

## Mini Review

## クロモグリク酸ナトリウムの遅発性喘息反応に対する抑制効果

奈邊 健, 山本麻紀, 河野茂勝

京都薬科大学薬理学教室

*Inhibitory effect of disodium cromoglycate on late asthmatic response*

Disodium cromoglycate (DSCG) is a widely used anti-asthmatic drug with few side effects. One of the mechanisms by which DSCG suppresses asthma is prevention of anaphylactic release of chemical mediators from mast cells. However, it has also been reported that DSCG attenuates late asthmatic response and airway hyperresponsiveness, the induction mechanisms of which can not be explained simply by release of chemical mediators from mast cells. Mechanisms of anti-inflammatory effects of DSCG other than its mast-cell stabilising effect have been unclear. In this study, we evaluated effects of DSCG on early and late asthmatic response in guinea pig. Guinea pigs were alternately sensitized and challenged by exposure to mists of ovalbumin+Al(OH)<sub>3</sub> and ovalbumin, respectively. DSCG administered intratracheally before the fifth challenge dose-dependently inhibited late asthmatic response, but early asthmatic response was not affected. Interestingly, DSCG at 2 mg/kg potently suppressed increases in cysteinyl leukotrienes and thromboxane A<sub>2</sub> in the lung during late asthmatic response. Eosinophilia was slightly reduced by DSCG. The inhibitory effect of DSCG on late asthmatic response is apparently due to inhibition of release of arachidonic acid metabolites.

Rec.9/29/2004, Acc.11/18/2004, pp123-129

Takeshi Nabe, Maki Yamamoto, Shigekatsu Kohno

Department of Pharmacology, Kyoto Pharmaceutical University

**Key words** disodium cromoglycate, late asthmatic response, cysteinyl leukotrienes, thromboxane A<sub>2</sub>, guinea pig

## はじめに

クロモグリク酸ナトリウム (DSCG) は, 一般に肥満細胞からのアレルギー性のケミカルメディエーター遊離を抑制することにより抗喘息作用を発揮することが知られてきた。しかしながら, DSCG は気管支喘息患者において, 慢性的な気道炎症に基づくとされる症状をも緩解することが報告されており<sup>1,2)</sup>, DSCG の抗喘息作用のメカニズムを論ずるためには, 単に肥満細胞の活性化の抑制だけでは説明できない。本稿では, 慢性的な気管支喘息の症状の一つである遅発性喘息反応 (late asthmatic response; LAR) を呈す

るモルモットモデルを用いて, DSCG の効果を検討し, その抑制作用のメカニズムの一端を解析した成績を紹介する。

## DSCG の肥満細胞からのケミカルメディエーター遊離抑制作用

DSCG は, ラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離に対し極めて強い抑制作用を示す<sup>3)</sup>ことはよく知られている。これに対し, 本薬物はヒト肺由来の肥満細胞からのケミカルメディエーター遊離に対しては, 若干の抑制を示す

