— 原 著 —

抗アレルギー剤, 4-(p-chlorobenzyl)-2-[N-methyl-perhydroazepinyl-(4)]-1-(2 H)-phthalazinone hydrochloride (azelastine) に関する基礎研究

井上 喜恵

東京栄養食糧専門学校 (校長: 高木和男博士)

日本医科大学微生物学免疫学教室 (指導: 木村義民教授)

Basic studies on antiallergy drug, 4-(p-chlorobenzyl)-2-[N-methyl-perhydroazepinyl-(4)]-1-(2 H)-phthalazinone hydrochloride (azelastine)

Yoshie Inoue

Tokyo College of Food and Nutrition

A new compound, azelastine, 4-(p-chlorobenzyl)-2-[N-methyl-perhydroazepinyl-(4)]-1-(2 H)-phthalazinone hydrochloride, has recently been proved to be an effective antiallergy drug. It is quite different in its chemical structure from hitherto reported antiallergy drugs. In the present investigation, the inhibitory effects of azelastine against the immediate type allergic reactions in the guinea pig or the rat were studied in comparison with those of known antihistamine drugs, clemastine and chlorpheniramine. The results obtained were as follows:

1) The contraction of the small intestine isolated from the intact guinea pig or the rat by adding the histamine, bledykinin, serotonin, acetylcholine were remarkably inhibited by the pretreatment of azelastine.

2) The guinea pigs pretreated orally with a dose of 0.1 mg/kg of azelastine were completely protected from shock, resulting in death by a lethal dose of intravenous injection of histamine (1 mg). When the guinea pigs were pretreated with 1 mg/kg of azelastine 18 hours before the challenging injection of histamine, they were completely protected from shock death, and even if the pretreatment were done 24 h before the challenging injection the survival rate of them was 80%.

3) The inhibitory effect of azelastine against the induction of heterologous PCA in the guinea pig and homologous PCA in the rat was rather potent in comparison with that of clemastine or chlorpheniramine.

4) Histamine release from the rat peritoneal mast cells by compound 48/80 or anti-rat IgE serum seemed to be slightly inhibited by the pretreatment with azelastine at the concentration of 10^{-8} ~ 10^{-6} M.

The results indicate that azelastine has a more potent antiallergic effect than such antihistamine drugs as clemastine or chlorpheniramine.

Key words: antiallergy drug, heterologous PCA, histamine release from mast cells

緒 言

azelastine, 4-(p-chlorobenzyl)-2-[N-methyl-perhydroazepinyl-(4)]-1-(2 H)-phthalazinone hydro-

chloride は、既存の抗アレルギー剤とは全く異なる化学構造を有する新しい化合物で、動物において引き起こした種々のアレルギー反応の実験モデルに対してユニークな抑制効果を示すことが報告されている^{1,2)}。す

なわち、ラットを用いたマウス IgE 抗血清による heterologous passive cutaneous anaphylaxis (hetero PCA) を抑制すること¹⁾、モルモット平滑筋を用いた *in vitro* の実験において histamine による収縮に対して強く、かつ持続性のある拮抗性を有すること、およびラット腸間膜片の compound 48/80 による histamine の遊離を抑制することが報告されている²⁾。

そこで今回著者らは、即時型アレルギー反応および histamine に対する抑制効果を検討した。すなわち、即時型アレルギー反応には、抗アレルギー剤の clemastine, chlorpheniramine を比較対照に、受身全身性アナフィラキシー (heterologous PSA), 異種受身皮膚アナフィラキシー (heterologous PCA), 同種受身皮膚アナフィラキシー (homologous PCA), *in vitro* におけるアナフィラキシーの実験系として compound 48/80 および anti-IgE による肥満細胞のヒスタミンの遊離を、また histamine によるモルモットの全身性ヒスタミンショック防御効果ならびに *in vitro* における平滑筋収縮物質に対する抑制効果について検討した。

実験材料および方法

(1) 供試動物

日本生物材料センターより購入した体重 300 ± 30 g の Hartley 系雄性モルモット、体重 $120 \sim 150$ g 雌性ラットおよび体重 200 ± 20 g Wistar 系雄性ラットを使用した。

(2) Azelastine

エーザイ研究所より分与された 4-(p-chlorobenzyl)-2-[N-methyl-perhydroazepinyl-(4)]-1-(2H)-pht-halazinone hydrochloride を使用した。

clemastine fumarate (三共製薬), chlorpheniramine maleate (塩野義製薬), histamine dihydrochloride (Sigma chemical Co.), acetylcholine (第一製薬), bradykinin (大阪大学蛋白研究所), serotonin (Merck Ltd.), ヘキスロン (帝国臓器), egg albumine (生化学工業), bovine serum albumine (生化学工業), 2, 4-dinitro benzene sulfonic acid (和光純薬工業), evans blue (和光純薬工業), anti-rat IgE serum (Reserch Products Division), および compound 48/80 (Sigma chemical Co.) を使用した。

