원 저

만성해수 치료제의 개발 연구

김연태*,**, 하혜경*, 김정숙*,***

*한국한의학 연구원 신약개발팀, **현(주)대웅제약 중앙연구소, ***Adress for correspondence.

Abstract

Development of an animal model for chronic asthma using Chungsangboha-tang

Yun Tai Kim*,**, Hye-kyung Ha*, Chungsook Kim*,***

*Drug Research and Development Team, Korea Institute of Oriental Medicine
**Clinical Research Team, Daewoong Phamaceutical Co.
***Address for correspondence,

Chronic asthma is considered as an incurable disease in modern society. This study focused on development of an animal model for the chronic asthma to investigate new drugs from traditional herbal medicine. And we tested the animal model with a typical prescription, Chungsangboha-tang and tried to find biochemical markers such as catecholamines and cAMP in serum, and as densities of beta-receptor in lung tissues.

SD rats were actively sensitized by exposure to ovalbumine (OA). Ten days after sensitization, rats were challenged with OA aerosol by nebulizer six times every three days. Mucin was increased in bronchoalveolar lavages (BALs) after antigen (OA) challenge. Serum concentration of epinephrine was decreased significantly although there were not changed much in serum concentration of cAMP and the densities of beta-receptor in lung tissues. Chungsangboha-tang (5 g/kg/day) was given orally to ovalbumin-sensitized rats (n=8) for 15 days. Mucin in bronchoalveolar lavages (BALs) was increased significantly after treatment of Chungsangboha-tang although concentrations of epinephrine and cAMP were not changed significantly. The densities of beta-receptor in lung tissues were not different from those of controls. These results suggest that the ovalbumin-sensitized rats can be a good animal model of chronic asthma and Chungsangboha-tang is a possible drug in the treatment of chronic asthma.

Keywords : Asthma, mucin, epinephrine, cAMP, beta-receptor, Chungsangboha-tang

Ⅰ. 서 론

현대의학의 발전으로 노령인구가 증가하고 건강유지 비용이 증가되고 있는데 노년층의 질환은 대부분 만성적이고 소모적인 양상을 띄고 있고 노화와 더불어 진행되고 있기 때문에 인체가 지니는 저항력이 저하되면서 표출되어왔다. 더욱이 복합적인

만성질환인 만성해수는 서양의학적으로 완치하지 못하기에 한약처방 연구가 필수적이라고 사료된다.

호흡기는 항상 外氣와 직접 접촉하는 기관이므로 많은 외부적 자극이나 감염으로 질병의 빈도가 높다. 이런 호흡기系 질병이 1994년도 사망요인의 약 20%이다(10%의 결핵 포함). 기관지 질환의 경우에 단독질환 혹은 합병된 질환으로 나눌 수 있는데 합병된 만성질환이 상당히 많다.[1]

그 보편적인 증상의 하나인 기침은 계속된 짧은 흡기로 성문폐색이 일어나서 흉강내압이 상승되고 성문이 열려 강한 공기 흐름과 함께 기도 내용이 밀려나오는 현상이고 기관지의 섬모운동 또는 연동운동으로 제거되지 않는 기관지내의 이물제거를 목적으로 하는 반사운동이다. 기침은 반사성으로 일어나는데 말초자극이 기도 내분비에 의해 생기며 인후두, 기관지, 폐 등에서 미주신경, 횡격신경의 구심성 섬유를 통해 연수중추(medulla oblongata)에 도달한다. 기침은 기도내 분비물을 제거하는 생리적인 현상이다. 그러나 기침은 여러가지 유해작용을 수반하기 때문에 치료대상이 될 수 있다.[2]

해수는 만성과 급성으로 나누고, 만성해수는 습성해수와 건성해수로 나누는데, 습성해수에는 혈담의 존재 여부로 또 다시 나눌 수 있다. 혈담이 존재치 않은 경우는 일반적으로 기관지천식이나 만성기관지염으로 분류되며 혈담이 있을 경우는 기관지 확장증이나 폐결핵으로 분류된다. 노인성 해수는 대개의 경우 복합적인 현상으로 나타난다. 특히 노화의 일환으로 체질이 허약해지거나 면역성의 감소로 인해 나타나는 노인성 질병중의 하나로 여긴다.[3] 대개의 노인성해수는 기침(cough), 가래(객담:sputum)를 동시에 지니며 기침만 수 년 동안 계속되는 일이 있다. 격심한 기침의 경우 담에 혈선, 혈점이 부착된 경우도 있다.

호흡기 질환인 해수 중에서 습성해수인 기관지 천식은 그 발생 빈도도 상당히 높고 재발되는 경우가 대부분이고 만성인 경우가 많아서 발작적인 호흡곤란을 일으키는 기도의 폐색에 대한 기전을 연구해야 할 필요가 있다. 현재까지의 연구로는 이 기도의 폐색은 기도의 기관지 과민 반응성에 기인한다. 이 과민성은 기관지 천식의 중요한 병태생리로써 그 기전을 밝히는 것이 기관지 천식의 치료를 위한 중요한 연구과제이다.[4]

일반적으로 기관지 천식환자의 병태생리학적 변화는 비만세포, 호산구, 호중구, 단핵구, 혈소판 등에서 분비되는 화학매체들의 작용의 결과로 설명하고 있다. 대표적인 증상은 발작적인 기침, 호흡곤란 및 천명 등인데 중증보다는 경증이 많아서 지속적인 기침, 흉부압박감, 인후의 이물감 같은 단순한 증상이 더 많다. 기도협착은 환자에 따라서 반응이 다르기 때문에 임상적 척도로는 부정확하며 경증천식은 대개의 경우 객담이 없으나 성인형 만성천식에는 객담이 많다. 외인성 천식의 객담에는 25-35%의 기관지 상피세포와 5-80%의 호산구와 중성구가 포함되어있다. 내인성 천식은 만성기관지염처럼 중성구 수가 증가되었고 호산구는 5-10%이며 악화시 전체세포수는 증가한다. 2차감염이 있으면 객담내 중성구수가 증가하고 경우에 따라 호산구의 수가 증가한다.[4]

이런 천식의 치료는 기관지 점막의 부종, 기관지 평활근 수축, 점액의 과다분비, 환기류비 불균등(ventilation-perfusion imbalance)을 발작전으로 원상시키는 치료과정이다. 예방법이 특히 중요하고 알레르기성 천식은 알레르겐으로부터의 회피요법이 중요하다. 수액요법으로 과호흡 및 섭취에 의한 탈수방지, 점액의 점도약화, 객담배출을 쉽게하기위해 수액치료가 중요하다.

한의학에서 보는 천식은 한의학적으로 보면 광의적으로 효천 천증 해수등이 이에 포함될수 있는데 차례대로 살펴보면 다음과 같다. 효천은 일반적으로 호흡촉급하고 천명유성인 것을 지칭하는 데, 문헌들[5] 가운데 의학입문[6]에 의하면 "呼吸促急者謂之喘 喉中有聲者謂之哮"라 하여 천과 효를 구분하였으며 醫學心悟7)에서는 "喘以氣息言 哮以聲響言"이라 하여 천과 효를 구분하였다. 이를 설명하면, 천은 호흡촉급

하고, 효는 호흡할 때에 聲高氣粗하여 聲如拉鋸(톱켜는 소리)라 할수 있다.

醫宗必讀[8]에서는 "喘者 促促氣急 喝喝痰聲 張口擡肩 搖身擧頭"라고 하였고 "喘者 與喘相類 但不似喘開口出氣之多 而有鵝鴨之音"이라 하였으며, 또한 천증은 허증이 많으면서 虛中痰實하고, 효증은 실증이 많으면서 往往 實中有虛한다. 같은 병자에 있어서 경증이면 喘하고 중증이면 哮가 된다.

해수의 특징은 건성과 습성해수 및 천증을 중심으로 하는 증상으로서 사실상의 해수 천증의 모든 증상을 포함하고 있으며 다만 노인성 해수는 나이가 듦에 따라 나타나는 노화현상의 하나로서 인식되고 있는 병이다. 이것을 한의학적 측면에서 광의적으로 보면 진액이 소모되어 음허의 증상으로 나타나는 현상으로 볼수 있으며 협의적으로는 脾虛生痰, 肝火犯肺, 肺臟의 虛損의 병리적인 상황으로 볼수 있고 구체적으로 살펴보면 다음과 같다.

