

発作がない時の受診 発作時の受診

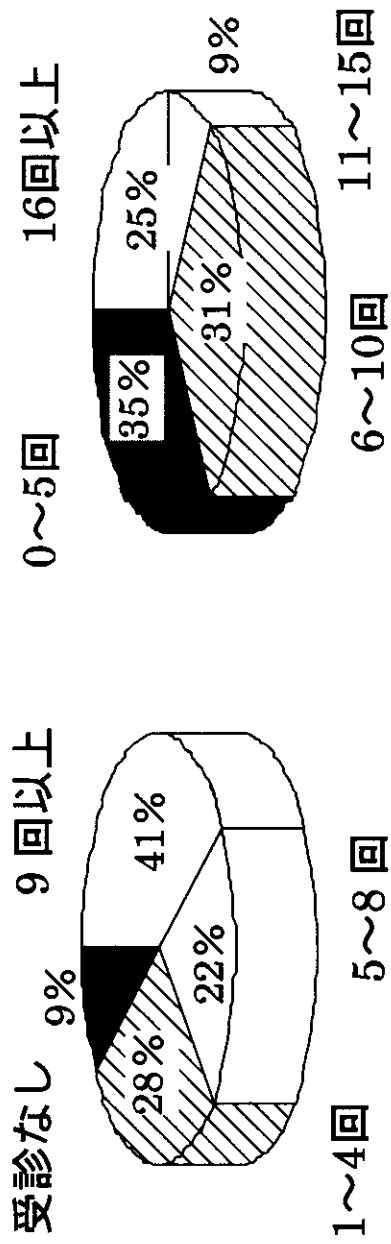


図2. 致死的喘息発作前1年間の受診状況

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業）分担研究

報告書. 気管支喘息急性期治療における薬物の科学的根拠に関する研究

—β2 刺激薬の長期反復曝露の気道の組織学的変化に及ぼす影響—

分担研究者 森川昭廣
群馬大学医学部小児科教授

研究要旨：異なった種類のβ2-刺激薬（フェノテロールとプロカテロール）をモルモットに長期反復曝露し、気道組織の形態学的変化（炎症細胞浸潤の有無、平滑筋の肥厚、外膜の肥厚など）を検討したところ、フェノテロール、プロカテロール吸入群ともに、外膜層は有意に肥厚した。しかしながらその程度はプロカテロール吸入群では有意に軽度であり、β2 刺激薬の種類により、惹起される気道の組織学的変化が異なることが示唆された。

研究協力者：

徳山研一	群馬大学医学部小児科講師
西村秀子	群馬県立がんセンター 小児科医長
望月博之	群馬大学医学部小児科講師
荒川浩一	群馬大学医学部小児科助手
加藤政彦	群馬大学医学部小児科助手

B.研究方法

1. 実験動物

実験動物にはハートレイ系雄性モルモットを使用した。モルモットは反復曝露の内容から以下の4群に区分された。1) 対照液（生理食塩水）吸入群、2) フェノテロール（1 mg/ml）吸入群、3) 低濃度プロカテロール（0.1mg/ml）吸入群、4) 高濃度プロカテロール（1mg/ml）吸入群。反復曝露開始時の体重は各群とも約 300g であった。

2. 反復曝露方法

長期反復曝露の方法としてはフェノテロールを用いて検討した Wang らの方法（Am J Respir Crit Care Med 149:960, 1994）に従った。即ち、0.1あるいは1 mg/ml の濃度のフェノテロール、プロカテロールあるいはこれらの対照液である生理食塩水を1回 50ml、15分かけて吸入させ、これを1日3回、6週間にわたりモルモットに反復して吸入曝露した。吸入装置としてはシズメ・メデイカル社製の実験動物用反復曝露装置を用いた。

3. 吸入方法と吸入量の評価

これら動物における気道への実際のβ2-刺激薬の到達量を把握するため、radio-isotope(RI)を用いて基礎実験として、以下の検討を行なった。実験動物としては、400g のモルモットを用いた。方法は 99mTc (20mCi) を標識したヒト血清アルブミン (HSA) を上記吸入器で15分モルモットに吸入してその気道を摘出し、各気道部位別のRI沈着量を、カウンター (Aloka) にてカウントした。気道は喉頭 (Larynx)、気管 (Trachea)、主気管支 (Main bronchi)、肺内気管支近位部

A.研究目的

吸入β2-刺激薬の連用が喘息管理を悪化させ、気道過敏性を亢進させる可能性が報告されている。一方、その可能性を否定する報告もある。このような相反する結果が得られるのは、それぞれの検討に用いられるβ2-刺激薬の種類が異なるためかもしれない。日常使用されるβ2-刺激薬は複数あるが、β-受容体への親和性、β1-受容体刺激作用、あるいはβ-受容体を介さない薬理学的作用の有無など、生体に対する作用は薬剤間で異なる可能性がある。このため、個々のβ2-刺激薬を長期投与することによる気道反応性の変化を直接、機能的、形態学的に比較検討することはβ刺激薬による喘息の治療指針を確立する上で貴重な基礎的検討資料となることが期待される。昨年我々はその仮説を検討する目的で、異なった種類のβ2-刺激薬、具体的にはフェノテロール、プロカテロールを長期反復曝露した場合の気道過敏性の変化を実験動物を用いて検討し、両薬剤とも気道過敏性を亢進させないという結果を得た。今年度は、これら薬剤の長期反復曝露による気道組織の形態学的変化（炎症細胞浸潤の有無、平滑筋の肥厚、外膜の肥厚など）について検討した。

(Proximal bronchi)、気管支遠位部 (Distal bronchi)、肺 (lung) に分けてカウントした。

計算方法; 20mCi は吸入開始時の値なので、その後は経過とともに崩壊してゆく。臓器の放射線量を測定する時点をとると、今回の実験では、20 時間 17 分が経過していた (=20.25 時間として以後計算)。このため、20mCi が t0 の時点でどの程度まで崩壊していたかを計算する。 $(20e^{-0.693 \times t / T} = 20e^{-0.693 \times 20.25 / 6.0}$ で計算される)。そして、これを t0 における基準値とする。そして、その後も各 well の測定までに崩壊は継続するため、その後の基準値としては、ある程度の時間が経っていれば基準値を設定しなおして計算をする必要が有る。1 本の測定には 1 分 15 秒を要するので、動物毎に 8.75 分ずつ加算して補正した。

4. 気道組織の評価

最終吸入後 3 日後、これらの動物のアセチルコリンに対する気道過敏性を測定 (昨年度報告書参照) したのち、気道組織を採取した。摘出肺の膜性部気管支を直径サイズから 2 レベル (0.4mm 未満と 0.4mm 以上) に分類し、気道壁の構成成分を内膜層、平滑筋層、外膜層の 3 部位に分け、それぞれの壁厚を計測した (図 1)。

C. 研究結果

1. 吸入方法と吸入量の評価

総霧化量に対する沈着量の割合は喉頭、気管+主気管支、肺内気道+肺の 3 部位に分けて検討した。動物の気道部位別の沈着量の総霧化量に対する割合 (%) の平均±SEM を図 2 に示す。気道への $\beta 2$ -刺激薬の総取り込み量は、約 0.04% であることが判明した。このため、1 mg/ml の濃度を 50ml 吸入した動物では、実際の気道への $\beta 2$ -刺激薬の沈着量は 1 吸入で約 20 μ g と概算され、1 日 60 μ g と計算された。

2. 気道組織の評価: 0.4mm 未満の気道における外膜層の厚さは対照液 (生理食塩水) 吸入群が $7.96 \pm 0.48 \mu$ m であったのに対し、フェノテロール (1 mg/ml) 吸入群では $15.6 \pm 1.4 \mu$ m、低濃度プロカテロール (0.1mg/ml) 吸入群 $9.8 \pm 0.7 \mu$ m、高濃度プロカテロール (1mg/ml) 吸入群 $11.1 \pm 0.8 \mu$ m、であった。フェノテロール吸入群のみならず、プロカテロール吸入群においても、外膜層は用量依存性に有意に肥厚した。しかしながらその程度はフェノテロール曝露群と比べて、統計学的に有意に軽度であった。一方、内膜層、平滑筋層では 4 群間に有意の差は認められなかった。0.4mm 以上の気道の壁厚は内膜層、平滑筋層、外膜層ともに差はなかった。

D. 考察

今回の我々の実験系では $\beta 2$ -刺激薬の吸入による長期反復曝露は、モルモットの気道過敏性に影響を与えなかったが、末梢気道における外膜層を肥厚させた。即ち、フェノテロール吸入群のみならず、プロカテロール吸入群においても、外膜層は用量依存性に有意に肥厚した。しかしながらその程度はフェノテロール曝露群と比べて、統計学的に有意に軽度であった。

