

# 気管支喘息における気道炎症の制御機構についての研究

－ 知覚神経による炎症調節機構を中心とした検討 －

1998 年

石川 淳

# 目次

緒言	1
第1章 気道炎症における神経系の関与	3
1. 実験方法および使用薬物	4
1-1. 使用動物	4
1-2. 気管および主気管支平滑筋標本の作成	4
1-3. 経壁的電気刺激 (EFS) 誘発非アドレナリン作動性非コリン作動性 (eNANC性) 収縮反応の測定	4
1-4. EFS 誘発コリン作動性収縮反応の測定	5
1-5. 外因性 neurokinin A 誘発収縮反応の測定	5
1-6. 外因性 acetylcholine 誘発収縮反応の測定	5
1-7. 肺組織内 substance P 含量の測定	5
1-8. 使用薬物	6
1-9. 統計解析	7
2. 実験結果	7
2-1. 抗原反復暴露の eNANC 性気道平滑筋収縮反応に対する影響	7
2-2. 抗原反復暴露の肺組織内 substance P 含量に対する影響	11
2-3. 抗原反復暴露のコリン作動性気道平滑筋収縮反応に対する影響	12
3. 考察	14
4. 小括	17
第2章 知覚神経による気道炎症調節機構	18
1. 実験方法および使用薬物	19
1-1. 使用動物	19
1-2. LTD <sub>4</sub> 誘発肺抵抗上昇の測定	19
1-3. LTD <sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進の測定	19
1-4. Capsaicin 前処置: 知覚神経ペプチド枯渇動物モデルの作成	20
1-5. 実験プロトコール	20

1-5-1. LTD <sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進ならびに肺抵抗上昇に対する neurokinin-1 (NK <sub>1</sub> ) 受容体拮抗薬 FK 888 および LTD <sub>4</sub> 受容体拮抗薬 ONO-1078 の作用	20
1-5-2. LTD <sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進ならびに肺抵抗上昇に対する NK <sub>1</sub> 拮抗薬 CP 96345 および neurokinin-2 (NK <sub>2</sub> ) 拮抗薬 SR 48968 の作用	21
1-5-3. LTD <sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進に対する capsaicin 前処置の影響	21
1-6. 使用薬物	21
1-7. 統計解析	22
2. 実験結果	22
2-1. LTD <sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進に対する ONO-1078 の作用	22
2-2. LTD <sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進に対する FK 888 の作用	24
2-3. LTD <sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進に対する CP 96345 および SR 48968 の作用	25
2-4. LTD <sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進に対する capsaicin 前処置の影響	26
2-5. LTD <sub>4</sub> 誘発肺抵抗上昇に対する ONO-1078 および FK 888 の作用	27
2-6. LTD <sub>4</sub> 誘発肺抵抗上昇に対する CP 96345 および SR 48968 の作用	28
3. 考察	29
4. 小括	31

### 第 3 章 神経原性気道炎症における K<sub>ATP</sub> チャンネルの関与

.....	32
1. 実験方法および使用薬物	32
1-1. 使用動物	32
1-2. 迷走神経刺激気道炎症実験プロトコール	33
1-3. 気道血管透過性亢進の測定	33
1-4. 使用薬物	34
1-5. 統計解析	34

2. 実験結果 .....	34
2-1. 迷走神経刺激血管透過性亢進に対する K <sup>+</sup> チャンネル開口薬 YM 934 の作用 .....	34
2-2. 外因性 substance P 誘発血管透過性亢進に対する YM 934 の作用 .....	36
2-3. YM 934 の抑制作用に対する ATP 感受性 K <sup>+</sup> チャンネル阻害薬 glibenclamide の作用 .....	36
2-4. 血圧に対する YM 934 の作用 .....	38
3. 考察 .....	39
4. 小括 .....	41

## 第 4 章 抗原誘発気道炎症における K<sub>ATP</sub> チャンネルの関与

.....	42
1. 実験方法および使用薬物 .....	42
1-1. 使用動物 .....	42
1-2. 抗原誘発気道炎症実験プロトコール .....	42
1-3. Histamine あるいは LTD <sub>4</sub> 誘発気道炎症実験プロトコール .....	43
1-4. 抗原誘発 histamine 遊離量の測定 .....	44
1-5. 使用薬物 .....	44
1-6. 統計的解析 .....	44
2. 実験結果 .....	45
2-1. 気道収縮反応に対する K <sup>+</sup> チャンネル開口薬 BRL 38227 の作用 .....	45
2-2. 血管透過性亢進に対する BRL 38227 の作用 .....	48
2-3. 血圧に対する BRL 38227 の作用 .....	51
2-4. 肺組織標本における抗原誘発 histamine 遊離に対する BRL 38227 の作用 .....	52
3. 考察 .....	53
4. 小括 .....	55
総括 .....	56
謝辞 .....	59

投稿雑誌目録 ..... 60  
引用文献 ..... 61

## 緒 言

気管支喘息は気道抵抗上昇あるいは気道狭窄による呼吸困難、咳ならびに気道過敏性亢進を特徴とする慢性疾患である (1)。気管支喘息の発症要因として気道平滑筋収縮反応 (2, 3), 気道内分泌の亢進 (4) および血管透過性亢進 (5, 6, 7) が知られている。特に今日では、気管支喘息が慢性炎症の一つであると認識されるようになり (8), 肺および気道内へ浸潤した好酸球をはじめとする炎症性細胞等に起因する炎症性伝達物質 (9), cytokine (10) および組織傷害性因子 (9) が血管透過性亢進や気道上皮傷害等の気道炎症を引き起こすと考えられている。また、古くから気道収縮反応には、副交感神経から放出される acetylcholine および知覚神経 C-fiber 由来の substance P 等の神経伝達物質 が関与することが知られていた (11)。近年になって、tachykinin 類が気道炎症にも深く関与することが知られるようになり (2, 4, 5), 知覚神経による気管支喘息の制御機構について多くの研究が行われているが、いまだ不明な点が数多く残されている。

本研究においては主に血管透過性亢進を気道炎症の指標として用い、気管支喘息における知覚神経を中心とした気道炎症の制御機構について解明を試みた。気道炎症における血管透過性亢進は、浮腫を伴う気道壁の肥厚を引き起こし、その気道壁肥厚は喘息の特徴的症状である気道過敏性を誘発する (6, 12)。気道における血管透過性亢進は histamine, leukotriene D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) および bradykinin といった炎症性伝達物質によって惹起される (13, 14)。また、知覚神経終末から放出される substance P をはじめとする tachykinin 類 (15) によっても血管透過性が亢進するが、血管透過性亢進は気道壁内を循環する細血管床の後毛細血管静脈部位において発現することが知られている (16, 17, 18)。後毛細血管静脈部位の内皮細胞には多くの炎症性伝達物質に対する受容体が存在しており、それら受容体刺激によって内皮細胞間隙が開くことによって血液中の血漿成分が気道組織内へ漏出すると考えられている。本研究において血管透過性の指標として組織内への Evans blue 漏出量を用いたが、Evans blue は血漿アルブミン高親和性色素として知られ (19), 組織内 Evans blue 漏出量は組織内へ漏出したアルブミンをはじめとする血漿中高分子成分とよく相関することが報告されている (20, 21)。

これまでに、我々のグループでは炎症性伝達物質の一つである bradykinin によっ

て誘発される気道炎症に知覚神経を介した機序が一部関与していることを報告している (22). 現在, 気道炎症は気管支喘息における重要な病因と考えられているが, この気道炎症には炎症性伝達物質のみならず知覚神経をはじめとする神経原性因子, 組織傷害性因子ならびに cytokine 類それぞれが相互に作用し合っていると考えられる. これら個々の因子それぞれにおける研究は目覚ましい発展を遂げており, 特にこれまで全く不明であった cytokine ネットワークはここ数年で全容を明らかにする勢いを見せている (23). しかしながら, 炎症性伝達物質, 神経原性因子, 組織傷害性因子および cytokine 類間での相互作用あるいは相互的な制御機構については未だに明らかになっていないのが現状である. 本研究では, 知覚神経の制御機構を中心とした気道内神経叢に対する慢性的抗原暴露の影響, ならびに炎症性伝達物質の一つ LTD<sub>4</sub> と知覚神経の相互作用について検討を行った.

また, 近年より K<sup>+</sup> チャンネル開口薬が気管支拡張薬 (24, 25, 26) として注目されているが, ATP 感受性 K<sup>+</sup> チャンネルは平滑筋細胞以外にもコリン作動性神経および知覚神経に存在して神経原性気道収縮反応を調節していることが報告されている (27). また, 気管支喘息患者において “morning dip” と呼ばれる早朝時の肺機能低下を K<sup>+</sup> チャンネル開口薬が改善することが報告されている (28). このように ATP 感受性 K<sup>+</sup> チャンネルが気管支喘息の気道狭窄に関与することは示唆されているが, 気管支喘息の病因として重要な気道炎症において ATP 感受性 K<sup>+</sup> チャンネルがどの程度関与しているかについては未だ明確ではない. 本研究では K<sup>+</sup> チャンネル開口薬を用いて, 神経原性ならびに抗原誘発気道炎症における ATP 感受性 K<sup>+</sup> チャンネルの関与について検討を行った.

## 第 1 章 気道炎症における神経系の関与

気管支喘息においてダニやハウスダストといった抗原に反復的に暴露されることが病態の慢性化を引き起こすと考えられている (29, 30). 慢性気管支喘息においてリモデリング等による気道壁の肥厚等の組織学的変化 (12, 31) が見られることは知られているが、気管支組織に分布する神経機能にどのような変化が見られるのかについては未だ明確な知見は得られていない. 気道においてはコリン作動性神経ならびに興奮性非アドレナリン作動性非コリン作動性 (eNANC 性) 神経の 2 種類の興奮性神経性制御機構が存在することが知られている (11). eNANC 性反応は知覚神経終末からの tachykinin 類放出 (32) によって惹起されるが、tachykinin 類は気管支喘息の特徴である気管支収縮反応 (2), 気道粘液分泌 (4) および血管透過性亢進 (5) に関与していることが報告されている. 炎症性伝達物質の 1 つである bradykinin 吸入は神経反射機構を介した気道平滑筋収縮反応 (33) を惹起するが、この反応は気管支喘息患者においてのみ観察され、正常人においてはみられない現象である (34). 我々はこの bradykinin 誘発神経反射機構に tachykinin が関与していることを報告している (35). 以上の報告は気管支喘息において eNANC 性反応が亢進していることを示唆している. また、気道過敏性は気管支喘息症状の代表的な特徴 (3) であるが、抗原感作動物においても抗原吸入暴露をおこなうと気管支喘息と同様な気道過敏性が惹起される (36, 37). これまでに抗原感作動物に抗原を吸入暴露した場合、in vivo で histamine に対する気道過敏性が誘発されるが、in vitro の histamine 誘発気道平滑筋収縮反応においては対照群と差がみられないことが報告されている (38). モルモットにおいて histamine 反応には迷走神経が関与する (39) ことが報告されており、抗原暴露後の気道過敏性亢進機序にコリン作動性神経因子の関与が示唆されている.

以上のように気管支喘息における抗原暴露の重要性ならびに eNANC 性およびコリン作動性神経機構の関与が示唆されているが、抗原暴露と神経性反応との相互の制御機構を明確に説明するような報告は未だなされていない. 本章では、モルモットにおける抗原反復吸入による実験的慢性気管支喘息モデルを用いて、気管支喘息の慢性化が気道壁に分布する eNANC 性神経および副交感神経を介した気道反応性にどのような影響を与えるかを検討した.

## 1. 実験方法および使用薬物

### 1-1. 使用動物

Dunkin-Hartley 系雄性モルモット (200-250 g, n = 55, 船橋実験動物, 仙台) を 10  $\mu$ g 卵白アルブミン (OA) および 100 mg 水酸化アルミニウムゲルを含む 0.5 ml 生理食塩水の皮下投与によって感作した (40). 感作は 1 日 1 回, 2 日間施行した. 感作 3 週間後から 4 週間に渡って 1 日 1 回の間隔で, 対照群 (n=28) は 0.9% 生理食塩水を, OA 反復暴露群 (n = 27) は 0.03% OA をそれぞれ 3 分間ずつ吸入暴露した. 吸入暴露はポリエチレン製暴露槽 (24.5  $\times$  40.5  $\times$  15.0 cm) 内で超音波ネブライザー (NE-U11B, オムロン, 東京) で生理食塩水あるいは 0.03% OA を霧化 (0.8 ml/min) することにより実施した.

### 1-2. 気管および主気管支平滑筋標本の作成

最終吸入暴露後, 動物を urethane (2 g/kg, ip) 麻酔下に気道を含む肺組織を摘出し, 気管あるいは主気管支平滑筋標本を作成した. 気管平滑筋標本は約 3 mm 幅の気管リングの軟骨部を正中に切断し, 両切断部に固定した木綿糸により organ bath 中に懸架した. また, 主気管支はリング標本中に通した 2 本の木綿糸で organ bath 中に懸架して主気管支平滑筋標本とした. Organ bath 中には 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> を通気し 37°C に保温した Krebs-Henseleit 溶液 (NaCl, 118 mM; KCl, 5.9 mM; MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM; CaCl<sub>2</sub>, 2.5 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM; NaHCO<sub>3</sub>, 25.5 mM および glucose, 5.6 mM, pH 7.4) を満した. また, cyclooxygenase 代謝生成物の影響を除去するために, 実験を通して栄養液中には indomethacin (10<sup>-5</sup> M) を添加した (41). 平滑筋収縮反応は圧トランスデューサー (UL-10GR, Minebea Co., Ltd, 東京) を介して等張性に測定し, その反応はポリグラフ (Rectigraph-8, NEC San-ei, 東京) 上に記録した. 気管平滑筋および主気管支平滑筋標本における初期負荷はそれぞれ 1 g および 0.5 g とした.

### 1-3. 経壁的電気刺激 (EFS) 誘発非アドレナリン作動性非コリン作動性 (eNANC 性) 収縮反応の測定

主気管支平滑筋標本を用いて atropine (10<sup>-6</sup> M) および propranolol (10<sup>-6</sup> M) 処置下に収縮反応を検討した. eNANC 性収縮反応は電気刺激装置 (SEN-7203, 日本光

電, 東京) に接続した 2 本の白金電極を用いて各平滑筋標本に対する経壁的電気刺激 (EFS) により惹起した. 対照群 ( $n = 5$ ) および OA 反復暴露群 ( $n = 5$ ) の EFS 誘発収縮反応は 15 秒間の 50 V および 0.5 ms の二層性矩形波電圧を 20 分間隔で負荷することにより周波数 (1 ~ 32 Hz) 依存的な反応曲線を得た. 対照群および OA 反復暴露群の周波数-反応曲線はそれぞれにおいて neutral endopeptidase (NEP) 阻害薬 phosphoramidon (10  $\mu$ M) 存在下および非存在下で検討した. なお, 本実験で用いた atropine, propranolol および phosphoramidon の濃度は以前の報告を参考にした (5, 42, 43).

#### 1-4. EFS 誘発コリン作動性収縮反応の測定

EFS 誘発コリン性収縮反応は電気刺激装置 (SEN-7203, 日本光電, 東京) に接続した 2 本の白金電極からの各平滑筋標本に対する経壁的電気刺激 (EFS) により惹起した. EFS 誘発収縮反応は 10 秒間の 50 V および 0.5 ms の二層性矩形波電圧を 4 分間隔で負荷することにより周波数 (1 ~ 64 Hz) 依存的な反応曲線を得た.

#### 1-5. 外因性 neurokinin A 誘発収縮反応の測定

Neurokinin A 誘発気道平滑筋収縮反応は主気管支平滑筋標本を用いて評価した. Neurokinin A ( $10^{-10}$  -  $3 \times 10^{-6}$  M) を 3 倍比で累積的に添加することにより, 気道上皮細胞の存在下あるいは非存在下での濃度依存的な濃度-反応曲線を得た (対照群,  $n = 10$ ; OA 反復暴露群,  $n = 10$ ). 気道上皮細胞剥離標本は主気管支平滑筋標本の内腔側を綿棒で 1 ~ 2 度軽く擦ることにより上皮細胞を剥離して作製した.

#### 1-6. 外因性 acetylcholine 誘発収縮反応の測定

外因性 acetylcholine (ACh) 誘発気道平滑筋収縮反応は気管平滑筋標本を用いて評価した. ACh ( $10^{-7}$  -  $10^{-3}$  M) を 3 倍比で累積的に添加することにより, 濃度依存的な濃度-反応曲線を得た (対照群,  $n = 5$ ; OA 反復暴露群,  $n = 6$ ).

#### 1-7. 肺組織内 substance P 含量の測定

抗原感作モルモットは urethane (2 g/kg, ip) 麻酔下に開胸した. 肺動脈内へ挿入したニードル・カテーテル (13 gage) を右心室上部で鉗子により固定し, 30 mmHg の環流圧で生理食塩水 (pH 5.5) を肺循環内を環流洗浄して肺実質内の血液を除去し

た。環流液は左心房より排出した。さらに、右心室から大動脈内へニードルを挿入・固定し 80 mmHg の環流圧で生理食塩水を環流洗浄することにより、気道内血管床の血液を除去した。環流液は右心房より排出した。血液除去後、摘出した肺実質部を液体窒素で凍結させて substance P 含量測定に供した (対照群, n = 8; OA 反復暴露群, n = 7)。凍結肺実質標本は -70°C で保存した。

肺実質標本は重量測定後、50 ml の 4% 酢酸 (pH 4.0) 中で粉碎し 40,000×g で 30 分間遠心した。遠心により得られた上清を Sep-Pak C18 カラムにロードした。カラムを 20 ml の 80% 酢酸 (pH 4.0) および 20 ml の蒸留水で洗浄した後、2 ml の 80% 酢酸 (0.1% trifluoroacetic acid 含有) によりサンプルを抽出した。抽出サンプルは減圧遠心により溶媒を除去した後に 0.15 ml の assay buffer [3.7 mg/ml ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) および 0.5% bovine serum albumin (BSA) を含む 50 mM 燐酸 buffer, pH 7.2] に溶解し、さらにサンプルを 10 倍希釈してラジオ・イムノアッセイ (RIA) 法により substance P 量を測定した。サンプルは 0.5 ml の assay buffer, 0.1 ml の anti-substance P rabbit serum および 0.1 ml の <sup>125</sup>I-labeled substance P と混和し、4°C で 24 時間放置した。5 倍量の dextran/charchol 混合液 (0.2% dextran および 2% charchol を含む assay buffer) 添加後、2,000×g で 10 分間遠心して上清中の放射活性を γ カウンターで測定した。Substance P 含量 (fmol/g tissue) を算出した後に、対照群と OA 反復暴露群間での差を比較した。

#### 1-8. 使用薬物

以下の薬物を使用した： Acetylcholine chloride (第一製薬, 大阪); histamine dihydrochloride, acetic acid, acetonitrile, trifluoroacetic acid, dextran および activated charcoal (和光純薬工業, 大阪); indomethacin (住友化学, 大阪); atropine sulfate (田辺製薬, 大阪); propranolol hydrochloride (Imperial Chemical Industries plc., UK); neurokinin A (ペプチド研究所, 大阪); phosphoramidon, urethane, ovalbumin (OA) および ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, Sigma Chemical Co., USA); <sup>125</sup>I-labeled substance P および anti-substance P rabbit serum (Amersham International plc., UK); 0.9% 生理食塩水 (大塚製薬, 東京)。なお、反復暴露に用いた OA は 0.9% 生理食塩水に 0.03% の濃度で溶解して使用した。

## 1-9. 統計解析

eNANC 性気道平滑筋収縮反応は histamine ( $10^{-3}$  M) により得られた最大収縮反応 ( $E_{max}$ ) に対する比率 (%) で表した。また、コリン作動性気道平滑筋反応は ACh ( $10^{-3}$  M) により得られた最大収縮反応 ( $ACh_{max}$ ) に対する比率 (%) で表した。反応曲線間の統計解析は二元配置分散分析を用いて行った。また、個々の薬物濃度あるいは周波数における統計解析は Student's unpaired t-test を用いた。

外因性 neurokinin A 誘発収縮反応の反応性は、各標本において  $E_{max}$  の 20% および 40% の収縮反応を誘発する neurokinin A 濃度 (それぞれ  $EC_{20}$  および  $EC_{40}$ ) を各群間で比較した。同様に、EFS 誘発 eNANC 性収縮反応の反応性は最大収縮反応を 100% としたとき 50% の収縮反応を誘発する周波数 ( $EF_{50}$ ) を各群間で比較した。これらの統計解析には Mann-Whitney U-test を用いて行った。また、コリン作動性収縮反応の反応性は  $ACh_{max}$  の 25% の収縮反応を誘発する周波数 ( $EF_{25}$ ) を周波数-反応曲線より算出し、 $EF_{25}$  の対数值 ( $\log EF_{25}$ ) を各群間で比較した。統計的解析には Student's unpaired t-test を用いた。

それぞれの値は平均値 $\pm$ 標準誤差 (mean $\pm$ SE) で表記した。また、各統計解析により p 値が 0.05 以下のものを統計的に有意差があると判断した。

## 2. 実験結果

### 2-1. 抗原反復暴露の eNANC 性気道平滑筋収縮反応に対する影響

Atropine ( $10^{-6}$  M) および propranolol ( $10^{-6}$  M) 存在下において、対照群および OA 反復暴露群の気道平滑筋標本はそれぞれ周波数依存的な EFS 誘発 eNANC 性収縮反応を示した。このとき、OA 反復暴露群の eNANC 性収縮反応は対照群の収縮反応に比して 4 ~ 32 Hz の高周波数において有意な収縮増強を示した (Figure 1)。OA 反復暴露群の eNANC 性神経刺激による最大収縮反応は  $38\pm 5\%$  を示し、対照群 ( $22\pm 2\%$ ) に比して有意に増加していた。これに対して、 $EF_{50}$  値は対照群 (2.8 Hz) および OA 反復暴露群 (3.7 Hz) 間で有意な差は認められなかった (Table 1)。

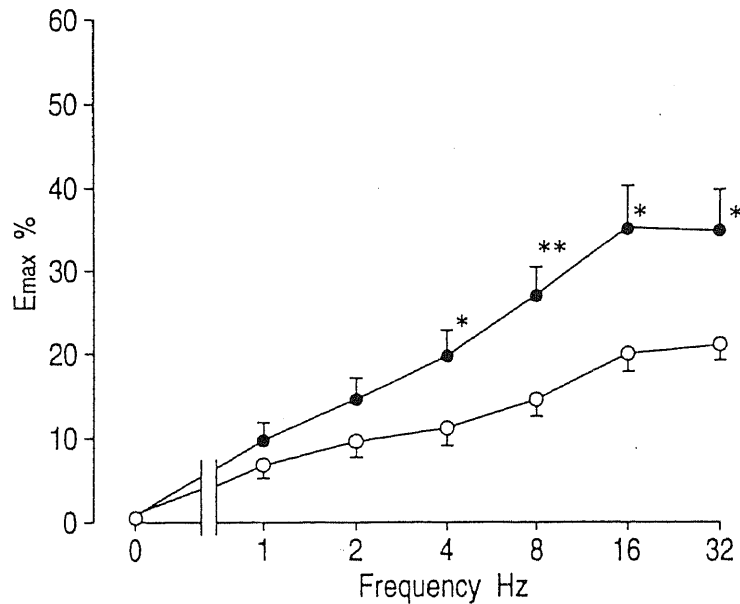


Figure 1. Effects of repeated inhalation challenge on excitatory non-adrenergic non-cholinergic (eNANC) nerve-mediated contraction of bronchial smooth muscle isolated from repeated saline (○, n = 5) or repeated ovalbumin challenged (●, n = 5) guinea pigs. Contractile responses were elicited by electrical field stimulation (EFS), 50 V, 0.5 ms, 1-32 Hz for 15 s, in the presence of indomethacin (10<sup>-5</sup> M), atropine (10<sup>-6</sup> M) and propranolol (10<sup>-6</sup> M) and expressed as the percentages of maximal responses to histamine (10<sup>-3</sup> M) (E<sub>max</sub>) in each preparation. Each point represents mean±SE of five animals. The difference between two groups were compared by Student's t-test for unpaired data. \*\* p<0.01, \* p<0.05 compared with the values of control group.

Table 1. Effect of repeated antigen exposure on the eNANC nerve-mediated muscle contraction

	Control n = 5	Challenged n = 5
E <sub>max</sub> <sup>#</sup> (%)	22±2	38±5*
EF <sub>50</sub> (Hz)	2.8	3.7 NS
95% CI	(2.4-3.4)	(3.5-3.8)

#, mean±SE. E<sub>max</sub>, maximal contractile response to EFS as a percentage of the contraction to histamine (10<sup>-3</sup> M); EF<sub>50</sub>, the frequencies producing 50% of E<sub>max</sub>; e-NANC, excitatory nonadrenergic noncholinergic; 95% CI, confidence interval; EFS, electrical field stimulation NS; not significant for the control. \* p<0.05 vs control (Mann-Whitney U-test).