첫째, 진액의 소모[9]에 기인하는데 진액이라 함은 인체내의 正常水液에 대한 총칭으로 타액, 위액, 장액, 관절강내의 액체 뿐만 아니라 눈물, 침, 땀, 소변 등을 포괄하는 개념으로서 병리상으로는 진액이 소모되어 고갈된다. 따라서 진액이 고갈되어 나타나는 증상이 많은데 노인성 해수에 국한하여 살펴보면 건성해수에 해당 된다고 볼수 있으며 진액이 고갈되어 상대적으로 火氣가 상승하는 경우에는 肝火犯肺의 현상으로 볼수 있으며, 화기로 인해 폐가 건조해져서 손상을 받으면 폐장허손으로 볼 수 있다. 이런 경우에는 진액의 소모로 인한 고갈로 육미지황탕과 같은 보음제를 사용하게 되는 것이다.

둘째, 脾虛生痰[10]의 경우로 담은 한방적으로 비에 속하게 되는데 이를 "脾爲生痰之源"이라고 표현하고 있다. 또한 담은 협의적으로는 腸胃之間에 있는 水液이 停留된 것이며 광의적으로는 진액이 비정상적인 병리적인 변화물이라고 볼 수 있다. 따라서 비장의 허약은 진액의 정상적인 소통이나 활동을 저해하게 되어 담이 생긴다고 할수 있다. 또한 폐장은 담을 저축하는 기관이다. 이것이 해수와 관련되는 것으로 비장이 허약해져 담이 생겨나고 폐장이 이 담을 저장하게 됨으로 습성해수를 일으키게 되는 것이며 습수, 담수, 담천과 관련되어 있다. 증상은 해수에 가래가 많고, 끈적하며, 흉부가 답답하며, 식욕부진하며, 피로등의 증상이 있어 건운비위하고 화조습화담하는 치료법을 사용한다. 이 경우의 특징은 가래를 동반하는 것으로 거담지제인 이진탕을 위주로 처방하게 되는 것이니 반하 진피 복령 감초가 사용된다.

셋째, 肝火犯肺로 간의 氣가 鬱滯되어 火氣가 上炎하면 위쪽으로 손상을 입히게 되는데 이때 폐가 손상을 받는 것으로 현대적으로 비유 해석해 본다면 감정적인 변화로 인해 기침을 유발하는 경우에 해당 할 수 있을 것이다. 증상은 기역해수하고, 기침할 때 흉협부가 견인통하고, 인후가 건조하며, 얼굴이 붉어진다. 이 경우는 淸肺瀉火之劑를 사용하게 되어 청폐화담탕으로 황금, 치자, 길경, 맥문동, 상백피, 패모, 과루인, 귤홍, 복령, 감초가 사용된다.

넷째, 肺臟虛損의 경우, 폐음이 虧耗하면 肺氣가 上逆되어 咳嗽痰少하고 肺氣가 부족하면 氣短하여 해수가 된다. 증상은 비교적 완만하고 마른 기침에 가래가 약간 있으며 혹은 가래에 피가 있으며 체형이 마르고 기력이 없고 음식부진, 인후건조, 오후미발열, 양측 관골이 붉어지고, 손바닥과 발바닥에서 열이 나며, 잠잘 때 땀이 난다. 이때에는 養陰淸肺하는 치료법과 化痰止咳의 치료법을 사용하여 천문동, 맥문동, 생지황, 산약, 백부근, 사삼, 패모, 복령, 삼칠근, 우절, 지골피 등의 본초를 치료제로 쓴다.

기관지 천식은 그 작용기전이 정확하게 확립되어 있지 않고 다만 β_2-receptor에 작용하는 β_2-agonist 혹은 항히스타민제, catecholamine 또는 steroid 제제등이 치료제로 우선 사용되어 왔다. 복합적인 질병이기 때문에 여러가지 약을 복합적으로 사용하고 장기간 복용하면 나타나는 desensitization 혹은 down-regulation 같은 부작용 때문에 어려움이 있다.[11,12] 그 대표적인 약이 Theophylline인데 장기간 복용에 불편함이 있기 때문에 최근에는 slow-releasing form으

로 제형만 바꾸어서 1일 2회 복용으로 사용되고 있다. 다시 말해서 만성 기관지 천식은 그 기전도 정확히 모르며 마땅한 근원적인 치료제가 없다.

특히 만성 기관지 천식의 경우는 발생정도에 따라 그 증상의 경중을 나누고 경한 경우는 대개 치유보다는 무시하고 지내나 심한 경우에만 allergen 회피 방법 또는 수액요법을 제시하고 위급한 경우에만 위에서 설명한 여러가지 치료제를 쓴다. 그러나 특히 노인성 만성 기관지 천식은[13] 그 환자의 수가 노인인구의 큰 비중을 차지하고 있으나 거의 무시되어온 질병이다. 본 연구에서는 이러한 점을 감안하여 앞으로 늘어날 노인인구들의 비중을 염두에 두고 기존 한방에서 오랫동안 치료하여 왔던 한방처방을 활용하여 이들의 치유와 또 그 작용기전을 밝히고자 하였다. 그러나 β_2-agonist 또는 catecholamine을 장기 복용할때 그 약의 작용 receptor(β_2-receptor)에 down-regulation을 일으키고 또 high-affinity state를 감소시키므로 이들의 변화는 그 receptor의 변화뿐만 아니라 cAMP 같은 secondary-messenger의 변화를 유발시켜서 인체에 대한 전체적인 영향은 상당히 크다고 본다.

따라서 한방이론을 도입하여서 전체적으로 몸을 도와주는 보약의 개념을 지닌 단미제의 한약재를 첨가하고 또 기관지나 알러지 반응에 작용하는 한약재를 첨가하여 복합처방함으로써[5] 그 효능을 검토하고자 하였다.

본 연구에서는 1) 천식에 적합한 병태 동물을 개발하고자 하였으며, 2) 개발된 천식 병태 동물에 복합한약재를 장기 복용시킨 후 혈장내 catecholamine의 농도 변화 및 폐내 β_2-receptor, secondary-messenger인 cAMP에 대한 영향을 알아보았다.

복합 한약재로는 청상보하탕을 선정하여 진행하였다. 한의학적인 관점에서 만성기관지 천식은 주로 음허와 관련되어 나타나는 것을 위주로 보게 되어 자음, 강화, 거담 등이 위주가 되는 치료법을 쓰게 되는데 자음이란 것은 인체의 음적인 부분을 자양해 준다는 말로 음을 보하는 보약의 개념이며 강화는 말 그대로 불(혹은 열기)을 내려준다는 것이며 이것은 폐기관지의 부담을 덜어주고 기관지가 건조해지는 원인을 제거하는 것이 된다. 거담제는 통상적으로 말하고 있는 객담을 제거하는 것이다. 이것을 총괄하여 기관지에 탈이 생기게 되어 해수가 되는데 근본적인 원인이 되는 음허와 火氣를 함께 제거해 주며 외부적인 증상으로 나타나는 담을 제거하여 안밖으로 치료하게 되는 것으로 보약과 기관지 약의 절묘한 만남이라 할 수 있으며 앞의 분류에 의해서 단미제로 볼 때는 그의 약리작용이 약간씩 다르다. 그러나 복합처방으로 보면 위의 내용을 포괄할수 있는 처방으로 선택한 것이 청상보하탕이다. 청상보하탕은 동의보감에 많이 출현하는 육미지황탕의 가미방이며 육미지황탕은 자음제, 보음제의 대표적인 처방이고 이에 해당되는 숙지황, 산약, 산수유, 목단피, 택사, 백복령의 여섯가지 약물이 기본이 되며 강화에 작용하는 맥문동, 천문동, 황련, 황금이 가미되고, 거감과 宣肺에 사용되는 오미자, 지실, 반하, 과루인, 길경, 패모, 행인, 감초가 가미된 처방이다. 따라서 만성기관지 천식의 기본 처방으로서 청상보하탕을 선택하여 연구를 실시하고자 하였다.

