

C., D. 結果と考察

研究1： β 吸入後にFEV1は6-81% (平均31%)改善し、悪化する例はなかった。しかしSpO2悪化例は28%に認められた。悪化例のほとんどは吸入前SpO2が94%以下であり、特にSpO2 92%以下で受診した中発作例では、62%の症例で吸入後のSpO2低下を認めた。この結果から、 β 吸入を第一選択薬として発作時に安全に使用するためには、SpO2測定が必須と考えられた。また β 吸入によるSpO2悪化を積極的に防ぐためには、SpO2 94%以下例に酸素吸入が必要と考えられた。

研究2：発作時のエピネフリン皮下注は全例(31例)で明かな肺機能改善効果を認めた。血漿エピネフリンは20-100倍に増加したが、ノルエピネフリンは増加しなかった。副反応については、 β 刺激薬を連用(内服11例、内服+吸入5例、貼付3例、吸入5例)している喘息患者では血清Kの低下は0.5mEq/l以内であったが(平均0.3)、 β 刺激薬非連用の喘息例(7例、 β 吸入頓用含む)では0.5-1.3,平均0.8mEq/lの低下を確認した。健常者6例も同様の低下であった。循環系への影響は血圧は各群で有意な変動はなかったが、脈拍数は β 非使用例で平均21増加した。SpO2の低下は各群で明かではなかった。以上の結果は、 β 刺激薬を吸入も含めて連用している例ではエピネフリン通常量は比較的安全に使用できるものの、 β 刺激薬非使用者には危険であることを示している。

研究3：プロカテロール経口とツロブテロールテープの6、12か月使用後のAch-PC20、Dminはほとんど変化しなかった。同様にサルブタモール吸入による気道可逆性も検討したが、その効果に変わりはない。この成績は、通常量の β 経口薬や貼付薬の連用は、気道過敏性や可逆性の悪化をもたらさずに、安全に長期連用可能であることを示している。

E. 結論

研究1： β 刺激薬吸入に際しては、SpO2測定が望ましく、SpO2 94%以下の例では高率に酸素飽和度の低下をまねくため、積極的に酸素吸入を併用すべきである。

研究2：エピネフリン皮下注射は β 刺激薬連用患者(吸入も含め)では副反応なく安全に使用可能できるが、 β 非連用者では血清Kの低下が著しく危険であり、使用に際しては投与量の減量、もしくは他の抗喘息薬の使用が望ましい。

研究3： β 刺激薬(経口、貼付)は0.5-1年間使用しても、気道過敏性や気道可逆性に影響なかったことから、安全に長期使用可能であると思われる。以上の成績は、いずれも今まで明らかにされていなかった重要かつ新しい知見であり、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。

F. 研究発表

第50回日本アレルギー学会総会、教育講演にて発表(2000年12月1日)

第13回日本アレルギー学会臨床大会、イブニングシンポジウムにて発表予定(2001年5月)

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 刺激薬の使用法に関する研究（小児科）—

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: 無投薬にて無発作状態の続く喘息児の末梢気道病変の残存の有無、残存例の背景因子、β2-刺激薬吸入に対する反応性の特徴等について検討した。残存例は非残存例に比べて肺機能検査までの無発作期間が有意に短く、発作消失後間もない例では、嚴重な経過観察が必要と考えられた。β2-刺激薬吸入に対する反応性は両群の間で差は認められなかった。喘息発作時のβ2-刺激薬吸入後のピークフロー値は有意に増加したが、酸素飽和度は、大きな変化は認められず、発作時の酸素飽和度測定の意義については今後更に検討する必要があると思われる。

研究協力者：

徳山研一	群馬大学医学部小児科講師
前田昇三	群馬県立小児医療センター アレルギー科医長
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

- ①無症状期喘息児の気道閉塞状態、特に末梢気道閉塞の評価と、β2-刺激薬吸入による可逆性についてのフローボリュームカーブを用いた検討
- ②喘息急性発作時のβ2-刺激薬吸入前後の発作症状、ピークフローの変動に関する研究
今年度は上記2課題について更にその詳細について検討した。

B. 研究の目的

A. 研究の概要

β2-刺激薬は主に気道平滑筋を弛緩させることにより強力な気管支拡張作用を有する。このため、β2-刺激薬の吸入は気管支喘息児においては、喘息発作時の対症療法のうち第一選択として用いられている。また、喘息の特徴の1つに気管支拡張薬により症状が改善することが挙げられる。β2-刺激薬吸入はその即効性などの利点から喘息の診断目的として喘息ガイドラインにも気道可逆性試験に用いられる薬剤として紹介されている。しかしながら、β2-刺激薬の吸入による気道の反応性にどのような個人間の差異がみられるのか、あるいはβ2-刺激薬の吸入による自覚症状あるいは他覚症状の改善の個人差にどのような背景因子が存在するのか、など未解決の疑問点も多い。

昨年度我々は、β2-刺激薬の単回吸入前後の肺機能あるいは自覚症状の改善率を評価する目的で以下の2点につき検討を行なった。

- ①無症状期喘息児の気道閉塞状態、特に末梢気道閉塞の評価と、β2-刺激薬吸入による可逆性についてのフローボリュームカーブを用いた検討：

喘息児においてピークフロー測定は気道閉塞の有無の検討を行なう上で、簡易でかつ臨床的に有用な方法である。しかしながら、ピークフロー値は主に大気道の閉塞状態を反映するため、末梢気道の病変の検出には適さない。一方、フローボリュームカーブの測定は、大気道の閉塞状態のみならず、末梢気道の病変の検出にも適しており、ピークフローよりも詳細な情報を得ることが出来る。そこで我々は、臨床的に発作がなく安定している喘息児に気道可逆性試験の方法に準じてβ2-刺激薬を吸入させた。昨年我々はこれらの児のうち、β2-刺激薬吸入前後で peak expiratory flow (PEF) が変動のない児、すなわちピークフロー値が安定していると思われる無症状期の喘息児のフローボリュームカーブの変化を検討し、少なくとも2つの亜型が存在することを示した。即ち、β2-刺激薬吸入によって末梢気道の状態を反映する V50、V25 値が

著明に改善する群と、吸入前後でこれらのパラメータが大きな変化を認めない群である。そこでこれら2群において、どのような背景因子の違いが存在するのか検討し、喘息児の長期管理上、注意すべき症例の検出を試みた。その結果、吸入によってV50、V25値が著明に改善する例では吸入前のV50、V25値は大きな変化を認めない例に比べて有意に低値であった。またこれらの例は後者に比べ過去の吸入ステロイド使用比率や重症度判定で重症であった既往が高く、現在も薬物療法を継続している例が多かった。即ち、吸入によってV50、V25値が著明に改善する例では慎重な経過観察が必要と考えられた。今年度は無発作状態の続く喘息児のうち、特に無投薬にて経過観察している児について注目した。これらの児は臨床的には喘息の治癒・寛解に近づいている状態にあり、肺機能学的評価を詳細に検討することは長期管理上重要と思われる。そこでこれらの児における末梢気道病変の残存の有無、残存例の背景因子、 β_2 -刺激薬吸入に対する反応性の特徴等について検討した。

②小児喘息急性発作時の β_2 -刺激薬吸入前後の発作症状、ピークフロー、酸素飽和度の変動に関する研究：

日本アレルギー学会の小児気管支喘息の治療ガイドラインの発作程度判定の目安として発作症状、ピークフローおよび酸素飽和度が示されている。即ち発作の症状は、小発作が軽い喘鳴、陥没呼吸、中発作が明らかな喘鳴、呼吸困難、大発作が起座呼吸となっており、ピークフロー値は、小発作が90~70%、中発作が50~70%、大発作が40%以下、酸素飽和度は小発作が95%以上、中発作が94~91%、大発作が90%以下となっている。一方、小児では症状をうまく表現できなかつたり、発作慣れによる呼吸困難感の低下を来す症例も存在し、症状だけで発作の重症度を判定するには注意が必要である。昨年我々は喘息発作時の症状とピークフローの関連について検討した。その結果、ピークフローの値が70%以上の群（小発作）と、70%~40%の群（中発作）と40%未満の群（大発作）で、吸入前後の変動をみると40%未満の群は吸入後も46.3%までしか改善せず、追加処置が必要で、吸入前のピークフロー値が治療計画上参考になると思われた。今年度は、喘息発作時の症状、ピークフロー、に加え酸素飽和度の変動についても検討し、 β_2 -刺激薬吸入によりそれぞれのパラメータがどのように変動するか検討した。

