能動感作モルモットの抗原曝露による 気道反応性亢進における thromboxane A_2 の役割と肺血管傷害の関与

有村昭典・浅沼富士夫・黒澤 淳・城山博邦*

Role of thromboxane A_2 in the development of antigen-induced long-lasting bronchial hyperresponsiveness in actively sensitized guinea pigs

Aerosol antigen challenge augmented the bronchial responsiveness to acetylcholine in guinea pigs actively sensitized with ovalbumin aerosol, which became significant 7 h and persisted for at least 120 h after antigen exposure as compared to saline treated animals. When orally administered to guinea pigs 1 h before antigen challenge, the specific thromboxane(Tx) A_2 receptor antagonist S-1452(10 mg/kg) almost completely inhibited the development of bronchial hyperresponsiveness, as assessed 24 h after antigen exposure. However, it was ineffective, when administered at 1 or 22 h post-challenge. Acute lung hemorrhagic vascular injury was observed immediately after antigen challenge, when marked production of TxB_2 was observed in the bronchoalveolar lavage fluid, and was dramatically suppressed by pretreatment with S-1452 at doses required to inhibit the bronchial hyperresponsiveness. These findings suggest that acutely and transiently generated TxA_2 contribute to the onset of aerosol antigen-induced long-lasting bronchial hyperresponsiveness in actively sensitized guinea pigs, probably by producing lung vascular damage.

Akinori Arimura・Asanuma Fujio・
Atsushi Kurosawa・Hirokuni Jyoyama*

**key words : S-1452, Thromboxane A_2 ,
bronchial hyperresponsiveness,
hemorrhagic lung vascular injury**

気管支喘息の基本的病態の一つである気道過敏性は、気道粘膜の損傷や気道炎症によって発現され、疾患の重症化難治化に寄与していることが知られている。近年、気道過敏性の発現に TxA_2 が重要な役割を演じていることが、抗原あるいは種々の炎症性の刺激によって惹起した動物モデ

ル¹⁻⁵⁾、さらには喘息患者⁶⁾において明らかにされつつある。

S-1452 は、選択的な TxA_2 受容体の拮抗薬として開発され^{7,8)}、経口可能な化合物であり、その薬理作用は強力でしかも持続的である⁹⁾。筆者らは、本化合物がモルモットのアナフィラキシー反応による気道収縮反応を著明に抑制し^{9,10)}、さらに LPS 吸入¹¹⁾や受動感作動物に抗原を静注して惹起した気道過敏性を著明に抑制すること¹⁰⁾から、気管支喘息の治療薬として有用であることを報告してきた。

本研究では、気道過敏性の成立における TxA_2 の役割を解明する目的で、抗原の反復吸入によって感作したモルモットに抗原を曝露して惹起される持続的な気道過敏性に対する S-1452 の作用を種々のタイミングで投与を行い検討した。

方 法

(1) 抗原反復吸入による感作および抗原曝露による気道過敏性モデル

体重 400~600 g の Hartley 系雄性モルモット(日本チャールスリバー社)に 1 週間おきに 2 回 1% OA(Grade III, Sigma 社)溶液を超音波ネブライザー TUR-3200(日本光電)にて 10 分間吸入させて感作した。また、1% OA 溶液のかわりに生理食塩水を同様に 2 回吸入させた動物を非感作動物とした。

2 回目の吸入 1 週間後に、抗ヒスタミン薬であるジフェンヒドラミン(10 mg/kg)を腹腔内に注射したあと、1% OA 溶液を 5 分間曝露してチャレンジした。また、抗原チャレンジの前に感作のモルモットから一部血液を採取し、血清中の抗 OA IgG1 抗体および IgE 抗体価をモルモットの 4 時間および 8 日間 PCA によって測定した。

* Discovery Research Laboratories II, Shionogi & Co., LTD 塩野義製薬創薬第二研究所

(2) アセチルコリン(ACh)に対する気道反応性の測定

気道反応性はウレタン(2 g/kg, i. p.)麻酔下でモルモットに、3.1, 6.3, 12.5, 25, 50 および 100 $\mu\text{g/kg}$ の ACh を低濃度より順次 5 分間隔で静脈内に投与し、直後に生じる気道抵抗の増大を Konzett-Rössler 法¹²⁾を改良した気道抵抗測定装置を用いて測定し、その最大収縮高を指標に ACh の用量反応曲線を作成して評価した。