(3) Histamine ショック

体重 $200 \sim 300$ g のモルモットに histamine の 1 mg/kg を静注することによりモルモットは呼吸困難

によるショック死を呈する。防御効果実験として、histamine 静注の2時間前に、azelastine を $0.001 \sim 50$ mg/kg の濃度範囲で経口投与を行ってから致死量の histamine (1 mg/kg) 静注後の生存数を判定した。また、histamine 静注の 2, 18, 24, および 30 時間前に azelastine 1 mg/kg を経口投与し、前処置時間の相違による死亡率延長効果についても合わせて検討した。生死の判定は、惹起注射1時間で行い、実験例数は各群5例ずつ使用した。

(4) 平滑筋収縮

モルモット摘出回腸筋切片に種々の濃度の収縮誘発物質を添加すると一定した収縮の強さを示す。この平滑筋切片は酸素供給下、 37°C タイロッド溶液中につるし、収縮の程度を表記する Magnus 装置を用いた。収縮抑制実験は、あらかじめ平滑筋に *in vitro* で azelastine を添加、30 秒間放置、その後誘発物質を添加した場合の腸管収縮を調べ、その抑制効果を測定した。

1) Histamine および acetylcholine による腸片収縮

体重 $200 \sim 250$ g のモルモットから摘出した回腸筋切片を用いた。histamine $0.05 \sim 0.2$ $\mu\text{g/ml}$ による腸片収縮および acetylcholine 0.03 $\mu\text{g/ml}$ による腸片の収縮に対する抑制 % を算定した。

2) Bradykinin および serotonin による子宮片収縮

体重 $120 \sim 150$ g の雌性ラットに実験の前日に合成女性ホルモン剤のヘキスロン 5 mg を腹腔内に投与し、当日、子宮を摘出して実験に用いた。bradykinin は 0.005 $\mu\text{g/ml}$, serotonin は $0.02 \sim 0.5$ $\mu\text{g/ml}$ の濃度による平滑筋の収縮に対する抑制効果を検討した。

(5) Hetero PSA

体重 300 ± 30 g の Hartley 系雄性モルモット前肢に、あらかじめ pool した抗卵白アルブミンウサギ血清 (沈降抗体価 16 倍) 0.5 ml 静脈注射の18時間後に 2% 卵白アルブミン 0.5 ml で惹起注射を行うと全例が2分以内に転倒し、ほとんどが4分以内に死亡した。抑制実験は惹起注射の2時間前に、各抗アレルギー剤を 10 mg/kg および 50 mg/kg の割合で経口投与した。判定は惹起注射後1時間以上生存したものは致死を免れたものとした。なお実験例数は各群5例とした。

(6) 受身皮膚アナフィラキシー反応

1) Hetero PCA

体重 300 ± 30 g の Hartley 系雄性モルモット側部を剃毛し片側部3カ所に抗卵白アルブミンウサギ血清

を生理食塩水で、512, 1,024, および 2,048 倍に希釈したもの各 0.1 ml と生理食塩水 0.1 ml を皮内注射した。その3時間後に、1.5 mg の卵白アルブミンを含む 1% evans blue の溶液 0.75 ml を静脈内に注射し、30 分間放置した後、モルモットを脱血死させ、皮膚を剥離裏面より色素斑の長径と短径を測定した。この時、生理食塩水注射部位には色素漏出斑がないか、少なくとも 4 mm 以下であることを確認した。薬剤の処置は PCA 惹起反応の2時間前に 50 mg/kg を経口投与した。一方 azelastine については PCA 惹起反応の 1, 2, 4, および 8 時間前に経口投与を行い持続時間の検討を行った。

2) Homo PCA

DNP-BSA の作製は 2, 4-dinitrobenzene sulfonic acid (DNP) を精製して再結晶を得た^{3,4)}。この DNP と bovin serum albumine (BSA) を conjugate^{5,6)} させて作製し、感作は Ovary ら⁷⁾の方法に準じて行った。すなわち、体重 200 g のラットに、作製した DNP-BSA 1 mg/0.5 ml (0.9% NaCl) を筋肉内注射し、百日咳ワクチン (2×10^{10} /ml) 1 ml を皮下注射し感作した。感作後 12 日目に採血してラット IgE 抗血清を得た。ラット抗 DNP-BSA 血清を 32, 64, および 128 倍に生理食塩水で希釈したもの各 0.1 ml を体重 150 ± 20 g の Wistar 系雄性ラットの剃毛片側部の3ヵ所に皮内注射し (対照として生理食塩水 0.1 ml を使用した。), 24 時間後に 3 mg DNP-BSA を含む 2% evans blue 溶液の 0.4 ml を静脈内注射し、30 分間放置した後、ラットを脱血死させ、皮膚を剥離裏面より色素の漏出斑の長径と短径を測定した。なおこの時、生理食塩水注射部位には色素漏出斑がないか、少なくとも 4 mm 以下であることを確認した。薬剤の処置は PCA 反応惹起2時間前に 50 mg/ml を経口投与した。