C. 研究の方法

①無症状期喘息児の気道閉塞状態、特に末梢気

道閉塞の評価と、 β_2 -刺激薬吸入による可逆性についてのフローボリュームカーブを用いた検討：

- (1)対象：予防的薬物療法を行わず、最低1カ月以上発作のない喘息児29名(11-17才)を対象とした。これらの児に対し、 β_2 -刺激薬(サルブタモール)吸入前後の努力性呼出曲線、フローボリュームカーブをChestac-33(Chest社)を用いて測定し、吸入前後のPEFあるいはV50、V25などのパラメーターの改善率を求めた。
- (2)吸入前のV50の%予測値が60%未満の例を末梢気道病変残存群、60%以上の例を末梢気道病変非残存群とした。
- (3) β_2 -刺激薬吸入前後の肺機能の変化の評価は、PEFあるいはV50、V25の改善程度(すべてのパラメーターにつき、改善率20%以上、未満にて分類)の有無から、以下の4群に大別した。
 - 1)安定型：PEFあるいはV50、V25ともに β_2 -刺激薬吸入後の改善率20%未満。
 - 2)末梢気道閉塞改善型：PEFの改善率20%未満で、V50、V25のいずれか、あるいは両者の改善率が20%以上。
 - 3)中枢気道閉塞改善型：PEFの改善率20%以上、V50とV25の改善率は20%未満。
 - 4)全般改善型：PEFあるいはV50、V25ともに改善率20%以上。

上記のうち、3)4)については臨床的には無発作であるが大気道の閉塞が存続している症例であり、ピークフロー値の測定により、容易にその異常が検出できると考えられる。一方、上記のうち、1)2)についてはピークフロー値の測定のみでは、末梢気道の異常の有無は検出できない症例である。

②小児喘息急性発作時の β_2 -刺激薬吸入前後の発作症状、ピークフロー、酸素飽和度の変動に関する研究：

対象は、喘息発作にて群馬県立がんセンター小児科外来を受診した、気管支喘息児96名(男子69名、女子27名)。年齢は、PEFR測定可能な6歳~14歳(平均 9.0 ± 2.4 歳)。プロトコールとしては、まず症状により小発作、中発作、大発作と発作の程度を判定し、治療としてサルブタモールとDSCG混合液の吸入を行った。その前後で、ミニピークフローメーターを用いてピークフロー値を、また酸素飽和度をあわせて測定し、症状とピークフロー値、酸素飽和度の変動を検討した。ピークフローの値は、年齢から得られた標準値を基準とした%で検討した。

D. 研究の結果

①無症状期喘息児の気道閉塞状態、特に末梢気道閉塞の評価と、 $\beta 2$ -刺激薬吸入による可逆性についてのフローボリュームカーブを用いた検討：

対象のうち末梢気道病変残存群は11名、末梢気道病変非残存群は18名であった。両群の検査時年齢、男女比、喘息初発年齢、喘息初発からの年数(罹患年数)、過去の喘息重症度のうち最も重症であった程度、発作予防目的で吸入ステロイドを定期的に使用したか否か、無発作期間、について表1に示す。検査時点の喘息罹患年数、無発作期間は末梢気道病変非残存群で残存群に比べ有意に長かった。一方、 $\beta 2$ -刺激薬吸入に対する反応性は末梢気道病変残存群では安定型7名、末梢気道閉塞改善型3名、中枢気道閉塞改善型0名、全般改善型1名であった。これに対し、末梢気道病変非残存群では安定型11名、末梢気道閉塞改善型7名、中枢気道閉塞改善型0名、全般改善型0名であり、両群に $\beta 2$ -刺激薬吸入に対する反応性の差は見られなかった(表2)。両群の $\beta 2$ -刺激薬吸入前後のV50の%予測値を表3に示すが、末梢気道病変残存群の $\beta 2$ -刺激薬吸入後のV50の%予測値は非残存群の吸入前の値よりも低値であった。

②小児喘息急性発作時の $\beta 2$ -刺激薬吸入前後の発作症状、ピークフロー、酸素飽和度の変動に関する研究：

昨年報告したごとく、症状による判定では、小発作は41名、中発作は42名、大発作は13名であった。各群の平均ピークフロー値は順に、 $74.0 \pm 16.8\%$ 、 $53.0 \pm 21.2\%$ 、 $36.9 \pm 20.7\%$ と、ほぼガイドラインと一致したが、個人間で変動が大きかった。ピークフロー値の吸入後の上昇は、小発作が約10%の改善、中発作が約15%の改善、大発作が約18%の改善であった。一方、吸入前の酸素飽和度は、小発作は 97.5 ± 1.2 、中発作は 95.7 ± 1.8 、大発作は 94.6 ± 1.7 であった。また、 $\beta 2$ -刺激薬吸入後の各群の平均酸素飽和度は順に、 97.0 ± 1.8 、 95.9 ± 1.6 、 94.9 ± 2.6 であった。

E. 考察と結論

①無症状期喘息児の気道閉塞状態、特に末梢気道閉塞の評価と、 $\beta 2$ -刺激薬吸入による可逆性についてのフローボリュームカーブを用いた検討：無発作状態の続く喘息児のうち、特に無投薬にて経過観察している児について注目した。これらの児は臨床的には喘息の治癒・寛解に近づいている状態にあり、肺機能学的評価を詳細

に検討することは長期管理上重要と思われる。そこでこれらの児における末梢気道病変の残存の有無、残存例の背景因子、 $\beta 2$ -刺激薬吸入に対する反応性の特徴等について検討した。末梢気道病変の残存の指標として今回はV50を用い、その%予測値が60%未満の者を末梢気道病変の残存例とした。その結果、末梢気道病変の残存例は非残存例と比べ、過去の最重症度や吸入ステロイドの定期使用の有無など、過去の発作の状態とは関係しなかった。一方、末梢気道病変の残存例は非残存例に比べ、肺機能検査までの無発作期間が有意に短かった。このことは小児の喘息では無発作状態が続くほど、肺機能は正常に近づく可能性を示唆している。逆に、発作消失後間もない例では、肺機能の改善は充分でなく、再発の可能性を注意しつつ管理していく必要があることを示唆している。 $\beta 2$ -刺激薬吸入に対する反応性については末梢気道病変残存例と非残存例の間で差は認められなかった。即ち、両群ともに $\beta 2$ -刺激薬吸入により肺機能が有意に改善する例は半数以下であり、 $\beta 2$ -刺激薬吸入前後の肺機能の変動で、末梢気道病変の残存の有無を推測することは難しいことが示唆された。

②小児喘息急性発作時の $\beta 2$ -刺激薬吸入前後の発作症状、ピークフロー、酸素飽和度の変動に関する研究：喘息発作時の症状、ピークフロー、に加え酸素飽和度の変動についても検討し、 $\beta 2$ -刺激薬吸入によりそれぞれのパラメータがどのように変動するか検討した。その結果、吸入前の酸素飽和度は、小発作は 97.5 ± 1.2 、中発作は 95.7 ± 1.8 、大発作は 94.6 ± 1.7 であり、ガイドラインの基準値より各群とも高値であった。また、 $\beta 2$ -刺激薬吸入後の各群の平均酸素飽和度は順に、 97.0 ± 1.8 、 95.9 ± 1.6 、 94.9 ± 2.6 と、ピークフロー値とは対照的に吸入前後で大きな変化は認められなかった。以上より、発作時の酸素飽和度測定の意義については今後更に検討する必要があると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表 該当事項なし
2. 学会発表

