

Fig. 5 Effects of fenoterol and prednisolone on the increase in serum antigen-specific IgE after repeated antigen challenge in sensitized BALB/c mice. Serum samples were obtained before the last antigen inhalation. Results were represented as the means \pm SEM of 5-7 mice. ND: not detected, NS: non-sensitized, S: sensitized, OA: ovalbumin-inhaled, Pred: prednisolone.

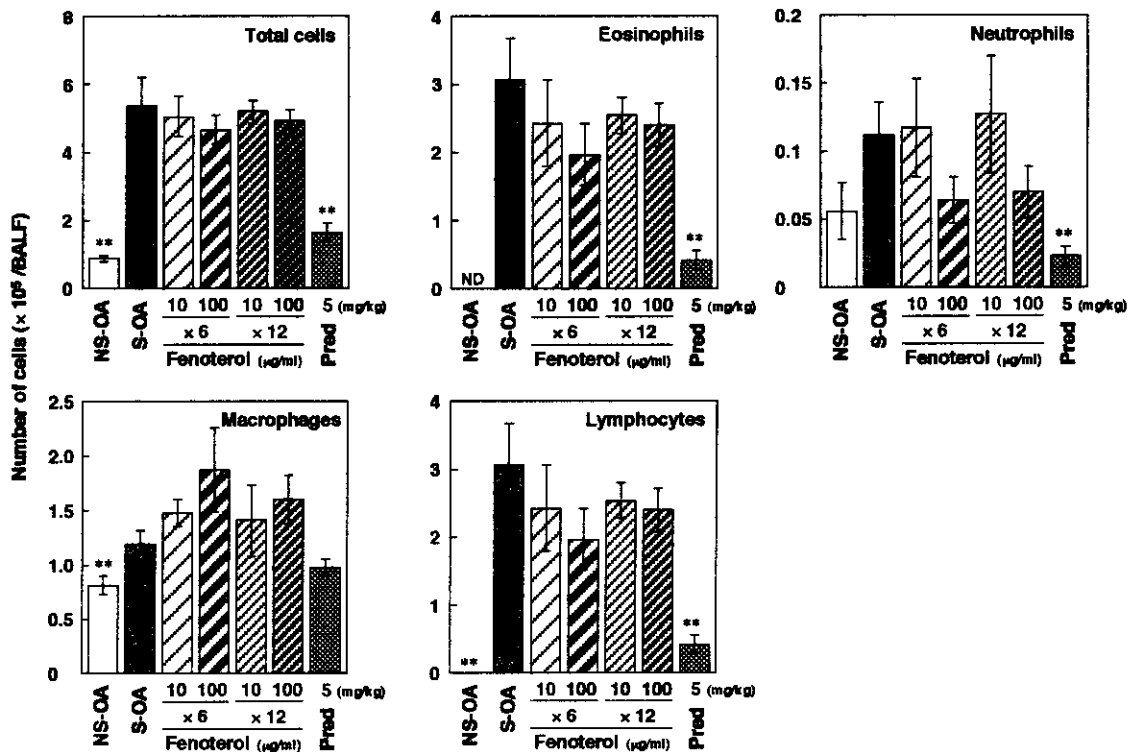


Fig. 6 Effects of fenoterol and prednisolone on antigen-induced leukocyte accumulation in bronchoalveolar lavage fluid after repeated antigen challenge in sensitized BALB/c mice. Results were represented as the means \pm SEM of 5-7 mice. BALF: bronchoalveolar lavage fluid, NS: non-sensitized, S: sensitized, OA: ovalbumin-inhaled, ND: not detected, Pred: prednisolone. ** $p < 0.01$

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

平成 13 年度 分担研究報告書

β 2 刺激薬の免疫系に与える作用に関する研究

分担研究者 野間 剛 北里大学大学院小児科学専任講師

研究要旨

末梢血リンパ球には、交感神経 β 2 及び α 2 受容体の遺伝子 (mRNA) が発現され、フェノテロール、イソプロテノール、プロカテロール、サルブタモールの β 2 刺激薬はダニ抗原誘発気管支喘息患児リンパ球のインターロイキン(IL)-5 産生を抑制した。一方、ヒト肺線維芽細胞には、加えて β 1 及び α 1 受容体の遺伝子 (mRNA) が発現され、イソプロテノール、プロカテロール、フェノテロールは高濃度の IL-4 と相乗的に作用し、サルブタモールは高濃度の IL-4 あるいは TNF- α と相乗的に作用し、いずれも、ヒト肺線維芽細胞からのエオタキシンの産生を著しく亢進する作用が存在した。サルブタモールの作用は β 2 及び β 1 刺激薬の拮抗剤プロプラノロールにて完全に、プロカテロールの作用は部分的に抑制されたが、フェノテロールの作用は抑制されなかった。フェノテロールは β 2 及び β 1 受容体を介さない作用点により、プロカテロールは部分的にこれらの受容体を介さない作用点によりエオタキシンの産生を増強する作用を併せ持っていると考えられた。

β 2 刺激薬は、末梢のリンパ球では IL-5 などの Th2 サイトカインの産生系を制御する作用が存在するが、気道局所では炎症性サイトカインと相乗的に作用してエオタキシンの産生を亢進し好酸球性炎症を増幅する作用が存在すると考えられる。その作用点は各々の β 2 刺激薬によって異なると考えられる。

吸入用 β 2 刺激薬の使用の際、IL-4 や TNF- α などの炎症性サイトカインの産生を抑制するようなステロイドや抗炎症剤の吸入を併用することが望ましいと考えられる。

研究協力者

松井猛彦 都立荏原病院小児科 (部長)
永井博式 岐阜薬科大学薬理学 (教授)
平井浩一 東京大学医学部生体防御機能学(助教授)
菅原陽子 北里大学小児科学 (実験助手)
藤原幸子 北里大学小児科学 (実験助手)
伊藤京子 北里大学小児科学 (実験助手)

A 研究目的

アレルギーで活性化された Th2 型 T 細胞からは、IgE 産生系の促進に関わるインターロイキン(IL)-4 やアレルギー性炎症の主体をなす好酸球の分化、活性化、遷延作用を示す IL-5 が産生される。ダニ抗原誘発気管支喘息患者リンパ球からは抗原刺激により eosinophil colony-stimulating factor が産生され、気管支喘息気道粘膜局所の細胞からは、IL-5 messenger RNA が検出されることから、IL-5 がアレルギー性炎症の遅発相に関わっていることが示唆される。ダニ抗原誘発気管支喘息患者末梢血単核細胞からは、マイトージェンやダニ抗原刺激により、IL-5 産生が有意にみとめられ、ま

た気管支喘息患者のダニ抗原で感作した気道上皮細胞や樹状細胞細胞は自己の未成熟 CD4 陽性 T cells を活性化し、IL-5 産生を誘導する。これらの IL-5 の産生は血清においても、単核細胞からの産生系においても、その活性は病勢と相関する。

一方、アレルギー性炎症における炎症局所では、浸潤細胞の主体は好酸球がしめる。アレルギー性炎症の遅発相では、炎症の進展にともない、さらに好塩基球が流入し炎症を増幅する。また、炎症に関わる Th2 型 T リンパ球の浸潤を認める。これらの好酸球、好塩基球、Th2 細胞は局所の上皮細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞から産生されるエオタキシンの高親和性 CC ケモカイン受容体(CCR3)をもち、その走化作用により局所に集積し炎症巣を形成する。とりわけエオタキシンは好酸球に対する走化作用は著しく、細胞接着、活性化酸素の産生、好酸球の脱顆粒を誘導し好酸球性炎症の発症に大きく関わっている。線維芽細胞は Th2 型サイトカインである IL-4 に反応して大量のエオタキシンを産生する。

β 2 刺激薬は平滑筋弛緩作用が存在することか

ら、気管支喘息発作の治療薬として広く使用されている。全身的投与に加え、局所への吸入療法も頻用されている。本研究では吸入用 β 刺激薬のアレルギー性炎症に与える免疫学的作用について評価するため、ダニ抗原誘発気管支喘息患児の末梢血単核細胞を用いIL-5産生に与える β 2刺激薬(フェノテロール、イソプロテノール、プロカテロール、サルブタモール)の影響、及びヒト胎児由来肺線維芽細胞を用いエオタキシン産生に与える影響について検討を加える。

B 研究方法

対象

IL-5産生に関する研究は、ダニ抗原 IgE Alastat スコアが4から6の6歳から14歳までの気管支喘息患児6名の末梢血単核細胞を用いた(Table 1)。診断は臨床症状、特異的 IgE RAST スコア、皮膚試験、抗原負荷テストの結果を用いて総合的に行なった。テオフィリン、 β 2刺激剤で治療されている患児を用い、ステロイド剤、漢方方剤、あるいは、他の抗アレルギー剤は、検査時及び、検査前2ヵ月以上に渡って使用していない症例を用いた。また、エオタキシン産生に関する研究にはヒト胎児肺線維芽細胞 (Human normal embryonic lung fibroblast, HFL-1; RIKEN gene bank (Tsukuba, Japan)) を用いた。