今回の我々の実験結果を左右する因子として実験動物が実際にどのぐらい $\beta 2$ -刺激薬を吸入していたかが問題となる。このため我々は生後週数の異なる 3 群のモルモットに、実験条件と同じ吸入システムで RI で標識した HSA を吸入させ、実際の吸入量を推測した。その結果、気道への $\beta 2$ -刺激薬の総取り込み量は 400g の動物で、0.043% であることが判明した。このため、1 mg/ml の濃度を 50ml 吸入した動物では、実際の気道への $\beta 2$ -刺激薬の吸入量は約 20 μ g と概算され、1 日 60 μ g となる。臨床的にはフェノテロールの成人に対する 1 日最大投与量は 800 μ g であり、その 10% が気道へ沈着したと仮定するならば、ヒトでは 1 日 80 μ g が気道へ沈着することになる。モルモットとヒトの吸入量を比較する 1 方法として体重当たりの吸入量を用いると、今回の実験のモルモット (500g) の体重当たりの 1 日吸入量は 120 μ g となる。一方、ヒトの体重を 50kg とすると 1 日の吸入量は体重当たり 1.6 μ g となり、今回の実験の吸入量はヒトの約 75 倍の量となる。昨年の報告で我々はこのような大量においても気道過敏性に影響がみられなかったことから、ヒトに用いられる常用量では $\beta 2$ -刺激薬は気道過敏性を直接悪化させる可能性は低いことを示した。今年度の結果は $\beta 2$ -刺激薬を長期間大量投与すると気道に組織学的をもたらしことを示唆しており、フェノテロールを長期反復曝露すると気道外膜が肥厚するとした Wang らの報告 (Am J Respir Crit Care Med 149:960. 1994) を追認した結果であった。しかしながらその臨床的意義は不明である。一方、外膜の肥厚の程度はプロカテロールでは軽微であった。その正確な機序は不明であるが、炎症細胞の機能に対する $\beta 2$ -刺激薬の効果が各薬剤間で異なることと関係している可能性がある。即ち、 $\beta 2$ 受容体は種々の炎症細胞表面に発現している。それぞれの $\beta 2$ 刺激薬のこれら炎症細胞に対する作用は、気道平滑筋に対する作用とは対照的に、必ずしも同一ではない。このような $\beta 2$ 刺激薬間の作用の差異の理由の 1 つに、フェノテロールのような full agonist とプロカテロールのような partial agonist の違いがある。即ち、平滑筋に対する作用に比べ、full agonist と partial agonist の

効果が細胞によっては大きく異なったり、時には partial agonist が full agonist の作用を阻害する場合もある。full agonist と partial agonist の効果が異なる原因としては、両者の薬理学的効果の差に加え、耐性獲得の差なども重要と考えられる。このため、気道に存在する種々の炎症細胞に対して異なった作用を有する結果の総和として、組織学的差異が生じた可能性がある。

E. 結論

モルモットの気道では投与する $\beta 2$ 刺激薬の種類により、惹起される気道の組織学的変化が異なることが示唆された。

F. 研究発表

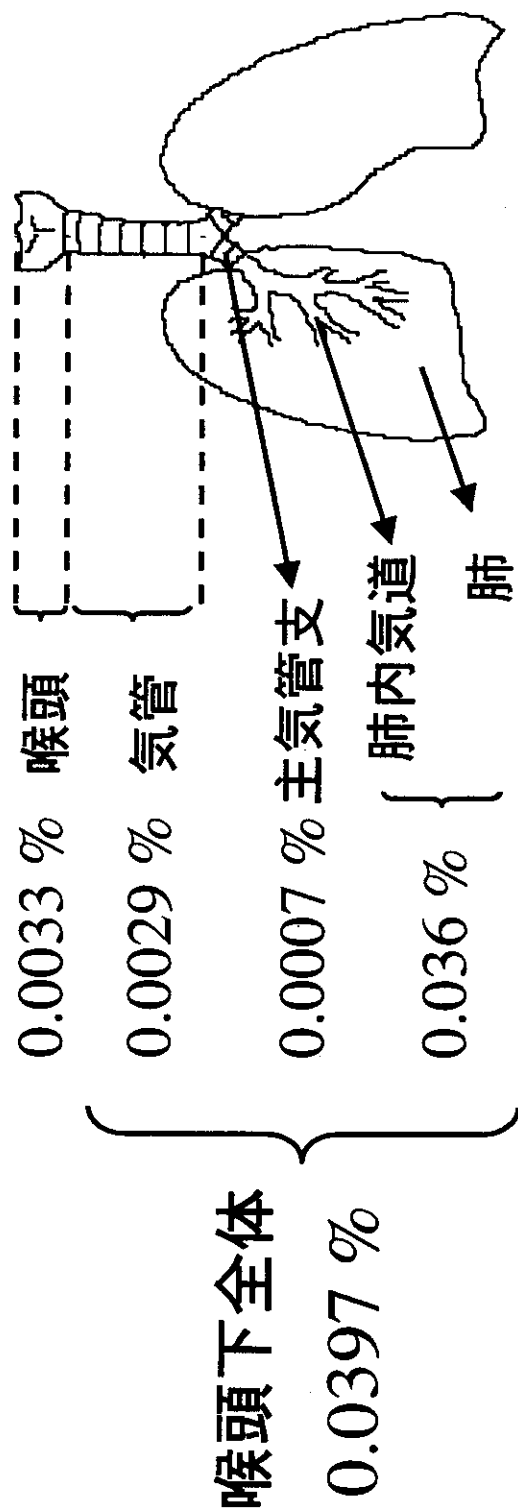
1. 論文発表 該当事項なし

2. 学会発表

1) 西村秀子、徳山研一、井上佳也、荒川浩一、加藤政彦、望月博之、森川昭廣：吸入 $\beta 2$ 刺激薬の長期反復曝露の気道過敏性に及ぼす影響. 第 50 回日本アレルギー学会総会（アレルギー49:929, 2000）

2) 西村秀子、徳山研一、大木康史、荒川浩一、加藤政彦、望月博之、森川昭廣：モルモット気道を用いた吸入 $\beta 2$ 刺激薬の長期反復曝露による気道壁リモデリングの形成に関する検討. 第 37 回日本小児アレルギー学会（日本小児アレルギー学会誌 14:368, 2000）

図1. 総噴霧量に対する部位別の沈着量



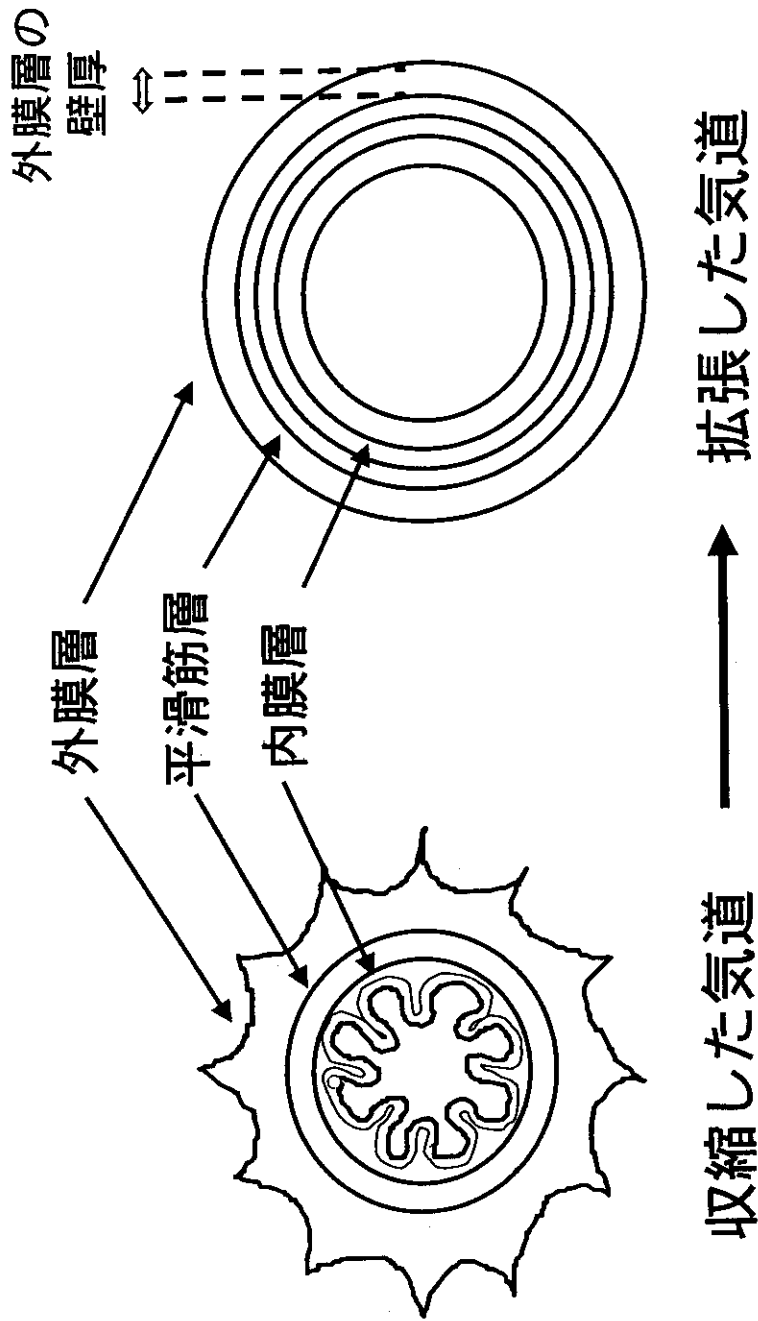


図2. 気道組織の評価方法.

