

が、あまり低濃度であると十分な効果が得られない可能性がある。

現在、テオフィリンは RTC 療法の形で使用されることが多い。その目的は気道炎症を完全に鎮静化させることにより気道過敏性の低下を期待するものであり、“ゼロレベル作戦”と呼ばれている。本研究の結果、テオフィリンには炎症細胞のみでなく、それらをコントロールする Th2 細胞の機能まで抑制する免疫調節作用のあることが示され、ゼロレベル作戦に最も適した薬剤の一つであることが証明された。今後はこのような根拠に基づいてさらに効果的な使用方法についての研究がなされるべきである。

#### E. 結論

テオフィリンは治療域の濃度でもダニ刺激による IL-5 や IL-13 などの Th2 サイトカイン産生を抑制することが明らかになった。これはテオフィリンが喘息の予防薬や長期管理薬として有用

であることを示す根拠となるものである。さらにサイトカイン産生抑制は速やかに発現するため、急性発作の治療にも有用であることが示唆される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表：

○ M Kimura, I Okafuji, T Yoshida.  
Theophylline suppresses IL-5 and IL-13 production, and lymphocyte proliferation in asthmatic children.  
(投稿中)

##### 2. 学会発表：

○ 木村光明、岡藤郁夫、吉田隆實.  
治療域濃度のテオフィリンによるダニ特異的 IL-5 産生の抑制. 第 14 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (平成 14 年 3 月 21~23 日、横浜)

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

図1. テオフィリンによるIL-5およびIL-13産生の抑制

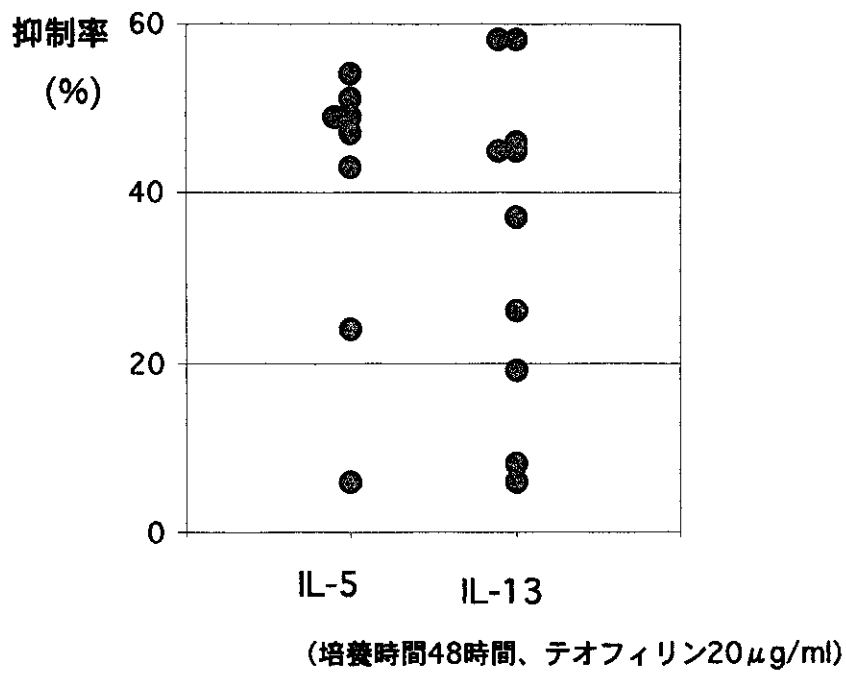
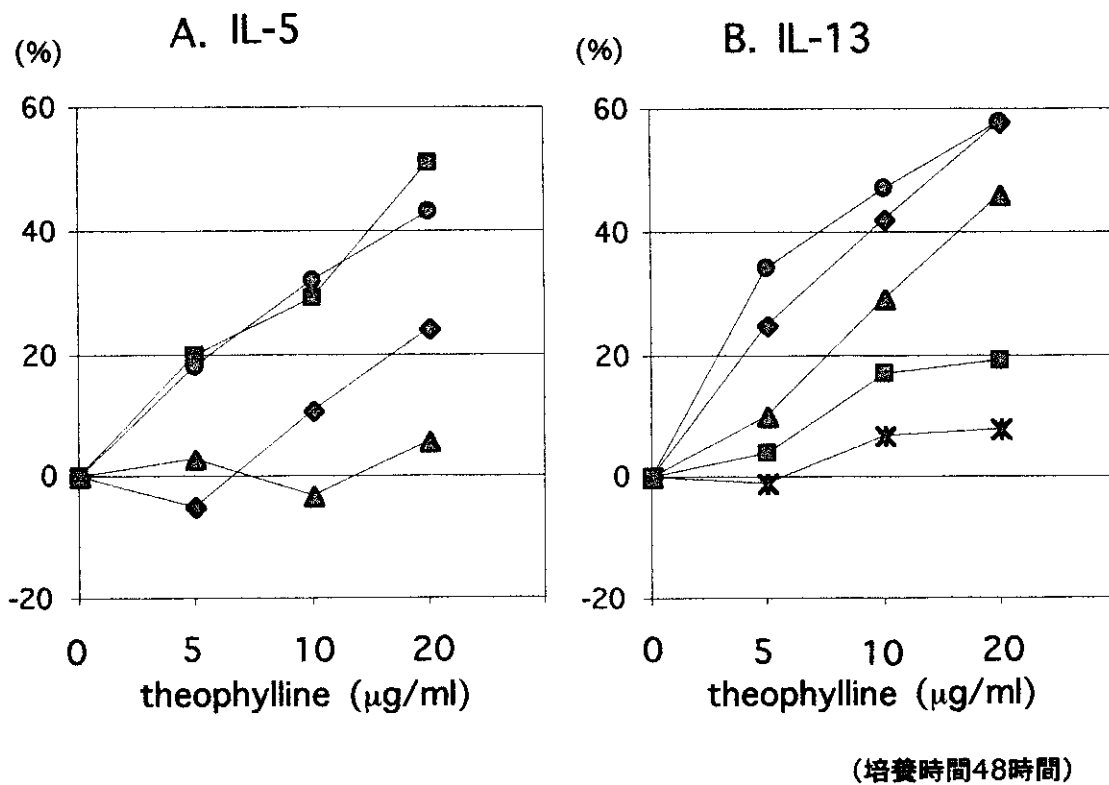