方法

エオタキシンの産生と測定

ヒト胎児肺線維芽細胞($3 \times 10^5 / 400 \mu\text{l}$)にリコンビナントIL-4 (Genzyme, Cambridge, MA, USA)あるいはTNF- α (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)を添加したのち、24穴平底プレートを用い、15%胎児牛血清(大日本製薬株式会社)加Ham's F-12 Medium(旭テクノグラス株式会社, Funabashi, Japan)にて48時間培養後(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO $_2$)、上清中のエオタキシン活性をELISA法にて測定した。即ち、抗エオタキシンモノクローナル抗体(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in CBS, pH9.0)(東京大学平井浩一博士より供与)の50 μl を96穴平底プレート(Lingro, McLean, VA)の各穴に添加し湿度を高くした4 $^{\circ}\text{C}$ の容器中にて16時間処理することにより各穴を抗体で被覆した。PBSで2回洗浄後、各穴の非被覆面を0.25%のゲラチン(Wako, Osaka, Japan)(300 μl)で37 $^{\circ}\text{C}$ 、1時間被覆処理をした。PBSで3回洗浄後、各穴に検体(培養上清)の50 μl を添

加し、湿度を高くした4 $^{\circ}\text{C}$ の容器中にて16時間静置することにより検体を反応させた。PBSで3回洗浄後、各穴に1%BSA加PBSで希釈したホースラデッシュペルオキシダーゼ結合抗エオタキシンモノクローナル抗体(Fab', Mab 174.4, 0.08 $\mu\text{g}/\text{ml}$)(東京大学平井浩一博士より供与)の50 μl を添加し、室温にて2時間反応させた。PBSで5回洗浄後、TMB substrate reagent kit(Pharmingen, San Diego, CA, USA)を用い、TMB溶液100 μl を各穴に同時添加し、陽性コントロールの発色を十分認め陰性コントロールの発色をほとんど認めない段階まで暗室、室温にて反応させた。2N硫酸の50 μl を各穴に同時添加し酵素反応を停止させた後、発色の程度を450nmの吸光波長をもちいて測定した。同時に測定した標準エオタキシンの標準曲線から検体のエオタキシン活性(units)を定量した。

IL-5の産生と測定

気管支喘息患児末梢血より比重遠心法で分離した単核細胞($2 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$)に1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のダニ抗原(Df=Dermatophagoides farinae)(鳥居)あるいはphytohemagglutinin-p (PHA-p)(1/200%)(Gibco)を添加し、96穴丸底プレートを用いて10%胎児牛血清(56 $^{\circ}\text{C}$ 30分非動化)加RPMI1640培養液にて5日間培養後(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO $_2$)上清中のIL-5活性をELISA法を用いて測定した。即ち、OptELIATM Set: Human Interleukin-5 (Pharmingen, San Diego, CA, USA)及びTMB substrate reagent kit(Pharmingen)を用い、製造者の方法に従いIL-5活性を定量した。

メッセンジャーRNAの測定

交感神経 β 1, 2及び α 1, 2受容体のメッセンジャー(m)RNAの測定は、RT-PCR法を用い型通り施行した。

β 2刺激薬の処理法

フェノテロール、イソプロテノール、プロカテロール、サルブタモールの原まつを蒸留水あるいは生理食塩水で溶解し 10^{-3} あるいは $10^{-2\text{M}}$ 液を作成し原液とした。試薬は用時調整とし、RPMI1640培養液で使用濃度の10倍まで希釈し各実験の細胞培養系に添加した。

統計学的処理

得られた成績は対照と比較することによりtwo-tailed Student's t-testにより検定した。P

<0.05 を有意とした。

倫理面への配慮

他の検査が臨床的に必要であると判断される患児に対して、検査に協力的で理解度の高い親権者を選択し、検査の必要性について十分な説明と納得を得た（インフォームドコンセント）後研究のための採血を施行した。これらの配慮ののち採血、検査が施行された場合、検査から得られる利益が大きいことの配慮から倫理面の問題はないと考えられた。ヒトゲノム・遺伝子解析研究は、樹立細胞株を使用し、倫理指針(平成 13 年 3 月 29 日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)を遵守して施行した。

C 研究結果

TNF- α 、IL-4 によるエオタキシン産生の誘導

線維芽細胞に TNF- α を添加培養すると、1000ng/ml 濃度でエオタキシンの産生の増強を認めた (Fig. 1)。10, 100ng/ml 濃度では、軽度の産生の亢進を認めた (Fig. 1)。一方、IL-4 を添加培養すると、濃度依存性にエオタキシンの産生の増強を認めた (Fig. 1)。TNF- α 及び IL-4 を同時添加にて培養すると、濃度依存性にエオタキシンの産生の増強を認めたが、両者の著しい相加・相乗作用は認めなかった (Fig. 1)。

エオタキシン産生に与える β 2 刺激薬の影響

線維芽細胞に各濃度の β 2 刺激薬を添加し、48 時間後の培養上清中のエオタキシン活性を ELISA 法を用いて測定すると、フェノテロール、イソプロテノール、プロカテロール、サルプタモールでは産生に大きな影響は与えなかった (Fig. 2)。

次に、TNF- α あるいは IL-4 添加時における β 2 刺激薬のエオタキシン産生に与える影響について検討を加えた。それぞれエオタキシン産生を高濃度に認める群と低濃度に認める群について検討を加えた。

フェノテロールにおいては、TNF- α 刺激時 (10,1000ng/ml) ではエオタキシンの産生は何れも軽度の低下を認めた (Fig. 3)。IL-4 刺激時では低濃度 (10U/ml) ではほとんど影響を与えなかったが、高濃度 (1000U/ml) で産生の低下を認めた (10^{-10} - 10^{-8M}) (Fig. 3)。

イソプロテノールにおいては、TNF- α 刺激時 (10,1000ng/ml) ではエオタキシンの産生は何れ

も軽度低下を認めた (Fig. 3)。IL-4 刺激時では低濃度 (10U/ml) ではほとんど影響を与えなかったが、高濃度 (1000U/ml) の IL-4 刺激培養ではエオタキシン産生の著しい亢進を認めた (10^{-10} - 10^{-7M}) (Fig. 3)。

プロカテロールでは TNF- α 刺激時 (10,1000ng/ml) エオタキシンの産生は何れもほとんど影響を与えなかった (Fig. 3)。IL-4 刺激時では低濃度 (10U/ml) で軽度亢進を認め、高濃度 (1000U/ml) の IL-4 刺激培養ではエオタキシン産生の軽度の亢進を認めた (10^{-8} - 10^{-7M}) (Fig. 3)。

サルプタモールでは、TNF- α 刺激時において低濃度 (10ng/ml) ではエオタキシンの産生はほとんど影響を与えなかったが、高濃度 (1000ng/ml) では著しい産生の増強を認めた (10^{-8} - 10^{-5M}) (Fig. 3)。IL-4 刺激時では同様に、低濃度 (10U/ml) でエオタキシンの産生はほとんど影響を与えなかったが、高濃度 (1000U/ml) では著しい産生の増強を認めた (10^{-8} - 10^{-5M}) (Fig. 3)。

β 2 刺激薬のエオタキシン産生増強作用に与える β 刺激拮抗阻害剤の作用

線維芽細胞に各濃度の β 2 及び β 1 刺激剤の拮抗阻害剤プロプラノロール (Sigma)、 β 2 刺激剤の拮抗阻害剤 ICI118,551HCL (Sigma)、 β 1 刺激剤の拮抗阻害剤メトプロロール (Sigma) をそれぞれ前処理した後、各 β 2 刺激薬を添加し、48 時間後の培養上清中のエオタキシン活性に与える作用を検討した。それぞれの拮抗剤はサルプタモールのエオタキシン産生増強作用をほぼ完全に抑制した (Fig. 4A)。プロカテロールでは、プロプラノロールはエオタキシン産生増強作用を部分的に抑制したが、ICI118,551HCL、メトプロロールは抑制しなかった (Fig. 4B)。一方、フェノテロールではいずれの拮抗阻害剤でも抑制しなかった (Fig. 4C)。

末梢血単核細胞からの IL-5 産生の誘導

気管支喘息患者単核細胞に Df 抗原を添加し、3.5 日間培養をすると、上清中には Df 抗原濃度依存的に IL-5 活性が認められた。PHA 刺激培養においても Df 抗原と同等の IL-5 活性が認められた。これらの IL-5 活性は $1\mu\text{g/ml}$ Df 刺激の場合では培養期間が 5 日間、 $10\mu\text{g/ml}$ Df 刺激の場合では培養期間が 5 乃至 6 日間、PHA 刺激の場合では培養期間が 6 乃至 7 日間で活性の最大値を得た。よって、以後の実験において単核細胞の培養期間は

5日間として成績を得た。

β2 刺激薬の IL-5 産生に与える作用

気管支喘息患者の末梢血単核細胞を用い β2 刺激薬の IL-5 産生に与える作用について検討した。それぞれの β2 刺激薬を培養開始時に添加し5日後の培養上清中の IL-5 活性を評価した。フェノテロールでは非刺激時 IL-5 産生に軽度の、1 μg/mlDf 及び PHA 刺激培養で著明な低下を認めた (Fig. 5)。イソプロテノールでは非刺激時、1 μg/mlDf, PHA 刺激培養で IL-5 産生の著明な低下を認めた (Fig. 5)。プロカテロール及びサルブタモールにおいても同様に IL-5 産生の低下を認めた (Fig. 5)。1 μg/mlDf 刺激にては全例で IL-5 産生の低下を認めたが、10 μg/mlDf 刺激では低下の程度は軽度あるいは低下を認めない症例を認めた (Fig. 5)。これらのフェノテロール、イソプロテノール、プロカテロール、サルブタモールの β2 刺激薬の作用はサイトカインネットワークを介した抑制作用であることが示唆された。