内膜、平滑筋、外膜のそれぞれの層を、拡張した状態に換算して、壁厚を求めた。

β₂ 刺激薬に関する薬理学的研究

分担研究者 永井博式 岐阜薬科大学 薬理学教室 教授

培養ヒト肥満細胞を IgE 依存性に刺激し、肥満細胞活性化に及ぼす β₂ 刺激薬の効果を検討した。β₂ 刺激薬の isoproterenol および salbutamol は細胞内 cAMP レベルを著明に上昇させ、histamine 遊離を濃度依存的に強く抑制した。両 β₂ 刺激薬は細胞内 Ca²⁺ イオン濃度の上昇には影響を及ぼさなかったが、protein kinase C の膜画分への移行を抑制した。protein kinase A 阻害薬 H-89 は β₂ 刺激薬による histamine 遊離の抑制および protein kinase C の膜画分への移行の抑制を消失させた。また、肥満細胞を長時間にわたって β₂ 刺激薬で処置すると、β₂ 刺激薬による細胞内 cAMP レベルの上昇、protein kinase C の膜画分への移行の抑制、および histamine 遊離の抑制は減弱した。

A. 研究目的

β₂ 刺激薬は強力な気管支拡張作用をもち、気管支喘息の発作の緩解、予防に繁用されている。発作時に吸入適用されることが多いが、重症度に応じて定期的な吸入や経口適用も行われる。最近、喘息で死亡する患者の数はようやく減少に転じたが、β₂ 刺激薬の過度の使用によって効果が減弱する可能性があること、また、心血管系に影響を及ぼす可能性があることなどから、β₂ 刺激薬の過度の使用と喘息死との関連が危惧されてきた。現時点においても結論は得られていない。また、ヒト肺や皮膚の肥満細胞を用いた検討から、β₂ 刺激薬が肥満細胞の活性化を強力に抑制することは古くから知られてきたが、これに基づく抗炎症効果あるいは抗アレルギー効果は臨床においてはほとんど認められていない。

本研究では、β₂ 刺激薬を使用する気管支喘息患者に認められるトラブルに β₂

刺激薬がどのように関与しうるか、また、臨床において β₂ 刺激薬の抗炎症効果が認められない理由は何かを明らかにすることを最終的な目標とし、培養ヒト肥満細胞を用い、β₂ 刺激薬の作用発現機構、および長時間処置後の作用減弱機構の解析を行った。

B. 研究方法

(1) 薬物

β₂ 刺激薬として isoproterenol および salbutamol を用いた。他に dibutyryl cAMP (Bt₂-cAMP)、forskolin および protein kinase A (PKA) 阻害薬 H-89 を用いた。

(2) 肥満細胞の培養

ヘパリン処置した約 20 ml の臍帯血を bovine serum albumin (BSA) を 1% 含有する RPMI 1640 medium で 2 倍に希釈し、lymphocyte separation medium 上に積層して室温、400×g で 25 分間遠心した。境界面

にできる比重 1.077 g/ml の細胞層を分取し、phosphate buffered saline (PBS) で 2 回洗浄した後、2 mM EDTA および 0.5 % BSA を含む PBS に浮遊して単核球浮遊液とした。細胞磁気分離システムを用い、単核球中の CD34 陽性細胞を分離した。CD34 陽性細胞を 80 ng/ml stem cell factor, 50 ng/ml IL-6 および 15 % fetal bovine serum を含む α -minimum essential medium に浮遊して $2\sim 5 \times 10^5$ cells/ml とし、培養した。1 週間に 1 回 medium を交換して維持し、12 週間以上培養した細胞を実験に用いた。培養細胞の 99 % 以上がトリプターゼ陽性、約 20 % がキマーゼ陽性で、約 50 % の細胞が Fc ϵ RI を発現する。 10^6 個細胞あたり約 8 μ g の histamine を含有し、IgE 依存性刺激によって prostaglandin D₂, leukotrienes を産生遊離する。

(3) histamine 遊離

培養肥満細胞を 1 μ g/ml のヒトミエローム IgE で一晩受動感作した後、Tyrode 液 (pH 7.4) で洗浄し、最終濃度が 1×10^5 cells/ml となるように細胞浮遊液を調製した。37 $^{\circ}$ C、5 分間のプレインキュベーションの後抗 IgE を添加し、30 分間インキュベートした。4 $^{\circ}$ C で遠心して上清を分離し、histamine を定量した。 β_2 刺激薬および Bt₂-cAMP は反応惹起 10 分前に、H-89 は反応惹起 15 分前に添加した。

上清中の histamine は HPLC と o-phthalaldehyde による蛍光測定法を組み合わせた自動測定装置を用いて測定した。また、細胞中総 histamine 含量は 1.2 % の過塩素酸で抽出して測定した。histamine の検出感度は 0.2 ng/ml であった。

(4) 細胞内 cAMP レベル

Tyrode 液で 5×10^5 cells/ml の肥満細胞浮遊液を調製し、 β_2 刺激薬を添加して 10 分間インキュベートした。cAMP レベルの測定には Verghese らの方法を用いた。

すなわち、インキュベーション後の細胞浮遊液を液体窒素で素早く凍結し、超音波で細胞を完全に破碎した。無水酢酸およびトリエチルアミンを用いてアセチル化した後 enzyme immunoassay 法で測定した。

(5) 細胞内 Ca イオン濃度

感作した肥満細胞に最終濃度 2 mM の fura-2 AM を加え、15 分間 loading した後遠心洗浄し、Tyrode 液に最終細胞濃度が 2×10^6 cells/ml となるように浮遊した。37 $^{\circ}$ C で 5 分間プレインキュベートした後、最終濃度 4 μ g/ml の抗 IgE で刺激し、細胞内 Ca イオン濃度の変化を蛍光測定器で測定した。蛍光は 340 nm および 380 nm の 2 波長で励起し、510 nm で測定した。なお、蛍光強度の変化は 340 nm 励起の蛍光強度と 380 nm 励起の蛍光強度の比でモニターした。 β_2 刺激薬および Bt₂-cAMP は反応惹起 10 分前に添加した。

(6) protein kinase C (PKC) の膜画分への移行

感作肥満細胞を洗浄後、Tyrode 液に最終細胞濃度 5×10^5 cells/ml となるように浮遊した。5 分間のプレインキュベーションの後、最終濃度 4 μ g/ml の抗 IgE を添加して反応を惹起した。インキュベーション後直ちに 3,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 2 分間遠心し、細胞ペレットを細胞溶解液 1 ml に懸濁して 30 秒間超音波処理した。細胞破碎液を 4 $^{\circ}$ C、100,000 \times g、60 分間遠心し、上清を細胞質画分とした。また、ペレット (細胞膜) を 1 % IGEPAL CA-630 を含む細胞溶解液 1 ml に懸濁し、20 秒間超音波処理して細胞膜画分とした。各画分に含まれる PKC 活性は PKC enzyme assay kit で測定した。PKC 活性は 1 分間に 1 pmol のリン酸を基質に転移する酵素量として示した。 β_2 刺激薬および Bt₂-cAMP は反応惹起 10 分前、H-89 は反応惹起 15 分前に添加した。

(7) β_2 刺激薬の長時間処置

肥満細胞を $1 \mu\text{g/ml}$ のヒトミエローマ IgE で一晚受動感作し、24 時間毎に終濃度 $2.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ の isoproterenol あるいは $2.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ の salbutamol を 3 回累積的に添加した。3 回目の添加から 24 時間後に Tyrode 液で 2 回洗浄し、細胞浮遊液を調製した。5 分間プレインキュベートした後、終濃度 $2.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ の isoproterenol あるいは $2.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ の salbutamol を添加した。単回処置群には薬物の代わりに培養液を 3 回添加し、4 回目のみ終濃度 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ または $2.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ の isoproterenol、 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ または $2.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ の salbutamol を添加した。