さらに、対照群ならびに OA 反復暴露群の EFS 誘発 eNANC 性収縮反応は NEP 阻害薬 phosphoramidon ( $10^{-5}$  M) の前処置によりともに有意な増強を示した (Figure 2). Phosphoramidon 前処置による eNANC 性収縮反応の増強は対照群および OA 反復暴露群ともほぼ同程度であった。

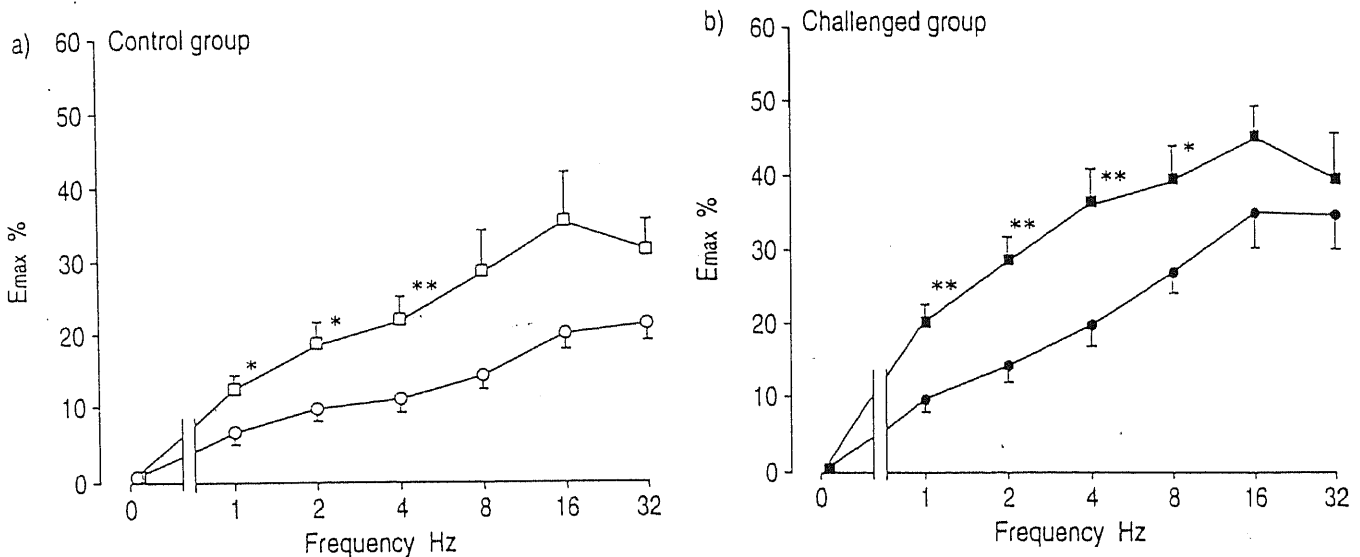


Figure 2. Effects of phosphoramidon on eNANC nerve-mediated contraction of main bronchi isolated from: a) repeated-saline challenged animals in the absence (○, n = 5) or presence (□, n = 5) of phosphoramidon ( $10^{-5}$  M), and b) repeated-ovalbumin challenged animals, in the absence (●, n = 5) or presence (■, n = 5) of phosphoramidon ( $10^{-5}$  M). Contractile responses were elicited as described in the legend of figure 1. Values are mean±SE of five animals. The difference was compared by Student's unpaired t-test. Significant differences from control are \*\* p<0.01, \* p<0.05. For definitions see legend table 1.

また、外因性 neurokinin A ( $10^{-10}$  ~  $10^{-6}$  M) は対照群ならびに OA 反復暴露群において濃度依存的な気道平滑筋収縮反応を示した (Figure 3). このとき、対照群

ならびに OA 反復暴露群それぞれの  $EC_{20}$ ,  $EC_{40}$  および  $E_{max}$  値の間に有意な差は認められなかった (Table 2). さらに, 対照群および OA 反復暴露群の両群において, 気道上皮細胞剥離群は非剥離群に比して neurokinin A 誘発収縮反応性が有意に増加していた (Figure 3). このとき, 気道上皮細胞剥離群の  $EC_{20}$  および  $EC_{40}$  値は対照群および OA 反復暴露群ともに気道上皮細胞非剥離群に比して有意に低値を示し,  $E_{max}$  値は有意に増強していた (Table 2).

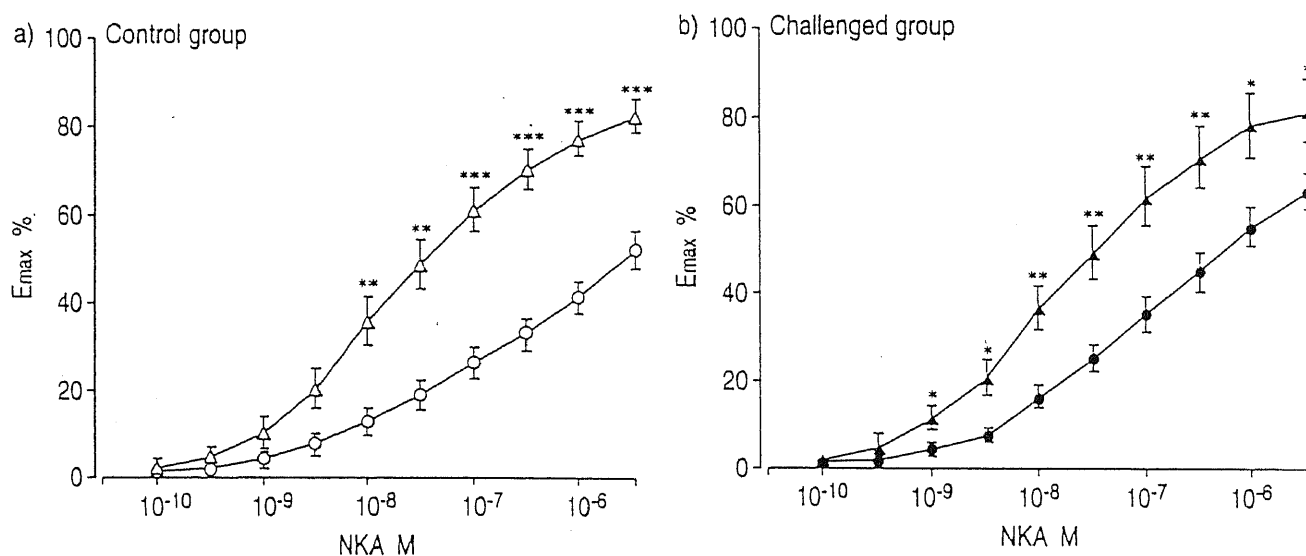


Figure 3. Neurokinin A (NKA,  $10^{-10} \sim 3 \times 10^{-6}$  M) induced contraction of a) repeated saline with (○,  $n = 5$ ) or without epithelium (△,  $n = 5$ ) and b) ovalbumin inhalation group with (●,  $n = 5$ ) or without epithelium (▲,  $n = 5$ ) in the presence of indomethacin ( $10^{-5}$  M), atropine ( $10^{-6}$  M) and propranolol ( $10^{-6}$  M). Each point represents mean  $\pm$  SE of five animals. Differences between the two curves with or without epithelium in each group were compared Student's t-test for unpaired data. \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  compared with the values of intact epithelium.  $E_{max}$ , maximal contractile response to the exogenous NKA expressed as a percentage of contraction to histamine ( $10^{-3}$  M).

Table 2. Exogenous neurokinin A-induced bronchial contraction and the effect of epithelial removal

	Control		Challenged	
	With epithelium (n = 5)	Without epithelium (n = 5)	With epithelium (n = 5)	Without epithelium (n = 5)
EC <sub>20</sub> (nM)	36.9 (14.5-95.5)	2.86* (1.8-4.6)	27.3 (16.9-44.1)	3.06** (1.8-5.3)
EC <sub>40</sub> (nM)	791 (383-1620)	16.2** (10.6-24.6)	213 (104-436)	18.5** (10-34.4)
E <sub>max</sub> (%)	52±4	82±4**	63±4	81±7*

95% confidence interval values are in parentheses. EC<sub>20</sub> and EC<sub>40</sub>, the concentration producing 20% and 40% of maximal contractile response to histamine (10<sup>-3</sup> M), respectively; E<sub>max</sub>, maximal contractile responses to the exogenous neurokinin A (3 × 10<sup>-6</sup> M) expressed as a percentage of contraction to histamine (10<sup>-3</sup> M). Significant differences from values with epithelium are indicated, \*: p<0.05; \*\*: p<0.01. There was no significant difference between control and challenged group in EC<sub>20</sub>, EC<sub>40</sub> or E<sub>max</sub> values.

## 2-2. 抗原反復暴露の肺組織内 substance P 含量に対する影響

対照群および OA 反復暴露群の肺組織内 substance P 含量はそれぞれ 24.5±3.7 fmol/g tissue および 51.2±8.4 fmol/g tissue で、OA 反復暴露群の肺組織内 substance P 含量は対照群に比して有意に増加していた (Figure 4).

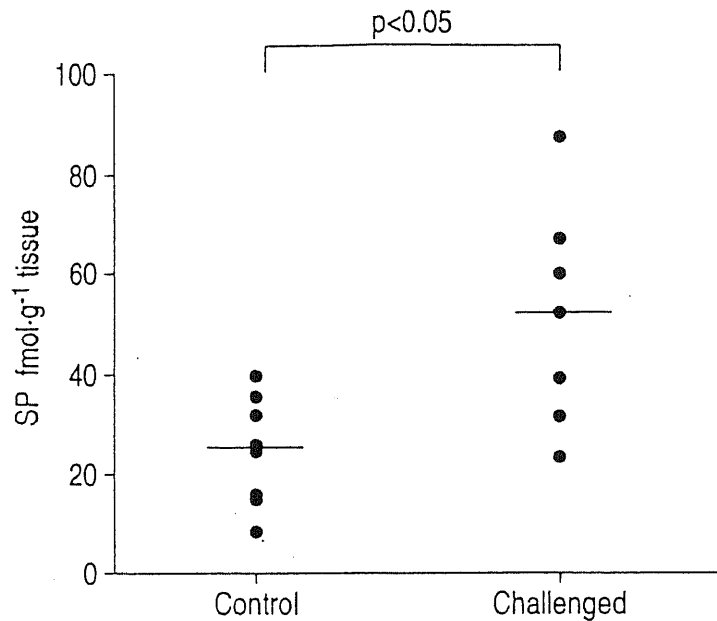


Figure 4. Substance P (SP) content (fmol/g tissue) in guinea-pig lung tissue in repeated saline exposed (control, n = 8) or repeated allergen challenged animals (challenged, n = 7). Bars indicate mean values. The difference between two groups was compared by Mann-Whitney U-test.

### 2-3. 抗原反復暴露のコリン作動性気道平滑筋収縮反応に対する影響

対照群および OA 反復暴露群の気道平滑筋標本はそれぞれ周波数依存的な EFS 誘発コリン作動性収縮反応を示した。OA 反復暴露群のコリン作動性収縮反応は対照群の収縮反応に比して有意な増強を示した (Figure 5a)。このとき, OA 反復暴露群の  $\log EF_{25}$  は  $0.66 \pm 0.08$  を示し, 対照群 ( $1.12 \pm 0.16$ ) に比して有意に低値を示した (Table 3)。なお, 外因性 ACh 誘発収縮反応に対しては対照群および OA 反復暴露群の間で有意な差は認められなかった (Figure 5b)。

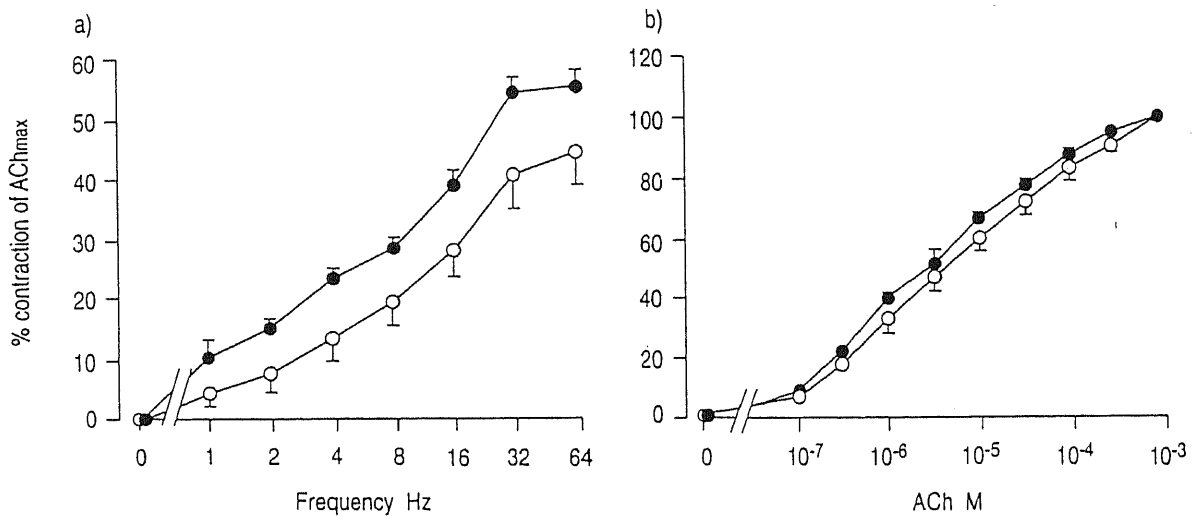


Figure 5. a) Electrical field stimulation (EFS) frequency response curves, and b) exogenous acetylcholine (ACh) dose-response relationships in control ( $\circ$ ,  $n = 5$ ) and challenged ( $\bullet$ ,  $n = 6$ ) groups. All points are mean $\pm$ SE. There was significant difference ( $p < 0.05$ ) in EFS frequency response between the two groups by two-way analysis of variance (ANOVA), but not in exogenous ACh dose-response..

Table 3. Effect of repeated antigen exposure on EFS-induced bronchoconstriction.

	Control	Challenged
Fmax (%)	45.2 $\pm$ 5.8	55.7 $\pm$ 2.5
LogEF <sub>25</sub>	1.12 $\pm$ 0.16	0.66 $\pm$ 0.08*

Fmax, maximal contractile response to the largest frequency of EFS given is expressed as a percentage of the maximal concentration to acetylcholine (ACh, 10<sup>-3</sup> M) (AChmax); EFS, electrical field stimulation; EF<sub>25</sub>, effective frequency producing 25% of AChmax. Differences between two groups was analyzed using student's t-test for the unpaired data (\*  $p < 0.05$ ).

### 3. 考察

#### eNANC 性反応に対する抗原反復吸入暴露の影響

抗原反復吸入暴露は EFS 誘発 eNANC 性気道平滑筋収縮反応を増強させた。Tachykinin 類による気道収縮反応は主に neurokinin-2 (NK<sub>2</sub>) 受容体刺激によって惹起される (15) が, NK<sub>2</sub> 受容体に対して高い親和性を示す tackykinin は neurokinin A (44) であることから, neurokinin A が eNANC 性気道収縮反応における主要な神経伝達物質であると考えられている。本研究において, 外因性 neurokinin A 誘発気道平滑筋収縮反応は抗原反復吸入暴露群と対照群との間で有意な差が見られなかった。このことは, 抗原反復吸入が気道平滑筋レベルの neurokinin A 反応性には影響を与えないことを示唆している。

今回, 肺組織における substance P 含量は抗原反復吸入暴露群において対照群に比して有意に高値を示した。この結果は, 抗原反復吸入暴露によって知覚神経内の神経ペプチド含量, あるいは肺組織における知覚神経数が増加していることを示している。神経細胞からの substance P 産生を制御する因子として cytokine 類, 特に interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) が知られている (45-47)。頸部神経節が気道の知覚神経機能を制御しているが, 培養ラット頸部神経節細胞において IL-1 $\beta$  は substance P 産生量および neurokinin A 前駆体 preprotachykinin の mRNA を増加させることが報告されている (47)。IL-1 $\beta$  は気道炎症に関与するマクロファージ (48), 内皮細胞 (49) および好酸球 (50, 51) 等の細胞から産生されるが, 喘息動物モデルにおける抗原吸入暴露が気道組織の IL-1 $\beta$  を増加させることが報告されている (52, 53)。また, 神経成長因子 (NGF) は知覚神経の成長ならびに機能に深く関与する因子 (54-56) であるが, IL-1 $\beta$  はこの NGF 産生に対しても増強的に働いている (57)。以上より, 抗原反復吸入暴露は気道組織において恐らく IL-1 $\beta$  等の cytokine 産生を誘導し, その結果として NGF 等の産生を亢進して substance P をはじめとする知覚神経ペプチド量を増加させると思われる。

免疫組織学的検討において, 気管支喘息患者の気道組織では特に粘膜下組織に substance P 含有知覚神経が増加していることが報告されている (58)。さらに, 抗原暴露後のアレルギー性患者由来の気管支肺胞洗浄液には substance P 様物質が非アレルギー性患者に比して増加している (59)。また, 我々は気管支喘息患者の喀痰中の substance P 含量が正常人に比べて増加していることを既に報告している (60)。本研究における結果ならびに上記の報告は慢性的な気道反応が substance P を介し

た神経原性反応を亢進し、気道炎症の増悪に關与していることを示唆している。近年、Ellis および Undem (61) はモルモット摘出気管標本において抗原暴露が eNANC 性神経刺激による収縮反応を増強することを報告している。彼らは histamine H<sub>1</sub> 受容体拮抗薬がこの収縮増強反応を阻害することから、抗原暴露によって產生される histamine が H<sub>1</sub> 受容体を介して知覚神経からの tachykinin 遊離を増強するものと考えている。このような前シナプス的な増強反応は本研究においても観察されたが、Table 1 に示すように抗原反復暴露は EFS 誘発収縮反応において EF<sub>50</sub> 値に対して影響を及ぼすことなく E<sub>max</sub> だけを増強した。また、抗原反復暴露は外因性 neurokinin A に対する反応性においても影響を及ぼさなかった。このことは、抗原反復吸入暴露による EFS 誘発収縮反応の増強が平滑筋レベルにおける NK<sub>2</sub> 受容体数増加あるいは気道平滑筋の反応性に起因する反応ではないことを示している。したがって、今回観察された抗原反復吸入暴露による eNANC 性収縮反応増強には知覚神経内の神経ペプチド含量あるいは神経刺激時の神経ペプチド放出量の増加が關与していることが示唆された。

また、他に考えられる eNANC 性収縮反応増強機序として tachykinin 分解反応機構の変化が挙げられる。気道組織において substance P あるいは neurokinin A といった tachykinin 類は主に neutral endopeptidase (NEP) によって分解を受けることが知られている。NEP は気道上皮細胞、粘膜下基底膜、神経細胞および平滑筋といったあらゆる気道組織に存在する (62)。事実、NEP 阻害薬は神経刺激あるいは capsaicin 刺激による eNANC 性収縮反応を増強することが動物気管標本において報告されている (63 - 65)。さらに、抗原反復吸入が組織中 NEP の減少を介して eNANC 性収縮反応を増強することが報告されている (66)。しかしながら、本研究において抗原反復吸入暴露群と対照群との間で外因性 neurokinin A 誘発収縮反応に差は見られなかった。さらに、抗原反復吸入暴露および対照の両群において NEP 阻害薬 phosphoramidon は eNANC 性収縮反応を同程度に増強させた。また、NEP 産生細胞である上皮細胞の剥離によっても外因性 neurokinin A 誘発収縮反応は抗原反復暴露群と対照群との両群で同様に増強を示した。以上の結果は tachykinin 分解酵素の機能低下は今回得られた eNANC 性収縮反応の増強機構には關与していないことを示唆している。

## コリン作動性反応に対する抗原反復吸入暴露の影響

本研究において eNANC 性収縮反応と同様に、抗原反復吸入暴露は能動感作モルモット気道平滑筋標本におけるコリン作動性神経性収縮反応を増強した。外因性 ACh 誘発収縮反応においては抗原反復吸入暴露群と対照群との間で差が見られなかったことより、今回得られた収縮増強反応は上向性コリン作動性神経に対して抗原暴露あるいは気道炎症が何らかの変化をもたらしたことを示唆している。

コリン作動性収縮反応は抗原暴露により生じる気道上皮傷害あるいは剥離によっても増強されるが、これは上皮細胞由来の弛緩因子 (67) が減少することに起因すると考えられる。抗原反復吸入が気道上皮傷害を誘発した場合、外因性 ACh 収縮反応においても抗原反復暴露群のほうが対照群よりも増強すると考えられる。しかしながら、今回得られた外因性 ACh 収縮反応は両群間で差が見られなかった。したがって、今回のコリン作動性収縮反応の増強に気道上皮傷害による影響は関与していないことが示唆された。

気道過敏性反応の亢進は気管支喘息の特徴の一つである (3)。以前の報告において、histamine に対するヒト気道の反応性が *in vivo* および *in vitro* とで相関性が見られず、気道過敏性亢進が気道平滑筋の異常に由来するものではないことが示されている (68)。同様に、histamine に対して気道過敏性反応の亢進を示す抗原暴露動物モデルにおいても *in vitro* の histamine 誘発収縮反応では対照群と差が見られないことが報告されている (38)。Histamine, prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) および bradykinin 等の気管支収縮薬は気道平滑筋に対する直接的な収縮作用の他にコリン作動性収縮機構を介して間接的に収縮反応を増強させることが知られている。また、McCaig (69) は抗原暴露が抗原感作モルモットにおいて神経性コリン作動性気道収縮反応を増強させることを報告しているが、彼らは外因性 ACh に対する反応性については検討を行っていないため、コリン作動性気道過敏性の亢進がどのような機序あるいは部位で起こっているのかを説明するには至っていない。本研究において、抗原暴露が気道平滑筋収縮反応性には影響することなくコリン作動性神経機能の亢進を惹起することを示した。このことは、抗原暴露によるコリン作動性気道過敏性反応の亢進が神経シナプス前メカニズムの変化に起因していることを示唆している。

今回の検討では、コリン作動性神経伝達の亢進機序の詳細を明らかにすることはできないが、これまでにモルモットにおいて抗原吸入暴露が肺の副交感神経系の muscarinic  $M_2$  受容体機能の低下およびコリン作動性神経伝達能の亢進が報告され

ている (70). さらに, 抗原暴露がモルモット気管支神経節細胞の興奮性を亢進すること (71) が報告されており, これらの報告は我々のコリン作動性神経機能亢進の結果を支持するものである. ヒト気道 (72) をはじめとした様々な動物種 (73, 74) において,  $\beta$ -作動薬がシナプス前でのコリン作動性神経伝達を抑制することが証明されているが, 抗原暴露による交感神経系の機能低下が抗原誘発コリン作動性神経機能亢進に関与している可能性も十分考えられる.

#### 4. 小括

- 1) 抗原反復吸入暴露は eNANC 性神経機能を亢進させることが示唆された.
- 2) その亢進機序として知覚神経細胞内の神経ペプチド産生量あるいは知覚神経からの神経ペプチド放出量の増加が関与する可能性が示唆された. eNANC 性神経から放出された神経ペプチドは気道収縮反応, 気道分泌, 血管透過性亢進および好酸球のプライミング等の気管支喘息の病因に深く関与していることが知られている. したがって, 慢性的なアレルギー性気道炎症は, 炎症細胞以外に神経原性機序によっても制御されていると考えられる.
- 3) 抗原反復吸入暴露はコリン作動性神経機能を亢進させた. 慢性的な抗原暴露によって誘発されるこのコリン作動性神経機能の亢進は気管支喘息における気道過敏性亢進の一因を担っていると考えられる.

