

慢性喘息モデルによる喘息の 難治化要因に関する研究

第 1 編

抗原の繰り返し吸入による慢性喘息モデルの作製

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

菅 野 尚

(平成 6 年 2 月 18 日受稿)

Key words : chronic asthma, animal model, guinea pig,
re-inhalation, late asthmatic response

緒 言

気管支喘息のなかでもアトピー型喘息の病因・病態に関する研究は近年長足の進歩をとげているが、内科領域で最もその対策に煩わされる難治性喘息の病因・病態は、多くの要因がからみ合っているばかりでなく、アトピー型喘息の機序とはかなり趣きを異にしており、いまだ不明の点が多い。長年にわたる教室の難治性喘息症例の検討^{1)~3)}から、その臨床像としては大部分が慢性・持続型発作でかつ通年性であり、40歳以降に発症する中高年発症型喘息群にステロイド依存性の難治性喘息が多いことが確認されている。さらにそのアレルギー学的特徴として、アトピー型喘息での IgE を介する反応系以外に、IgG 系の反応すなわち Candida 特異的な IgG₁ 抗体⁴⁾やリンパ球の活性化⁵⁾⁶⁾とより密接に関連するとの成績が現在得られている。かかるアレルギー学的背景を基盤に種々の血液細胞が交錯して相互の複雑な連鎖反応系を形成し、その結果種々の化学伝達物質が遊離されるいわゆる細胞反応型アレルギー⁷⁾の機序に基づいて重症、難治性喘息発作が発症すると考えられる³⁾。

かかる喘息発作は、抗原吸入後 3~10 時間で誘発され、ステロイド剤以外の治療に抵抗性を示し遷延、重症化しやすいなどの点で遅発型気道反応の病態と関連の深いことが報告³⁾されてい

る。さらに難治性喘息の特徴である慢性発作の発症機序は、抗原の持続的あるいは繰り返し曝露とか生体側の反応性や抗体産生能⁸⁾などに依存していることが想定されるが、いまだ不明の点が多く、かかる諸問題を解決するためには喘息モデルによる詳細な検討が必要と考えられる。

以上の観点から、LAR を呈するモルモットを用いて、抗原を繰り返し吸入することにより気道反応を検討し、慢性発作状態を作製し得るなど興味ある成績を得たので報告する。

対象と方法

実験動物には約 200 g のハートレー系雄モルモット 31 匹を用い、飯島らの方法⁹⁾の変法にて感作した。すなわち、抗原として *Ascaris suum* (Greer Laboratories, USA) 0.1 ml をアジュバントの水酸化アルミニウム 10 mg とともに生理食塩水で溶解して 1.0 ml とし、2 週間隔で 3 回腹腔内に注射をすることにより感作を行った (Fig. 1)。

次いで感作したモルモットに第 3 回目の感作の 1 週間後から抗原による吸入誘発試験を行った。すなわち抗原液として *Ascaris suum* 0.5 ml を生理食塩水 2.5 ml で希釈したものを作製し、吸入用の箱に接続した加圧式ネブライザーで 1 回につき 10 分間、24 時間間隔で合計 8 回繰り返し吸入を行った (Fig. 2)。途中で強い即時型気道反応を生じたモルモットはその時点で吸入箱よ