図2. テオフィリン濃度とIL-5およびIL-13産生の抑制との関係



## 乳幼児のステロイドに関する研究

分担研究者 西牟田敏之 国立療養所下志津病院長

乳幼児の喘息治療薬として、ステロイド薬の有効性と安全性を検討した。急性増悪時の全身投与の検討は、研究協力者施設に発作入院した0～5歳の喘息患者で、アミノフィリン持続点滴と通常の $\beta$ 刺激薬吸入に反応が悪く、Wood score 3～6点を呈するため低用量アスプールの持続吸入を実施した症例につき、無作為にプレドニゾロン注射液3mg/kg/dayを使用群と、未使用群とに振り分け、プレドニゾロンの上乗せ効果を検討した。その結果、使用群ならびに未使用群のWood scoreの改善には差がなく、点滴日数、入院日数にも有意差はなく、プレドニゾロンの上乗せ効果は認められなかった。長期管理薬としての吸入ステロイド薬の乳幼児に対する有用については、DSCG+ $\beta_2$ の定時吸入をしても発作入院を繰り返していた、6ヵ月～3歳迄の中等症以上の喘息患者24名に対し、吸入補助具(ベビーヘラー)によりベクロメタゾン100～600 $\mu$ g/dayの定時吸入を行い、使用前と使用後の発作点数を比較検討した。BDP吸入開始後2週間で発作点数の有意な改善があり有用性が確認されたが、数症例についてはほとんど改善がみられず、吸入手技の問題も大きいと考えられた。開始時のBDP吸入量が100～200と300～600 $\mu$ g/dayの2群の比較では、使用後4週間以降では高用量群に発作点数の低下傾向が認められた。

### 研究協力者

向山徳子 (同愛記念病院小児科部長)  
小田嶋博 (国療南福岡病院小児科医長)  
井上壽茂 (住友病院小児科部長)  
青柳正彦 (国療下志津病院アレルギー科医長)

### A. 研究目的

経口ステロイド薬はともかくとして、注射によるステロイド薬全身投与は、以前は急性増悪時の救命的役割として位置付けられていたが、現在では気管支喘息の重症発作時の治療として、ステロイド薬の全身投与が一般的になされるようになり、さらに最近ではテオフィリン薬の使用が手控えられる風潮もあり、必然的にその使用時期が早まる傾向もあるように思われる。しかし、急性呼吸不全状態時は別として、重症発作時に注射で用いる全身ステロイド薬が、症状の改善にどれだけ役立っているのかという客観的評価は十分とはいえない。まして、乳幼児に対する至適用量や用法に関しては経験的に設定されており、その根拠については実証に乏しい。一方、ステロイド薬の局所投与による気管支喘息長期管理については、抗炎症作用によりその有用性が評価され、ガイドラインにも確たる位置付けがなされている。しかし、わが国で使用が可能な剤形(定量噴霧式吸入器:MDIと略)による吸入ステロイド薬治療が、乳幼児ことに乳児喘息患者にどれだけ有効性があるのか、また、副作用の視点を考慮した安全かつ有効な使用量をどこに設定すべきかなどについては、検討が不十分である。このような実態をふまえ、乳幼児喘息患者に対する急性増悪時における全身ステ

ロイド投与ならびに、吸入ステロイド薬による長期管理に関する科学的根拠を提示することを目的としている。

### B. 研究方法

(1) 急増悪時の全身投与: 研究協力者施設に発作入院した5歳以下の喘息患者で、ジェットネブライザーによる通常の $\beta_2$ 刺激薬吸入治療およびアミノフィリン持続点滴療法に反応が悪く、急性呼吸不全の判定に用いるWood scoreで3～6点を呈し、低用量アスプールの持続吸入(0.5%アスプールの吸入液2Mlを生理的食塩水400Mlに混じ、インスピロンネブライザーを用いて酸素流量10l/分で、フェイスマスクにより持続吸入する方法)を実施した症例を、プレドニゾロン(以下PSL)注射薬使用群(3mg/kg/day 分3、3日間投与)と未使用群の2群に無作為に振り分けた。持続吸入に対するPSLの上乗せ効果を、心拍数、呼吸数、Wood scoreを経時的に観察し、両群の指標の推移を比較することによって評価した。臨床効果は、Wood scoreが2に改善する迄の時間、アスプールの持続吸入が中止されるまでの時間、点滴日数、入院日数を指標として、両群の有意差を検討し判定した。

