実験技術

スギ花粉を用いた
実験的アレルギー性鼻炎モデルの開発水谷 暢明¹⁾, 吉野 伸¹⁾, 奈邊 健²⁾, 河野 茂勝²⁾

要約: アレルギー性鼻炎は、くしゃみ、鼻汁分泌亢進および鼻閉を主症状とする典型的な I 型アレルギー疾患である。くしゃみおよび鼻汁分泌の亢進は、抗ヒスタミン薬により抑制される。一方、患者にとって最も苦痛を強いられる鼻閉にはグルココルチコイドが常用されるが、周知のごとくグルココルチコイドは優れた効果を発揮するが副作用も強く、これに代わる鼻閉の治療薬が望まれている。実験動物を用いたヒトの病態を反映した良好なモデルは、新規治療薬の開発に極めて重要な位置にあることは論をまたない。そこで、我々はモルモットを用いてスギ花粉抽出エキスを経鼻的に感作し、以後スギ花粉の反復吸入を行うことにより、ヒトの病態に類似した症状を呈するアレルギー性鼻炎モデルの開発を企図した。本法により、抗原惹起後に明らかなくしゃみおよび二相性の鼻閉が認められ、くしゃみの発現は周知のごとく抗ヒスタミン薬で強力に抑制された。一方、遅発性の鼻閉は、システイニルロイコトリエン (CysLT) の受容体拮抗薬で強く抑制され、さらには遅発性に明らかな CysLTs の産生が認められた。また、一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害薬が遅発相を抑制したことから、遅発性に産生された CysLTs が NO を介する血管拡張により遅発性の鼻閉を誘起しているものと推察された。さらに、本モデルの特徴は、慢性および重症化した患者において認められる鼻過敏性が認められることである。本鼻過敏性の発症は、ブラジキニン B₁ および B₂ 受容体に対する拮抗薬で抑制され、さらにはこれらの受容体のアゴニストである des-Arg¹⁰-カリジンおよびブラジキニンの点鼻は感作-惹起動物においていずれも鼻過敏性を誘起することから、本鼻過敏性の発症にはキニン類が大きな役割を演ずる可能性が示唆された。このように、

本モデルはヒトのアレルギー性鼻炎の病態を良好に反映しており、薬効評価さらには病態のメカニズム解析において有用であると考えられる。

はじめに

アレルギー性鼻炎は、典型的な I 型アレルギー疾患であり、この 30 ~ 40 年間に患者が急増し、現在では我が国の人口の 20% 以上が罹患していると推定され、今後も患者数は増加するものと予測されることから重要な国民健康問題の 1 つになっている。アレルギー性鼻炎患者の鼻局所に実際に抗原惹起を行うと、即時性にくしゃみ、鼻汁分泌亢進および鼻閉が認められ (1, 2)、さらに抗原に繰り返し曝露されることによって慢性および重症化した患者では即時性の反応に引き続き、数時間後に鼻閉を主症状とする遅発性の反応も惹起されるとともに非特異的な刺激に過剰反応を示す、いわゆる鼻過敏性が獲得されることが報告されている (3, 4)。しかしながら、アレルギー性鼻炎の病態の発症機構については不明な点が多く、ヒトの病態に類似した症状を示す動物モデルによる一貫した検討が不可欠であると考えられる。

病態を良好に反映した実験的病態モデルの開発は、病態の解析のみならず新たな作用機序を有する治療薬の開発にとって重要な位置を占めることは論をまたない。これまでに開発され、疾病に応用されている治療薬の多くは、実験動物により前臨床的評価がなされ、開発されてきた物質 (化合物) である。したがって、臨床に近い病態モデルを開発することは、これまでに見落とされてきた有効な化合物、あるいは今後見落とされるかもしれない有効な化合物を治療薬の開発候補として発展させる可能性がある。

キーワード: 動物モデル, アレルギー性鼻炎, スギ花粉, 鼻閉, 鼻過敏性

¹⁾ 神戸薬科大学薬理学教室 (〒658-8558 神戸市東灘区本山北町 4-19-1) e-mail: mizutani@kobepharm-u.ac.jp

²⁾ 京都薬科大学薬理学教室 (〒607-8414 京都市山科区御陵中内町 5) e-mail: kohno@mb.kyoto-phu.ac.jp

原稿受領日: 2007 年 8 月 6 日, 依頼原稿

Title: Development of experimental allergic rhinitis model using Japanese cedar pollen

Author: Nobuaki Mizutani, Shin Yoshino, Takeshi Nabe, Shigekatsu Kohno

図2 本実験のアレルギー性鼻炎モデルの鼻閉の指標とした鼻腔抵抗の測定に用いた2室からなるダブルフロープレチスモグラフィシステムの概略図

図3 抗原惹起後の二相性の鼻閉、くしゃみおよび鼻過敏症

それぞれの点もしくはカラムは、12例の平均±標準誤差を表す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (非感作-非惹起群との比較), † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ (非感作-惹起群との比較) (文献6および8より改変)