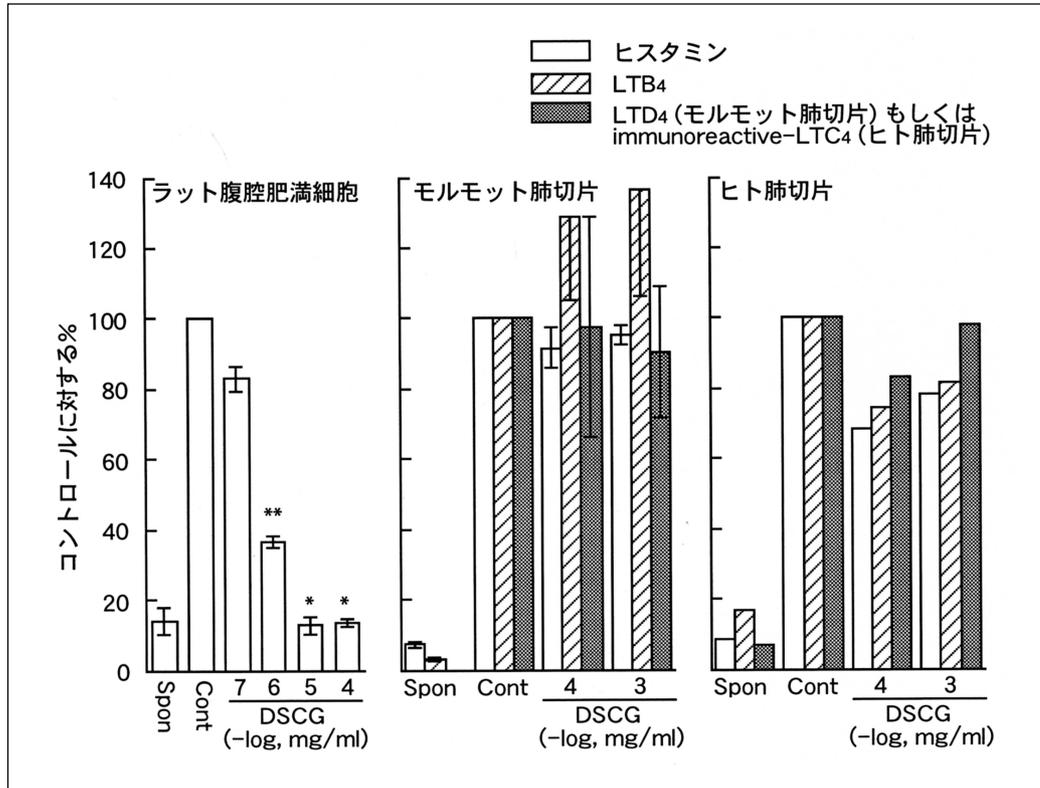


図1 ラット腹腔肥満細胞,モルモット肺切片ならびにヒト肺切片からのアナフィラキシー性ヒスタミンおよびロイコトリエン(LT)遊離に及ぼす影響

ラットの受動的感作は抗 dinitrophenylated *Ascaris suum* extract(DNP-As)ラット血清を腹腔内投与することにより行い,投与48時間後に腹腔浸出細胞を採取した。モルモットは抗 benzylpenicilloyl bovine gamma globulin(BPO-BGG)を静脈内投与することにより受動的に感作し,感作48時間後に肺を摘出して切片とした。肺癌患者の摘出肺の肉眼的正常部分より作成した肺切片は,抗ダニヒトアトピー血清中でインキュベーションすることにより受動的感作を行った。これらの細胞もしくは肺切片は,試験管内でDNP-As, BPO-BGG もしくはダニ抗原抽出物とともに10~15分インキュベーションした。クロモグリク酸ナトリウム(DSCG)は抗原添加の1(ラットおよびモルモット)もしくは5(ヒト)分前に添加した。それぞれのカラムは3もしくは2例の平均±標準誤差もしくは平均でそれぞれ表示している。

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (コントロールとの統計学的有意差), Spon; 自発性遊離, Cont; コントロール

ものの強力な抑制を示さない<sup>4)</sup>。

我々も,これまでにラット腹腔肥満細胞,ならびにモルモットおよびヒトの肺切片からのアナフィラキシー性のヒスタミンおよびシステインロイコトリエン(CysLT)遊離に及ぼすDSCGの効果を検討してきた<sup>5,6)</sup>。図1に示すごとく,受動的に感作したラットの腹腔から採取した肥満細胞からの抗原による *in vitro* ヒスタミン遊離は, DSCGの前処置により $10^{-7}$ g/mlより濃度依存的に抑制され, $10^{-6}$ g/ml以上の濃度では完全な抑制であった<sup>5)</sup>。これに対し,抗ダニヒトアトピー血清中で受動的に感作したヒト肺切片からの抗原刺激によるヒスタミンならびにLTC<sub>4</sub>およびimmunoreactive-LTC<sub>4</sub>の遊離は,高濃度( $10^{-4}$ および $10^{-3}$ g/ml)の