## 第 2 章 知覚神経による気道炎症調節機構

気道炎症は気管支喘息の重要な発症要因と考えられ、炎症性細胞に由来する炎症性伝達物質の遊離や、気道壁に介在する知覚神経系および副交感神経系の異常がこの気道炎症に大きく関与している (8)。また、第 1 章で示したように、慢性的な気道炎症は何らかの機序を介して気道の神経性反応を制御していると考えられる。炎症性伝達物質の中でも leukotriene 類は気管支喘息の重要な惹起物質と考えられている。近年の leukotriene 類の受容体拮抗薬 (75) や合成阻害薬 (76) の開発に伴い肺機能における leukotriene 類の生理作用が急速に解明され、気管支喘息患者における抗原誘発 (77) あるいは運動誘発気道狭窄 (78) において leukotriene 類が重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、気道壁に分布する知覚神経から放出される神経ペプチド、特に tachykinin 類は、気管支喘息の症状に見られるような気道平滑筋収縮反応、血管透過性亢進ならびに気道粘膜分泌の亢進を誘発することが知られている (15)。

幾つかの報告において leukotriene D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) と tachykinin 類間での相互作用が示唆されている。たとえば、capsaicin 感受性知覚神経刺激による気道収縮反応および血管透過性亢進が LTD<sub>4</sub> 拮抗薬によって一部抑制されることが報告され (79)、tachykinin 類が内因性 LTD<sub>4</sub> 遊離を亢進させることが示唆されている。一方、モルモット回腸縦走筋標本において、LTD<sub>4</sub> 誘発収縮反応を substance P 拮抗薬が一部抑制する (80)。このことは回腸縦走筋における LTD<sub>4</sub> 収縮反応には substance P が関与していることを示唆している。また、モルモット肺組織においても LTD<sub>4</sub> が知覚神経からの tachykinin 類放出を惹起することが報告されている (81)。しかしながら、LTD<sub>4</sub> 誘発気道反応において内因性 tachykinin 類が機能的にどの程度関与しているのかを明確に示す答えは得られていない。

本章では、炎症性伝達物質 LTD<sub>4</sub> が知覚神経の炎症反応調節機構にどの程度関与しているかを調べるために、capsaicin 前処置による知覚神経からの神経ペプチド枯渇ならびに neurokinin 拮抗薬処置により LTD<sub>4</sub> 誘発気道反応がどのように変化するかを検討する。

## 1. 実験方法および使用薬物

### 1-1. 使用動物

実験には体重 350 ~ 450 g の Dunkin-Hartley 系雄性モルモット ( $n = 70$ , 船橋実験動物, 仙台) を用いた。動物は urethane (2 g/kg) の腹腔内投与による麻酔下に総頸静脈を露出させて静脈内投与に供した。実験の 30 分前に atropine (1 mg/kg) および propranolol (1 mg/kg) を静脈内投与して muscarinic および  $\beta$ -adrenergic 受容体を介する作用を遮断した。また、気管上部に気管カニューレを装着し、人工呼吸器 (Model SN-480-7, シナノ製作所, 東京) に接続した。人工呼吸は体重 100 g あたり 1 ml の 1 回換気量を 60 回/min の条件下で行った。なお、動物は約 37°C の保温パッド (Deltaphase Isothermal Pad, model 39DP, Braintree Science Inc, UK) 上に背位に置き、体温を安定させた状態で実験を行った。

### 1-2. LTD<sub>4</sub> 誘発肺抵抗上昇の測定

気流量 ( $V'$ ) は気管カニューレに接続したニューモタコグラフ (Model 00, Fleisch, Switzerland) および差圧トランスデューサー (MP45,  $\pm 5$  cmH<sub>2</sub>O, Validyne Corp, USA) より得られる差圧から算出した。1 回換気量 ( $V_T$ ) は気流波形より算出した。肺内外圧 ( $P_{tp}$ ) は気道内圧 ( $P_{ao}$ ) および食道内バルーンに接続した差圧トランスデューサー (MP45,  $\pm 100$  cmH<sub>2</sub>O) から得られる胸腔内圧 ( $P_{pl}$ ) により算出した。肺抵抗 ( $R_L$ ) は Mead & Whittenberger の方法 (82) に従って  $V_T$ ,  $V'$  および  $P_{tp}$  より算出した。肺抵抗の変化は LTD<sub>4</sub> 吸入後 5 分間測定した。

### 1-3. LTD<sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進の測定

血管透過性亢進による血漿漏出は Evans blue の血管外漏出量によって測定した。LTD<sub>4</sub> 誘発気道炎症は LTD<sub>4</sub> (5  $\mu$ g/ml) を人工呼吸器および気管カニューレ間の吸気部位に接続した超音波ネブライザー (NE-U11B, オムロン, 東京) により 1 分間吸入させることにより惹起した。LTD<sub>4</sub> 吸入の 1 分前に Evans blue (30 mg/kg) を静脈内投与した。LTD<sub>4</sub> 吸入 5 分後に開胸し、左心室より大動脈内へ挿入したカニューレから約 100 ml の生理食塩水を 80 mmHg の圧力で環流することにより血管内の Evans blue を洗浄した。環流液は右心房より放出した。環流により環流廃

液が無色透明になっていることを確認した後に肺を摘出し、肺実質部を板上で丁寧に削ぎ落とした。気道標本は主気管支および肺内気管支に分け、さらに肺内気管支は中枢部位 (central intrapulmonary airways, cIPA) および末梢部位 (peripheral IPA, pIPA) に分割して Evans blue 漏出量の測定に供した。それぞれの組織標本は湿重量を測定した後に 37°C に保温した 2 ml の formamide 中で 16 時間インキュベートして Evans blue を抽出した。抽出液中の Evans blue 濃度は吸光度計 (Spectrophotometer 220A, 日立製作所, 東京) で 620 nm 波長の吸光度を測定することにより求めた。このとき Evans blue の検量線は 0.5 ~ 10 µg/ml の範囲で測定した。Evans blue 濃度を組織重量で補正して組織あたりの Evans blue 漏出量 (ng/wet weight tissue) を算出した。

#### 1-4. Capsaicin 前処置：知覚神経ペプチド枯渇動物モデルの作成

Capsaicin 処置による tachykinin 類を主とする知覚神経伝達物質の枯渇動物モデルを作製するために以下の処置を行った。動物は ketamine (50 mg/kg) および xylazine (0.1 mg/kg) の筋肉内投与により麻酔を行った。また, aminophylline (25 mg/kg) 腹腔内投与および terbutaline (0.1 mg/kg) 皮下投与を capsaicin 処置の 30 分前に施して capsaicin による気道狭窄を防御した。Capsaicin (50 mg/kg) あるいは capsaicin の溶媒 (ethanol/Tween 80, 1 ml/kg) を皮下投与し, その 1 週間後に LTD<sub>4</sub> 誘発気道炎症実験に供した。

#### 1-5. 実験プロトコール

##### 1-5-1. LTD<sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進ならびに肺抵抗上昇に対する neurokinin-1 拮抗薬 FK 888 および LTD<sub>4</sub> 拮抗薬 ONO-1078 の作用

LTD<sub>4</sub> 誘発 Evans blue 漏出ならびに肺抵抗上昇に対する neurokinin-1 (NK<sub>1</sub>) 拮抗薬 FK 888 あるいは LTD<sub>4</sub> 拮抗薬 ONO-1078 の静脈内投与による作用は以下の 7 群において検討した：第 I 群, dimethylsulfoxide (DMSO, 0.1 mg/kg) および生理食塩水吸入 (n = 5); 第 II 群, FK 888 (10 mg/kg) および生理食塩水吸入 (n = 5); 第 III 群, ONO-1078 (200 µg/kg) および生理食塩水吸入 (n = 5); 第 IV 群, DMSO および LTD<sub>4</sub> 吸入 (n = 6); 第 V 群, FK 888 (1 mg/kg) および LTD<sub>4</sub> 吸入 (n = 6); 第 VI 群, FK 888 (10 mg/kg) および LTD<sub>4</sub> 吸入 (n = 7); 第 VII 群, ONO-1078 (0.2 mg/kg) および LTD<sub>4</sub> 吸入 (n = 5)。FK 888 あるいは ONO-1078 は Evans blue

(30 mg/kg) 静脈内投与の 1 分前に投与した。

#### 1-5-2. LTD<sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進ならびに肺抵抗上昇に対する NK<sub>1</sub> 拮抗薬 CP 96345 および neurokinin-2 (NK<sub>2</sub>) 拮抗薬 SR 48968 の作用

LTD<sub>4</sub> 誘発 Evans blue 漏出ならびに肺抵抗上昇に対する neurokinin サブタイプの違いについて調べるために、NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬 CP 96345 および neurokinin-2 (NK<sub>2</sub>) 受容体拮抗薬 SR 48968 静脈内投与の作用を検討した。CP 96345 (4 mg/kg, n = 5), SR 48968 (0.3 mg/kg, n = 5) あるいは溶媒 (DMSO, 0.1 ml/kg, n = 5) は Evans blue 処置の 1 分前に投与した。LTD<sub>4</sub> 誘発気道反応の惹起は Evans blue 処置の 1 分後に行った。

#### 1-5-3. LTD<sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進に対する capsaicin 前処置の影響

Tachykinin 枯渴の影響を調べるために、capsaicin 処置を行った動物を用いて LTD<sub>4</sub> 吸入 (n = 8) あるいは生理食塩水吸入 (n = 8) 後の気道反応を検討した。

#### 1-6. 使用薬物

FK 888 および ONO-1078 はそれぞれ藤沢薬品工業 (大阪) および小野薬品 (大阪) から譲渡されたものを用いた。CP 96345 は山之内製薬 (東京) で合成したものを用いた。SR 48968 は Emonds-Alt 氏 (Sanofi Recherche, France) より譲渡されたものを用いた。他に以下の化合物を用いた: Evans blue (Aldrich Chemical Co., Inc, USA); substance P, urethane および xylazine (Sigma Chemical Co., USA); dimethylsulfoxide (DMSO), ethanol, formamide および Tween 80 (和光純薬工業, 大阪); atropine sulfate (田辺製薬, 大阪); propranolol hydrochloride (Imperial Chemical Industries plc, UK); 5% glucose 溶液および 0.9% 生理食塩水 (大塚製薬, 東京); aminophylline (エーザイ, 東京); ketamine (三共, 東京)。

Evans blue は 30 mg/ml の濃度で生理食塩水に溶解した後に孔径 0.22 μm のフィルター (MILLEX-GV, Millipore, USA) で濾過したものを使用した。FK 888, ONO-1078, CP 96345 および SR 48968 は投与容量が 0.1 ml/kg になるように DMSO に溶解し、マイクロシリンジ (MS-N50, テルモ, 東京) で投与した。Capsaicin は 50 mg/ml の濃度で 10% ethanol/10% Tween 80/80% 生理食塩水に溶解した。なお、実験に使用した FK 888, CP 96345 および SR 48968 の用量

は in vivo 阻害活性が報告されている用量を用いた (22, 83, 84).

## 1-7. 統計解析

データは平均値±標準誤差 (mean±SE) で表記した. 各群間の Evans blue 漏出量の統計的比較は Student's unpaired t-test および Bonferroni correction を用いて行った. LTD<sub>4</sub> 誘発肺抵抗変化は二元配置分散分析ならびに Student's unpaired t-test を用いて統計的に比較した. 各種統計解析によって p 値が 0.05 以下の値を示したものを統計的に有意とした.

## 2. 実験結果

### 2-1. LTD<sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進に対する ONO-1078 の作用

非刺激群において, 生理食塩水吸入暴露による Evans blue の気管組織中漏出量は主気管支, 中枢側肺内気管支 (cIPA) および末梢側肺内気管支 (pIPA) においてそれぞれ 13.8±3.3, 18.9±8.8 および 17.4±4.6 ng/mg tissue を示した. このとき, LTD<sub>4</sub> 吸入暴露による Evans blue 漏出量は主気管支で 127.1±16.2 ng/mg tissue, cIPA で 124.9±8.4 ng/mg tissue および pIPA で 178.3±18.2 ng/mg tissue を示し, その Evans blue 漏出量は生理食塩水吸入暴露群に比して有意に増加していた (Figure 6).

LTD<sub>4</sub> 拮抗薬 ONO-1078 (0.2 mg/kg) 静脈内投与は生理食塩水吸入による Evans blue 漏出量に対して影響を与えなかった. また, 同用量の ONO-1078 は LTD<sub>4</sub> 誘発 Evans blue 漏出に対して気管組織の全部位 (主気管支, cIPA および pIPA) において有意な抑制作用を示し, そのときの Evans blue 漏出量は生理食塩水吸入による漏出量レベルまでほぼ完全に抑制された (Figure 6).

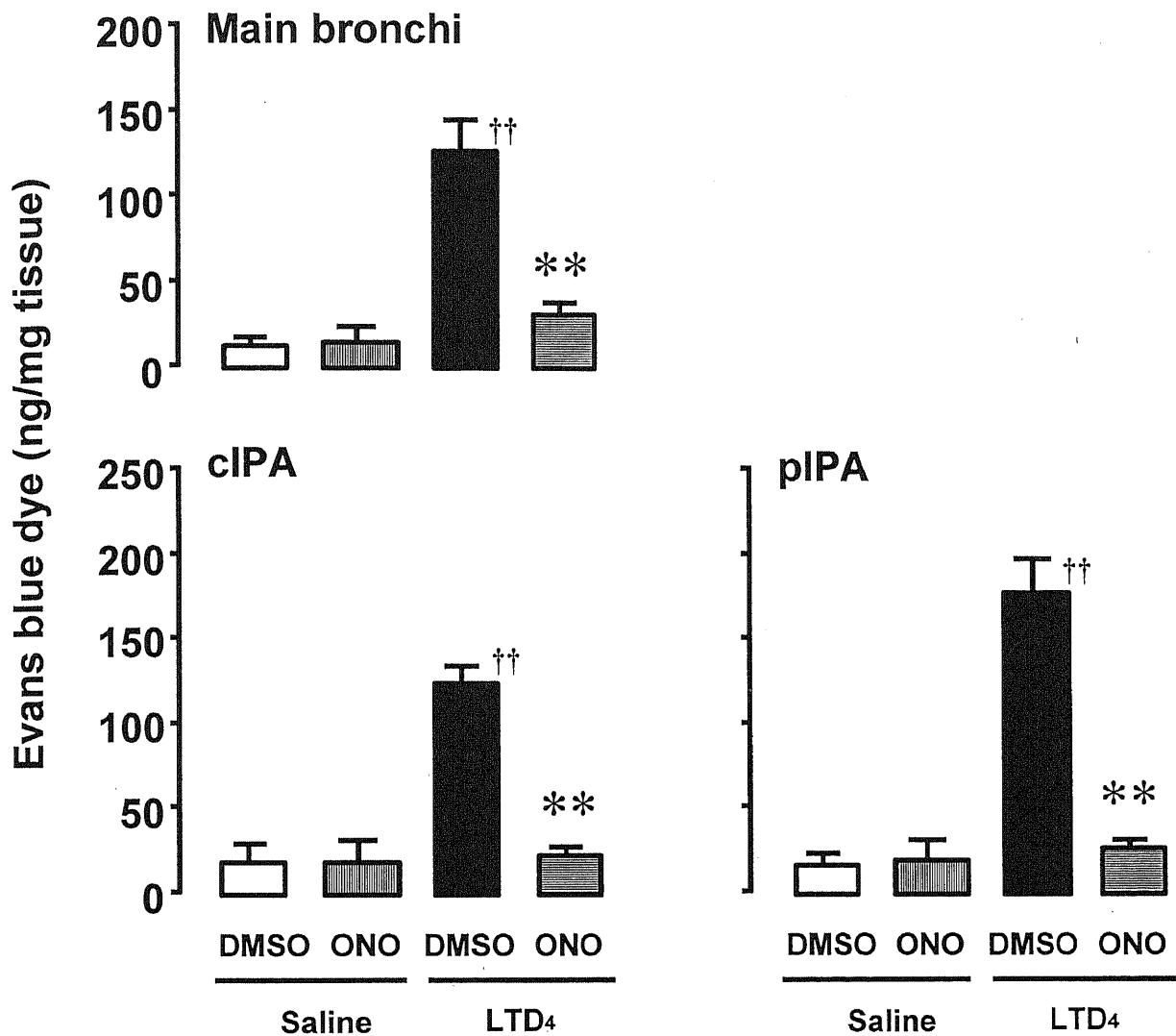


Figure 6. Histogram illustrating the degree of Evans blue exudation evoked by LTD<sub>4</sub> (5 µg/ml in saline for 1 min) inhalation challenge in guinea-pig airways. : response to saline inhalation challenge (for 1 min) after iv injection of DMSO (vehicle for ONO-1078, 0.1 ml/kg, n = 5). : response to saline inhalation after ONO-1078 (0.2 mg/kg, iv, n = 5). : response to LTD<sub>4</sub> inhalation after iv injection of DMSO (n = 6). : response to LTD<sub>4</sub> inhalation after ONO-1078. The data are presented as mean±SE. cIPA and pIPA: central and peripheral intrapulmonary airways, respectively; LTD<sub>4</sub>: leukotriene D<sub>4</sub>; DMSO: dimethylsulfoxide; ONO: ONO-1078. †† p<0.01 compared with values of saline inhalation after DMSO administration; \*\* p<0.01 compared with the values of LTD<sub>4</sub> inhalation after DMSO administration.

## 2-2. LTD<sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進に対する FK 888 の作用

FK 888 (10 mg/kg) 静脈内投与は生理食塩水吸入による Evans blue 漏出量に対して影響を与えなかった。 LTD<sub>4</sub> 誘発 Evans blue 漏出に対して FK 888 (1 および 10 mg/kg) は 10 mg/kg で主気管支における漏出量を有意に抑制した。 これに対して、FK 888 は cIPA および pIPA における Evans blue 漏出に対しては抑制を示さなかった (Figure 7).

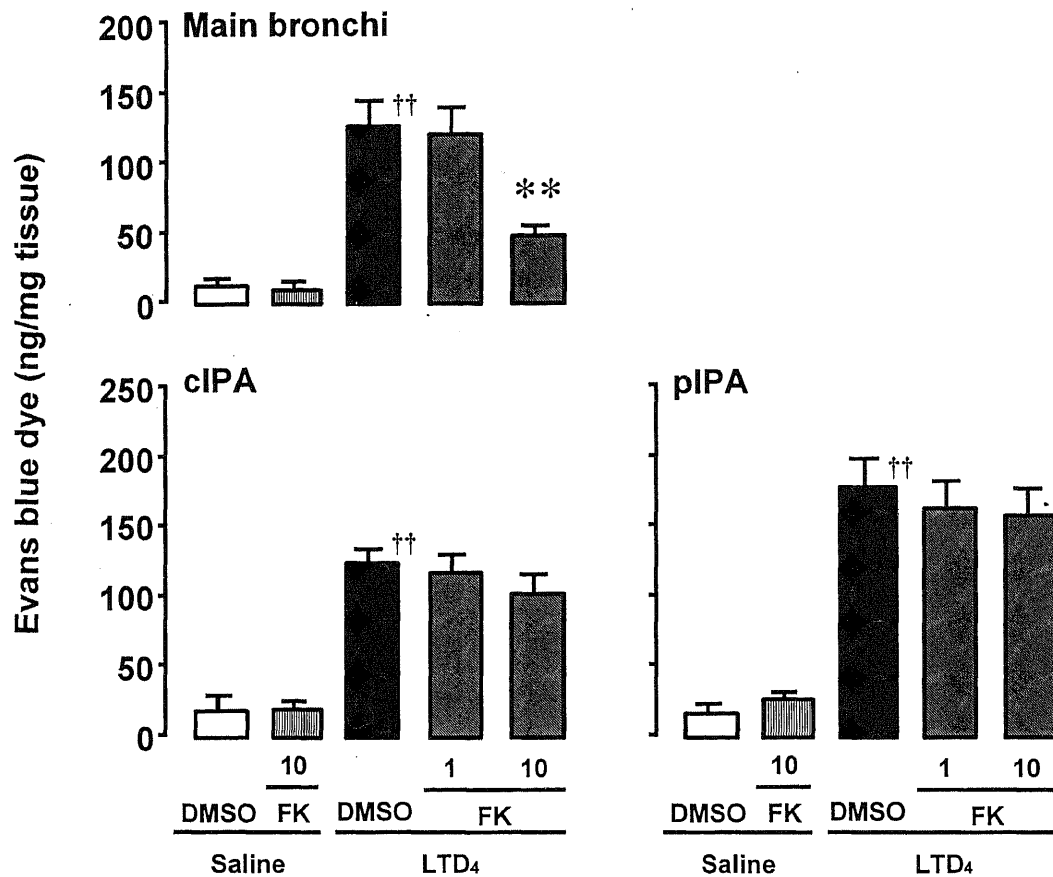


Figure 7. Effects of NK<sub>1</sub> receptor antagonist, FK 888 (FK), on LTD<sub>4</sub>-induced airway plasma exudation in main bronchi, and central (cIPA) and peripheral intrapulmonary airways (pIPA). □ : response to saline inhalation (for 1 min) after iv injection of DMSO (vehicle for FK 888, 0.1 ml/kg, n = 5). ▨ : response to saline inhalation (10 mg/kg, iv, n = 5). ■ : response to LTD<sub>4</sub> inhalation (5 μg/ml for 1 min) after iv injection of DMSO (n = 6). ▩ : response to LTD<sub>4</sub> inhalation after FK 888 (1 mg/kg, iv, n = 6; and 10 mg/kg, iv, n = 7). The data are presented as mean±SE. †† p<0.01 compared with values of saline inhalation after intravenous injection of DMSO. \*\* p<0.01 compared with the values of LTD<sub>4</sub> inhalation after intravenous injection of DMSO. For further abbreviations see legend of figure 6.

### 2-3. LTD<sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進に対する CP 96345 および SR 48968 の作用

CP 96345 (4 mg/kg) 静脈内投与は LTD<sub>4</sub> 誘発 Evans blue 血管外漏出に対して主気管支および cIPA において有意な抑制作用を示したが, pIPA においては抑制を示さなかった (Figure 8). また, SR 48968 (0.3 mg/kg) 静脈内投与はいずれの気道部位においても有意な抑制作用を示さなかった (Figure 8).

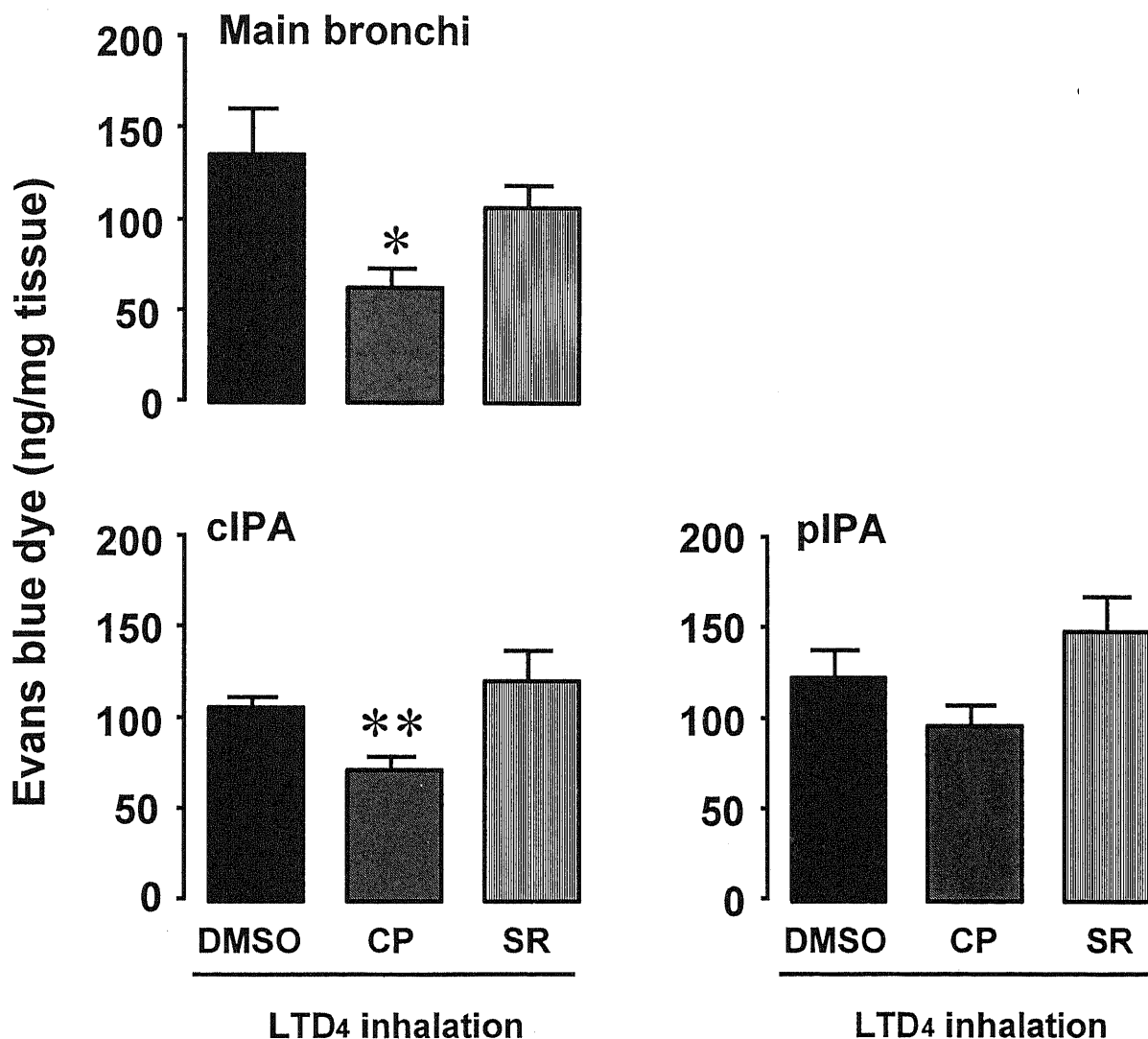


Figure 8. Effect of CP 96345 (CP) and SR 48968 (SR) on LTD<sub>4</sub>-induced airway plasma exudation. The data are presented as mean±SE. ■ : response to LTD<sub>4</sub> (5 μg/ml for 1 min) after iv injection of DMSO (n = 5); ▨ : response to LTD<sub>4</sub> inhalation after CP 96345 (4 mg/kg iv, n = 5); ▩ : response to LTD<sub>4</sub> inhalation after SR 48968 (0.3 mg/kg iv, n = 5). \* p < 0.05 and \*\* p < 0.01 compared with the values of DMSO (vehicle for CP and SR) pretreatment. For abbreviations see legend to figure 6.

#### 2-4. LTD<sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進に対する capsaicin 前処置の影響

Capsaicin の溶媒のみを前処置した動物において LTD<sub>4</sub> 吸入暴露は、主気管支、cIPA および pIPA においてそれぞれ  $140.0 \pm 20.5$ ,  $133.5 \pm 12.1$  および  $197.3 \pm 23.0$  ng/mg tissue の Evans blue 漏出を惹起した。このとき、主気管支の Evans blue 漏出量は capsaicin 前処置によって有意に抑制された。しかし、肺内気管支部位においては cIPA および pIPA とも溶媒処置群と capsaicin 処置群の間で有意な差は見られなかった (Figure 9).