II. 실험 방법

1. 실험 동물

평균 체중 200-300g 정도의 male Sprague-Dawley rat을 온도 22±3℃, 습도 50-60%, 조명은 12시간 명/암 주기가 되도록 하여 사육하였으며, 동일 조건하에서 식수와 사료를 충분히 공급하였다.

40마리의 male Sprague-Dawley rat을 서울대학교 종합약학연구소에서 분양받아 정상군과 천식유발군으로 나누었다. 각각 10마리는 각군의 대조군으로, 각각 10마리는 각군의 투약군으로 4군으로 나누고, 대조군은 해당량의 물을 투여하고 투여군은 총 건조 약재 5g/kg에 해당량의 청상보하탕 전탕액을 15일 동안 매일 1회 구강 투여하였다. 이 때 천식유발

군은 3일에 한 번씩 antigen challenge를 계속하였다.

Antigen challenge처치 4시간 후에 동물을 CO_2로 질식사시킨 직후 혈액을 전량 채취하여 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리(Beckman AvantiTm 30 Centrifuge, USA)하여 상등액만 취하여 혈청을 분리하고, epinephrine과 cAMP농도를 정량하였다.

또한 기도에서 BAL 액을 채취하여 기도에서 분비되는 mucin의 양을 ELISA법으로 측정하였으며, 폐세포막에서의 receptor binding assay를 행하여 β-receptor 결합변화를 관찰하였다.

2. 기관지 천식 유발

2-1. Animal sensitization

Rat의 뒷다리에 90㎍의 grade V egg albumin (Sigma)을 포함하고 있는 $AlOH_3$ conjugate 600㎕을 근육 주사한 후, Bordetella pertussis antigen(Difco Laboratories)을 1:3의 비율로 saline으로 희석하여 1 ml씩 복강 주사하였다.[14,15] 복강 주사 후 10일 정도가 경과한 후, aerosolized ovalbumin challenge를 적용하였다.[16,17]

2-2. Antigen challenge

5% type III ovlabumin의 saline용액을 nebulizer (PARI master, Starnberg, Germany)를 이용하여 aerosol의 상태로 각 동물들에게 15분씩 흡입시켰다. Ovalbumin 처치는 sensitization 후 10일째부터 3일에 한 번씩 6회 반복 처치하였다.[18, 19]

2-3. 혈청 및 Bronchoalveolar lavage fluid (BAL)수거

마지막 ovalbumin 처치가 끝난 후, 4시간, 1주, 2주, 4주가 경과한 후에 동물을 CO_2로 질식사 시킨 직후 주사기로 혈액을 전량 채취해 30분간 방치한 후 원심분리하여 혈청을 얻어서 epinephrine 및 cAMP의 정량에 사용하였다. 또한 기도에 3ml saline을 넣었다가 즉시 빼내는 과정을 4번 반복하여 12ml 정도의 lavage fluid를 얻었다. 이렇게 얻은 lavage fluid는 ELISA에 사용하였으며, 동물의 기도를 적출하여 조직학적 변화를 관찰하는 데 사용하였다.[20]

2-4. 천식유발 확인

1) 유리되는 mucin량의 측정

천식의 유발 여부는 기도에서의 mucin 분비량 증가 정도로서 판정하였다. Antigen challenge를 받은 동물에서 수거한 BAL를 12,000×g에서 15분 원심분리한 뒤 상등액만을 취하여 ELISA에 사용하였다. Microtiter assay plate의 각 well에 희석한 lavage fluid 상등액을 100㎕씩 가한 후 32℃에서 약 2시간 동안 흡착시켰다. 세 번 세척 후, blocking solution을 200㎕씩 가하여 마찬가지로 32℃에서 2시간 동안 방치시켰다. 세 번 세척 후 anti-rat mucin antibody를 가한 후 같은 조건에서 2시간 동안 방치하였다. 세 번 세척 후 horseradish peroxidase-labeled goat anti-mouse IgM antibody를 가하여 2시간 방치하였다. 세척 후 50㎕의 substrate solution (0.01mg 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine/ml-0.1 M sodium acetate, pH 6.0, 0.01 % H_2O_2)를 각 well에 가하였다. 상온에서 약 20분 동안 방치한 후 50㎕의 1 M HCl을 가하여 반응을 종결시켰다. 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 조직학적 검사

적출한 기도를 saline으로 세척하여 4% paraform-aldehyde로 고정시키고, paraffin으로 embedding하여 microtome으로 박편을 제조하여 열판에서 건조시킨 후, periodic acid-Schiff reagent로 staining을 시행하였다. Periodic acid로 10분 동안 oxidation시킨 후, 흐르는 물로 5분 동안 세척하였다. Schiff reagent로 10분 동안 처치한 후, sodium metabisulfite을 2분씩 3번 반복 처리하였다. Dehydration 과정은 95%의 에탄올로 10초, 100%의 에탄올로 10초 동안 2번 반복하였다. Xylene으로 3분씩 2번 clearing시킨 후, permount를 떨어뜨리고 coverslip으로 덮은 뒤, 광학현미경으로 관찰하였다.

3) Epinephrine 정량

혈청 내 에피네프린은 HPLC-ECD system을 이용하여 정량하였다. 혈청을 원심분리기를 이용하여 0.22㎛ membrane filter로 여과하여 여액 5㎕를 Rheodyne injection valve를 통해 주입하였다.

HPLC system은 Spectra system Isocratic Pump (TSP P1000, TSP Inc., Sunnyvale, CA, U.S.A.), Electrochemical Detector (ED 40, Dionex Co., Sunnyvale, CA, U.S.A.), injection valve (Rheodyne model 7225i, Cotati, Calif., USA)로 구성되었고, 에피네프린 분리를 위해 Biophase cartridge column (Biophase II ODS C18 3㎛, 3.2x 100mm, BAS, Lafaytte, Ind., USA)을 사용하였다. Mobile phases는 0.1M citric acid, 0.225mM octyl sodium sulfate, 0.06% triethylamine, 0.05mM Na_2EDTA, 9% acetonitrile (pH 2.55)을 사용하였다. Electrochemical detector는 DC amperometry mode에서 working electrode 전압 + 0.7V, 감수성 범위는 3nA이었다.

4) cAMP 정량

혈청내 cAMP는 항체와 방사선 동위원소가 표지된 cAMP를 이용한 radioimmunoassay (Amersham, Buckinghamshire, England)로 정량하였다. 시료 일정량에 cAMP에 대한 항체와 ^{125}I로 표지된 cAMP를 가해 2-4℃에서 3시간 반응시켜 competitive binding을 시켰다. 그 후 이차 항체를 가해 원심분리(1,500x g, 10min)하여 상등액은 버리고 침전물의 방사선 양을 γ-counter로 조사하였다. 혈장내 cAMP 농도는 cAMP 표준품을 이용하여 작성한 검량선을 사용하여 계산하였다.

3. 청상보하탕 조제

청상보하탕은 동의보감에 많이 출현하는 육미지황탕의 가미방인데, 숙지황, 산약, 산수유, 목단피, 택사, 백복령의 여섯가지 약물이 기본이 되며 강화에 작용하는 맥문동, 천문동, 황련, 황금이 가미되고, 거감과 宣肺에 사용되는 오미자, 지실, 반하, 과루인, 길경, 패모, 행인, 감초가 가미된 처방이다. 그 비율은 숙지황(8), 산약(4), 산수유(4), 목단피(3), 택사(3), 백복령(3), 맥문동(3), 천문동(3), 황련(3), 황금(3), 오미자(3), 지실(3), 반하(3), 과루인(3), 길경(3), 패모(3), 행인(3), 감초(1)이었다.

청상보하탕 전탕액은 약재 100g을 취하여 전자약탕기(대웅전자, DW-96000S)에 담고 증류수 1 *l* 를 넣은 후 2시간 동안 전탕한 뒤 여과포로 여과한 다음 여과한 약재를 다시 증류수 1 *l* 를 넣은 후 같은 방법으로 재탕하여 여액을 얻어 1차, 2차 여액을 rotatory evaporator에 넣어 감압 농축하였다. 최종 농축액이 건조약재 0.5g/ml가 되도록 제조하여 투약하였다.