(3) 気管支肺胞洗浄液(BALF)中の TxB_2 および 6-keto-PGF $_1\alpha$ 量および炎症性細胞の測定

モルモットを過剰のウレタン(5 g/kg, i. p.)によって致死させ、気管を切開、気管カニューレを装着し、10 $\mu\text{g/ml}$ のインドメタシンを含む生理食塩水 10 ml を用いて気道内に注入・吸引を 3 回反復して肺胞洗浄(BAL)した。採取した BALF 中の総炎症性細胞数を血球計算盤でカウントしたあと、ただちに 4°C で 300 $\times$ g, 10 分間遠心し、その上清を -20°C に保存した。細胞画分の一部を塗抹標本とし、May-Grünwald Giemsa 染色し、500 個以上の細胞を観察して細胞分類を行った。BALF 中の TxB_2 および 6-keto-PGF $_1\alpha$ 量は SEP-PAK C_{18} カラムで抽出したあと RIA(NEN 社)で定量した。

(4) 肺血管傷害の測定

肺血管傷害は、肺血管透過性の亢進と気道内への血球成分の侵入および肺組織学的検査によって評価した。すなわち、肺血管透過性の亢進はエバンスブルー(30 mg/kg)を静脈内に投与し、その 6 分後にモルモットを放血致死させ、BALF 中の色素量を OD 620 nm で吸光度を測定することにより求めた。気道内に侵入した赤血球は、ヘモグロビンテスト・ワコーキット(和光純薬)を用いて BALF 中のヘモグロビン量を定量して評価した。また、肺組織は、1%の paraformaldehyde 100 ml を右心室から肺動脈に挿入したカニューレより肺を灌流固定したのち摘出した。その後 10%のリン酸緩衝ホルマリンで固定し、切片を HE 染色して光学顕微鏡にて観察した。

(5) 統計学的解析

数値は平均 $\pm$ 標準誤差で表示し、有意差検定は Student's t-test, あるいは Dunnet's multiple

図1 Time course of bronchial hyperresponsiveness after aerosol antigen challenge in actively sensitized guinea pigs

Bronchial responsiveness was assessed before and 4, 7, 24, 48 and 120 h after the exposure to OA aerosol in unsensitized($\circ$) or actively sensitized guinea pigs($\bullet$). Each value represents the mean $\pm$ SE for seven or eight guinea pigs. *, ** Significantly different from time-matched unsensitized group at $P<0.05$ and 0.01 , respectively.

range test によって行った。

結果

(1) 抗原曝露後の気道反応性の経時的変化

抗原の反復吸入によって感作したモルモットの血清中の抗 OA IgG1 抗体価は、12 例の平均で 27.3 ± 0.3 倍であったが、IgE 抗体価は 4 倍以下であった。気道反応性は、抗原曝露前、感作および非感作モルモットの間で有意な差は認められなかったが、曝露 7 時間後より感作モルモットの気道反応性が非感作モルモットのそれに比し有意に亢進し、24 から 48 時間でピークを示し、少なくとも 120 時間まで持続的に亢進した(図 1)。

(2) BALF 中の炎症性細胞数の経時的変化

感作モルモットの BALF 中の総細胞数は、抗原曝露前すでに非感作モルモットのそれに比べ約 2 倍増加しており、特に好酸球と好中球の増加が

図2 Time course of changes in total and differential cell counts in BALF after aerosol antigen challenge in actively sensitized guinea pigs

BAL was performed before and 4, 7, 24, 48 and 120 h after antigen challenge in sensitized guinea pigs, and also performed in unsensitized guinea pigs for comparison. The results are expressed as mean $\pm$ SE for seven or eight animals. *, ** Significantly different from prechallenge value at $P < 0.05$ and 0.01 , respectively.

