

喘息モデルモルモットの

病理学的検討

1997年

佐藤裕和

目 次

第 1 章	緒 論	1
第 2 章	卵白アルブミン反復吸入曝露によるモルモット気道 における病理組織学的及び免疫組織化学的検索	4
	緒 言	5
	材料及び方法	6
	結 果	9
	考 察	18
	要 約	19
第 3 章	卵白アルブミンの感作及び誘発により作製した モルモット喘息病態モデルにおける病理組織学的 及び免疫組織化学的検索	21
	緒 言	22
	材料及び方法	23
	結 果	26
	考 察	36
	要 約	37

第 4 章	総括	38
	謝辞	41
	文献	42

第 1 章

緒 論

近年の分子生物学、免疫学、アレルギー学の進歩は、気管支喘息の病態とその発症機序の解明に大きく寄与している。喘息は I 型アレルギー反応の代表疾患として、特異的 IgE 抗体を介した肥満細胞の脱顆粒現象に始まり、気管支平滑筋収縮を惹起するヒスタミン、SRS-A (Slow Reacting Substance of anaphylaxis) などの化学物質、アラキドン酸カスケードなど、生化学的研究が 70 年代から 80 年代前半にかけてなされてきた。80 年代後半から、好酸球顆粒蛋白の MBP (Major Basic Protein) が気管支上皮を障害することが報告され、好酸球などの炎症細胞の気道粘膜への浸潤という炎症反応の側面が注目されてきた¹²⁾。気道におけるアレルギー性炎症反応に関与する炎症細胞には、肥満細胞や好酸球の他にも好中球、リンパ球、マクロファージ及び血小板などの血液由来細胞と、気道粘膜上皮細胞、自律神経を含めた下部気道を形成している細胞がサイトカインなどの伝達物質を介して相互にネットワークを作り、特別な形の気道炎症の形態をとるという概念が世界的なレベルで広く認められるようになってきた^{4, 22)}。

気管支喘息の疾患としての特徴は、発作性呼吸困難、喘鳴を主徴とする気道収縮反応、ヒスタミン、アセチルコリンなどの非特異的気管支平滑筋収縮物質の吸入に対する反応性亢進状態¹⁴⁾、肥満細胞、好酸球、リンパ球などの気道粘膜への細胞浸潤などである³⁸⁾。アレルギー性喘息患者がアレルゲン曝露によって惹起される気道反応には、抗原吸入直後より始まり、10～30分をピークとする典型的な気道収縮反応として捉えられる即時型喘息反応 (immediate asthmatic response : IAR)、抗原吸入後 3～12 時間後に徐々に出現する気道閉塞を特徴とした遅発型喘息反応 (late asthmatic response : LAR)、及び吸入後 24 時間以後の、僅かな刺激や誘因で発作を起こしうる気道反応性亢進状態である後遅発型喘息反応 (post-late asthmatic response : p-LAR) の 3 種類に大別できる。

一方、気管支喘息の病因、病態の解明とその治療法の確立は、優れた動物モデルの開発によって可能となる。上述したように、喘息

の気道病理像から好酸球性気管支炎なる概念も提唱されているが、その病態生理の機序の解明が進んだのは動物モデルの利用によるところが大きい。このように、喘息モデルに関する研究は数多くなされてきたが、その作製は基本的には比較的少量の抗原を単回もしくは反復曝露して能動的もしくは受動的感作を行い、抗原特異的 IgE を産生させた後、同一抗原で誘発を行ってアレルギー反応を惹起させるものである^{7, 31)}。しかしながら、ヒトの慢性気管支喘息という点で考えると、絶えず経気道的に感作された状態、すなわち、感作処置のみを施した動物において、経時的に病理組織学的検討を行った報告は少なく³⁶⁾、特にアポトーシス及び細胞増殖活性を示す細胞の動態に注目した報告はない。また、IAR から LAR に推移する過程で、両病態に対する経時的な病理組織学的検討を実施した報告も少ない。

そこで、著者は実験動物の中でもアセチルコリンやヒスタミンに対する感受性が強く、アナフィラキシー反応の主な反応の場が呼吸器系であるモルモット^{20, 35)}を用い、抗原として卵白アルブミンを反復吸入曝露させることにより感作動物を作製し、曝露回数を重ねることによって気道に対しどのような変化が認められるかを病理組織学的及び免疫組織化学的に検討した³²⁾。更に、同様の操作で作製した感作成立モルモットに対し、同一抗原によるブースター処置及び誘発を行って喘息病態モデルを作製し、気道における変化を病理組織学的及び免疫組織化学的に経時的な検討を加えた³³⁾。

第 2 章

卵白アルブミン反復吸入曝露による
モルモット気道における病理組織学的及び免疫組織化学的検索

緒 言

アレルギー患者がアレルゲン曝露によって惹起される気道反応には、活性化した粘膜内の肥満細胞から遊離されるヒスタミンや各種の化学遊走物質によって誘発される即時性の気道収縮¹⁶⁾と、持続的な気道破壊を特徴とする遅発型喘息反応があり、後者は抗原誘発後3ないし4時間で認められ、7ないし8時間でピークに達し、その後数日間持続する²⁷⁾。さらに、遅発型喘息反応はその重症度に比例して、非特異的な種々の刺激に対して気管支の気道反応性亢進を引き起こすとされており⁵⁾、気管支喘息の最も重要な病態であるとともに、臨床上の重症度とも関連している。

近年、気管支喘息における種々の免疫・アレルギー性反応の炎症としての側面に注目が集まり、気管支喘息はアレルギー性炎症反応として把握されつつある。気道系におけるアレルギー性炎症反応に関与する炎症細胞には、好酸球、好中球、肥満細胞、リンパ球、マクロファージなどがあり、これらの細胞の機能に種々のサイトカインが影響を与えていると考えられる。事実、気管支喘息の最も重要な病態である気道過敏性は、実験的にインターロイキン-2 (以下IL-2と略)の投与により誘発することが注目されており^{29・31)}、サイトカインが各種遊走細胞の誘導や、更なるサイトカイン産生刺激作用を介して気管支喘息病態に重要なメディエーターとして働いている可能性が示唆されている⁴⁾。

実験動物における喘息病態モデルに関しては、これまでに多くの作製がなされ、研究が行われてきた^{20, 35)}。しかしながら、喘息病態作製には、動物に能動的な感作を成立させた後、一定期間をおいて再度抗原曝露による誘発を行う方法が主流であり、喘息病態モデル作製過程で、抗原の反復曝露による感作処理のみを実施した動物、すなわちヒトのアレルギー性喘息に置き換えた場合、「絶えず抗原に曝露され、その後の抗原吸入誘発発作が生じる前の状態」に相当する動物に対し、経時的な病理組織学的検討を行った報告は少ない。また、喘息モデル作製過程で、アポトーシスや細胞増殖活性に注目

した報告は未だ見られていない。このような状況の下、本試験において、霧化した卵白アルブミンをモルモットに吸入曝露し、その曝露回数の相違による気道の変化を病理組織学的及び免疫組織化学的に検索した²¹⁾。

材料及び方法

1. 実験動物

本実験には4週齢の雄性 Hartley 系モルモット（日本医科学動物資材研究所より購入、使用時体重約 250 g）計 23 匹を用いた。実験を通じてこれらの動物は温度 23 ± 2 °C、湿度 50 ± 10 %、照明時間 7:00 ~ 19:00 の環境下で飼育し、水（水道水）及び餌（CG-7；日本クレア）をそれぞれ自由に摂取させた。

2. 実験方法

吸入感作は有馬ら²¹⁾の方法に準じて行った。すなわち、モルモットをアクリル製 exposure chamber ($300^{(W)} \times 400^{(D)} \times 300^{(H)}$ mm) に入れ、卵白アルブミン（Grade III, Sigma, St. Louis, MO, 1% wt/vol in 0.9% sodium chloride）を超音波ネブライザー（1.5 ml/min., NE-U10B, オムロン株式会社、東京）を用いて、無麻酔、自発呼吸の条件下で、1日1回10分間、吸入曝露を行った（Fig. 1）。この操作を0回（無処置対照）、2, 5, 8, 及び10回連続して行い、感作処理を行った。なお、モルモットの一般状態から喘鳴呼吸やチアノーゼが認められた時点で感作成立と判断した。

3. 病理組織学的検索

吸入曝露の0回（無処置対照）、2, 5, 8, 及び10回のそれぞれの時点（n=4 ~ 5）で、動物をエーテル麻酔下で放血致死せしめ、気管及び肺を採取した。気管の断端から10%緩衝ホルマリンを注入し、採取した気管及び肺の固定を行った。モルモットの気管及び肺の一定部位（右肺後葉、主気管支直下）を切り出し、パラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン、ギムザ、アルシアン・ブルー PAS、トルイジンブルーの各染色を施し、光学顕微鏡下で観察を行った。

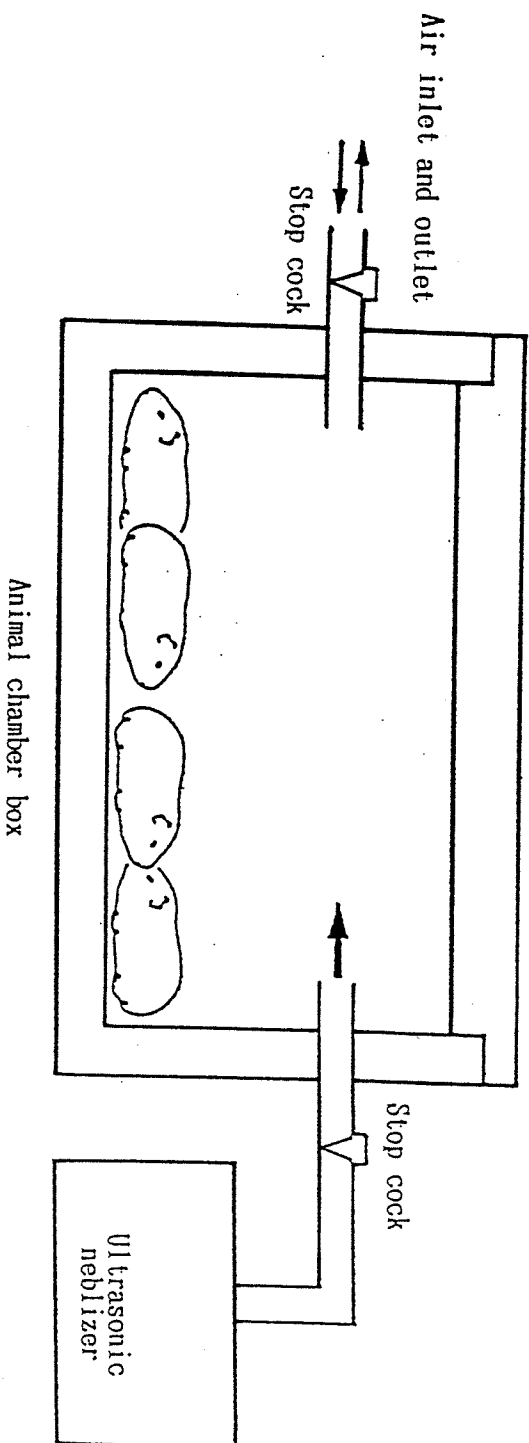


Fig. 1. Schematic illustration of experimental apparatus for sensitization of guinea pigs by OA inhalation.

