モデル動物による鼻アレルギーの検討

— 第1報 —

— ヒスタミン加免疫グロブリンの効果と組織ヒスタミン含有量 —

入船 盛弘・荻野 敏・原田 保

大川内一郎・松永 亨

Effect of in vivo Treatment with Histamine-Gammaglobulin-Conjugate and Histamine Contents of Several Tissues in Sensitized Guinea Pigs

Morihiro Irifune, Satoshi Ogino, Tamotsu Harada,
Ichiro Ohkawachi and Toru Matsunaga

(Osaka University)

The effect of HG (Histamine-Gammaglobulin-Conjugate), which has been used to treat allergic rhinitis, was studied in actively sensitized Hartley guinea pigs weighing 200–300 g.

After a sensitizing application of 10% TDI (toluene diisocyanate) to the noses of guinea pigs, we confirmed sensitization by applying 5% TDI. Eight sensitized and seven nonsensitized guinea pigs received subcutaneous injections of HG or saline.

Symptom scores were recorded, and the therapeutic effect was assessed. Furthermore, after challenge of the animals, the histamine content of the blood, the turbinates and the lungs was determined after sacrifice under general anesthesia with pentobarbital sodium.

Five of the seven treated with HG showed a good response, while none of those injected with saline improved. The group treated with HG had a higher content of histamine in the turbinates and the lungs, but a lower blood level than the control group.

This experiment on model animals with nasal allergy verified the safety and therapeutic effectiveness of HG. The tissue histamine content suggested that HG inhibits histamine release from mast cells.

Key words : nasal allergy, TDI (toluene diisocyanate), Histamine-Gammaglobulin-Conjugate, model animal, histamine content

は じ め に

鼻アレルギーの病態を検討するためモデル動物を作成し実験的な観察を行うことは極めて意義の

あることであり, それを利用することにより種々の治療法の検討や作用機序の解明に応用しようと思われる。

現在まで鼻アレルギーモデル動物作成の試みはいろいろと行われてきている¹⁾²⁾が, 最近田中らの報告³⁾したモルモットに対して, **toluene diisocyanate** (以下 **T D I**) を用いる方法が比較的簡便で注目されている。

今回田中らの方法を基本に若干の修正を加えて鼻アレルギー症状を有するモルモットを作成した。その動物モデルを使用し, 今回最初の検討として臨床の実際上鼻アレルギーに広く使用されているヒスタミン加免疫グロブリン (**Histamine-Gammaglobulin-Conjugate**, 以下 **H G**) の効果を新しく考案した症状スコアの変動により観察した。

さらに **H G** 及び対照として生理食塩水 (以下生食) 投与後の各モルモットの組織 (血液, 鼻粘膜, 肺) のヒスタミン含有量を測定し, 観察結果との関係などから, **H G** の作用機序についても検討を行ったので文献的考察を加えて報告する。

対象ならびに方法

1) モデル動物作成法

実験動物は体重 200~300 g の **Hartley** 系のモルモット 15 匹を用いた。図 1 に示すような方法で鼻アレルギーモデルを作成した。

すなわち 10% **T D I** 酢酸エチル溶液をモルモットの両側鼻前庭に 1 日 1 回 5 日間連続して塗布し, 3 週間の観察期間を経て再び 10% **T D I** 酢酸エチル溶液を 1 日 1 回 5 日間塗布した。1 週後 5 % **T D I** を再塗布して感作の有無を確認した。

2) 薬剤投与方法

上記にて感作の確認できたモルモットを 2 群に分け, **A** 群は **H G** 投与群とし, **B** 群は対照群として生食を投与した。

感作の確認できなかったモルモットも予防効果をみるため 2 群に分け, **C** 群は **H G** 投与群とし **D** 群は生食投与群とした。

なお **H G** はモルモット免疫グロブリン 12mg, ヒスタミン二塩酸塩 0.15 μ g を含有し, 0.5 ml の生食に溶解したものをを用い, 生食投与群には