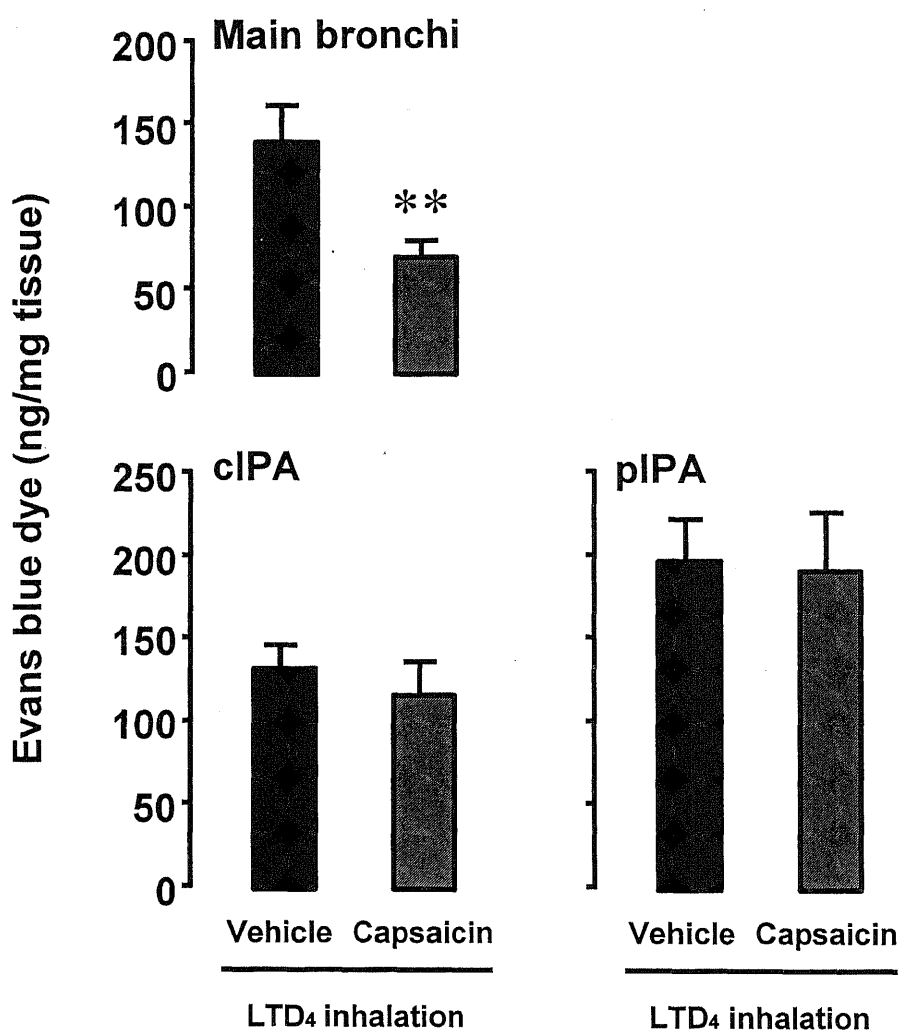


Figure 9. Effect of capsaicin pretreatment on LTD<sub>4</sub>-induced airway plasma exudation in guinea-pig airways.  : response to LTD<sub>4</sub> inhalation (5 µg/ml for 1 min) after pretreatment with vehicle for capsaicin (vehicle, n = 8);  : response to LTD<sub>4</sub> inhalation after pretreatment with capsaicin (50 mg/kg im, n = 8). The data are presented as mean±SE. \*\* p<0.01 compared with the value of vehicle pretreatment. For abbreviations see legend of figure 6.

## 2-5. LTD<sub>4</sub> 誘発肺抵抗上昇に対する ONO-1078 および FK 888 の作用

LTD<sub>4</sub> 吸入暴露は吸入後 1 ~ 5 分の間で有意な肺抵抗上昇を示した (Figure 10). この肺抵抗上昇に対して ONO-1078 (0.2 mg/kg) 静脈内投与は有意な抑制作用を示し, 肺抵抗の上昇はほぼ完全に抑制された. 一方, FK 888 (10 mg/kg) 静脈内投与は LTD<sub>4</sub> 誘発肺抵抗上昇に対して影響を与えなかった (Figure 10).

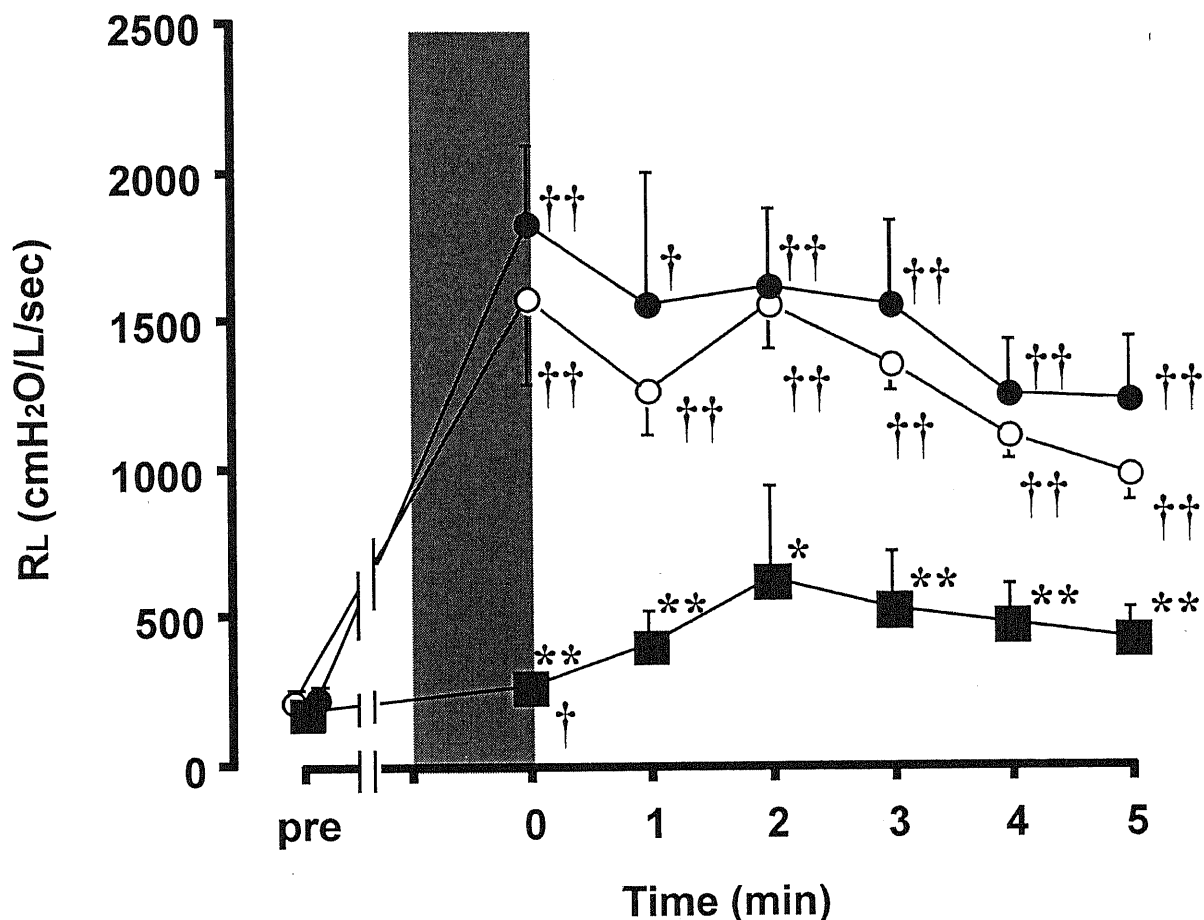


Figure 10. Effect of FK 888 and ONO-1078 on pulmonary resistance (RL) changes evoked by LTD<sub>4</sub> inhalation (5 μg/ml for 1 min) challenge in guinea-pig airways. The shaded area indicates the period of LTD<sub>4</sub> inhalation. ○ : response to LTD<sub>4</sub> inhalation after intravenous injection of DMSO (vehicle for ONO-1078 and FK 888, n = 6); ● : response to LTD<sub>4</sub> inhalation after FK 888 (10 mg/kg iv, n = 5); ■ : response to LTD<sub>4</sub> inhalation after ONO-1078 (0.2 mg/kg iv, n = 5). The data are presented as mean±SE. † p<0.05 and †† p<0.01 compared with the values of preinhalation (pre); \* p<0.05 and \*\* p<0.01 compared with the values of LTD<sub>4</sub> inhalation after intravenous injection of DMSO. For further abbreviation see legend of figure 6.

## 2-6. LTD<sub>4</sub> 誘発肺抵抗上昇に対する CP 96345 および SR 48968 の作用

SR 48968 (0.3 mg/kg) 静脈内投与は LTD<sub>4</sub> 誘発肺抵抗の上昇に対して吸入後 1 分および 2 分で有意な抑制作用を示した (Figure 11). これに対して, CP 96345 (4 mg/kg) 静脈内投与は LTD<sub>4</sub> 誘発肺抵抗上昇に対して影響を与えなかった (Figure 11).

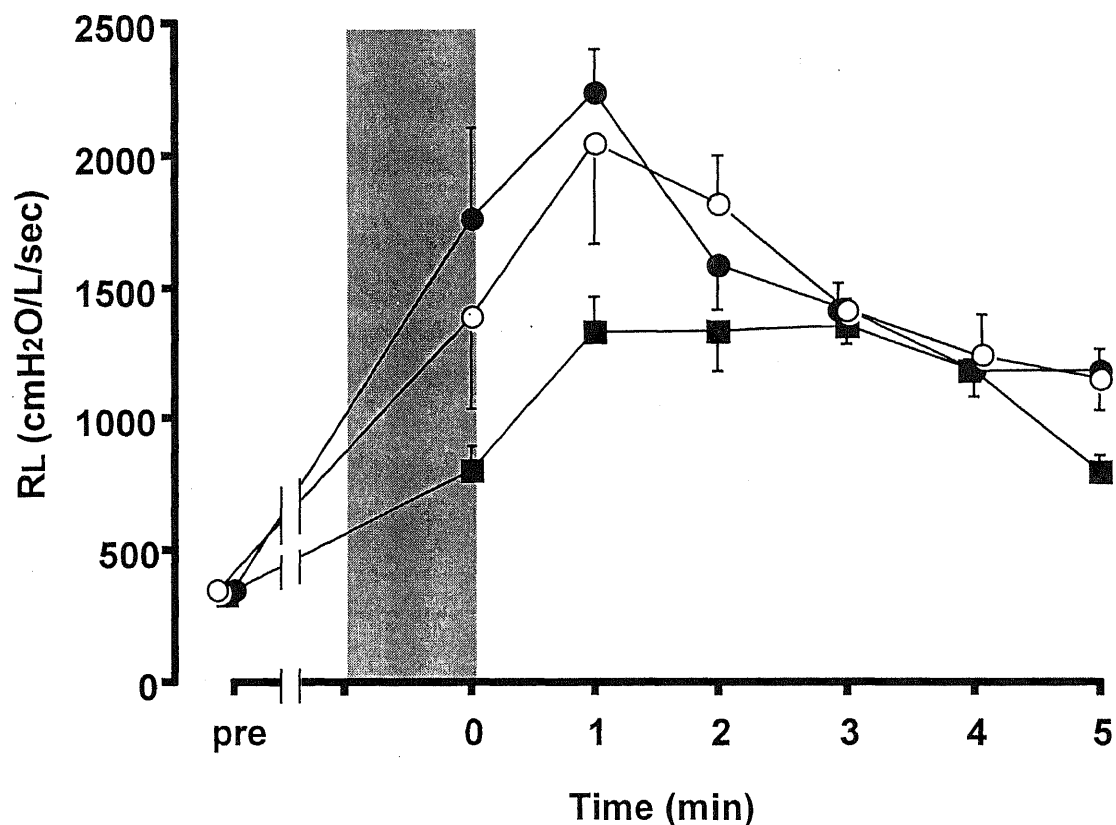


Figure 11. Effect of CP 96345 (●, 4 mg/kg iv) and SR 48968 (■, 0.3 mg/kg iv) on pulmonary resistance (R<sub>L</sub>) changes evoked by LTD<sub>4</sub> inhalation. The shaded area indicates the period of LTD<sub>4</sub> inhalation (for 1 min). ○ : response to LTD<sub>4</sub> inhalation after DMSO pretreatment. The data are presented as mean±SE. Each point after LTD<sub>4</sub> inhalation was significantly different from the preinhalation (pre) values ( $p < 0.05$ ). At 1 and 2 min after LTD<sub>4</sub> inhalation, R<sub>L</sub> values of SR 48968 pretreatment were significant by lower than those of DMSO pretreatment ( $p < 0.05$ ). There was no significant difference between the values of CP 96345 and DMSO pretreatment. For further abbreviation see legend of figure 6.

### 3. 考察

本章では LTD<sub>4</sub> 吸入が気道の中枢から末梢にかけての全部位において血管透過性亢進を誘発することを示した。モルモット気道における LTD<sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進については Evans blue (85, 86) あるいは <sup>125</sup>I-ラベル牛血清アルブミン (87) を血漿漏出の指標として用いて、全気道部位において同等に血管透過性が亢進することが報告されているが、今回の結果はそれらの報告とほぼ一致している。LTD<sub>4</sub> 受容体拮抗薬、ONO-1078 はこの血管透過性亢進に伴う血管外への血漿漏出をほぼ完全に抑制した。すなわち、気道組織における LTD<sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進は leukotriene 受容体特異的な反応であることを示している。

今回、LTD<sub>4</sub> 誘発気道血管透過性亢進における内因性 tachykinin 遊離の関与を調べるために、capsaicin 前処置および NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬処置の 2 つの手法を用いた。Capsaicin は知覚神経 C-fiber を選択的に刺激 (88-90) するため、本薬物を処置することにより知覚神経から神経ペプチドを枯渇させる (91)。Capsaicin 処置を施した実験動物では知覚神経刺激による気道血管透過性亢進が惹起されないことが知られている (27, 89, 92, 93)。また、NK<sub>1</sub> 受容体は血管透過性部位である後毛細血管細静脈床に局在しており (18, 94)、substance P は neurokinin A や neurokinin B よりも約 8 倍ほど強力な NK<sub>1</sub> 受容体作動薬であることから、この神経ペプチドはモルモットにおける tachykinin 誘発気道内血管透過性亢進において最も重要な伝達物質であると考えられている (95)。NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬 FK 888 は知覚神経刺激による気道反応を抑制する (96) とともに外因性 substance P 誘発反応 (97) を阻害することが報告されている。今回の検討において capsaicin 処置および NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬投与はともに LTD<sub>4</sub> 誘発気道内血管透過性亢進を中枢気道部位において有意に抑制した。この結果は、中枢気道においては LTD<sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進機序の一部、知覚神経からの tachykinin 遊離を介したメカニズムが存在することを示唆している。

肺組織を用いた in vitro 検討においても LTD<sub>4</sub> 刺激が substance P および neurokinin A 産生を増強すること (81) が報告されており、このことは今回の in vivo でのモルモットの結果を支持するものと思われる。LTD<sub>4</sub> による tachykinin 遊離に関しては、回腸を用いた実験で今回と同様のことが示唆されている。Bloomquist ら (80) はモルモット回腸標本において LTD<sub>4</sub> 誘発収縮反応は神経毒 tetrodotoxin によって一部抑制されることを示し、この抑制作用が capsaicin 前処置

あるいは substance P 拮抗薬処置により消失することを報告している。これに対して、Manzini および Meini (98) はモルモット主気管支標本において capsaicin 前処置は LTD<sub>4</sub> 誘発気管支収縮反応に対して影響を及ぼさないことを報告している。本研究においては capsaicin 前処置の LTD<sub>4</sub> 誘発気道収縮反応に対する検討を行っていないために Manzini らの報告と比較することはできないが、in vitro での capsaicin 前処置と in vivo での同前処置の間では何らかの機能的違いが存在するのかもしれない。

今回、capsaicin 前処置および NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬処置がともに気道の中枢部位においてのみ LTD<sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進を抑制することを示した。このことは LTD<sub>4</sub> 誘発気道炎症における tachykinin を介した機序は細気管支のような気道末梢部位よりも気管あるいは主気管支のような中枢気道部位において関与していることを示唆している。Substance P 含有神経細胞 (99) は気道組織のほぼ全域に存在しているが、知覚神経刺激による気道血管透過性亢進は末梢気道部位に比して中枢気道部位の方が顕著な増強を示すことが知られている (100, 101)。このことは、外的刺激に対する知覚神経の機能的反応性は末梢気道部位よりも中枢気道部位において高いことを意味している。すなわち、主に中枢気道部位においては知覚神経が LTD<sub>4</sub> 刺激によって活性化され、内因性 substance P を放出すると考えられる。したがって、中枢気道部位では LTD<sub>4</sub> を介した炎症は後毛細血管静脈床の NK<sub>1</sub> 受容体および LTD<sub>4</sub> 受容体の双方を介した機序によって引き起こされ、末梢気道における LTD<sub>4</sub> 誘発気道炎症は主に LTD<sub>4</sub> 受容体のみによって惹起されるものと考えられる。われわれは LTD<sub>4</sub> と同様に気道炎症の惹起物質である bradykinin も中枢気道部位において同様な内因性 tachykinin を介する機序を有していることを報告している (22)。恐らく、少なくとも中枢気道部位においては、LTD<sub>4</sub> を含む炎症性伝達物質によって惹起される気道炎症は知覚神経刺激を介する調節機構によって制御されていると考えられる。

本章での検討において、FK 888 はこれまでの報告 (96, 97) に比べて高用量においてのみ抑制作用を示した。この FK 888 の薬理作用が非選択的な活性による可能性もあるため、われわれは化学構造的に異なる NK<sub>1</sub> 拮抗薬 CP 93645 を用いても同様の検討を行ったが、本拮抗薬も FK 888 と同様に中枢気道部位においてのみ LTD<sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進を抑制した。したがって、FK 888 の示した抑制作用は NK<sub>1</sub> 受容体に選択的な作用であると考えられる。

LTD<sub>4</sub> 吸入は肺抵抗を有意に上昇させたが、血管透過性亢進に対して有意な抑制作用を示した NK<sub>1</sub> 拮抗薬 FK 888 および CP 93645 はこの LTD<sub>4</sub> 誘発肺抵抗上昇に対して作用を示さなかった。これに対して、NK<sub>2</sub> 拮抗薬 SR 48968 は有意に LTD<sub>4</sub> 誘発肺抵抗上昇を抑制した。これらの結果は tachykinin が NK<sub>2</sub> 受容体を介して気道平滑筋収縮を引き起こすという事実 (15, 95) とよく一致するものである。したがって、今回得られた LTD<sub>4</sub> 誘発気道抵抗の上昇は血管透過性亢進あるいは粘膜下の気道浮腫による壁肥厚に由来するものではなく、平滑筋収縮反応に起因するものであることが示唆された。

#### 4. 小括

- 1) モルモットにおいて LTD<sub>4</sub> 吸入が気道の血管透過性亢進ならびに気道狭窄を惹起した。
- 2) Capsaicin による知覚神経からの tachykinin 枯渇, および NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬投与は中枢気道部位において LTD<sub>4</sub> 誘発血漿漏出量の増加を一部抑制した。
- 3) NK<sub>2</sub> 受容体拮抗薬は LTD<sub>4</sub> 誘発気道抵抗の上昇を有意に抑制した。
- 4) 以上の結果より, LTD<sub>4</sub> 誘発気道反応には一部, 知覚神経からの tachykinin 遊離を介した機序が関与することが示唆された。

## 第 3 章 神経原性気道炎症における $K_{ATP}$ チャンネルの関与

ATP 感受性  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) チャンネル開口薬は血管拡張作用 (102) がよく知られているが, その機序は細胞膜  $K^+$  チャンネル開口により細胞外への  $K^+$  イオン流出を促進することで細胞膜を過分極させることと考えられている (102, 103, 104). これまでに  $K^+$  チャンネル開口薬は acetylcholine (25, 27) および histamine (25) 誘発気道平滑筋収縮反応ならびに serotonin (5-HT) 誘発気道狭窄 (24) を抑制することが報告されている. また, ATP 感受性  $K^+$  チャンネル開口薬がコリン作動性神経あるいは eNANC 性神経刺激により惹起される気道平滑筋収縮反応を抑制することが知られているが, この作用は平滑筋収縮反応に対する機能的拮抗作用だけでなくコリン作動性神経および eNANC 性神経終末からの acetylcholine や substance P といった神経伝達物質の放出制御機序が関与していることが報告されている (27). 知覚神経より放出される substance P は気管支収縮だけでなく気道炎症の惹起物質として知られ, 強い血管透過性亢進作用を有する (5). 気管支喘息において気道炎症は重要な病因と考えられ (8), 知覚神経を介した神経原性炎症もその一端を担っている. しかしながら, この気道炎症において ATP 感受性  $K^+$  チャンネルがどのように関与しているかを検討した報告は未だない. 本章では,  $K^+$  チャンネル開口薬を用い, 神経原性気道炎症における ATP 感受性  $K^+$  チャンネルの関与について検討する.

### 1. 実験方法および使用薬物

#### 1-1. 使用動物

実験には体重 300 ~ 350 g の Hartley 系雄性モルモット (船橋実験動物, 仙台,  $n = 88$ ) を用いた. 動物は urethane (2 g/kg) 腹腔内投与による麻酔下に 37°C の保温パッド (Deltapase Isothermal Pad, Model 39DP, Braintree Science Inc., UK) 上に置き左頸動脈, 両頸静脈ならびに両迷走神経を露出した. 左頸動脈にはポリエチレンカニューレ (PE-50) を挿入して, 接続した圧トランスデューサーにより血圧を測定した. また, 両頸静脈は静脈内投与に使用した. 静脈投与にはマイクロシリッジ (MS-N50, テルモ, 東京) を用いた. 動物は実験の 30 分前に atropine (1

mg/kg) および propranolol (1 mg/kg) を静脈内投与し, muscarinic 受容体ならびに  $\beta_2$ -adrenergic 受容体を介した刺激を遮断した.

### 1-2. 迷走神経刺激気道炎症実験プロトコール

両側の頸部迷走神経は中枢側を切断した後にそれぞれ白金電極を装着した. YM 934 静脈内投与実験において以下の 6 群を用いた: 第 I 群, YM 934 溶媒 (1 ml/kg 静脈内投与) 前処置および模擬的神経刺激 ( $n = 5$ ); 第 II 群, YM 934 (100 mg/kg 静脈内投与) 前処置および模擬的神経刺激 ( $n = 5$ ); 第 III 群, YM 934 溶媒前処置および迷走神経刺激 ( $n = 6$ ); 第 IV 群, YM 934 (10  $\mu$ g/kg 静脈内投与) 前処置および迷走神経刺激 ( $n = 6$ ); 第 V 群, YM 934 (30  $\mu$ g/kg 静脈内投与) 前処置および迷走神経刺激 ( $n = 6$ ); 第 VI 群, YM 934 (100  $\mu$ g/kg 静脈内投与) 前処置および迷走神経刺激 ( $n = 6$ ). YM 934 あるいは溶媒は Evans blue (30 mg/kg) 静脈内投与の 1 分前に処置し, 処置 1 分後に迷走神経刺激あるいは模擬的神経刺激を行った. なお, 迷走神経刺激は電気刺激装置 (SEN 3201, 日本光電, 東京) を用いて 5 V, 7 Hz およびパルス間隔 5 ms の条件下で 3 分間行った.

外因性 substance P (0.5 および 1  $\mu$ g/kg 静脈内投与) 誘発血管透過性亢進に対する YM 934 (100  $\mu$ g/kg,  $n = 5$ ) あるいは溶媒 ( $n = 5$ ) の作用は, 迷走神経刺激と同程度の Evans blue 漏出量増加を示す substance P 量を用いて行った. YM 934 あるいは溶媒は Evans blue 静脈内投与 1 分前に処置し, 処置 1 分後に各用量の substance P 静脈内投与により血管透過性亢進を惹起した.

ATP 感受性  $K^+$  チャンネル阻害薬 glibenclamide (25 mg/kg) 存在下 ( $n = 6$ ) および非存在下 (glibenclamide 溶媒 5 ml/kg,  $n = 7$ ) での YM 934 (100  $\mu$ g/kg, 静脈内投与) の迷走神経刺激血管透過性亢進に対する作用を検討した. また, 擬刺激条件下でも同様に glibenclamide ( $n = 5$ ) およびその溶媒 ( $n = 5$ ) の作用を検討した. なお, glibenclamide あるいはその溶媒は YM 934 投与の 15 分前にゆっくりと (約 0.5 ml/min) 静脈内投与した.

### 1-3. 気道血管透過性亢進の測定

気道組織内 Evans blue 漏出量の測定は第 2 章で記述した方法に準じて行った. 迷走神経刺激あるいは substance P 刺激 1 分後に肺動脈および大動脈を環流し, 気道組織を摘出した. 気道部位は気管, 主気管支, 中枢側および末梢側肺内気管支 (そ

れぞれ, cIPA および pIPA) の 4 部位に分けて Evans blue 漏出量を測定した.

#### 1-4. 使用薬物

K<sup>+</sup> チャンネル開口薬 YM 934 は山之内製薬 (東京) で合成したものを使用した. その他に以下の化合物を使用した: Evans blue dye, glibenclamide, substance P および urethane (Sigma Chemical Co., USA); dimethylsulfoxide (DMSO), ethanol, formamide および sodium hydroxide 溶液 (NaOH, 和光純薬工業, 大阪); atropine sulfate (田辺製薬, 大阪); propranolol hydrochloride (Imperial Chemical Industries plc, UK); 5% glucose 溶液および生理食塩水 (大塚製薬, 東京).

YM 934 は 1mg/ml になるように 10% ethanol, 10% DMSO および 80% 蒸留水に溶解したものを蒸留水で順次希釈して使用した. Glibenclamide は 0.1N NaOH に 25 mg/ml で溶解したものを 5% glucose 溶液で 5 mg/ml に希釈して使用した.