するのに対し、即時性喘息反応時には気道抵抗の上昇が分時呼吸数の増加にともなって誘起されることが知られている。これらのことより、本測定装置を用いて覚醒下でモルモットのsRawの変動を測定することは、上気道の反応である鼻閉を捕らえていることを示す。

4. 反復反応惹起による鼻炎症状の発現

スギ花粉による反復反応惹起を繰り返すと、反応惹起4回目以降には、惹起後30分-2時間(即時相)および4-6時間(遅発相)をピークとする明らかな

二相性の鼻腔抵抗の上昇(鼻閉)が再現性よく認められ、鼻閉の程度に一致して呼吸数の減少が観察される。このモデルでは二相性の鼻閉とともに抗原吸入惹起直後の比較的短い時間内にくしゃみが認められ(図3)、これらは非感作群にスギ花粉を吸入した際に認められる物理的刺激により引き起こされるそれに比して明らかに増加している(6)ことより、大部分がアレルギー反応により誘発されたものであると考えられる。また、本モデルにおいて血中のアナフィラキシー性抗体価の明らかな上昇、さらには鼻汁分泌の亢進も認められる

が、鼻汁分泌に関しては現在までのところ定量するまでには至っていない。

一方、本モデルにおける特徴は、臨床において慢性症状に特徴的な鼻過敏性が認められることである。感作群のスギ花粉吸入の2日後にヒスタミンもしくはロイコトリエン (LT) D_4 を点鼻投与すると濃度依存的な鼻腔抵抗の上昇がみられ、非感作群に比して1000倍以上低濃度から反応を示す他の実験的アレルギー性鼻炎モデルでは報告がみられない強力な鼻過敏性が認められる(7,8)(図3)。

5. 鼻炎発症に関与するメディエーター

まず、本モデルにおける二相性の鼻閉がどのような原因によって引き起こされているかを解析した。非感作のモルモットに血管収縮薬であるナファゾリンを静脈内投与すると、速やかに通常の鼻腔抵抗を低下させる。アレルギー性鼻炎を引き起こした場合の即時性および遅発性の鼻閉（鼻腔抵抗の上昇）のいずれもナファゾリンによる同様の処置により速やかかつ大きく減弱する。このことはいずれの鼻閉も血管拡張により引き起こされたものであると考えられる。また、一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害薬、 N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) の処置は、感作モルモットの抗原非惹起の鼻腔抵抗に対して何らの影響を及ぼさないが、抗原惹起による即時性および遅発性の鼻閉に対していずれも強く抑制する(9)(表1)。NOSには大別すると構成型 (constitutive, c) と誘導型 (inducible, i) NOSが知られている。スギ花粉吸入により誘起される鼻閉に対して、選択的 iNOS 阻害薬である $1-N^G$ -

(1-iminoethyl) lysine (L-NIL) およびアミノグアニジンを前処置してもほとんど何らの影響もみられない。したがって、モルモットを用いた本アレルギー性鼻炎モデルにおける鼻閉は、iNOS によるものではなく cNOS により生成された NO を介した血管拡張により主として引き起こされることが強く示唆される(8)。

さらには、抗ヒスタミン薬であるメピラミンの投与はいずれの鼻閉に対してもほとんど抑制を示さない。これに対して、システイニルロイコトリエン (CysLT) 拮抗薬であるプラナルカストの経口投与は即時性の鼻閉に対してはほとんど抑制を示さないが、遅発性のそれを強く抑制する(8,10)(図4)。

一方、我々は花粉吸入誘発後に鼻腔洗浄を行うことにより経時的なメディエーターの変動を捕らえることを考えた。図5は鼻腔洗浄方法を示す(5)。モルモットをペントバルビタール麻酔下、左側鼻孔にエアロポンプに連結したシリコンチューブを挿入して吸入するとともに、右鼻孔にシリコンチューブを挿入して生理的食塩水の1 ml/animal を吸引させ、鼻腔洗浄を行った。鼻腔洗浄液中の CysLTs 量は、いずれも花粉吸入誘発20分および5時間後をピークとして有意に二相性に増加した(11)(図5)。また、ヒスタミンも同様の経時的変動パターンを示したが、遅発性の増加は感作-非惹起と比較して有意ではなかった(11)。

これらのことから、遅発性の鼻閉発現は、産生された CysLTs が鼻粘膜血管の内皮細胞の CysLT 受容体の刺激を介して cNOS の活性化とそれに引き続く NO の産生により主として血管拡張が引き起こされた結果によると考えられる。