0.5 ml 生食のみ注射した。

投与方法は週 1 回上記の **H G** 生食溶液あるいは生食の背部皮下への注射を行い計 6 回投与した。

3) 症状の観察

毎回体重測定の後, 5 % **T D I** にて誘発を行い 5 分間の誘発症状 (くしゃみの回数, 水様性鼻汁の量, 喘鳴の程度) を観察したのち **H G** あるいは生食の皮下注射を行った。

初回感作確認後 6 週目に 5 % **T D I** での誘発のあとただちに心採血により失血死させ, 血液及び鼻粘膜, 肺組織の採取を行った。組織は測定日まで -80°C にて保存した。

4) 効果判定

誘発症状は表 1 に示すごとく, くしゃみの回数, 水様性鼻汁の量, 喘鳴の程度によりそれぞれの症状スコアを設け, スコア合計により変動を調べた。

薬剤投与開始前の症状スコアの合計が 2 点以上を感作されたとし, 0 あるいは 1 点は感作な

図 1 鼻アレルギーモデルモルモット作成及び実験計画

しとした。薬剤投与の有効性を判定するためその程度を表2のごとくスコアの変化により著効、有効、不変、悪化の4段階に分類した。

5) ヒスタミン量測定

血液及び鼻粘膜、肺組織の各ヒスタミン量はShoreの変法⁴⁾により測定した。その方法はHasegawaらの報告⁵⁾に準じた。

簡単に説明すると、血液に perchrolic acid

(以下PCA)を加えて除蛋白後、4℃3000回転で10分間遠心分離した上清を集める。

鼻粘膜、肺組織についてもPCAを加えた後ホモジナイズし同様の抽出操作を行った。

その後高速液体クロマト装置を用いてヒスタミンを分離溶出した後、o-phthalaldehydeによるエアークロマトグラフィー法で蛍光誘導体として測定した。

成績

1) モルモット感作状態による分類

初回感作の確認できたモルモットは8匹で残りの7匹は確認できなかった。

前者8匹のうちA群として7匹にHGを投与し、B群として1匹に生食を投与した。後者7匹のうち、C群として2匹にHGを投与し、残

り5匹をD群として生食を投与した。全例につき体重の変動を観察したが、減少は1例もなく途中死亡例もなかった。

2) 効果

表3にすべてのデータを示す。各群の有効性については表4に示した。

表1 症状スコア Symptom Score

Score	0	1	2	3
Symptom				
くしゃみ (5分間の回数)	(-)	1~2	3~5	6≦
水様性鼻汁	(-)	鼻入口部 に見える	1と3の 中間	鼻外にまで 流れ落ちる
喘 鳴	(-)	軽くある	1と3の 中間	努力性呼吸 を伴う

表2 効果判定

効 果	スコア合計の変化
著 効(≡)	消失(0)
有 効(+)	2点以上減少
不 変(±)	変化が1点以内
悪 化(-)	2点以上増加

表3 全モルモットそれぞれの症状スコアの変化、効果判定、ヒスタミン含有量

No.	Group	Symptom score	Effectivity	Histamine Contents		
				Blood (ng/ml)	Nose (μg/g)	Lung (μg/g)
1	A	4→0	(≡)	187	11.7	2.5
2	"	4→0	(≡)	164	14.1	9.9
3	"	4→1	(+)	90	17.3	12.1
4	"	4→2	(+)	213	11.9	23.0
5	"	4→2	(+)	84	1.2	6.2
6	"	4→3	(±)	174	12.5	6.8
7	"	2→2	(±)	151	9.6	20.5
8	C	1→1	(±)	112	38.3	5.0
9	"	0→3	(-)	112	20.9	1.7
10	B	4→4	(±)	80	10.1	5.8
11	D	1→1	(±)	125	9.5	12.5
12	"	0→1	(±)	103	11.7	37.4
13	"	1→4	(-)	97	4.2	5.4
14	"	0→5	(-)	179	20.3	10.1
15	"	0→6	(-)	223	4.7	29.3

HG投与のA群では著効が2例, 有効が3例, 不変2例であった. 計7例中有効以上が5例で有効率は71.4%であった. 同じくC群では2例中1例が不変, 1例が悪化を認めた. 生食投与のB群は1例のみで不変, 同じくD群は2例が不変で3例が悪化を認めた.

