胞に対する natural cytotoxicity を検討することが重要である。

一方、抗アレルギー剤が気管支喘息に有効であることの一つの証明として上述の気管支喘息

悪化過程を防禦できるか否かにある。

抗アレルギー剤である WP-871 の作用を至適濃度である 0.33% で検討した。この 0.33% は WP-871 吸入時の至適濃度である⁶⁾ (図6)。

我々の検討では A23187 刺激下で WP-871 は好酸球の活性酸素産生能を低下させた (図6)。ヒト気管支上皮細胞に対する好酸球の natural cytotoxicity に対しても障害を有効に抑制した。

我々は未発表であるが WP-871 が好中球、多核白血球の活性酸素産生系を産生を抑制することを発見した¹⁴⁾。これは f-MLP による系、即ち Ca^{++} influx を介する系で抑制し、 Ca^{++} influx を直接的に必要としない PMA 刺激下における活性酸素系では抑制作用はみとめられない¹⁴⁾。

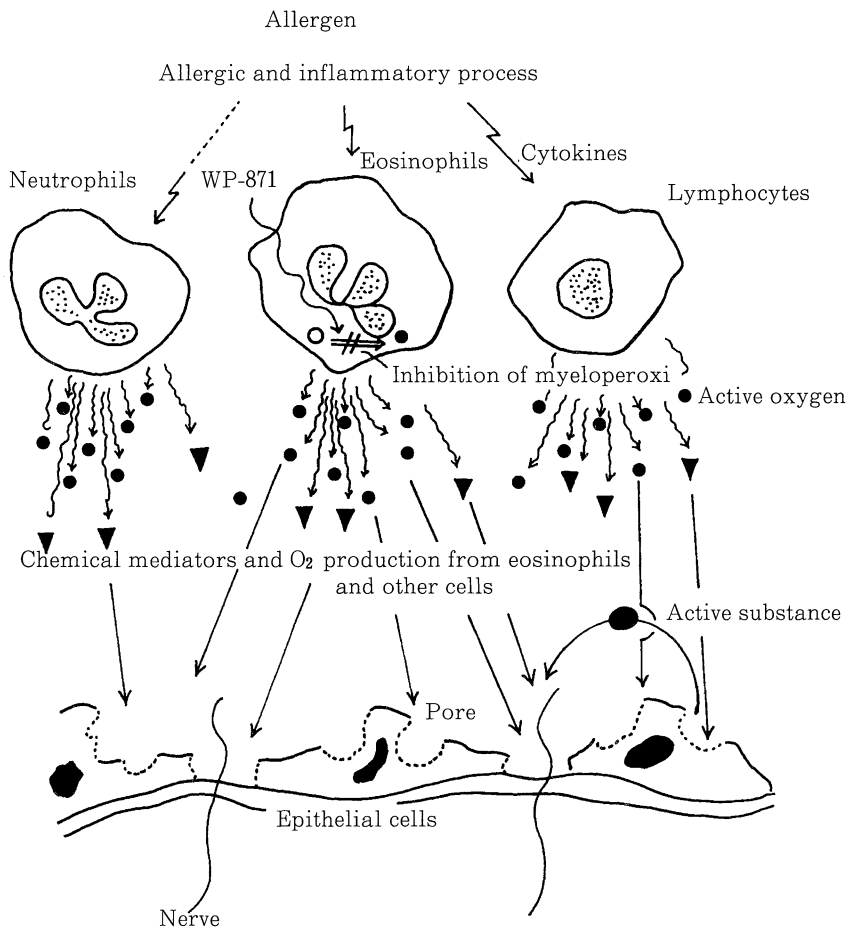


図 - 5 好酸球の気管支喘息モデルと WP-871 の作用

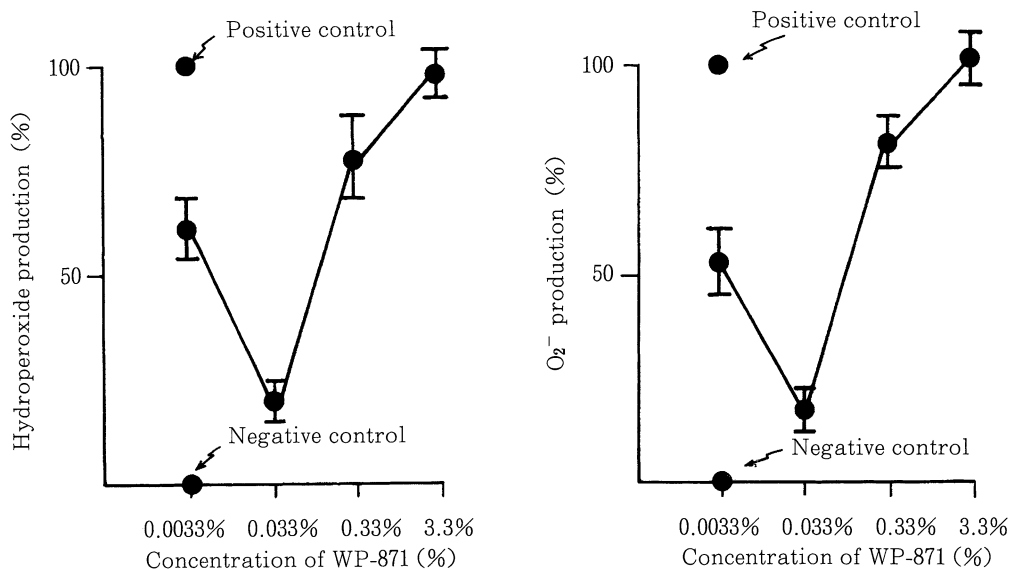


図 - 6 WP-871 の活性酸素抑制効果

今回、Ca⁺ influx を惹起する Ca ionophore A23187 の刺激下で好酸球について検討した。ただし我々の working hypothesis として Ca⁺ influx そのものに対し WP-871 が抑制するかどうかの最終的な検討が必要と思われる。この点に関しても WP-871 が Ca⁺ influx を阻害することで好酸球の活性酸素を抑制するのではないかという preliminary な結果を得ている¹⁵⁾。

好酸球による気管支上皮障害、これに続く気道過敏性、慢性気管支喘息の病態中 WP-871 が好酸球の活性酸素産生を抑制し、その結果気管支上皮細胞の障害をも抑制する結果は WP-871 に気管支喘息で最も重要な point である好酸球の作用抑制を介して気管支喘息の症状を改善するのではないかという可能性を示唆する。このことから抗アレルギー剤の新たな薬効が示唆された。

