岡山医誌（1992）104，721～733

難治性喘息の病態と治療に関する研究

第 1 編

難治性喘息患者のリンパ球および好中球機能に及ぼす選択的 Thromboxane A_2 合成酵素阻害剤の効果

岡山大学医学部第二内科学教室（指導：木村郁郎教授）

金　廣　有　彦

（平成4年4月1日受稿）

Key words：intractable asthma, cell-mediated allergy, thromboxane A_2, thromboxane A_2 synthetase inhibitor (OKY-046)

緒　　言

成人喘息の重症，難治化病態の解明にあたり，木村は中高年発症型難治性喘息（late onset intractable asthma, LOIA）[1]の独立性を提唱し，関与するアレルギー反応並びに種々の炎症細胞間の相互作用についての一連の研究から，Ⅲ型およびⅣ型反応いわゆる細胞反応型アレルギー[2]が深く関与することを想定している[3]．さらに難治性喘息の病像に多くの類似点を共有する遅発型気道反応（late asthmatic response, LAR）を構成する諸因子がその発症に関与し，抗原は house dust・mite よりも Candida が中心で，IgE よりは IgG とくに IgG_1 抗体優位のⅢ型と感作リンパ球を介するⅣ型反応が重要であり，最終的には末梢気道に集積した好中球，好酸球などの顆粒球から放出される mediator が関与することが明らかにされている[4]．従って難治性喘息の治療には，Candida 抗原などによる細胞反応型アレルギーを制御することが重要と思われる．

各種炎症反応と関係の深いアラキドン酸代謝産物のひとつである thromboxane A_2（TXA_2）は動物モデルにおいて抗原[5]，オゾン[6]，platelet activating factor（PAF）[7]，leukotriens（LT_S）[8)9)]による気道収縮反応や気道過敏性とか，成人喘息患者のアセチルコリン[10]や LT_S[11]に対する気道反応性の亢進，さらに抗原吸入後にみられる LAR の発現にも関与する可能性が報告されており[12]，histamine, PAF, LT_S などと並ぶ chemical mediator のひとつと考えられている．

一方，選択的 TXA_2 合成酵素阻害剤である塩酸オザグレル（OKY-046）{(E) -3- [p- (1H -imidazol -1- ylmethyl) phenyl] -2-propenoic acid}は，成人喘息への24週間以上の長期投与試験において，ステロイドの減量効果も含めて重症喘息に対する有効性が認められている[13]．そこで今回著者は難治性喘息病態の中核を成すと考えられている細胞反応型アレルギーのうち特にⅣ型反応における TXA_2 の関与を明かにする目的で，成人の難治性喘息患者におけるリンパ球および好中球の機能に対する OKY-046の効果を検討した．

対 象 と 方 法

対象には当科外来通院および入院中の成人の難治性喘息12例（男10例，女2例，27～63歳，平均47.1歳）を選んだ．その患者背景は，全例 mite および Candida の RASTscore が陰性で，Candida 抗原によるリンパ球幼若化反応あるいは interleukin 2（IL-2）産生能の亢進が認め

Table 1 Characteristics of intractable asthmatics.

No.	Age	Sex	IgE (RIST) IU/ml	IgE (RAST)		Lymphocyte blastogenesis(S.I.)		IL-2 production (S.I.)	
				mite	Candida	mite	Candida	mite	Candida
1	55	M	1019.8	0	0	1.19	5.55	1.14	3.47
2	28	M	215.6	0	0	1.80	2.67	1.00	2.50
3	63	M	46.3	0	0	1.62	3.57	1.09	2.50
4	35	F	156.2	0	0	1.03	2.13	0.92	2.24
5	61	M	58.6	0	0	1.24	3.81	0.89	2.86
6	47	F	125.5	0	0	1.30	4.67	1.10	3.20
7	27	M	383.5	0	0	1.80	3.29	1.80	3.81
8	58	M	99.7	0	0	1.26	4.15	0.88	3.45
9	45	M	391.4	0	0	1.40	4.46	1.64	3.87
10	48	M	897.6	0	0	1.73	3.00	1.45	2.74
11	39	M	142.0	0	0	2.03	4.67	1.11	2.35
12	59	M	103.1	0	0	1.40	5.24	1.02	3.88

られた症例である(Table 1). 難治性喘息の定義は，現在一般に用いられている喘息治療薬では症状の改善をみず，ステロイド剤を用いなければ日常生活ができない重症かつ通年性の気管支喘息で，しかも病型判定時以前に1年間以上ステロイド療法(プレドニゾロン換算平均5mg/日以上）を続けているいわゆるステロイド依存性喘息とした.

方法は下記の如く，患者末梢血単核球にOKY-046溶解液を試験管内で添加し，PHA およびCandida 抗原によるリンパ球幼若化反応，IL-2，好中球遊走活性因子（neutrophil chemotactic factor, NCF）および好酸球遊走活性因子（eosinophil chemotactic factor, ECF）の産生能に及ぼす影響を検討した．さらに好中球に対するOKY-046の薬理作用として，患者末梢血好中球からのleukotriene C_4 (LTC_4)およびsuperoxide (O_2^-) 産生能に及ぼす影響も併せ検討した.

1．末梢血リンパ球幼若化反応に及ぼすOKY-046の効果の検討

ヘパリン1ml加患者末梢血10mlをHistopaque1077 (Sigma) による比重遠沈法にて単核球層を分離採取し，RPMI1640(GIBCO)にて1200回転，3分間遠沈し血小板を除去した後2回洗浄し，10%fetal calf serum(FCS)加RPMI1640にて1×10^6/mlに調整した．かかる浮遊液を96 well tissue culture cluster (Coster) に100μlずつ tripricate にて分注し，各濃度のOKY-046を添加後5%CO_2 incubator にて37℃，3時間培養した．次いで各wellに5，25，125倍希釈Candida 抗原液（Candida 凍乾末，鳥居薬品をRPMI1640にて10mg/mlに溶解)，および PHA（100μg/ml)，対照としてRPMI1640を50μlずつ添加し37℃の5%CO_2 incubator にて培養した．培養後各well に ^{3}H-thymidine (^{3}H-TdR) 0.2μCi を添加し，7時間培養後細胞を回収し液体シンチレーションカウンターにて ^{3}H-TdR の取り込み値（dpm）を測定した．抗原あるいはPHA 添加群の各濃度における平均dpmのうちの最高値と非添加群の平均 dpm 値の比によりstimulation index（S. I.）を求め，リンパ球幼若化反応として表わした.

