

氏名(本籍)	千葉義彦 (埼玉県)
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	甲 第60号
学位授与年月日	平成7年3月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者
学位論文の題名	Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Airway Hyperresponsiveness in Allergic Asthma アレルギー性気管支喘息時の気道過敏性発症機序の 追究
論文審査員	主査 教授 三澤美和 副査 教授 入江昌親 副査 教授 町田良治

## 論文内容の要旨

気管支喘息は『気道障害あるいは気道収縮、気道炎症、種々の刺激により誘発される気道過敏性 (airway hyperresponsiveness: AHR) に特徴づけられ、自然にあるいは治療により、その程度が変化する広範囲な気道閉塞により症状を示す疾患』と定義づけられている。この非特異的刺激に対する AHR はアレルギー性気管支喘息患者に共通に認められる特徴であり、喘息本態の把握には AHR 発症のメカニズムを解明することが極めて重要であると考えられている。しかしながら、そのメカニズムについては未だに詳細には明らかにされておらず、喘息発作に苦しむ患者は対症療法にのみ頼らなければならないのが現状である。AHR 発症のメカニズムが明らかにされない一因として、喘息患者に酷似した再現性の良い AHR を発現する動物モデルが存在しないことが挙げられる。そこで本研究では、まず初めに、ラットアレルギー性気管支喘息モデルを用いて、抗原誘発 AHR モデルを作製することを試みた。さらに、このラット AHR モデルを用いて AHR 発症メカニズムの一端を解明することを試みた。

### 1. ラット抗原誘発 AHR モデルの作製およびその特色

Wistar 系雄性ラットを用い、DNP-*Ascaris* (DNP-Asc) を抗原とし、死菌百日咳菌ワクチンをアジュバントとして能動感作を施した。5 日後、追加感作を行い、その3日後より、無麻酔下、抗原を自然吸入させることにより、抗原チャレンジを開始した。初

回チャレンジの 24 時間後に実験を行ったものを単回チャレンジ群とし、また、初回チャレンジより 48 時間毎に計 3 回抗原チャレンジを行ったものを反復チャレンジ群とした。*In vivo* 実験系において、単回チャレンジ後の acetylcholine (ACh) あるいは neurokinin A (NKA) 吸入に対する気道の反応性はわずかではあるが有意に亢進していた。一方、反復チャレンジ後の ACh あるいは NKA 吸入に対する気道の反応性は、著明かつ有意に亢進していた。この反復チャレンジ群の ACh に対する気道反応性亢進のピークは最終チャレンジの 24 時間後であった。また、最終チャレンジ 24 時間後において、気道血管透過性の亢進あるいは気道組織への炎症細胞の浸潤などの顕著な気道炎症像が認められた。さらに、最終チャレンジ 24 時間後において、摘出気管支レベルでも気道の反応性が著明に亢進していた。以上の結果より、感作ラットに抗原を反復吸入チャレンジすることにより、*in vivo* および *in vitro* レベルにおいて著明な AHR 状態が獲得されることが明らかとなった。さらに、この AHR は気道炎症と相関していることが明らかとなった。

## 2. ラット抗原誘発 AHR 発症における系統差の関与

Wistar 系ラット、IgE 抗体産生能が高い Brown-Norway (BN) 系ラットおよび helper T-cell を欠損している Long-Evans Cinnamon (LEC) 系ラットを用いて、抗原誘発 AHR 発症における系統差についての検討を行った。各系統の雄性ラットを DNP-Asc にて 1. と同様の方法で感作、追加感作し、その後 48 時間毎に計 3 回の抗原反復チャレンジを行い、最終チャレンジの 24 時間後に実験に供した。*In vivo* における ACh に対する気道の反応性は Wistar において著明かつ有意に亢進していたが、LEC ではまったく認められず、BN では Wistar より軽度な AHR が認められた。摘出気管支の ACh に対する反応性は Wistar では有意に亢進していたが、BN、LEC では著明な変化は認められなかった。気管支組織の wet/dry weight ratio を算出したところ、Wistar においてのみ有意な増大が認められた。以上の結果より、Wistar において気道炎症と AHR の相関性が認められ、3 系統のラットのうち抗原誘発 AHR モデルには、Wistar が最も適していることが示唆された。