(2) 長期管理薬としての吸入ステロイド薬: 研究協力者施設で治療管理中の乳幼児喘息患者(6ヵ月～3歳)で、クロモグリク酸ナトリウム(以下DSCG)+サルブタモール吸入を施行していても入院を繰り返している中等症以上の症例に対して、プロピオン酸ベクロメタゾン(以下BDP)100～600mg/dayを補助具としてベビーヘラーを用い、分2

で定期吸入を施行した。投与前の観察期間4週間と、投与後8週間の発作状態を喘息日記に記録し、両期間の2週間毎の発作点数累計の推移を検討した。発作点数は、咳嗽0.5点、小発作3点、中発作6点、大発作9点とし、1日の内で最大の発作に相当する点数を採用した。副作用の観察のために、1回/月の身長計測と、BDP吸入開始前と吸入後の口腔内カンジダ培養検査を行った。

## C. 研究結果

### (1) 急性増悪時のPSLの効果

表1にPSL使用群、未使用群の臨床背景比較を示した。症例数は使用群13例(男8, 女5)、未使用群12例(男6, 女6)であった。年齢、重症度およびアスプルー開始時のSpO<sub>2</sub>、心拍数、呼吸数、Wood score等において両群間で差を認めなかった。感染合併は使用群で8/13、非投与群では7/12で差を認めなかった。アスプルー持続吸入開始前のWood scoreは、PSL投与群(4.8±0.8)、非投与群(4.7±0.5)であり、SpO<sub>2</sub>は前者90.5±2.8、後者91.6±2.4で両群間に有意差はなく、通常の治療にもかかわらず大発作状態が持続する症例であった。また、両群の心拍数、呼吸数にも有意差が認められなかった(表2)。図1に治療開始後のWood scoreの経時的変化を示した。両群とも治療開始後速やかにscoreが低下し、最初の12時間までに著しい改善が認められた。24時間でのscoreは未使用群で改善が劣るように見えるが、両群間に有意差はなかった。心拍数、呼吸数については使用群において未使用群より早い減少効果が認められた。一方、Wood scoreが2点に改善するまでの時間は、使用群12.5±6.8、未使用群13.9±12.3であり、アスプルー吸入持続時間についてはそれぞれ36.5±14.5、30.8±12.3、アミノフィリン持続点滴日数は4.2±1.6、4.0±1.4であり、入院日数も6.5±1.8、6.2±1.3で、改善状態を反映する各パラメーターに関して両群に有意差を認められなかった(表3)。

### (2) 吸入ステロイド薬による長期管理の効果

対象者24例のBDP吸入開始時の月齢は7~42ヵ月で、24ヵ月未満が11例、24~42ヵ月が13例で、平均24.4ヵ月であった。性別は男17例、女7例、入院の既往が有る者は22/24(91.7%)、過去の発作入院時にステロイド薬の全身投与を要した者は18/24(75%)、急性呼吸不全歴がある者が6/24(25%)であり、重症度内訳は中等症5例、重症19例であった。長期管理薬の使用状況としては、テオフィリ

ン薬が23/24(95.8%)、DSCG吸入液単独は2/24(8.3%)、DSCG+β<sub>2</sub>は22/24(91.7%)であった。全員ベビーヘラーの使用によりBDP吸入を行ったが、初期吸入量の設定は統一されておらず、1日使用量が100μg:1例、150μg:1例、200μg:15例、300μg:1例、400μg:4例、600μg:2例であった。ほとんどの症例において吸入開始後2週間で発作点数の有意な改善が認められ、その後8週目まで発作点数は徐々に改善していく傾向を示した(図2)。しかし、数症例についてはほとんど改善が認められず、これらの症例においては吸入手技に問題があると思われた。BDP初期設定量に関しては、100~200μg/day(低用量群)と300~600μg/day(高用量群)では、開始2週間での両群の改善は同等であったが、4週以降になると高用量群の方が発作点数の低下傾向が認められた(図3)。表4に2群の背景比較を示したが、200μg/day以下群はBDP吸入を開始した月齢が若く、以前の発作入院時において全員ステロイド全身投与歴があり、呼吸不全歴が6/17(35.3%)に認められ、300~600μg/day群より重症傾向にあり、BDP開始前の発作点数も高いことが、低用量群の効果に影響していると考えられた。

開始年齢が2歳未満群と2,3歳群のBDP開始後の発作点数推移の比較を図4に示した。表5に示した両群の背景比較では、重症者割合、ステロイド全身投与歴、入院歴等はほぼ同等であり、開始時のBDP吸入量は前者292μg/ml、後者232μg/mlで前者に高かった。2週目以降の発作点数の改善は、2歳未満群で悪い傾向を認めた。経過観察中において、口腔内カンジダ症は認められなかった。

## D. 考察

### (1) 急性増悪時のPSLの効果

昨年度の本研究において、0~5歳の乳幼児喘息患者でテオフィリン薬と十分なβ刺激薬投与に反応が悪かった39症例(Wood score3~7)についてレトロスペクティブに検討したところ、PSL注射薬使用群18例(score平均4.0)、未使用群23例(score平均3.2)のscore改善比較では、前者においてscore平均が高いとはいえ、両群の経時的なscoreの改善は平行しており、PSL使用群において改善が早まる傾向はなく、呼吸不全時は別として、通常大発作時におけるPSLの効果は疑問視された。そこで、PSLの効果のプロスペクティブに検討するために、アミノフィリン持続点滴と十分なβ<sub>2</sub>刺激薬吸入に反応しなかった27症例(Wood score3~6)に低用量アスプルー持続吸入を施行し、持続吸入単独群13例(score平均4.3)と、持続吸入にPS

