

ラットの実験的アレルギー性鼻炎および それに及ぼす tranilast の影響

小島 正三 堤 直行 百瀬 泰紀
西垣 敏明 氏家 新生 内藤 惇
キッセイ薬品工業(株)・中央研究所

Effect of Tranilast on Experimental Allergic Rhinitis in Rats

Masami KOJIMA, Naoyuki TSUTSUMI, Yasunori MOMOSE,
Toshiaki NISHIGAKI, Arao UJIE and Jun NAITO
Central Research Laboratories, Kissei Pharmaceutical Co., Ltd.

We studied the effect of N-(3, 4-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (tranilast) on experimental allergic rhinitis. In actively sensitized rats under pentobarbital-Na anesthesia, a significant increase in leakage of pontamine sky-blue into the nasal cavity was observed during antigen (DNP-As) perfusion. Thereafter a constant dye leakage continued for 30 min after washing out the antigen. On the other hand, when saline was perfused in the nasal cavity such an increase was hardly observed. Tranilast (75-300 mg/kg, p.o.) significantly inhibited the dye leakage due to antigen in a dose-dependent manner. Diphenhydramine (150 mg/kg, p.o.) also exhibited an inhibitory effect to the same degree as 150 mg/kg of tranilast. In passively sensitized rats with anti-DNP-As IgE serum, a significant increase in dye leakage was also observed during antigen perfusion. However, after washing out the antigen, a significant dye leakage was obvious not only during antigen perfusion but also during saline perfusion. The dye leakage during antigen perfusion was inhibited by tranilast (75-300 mg/kg, p.o.) but the inhibition was not dose-dependent, while diphenhydramine exhibited a potent inhibitory effect compared to that of tranilast. From these results our model seems to be adequate as an experimental model of allergic rhinitis. Moreover, tranilast seems to be applicable to allergic rhinitis, because it exhibited a significant inhibitory effect on oral administration. *Shinshu Med. J.*, 31: 123-127, 1983

(Received for publication December 20, 1982)

Key words : allergic rhinitis, experimental model, tranilast

アレルギー性鼻炎, 実験モデル, トラニラスト

I 緒 言

アントラニール酸誘導体, N-(3, 4-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (tranilast) はラットおよびモルモットの homologous passive cutaneous anaphylaxis (PCA) を経口投与により著明に抑制し¹⁾²⁾, 臨床的にもすぐれた抗アレルギー作用を示す薬物であ

る³⁾⁴⁾。その作用機作について, 肥満細胞からの histamine 遊離抑制が報告されている⁵⁾。一方, アレルギー性鼻炎について, 鼻粘膜に肥満細胞が多く存在し鼻汁中に好塩基球が多く認められるという報告⁶⁾⁷⁾, さらに抗原誘発時におけるこれらの細胞の脱顆粒像が観察されるという報告⁸⁾ はアレルギー性鼻炎の発生に肥満細胞などから遊離された chemical mediator が

重要な因子をなしていることを示すものである。したがって、tranilast がアレルギー性鼻炎の治療に有効であると思われる。

我々は、ラットを用いて実験的アレルギー性鼻炎のモデルを検討し、合わせてそれに及ぼす tranilast の作用を検討したので報告する。

II 実験材料および方法

A 薬物

Tranilast (キッセイ薬品) および diphenhydramine hydrochloride (興和) は 0.5% sodium carboxymethyl cellulose (CMC) に懸濁して使用した。

B 能動感作動物の作製法

感作動物は Tada と Okumura の方法⁹⁾ に準じて、2, 4-dinitrophenyl-coupled ascaris extract (DNP-As) を抗原として体重180~200gの Wistar 系雄性ラットを用いて作製した。これら動物の血清の 48-hr homologous passive cutaneous anaphylaxis (PCA) の力価は、1:96~256であった。

C 受動感作動物の作製法

能動感作ラットより抗 DNP-As・IgE 血清 (力価 1:128) を得て、これを非感作ラットの両側の頬部皮下と鼻吻皮下におのおの 0.1ml 宛を注射し 48時間後に使用した。