4. β -아드레날린성 수용체 (β-receptor) 정량

4-1. 흰쥐 폐의 절제 및 분절세포막 분획의 제조

흰쥐 폐 조직의 베타수용체 변동을 알아보기 위해 먼저 폐 조직의 분절세포막 분획을 제조하였다. 동물을 마취하고 폐를 노출시킨후 차가운 Tris Buffered Saline(TBS)를 관류시켜 혈액을 제거하고 기관지를 제외한 부분을 적출하여 얼음 유리판 위에서 잘게 잘랐다. 여기에 5배 용적의 50mM Tris, 5mM EDTA, 100mM NaCl pH7.2의 4℃ buffer를 가하고 Teckmar tissumizer로 얼음상에서 균질화하였다. 이 때 사용한 buffer에 단백분해를 최소화하기 위해 각종 단백분해 효소 억제제를 첨가하였다 (10mM benzaimdine, 2mM PMSF, 10㎍/ml leupeptin, 10㎍/ml trasylol, 5㎍/ml pepstatin, 5㎍/ml antipain, 5㎍/ml chymostatin). 균질액은 두장의 cheese cloth를 통과시켜 unbroken tissue debris를 제거한 후 39,000xg, 20분간 원심분리하였다. 얻어진 침전은 같은 buffer로 3회 resuspension, recentrifugation 과정을 반복하여 세척하였다. 최종적으로 얻어진 침전물을 현탁시킨 것을 분절 세포막 분획이라 칭하며 다음 단계의 β-수용체 결합 실험에 이용하였다.

4-2. β-수용체 결합 실험

분절세포막 분획에 대한 β-수용체 결합실험은 radioligand로 [^{3}H]Dihydroalprenolol ([^{3}H]DHA)를 사용하고 반응 buffer로는 50mM Tris, 100mM NaCl, 5mM EDTA (pH 7.2 at 4℃)를 사용하였다. 반응액을 23℃에서 30분간 배양한 후 5ml의 stopping buffer (50mM Tris, 100mM NaCl, 5mM EDTA, pH 7.2 at 4℃)로 처리한 후 Whatmann GF/B filter로 감압여과 시켰다. 이 때, filter는 각 5ml의 stopping buffer로 3회 세척하였다. Filter를 scintillation vial에 담아 10ml의 Triton X-100-toluene based scintillation cocktail을 가해 Liquid scintillation counter로 방사성을 측정하였다. Nonspecific binding은 10μM의 dl-propranolol 존재하에 측정하고 total binding과 nonspecific binding의 차이를 specific binding으로 하였다. 흰쥐 폐조직의 베타수용체의 특성 확인을 위해서는 수용체 결합포화실험을 수행하였으며 데이터는 Scatchard analysis를 통해 분석하였다. 약물투여에 의한 베타수용체의 변동을 확인하기 위해서는 5mg의 폐분절세포막 분획을 이용하였으며 [^{3}H]DHA의 농도는 2nM을 적용하였다.

4-3. Kinetic binding experiment

흰쥐 폐 세포막 분획의 약물 결합 속도를 구하기 위하여 결합의 kinetic 실험을 수행하였다. 수용체 결합실험과 같은 조건으로 sample tube를 준비하고 radioligand를 가한 후 1분부터 60분까지 각 시간대별로 반응을 중지시키고 vacuum filtration 하였다. 시간대별의 특이적 결합을 구하고 반응이 충분히 평형상태에 도달하는 시간을 도출하여 약물결합실험에 적용하도록 하였다.

5. 통계처리

통계처리는 Systat®(Systat, Inc., Evanston, Il, USA) Computer Program으로 각 실험에서 실험군과 대조군 사이에서의 차이를 ANOVA test나 multiple regression analysis를 통해 $P<0.05$ 이하 일때 확실한 차이가 있는 것으로 결론을 내렸다.

III. 실험 결과

1. 병태동물 유발

1-1. 유리되는 mucin량의 측정

유리된 mucin의 양을 ELISA로 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Bordetella pertussis antigen으로 sensitization시킨 후, aerosolized ovalbumin을 반복 처치한 군에서 마지막 ovalbumin 처치 후 4시간이 경과했을 때 유리되는 mucin의 양은 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다. 마지막 ovalbumin 처치후 1, 2, 4주일 경과 후에는 mucin유리량이 대조군과 유사한 수준으로 회복되었다.

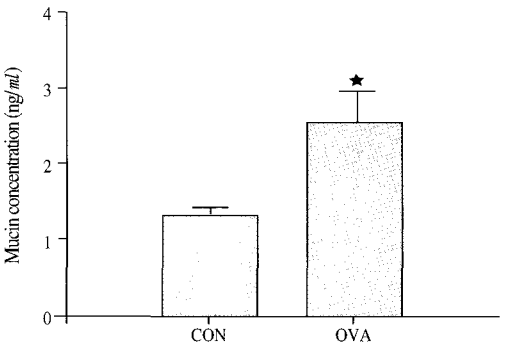

Figure 1. Amount of mucin present in bronchoalveolar lavage of rats determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Each bar represents the mean±S.E. from 9-10 animals. * indicates a significant difference from control group ($P<0.05$). CON means control group and OVA does ovalbumin challenge treated group.

1-2. 조직학적 검사

기도 점액 분비 세포의 조직학적 변화를 보기 위하여 Periodic acid-Schiff reagent로 기도점액을 분비하는 세포 내의 mucin을 염색한 결과는 Fig. 2에 나타나 있다. Bordetella pertussis antigen으로 sensitization시킨 후, aerosolized ovalbumin을 반복 처치한 군에서 마지막 ovalbumin 처치 후 4시간이 경과했을 때 적출한 trachea내의 mucin염색정도는 대조군에 비해 증가하였다. 마지막 ovalbumin처치후, 1주, 2주, 4주