11mg/kg/dayを上乗せした群14例(score平均4.6)の2群の改善を比較したが、この結果においても、PSLの上乗せ効果は認められなかった。

昨年度の低用量アスプールの持続吸入に対するPSL上乗せ効果の結果からは、2つの疑問が提起される。一つは、上乗せされたPSL使用量が十分であったか否かという疑問である。もう一つは、重症発作時の治療としては、PSL投与よりも低用量アスプールの持続吸入の方が優れているのではないかという疑問である。そこで第一の疑問に回答を得るため、今回はPSL注射薬量を3mg/kg/dayに増量して、使用群、未使用群の2群比較を行ったが、このPSL使用量でも低用量アスプールの持続吸入に対する上乗せ効果は証明できなかった。PSL1mg/kg/dayと3mg/kg/day使用群及び未使用群における発作点数の推移ならびに効果の比較を図5と表6に示した。Wood scoreの改善はこの範囲のPSL使用量変化には全く関係ないばかりか、アスプールの持続吸入を必要とした期間、入院日数等の短縮にも影響しなかったため、PSLの量的問題ではないと結論した。第二の疑問については、未使用群の改善の仕方がPSL使用群の改善と有意差が認められないことから、この段階の発作治療としては、 $\beta$ 刺激薬の十分量が酸素とともに継続的に投与されれば、PSL全身投与は必要としないことを示唆している。 $\beta$ 刺激薬の投与方法としては、目下のところ低用量アスプールの持続療法が安全性とコストの面で推奨されるが、プロタノール注射液を用いた持続吸入療法も、医療保険適応が認められれば同等の治療と考えられる。

急性呼吸不全のような極めて重症な発作時における救命的治療の場合にはともかく、一般の発作治療において全身ステロイド薬を使用する必要があるのだろうか。GINAのガイドラインでは、極めて早い段階からステロイド薬全身投与をするように設定されているが、乳幼児喘息の急性発作時に、ステロイド薬を投与した方が、適確なテオフィリン薬と十分な $\beta$ 刺激薬を使用した場合より改善を早めるという科学的根拠があるのだろうか。まだ症例数が十分でないので今回は詳細な報告を省いたが、我々は持続吸入を施行せずに、アミノフィリン持続点滴と $\beta_2$ 刺激薬の頻回吸入をベースにして、Wood score3~5点の8症例について、保護者の同意を得て無作為にPSL注射使用群4例と非使用群4例とに振り分け、症状経過よりPSLの効果を検討した。PSL注射薬の投与量は1~2mg/kg/dayで、日本小児アレルギー学会の治療・管理ガイドライン2000の使用より少ない目ではあるが、呼吸器感染合併の認められなかった症例では両群

とも6時間でscore2まで改善したが、感染合併症例ではPSL使用例においても改善は認められず、また、PSLを使用しても1時間での改善は期待できないと考えられた。

このような結果から、乳幼児の気管支喘息急性発作時におけるステロイド全身投与には切札的な効果は期待できず、急性呼吸不全に陥る危険性がある症例では、むしろ低用量イソプロテレンール持続吸入の方が速効性があり効果的であることと、低用量であれば心・循環系に対する副作用の心配もなく安全性もあることから、この方法が推奨されると考えられた。しかし、現実問題として、イソプロテレンール持続吸入療法を実施するには、設備的にはともかくもとしても、実施中の観察、モニタリングを考えると一般診療所では困難であり、実施できる施設が限定されることになる。もともと重症発作時の治療は、喘息治療管理を専門とする診療所以外では限界があり、専門病院に搬送する前に喘息死を防ぐためにステロイド薬の全身投与が行われることは異論のないところであるが、乳幼児に対する注射によるステロイド薬の効果についての科学的根拠がない現状においては、イソプロテレンール持続吸入による治療管理が可能な施設においては、効果がある治療法を優先させるべきであると考えられる。

## (2) 吸入ステロイド薬による長期管理の効果

小児気管支喘息の長期管理における吸入ステロイド薬の位置付けは、中等症持続型のステップ4からの使用となっている。現在のところ、吸入ステロイド薬で小児の適応が認められているものは、MDIによるBDPと、パウダー吸入式のプロピオン酸フルチカゾン(FP)であるが、後者は5歳以下の乳幼児では手技的に使用できないので、乳幼児に使用できるものはMDI式のBDPをベビーヘラーやエアロチャンパー等の吸入補助具を用いた方法に限定される。この度の検討において3歳以下であっても、ベビーヘラーを使用すればBDP吸入効果はあり、有効な治療法であると考えられた。しかし一部患者においては吸入手技上の問題があり、使用効果が期待できない場合があるので、わが国においてもネブライザーで使用できるステロイド吸入液剤の発売が待たれる。

乳幼児を対象としたBDPの吸入量は、幼弱であるが故に有害事象の観点から少量に設定したいところであるが、実際には吸入時のロスを考慮して体重の割りには多めの設定となってしまうのが実態である。200 $\mu$ g/dayの投与量を設定した15例中5例が、1~2カ月で300ないし400 $\mu$ g/dayに増量