2．IL-2, NCF, ECF および thromboxane B_2 (TXB_2)産生能測定のための培養上清の作製法

まずヘパリン加患者末梢血より分離した単核球を，1%FCS加RPMI1640にて1×10^6/mlに調整した．これを1mlずつ24wellのtissue culture cluster (Coster) に分注し，各濃度のOKY-046を添加後5%CO_2 incubator にて37℃，3時間培養した．さらに各wellに最終濃度がCan-

dida 抗原は150μg/ml, PHA は10μg/mlになるように添加し，対照は RPMI1640のみ添加後，5 %CO_2 incubator にて37℃，48時間培養し，この培養上清を採取して IL-2, NCF および ECF 産生能の測定用検体とした．一方 TXB_2 産生能は，EDTA, indomethacin 加患者末梢血より単核球を分離し，同様にして得られた培養上清を検体とした．なお NCF および ECF 産生能は，検体を56℃，30分間の熱処理にて非働化して測定した．

3．末梢血単核球の IL-2 産生能に及ぼす OKY-046の効果の検討

末梢血単核球の IL-2 産生能は，宮川らの方法[14] に準じて測定した．すなわち，まず IL-2 assay には IL-2 dependent cell line である CTLL-2 (cytotoxic T cell line) [15] を，recombinant IL-2 (TGP-3, 武田薬品) を含む 10%FCS 加 RPMI1640にて継代培養して用いた．次いで上記の検体(培養上清)を96 well tissue culture cluster に tripricate にて100μl/well の希釈系列 (2^1-2^8倍) を 7 %FCS 加 RPMI1640 にて作製し，その各 well に 1×10^5/mlに 7 %FCS 加 RPMI1640にて調整浮遊させた CTLL-2 を 100μl ずつ添加後，5 % CO_2 incubator にて 37℃，24時間培養した．培養後各 well に ^{3}H-TdR0.2μCi を添加し18時間培養後，リンパ球幼若化反応と同様に液体シンチレーションカウンターにて ^{3}H-TdR の取り込み値 (dpm) を測定し，S. I. を求め IL-2 産生能として表わした．

4．末梢血単核球のNCF 産生能に及ぼす OKY-046の効果の検討

末梢血単核球の NCF 産生能は宮川ら[14], Harvath ら[16] の方法に準じて，Multiwell micro chemotaxis chambar (Neuroprobe) を用い Modified Boyden's method にて測定した．すなわち，デキストランを用いた比重遠沈法にて得られた好中球比率95%以上の同一健常人好中球を Hanks' balanced salt solution (HBSS, GIBCO) にて 2×10^6/mlに調整し，かかる浮遊液を上室に200μl，下室には検体 (培養上清) を 25μlずつ注入した．上室と下室の間はヌクレオポアフィルター (pore size 5 μm) で仕切り，5 %CO_2 incubator にて37℃，30分間静置後，フィルターを取り出し Giemsa 染色を行い，光学顕微鏡400倍にて下室側に遊走した好中球の10視野の合計を NCF 産生能として表わした．

5．末梢血単核球の ECF 産生能に及ぼす OKY-046の効果の検討

末梢血単核球の ECF 産生能は河田らの方法[17] に準じて，NCF 産生能と同様に Modified Boyden's method にて測定した．すなわち，まず同一健常人末梢血よりフローサイトメトリー[18] を用いて好酸球を分離し，90%以上の高純度で得られた好酸球を HBSS にて 2×10^5/mlに調整し，かかる浮遊液100μl を上室に，検体 (培養上清) 50μl を下室に入れ 5 %CO_2 incubator にて37℃，30分間静置後，フィルターを取り出し eosin 染色 (エオジノステイン，鳥居薬品) を行い，400倍にて下室側に遊走した好酸球数の10視野の合計を ECF 産生能とした．

6．末梢血単核球からの TXB_2 産生能に及ぼす OKY-046の効果の検討

TXB_2 は－80℃で保存していた検体 (培養上清) を New England Nuclear (NEN) 社製〔^{125}I〕-RIA Kit を用いて型のごとく測定した．

7．末梢血好中球からの LTC_4 および TXB_2 産生能に及ぼす OKY-046の効果の検討

LTC_4 産生能の測定は，高橋らの方法[19] に準じて行なった．すなわち，ヘパリン 1 ml加患者末梢血12mlにデキストラン 2 mlを加え室温に 30～60分間静置後，得られた buffy coat を Histopaque1077による比重遠沈法にて好中球分画を採取した．蒸留水 1 mlを加えて溶血処理後，1 mlの1.8%NaCl により等張に戻し再度遠沈後 Tris buffer (ヒトアルブミン，Ca^{2+}, Mg^{2+} 添加，pH7.38) により好中球比率95%以上の好中球浮遊液 (7×10^6PMNs/ml) を作製した．かかる浮遊液 1 mlに各濃度の OKY-046を添加し 1 時間前処置後，5 μg/mlの calcium ionophore A23187 (CaI) あるいは Candida 抗原を最終濃度150μg/mlになるように添加し37℃，15分間反応させた後，4 倍量の純エタノールを加えて反応を停止した．その上清を SEP-PAKC_{18} (Waters 社製) で処理後，Concentrator TC-8 (太陽科学工業社製) にて蒸発乾固させ50%アセトニトリル500μl で再溶解した．この150μl を

TSK-GELODS-120T（東ソー社製）カラムを用いた高速クロマトグラフィー（High performance liquid chromatography, HPLC, Water 社製）に注入し定量した．LTC_4 産生能は ng/7×10^6 PMNs に換算して表わした．また，TXB_2 は同様にして作製した上清を〔^{125}I〕-RIA Kit（NEN）にて測定した．