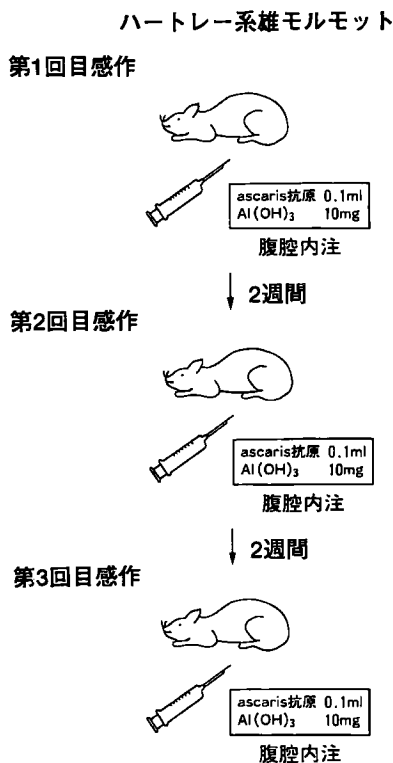


Fig. 1 感作方法

り取り出し呼吸曲線を記録した。気道反応の判定は、各吸入前、吸入終了直後と5時間後に胸壁に取り付けた小動物用呼吸ピックアップ（日本光電社製）からの電気信号をアンプで増幅して呼吸曲線を記録し、教室の沖¹⁰⁾の方法に準じ、呼吸曲線の呼気/吸気が平均2.0以上の場合を気道反応陽性とした。更にこのような気道反応の結果を即時型気道反応（Immediate asthmatic response：以下 IAR）、遅発型気道反応（Late asthmatic response：以下 LAR）、2相性気道反応（Dual asthmatic response：以下 DAR）に分類した。なお、内因性ステロイド分泌の低下が一因となり発症すると思われるステロイド依存性の難治性喘息の病態を示すモデルとして、11-デオキシコルチゾールからコルチゾールへの変換に必要な11 β -hydroxylase を抑制する metyrapone（メトピロン[®], Cibagaigi Pharmaceutical Co., Japan）10mgを、吸入開始の前日と、各吸入1時間前に腹腔内へ注射した。またその逆のステロイド過剰状態を作成するために、

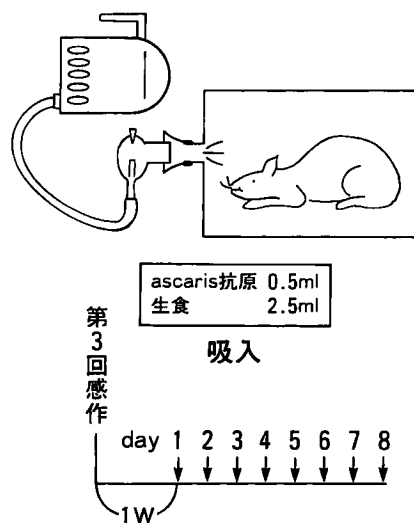
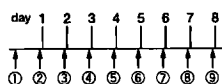
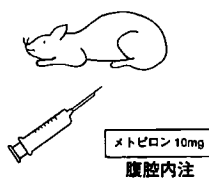


Fig. 2 抗原繰り返し誘発試験

A メトピロン処置



B ステロイド処置

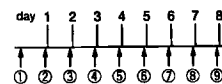
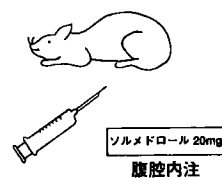


Fig. 3 メトピロン及びステロイドによる処置
吸入開始前日及び各吸入前にメトピロン10mg (A) またはソルメドロール20mg (B) を腹腔内投与した。

methylprednisolone（ソルメドロール[®], Upjohn Limited, Japan）20mgをメトピロン投与実験と同じスケジュールで腹腔内に注射した（Fig. 3）。