1) 徳山研一、大塚隆幸、嵯峨礼子、西村秀子、加藤政彦、荒川浩一、望月博之、森川昭廣：無症状期喘息児の気道閉塞状態、特に末梢気道閉塞の評価とその可逆性に関する検討. 第49回日本アレルギー学会総会 (アレルギー48:1083, 1999)

2) 前田昇三、鈴木幸代：喘息発作時におけるピークフロー・SpO₂の検討. 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14:366, 2000)

表 1. 末梢気道病変残存群と非残存群の喘息背景

	検査時年齢	男女比 (M/F)	喘息初発(才)	罹患年数*	過去の最重症度 (軽/中/重)	BD I 経験 (あり/なし)	無発作期間* (月)
末梢気道病変残存群 (n=11)	12.9±0.4	11/0	6.1±1.1	3.0±1.1	0/10/1	3/8	7.5±1.6
末梢気道病変非残存群 (n=18)	13.1±0.8	12/6	3.6±0.5	9.7±1.3	0/10/5	4/11	37.8±8.2

* 両群間で $P < 0.05$ の有意差があることを示す。

表 2. β_2 -刺激薬吸入前後の肺機能の変化

	安定型	末梢気道閉塞改善型	中枢気道閉塞改善型	全般改善型
末梢気道病変残存群	7	3	0	1
末梢気道病変非残存群	11	7	0	0

表 3. β_2 -刺激薬吸入前後の%V50 の変化

	β_2 -刺激薬吸入前	吸入後
末梢気道病変残存群	48.9 ± 2.4	52.4 ± 2.6
末梢気道病変非残存群	69.9 ± 4.1	75.8 ± 4.6

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）

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班

分担 研究報告書

サイトカイン遺伝子解析による喘息治療薬の治療効果予測と客観的判定に関する研究

分担研究者 原寿郎 九州大学大学院医学研究院成長発達医学 教授

研究要旨

【目的】喘息の発症と治療薬への反応性を規定する遺伝子を明らかにすることを目的として、日本人アトピー喘息における遺伝的背景因子としての IFN- γ とその関連遺伝子の関与を明らかにする。そして、喘息患者の治療歴や臨床データとを比較検討することで、各遺伝子多型と各種喘息治療の反応性を集学的に分析し、最終的に遺伝子多型に基づいた気管支喘息の安全な治療法の開発を検討する。

【方法】＜対象集団＞当科および研究協力病院にて管理中のアトピー素因を有する気管支喘息で、インフォームドコンセントを得た小児患者 158 例。血清 IgE 高値、吸入抗原に対する RAST (スコア>2) 陽性で診断されたアトピー素因を持ち、平均発症年齢は 2.9 ± 3.3 歳。＜IFN- γ とその関連因子の遺伝子多型の解析＞IFN- γ 遺伝子イントロン 1 (CA) n マイクロサテライト多型、IRF-1 遺伝子イントロン 7 (GT) n マイクロサテライト多型を ABI310 PRISM GeneScan システムを用いて解析した。また、INFGR1 遺伝子 14Val/ Met 多型、INFGR2 遺伝子 64Gln/ Arg 多型を PCR-SSCP 法にて解析した。

【結果】 IFN- γ イントロン 1 と IRF-1 遺伝子イントロン 7 の遺伝子多型がアトピー喘息と関連した。さらに早期発症群 (3 歳未満で発症)、および家族歴陽性群では、より明らかな有意差が確認された。IFN- γ レセプター 1/2 の遺伝子多型は有意な関連は示さなかった。さらに IRF-1 の遺伝子多型と IL-4 プロモーターの -590 T/C 多型との組み合わせで、アトピー喘息発症に対する相乗効果を認めた。

【考察】 IFN- γ あるいはそのシグナル伝達に関連する遺伝子群の多型の組み合わせとアトピー喘息との間に明確な関連性を見出した。このことは、アトピー喘息の発症機序における TH1 サイトカインの重要性を意義づけるとともに、これら遺伝子多型を調べることで気管支喘息の発症、重症度や治療反応性の予測へ応用できる可能性がある。

【結論】 IFN- γ 遺伝子はアトピー喘息発症の遺伝的背景因子と考えられた。また複数の TH1/TH2 遺伝子多型の組み合わせにより、アトピー喘息発症に対する相乗効果を有する遺伝子が明らかとなった。以上から、TH2 系のみならず TH1 系サイトカインの各種遺伝子がアトピー喘息発症の遺伝的背景因子として関与していると考えられた。

研究協力者

井原健二

九州大学大学院医学研究院成長発達医学 助手

楠原浩一

九州大学大学院医学研究院成長発達医学 助教授

中尾太

九州大学医学部附属病院小児科 医員

佐々木由佳

九州大学大学院医学研究院成長発達医学大学院生

西間三馨

国立療養所南福岡病院 院長

高林明

国立療養所南福岡病院 小児科医師

A. 研究目的： 小児気管支喘息は、種々な環境要因と遺伝的要因が気管支喘息の発症に関与する多因子疾患である。最近、アレルギー素因を規定するいくつかの遺伝子が同定され、それらの遺伝子の遺伝子多型を調べることで、気管支喘息に背景に潜在するアレルギー素因を迅速かつ正確に判定することが可能になりつつある。我々は昨年までの本研究により、アレルギー素因あるいは小児気管支喘息を規定する遺伝子の中では IL4 受容体 50 Ile/ Val 遺伝子多型、喘息の治療反応性を規定する遺伝子としては $\beta 2$ アドレナリン受容体遺伝子 27Gln/ Glu が、日本人における小児喘息の疾患感受性に関わる遺伝子多型であることを明らかにした。これまでに IL4 受容体以外に TH2 サイトカインである IL-4、IL-13 やその受容体遺伝子などが候補遺伝子として報告されているが TH1 系サイトカインとその関連分子に関してはこれまでは報告がない。一方、気管支喘息治療に使用する $\beta 2$ 刺激剤は $\beta 2$ アドレナリン受容体を介してその作用が気管支平滑筋に作用し平滑筋弛緩作用をもたらされるが、この受容体は TH1 系細胞にほぼ特異的に発現し、 $\beta 2$ 刺激により IL2 や IFN- γ 産生が低下すること、あるいは IL12 産生を抑制することで TH1 分化が阻害され、結果として TH2 優位になることが報告されている。

今回我々は、代表的な TH1 サイトカインである IFN- γ とそのシグナル伝達に関わる遺伝子に

ついて、小児アレルギー性気管支喘息の疾患感受性への関与、あるいは治療反応性を規定する遺伝子としての関連性を明らかにし、気管支喘息の発症、重症度や $\beta 2$ 刺激剤の治療反応性の予知法を開発することを目的として研究を行った。

B. 研究方法：

<対象集団>

対象は、血清 IgE 値、吸入 RAST スコアにて診断したアトピー素因を持つ気管支喘息児 158 例で、発症年齢は 2.9+3.3 歳である。当科および研究協力病院にて管理中で、インフォームドコンセントを得た小児患者のみを対象とした。

<IFN- γ とその関連因子の遺伝子多型の解析>

- IFN- γ 遺伝子：IFN- γ 遺伝子イントロン 1 に存在する(CA) n micorsatellite 多型を、ABI310 PRISM GeneScan システムを用いて解析した。
- IRF-1 遺伝子：IRF-1 遺伝子イントロン 7 に存在する(GT) n micorsatellite 多型を、同様に GeneScan システムを用いて解析した。
- INFGR1 遺伝子：INFGR1 遺伝子 14Val/ Met 多型を PCR-SSCP 法にて同定した。
- INFGR2 遺伝子：INFGR2 遺伝子 64Gln/ Arg 多型を PCR-SSCP 法にて同定した。