患者成績のうち、刺激抗原の種類と濃度によって IL-5 産生の低下を認めない症例が存在した。

末梢血リンパ球及び線維芽細胞における交感神経受容体 mRNA の発現

末梢血リンパ球及びヒト胎児肺線維芽細胞の交感神経 β 1, 2 及び α 1, 2 受容体のメッセンジャー(m)RNA の発現を RT-PCR 法を用い型通り施行した。末梢血リンパ球では β 2 及び α 2 受容体の mRNA の発現を認め、β 1 及び α 1 受容体の発現は認めなかった (Fig. 6A)。一方、ヒト胎児肺線維芽細胞では β 1, 2 及び α 1, 2 受容体の mRNA の発現を認めた (Fig. 6B)。

D 考察

気管支喘息患者の末梢血単核細胞から、1 μg/mlDf 刺激にて全例で IL-5 産生の低下を認めたが、10 μg/mlDf 刺激では低下の程度は軽度あるいは低下を認めない症例を認めた。患者末梢血単核細胞を用いた場合、Df 抗原刺激で、IL-1 産生、IL-5 産生、IL-4 産生の亢進と IFN-γ 産生の低下を認めるが、それぞれのサイトカインは相互に調節し、サイトカインネットワークを形成している。β2 刺激薬、フェノテロール、イソプロテノール、プロカテロール、サルブタモールの IL-5 産生に対する作用機序は、リンパ球に交感神経 β 2 及び 2 受容体の mRNA が発現していたことか

ら、β 2 受容体を介したシグナルが末梢血単核細胞によるサイトカインネットワークを介し IL-5 産生を抑制した可能性が示唆される。今回得られた成績からは、これらのネットワークは刺激する抗原濃度や患者の病態によって異なる場合があることが推測された。

β2 刺激薬の使用により IL-5 の産生は、結果として抑制され、好酸球の活性化、延命作用は、従って、抑制される。IL-5 には軽度の好酸球の走化作用が存在することから、好酸球の走化作用は抑制される可能性が考えられるが、今回検討した β2 刺激薬のなかで、フェノテロール、イソプロテノール、プロカテロールは高濃度の IL-4 と相乗的に作用し、サルブタモールは高濃度の IL-4 と TNF-α と相乗的に作用し、いずれも、強力な好酸球走化因子であるエオタキシンの産生を著しく亢進したことから、炎症が進展し IL-4 の産生が著明になった炎症局面では、これらの β2 刺激薬を吸入した場合、平滑筋の弛緩は起こっても、好酸球の局所への著しい動員と炎症の拡大・遷延が予測される。動員された好酸球はその場で IL-5 産生の低下により活性化・延命は抑制されるが、一方、エオタキシンは動員され死滅予定の好酸球を延命、活性化させて炎症を増強する可能性を秘めている。

各 β2 刺激薬のエオタキシンの産生増幅作用の機序を解明するため、β 刺激剤の拮抗阻害剤を用いて検討を加えた。β 2 及び β 1 刺激剤の拮抗阻害剤プロプラノロールは、サルブタモールのエオタキシン産生増強作用をほぼ完全に抑制した。また、β 2 刺激剤の拮抗阻害剤 ICI118,551HCL 及び β 1 刺激剤の拮抗阻害剤メトプロロールも同様にサルブタモールの作用を抑制した。用いたエオタキシン産生肺線維芽細胞は交感神経 β 1, 2 及び α 1, 2 受容体の mRNA を発現していたこと、サルブタモールの作用は、少なくとも β 1 あるいは β 2 受容体を介した作用であると考えられた。β 2 刺激剤の β 1 受容体の作用はわかりにくい部分もあるが、β 1 と β 2 受容体の交差反応性を考えれば可能な現象であると考えられた。プロカテロールでは、プロプラノロールはエオタキシン産生増強作用を部分的に抑制したが、ICI118,551HCL, メトプロロールは抑制しなかった。従って、プロカテロールは β 1 と β 2 受容体に加えて、他の別の作用点によってエオタキシン産生増強作用を示している可能性が示唆された。

一方、フェノテロールではいずれの拮抗阻害剤でも抑制しなかったことから、 $\beta 1$ と $\beta 2$ 受容体によるものである可能性を否定するものではないが、作用点は $\beta 1$ と $\beta 2$ 受容体以外の部分に依存していると考えられた。

このように、サルブタモールの作用は $\beta 2$ 及び $\beta 1$ 刺激薬の拮抗剤プロプラノロールにて完全に、プロカテロールの作用は部分的に抑制されたが、フェノテロールの作用は抑制されなかった。フェノテロールは $\beta 2$ 及び $\beta 1$ 受容体を介さない作用点により、プロカテロールは部分的にこれらの受容体を介さない作用点によりエオタキシンの産生を増強する作用を併せ持っていると考えられる。

アレルギー性炎症の指標は、今回検討したIL-5やエオタキシンの産生の他に好酸球のIL-5に対する反応性、CCケモカイン受容体3(CCR3)発現の程度やCCR3によるエオタキシンに対する反応性、ECPなどの好酸球脱顆粒炎症物質の定量など検討すべき指標が残されている。試験管内での成績を総合的に判断し $\beta 2$ 刺激薬の生体に与える作用については今後慎重な検討が必要であると考えられる。

E 結論

$\beta 2$ 刺激薬は末梢のリンパ球ではIL-5などのTh2サイトカインの産生系を制御する作用するが、気道局所では、IL-4やTNF- α などの炎症性サイトカインと相乗的に作用してエオタキシンの産生を亢進し好酸球性炎症を増幅する作用が存在すると考えられる。その作用点は、 $\beta 2$ 及び $\beta 1$ 受容体以外の部分を含め、各々の $\beta 2$ 刺激薬によって異なると考えられる。

実際の臨床での成績、即ち、各種 $\beta 2$ 刺激薬を用いて治療した場合の症状や重症度の改善あるいは増悪との相関など、各 $\beta 2$ 刺激薬の成績が検証されることが望ましい。吸入用 $\beta 2$ 刺激薬使用の是非についての結論を得るには慎重な検討が必要であると考えられる。今回得られた結果からは、少なくとも、吸入用 $\beta 2$ 刺激薬の使用の際、IL-4やTNF- α などの炎症性サイトカインの産生を抑制するようなステロイドや抗炎症剤の吸入を併用することが望ましいと考えられる。

謝辞

フェノテロール、イソプロテノール、プロカテロール、サルブタモールを供与頂いた各社関係諸氏

に深謝申し上げます。

F 研究発表

1 論文発表

1 Takeshi Noma, Yukiko Fujiwara, Yoko Sugawara, Kyuko Itho, Kouiti Hirai, Takehiko Matsui, Hiroiti Nagai, Yutaka Kawano, Toshiaki Saeki, Nobuo Matsuura: $\beta 2$ adrenergic receptor agonists; fenoterol, isoproterenol, procaterol and salbutamol augment production of eotaxin by lung fibroblasts exposed to IL-4 and/or TNF- α (submitted)2002

2 Takeshi Noma, Yoko Sugawara, Toshiaki Saeki, Yutaka Kawano, Nobuo Matsuura, Hiroiti Nagai, Takehiko Matsui: Inhibition of interleukin-5 production by $\beta 2$ adrenergic receptor agonists; fenoterol, isoproterenol, procaterol and salbutamol in *Dermatophagoides*-stimulated peripheral blood mononuclear cells from patients with childhood asthma. (submitted) 2002

3 野間 剛: $\beta 2$ 刺激薬の免疫に及ぼす影響、第12回日本アレルギー学会 春季臨床大会記録集、印刷中、2002.

2 学会発表

1 野間 剛: シンポジウム 3 わが国の $\beta 2$ 刺激薬MDIと喘息死/ $\beta 2$ 刺激薬の免疫に及ぼす影響、第12回日本アレルギー学会春季臨床大会、福岡市、2000.アレルギー49(2.3):164. 2000

2 藤原幸子、菅原陽子、小川倫史、石川義人、野間 剛、松井猛彦、永井博式: $\beta 2$ 刺激薬のエオタキシン産生亢進作用と $\beta 2$ 受容体の解析、アレルギー50(2.3):292. 2001

3 野間 剛、藤原幸子、伊藤京子、小川倫史、川野 豊、石川義人、松井猛彦: $\beta 2$ 刺激薬のエオタキシン産生の亢進とその作用機序の解析、日本アレルギー学会誌15(4):457. 2001

Table 1 Subjects used for the study

Age (yr, range, median) 6-14, 12

serumIgE 1336.7 ± 730U/ml

Df-Alastat 4-6

	Age (yr)	Sex	Df-Alastat	IgE(U/ml)
Patient① (H.I)	13	F	4	401
Patient② (R.S)	10	M	5	391
Patient③ (Y.S)	12	F	6	403
Patient④ (A.O)	14	F	6	4860
Patient⑤ (Y.Y)	13	M	4	1571
Patient⑥ (Y.Y)	6	M	5	394