C. 研究結果

(1) histamine 遊離

感作肥満細胞を $10 \mu\text{g/ml}$ までの抗 IgE で刺激すると、抗 IgE の濃度に依存して histamine 遊離が認められた。histamine 遊離は約 30 分でプラトーに達し、 $10 \mu\text{g/ml}$ の抗 IgE 刺激では総 histamine の約 50% が遊離した。

isoproterenol は $0.01 \mu\text{M}$ から、salbutamol は $0.1 \mu\text{M}$ から histamine 遊離を抑制し、濃度に依存して抑制は増強した (Fig. 1A)。また、 1 mM の Bt2-cAMP も histamine 遊離を強く抑制した。

(2) 細胞内 cAMP レベル

isoproterenol および salbutamol は細胞内 cAMP レベルを著明に上昇させ、検討した最低濃度である isoproterenol $0.001 \mu\text{M}$ および salbutamol $0.01 \mu\text{M}$ においても明らかな上昇がみられた (Fig. 1B)。

また、Fig. 1C に示すように、isoproterenol および salbutamol の histamine 遊離抑制作用と細胞内 cAMP レベル上昇作用とは有意な正の相関関係を示した。

(3) 細胞内 Ca イオン濃度

感作肥満細胞を抗 IgE で刺激すると、細胞内 Ca イオン濃度は数秒以内に上昇を始め、2~3 分で最大となり、以後徐々に減少した。

isoproterenol および salbutamol はいずれも刺激 2 分後の細胞内 Ca イオン濃度に影響を及ぼさなかった。また、Bt2-cAMP も細胞内 Ca イオン濃度の上昇を抑制しなかった (Fig. 2)。

(4) PKC の膜画分への移行

PKC は活性化に際して細胞質画分から膜画分へ移行する。無刺激時には 90% 以上の PKC 活性が細胞質に検出されるが、感作肥満細胞を抗 IgE で刺激すると、1 分後から膜画分への移行が観察され、5 分後には総 PKC 活性の約 40% が膜画分に検出される。histamine 遊離がほぼ完了する刺激 30 分後においても約 30% が膜画分に検出される。

isoproterenol および salbutamol はいずれも PKC の膜画分への移行を用量依存的に抑制した (Fig. 3)。また、Bt2-cAMP も同様に抑制作用を示した。 β_2 刺激薬による PKC の膜分画への移行の抑制強度は、histamine 遊離抑制の強度および細胞内 cAMP レベルの上昇の強度によく相関した。また、成績には示さないが、forskolin も明らかに PKC の膜分画への移行を抑制した。

(5) H-89 の影響

$0.01 \mu\text{M}$ isoproterenol および $0.1 \mu\text{M}$ salbutamol は感作肥満細胞からの抗 IgE 刺激による histamine 遊離を 80~90% 抑制した。PKA 阻害薬 H-89 は濃度依存的に histamine 遊離抑制を減弱させ、 $3 \mu\text{M}$ では抑制をほぼ消失させた (Fig. 4)。また、 1 mM の Bt2-cAMP は histamine 遊離を約 75% 抑制したが、その抑制は H-89 によって濃度依存的に減弱した。成績には示さないが、forskolin による histamine 遊離抑

制作用も H-89 によって減弱した。なお、H-89 は 10 μ M までの濃度では histamine 遊離を惹起しないこと、また、抗 IgE 刺激による histamine 遊離に影響を及ぼさないことを確認した。

0.01 μ M isoproterenol および 0.1 μ M salbutamol は抗 IgE 刺激による PKC の膜画分への移行をほぼ完全に抑制した。3 μ M の H-89 はその抑制をほぼ完全に消失させた (Fig. 5)。Bt2-cAMP による PKC の膜画分への移行の抑制も H-89 によって明らかに減弱した。成績には示さないが、forskolin による PKC の膜画分への移行の抑制に対しても H-89 は明らかな抑制作用を示した。

(6) β_2 刺激薬の長時間処置

感作肥満細胞を 3 日間にわたって β_2 刺激薬で処置した後の histamine 遊離に及ぼす抑制効果を検討した。2.5 $\times 10^{-8}$ M の isoproterenol の刺激 10 分前の処置は histamine 遊離を約 60 % 抑制した。これに対し、3 日間前処置を行った場合には、isoproterenol による histamine 遊離抑制は約 10 % に減弱した (Fig. 6)。salbutamol の場合にも長時間の前処置によって histamine 遊離抑制の減弱が認められた。

2.5 $\times 10^{-8}$ M の isoproterenol あるいは 2.5 $\times 10^{-7}$ M の salbutamol により 10 分後の細胞内 cAMP レベルは約 300 % 上昇し、75 fmol 以上の値を示した。これに対し、3 日間にわたって薬物を前処置した場合には細胞内 cAMP レベルの上昇は減弱し、50 fmol 以下であった (Fig. 7)。しかし、減弱の程度は histamine 遊離の場合に比して軽度であった。

2.5 $\times 10^{-8}$ M および 1 $\times 10^{-7}$ M の isoproterenol は PKC の膜画分への移行を、それぞれ約 50 % および約 35 % 抑制した。これに対し、3 日間にわたって薬物で前処置した場合には PKC の膜画分への移

行の抑制は消失した (Fig. 8A)。salbutamol によっても同様の成績が得られたが、薬物前処置によって PKC の膜画分への移行は促進された (Fig. 8A)。一方、細胞質画分の PKC 活性は刺激 10 分前の isoproterenol あるいは salbutamol の処置によって増大したが、3 日間の前処置によって増大はほぼ完全に消失した (Fig. 8B)。

D. 考察

β_2 刺激薬はヒト肺組織や肺から分離した肥満細胞からのメディエーター遊離を強く抑制する。その抑制効果は disodium cromoglycate よりもはるかに強力である。本研究においても、isoproterenol および salbutamol は培養ヒト肥満細胞を IgE 依存性に刺激して誘発する histamine 遊離を強力に抑制した。

これまでの検討から、培養ヒト肥満細胞に Fc ϵ RI cross-linking を介してシグナルが導入されると、さまざまなシグナル伝達経路が活性化されるが、脱顆粒および histamine 遊離には PLC- γ 1 の活性化を介する Ca イオンの細胞内濃度の上昇と PKC の活性化が関与し、arachdonic acid 代謝産物の産生遊離は PLC- γ 1 の経路および ERK の経路が役割をはたすものと推定される。また、cytokine の産生遊離には ERK および JNK の両経路が関与すると考えられるが、P38 MAPK は JNK の経路を制御する役割をもつと推定される。

本研究における成績から、 β_2 刺激薬は受容体を介し、adenylate cyclase を活性化して cAMP レベルを上昇させ、PKC の活性化を抑制して histamine 遊離を抑制するものと推定される。PKA 阻害薬 H-89 によって β_2 刺激薬による histamine 遊離抑制ならびに PKC 活性化抑制のいずれも消失することから、PKC 活性化抑制には PKA の活性化が関与することを示唆する。

また、肥満細胞を β_2 刺激薬で長時間処置することによって histamine 遊離に対する抑制効果は著しく減弱した。同時に、細胞内 cAMP レベルの上昇および PKC 活性化抑制も減弱した。したがって、 β_2 刺激薬との長時間の接触によって生じる β_2 刺激薬の反応性低下は、受容体もしくは受容体直下のシグナル伝達経路の機能低下によって生じることを示唆する。これまでに β_2 受容体刺激が受容体と Gs タンパクとのカプリング阻害をもたらすこと、長期間にわたる刺激が受容体発現を低下させることなどが報告されており、培養ヒト肥満細胞における β_2 刺激薬の効果減弱に関わるものと推定されるが、今後具体的に確認することが必要である。

D. 結論

β_2 刺激薬の isoproterenol および salbutamol は培養ヒト肥満細胞の IgE 依存性刺激による histamine 遊離を著明に抑制する。抑制には PKA の活性化を介した PKC 活性化の抑制が関与すると考えられる。また、 β_2 刺激薬との長時間の接触によって生じる β_2 刺激薬の反応性低下は、受容体もしくは受容体直下のシグナル伝達経路の機能低下によって生じることが示唆される。これらの知見は、 β_2 刺激薬を使用する気管支喘息患者に認められるトラブルに β_2 刺激薬がどのように関与するか、また、臨床において β_2 刺激薬の抗炎症効果が認められない理由は何かを考察するさいに有用であると考えられる。

F. 研究発表

学会発表

Kimata M, Inagaki N, Nagai H. Inhibitory mechanisms of human mast cell histamine release caused by beta-adrenoceptor agonists. J Allergy Clin Immunol 105: S65, 2000