結 果

1. 抗原繰り返し吸入による気道反応の発現様式

抗原吸入後の気道反応の発現様式は、メトピロン群、ステロイド群、無処置群のいずれの群でも初回から DAR が多かったが、無処置群で

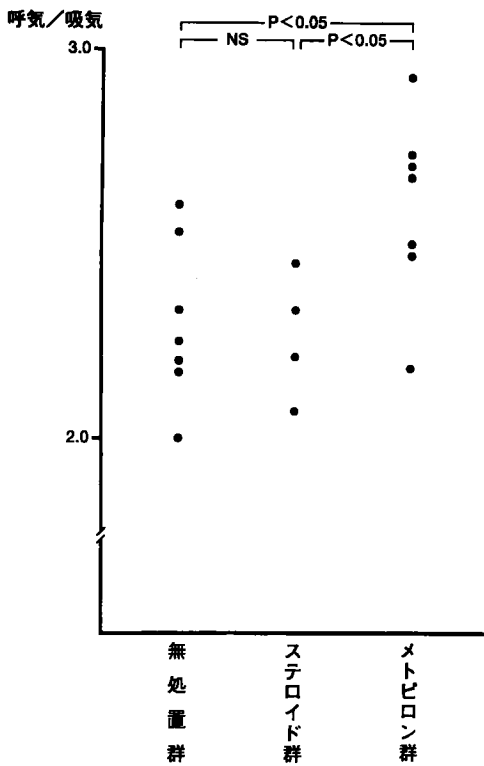


Table 1 抗原繰り返し吸入による気道反応の様式

DAY	1	2	3	4	5	6	7	8
メトピロン群	D	D	D	D	D	D	I	D
	D	D	D	D	D	D	D	D
	D	D	D	D	D	D	D	D
	D	D	D	D	D	D	D	D
ステロイド群	L	L	D	D	D	D	D	D
	D	I	D	D	D	D	D	D
	D	D	I	D	D	D	D	D
	L	L	D	D	D	D	D	D
無処置群	D	D	D	D	D	D	D	D
	D	D	L	D	D	D	D	D
	I	I	I	I	D	D	D	D
	I	I	I	I	D	D	D	D
群	I	I	I	I	I	D	D	D

I : immediate asthmatic response
 L : late asthmatic response
 D : dual asthmatic response