DSCGにより若干抑制される傾向が認められるにすぎない<sup>6)</sup>。また,受動的感作モルモットから摘出した肺切片からの抗原によるヒスタミンならびにLTsの遊離はDSCGによって何ら影響を受けない<sup>5)</sup>。モルモットおよびヒトの肺組織より酵素処理によってdisperseして得られた肥満細胞からのアナフィラキシー性のヒスタミン遊離もDSCGによって大きな影響を受けない<sup>4,7)</sup>ことから,上述のラット腹腔肥満細胞ならびに肺切片に対するDSCGの作用態度の相違は,単に細胞と組織の違いであるとは言い難く,むしろこれまでに多くの報告によって示唆されてきたごとく,肥満細胞からのケミカルメディエーター遊離反応には大きな種属差および臓器差が存在することに基づくものと考え

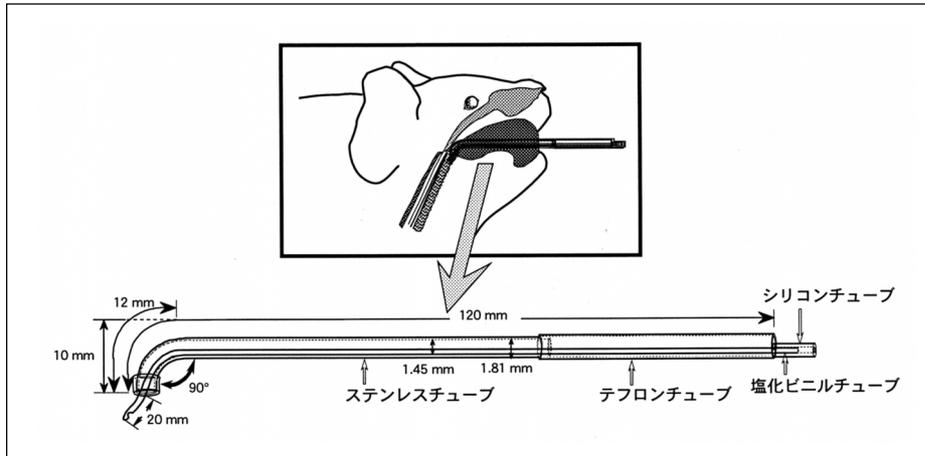


図2 モルモットにおける気管内投与方法(文献17)より引用)

詳細は本文中を参照.

られる.

さて, 1980年代を中心に DSCG 様の作用を有する経口投与可能な, いわゆる「メディエーター遊離抑制薬(狭義の抗アレルギー薬)」が盛んに開発され, 現在でも7種類の薬物が気管支喘息をはじめとしたアレルギー疾患の治療薬として使用されている. これらの薬物の開発は, 主としてラット腹腔肥満細胞からのアナフィラキシー性ヒスタミン遊離に及ぼす影響を指標としてなされてきた. しかしながら, 上述のごとく, ラット腹腔肥満細胞と少なくともヒト肺からのヒスタミン遊離反応の機序には DSCG に対する作用態度の点で大きな相違がある. したがって, 「メディエーター遊離抑制薬」の開発にラット腹腔肥満細胞を使用することが適当であるかどうかについての疑問が一部の研究者によって強く示唆されてきた.

さらに, 「メディエーター遊離抑制薬」が単に肥満細胞からのケミカルメディエーターの遊離を抑制する作用のみで抗喘息作用を発揮しているか否かは明らかではない. というのは, DSCG は気管支喘息患者における気道過敏性亢進やLARを抑制することが1980年代後半より示唆されてきたからである<sup>12)</sup>. 気道過敏性亢進やLARの発現には, 確かに肥満細胞の活性化がトリガーになっている可能性も考えられるが, それ以外に多くの免疫担当細胞の活性化を伴って引き起こされている可能性がより高い. したがって, これらの臨床知見は, DSCG が「肥満細胞膜安定化作用」以外の何らかの抗炎症作用を有していることを強く示唆するものである.