(7) In vitro におけるアナフィラキシー反応

1) 肥満細胞の採取および分離

体重 300~400 g の正常両性 Wistar 系ラットをエーテル麻酔の後、放血致死させ BSS-A⁸⁾ 液 (135 mM NaCl, 1.7 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 mM KH_2PO_4 ; pH 6.0) 10 ml を腹腔内に注射する。3 分間腹部を静かにマッサージしてから腹壁を開口し、腹腔液を Ficoll を重層したプラスチック試験管に移した^{9,10)}。肥満細胞の精製は石坂ら¹¹⁾の方法に準じて行った。細胞数は 2.0×10^6 cell/ml に調製して実験を行った。

2) Compound 48/80 および anti-IgE による his-

tamine の遊離

調製した肥満細胞 200 μl に anti-rat IgE serum 50 倍希釈液, compound 48/80 の 0.1, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の各 200 μl を加え、37°C で anti-IgE は 15 分間、48/80 は 10 分間インキュベイトの後、直ちに冷 BSS-B⁸⁾ 液 [BSA 1 mg/ml を含む BSS-B (144 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.9 mM CaCl_2 , 4.7 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.0 mM KH_2PO_4 ; pH 7.0)] 2.4 ml を加えて反応を停止し、1,200 rpm 10 分間遠心分離し、上清と沈渣には H_2O 3 ml を加えたものを 24 時間冷凍し、histamine enzymatic isotopic assay 法にて上清および沈渣中のヒスタミン含量を測定した^{12,13)}。抑制実験は細胞崩壊物質の添加前に本剤の $10^{-8} \sim 10^{-6}$ M で 37°C 10 分間肥満細胞を前処置しておいた。肥満細胞からのヒスタミン遊離量および抑制は次の計算式にて求めた。

ヒスタミン遊離%

$$= \frac{\text{上清中の遊離ヒスタミン量}}{\text{上清中の遊離ヒスタミン量} + \text{沈渣中のヒスタミン量}} \times 100$$

$$\text{ヒスタミン抑制\%} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A: ヒスタミン遊離物質による遊離率

B: 薬剤処置による遊離率

結 果

1. Histamine ショックに対する azelastine の防御効果の検討

モルモットの静脈内へ histamine を 1 mg/kg の割合で注射すると、1 分 45 秒から3分以内に全例がショック死をきたした。azelastine の 0.001~50 mg/kg を2時間前に投与しておくことによるショック死から

Table 1 Protective effect of pretreated azelastine at different dose levels against histamine shock

Dosage of azelastine*	No. of survival /No. tested	Surviving rate (%)
50 mg/kg	10/10	0
10 mg/kg	5/5	100
1 mg/kg	5/5	100
0.1 mg/kg	5/5	100
0.01 mg/kg	2/5	40
0.001 mg/kg	1/5	20

Remarks: *Azelastine was orally administered 2 h before challenging injection. Histamine dihydrochloride (1 mg) was intravenously injected as the challenging injection.

Table 2 Protective effect of azelastine (1 mg/kg) against histamine shock at different time after pretreatment

Time of pretreatment*	Surviving rate
2 hours before	5/5
18 hours before	5/5
24 hours before	4/5
30 hours before	0/5

Remarks : *Azelastine (1 mg/kg) was orally administered 2~30 h before challenging injection of histamine (1 mg).

の防御効果を検討した。

本剤は 0.1 mg/kg の前処置によって histamine によるショック死を 100% 防御した。この場合の ED_{50} 値は 0.001~0.1 mg/kg の間にあった。また、前処置の時間を 2 時間から 30 時間の間で変えて検討した。

18 時間の処置でも histamine ショック死を完全に防御した。しかし 30 時間前では全く防御できなかったが、24 時間前投与では 5 匹中 4 匹が生存し防御率 80% を示した。

2. Histamine, acetylcholine, bradykinin

および serotonin による平滑筋収縮に対する azelastine の抑制効果の検討

(1) In vitro における histamine による平滑筋収縮に対する拮抗作用の検討

histamine 0.2 μ g/ml によるモルモット回腸筋切片の収縮に対して、azelastine は 0.05 μ g/ml 濃度で 100%, 同じく 0.005 μ g/ml 濃度で 50%, 0.0005 μ g/ml 濃度で 10% の抑制率を、また histamine 0.05 μ g/ml 濃度の収縮に対しては 0.001 μ g/ml 濃度で平滑筋収縮を 45%, 0.005 μ g/ml 濃度では 10% 抑制した。この際の ED_{50} 値は 0.0036 μ g/ml であった。