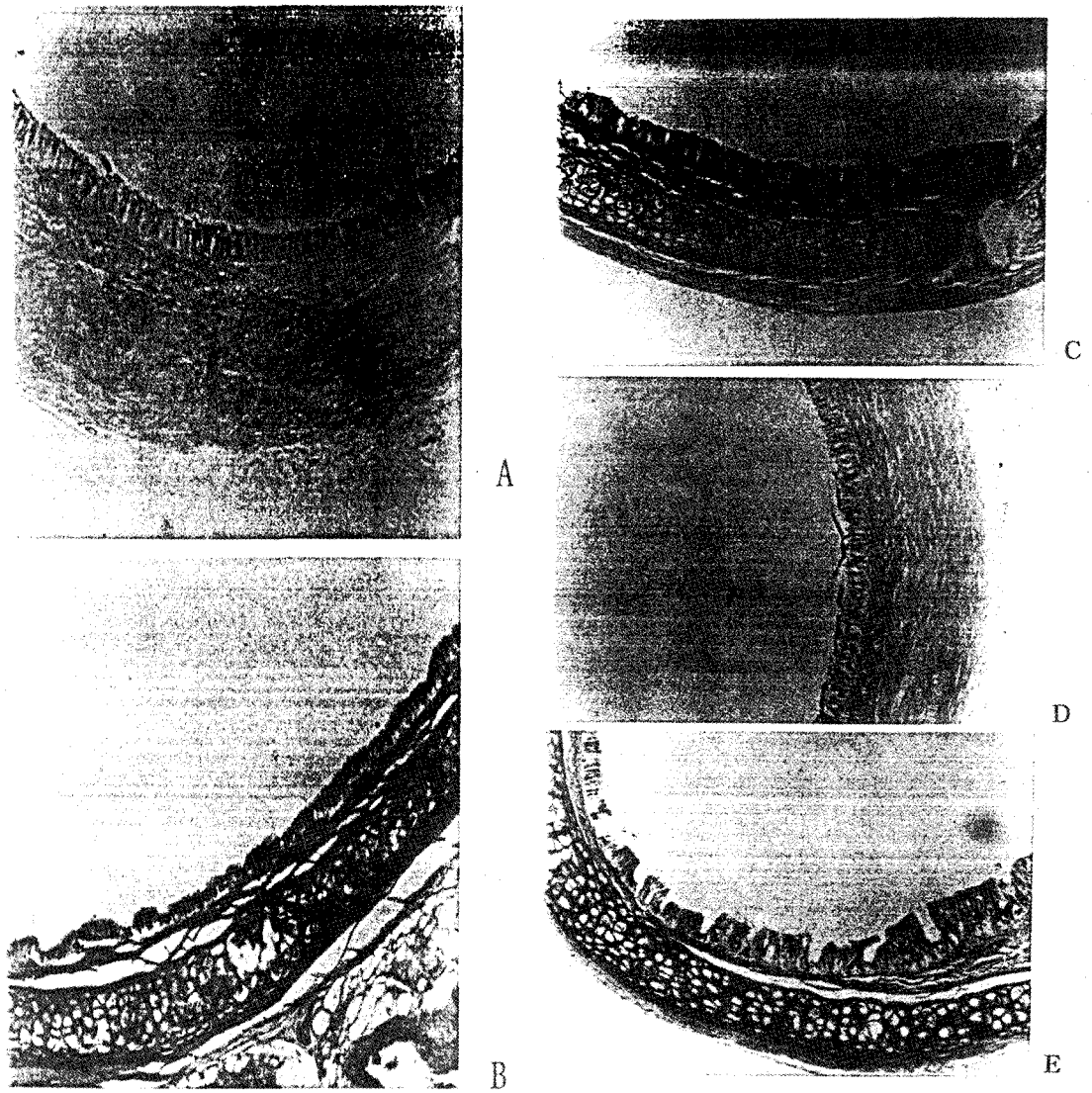

Figure 2. Histology of rat trachea stained with periodic acid-Schiff reagent. A: control group, B: 4 hours after last ovalbumin challenge. C: 1 week after last ovalbumin challenge, D: 2 weeks after last ovalbumin challenge, E: 4 weeks after last ovalbumin challenge.

Table 1. Serum Concentrations of Epinephrine and cAMP. (n = number of animal used)

	대조군(control)	천식유발군(asthma)	
Epinephrine (ng/ml)	8.459 ± 1.789 (6)	4.918 ± 0.539 (9)	P=0.043
cAMP (fmol/100ml)	161.686 ± 13.910 (6)	180.340 ± 43.080 (9)	P=0.493

가 경과한 후에는 이러한 조직학적 변화가 대조군과 유사한 수준으로 회복되었다.

1-3. 혈청 epinephrine의 정량

천식유발 쥐와 정상쥐의 혈청 epinephrine의 농도는 Table 1에서와 같이 정상군의 8.459±1.789 ng/ml에서 천식유발 쥐의 4.918±0.539 ng/ml로 유의성 있게 감소되었다.($P<0.05$)

1-4. 혈청 cAMP의 정량

정상군과 천식유발 쥐에서 혈청 cAMP의 농도가 비교되었으나, 큰 차이가 없었다.(Table 2)

2. 투약실험

투약실험은 두가지 목적으로 진행되었는데 첫째는 천식 유발 동물이 만성해수 병태 동물로 적절한지 확인하는 것이며, 둘째는 복합 한약재의 효과를 스크리닝하는 것이다.

2-1. mucin의 정량

정량을 위한 표준곡선의 상관계수 r^2= 0.993 이었다. 정상군와 천식유발군에서 각각의 대조군과 청상보하탕 투여군으로 나누어서 mucin농도를 측정한 결과 Fig. 3에서와 같이 천식유발 쥐가 정상쥐보다 mucin농도가 증가하였고 청상보하탕 투여군은 대조군보다도 mucin분비가 증가하였으나 통계적인 의미는 없었다(Table 2)($P<0.1$).

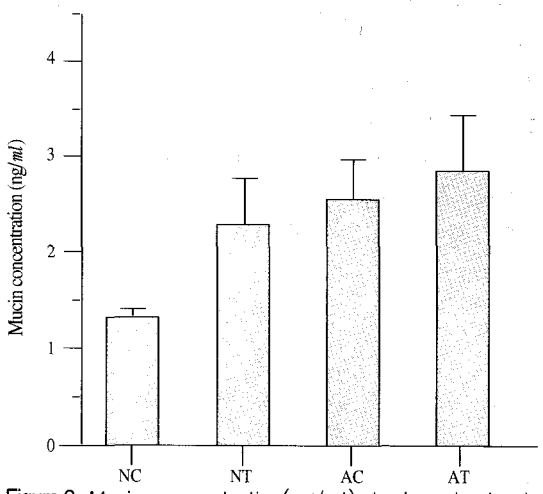

Figure 3. Mucin concentration(ng/ml) in bronchoalveolar lavage of various groups of rats. NC:normal control rats, NT:Chungsangboha-tang administered normal rats, AC:control group of asthma induced rats, and AT:Chungsangboha-tang administered normal rats

2-2. 에피네프린 (Epinephrine) 정량

대표적인 에피네프린의 HPLC chromatogram 이 Fig. 4~6에 있다. Catecholamine의 정량은 Fig. 4의 표준물질들의 chromatogram에서 Dopamine은 retention time이 3.9min, Epinephrine은 2.9min, Norepinephrine은 2.5min이었다. 그러나 천식유발 쥐의 대조군 (Fig. 5)이나 청상보하탕 투여군 (Fig. 6)의 혈청에서는 epinephrine농도만 확인되었고 dopamin이나 norepinephrine의 존재는 확인되지 않았

Table 2. Serum Concentrations of Epinephrine and cAMP. (n=number of animal used)

	Normal		Asthma Induced		
	Control	Treated	Control	Treated	
Mucin	1.331±0.089	2.297±0.488	2.569±0.420	2.874±0.589	P=
(ng/ml)	(9)	(6)	(10)	(10)	0.092
Epiephrine	4.181±0.669	4.990±1.016	4.806±0.681	3.510±0.785	P=
(ng/ml)	(8)	(6)	(9)	(8)	0.537
cAMP	319.415±96.626	281.131±71.225	1108.817±273.316	1103.395±265.133	P=
(fmol/100ml)	(6)	(5)	(10)	(8)	0.035

다. 에피네프린 정량을 위한 표준곡선의 상관계수는 r^2=0.999 이었다.

투약실험에서 나누었던 4군의 혈청 epinephrine의 농도는 Table 2에 요약되어 있다. 정상쥐의 대조군과 투약군 및 천식유발 쥐의 대조군과 투약군 각각의 혈청 epinephrine의 농도를 비교하였으나 통계적인 차이점은 없었다(P=0.537).

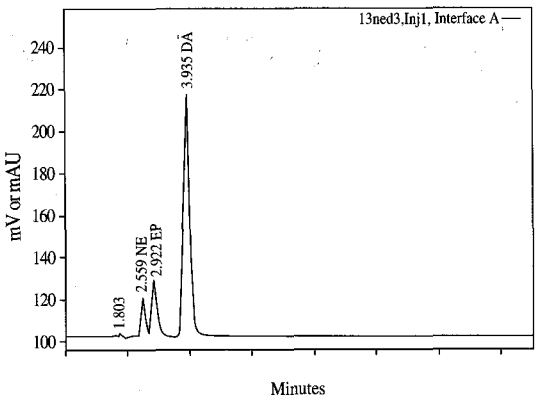

Figure 4. A Representative HPLC chromatogram of standard epinephrine, norepinephrine, and dopamine. The retention time of epinephrine is 2.922 min and those of norepinephrine and dopamine are 2.559 min and 3.935 min.

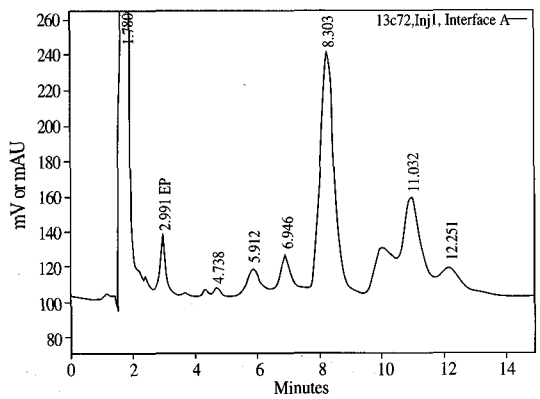

Figure 5. A Representative HPLC chromatogram of serum epinephrine of normal control rat. The peak at 2.991min indicates epinephrine. norepinephrine and dopamine are not present in the serum.