そこで, 我々は DSCG の抗喘息作用に繋がる抗炎症作用の一端を明らかにすることを目的とし, 以前より確立してきたモルモット気管支喘息モデルを用い, 本モデルにおいて発症するLARにDSCGが有効性を示すか否か, さ

らにその抑制作用の機序に関する若干の検討を行った.

## モルモット遅発性喘息モデルの特徴

気管支喘息患者に抗原の吸入を行うと, 抗原吸入直後から約30分以内に呼吸困難症状がみられ, 2時間以内に緩解する即時性喘息反応(early asthmatic response; EAR)が認められる<sup>8,9)</sup>. さらに一部の患者では, 数時間後より徐々に発症し, 比較的長時間持続するLARも発現することが報告されてきた<sup>8,9)</sup>. 実際に成人気管支喘息患者の約50%がLARを発症するとされ<sup>8,9)</sup>, またLARの程度は, 重症の気管支喘息の特徴的な症状である気道過敏性の亢進の程度と関連することも示唆されている<sup>10)</sup>.

病態の発症機構の詳細な解析ならびに治療薬の開発には, 実験的な動物モデルは不可欠である. これまでに種々の実験動物を用いたアレルギー性気管支喘息モデルが開発されてきた. モルモットは, アナフィラキシー時の標的臓器が主として気道系であり<sup>11)</sup>, また種々のagonistsによる気道系平滑筋の反応性<sup>12)</sup>がヒトのそれらと類似している. これまでに我々は, 抗原として用いたovalbumin (OVA) をモルモットに繰り返し吸入させることで, ほぼ再現性よくLARを発現する喘息モデルを確立してきた<sup>13,14)</sup>. すなわち, Al(OH)<sub>3</sub>に抗原として用いたOVAを吸着させ, この懸濁液 [OVA+Al(OH)<sub>3</sub>] をガラス製加圧ネブライザーを用いてミスト化し, これをモルモットに2週間間隔で交互に吸入させることにより, それぞれ反応惹起および感作を繰り返した. 本法により4もしくは5回目の反応惹起からEARおよびLARをほぼ再現性よく発現させることができる<sup>14)</sup>. 後述の図3のコントロール群の反応に示すごとく, 5回目の反応惹起後の気道抵抗(specific airway resistance)をdouble-flow plethysmograph法で測定すると, 反応惹起