### 3. ラット抗原誘発 AHR 発症に関与するメディエーターの検討

抗原反復チャレンジ後に見られる AHR 発症に対する thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) 合成酵素阻害薬 (ozagrel) あるいは platelet activating factor (PAF) 拮抗薬 (CV-3988) の効果について検討した。Wistar 系雄性ラットを DNP-Asc にて 1. と同様の方法で感作、追加感作し、その後、48 時間毎に計 3 回抗原反復チャレンジを行った。各チャレンジの前に ozagrel (100 mg/kg, p.o., 30 分前)、CV-3988 (3 mg/kg, i.v., 5 分前) あるいはそれぞれの溶媒を前処置した。最終チャレンジの 24 時間後に *in vivo* における気道反応性を測定した。Ozagrel および CV-3988 単独では ACh に対する気道の反応性に有意な影響を与えなかった。抗原反復チャレンジ後に見られる ACh に対する AHR は、ozagrel 前処置により部分的にはあるが有意に抑制されたが、CV-3988 前処置による影響はまったく受けなかった。以上の結果より、本気道過敏性の発現に TXA<sub>2</sub> が関与していることが示唆された。

### 4. ラット抗原誘発 AHR 発症における sensory neuropeptides の関与

Capsaicin を前処置して sensory neuropeptides を枯渇させた動物に 1. と同様の方法で感作、追加感作および抗原反復チャレンジを行い、その 24 時間後に ACh に対する気道反応性を測定したところ、抗原誘発 AHR は有意に抑制された。Normal ラットに neutral endopeptidase (NEP) 阻害薬である phosphoramidon (3 mg/kg, i.v.) を処置したところ ACh に対する気道の反応性が有意に亢進したが、抗原反復チャレンジ群ではさらなる気道反応性の亢進は認められなかった。一方、気道組織膜分画の NEP 活性を測定したところ、抗原反復チャレンジ群において有意な NEP 活性の低下が認められたが、angiotensin converting enzyme 活性は normal レベルであった。以上の結果より、抗原誘発 AHR の発症に sensory neuropeptides が関与しており、また、抗原誘発 AHR 時に気道組織の NEP 活性が低下していることが示唆された。

### 5. Normal ラットの気道反応性に対する NEP 阻害薬あるいは neuropeptides の効果

Normal ラットに麻酔下、収縮閾値下の濃度である NKA (0.001 %) あるいは

substance P (SP; 0.01 %) を吸入させ、その直後に ACh に対する気道反応性を測定したところ、有意な気道反応性の変化は見られなかったが、NEP 阻害薬である phosphoramidon あるいは thiorphan 処置下同様の実験を行ったところ、著明かつ有意な気道反応性の亢進が認められた。このとき、phosphoramidon あるいは thiorphan 単独処置のみでも用量依存的かつ有意な気道反応性の亢進が認められた。この NEP 阻害薬誘発 AHR は、capsaicinize した動物ではまったく見られなくなり、また、両側迷走神経切断あるいは tachykinin receptor 阻害薬により有意に抑制された。Normal ラットより摘出した気管支に phosphoramidon ( $10^{-6}$  M) 存在下、 $10^{-6}$  M NKA を処置した場合、NKA 自体では収縮あるいは弛緩反応は認められなかったが、ACh による収縮反応の濃度反応曲線が左にシフトした。この *in vitro* における NKA 誘発 AHR は、 $10^{-6}$  M tetrodotoxin 前処置により完全に抑制された。一方、気道組織の膜分画を用いて muscarinic receptors の binding assay を行った結果、phosphoramidon および NKA は [ $^3$ H] quinuclidinyl benzilate binding sites に何等影響を与えなかった。以上の結果より、normal ラットにおいて NEP 活性の低下が気道組織への neuropeptides の蓄積を引き起こし、この neuropeptides が迷走神経反射などの神経要素を介して ACh に対する AHR を発現させることが示唆された。