(2) In vitro における acetylcholine による平滑筋収縮に対する拮抗作用の検討

acetylcholine 0.03 μ g/ml によるモルモット回腸切片の収縮に対して、azelastine は 5.0 μ g/ml 濃度で 60%, 1.0 および 0.5 μ g/ml では 10% の抑制, 0.1 μ g/ml では抑制なく、 ED_{50} 値は 4.0 μ g/ml であった。

(3) In vitro の bradykinin による平滑筋収縮に対する拮抗作用の検討

bradykinin 0.005 μ g/ml 濃度によるラット子宮切片の収縮に対して、azelastine は 10 μ g/ml 濃度で 70%, 5 μ g/ml 濃度で 25% の抑制, 1 μ g/ml では抑制効果

Table 3 Inhibitory effect of azelastine against smooth muscle contraction by histamine

Concentration of histamine	Dose of azelastine	Inhibition %
0.2 μ g/ml	0.0001 μ g/ml	0
	0.0005 μ g/ml	10
	0.001 μ g/ml	25
	0.005 μ g/ml	50
	0.01 μ g/ml	60
	0.05 μ g/ml	100
0.05 μ g/ml	0.0005 μ g/ml	10
	0.001 μ g/ml	45

Remarks : ED_{50} of azelastine against histamine contraction (0.2 μ g/ml) was 0.0036 μ g/ml.

Table 4 Inhibitory effect of azelastine against smooth muscle contraction by acetylcholine

Concentration of acetylcholine	Dose of azelastine	Inhibition %
0.03 μ g/ml	0.05 μ g/ml	0
	0.1 μ g/ml	0
	0.5 μ g/ml	10
	1.0 μ g/ml	10
	5.0 μ g/ml	60

Remarks : ED_{50} of azelastine against acetylcholine contraction (0.03 μ g/ml) was 4.0 μ g/ml.

Table 5 Inhibitory effect of azelastine against smooth muscle contraction by bradykinin

Concentration of bradykinin	Dose of azelastine	Inhibition %
0.005 μ g/ml	1 μ g/ml	0
	5 μ g/ml	25
	10 μ g/ml	70

Remarks : ED_{50} of azelastine against bradykinin contraction (0.005 μ g/ml) was 7.8 μ g/ml.

なく、 ED_{50} は 7.8 μ g/ml であった。

(4) In vitro の serotonin による平滑筋収縮に対する拮抗作用の検討

serotonin 0.02 μ g/ml によるラット子宮切片の収縮に対して、本剤は 0.1 μ g/ml で 80%, 0.05 μ g/ml で 30%, 0.01 μ g/ml では 20% の抑制があり、serotonin 0.1 μ g/ml の収縮に対しては 1 μ g/ml では 70%, 0.1 μ g/ml で 50% の抑制を、serotonin 0.5 μ g/ml による収縮に対しては 0.5 μ g/ml で 40%, 0.1 μ g/ml で 25% の抑制を示した。抗 serotonin 活性は ED_{50} 値で 0.27 μ g/ml であった。

平滑筋収縮誘発物質に対する azelastine の作用を

Table 6 Inhibitory effect of azelastine against smooth muscle contraction by serotonin

Concentration of serotonin	Dose of azelastine	Inhibition %
0.02 $\mu\text{g/ml}$	0.005 $\mu\text{g/ml}$	20
	0.01 $\mu\text{g/ml}$	20
	0.05 $\mu\text{g/ml}$	30
	0.1 $\mu\text{g/ml}$	80
0.1 $\mu\text{g/ml}$	0.05 $\mu\text{g/ml}$	20
	0.01 $\mu\text{g/ml}$	20
	0.1 $\mu\text{g/ml}$	50
	1.0 $\mu\text{g/ml}$	70
0.5 $\mu\text{g/ml}$	0.1 $\mu\text{g/ml}$	25
	0.5 $\mu\text{g/ml}$	40

Remarks : ED_{50} of azelastine against serotonin contraction (0.1 $\mu\text{g/ml}$) was 0.273 $\mu\text{g/ml}$.

ED_{50} 値と比較すると, 抗 histamine 活性は 0.0036 $\mu\text{g/ml}$ ときわめて強力な作用を示した. 抗 acetylcholine 活性は 4.0 $\mu\text{g/ml}$, 抗 bradykinin 活性は 7.8 $\mu\text{g/ml}$ と低く, 抗 serotonin 活性は 0.273 $\mu\text{g/ml}$ であったが, 抗 histamine 活性に比べれば 1/100 であった.