4. アポトーシス細胞の検出

病理組織学的検査で用いたものと同じホルマリン固定、パラフィン包埋切片を使用した。

アポトーシス細胞の検出には、Apop-Tag™ Plus-Peroxidase in situ Apoptosis Detection kit (Oncor Inc., Gaithersburg, MO) を用いた TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (以下 TUNEL と略) 法¹¹⁾に従った。

この方法は、アポトーシス細胞においてヌクレオソーム単位で断された DNA 切断部位を、末端基転移酵素 (Terminal deoxynucleotidyl transferase) と、ビオチン化したデオキシウリジン (dUTP-biotin) を用いて標識し、3,3-diaminobenzidine (以下 DAB と略、DAB Tablets S-300, DAKO Japan Inc., 京都) で発色し、検出する方法である。なお、対比染色としてメチルグリーン染色を施した。

5. PCNA 細胞の検出

病理組織学的検査で用いたものと同じ切片を使用した。切片は脱パラフィン後、オートクレーブ (SS-320, TOMY SEIKO Co. Ltd., 東京) で熱処理 (121 °C, 15 min.) を行い、内因性パーオキシダーゼ除去のために、5% H₂O₂, 5 分間処理を行った。蒸留水及び tris buffered saline (以下 TBS と略) でリンスした後、抗 proliferating cell nuclear antigen (以下 PCNA と略) 抗体 (DAKO-EPOS Anti-PCNA/HRP ; DAKO Japan Inc., 京都) を 60 分間インキュベートした。蒸留水及び TBS でリンスした後、DAB で発色し、ヘマトキシリンによる対比染色を施した。

6. 組織学的評価方法

気管及び肺について、光学顕微鏡による検索を実施した。肺については便宜上 3 種類の大きさの異なる気管支について検討を加えた。すなわち、全周に気管支軟骨が認められる部位を Bronchus として 1 箇所、気管支軟骨が散在する部位を Small bronchiole として 2 箇所、軟骨を認めず、平滑筋のみが存在する部位を Terminal bronchiole として 3 箇所、それぞれ任意に選択し、鏡検を行った。好酸球などの炎症細胞浸潤や病変の程度については次の 5 段階に分類し、以下に示す評点を賦して評価した。- : ほとんど認められない (score : 0)、± : 少

く僅かに浸潤又は存在する (score : 1)、+ : 軽度に浸潤又は存在する (score : 2)、++ : 中等度に浸潤又は存在する (score : 3)、+++ : 重度に浸潤又は存在する (score : 4)。

なお、病変の分布が一様でないような場合は、±～+のように中間として表し、評点も 1.5 とした。アポトーシス細胞及び PCNA 細胞については、切片上の全視野について高倍率 (× 400) 下で観察し、その出現数をカウントした。

7. 統計学的分析

全ての計量値は平均 ± 標準偏差で表し、t 検定 (不等分散の場合は Cochran-Cox 法) を行った。有意水準は両側 5% 以下とした。

結 果

1. 病理組織学的検索結果

Table 1 に病理組織学的検索結果を示した。2 回目曝露時より気管支の収縮を認め、リンパ球の気管あるいは気管支粘膜下への軽度な浸潤が認められるようになった。これらの所見はその後も散発的に認められたが、10 回目の曝露 (感作成立時) には全例にやや強い気管支収縮と気管支もしくは血管周囲の水腫 (Fig. 2)、並びに肺気腫が認められた。また、出血や好中球浸潤、泡沫細胞の集簇を伴うものも見られた。

好酸球の浸潤度を Fig. 3 に示した。曝露 0 回 (control) にも少数ではあるが好酸球の存在が認められたが、10 回目の感作成立時 (Fig. 4) にはやや浸潤が強くなる傾向が認められた。

2. アポトーシス細胞の動態

切片あたりのアポトーシス細胞数の推移を Table 2 及び Fig. 5 に示した。曝露回数を重ねるに従ってアポトーシス細胞が増加する傾向が認められ、曝露 0 回の対照群に比し、曝露 8 回目及び 10 回目では有意 ($p < 0.05$) な増加を示した。なお、アポトーシス細胞は気管や気管支の上皮細胞には少数しか認められず、大多数が末梢の肺胞上皮に認められた (Fig. 6)。

Table 1 Histopathological findings in guinea pigs sensitized with OA inhalation

Times of OA sensitization	0	2	5	8	10
No. of guinea pigs examined	4	4	5	5	5
Grade	-	- ± + #	- ± + #	- ± +	- ± + # #
Pulmonary bronchoconstriction :	4 ^{a)}	1 0 2 1	4 0 0 1	2 2 1	0 0 1 3 1
Lymphocyte infiltration in tracheal submucosa	4	2 0 2 0	3 2 0 0	3 2 0	0 3 2 0 0
Lymphocyte infiltration in bronchial submucosa	4	3 0 1 0	3 1 1 0	4 1 0	3 2 0 0 0
Neutrophil infiltration in bronchial submucosa	4	4 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0	2 1 2 0 0
Peribronchial and perivascular edema	4	4 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0	0 0 5 0 0
Foam cell (macrophage) aggregation	4	3 1 0 0	5 0 0 0	4 1 0	2 3 0 0 0
Emphysema	4	4 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0	0 2 1 2 0
Alveolar hemorrhage	4	4 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0	2 1 1 1 0

OA ; Ovalbumin. a) ; No. of guinea pigs.

- ; No pathological changes, ± ; Very slight changes, + ; Slight changes, # ; Moderate changes,

; Severe changes.

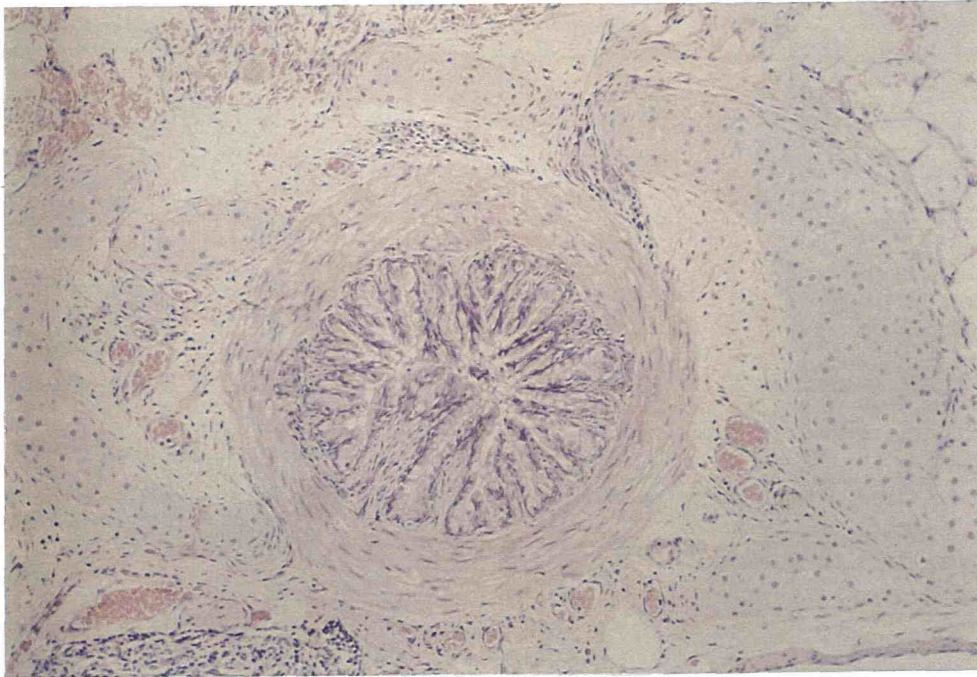


Fig. 2. Bronchoconstriction, lymphocyte infiltration and peribronchial edema after inhalation for 10 times. Hematoxylin & eosin stain. X33.

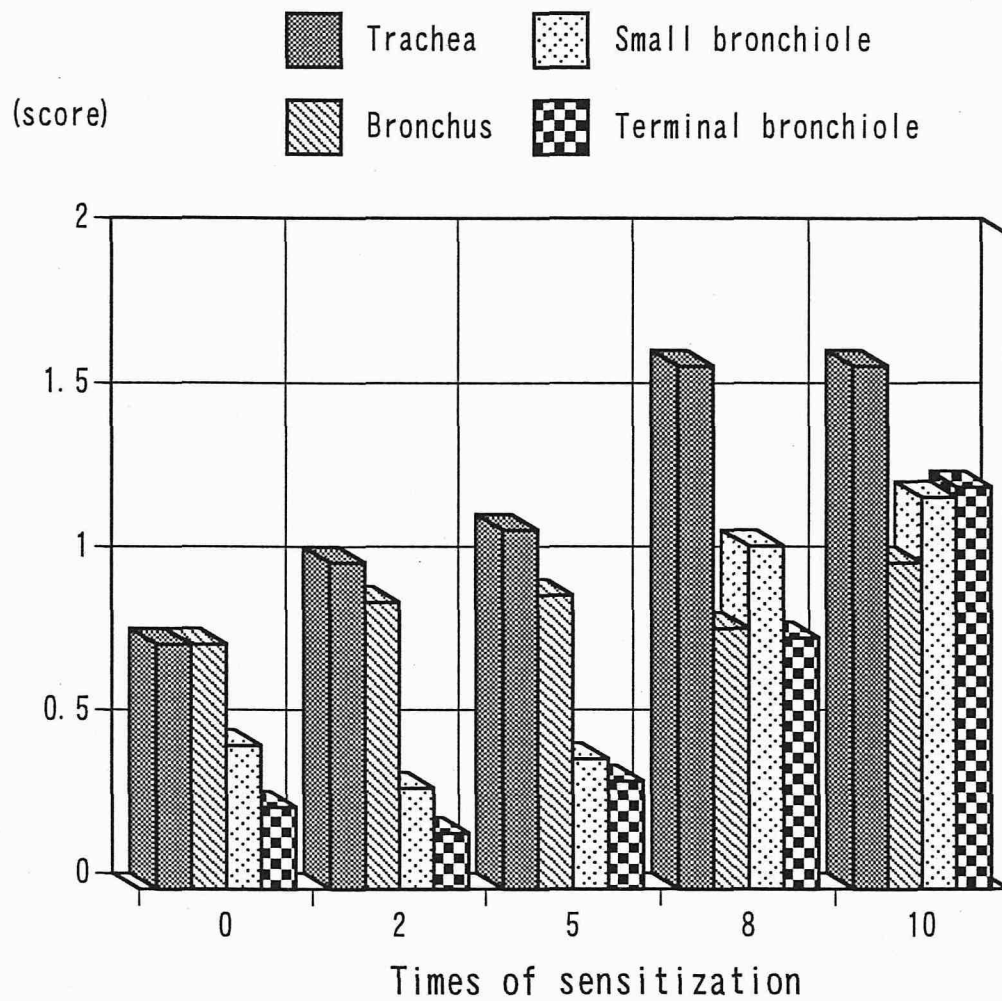


Fig. 3. The degrees of eosinophil infiltration in guinea pigs sensitized with OA inhalation.