Fig. 4 8日間繰り返し抗原吸入した際の吸入5時間後における呼気/吸気比較

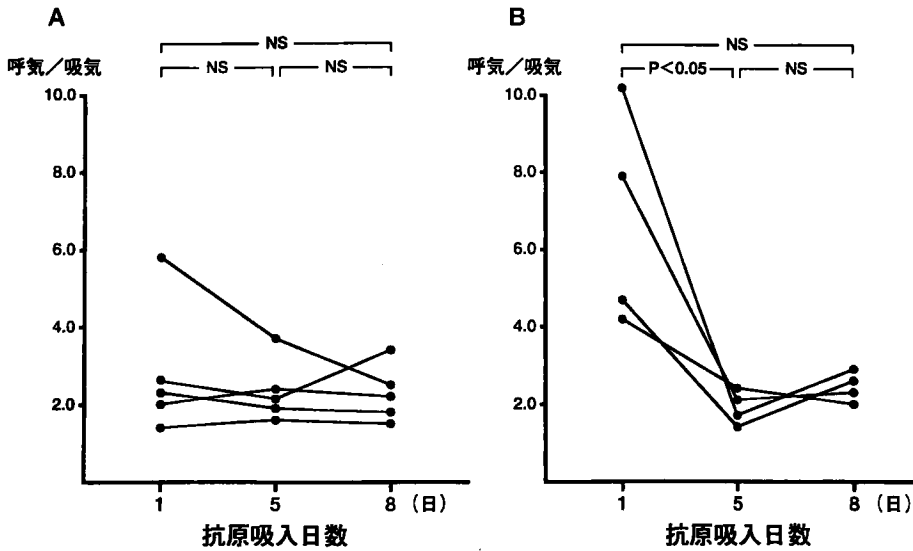


Fig. 5 抗原吸入日数別にみた吸入直後における呼気/吸気比較
 (A) 無処置群 (B) メトピロン群

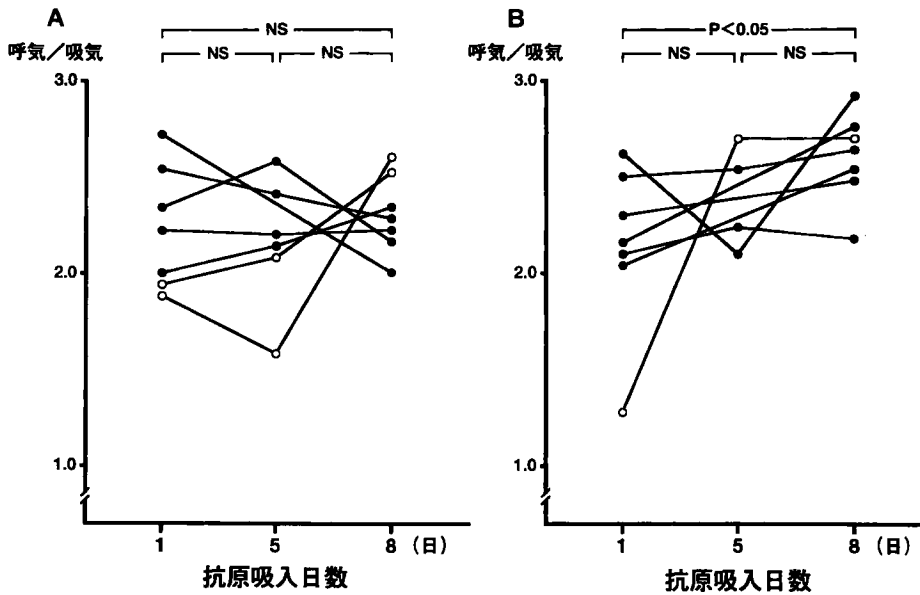


Fig. 6 抗原吸入日数別にみた吸入5時間後における呼気/吸気の比較
(A) 無処置群 (B) メトピロン群

○のモルモットは第1日目の吸入5時間後、呼気/吸気<2.0であったもの

初回時 IAR のみしか出現しないモルモットは、抗原吸入を繰り返すうちに次第に DAR を呈した (Table 1)。

2. 繰り返し抗原吸入後の LAR の比較

8日間の抗原吸入終了時より5時間後の呼気/吸気の強さを各々の群で比較したところ、Fig. 4の如くメトピロン群では無処置群 ($P < 0.05$) やステロイド群 ($P < 0.05$) に比べて、気道反応の強さを反映すると思われる呼気の延長が有意に認められた。なお、ステロイド群と無処置群の間には有意差がなかったことより、以下メトピロン群と無処置群で比較検討した。

3. 抗原吸入日数別にみた IAR 及び LAR の比較

初回吸入時には、LAR に比して IAR の方が強いと窒息死に至るモルモットも認められたが、抗原吸入を繰り返すうちに anaphylactic な IAR を呈するモルモットが少なくなる印象を受けたことより、吸入直後における呼気/吸気を抗原吸入日数別に比較した。その結果、Fig. 5の如く個々のモルモットの呼気/吸気の推移をみると、無処置群では吸入日数による明らかな変化は認められなかったが、メトピロン群では第1

日目に比し、第5日目では呼気/吸気が有意に減少していた ($P < 0.05$)。

同様に吸入5時間後における呼気/吸気の推移を抗原吸入日数別に比較したところ、Fig. 6の如く無処置群 (A) では抗原吸入1日目にLAR陰性であったモルモット (○印) が抗原吸入を重ねるに従って次第にLAR発作を呈するようになった。また、メトピロン群 (B) では呼気/吸気は第1日目に比し、第8日目では有意に延長していた ($P < 0.05$)。

この呼気/吸気の推移を平均値で比較すると、Fig. 7の如く無処置群 (A) では抗原吸入を繰り返すことによっても IAR, LAR ともに有意な変化はなかったのに比し、メトピロン群 (B) では強かった IAR の反応が吸入5日目には有意に軽減し ($P < 0.05$)、一方で LAR の反応は逆に次第に増強する傾向にあった。

4. 抗原連続吸入時の吸入前における呼気/吸気の比較

感作モルモットに抗原を繰り返し吸入させると、吸入前すでに明らかな発作状態を示すようになることから、吸入直前の呼気/吸気を吸入日数別に比較した。その結果 Fig. 8 の如く無処置