顕著であった(図2)。

抗原曝露後、感作モルモットの総細胞数は7時間後より持続的に増加した。細胞別にみると、マクロファージが曝露後4時間より持続的に増加し、好酸球は逆に7時間後をピークに一度低下したのち、120時間後で再び有意に増加した。好中球およびリンパ球は24時間後をピークに軽度の増加が認められた。図には示していないが、非感作モルモットでは抗原曝露しても細胞の変化は認められなかった。

(3) TxB_2 および $6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$ 産生の経時的変化(図3)

感作モルモットのBALF中の TxB_2 は非感作モルモットのそれにくらべ抗原曝露後一過性に増加したが、24時間後では曝露前の値にまで回復した。また、 $6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$ は逆に抗原曝露後低下する傾向を示した。

(4) S-1452の気道過敏性、炎症性細胞の浸潤およびPG類の産生に対する作用

抗原曝露24時間後の気道過敏性に対するS-1452の作用を抗原曝露1時間前、曝露1時間後および22時間後の3通りのタイミングで経口投与して検討を行った。抗原曝露前に投与した場合、S-1452は1~10 mg/kgで用量依存的に気道過敏性を抑制したが、曝露後に投与した場合、10 mg/

kgを投与しても全く抑制しなかった(図4)。

また、成績は示していないが、抗原曝露後24時間の炎症細胞の浸潤および3分後の TxB_2 の著明な増加に対し、S-1452(10 mg/kg)の前処置はまったく影響を及ぼさなかった。

(5) 肺血管傷害の経時的変化およびS-1452の抑制作用

感作モルモットに抗原を曝露すると、BALF中のエバンスブルーおよびヘモグロビン量が曝露後3分をピークに著明に増加した(図5)。その後、エバンスブルー量は速やかに前値にまで回復したが、ヘモグロビン量は24時間後でも前値にくらべ有意に増加していた。

一方、非感作モルモットのエバンスブルーおよびヘモグロビン量は、抗原曝露前および曝露後3分の間で有意な変化は認められなかった(エバンスブルー： 0.13 ± 0.02 vs $0.13 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$ ；ヘモグロビン： 0.96 ± 0.12 vs $0.84 \pm 0.18 \text{ mg/ml}$)。

また、感作モルモットの抗原曝露後3分の肺組織像を観察したところ、肺胞あるいは気管支内に赤血球を多く認め、血管傷害像が確認された(図6)。

S-1452(10 mg/kg)の前処置は、この抗原曝露3分後の血管傷害をほぼ完全に抑制した(図5、6)。

図3 Time course of changes in TxB₂ and 6-keto-PGF_{1α} levels in BALF after antigen exposure in unsensitized (open column) and actively sensitized guinea pigs (closed column)

BAL was performed before and 3, 15 and 30 min and 24 h after antigen challenge. Each value represents the mean±SE for six animals. *, ** Significantly different from time-matched unsensitized group at $P<0.05$ and 0.01 , respectively.

考 察

本研究では、抗原反復吸入して感作したモルモットに抗原を曝露して気道過敏性モデルを作製し、このモデルに対する S-1452 の影響を検討した。

図4 Effect of S-1452 on antigen-induced bronchial hyperresponsiveness in actively sensitized guinea pigs

Bronchial responsiveness was assessed 24 h after antigen exposure. Vehicle (○) or S-1452 at doses of 1 (△) and 10 mg/kg (●) was administered orally to guinea pigs 1 h before (Pre 1h) and 1 (Post 1h) and 22 h (Post 22h) after antigen challenge. Each value represents the mean±SE for seven to ten guinea pigs. The broken line indicates time-matched bronchial responsiveness of the unsensitized guinea pigs after the exposure to OA aerosol. **, Significantly different from vehicle group at $P<0.01$.

筆者らがすでに報告した LPS 曝露による気道過敏性は、一過性であるのに対し¹¹⁾、抗原曝露による気道過敏性は曝露後7時間からはじまり120時間以上も持続することが特徴である。LPS 曝露に

図 5

a : Time course of changes in Evans blue dye and hemoglobin concentrations in BALF after antigen exposure in actively sensitized guinea pigs. BAL was performed before and 3, 30 and 60 min and 24 h after the antigen challenge.

Each value represents the mean $\pm$ SE for five to eight guinea pigs. *, ** Significantly different from prechallenge value at $P < 0.05$ and 0.01 , respectively.

b : Effect of S-1452 on the increase in Evans blue dye and hemoglobin concentrations in BALF. S-1452 at doses of 1 and 10 mg/kg was administered orally to animals 1 h before the antigen challenge, and BAL was performed 3 min after antigen challenge.