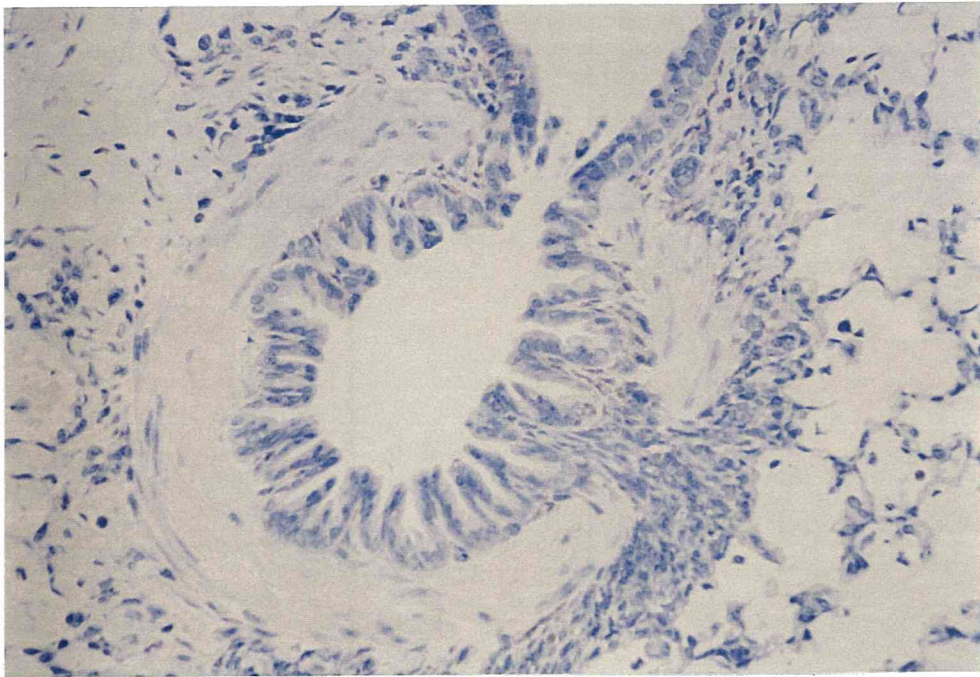


Fig. 4. Eosinophil infiltration after inhalation for 10 times. Giemsa stain. X66.

Table 2. Number of apoptotic cells and PCNA-positive cells in lung tissue of guinea pigs sensitized with OA inhalation

Times of OA sensitization	Number of guinea pigs examined	Number of apoptotic cells	Number of PCNA-positive cells
0	4	70.0 ± 21.8	7.50 ± 3.70
2	4	137.0 ± 134.5	3.75 ± 1.26
5	5	190.0 ± 100.5	15.60 ± 8.08
8	5	244.0 ± 78.5**	19.60 ± 11.99
10	5	476.8 ± 153.0**	134.40 ± 52.50**

OA ; Ovalbumin. Values are expressed as mean ± SD.

** ; Significantly different from the value of 0 time sensitization.

Asterisk indicates $p < 0.01$.

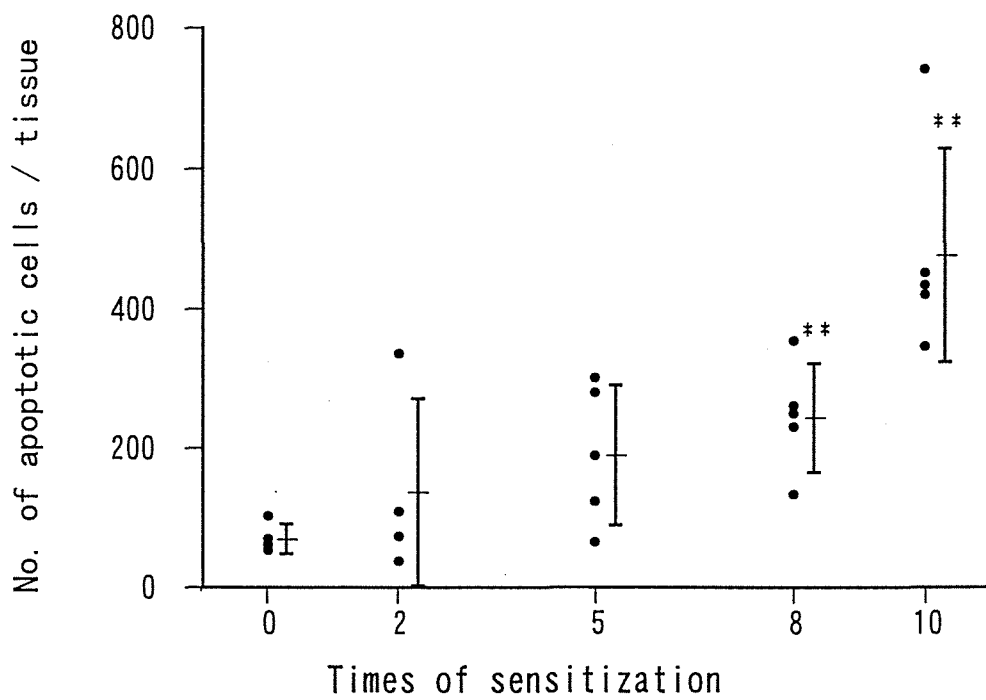


Fig. 5. Number of apoptotic cells in guinea pigs sensitized with OA inhalation.
 **: Significantly different from the value of 0 time sensitization ($p < 0.01$).

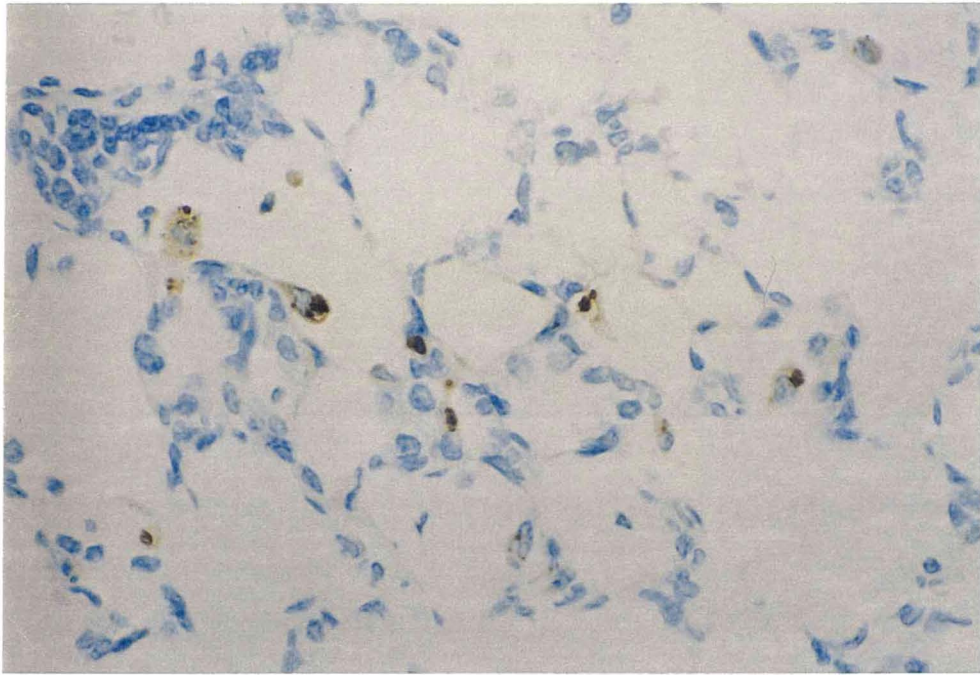


Fig. 6. Many TUNEL positive, apoptotic cells in alveolar regions after inhalation for 10 times. TUNEL stain. X132.

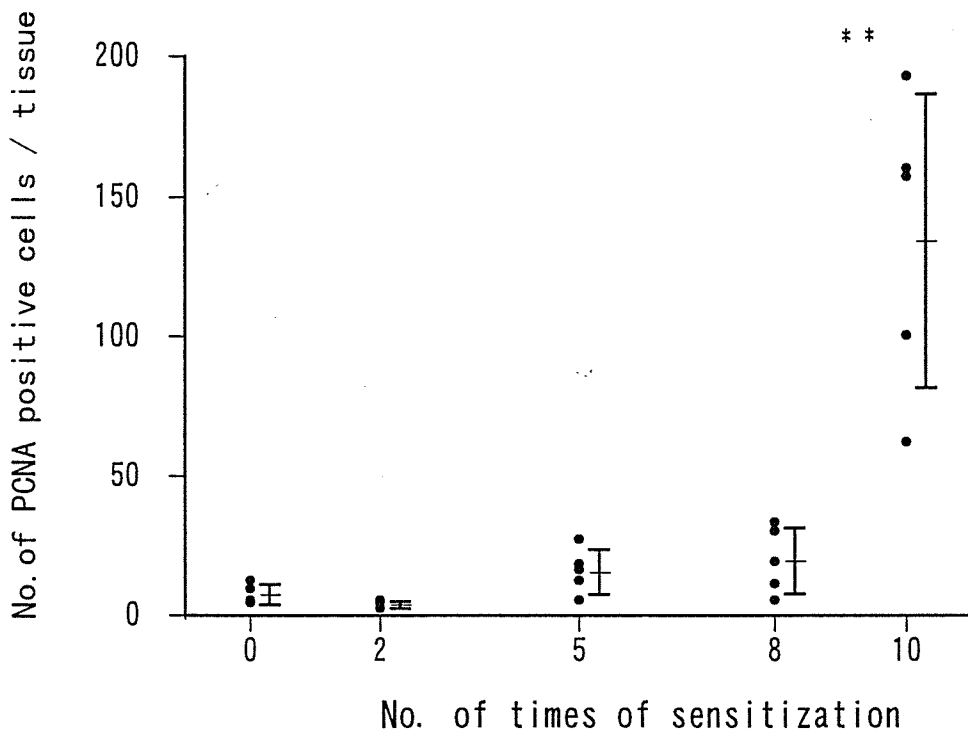


Fig. 7. Number of PCNA positive cells in guinea pigs sensitized with OA inhalation.