HG投与群と生食投与群それぞれの各週における症状スコア合計の平均値の変動を図2に示した. 生食投与群では明らかにスコアの増加を認めるがHG投与群では週ごとに漸減していた.

3) ヒスタミン含有量について

表5にHG投与群と生食投与群それぞれの各組織ヒスタミン量の平均値を示した. 血液及び鼻粘膜においてはHG投与群の方が生食投与群に比較しヒスタミン量の多い傾向があったが, 肺においては逆であった.

HG投与有効群と無効群の2群で各組織ヒスタミン含有量の平均値を比較した(表6). 表3のNo.8は終始アレルギー症状を起こすこと

がなかったのでHGの予防的効果ありとし有効群に含め検討した. その結果有効群と無効群ではほとんど差を認めなかったが, 鼻粘膜, 肺の両組織とも有効群で高く, 逆に血中では無効群が高いという傾向を認めた.

次に生食投与不変群と悪化群でのヒスタミン含有量について比較した(表7). No.10は終始強い症状が続いたので悪化群に含めて考えた. その結果不変群では悪化群に比較してヒスタミン含有量は血中で低く鼻粘膜及び肺の組織中で高い傾向を示した.

表5 HG投与群と生食投与群の組織ヒスタミン含有量

Sample	Histamine Contents		
	Blood (ng/ml)	Nose (μg/g)	Lung (μg/g)
H G (9)	143±45.3	15.3±10.2	9.7± 7.6
Saline (6)	134.5±55.3	10.1± 5.6	16.8±13.4

表6 HG群の有効と無効

Sample	Histamine Contents		
	Blood (ng/ml)	Nose (μg/g)	Lung (μg/g)
HG有効群 (No. 1, 2, 3, 4, 5, 8)	141.7	15.8	9.8
HG無効群 (No. 6, 7, 9)	145.7	14.3	9.6

表7 生食群の不変と悪化

Sample	Histamine Contents		
	Blood (ng/ml)	Nose (μg/g)	Lung (μg/g)
Saline不変群 (No. 11, 12)	114.0	10.6	24.9
Saline悪化群 (No. 10, 13, 14, 15)	144.8	9.8	12.7

表8 最後の発作症状による分類

Sample	Histamine contents		
	Blood (ng/ml)	Nose (μg/g)	Lung (μg/g)
無症状群 (No. 1, 2, 3, 8, 11, 12)	113.3	16.2	13.2
症状群 (No. 4, 5, 6, 7, 9, 10, 13, 14, 15)	150.7	10.6	12.1

表4 各群の有効性

Group	使用 薬剤	初回時 感作	各 例 数				
			合計	著効	有効	不変	悪化
A	HG (+)		7	2	3	2	0
B	生食	"	1	0	0	1	0
C	HG (-)		2	0	0	1	1
D	生食	"	5	0	0	2	3

図2 HG投与群と生食投与群の症状スコアの変動

表8では最終誘発時の症状で全例を分類しそのヒスタミン含有量を比較した。スコア1以下を無症状群、スコア2以上を有症状群として分

類した。無症状群は有症状群に比べて血中ではヒスタミン量が低く鼻粘膜、肺では高い傾向があった。

考 察

実験的アレルギー性喘息については八倉らの報告⁶⁾があり、喘息の成因、病態の解明、治療効果の検討などに利用されている。田中ら⁷⁾もTDIにより作られた喘息モデルに観察された鼻アレルギーは実験モデルとして利用できることを報告している。山下ら⁸⁾も同様に鼻アレルギーモデルを用いた抗アレルギー剤の薬効判定を提唱している。

喘息と鼻アレルギーは同じくI型アレルギーが中心となる気道疾患と言われているが、発症の要因や機序には若干の違いがあり、今回はモデル動物の鼻アレルギー症状を中心に観察を行った。なお喘息症状も参考に加えて検討をした。

モルモットの感作は比較的容易に行うことができた。感作を確実に行うために田中らの従来の方法³⁾に加えさらに1クールのチャレンジを行った。また症状スコア合計が1点の場合は非感作という判定にした。

モデル動物による鼻アレルギー治療薬の効果について症状のスコア化による観察は初めての試みである。モルモットではくしゃみの回数及び鼻汁の程度は容易に観察でき、今回はそれに喘鳴を加えることにより症状スコアとして判定し、有効性の検討を行った。