[56th AAAAI Annual Meeting, San Diego, USA]

稲垣直樹, 永井博式. β_2 刺激薬 MDI の薬理的検討. アレルギー 49: 162, 2000 [第 12 回 日本アレルギー学会春期臨床大会, 福岡]

加藤俊伸, 木股正博, 田中宏幸, 稲垣直樹, 永井博式. β 刺激薬による肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制機構の解析. 日本薬理学雑誌 117: 32P, 2001 [第 98 回 日本薬理学会近畿部会, 岐阜]

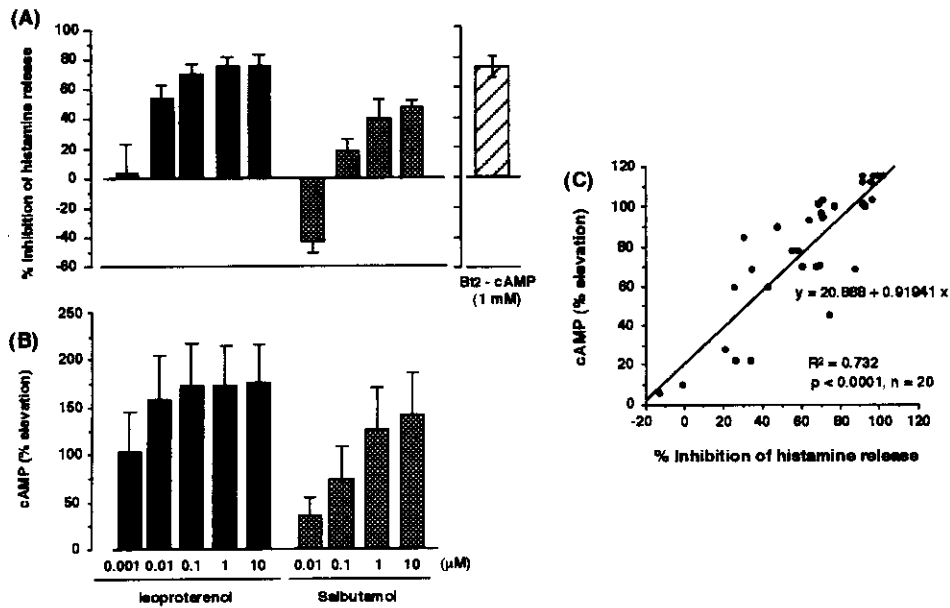


Fig. 1 The effects of β -agonists on histamine release (A, $n=4$), and on the levels of cAMP (B, $n=6$) are shown. Values are expressed as percent inhibition of the control histamine release and percent enhancement of the control cAMP levels. Relationship between the inhibition of histamine release and the elevation of cAMP levels by β -agonists is shown in (C).

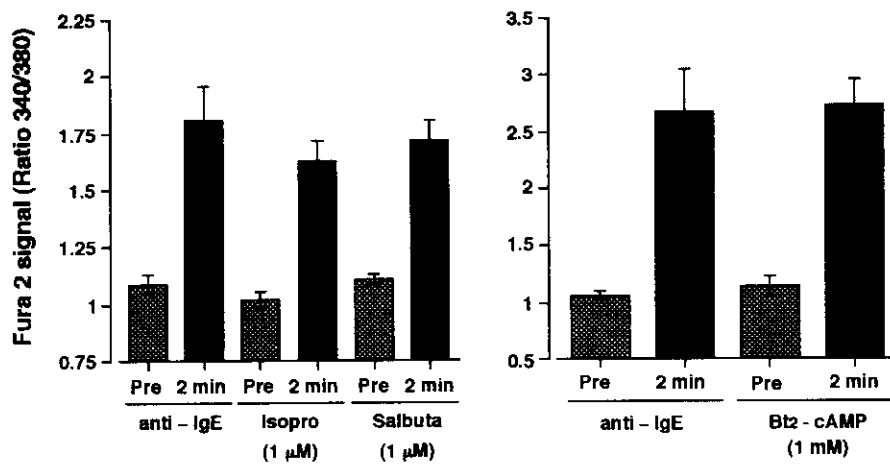


Fig. 2 Effects of β -agonists on IgE-mediated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation in HCMC. Ratio of fura-2 signals was measured by a Ca^{2+} analyzer. Each value represents the mean \pm SEM of 3 different experiments.

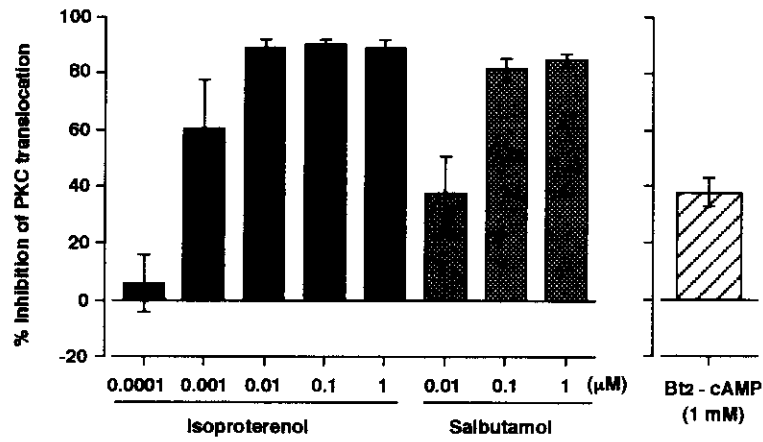


Fig. 3 Effects of β -agonists on IgE-mediated PKC translocation to the membrane fraction in HCMC. Sensitized HCMC were challenged with anti-IgE, and then separated into the membrane fraction and the cytosol fraction. β -agonists were added 10 min before challenge. PKC content in these fractions were determined by Amersham's PKC enzyme assay system, and values were expressed as the % inhibition of the control response. Each value represents the mean \pm SEM of 3 different experiments.

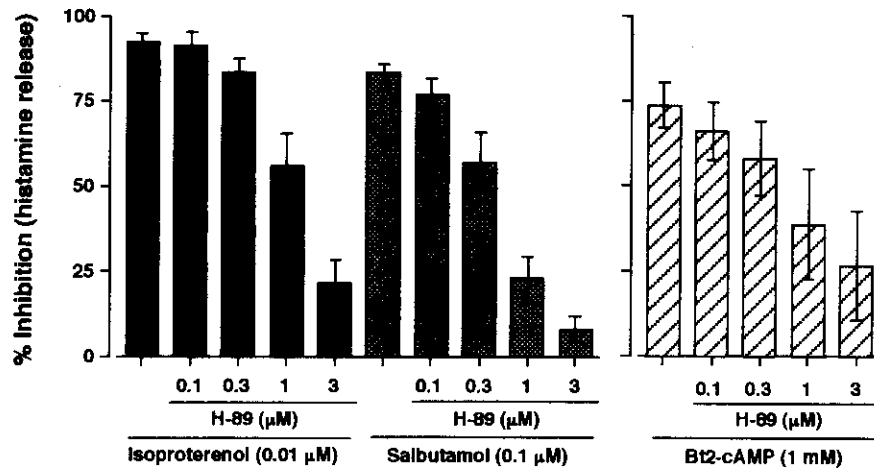


Fig. 4 Effect of H-89 on β -agonist-induced inhibition of histamine release. Values are expressed as the % inhibition of the control histamine release. Each value represents the mean \pm SEM of 3 different experiments.

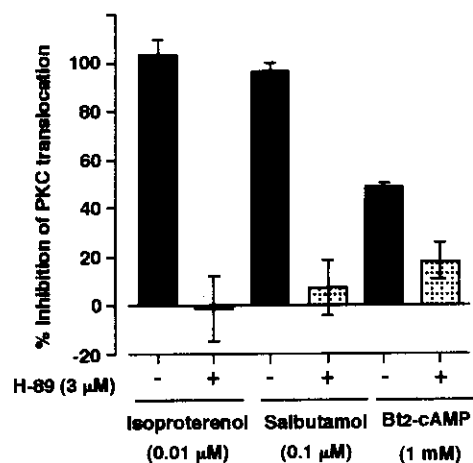


Fig. 5 Effect of H-89 on β -agonist-induced inhibition of PKC translocation. Values are expressed as the % inhibition of the control response. Each value represents the mean \pm SEM of 3 different experiments.