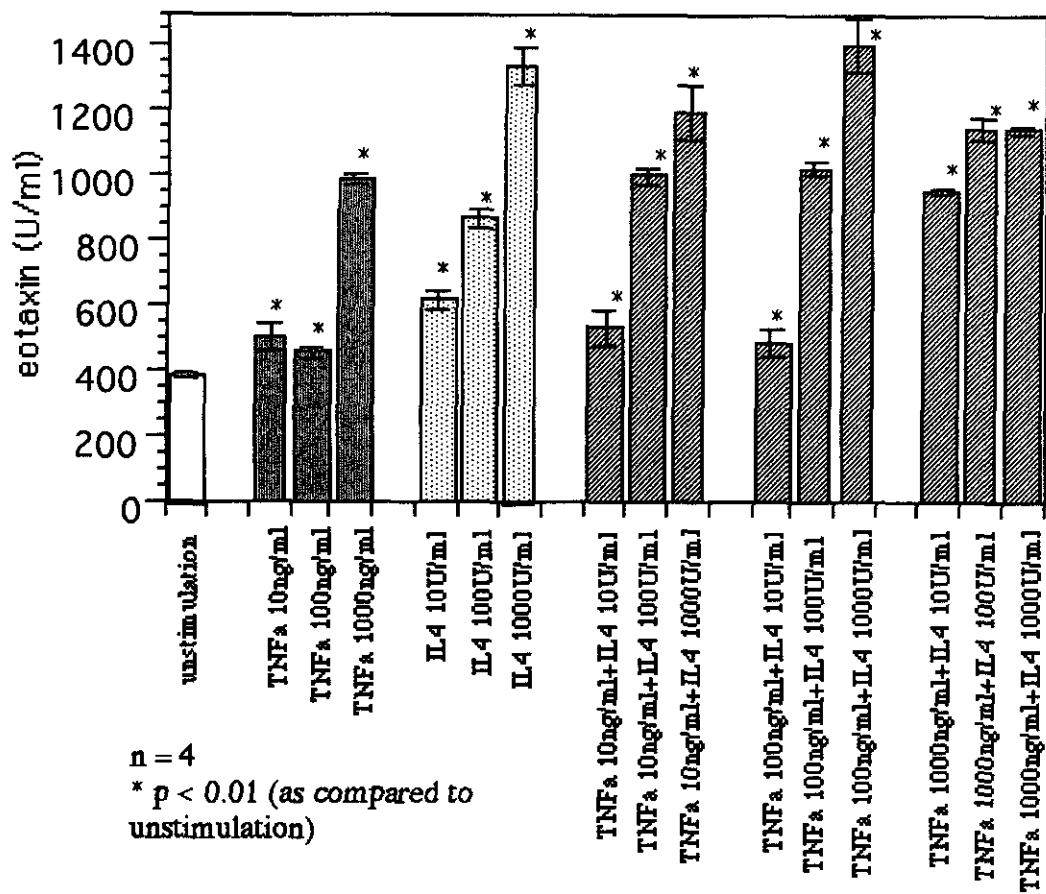


Fig.1 Effect of IL-4 and/or TNF-α on eotaxin production by lung fibroblasts

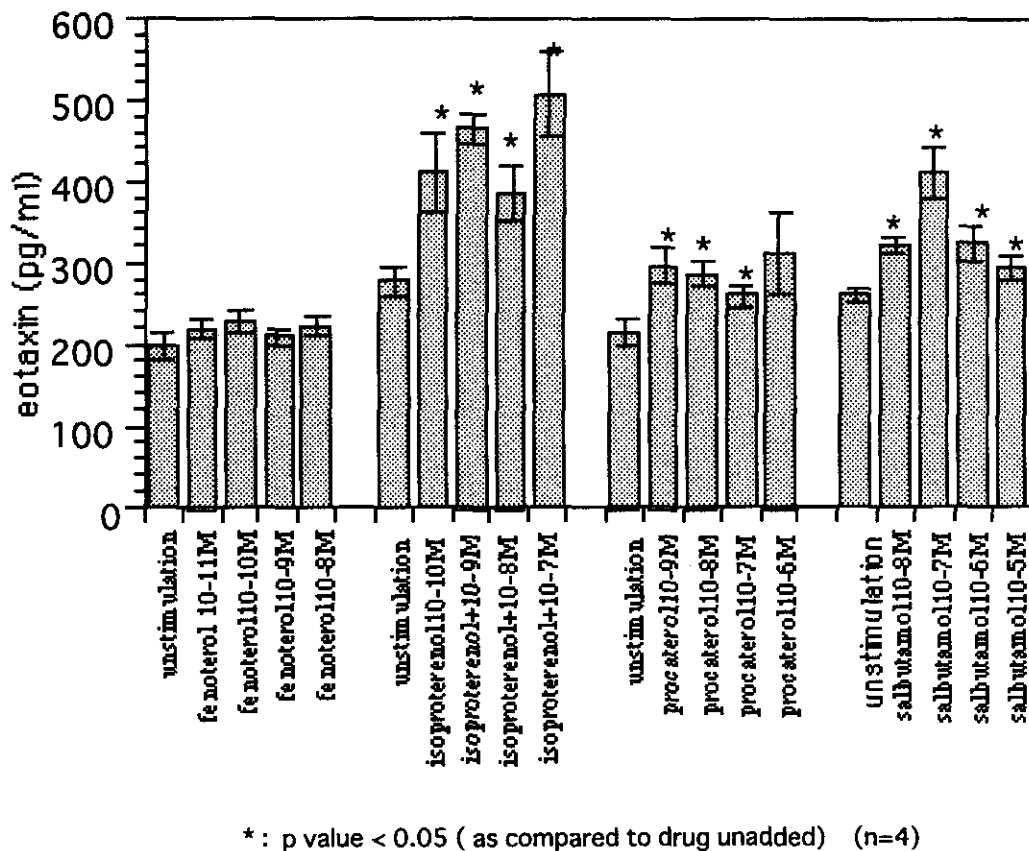


Fig.2 Effect of b2-agonists on production of eotaxin by lung fibroblasts

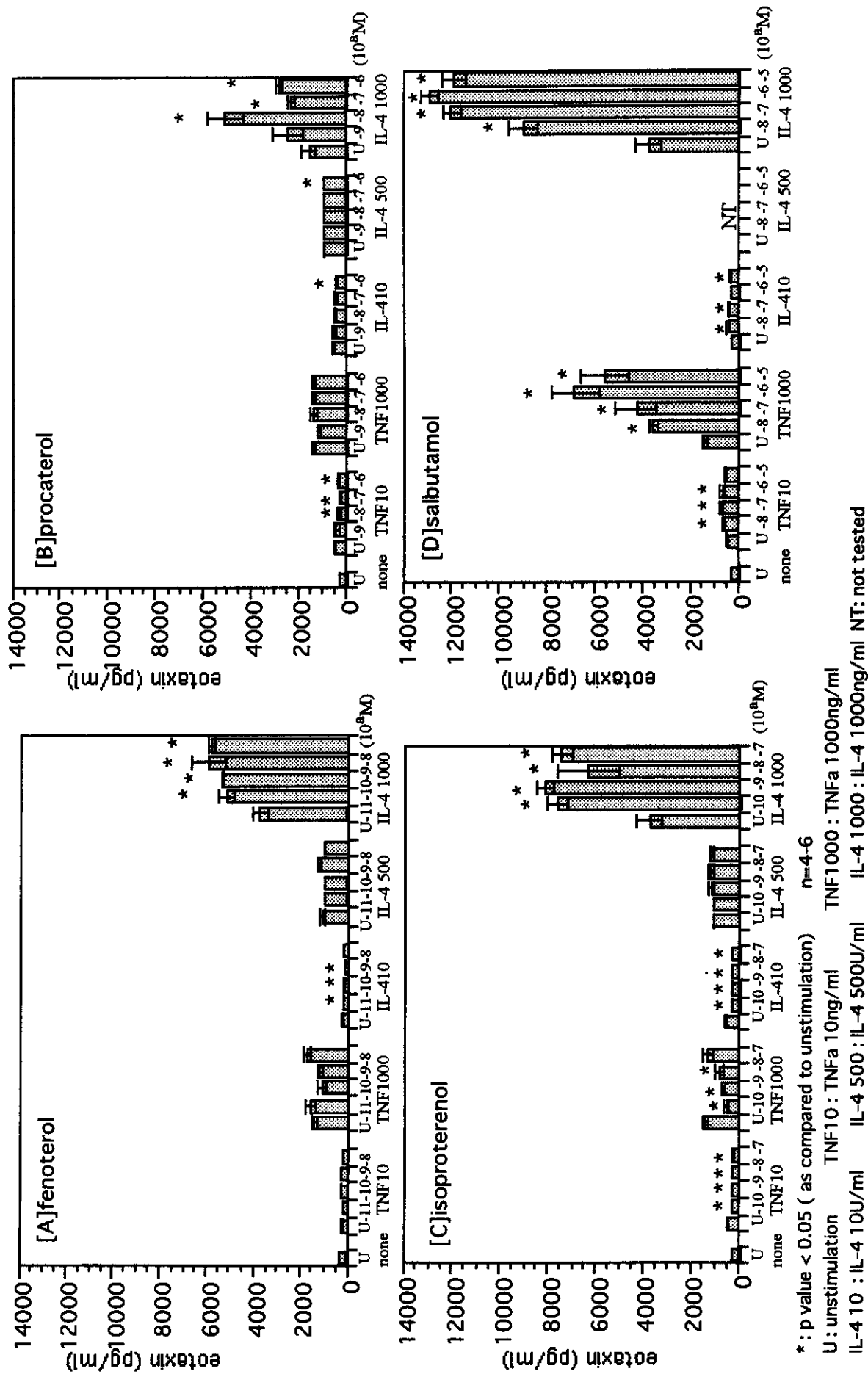
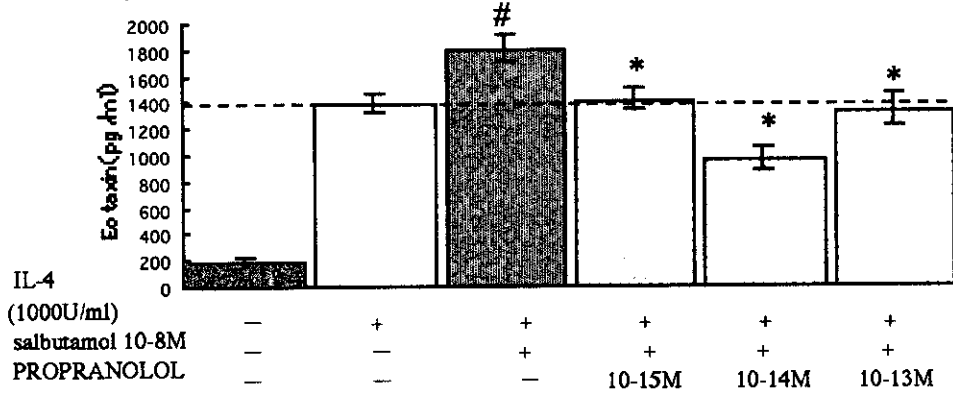
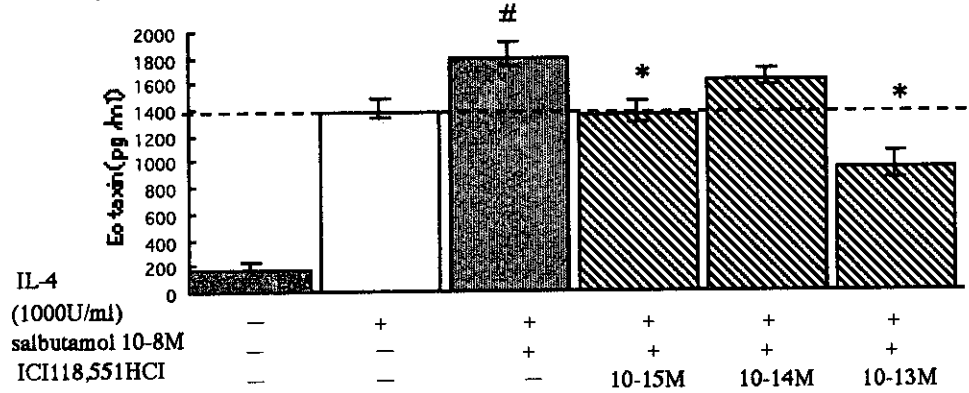