3. 即時型アレルギー反応に対する抑制効果の検討

(1) Hetero PCA に対する抑制効果

抗卵白 アルブミンウサギ血清の 1 ml をモルモットの静脈内へ注射し, 18 時間後に 2% 卵白アルブミンの 0.5 ml で惹起注射を行うと, 1~2 分以内に転倒し約 4 分以内に全例が死亡した. そこで惹起注射の 2 時間前に, 薬剤を 10 mg/kg および 50 mg/kg の割で経口投与した. なお惹起注射により転倒し重篤症状を呈しながらも 1 時間以上生存したものは生存例として扱った.

いずれの薬剤も, 50 mg/kg の割であらかじめ投与しておいた際は呼吸困難によるショック死を完全に阻止した. 10 mg/kg では azelastine および chlorpheniramine の場合ともに 5 匹中 4 匹の生存で 80% の防御率を示したが, clemastine は 60% の防御率であった.

(2) 受身皮膚アナフィラキシー反応に対する抑制効果の検討

Table 7 Protective effect of azelastine against anaphylactic shock in the passively sensitized guinea pig

Group	Doses of pretreated	No. of survival / Test animals	Survival rate %
Control	Saline	0/10	0
Azelastine	50 mg/kg	5/5	100
	10 mg/kg	4/5	80
Chlorpheniramine	50 mg/kg	5/5	100
	10 mg/kg	4/5	80
Clemastine	50 mg/kg	5/5	100
	10 mg/kg	3/5	60

1) Hetero PCA に対する効果

モルモットの PCA に対する azelastine の効果を検討した. すなわち, 抗卵白アルブミンウサギ血清の 512, 1,024 および 2,048 倍希釈液の各 0.1 ml を皮内注射し, 抗原注射の 2 時間前に薬剤を経口投与し, PCA に対する抑制を, 他剤のそれと比較検討した.

いずれの薬剤も反応強度に応じて抑制を示し, 1,024

Table 8 Inhibitory effect of azelastine to heterologous PCA in the guinea pig

Group	Pretreatment	PCA (Ave. diameter)		
		$\times 512$	$\times 1,024$	$\times 2,048$
Control	None	15.3 $\pm$ 1.61	13.5 $\pm$ 2.13	10.6 $\pm$ 3.59
Azelastine 50 mg/kg	Before 1 h	9.5 $\pm$ 4.44	6.9 $\pm$ 4.33	4.7 $\pm$ 3.93
	Before 2 h	9.1 $\pm$ 2.57	2.4 $\pm$ 4.41	1.7 $\pm$ 3.03
	Before 4 h	11.5 $\pm$ 1.58	3.9 $\pm$ 4.10	2.2 $\pm$ 3.89
	Before 8 h	12.7 $\pm$ 2.15	9.3 $\pm$ 3.56	6.5 $\pm$ 1.79
Chlorpheniramine 50 mg/kg	Before 2 h	10.5 $\pm$ 3.13	4.6 $\pm$ 4.09	0
Clemastine 50 mg/kg	Before 2 h	11.8 $\pm$ 2.09	9.0 $\pm$ 4.15	3.4 $\pm$ 4.22

Remarks : Figure indicate the average diameters of maximal and minimal axis $\pm$ standard error (S.E.). 7~13 animals were used in each group.

Table 9 Inhibitory effect of azelastine to homologous PCA in the rat

Group	Pretreatment	PCA (Ave. diameter)		
		$\times 32$	$\times 64$	$\times 128$
Control	None	18.2 $\pm$ 2.11	17.1 $\pm$ 1.37	16.1 $\pm$ 1.35
Azelastine	50 mg/kg	12.6 $\pm$ 1.40	11.3 $\pm$ 0.65	1.5 $\pm$ 2.6
Chlorpheniramine	50 mg/kg	15.1 $\pm$ 1.34	13.6 $\pm$ 1.57	10.5 $\pm$ 4.15
Clemastine	50 mg/kg	14.8 $\pm$ 0.95	13.6 $\pm$ 1.07	9.5 $\pm$ 3.35

Remarks : Figure indicate the average diameters of maximal and minimal axis $\pm$ standard error (S.E.). 7~8 animals were used in each group.

倍希釈血清を用いた場合は azelastine が最も強い 82% ($p < 0.05$) の抑制を示し、次いで chlorpheniramine では 66% ($p < 0.001$) の抑制で各々有意の抑制効果を示した。

azelastine については処置時間を 1, 2, 4 および 8 時間に延長した場合の効果についても検討した。2 時間前処置が 82% ($p < 0.05$) という最も強い抑制効果を示し、4 時間前では 71% ($p < 0.01$)、8 時間前になると 31% ($p < 0.01$) と有意な抑制効果を示した。

2) Homo PCA に対する効果

ラット IgE 抗血清によるラットの 24 時間 PCA に対する azelastine の抑制効果を検討した。すなわち、抗 DNP-BSA ラット血清の 32, 64 および 128 倍希釈液を各 0.1 ml 皮内注射後、抗原惹起の 2 時間前に azelastine を 50 mg/kg の割で経口投与し、他剤と比較検討した。