<統計学的検討>

それぞれの多型について、患者群とコントロール群の genotype 頻度および allele 頻度をカイ 2 乗検定により関連性を評価した。

C. 研究結果：

<IFN- γ とその関連因子の遺伝子多型の解析>

1. IFN- γ 遺伝子 (Table 1)

IFN- γ の CA repeat 多型は、12 から 18 リピートまで 7 つの多型が存在した。各アレル頻度を検討した結果、コントロール分布と比較して喘息群では allele5 が有意に少なく($p < 0.001$)、allele7 が有意に多かった($p = 0.034$)。また全体の分布の偏りを検討するために whole allele distribution の解析を行ったところ両群の分布に有意差を認めた($p = 0.0018$)。また、アトピー喘息群を 3 歳未満の早期発症群と家族歴陽性群に分けて検討したところ、allele5、7 また whole distribution で有意

差が増強された。

2. IRF-1 遺伝子 (Table 2)

IRF-1 の GT repeat 多型は、11 から 19 リピートまで 8 つの多型が存在した。全体のアレル頻度を喘息群とコントロール群とで比較した結果、有意差を認めた($p=0.044$)。また、3 歳未満の早期発症アトピー喘息群では、whole allele distribution で有意差が増強された。なお家族歴陽性の群では有意差を認めなかった。

3. INFGR1/2 遺伝子 (Table 3)

IFN- γ レセプター 1 および 2 遺伝子の各 genotype 頻度と allele 型を検討した結果、喘息群とコントロール群の間で有意差は認めなかった。重症度、発症時期、家族歴の subgroup でも検討したが、いずれも有意差は認めなかった。

4. 複数の TH1/TH2 サイトカイン遺伝子多型の相乗効果の検討

複数の遺伝子多型の組み合わせにおける相乗効果を検討するため、今回検討した 4 つの遺伝子と昨年度の本研究にて調査を行った IL-4 プロモーター、IL-4 レセプターの計 6 つの遺伝子多型の組み合わせを検討した。今回有意差を認めた IFN- γ 多型との組み合わせでは、相乗効果を認めなかったが、IRF-1 allele1($p=0.016$) および allele6 ($p=0.030$)と IL-4 プロモーターの-590 TT の組み合わせで、有意にアトピー喘息発症への相乗効果を認めた。

D. 考察

小児のアレルギー性疾患では環境要因のみならず遺伝的要因が比較的強く関与していることが指摘されている。遺伝的要因として 10 数個の候補遺伝子が報告されており、近年、特定の遺伝子多型とアレルギー性喘息との関連が明らかにされている。今回我々は代表的な TH1 サイトカインである IFN- γ とそのシグナル伝達に関わる遺伝子について、小児アレルギー性気管支喘息の疾患感受性に関わる遺伝子としての関連性を解析し IFN- γ 遺伝子の CA repeat 多型および IRF-1 の GT repeat 多型は小児アレルギー性喘息との関連性を認めた。さらに IRF-1 と IL-4 プロモーターの多

型の組み合わせにより、喘息発症に対する相乗効果を認めた。以上の結果は TH1 系のサイトカインである IFN- γ 関連遺伝子は、他の遺伝的背景因子や環境因子の影響下で小児アレルギー性喘息の疾患関連遺伝子として関与していると考えられた。

今回 IFN- γ の遺伝子多型と小児アレルギー性喘息との関連を解析したが、過去には TH1 優位の疾患の 1 つである IDDM に関して日本人集団における解析の報告がある。TH2 疾患であるアトピーで減少していた allele 5 が、IDDM で増加していたことから、このアレルが TH1/TH2 バランスに関与している可能性がある。さらにこの遺伝子多型はイントロン 1 に存在するが、アレルの違いにより IFN- γ 産生能に差があるという報告があることから、IFN- γ 産生能の差異が疾患感受性に直接影響を及ぼしている可能性が推定されるとともに、今後の小児アレルギー性喘息に対する IFN- γ 治療の発展性が示唆される結果であると考えられる。

IRF-1 の GT repeat 多型は、特定のアレルにおける小児アレルギー性喘息への関連性は認めなかったが、whole allele distribution による解析と、複数の TH1/TH2 サイトカイン遺伝子多型の組み合わせにおける検討で TH2 系の IL-4 プロモーター遺伝子多型との相乗効果を認めた。最近 TH1/TH2 系サイトカインの刺激伝達経路の相互作用の分子メカニズムが明らかにされている。IFN- γ は STAT1 を活性化して IRF-1 の binding site に結合し転写を誘導する一方、IL-4 は IL-4 receptor α に結合して、STAT6 を活性化し、IL-4 responsible gene の転写を制御する。IL-4 の刺激による STAT6 は、IRF-1 の STAT1 結合部位に競合的に結合して、STAT1 の IRF-1 への結合を障害し、転写を抑制する。従って、IRF-1 と IL-4 の遺伝子多型の組み合わせがアトピー喘息の発症に相乗効果を示したことは、TH1/TH2 バランスを規定する複数の疾患関連遺伝子が、それぞれ独立に発症、重症度を規定するとともに、その中の複数の遺伝子群の組み合わせが病態形成に関与する

可能性を示唆する結果であると考えられた。

気管支喘息治療に使用するβ2刺激剤は、気管支平滑筋に発現しているβ2アドレナリン受容体を介してその作用が気管支平滑筋に作用し平滑筋弛緩作用がもたらされる。この受容体はTリンパ球の中でTH1系細胞にほぼ特異的に発現し、β2刺激によりIL2やIFN-γ産生が低下すること、あるいは単球系細胞などからのIL12産生を抑制することでTH1分化が阻害され、結果としてTH2優位になることが報告されている。従ってβ2刺激剤を使用した気管支喘息治療薬剤の副反応の出現を規定する遺伝的背景因子として、今回解析を行ったTH1系サイトカイン遺伝子多型は重要な意味を持つ可能性があり、副反応出現例を中心に治療薬剤との関連性を明らかにすることは重要なテーマであると考えられる。今後これらTH1/TH2サイトカイン遺伝子を含めて小児気管支喘息を規定する遺伝子多型を明らかにするとともに、種々の環境要因も含めて包括的に検討する

ことで患者個人個人の病態と治療反応性を細かく掌握し、より安全な適切な治療方針を確立することが可能になると考えられる。特に、成人と違いアレルギーに関する検査を十分に施行できない小児において特にその有用性が大きいと思われる。
E. 結論：

IFN-γ遺伝子はアレルギー性喘息発症の遺伝的背景因子と考えられた。また複数のTH1/TH2遺伝子多型の組み合わせにより、アレルギー性喘息発症に対する相乗効果を有する遺伝子が明らかとなった。以上から、TH2系のみならずTH1系サイトカインの各種遺伝子がアトピー喘息発症の遺伝的背景因子として関与していると考えられた。今後、遺伝子多型とβ2刺激剤による喘息治療反応性を検討し、気管支喘息の安全な治療法の確立を目指し研究を進める。

TABLE I. Allele frequencies of IFN-γ gene CA repeat polymorphism in patients with atopic asthma and controls

IFN-γ polymorphism (CA)n repeat	Controls n=218 (436 alleles) (%)		Atopic Asthma n=158 (316 alleles) (%)		Atopic Asthma Subgroups						
	p-value		p-value		Onset < 3 years n=97 (174 alleles) (%)		Presence of family history n=92 (184 alleles) (%)				
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)			
Allele 1 12 repeat	40	(9.2)	39	(12.3)	n.s.	21	(12.1)	n.s.	21	(11.4)	n.s.
Allele 2 13 repeat	251	(57.6)	175	(55.4)	n.s.	92	(52.9)	n.s.	100	(54.3)	n.s.
Allele 3 14 repeat	5	(1.1)	9	(2.9)	n.s.	6	(3.4)	n.s.	4	(2.2)	n.s.
Allele 4 15 repeat	116	(26.6)	78	(24.7)	n.s.	46	(26.4)	n.s.	45	(25.0)	n.s.
Allele 5 16 repeat	21	(4.8)	4	(1.3)	0.0069	1	(0.6)	0.0076	3	(1.6)	n.s.
Allele 6 17 repeat	0	(0.0)	2	(0.6)	n.s.	1	(0.6)	n.s.	2	(1.0)	n.s.
Allele 7 18 repeat	3	(0.7)	9	(2.8)	0.034	7	(4.0)	0.0074	8	(4.3)	0.0037
whole distribution					0.0018*			0.0004*			0.0038*

