

血小板活性化因子 (PAF) による マウス皮膚血管透過性亢進に関する研究

—抗アレルギー薬の評価への応用—

赤木玲子・赤木正明*

要 約

血小板活性化因子 (PAF) (0.125-25ng/25 μ l) の皮内注射は、マウス皮膚の血管透過性を用量依存的に亢進した。用量-反応曲線の直線性は、5から25ng/25 μ lの用量範囲で満足いくものであり、その相関係数は、青色斑点の面積では0.974、漏出色素量では0.999であった。抗PAF薬であるWEB 2086 (0.5-1mg/kg, p.o.) は、PAFにより誘発された皮膚反応を特異的に抑制し、抗leukotriene (LT) 薬であるFPL-55712は、PAFによる皮膚反応を抑制しなかった。この結果は、PAFにより誘発される皮膚反応は、LTの遊離を介していないことを示唆している。抗アレルギー薬であるterfenadineおよびketotifenはPAFにより誘発される皮膚反応を用量依存的に抑制した。以上の結果より、PAFがマウスの皮膚において血管透過性を用量依存的に亢進すること、およびin vivoにおける抗アレルギー薬の抗PAF作用の評価にPAFによる皮膚反応が利用できることが明らかになった。

緒 言

気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎あるいは蕁麻疹のようなアレルギー性疾患に、抗原-抗体反応により惹起されるhistamine, slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) の成分であるleukotrienes (LTs), 血小板活性化因子 (PAF) などのchemical mediatorsの遊離が関与し、これらの遊離されたmediatorsにより種々な反応、例えば気管支平滑筋の収縮、血管透過性の亢進、搔痒感などが誘発されることはよく知られている。¹⁻³⁾ 多くの抗アレルギー薬は、肥満細胞からのこれらのchemical mediatorsの遊離を抑制することによりその効果を発揮することが知られている。また、histamineやLTsにより誘発される気管筋や回腸の収縮に対して拮抗する薬物も知られている。^{4) 5)} このようなchemical mediatorsに対する拮抗作用は、遊離抑制作用と同様にアレルギー疾患の治療に有益

であると考えられる。

Histamine, LTs, PAFなどを皮内注射すると、ヒトの皮膚局所において血管透過性の亢進、紅斑および痒みを誘発することが報告されている^{6) 7)} が、動物を用いた抗アレルギー薬や抗炎症薬の効力検定には、血管透過性の亢進を定量的に測定する目的で、透過性亢進の指標として血漿タンパクと結合性の良い色素を静注する方法が広く利用されてきた。本研究では、マウス皮内に注射されたPAFにより誘発される血管透過性亢進の濃度依存性および再現性について検討し、この方法が抗アレルギー薬の評価法として利用できるか否かについて解析したので、以下にその成果を報告する。

実験方法

1. PAFおよびleukotriene D₄ (LTD₄) により誘発される血管透過性亢進の測定

実験には、体重30-35gの雄性ddyマウスを用いた。0.5% Evans blue溶液 (0.1ml/10g) を静注した直後に、種々な濃度のPAFあるいはLTD₄溶液25 μ lを予め毛を刈り取った背部皮内に6ヵ所注射した。皮内注射30分後にマウスを出血致死させ、皮膚を剥離し、血管透過性亢進により生じた青色斑点の長径と短径をノギスで計測した。測定した長径と短径より青色斑点の面積を計算した。治験薬は、あらかじめ一晩絶食させたマウスにPAFあるいはLTD₄の皮内注射1時間前に生理食塩水に溶解させるか0.25% carboxymethylcellulose に懸濁させて経口投与した。

2. 漏出色素の抽出法

血管透過性亢進により皮膚に漏出した色素量は、片山らの方法⁸⁾の変法により抽出し、比色法により定量した。すなわち、青色色素斑を切り取り、小片に細切した後1N KOH 0.5ml中で37 $^{\circ}$ C, 12時間振とうした。強アルカリ溶液中で溶解した皮膚片に0.6Nリン酸とアセトンの5:13混液4.5mlを加え、3000rpm, 15分間遠心分離して得られた上清の620nmの吸光度を吸光度計により測