HGは過去20年来アレルギー治療に用いられ臨床上有効と言われている薬剤である。HG開発の歴史的背景としてはまずParrotとLaborde⁹⁾¹⁰⁾がモルモットを使い、ヒスタミンによって誘発されるショックを防禦する能力が健常人血清にみられることを示し、これをヒスタミン防禦力(Histaminophylaxie)と名付けたことから始まる。さらにParrotとLaborde¹¹⁾¹²⁾はモルモットの回腸片を用いた実験で、健常人の血清にはヒスタミンを固定してその腸

管収縮作用を不活化する作用があるが、アレルギー性疾患の患者血清ではその作用が減少ないし欠如していることを認め、この能力をヒスタミン固定力(Histaminopexie)と名づけそれを回復することを目的に本剤の開発があったと言える。

実験中の全経過において体重の変動を観察したが、すべての症例で体重は順調に増加し途中死亡例もなかった。このことはHGの急性毒性を否定できるデータの1つと言えよう。

症状スコア平均値の変動をみるとHG投与により徐々にではあるが、誘発症状を軽減しているのがわかる。

投与3、4週で症状の安定をみるようである。条件は違うもののヒトの場合小山らの報告¹³⁾によるとHGの5回から10回投与で高い有効率があったとしている。その後のいわゆる維持としての投与は今後の課題であろう。

今回の実験系ではHG投与による有効率は71.4%であり、それに対し生食投与群では症状改善例がなく、その実験的効果は明らかである。ヒトの鼻アレルギーに対するHGの効果について久松ら¹⁴⁾、伊藤ら¹⁵⁾は二重盲検試験の結果、くしゃみ、水様性鼻汁についての効果にはプラシーボと有意差を認め、それぞれ60~70%の有効率と報告している。

ヒスタミンはI型アレルギーとされている鼻アレルギーにおいて症状発現に最も関係するchemical mediatorである。モデル動物におけるその動態を観察するためヒスタミンの含有量を実験終了時点での各モルモット血液、鼻腔粘膜、肺組織について測定した。

HG投与有効群と無効群ではヒスタミン含有量にほとんど差はないものの、有効群では無効群に比較し血中で低く鼻粘膜、肺で高いような

成績であった。これは生食投与の不変群と悪化群の比較及び最終誘発時の症状の有無による比較より症状の少なかった群では症状を有した群に比べて血中で低く、鼻粘膜及び肺の組織で高いという傾向と同様であった。すなわち発作を起こした群では起こさない群に比べ、組織中のヒスタミン含有量の低下を認め、逆に血中ではヒスタミンの増加を示したと言える。そしてその変化はHG投与群では少なかったと言えるであろう。

これらの結果からHG有効例では鼻粘膜や肺などの組織中では無効例に比較し肥満細胞からのヒスタミン脱顆粒が抑制されているのではないかと推測した。しかしその程度は生食投与群に比べ、有効無効との間の違いが少なく、HG投与により無効の群でもそれなりに脱顆粒の抑制がおこっているものと想像できた。これらのことに関しては Ishikawa ら¹⁶⁾はラットについてHGが肥満細胞からのヒスタミン遊離を抑制することを *in vitro* の実験で報告している。さらに大西ら¹⁷⁾はHGがヒト白血球からのヒスタミン遊離反応を *dose dependent* に抑制する

ことも報告している。以上からHGは前述したごとくヒスタミン固定力とヒスタミン防禦力という力能に基づいて作られた製剤であるが、最近言われている作用機序としてヒスタミン遊離抑制なども考えられることがわかった。

また症状のひどい群、HGの無効群では血中ヒスタミン量の多い傾向がみられたが、先に述べたごとくヒスタミンは鼻アレルギー症状に最も関係する *chemical mediator* であることから当然考えられることである。実際 Hasegawa ら⁵⁾はスギ花粉症患者で発作期は非発作期に比べて全血ヒスタミン量の高いことを示している。