Fig.3 Effect of beta2 agonists on eotaxin production by lung fibroblasts

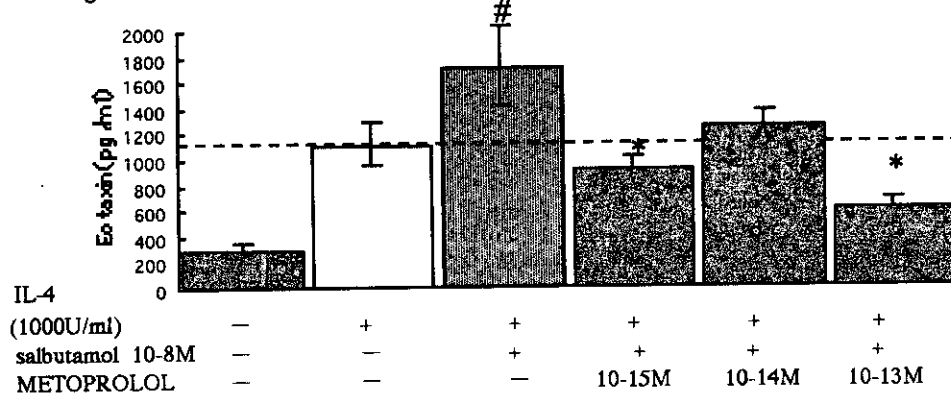
β 2+1-antagonists



β 2-antagonists



β 1-antagonists

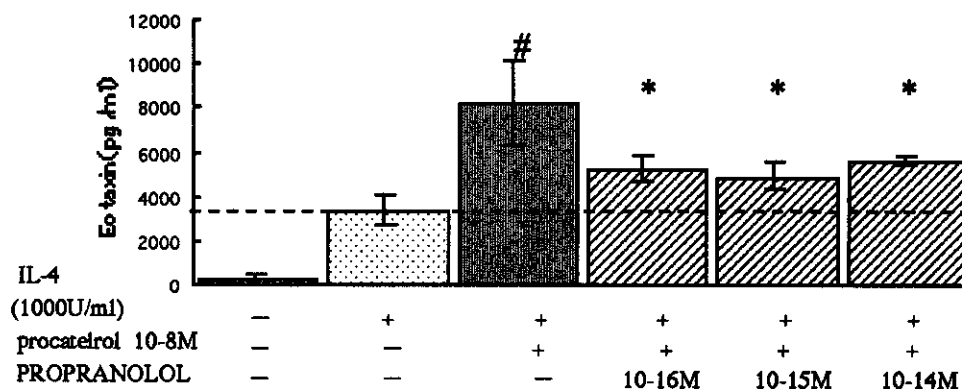


P value < 0.05 (as compared to IL4-treatment)

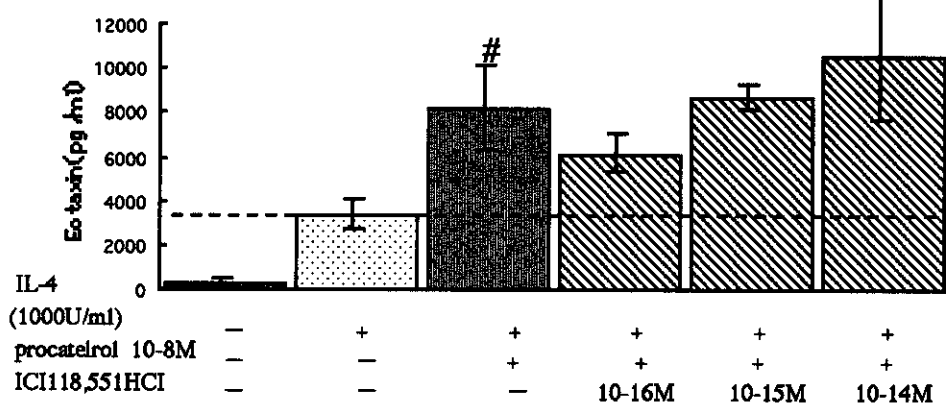
* P value < 0.05 (as compared to IL4 plus β -antagonist-treatment)
n=4

Fig.4A Effect of β -antagonists on salbutamol induced eotaxin production by IL4-treated-fibroblasts

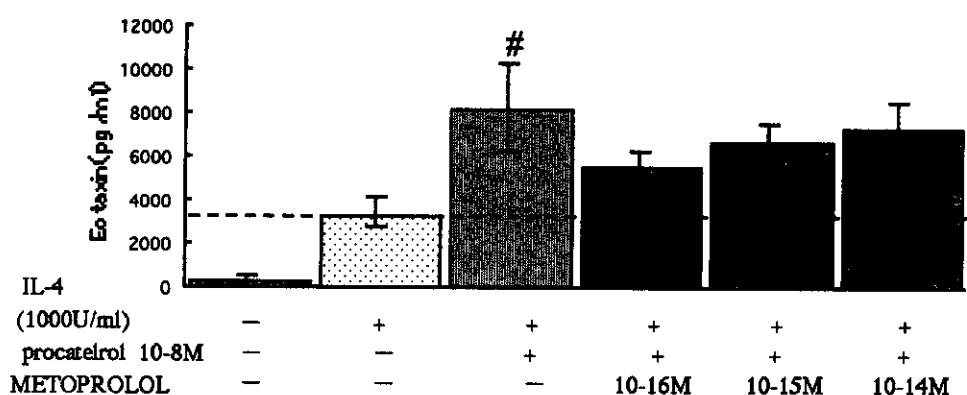
β 2+1-antagonists



β 2-antagonists



β 1-antagonists



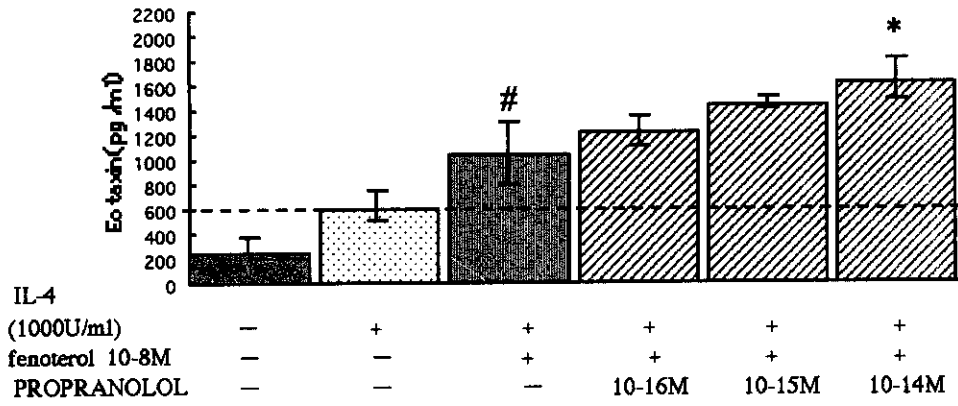
[#] P value < 0.05 (as compared to IL4-treatment)

^{*} P value < 0.05 (as compared to IL4 plus β -antagonist-treatment)