## 6. 抗原誘発 AHR ラット摘出気管支平滑筋における $Ca^{2+}$ 利用能の変化

1. と同様の方法で AHR ラットを作製し、その左主気管支を摘出して、organ bath 内で以下の実験を行った。 $Ca^{2+}$  free (0.01 mM EGTA,  $10^{-6}$  M nifedipine) 下、 $10^{-3}$  M ACh による収縮反応を normal 群のものと比較したところ、その phasic 収縮は AHR 群のほうが著明かつ有意に大きくなっていた。このとき、 $Ca^{2+}$  (0.1-5.0 mM) 累積投与による収縮反応を比較したところ、normal 群と比較して AHR 群の濃度反応曲線は左上方にシフトしていた。一方、 $Ca^{2+}$  free (0.01 mM EGTA,  $10^{-6}$  M atropine) 下、60 mM  $K^+$  脱分極時の  $Ca^{2+}$  累積投与による収縮反応を比較したところ、両群の濃度反応曲線はほぼ重なり合っていた。以上の結果より、AHR 時に  $IP_3$  を介して筋小胞体から遊離される  $Ca^{2+}$ 、あるいは受容体作動性  $Ca^{2+}$  channel から流入してくる  $Ca^{2+}$  の利用能が亢進している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

気管支喘息の根底には気道過敏性が存在するといわれているが、気道過敏性の本態とその発症機序は不明な部分が多い。気管支喘息の治療薬も現在まで数種類のカテゴリーのものが使用されているが、まだ患者の発作を安全にかつ有効に抑制する薬物の開発が期待されている状況である。気道過敏性の実態が鮮明でないため、これを抑制する薬物の開発が決定的に遅れている。これを効果的に抑制する薬物が開発されれば、喘息治療の道が開けるものと考えられる。

本研究では、まず小動物において気管支喘息時に発症すると同様な気道過敏性を発現する実験的モデルの開発をまず試みている。その結果、ラットをDNP-Ascarisで感作し、同抗原で反復チャレンジすることにより、最終チャレンジから48時間後に強度な気道過敏性を発現することに成功した。次いでこのアレルギー性に誘発した実験的気道過敏性を用いて気道過敏性の発症機序を深く追究している。

Wistar系、Brown-Norway系、およびLong-Evans Cinnamnon系ラットを用い、上記手法による気道過敏性発症の程度を比較し、種々の観点から気道過敏性モデルとしてWistar系ラットを用いて気道過敏性の発症に関与する chemical mediators の検討を行ったところ、thromboxane A<sub>2</sub>が本気道過敏性に少なくとも一部関与していることを示唆した。

第3の自律神経として注目されている非アドレナリン非コリン作動性(NANC)神経系の関与についても詳細な検討を行っている。気道過敏性はcapsaicinでsensory neuropeptidesを枯渇しておくことで抑制されること、また正常ラットにneutral endopeptidase (NEP)阻害薬を処置すると気道の反応性が亢進する、すなわち気道過敏性状態が発現すること、また抗原反復チャレンジ動物では気道組織のNEP活性が低下していることから、NANC神経系の活性亢進が副交感神経末端からのacetylcholine遊離の増大等を介して気道過敏性発症の背景に存在することを明らかにした。

本気道過敏性はin vivoで見られるだけでなく、気道過敏性ラットから摘出した気管支といったin vitroレベルでも認められることから、ムスカリン性acetylcholine受容体の増減をreceptor binding assayによって測定したが、受容体自体には変化は起こっていないことを示した。そこで受容体以降の細胞内情報伝達機構の変化が気道過敏性の発現に関与しているのではないかと考え、

気道過敏性を発症している動物と正常動物の摘出気管支平滑筋を用いて、その収縮過程における $\text{Ca}^{2+}$ 利用能の変化を比較検討した。その結果、気道過敏性時には $1\text{P}_3$ を介して筋小胞体から遊離される $\text{Ca}^{2+}$ 、あるいは受容体作動性 $\text{Ca}^{2+}$  channel から流入してくる $\text{Ca}^{2+}$ 利用能が亢進している可能性を示した。

本論文において、すぐれた気道過敏性モデルを作製したことはこの分野の今後の研究に大きな礎石として貢献し、また、本モデルを用いて気道過敏性発症機序をかなり解明しており、博士号（薬学）を授与するに十分値するものと認められる。本博士論文は全文すぐれた英文で書かれていることもこれにさらに価値を付け加えている。