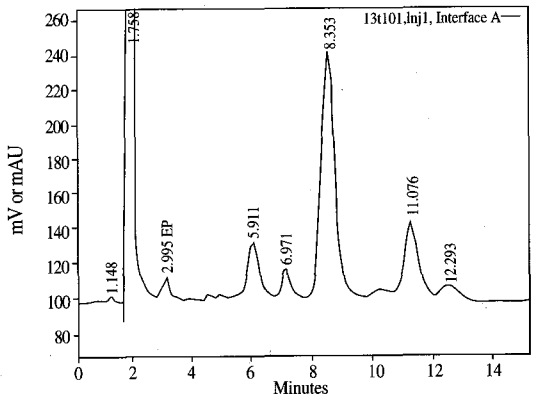

Figure 6. A Representative HPLC chromatogram of serum epinephrine of asthma induced rat as described earlier. The retention time of epinephrine is 2.995min although norepinephrine and dopamine are not present in the serum.

2-3. cAMP 정량

cAMP의 표준곡선의 상관계수는 r^2= 0.997 이었다. 각 군에서 나타내는 cAMP의 농도를 Table 2에 요약하였는데 정상쥐보다 천식유발 쥐의 cAMP농도가 증가되었으며(P<0.05), 청상보하탕 투여군은 각각의 군에서 대조군과 비교하였을 때 차이가 없었다.

2-4. β-아드레날린성 수용체 (β-receptor) 정량

1) 폐 분절 세포막 농도 영향

흰쥐 폐 분절세포막 β-수용체의 결합에 세포분획 농도가 미치는 영향을 관찰하였다 (Fig. 7). 흰쥐 폐 세포막 분획을 0.5mg에서 10mg의 다양한 농도로 제조하여 2 nM의 [^{3}H]DHA와 혼합하여 23℃에서 30분간 반응시켰다. 감압여과하여 반응을 중지시키고 여지위에 남은 방사능 양을 측정하여 베타수용체에 대한 결합을 측정하였다. 비특이적 결합 (nonspecific binding)은 10M의 dl-propranolol을 반응 혼합액에 가했을 때의 결합으로 정의하고 이를 전체 결합에서 빼 주어 특이적 결합 (specific binding)으로 정하였다.

폐 조직의 농도가 증가함에 따라 결합은 일정한 비율로 증가하는 양상을 나타내었으므로 이 후의 연

구에서는 linear range에 해당하는 5mg의 조직을 사용하도록 결정하였다.

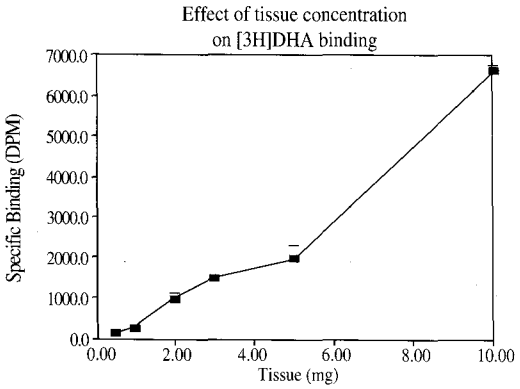

Figure 7. Specific binding (DPM) of ^{3}H-Dihedroalprenolol (DHA) to the various amount of lung membrane preparation. Each point indicates mean value of triplicate.

2) 반응 시간에 따른 효과

흰쥐 폐 세포막 분절과 [^{3}H]DHA의 결합이 반응시간에 따라 변화하는 양상을 비교하였다(Fig. 8). 흰쥐의 폐 세포막 분획을 제조하고 이를 1분에서 60분까지의 다양한 시간대별로 2nM의 [^{3}H]DHA와 혼합하여 23℃에서 반응시켰다.

반응 시간이 증가함에 따라 베타수용체 특이적 결합이 증가되어 약 30분 이후로는 Fig. 8에서와 같이 최대결합인 평형상태에 도달하였으므로 이 후의 연구에서는 반응시간을 30분으로 결정하였다.

3) Ligand인 [^{3}H]DHA 농도 영향

Ligand [^{3}H]DHA의 농도에 따른 흰쥐 폐 조직의 베타수용체 결합양상 변화를 관찰하였다(Fig. 9). 흰쥐의 폐 세포막 분획을 제조하고 이를 0.25nM에서 20nM 까지의 다양한 농도의 [^{3}H]DHA와 혼합하여 23℃ 에서 30분간 반응시켰다.

방사성 동위원소 ([^{3}H]DHA)의 농도가 증가함에 따라 결합은 포화 (saturation)양상을 나타내었다. 이후의 연구에서는 [^{3}H]DHA의 농도를 ½ 최대결합

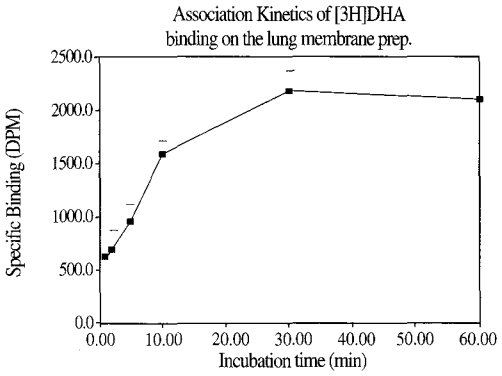

Figure 8. Changes in specific binding (DPM) of [^{3}H]DHA on the rat lung membrane preparation at various incubation time (min). Each point indicates mean of triplicate.

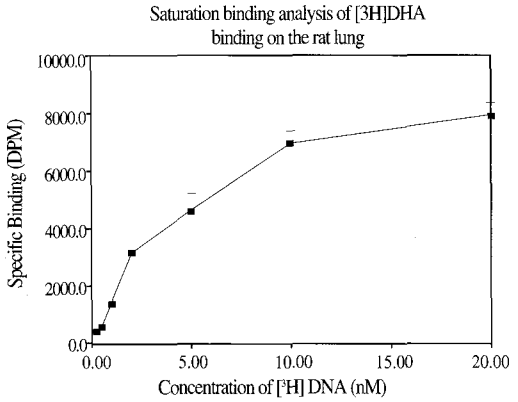

Figure 9. The Saturation Curve of specific binding (DPM) of ^{3}H-dihydroalprenolol (DHA) on the rat lung membrane preparation at various concentrations of DHA. Each point indicates triplicates.

이하를 나타내며 직선성을 유지하는 2nM를 사용하였다.

4) [^{3}H]DHA결합의 Scatchard 분석

흰쥐 폐조직의 분절세포막 분획의 베타수용체에 대한 [^{3}H]DHA결합 특성을 규명하기 위하여 Scatchard 방법으로 분석하였다(Fig. 10). 흰쥐 폐 세포막 분획의

베타수용체의 결합특성을 확인하기 위하여 Fig. 9에 나타낸 바와같이 결합포화 실험을 수행하고 이를 nonlinear iterative curve fitting program인 "Ligand"를 이용하여 Scatchard 분석하였다.

흰쥐 폐 조직의 베타수용체는 [^{3}H]DHA에 대한 높은 친화력과 결합 포화성을 나타내었으며 해리상수인 K_d=0.793nM, B_{max}=1.03pmol/g tissue 이었다 (Fig. 10).

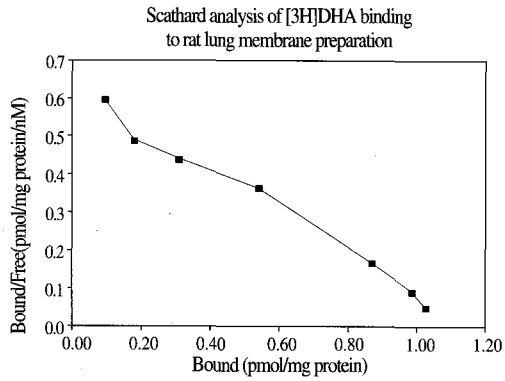

Figure 10. A Representative Scatchard Plot of [^{3}H]-dihydroalprenolol binding on rat lung membrane preparation. X axis indicates bound [^{3}H]-dihydroalprenolol on the membrane and the unit is pmol/mg protein. Y axis represents the ratio of bound to unbound forms on the membrane and the unit is pmol/mg protein/nM. K_d=0.793nM and B_{max}=1.03 pmol/g tissue.