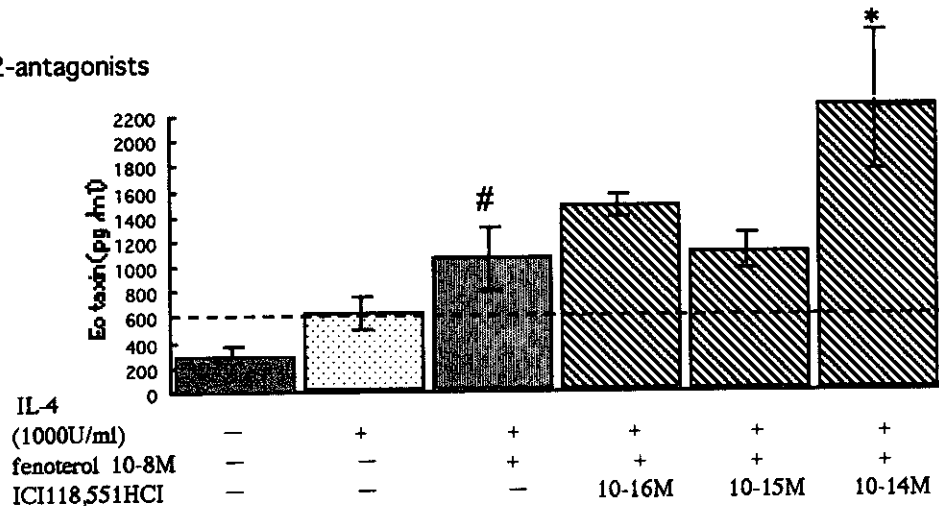
n=4

Fig.4B Effect of β -antagonists on procaterol-induced eotaxin production by IL4-treated fibroblasts

β 2+1-antagonists



β 2-antagonists



P value < 0.05 (as compared to IL4-treatment)

* P value < 0.05 (as compared to IL4 plus β -antagonist-treatment)

n=4

Fig.4C Effect of β -antagonists on fenoterol-induced eotaxin production by IL4-treated fibroblasts

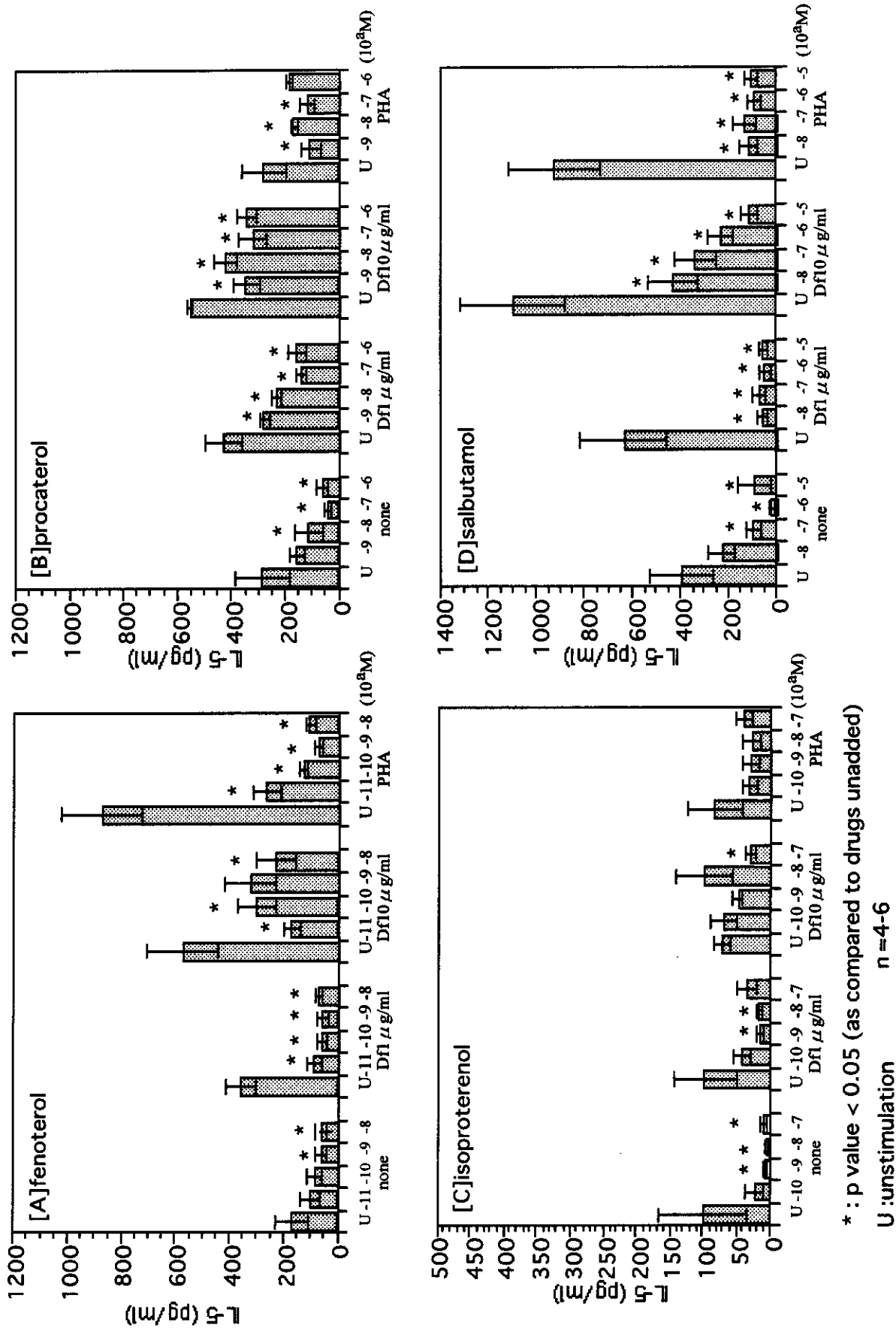
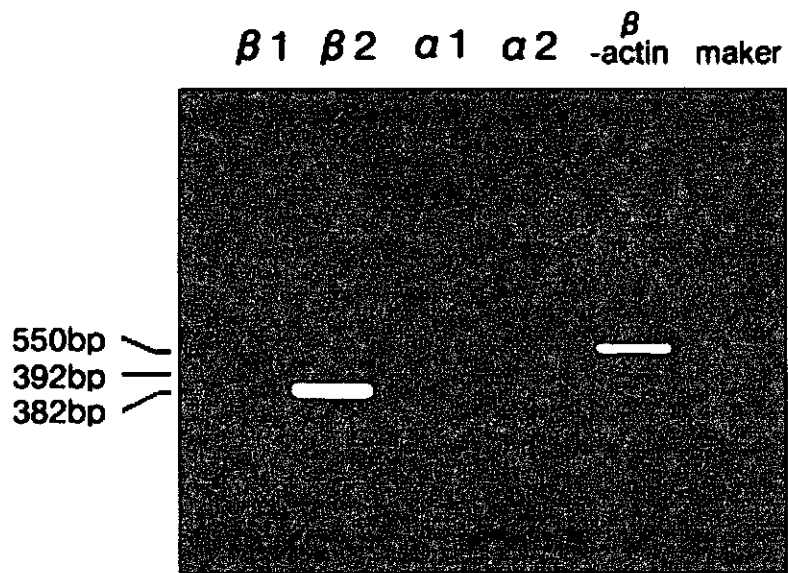


Fig.5 Effect of beta2 agonists on IL-5 production by lymphocytes

A Lymphocytes



B Fibroblasts

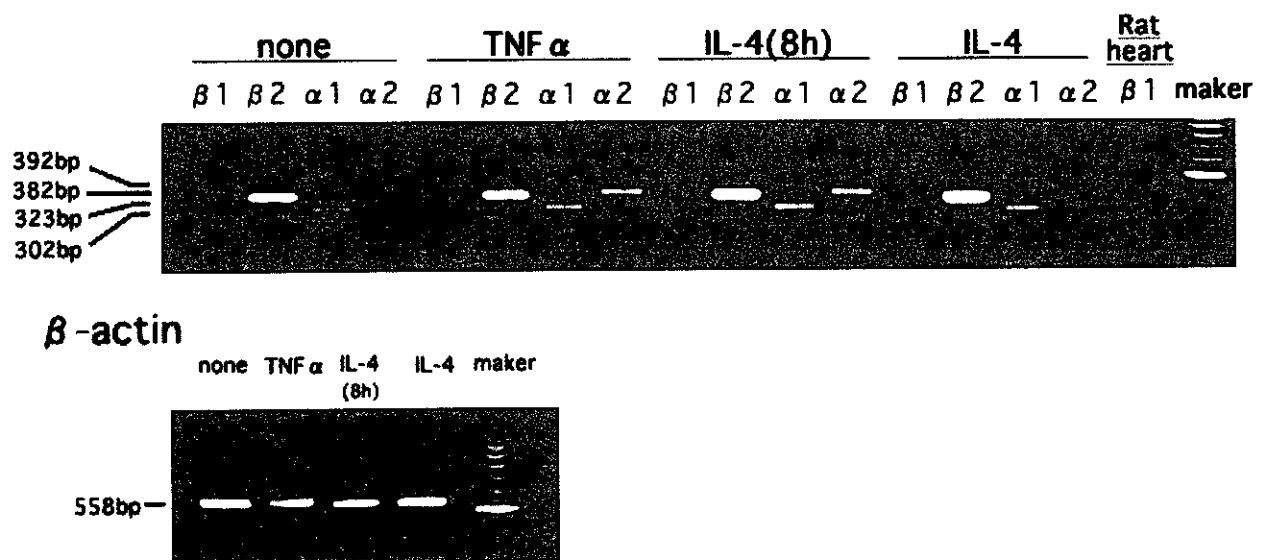


Fig.6 Expression of mRNA for α and β adrenoceptors

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
分担研究報告書

各種 $\beta 2$ 刺激薬のスーパーオキシド 産生抑制に関する研究

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：フェノテロール、サルブタモール、プロカテロールのヒト好中球からのスーパーオキシド (O_2^-) 産生抑制作用を比較した。フェノテロールは、FMLP、PMA 刺激による O_2^- 産生をともに高濃度において有意に抑制したが、サルブタモール、プロカテロールは FMLP による刺激を部分的にのみ抑制し、PMA に対しては抑制しなかった。サルブタモール、プロカテロールによる抑制は非特異的な $\beta 2$ 遮断薬である propranolol あるいは $\beta 2$ 特異的遮断薬である ICI-118551 により完全に消失した。一方、FMLP による O_2^- 産生に対するフェノテロールの抑制効果はこれらの遮断薬により部分的に消失したのみであった。また PMA 刺激による O_2^- 産生に対するフェノテロールの抑制効果は、これら β 遮断薬の前投与によっても消失しなかった。フェノテロール、サルブタモール、プロカテロールとも O_2^- のスカベンジャー効果はなかった。このことから特に高濃度のフェノテロールは $\beta 2$ 受容体を介さない O_2^- 産生の抑制効果を有することが示唆され、その機序として protein C に対する直接的な抑制か、その下流の部位における抑制が示唆された。フェノテロールのこの活性が喘息発作時のこの薬物の過剰使用による死亡に関与している可能性もあるが、この点に関しては今後の検討が必要である。