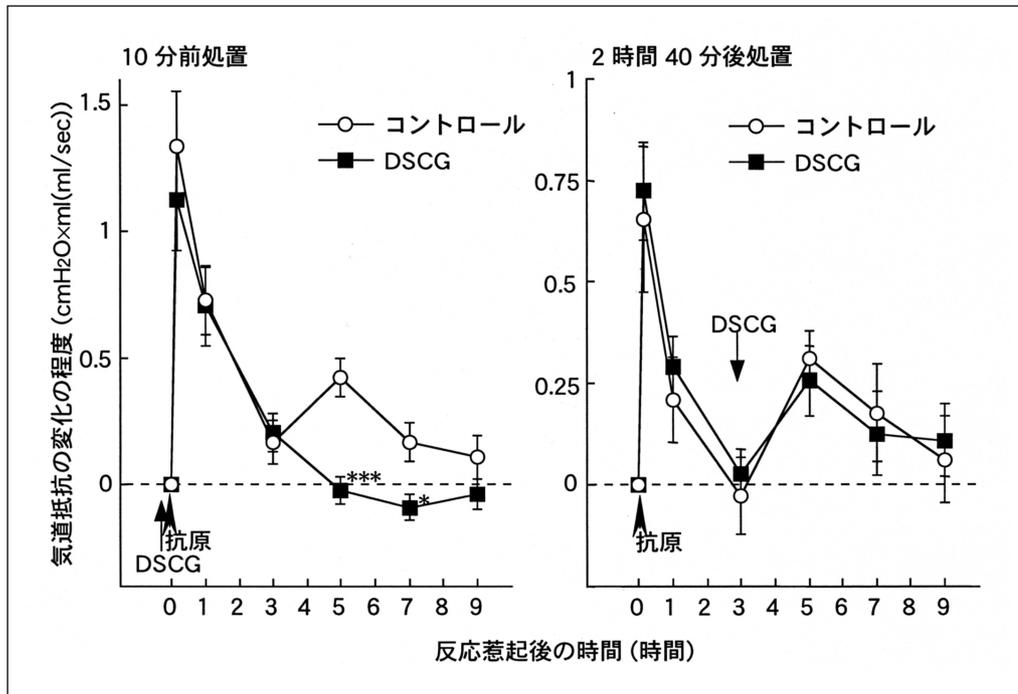


図3 感作モルモットにおける即時性および遅発性の喘息反応に及ぼすクロモグリク酸ナトリウム(DSCG)の影響(文献17)より引用)

DSCG(2mg/animal)は反応惹起の10分前もしくは2時間40分後に気管内投与した。それぞれの点は11～13例の平均±標準誤差で表示している。

\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  (コントロール群との統計学的有意差)

10分および5時間後をピークとする2相性の気道抵抗の有意な上昇が認められる。

## DSCGのLAR抑制作用

DSCGは、消化管からの吸収性に乏しいため、喘息治療には専らドライパウダーもしくはエアロゾルを吸入投与される。これまでにモルモットなどの実験動物を用いた喘息モデルにおいて、DSCGは溶液をミストにしたものを鼻孔から自発呼吸によって吸入させる方法がとられてきた<sup>15,16)</sup>。しかしながら臨床の喘息治療時には鼻腔を介さず口腔より効率よく吸入する方法がとられている。手術的侵襲を伴わない気管内投与は、モルモットではマウスやラットとは異なり困難である。そこで、筆者らは新たにモルモットの気管内投与の方法を考案し確立した<sup>17)</sup>。

すなわち、モルモットの口腔内に残存した飼料を脱脂綿にて可及的除去した後、リドカイン溶液を染み込ませた脱脂綿でモルモットの口腔内および喉頭部を局所的に麻酔した。この条件下、図2に示すごとく、モルモットの喉頭部の構造を考慮に入れて、先端を90度彎曲させたステンレス製チューブを口腔より挿入し、喉頭部の気管上部に当てがった。このステンレスチューブの他端に取り付けたテフ

ロンチューブ内を呼気が通過する際の曇りを指標にしてこのチューブを介して呼吸が行われていることを確認した上で、小児用栄養カテーテルをステンレスチューブ内に挿入し、チューブの先端より栄養カテーテルの先端をさらに約2cm気道内へ導出した。栄養カテーテルの他端に、パイペットマンチップを装着し、このチップに溶液を充填して100 $\mu$ L/animalで投与するわけであるが、気管に栄養カテーテルが正しく挿入されていれば溶液が吸気に同調して気道内へ自然に吸引滴下される。

図3に示すごとく、DSCGを2mg/animalの用量で5回目の反応惹起の10分前に気管内投与すると、EARには何ら影響を及ぼさないが、LARを完全に抑制した<sup>17)</sup>。このDSCGによるLARの抑制作用は0.5-2mg/animalの用量で用量に依存したものであった<sup>17)</sup>(データには示さず)。しかしながら、DSCGを反応惹起の2時間40分後に気管内投与すると、2mg/animalの用量でも全く抑制効果は認められなかった<sup>17)</sup>(図3)。