** : Significantly different from the value of 0 time sensitization ($p < 0.01$).

3. PCNA 陽性細胞の動態

切片あたりの PCNA 陽性細胞数の変動を Table 2 及び Fig. 7 に示した。曝露 0 回から 8 回目まではほとんど差を認めなかったが、10 回目（感作成立時）には有意 ($p < 0.01$) な著しい増加が認められた。なお、PCNA 陽性細胞の分布はアポトーシス細胞の場合と同様に、末梢の肺胞上皮に多く認められた。

考 察

喘息モデルの作製には種々の方法が知られているが、基本的には能動的もしくは受動的に感作した動物に対し、同一抗原による誘発を行ってアレルギー反応を惹起させるものである^{7, 8)}。しかしながら、抗原の反復曝露による感作時に、感作成立に至る過程で、気道における病理学的な検討を行った報告は少なく、僅かに気管支の基底膜の肥厚、筋層肥大などが感作成立時に認められたという報告があるに過ぎない³⁶⁾。また、同時にアポトーシス及び細胞増殖活性を示す細胞の動態に注目した報告はない。そこで、著者は抗原として卵白アルブミンを反復吸入曝露させることにより感作動物を作製し、曝露回数を重ねることによって気道に対しどのような変化が認められるかを病理組織学的及び免疫組織化学的に検討した。

感作成立動物の剖検及び病理組織学的検査で、肺における出血並びに肺気腫が認められた。肺気腫は気道の閉塞により空気が吸入されても呼出されにくい状態で生じ、また、肺出血は血管平滑筋収縮及び血管透過性亢進の結果生じたことが類推された。事実、本実験においても組織学的に著しい気道収縮が認められ、出血とともに血管及び気管支周囲の水腫も認められた。これらの病態は、いわゆるアナフィラキシー状態に相当する変化であると思われる。しかしながら、アナフィラキシーだけでは説明できない現象として、本実験において 2 回目の処置時より軽度ではあるがリンパ球の浸潤及び好酸球の増加傾向とともに、アポトーシスを示唆する TUNEL 陽性細胞の経時的かつ有意な増加傾向、ならびに吸入曝露 10 回目の感作成

立時に PCNA 陽性細胞数の増加が認められた。好酸球やリンパ球などの炎症細胞の浸潤は気管や気管支粘膜下が主体であったのに対し、TUNEL 及び PCNA 陽性細胞は、末梢の肺胞上皮細胞に相当する部位に多く認められた。何故 TUNEL 及び PCNA 陽性細胞が、標的細胞であると思われる気管、または気管支上皮に出現せず、肺胞上皮に認められるのかは不明であるが、今後、より詳細な究明が必要となるものと思われた。

本実験において、アポトーシス細胞及び PCNA 陽性細胞の増加のメカニズムについては明らかにされなかった。しかしながら、癌治療のために IL-2 を投与された患者において、いわゆる vasucular leak syndrome (以下 VLS と略) が生じることが知られている。VLS の病態としては、肺水腫を伴った血管透過性の亢進、胸水の滲出及び末梢の好酸球増加などが認められる^{23,37)}。同様の VLS は実験的に大量の IL-2 を投与したときにも認められる^{1,10,28)}。Zhang ら⁴³⁾はヒト組み替え IL-2 を投与したラットにおいて、血管内皮への障害、間質の浮腫、気管支及び肺胞上皮の損傷などを観察しており、特に、肺胞上皮の損傷は主に type-II 細胞に見られ、その細胞質の特徴などからアポトーシスによるものと類推している。以上の事実から、本実験で認められた病変は、VLS にきわめて類似した病態であるといえ、卵白アルブミンの反復吸入曝露による感作成立過程で、経時的なアポトーシス細胞の増加に IL-2 などのサイトカインが関与している可能性が示唆された。

要 約

これまでに、モルモットを用いた喘息モデル作製過程で、抗原の反復曝露による能動感作のみを施した動物において、経時的な組織学的検索を実施した報告は少なく、特に、アポトーシス及び細胞増殖活性に注目した報告はない。

本実験では、霧化した卵白アルブミンを経気道的にモルモットに吸入させ、その回数の相違による気道の変化を病理組織学的及び免

疫組織化学的に検討し、以下の結論を得た。

- 1) 卵白アルブミンの 10 回曝露による感作成立時に、肺の出血、気腫及び気管支あるいは血管周囲性の水腫といったアナフィラキシー様の変化が認められた。また、細胞増殖活性を示唆する PCNA 陽性細胞数の増加が見られた。
- 2) アナフィラキシー様の変化以外に気管及び気管支粘膜におけるリンパ球ならびに好酸球の増加傾向が認められた。
- 3) 肺胞上皮細胞において、曝露回数を重ねることにより、アポトーシス細胞数の増加傾向が認められた。
- 4) アポトーシス細胞の発生原因については明らかにされなかったが、その特徴などから、実験動物や癌患者で IL-2 投与によって生じるとされている VLS に類似した変化であることが示唆された。

第 3 章

卵白アルブミンの感作及び誘発により作製した
モルモット喘息病態モデルにおける
病理組織学的及び免疫組織化学的検索

緒 言

好酸球は、以前、アナフィラキシー反応によって遊離されたケミカルメディエーターのいくつかを中和ないし不活化する酵素、たとえば Histaminase⁴²⁾, Arylsulfatase³⁹⁾, Phospholipase D²¹⁾などを有し、ヒスタミン遊離を抑制する Eosinophil-derived inhibitor¹⁷⁾を放出したり、さらに好酸球の顆粒蛋白のひとつである Eosinophil peroxydase が一連の Leukotrien B₄, C₄, D₄ を不活化する¹⁵⁾など、アレルギー反応を鎮静化する方向に働くと考えられてきた。しかしながら、最近になって、好酸球顆粒蛋白である Major basic protein^{9, 12)}, Eosinophil cationic protein²⁵⁾, Eosinophil-derived neurotoxin 及び Eosinophil peroxydase¹³⁾には組織傷害性があること、また、好酸球は強力な炎症性メディエーターである Leukotrien C₄²¹⁾や Platelet activating factor を産生する²⁴⁾ことが明らかになったことなどから、好酸球はアレルギー反応における effector 細胞として位置づけられるようになってきた^{6, 7, 18)}。

アレルギー性喘息患者の気道反応には、気道収縮反応である即時型喘息反応 (immediate asthmatic response : IAR)、気道閉塞を特徴とした遅発型喘息反応 (late asthmatic response : LAR)、及び気道反応性亢進状態である後遅発型喘息反応 (post-late asthmatic response : p-LAR) の3種類が挙げられ、特に、LAR 及び p-LAR において気道の好酸球浸潤が著明である。好酸球浸潤は喘息死の病理診断の一部であり、また、好酸球浸潤部位では気道上皮の破壊像も認められている^{13, 26)}。

これまでに多くの喘息動物モデルを用いた研究が数多くなされてきた。中でもモルモットは実験動物の中でアセチルコリン、ヒスタミンに対する過敏性が高いこと、アナフィラキシー反応では主たる反応の場は呼吸器系であり、反応が軽度の場合には呼吸器系だけの症状が観察されることから、ヒトの気管支喘息モデルとして広く使われてきた^{20, 34, 35)}。これらの喘息モデルの病理組織学的研究で、気管支喘息と気道内好酸球浸潤との関連性、重要性が論議されてきたが、喘息とアポトーシス及び細胞増殖活性に注目した報告は無い。

そこで本試験では、第2章で報告した操作により感作成立動物を製作し、同一抗原によるブースター処置及び誘発を行って、誘発後の経時的な病理組織学的及び免疫組織化学的検討を行った³¹⁾。

材料及び方法

1. 実験動物

本実験には4週齢の雄性 Hartley 系モルモット（日本医科学動物資材研究所より購入、使用時体重約 250 g）計 17 匹を用いた。実験を通じてこれらの動物は温度 23 ± 2 °C、湿度 50 ± 10 %、照明時間 7:00 ~ 19:00 の環境下で飼育し、水（水道水）及び餌（CG-7；日本クレア）をそれぞれ自由に摂取させた。

2. 実験方法

吸入感作、ブースター処理及び誘発は有馬ら²⁾の方法に準じて行った。モルモットをアクリル製 exposure chamber ($300^{(W)} \times 400^{(D)} \times 300^{(H)}$ mm) に入れた後、1%卵白アルブミン（Grade III, Sigma, St. Louis, MO, 1% wt/vol in 0.9% sodium chloride）を超音波ネブライザー（1.5 ml/min., NE-U10B, オムロン株式会社、東京）を用いて、無麻酔、自発呼吸の条件下で、1日1回10分間、吸入曝露を行った（Fig. 1）。この操作を10回繰り返すことにより感作処理を行った。感作の成立は、モルモットの一般状態から喘鳴呼吸やチアノーゼの出現で確認した。

感作成立後、1及び2週目に1%卵白アルブミンを5分間吸入曝露させ、ブースター処理を行った。なお、この際、ヒスタミンにより誘発される致死的なアナフィラキシーショックを避けるために、吸入開始15分前に diphenhydramine（Sigma, St. Louis, MO）60mg/kg を腹腔内に投与した。

2回目のブースター処置から1週間後に誘発を行った。誘発は2%卵白アルブミンを10分間吸入曝露することにより行った。なお、前述と同じ理由で吸入曝露15分前に diphenhydramine, 60mg/kg を腹腔内に投与した（Fig. 8）。

3. 病理組織学的検索

動物は誘発前（対照群）、誘発後 1, 3, 6, 24 及び 48 時間目にエーテル麻酔下で放血致死せしめ (n=2 ~ 3)、気管及び肺を採取した。気管の断端から 10%緩衝ホルマリンを注入し、採取した気管及び肺の固定を行った。モルモットの気管及び肺の一定部位（右肺後葉、主気管支直下）を切り出し、パラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン、ルナ、ギムザ、アルシアン・ブルー PAS、トルイジンブルーの各染色を施し、光学顕微鏡下で観察を行った。