図4 抗原惹起後の二相性の鼻閉およびくしゃみに及ぼすメピラミンおよびプラナルカストの効果

それぞれの点もしくはカラムは、12例の平均±標準誤差を表す。メピラミン (10 mg/kg) およびプラナルカスト (30 mg/kg) は反応惹起の1時間前に経口投与した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (感作-惹起群との比較) (文献8および10より改変)

図5 モルモット鼻腔洗浄方法ならびに鼻腔洗浄液中のヒスタミンおよびロイコトリエン量の経時的変動
それぞれの点は、12例の平均±標準誤差を表す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (抗原惹起前との比較)

6. くしゃみの発症機構

くしゃみの発現に関しては、抗ヒスタミン薬であるメピラミンがこの発現を抑制したのに対して CysLT拮抗薬であるプラナルカストは全く抑制を示さなかった(10)(図4)。また、ヒスタミンは抗原惹起直後の鼻洗浄液中に大量に認められる(図5)。これらのことから、これまでに考えられていたごとく、遊離したヒスタミンが知覚神経終末の H_1 受容体を刺激することによりくしゃみ中枢を介して運動神経の興奮を引き起こし、その結果呼吸筋の収縮や関連する呼吸器系組織が連動してくしゃみが発現したものと考えられる。

7. 鼻過敏性

本モルモットアレルギー性鼻炎モデルにおいて、ブラジキニン B_1 受容体の拮抗薬である des-Arg⁹-[Leu⁸]ブラジキニン、および B_2 受容体の拮抗薬であるイカチバンドの反応惹起5分前の1回静脈内投与は、惹起2日後にみられる LTD₄ に対する鼻過敏症を抑制した(12)。この鼻過敏性の発症におけるキニン類の関与をさらに確認するため、 B_1 受容体アゴニストである des-Arg¹⁰-カリジン、ならびに B_2 受容体アゴニストであるブラジキニンを感作・惹起動物に点鼻して過敏

症が発症するか否かを検討したところ、点鼻2日後には両アゴニストは明らかに過敏症を発症させた。しかしながら、非感作動物ではブラジキニンでのみ鼻過敏症が発症し、des-Arg¹⁰-カリジンでは発症しなかった(12)。また、本モデルでは鼻腔洗浄液中に反応惹起10分後をピークとして持続的なブラジキニンの産生が認められた(12)。

以上の成績より、感作反応惹起を繰り返した感作動物の鼻粘膜には B_2 受容体のみならず B_1 受容体が発現し、抗原惹起によって産生されるキニン類がこれらの両受容体の活性化を介して鼻過敏症の発症に大きく関与する可能性が強く示唆された(表1)。

表1 鼻アレルギー症状の発症における種々ケミカルメディエーターの関与

	くしゃみ	鼻閉		鼻過敏性
		即時相	遅発相	
一酸化窒素	-	++	+	-
ヒスタミン	++	-	-	-
CysLTs	-	-	+	-
キニン類	-	-	-	++

- : 関与なし, + : 一部関与, ++ : かなりの関与, CysLTs : システイニルロイコトリエン

おわりに

近年, アレルギー性鼻炎患者の急激な増加に伴い, 本症発症に関する基礎的および臨床的研究報告が増加しつつあり, 副作用の少ない, かつステロイド薬に匹敵する効果を示す新規薬物の開発が待たれている. 新規薬物の開発には, *in vitro* 実験は不可欠であるが, *in vivo* 実験動物モデルは臨床では不可能な実験研究を構築する上では極めて有用である. ここでは, 本教室で開発してきた, 繰り返しアレルギー性鼻炎を発症させることのできる病態モデルについて主として報告した. 今後, 本モデルによるさらなる解析, さらにモルモットだけでなくマウスなどを用いたアレルギー性鼻炎モデルの作製ならびに解析は, アレルギー性鼻

炎発症メカニズムの解明および新規治療薬の開発の一助として役立つことが期待される.

文 献

- 1) Anderson M, et al. Allergic and nonallergic rhinitis. Blackwell; 1995. p. 145-155.
- 2) Naclerio RM. N Engl J Med. 1991;325:860-869.
- 3) Dvoracek JE, et al. J Allergy Clin Immunol. 1984;73:363-368.
- 4) Kanthawatana S, et al. Asian Pac J Allergy Immunol. 1997; 15:65-69.
- 5) Nabe T, et al. Jpn J Pharmacol. 1997;75:243-251.
- 6) Nabe T, et al. Inflamm Res. 1998;47:369-374.
- 7) Mizutani N, et al. Eur Respir J. 1999;14:1368-1375.
- 8) Mizutani N, et al. Jpn J Pharmacol. 2001;86:170-182.
- 9) Imai A, et al. Eur J Pharmacol. 2001;423:63-70.
- 10) Yamasaki M, et al. Inflamm Res. 2001;50:466-473.
- 11) Yamasaki M, et al. Inflamm Res. 2001;50:474-482.
- 12) Sugahara S, et al. Eur J Pharmacol. 2003;476:229-237.