#### 1-5. 統計解析

データは平均値±標準誤差 (mean±SE) で表示した. 平均血圧は以下の式より算出し, 各群間で Student's unpaired t-test により統計的解析を行った.

$$[\text{平均血圧}] = [\text{拡張期血圧} + 0.33 \times (\text{収縮期血圧} - \text{拡張期血圧})]$$

Evans blue 漏出量は Student's unpaired t-test および Bonferroni correction 多重検定により統計的解析を行った. また, それぞれの統計的解析により得られた p 値が 0.05 以下の値を示したものを統計的に有意な差があると判断した.

## 2. 実験結果

### 2-1. 迷走神経刺激血管透過性亢進に対する K<sup>+</sup> チャンネル開口薬 YM 934 の作用

迷走神経刺激は気管, 主気管支, cIPA および pIPA のすべての気道部位において有意に血管透過性を亢進した (Figure 12). YM 934 (10 - 100 μg/kg) 静脈内投与はそれぞれの気道部位における迷走神経刺激血管透過性亢進を用量依存的に抑制し

た. このとき, YM 934 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 静脈内投与は擬刺激条件下の血漿漏出量に対して影響を及ぼさなかった (Table 4).

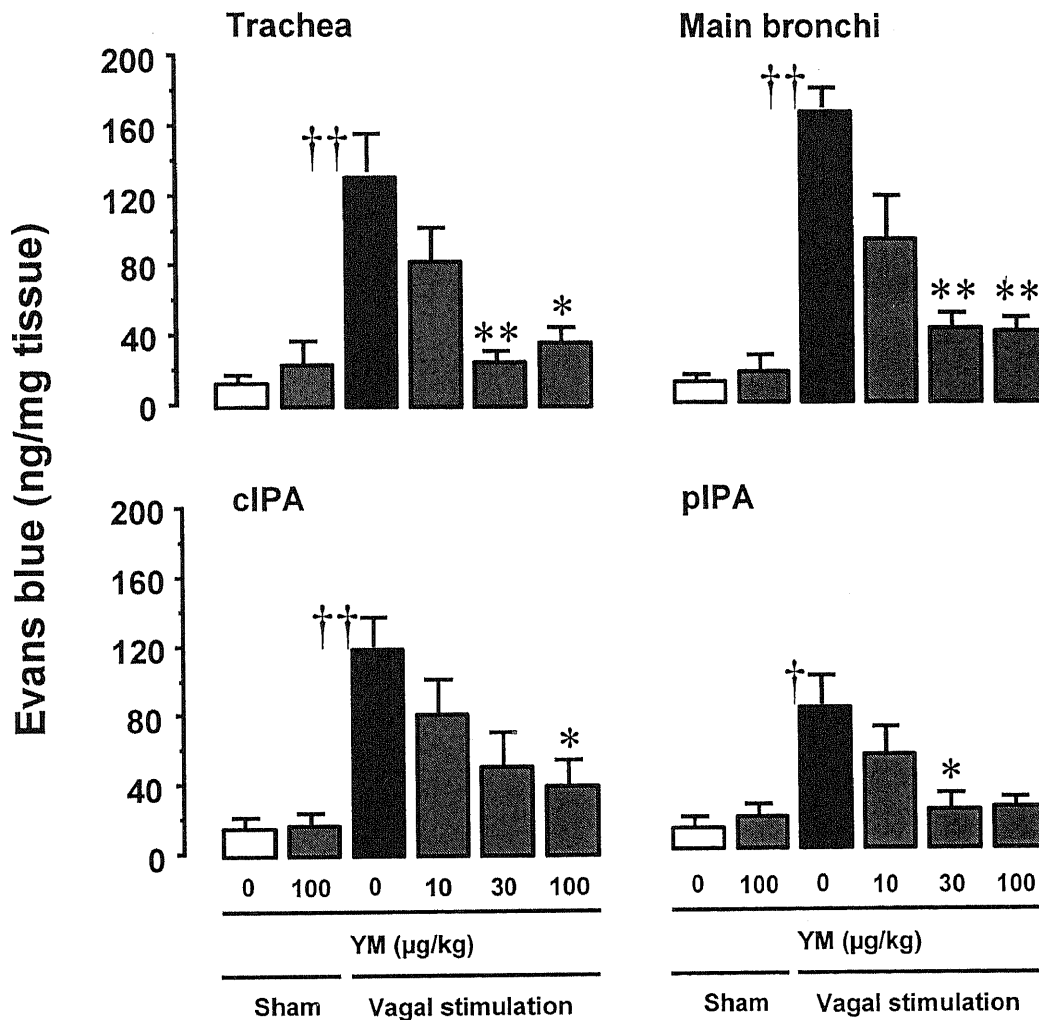


Figure 12. Effects of YM 934 (YM) on plasma leakage induced by vagal nerve stimulation in trachea, main bronchi, and central (cIPA) and peripheral intrapulmonary airways (pIPA). The open columns indicate the response to sham stimulation (sham) after injection of the vehicle for YM 934 (0) (1 ml/kg, intravenous,  $n = 5$ ). The shaded columns indicate the response to sham stimulation after YM 934 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , intravenous,  $n = 5$ ). The closed columns indicate the response to vagal nerve stimulation after injection of the vehicle for YM 934 ( $n = 6$ ). The oblique columns indicate the response to vagal nerve stimulation after intravenous injection of YM 934 (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n = 6$ ; 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n = 6$ ; 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n = 6$ ). The data are given as mean $\pm$ SE. †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$ ; significant differences between 0 values and sham stimulation (Student's unpaired t-test). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; significant difference between 0 values and vagal stimulation (Student's unpaired t-test with Bonferroni correction).

## 2-2. 外因性 substance P 誘発血管透過性亢進に対する YM 934 の作用

外因性 substance P (0.5 および 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 静脈内投与はすべての気道部位において迷走神経刺激とほぼ同程度の血管透過性亢進を示した (Figure 13). この外因性 substance P 誘発血管透過性亢進に対して YM 934 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) は抑制作用を示さなかった。

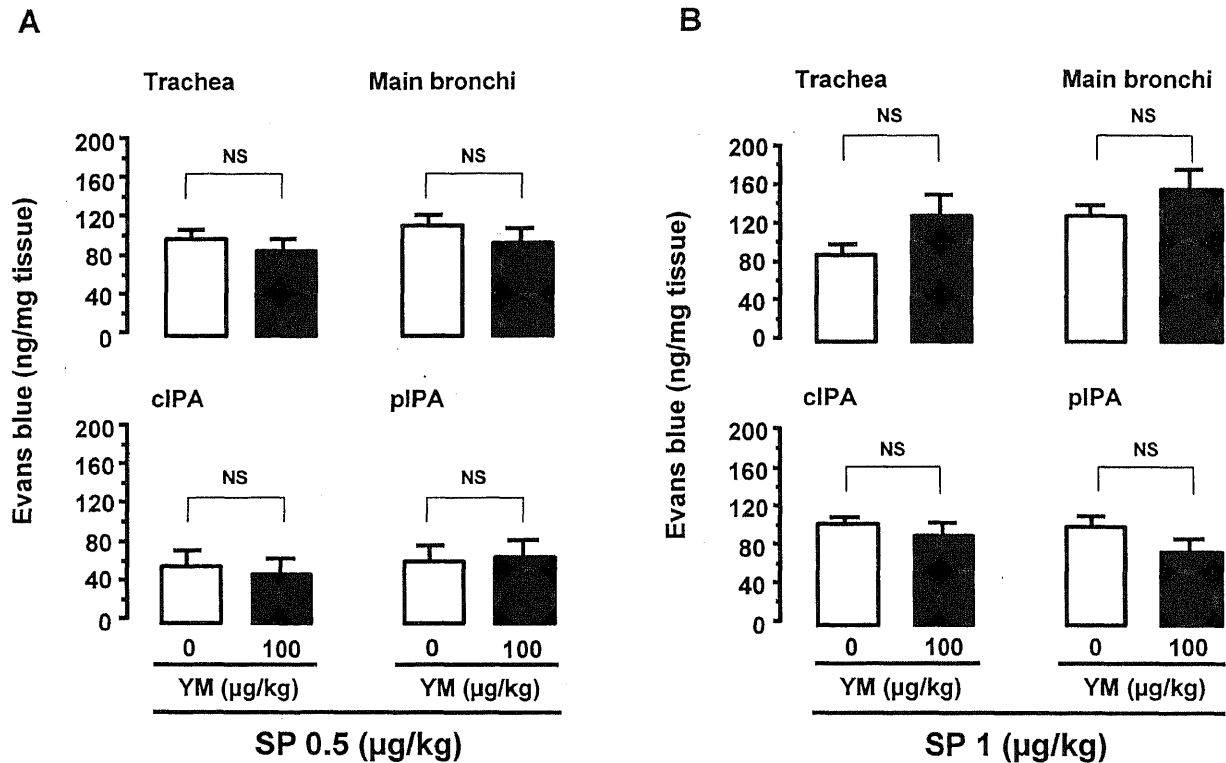


Figure 13. Effect of YM 934 (YM) on plasma leakage by exogenous substance P (SP) in trachea, main bronchi, and central (cIPA) and peripheral intrapulmonary airways (pIPA). A: administration of SP (0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , intravenous). B: administration of SP (1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , intravenous). The open columns indicate the response to SP after intravenous injection of vehicle for YM 934 (0) (1 ml/kg). The closed columns indicate the response to SP after YM 934 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). The data are given as mean $\pm$ SE of five animals. NS: not significant (Student's unpaired t-test).

## 2-3. YM 934 の抑制作用に対する ATP 感受性 $\text{K}^+$ チャンネル阻害薬 glibenclamide の作用

ATP 感受性  $\text{K}^+$  チャンネル阻害薬 glibenclamide (25 mg/kg 静脈内投与) それ自

身は擬刺激条件下の血漿漏出に対して影響を及ぼさなかった (Table 4). Glibenclamide (25 mg/kg) の静脈内投与により YM 934 (100  $\mu$ g/kg 静脈内投与) の迷走神経刺激誘発 Evans blue 漏出量増加に対する抑制作用はすべての気管部位でほぼ完全に消失した (Figure 14). このとき, glibenclamide の溶媒によっては YM 934 の作用は影響を受けなかった.

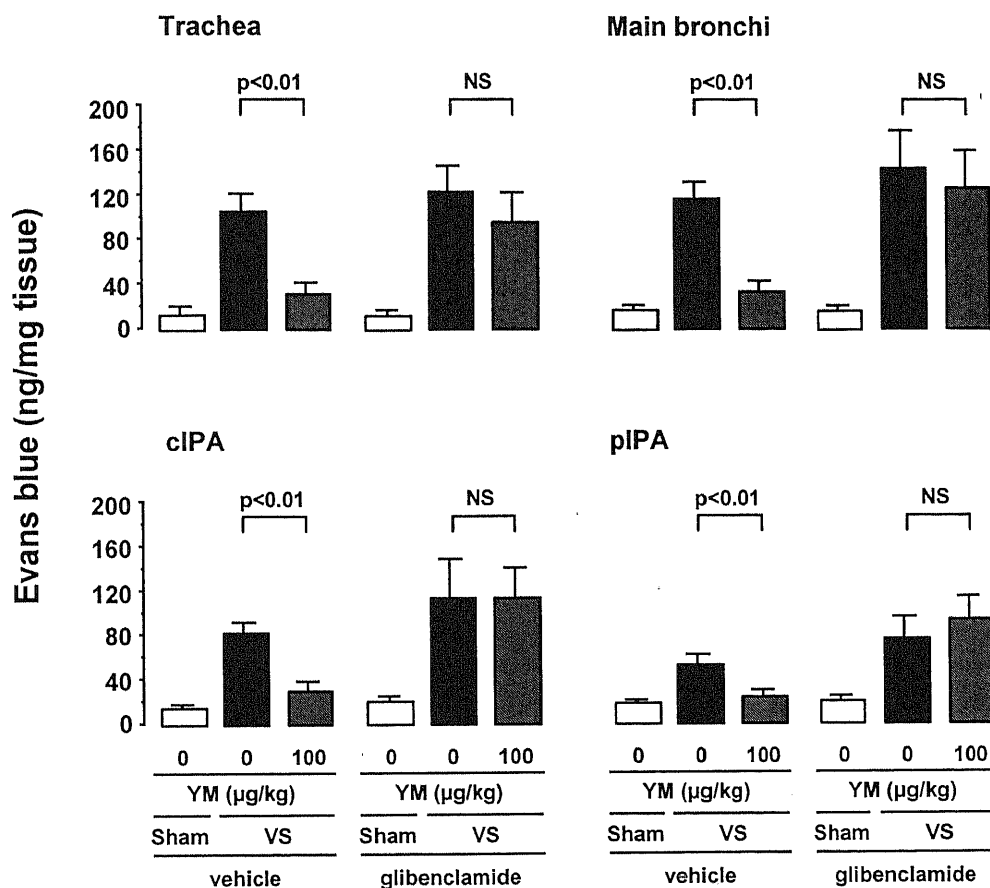


Figure 14. Histogram illustrating the degree of inhibition of vagal nerve stimulation (VS)-mediated plasma leakage by YM 934 (YM) in trachea, main bronchi, and central (cIPA) and peripheral intrapulmonary airways (pIPA) in the presence or absence of glibenclamide. The open columns indicate the response to sham stimulation (sham) after intravenous injection of vehicle for YM 934 (0) (1 ml/kg, both n = 5). The closed columns indicate the response to vagal nerve stimulation after intravenous injection of vehicle for YM 934 (vehicle for glibenclamide, n = 6; glibenclamide, n = 5). The oblique columns indicate the response to vagal nerve stimulation after YM 934 (100 mg/kg, intravenous) (vehicle for glibenclamide, n = 7; glibenclamide, n = 6). The data are given as mean  $\pm$  SE. Significant differences between means were analyzed by Student's t-test.

Table 4. Effect of YM 934 and glibenclamide on basal plasma leakage

	Plasma leakage (ng/mg tissue)			
	Trachea	Main bronchi	cIPA	pIPA
Vehicle for YM 934				
(n = 5)	13.0±3.5	12.4±2.0	16.0±5.1	12.3±4.3
YM 934 (100 µg/kg)				
(n = 5)	24.5±11.8	17.9±8.0	17.4±5.8	18.8±5.0
Vehicle for GB				
(n = 5)	13.9±6.3	17.2±3.2	15.6±1.5	18.2±1.8
GB (25 mg/kg)				
(n = 5)	13.2±3.8	15.9±3.6	20.7±3.2	20.2±3.2

Values are mean±SE. cIPA and pIPA; central and peripheral intrapulmonary airways, GB = glibenclamide. Vehicle for YM 934 consists of ethanol, DMSO and distilled water. Vehicle for GB includes glucose, NaOH and distilled water. No significant difference was observed among the values of YM 934, vehicle for YM 934, GB and vehicle for GB (Student's unpaired t-test).

#### 2-4. 血圧に対する YM 934 の作用

YM 934 は拡張期血圧および収縮期血圧を用量依存的に下降させた (Table 5, Figure 15). YM 934 各用量の最大反応は処置後 1 分以内に認められた。

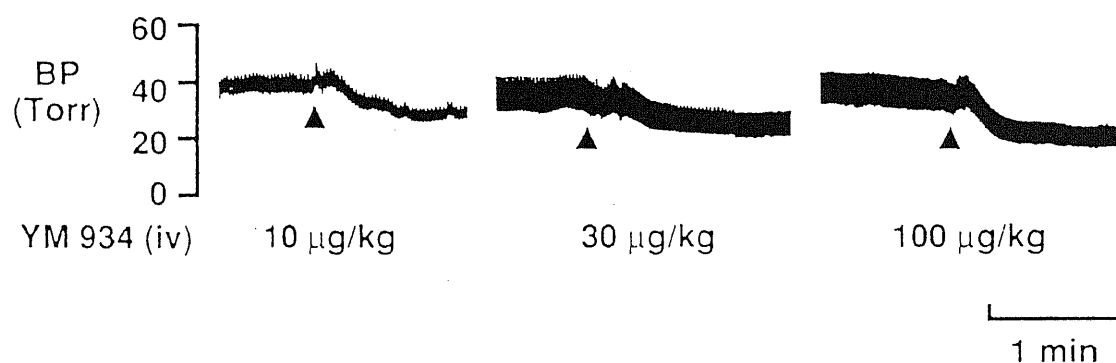


Figure 15. Recording of systemic blood pressure (BP). The time of intravenous (iv) injection with YM 934 is shown by the closed triangles.

Table 5. Mean blood pressure change by intravenous YM 934

	Preinjection	Postinjection	$\Delta$ change	
	mmHg		% change	
Vehicle				
(n = 6)	44.4 $\pm$ 5.9	47.3 $\pm$ 7.7	2.1 $\pm$ 3.3	2.1 $\pm$ 3.3
YM 934 (10 $\mu$ g/kg)				
(n = 6)	42.5 $\pm$ 4.0	31.1 $\pm$ 1.8	-11.4 $\pm$ 2.9*	-25.3 $\pm$ 5.1**
YM 934 (30 $\mu$ g/kg)				
(n = 6)	40.6 $\pm$ 3.0	26.6 $\pm$ 2.4	-13.9 $\pm$ 1.0*	-34.7 $\pm$ 2.1**
YM 934 (100 $\mu$ g/kg)				
(n = 6)	37.3 $\pm$ 1.4	23.5 $\pm$ 0.7	-13.8 $\pm$ 1.7*	-36.6 $\pm$ 3.1**

Values are mean $\pm$ SE. Vehicle for YM 934 consists of ethanol, DMSO and distiller water.

\* p<0.05, \*\* p<0.01 compared with values of vehicle for YM 934 administration (Student's unpaired t-test).

### 3. 考察

気道内血管透過性亢進は、後毛細血管静脈における内皮細胞の収縮によって内皮細胞間接合部の間隙が開くことにより引き起こされる。このことは既に病理組織学的あるいは薬理学的に裏付けられている (7)。モルモット気道における神経原性血管透過性亢進は atropine, propranolol あるいは神経節遮断薬 hexamethonium の前処置によって影響を受けないことから、知覚神経由来の tachykinin 類によって引き起こされると考えられている (100, 105)。また, capsaicin 前処置による知覚神経内の神経ペプチド枯渇 (105) あるいは tachykinin 拮抗薬投与 (5) によってこの血管透過性亢進は抑制されることが知られている。さらに, substance P はモルモット気道において最も強い血管透過性亢進作用 (106) を示し, その受容体は上気道から末梢気道のあらゆる部位の気道平滑筋および血管内皮細胞に存在している (15)。

YM 934 はモルモット気道の神経原性血管透過性亢進を抑制したが, 神経刺激と同程度の血漿漏出量を示す外因性 substance P による血管透過性亢進に対しては影響を与えなかった。YM 934 は収縮期および拡張期血圧を他の K<sup>+</sup> チャンネル開口薬 (107, 108) と同様に用量依存的に下降させた。気管支動脈の弛緩反応は血管透

過性発現部位である後毛細血管静脈での血流量を増加させ、その結果、気道組織において血管透過性が亢進する可能性がある。 実際、第 4 章で述べるように高用量 BRL 38227 (600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  静脈内投与) はそれ自身で気道組織における血管透過性を亢進させた。 しかしながら、本章で用いた YM 934 の用量は非刺激時の血漿漏出量に影響を与えず、外因性 substance P 誘発血管透過性亢進に対しても有意な影響を与えなかった。 さらに、YM 934 の抑制作用は glibenclamide 処置により完全に消失したことより、今回得られた YM 934 の神経原性血管透過性亢進に対する抑制作用は ATP 感受性  $\text{K}^+$  チャンネル開口作用によるものではあるが、血圧下降作用ならびに血流量変化に基づく間接的な作用ではないと考えられる。 したがって、YM 934 は知覚神経終末からの神経ペプチド放出を阻害することによって神経原性血管透過性亢進を抑制すると考えられる。

知覚神経からの神経ペプチド放出を調節する種々の薬物 (109) が知られている。 Opioids は中枢神経において substance P 放出を阻害するが、気道においても tachykinin 放出阻害によって神経原性血管透過性亢進を抑制する (21)。 さらに、 $\gamma$ -aminobutyric acid ( $\text{GABA}$ )<sub>B</sub> 受容体 (110)、histamine  $\text{H}_3$  受容体 (101) および neuropeptide Y 受容体 (111) は知覚神経終末に存在するが、気道においてこれら受容体の活性化は知覚神経からの神経ペプチド放出を阻害することが知られている。 このように知覚神経のシナプス前に存在する数多くの異なる受容体刺激がいずれも神経ペプチド放出を阻害することから、それらの阻害作用に共通の機序が存在しているはずである (109)。 たとえば、ラット脳切片標本において  $\mu$ -opioid,  $\text{GABA}_B$  および muscarinic  $\text{M}_2$  受容体刺激はいずれも細胞膜  $\text{K}^+$  コンダクタンスを増強させるとともに細胞膜の過分極を介して神経細胞の活性化を抑制することが報告されている (112)。 以前の研究において、われわれは抗喘息治療薬 ibudilast が ATP 感受性  $\text{K}^+$  チャンネル開口を介して知覚神経終末からの神経ペプチド放出を阻害し、神経原性血管透過性亢進を抑制することを報告した (113)。 したがって、 $\text{K}^+$  チャンネルが様々なシナプス前受容体の活性化によって惹起される神経ペプチド放出阻害に共通の機序として存在する可能性が考えられる。

$\text{K}^+$  チャンネル開口薬は  $\text{K}^+$  チャンネル開口作用による細胞膜の過分極 (103) を作用機序とする平滑筋弛緩薬である。  $\text{K}^+$  チャンネル開口薬 cromakalim は *in vivo* (24) および *in vitro* (25) においてモルモット気道平滑筋を弛緩させる。 また、ラセミ体 cromakalim の活性体である BRL 38227 もまたヒト気道平滑筋標本を弛

緩させることが知られている (26). 神経原性気管支収縮反応において, cromakalim はコリン作動性収縮反応および eNANC 性収縮反応の両収縮機序を抑制することが報告されているが, この抑制作用は気管支平滑筋に対する直接弛緩作用だけではなく上向性コリン作動性神経からの ACh 放出抑制ならびに eNANC 性神経からの神経ペプチド放出抑制によって引き起こされている (27). 第 1 章で述べたように, 気管支喘息の動物モデルである慢性的抗原暴露モルモットは気道組織においてコリン作動性および eNANC 性神経の反応性が亢進しており, 気管支喘息における神経原性気道反応の重要性が示唆される. 本章の結果より, ATP 感受性  $K^+$  チャンネル開口薬は知覚神経からの神経ペプチド放出を阻害することで神経原性気道炎症を抑制することが示された.

#### 4. 小活

- 1) 本研究において,  $K^+$  チャンネル開口薬 YM 934 はモルモット気道における神経原性血管透過性亢進を抑制した.
- 2) 外因性 substance P 誘発血管透過性亢進に対しては抑制作用を示さなかったことより,  $K^+$  チャンネル開口薬は知覚神経終末からの substance P をはじめとする神経ペプチドの放出を阻害することで神経原性気道炎症を抑制することが示唆された.
- 3) 従って,  $K^+$  チャンネル開口薬のような知覚神経機能を調節する薬物は, 神経原性気道炎症を制御するのに有用であると思われる.