していることを考えると、初期投与量は200~300  $\mu\text{g}/\text{day}$ 位が妥当なところではないかと考えられる。しかし、重症・難治症例の場合には、吸入効率も念頭に入れて400~600  $\mu\text{g}/\text{day}$ という高用量の初期量設定を必要とする症例もあると思われるが、この場合には効果のチェックを適確に行い高用量が長引かないように、step downを常に念頭に置いておくことが肝要であろう。年長児においては、BDP 400  $\mu\text{g}/\text{day}$ の使用では身長や副腎機能に対する抑制はないとされているが、乳幼児にそれが適応されるか否かについても観察が必要と思われる。

### E. 結論

(1) 気管支喘息の急性増悪時の治療としてのステロイド薬の効果については、有効性を支持するものと、有効性を疑問視するものがあるが、ほとんどが成人や年長児を対象とした研究であり、乳幼児に対する有効性に関する確たる知見に乏しく、また、投与量や安全性についても科学的根拠は示されていない。今回、5歳以下の乳幼児の急性発作時におけるPSL注射薬の有用性について検討を試みたが、1~3mg/Kg/dayの使用範囲では、急性呼吸不全ではない通常の発作時におけるPSL注射薬の有用性を明らかにすることはできなかった。むしろ、低用量のアスプールの持続吸入の方が速効性に優れ、ステロイド薬の必要性を減じることができるので、小児気管支喘息治療・管理ガイドラインの改訂も考慮して、さらなる検討が必要である。

(2) 乳幼児における吸入ステロイド療法の有効性については、患者の協力が得られれば症状改善に役立つことが実証された。しかし、標的臓器への効率的なデリバリーシステムの問題、安全性と効果を考慮した初期投与量の設定、吸入ステロイド投与群と非投与群の予後調査に基づく中・長期的な効果判定など、今後も継続した科学的根拠となるコントロールスタディが必要である。

表1  
プレドニゾン注射薬使用群と未使用群の臨床背景

	n	男:女	年齢(歳)		重症度			感染合併	
			≤2	3~5	軽症	中等	重症	有	無
使用群	13	8:5	5	8	11	2	0	8	5
未使用群	12	8:4	2	10	9	2	1	7	5

表2

プレドニゾン注射薬使用群、未使用群の治療開始前発作状況

	n	Wood score	心拍数	呼吸数	SpO2
使用群	13	4.8±0.8	148±17	47.2±10.6	90.5±2.8
未使用群	12	4.7±0.5	154±17	45.8±9.0	91.6±2.4

各臨床データに両群間で有意差を認めなかった

図1

プレドニゾン使用群未使用群のWood scoreの経時的変化 (3mg/kg/d)

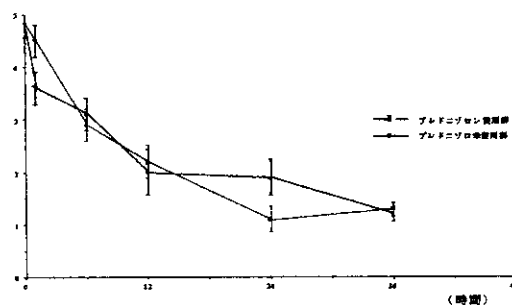


表3

プレドニゾン注射薬の上乗せ効果の検討

	アスプールの持続時間(H)	点滴日数(日)	入院日数(日)	Woodスコア2点までの時間(H)
ステロイド投与(n=13)	36.5±14.5	4.2±1.6	6.5±1.8	12.5±6.8
ステロイドなし(n=12)	30.8±12.3	4.0±1.4	6.2±1.3	13.9±12.3

\*両群で各パラメーターにつき、改善に要する時間に有意な差はなかった

図2

吸入ステロイド薬使用前後での発作点数の推移 (n=24)

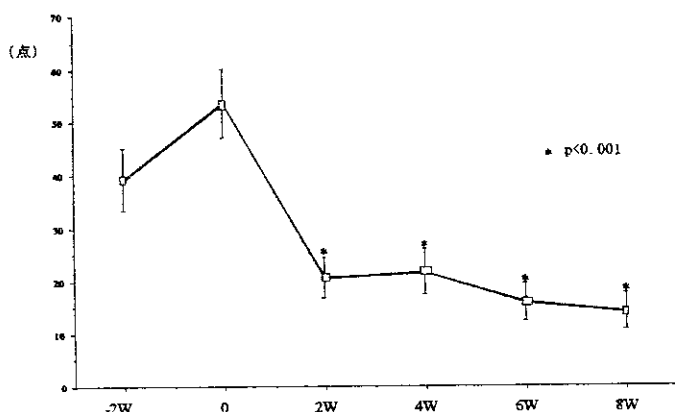


図3

吸入ステロイド薬使用前後での発作点数の推移用量別

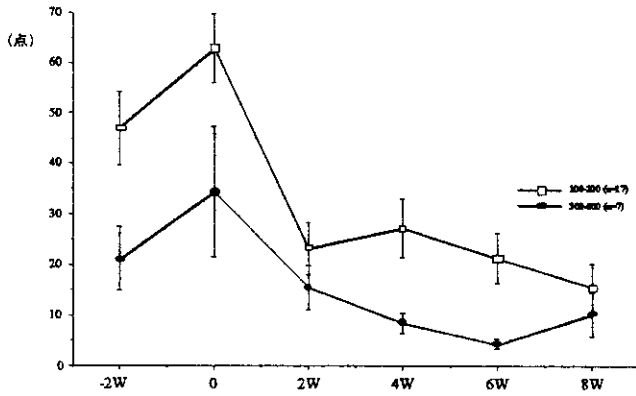


図4

吸入ステロイド薬使用前後での発作点数の推移(年齢別)