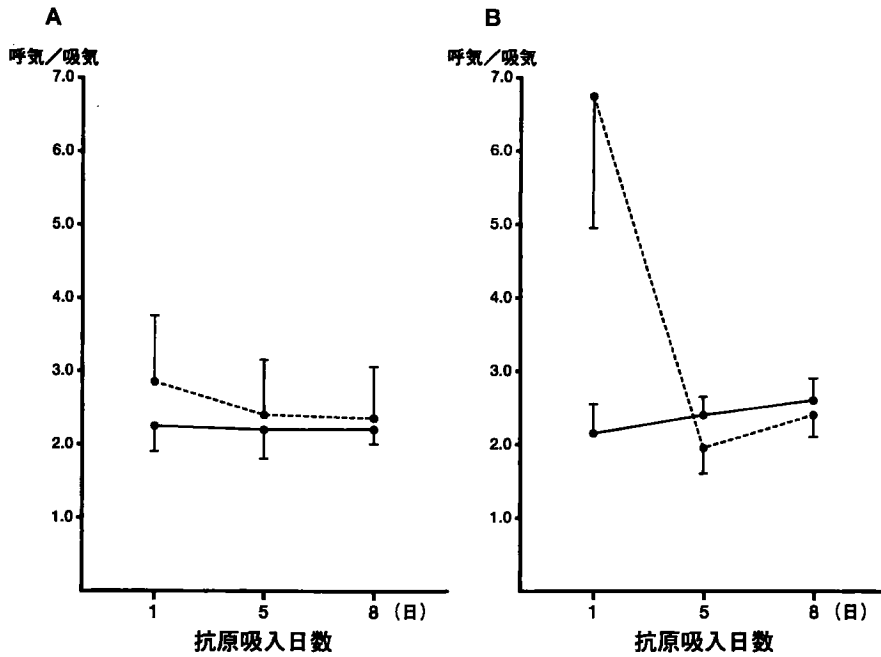


Fig. 7 抗原吸入日数別にみた吸入直後 (●……●) 及び吸入5時間後 (●—●) での呼気/吸気 (平均値) の推移
 (A) 無処置群 (B) メトピロン群

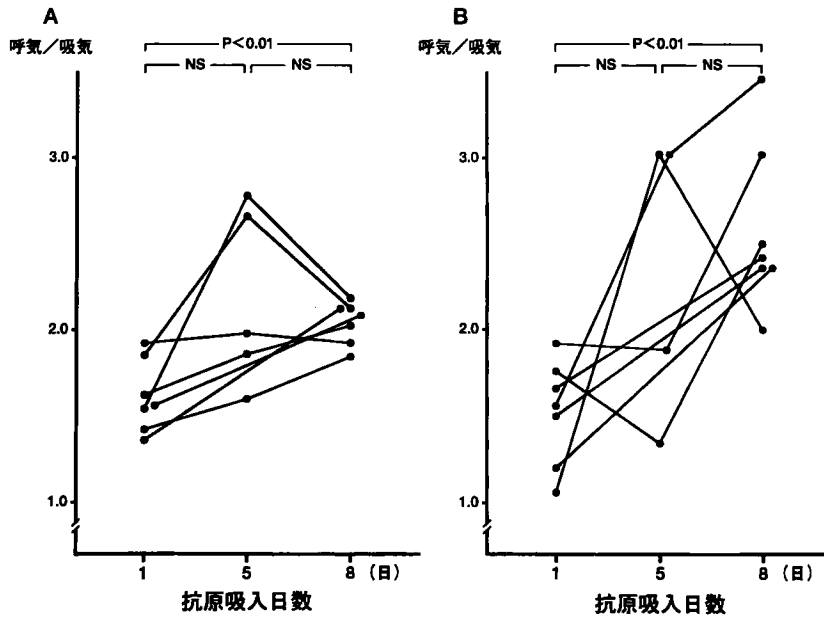


Fig. 8 抗原吸入日数別にみた吸入前における呼気/吸気 (平均値) の比較
 (A) 無処置群 (B) メトピロン群

群, メトピロン群ともに抗原吸入1日目に比し, 8日目では有意に呼気/吸気の延長がみられ($P < 0.01$), すなわち抗原吸入を重ねるに従い24時間以上発作が持続するようになるものと思われた。特にメトピロン群では8日目には7匹全例が同様の状態, すなわち寛解期のない慢性喘息発作の状態を呈するようになった。

考 察

重症, 難治性喘息は通年性で遷延する慢性発作が臨床像の特徴であり, その一因として抗原が持続的あるいは繰り返し曝露されていることが想定される。かかる観点に立ち, 沖¹¹⁾はLAR動物モデルを用いて抗原の再吸入誘発試験を行い, LAR時再吸入では, IAR後再吸入より呼気の延長が長時間にわたって続いたと報告している。そこで著者は, 連続8日間抗原の吸入を繰り返すことにより, IARからLARになりしかもLARの回復が遅延して顕著に呼気が延長し, さらに8日目には吸入直前にも既に発作状態を呈し, 前日の発作が寛解せず持続する, いわゆる慢性発作状態のモデルを作製することに成功した。さらにこの状態はメトピロン群でより明瞭であったことから, 内因性ステロイドの低下状態ではかかる病態がより顕著になり易いことが想定された。