* The whole distributions of alleles between patients subgroups and controls were evaluated by two-sided Fisher's exact test for 2x7 table
n.s. not significant

TABLE II. Allele frequencies of IRF-1 gene GT repeat polymorphism in patients with atopic asthma and controls

IRF-1 polymorphism (GT)n repeat	Controls n=218 (436 alleles) (%)		Atopic Asthma n=158 (316 alleles) (%)		Atopic Asthma Subgroups						
	p-value		p-value		Onset < 3 years n=97 (174 alleles) (%)		Presence of family history n=92 (184 alleles) (%)				
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)			
Allele 1 11 repeat	116	(26.6)	102	(32.3)	0.10	59	(33.1)	0.075	50	(27.2)	0.92
Allele 2 12 repeat	174	(39.9)	110	(34.8)	0.17	65	(36.5)	0.58	67	(36.4)	0.47
Allele 3 13 repeat	6	(1.4)	2	(0.6)	0.47	0	(0.0)	0.19	1	(0.5)	0.68
Allele 4 14 repeat	0	(0.0)	2	(0.6)	0.17	2	(1.1)	0.081	2	(1.1)	0.088
Allele 5 15 repeat	22	(5.0)	8	(2.5)	0.091	4	(2.2)	0.18	6	(3.3)	0.40
Allele 6 16 repeat	88	(20.2)	59	(18.7)	0.64	24	(13.5)	0.082	40	(21.7)	0.57
Allele 7 17 repeat	30	(6.9)	32	(10.1)	0.14	19	(10.7)	0.10	18	(9.8)	0.25
Allele 8 18 repeat	0	(0.0)	1	(0.3)	0.42	1	(0.6)	0.29	0	(0.0)	0.27*
whole distribution					0.044*			0.0058*			0.27*

* The whole distributions of alleles between patients subgroups and controls were evaluated by two-sided Fisher's exact test for 2x8 table

TABLE III. Distributions of IFNGR1 and IFNGR2 genotypes

	Controls n=118 (%)	Patients n=119 (%)	p-value
IFNGR 1			
Genotype frequency			
Val 14/ Val 14	113 (95.8)	110 (93.2)	—
Met 14/ Val 14	5 (4.2)	8 (6.8)	0.16*
Met 14/ Met 14	0 (0)	0 (0)	—
Allele frequency			
Val	231 (97.9)	228 (96.6)	—
Met	5 (2.1)	8 (3.4)	0.34
IFNGR 2			
Genotype frequency			
Arg 64/ Arg 64	31 (26.3)	28 (23.7)	—
Arg 64/ Gln 64	53 (44.9)	65 (55.1)	0.35*
Gln 64/ Gln 64	34 (28.8)	25 (21.2)	—
Allele frequency			
Arg	115 (48.7)	121 (51.3)	—
Gln	121 (51.3)	115 (48.7)	0.54
Total	118	118	

* Analysis performed among the three genotypes

F. 研究発表

1. 論文発表

Nakao F, Ihara K, Kusuhara K, Sasaki Y, Takabayashi A, Nishima S, Hara T:
Childhood atopic asthma showed a positive association with a polymorphism of interferon- γ gene but not with that of interferon- γ receptor α -chain / β -chain and interferon regulatory factor-1 genes.

J Allergy Clin Immunol 2001 (in press)

Sasaki Y, Ihara K, Ahmed S, Yamawaki K, Kusuhara K, Nakayama H, Nishima S, Hara T:

Lack of association between atopic asthma and polymorphisms of the histamine H1 receptor, histamine H2 receptor and histamine N-methyltransferase genes.

Immunogenet 2000, 51:238-240.

Takabayashi A, Ihara K, Sasaki Y, Suzuki Y, Nishima S, Izuhara K, Hamasaki N, Hara T:

Childhood atopic asthma showed a positive association with a polymorphism of Interleukin-4 receptor α gene but not with that of Interleukin-4 promoter or Fc ϵ receptor I β gene.

Exp Clin Immunogenet 2000, 17:63-70.

Nakao F, Ihara K, Sasaki Y, Ahmed S, Kusuhara K, Nishima S, Takabayashi A, Hara T:

Lack of association between CD28/CTLA-4 gene polymorphisms and atopic asthma in Japanese population.

Exp Clin Immunogenet 2000, 17:179-184.

Ahmed S, Ihara K, Sasaki Y, Nakao F, Nishima S, Fujino T, Hara T:
Novel polymorphism in the coding region

of IL-13 receptor α' gene: Association study with atopic asthma in the Japanese population.

Exp Clin Immunogenet 2000, 17:18-22.

2. 学会発表

第21回福岡臨床免疫研究会

IFN- γ 関連遺伝子とアトピー喘息

九州大学大学院医学研究院成長発達医学

中尾 太 井原健二 佐々木由佳 原 寿郎

(平成12年12月16日)

第413回日本小児科学会福岡地方会例会

アトピー喘息における IFN- γ 関連遺伝子群の
遺伝子多型の検討

中尾 太 井原健二 佐々木由佳 楠原浩一
原寿郎 (九大 児)

高林 明 西間三馨 (国療南福岡 児)

(平成13年2月10日)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生省感覚器障害及び・アレルギー等研究事業

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（班研究報告）

テオフィリンの急性効果に関する研究（サルブタモールとの比較）

分担研究者 大田 健 帝京大学 医学部 内科 （教授）

研究要旨：喘息の急性増悪の治療としてアミノフィリンの点滴またはサルブタモールの吸入を日本の喘息予防・管理ガイドライン（1998）に準じて施行した。その治療の前後1時間でPEF, SpO₂, さらに化学伝達物質としてECP, ヒスタミン, トロンボキサン B₂, セロトニン, ロイコトリエン C₄ を測定した。その結果いずれの治療においてもPEF, SpO₂ は有意に改善した。その一方でアミノフィリンの治療によりECP, ヒスタミン, トロンボキサン B₂ が低下する事が明らかとなった。急性期に対するアミノフィリンによる治療は科学的にも合理的であると考えられる。

研究協力者

中野 純一 帝京大学医学部内科 講師

山下 直美 帝京大学医学部内科 助教授

A 研究目的

気管支喘息では気道の収縮とその慢性炎症が重要な病態である。従って薬理的な側面からは気管支拡張作用と抗炎症作用が喘息の治療の基本戦略となる。また臨床的な側面からは喘息の治療は急性増悪期への対処すなわち発作に対する治療と喘息の慢性期における長期管理と大きく二つに分けることができる。本邦の喘息予防・管理ガイドライン（1998）では気管支拡張作用を主体とする治療薬としてβ₂ 刺激薬, テオフィリン薬を基本的な治療薬と位置づけ, 吸入ステロイド薬を抗炎症薬として治療指針をまとめている。すなわちテオフィリン薬は日本の喘息治療の

ガイドラインでは長期管理では経口の徐放性テオフィリン薬, 急性増悪・発作にはアミノフィリンの点滴静注による治療法として提唱されている。また興味あることに近年になりテオフィリン薬は喘息の長期管理において気管支拡張作用とともに気道の好酸球性炎症を抑制する抗炎症作用も有することが報告されている。しかし一方で1997年に発表されたExpert Panel Report 2: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma（以下EPR-2）では喘息の急性増悪においてテオフィリン薬（アミノフィリン）による治療を必ずしも推奨していない。一方で我々は急性期の治療法としてアミノフィリンおよびサルブタモールともに有効であり, さらにアミノフィリンではサルブタモールの追加治療を必要としない場合も多く認められたことを報告している（Clin Exp Allergy. 1996; 26: 32-7）。そこで前年度われわれは急性期におけるアミノフ