ヒトをはじめとし多くの種類の哺乳類の好酸球は種々の刺激により super oxide anion, hydrogen peroxide hydroxyl radical, singlet oxygen などいわゆる活性酸素の産生、遊離することが知られ^{16,17)}、肺の単なる障害だけでなく¹⁸⁾、種々酸素系を介して気道粘膜上皮運動障害¹⁹⁾、ネコの気道の収縮とそれにつづく気

道反応性の亢進を誘導すること²⁰⁾、さらにラット mast cells からの histamine の遊離、モルモット気道平滑筋の Ca⁺ homeostasis の変化、イヌ血管内皮細胞等での Endothelium derived relaxing factor の不活化等が報告されている。

一方 Yukawa ら¹⁰⁾ はポリミキシンを注射により集積させたモルモット腹腔内好酸球を純化して分離し、PAF でこれを刺激しモルモット摘出気管輪に作用させると経時的、また、好酸球の濃度依存的に ciliary beat frequency と % ciliation of tracheal circumference の低下がみとめられ、14 時間後気管支粘膜上皮の著しい痙攣がみとめられることを光学、電子顕微鏡的に証明した。

PAF 活性化好酸球による気道粘膜の障害は不完全ながら PAF の特異的受容体拮抗薬である WEB2083, Catalase により有意に抑制される。このことは PAF 活性化好酸球が活性酸素の産生を抑制し気管支上皮抑制に作用していることを示唆する。

WEB2083, Catalase に比較して WP-871 等抗アレルギー剤の活性化好酸球の活性酸素産生遊離抑制能は低いが WP-871 の作用が DSCG より強いことを考えると将来吸入抗アレルギー

剤として有望な薬品といえる。

最後になるが好酸球を Robert らの方法に準じて摂取し、これを Uhara の方法に準じて改良した方法でおこなった。Uhara らのいうように Yazdambakhah らの報告のように f-MLP が好酸球自体に作用する危険があるが、Uhara らの方法を追試したところ ① f-MLP の濃度が $3 \times 10^{-7} M$ 以下、② f-MLP と接触する時間を短縮するため metrizamide 溶液に重層する前に一度洗浄し、時間の短縮をはかった。③ Percoll でなく metrizamide を用いた。④ WP-871 使用、対照にも f-MLP の好酸球への作用を同様にして用いた等の点で上述の危惧は考えなくてもよいと考えられた。