今回得られた成績を喘息患者にあてはめると, ダニなど常時吸入している抗原によりIARを基盤として発作を起こす症例では慢性化しないが, LARを基盤とする場合には発作が遷延し次第に慢性の発作となることが想定される。Hutson¹²⁾らは, 経気道感作したモルモットに抗ヒスタミン剤の前処置後卵白アルブミンを吸入させると, 2時間後にピークをもつIAR, 及び17時間と72時間後に2相性のLARが出現することを報告している。今回の実験でも, さらに遅延型反応の時相も考慮した観察が必要と思われた。難治性喘息患者は長期間ステロイド依存性になっている場合が多いが, Nakazawa¹³⁾らは喘息患者のLAR時にも血中コルチゾールが低下している症例の多いことを報告し, コルチゾールの低下がLARと関係があることを示唆した。また動物モデルでも, コルチゾールの低下とLARの

関係をSasaki¹⁴⁾が報告している。すなわちAscaris抗原に自然に感作された皮内反応陽性の麻酔イヌにAscaris抗原を吸入させたところ, メトピロン投与群の10匹にIARが出現し, そのうち8匹にはLARも認められたのに対し, メトピロン非処置群の10匹ではIARのみでLARは全く認められず, コルチゾール低値の状態ではIARに変化はないがLARが発現し易くなることを示唆している。また江田¹⁵⁾らは, プレドニソロン10-20mg/kgを投与してもモルモットの喘息反応は全く抑制できないが, メトピロンを抗原吸入前2回に分けて投与すると, プレドニソロンでLARを抑制することができたと報告している。このような事実に基づき, 今回LARを基礎とした慢性喘息発作を得るためにメトピロン処置をした群と, 逆にステロイド過剰状態のステロイド投与群及び無処置群で気道反応の発現様式の相違を比較検討した結果, メトピロン投与群の方が, 他群に比しLARが強かつ慢性喘息モデルがより高頻度に認められた。すなわち前述の報告と同様, モルモットのLAR及び慢性喘息の病態は, 成人の難治性喘息と同様コルチゾール分泌の低下した状態が関連するものと想定された。なおステロイド投与群及び無処置群に8日間繰り返し抗原を吸入した際のLAR時相では有意差が認められなかったが, これはモルモットがステロイド過剰分泌動物(ステロイド耐性動物)であるためと考えられた。

今回の慢性喘息モデル作製のために吸入させたAscaris抗原の量に関連して, Ihre¹⁶⁾らは抗原量により気道反応に差異があることを報告している。すなわち, ごく低濃度の抗原量を用いるとLARのみ出現し, 中等度の抗原量ではDARとなり, さらに多量の抗原量を投与するとLARは出現せず, IARのみ出現し, 低濃度の抗原では中枢気道で即時型の閉塞をおこさず末梢まで抗原が到達することが可能であり, 主にsmall airwayにおいてLARを生じることを想定している。従って抗ヒスタミン剤¹⁷⁾や β_2 -agonist¹⁸⁾の吸入で前処置した患者でLARの頻度が増えるのも, このような解釈に合致しているものと思われる。さらに喘息患者では, 空中のアレルゲンはごく低濃度のため, 日常IARをひきおこ

すことは少ないが、吸入されたアレルゲンが末梢に貯留されることにより LAR を生じる可能性が推測される。もし少量のアレルゲンが今回のモデルのように長期に繰り返し吸入されれば、結果として LAR を生じ、これを基盤にして気道過敏性の亢進及び慢性喘息発作が生じるものと考えられた。このように慢性発作の成立に必要な外的要因として、吸入する抗原量は重要と思われるが、本モデルでは抗原吸入量が自然吸入量に比してかなり多く、生理的な処理能力を大きく上回っている点で問題を残している。なお皮内テストの際には、低い抗原濃度で即時型皮膚反応しかみられないものにさらに多くの抗原量を用いると遅発型皮膚反応が出現するという相反する事実もあり、今後はより少ない抗原量を頻回に長期曝露した際の発作の反応様式や気道過敏性等の検討が必要と思われた。