研究協力者：

徳山研一	群馬大学医学部小児科講師
加藤政彦	群馬大学医学部小児科助手
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

A. 研究目的

吸入 $\beta 2$ 刺激薬の定期吸入（レギュラユース）が喘息管理を逆に悪化させ、気道過敏性を亢進させる可能性が報告されているが結論は得られていない。このような相反する結果が得られる原因の 1 つは、検討対象である $\beta 2$ 刺激薬の種類によって作用が異なるため相反する結果が得られる可能性がある。

我々は昨年度までの本研究のプロジェクトにおいて、2 種類の $\beta 2$ 刺激薬、即ちフェノテロールとプロカテロールを長期反復曝露し、気道過敏性と気道の形態学的変化について検討してきた。その結果、2 種類の $\beta 2$ 刺激薬とも気道過敏性は亢進させなかったが、形態学的に気道の外膜層を用量依存性に有意に肥厚させた。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、プロカテロール曝露群では統計学的に有意に軽微であり、 $\beta 2$ 刺激薬はその種類により、気道の構成細胞あるいは炎症細胞に対する作用が異なる可能性が示唆された。

今回我々はその仮説のもと、異なった種類の $\beta 2$ 刺激薬が、気道における重要な炎症細胞である好中球や好酸球からのスーパーオキシド産生をどのように抑制するか比較検討した。即ち、好中球や好酸球

はフリーラジカルやトロンボキサンあるいはロイコトリエン C4 を遊離することにより、気道過敏性や気道炎症を惹起することが示唆されている。このうちフリーラジカルは、肥満細胞のみならず、好酸球、好中球、マクロファージなどの炎症性細胞から発生する過剰の活性酸素であり、気道炎症の拡大や細胞および組織傷害に関与していると考えられている。活性酸素あるいは活性酸素種 (active oxygen または active oxygen species) は、大気を構成する通常の酸素より活性化された酸素とその関連化合物をいう。フリーラジカルとはこのうち不対電子を持った原子や分子をさす。通常、電子は対になって存在し安定した状態にあるのに対し、不対電子は一般的に不安定で反応性に富んでいる。狭義の活性酸素としては、スーパーオキシド (O_2^-)、過酸化水素、ヒドロキシラジカル、一重項酸素の 4 種が知られているが、フリーラジカルは、スーパーオキシドとヒドロキシラジカルの 2 つである。活性酸素、フリーラジカルの生体内標的分子としては、脂質、核酸、リン、蛋白質などが知られているが特に、すべての細胞膜の脂質中に存在する高度不飽和脂肪酸は、これらの活性酸素、フリーラジカルにより攻撃され有害な過酸化脂質を生成し、細胞、組織傷害を増強させると考えられている。

実際我々は、喘息児において薬物を用いた気道過敏性の程度と好中球からのフリーラジカル、特にスーパーオキシド産生が相関すること、喘息発作時ではその産生量が増加すること、などを報告している。 $\beta 2$ 刺激薬は炎症細胞からのフリーラジカルの産生を一般に抑制することが知られるが、その種類によって抑制効果が異なり、逆に産生を増強する可能性もある。その理由としては、個々の $\beta 2$ 刺激薬の $\beta 2$ -受容体刺激の選択作用の違いに加え、 $\beta 1$ -受容体刺激作用の相違、あるいは β -受容体を介さない薬理学的作用の存在などが示唆されるからである。このため、個々の $\beta 2$ 刺激薬の抗炎症作用を各薬剤間で比較することは、各薬剤の薬理学的特性を知り、喘息治療上の位置付けを検討する際に重

要と思われる。

B. 方法

(1) ヒト好中球からのスーパーオキシド産生に対する $\beta 2$ 刺激薬による抑制：

1) 好中球の分離

インフォームドコンセントを得たのち、健常成人より末梢血をヘパリン加シリンジにて採取した。血液を 5 ml の polymorphprep 上に重層し、4℃にて 30 分、400 x g にて遠沈し、好中球を得た。得られた好中球のバイアビリティはすべての実験で 97% 以上であった。

2) スーパーオキシド産生能の測定

O_2^- 産生能の測定には、 O_2^- に特異的に発光するウミホタル・ルシフェリン誘導体 (2-methyl-6-(p-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one; MCLA) 依存性の化学発光法により測定した。刺激剤としては、phorbol myristate acetate (PMA), N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) を用いた。MCLA 依存性の化学発光は、光電子倍增管による全波長検出器、Luminescence Reader (アロカ社、BLR-102) を用いて測定し、PMN からのスーパーオキシド産生能は最大発光強度 maximum light intensity で表した。好中球を一定時間各種 $\beta 2$ -刺激薬とインキュベーションした後、発光物質である MCLA さらに FMLP、PMA などの刺激剤を添加し、各種 $\beta 2$ 刺激薬の抑制効果の差異を検討した。

3) 用いた $\beta 2$ 刺激薬

フェノテロール、サルブタモール、プロカテロールをそれぞれ蒸留水にて希釈し、 10^{-9} から 10^{-5} の濃度の間で用いた。

4) $\beta 2$ 刺激薬のスカベンジャー作用の検討

2×10^{-7} の MCLA、 5×10^{-5} の hypoxanthine ならびに 6.5 単位の xanthine oxidase (XOD) に各種 $\beta 2$ 刺激薬

を加えることにより、フェノテロール、サルブタモール、プロカテロールのスーパーオキシドに対するスカベンジャー作用を検討した。

(2) ヒト好酸球からのスーパーオキシド産生に対する抑制：

ヒト好酸球を human serum albumin (HSA) でコートしたチューブ上で血小板活性化因子 (PAF) 刺激によるスーパーオキシド産生を測定した。スーパーオキシド産生は、ウミホタル・ルシフェリン誘導体依存性の化学発光法を用いる。以上の反応における β 刺激剤 (フェノテロール、サルブタモール、プロカテロール) の抑制効果の差異を検討した。

C. 結果

(1) ヒト好中球からのスーパーオキシド産生に対する $\beta 2$ 刺激薬による抑制：

1) FMLP 刺激によるスーパーオキシド産生に対する抑制効果

フェノテロールは $10^{-9}M$ から有意な抑制効果を認めた (約 25%)。その抑制効果は用量依存性に増強し、 $10^{-5}M$ では約 80% となった。サルブタモールおよびプロカテロールによる抑制は $10^{-8}M$ から有意であった。 $10^{-5}M$ における両薬物の抑制率はともに約 50% で、フェノテロールに比べ部分的抑制であった。

サルブタモールおよびプロカテロールによる抑制効果は非特異的な $\beta 2$ 遮断薬である propranolol あるいは $\beta 2$ 特異的遮断薬である ICI-118551 により完全に消失した。一方、FMLP によるスーパーオキシド産生に対する $10^{-6}M$ より濃い濃度のフェノテロールの抑制効果はこれらの遮断薬により部分的に消失したのみであった。

2) PMA 刺激によるスーパーオキシド産生に対する抑制効果

フェノテロールは $10^{-7}M$ 以下の濃度では有意な抑制効果を認めなかったが、 $10^{-6}M$ から $10^{-5}M$ では用量依存性に抑制し、

$10^{-5}M$ では約 60% となった。一方、サルブタモールおよびプロカテロールは $10^{-5}M$ の濃度においても有意な抑制は認めなかった。

PMA 刺激によるスーパーオキシド産生に対するフェノテロールの抑制効果は、これら β 遮断薬の前投与によっても全く減弱しなかった。

3) $\beta 2$ 刺激薬のスカベンジャー作用の検討

フェノテロール、サルブタモールおよびプロカテロールともスーパーオキシドのスカベンジャー効果はなかった。

(2) ヒト好酸球からのスーパーオキシド産生に対する抑制：

PAF 投与により HSA に接着した好酸球は、一過性のピークに続く、より大きな遷延する相からなる 2 相性のスーパーオキシド産生を示した。フェノテロールは、スーパーオキシド産生の第 1, 2 両相をほぼ完全に抑制した。一方、サルブタモールおよびプロカテロールは、第 1, 2 両相ともに部分抑制であった。またフェノテロールは、PMA 刺激によるスーパーオキシド産生を部分抑制したが、サルブタモールおよびプロカテロールは抑制しなかった。