8．末梢血好中球からの superoxide（O_2^-）産生能に及ぼす OKY-046の効果の検討

O_2^- 産生能の測定は，高橋らの方法[19]に準じて以下のごとく行なった．すなわち，患者末梢血より分離した好中球の Krebs ringer phosphate buffer（KRP, pH7.4）浮遊液（1×10^6 PMNs/ml）20μl を65μM の酸化型 cytochrome C を含む KRP に加え，これに各濃度の OKY-046 を添加し15分間 preincubate 後，concanavalin A（10mg/ml）20μl と cytochalasin E（2 mg/ml）20μl を添加し，産生される O_2^- により還元される cytochrome C の吸光度の変化を double beam spectrophotometer UV-210A（島津）を用いて UV550nm で測定した．なお O_2^- 産生能は nmol/min/10^6PMNs で表わした．

9．各種薬剤の cytotoxicity に関する検討

添加に用いた OKY-046は，各種 buffer にて溶解後ミリポアフィルター（MillexHA 0.45μm）で濾過することにより作製した．また，OKY-046 添加による単核球，好中球および CTLL-2 の viability を，trypan blue dye exclusion test および培養上清中の lactate dehydrogenase（LDH）値により測定した結果，対照に比し有意差がなかったことから，OKY-046には直接的な cytotoxicity がないことをあらかじめ確認した．

10．薬理効果の評価と推計学的検定

添加薬剤の効果の評価は〔（薬剤非添加時の値－薬剤添加時の値）÷薬剤非添加時の値〕×100＝抑制率（%）で表わした．またその推計学的有意差検定は student's test を用い，P value は $p<0.05$を有意とした．

結　　果

1．TXB_2 産生能に及ぼす OKY-046の効果

1）末梢血単核球からの産生：患者末梢血単核球からの PHA および Candida 抗原刺激に

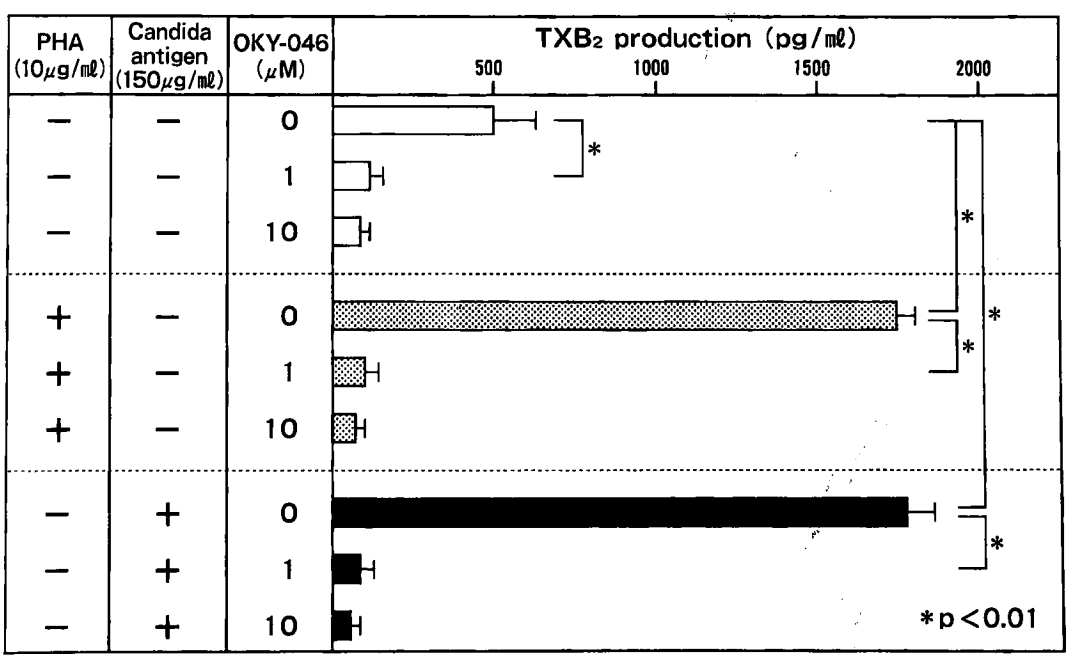


Fig. 1 Effect of OKY-046 on TXB_2 production from peripheral blood mononuclear cells stimulated by PHA and Candida antigen in intractable asthmatics. (n=12)

よる TXB_2 産生能および OKY-046添加による抑制効果を検討した．その結果，Fig. 1のごとくまず非刺激群に比して PHA および Candida 抗原のいずれの刺激でも TXB_2 産生能は同程度の有意な増加を示した($P<0.01$, $P<0.01$)．かかる TXB_2 産生能は OKY-046の1 μM 添加により有意に抑制され($P<0.01$, $P<0.01$)，また非刺激群でも濃度依存性に有意な抑制効果が認められた．

2）末梢血好中球からの産生：患者末梢血好中球分画からの CaI 刺激による TXB_2 産生能および OKY-046添加による抑制効果を検討し

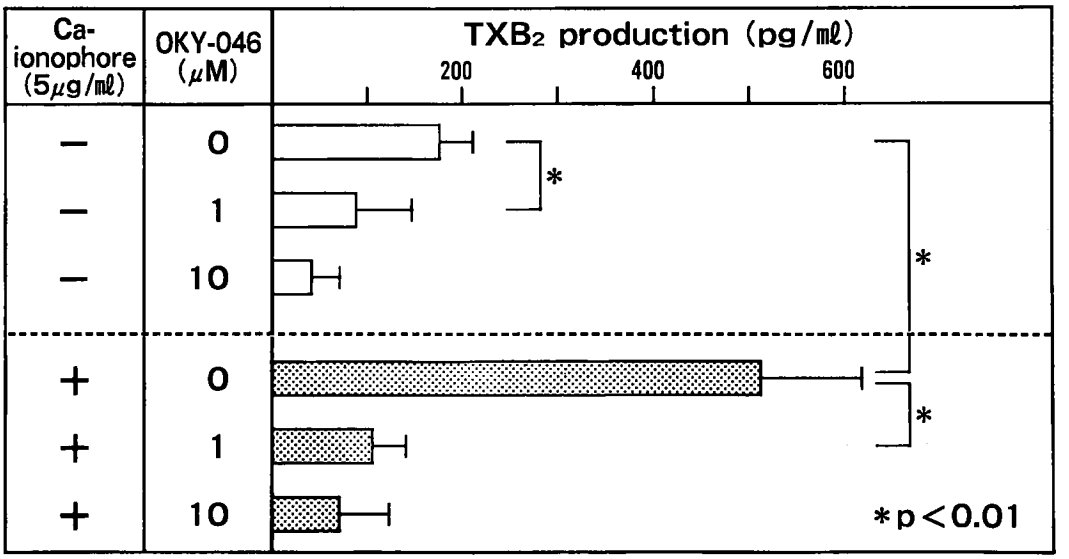


Fig. 2 Effect of OKY-046 on TXB_2 production from peripheral blood neutrophils stimulated by calcium ionophore in intractable asthmatics. (n=12)