また、成人の特に中高年発症型難治性喘息では、ダニよりはむしろ *Candida* が抗原となることが判明しており¹⁹⁾、抗原の相違によって関与する抗体系とか標的細胞などが異なることから、成人の場合には種々の病態が誘起されて、治療抵抗性の発作が惹起され易いものと思われる³⁾。今回抗原として *Ascaris suum* を用いたが、それ自体が好酸球遊走活性をもっており、繰り返し吸入させる際にやや問題があると考えられる。Kabe²⁰⁾らは、モルモットに *Candida* の protein fraction で感作後吸入させると、即時型反応及び24時間後の遅延型気道反応がみられたことから、I型とIV型アレルギーの関与を示唆している。また *Candida* は、ヒトの生体内生着真菌であると共に空中浮遊真菌でもあり、慢性喘息発

作の抗原としての関与が強く示唆されることから、今後成人の慢性喘息と *Candida* 抗原との関連を検討する必要があるだろう。

結 論

気管支喘息の難治化要因を検討する目的で、LAR 動物モデルを無処置群、ステロイド投与群、メトピロン処置群に分け、抗原を8日間連続吸入させた際の呼吸曲線から気道反応様式を検討した結果、以下の成績を得た。

1) 感作モルモットに繰り返し抗原を吸入させることにより、LARの出現頻度が増した。

2) 無処置群、ステロイド群では発作の強度に差は認められなかったが、メトピロン群では強いLARが惹起された。

3) メトピロン群では、吸入を繰り返すに比べてIARの強さが低下し、LARは逆に増強した。

4) 抗原吸入を重ねることにより24時間以上発作が続き、強いLARを惹起する慢性喘息動物モデルが得られた。

以上、本モデルのかかる気道反応は、ヒトの喘息発症の過程とか慢性喘息発作や難治化を解明するうえで有用な手段となり得るものと思われた。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜りました恩師木村郁郎教授に深謝するとともに、終始懇切な御指導と助言を頂きました高橋 清講師に深謝いたします。

尚、本論文の要旨は、第30回日本胸部疾患学会総会(平成2年4月9日)において発表した。

文 献

- 1) 木村郁郎：喘息の病型とその本質論 — 中高年発症型難治性喘息の独立性 —。日胸疾患誌 (1983) 21, 181—182.
- 2) 木村郁郎：遅発アレルギーの発症機序 — 細胞反応を中心に —；第3回免疫薬理シンポジウム、富岡玖夫編、デーエムページャパン、東京 (1985) pp 23—40.
- 3) 高橋 清：中高年発症型難治性喘息の機序；第4回免疫薬物療法研究会記録集、山村雄一編、医薬ジャーナル社、東京 (1988) pp 110—130.
- 4) 小栗栖和郎、高橋 清、多田慎也、宗田 良、難波一弘、高田 稔、難波康夫、金広有彦、谷本 安、木村五郎、高橋寿保、木村郁郎、谷崎勝朗：成人喘息におけるIgGサブクラス抗体に関する研究 第1報 血