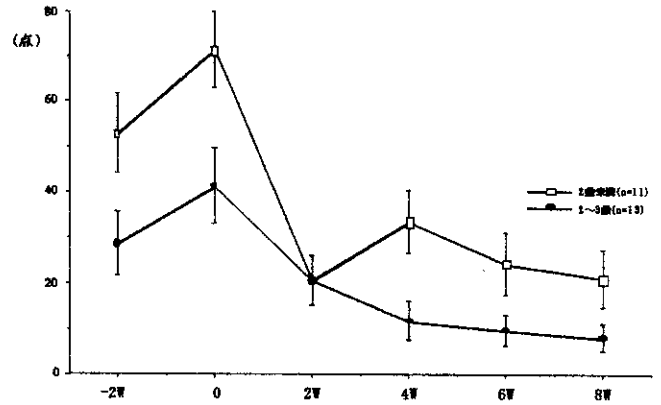


表4

200 µg/d以下群と300～600 µg/d群の臨床背景

	BDP開始平均年齢	男：女	重症：中等症：軽症	ステロイド全身投与歴あり	入院歴あり	呼吸不全歴あり	DSCG+β	開始時BPP量の平均	IgE平均
200 µg/d以下 (n=17)	22.6ヶ月	13：4	12：5：0	17	16	6	15	191 µg/d	240
300～600 µg/d (n=7)	28.7ヶ月	4：3	4：3：0	1	6	0	7	443 µg/d	168

表5

2歳未満群と2,3歳群の臨床背景

	BDP開始平均年齢	男：女	重症：中等症：軽症	ステロイド全身投与歴あり	入院歴あり	呼吸不全歴あり	DSCG+β	開始時BPP量の平均	IgE平均
2歳未満 (n=11)	14.5ヶ月	10：1	8：3：0	9	10	2	10	292 µg/d	64.7
2,3歳 (n=13)	32.8ヶ月	7：6	8：5：0	9	12	3	12	232 µg/d	349.6

図5

プレドニゾン使用群、未使用群のWood スコアの経時的変化

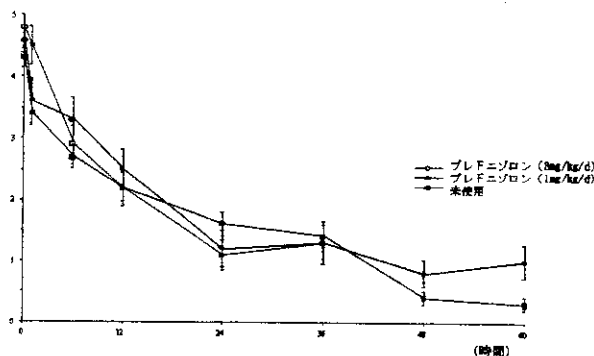


表6

プレドニゾン注射薬の上乗せ効果の検討

	アスプールの持続時間 (H)	点滴日数 (日)	入院日数 (日)	Woodスコア2点までの時間 (H)
3mg/kg/d (n=13)	36.5±14.5	5.2±1.6	6.5±1.8	12.5±6.8
1mg/kg/d (n=14)	36.4±17.7	6.0±1.9	7.3±2.2	16.9±11.7
未使用 (n=28)	37.1±17.1	5.1±1.4	6.4±1.5	15.6±12.3

厚生科学研究補助金（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

気道リモデリングに関与する細胞遊走に関する研究（平成13年度）

分担研究者 庄 司 俊 輔

国立療養所南福岡病院 副院長

### 研究要旨

気管支喘息患者の気道粘膜に生じる構造変化である「気道のリモデリング」はアレルギー疾患、特に気管支喘息において、傷害から修復に向かうステップでの重要な気道粘膜の組織変化である。今年度の研究においては、気道リモデリングにおける重要な組織変化であるとされながら、研究知見に乏しい、結合織での「血管新生 (angiogenesis)」について、正常ヒト血管内皮細胞の遊走実験により、その発生機序についての検討・考察を行った。その結果、正常ヒト血管内皮細胞 (HMVEC-L) は、フィブロネクチン、ラミニン、I、IV型コラーゲンなどの細胞外基質 (ECM) 因子、および VEGF、PDGF、EGF、b-FGF および TGF $\beta$ -1 などのサイトカインに対しては遊走が認められたが、III型コラーゲンには遊走しなかった。これは血管新生において種々のサイトカインや ECM 因子が重要な役割を演じていること、及び、結合織中のコラーゲンの種類により、血管新生減少が修飾される可能性を示唆している。

#### A. 研究目的

喘息患者の気道粘膜において組織の構造変化である「気道のリモデリング」は組織が傷害から修復へ向かう過程での主要な病態であり、組織を構成する上皮細胞、内皮細胞および血管内皮細胞などが、活性化され、遊走し、増殖しかつ種々の遊走因子やサイトカインを産生・放出するものと考えられる。今回の研究では、国際的な喘息ガイドラインであ

る Global Initiative for Asthma (通称 GINA) の中でも気管支喘息でのリモデリングの重要な徴候とされる血管新生 (angiogenesis) に研究の焦点を絞り、培養血管内皮細胞の遊走実験によりこれを検討した。

#### B. 方法

血管内皮細胞としてはヒト肺動脈由来の培養正常血管内皮細胞 (HMVEC-L, 三光純薬) を用いた。血管内皮細胞の遊走活性を検討する



物質として、細胞外基質 (ECM) 蛋白であるフィブロネクチン、ラミニンおよび I、III、IV型コラーゲン、血管新生やリモデリングに関わると考えられるサイトカインである VEGF、PDGF、EGF、b-FGF および TGF $\beta$ -1 を用いた。