5) 천식유발 및 약물처치에 의한 폐조직중 베타수용체의 변화

천식유발 및 약물처치에 따른 폐조직중 베타수용체의 변화를 측정하였다. 앞의 실험에서 조건을 확립한 후에 흰쥐의 폐 세포막 분획을 제조하고 5mg의 조직을 2nM의 [^{3}H]DHA와 혼합하여 23℃에서 30분간 반응시켰다.

각 4개 군에서 β-receptor의 변화를 측정하였으나 모든군에서 베타수용체의 유의성 있는 변동은 관찰되지 않았다 (Fig. 11).

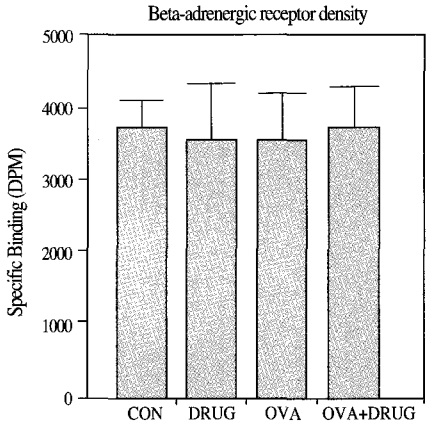

Figure 11. The density of β-adrenergic receptors on rat lung membrane. CON is normal rat control group, DRUG is chungsangbohatang administered normal rat group, OVA is control group of asthma induced rats, and OVA+DRUG is chungsangbohwa-tang treated group of asthma induced rats. Each group contains n=7~10.

Ⅳ. 고 찰

오랫동안 만성 기관지 천식에 사용해오고 있는 한약처방의 작용기전을 현대 과학적으로 규명하고 그 효능을 규명하고자 하였다. 본 연구를 수행함에 있어서 몇가지 어려움이 제기되었는데 그 중 하나는 병태동물 선택이었다. 현재까지 국내외의 연구를 총망라하여 기관지 천식에 대해 복합적인 증상을 보여주는 동물모델이 없었다. 더우기 기존의 발표된 동물모델이 만성기관지 천식의 동물실험으로는 미흡한 점이 많다. 그러나 우리는 만성질환인 천식으로 인해 나타나는 기관지에서의 β-receptor의 변화와 객담을 유발시키는 원인인 화학매체(mediator)의 변화에 기인하는 연구를 하는 것이 바람직하다고 생각되므로 천식이 약 6개월간 지속되는 Ascaris suum을 사용한 기관지 천식유발 동물모델[21]을 선택하고자 하였으나 Ascaris suum을 구할 수 있는 방법이 없었다. 그래서 본 연구에서는 차선책으로 비록 짧

은 회복기를 가졌지만 ovalbumin을 사용한 천식 동물모형을 사용하였다.

이 천식유발 쥐는 Bordetella pertussis antigen으로 sensitization시킨 후, aerosolized ovalbumin을 반복 처치할 경우, bronchoalveolar lavage 내의 mucin 유리가 증가하였으며(Fig. 1), 조직학적으로도 기도점액분비 세포 내의 mucin양이 증가하였다(Fig. 2). 이상의 결과로부터 Bordetella pertussis antigen으로 sensitization시킨 rat에 aerosolized ovalbumin challenge를 적용시킨 본 동물모델에서 기관지 천식이 충분히 유발되었음을 알 수 있다. 그러므로, 이 모델은 기관지 천식의 발병기전을 연구하거나, 기관지 천식 치료제의 약효를 검색하고자 할 때 기관지 천식 동물모델로서 사용될 수 있다고 사료된다.

그러나, ovalbumin의 6회 처치가 끝난 후, 1 주일 이상 방치할 경우 동물에서 유발된 천식정도가 점차 감소하여 정상수준으로 회복되는 것으로 보아 이 동물 모델을 기관지 천식 치료제의 약효 검색용으로 사용할 경우, 약물의 투여시기를 잘 고려해야 할 것이다. 기관지 천식 예방약의 경우에는 약물을 미리 투여한 후 ovalbumin challenge에 의해 천식유발이 되었는지 여부로서 약물효능을 검정하고, 기관지 천식 치료제의 경우에는 ovalbumin challenge 기간 중의 일정 기간에 검색 약물을 병용 투여하여 천식 치료효능 여부를 검색하는 데 활용하는 것이 바람직한 것으로 사료된다.

또한 본 연구에서는 동물실험 후 각각의 해당하는 날짜에 혈액을 채취하여 혈청을 분리하여 catecholamines (특히 epinephrine), cAMP의 농도를 정량하고 동시에 폐 조직내 β_2-receptor의 density를 측정하고자 하였다. 그 결과 혈청내 epinephrine은 천식 유발시 유의성 있게 감소하였고 cAMP 농도는 유의성있는 변화가 나타나지 않았다 (Table 1).

이는 심한 천식환자의 경우에 폐기능이 감소되었고, 혈중 cortisol 및 epinephrine의 농도가 감소되었고[22], 또한 혈중 histamine의 농도가 증가되었으며[23], bronchial reactivity가 증가하여 기관확장효과를 나타냈다는 보고가 있다. 그러나 histamine과 다른 mediator의 증가 (cAMP등)는 세포막에서 adenylcyclase에 영향을 미치는 β-agonist의 증가에 영향을 주고 cortisol도 이에 영향을 주는 것으로 알려졌다.[24,25] 특히 β-agonist가 서양의학적으로는 치료제로 많이 사용되므로 이 receptor의 desensitization이나 down-regulation이 중요한 역할을 한다고 추정된다. 복합적인 증상을 모두 합한 동물모델이 아니라서 미흡한 점이 있으나 임상실험에서 만성 천식환자의 경우는 실제약의 투여 전 후에 나타나는 histamine, cortisol, epinephrine, cAMP농도 및 β-receptor의 변화는 중요한 결과를 주리라고 기대한다. 이들 bio-assay들은 실제 천식에 사용되는 기존 한약재들의 천식에 사용 유무를 현대적인, 과학적인 방법으로 검증하는데 더 큰 의미를 부여한다.

그러나 혈중 epinephrine 및 cAMP의 농도들이 24시간 동안 항상 일정치 않기 때문에 그 결과의 분석에 어려움이 따른다. 특히 이들은 서로 상호 작용하는 경우가 많고 특히 β-receptor, adenylcyclase의 변화는 second messanger로 불리우는 cAMP의 생성에 직접 또는 간접적으로 관여한다. 그러므로 본 연구에서 사용할 한약재 역시 복합처방으로 이들 농도에 미치는 영향을 연구한 경우가 없기 때문에 사용량 설정 및 실험 결과 해석에 상당히 어려운 점이 있는 것으로 판단되었다.

개발된 기관지 천식 병태 동물을 만성해수 병태 모델로 사용하는 것이 적절한지 확인하기 위하여 청상보하탕을 15일간 매일 1회 투약한 후 mucin분비량, epinephrine, β-receptor, cAMP정량을 진행하였다.

Epinephrine정량, mucin정량, β-receptor density정량, cAMP의 정량분석에서 나타난 결과들을 (Fig. 3~11, Tables 1, 2) 비교하여 볼 때 정상쥐보다는 청상보하탕을 투여한 쥐의 mucin분비가 증가하였고 기관지 천식유발 쥐에서도 청상보하탕을 투여한 쥐의 mucin분비가 증가하였다. 또한 병태동물 개발에서도 마찬가지로 천식유발 쥐가 정상쥐보다 더 많은 mucin을 분비하였다. 이것으로 미루어 보면 기관지

천식유발이 mucin분비를 촉진시키는 것 같이 청상보하탕은 기관지에서 mucin분리를 증가시킴으로 거담제의 역할을 하는 것이 밝혀졌다. 또한 기관지 천식 유발쥐의 회복기간이 약 1주일을 기준으로 볼 때 투약기간이 너무 긴 것으로 사료되어 계속적인 antigen처치를 하였으나 한의학에서 인정하는 만성해수로 보기에는 문제가 있었다. 왜냐하면 한의학적인 만성해수는 기관지 뿐만 아니라 인체내의 전체적인 문제로 질병이 진행된 상황이기 때문이다. 따라서 청상보하탕의 투여기간 및 투여량에 대한 조절은 앞으로 계속 연구되어야 할 것으로 사료된다.