- 清中抗原特異的 IgG サブクラス抗体と遅発型気道反応の関連について。アレルギー (1991) 40, 506—515.
- 5) 金廣有彦, 江田良輔, 小栗栖和郎, 小塚明子, 猪木篤弘, 木村五郎, 宗田 良, 多田慎也, 高橋 清, 木村郁郎: 気管支喘息の病態における感作リンパ球の関与について—Candida 及び mite 抗原特異的リンパ球幼若化反応による検討。アレルギー (1990) 39, 1261 (抄録).
 - 6) 河田一郎: 気管支喘息の発症機序における好酸球の動態に関する研究。第 2 編 カンジダ抗原による末梢血単核球由来好酸球遊走因子について。岡山医誌 (1990) 102, 745—755.
 - 7) 木村郁郎: 気管支肺病変におけるアレルギーとリンパ球。アレルギー (1990) 19, 12—16.
 - 8) 伊藤幸治: 実験喘息。臨免疫 (1985) 17, 138—148.
 - 9) Iijima H, Ishii M, Yamauchi K, Chao CL, Kimura K, Shimura S, Shindoh Y, Inoue H, Mue S and Takishima T: Bronchoalveolar lavage and histologic characterization of late asthmatic response in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* (1987) 136, 922—929.
 - 10) 沖 和彦: 気管支喘息の重症難治化要因に関する研究。第 1 編 喘息動物モデルによる遅発型気道反応の機序に関する検討。岡山医誌 (1990) 102, 1187—1196.
 - 11) 沖 和彦: 気管支喘息の重症難治化要因に関する研究。第 2 編 遅発型気道反応動物モデルにおける抗原再吸入の影響。岡山医誌 (1990) 102, 1197—1205.
 - 12) Hutson PA, Church MK, Clay TP, Miller P and Holgate ST: Early and late-phase bronchoconstriction after allergen challenge of nonanesthetized guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* (1988) 137, 548—557.
 - 13) Nakazawa T, Umegae Y, Matsui S, Yoshie Y, Fueki R and Kobayashi S: Serial changes of plasma cortisol levels during various types of asthmatic responses due to allergen inhalation. *Ann Allergy* (1986) 56, 67—71.
 - 14) Sasaki H, Yanai M, Shimura S, Okayama H, Aikawa T, Sasaki T and Takishima T: Late asthmatic response to ascaris antigen challenge in dogs treated with metyrapone. *Am Rev Respir Dis* (1987) 136, 1459—1465.
 - 15) 江田昭英: 遅発型喘息反応についての基礎的検討; 第 1 回免疫薬物療法研究会記録集, 山村雄一編, メディカルトリビューン, 東京 (1983) pp 92—108.
 - 16) Ihre E, Axelsson IGK and Zetterström O: Late asthmatic reactions and bronchial variability after challenge with low doses of allergen. *Clin Allergy* (1988) 18, 557—567.
 - 17) Lai CKW, Beasley R and Holgate ST: The effect of an increase in inhaled allergen dose after terfenadine on the occurrence and magnitude of the late asthmatic response. *Clin Exp Allergy* (1989) 19, 209—216.
 - 18) Lai CKW, Twentyman OP and Holgate ST: The effect of an increase in inhaled allergen dose after rimeterol hydrobromide on the occurrence and magnitude of the late asthmatic response and the associated change in nonspecific bronchial responsiveness. *Am Rev Respir Dis* (1989) 140, 917—923.
 - 19) 木村郁郎, 高橋 清: 老人喘息とその対策。現代医療 (1985) 17, 2308—2312.
 - 20) Kabe J, Aoki Y and Miyamoto T: Antigenicity of fractions from extracts of *Candida albicans*. *J Allergy* (1971) 47, 59—75.

Studies on the cause of intractable asthma using animal model**Part 1. Establishment of a chronic asthma model by
repeated antigen inhalation****Hisashi SUGANO****Second Department of Internal Medicine,****Okayama University Medical School,****Okayama 700, Japan****(Director : Prof. I. Kimura)**

To elucidate the cause of intractable asthma, guinea pigs were actively sensitized by intraperitoneal injection of *ascaris suum* as an antigen. We repeated the inhalation of aerosolized ascaris antigen eight times in the animal models which consisted of a non-treated group, a metopirone-treated group and a steroid-treated group. We investigated the course of asthmatic response by evaluating the ratio of expirations to inspirations after the inhalation challenge. The frequency of late asthmatic response (LAR) was increased by repeated inhalation of the antigen. There was no significant difference in the frequency between non-treated group and steroid-treated group, but the metopirone-treated group showed strong LAR compared with the other two groups. The intensity of LAR was gradually increased and that of immediate asthmatic response (IAR) was decreased in the metopirone-treated group. Finally, we established a chronic asthma model in which LAR was strong and the asthma attack was prolonged over twenty-four hours. These results suggest that the model will be useful in clarifying the causes of intractable asthma in humans.