ラットの場合もモルモットと同様にいずれの薬剤も惹起された反応の強度に応じる抑制効果を示した。64 倍希釈血清を用いた場合では、azelastine が最も強い抑制効果 34% ($p < 0.001$) を示し、clemastine, chlorpheniramine ではともに 20% ($p < 0.001$) といずれも有意な抑制を示した。

4. Anti-rat IgE, compound 48/80 による肥胖細胞からのヒスタミンの遊離抑制効果

分離正常ラット肥胖細胞に anti-rat IgE および compound 48/80 で 37°C のインキュベーションを行うと肥胖細胞からヒスタミンが遊離した。この際のヒスタミン遊離率は anti-rat IgE 血清の 160 倍希釈液では 42.3%, compound 48/80 の 0.1 $\mu\text{g/ml}$ で 29.4%, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ では 67.2% であった。azelastine 10^{-8} ~ 10^{-6} M で 10 分前にインキュベートしておくことによる肥胖細胞からのヒスタミン遊離の抑制効果を検討した。

azelastine 10^{-8} M は、ラット肥胖細胞から 98% のヒスタミンが遊離した。しかし 10^{-8} ~ 10^{-4} M 濃度では自然ヒスタミン遊離による 4.1% の範囲内であった。anti-rat IgE に対する効果は 10^{-8} M で 14.7%, 10^{-6} M では 10.0% とヒスタミン遊離を抑制した。一方 compound 48/80 0.1 $\mu\text{g/ml}$ に対する抑制率は、 10^{-8} M で 30.3% ($p > 0.05$)、 10^{-6} M で 29.3% ($p > 0.05$) 抑制し、0.5 $\mu\text{g/ml}$ では 10^{-6} M の 8.3% ($p > 0.05$) 抑制したが、推計学的には有意差は認め

Table 10 Inhibitory effect of azelastine against histamine release by anti-rat IgE serum in rat mast cells in vitro

Azelastine	Histamine release (%) Ave.	Inhibition of histamine release (%)
None	34.7 $\pm$ 3.55	—
10^{-8} M	29.6 $\pm$ 1.35	14.7
10^{-7} M	30.4 $\pm$ 2.25	12.4
10^{-6} M	31.2 $\pm$ 2.48	10.0

Remarks: Figure indicate the average of histamine release percent $\pm$ standard error (S.E.). Three experiments were repeated in each group.

Table 11 Inhibitory effect of azelastine against histamine release by compound 48/80 (0.1 $\mu\text{g/ml}$) in rat mast cells in vitro

Azelastine	Histamine release (%) Ave.	Inhibition of histamine release (%)
None	29.4 $\pm$ 7.33	—
10^{-8} M	20.5 $\pm$ 7.10	30.3
10^{-7} M	28.3 $\pm$ 1.89	3.7
10^{-6} M	20.8 $\pm$ 10.11	29.3

Remarks: Figure indicate the average of histamine release percent $\pm$ standard error (S.E.). Three experiments were repeated in each group.

Table 12 Inhibitory effect of azelastine against histamine release by compound 48/80 (0.5 $\mu\text{g/ml}$) in rat mast cells in vitro

Azelastine	Histamine release (%) Ave.	Inhibition of histamine release (%)
None	67.2 $\pm$ 4.85	—
10^{-8} M	71.1 $\pm$ 6.64	—
10^{-7} M	64.8 $\pm$ 1.80	3.5
10^{-6} M	61.6 $\pm$ 7.80	8.3

Remarks: Figure indicate the average of histamine release percent $\pm$ standard error (S.E.). Three experiments were repeated in each group.

られなかった。

考 察

azelastine の平滑筋収縮物質に対する抑制作用においては特に histamine に対して強力な拮抗作用を有しており、ED₅₀ は 0.0036 $\mu\text{g/ml}$ であった。serotonin に対しては 0.273 $\mu\text{g/ml}$ 、これは抗 serotonin 作用の約 1/100 の量に相当し、histamine に特に強い拮抗作用を示した。一方 azelastine の 0.1 mg/kg の経口投

与による前処置でモルモットにおける致死量の histamine 投与によるショック死は完全に防御された。また、薬剤処置後惹起注射までの時間を 18 時間に延長しても 100% 防御し、24 時間後でも 80% の防御率を示した。これらの結果から azelastine には histamine に対して強い拮抗性および持続性があることが実証された。同様のことは、Tasaka ら²¹⁾もモルモット回腸筋切片の histamine による収縮に対して他剤に比べ効果があったことが報告されている。