イリンの効果。新たな側面より科学的に検討する目的で理学所見とともに SpO₂、ピークフロー (PEF : peak expiratory flow) を測定し、その臨床的な効果について研究を行うとともに化学伝達物質についても検討した。その結果アミノフィリンの急性期の効果に化学伝達物質を抑制する広義の抗炎症作用が関与していることを見いだした。そこで今年度は急性期におけるアミノフィリンとサルブタモールの効果についてこの化学伝達物質の検討を含め臨床研究をさらに進めることとした。

B 研究方法

気管支喘息の急性増悪で当院の救急外来を受診した患者を対象に検討した。なお、この検討を始めるにあたり、研究の目的と内容を個々の患者に説明し同意を得たのちに治療プロトコルを開始した。また最初の治療法は封筒法による無作為比較試験とした。対象とした喘息患者はアミノフィリン治療群 10 名 (年齢 47.6 ± 4.7 歳) であり、日本アレルギー学会の分類で発作強度は小発作 7 名、中発作 3 名であり、長期管理における重症度は step2 が 6 名、step3 が 2 名、step4 が 2 名である。サルブタモール治療群は 8 名 (年齢 47.5 ± 5.2 歳) であり、日本アレルギー学会の分類で発作強度は小発作 6 名、中発作 2 名であり、長期管理における重症度は step2 が 4 名、step3 が 3 名、step4 が 1 名である。両群の背景に有意差は認めなかった。

喘息の急性増悪の治療としてアミノフィリンの点滴またはサルブタモールの吸入を日本の喘息予防・管理ガイドライン (1998) に準じて施行した。具体的にはアミノフィリン

250mg を維持液 200ml に溶解させ、最初の 15 分でその半分をローディングドースとして点滴し、残りを 45 分で残りをゆっくりと点滴した。治療中は自覚症状、会話の状態、血圧、脈拍や聴診所見などの理学所見に加え、パルスオキシメーターによる SpO₂ とピークフローメーターによる PEF の測定を行った。サルブタモール群では維持液の点滴とともにサルブタモール吸入液 0.3ml + 生食 3.0ml を 15 分ごとに吸入した。さらに治療前とその治療開始後 1 時間の時点で採血を行い血算、テオフィリン濃度と炎症性化学伝達物質として血清中の ECP (eosinophil cationic protein)、ヒスタミン、トロンボキサン B₂、セロトニン、ロイコトリエン C₄ を測定した。さらにまた追加の治療を要する場合にはアミノフィリン点滴、β₂ 刺激薬の吸入に加え副腎皮質ステロイド薬の点滴を含め、治療を担当した医師の判断で症状が改善するまで治療を施行した。

C 研究結果

テオフィリンの血中濃度 (μg/ml) は 10.4 ± 1.4 から 19.2 ± 1.5 へと有意に上昇した。表 1 に示すように臨床的な指標としての PEF (l/min) はアミノフィリンにより 151.0 ± 10.5 から 259.0 ± 26.6、SpO₂ (%) は 94.7 ± 0.5 から 96.6 ± 0.3 へと有意 (P < 0.01) に改善を認めた。さらに炎症性の化学伝達物質の検討では ECP (μg/l) は 19.3 ± 2.7 から 14.7 ± 2.1 (p < 0.01)、ヒスタミン (nM/l) では 6.5 ± 2.1 から 3.2 ± 0.7 (p < 0.05)、さらに変化率で検討するとトロンボキサン B₂ (pg/ml) は 78.3 ± 8.8% (p < 0.05) の低下を認めいずれも有意にアミノフィリンの治療によりその喘息発作中の増加が

抑制されることが示された。一方でサルブタモールによる治療では同じく表1に示すように臨床的な指標としての PEF (l/min)は 175.0 ± 36.8 から 250.0 ± 30.8 , SpO₂ (%)は 95.5 ± 0.9 から 98.2 ± 0.3 へと有意 ($P < 0.05$) に改善を認めた。しかし炎症性の化学伝達物質の検討では ECP ($\mu\text{g/l}$)は 8.2 ± 1.4 から 9.3 ± 1.8 ($p < 0.01$), ヒスタミン (nM/l)では 2.3 ± 0.6 から 2.8 ± 0.7 ($p < 0.05$), さらに変化率で検討してもトロンボキサン B₂ (pg/ml)は $108.8 \pm 37.5\%$ ($p < 0.05$) であった。

D 考察

テオフィリン薬は抗炎症作用を有することが次第に明らかにされている。そのエビデンスとして我々は *In vitro* の実験で interleukin-5 (IL-5)で活性化を受け寿命が延長している好酸球にテオフィリンを加えるとアポトーシスが誘導されることや, platelet activating factor (PAF)の刺激により好酸球から ECP が遊離されるがテオフィリンによりその遊離が抑制されることなどを我々は報告している。また実際の喘息の長期管理においても徐放性テオフィリンにより気道閉塞の改善とともに気道の好酸球炎症が抑制されることが報告されている。実際に我々も臨床面でのエビデンスとして当院の外来通院中の喘息患者のテオフィリン血中濃度と血清 ECP が明らかに負の相関を認めることも報告している。

またさらに喘息の急性増悪に対するアミノフィリン点滴治療の臨床的な有効性を示すエビデンスに関しても我々は従来より検討し報告している。その中では喘息発作 53 例 (年齢 50.1 ± 2.4 歳, 男:女=27:26) に対する

治療としてアミノフィリンの点滴静注 (34 名) と β_2 受容体刺激薬のサルブタモール 15 分毎の吸入 (19 名) とを比較した。さらに最初の治療で十分の効果が認められない場合にはその治療を交差させ追加治療をおこなった。その結果, 両者とも治療開始より1時間の時点で PEF は有意に改善すること, またそれぞれ最初に施行した治療で十分な効果が得られなかった場合にその後追加した治療 (サルブタモール吸入に対するアミノフィリン点滴あるいはアミノフィリン点滴に対するサルブタモール吸入) いずれでも追加効果を示した。さらに興味あることにアミノフィリンを最初に投与した群では追加治療を要したものが 18%に対してサルブタモール単独ではその後アミノフィリンの追加治療を 89%と統計学的に多く要したことを報告している (Clin Exp Allergy 1996)。

海外の喘息治療のガイドライン EPR-2 などでは急性期に使用する気管支拡張薬としてアミノフィリンを第一選択薬からはずしているが, それはいくつかの文献で β_2 刺激薬にアミノフィリンを追加しても相加的な効果がないことを根拠としている。しかしそれらの文献は β_2 刺激薬の吸入と副腎ステロイド薬とを同時に併用した症例にアミノフィリンを追加した研究も含まれており, かならずしも β_2 刺激薬の単独投与に対するアミノフィリンの効果を評価したものではない。1996 年の我々の報告ではアミノフィリンと β_2 刺激薬それぞれの追加的な効果が認められており, また今回の検討でも PEF, SpO₂ いずれの臨床的な指標はアミノフィリン点滴で改善を認

めたことは本邦の喘息予防・管理ガイドライン（1998）で提唱している急性期におけるアミノフィリン治療の妥当性を示していると考えられる。この知見に関連する海外の文献としては Mitenko ら (Rational intravenous doses of theophylline. *N Engl J Med* 1973 20;289(12):600-3) は、テオフィリンの気道拡張作用は用量依存的な薬理作用であることを示しており、また Magnussen らは (Theophylline has a dose-related effect on the airway response to inhaled histamine and methacoline in asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 136 : 1163, 1987) テオフィリン濃度 6.14 $\mu\text{g/ml}$ とテオフィリン濃度 12.9 $\mu\text{g/ml}$ を比較し、気道過敏性 (PC20 histamine) はテオフィリン用量依存的に改善する事を報告している。すなわちテオフィリンの効果は用量依存的に発揮される要素もある。その点で海外における研究でアミノフィリンの急性期での有効性を見いだせなかった報告では日本のガイドラインより多くの β_2 刺激薬吸入とステロイド薬を使用するとともにテオフィリンとして十分な効果を発揮するだけの使用量ではなかった可能性が考えられる。今回の我々の研究で通常の喘息管理の中で重症発作の場合には抗炎症作用を期待してステロイド薬を併用するとともに、気管支拡張薬としてアミノフィリンおよび β_2 受容体刺激薬を併用することが合理的であることを示唆していると考えられた。