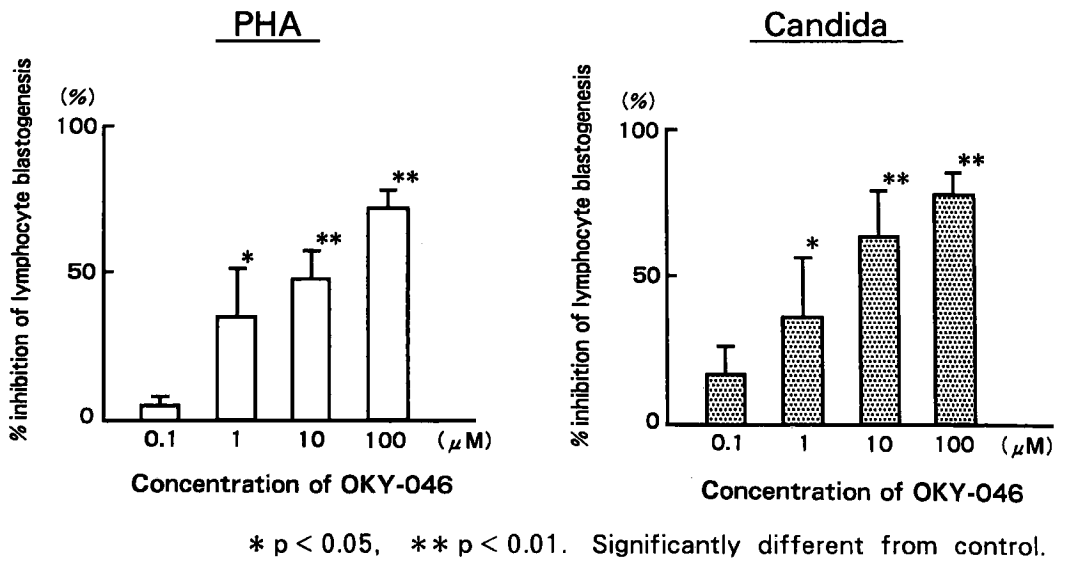
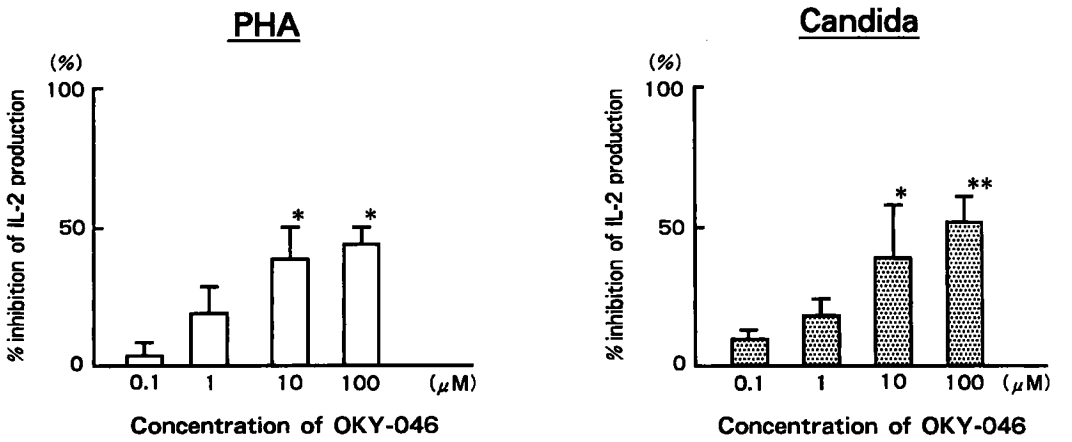


Fig. 3 Effect of OKY-046 on lymphocyte blastogenesis from peripheral blood mononuclear cells stimulated by PHA and Candida antigen in intractable asthmatics.(n=12)

た．その結果，Fig. 2のごとくCaI刺激によりTXB_2産生能は有意に増加したが（P<0.01），OKY-046の1μM，10μM添加により濃度依存性に有意な抑制効果が認められた（P<0.01）．またOKY-046はCaI非刺激群でも濃度依存性にTXB_2産生能を抑制した．

2．末梢血単核球に及ぼすOKY-046の効果

1）リンパ球幼若化反応およびIL-2産生能：非特異的刺激であるPHAと特異抗原刺激であるCandidaによる患者末梢血リンパ球の幼若化反応およびIL-2産生能に及ぼすOKY-046の抑制効果を検討した．その結果，まずFig. 3に示すPHA刺激によるリンパ球幼若化反応の抑制率はOKY-046の1μM，10μM，100μM添加では濃度依存性に有意な抑制効果が認められ（P<0.05，P<0.01，P<0.01），またCandida抗原



* p < 0.05, ** p < 0.01. Significantly different from control.

Fig. 4 Effect of OKY-046 on IL-2 production from peripheral blood mononuclear cells stimulated by PHA and Candida antigen in intractable asthmatics.(n=12)