2mg/animalの用量は臨床用量に比較して決してかけ離れた量ではなく、DSCGは惹起前に処置することで強力なLAR抑制作用を示すことが明らかとなった。一方、EARに対しては何ら抑制を示さない成績は、図1に示したよう

表 遅発性喘息発症時の気管支肺胞洗浄液中のシステインロイコトリエン (CysLTs) およびトロンボキサン (TX) B<sub>2</sub>産生に及ぼすクロモグリク酸ナトリウム (DSCG) の影響

	CysLTs(pg/ml)	TXB <sub>2</sub> (pg/ml)
ネガティブコントロール	311 ± 63	6760 ± 1340
コントロール	507 ± 123	11500 ± 2650
DSCG	182 ± 29*	5780 ± 796*

DSCG (2 mg/animal) は反応惹起の10分前に気管内投与し、惹起5時間後に気管支肺胞洗浄した。それぞれの値は12～14例の平均±標準誤差で表示している。\* $p < 0.05$  (コントロール群との統計学的有意差)。ネガティブコントロール：感作モルモットの5回目の惹起時に生理食塩水吸入を行った群

に、本薬物がモルモット肺切片からのアナフィラキシー性ケミカルメディエーター遊離に対して全く抑制を示さない成績と一致するものである。したがって、DSCGのこのLARの抑制の作用機序は少なくとも即時性の肥満細胞からのメディエーター遊離を抑制したことに基づくものではないことが予想される。さらに、後処置では抑制がみられなかったことから、DSCGは反応惹起直後より引き起こされるLARの惹起に繋がる何らかのイベントを抑制し、結果的にその発現を抑制したものと考えられる。

## DSCGの肥満細胞膜安定化作用以外の抗喘息作用機序

本モデルにおいて発現するLARは、CysLTsの受容体であるCysLT<sub>1</sub>受容体に対する拮抗薬ならびにトロンボキサン(TX)A<sub>2</sub>の受容体であるTP受容体に対する拮抗薬の処置によりいずれも約40%抑制される<sup>18)</sup>。これらのアラキドン酸代謝物がLAR発現時にどの細胞からどのように遊離してくるのかは不明であるが、これらが本LARの発現に関与していることは明らかである。

そこでDSCGの前処置がLAR発現時におけるこれらのアラキドン酸代謝物の産生に影響を及ぼすか否か検討した。すなわち、DSCGを反応惹起10分前に気管内投与し、惹起5時間後に気管支肺胞洗浄を行い、洗浄液中のCysLTsならびにTXA<sub>2</sub>の安定代謝物であるTXB<sub>2</sub>を測定した。その結果、表に示すごとく、惹起5時間後のCysLTsおよびTXB<sub>2</sub>の産生量の増大はDSCGの前処置により完全に抑制された<sup>17)</sup>。

上述のごとく、DSCGが肺切片からのCysLT遊離を抑制しないこと、ならびにEARには影響を及ぼさないことから、DSCGのLAR時におけるアラキドン酸代謝物の産生・遊離の抑制は、即時性に肥満細胞の活性化を抑制することによるものではないと考えられる。したがって、DSCGは

これらのアラキドン酸代謝物の遅発的な産生を抑制したものと考えられる。一方、これまでにDSCGはintercellular adhesion molecule-1やvascular cell adhesion molecule-1などの接着分子の発現を抑制することで、好酸球などの炎症性細胞の肺への浸潤を抑制する可能性が示唆されてきた<sup>19,20)</sup>。これらの報告を考慮に入れると、本モデルにおいてもDSCGはアラキドン酸代謝物のcellular sourceになりうる炎症細胞の浸潤を抑制することで、LAR時のCysLTsおよびTXA<sub>2</sub>の産生を抑制したのかもしれない。