## 第 4 章 抗原誘発気道炎症における $K_{ATP}$ チャンネルの関与

免疫グロブリン、特に IgE を介したアレルギー性気道反応は、気管支喘息において重要な病因の一つと考えられる (1)。なかでも、抗原吸入によって肥満細胞から遊離する histamine や  $LTD_4$  といった炎症性伝達物質 (114) は、気管支収縮反応ならびに血管透過性亢進をはじめとする気道炎症を誘発する。気管支喘息の気道炎症においては、第 3 章で示したように知覚神経を介した神経原性炎症が存在するが、従来から知られている抗原により誘発されるアレルギー性気道炎症反応も重要である。このアレルギー性反応は主に肥満細胞からの histamine 遊離および  $LTD_4$  遊離を介して誘発されるが、この抗原誘発気道炎症に対する  $K^+$  チャンネル開口薬の作用について明確な報告はない。本章において、抗原誘発気道炎症反応に対する  $K^+$  チャンネル開口薬の作用を検討することで、気道炎症において ATP 感受性  $K^+$  チャンネルがどのように関与しているか解明を試みた。

### 1. 実験方法および使用薬物

#### 1-1. 使用動物

実験には能動感作した Dunkin-Hartley 系雄性モルモット (船橋実験動物, 仙台, 体重 200 ~ 250 g,  $n = 77$ ) を用いた。抗原感作は 0.5 ml 中に 10  $\mu$ g ovalbumin (OA) および 100 mg  $Al(OH)_3$  を含む生理食塩水溶液を 4 週齢モルモットの腹部に 2 箇所皮内投与することにより行い、抗原感作 3 週間後に実験に供した (40)。

#### 1-2. 抗原誘発気道炎症実験プロトコール

動物は urethane (2 g/kg) 腹腔内投与により麻酔後、体温を約 37°C に維持するために保温パッド上に置き、血圧測定のために左頸動脈ならびに薬物投与のために両頸静脈をそれぞれ露出させた。左頸動脈にはポリエチレンカニューレ (PE-50) を挿入して、接続した圧トランスデューサーにより血圧を測定した。実験の 30 分前に atropine (1 mg/kg) および propranolol (1 mg/kg) を静脈内投与して muscarinic および  $\beta_2$ -adrenergic 受容体反応を遮断した。上気道部に気管カニューレを挿入し、

接続した人工呼吸器 (Model SN-480-7, シナノ製作所, 東京) により 1 ml/100 g の 1 回換気量を 60 回/min の条件下で人工換気した。

OA (3 mg/ml) あるいは生理食塩水吸入暴露は超音波ネブライザー (NE-U11B, オムロン, 東京) を用いて霧化 (平均粒子径 5.0  $\mu\text{m}$ ) し, 人工呼吸器の吸気側を介して気管カニューレより 30 秒間行った。本吸入暴露実験においては以下の 5 群を用いた: 第 I 群, DMSO (BRL 38227 溶媒, 0.1 ml/kg 静脈内投与) 前処置および生理食塩水吸入暴露 (n = 6); 第 II 群, BRL 38227 (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  静脈内投与) 前処置および生理食塩水吸入暴露 (n = 6); 第 III 群, DMSO 前処置および OA 吸入暴露 (n = 6); 第 IV 群, BRL 38227 (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  静脈内投与) 前処置および OA 吸入暴露 (n = 6); 第 V 群, BRL 38227 (600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  静脈内投与) 前処置および OA 吸入暴露 (n = 5)。DMSO あるいは BRL 38227 は Evans blue (30 mg/kg) 静脈内投与の 1 分後に投与し, その 1 分後に OA あるいは生理食塩水を吸入暴露した。吸入暴露後 5 分間の肺抵抗を測定すると共に, 5 分後の気管組織への Evans blue 漏出量を測定した。なお, 測定方法は第 2 章で記述した方法に準じて行った。ただし, Evans blue 漏出量の測定は気管, 主気管支, 中枢側肺内気道 (cIPA) および末梢側肺内気道 (pIPA) の 4 部位を用いて実施した。

### 1-3. Histamine あるいは LTD<sub>4</sub> 誘発気道炎症実験プロトコール

実験は抗原誘発気道炎症実験に準じた方法に従い, OA 能動感作モルモットを用いて行った。Histamine (2 mg/ml), LTD<sub>4</sub> (5 mg/ml) および生理食塩水は超音波ネブライザーを用いて霧化し, 人工呼吸器の吸気側を介して気管カニューレより 1 分間行った。本実験において以下の 6 群を用いた: 第 I 群, DMSO (0.1 ml/kg 静脈内投与) 前処置および生理食塩水 (histamine 溶媒) 吸入暴露 (n = 6); 第 II 群, DMSO 前処置および histamine 吸入暴露 (n = 6); 第 III 群, BRL 38227 (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  静脈内投与) 前処置および histamine 吸入暴露 (n = 6); 第 IV 群, DMSO 前処置および生理食塩水 (LTD<sub>4</sub> 溶媒) 吸入暴露 (n = 6); 第 V 群, DMSO 前処置および LTD<sub>4</sub> 吸入暴露 (n = 6); 第 VI 群, BRL 38227 (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 前処置および LTD<sub>4</sub> 吸入暴露 (n = 6)。Histamine および LTD<sub>4</sub> 濃度は OA 吸入暴露と同程度の肺抵抗上昇ならびに Evans blue 漏出亢進が得られる濃度を用いた。

#### 1-4. 抗原誘発 histamine 遊離量の測定

OA 能動感作したモルモット 12 匹から摘出した厚さ 1 ~ 2 mm の肺組織標本を用いた。肺切片 (100 mg) は 37°C に保温した 1 ml の 10 mM HEPES バッファーを含む Tyrode's 液中で 15 分間安定化させた後に OA (0.03 - 1 µg/ml) あるいは生理食塩水で 30 分間暴露した。

Histamine 量は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて定量した (115)。それぞれのサンプルから採取した 0.5 ml の上清あるいは肺切片サンプルに 25 µl の 60% perchloric acid を添加した。肺切片サンプルはポリトロン・ホモジナイザー (Kinematica, Switzerland, 15 秒間) を用いて粉碎した後に、15 分間遠心 (10,000× g) して上清を得た。50 µl の上清を HPLC 装置に注入して histamine を cation-exchanger (TSK SP-2SW, 6 mm intradermally × 15 cm, 東ソー, 東京) により分離した後にアルカリ条件下で *o*-phthalaldehyde により誘導し、蛍光測定装置 (F-1100, 日立, 東京) を用いて 360 ~ 450 nm の波長範囲で蛍光強度を測定した。Histamine 遊離量は肺組織中 histamine 総含量に対する割合 (%) で表示した。このとき、肺組織中 histamine 総含量は反応上清中 histamine 量と肺切片サンプル中 histamine 量の和によって算出した。

#### 1-5. 使用薬物

ATP 感受性 K<sup>+</sup> チャンネル開口薬 BRL 38227 は SmithKline Beecham 製薬 (東京) より譲渡されたものを使用した。他に以下の薬物を使用した: Ovalbumin (OA, grade V), urethane, histamine, dimethylsulfoxide (DMSO), formamide および Evans blue dye (Sigma Chemical Co., USA); atropine sulfate (田辺製薬, 大阪); propranolol hydrochloride (Imperial Chemical Industries plc, UK); leukotriene D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>, Cayman Chemical Co., USA)。

#### 1-6. 統計解析

データは平均値±標準誤差 (mean±SE) で表示した。平均血圧は記録紙上の血圧変化から計測した拡張期血圧および収縮期血圧より、以下の式を用いて算出した。

$$[\text{平均血圧}] = [\text{拡張期血圧} + 0.33 \times (\text{収縮期血圧} - \text{拡張期血圧})]$$

肺抵抗および OA 誘発 histamine 遊離量は二元配置分散分析および Student's unpaired t-test により, Evans blue 漏出量は Student's unpaired t-test により統計的解析を行った。また, それぞれの統計的解析により得られて p 値が 0.05 以下の値を示したものを統計的に有意な差があると判断した。

## 2. 実験結果

### 2-1. 気道収縮反応に対する K<sup>+</sup> チャンネル開口薬 BRL 38227 の作用

OA 吸入暴露は有意に肺抵抗を上昇し, その上昇は吸入暴露 3 分後に最大となった。BRL 38227 (200 μg/kg) 静脈内投与はこの OA 誘発肺抵抗上昇を有意に抑制した (Figure 16)。また, histamine および LTD<sub>4</sub> 吸入暴露によっても抗原吸入暴露と同様に有意な肺抵抗の上昇を示した。Histamine および LTD<sub>4</sub> それぞれの肺抵抗上昇は暴露後 5 分以内に最大となった。BRL 38227 は histamine 誘発肺抵抗上昇に対して有意な抑制作用を示した (Figure 17)。また, 同用量の BRL 38227 は LTD<sub>4</sub> 誘発肺抵抗上昇に対して抑制傾向を示すに留まった (Figure 18)。

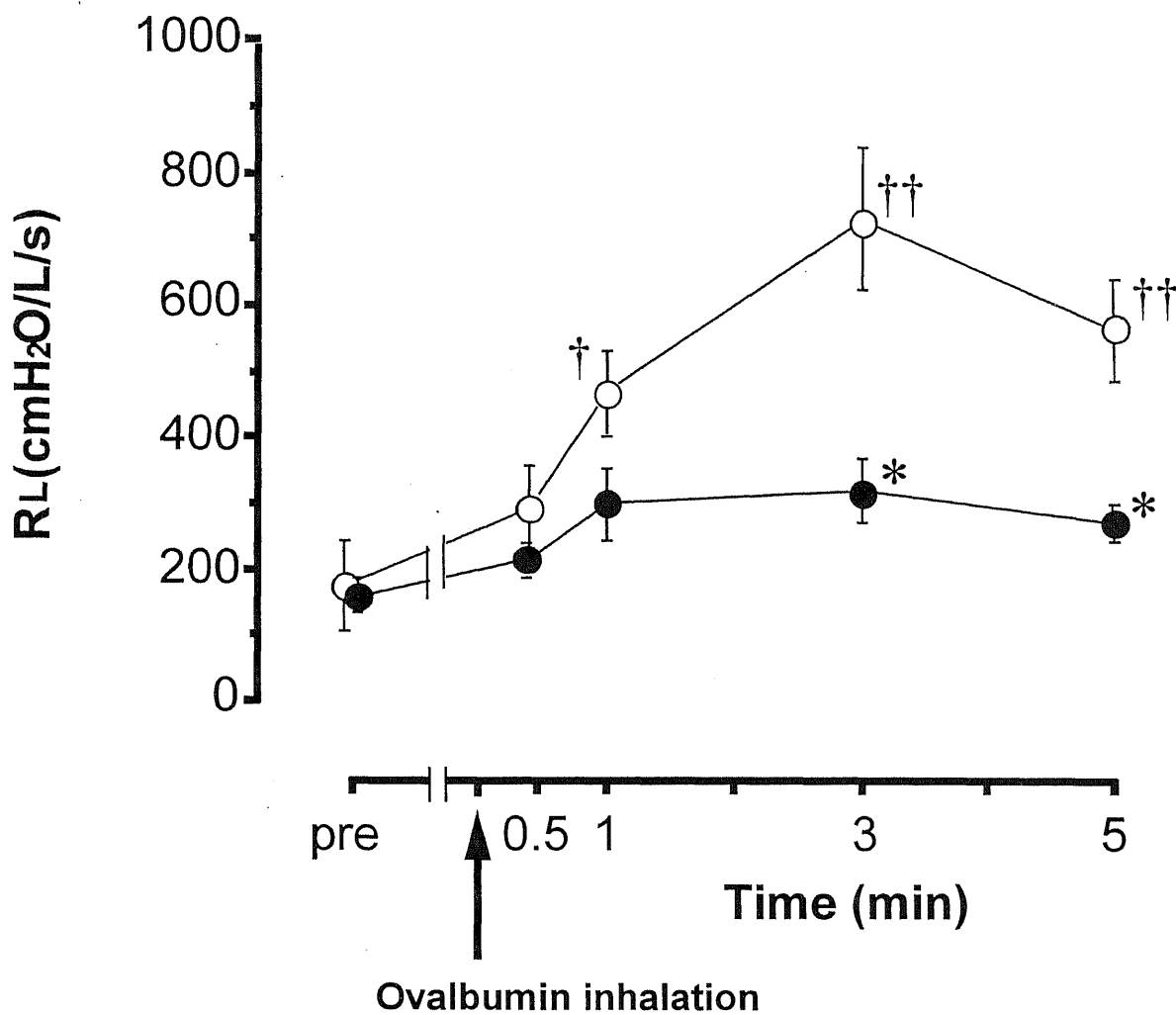


Figure 16. Inhibition of ovalbumin (OA)-induced bronchoconstriction by BRL 38227 (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , given intravenously). Open circles indicate the values after DMSO (vehicle for BRL 38227), and closed circles indicate the values after BRL 38227. Each point represents mean $\pm$ SE of six sensitized animals. There is a significant difference between two time-response curves (two-way ANOVA,  $p < 0.01$ ). Significant differences from saline (vehicle for OA) inhalation values (pre) are indicated by  $\dagger$   $p < 0.05$  and  $\dagger\dagger$   $p < 0.01$  (Student's unpaired t-test). \*  $p < 0.05$ ; significant difference compared with the values of DMSO-pretreated animals (Student's unpaired t-test).

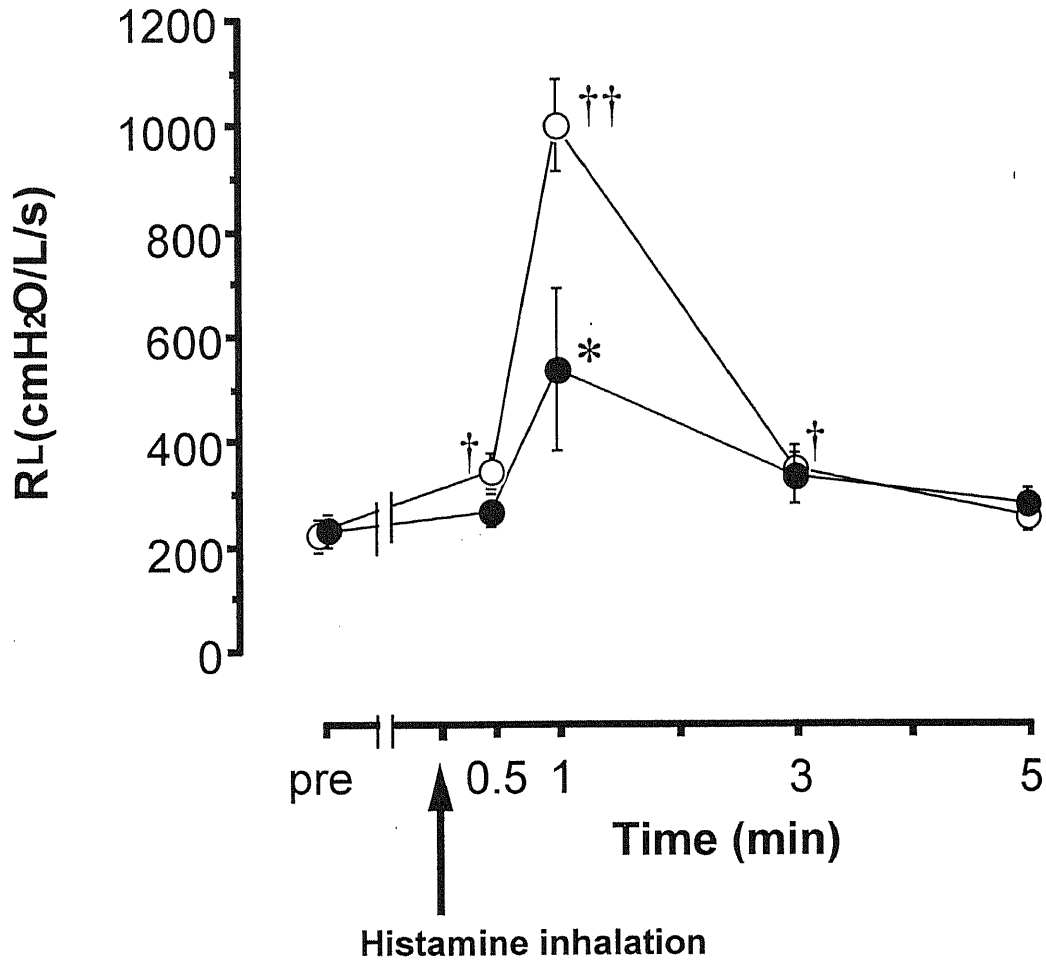


Figure 17. Inhibition of histamine-induced bronchoconstriction by BRL 38227 (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , given intravenously). Open circles indicate the values after DMSO (vehicle for BRL 38227), and closed circles indicate the values after BRL 38227. Each point represents mean $\pm$ SE of six animals. There is a significant difference between the two time-response curves (two-way ANOVA,  $p < 0.05$ ). Significant differences from saline (vehicle for histamine) inhalation values (pre) are indicated by  $\dagger$   $p < 0.05$  and  $\dagger\dagger$   $p < 0.01$  (Student's unpaired t-test). \*  $p < 0.05$ ; significant difference compared with the values of DMSO-pretreated animals (Student's unpaired t-test).

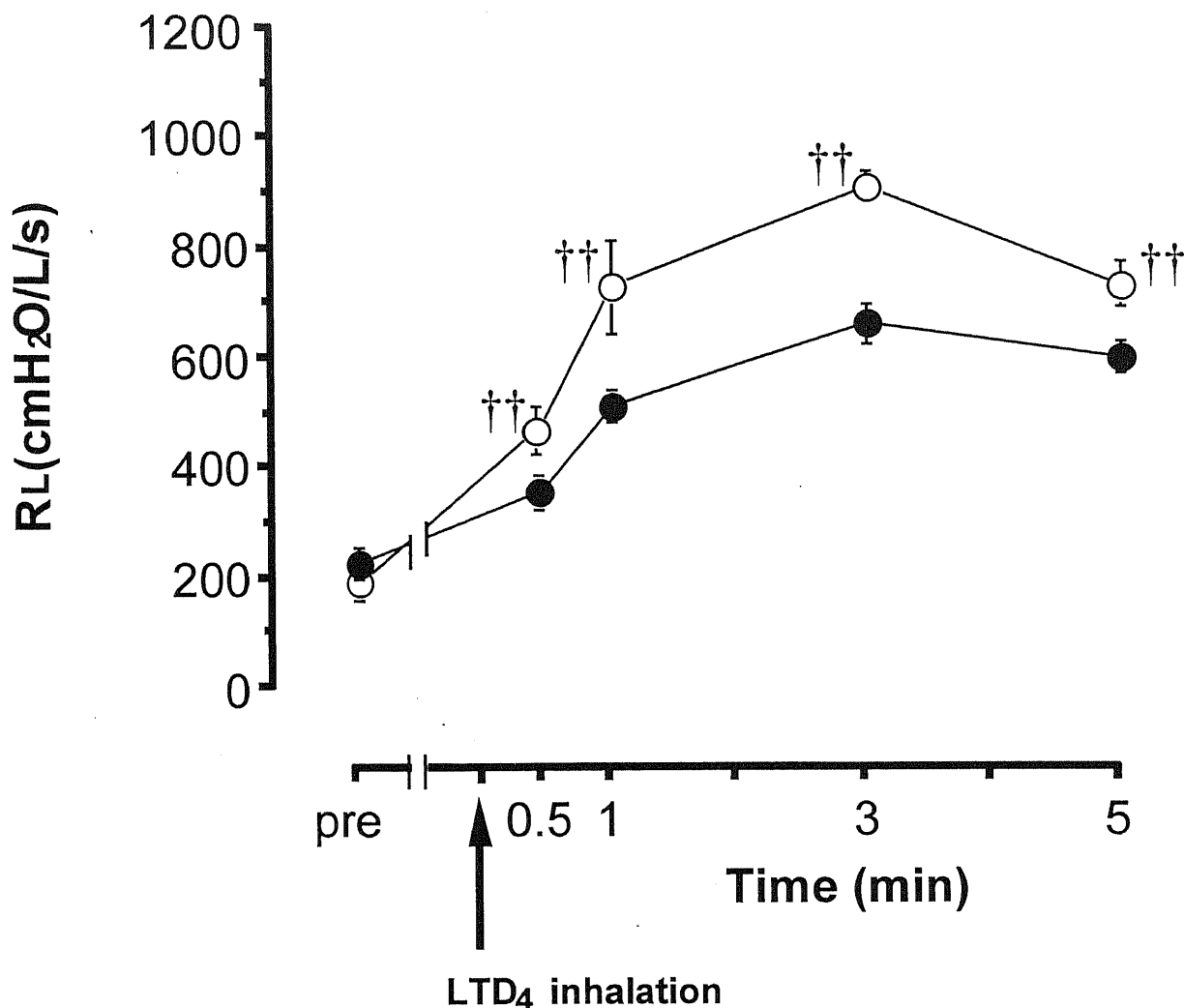


Figure 18. Effect of BRL 38227 on LTD<sub>4</sub>-induced bronchoconstriction after DMSO (vehicle for BRL 38227, open circles) or BRL 38227 (200 µg/kg, given intravenously, closed circles). Each point represents mean±SE of six animals. There is no significant difference between the two time-response curves (two-way ANOVA,  $p < 0.01$ ). Significant differences from saline (vehicle for LTD<sub>4</sub>) inhalation values (pre) are indicated by ††  $p < 0.01$  (Student's unpaired t-test).

## 2-2. 血管透過性亢進に対する BRL 38227 の作用

OA 吸入暴露は生理食塩水吸入暴露に比して、気管、主気管支、cIPA および pIPA の 4 部位の全てにおいて有意な Evans blue 漏出量増加を示した。BRL 38227 (200 µg/kg) 静脈内投与それ自身では生理食塩水吸入暴露時の Evans blue 漏出量に影響を与えなかったが、OA 誘発 Evans blue 漏出量増加を気道、主気管支において

有意に抑制した (Figure 19). しかしながら, cIPA および pIPA における Evans blue 漏出量増加に対しては有意な抑制を示さなかった (Figure 19).

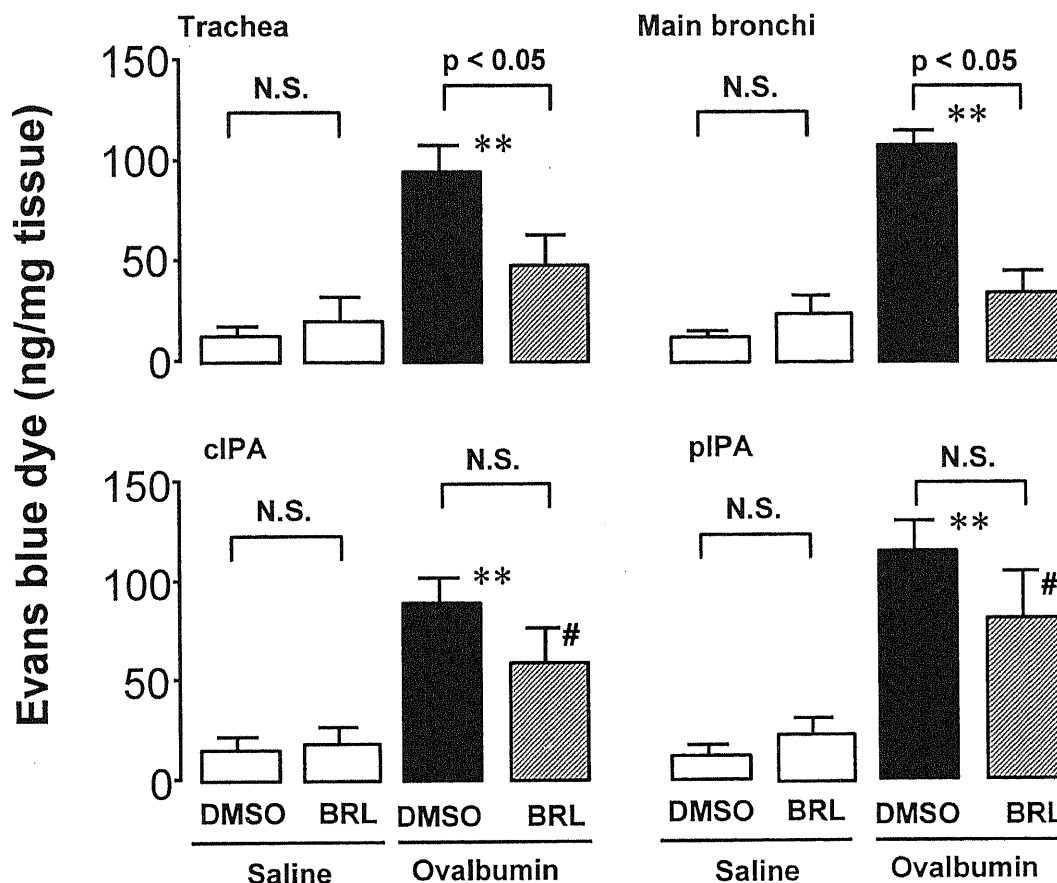


Figure 19. Effect of intravenous administration of BRL 38227 (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) on ovalbumin-induced airway microvascular leakage in trachea, main bronchi, and central (cIPA) and peripheral intrapulmonary airways (pIPA). Responses to saline and ovalbumin inhalation after DMSO. The data are given by mean $\pm$ SE of six sensitized animals. Differences between means were analyzed by Student's unpaired t-test; N.S., no significant difference. \*\*  $p < 0.01$ ; significant difference compared with that of saline inhalation after DMSO values. #  $p < 0.05$ ; significant difference compared with that of saline inhalation after BRL values.

高用量の BRL 38227 (600  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 静脈内投与は生理食塩水吸入暴露時の Evans blue 漏出に対して有意な増強作用を示した. このときの Evans blue 漏出量変化は気道で  $11.2 \pm 3.6$  v.s.  $58.0 \pm 7.6$  ( $p < 0.05$ ), 主気管支で  $19.2 \pm 5.2$  v.s.  $116.6 \pm 13.7$  ( $p < 0.01$ ), cIPA で  $15.1 \pm 2.6$  v.s.  $84.6 \pm 26.0$  ( $p < 0.01$ ) および pIPA で  $17.7 \pm 4.6$  v.s.