D. 考察と結論

フェノテロールは full agonist であり、サルブタモールおよびプロカテロールは partial agonist である。このため今回我々はそれぞれの agonist によるスーパーオキシド産生抑制作用を比較し、抑制作用の相違についても検討した。その結果、フェノテロールは FMLP および PMA 刺激によるスーパーオキシド産生をサルブタモールやプロカテロールよりも協力に抑制した。フェノテロールのこの抑制作用は非特異的な $\beta 2$ 遮断薬である propranolol あるいは $\beta 2$ 特異的遮断薬である

ICI-118551により完全に消失しなかった。このことから、フェノテロールによるスーパーオキシド産生抑制効果は一部分 $\beta 2$ 受容体を介さないメカニズムを含む可能性が示唆された。

FMLPとPMAは互いに異なる経路を介して炎症細胞からのスーパーオキシド産生を惹起することが知られる。即ち、FMLPはその受容体刺激によりG蛋白を介して、phospholipase C (PLC)を活性化する。その結果、2つのセカンドメッセンジャーである、inositol 1,4,5-triphosphateとdiacylglycerolを産生する。これらのメッセンジャーは細胞内カルシウムの上昇とPKCの活性化を惹き起こし、NADPHなどのスーパーオキシド産生酵素を活性化する。一方、PMAは直接PKCを活性化する物質である。 $\beta 2$ 刺激薬はG蛋白を介して、adenylate cyclaseを活性化し、細胞内cyclic AMPを増加する。cyclic AMPはPKAを活性化し、PLC活性を抑制する。今回の検討でフェノテロールのFMLP刺激によるスーパーオキシド産生抑制効果の一部は $\beta 2$ 受容体を介さないことが示唆された。その機序としてはprotein Cに対する直接的な抑制か、その下流の部位における抑制が示唆された。フェノテロールのこの薬理的活性が喘息発作時のこの薬物の過剰使用による死亡に関与している可能性もあるが、この点に関しては今後の検討が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mirza ZN, Kato M, Kimura H, Tachibana A, Fujiu T, Suzuki M, Mochizuki H, Tokuyama K, Morikawa A. Fenoterol inhibits superoxide anion generation by human polymorphonuclear leukocytes via $\beta 2$ -adrenoceptor-dependent and -independent mechanisms. *Ann Allergy Asthma Immunol* (in press).

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

定量噴霧式吸入器を臨床適用する際には、薬剤粒子の粒子径分布や粒子密度などの基礎物性のみならず、呼吸と同期させた吸入法の検討が必要である。ここでは、数値解析モデルにより薬剤沈着率を推算して定量噴霧式吸入器の総合的評価を行った。その結果、気道内での薬剤局所沈着量は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。一方、定量噴霧式吸入器を臨床使用する際に、剤形に強く依存して製剤ごとに吸入の仕方が異なるという点や、薬剤タゲッティングという面からも到達すべき部位に本当に必要な量の薬剤が投与できているのかが明確でない点など、吸入手法や製剤上のさまざまな問題を指摘した。これらの問題点を解決するためには、呼吸と同期するモジュールを検討して吸入方法や定量噴霧式吸入器の製剤設計を標準化する必要があると考えられ、定量噴霧式吸入器々の解析結果から吸入条件や薬剤物性などを総合的に評価して標準化の科学的根拠を明らかにした。

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た。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。さらに平成12年度の研究報告では、代替フロンpMDIsの開発に平行して使用されてきたドライパウダー吸入剤(DPIs)による吸入療法の問題点を明らかにした。

しかし、いずれの定量噴霧式吸入器においても吸入手法の最適化が求められており、吸入療法の標準化が必要となってきた。すなわち、気道内での薬剤局所沈着量は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からである。そこで本研究では、試作した呼吸同期モジュールを用いて呼吸定量噴霧式吸入療法の標準化を検討するとともに、吸入療法における定量噴霧式吸入器の有効な使用法を提案することを研究目的とした。

B. 研究方法

気道局所における吸入剤の測定には、薬剤粒子の空気力学径の直接測定として飛行時間法(TSI社)、また平均的な薬剤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)を採用した。ここで、気道内での薬剤粒子沈着率は薬剤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、また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

吸入剤における薬剤粒子沈着率を高める手法として、薬剤粒子径だけではなく薬剤粒子密度や吸入流量などを要因とする最適化を検討した。その結果、薬剤粒子沈着率は空気力学径を基準とする因子により推算できること、また β 刺激薬やステロイド薬のように気管・細気管支領域への薬剤粒子の局所投与を考える場合には1回換気量が少ないほど気管・細気管支領域への薬剤粒子の到達度は向上した。さらに、試作した呼吸同期型モジュールを使用すること

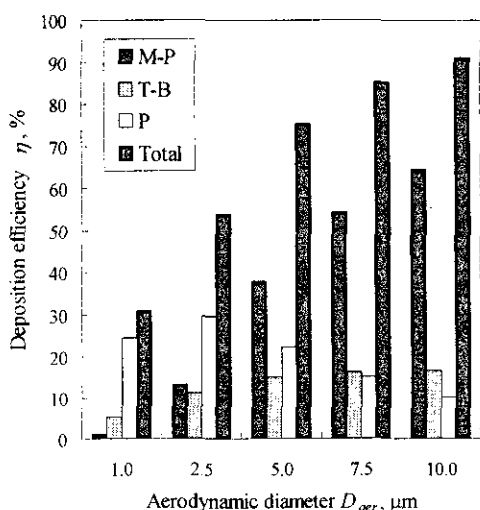
によって所期の空気力学径をもつ薬剤粒子を分離し吸入制御できることなど、安静時呼吸条件化における薬物吸入療法が有効であることを実験的に明らかにした。

(倫理面への配慮) 特に無し

D. 考察

ここでは、モジュールを使用した場合の薬剤粒子の気道内局所沈着率を考察した。まず、成人で口呼吸をする場合に、1回換気量を500~2000mlと変化させたときの薬剤の空気力学径とその局所沈着率の関係を調べた。例えば、空気力学径が5 μ mの場合に、1回換気量が多くなるほど、口・喉頭および肺胞領域への薬剤到達度が著しく増加し、逆に気管支領域への薬物到達度は減少した。このように、気管支への薬剤タゲティングを考えると自然呼吸状態での薬剤吸入が、気管支領域への薬剤到達度を最も有効にし、さらに吸入のコンプライアンスを高めるという意味からも必要であると考えられる。

つぎに、口・喉頭、気管支、ならびに肺胞領域への薬剤到達度を調べた。これは小児の場合であるが、成人の場合と同様に自然呼吸状態での薬剤吸入が望ましいことがわかった。また吸入剤の空気力学径分布はできるだけ狭い方が気管支領域への薬剤到達度は上昇した。一方、市販の薬剤での比較結果から、薬剤到達度はサルブタモールでは有意に高く、フェノテロールおよびイソプロテロールではほぼ同等に低い値を示すことが明らかにされた。解析結果から、小児の気管支領域での薬剤到達度は成人の場合より高い値であり、定量噴霧式吸入器を小児に使用させるときに注意が必要であるとの知見を得た。



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 15min⁻¹, and geometric standard deviation 2.0).

さらに、薬剤粒子沈着メカニズムから、1回換気量が多い場合には、口頭および咽頭などの上気道だけではなく同時に肺胞への薬剤粒子沈着量が増加する。したがって、 β 刺激薬やステロイド薬の気管・細気管支への局所投与では、これらの領域への薬剤粒子の到達度を高めるために、安静時呼吸条件によって、気管・細気管支領域へ到達する所期の空気力学径をもつ薬剤粒子を特定でき製剤設計上でも有利であり、しかも吸入方法を標準化できると判断される。

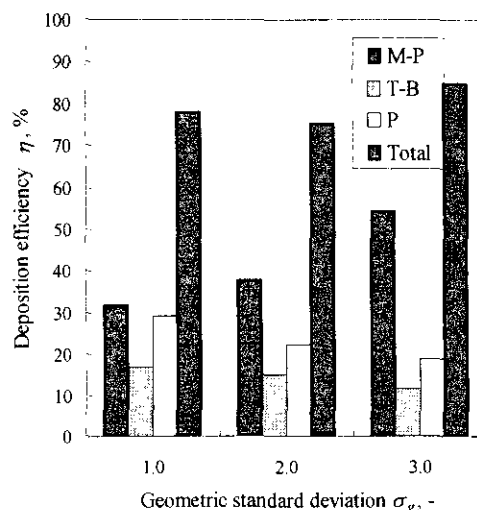
E. 結論

薬物吸入療法では、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1回換気量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。特に、喘息治療における定量噴霧式吸入器による治療では、 β 刺激薬やステロイド薬のように細気管支領域への薬剤粒子の直接的局所投与が必要であり、呼吸同期型モジュールを用いた安静時呼吸条件下での薬剤粒子吸入によりこの目的が達成できるとの結論を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 松永真由美, 河合房夫, 宮地栄一, 三輪正人, 平野光芳, 内藤健晴, 高野 頌: クロライドチャンネルに対するステロイドの効果, 日本鼻科学会会誌, 2001, Vol. 40, pp. 34-36.
- 2) 西城隆一郎, 間島雄一, 兵 昇, 国貞智弘, 阿部武史, 高野 頌: 術後上顎洞筋骨洞へのエアロゾル沈着の検討—鼻・副鼻腔モデルを用いて—, 耳鼻咽喉科展望, 2001, Vol. 44, pp. 38-43.



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, and respiratory frequency 15min⁻¹, aerodynamic diameter 5.0 μ m).