4. アポトーシス細胞の検出

病理組織学的検査で用いたものと同じホルマリン固定、パラフィン包埋切片を使用した。

アポトーシス細胞の検出には、Apop-Tag™Plus-Peroxidase in situ Apoptosis Detection kit (Oncor Inc., Gaithersburg, MO) を用いた TUNEL 法¹¹⁾に従った。

この方法は、アポトーシス細胞においてヌクレオソーム単位で分断された DNA 切断部位を、末端基転移酵素 (Terminal deoxynucleotidyl transferase) と、ビオチン化したデオキシウリジン (dUTP-biotin) を用いて標識し、3,3-diaminobenzidine (DAB Tablets S-300, DAKO Japan Inc., 京都) で発色し、検出する方法である。なお、対比染色としてメチルグリーン染色を施した。

5. PCNA 細胞の検出

病理組織学的検査で用いたものと同じ切片を使用した。切片を脱パラフィン後、オートクレーブ (SS-320, TOMY SEIKO Co. Ltd., 東京) で熱処理 (121 °C, 15 min.) を行い、内因性パーオキシダーゼ除去のために、5% H₂O₂, 5 分間処理を行った。蒸留水及び TBS でリンスした後、抗 PCNA 抗体 (DAKO-EPOS Anti-PCNA/HRP ; DAKO Japan Inc., 京都) を 60 分間インキュベートした。蒸留水及び TBS でリンスした後、DAB で発色し、ヘマトキシリンによる対比染色を施した。

6. 組織学的評価方法

気管及び肺について、光学顕微鏡による検索を実施した。肺については便宜上 3 種類の大きさの異なる気管支について検討を加え

た。すなわち、全周に気管支軟骨が認められる Bronchus を 1 箇所、気管支軟骨が散在する Small bronchiole を 2 箇所、軟骨を認めず、平滑筋のみが存在する Terminal bronchiole を 3 箇所、それぞれ任意に選択し、鏡検を行った。好酸球などの炎症細胞浸潤や病変の程度については次の 5 段階に分類し、以下に示す評点を賦して評価した。- : ほとんど認められない (score : 0)、± : ごく僅かに浸潤又は存在する (score : 1)、+ : 軽度に浸潤又は存在する (score : 2)、++ : 中等度に浸潤又は存在する (score : 3)、+++ : 重度に浸潤又は存在する (score : 4)。

なお、病変の分布が一様でないような場合は、±~+ のように中間として表し、評点も 1.5 とした。アポトーシス細胞及び PCNA 細胞については、切片上の全視野について高倍率 (× 400) 下で観察し、その出現数をカウントした。

7. 統計学的分析

全ての計量値は平均±標準偏差で表し、t 検定 (不等分散の場合は Cochran-Cox 法) を行った。有意水準は両側 5% 以下とした。

結 果

1. 病理組織学的検索結果

卵白アルブミンによる誘発後の経時的な組織学的変化を Table 3 に示した。誘発 1 時間後より、肺における軽度から中等度な血管周囲性の浮腫が認められ、誘発 6 時間後に最も強い変化が認められた。また、気管支収縮は、誘発 1 及び 6 時間後にそれぞれ 1 例ずつ認められた。その他、肺の局所性の出血、好中球及び泡沫細胞の浸潤もしくは集簇が認められたが、いずれも軽度あるいは少数例に過ぎないものであった。

一方、好酸球の浸潤 (Fig. 9) は時間の経過とともにその程度が増す傾向が認められ、誘発 6 時間後で対照群に比較して明らかに浸潤程度が強くなった (Fig. 10)。それ以降はほぼプラトーに達したように思われたが、気管上皮及び気管粘膜下における浸潤は誘発 48 時間後に最も強くなった (Fig. 11)。

Table 3. Time-related histopathological findings in sensitized guinea pigs after provocation by OA inhalation

Time (hr) after OA provocation	Pre provocation				
	1	3	6	24	48
Number of guinea pigs examined	3	3	3	3	2
Grade of the lesions	- ± + #	- ± + #	- ± + #	- ± +	-
<u>Anaphylactic lesions</u>					
Perivascular edema in lungs	3 ^{a)} 1 0 1 1	1 1 0 1	0 2 0 1	3 0 0	2
Pulmonary bronchoconstriction	3 2 0 1 0	3 0 0 0	2 1 0 0	3 0 0	2
<u>Other lesions</u>					
Alveolar hemorrhage	3 3 0 0 0	2 0 1 0	3 0 0 0	2 0 1	2
Neutrophil infiltration in bronchial submucosa	3 3 0 0 0	2 1 0 0	3 0 0 0	3 0 0	2
Foam cell aggregation in lungs	3 3 0 0 0	3 0 0 0	3 0 0 0	2 0 1	2

-: No pathological changes, ±: very slight changes, +: slight changes, #: Moderate changes, a): Number of guinea pigs.

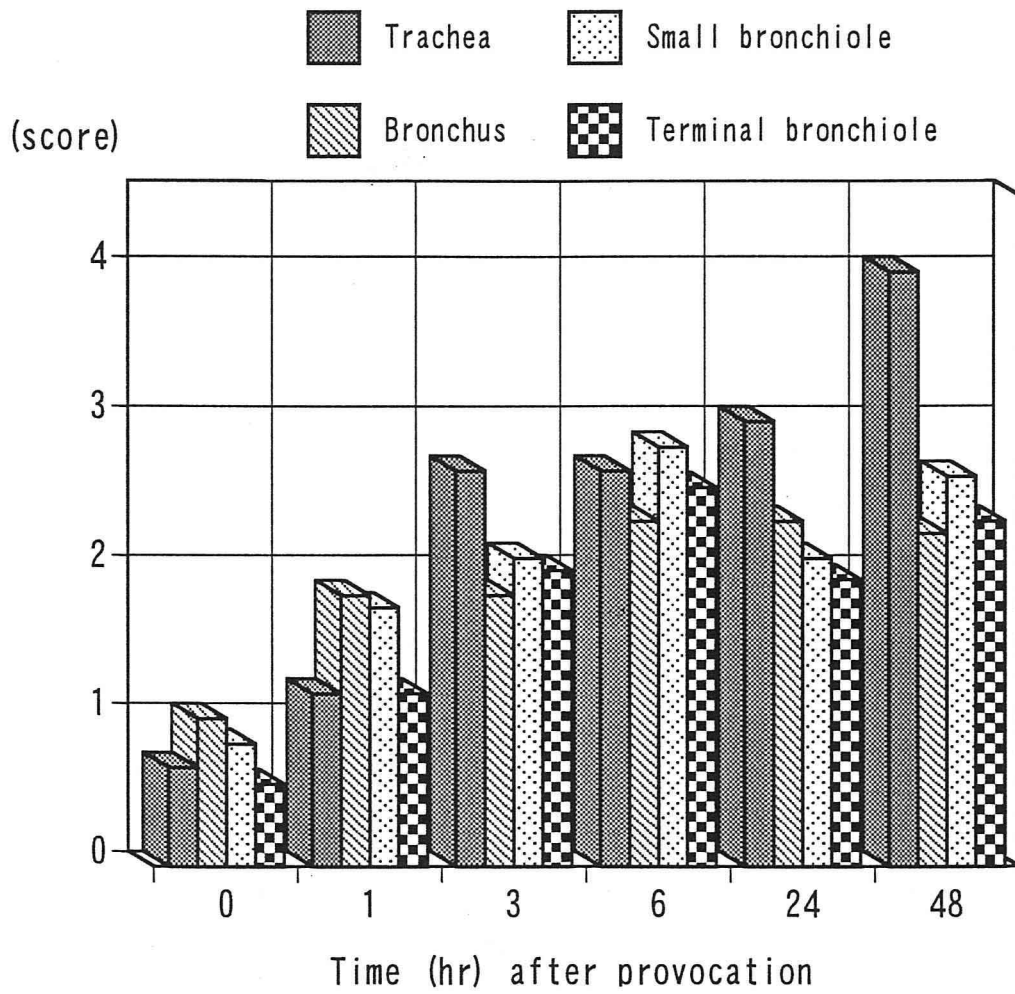


Fig. 9. The degrees of eosinophil infiltration in lung tissue of sensitized guinea pigs after provocation with OA inhalation.

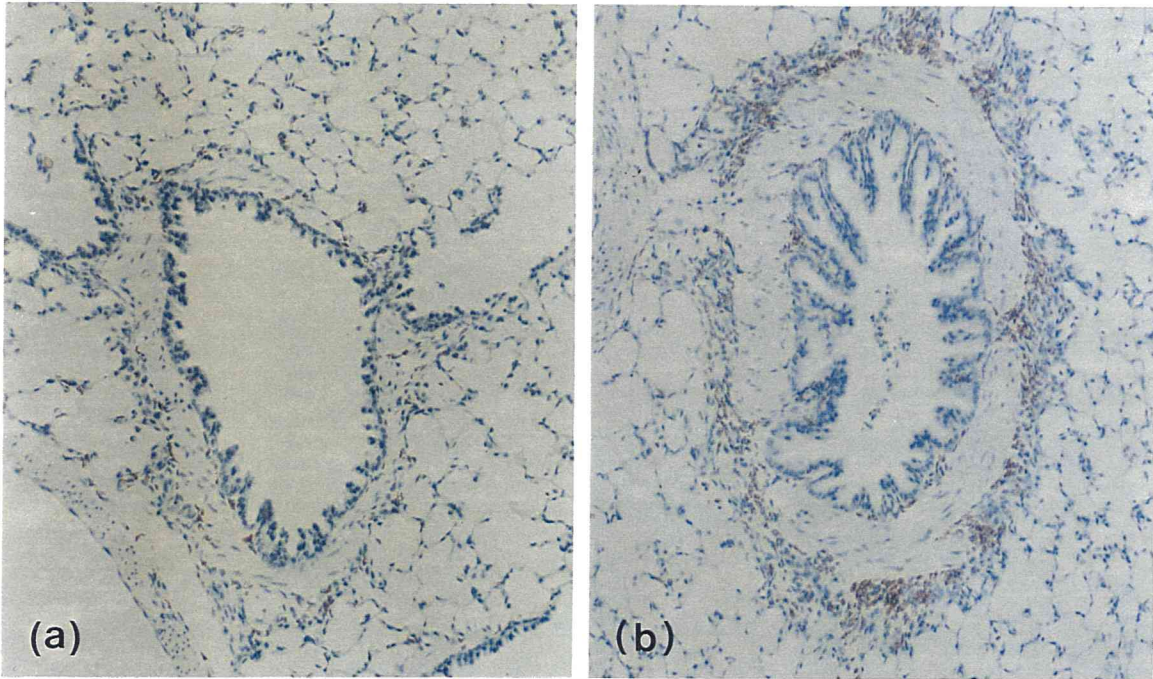


Fig. 10. (a):No pathological changes at pre-provocation,
and (b):moderate to severe eosinophil infiltration
at small bronchiolar mucosa or submucosa at 6 hrs
after provocation. Luna stain. X33.