D アレルギー性鼻炎におよぼす影響

感作ラットを 16時間水のみ自由に与え絶食した。薬物投与群には tranilast および diphenhydramine を経口投与し、30分後に pentobarbital sodium (大日本製薬) 30mg/kg の腹腔内投与により麻酔した。背位に固定し、頸部正中切開を施し呼吸維持のため cannula を気管に挿入し食道を結紮した。気管切開部より鼻腔内に外径 1mm のポリエチレンチューブ (Hibiki Fr No. 3) を挿入した。ポリエチレンチューブの他端は灌流ポンプ (シャープ, MP-25) に接続して、37°C に加温した生理食塩水を 0.25ml/min の流速で灌流し、鼻吻より流出する液を 10分間採取した。次に 4% pontamine sky blue (東京化成) を 0.5ml/100g body weight の割合で尾静脈注入し、同様に 10分間灌流液を採取した (period 1)。その後 DNP-As 生理食塩液 (2mg/ml) を 10分灌流し (period 2)、鼻腔内の抗原を洗浄除去した後、再び生理食塩水にて 30分灌流した (period 3, 4, 5)。なお口腔内には灌流液の漏出を防ぐため、グリセリンを浸した脱脂綿を詰めた。採取した試料は、3,000rpm、

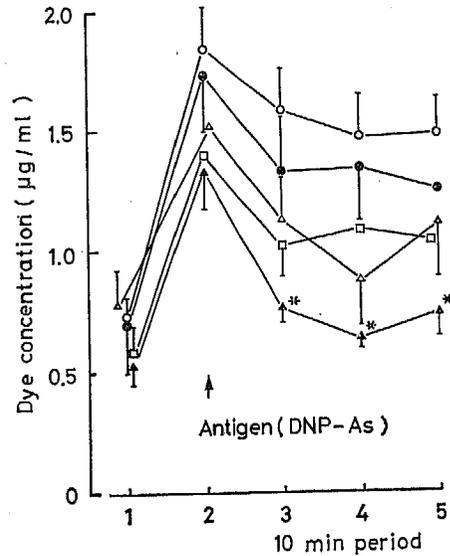


Fig. 1 Effects of tranilast and diphenhydramine on the antigen-induced increase in nasal capillary permeability in actively sensitized rats.

Drugs were administered orally 70 min before challenge with antigen. ○: 0.5% CMC, ●: tranilast 75mg/kg, △: tranilast 150 mg/kg, ▲: tranilast 300 mg/kg, □: diphenhydramine 150 mg/kg. Each point indicates the mean of 6-11 observations. Vertical bars indicate S.E. of the mean. *: Significant difference from control at $p < 0.05$ according to Student's t-test.

10分遠心分離した後、自記分光光度計 (島津 UV-240) にて 620nm の吸光度を測定した。

E 病理組織学的検索

能動感作ラットの両鼻腔内に DNP-As 0.025mg/0.05ml を注入し、30分後に放血致死せしめ病理学的検索に供した。すなわち、頭部を切断して不必要部を除去し、Karnovsky¹⁰⁾ の方法により鼻粘膜を固定した。次いで脱灰後、常法にしたがい、0.05% toluidine blue (pH 2.5) 染色により病理組織標本を作製し、鼻粘膜固有層の肥満細胞を鏡下に (400倍) 観察した。