さらにこの急性期のアミノフィリンによる治療で喘息の炎症に関わると考えられる化学伝達物質の遊離が抑制されるのかを検討した。その結果、表1にまとめたように、ECP、

ヒスタミン、トロンボキサン B2 など化学伝達物質の血清中の濃度がアミノフィリン投与により減少を認めた。ECP は喘息における最も重要なエフェクター細胞の一つである好酸球の活性化を示している。喘息発作中あるいは有症状期の喘息患者では非発作時や症状消失期と比較して ECP が上昇することが報告されている。従って今回の結果は喘息発作時に認められる好酸球からの ECP の脱顆粒がアミノフィリンにより有意に抑制されていると考えられた。さらに好酸球以外のアレルギー性炎症のエフェクター細胞である肥満細胞や好塩基球からも気管支収縮作用を有するヒスタミンやトロンボキサン A2 などが遊離されることが知られている。このトロンボキサンはアラキドン酸カスケードの活性化によりあらたに産生される化学伝達物質であり、トロンボキサン B2 はトロンボキサン A2 の代謝産物である。今回の検討ではこれらの炎症性化学伝達物質の遊離もアミノフィリンにより抑制されることが示唆された。テオフィリンの *in vitro* における抗炎症作用のエビデンスとして基礎研究でマスト細胞、好塩基球、好中球、マクロファージ、血小板と多くの炎症性細胞の活性化を本薬剤が抑制しうることが報告されている。すなわち今回の臨床的な検討で認められたテオフィリン（アミノフィリン）の抗炎症効果も我々の報告している好酸球に対する活性化抑制作用、あるいは文献的に報告されている肥満細胞や好塩基球に対する活性化抑制作用を反映したものと考えられる。

一方でサルブタモールによる治療では

PEF, SpO₂ といった臨床的な指標はアミノフィリンと同様に有効であることが確認された。しかし今回の検討では化学伝達物質の遊離に対しては有意な効果を見いだすことができなかった。In vitro の実験においてはβ₂ 刺激薬はその dcAMP の上昇作用を介して種々の炎症細胞からの化学伝達物質の遊離を抑制することが知られている。今回の研究でそのような結果が得られなかったことは実際の臨床で使用されるサルブタモールの吸入療法では実験的な薬物濃度まで達していない可能性も考えられる。ただし振戦などの副作用を回避するためにはβ₂ 刺激薬の濃度もある程度抑制する必要がある、今回我々が使用した量をこえることは臨床的には困難な面を有していると考えられる。

今回の検討によりテオフィリン薬は喘息の長期管理のみならず急性発作の治療においても有効であることが示された。その多くは本薬剤の古典的な薬理作用である気管支拡張作用によると考えられる。しかし今回の急性期における検討で、長期管理のみならず喘息の急性増悪においてもその効果の少なくとも一部にテオフィリンの抗炎症作用が関与していると考えられた。喘息治療における本薬剤の新たな側面に関しさらなる検討が期待される。またサルブタモールの臨床的に有用であるが、化学伝達物質の変化は認めることができなかった。しかしサルブタモールの薬理作用としての気管支拡張は強力であり、今回の我々の結果を踏まえればアミノフィリンとサルブタモールの併用は合理的な治療法と考えられる。

E 結論

日本の喘息予防・管理のガイドラインで推奨されている喘息急性増悪に対するアミノフィリンの治療は科学的にも妥当である。その効果には気管支拡張作用とともに少なくとも一部抗炎症作用も関与することが示された。またサルブタモールの吸入も臨床的な効果を認めることができた。喘息の急性発作に対して症例に合わせアミノフィリンとサルブタモールを併用することが合理的であると考えられる。

F 研究発表

1. 現在 American thoracic society の論文に投稿中である。

Table 1

Sabutamol	before	after	after/before(%)
PEF (l / min)	175±36.8	250±30.4 (p < 0.01)	NA
SpO ₂ (%)	95.5±0.9	98.2±0.3 (p < 0.05)	NA
ECP(µg / l)	8.24±1.39	9.29±1.79	121.4±21.6
histamine (nM/l)	2.29±0.57	2.84±0.72	135.5±35.1
TXB ₂ (pg / ml)	27.43±12.23	23.49±10.52	108.8±37.5
Aminophylline			
PEF (l / min)	151±10.5	259±26.6 (p < 0.01)	NA
SpO ₂ (%)	94.7±0.5	96.6±0.3 (p < 0.01)	NA
ECP (µg / l)	19.3±2.7	14.7±2.1 (p < 0.01)	
histamine (nM / l)	6.5±2.1	3.2±0.7 (p < 0.05)	64.9±8.3 (p < 0.01)
TXB ₂ (pg / ml)	18.7±4.0	14.1±3.3	78.3±8.8 (p < 0.05)

厚生省科学研究補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業）
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
分担研究報告書

小児におけるテオフィリンの有効で安全な使用に関する研究

分担研究者氏名 吉田隆實 静岡県立こども病院感染免疫アレルギー科
研究協力者氏名 木村光明 静岡県立こども病院感染免疫アレルギー科

研究要旨

テオフィリンは気管支喘息の治療に頻用されているがその作用機序はまだ十分明らかにされていない。従来は phosphodiesterase 阻害作用による気道平滑筋の弛緩作用が薬効の中心と考えられていたが、この作用は治療に用いられる濃度より遥かに高い濃度でしか認められない。最近ではテオフィリンの治療域の血中濃度での薬理作用として抗炎症作用が注目され、好酸球のアポトーシス誘導や接着因子発現の抑制、chemical mediator 放出の抑制などが報告されている。しかし、これらはいずれも炎症のエフェクター相の細胞への作用であり、アレルギー反応を誘導・調節する立場にあるアレルギー特異的 Th 細胞への作用についてはほとんど知られていない。われわれはこれまで小児気管支喘息を含むアレルギー患者を対象として末梢血単核球のダニ特異的リンパ球増殖反応や IL-5 産生能について研究してきた。本研究ではこのシステムを用いて気管支喘息患者のアレルギー特異的 Th 細胞の増殖性やサイトカイン産生に及ぼすテオフィリンの作用を解明することを試みる。まず第一の課題としてテオフィリンがダニ特異的 Th 細胞の増殖に及ぼす影響について検討したところ、 $10\mu\text{g/ml}$ の常用治療濃度域でもダニ特異的リンパ球増殖反応を $18.0\pm 9.9\%$ ($n=6$) 抑制することが明らかになった。 $20\mu\text{g/ml}$ のテオフィリン存在下では $20.8\pm 12.5\%$ ($n=17$) の抑制率であり、最大抑制率は 42% に及んだ。このような結果からテオフィリンにはアレルギー特異的 Th 細胞の増殖を抑制することにより気道でのアレルギー反応を減弱化させる作用があることが示唆され、抗喘息作用の機序の一つとして重要と思われる。

A. 研究目的

テオフィリンには cAMP を分解する phosphodiesterase (PDE) 阻害作用があり、細胞内 cAMP を上昇させる。細胞内 cAMP の上昇は気管支平滑筋の弛緩をもたらすことが知られており、テオフィリンの抗喘息作用はかつてはこのような機序によると考えられていた。しかし治療域のテオフィリン濃度では明らかな PDE 阻害作用が見られないことからこの説は次第に省

みられなくなった。代わって浮上しつつあるのが抗炎症作用であり、好酸球などの炎症細胞の活性化抑制や寿命短縮などが報告されている。これらの作用は治療域濃度でも観察される点で PDE 阻害作用と異なっている。喘息発作において急性相ではヒスタミン、遅発相ではアレルギー性炎症が気道平滑筋収縮の主要な原因であるが、テオフィリンの気管支平滑筋収縮抑制作用は前者より後者でより明瞭に見られる