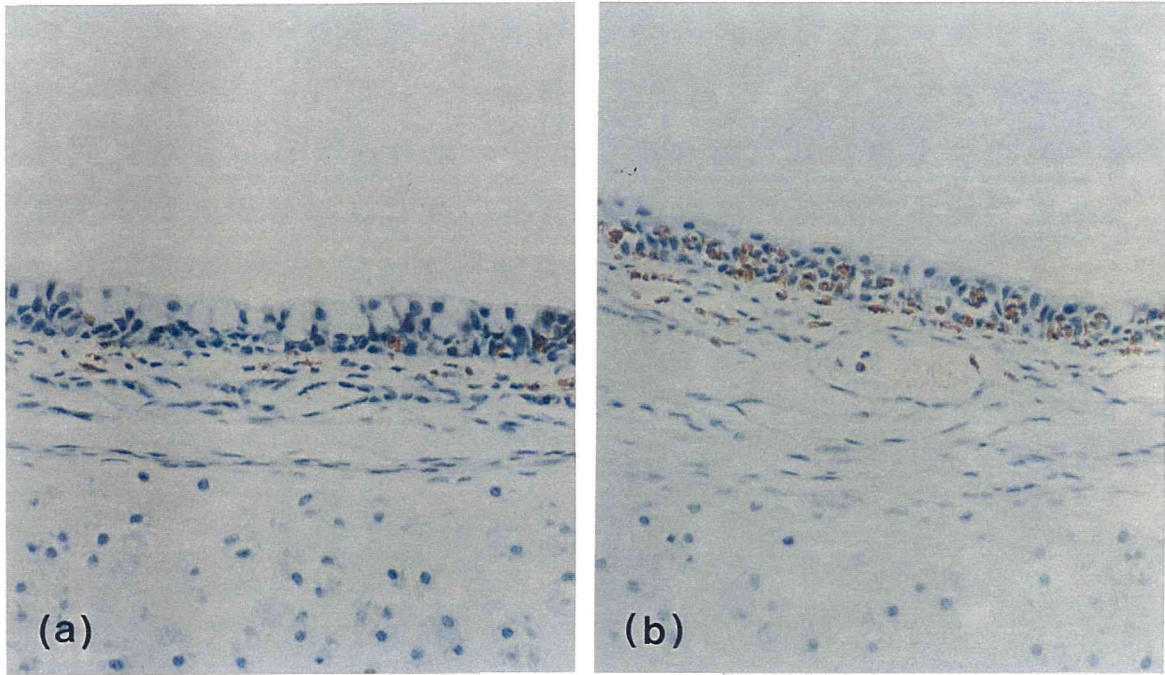


Fig. 11. (a):No pathological changes at pre-provocation, and (b):moderate to severe eosinophil infiltration at tracheal mucosa or submucosa at 48 hrs after provocation. Luna stain. X33.

2. アポトーシス細胞の動態

Fig. 12 及び Table 4 に示したように、誘発 6 時間後までは漸減する傾向が認められ、誘発 3 及び 6 時間後で有意 ($p < 0.05$) な減少が認められた。しかしながら、誘発 24 時間後では対照群に比し有意 ($p < 0.01$) かつ急激な増加が認められた。その後、誘発 48 時間後には対照群のレベルに復した。なお、TUNEL 陽性細胞の分布は気管又は気管支上皮よりも末梢の肺胞上皮に多く認められた (Fig. 13)。

3. PCNA 陽性細胞の動態

卵白アルブミン誘発後の経時的な PCNA 陽性細胞出現数の変化を Fig. 14 及び Table 4 に示した。誘発 3 時間後に一過性の増加が認められたが有意差は認められなかった。その後、24 時間までは対照群と同じレベルで推移したが、誘発 48 時間後には再び増加傾向が見られ、例数は少ないながら、有意差 ($p < 0.05$) が認められた。なお、PCNA 陽性細胞は TUNEL 陽性細胞と同様、末梢の肺胞上皮に多く出現する傾向が認められた。

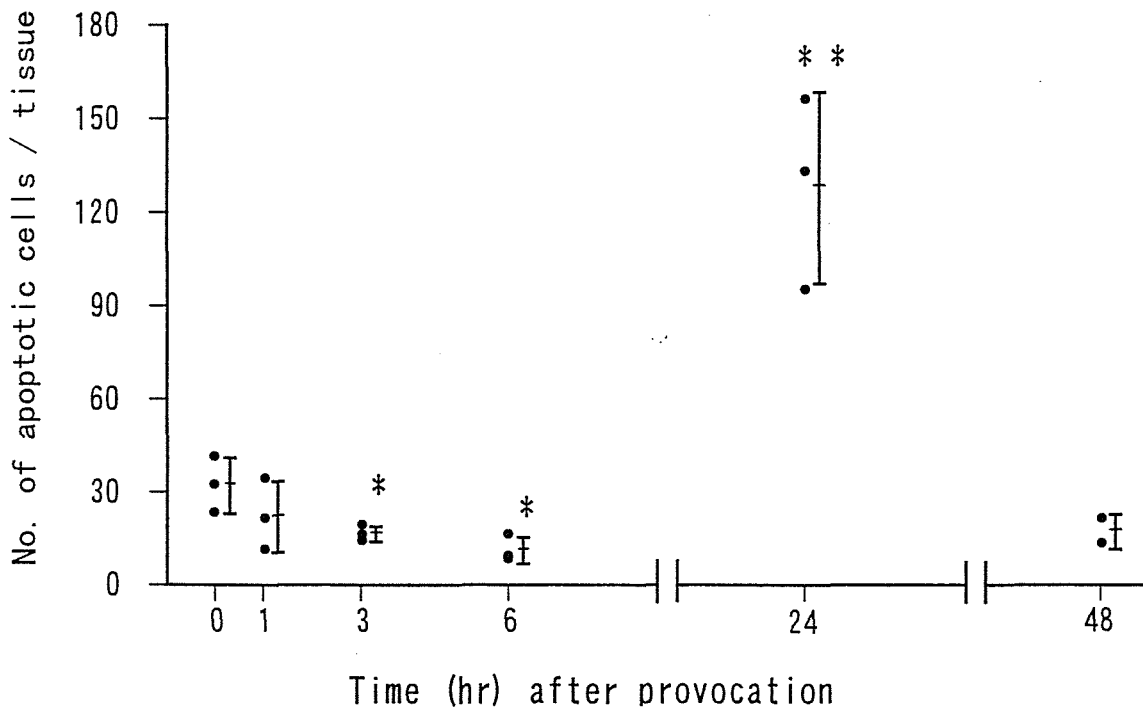


Fig. 12. Number of apoptotic cells in lung tissue of sensitized guinea pigs after provocation by OA inhalation. *, **: Significantly different from the value of pre-provocation (0 hr). Asterisk indicates $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

Table 4. Number of apoptotic cells and PCNA-positive cells in lung tissue of sensitized guinea pigs after provocation by OA inhalation

Time (hr) after OA provocation	Number of guinea pigs examined	Number of apoptotic cells	Number of PCNA-positive cells
Pre-provocation	3	32.00 ± 9.00	16.33 ± 6.51
1	3	22.00 ± 11.53	16.00 ± 7.55
3	3	16.33 ± 2.52*	41.33 ± 19.14
6	3	11.00 ± 4.36*	15.67 ± 12.06
24	3	128.00 ± 30.81**	20.67 ± 17.47
48	2	17.00 ± 5.66	45.00 ± 2.83*

OA ; Ovalbumin. Values are expressed as mean ± SD.
 *,**; Significantly different from the value of pre-provocation.
 Asterisk indicates $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

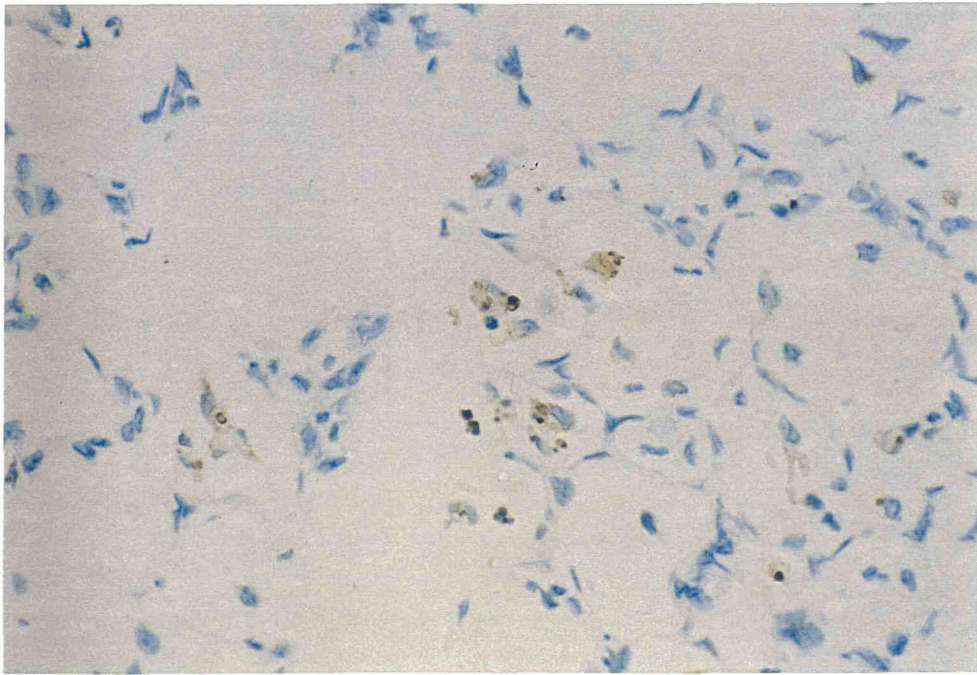


Fig. 13. Many TUNEL positive, apoptotic cells in alveolar compartment at 24 hrs after provocation. TUNEL stain. X132.