100.0±29.8 (p<0.05) ng/mg tissue であった。

Histamine 吸入暴露は生理食塩水吸入暴露に比して、cIPA を除くすべての気管部位で有意な Evans blue 漏出量増加を示した。この histamine 誘発 Evans blue 漏出量増加に対して BRL 38227 (200 µg/kg) 静脈内投与は主気管支においてのみ有意な抑制を示した (Figure 20)。LTD<sub>4</sub> 吸入暴露も histamine と同様に有意な Evans blue 漏出量の増加を示した。この Evans blue 漏出量増加に対して BRL 38227 (200 µg/kg) 静脈内投与は気道、主気管支および pIPA においては有意な抑制作用を示したが、cIPA においては抑制傾向を示すに留まった (Figure 21)。

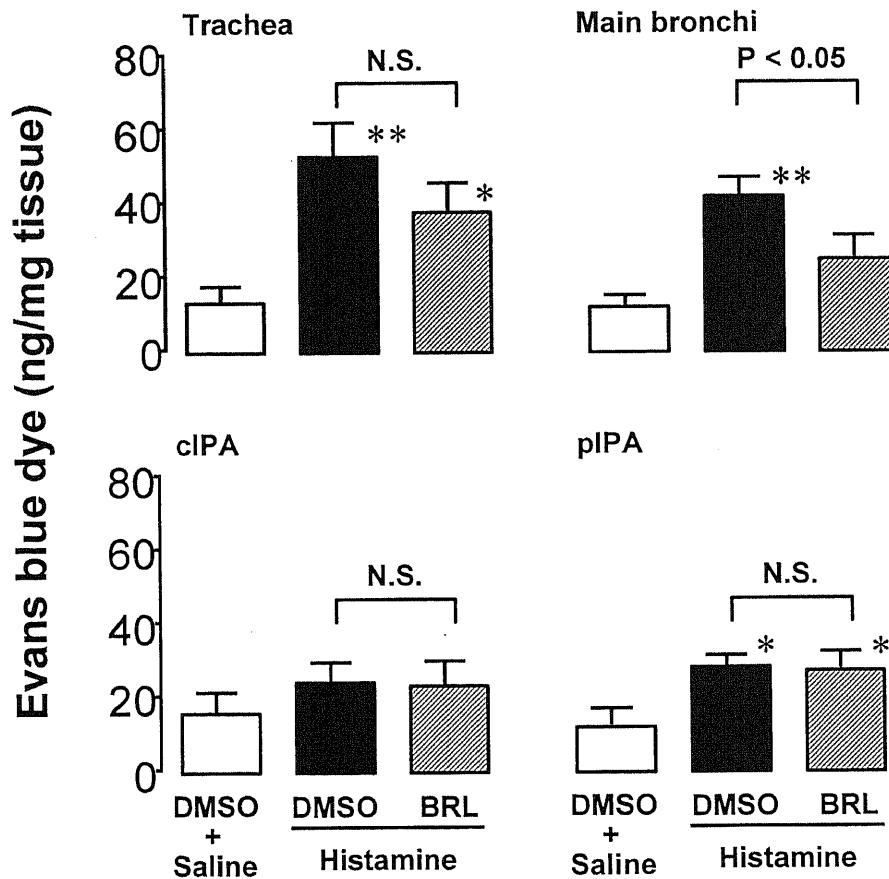


Figure 20. Effect of BRL 38227 (200 µg/kg, given intravenously) on histamine-induced microvascular leakage in trachea, main bronchi, and central (cIPA) and peripheral intrapulmonary airways (pIPA). Each bar indicates mean±SE of six animals. Abbreviations are the same as in figure 15. Differences between means were analyzed by Student's unpaired t-test; N.S., no significant difference. \* p<0.05, \*\* p<0.01; significant difference compared with the saline inhalation after DMSO.

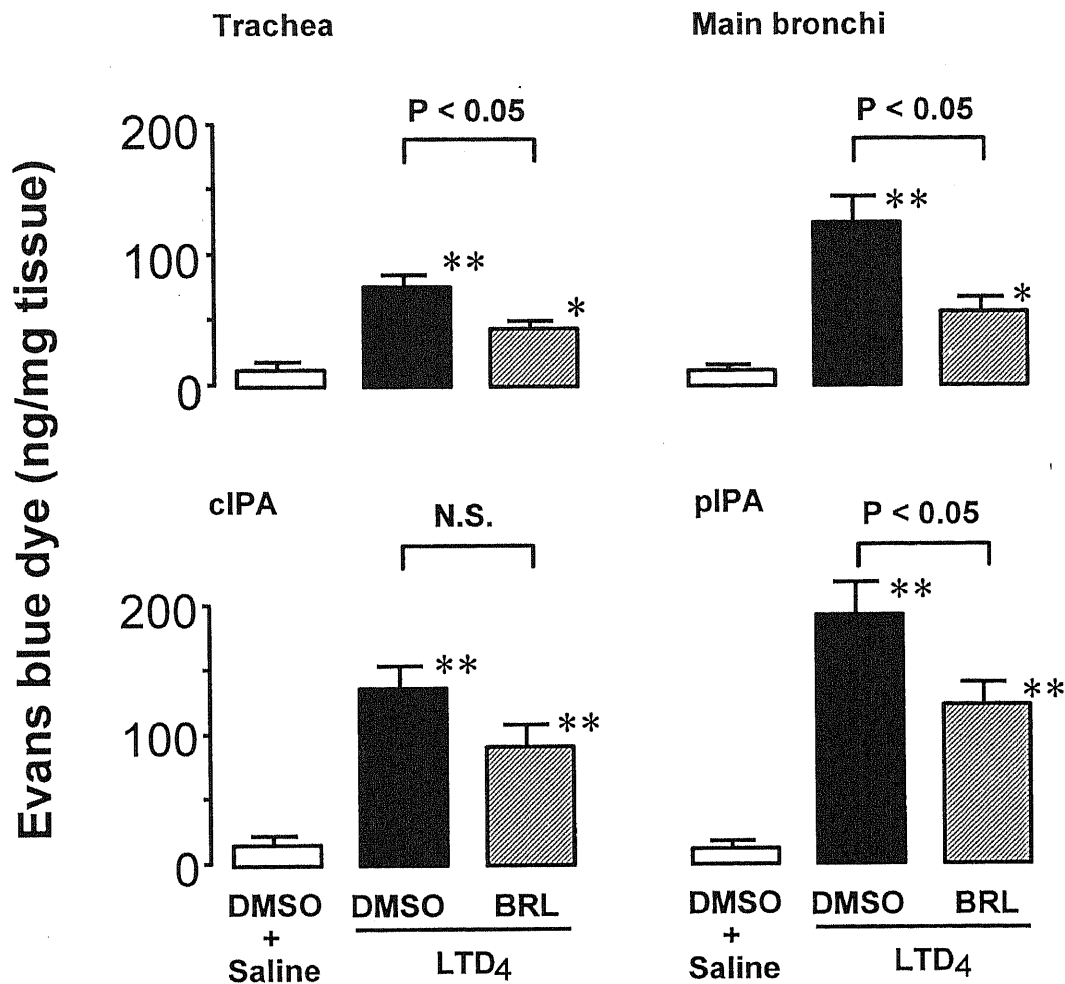


Figure 21. Inhibition of LTD<sub>4</sub>-induced airway microvascular leakage by DMSO (vehicle for BRL 38227) or BRL 38227 (200 µg/kg, given intravenously). Each bar indicates mean±SE of six animals. Differences between means were analyzed by Student's unpaired t-test; N.S., no significant difference. \* p<0.05, \*\* p<0.01; significant difference compared with the saline inhalation after DMSO values.

### 2-3. 血圧に対する BRL 38227 の作用

BRL 38227 (200 および 600 µg/kg) 静脈内投与は投与後 1 分以内にその最大反応を示した。 BRL 38227 はほぼ用量に依存した血圧下降作用を示し、その血圧下降作用は溶媒 (DMSO, 0.1 ml/kg) 投与群に比して有意に低値を示していた (Table 6).

Table 6. Mean blood pressure changes after DMSO or BRL 38227 in sensitized guinea pigs.

	n	Preinjection	Postinjection
		(mmHg)	
DMSO			
0.1 ml/kg, iv	6	38.9±3.1	41.2±1.9
BRL 38227			
200 µg/kg, iv	6	40.0±2.6	30.4±1.9†
600 µg/kg, iv	5	41.0±2.9	25.8±1.8†

Definition of abbreviation: n = number of animals; iv = intravenous injection; DMSO = dimethylsulfoxide. Values are presented as mean±SE. † p<0.05; significant difference compared with preinjection value by Student's unpaired t-test.

#### 2-4. 肺組織標本における抗原誘発 histamine 遊離に対する BRL 38227 の作用

OA 能動感作モルモットの肺組織標本において OA (30 ~ 1,000 µg/ml) は濃度依存的に histamine 遊離作用を示した。 BRL 38227 ( $10^{-5}$  および  $10^{-4}$  M) はこの histamine 遊離に対して影響を与えなかった (Figure 22).

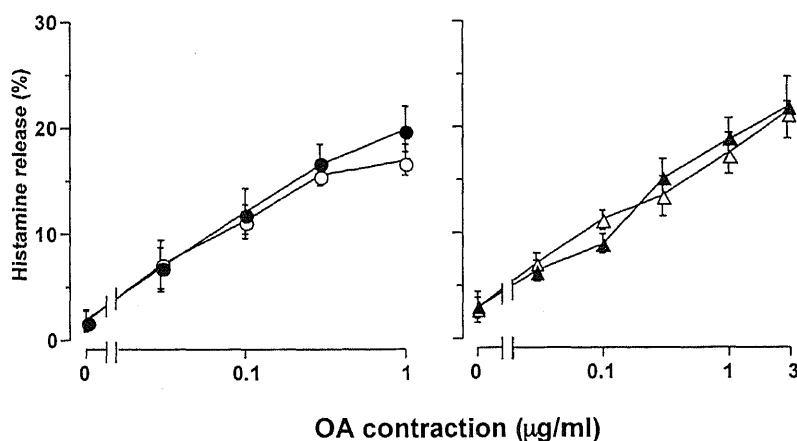


Figure 22. Effect of DMSO (vehicle for BRL 38227, open circles and open triangles) or BRL 38227 ( $10^{-5}$  M, closed circles;  $10^{-4}$  M, closed triangles) on ovalbumin-induced histamine release from chopped lung tissues. Each point represents mean±SE of six sensitized animals. There is no significant difference between two concentration-response curves (two-way ANOVA).

### 3. 考察

本章では  $K^+$  チャンネル開口薬 BRL 38227 を用いて OA 抗原能動感作モルモットの抗原誘発肺抵抗上昇および抗原誘発気道血管透過性の亢進における  $K^+$  チャンネルの関与を検討した。これらの反応を惹起する化学伝達物質としては肥満細胞脱顆粒により放出される histamine や  $LTD_4$  がよく知られている (116)。特に, histamine はアレルギー性の即時型気道収縮反応における主要な刺激物質であり, histamine  $H_1$  拮抗薬を用いた研究が古くから数多く行われている (116, 117)。

OA 感作モルモットの抗原誘発肺抵抗上昇反応に対して BRL 38227 は *in vivo* で抑制作用を示したが, 摘出肺組織標本からの抗原刺激による histamine 遊離に対しては抑制作用を示さなかった。また, Black および Barnes (118) も  $K^+$  チャンネル開口薬が肥満細胞のような非興奮性細胞の活性化ならびに脱顆粒を阻害しないことを報告している。一方, BRL 38227 は外因性の histamine による肺抵抗上昇を抑制した。また, *in vitro* においては  $K^+$  チャンネル開口薬 BRL 34915 は histamine 刺激による気道平滑筋収縮反応を濃度依存的に抑制するという報告 (24) もある。したがって, BRL 38227 が示した OA 感作モルモットにおける肺抵抗上昇に対する抑制作用は, 肥満細胞の脱顆粒抑制によるものではなく, 気道平滑筋に対する直接作用と考えられる。

BRL 38227 は抗原誘発および histamine 誘発気道収縮反応に対する顕著な抑制作用を示したのに対して,  $LTD_4$  誘発肺抵抗上昇に対しては著明な抑制作用を示さなかった。このような収縮物質の違いによる  $K^+$  チャンネル開口薬の作用の違いは他にも知られている。たとえば,  $K^+$  チャンネル開口薬 cromakalim は ACh 誘発気道収縮反応は抑制するが, substance P 誘発気道収縮反応に対しては抑制作用を示さないことが報告されている (27)。このように, 収縮薬の違いによって  $K^+$  チャンネル開口薬の抑制作用が異なる理由として以下に示すような可能性が考えられる。

① ATP 感受性  $K^+$  チャンネルの開口が  $K^+$  チャンネル開口薬による平滑筋弛緩作用の主な機序であるが, 収縮物質の違いによって誘発されるそれぞれの平滑筋脱分極の強さが異なるために  $K^+$  チャンネル開口薬の作用にも違いが出てくる。② また, 種々の収縮物質が収縮反応を惹起するためには細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇が必要となるが, 各収縮物質によってその  $Ca^{2+}$  の由来等が異なることが知られている (103)。

肺抵抗上昇とならび気道における血管透過性の亢進も喘息病態形成の重要な因子である。BRL 38227 は OA 感作モルモットの抗原誘発気道血管透過性亢進に対し

て、気道の気道の部位により若干の差違はあるものの、抑制作用を示した。K<sup>+</sup> チャンネル開口薬は血管拡張薬 (102, 103, 119) として知られているため、K<sup>+</sup> チャンネル開口薬の血管透過性亢進に対する作用を論じる場合、この血管拡張作用を介した血流量の変化による血管透過性に対する影響を考慮に入れる必要がある。すなわち、K<sup>+</sup> チャンネル開口薬投与による気道壁内血流量の増加は血管透過性亢進部位における血液供給量ならびに供給領域を増加させる可能性が考えられる。実際、BRL 38227 は 200 および 600 μg/kg 静脈内投与で明らかな血圧降下作用を示し、600 μg/kg の静脈内投与はすべての気道組織においてそれ自身で有意に色素漏出量を増加した。しかしながら、200 μg/kg の BRL 38227 は有意な血管透過性亢進を惹起せず、200 μg/kg 以下の用量では血圧降下作用は有するものの、血管透過性亢進に対しては影響を及ぼさないことが示唆された。従って、今回得られた BRL 38227 の抗原誘発血管透過性亢進に対する抑制作用は血管拡張作用に由来した二次的な作用ではないと考えられる。

これまでに気道血管透過性亢進の部位が後毛細血管静脈にあることが病理生理学的あるいは薬理学的研究により解明されている (120)。事実、幾つかの抗喘息治療薬 (121, 122) が後毛細血管静脈における内皮細胞の収縮反応を直接阻害することによって気道血管透過性亢進を抑制することが報告されている。本章において肺抵抗上昇抑制と同様に BRL 38227 は抗原誘発気道血管透過性亢進を機能的に抑制することを示した。すなわち、BRL 38227 は肥満細胞脱顆粒に影響しないが、LTD<sub>4</sub> 誘発血管透過性亢進に対しては cIPA を除くほぼすべての気道組織において、また histamine 誘発血管透過性亢進に対しては主気管支においてそれぞれ抑制作用を示した。BRL 38227 は抗原誘発血管透過性亢進に対して末梢気道部位 (cIPA および pIPA) においては抑制作用を示さなかったが、その理由は今回の結果からは明らかにできない。しかしながら、histamine H<sub>1</sub> 受容体拮抗薬あるいは LTs 受容体拮抗薬を用いた検討でも末梢気道部位では抗原誘発血管透過性亢進が抑制されないことが報告されている (13)。恐らく、末梢気道組織では histamine あるいは LTD<sub>4</sub> 以外の伝達物質が抗原誘発血管透過性亢進に関与していると考えられ、K<sup>+</sup> チャンネル開口薬の各伝達物質に対する活性の違いによって histamine および LTD<sub>4</sub> 以外の伝達物質による血管透過性亢進に対しては抑制作用を示さなかったものと考えられる。このような K<sup>+</sup> チャンネル開口薬の刺激物質依存した抑制活性の違いの存在はタバコ煙誘発気道血管透過性亢進に対しては抑制作用を示す (123) が、血小板活性化

因子 (PAF) 誘発血管透過性亢進に対しては影響しない (118) ことから支持される。

#### 4. 小括

- 1)  $K^+$  チャンネル開口薬 BRL 38227 は抗原誘発肺抵抗上昇ならびに気道血管透過性の亢進を抑制した。
- 2) この作用機序としては、肥満細胞から放出された histamine や  $LTD_4$  といった炎症性伝達物質の作用部位である気道平滑筋ならびに後毛細血管静脈のそれぞれに  $K^+$  チャンネル開口薬が直接抑制作用を示した結果であることが示唆された。
- 3)  $K^+$  チャンネル開口薬は気管支喘息において気管支拡張薬としてだけでなく、アレルギー反応により誘発される気道炎症に対しても有効性を発揮する可能性を示唆している。

## 総括

気管支喘息は気道狭窄による呼吸困難、咳ならびに気道過敏性亢進を特徴とする慢性疾患である。気管支喘息の発症要因として気道平滑筋収縮反応、気道内分泌の亢進および血管透過性亢進が知られている。今日では気管支喘息が慢性炎症性疾患の一つと認識され、好酸球をはじめとする炎症細胞等に起因する種々の炎症性伝達物質、サイトカインおよび組織傷害性因子によって気道炎症が引き起こされると考えられている。また、副交感神経および知覚神経 C-fiber が気道の様々な反応に深く関与していることが知られている。本研究では気道炎症の慢性化に伴う気道内神経機能の変化ならびに気道炎症と気道内知覚神経の相互調節機構について解明を試みた。まず、慢性気管支喘息における気道壁内神経系の機能的変化についてモルモット慢性気管支喘息モデルを用いて検討した。続いて、炎症性伝達物質と知覚神経の相互制御機構を調べる目的で LTD<sub>4</sub> 誘発気道反応における知覚神経の関与を検討した。最後に、ATP 感受性 K<sup>+</sup> チャンネル開口薬を用いて、知覚神経刺激を介した神経原性気道炎症ならびに炎症性伝達物質により惹起される抗原誘発気道炎症の二つの気道炎症モデルに対する ATP 感受性 K<sup>+</sup> チャンネルの関与について検討を行った。

まず、気管支喘息病態における神経系の関与を明らかにする目的で、抗原反復吸入暴露により誘発したモルモット慢性喘息モデルを用いて、気道の興奮性非アドレナリン性非コリン性 (eNANC 性) 神経ならびにコリン作動性神経の機能的変化をそれぞれ EFS 誘発気道平滑筋収縮反応によって検討した。その結果、抗原反復吸入暴露が eNANC 性収縮反応を亢進させることが示された。しかし、抗原反復吸入暴露群および対照群の両群において外因性 neurokinin A に対する気道収縮反応、ならびに tachykinin 分解酵素処置あるいは気道上皮剥離による収縮増強反応が同様に観察されたことより、抗原反復吸入暴露は気道平滑筋の反応性自体には影響を与えていないことが示唆された。また、抗原反復吸入暴露群では肺組織内 substance P 含量が対照群に比べて有意に高値を示したことから、抗原反復暴露による eNANC 性反応亢進機構として知覚神経細胞内の神経ペプチド産生量の増加あるいは知覚神経からの神経ペプチド放出量の増加が関与する可能性が示唆された。さらに、抗原反復吸入暴露は EFS 誘発コリン作動性収縮反応を亢進させたが、外因性 ACh 誘発収縮反応においては対照群および抗原反復暴露群の両群間で差がみられず、抗原反復吸

入暴露は eNANC 性神経と同様にコリン作動性神経機能を亢進させることが示唆された。以上の結果より、慢性的な気道炎症が気道組織における eNANC 性あるいはコリン作動性神経機能制御に関与していることが示唆された。

気管支喘息はダニやハウスダストといったアレルゲンの吸入によって惹起されるが、それらのアレルゲンは免疫グロブリン IgE を介して肥満細胞をはじめとする炎症細胞から histamine および leukotriene 類の遊離を促して気道狭窄ならびに気道炎症を誘発すると考えられる。そこで次に、気管支喘息における炎症性伝達物質が気道の知覚神経機能に関与しているかどうかを調べる目的で、モルモットにおける LTD<sub>4</sub> 吸入により誘発される気道血管透過性の亢進ならびに気道狭窄に対する capsaicin 前処置および tachykinin 拮抗薬の影響を検討した。Capsaicin 処置による知覚神経からの tachykinin 類枯渇、ならびに NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬 FK 888 および CP 39345 の投与は気道中枢部位において LTD<sub>4</sub> による血漿漏出を一部抑制した。さらに、NK<sub>2</sub> 受容体拮抗薬 SR 48968 は LTD<sub>4</sub> による気道抵抗上昇を有意に抑制した。以上の結果より、LTD<sub>4</sub> 誘発の気道反応には知覚神経からの tachykinin 遊離を介した機序が一部関与することが示唆された。この LTD<sub>4</sub> による知覚神経制御機構は慢性気道炎症における eNANC 性反応亢進の一因をになっていると考えられ、気管支喘息における気道炎症は炎症性伝達物質と知覚神経を含む気道内神経叢との相互作用によって制御されていると考えられる。

次に、気道炎症における ATP 感受性 K<sup>+</sup> チャンネルの関与を調べる目的で、神経原性気道炎症に対する K<sup>+</sup> チャンネル開口薬 YM 934 の作用を検討した。YM 934 はモルモット気道における神経原性血管透過性の亢進を抑制したが、外因性 substance P 誘発気道血管透過性の亢進に対しては抑制を示さなかった。すなわち、K<sup>+</sup> チャンネル開口薬の神経原性気道炎症に対する抑制作用は知覚神経からの substance P をはじめとする神経ペプチド放出阻害による結果であることが示唆された。

さらに、抗原誘発気道炎症における ATP 感受性 K<sup>+</sup> チャンネルの関与について検討した。K<sup>+</sup> チャンネル開口薬 BRL 38227 は抗原吸入暴露による肺抵抗上昇ならびに気道血管透過性の亢進を抑制した。抗原吸入暴露は肥満細胞からの histamine や LTD<sub>4</sub> 遊離を介して気道反応を惹起することが知られている。BRL 38227 は histamine および LTD<sub>4</sub> 吸入暴露による気道反応に対しても抗原吸入誘発気道反応と同様に抑制あるいは抑制傾向を示した。しかしながら、BRL 38227 は肥満細胞

からの抗原誘発 histamine 脱顆粒に対しては抑制作用を示さなかったことより、この抗原誘発気道反応に対する  $K^+$  チャンネル開口薬の抑制作用は肥満細胞に由来する伝達物質の作用部位である気道平滑筋ならびに後毛細血管静脈に対する直接作用であることが示唆された。

本研究ではモルモットの慢性気管支喘息モデルを用いて、気道収縮あるいは気道炎症において炎症性伝達物質と知覚神経あるいはコリン作動性神経が互いに制御する調節機構が存在することを明らかにした。気管支喘息は、気道収縮反応や気道炎症においてこのような調節機構が複雑に絡み合って病態が形成されており、その根本治療は未だ困難である。しかしながら、本研究で用いた  $K^+$  チャンネル開口薬のように神経原性炎症ばかりでなく抗原誘発気道炎症をも抑制するような薬物は喘息治療にとって重要と考えられ、本研究は新しい喘息治療薬を創造してゆく上で一つの指針を与えるものであると思われる。

## 謝辞

本論文の作成ならびに発表にあたり、懇切なる御指導とともに、論文の御校閲を賜りました千葉大学薬学部、渡辺和夫教授に謹んで感謝致します。

本研究の機会を賜るとともに、過分の御便宜および御配慮を賜りました東北大学医学部、白土邦男教授ならびに山之内製薬株式会社・常務取締役、竹中登一博士に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、終始有益な御助言ならびに直接御指導を賜るとともに、本学位取得にあたり多方面に渡る御配慮を賜りました東北大学医学部、一ノ瀬正和先生に心より深く感謝致します。

また、本研究の遂行にあたり、暖かい御助言ならびに御支援を賜りました山之内製薬株式会社・薬理研究室所長 本田一男博士、国際開発室長 浅野雅晴博士、および薬理第四研究室長 山田利光博士に深く感謝致します。

さらに、共同研究者として実験に協力して頂きました東北大学医学部内科学第一講座、肺機能研究室の三浦元彦博士および影山夏子博士をはじめとする医局員の皆様に心より感謝申し上げます。

## 投稿雑誌目録

本学位論文は以下の論文を再構成して作成した。

1. Ishikawa J., Ichinose M., Miura M., Kageyama N., Yamauchi H., Tomaki M., Sasaki Y. and Shirato K.: Involvement of endogenous tachykinins in LTD<sub>4</sub>-induced airway responses. *Eur. Respir. J.* 9, 486-492 (1996)
2. Ishikawa J., Ichinose M., Nakajima N., Takahashi T., Yamauchi H., Miura M. and Shirato K.: Potassium channel opener, YM 934, inhibits neurogenic plasma leakage in guinea pig airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150, 1379-1383 (1994)
3. Ichinose M., Miura M., Takahashi T., Yamauchi H., Nakajima N., Igarashi A., Ishikawa J., Inoue H., Maeyama K., Watanabe T., Takishima T. and Shirato K.: Antigen-induced airway responses are inhibited by a potassium channel opener. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150, 388-393 (1994)
4. Kageyama N., Ichinose M., Igarashi A., Miura M., Yamauchi H., Sasaki Y., Ishikawa J., Tomaki M. and Shirato K.: Repeated allergen exposure excitatory nonadrenergic noncholinergic nerve-mediated bronchoconstriction in sensitized guinea-pigs. *Eur. Respir J.* 9, 1439-1444 (1996)
5. Kageyama N., Igarashi A., Ichinose M., Miura M., Yamauchi H., Tomaki M., Ishikawa J., Sasaki Y. and Shirato K.: Chronic allergen exposure enhances cholinergic neurotransmission in sensitized guinea-pigs. *Eur. Respir. J.* 8, 752-754 (1995)

## 引用文献

- 1) American Thoracic Society: Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136, 225-244 (1987)
- 2) Lundberg J.M., Lundblad L., Änggård A., et al.: Bioactive peptides in capsaicin-sensitive C-fiber afferents of the airways: functional and pathophysiological implications. In: Kaliner M., Barnes P.J., eds. *The Airways: Neural Control in Health and Disease*. New York, Marcel Dekker, pp 417-445 (1987)
- 3) Boushey H.A., Holtzman M.J., Sheller J.R. and Nadel J.A.: Bronchial hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* 121, 389-413 (1980)
- 4) Peatfield A.C. and Richardson P.S.: Evidence for noncholinergic, nonadrenergic nervous control of mucus secretion into the cat trachea. *J. Physiol.* 342, 335-345 (1983)
- 5) Lundberg J.M., Saria A., Brodin E., Rosell S. and Folkers K.: A substance P antagonist inhibits vagally-induced increase in vascular permeability and bronchial smooth muscle contraction in the guinea-pig. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1120-1124 (1983)
- 6) Kimura K., Inoue H., Ichinose M., Miura M., Katsumata U., Takahashi T. and Takishima T.: Bradykinin causes airway hyperresponsiveness and enhances maximal airway narrowing: role of microvascular leakage and airway edema. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146, 1301-1305 (1992)
- 7) Persson C.G.A.: Plasma exudation and asthma. *Lung* 166, 1-23 (1988)
- 8) McFadden E.R. Jr and Gilbert I.A.: Asthma. *N. Engl. J. Med.* 327, 1928-1937 (1992)
- 9) Chung K.F. and Barnes P.J.: Role of inflammatory mediators in asthma. *Br. Med. Bull.* 48, 135-148 (1992)
- 10) Brennan F.M., Maini R.N. and Feldman M.: Cytokine expression in chronic inflammatory disease. *Br. Med. Bull.* 51, 368-384 (1995)
- 11) Barnes P.J.: Neural control of human airways in health and disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134, 1289-1314 (1986)