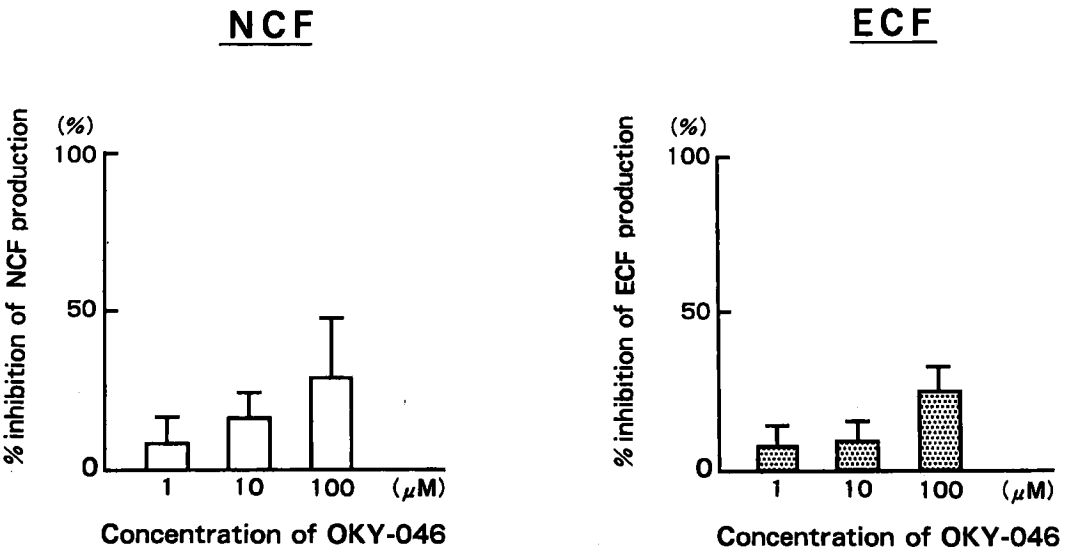
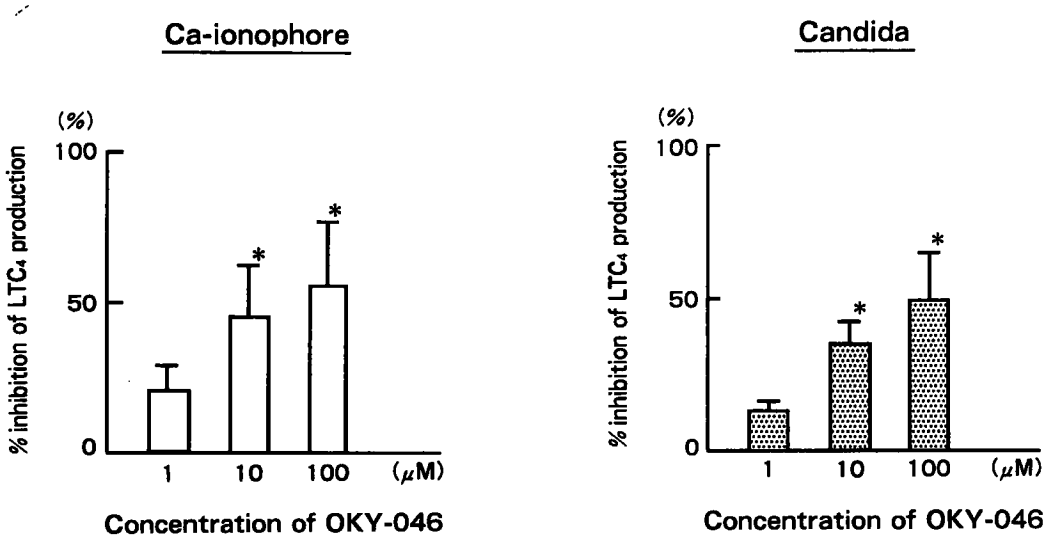
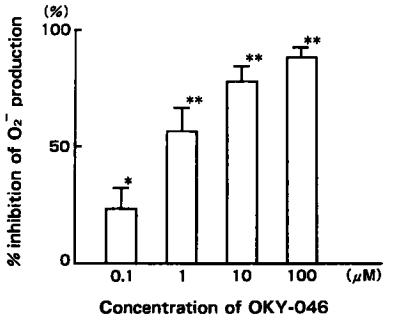


Fig. 5 Effect of OKY-046 on NCF and ECF production from peripheral blood mononuclear cells stimulated by Candida antigen in intractable asthmatics.(n=8)



* p < 0.05, Significantly different from control.

Fig. 6 Effect of OKY-046 on LTC_4 production from peripheral blood neutrophils stimulated by calcium ionophore and Candida antigen in intractable asthmatics.(n=10)



* p < 0.05, ** p < 0.01. Significantly different from control.

Fig. 7 Effect of OKY-046 on superoxide (O_2^-) production from peripheral blood neutrophils stimulated by concanavalin A and cytochalasin E in intractable asthmatics.(n=10)

刺激によるリンパ球幼若化反応も PHA と同様に濃度依存性に有意な抑制を示した (P<0.05, P<0.01, P<0.01). 一方 Fig. 4 の PHA による IL-2 産生能の抑制率は10μM 以上で濃度依存性に有意な抑制効果が認められた (P<0.05). また Candida 抗原刺激の際の抑制率も, 10μM 以上で濃度依存性に有意な抑制効果が認められた (P<0.05).

2) NCF および ECF 産生能：Candida 抗原刺激による患者末梢血単核球の NCF および ECF 産生能に及ぼす OKY-046の抑制効果を検討した. その結果, Fig. 5 のごとく NCF および ECF 産生能は OKY-046添加により濃度依存性に抑制される傾向が認められた.

3. 末梢血好中球に及ぼす OKY-046の効果

1) LTC_4 産生能：患者末梢血好中球分画に OKY-046溶液を 1 μM, 10μM および100μM 添加した際の LTC_4 産生能の抑制率を検討したところ, Fig. 6 のごとく CaI および Candida 抗原のいずれの刺激による LTC_4 産生能も OKY-046により濃度依存性に有意に抑制された (P<0.05, P<0.05).

2) O_2^- 産生能：患者末梢血好中球分画に OKY-046溶液を0.1μM, 1 μM, 10μM および 100μM 添加した際の O_2^- 産生の抑制率は, Fig. 7 のごとく濃度依存性に有意な抑制効果が認められた (P<0.05, P<0.01, P<0.01, P<0.01).