そこで、LAR発現時における肺組織中の好酸球浸潤に及ぼすDSCGの影響を検討した。本モデルでは、LAR発現のピークである反応惹起5時間後には未だ気管支肺胞洗浄液中に回収される好酸球は顕著に増加しないが、肺組織ホモジネート中のeosinophil peroxidase活性を指標とした肺組織中好酸球は顕著に増加することをこれまでに明らかにしてきた<sup>21)</sup>。DSCGの惹起10分前の気管内投与は、このアレルギー性好酸球増多に対し、部分的に抑制したが有意な差ではなかった<sup>17)</sup>(データには示さず)。DSCGのCysLTsおよびTXA<sub>2</sub>の産生に対する抑制が完全であったのに対し、好酸球浸潤に対する抑制は部分的であったという結果より、これらのアラキドン酸代謝物のcellular sourceの一部は好酸球であるかもしれないが、それ以外の細胞も関与する可能性が推察される。実際に、モルモット好酸球はCysLTsおよびTXA<sub>2</sub>の産生能を有するが、これにはCa<sup>2+</sup> ionophore A23187などの刺激剤の高濃度を必要とする<sup>22)</sup>。

以上の成績より、DSCGのLARに対する抑制作用機序の少なくとも一部はCysLTsおよびTXA<sub>2</sub>の産生量を減ずることにあると考えられる。この作用はDSCGの後処置では認められないことから、すでに肺組織に浸潤した細胞の活性化を抑制した結果ではなく、むしろ反応惹起直後より誘起されるアラキドン酸代謝物産生細胞の浸潤自体を抑制した結果である可能性が考えられる。

## おわりに

これまでの臨床における成績ならびに本研究の結果より、DSCGの抗喘息作用の機序は肥満細胞からのケミカルメディエーター遊離抑制作用のみに基づくものではないことは明らかである。しかしながら、LARや気道過敏性亢進など、気道炎症に基づくと考えられる喘息の症状が、DSCG様の作用を示す他の薬物(ケミカルメディエーター遊離抑制薬)によっても抑制されるか否かは明らかではない。今後、DSCGの抗喘息作用の詳細がさらに明らかになることが期待される。