今回鼻アレルギーモデル動物を作成し薬物治療の効果検討を実験的に行い、加えて組織ヒスタミン含有量を観察した。症状スコアの設定でその効果判定はかなり客観化でき、モデル動物の組織ヒスタミン含有量の測定により鼻アレルギーに対する薬効メカニズム解明の一助となることがわかった。この実験系は鼻アレルギー病態などの研究にあたり有用であり、これからのさらに一層の研究が必要であろうと思われた。

ま と め

- 1) 実験的に鼻アレルギーモデル動物を作成し、症状の程度によりスコアを設けた。
- 2) 治療法としてヒスタミン加免疫グロブリン (HG) を選び、その効果をモデル動物により検討し、HGの明らかな実験的效果と安全性を確認した。
- 3) モデル動物の組織ヒスタミン含有量を測定し、HGの実験効果と比較検討を行い、HGが有するとされる肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制作用を支持する結果を得た。
- 4) モデル動物による鼻アレルギーの検討は病態などを研究するにあたり有効な方法と思われた。

稿を終えるにあたりヒスタミン加モルモット免疫グロブリンの提供を頂いた日本臓器製薬株式会社及び組織ヒスタミン含有量の測定にご協力頂いた同社生物活性科学研究所スタッフの方々に深謝いたします。

なお本論文の要旨は第13回世界耳鼻咽喉科学会（マイアミ）において発表した。

文 献

- 1) 奥田 稔：鼻アレルギーの基礎と臨床。耳鼻 20：277～344, 1974.
- 2) 山下敏夫，他：実験的Ⅰ型鼻アレルギー。日耳鼻 84：251～256, 1981.
- 3) 田中健一，他：TDIによるモルモット喘息惹起の試みについて。アレルギー 31：1004～1007, 1982.
- 4) Shore PA, Burkhalter A and Cahn VH：A

- method for the fluorometric assay of histamine in tissue. *J Pharmacol Exp Ther* 127 : 182~186, 1959.
- 5) Hasegawa M, et al : Seasonal variations of total histamine in patients with seasonal allergic rhinitis. *Clin Allergy* 13 : 227~236, 1983.
- 6) 八倉隆保 : 実験的アレルギー喘息. 最新医学 28 : 1464~1472, 1973.
- 7) 田中健一, 他 : T D I による喘息モデルに観察された鼻アレルギー. アレルギー 33 : 199~206, 1984.
- 8) 山下敏夫, 他 : 鼻アレルギーに対する抗アレルギー剤の実験的薬効判定法について. 日本鼻科学会誌 22 : 316~366, 1984.
- 9) Benda R and Urquia DA : Transmissibilité chez le cobaye de la protection antihistaminique. *CR Soc Biol* 144 : 492~493, 1950.
- 10) Benda R and Urquia DA : Action antihistaminique du sérum humain ou animal chez le cobaye. *CR Soc Biol* 142 : 167~169, 1948.
- 11) Parrot JL and Laborde C : Action of serums from normal and asthmatic human subjects on the biological activity of histamine. *Compt Rend Soc Biol* 145 : 885~889, 1951.
- 12) Parrot JL and Laborde C : Histamine fixation power of the blood serum ; Studies on its regulation. *J Physiol (Paris)* 45 : 211~214, 1953.
- 13) 小山英明, 他 : 鼻アレルギーに対するヒスタグロビン 2 vial 療法の使用成績. 耳展 22 : 334~341, 1979.
- 14) 久松建一, 他 : 鼻アレルギーに対するヒスタグロビンの二重盲検法による検討. 耳展 22 : 33~49, 1979.
- 15) 伊藤明和, 他 : 鼻アレルギーに対する Histaglobin の臨床効果. 耳鼻臨床 72 : 1539 ~ 1551, 1979.
- 16) Ishikawa T, et al : Inhibition of rat mast cell degranulation and histamine release by histamine-rat-gammaglobulin conjugate. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 59 : 403~407, 1979.
- 17) 大西章元, 他 : ヒスタグロビンによる白血球よりのヒスタミン遊離抑制. 日本臓器製薬社内資料, 1982.
- (原稿到着 : 昭和60年9月6日 急載
別刷請求先 : 入船盛弘
〒553 大阪市福島区福島1丁目1番50号
大阪大学医学部耳鼻咽喉科学教室)