#### C. 結果

フィブロネクチン、ラミニン、I、IV型コラーゲン、VEGF、PDGF、EGF、b-FGF および TGF $\beta$ -1 には至適濃度の差はあるものの全てに HMVEC-L に対する遊走活性が認められたが、III型コラーゲンのみは HMVEC-L を遊走させなかった (下図)。

#### D. 考察

気管支喘息での気道リモデリングにおいては、血管新生が特徴的に見られ、そのきっかけは、微少血管由来と思われる内皮細胞の結合織内への遊走であると推定される。今回の結果では、ECM 蛋白 (フィブロネクチン、ラミニン、I型及びIV型コラーゲン)、それに線維化や血管新生に関わるサイトカイン (VEGF、PDGF、EGF、b-FGF、TGF $\beta$ -1) はそれぞれが血管内皮細胞に対する遊走活性を有しており、気道粘膜の修復及びリモデリングにおける血管新生への関わりが推定される。特に、血管内皮細胞が、I型及びIV型コラーゲン

に対しては遊走するのに対し、III型コラーゲンには全く血管内皮細胞に対する遊走活性はなく、III型コラーゲンがいわゆる「基底膜の肥厚」(実際には基底膜下のIII型コラーゲンなどの沈着)の主成分であることを考えると、リモデリングにおける血管新生において、結合織中の有意となっているサイトカインの種類が重大な影響を及ぼしている可能性が示唆される。

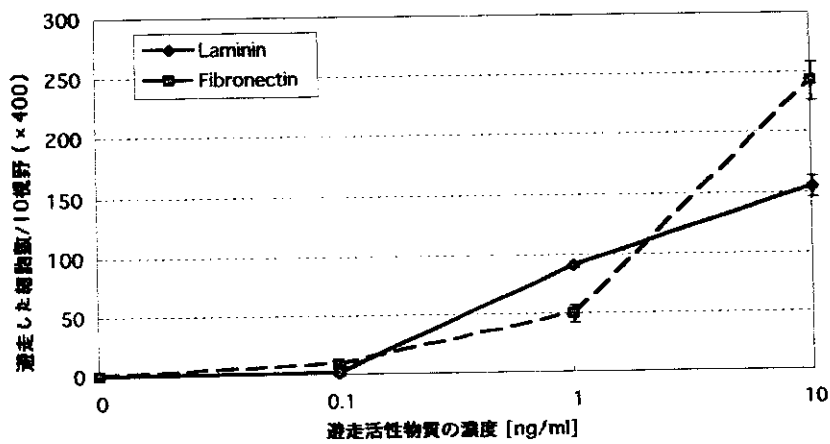
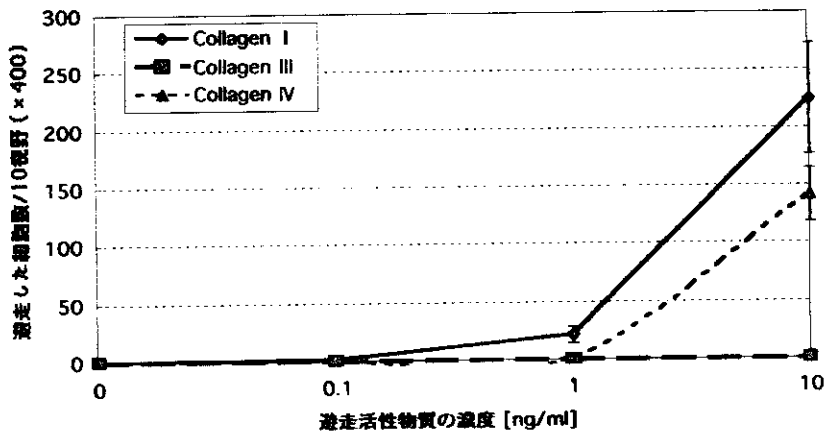
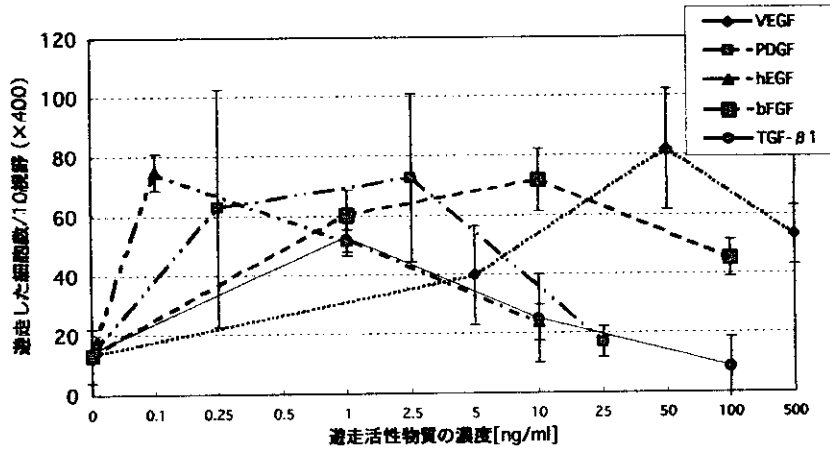
#### E. 結論

血管内皮細胞の遊走は、気管支喘息の病態、特にその気道リモデリングにおいて、血管新生の発生機序に重要に関わっており、その後の修復過程についても大きな影響を及ぼすものと考えられる。今後も、この細胞遊走系により気管支喘息病態の解明をめざしていきたいと考えている。

#### F. 研究発表

- 1) 庄司俊輔：気管支喘息における気道リモデリング  
日本医事新報 4042：33-36, 2001.
- 2) 庄司俊輔：気道リモデリングと気道上皮細胞、線維芽細胞  
喘息 15：17-22, 2002.
- 3) 庄司俊輔：気道のリモデリング  
アレルギー・免疫 9：54-61, 2002.