- 12) James A.L., Pare P.D. and Hogg J.C.: The mechanics of airway narrowing in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139, 242-246 (1989)
- 13) Evans T.W., Rogers D.F., Aursudkij B., Chung K.F. and Barnes P.J.: Inflammatory mediators involved in antigen-induced airway microvascular leakage in guinea pigs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138, 395-399 (1988)
- 14) Ichinose M. and Barnes P.J.: Bradykinin-induced airway microvascular leakage and bronchoconstriction are mediated via a bradykinin B2 receptor. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142, 1104-1107 (1990)
- 15) Barnes P.J., Baraniuk J.N. and Belvisi M.G.: State of the art: neuropeptides in the respiratory tract. Part I. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144, 1187-1198 (1991)
- 16) Majno G. and Palade M.G.: Studies on inflammation, I. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11, 571-605 (1961)
- 17) Hultstrom D. and Svensjo E.: Intravital and electron microscopic study of bradykinin-induced vascular permeability changes using FITC-dextran as a tracer. *J. Pediatr.* 129, 125-133 (1980)
- 18) Persson C.G.A.: Role of plasma exudation in asthmatic airways. *Lancet* 2, 1126-1129 (1986)
- 19) Rawson R. A.: The binding of T-1824 and structurally related diazo dyes by the plasma protein. *Am. J. Physiol.* 138, 708-717 (1943)
- 20) LeVeen H.H. and Fishman W.H.: Combination of Evans blue with plasma protein: Its significance in capillary permeability studies, blood dye disappearance curves, and its use as a protein tag. *Am. J. Physiol.* 151, 26-33 (1947)
- 21) Rogers D.F., Boshetto P. and Barnes P.J.: Plasma exudation: correlation between Evans blue dye and radiolabelled albumin in guinea-pig airways in vivo. *J. Pharmacol. Methods* 21, 309-315 (1989)
- 22) Nakajima N., Ichinose M., Takahashi T., et al.: Bradykinin-induced airway inflammation: contribution of sensory neuropeptides differs according to airway site. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149, 694-698 (1994)
- 23) Romagnani S.: The Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Today* 18, 263-266 (1997)

- 24) Arch J.R.S., Buckle D.R., Bumstead J., Clarke G.D., Taylor J.F. and Taylor S.G.: Evaluation of the potassium channel activator cromakalim (BRL 34915) as a bronchodilator in the guinea pig: comparison with nifedipine. *Br. J. Pharmacol.* 98, 763-770 (1988)
- 25) Allen S.L., Boyle J.P., Cortijo J., Foster R.W., Morgan G.P. and Small R.C.: Electrical and mechanical effects of RBL 34915 in guinea-pig isolated trachealis. *Br. J. Pharmacol.* 89, 395-405 (1986)
- 26) Black J.L., Armour C.L., Johnson P.R.A., Alouan L.A. and Barnes P.J.: The action of a potassium channel activator, BRL 38227 (lemakalim), on human airway smooth muscle. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142, 1384-1389 (1990)
- 27) Ichinose M. and Barnes P.J.: A potassium channel activator modulates both excitatory noncholinergic and cholinergic neurotransmission in guinea-pig airways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252, 1207-1212 (1990)
- 28) Williams A.J., Lee T.H., Cochrane G.M., Hopkirk A., Vyse T., Chiew F., Lavender E., Richarde D.H., Owen S., Stone P., Church S. and Woodcock A.A.: Attenuation of nocturnal asthma by cromakalim. *Lancet* 336, 334-336 (1990)
- 29) Beasley R., Roche W.R., Roberts J.A. and Holgate S.T.: Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139, 806-817 (1989)
- 30) Sprik R., Holgate S.T., Platts Mills T.A. and Cogswell J.J.: Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood. A prospective study. *N. Engl. J. Med.* 323, 502-507 (1990)
- 31) Padrid P., Snook S., Finucane T., Shiue P., Cozzi P., Solway J. and Leff A.R.: Persistent airway hyperresponsiveness and histologic alterations after chronic antigen challenge in cats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151, 184-193 (1995)
- 32) Barnes P.J.: Asthma as an axon reflex. *Lancet* i, 242-245 (1986)
- 33) Ichinose M., Belvisi M.G. and Barnes P.J.: Bradykinin-induced bronchoconstriction in guinea-pig in vivo: role of neural mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253, 594-599 (1990)
- 34) Fuller R.W., Dixon C.M.S., Cuss F.M.C. and Barnes P.J.: Bradykinin-

- induced bronchoconstriction in humans: mode of action. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135, 176-180 (1987)
- 35) Ichinose M., Nakajima N., Takahashi T., Yamauchi H., Inoue H. and Takishima T.: Protection against bradykinin-induced bronchoconstriction in asthmatic patients by neurokinin receptor antagonist. *Lancet* 340, 1248-1251 (1992)
- 36) Marsh W.R., Irvin C.G., Murphy K.R., Berhrens B.L. and Larsen G.L.: Increases in airway reactivity to histamine and inflammatory cells in bronchoalveolar lavage after the late asthmatic response in an animal model. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131, 875-879 (1985)
- 37) Chung K.F., Becker A.B., Lazarus S.C., Frick O.L., Nadel J.A. and Gold W.M.: Antigen-induced airway hyperresponsiveness and pulmonary inflammation in allergic dogs. *J. Appl. Physiol.* 58, 1347-1353 (1985)
- 38) Stewart A.G. and Fennessy M.R.: A model of bronchial hyperreactivity using ovalbumin-sensitized guinea-pigs. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 10, 205 (1983)
- 39) Hulbert W.C., McLean T., Wiggs B., Paré P.D. and Hogg J.C.: Histamine dose-response curves in guinea-pigs. *J. Appl. Physiol.* 58, 625-634 (1985)
- 40) Andersson P.: Antigen-induced bronchial anaphylaxis in actively sensitized guinea-pigs. *Allergy* 35, 65-71 (1980)
- 41) Undem B.J., Myers A.C., Barthlow H. and Weinreich D.: Vagal innervation of guinea-pig bronchial smooth muscle. *J. Appl. Physiol.* 69, 1336-1346 (1990)
- 42) Taylor S.M., Paré P.D. and Schellenberg R.R.: Cholinergic and nonadrenergic mechanisms in human and guinea-pig airways. *J. Appl. Physiol.: Respirat Environ Exercise Physiol.* 56, 958-965 (1984)
- 43) Naline E., Devillier P., Drapeau G., et al.: Characterization of neurokinin effects and receptor selectivity in human isolated bronchi. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140, 679-686 (1989)
- 44) Regoli D., Drapeau G., Dion S. and D'Orléans-Juste P.: Pharmacological receptors for substance P and neurokinins. *Life Sci.* 40, 109-117 (1987)
- 45) Hart R.P., Shadiack A.M. and Jonakait G.M.: Substance P gene expression is regulated by interleukin-1 in cultured sympathetic ganglia.

- J. Neurosci. Res. 29, 282-291 (1991)
- 46) Hurst S.M., Stanisiz A.M., Sharkey K.A. and Collins S.M.: Interleukin-1 $\beta$ -induced increase in substance P in rat myenteric plexus. *Gastroenterology* 105, 1754-1760 (1993)
  - 47) Freidin M. and Kessler J.A.: Cytokine regulation of substance P expression in sympathetic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3200-3203 (1991)
  - 48) Borish L., Mascali J.J., Dishuck J., Beam W.R., Martin R.J. and Rosenwasser L.J.: Detection of alveolar macrophage-derived IL-1 $\beta$  in asthma: inhibition with corticosteroids. *J. Immunol.* 149, 3078-3082 (1992)
  - 49) Miossec P., Cavender D. and Ziff M.: Production of interleukin-1 by human endothelial cells. *J. Immunol.* 136, 2486-2491 (1986)
  - 50) Del Pozo V., De Andres B., Martin E., et al.: Murine eosinophils and IL-1: IL-1 $\alpha$  mRNA detection by in situ hybridization. Production and release of IL-1 from peritoneal eosinophils. *J. Immunol.* 144, 3117-3122 (1990)
  - 51) Marucha P.T., Zeff R.A. and Kreutzer D.L.: Cytokine regulation of IL-1 $\beta$  gene expression in human polymorphonuclear leukocyte. *J. Immunol.* 145, 2932-2937 (1990)
  - 52) Denis M., Kelly D.E. and Biggs D.F.: Release of monokines by pulmonary macrophages following antigen challenge in sensitized guinea pigs. *Inflammation* 18, 349-360 (1994)
  - 53) Okada S., Inoue H., Yamauchi K., Iijima H., Ohkawara Y., Takishima T. and Shirato K.: Potential role of interleukin-1 in allergen-induced late asthmatic reactions in guinea pigs: suppressive effect of interleukin-1 receptor antagonist on late asthmatic reaction. *J. Allergy Clin. Immunol.* 95, 1236-1245 (1995)
  - 54) Otten U.: Nerve growth factor and the peptidergic sensory neurons. *Trends Pharmacol. Sci.* 5, 307-310 (1990)
  - 55) Lindsay R.M. and Harmar A.J.: Nerve growth factor regulates expression of neuropeptides genes in adult sensory neurons. *Nature* 337, 362-364 (1989)
  - 56) Gilchrist C.A., Morrison C. and Harmar A.J.: Regulation of

- prprotachykinin gene expression by nerve growth factor. In: Leeman S.E., Krause J.E. and Lembeck F. eds. Substance P and related peptides: cellular and molecular physiology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 632, 391-393 (1991)
- 57) Lindholm D., Heumann R., Meyer M. and Thoenen H.: Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in nonneural cells of rat sciatic nerve. *Nature* 330, 658-659 (1987)
- 58) Ollerenshaw S.L., Jarvis D., Sullivan C.E. and Woolcock A.J.: Substance P immunoreactive nerves in airways from asthmatics and nonasthmatics. *Eur. Respir. J.* 4, 673-682 (1991)
- 59) Nieber K., Baumgarten C.R., Rathsack R., Furkert J., Oehme P. and Kunkel G.: Substance P and  $\beta$ -endorphin-like immunoreactivity in lavage fluids of subjects with and without allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 90, 646-652 (1992)
- 60) Tomaki M., Ichinose M., Miura M., et al. Elevated substance P content in induced sputum from patients with asthma and patients with chronic bronchitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151, 613-617 (1995)
- 61) Ellis J.L. and Udem B.J.: Antigen-induced enhancement of noncholinergic contractile responses to vagus nerve and electrical field stimulation in guinea-pig isolated trachea. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262, 646-653 (1992)
- 62) Nadel J.A.: Neutral endopeptidase modulates neurogenic inflammation. *Eur. Respir. J.* 4, 745-754 (1991)
- 63) Djokic T.D., Nadel J.A., Dusser D.J., Sekizawa K., Graf P.D. and Borson D.B.: Inhibitors of neutral endopeptidase potentiate electrically- and capsaicin-induced noncholinergic contraction in guinea-pig bronchi. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 248, 7-11 (1989)
- 64) Frossard N., Rhoden K.J. and Barnes P.J.: Influence of epithelium on guinea-pig airway responses to tachykinins: role of endopeptidase and cyclooxygenase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 248, 292-298 (1989)
- 65) Sekizawa K., Tamaoki J., Nadel J.A. and Borson D.B.: Enkephalinase inhibitor potentiates substance P- and electrically-induced contraction in ferret trachea. *J. Appl. Physiol.* 63, 1401-1405 (1987)

- 66) Lilly C.M., Kobzik L., Hall A.E. and Drazen J.M.: Effects of chronic airway inflammation on the activity and enzymatic inactivation of neuropeptides in guinea-pig lungs. *J. Clin. Invest.* 93, 2667-2674 (1994)
- 67) Flavahan N.A., Aarhus L.L., Rimele T.J. and Vanhoutte P.M.: The respiratory epithelium inhibits bronchial smooth muscle tone. *J. Appl. Physiol.* 58, 834-838 (1985)
- 68) Vincenc K.S., Black J.I., Yan K., Armour C.L., Donnelly P.D. and Woolcock A.J.: Comparison of in vivo and in vitro responses to histamine in human airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128, 875-879 (1983)
- 69) MaCaig D.J.: Comparison of autonomic responses in the trachea isolated from normal and albumin-sensitive guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.* 92, 809-816 (1987)
- 70) Fryer A.D. and Wills-Karp M.: Dysfunction of M<sub>2</sub>-muscarinic receptors in pulmonary parasympathetic nerves after antigen challenge. *J. Appl. Physiol.* 71, 2255-2261 (1991)
- 71) Myers A.C., Udem B.J. and Weinreich D.: Influence of antigen on membrane properties of guinea-pig bronchial ganglion neurons. *J. Appl. Physiol.* 71, 970-976 (1991)
- 72) Rhoden K.J., Meldrum L.A. and Barnes P.J.: Inhibition of cholinergic neurotransmission in human airways by  $\beta$ <sub>2</sub>-adrenoceptors. *J. Appl. Physiol.* 65, 700-705 (1988)
- 73) Ito Y. and Tajima K.: Dual effects of catecholamines on pre- and post-junctional membranes in the dog trachea. *Br. J. Pharmacol.* 75, 433-440 (1982)
- 74) Skoogh B.E. and Svedmyr N.:  $\beta$ <sub>2</sub>-adrenoceptor stimulation inhibits ganglionic transmission in ferret trachea. *Pulm. Pharmacol.* 1, 167-172 (1989)
- 75) Hui K.P. and Barnes N.C.: Lung function improvement in asthma with a cysteinyl-leukotriene receptor antagonist. *Lancet* 337, 1062-1063 (1991)
- 76) Gaddy J.N., Margolskee D.J., Bush R.K., Williams V.C. and Busse W.W.: Bronchodilation with a potent and selective leukotriene D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) receptor antagonist (MK-571) in patients with asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146, 358-362 (1992)

- 77) Taylor I.K., O'Shaughnessy K.M., Fuller R.W. and Dollery C.T.: Effect of cysteinyl-leukotriene receptor antagonist ICI 204219 on allergen-induced bronchoconstriction and airway hyperreactivity in atopic subjects. *Lancet* 337, 690-694 (1991)
- 78) Manning P.J., Watson R.M., Margolskee D.J., Williams V.C., Schwartz J.I. and O'Byrne P.M.: Inhibition of exercise-induced bronchoconstriction by MK-571, a potent leukotriene D<sub>4</sub>-receptor antagonist. *N. Engl. J. Med.* 323, 1736-1739 (1991)
- 79) Ellis J.L. and Undem B.J.: Role of peptidoleukotrienes in capsaicin-sensitive sensory fiber-mediated responses in guinea-pig airways. *J. Physiol. (Lond.)* 436, 469-484 (1991)
- 80) Bloomquist E.I. and Kream R.M.: Leukotriene D<sub>4</sub> acts in part to contract guinea-pig ileum smooth muscle by releasing substance P. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 240, 523-528 (1987)
- 81) Martins M.A., Shore S.A. and Drazen J.M.: Release of tachykinins by histamine, methacholine, PAF, LTD<sub>4</sub>, and substance P from guinea-pig lungs. *Am. J. Physiol.* 261 (Lung Cell Mol. Physiol. 5), L449-L455 (1991)
- 82) Mead J. and Whittenberger J.L.: Physical properties of human lungs measured during spontaneous respiration. *J. Appl. Physiol.* 5, 779-796 (1953)
- 83) Bertrand C., Geppetti P., Baker J., Yamawaki I. and Nadel J.A.: Role of neurogenic inflammation in antigen-induced vascular extravasation in guinea-pig trachea. *J. Immunol.* 150, 1479-1485 (1993)
- 84) Qian Y., Emonds-Alt X. and Advenier C.: Effects of capsaicin, (±)-CP-96345 and SR 48968 on the bradykinin-induced airways microvascular leakage in guinea-pigs. *Pulm. Pharmacol.* 6, 63-67 (1993)
- 85) Hua X.-Y., Dahlen S.-E., Lundberg J.M., Hammarstrom S. and Hedqvist P.: Leukotriene C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> and E<sub>4</sub> cause widespread and extensive plasma extravasation in the guinea-pig. *Naunyn. Sch. Arch. Pharmacol.* 330, 136-141 (1985)
- 86) Obata T., Kobayashi T., Okada Y., Nakagawa N., Terawaki T. and Aishita H.: Effect of a peptide leukotriene antagonist, ONO-1078 on antigen-induced airway microvascular leakage in actively sensitized guinea-pigs.

- 87) Woodward D.F., Weichman B.M., Gill C.A. and Wasserman M.A.: The effect of synthetic leukotrienes on tracheal microvascular permeability. *Prostaglandins* 25, 131-142 (1983)
- 88) Jancso N., Jancso-Gabor A. and Szolczanyi J.: Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* 31, 138-151 (1967)
- 89) Holzer P.: Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 24, 739-768 (1988)
- 90) Saria A., Martling C.-R. and Yan Z., Theodorsson-Norheim E., Gamse R. and Lundberg J.M.: Release of multiple tachykinins from capsaicin-sensitive sensory nerves in the lung by bradykinin, histamine, dimethylphenyl piperazinium, and vagal nerve stimulation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137, 1330-1335 (1988)
- 91) Jancso N.: Desensitization with capsaicin and related acylamides as a tool for studying the function of pain receptors. In: Lim R.S.K. ed. *Pharmacology of Pain*. Oxford, Pergamon Press pp. 33-55 (1968)
- 92) Nagy J.I., Iversen L.L., Goedert M., Chapman D. and Hunt S.P.: Dose-dependent effects of capsaicin on primary sensory neurons in neonatal rat. *J. Neurosci.* 3, 399-406 (1983)
- 93) Jancso G., Kiraly E., Joo F., Such G. and Nagy A.: Selective degeneration by capsaicin of a subpopulation of primary sensory neurons in the adult rat. *Neurosci. Lett.* 59, 209-214 (1985)
- 94) McDonald D.M.: Endothelial gaps and permeability of venules in rat tracheas exposed to inflammatory stimuli. *Am. J. Physiol.* 266 (Lung Cell Mol. Physiol. 10), L61-L83 (1994)
- 95) Solway J. and Leff A.R.: Sensory neuropeptides and airway function. *J. Appl. Physiol.* 2077-2087 (1991)
- 96) Hirayama Y., Lei Y.-H., Barnes P.J. and Rogers D.F.: Effects of two novel tachykinin receptor antagonists, FK 224 and FK 888, on neurogenic airway plasma exudation, bronchoconstriction and systemic hypertension in guinea-pig in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 108, 844-851 (1993)

- 97) Fujii T., Murai M., Morimoto H., et al.: Pharmacological profile of a high affinity dipeptide NK<sub>1</sub> receptor antagonist, FK 888. *Br. J. Pharmacol.* 107, 785-789 (1992)
- 98) Manzini S. and Meini S.: Involvement of capsaicin-sensitive nerves in the bronchomotor effects of arachidonic acid and melittin: a possible role for lipoxin A<sub>4</sub>. *Br. J. Pharmacol.* 103, 1027-1032 (1991)
- 99) Lundberg J.M., Hokfelt T., Martling C.R., Saria A. and Cuello C.: Substance P-immunoreactive sensory nerves in the lower respiratory tract of various mammals including man. *Cell Tissue Res.* 235, 251-261 (1984)
- 100) Belvisi M.G., Rogers D.F. and Barnes P.J.: Neurogenic plasma extravasation: inhibition by morphine in guinea-pig airways in vivo. *J. Appl. Physiol.* 66, 268-272 (1989)
- 101) Ichinose M., Belvisi M.G. and Barnes P.J.: Histamine H<sub>3</sub>-receptors inhibit neurogenic microvascular leakage in airways. *J. Appl. Physiol.* 68, 21-25 (1990)
- 102) Cook N.S., Weir S.W. and Danzeisen M.C.: Anti-vasoconstrictor effects of the K<sup>+</sup> channel opener cromakalim on the rabbit aorta — comparison with the calcium antagonist isradipine. *Br. J. Pharmacol.* 95, 741-752 (1988)
- 103) Cook N.S.: The pharmacology of potassium channels and their therapeutic potential. *Trends Pharmacol. Sci.* 9, 21-24 (1988)
- 104) Hamilton T.C., Weir S.W. and Weston A.H.: Comparison of the effects of BRL 34915 and verapamil on electrical and mechanical activity in rat portal vein. *Br. J. Pharmacol.* 88, 103-111 (1986)
- 105) Lundberg J.M. and Saria A.: Capsaicin-sensitive vagal neurons involved in the control of vascular permeability in rat trachea. *Acta Physiol. Scand.* 115, 521-523 (1982)
- 106) Rogers D.F., Belvisi M.G., Aursudkij B., Evans T.W. and Barnes P.J.: Effects and interaction of sensory neuropeptides on airway microvascular leakage on guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.* 95, 1109-1116 (1988)
- 107) Uchida W., Shibasaki K., Matsumoto Y., Asano M., Fujikura T., Takenaka T. and Honda K.: Pharmacological profiles of YM934, a novel K channel opener. *FASEB J.* 6, A1291 (1992)
- 108) Yamada M., Terzic A., Findlay I., Jahangir A. and Kurachi Y.: A new K<sup>+</sup>

- channel opener YM934: its effect on the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cardiac myocytes and a pancreatic  $\beta$ -cell line. *J. Am. Coll. Cardiol.* 21, A22 (1993)
- 109) Barnes P.J.: Modulation of neurotransmission in airways. *Physiol. Rev.* 72, 699-729 (1992)
- 110) Belvisi M.G., Ichinose M. and Barnes P.J.: Modulation of nonadrenergic, noncholinergic neural bronchoconstriction in guinea-pig airways via GABA<sub>B</sub>-receptors. *Br. J. Pharmacol.* 97, 1225-1231 (1989)
- 111) Takahashi T., Ichinose M., Yamauchi H., Miura M., Nakajima N., Ishikawa J., Inoue H., Takishima T. and Shirato K.: Neuropeptide Y inhibits neurogenic inflammation in guinea pig airways. *J. Appl. Physiol.* 75, 103-107 (1993)
- 112) Christie M.J. and North R.A.: Agonists at  $\mu$ -opioid, M<sub>2</sub>-muscarinic and GABA<sub>B</sub>-receptors increase the same potassium conductance in rat lateral parabrachial neurons. *Br. J. Pharmacol.* 95, 896-902 (1985)
- 113) Ichinose M., Kimura K., Takahashi T., Miura M., Inoue H., Takishima T. and Shirato K.: Antiasthma drug, ibudilast, inhibits neurogenic plasma extravasation in guinea-pig airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148, 431-434 (1993)
- 114) Barnes P.J., Chung K.F. and Page C.P.: Inflammatory mediators and asthma. *Pharmacol. Rev.* 40, 49-84 (1988)
- 115) Yamatodani A., Fukuda H., Wada H., Iwaeda T. and Watanabe T.: High-performance liquid chromatographic determination of plasma and brain histamine without previous purification of biological samples: cation-exchange chromatography coupled with post-column derivatization fluorometry. *J. Chromatogr.* 344, 115-123 (1985)
- 116) Adams G.K.: In vitro studies of antigen-induced bronchospasm. *Monogr. Allergy* 14, 95-105 (1979)
- 117) Ichinose M. and Barnes P.J.: Histamine H<sub>3</sub> receptor modulates antigen-induced bronchoconstriction in guinea pigs. *J. Allergy Clin. Immunol.* 86, 491-495 (1990)
- 118) Black J.L. and Barnes P.J.: Potassium channels and airway function: new therapeutic prospects. *Thorax* 45, 213-218 (1990)

- 119) Nakao K., Okada K., Kimura K., Kuriyama H. and Weston A.H.: Characteristics of cromakalim-induced relaxation in the smooth muscle cells of guinea-pig mesenteric artery and vein. *Br. J. Pharmacol.* 95, 795-804 (1988)
- 120) Udaka K., Takeuchi Y. and Movat H.Z.: Simple method for quantification of enhanced vascular permeability. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 133, 1384-1387 (1970)
- 121) Erjefult I. and Persson C.G.A.: Anti-asthma drugs attenuate inflammatory leakage into airway lumen. *Acta Physiol. Scand.* 128, 653-655 (1986)
- 122) Boshetto P., Roberts N.M., Rogers D.F. and Barnes P.J.: The effects of antiasthma drugs on microvascular leakage in guinea pig airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139, 416-421 (1989)
- 123) Rogers D.F., Lei Y., Kuo H.-P., Rohde J.A.L. and Barnes P.J.: A K<sup>+</sup>-channel activator, lemakalim, inhibits cigarette smoke-induced plasma exudation and goblet cell secretion in guinea pig trachea (abstract). *Am. Rev. Respir. Dis.* 143, A754 (1991)

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究科で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学教授 (薬学部)	薬学博士	渡辺 和夫
副査	千葉大学教授 (薬学部)	薬学博士	小林 弘
副査	千葉大学教授 (薬学部)	薬学博士	千葉 寛
副査	千葉大学教授 (薬学部)	医学博士	上田 志朗
副査	千葉大学教授 (薬学部)	薬学博士	矢野 眞吾