Each value represents the mean $\pm$ SE for five to eight guinea pigs. ** Significantly different from vehicle group at $P < 0.01$.

よる気道過敏性は、BALF 中の TxB_2 レベルとよく相関し、S-1452 によって著明に抑制されることから、 TxA_2 が気道過敏性の発現に直接寄与していることが推察されている。抗原曝露による気道過敏性も、S-1452 の前投与によってほぼ完全に抑制されることから、 TxA_2 が重要な役割を演じていることは明らかである。しかしながら、BALF 中の TxB_2 の増加は抗原曝露直後で一過性に増加するのみで、気道過敏性とは必ずしも相関せず、また、曝露後 24 時間に認められる気道過敏性に対し、S-1452 は抗原曝露 1 時間後あるいは 22 時間後、すなわち気道反応性を測定する 2 時間前に投与してもまったく抑制作用を示さなかった。このことから、 TxA_2 が直接気道過敏性を引き起こしているのではなく、引き金として重要な役割を演じていることが示唆された。

興味深いことに、 TxB_2 の増加に相関して、BALF 中のエバンスブルーおよびヘモグロビン量の増加が認められ、肺組織像より肺血管傷害が生じていることが確認された。この肺血管傷害は S-1452 の前投与によって抑制され、その用量は気道過敏性を抑制する用量とほぼ一致する 10 mg/kg であった。したがって、抗原曝露直後に産生された TxA_2 が肺血管傷害を引き起こし、その結果、持続的な気道過敏性へと発展したものと考えられる。このような肺血管傷害がどのような機序で持続的な気道過敏性を導くのかは不明であるが、おそらく血管傷害によって気道内に侵入した補体成分や血小板¹³⁾などの血球成分が肺組織の損傷を助長させ、最終的には知覚神経末端の露出によって、気道過敏性を導いたのではないかと推察される。

肺血管傷害における TxA_2 の作用点についてはいくつか考えられるが、主に TxA_2 の血行力学的作用によるものと推察される。虚血再灌流や interleukin-2 投与による肺損傷の一部は、 TxA_2 の血管平滑筋収縮作用による肺動脈圧上昇が原因であると報告されていること^{14,15)}から、本モデルにおいても、抗原曝露直後に産生された TxA_2 が肺血管内圧の上昇を介して肺血管の破綻に寄与していることが考えられる。

このほか、肺血管傷害を惹起しうる因子としては、抗原の吸入感作によって気道局所に集積した

図6 Morphological features of hemorrhagic vascular injury in the lung obtained from actively sensitized guinea pigs

Lungs were removed before (A) and 3 min (B, C, D) after aerosol antigen challenge from guinea pigs pretreated with vehicle (B and C) or S-1452 (D). Vehicle or S-1452 at 10 mg/kg was administered to animals 1 h before antigen challenge. The tissue was stained with hematoxyline and eosin (Frames A, B, D, $\times 25$; Frame C, $\times 125$).

好酸球や好中球が抗原曝露によって産生遊離する組織傷害性の蛋白やラジカル¹³⁾が考えられ、これが気道と血管の barrier を損傷し、血管傷害に寄与する可能性がある。特に組織傷害を引き起こす因子の一つである O_2^- の産生に TxA_2 が促進的に作用しているとの報告¹⁶⁾もあることから、S-1452 はラジカル産生を阻害し、気道組織の損傷を抑制している可能性も考えられる。

以上のことから、モルモットの抗原曝露による持続的な気道過敏性は、 TxA_2 の直接作用によって発現されているのではなく、抗原曝露直後に産生された TxA_2 が肺血管傷害を引き起こし、これが引き金となって生じていることが示唆された。喘息患者では発作の繰り返しにより気道過敏性が獲得されることから、S-1452 を予防的に投与する

ことにより新たな気道過敏性の獲得を阻止し、その結果、喘息症状が徐々に緩解していくものと期待される。

稿を終わるに当たり、貴重なご助言をいただいた岐阜薬大薬理学教室永井博式教授、ならびに本研究にご協力いただいた松本洋子氏に深謝いたします。なお、本論文の要旨は第14回日本炎症学会(1993年6月、岐阜)において報告した。

文 献

- 1) Komatsu H., Takehana, Y., Kikuchi, S., Kojima, M., Hamano S., Kusama, H., Okegawa, T., Ikeda, S.: Effect of thromboxane A_2 synthetase inhibitor (OKY-046 $\cdot$ HCl) on airway hyperresponsiveness in guinea pigs. Eur. J. Pharmacol. 184 : 87-95, 1990.