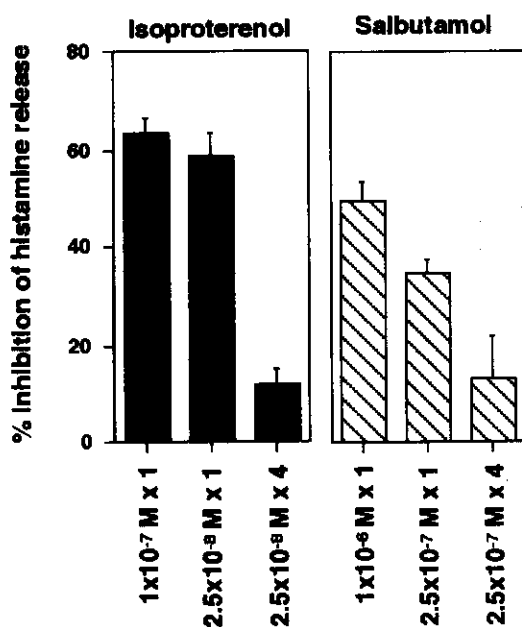


Fig. 6 Effects of repeated treatment with β -agonists on histamine release from HCMC. Values are expressed as the % inhibition of the control histamine release. Each value represents the mean \pm SEM of 5 independent experiments.

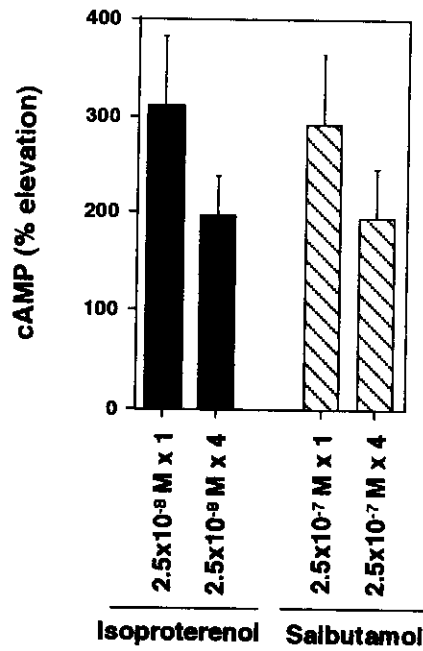


Fig. 7 Effects of repeated treatment with β -agonists on cAMP levels in HCMC. Values are expressed as % enhancement of the control cAMP levels. Each value represents the mean \pm SEM of 3 independent experiments.

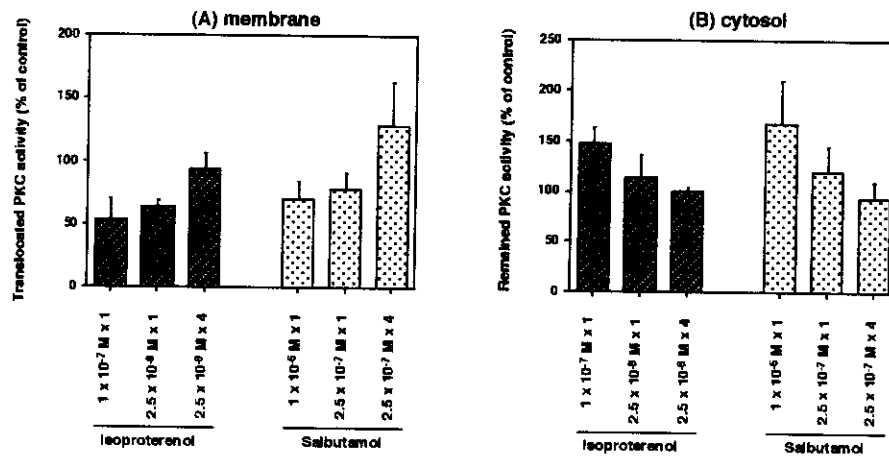


Fig. 8 Effects of repeated treatment with β -agonists on PKC translocation in HCMC. Values are expressed as the translocated (A) or remained (B) PKC activity (% of control). Each value represents the mean \pm SEM of 3 independent experiments.

定量噴霧式吸入器に関する研究

研究分担者 高野 頌
同志社大学工学部・教授

研究要旨

定量噴霧式吸入器のひとつであるドライパウダー吸入剤(DPIs)の臨床適用における薬剤粒子の霧化特性を実験的に明らかにした。また、数値解析モデルを用い薬剤沈着率を推算してDPIsの総合的評価を行った。DPIsでは、気道内局所沈着量が薬剤粒子密度や重量基準空気力学径に強く依存するとともに、呼吸パターンや吸入速度などの吸入条件によっても著しく変化することがわかった。ここで、重量基準空気力学径の測定には飛行時間法などの直接測定が必要である。一方、下気道での薬物到達量を変化させるため、呼吸パターンの違いや小児と成人の比較において、気管・気管支領域における薬物沈着率の推算値が有意に異なるなど、解決すべきいくつかの問題点が見出された。さらに、加圧型定量噴霧式吸入器(pMDIs)との比較検討を行って、両者の差異を明らかにした。喘息治療において定量噴霧式吸入器の有用性は明らかであるとしても、pMDIsとDPIsの比較検討により両方で気道局所での薬剤沈着率に差異が認められることなどから、超音波吸入器など他の吸入剤を含めた薬物投与法の標準化が必要であるとの結論を得た。

A. 研究目的

喘息治療において、 β 刺激薬やステロイド薬の剤形として定量噴霧式吸入器の使用頻度が高い。その中でも特に加圧型定量噴霧式吸入器(pMDIs)は使用頻度が多いが、特定フロンから代替フロンへの移行という緊急の課題を抱えている。本研究班でも平成11年度の研究報告において、pMDIsの諸特性の評価を行い、上気道では薬物粒子の沈着はプロペラントの蒸発速度と関連するため薬物粒子径と粒子速度を同時に測定する新たな手法が必要であり、また下気道では空気力学径を直接に測定する新たな手法を既存の評価法に加えるべきとの結論を得た。しかし一方で、ドライパウダー吸入剤(DPIs)が代替フロンpMDIsの開発に平行して使用されてきたことから、吸入療法を総合的に評価する場合には、DPIsの霧化特性や沈着特性を明らかにするとともに、さらにDPIsとpMDIsの吸入療法としての比較検討と吸入手法の標準化が必要となってきた。

そこで本研究では、DPIsの臨床適用に際し、薬剤粒子の霧化特性を実験的に明らかにし、さらに数値解析モデルを用い薬剤沈着率を推算してDPIsの総合的評価を行うことを目的とする。またpMDIsとの比較検討を行って吸入療法におけるこれらの定量噴霧式吸入器の有効な使用法を検討する。

B. 研究方法

気道局所におけるドライパウダー吸入剤の測定には、薬物粒子の空気力学径の直接測定として飛行時間法(TSI社、代理店:セントラル科学貿易)、また平均的な薬物粒子沈着率の測定としてアンダーセン法(東京ダイレック社)を用いた。ここで、粒子沈着は粒子密度の補正によってすべて空気力学径で統一して評価された。また、上気道および下気道における薬剤粒子の沈着メカニズムと評価手法には、慣性衝突による上気道での薬剤粒子沈着に対して慣性パラメータおよびストークス数、安静時および高負荷時における薬剤粒子沈着特性の数値解析には呼吸パターン、小児および成人における気道形態の差異などを計算因子とした。数値解析モデルにはワイブルモデルおよび五葉モデルを用いた。

C. 研究結果

ドライパウダー吸入剤(DPIs)では、上気道と下気道において薬物粒子の沈着メカニズムに差異が認められた。すなわち、薬物を送達するためのキャリアー成分とそのキャリアー上に付着する薬物のそれぞれの重量基準(体積基準)の空気力学径が異なるために、上気道では薬物を付着したままのキャリアー成分が沈着し、さらに吸入速度や薬物粒子密度によって下気道での薬物沈着率が著しく変化するこ

となど、臨床において検討すべき問題点が明らかにされた。また、DPIsとpMDIsの吸入療法としての比較検討を行った結果、pMDIsに比べてDPIsの方がわずかに高い薬剤沈着率を示した。

D. 考察

解析結果より、pMDIsに比べてDPIsの方が比較的に高い薬剤沈着率を示したとしても、DPIsの場合には、Fig. 1に示すように、キャリアー成分が薬剤に添加されているため、気道における有効な薬物の局所沈着率の推算には不確かさが伴っている。またFig. 2およびFig. 3での成人の場合、自然呼吸では薬剤粒子の空気力学径と分布の広さによって上気道および下気道での薬剤局所沈着率には明かな差異が認められた。一方、小児の場合にも、Fig. 5に結果を示すように同様の結論を得た。

呼吸における吸入量に対しては、Fig. 4に示すように粒子径の変化と同様に薬物局所沈着率は変化した。すなわち、吸入量が多くなると上気道での沈着量は増加し、逆に下気道での沈着率はやや減少した。しかし、総沈着量は増大した。さらにFig. 6の結果のように、フェノテロール、(pMDIs)、イソプロカテロール (pMDIs)、サルブタモール (non-CFC pMDIs)、フルチカゾン (DPI) などのいくつかの薬剤で、薬物局所沈着率はDPIsとpMDIsにおいて顕著な差異が認められた。