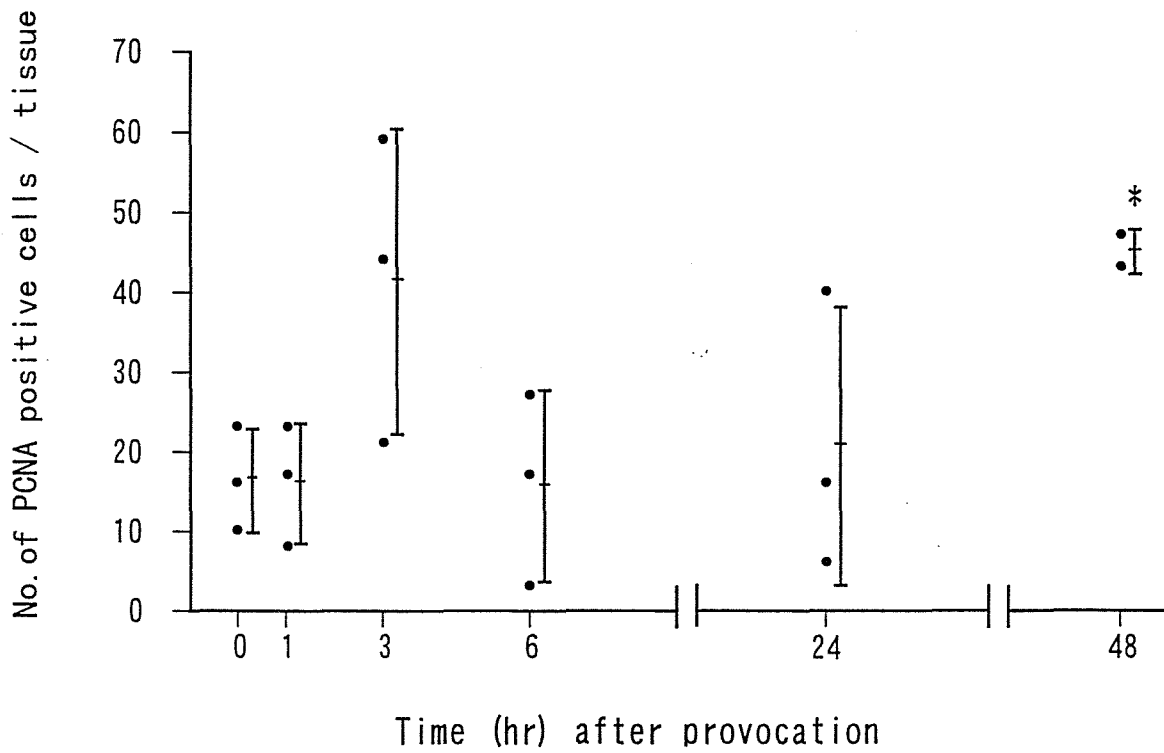


Fig. 14. Number of PCNA positive cells in lung tissue of sensitized guinea pigs after provocation by OA inhalation. *: Significantly different from the value of pre-provocation (0 hr). Asterisk indicates $p < 0.05$.

考 察

第2章で述べたように、霧化した卵白アルブミンを経気道的にモルモットに吸入曝露させたところ、感作成立時に、肺の出血、気腫及び気管支あるいは血管周囲性の水腫といったアナフィラキシー様の変化が認められた。本実験では、更に同様の操作により感作を成立させた動物に対し、同一抗原によるブースター及び誘発処置を施し、モルモットの気道における誘発後の経時的な変化を病理組織学的及び免疫組織化学的に検討した。

本実験において、病理組織学的に、誘発後比較的早期から肺における軽度から中等度な血管周囲性の浮腫及び気管支の収縮が認められ、これらの変化はいずれもアナフィラキシーを示唆する変化と思われた。その後、気道粘膜における好酸球の浸潤が時間の経過とともに、その程度が増す傾向が認められた。これらの病理組織学的変化は、いわゆる喘息患者における IAR 及び LAR に相当する変化であり^{6, 22)}、IAR の後、4 ないし 12 時間で好酸球浸潤に伴って LAR に進展する事実³⁾とも一致した。また、喘息モデルを用いた研究において、Iijima ら¹⁸⁾は即時型喘息反応を示したモルモットの 40 %にのみ遅発型喘息反応を誘発させ、湯川ら⁴⁾は卵白アルブミン受身感作モルモットにおいて遅発型喘息反応を認めていないなど、IAR 及び LAR を同じ実験系で確認できるモデルは少ない。以上のような観点から、本喘息モデルがヒト喘息病態の研究並びにその病態の解明に有用なモデルとなりうることが示唆された。

第2章で示した実験において、著者は感作成立に至る過程でアポトーシス細胞と細胞増殖活性を示す PCNA 陽性細胞の肺胞上皮領域における増加を観察した。同様の変化は本実験においても認められ、これらの事実は前回の所見を裏付けるものであることが示唆された。本実験では、これらの肺胞上皮の変化の発生機序並びにそれらの重要性を明らかにすることはできなかったが、著者の知る限りでは、ヒト喘息患者及び喘息病態動物モデルにおいて、アポトーシス細胞と細胞増殖活性を示す PCNA 陽性細胞の肺胞上皮領域における

増加を認めたとの報告はなく、喘息の発生機序あるいは素因の一つに新規の可能性を示唆するものと思われ、今後、注目すべき病変であると考えられた。

要 約

霧化させた卵白アルブミンの反復吸入曝露によって、能動感作を行ったモルモットに対し、同一抗原によるブースター処置並びに誘発処置を施した。これらの気道における誘発後の経時的な変化を病理組織学的及び免疫組織化学的に検討し、以下の結論を得た。

- 1) 病理組織学的に、誘発後比較的早期から肺における軽度から中等度な血管周囲性の浮腫及び気管支の収縮が認められ、これらの変化はいずれもアナフィラキシーを示唆する変化と思われた。
- 2) その後、気道粘膜における好酸球の浸潤が時間の経過とともに、その程度が増す傾向が認められた。
- 3) これらの病理組織学的変化は、いわゆる喘息患者における IAR 及び LAR に相当する変化であり、本喘息モデルがヒト喘息病態の研究並びにその病態の解明に有用なモデルとなりうることが示唆された。
- 4) アポトーシス細胞と細胞増殖活性を示す PCNA 陽性細胞の肺胞上皮領域における増加が認められた。ヒト喘息患者及び喘息病態動物モデルで、同様の報告はされていない。
- 5) これらの肺胞上皮の変化の発生機序並びにそれらの重要性に関しては明らかにされなかったが、今後、注目すべき病変であると思われた。

第 4 章

総 括

気管支喘息の病因、病態の解明とその治療法の確立は、優れた動物モデルの開発によって可能となる。喘息モデルに関する研究は数多くなされてきたが、その作製は基本的には能動的もしくは受動的感作及び誘発を行うものであり、感作のみを施した動物における経時的な病理組織学的検討を行った報告は少なく、特にアポトーシス及び細胞増殖活性を示す細胞の動態に注目した報告はない。また、IAR から LAR に推移する過程で、両病態に対する経時的な病理組織学的検討を実施した報告も極めて少ない。

本研究において、著者は抗原として卵白アルブミンを用い、これを霧化して反復吸入曝露させることにより感作モルモットを作製し、曝露回数を重ねることによって気道に対しどのような変化が認められるかを病理組織学的及び免疫組織化学的に検討した³²⁾。更に、同様の操作で作製した感作成立動物に対し、同一抗原によるブースター処置及び誘発を行って喘息病態モデルを作製し、気道における変化を病理組織学的及び免疫組織化学的に経時的な検討³³⁾を加え、以下の結果を得た。

1. 卵白アルブミン反復吸入曝露によるモルモット気道における病理組織学的及び免疫組織化学的検索

霧化した卵白アルブミンを経気道的にモルモットに吸入させ、その回数の相違によって、感作成立に至る気道の変化を病理組織学的及び免疫組織化学的に検討し、以下の結論を得た。

- 1) 卵白アルブミンの 10 回曝露による感作成立時に、アナフィラキシー様の変化とともに、細胞増殖活性を示唆する PCNA 陽性細胞数の増加が見られた。
- 2) 気管及び気管支粘膜におけるリンパ球ならびに好酸球の増加傾向が認められた。

- 3) 肺胞上皮細胞において、曝露回数を重ねることにより、アポトーシス細胞数の増加傾向が認められた。
- 4) アポトーシス細胞の発生原因については明らかにされなかったが、IL-2投与によって生じるとされている VLS に類似した変化であることが示唆された。

2. 卵白アルブミンの感作及び誘発により作製したモルモット喘息病態モデルにおける病理組織学的及び免疫組織化学的検索

霧化させた卵白アルブミンの反復吸入曝露によって、能動感作を行ったモルモットに対し、同一抗原によるブースター処置並びに誘発処置を施した。これらの気道における誘発後の経時的な変化を病理組織学的及び免疫組織化学的に検討し、以下の結論を得た。

- 1) 病理組織学的に、誘発後比較的早期からアナフィラキシーを示唆する変化が肺において認められた。
- 2) 時間の経過とともに、好酸球浸潤程度が増す傾向が認められた。
- 3) これらの変化は、いわゆる喘息患者における IAR 及び LAR に相当する変化であり、本喘息モデルがヒト喘息の研究並びにその病態の解明に有用なモデルとなりうることが示唆された。
- 4) アポトーシス細胞と細胞増殖活性を示す PCNA 陽性細胞の肺胞上皮領域における増加が認められた。
- 5) これらの肺胞上皮の変化の発生機序並びにそれらの重要性に関しては明らかにされなかったが、今後、注目すべき病変であると思われた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に対し終始適切なる御指導、御校閲を賜りました元鳥取大学農学部、現北海道大学獣医学部梅村孝司先生に衷心より感謝いたします。また、本論文の査読並びに御助言を賜りました鳥取大学農学部上原正人先生、御助言とご鞭撻を賜りました宮崎大学農学部立山晋先生、鳥取大学農学部島田章則先生、同じく北川智敬先生、菱沼貢先生の各諸先生方に深甚なる謝意を表します。

本研究の機会を与えて頂き、終始御援助と励ましの言葉を賜りました元杏林製薬株式会社代表取締役会長、故荻原秀博士、杏林製薬株式会社常務取締役、西納啓吾博士、研究センター所長、岡田孝道博士に厚く御礼申し上げます。最後に、本研究遂行に際し、実験動物の感作手技に御指導を頂いた中央研究所創薬研究三部部長、大橋光雄博士並びに種々の御協力を頂いた安全性研究部の諸氏に感謝いたします。

文 献

1) Anderson, T.D. and Hayes, T.J. : Toxicity of human recombinant interleukin-2 in rats. Pathologic changes are characterized by marked lymphocytic and eosinophilic proliferation and multisystem involvement. *Lab.Invest.*, **60**, 331-346, 1989.