文 献

- 1) WP-871 概要集 わかもと製薬社内資料.
- 2) 荏原順一：肺と好酸球，呼吸 6：678～689，1987.
- 3) Burman WJ and Martin II WJ.：Oxidant-mediated ciliary disfunction：possible role in airway disease, Chest 89：410～413，1987.
- 4) 木原廣美他：tranilast によるヒト好中球 O_2^- 産生の抑制，医学のあゆみ，142：775～776，1987.
- 5) 西澤芳男：成人気管支喘息に対する抗アレルギーの効果，日本胸部臨床（執筆中）
- 6) 西澤芳男：WP-871 の ultrasonic nebrizer による抗アレルギー効果（執筆中）
- 7) Roberts, RL et al.：Rapid method for isolation of normal human peripheral blood eosinophils on discontinuous percoll gradients and comparison with neutrophils, Blood 65：432～440，1985.
- 8) Kniazeff AJ et al.：Characteristics of epithelial cells cultured from feline lung, Lab Invest. 34：495～500，1976.
- 9) 荏原順一他：好酸球の活性酸素産生能と気管支上皮細胞障害性に対する tranilast の抑制効果，呼吸，8：858～863，1989.
- 10) Yukawa, T et al.：Inhibition of guinea pig and human eosinophil function by corticosteroid in vitro, Thorax 44：837p (Abs) 1989.
- 11) 富岡玖夫：抗アレルギー剤，感染・炎症・免疫，17：1～15，1992.
- 12) 富岡玖夫，鏡味勝，松村竜太郎：抗アレルギー薬，アトピー，アレルギー疾患，最新日本内科学大系，pp.172～198，中山書店，東京.
- 13) 富岡玖夫：アレルギー反応，代謝，26：202～212，1982.
- 14) 西澤芳男他：WP-871 のヒト好中球，多核白血球に対するヒト O_2^- 産生の抑制（執筆中）
- 15) 西澤芳男他：WP-871 の mast cell ^{45}Ca uptake に対する抑制効果による好酸球活性酸素産生抑制（執筆中）
- 16) Gleich, GJ：The eosinophilic leukocyte：Structure and Junction, Adv. Immunol 39：177～253，1986.
- 17) Spry, CJF.：Methods：eosinophil structure, constituents, and metabolism, In Eosinophils：A Comprehensive Review and Guide to the Scientific and Medical Literature Spry, CJF (ed) pp.29～73, Oxford, Oxford University Press 1988.
- 18) Barnes PJ et al.：Inflammatory mediators and asthma, Pharmacol Rev. 40：49～84，1988.
- 19) Nishizawa Y, Nishizawa Y and Amakata Y：The effect of active oxygen on bronchial epithelial cells (in press).
- 20) Nishizawa Y, Nishizawa Y and Amakata Y：Active oxygen induced cat's contraction of air way tracts (in press).

討 論

質問；佐藤（神戸常盤短大）

- 1) 繊毛運動を抑制するという結果ですが、そのメリット、デメリットは？
- 2) エアロゾル特性（濃度、粒径等の条件）で差はなかったでしょうか。
また、好酸球の生理的作用についても併せて教示下さい。

応答；西澤（西沢クリニック）

- 1) MTCCのメリットはDSCGよりはるかに作用が強いため少量で有効である。また、治療効果もよいが高濃度になると気管支上皮に対して毒性を示すことがあり用いる用量を十分考えるべきである。また本年の癌学会、アレルギー、日本内分泌学会誌、Neis Eng J Med, Jap J Corder Res等に報告するが内服では肺に必要な濃度より低濃度でLedich cellを増殖させるため子宮癌、乳癌には内服はどうかと思う。又、Ca⁺拮抗剤的作用が強いため吸入でも頭痛、顔面潮紅がでる。この点が今後の改善点であろう。
- 2)-① 実験はヒトBALF中好酸球、健常人末梢血中好酸球を富岡先生の方法で得、又気管支上皮もヒトより得たものを用いたin vitroの実験である。1例だけWP-871吸入（4 week, every day, 0.033%）のBALF中好酸球の減少をみたものがある。
- 2)-② 気道での好酸球は人間にプラスの働きはしないと思うがHubshが1975年にPGE₁、PGE₂を分泌してasthma regulateし良化させるとかヒスタミンナーゼ等のプラスの問題がある。我々も1979年に好酸球がPGE₁、PGE₂を分泌し喘息を軽快させる症例を見出したが10万人に1人位が改善に働くにすぎず、おむね好酸球の働きは気管支喘息を悪化させる。

追加；西澤

WP-871 (MTCC) の作用機序について今後とも研究を重ねてゆく予定である。MTCCは肺でのLPO, hydroperoxide その他のorgan

での活性酸素もおさえ、その他血管拡張作用もあり、今後興味ある薬剤でありここ当分研究をしたと思っています。

相変わらずの御指導たまわりたく存じあげます。