以上のように、主として吸入速度のパラツキが薬物粒子の分散効果や下気道での薬物到達量を変化させるため、呼吸パターンの違いや小児と成人の比較において、気管・気管支領域における薬物沈着率の推算値が有意に異なるなど、解決すべきいくつかの問題点が見出された。

E. 結論

ドライパウダー吸入剤では、気道内局所沈着量が薬剤粒子密度や重量基準空気力学径に強く依存するとともに、呼吸パターンや吸入速度などの吸入条件によっても著しく変化することを明らかにした。ここで重量基準空気力学径の測定には飛行時間法などによる直接測定が求められる。また、喘息治療において定量噴霧式吸入器の有用性は明らかであるとしても、pMDIsとDPIsの比較検討により両者で気道局所での薬剤沈着率に差異が認められることなどから、超音波吸入器など他の吸入剤を含めた薬物投与法の標準化が必要であるとの結論を得た。

<研究成果>

- 1) H. Takano, N. Futagawa and M. Itoh: Mediated transepithelial permeation of normal human bronchi under ultrasonic radiation, Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Matr., 2000, Vol. 27, pp.141-142.
- 2) H. Takano, T. Tachiwaki, M. Nakazawa and M. Itoh: Characteristics of propellant evaporation and drug depositon for pressurized metered dose inhaler substituting HFA-134A, Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Matr., 2000, Vol. 27, pp.338-384.
- 3) H. Takano, T. Ohtani, Y. Tsumaru, T. Soma and M. Itoh: A physical model for diffusivity of drugs through membrane, Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Matr., 2000, Vol. 27, pp.714-715.
- 4) 西城隆一郎, 間島雄一, 兵 昇, 高野 頌, 国貞 智弘: 鼻内手術後副鼻腔へのエアロゾル到達濃度の検討, 耳鼻咽喉科展望, 2000, Vol. 43, pp. 11-14.

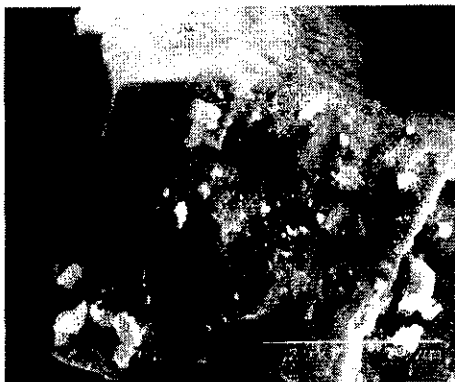


Fig.1 Photograph of fluticasone propionate and lactose.

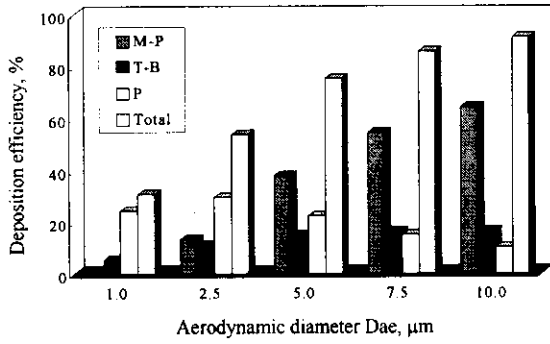


Fig.2 Deposition efficiency of drugs in airways for various aerodynamic diameters (Adults, mouth breathing, tidal volume 750ml, functional residual capacity 3000ml, skewness of respiratory wave form 0.45, respiratory frequency 15 min⁻¹, and geometric standard deviation 2.0)

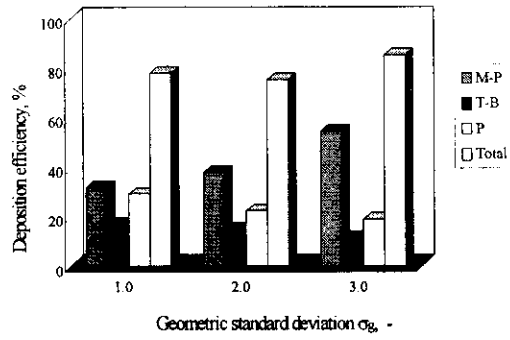


Fig.3 Deposition efficiency of drugs in airways for various particle distributions (Adults, mouth breathing, tidal volume 750ml, functional residual capacity 3000ml, skewness of respiratory wave form 0.45, respiratory frequency 15 min⁻¹, and aerodynamic diameter Dae 5.0μm)

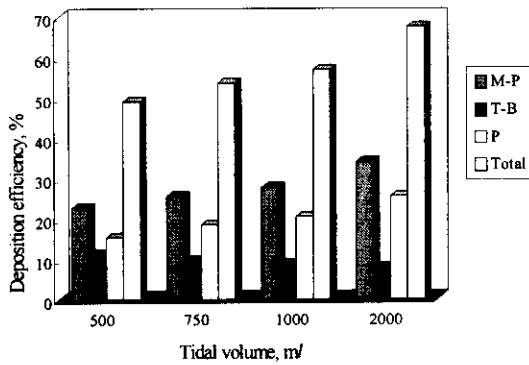


Fig.4 Deposition efficiency of drugs in airways for various tidal volumes (Adults, mouth breathing, functional residual capacity 3000ml, skewness of respiratory wave form 0.45, respiratory frequency 15 min⁻¹, aerodynamic diameter Dae 5.0μm, and geometric standard deviation 2.0)

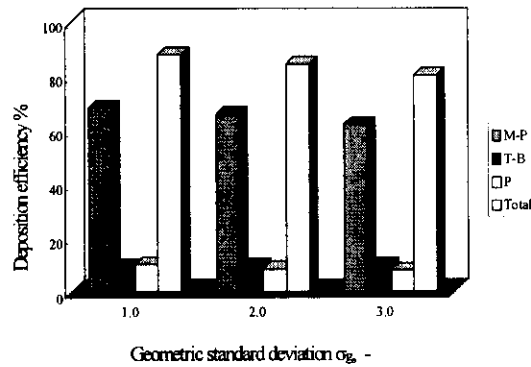


Fig.5 Deposition efficiency of drugs in airways for various particle distributions (Children, mouth breathing, tidal volume 200ml, functional residual capacity 770ml, skewness of respiratory wave form 0.45, respiratory frequency 25 min⁻¹, and aerodynamic diameter Dae 5.0μm)

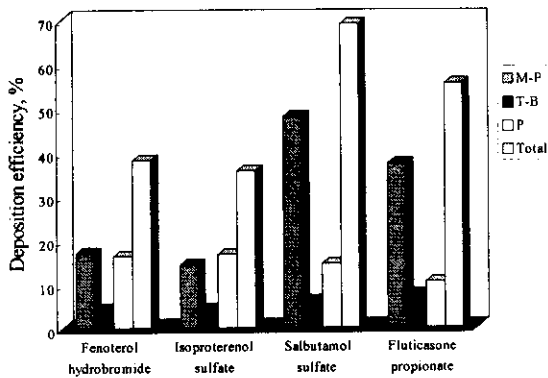


Fig.6 Deposition efficiency of drugs in airways with various pMDIs and DPIs (Children, mouth breathing, tidal volume 200ml, functional residual capacity 770ml, skewness of respiratory waveform 0.45, and respiratory frequency 25 min⁻¹)