ことも抗炎症作用が注目される要因の一つとなっている。

しかしこれまで報告されたテオフィリンの抗炎症作用はいずれもアレルギー性炎症のエフェクター細胞に対するものであり、炎症を誘導・調節する作用を持つアレルギー特異的ヘルパーT (Th) 細胞への作用についてはほとんど知られていない。Th 細胞へのテオフィリンの作用の有無は抗喘息薬としてのテオフィリンの位置づけに決定的な影響を与える極めて重要な問題である。

われわれはこれまでに小児気管支喘息患者の末梢血単核球をダニ抗原で刺激する方法でダニ特異的 Th 細胞の増殖や Th2 サイトカインである IL-5 の産生について研究してきた。本研究はこのような *in vitro* の実験系を用いて、テオフィリンのダニ特異的 Th 細胞機能への作用を解明し、その抗喘息薬としての性格を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1) 研究計画：テオフィリンのダニ特異的 Th 細胞への抑制作用をリンパ球増殖反応および IL-5 産生への影響を研究することにより明らかにする。

2) 対象：非発作時の小児気管支喘息患者 17 名、平均年齢 5.8 ± 5.1 歳 (範囲 0~15 歳)、男：女 = 11：6、血清 IgE (幾何平均および 1SD の範囲)：213.8 (28.2-1585.0) IU/ml、ダニ IgE-RAST 値：14.5 (1.1-195.0) UA/ml、末梢血好酸球比率： $6.1 \pm 4.6\%$

3) 方法：

a) リンパ球増殖反応：末梢血単核球を分離し 1×10^6 /ml に調整して 10% FCS を含む RPMI1640 培養液に浮遊させる。ダニ粗抗原を $50 \mu\text{g/ml}$ 加え 6 日間培養する。培養終了後、細胞を 70% エタノールで固定し DNA をヨウ化プロピデイウムで染色、フローサイトメトリーで S 期細胞比率を測定する。テオフィリ

ンの作用を見るためダニ粗抗原とともに $20 \mu\text{g/ml}$ のテオフィリンを加えたサンプルを作って同様に S 期細胞比率を測定する。両サンプルの S 期細胞比率を比較してテオフィリンによる増殖抑制率を算出する。

b) IL-5 産生：上記と同様に末梢血単核球を準備し、ダニ粗抗原で刺激後の培養上清を保存する。培養期間は 6 日間を主とするが一部の研究では培養期間を 1~2 日間として短期の作用についても検討する。テオフィリンの作用を調べるためにダニ粗抗原とともに $20 \mu\text{g/ml}$ のテオフィリンを加えたサンプルを作り、同様に培養してその上清を保存する。両者の培養上清中の IL-5 量を ELISA キットで測定し、比較してテオフィリンによる IL-5 産生抑制率を算出する。

(倫理面への配慮)

採血はルーチン検査と同時に行い、患者に余分な苦痛を与えない。

C. 研究結果

テオフィリンは濃度依存性にダニ特異的リンパ球増殖反応を抑制した (図 1)。テオフィリン $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度では約 50% 程度の増殖抑制が見られるが、 $10 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ の治療域の濃度でも 20% 程度の増殖抑制が安定的に認められた。6 名を対象として $10 \mu\text{g/ml}$ と $20 \mu\text{g/ml}$ のテオフィリンの作用を比較したところそれぞれ $18.0 \pm 9.9\%$ および $21.3 \pm 14.4\%$ の抑制率であった。前者では後者より約 2 割低いものの明らかな増殖抑制作用が認められることを確認して以後の研究にはテオフィリン $20 \mu\text{g/ml}$ の濃度を使用した。対象 17 名のテオフィリンによる増殖抑制作用は $20.8 \pm 12.5\%$ であり、最大は 42% に達した (図 2)。増殖抑制には年齢による影響は認められなかった。また血清 IgE 値やダニ IgE-RAST 値との間にも相関は認められなかったが、

末梢血好酸球比率とは正相関傾向が認められ、ダニ特異的リンパ球増殖反応との間には有意な正相関が認められた ($r=0.56, p<0.05$) [図 3]。

ダニ特異的 IL-5 産生については現在準備中であり、まだ測定していない。

D. 考察

近年小児気管支喘息の病態においてもアレルギー性炎症の重要性が広く認められつつある。アレルギー性炎症の発生に中心的な役割を果たしているのは Th2 細胞である。アレルギー特異的 Th2 細胞は IL-5 産生により好酸球の分化・増殖を促進し、また好酸球の活性化や局所での好酸球寿命の延長作用により気道のアレルギー性炎症の発生・持続に不可欠の役割を果たしている。また IL-4 産生により IgE 抗体産生を増加させ、即時型アレルギーの発生にも必須の役割を果たしている。即時型アレルギーはヒスタミン遊離による即時反応にとどまらず続発性にアレルギー性炎症も誘発する。IgE 抗体にはまた抗原提示細胞の表面に発現されている IgE レセプターに結合して抗原摂取を促進し、T 細胞への抗原提示を効率化する作用もある。

テオフィリンはかつては PDE 阻害作用により抗喘息作用を発揮すると考えられていた。しかし治療域の濃度ではそのような作用が見られないことから最近では抗炎症作用の観点から抗喘息作用が論じられることが多い。これまでにテオフィリンの治療濃度域での抗炎症作用については以下のことが知られている。1) 好酸球のアポトーシスを誘導、2) 好酸球からのケミカルメディエーターの放出を抑制、3) 好中球の活性酸素の産生を抑制、4) 好酸球の接着因子の発現を抑制、5) 末梢血単核球からの IFN- γ 産生を抑制、IL-10 の産生を促進、6) 好酸球やリンパ球の気道組織への浸潤を抑制。これらはほとんど炎症のエフェクター細胞に関するものであり、炎症を直接的

に鎮静化させる作用である。

これまでのところアレルギー性炎症の発生や進展をコントロールする役割を担っている Th2 リンパ球へのテオフィリンの作用についてはほとんど知られていない。Th2 細胞へのテオフィリンの作用の有無は抗喘息薬としてのテオフィリンの位置づけに関わる問題であり、その究明は極めて重要である。

われわれはアレルギー患者の末梢血単核球を用いてアレルギー特異的リンパ球増殖反応をフローサイトメトリーで測定する方法の開発し (Kimura M, et al, *J Allergy Clin Immunol* 1998 101:84-89)、アトピー性皮膚炎患者や気管支喘息患者ではダニ特異的リンパ球増殖反応が亢進しているという従来からの知見を確認することができた (木村光明他、アレルギー 1997 46:384-390, 木村光明他、アレルギー 1997 46:520-527)。さらに乳児アトピー性皮膚炎患者ではダニ特異的 IgE 抗体産生に先立ってダニ特異的リンパ球増殖反応が上昇しており、ダニ感作の早期の指標として有用であることを報告した (Kimura M, et al, *J Allergy Clin Immunol* 1998 101:84-89)。

われわれのシステムでは培養終了後細胞成分と培養上清をともに利用できるため、培養上清を用いてアレルギー患者のアレルギー特異的サイトカイン (IL-4, IL-5, IFN- γ) 産生についても研究を進めてきた。その結果アレルギー特異的リンパ球増殖反応と IL-5 産生との間に正相関が見られること (Kimura M, et al, *J Allergy Clin Immunol* 1998 101:84-89)、アトピー性皮膚炎患者と気管支喘息患者とではアレルギー特異的サイトカイン産生量が明らかに異なること (Kimura M, et al, *Clin Exp Immunol* 1999 118:192-196)、ダニ特異的 IgE 抗体レベルとダニ特異的 IL-4 産生との間には有意な相関関係が見られることなどを明らかにしてきた (Kimura M, et al, *J Allergy Clin Immunol* 2000 105:327-332)。