考　　察

近年, 抗アレルギー薬開発の進歩は目ざまし

くその薬理作用は多岐にわたり，病態に応じた治療薬の選択が可能となっている[20]．しかしこれらは，IgE 系の反応が主体を成す軽症のアトピー型喘息症例には有効性を認め，また通年性の非アトピー型喘息でもある程度の効果が認められているが，いずれも重症例には有効率が低く多くを期待できない．特に成人の難治性喘息発作の機序は Candida 感作によるⅢ型およびⅣ型反応すなわち細胞反応型アレルギー[2] であり，そのような症例の多くは種々の治療に抵抗性を示し，その治療薬もステロイド剤に勝る薬剤はいまだ見いだし難いのが現状であろう．

一方，近年開発された各種抗アレルギー剤の中で選択的 TXA_2 合成酵素阻害剤である塩酸オザグレル（OKY-046）は，LAR に対する抑制効果[12] や成人の重症喘息に対する長期投与での有用性，さらにはステロイドの減量効果のあることが報告されている[13]．そこで今回著者は，成人難治性喘息病態への PG_S および TXA_2 の関与を明かにする目的で，細胞反応型アレルギーのうち特にⅣ型反応を担当するリンパ球に対する OKY-046の抑制効果および好中球の各種反応性に及ぼす OKY-046の抑制効果を検討した．その結果，OKY-046は難治性喘息患者末梢血リンパ球の PHA および Candida 抗原による幼若化反応並びに IL-2 産生能を濃度依存性に有意に抑制し，さらに Candida 抗原による NCF およびECF 産生能も抑制する傾向が認められた．また患者末梢血好中球からの LTC_4 および O_2^- 産生能も濃度依存性に有意に抑制した．

ヒトにおいて，抗原吸入後にみられる LAR の際に血中 TXB_2 が peak を示し，OKY-046がそれを抑制することにより，TXA_2 は LAR の誘導及び発現に重要な役割を担っていることが想定されている[12]．さらに著者らは，Cadida 抗原吸入により LAR が誘発される症例では，そのリンパ球由来の Candida 抗原特異的 IL-2, NCF および ECF 産生能の著明な亢進を，また house dust による LAR 症例では mite 抗原特異的 IL-2 および ECF 産生能の有意な亢進を認め，細胞反応型アレルギーの一環としての LAR 発現に T リンパ球由来の諸因子が関与し，かかる LAR は喘息の重症難治化の機序に深く係わっている可能性を報告している[21]．また難治性喘息症例の気管支肺胞洗浄液（bronchoalveolar lavage fluid, BALF）中のリンパ球は Candida に強く感作され[22]，さらに末梢血でも同様の所見が得られており[23]，従って喘息の難治化病態には TXA_2 を介するリンパ球機能の調節機序が深く関与する可能性が想定される．

かかる観点から，今回リンパ球に対する選択的 TXA_2 合成酵素阻害剤を検討したところ，Candida に感作された難治性喘息患者末梢血リンパ球の Candida 抗原による幼若化反応並びに IL-2 産生能の亢進を，OKY-046が濃度依存性に有意に抑制した．さらに OKY-046は，患者末梢血リンパ球の Candida 抗原刺激による NCF および ECF 産生能の亢進を抑制する傾向が認められた．以上より OKY-046は，ステロイドのごとき強力な免疫抑制作用ではなく，むしろ抗原特異的なサイトカイン産生を中心とする細胞反応に対する抑制効果を介して LAR とか成人の難治性喘息に有効性を示すものと考えられた．

一方，TXA_2 合成酵素を10^{-8}M という低濃度で抑制し，cyclooxygenase や PGI_2 合成酵素に対しては10^{-4}M でも抑制しない特異性の高い阻害剤である OKY-046により TXA_2 の合成が阻害されると，prostaglandin I_2 (PGI_2)[24)25)] や prostaglandin E_2 (PGE_2)[26)] の産生が相対的に促進されるという報告がある．かかる影響に関して Leung らはヒト spleen cell に TXA_2 合成酵素阻害剤である imidazole, PGI_2 合成酵素阻害剤の tranylcypromine および PGE_2 を添加して幼若化反応を検討し，imidazole による抑制作用に tranylcypromine は影響せず，PGE_2 も相加的抑制効果しか認めなかったと報告しており[26]，従って今回の検討においてかかる PGI_2 の関与は少ないものと思われるが，PGE_2 の影響については thromboxane A_2 receptor antagonist，あるいは analogue などを用いてさらに詳細な検討が必要である．

気道平滑筋や血管系のみならずリンパ球などの白血球機能にも強い影響を及ぼすと考えられる TXA_2 は，アラキドン酸の cyclooxygenase 系代謝産物の一つであり，強力な気管支収縮作用を有し，その生物活性半減期は約30秒と非常

に不安定で自然に加水分解され TXB_2 に変換される[27]. Winther らは TXA_2 合成酵素阻害剤により細胞内の cAMP が増加することを報告しており[28], TXA_2 は Ca^{2+} の転送, 細胞内 cAMP の低下に関与している可能性があるが, TX の薬理作用ならびに機序には未だ不明解な点が多い. 小林らはイヌにおいてオゾンによる気道炎症時に TXA_2 合成酵素阻害剤の前処置により気道反応性亢進が減弱することから, TXA_2 が気道反応性の亢進にも重要な役割を担っていることを示唆している[29]. さらに成人の喘息患者のアセチルコリンや LTD_4 に対する気道反応性亢進にも同じく TXA_2 が関与している可能性が報告されている[10][11]. また Holtzman らはオゾン吸入後のイヌの気管の生検を行い, 気道上皮内に遊走してきた好中球数と気道反応性に相関があること[30], ヒトでも Seltzer らはオゾン吸入後に気道反応性亢進と BALF の好中球増加を認めている[31]. また相沢らは気道に炎症が発症することにより浸潤した好中球より遊離された TXA_2 の働きによって気道過敏性が成立すると報告しており[6], 気道炎症部位での TXA_2 の主たる産生細胞である好中球の動態は重要と考えられる.

また, かかる観点から木村らは, 重症難治性喘息および抗原吸入による LAR 後の BALF において好中球が高率に出現することを報告しており[32][33], この機作に Candida 抗原に感作されたリンパ球由来の NCF 産生亢進による好中球の局所集積を想定しており, さらに重症難治性喘息では末梢血好中球の LTC_4 および O_2^- 産生能の有意な亢進を認めている[3][4][19]. 従って喘息の難治化病態には, 感作リンパ球由来の NCF により気道局所に集積する好中球から産生される TXA_2 が関与する可能性が想定される. さらに今回の難治性喘息における好中球に及ぼす OKY-046の直接作用の検討では, LTC_4 および O_2^- 産生能が濃度依存性に有意に抑制されており, 本剤の多面的な薬効が判明した.