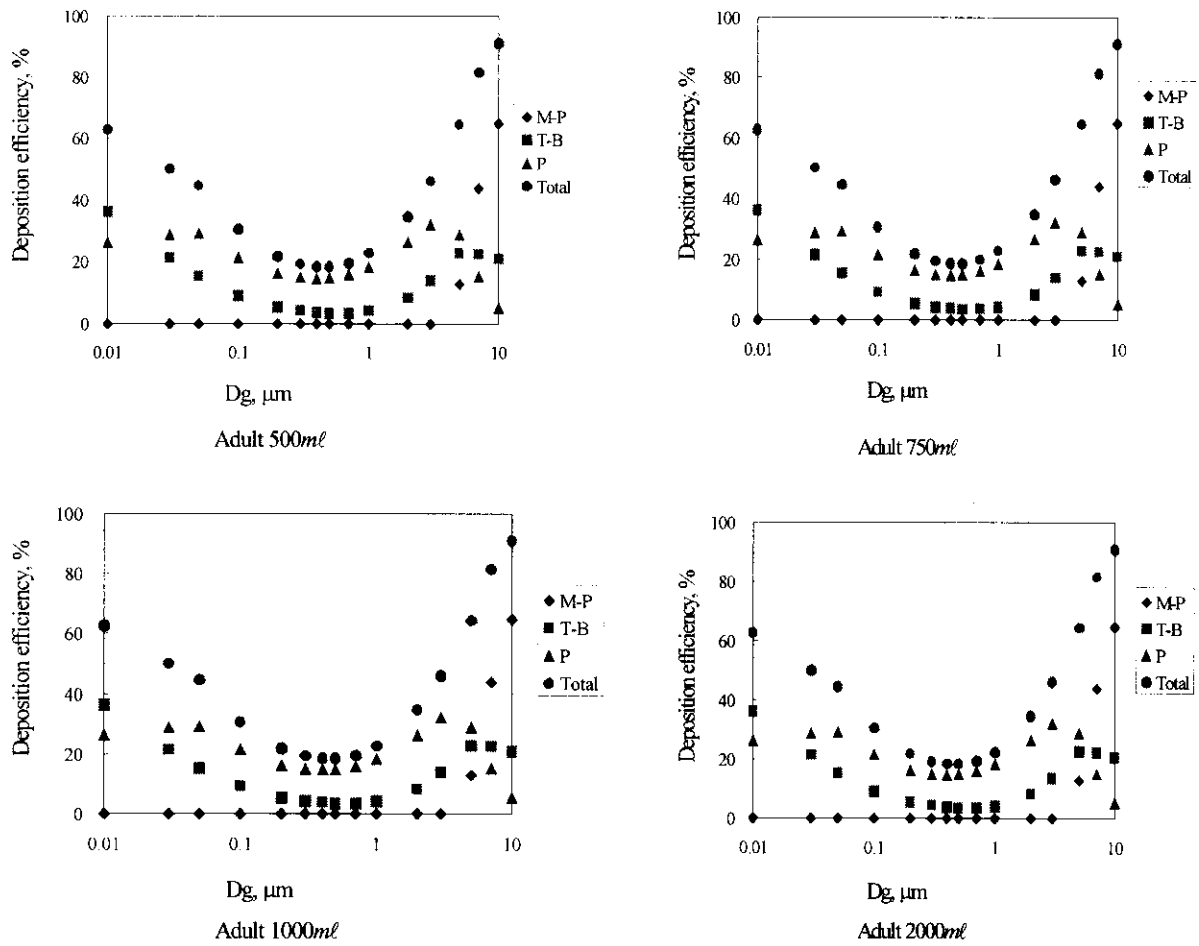


Fig. 7 Partial deposition efficiency of drug particles for various tidal volume (Adults).

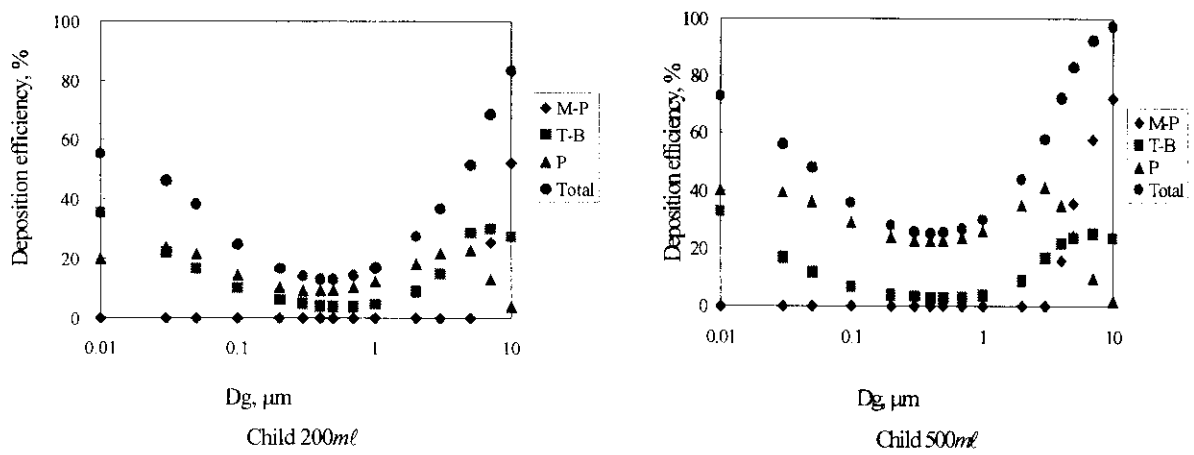


Fig. 8 Partial deposition efficiency of drug particles for various tidal volume (Children).

成人喘息に対するβ刺激薬の使用法に関する研究

分担研究者 秋山一男（国立相模原病院 臨床研究センター アレルギー疾患研究部長）

研究協力者 谷口正実、長谷川真紀、釣木澤尚実、森 晶夫、前田裕二、村上恵理子

研究要旨

β刺激薬は喘息治療薬として頻用されるにもかかわらず、その適切かつ安全な使用法は、必ずしも明確化されていない。今回はいまだEBMの成績として不足していると考えられる3つのβ刺激薬使用法に関して検討した。研究1として急性発作期のβ刺激薬吸入の効果的かつ安全な使用法、研究2として重症発作時のエピネフリン皮下注の副反応出現因子、そして研究3として慢性期の経口および貼付β刺激薬長期連用の気道過敏性への影響を明らかにした。その結果、(1)急性喘息発作時に頻用される硫酸サルブタモール吸入は約3割の例でSpO₂低下を招くことが明かとなった。悪化例の多くは吸入前SpO₂が94%以下がほとんどで、特にSpO₂92%以下例では約6割で低下した。(2)エピネフリン通常量皮下注の副反応は、むしろβ刺激薬を経口などで連用していない群で顕著であることが判明した(特に血清Kは平均0.8mEq/l低下した)。(3)経口および貼付β刺激薬は6ヶ月から1年間にわたり単独で長期使用しても、気道過敏性の悪化や気道可逆性の低下を招かなかった。以上(1)(2)(3)の成績は、いずれも今まで明らかにされていなかった新知見であり、より安全かつ効果的なβ刺激薬の使用指針の作成に貢献すると思われる。

A. 研究目的

β2交感神経系刺激薬(以下β刺激薬)は、喘息発作に極めて有効であり、第1選択薬となる。急性期に用いるβ刺激薬としては、β吸入薬と全身投与のエピネフリン皮下注があるが、前者は低酸素血症を悪化させたり、発作そのものを増悪させることが知られている。また後者では循環系の副反応も多く、まれに死亡例も報告されている。日常臨床に広く用いられるにもかかわらず、その使用法や適応については、昔からの経験によるもので、必ずしも明確化されていない。その薬理学的効果から、副反応はつきものだが、どのように使用すれば安全なのかも、十分に検討されていない。

本研究では研究1としてβ吸入薬、硫酸サルブタモールの通常量吸入がどのような喘息発作に効果不良や酸素濃度低下を招くかを明かにし、効果的かつ安全な使用指針の作成を目指す。

研究2では、重症発作に極めて有効なエピネフリンの皮下注が、どのような患者背景を有した場合、副反応のリスクが高まるのかを明かにする

一方、喘息慢性期にはβ刺激薬の経口薬や経皮貼付薬が本邦では特に用いられている。すでにβMDIの連用が気道過敏性の悪化をまねくとの指摘があるが、経口薬や貼付薬がどうかは不明である。今回は研究3として経口β刺激薬と経皮β刺激薬の長期連用が気道過敏性に与える影響を検討する。

B. 研究方法

以下の検討は、患者や健常人ボランティアを対象とするため、十分に趣旨を説明し、インフォームドコンセントを得たうえで行った。

研究1:β刺激薬による可逆性が前もって証明されている成人喘息患者121例の小-中発作時に、通常の発作治療と同様に、サルブタモール0.5ml+生理食塩水2mlジェットネブライザー吸入の単独治療を行い、前後の肺機能、SpO₂の変化などを測定した。肺気腫などの合併例は対象から除外した。β吸入の効果不良因子を検討した。

研究2:喘息発作時にエピネフリンの通常量(5μg/kg)を皮下注し、その後のSpO₂、肺機能、循環系、血清電解質などを経時的に観察測定し、副反応のリスク因子を検討する。今回は健常人、喘息群(発作寛解期と喘息中-大発作期)のそれぞれに対する影響を検討する。

研究3:喘息慢性期の管理によく用いられる2つのβ刺激薬、経口薬プロカテロール(国内市場一位のβ経口薬として選択した)、貼付薬ツロブテロールテープ(唯一の貼付薬のため選択した)を長期(6-12ヶ月)投与し、気道過敏性への影響を検討する。対象は、プロカテロール群は成人喘息12例(step2)でDmin(Mch)で評価、ツロブテロール群は成人喘息11例(step2-3)でAch-PC20で気道過敏性を評価した。気道可逆性は発作寛解期の軽度肺機能低下時、もしくは小発作時のサルブタモール吸入に対するFEV₁改善効果で前と6ヶ月後に評価した。