혈청 epinephrine이나 폐조직 membrane의 β-receptor등은 천식유발로 변화가 없었으나 cAMP의 농도는 증가하였고 (Table 2, Figure 11), 정상쥐에 비해 천식유발쥐는 epinephrine의 농도가 감소하였고 cAMP의 농도는 변화가 없었다(Table 1). 천식유발쥐가 정상쥐에 비해 epinephrine농도가 감소한 것은 천식환자의 경우와 유사하지만 이 변화도 반복실험을 했을 경우는 다르게 나타났다. 이와 같이 실험의 결과가 반복실험에서 서로 상반된 것으로 앞으로 여러번의 반복실험을 통하여 밝혀야 할 문제이고 동일한 동물 내에서도 시간과 조건에 따라 농도변화가 심한 catecholamin이나 cAMP 같은 물질의 정량에는 좀 더 정확한 여건이 필수적인 것으로 사료된다.

정상쥐나 천식유발쥐에서 청상보하탕의 투여는 mucin분비를 증가시켰으나 epinephrine농도를 변화시키지는 않았으며 cAMP의 농도도 변화가 없었다 (Table 2). 이 결과는 청상보하탕이 거담역할을 하는 것으로 추정된다. 그러나 epinephrine이나 cAMP의 변화가 없는 것은 좀 더 연구되어야 할 것으로 보인다. 또한 β-receptor의 변화가 없었는데 (Fig. 11), 이 결과는 epinephrine과 cAMP의 변화가 없는 것과 일괄성이 있는 것이지만 이는 천식 유발이 심하지 않은 것으로 추정된다.

본 연구에서 만성해수에 대한 병태동물을 기관지 천식유발쥐로 대체하여 진행하였는데 한의학에서 논의하고 있는 만성해수는 장기간에 걸쳐 천식을 유발시켜야 청상보하탕의 적응증이 유발된다고 사료되며 본 병태 동물은 단기간에 걸쳐 유발된 기관지 천식쥐이므로 차후에 본 과제가 연속하여 진행될 때에는 반드시 이번에 유발된 천식과정을 수 회에 걸쳐 반복하여 인체에 전반적인 병증을 일으킬 정도로 만성질환을 유발한 후에 육미지황탕이나 그의 변방인 청상보하탕의 적응증을 검토하여야 하는 것으로 사료된다.

색인어 만성해수, mucin, epinephrine, cAMP, β-아드레날린성 수용체, 청상보하탕

참고문헌

1) Yoshitoshi, Yawara.「4장 호흡기 질환의 진단」.『Medical diagnosis』6th ed. 제일의학사, 1992: 271-324.
2) 한용철.『임상호흡기학』. 일조각, 1990: 208-225.
3) Banerjee, D.K., Lee, G.S., Malik, S.K., and Daly, S.「Underdiagnosis of asthma in the elderly」.『Br. J. Dis. Chest』1987: Vol. 81: 23-29.
4) 황한식.『Clinical Review』.
5) 李珩九.『同意肺系內科學』. 서울: 民瑞出版社, 1986.
6) 李천.『醫學入門』. 서울: 崇文社, 1974.
7) 程國彭.『醫學心悟』. 서울: 우련출판사, 1961.
8) 李仲梓.『醫宗必讀』. 서울: 書苑堂, 1976.
9) 張景岳.『景岳全書』. 臺灣: 국풍출판사, 1976.
10) 김완희, 최달영.『장부변증론치』. 서울: 성보사, 1990: 66-71.
11) Galant, S.P., Duriseti, L., Underwood, S. and Insel, P.A.「Decreased beta-adrenergic receptors of polymorphonuclear leukocytes after adrenergic therapy」.『N. Engl. J. Med.』1978; Vol. 299: 933-936.
12) Galant, S.P., Duriseti, L., Underwood, S., Allred, S. and Insel, P.A.「Beta adrenergic receptors of polymorphonuclear particulates in bronchial asthma」.『J. Clin. Invest.』1980; Vol. 65: 577-585.
13) Itabashi, S., Fukushima, T., Aikawa, T., Yanai, M., Sekizawa,

K., Sasaki, H., and Takishima, T. 「Allergic sensitization in elderly patients with chromatic obstructive pulmonary disease」. 『Respiration』 1990; Vol. 57: 384-388.

14) Haczku, A. , Chung, K.F., Sun, J., Barnes, P.J., Kay, A.B., Moqbel, R. 「Airway hyperresponsiveness, elevation of serum-specific IgE and activation of T cells following allergen exposure in sensitized Brown-Norway rats」. 『Immunology』 1995; Vol. 85: 598-603.

15) Sugiyama, H., Eda, R., Okada, C., Hopp, R.J., Bewtra, A.K., Townley, R.G. 「Eosinophil accumulation and activation in antigen-induced late asthmatic response in guinea pigs」. 『J. Asthma.』 1995; Vol. 32: 37-45.

16) Abraham, W.M., Delehunt, J.C., Yerger, L. and Marchette, B. 「Characterization of a late phase pulmonary response after antigen challenge in allergic sheep」. 『Am. Rev. Respir. Dis.』 1983; Vol. 128: 839-844.

17) Yanni, J.M., Foxwell, M.H., Whitman, L.L. 「Effect of antihistamines on antigen-induced increase of rat tracheal mucous gel layer thickness」. 『Int. Arch. Allery Appl. Immunol.』 1988; Vol. 87: 430-434.

18) Underwood, S.L., Kemeny, D.M., Lee, T.H., Raeburn, D., Karsson, J.A. 「Ricin incrases IgE levels and airway inflammation but not hyperresponsiveness in the rat」. 『Int. Arch. Allery Appl. Immunol.』 1995; Vol. 107: 119-121.

19) Nagase, T., Moretto, A., Dallaire, M.J., Eidelman, D.H., J.G.Martin, Ludwig, M.S. 「Airway and tissue responses to antigen challenge in sensitized Brown Norway rats」. 『Am. J. Respir. Crit. Care. Med.』 1994; Vol. 150: 218-226.

20) Kung, T.T., Jones, H., Adams III, G.K., Umland, S.P., Kreutner, W., Chapman, R.W., Watnick, A.S. 「Characterization of a murine model of allergic pulmonary inflammation」. 『Int. Arch. Allery Appl. Immunol.』 1994; Vol. 105: 83-90.

21) Itabashi, S., Ohrui, T., Sekizawa, K., Aikawa, T., Nakazawa, H., and Sasaki, H. 「Late asthmatic response causes peripheral airway hyperresponsiveness in dogs treated with Metopirone」. 『Int. Arch. Allergy Immunol.』 1993; Vol. 101: 215-220.

22) Szefler, S.J., Ando, R., Cicutto, L.C., Surs, W., Hill, M.R. and Martin, R.J. 「Plasma histamine, epinephrine, Cortisol, and leuckocyte」. 『Clin. Pharmacol. Ther.』 1991; Vol. 49: 59-68.

23) Busse, W.W. 「Pathogenesis and pathophusiology of nocturnal asthma」. 『Am. J. Med.』 1988; Vol. 85(suppl. 1B): 24-29.

24) Morrison, J.F.J., Pearson, S.B. and Dean, H.G. 「Parasymphthetic nervous system in nocturnal asthma」. 『BMJ』1988; Vol. 296(6634): 1427- 9.

25) Martin, R.J., Cicutto, L.C. and Ballard, R.D. 「Factors related to the nocturnal worsening of asthma」. 『Am. Rev. Respir. Dis.』 1990; Vol. 141: 33-38.