なお, LT と TXA_2 の相互作用については, モルモットに LTC_4, LTD_4 を静注した際の気道内圧亢進が TXA_2 合成酵素阻害剤で抑制されたという報告や[34], 臨床的にも成人気管支喘息患者の LTD_4 に対する気道反応亢進を OKY-046 が有意に改善したという報告があり[11], LT の作用の一部が TXA_2 を介している可能性が示唆されている. また OKY-046は O_2^- 産生能に対して, より強い抑制効果が認められたが, かかる抑制効果が細胞内 Ca^{2+} の低下やプロテインキナーゼ C の不活化を介した O_2^- 生成酵素である NADPH オキシダーゼの抑制による可能性, あるいは O_2^- 産生抑制作用を有する PGE_2[35]およびPGI_2[36] の産生亢進による可能性などが考えられ, 今後更に詳細な検討が必要と思われる.

以上, 今回著者は成人の難治性喘息患者を対象にリンパ球に対する作用として幼若化反応並びに IL-2, NCF および ECF 産生能を, 好中球に対する作用として LTC_4 および O_2^- 産生能を指標として OKY-046の作用機序を検討した結果, 本剤にはⅣ型反応および好中球からの mediator release に対する抑制効果が認められ, 本剤は難治性喘息の病態に基づいた治療薬として有用である可能性が示唆された.

結　　論

成人難治性喘息患者を対象に細胞反応型アレルギーに対する TXA_2 の関与を明かにする目的で, 選択的 Thromboxane A_2 合成酵素阻害剤塩酸オザグレル (OKY-046) を用い, 末梢血リンパ球および好中球の各種反応性に対する効果について検討し, 以下の結果を得た.

1. 患者末梢血単核球からの PHA および Candida 抗原刺激による TXB_2 産生能は有意に増加し ($P<0.01$, $P<0.01$), OKY-046はこれを有意に抑制した ($P<0.01$, $P<0.01$).

2. 患者末梢血中球からの CaI 刺激による TXB_2 産生能は有意に増加し($P<0.01$), OKY-046はこれを有意に抑制した ($P<0.01$).

3. 患者末梢血単核球の PHA および Candida 抗原によるリンパ球幼若化反応 ($P<0.01$, $P<0.01$) 並びに IL-2 産生能 ($P<0.05$, $P<0.01$) は OKY-046により濃度依存性に有意に抑制された.

4. 患者末梢血単核球の Candida 抗原による NCF および ECF 産生能は OKY-046により抑制される傾向が認められた.

5．患者末梢血好中球からのLTC_4およびO_2^-産生能はOKY-046により濃度依存性に有意に抑制された（$P<0.05$, $P<0.01$）.

以上より気管支喘息の難治化の病態にTXA_2の関与が認められ，OKY-046は難治性喘息治療薬としての有用性が示唆された.

稿を終えるにあたり，御指導御校閲を賜わりました恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表わしますと共に直接御指導御助言を頂きました高橋 清講師に深謝致します.

（本論文の要旨は第3回日本アレルギー学会春季臨床集会にて発表した.）

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．日胸疾患会誌（1983）**21**, 181—182.

2）木村郁郎：気管支病変におけるアレルギーとリンパ球．アレルギア（1990）**19**, 12—16.

3）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記録集，デー・エムベー・ジャパン，東京（1985）pp. 23—40.

4）高橋 清：中高年発症型難治性気管支喘息の機序；第4回免疫薬物療法研究会記録集，医薬ジャーナル社，大阪（1987）pp. 110—130.

5）Chung KF, Aizawa H, Becker AB, Frick O, Gold WM and Nadel JA：Inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness by a thromboxane synthetase inhibitor (OKY-046) in allergic dogs. Am Rev Respir Dis (1986) **134**, 258—261.

6）Aizawa H, Chung KF, Leikauf GD, Ueki I, Bethel RA, O' byrne PM, Hirose T and Nadel JA：Significance of thromboxane generation in ozon-induced airway hyperresponsiveness in dogs. J Appl Physiol (1985) **59**, 1918—1923.

7）Chung KF, Aisawa H, Leikuf GD, Ueki I, Evans TW and Nadel JA：Airway hyperresponsiveness induced by platelet-activating facter；Role of thromboxane generation. J Pharmacol Exp Ther (1986) **236**, 580—584.

8）O' byrne PM, Leikauf GD, Aizawa H, Bethel RA, Ueki I, Holtzman MJ and Nadel JA：Leukotriene B_4 induces airway hyperresponsiveness in dogs. J Appl Physiol (1985) **59**, 1941—1946.

9）堂前真理子，広瀬隆士，石橋正義，池田東吾，重松信昭，松本法親，長野 準：感作モルモットの気道攣縮にあずかるSRS-Aの作用機序について．呼吸（1982）**1**, 235—240.

10）Fujimura M, Sasaki F, Nakatsumi Y, Takahashi Y, Hifumi S, Taga K, Mifune J, Tanaka T and Matsuda T：Effect of thromboxane synthetase inhibitor (OKY-046) and a lipoxygenase inhibitor (AA-861) on bronchial responsiveness to acetylcholine in ashmatic subjects. Thorax (1986) **41**, 955—959.

11）湯川龍雄，山井孝夫，渡辺茂男，福田 充，寺師義典，福田 健，牧野荘平：選択的Thromboxane A_2合成酵素阻害剤（OKY-046）が気管支喘息患者の気道過敏性に及ぼす影響．日胸疾患会誌（1987）**25**, 1309—1319.

12）岩本逸夫，羅 智靖，佐藤俊子，富岡玖夫，吉田 尚：アレルゲン吸入誘発即時型および遅発型喘息反応におけるトロンボキサンA_2産生．アレルギー（1986）**35**, 437—446.

13）長野 準，広瀬隆士，吉田 稔，石橋正義，田丸紀子，安武敏明，直江弘昭，工藤秀雄，井上謙次朗，鬼塚れい子：気管支喘息に対するThromboxane合成酵素阻害剤（OKY-046）の長期使用経験．診療と新薬（1990）**27**, 1065—1076.

14）宮川秀文，難波一弘，白石高昌，名部 誠，槇本 晃，佐藤 恭，武田 昌，多田慎也，高橋 清，木村郁郎：重症難治性喘息におけるⅣ型アレルギーの関与について — カンジダ抗原によるIL-2産生能と好中球

遊走能一. アレルギー (1988) **37**, 12—18.