2) 有馬雅史、湯川龍雄、寺師義典、牧野莊平：モルモット気道アレルギーにおける遅発型反応とヒスタミンに対する気道過敏性亢進に対する cyclosporine A の効果。日胸疾会誌，**29**, 1089-1095, 1991.

3) Booij-Noord, H., Orië, N.G.M., and De Vries, K. : Immediate and late bronchial obstructive reactions to inhalation of house dust and protective effects of disodium cromoglycate and prednisolone. *J.Allergy Clin.Immunol.*, **48**, 344-354, 1971.

4) 陳沆，棟方充，川上義和：サイトカインの気道における役割。呼吸と循環，**41**, 104-112, 1993.

5) Cockcroft, D.W., Ruffin, R.E., Dolovich, J., and Hargreave, F.E. : Allergen-induced increase in non-allergic bronchial reactivity. *Clin.Allergy*, **7**, 503-513, 1977.

6) De Monchy, J.G.R., Kauffman, H.F., Venge, P., K oeter, G.H., Jansen, H.M., Sluiter, H.J., and De Vries, K. : Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am.Rev.Respir.Dis.*, **131**, 373-376, 1985.

7) Dunn, C.J., Elliott, G.A., Oostveen, J.A., and Richards, I.M. : Development of a prolonged eosinophil-rich inflammatory leukocyte infiltration in the guinea-pig asthmatic response to ovalbumin inhalation. *Am.Rev.Respir.Dis.* **137**, 541-547, 1988.

8) Frew, A.J., Moqbel, R., Azzawi, M., Hartnell, A., Barkans, J., Jeffery, P.K., Kay, A.B., Scheper, R.J., Varley, J., Church, M.K., and Holgate, S.T. : T lymphocytes and eosinophils in

allergen-induced late-phase asthmatic reactions in the guinea pig. *Am.Rev.Respir.Dis.*, **141**, 407-413, 1990.

9) Frigas, E., Loegering, D.A., and Gleich, G.J. : Cytotoxic effect of the guinea pig eosinophil major basic protein on trachial epithelium. *Lab.Invest.*, **42**, 35-43, 1980.

10) Fujita, S., Puri, R.K., Yu, Z.X., Travis, W.D., and Ferrans, V.J. : An ultrastructural study of *in vivo* interactions between lymphocytes and endothelial cells in the pathogenesis of the vascular leak syndrome induced by interleukin-2. *Cancer*, **68**, 2169-2174, 1991.

11) Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S.A. : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Cell Biol.*, **119**, 493-501, 1992.

12) Gleich, G.J., Frigas, E., Loegering, D.A. Wassom, D.L., and Steinmuller, D. : Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein. *J.Immunol.*, **123**, 2925-2927, 1979.

13) Gleich, G.J., Flavahan, N.A., Fujisawa, T., and Vanhoutte, P.M. : The eosinophil as a mediator of damage to respiratory epithelium : A model for bronchial hyperreactivity. *J.Allergy Clin.Immunol.*, **81**, 776-781, 1988.

14) Hargreave, F.E., Ryan, G., Thomson, N.C., O'Byrne, P.M., Latimer, K., Juniper, E.F., and Dolovich, J. : Bronchial responsiveness to histamine or methacholine in asthma : measurement and clinical significance. *J.Allergy Clin.Immunol.* **68**, 347-355, 1981.

15) Henderson, W.R., Jörg, A., and Klebanoff, S.J. : Eosinophil peroxidase-mediated inactivation of leukotrienes B₄, C₄, and D₄. *J.Immunol.*, **128**, 2609-2613, 1982.

16) Holgate, S.T., Benyon, R.C., Howarth, P.H., Agius, R., Hardy, C., Robinson, C., Durham, S.R., Kay, A.B., and Church, M.K. : Relationship between mediator release from human lung mast cells in vitro and in vivo. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.*, **77**, 47-56, 1985.

- 17) Hubscher, T. : Role of the eosinophil in the allergic reactions. I. EDI-an eosinophil-derived inhibitor of histamine release. *J.Immunol.*, **114**, 1379-1388, 1975.
- 18) Iijima, H., Ishii, M., Yamauchi, K., Chao, C-L., Kimura, K., Shimura, S., Shindoh, Y., Inoue, H., Mue, S., and Takishima, T. : Bronchoalveolar lavage and histologic characterization of late asthmatic response in guinea pigs. *Am.Rev.Respir.Dis.*, **136**, 922-929, 1987.
- 19) Ishida, K., Kelly, L.J., Thomson, R.J., Beattie, L.L., and Schellenberg, R.R. : Repeated antigen challenge induced airway hyperresponsiveness with tissue eosinophilia in guinea pigs. *J.Appl.Physiol.*, **87**, 983-910, 1989.
- 20) 伊藤幸治 : 気管支喘息の動物モデル. 医学のあゆみ, **123**, 456-463, 1982.
- 21) Kater, L.A., Goetzl, E.J. and Austen, K.F. : Isolation of human eosinophil phospholipase D. *J.Clin.Invest.*, **57**, 1173-1180, 1976.
- 22) Kay, A.B. : Asthma and inflammation. *J.Allergy Clin.Immunol.*, **87**, 893-910, 1991.
- 23) Kovach, J.S. and Gleich, G.J. : Eosinophilia and fluid retention in systemic administration of interleukin-2. *J.Clin.Oncol.* **4**, 815-816, 1986.
- 24) Lee, T-C., Lenihan, D.J., Malone, B., Roddy, L.L., and Wasserman, S.I. : Increased biosynthesis of platelet-activating factor in activated human eosinophils. *J.Biol.Chem.*, **259**, 5526-5530, 1984.
- 25) Motojima, S., Frigas, E., Loegering, D.A., and Gleich, G.J. : Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig trachial epithelium *in vitro*. *Am.Rev.Respir.Dis.*, **139**, 801-805, 1989.

- 26) 無江昭子 : 気管支喘息の病理学的研究 - 気管支喘息の病理形態像 - . アレルギー , 20, 885-902, 1971.
- 27) Newman Taylor, A.J., Davies, R.J., Hendrick, D.J., and Pepys, J. : Recurrent nocturnal asthmatic reactions to bronchial provocation tests. *Clin.Allergy*, 9, 213-219, 1979.
- 28) Queluz, T.T., Brunda, M., Vladutiu, A.O., Brentjens, J.R., and Andres, G. : Morphological basis of pulmonary edema in mice with cytokine-induced vascular leak syndrome. *Exp.Lung Res.* 17, 1095-1108. 1991.
- 29) Renzi, P.M., Sapienza, S., Du, T., Wang, N.S., and Martin, J.G. : Lymphokine-induced airway hyperresponsiveness in the rat. *Am.Rev.Respir.Dis.*, 143, 375-379, 1991.
- 30) Renzi, P.M., Du, T., Sapienza, S., Wang, N.S., and Martin, J.G. : Acute Effects of interleukin-2 on lung mechanics and airway responsiveness in rats. *Am.Rev.Respir.Dis.*, 143, 380-385, 1991.
- 31) Renzi, P.M., Sapienza, S., Wasserman, S., Du, T., Olivensten, R., Wang, N.S., and Martin, J.G. : Effect of interleukin-2 on the airway response to antigen in the rat. *Am.Rev.Respir.Dis.*, 146, 163-169, 1992.
- 32) Sato, Y. and Umemura, T. : Histopathological and immunohistochemical evaluation on airways of guinea pigs sensitized with aerosolized ovalbumin inhalation. *J.Toxicol.Pathol.*, 10, 199-203, 1997.
- 33) Sato, Y., Kishi, T., and Umemura, T. : Histopathological and immunohistochemical studies on experimental asthmatic model induced by aerosolized ovalbumin inhalation in guinea pigs. *J.Toxicol.Sci.*, 23, 69-75, 1998.

- 34) 下山 冽, 田谷 禎増, 小林 節雄 : モルモットにおける実験喘息に関する研究. *アレルギー*, 20, 386-394, 1971.
- 35) 須甲 松伸 : 気管支喘息の動物モデル. *医学のあゆみ*, 159, 640-643, 1991.
- 36) 寺師 義典, 湯川 龍雄, 福田 健, 牧野 荘平 : モルモット気道アレルギーにおける遅発型反応の出現とその発症因子に関する基礎的研究. I. 同種抗体受身感作モデル及び抗原反復吸入能動感作モデルの比較検討. *アレルギー*, 37, 980-991, 1988.
- 37) Van Haelst Pisani, C., Kovach, J.S., Kita, H., Leiferman, K.M., Gleich, G.J., Silver, J.E. Dennin, R., and Abrams, J.S. : Administration of interleukin-2 (IL-2) results in increased plasma concentration of IL-5 and eosinophilia in patients with cancer. *Blood*, 78, 1538-1544, 1991.
- 38) Wardlaw, A.J., Dunnette, S., Gleich, G.J., Collins, J.V., and Kay, A.B. : Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma : Relationship to bronchial hyperreactivity. *Am.Rev.Respir.Dis.*, 137, 62-69, 1988.
- 39) Wasserman, S.I., Goetzl, E.J., and Austen, K.F. : Inactivation of slow reacting substance of anaphylaxis by human eosinophil arylsulfatase. *J.Immunol.*, 114, 645-649, 1975.
- 40) Weller, P.F., Lee, C.W., Foster, D.W., Corey, E.J., Austen, K.F., and Lewis, R.A. : Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophils: Predominant production of leukotriene C₄. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 80, 7626-7630, 1983.
- 41) 湯川 龍雄, 寺師 義典, 福田 健, 牧野 荘平, 細野 克彦, 副島 和彦 : モルモット気道アレルギーにおける組織学的検討. I. 同種抗体受身感作モデルにおける単回抗原暴露後の好酸球浸潤と気道形態変

化 . アレルギー , 36, 227-237, 1987.

42) Zeiger, R.S. and Colten, H.R. : Histaminase release from human eosinophils. *J.Immunol.*, 118, 540-543, 1970.

43) Zhang, J., Wenthold, Jr, R.J., Yu, Z-X., Herman, E.H., and Ferrans, V.J. : Characterization of the pulmonary lesions induced in rats by human recombinant interleukin-2. *Toxicol.Pathol.*, 23, 653-666, 1995.

END