*徳島文理大学薬学部薬理学教室

定した。

3. 統計処理

グループ間の平均値の差の有意性については、Student's t testを用いて解析し、危険率5%以下を有意であるとみなした。

実験結果

1. PAFにより誘発されるマウス皮膚血管透過性の亢進

種々な濃度のPAF (0.125-25ng/25 μ l) をマウス背部皮内に注射すると、濃度依存的な透過性の亢進が誘発された(表1)。PAFの濃度と血管透過性亢進との間にはほぼ直線的な関係が成立し、特に、5-25ng/25 μ lの濃度範囲では回帰直線の相関係数として面積に対して0.974、漏出色素量に対して0.999が算出された。それ故に、PAFにより誘発される血管透過性亢進に対する拮抗薬の評価には、5, 12.5, 25ng/25 μ lの濃度を採用した。

表1 PAFにより誘発されたマウス皮膚血管透過性の亢進の青色斑点の面積と漏出色素量による検討

| Amount of injected PAF (ng/site) | Area (mm ²) | Dye leakage (μ g/ml) |
|----------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 0.125 | 9.4 \pm 0.8 | 0.42 \pm 0.04 |
| 0.25 | 10.8 \pm 1.5 | 0.44 \pm 0.02 |
| 0.50 | 13.0 \pm 2.2 | 0.58 \pm 0.06 |
| 1.25 | 16.1 \pm 2.5 | 0.85 \pm 0.10 |
| 2.50 | 18.3 \pm 2.4 | 0.96 \pm 0.17 |
| 5.00 | 23.8 \pm 2.2 | 1.23 \pm 0.27 |
| 12.50 | 32.5 \pm 1.2 | 1.54 \pm 0.12 |
| 25.00 | 39.0 \pm 1.5 | 2.06 \pm 0.07 |

Each value is the mean \pm S.E. of ten determinations.

表2 Leukotriene D₄により誘発されたマウス皮膚血管透過性の亢進の青色斑点の面積と漏出色素量による検討

| Amount of injected LTD ₄ (ng/site) | Area (mm ²) | Dye leakage (μ g/ml) |
|---|-------------------------|---------------------------|
| 0.125 | 10.0 \pm 2.1 | 0.49 \pm 0.08 |
| 0.25 | 13.3 \pm 1.2 | 0.61 \pm 0.16 |
| 0.50 | 15.8 \pm 4.7 | 0.73 \pm 0.16 |
| 1.25 | 20.8 \pm 2.3 | 0.93 \pm 0.15 |
| 2.50 | 25.3 \pm 1.6 | 1.15 \pm 0.14 |
| 5.00 | 30.8 \pm 3.6 | 1.34 \pm 0.12 |
| 12.50 | 37.0 \pm 3.1 | 1.88 \pm 0.17 |
| 25.00 | 41.3 \pm 1.5 | 2.12 \pm 0.05 |

Each value is the mean \pm S.E. of ten determinations.

2. LTD₄により誘発されるマウス皮膚血管透過性の亢進

PAFと同様の濃度範囲でLTD₄をマウスに皮内注射すると、濃度依存的な血管透過性の亢進が誘発された(表2)。PAFによる血管透過性亢進効果に比較して僅かに強い効果を示したが、その差は有意ではなかった。PAFと同様に5-25ng/25 μ lの濃度範囲でLTD₄の濃度と血管透過性亢進効果との間の相関性は良好で、相関係数は、面積に対して0.970、漏出色素量に対して0.935であった。

3. PAFとLTD₄による血管透過性亢進に対するWEB 2086の影響

WEB 2086は、特異的で強いPAF拮抗作用がin vitroおよびin vivoにおいて認められている化合物である⁹⁾。WEB 2086の0.5あるいは1mg/kgをPAFを皮内注射する1時間前に経口投与すると、PAFにより誘発される血管透過性の亢進は有意に抑制された(図1)。しかし、図1に示したように、LTD₄による亢進に対しては弱い抑制効果しか示さなかった。また、WEB 2086による拮抗作用の評価において、色素斑の面積で行う場合と漏出色素量で行う場合に有意な差は認められなかった。