15) Gillis S, Marry MF, Winny OU and Smith KA : T cell growth factor ; Parameters of production and a quantitation microassay for activity. J Immunol (1978) **120**, 2027—2032.

16) Harvath L, Falk W and Leonard EJ : Rapid quantitation of neutrophil chemotaxis. Use of a polyvinylpyrrolidonate-free polycarbonate membrane in multiwell assembly. J Immunol Methods (1980) **37**, 39—45.

17) 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.

18) 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1編フローサイトメトリーを用いた好酸球分離法と好酸球遊走因子について. 岡山医誌 (1990) **102**, 733—743.

19) 高橋 清, 清水一紀, 難波一弘, 中山堅吾, 岡田千春, 辻 光明, 中藤研一, 周藤真康, 多田慎也, 谷崎勝朗, 木村郁郎：重症難治性喘息における末梢血好中球分画からのロイコトリエン産生能に関する検討. アレルギー (1988) **37**, 5—11.

20) 木村郁郎, 高橋 清：気管支喘息—最近の考え方と治療の進歩—. 診断と治療 (1989) **7**, 1669—1673.

21) 金廣有彦, 古藤直紀, 岡本章一, 猪木篤弘, 難波康夫, 宗田 良, 多田慎也, 高橋 清, 谷崎勝朗, 木村郁郎：抗原特異的感作リンパ球からみた気管支喘息の病態について. 日胸疾患会誌 (1991) **29**, 142.

22) 武田 昌：気管支喘息におけるリンパ球機能に関する研究, 第1編気管支喘息における BAL 液中並びに末梢血中リンパ球の吸入抗原に対する幼若化反応の検討. 岡山医誌 (1991) **103**, 387—397.

23) 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. アレルギー (1990) **39**, 422.

24) Hiraku S, Kawasaki A and Ujiie A : Pharmacological studies on the TXA_2 syntetase inhibitor (E) -3- [p-(H-imidazol-1-ylmethyl) phenyl] -2-propenoic acid (OKY-046). Jpn J Pharmacol (1986) **41**, 393—401.

25) Kitamura S, Ishihara Y and Takaku F : Effect of thromboxane synthetase inhibitors (OKY-046, OKY-1580) on the action of bronchoactive agents in guineapig tracheal strips and on arachidonate metabolism in ginea pig lung lobes. Prostaglandins Leukotrienes Med (1984) **14**, 341—350.

26) Leung KH and Enrico M : Prostaglandin modulation of development of cell-mediated immunity in culture. Nature (1980) **288**, 597—600.

27) Hamberg M, Svensson J and Samuelsson B : Thromboxanes ; A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. Proc Natl Acad Sci USA (1975) **72**, 2994—2998.

28) Winther K, Knudsen JB, Malling HJ, Skov PS and Norn S : Leukocytes, specific thromboxane inhibition and histamine release. Acta Pharmacol Toxicol (1982) **51**, 46.

29) Kobayashi H, Adachi M, Satoh H, Okada Y and Takahashi T : The effect of thromboxane (TX) A_2 synthetase inhibitor on airway hyperresponsiveness induced by ozone exposure in beagles. Jpn J Allergol (1985) **34**, 469—473.

30) Holtzman MJ, Fabbri LM, O' byrne PM, Gold BD, Aizawa H, Walters EH, Alpert SH and Nadel JA : Importance of airway inflamation for hyperresponsiveness induced by ozone. Am Rev Respir Dis (1983) **127**, 686—690.

31) Seltzer J, Bigby BG, Stulbarg M, Holtzman MJ, Nadel JA, Ueki I, Leikauf GD, Goetzer Ej and Boushey HA : O_3-induced change in bronchial reactivity to methacholine and airway inflamation in humans. J Appl Physiol (1986) **60**, 1321—1326.

32) 木村郁郎：気管支肺胞洗浄液. 免疫と疾患 (1982) **4**, 329—336.

33) 難波一弘，高橋 清，多田慎也，清水一紀，中藤研一，岡田千春，辻 光明，沖 和彦，谷崎勝朗，木村郁郎：House dust による気管支喘息患者遅発型気道反応の発症機序に関する検討 ― 気管支肺胞洗浄法を中心に ―．アレルギー (1988) **37**, 67—74.

34) Ueno A, Tanaka K and Katori M : Possible involvement of thromboxane in bronchocostrictive and hypertensive effect of LTC_4 and LTD_4 in guinea pigs. Prostaglandins (1982) **23**, 865.

35) Wong K and Freund K : Inhibition of the n-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine induced respiratory burst in human neutrophils by adrenergic agonists and prostaglandins of the E series. Can J Physiol Pharmacol (1981) **59**, 915—920.

36) Fantone JC and Kinnes DA : Prostaglandin E_1 and prostaglandin I_2 modulation of superoxide production by human neutrophils. Biochem Biophys Res Commun (1983) **1133**, 506—512.

Studies on the mechanism and treatment of intractable asthma Part 1. Effects of a specific thromboxane A_2 synthetase inhibitor on lymphocyte and neutrophil functions in intractable asthmatics

Arihiko KANEHIRO
Second Department of Internal Medicine,
Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan
(Director : Prof. I. Kimura)

To clarify whether thromboxane A_2 (TXA_2) is involved in type III and IV allergy, so-called "cell-mediated allergy", the effects of a specific TXA_2 synthetase inhibitor, sodium ozagrel (OKY-046) on peripheral blood mononuclear cells and neutrophils in adult intractable asthmatics were studied.

Lymphocyte blastogenesis and interleukin-2 (IL-2) production from peripheral blood mononuclear cells stimulated by PHA and Candida antigen in intractable asthmatics was significantly suppressed dose-dependently by OKY-046. The neutrophil chemotactic factor (NCF) and eosinophil chemotactic factor (ECF) from peripheral blood mononuclear cells stimulated by Candida antigen in intractable asthmatics tended to be suppressed by OKY-046. Furthermore, leukotriene C_4 (LTC_4) and superoxide (O_2^-) production from peripheral blood neutrophils in intractable asthmatics was significantly suppressed dose-dependently by OKY-046.

These findings suggest that TXA_2 plays an important role in the developement of intractable asthma and OKY-046, which has a suppressive effect on type IV allergy caused by lymphocyte activation and on mediator release from neutrophils, might be a useful drug in the treatment of intractable asthmatics.