## 文 献

- 1) Cockcroft DW, Murdock KY: Comparative effects of inhaled salbutamol, sodium cromoglycate, and beclomethasone dipropionate on allergen-induced early asthmatic responses, late asthmatic responses, and increased bronchial responsiveness to histamine. *J Allergy Clin Immunol*, 79: 734-740, 1987.
- 2) Hoag JE, McFadden ER Jr: Long-term effect of cromolyn sodium on nonspecific bronchial hyperresponsiveness: a review. *Ann Allergy*, 66: 53-63, 1991.
- 3) Kusner EJ, Dubnick B, Herzig DJ: The inhibition by disodium cromoglycate in vitro of anaphylactically induced histamine release from rat peritoneal mast cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 184: 41-46, 1973.
- 4) Okayama Y, Benyon RC, Rees PH, Lowman MA, Hillier K, Church MK: Inhibition profiles of sodium cromoglycate and nedocromil sodium on mediator release from mast cells of human skin, lung, tonsil, adenoid and intestine. *Clin Exp Allergy*, 22: 401-409, 1992.
- 5) Nabe T, Yamamura H, Kohno S, Ohata K: Effect of SA-103 on experimental allergic models in vivo and in vitro--comparison with disodium cromoglycate. *Arerugi*, 41: 676-685, 1992.
- 6) Nabe T, Hashii H, Matsubara S, Yasui K, Yamamura H, Horiba M, Watanabe-Kohno S, Ohata K: A tiaramide derivative, 5-chloro-3-(4-hydroxypiperidinocarbonylmethyl) benzothiazoline-2-one (HPR-611), a potent inhibitor of anaphylactic chemical mediator release--a distinctive feature from disodium cromoglycate. *J Pharmacobiodyn*, 15: 673-679, 1992.
- 7) Lau HY, Wong PL, Lai CK: Effects of beta 2-adrenergic agonists on isolated guinea pig lung mast cells. *Agents Actions*, 42: 92-94, 1994.
- 8) Booij-Noord H, de Vries K, Sluiter HJ, Orie NGM: Late bronchial obstructive reaction to experimental inhalation of house dust extract. *Clin Allergy*, 2: 43-61, 1972.
- 9) Robertson DG, Kerigan AT, Hargreave FE, Dolovich J: Late asthmatic responses induced by ragweed pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol*, 54: 244-254, 1974.
- 10) Cartier A, Thomson NC, Frith PA, Roberts R, Hargreave FE: Allergen-induced increase in bronchial responsiveness to histamine: relationship to the late asthmatic response and challenge in airway caliber. *J Allergy Clin Immunol*, 70: 170-177, 1982.
- 11) Kallós P, Kallós L: Experimental asthma in guinea pig revisited. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 73: 77-85, 1984.
- 12) Muccitelli RM, Tucker SS, Hay DWP, Torphy TJ, Wasserman MA: Is the guinea pig trachea a good in vitro model of human large and central airways? Comparison on leukotriene-, methacholine-, histamine- and antigen-induced contractions. *J Pharmacol Exp Ther*, 243: 467-473, 1987.
- 13) Nabe T, Shinoda N, Yamashita K, Yamada M, Yamamura H, Kohno S: Comparative studies on nebulizers for antigen inhalation in experimental asthma. *Allergol Intl*, 46: 261-267, 1997.
- 14) Nabe T, Shinoda N, Yamada M, Sekioka T, Saeki Y, Yamamura H, Kohno S: Repeated antigen inhalation-induced reproducible early and late asthma in guinea pigs. *Jpn J Pharmacol*, 75: 65-75, 1997.
- 15) Hutson PA, Holgate ST, Church MK: The effect of cromolyn sodium and albuterol on early and late phase bronchoconstriction and airway leukocyte infiltration after allergen challenge of nonanesthetized guinea pigs. *Am Rev Respir Dis*, 138: 1157-1163, 1988.
- 16) Sugasawa T, Imanishi N, Morooka S: Effect of the selective PAF antagonist SM-10661 on an asthmatic model. 2. Effect on antigen-induced dual asthmatic response and infiltration of leukocytes into airways in actively sensitized conscious guinea pigs. *Lipids*, 26: 1305-1309, 1991.
- 17) Nabe T, Yamamoto M, Suga M, Kohno S: Intratracheal dosing with disodium cromoglycate inhibits late asthmatic response by attenuating eicosanoid production in guinea pigs. *Eur J Pharmacol*, 497:97-104, 2004.
- 18) Yamashita K, Nabe T, Tomioka H, Kohno S: Repeated antigen inhalations alter chemical mediators that cause asthmatic obstruction in guinea pigs. *Jpn J Pharmacol*, 81: 48-55, 1999.
- 19) Diaz P, Galleguillos FR, Cristina Gonzalez M, Pantin, CFA, Kay AB: Bronchoalveolar lavage in asthma: the effect of

disodium cromoglycate (cromolyn) on leukocyte counts, immunoglobulins, and complement. *J Allergy Clin Immunol*, 74: 41-48, 1984.

20) Hoshino M, Nakamura Y: The effect of inhaled sodium cromoglycate on cellular infiltration into the bronchial mucosa and the expression of adhesion molecules in asthmatics. *Eur Respir J*, 10: 858-865, 1997.

21) Nabe T, Shinoda N, Yamashita K, Yamamura H, Kohno S:

Leucocyte kinesis in blood, bronchoalveoli and nasal cavities during late asthmatic responses in guinea-pigs. *Eur Respir J*, 11: 636-642, 1998.

22) Nabe T, Miura M, Kamiki T, Kohno S: Arachidonate 5-lipoxygenase and cyclooxygenase metabolites from guinea pig eosinophils and macrophages. *Jpn J Pharmacol*, 83: 261-264, 2000.