- 2) O'Byrne, P. M., Leikauf, G. D., Aizawa, H., Bethel, R. A., Ueki, I. F., Holzman, M. J., Nadel, J. A. : Leukotriene B₄ induces airway hyperresponsiveness in dogs. *J. Appl. Physiol.* 59 : 1941-1946, 1985.
- 3) Chung, K. F., Aizawa, H., Becker A. B., Frick, O., Gold, W. M., Nadel, J. A. : Inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness by a thromboxane synthetase inhibitor (OKY-046) in allergic dogs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134 : 258-261, 1986.
- 4) Chung, K. F., Aizawa, H., Leikauf, G. D., Ueki, I. F., Evans, T. W., Nadel, J. A. : Airway hyperresponsiveness induced by platelet-activating factor : Role of thromboxane generation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 236 : 580-584, 1986.
- 5) Aizawa, H., Chung, K. F., Leikauf, G. O., Ueki, I. F., Bethel, R. A., O'Byrne, P. M., Hirose, T., Nadel, J. A. : Significance of thromboxane generation in ozone-induced airway hyperresponsiveness in dogs. *J. Appl. Physiol.* 59 : 1918-1923, 1985.
- 6) Fujimura, M., Sakamoto, S., Saito, M., Miyake, Y., Matsuda T. : Effect of a thromboxane A₂ receptor antagonist (AA-2414) on bronchial, hyperresponsiveness to methacholine in subjects with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87 : 23-27, 1991.
- 7) Kishino, J., Hanasaki, K., Nagasaki, T., Arita, H. : Kinetic studies on stereospecific recognition by thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor of the antagonist, S-145. *Br. J. Pharmacol.* 103 : 1883-1888, 1991.
- 8) Ohtani, M., Matsuura, T., Watanabe, F., Narisada, M. : Enantioselective synthesis of S-1452, and orally active potent thromboxane A₂ receptor antagonist. *J. Org. Chem.* 56 : 2122-2127, 1991.
- 9) Arimura, A., Asanuma, F., Kurosawa, A., Harada, M. : Anti-asthmatic activity of a novel thromboxane A₂ receptor antagonist, S-1452, in guinea pigs. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 98 : 239-246, 1992.
- 10) Arimura, A., Asanuma, F., Kurosawa, A., Harada, M. : Contribution of thromboxane A₂ to the antigen-induced immediate asthmatic response mediated by IgG1 antibody by augmenting bronchial hyperresponsiveness in guinea pigs. *Br. J. Pharmacol.* 111 : 339-345, 1994.
- 11) Arimura, A., Asanuma, F., Yagi, H., Kurosawa, A., Harada, M. : Involvement of thromboxane A₂ in bronchial hyperresponsiveness but not lung inflammation induced by bacterial lipopolysaccharide in guinea pigs. *Eur. J. Pharmacol.* 231 : 13-21, 1993.
- 12) Konzett, H., Rössler, R. : Versuchsanordnung zu Untersuchungen an der β Bronchialmuskulatur. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 195 : 71-75, 1940.
- 13) Barnes, P. J. : New concepts in the pathogenesis of bronchial hyper-responsiveness and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 83 : 1013-1026, 1989.
- 14) Klausner, J. M., Paterson, I. S., Morel, N. M. L., Goldman, G., Gray, A. D., Valeri, R., Eberlein, T. J., Shepro, D., Hechtman, H. B. : Role of thromboxane in interleukin 2-induced lung injury in sheep. *Cancer Res.* 49 : 3542-3549, 1989.
- 15) Zamora, C. A., Baron, D. A., Hefener, J. E. : Thromboxane contributes to pulmonary hypertension in ischemia-reperfusion lung injury. *J. Appl. Physiol.* 74 : 224-229, 1993.
- 16) Kato, M., Tokuyama, K., Morikawa, A., Kuroume, T., Barnes, P. J. : Platelet-activating factor-induced enhancement of superoxide anion generation in guinea-pigs. *Eur. J. Pharmacol.* 232 : 7-12, 1993.