III 成績

A 能動感作ラットを用いた検討

色素投与後、抗原灌流による灌流液の色素の濃度の

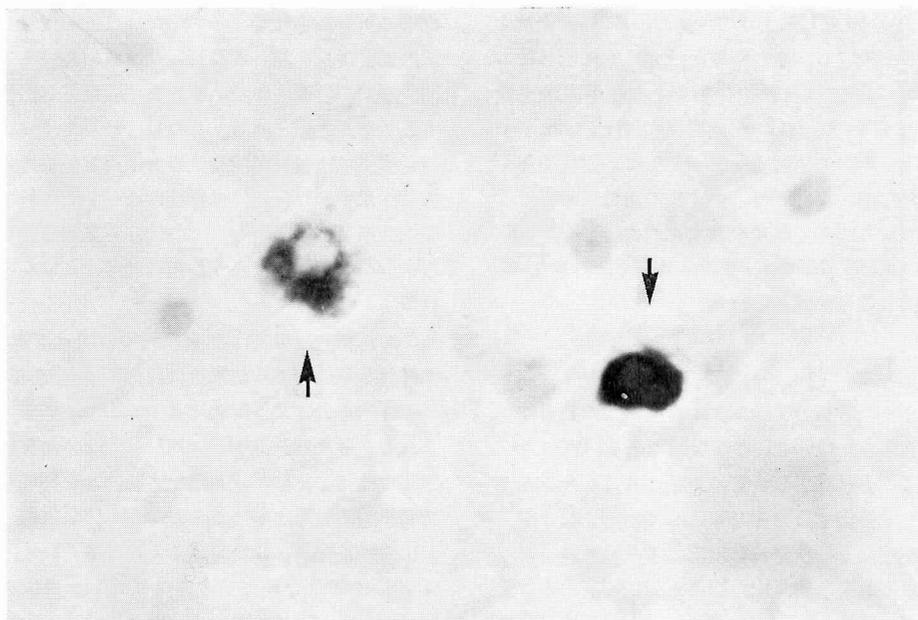


Fig. 2 Mast cells in the nasal lamina propria. Appearance of abnormal cell (↑) and clear degranulation are observed after antigen application. A normal mast cell is also shown at (↓). Toluidine blue (0.05%, pH 2.5) staining ($\times 1,500$).

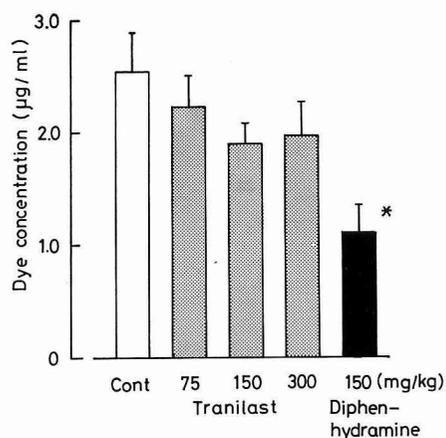


Fig. 3 Effects of tranilast and diphenhydramine on the antigen-induced increase in nasal capillary permeability in passively sensitized rats with anti-DNP-As IgE serum. Drugs were administered orally 70 min before challenge with antigen. Each datum indicates the mean of 6-11 observations. Vertical bars indicate S. E. of the mean.

* : Significant difference from control at $p < 0.05$ according to Student's t-test.

変化を Fig. 1 に示した。対照群 ($n=11$) では DNP-As を作用させると著明な色素の漏出が認められ、period 2 で $1.8 \pm 0.17 \mu\text{g/ml}$ (平均土標準誤差) に達し、以後 period 5 まで約 $1.5 \mu\text{g/ml}$ の濃度を維持した。この DNP-As による色素漏出に対して、tranilast (75~300mg/kg, $n=7\sim 8$) は用量依存性の抑制作用を示し、特に 300mg/kg 投与群では対照群に比し統計的に有意な抑制作用 ($p < 0.05$) が認められた。また抗ヒスタミン剤である diphenhydramine (150mg/kg, $n=6$) では tranilast 150mg/kg と同程度の抑制作用を示した。一方、鼻腔内に生理食塩水のみを灌流した場合、灌流開始後 period 4 まではほとんど影響は認められず period 5 では軽度の色素漏出が認められた。

また Fig. 2 に示すように別に作製した能動感作ラットの鼻腔内に抗原を challenge した場合肥満細胞の異常像が認められた。

B 受動感作ラットを用いた検討

受動感作ラットの場合、抗原洗浄後にも色素漏出が漸次増加し、生理食塩水だけの灌流でも period 3 以後に急激な色素漏出が認められたために、これらの影響の認められない period 2 での比較試験を行った。

抗原を10分灌流した場合の色素漏出に及ぼす被検薬物の影響を検討し、その成績を Fig. 3 に示した。対照群 (n=11) では抗原を作用させると著明な色素漏出が認められた。この色素漏出に対し tranilast 投与群 (75~300mg/kg, n=6~9) では、用量依存性は認められなかったものの、いずれの用量においても色素漏出に対して抑制作用が観察された。一方、diphenhydramine (150mg/kg, n=8) では有意な ($p < 0.05$) 抑制作用が認められた。

IV 考 察

アレルギー性鼻炎の実験モデルについての報告は少なく、一般化されていないのが現状である。野口ら¹¹⁾は酢酸による鼻粘膜毛細血管の透過性亢進を色素漏出を指標として評価する方法を報告している。我々は、この方法を応用し、抗原抗体反応による鼻粘膜での血管透過性の亢進を色素漏出を指標として検討することを試みたが、能動、受動感作ラットとも抗原の灌流により鼻粘膜血管透過性の著明な亢進が認められたので、これは鼻粘膜での抗原抗体反応により惹起されていると思われる。事実病理組織学的観察においても抗原抗体反応により異常細胞の出現が認められた。川堀ら⁸⁾も、ヒトの肥満細胞のアレルギー性鼻炎時に、このような異常細胞像を報告しており、また鼻粘膜固有層の表層の肥満細胞が抗原抗体反応の場であることを立証し、