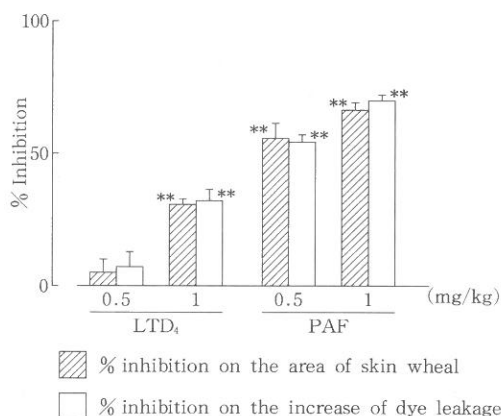


図1: LTD₄あるいはPAFによるマウス皮膚血管透過性亢進に対するWEB 2086の抑制効果。WEB 2086はLTD₄あるいはPAFを皮内注射する1時間前に経口投与した。***P<0.01 (N=9)

4. PAFとLTD₄による血管透過性亢進に対するFPL-55712の影響

FPL-55712は、SRS-Aの特異的な拮抗薬として最初に報告された化合物であり¹⁰⁾、摘出モルモット回腸のSRS-Aによる収縮を特異的に抑制する。0.25ng/siteから25ng/siteまでの濃度範囲のFPL-55712をPAFあるいはLTD₄と同時に皮内注射すると、図2に示したように、

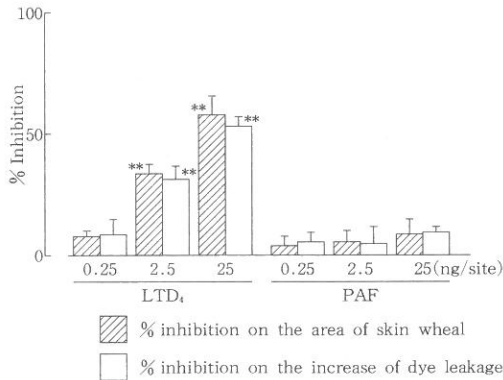


図2: LTD₄あるいはPAFによるマウス皮膚血管透過性亢進に対するFPL 55712の抑制効果。FPL 55712はLTD₄あるいはPAFと同時に皮内注射した。**P<0.01 (N=9)

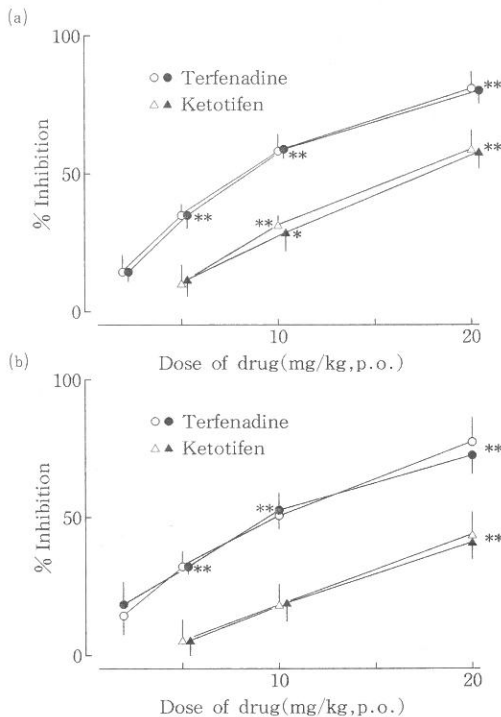


図3: LTD₄ (a) あるいはPAF (b) によるマウス皮膚血管透過性亢進に対するterfenadineおよびketotifenの抑制効果。Terfenadineおよびketotifenは、LTD₄あるいはPAFを皮内注射する1時間前に経口投与した。*P<0.05, **P<0.01 (N=6)

2.5ng/site 以上の濃度でLTD₄による血管透過性亢進に対しては濃度依存的な抑制効果を示したが、PAFによる亢進に対しては有意な抑制効果を示さなかった。

5. PAFとLTD₄による血管透過性亢進に対する抗アレルギー薬の抑制効果

LTD₄あるいはPAFを皮内注射する1時間前にterfenadineあるいはketotifenを経口投与した際、これらの抗アレルギー薬は用量依存的な有意な抑制効果を示した。また、その抑制効果を、青色斑点の面積と漏出色素量の両方で検討したところ、両者に全く差は認められなかった(図3)。