H₁-レセプターブロック剤はモルモットのアナフィラキシー反応を抑制することが知られている。即時型 hetero PSA について、H₁ ブロック剤の clemastine, chlorpheniramine と比較検討した。すべての薬剤が 50 mg/kg 経口投与によってモルモットのショック死を完全に阻止した。しかし、10 mg/kg では azelastine は他剤に比べより強い防御効果があった。Tatumi ら¹⁴⁾は、¹⁴C-標識 azelastine のモルモットおよびラットの組織分布は長時間の 24 時間後でも肺に残存していることを報告している。このことは、先の histamine およびアナフィラキシーにおけるモルモットの呼吸困難によるショック死を完全に防御できたこと、また薬剤処置後の時間を 18 時間に延長しても histamine によるショック死を完全に防御したことを裏付けるものである。

皮膚アナフィラキシー反応に対する抑制効果を clemastine および chlorpheniramine と比較検討した結果、hetero および homo PCA のいずれに対しても azelastine の効果がより顕著であった。homo PCA に対しては、azelastine は抑制率 34% ($p < 0.001$) で、clemastine, chlorpheniramine は 20% ($p < 0.001$) の抑制と azelastine により強い抗アレルギー効果が認められた。Kaji ら¹³⁾は、azelastine 5 mg/kg 以上の静脈注射により hetero PCA (抗マウスハプテン IgE 血清をラットに感作) を 100% 近く抑制したと報告している。

hetero PCA においては薬剤処置時間の延長効果についても検討した。すなわち 2 時間前処置の場合 82% ($p < 0.05$)、8 時間前処置の場合は 31% ($p < 0.01$) の抑制を示し時間の延長とともに抑制効果は軽度になった。

Mota, Humphrey ら^{15,16)}はモルモットのアナフィラキシー反応によるヒスタミンの遊離と肥満細胞からの遊離は相関関係にあることを、また compound 48/80 による正常ラット肥満細胞の崩壊が感作肥満細胞にお

ける抗原抗体の反応機構と類似していることを^{17,18)}、anti-IgE が細胞からのヒスタミンを遊離させるとの報告^{19~22)}がある。

本実験においても compound 48/80 の 0.1 μ g/ml および 0.5 μ g/ml の添加により、それぞれ 29.4, 67.2% のヒスタミンが遊離し、anti-rat IgE 血清の 150 倍希釈液では 34.7% の遊離があった。azelastine の 10^{-8} ~ 10^{-4} M は compound 48/80 0.1 μ g/ml および anti-rat IgE によるヒスタミンの遊離を軽度ながら抑制する傾向がみられたが、推計学的には有意差は認められなかった。Tasaka ら²¹⁾は、compound 48/80 50 μ g/ml によるラット腸間膜片からのヒスタミンの遊離が azelastine 10^{-4} ~ 10^{-8} mg/ml の処置により抑制されたが、 10^{-8} mg/ml 以上の投与ではヒスタミンが遊離したとの報告と類似している。また、ラット子宮およびイヌの皮膚切片の実験において、抗ヒスタミン剤は低濃度では抑制するが高濃度になると抑制しないという報告^{23,24)}があるが、azelastine もこれら抗ヒスタミン剤的な性状を示した。

結 論

抗アレルギー剤として開発された azelastine について、即時型アレルギー反応および histamine に対する抑制効果の検討を行った。すなわち、即時型アレルギー反応に対する抑制実験には、抗アレルギー剤の clemastine, chlorpheniramine を比較対照に、受身全身性アナフィラキシー、hetero PCA, homo PCA, さらに anti-rat IgE 血清、compound 48/80 による肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制効果について検討し、次の結果を得た。

1) in vitro の平滑筋収縮抑制作用としては histamine に対し最も強い抑制活性を示し、その活性は抗 serotonin 作用の 100 倍であった。

2) 0.1 mg/kg の経口投与で致死量の histamine によるショック死を完全に防御した。さらに処置時間を延長しても 18 時間までは 100%、24 時間延長では 80% の防御率を示し、本剤の効力持続性が認められた。

3) hetero PSA および hetero PCA に対して抑制効果を示し、その抑制効果は対照抗ヒスタミン剤として用いた clemastine および chlorpheniramine に比較してより顕著であった。

4) homologous PCA に対しては、azelastine は 31% ($p < 0.001$)、clemastine および chlorphenira-

mine は 20% ($p < 0.001$) の抑制を示し azelastine より強い効果が認められた。

5) compound 48/80 $0.1 \mu\text{g/ml}$ によるラット肥細胞よりのヒスタミンの遊離は azelastine の $10^{-8} \sim 10^{-6} \text{ M}$ の処置により軽度の抑制効果がみられた。