深層の肥満細胞は関与していないことを報告している。このことより今回我々が行った抗原の鼻腔内灌流は粘膜表層での抗原抗体反応を惹起する系としては的確な方法であると思われる。この系に対して tranilast は受動感作では弱いが能動感作では用量依存性の著明な抑制作用を示した。この作用は PCA²⁾ に対すると同様に低用量から出現したことから高用量時に出現する¹²⁾ tranilast の抗炎症作用の関与は薄いものと思われる。

アレルギー性鼻炎は、鼻粘膜中の肥満細胞あるいは好塩基球における抗原抗体反応により遊離される histamine などの chemical mediator によって惹起されると考えられる¹³⁾。川堀ら⁶⁾⁷⁾は、鼻粘膜上皮細胞間では肥満細胞が大多数を占め、鼻粘膜固有層では肥満細胞の分布が多いことを報告している。これは、上記の推察をさらに支持するものである。したがって、tranilast のアレルギー性鼻炎モデルに対する著明な抑制効果は肥満細胞からの chemical mediator 遊離抑制作用⁵⁾に基づいているものと思われる。

以上、我々の色素漏出による方法はアレルギー性鼻炎モデルとして有用と思われる。また、抗アレルギー剤 tranilast は経口投与により、これらのモデルに有効性が認められたことからアレルギー性鼻炎に適用可能な薬剤と思われる。

文 献

- 1) Koda, A., Nagai, H., Watanabe, S., Yanagihara, Y. and Sakamoto, K.: Inhibition of hypersensitivity reactions by a new drug, N-(3', 4'-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (N-5'). *J Allergy Clin Immunol*, 57: 396-407, 1976
- 2) 中沢政之, 吉村哲郎, 内藤 惇, 東 洋: 新しいアトピー性疾患治療剤, N-(3', 4'-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (N-5') の薬理学的性質(3)―受身皮膚アナフィラキシー (PCA) に及ぼす影響―. *日薬理誌*, 74: 467-472, 1978
- 3) 山村雄一ら: 気管支喘息における N-5' の薬効評価―多施設二重盲検法による検討―. *医学のあゆみ*, 108: 252-273, 1979
- 4) 山村雄一ら: 抗アレルギー剤 N-5' の気管支喘息に対する有用性の検討― Disodium cromoglycate および placebo を比較対照とした多施設二重盲検法による検討―. *診療と新薬*, 19: 529-572, 1982
- 5) 中沢政之, 吉村哲郎, 内藤 惇, 東 洋: 新しいアトピー性疾患治療剤, N-(3', 4'-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (N-5') の薬理学的性質(5)―分離ラット腹腔細胞からの histamine 遊離に及ぼす影響―. *日薬理誌*, 74: 483-490, 1978
- 6) 川堀真一, 奥田 稔, 大塚博邦: 鼻汁, 鼻粘膜の好塩基性顆粒細胞. *日耳鼻会報*, 81: 45-49, 1978
- 7) Kawabori, S., Unno, T., Okuda, M. and Otsuka, H.: Electron microscopic study of the basophilic cells in allergic nasal secretion and mucous membrane. *Rhinology (suppl)*, 1: 115-123, 1981
- 8) 川堀真一, 海野徳二, 高橋光明, 奥田 稔: 鼻アレルギー鼻粘膜上皮細胞間および固有層の肥満細胞 抗原

誘発前後での電子顕微鏡的観察. アレルギー, 31 : 94-99, 1982

- 9) Tada, T. and Okumura, K. : Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. J Immunol, 106 : 1002-1011, 1971
- 10) Karnovsky, M.J. : A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J Cell Biol, 27 : 137 A-138 A, 1965
- 11) 野口晏弘, 大槻 勲, 尹 石淳, 宗蓮司朗, 石河醇一 : Tetrahydrozoline hydrochloride および prednisolone の点鼻液における併用効果. 応用薬理, 20 : 935-940, 1980
- 12) 中沢政之, 吉村哲郎, 内藤 惇, 東 洋 : 新しいアトピー性疾患治療剤, N-(3', 4'-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (N-5') の薬理学的性質(4)—抗炎症作用について—. 日薬理誌, 74 : 473-481, 1978
- 13) Ishizaka, T., Ishizaka, K., Orange, R. and Austen, K.F. : The capacity of human immunoglobulin E to mediate the release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) from monkey lung. J Immunol, 104 : 335-343, 1970

(57. 12. 20 受稿)