考 察

SRS-Aは、抗原刺激やanti-IgEの添加により肥満細胞やヒトの肺切片において生成され、遊離されることが報告されている¹¹⁾。SRS-Aの静脈内投与は、気道抵抗を増大し、著しいdynamic complianceの変化を引き起こし¹²⁾、PAFも単離された肺の肥満細胞や好塩基球からIgE依存的に遊離されることが示されている³⁾。また、PAFの吸入が気道過敏性の亢進を引き起こし、この亢進が数日間持続することも報告されている¹³⁾。この様な事実から、SRS-AやPAFがアレルギー疾患の発症に関与していることの可能性が示唆されている。その上、LTD₄や、PAFの皮内注射が、注射局所の血管透過性を亢進することが報告されている^{6) 7)}。更に、投与したこれらのagonistsの投与量と皮膚反応の強さの間に直線的な関係の成立することが、本研究によりマウスの皮膚を用いて明らかになった。そこで、我々はPAFおよびLTD₄により誘発される皮膚反応が、抗アレルギー薬のPAFやLTD₄に対する拮抗作用のin vivoにおける評価法として利用できるか否かについて検討を行った。マウスの皮膚反応の強さは、青色斑点の面積と漏出色素量を測定することにより判定したが、PAFやLTD₄の用量反応曲線や薬物の拮抗作用の評価に両者間に差はまったく認められなかった。従って、マウス皮膚反応の強さの判定及び拮抗薬の評価には、測定の手軽さから青色斑点の面積の測定のみで充分であると考えられる。

マウスの皮膚において、FPL-55712はLTD₄による血管透過性の亢進のみを抑制し、WEB 2086 はLTD₄による皮膚反応に比較してPAFによる反応を顕著に抑制した(図1, 2)。これらの結果は、PAFおよびLTD₄はいずれも直接作用により皮膚の血管透過性亢進を引き起こすことを示している。PAFにより誘発される血管透過性の亢進が、注射局所におけるPAF誘発LTD₄遊離を介していることも考えられるが、本研究の結果より、そ

の可能性は少ないと思われる。また、抗PAF薬であるWEB 2086の評価に、ラットのPAFによる皮膚反応が皮内注射により抑制されることや静注によりモルモット気道におけるPAF誘発の血管透過性亢進を抑制することが利用されている^{9) 14)}。これらの事実より、PAFやLTD₄により誘発される皮膚反応が、PAFあるいはLTD₄に対する拮抗作用のin vivoにおける評価法として利用できることが強く示唆された。その上、マウスを利用することは、スペース的に、装置的に、價格的に、経済的であり、簡便である利点がある。

Terfenadineやketotifenは、ラットPCA反応やモルモットにおける実験的喘息の抑制効果およびラット腹腔肥満細胞やモルモット肺切片からのchemical mediatorsの遊離を抑制することが既に報告されている^{4) 5)}。また、これらの抗アレルギー薬は、PAFやLTD₄により誘発された気道攣縮に対しても抑制効果を発揮することが知ら

れている¹⁶⁾。そして、本研究により、これらの薬物がPAFやLTD₄により誘発されるマウスの皮膚反応に対しても抑制効果を示すことが明らかになった。図3に示したように、抑制の強さは気道攣縮に対する抑制効果より強かったが、これらの結果は、PAFやSRS-Aに対する拮抗作用は、皮膚と肺で同様に出現することが明らかになった。また、モルモットやヒトの皮膚におけるPAFにより誘発される急性の炎症反応が、H₁受容体拮抗薬により修飾されることが報告されているが¹⁷⁾、今回使用した抗アレルギー薬はいずれもH₁受容体拮抗作用を有しているので、PAFによる皮膚反応の抑制にこれらの薬物の抗ヒスタミン作用が関与している可能性は否定できない。しかし、皮膚反応の抑制の程度が、これらの薬物の抗ヒスタミン作用の強さに必ずしも相関しないことから、その関与は少ないと考えられる。