稿を終わるにあたり、本研究にご協力くださいました日本医科大学微生物学免疫学教室野呂瀬嘉彦助手、中川洋子副手および教員各位に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Kaji, R., Kamijo, T., and Kojima, S.: Inhibitory effects of a new antiallergic agent, azelastine, on passive cutaneous anaphylaxis and expulsion of *nippostrongylus brasiliensis*. *Immunopharmacology*, **3**, 49~52, 1981.
- 2) Tasaka, K., and Akagi, K.: Anti-allergic properties of a new antagonist, 4-(p-chlorobenzyl)-2-[N-methyl-perhydroazepinyl-(4)]-1-(2H)-phthalazinone hydrochloride (azelastine). *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **29**, 488~493, 1979.
- 3) Herman, N.E., and Russell, J.: *Methods in immunology and immunochemistry*. Vol. 1, p. 128~131, Academic Press, New York, London, 1967.
- 4) 幅真二, 浜岡理己: 免疫実験操作法. p. 865, 日本免疫学会, 金沢, 1974.
- 5) Eisen, H.N., Belman, S., and Carsten, M.E.: The reaction of 2, 4-dinitrobenzenesulfonic acid with free amino groups of proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4583~4585, 1953.
- 6) Ovary, Z., and Benacerraf, B.: Immunological specificity of the secondary response with dinitrophenylated proteins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **114**, 72~76, 1963.
- 7) Ovary, Z., Caiazza, S., and Kojima, S.: PCA reactions with mouse antibodies in mice and rats. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **48**, 16~21, 1975.
- 8) Per, E. A., and Gunnar, D.: Effect of norepinephrine on in vitro histamine release from rat mast cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **6**, 60~76, 1979.
- 9) Uvnas, B., and Thon, I. L.: Isolation of "Biologically intact" mast cells. *Exp. Cell Res.*, **18**, 512~520, 1959.
- 10) Uvnas, B., and Thon, I.L.: Evidence for enzymatic histamine release from isolated rat mast cells. *Exp. Cell Res.*, **23**, 45~57, 1961.
- 11) Ishizaka, T., Konig, W., and Ishizaka, K.: Immunologic properties of mast cells from rats infected with *nippostrongylus brasiliensis*. *J. Immunol.*, **115**, 1078~1083, 1966.
- 12) Snyder, S. H., Baldessarini, R. J., and Axelrod, J.: A sensitive and specific enzymatic isotopic assay for tissue histamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **153**, 544~549, 1966.
- 13) Beaven, M. A., Jacobsen, S., and Horáková, Z.: Modification of the enzymatic isotopic assay of histamine and its application to measurement of histamine in tissues, serum and urine. *Clin. Chim. Acta*, **37**, 91~103, 1972.
- 14) Tatumi, K., Ou, T., Yamada, H., and Yoshimura, H.: Studies on metabolic fate of a new antiallergic agent, azelastine (4-(p-chlorobenzyl)-2-[N-methyl-perhydroazepinyl-(4)]-1-(2H)-phthalazinone hydrochloride). *Jpn. J. Pharmacol.*, **30**, 37~48, 1980.
- 15) Mota, I.: Mast cells and anaphylaxis. *J. Physiol.*, **140**, 6, 1958.
- 16) Humphrey, J.H., and Mota, I.: The mechanism of anaphylaxis; Specificity of antigen-induced mast cell damage in anaphylaxis in the guinea pig. *Immunology*, **2**, 31~43, 1959.
- 17) Mota, I., and Ishi, Y.: Inhibition of mast cell disruption and histamine release in rat anaphylaxis in vitro comparison with compound 48/80. *Br. J. Pharmacol.*, **15**, 82~83, 1960.
- 18) Orr, T. S. C., Hall, D. H., Gwilliam, J. M., and Cox, J. S. C.: The effect of disodium cromoglycate on the release of histamine and degranulation of rat mast cells induced by compound 48/80. *Life Sci.*, **10**, 805~812, 1971.
- 19) Ishizaka, K., Tomioka, H., and Ishizaka, T.: Mechanisms of passive sensitization. 1. Presence of IgE and IgG molecules of human leukocytes. *J. Immunol.*, **105**, 1459~1467, 1970.
- 20) Ishizaka, T., Ishizaka, K., and Tomioka, T.: Release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis by IgE-anti-IgE reaction on monkey mast cells. *J. Immunol.*, **108**, 513~520, 1972.
- 21) Kulczucki, A., Jr., Isersky, C., and Metzger, H.: The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells. 1. Evidence for specific binding of IgE. *J. Exp. Med.*, **139**, 600~616, 1974.
- 22) Conrad, D.H., Bazin, H., Sehon, A.H., and Friese, A.: Binding parameters of the interaction between rat IgE and rat mast cell receptors. *J. Immunol.*, **114**, 1688~1691, 1975.
- 23) Ash, A. F. S., and Schild, H.O.: Receptors mediating some actions of histamine. *Br. J. Pharmacol.*, **27**, 427~439, 1966.
- 24) 田坂賢二: 抗 Histamine 剤の Histamine 遊離作用と遊離抑制作用. *日薬理誌*, **53**, 1029~1035, 1957.

(受付: 1982 年 10 月 13 日)