参 考 文 献

- 1) Austen, K. F. : Homeostasis effector systems which can also be recruited for immunologic reactions. *J. Immunol.* , 121:793-805, 1978
- 2) Orange, R. P. and Austen, K. F. : Slow reacting substance of anaphylaxis. *Adv. Immunol.* , 10:105-144, 1969
- 3) Benveniste, J. , Henson, P. M. and Cochrane, C. G. : Leukotriene-dependent histamine release from rabbit platelets. *J. Exp. Med.* , 136:1356-1377, 1972
- 4) Martin, U. and Romer, D. : The pharmacological properties of a new, orally active antianaphylactic compound: Ketotifen, a benzocycloheptathiophene. *Arzneim. -Forsch/Drug Res.* , 28:770-782, 1978
- 5) Katayama, S. , Tsunoda, H. , Sakuma, Y. , Kai, H. , Tanaka, I. and Katuyama, K. : Effect of azelastine on the release and action of leukotriene C₄ and D₄. *Int Archs Allergy appl. Immun.* , 83:284-289, 1987
- 6) Sorter, N. A. , Lewis, R. A. , Corey, E. J. and Austen, K. F. : Local effects of synthetic leukotrienes (LTC₄, LTE₄, and LTD₄) in human skin. *J. Invest. Dermatol.* , 80:115-119, 1983
- 7) Fjellner, B. O. and Hägermark, Ö. : Experimental pruritus evoked by platelet activating factor (PAF-acether) in human skin. *Acta Derm. Venereol. (stockh)* , 65:409-412, 1985
- 8) Katayama, S. , Shionoya, H. and Ohtake, S. : A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rats. *Microbiol. Immunol.* , 22:89-101, 1978
- 9) Casals-Stenzel, J. , Muacevic, G. and Weber, K. H. : Pharmacological actions of WEB 2086, a new specific antagonist of platelet activating factor. *J. Pharmacol. exp. Ther.* , 241:974-981, 1987
- 10) Appleton, R. A. , Bantick, J. R. , Chamberlain, T. R. , Hardern, D. N. , Lee, T. B. and Pratt, A. D. : Antagonists of slow reacting substance of anaphylaxis. Synthesis of a series of chromone-2-carboxylic acids. *J. Med. chem.* , 20:371-378, 1977
- 11) Orange, R. P. , Murphy, R. C. , Karnovsky, M. L. and Austen, K. F. : The physicochemical characteristics and purification of slow-reacting substance. *J. Immunol.* , 110:760-770, 1973
- 12) Drazen, J. M. and Austen, K. F. : Effects of intravenous administration of slow reacting substance of anaphylaxis, histamine, bradykinin, and prostaglandin F_{2α} on pulmonary mechanics in the guinea pig. *J. Clin. Invest.* , 53:1679-1685, 1974

- 13) Mazzoni, L. , Morley, J. , Page, C. P. and Sanjar, S. : Induction of airway hyper-reactivity by platelet activating factor in the guinea pig. *J. Physiol.* , 365:107P, 1985
- 14) Evans, T. W. , Dent, G. , Rogers, D. F. , Aursudkij, B. , Chung, K. F. and Barnes, P. J. : Effect of Paf antagonist, WEB 2086, on airway microvascular leakage in the guinea-pig and platelet aggregation in man. *Br. J. Pharmacol.* , 94:164-168, 1988
- 15) Akagi, M. , Mio, M. , Miyoshi, K. and Tasaka, K. : Antiallergic effects of terfenadine on immediate type hypersensitivity reactions. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* , 9:257-279, 1987
- 16) Akagi, M. and Tasaka, K. : Inhibitory effect of terfenadine on a variety of actions exerted by leukotriene D₄ and platelet activating factor. *Pharmacometrics*, 35:365-371, 1988
- 17) Archer, C. B. , MacDonald, D. M. , Morley, J. , Page, C. P. , Paul, W. and Sanjar, S. : Effects of serum albumin, indomethacin and histamine H₁-antagonists on Paf-acether-induced inflammatory responses in the skin of experimental animals and man. *Br. J. Pharmacol.* , 85:109-113, 1985

平成 3 年 5 月 27 日 受付

平成 3 年 6 月 20 日 受理