肺微小血管内皮細胞(HMVEC-L)に対する遊走活性の比較



分担研究報告書

薬剤レセプター遺伝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  
—インターロイキン4（IL-4）、IL-13の気道上皮細胞における誘導遺伝子の同定に関する検討—

分担研究者 出原賢治 佐賀医科大学医学部生化学講座教授

**研究要旨** インターロイキン4（IL-4）、IL-13は気管支喘息の発症に重要である。我々は気管支上皮細胞上にIL-4、IL-13レセプターが高発現していることを一昨年見出し、昨年、マイクロアレイ法を用いてIL-4、IL-13により誘導される遺伝子を同定した。今回これらの遺伝子が気管支喘息患者の病変部位において発現が認められるか解析を行った。さらに発現の増強が認められたSCCA分子に関して気管支喘息との関連を解析した結果、気管支喘息患者の血中において、特に発作時にSCCAレベルが上昇することを明らかにした。今後これらの分子の機能解析を進めることによって気道リモデリングや薬剤に対する反応性の分子機序が明らかにされることが期待される。

**A. 研究目的**

喘息治療薬の治療効果を予測しようとする場合、気道リモデリングの有無あるいはその程度が問題となってくる。気道リモデリングの形成には多くのサイトカイン、メディエーター等の分子が関与していると考えられる。本研究においては、気道リモデリング、薬剤に対する反応性に関与する分子を同定し、疾患の予後あるいは治療反応性との関連を検討していくことを目指している。インターロイキン4（IL-4）、IL-13が気管支喘息の発症に重要な役割を果たしていることはよく知られており、動物モデルにおける解析から気道リモデリングにこれらのサイトカインが関与していることが示唆されている。薬剤に対する反応性についてはまだ詳細な機序は不明であるが、このような気道リモデリングの形成が薬剤の反応性に影響を与えている可能性も考えられる。我々は一昨年IL-4、IL-13レセプターの気道組織における発現分布を組織染色により解析した結果、気管支上皮細胞においてIL-4レセプターとIL-13レセプターが高発現していることを示した。そして、昨年気管支上皮細胞においてIL-4、IL-13によりその発現が誘導される遺伝子をマイクロアレイ法により同定することを試み、その結果、squamous cell carcinoma antigen (SCCA)1、SCCA2など12遺伝子を同定した。今回、これら同定された遺伝子の気管支喘息との関連について解析を行った。

**B. 研究方法**

英国サザンプトン大学Holgate博士らとの共同研

究により、アトピー性気管支喘息患者とアトピー性正常者に対して気管支生検を施行し、cDNAライブラリーを作製して、各サンプルから約4000個のクローンをシーケンスし、同定した12遺伝子のクローン数を解析した。また、SCCA分子に関して、ヒト気管支上皮細胞におけるタンパク質発現を解析するとともに、喘息患者血中における産生レベルを解析した。

気管支生検による解析は、サザンプトン大学の倫理委員会により承認を受け、患者の同意を得た上で施行した。

**C. 研究結果**

12遺伝子の内、SCCA1、SCCA2、KAL-1、DD96の4遺伝子がアトピー性気管支喘息患者由来のcDNAライブラリーにおいて存在、あるいは発現が増強していた。特に、SCCA関連クローンはアトピー性気管支喘息患者由来のcDNAライブラリーでは11クローン、アトピー性正常者由来のcDNAライブラリーでは3クローンと、著明に喘息患者において増強していた。

次に、ヒト気管支上皮細胞におけるSCCA分子のタンパク質レベルでの発現を解析したところ、IL-4、IL-13によりSCCAの発現が増強されることが免疫染色により確認された。また、SCCA産生の時間経過を解析したところ、細胞内では刺激24時間後にすでに産生が認められ、その後わずかに増えていた。一方、細胞外への分泌は、刺激24時間後では認めら

れず、48時間後になって認められた。

さらに、気管支喘息患者と非気管支喘息患者の血中における SCCA レベルを解析したところ、明らかに気管支喘息患者において SCCA レベルが高くなっていた。また、気管支喘息患者の発作時と非発作時における血中 SCCA レベルを解析したところ、何人かの患者では SCCA レベルが発作時において高くなっていた。

#### D. 考察

IL-4 と IL-13 は気管支喘息の発症に重要な役割を果たしていると考えられており、昨年、気管支上皮細胞におけるこれらのサイトカインによる誘導遺伝子の同定を行い、今回、これらの遺伝子と気管支喘息との関連について解析を行った。その結果、SCCA1、SCCA2、KAL-1、DD96 の 4 遺伝子の発現が気管支喘息の病変部位において存在、あるいは増強されており、これらの遺伝子と気管支喘息との関連が示唆された。特に、SCCA 遺伝子は喘息病変部位において著明に発現が増強しており、関連が強く示唆された。喘息患者の血中においても SCCA レベルが特に発作時において上昇しており、血中における SCCA レベルの測定は気管支喘息の病態の評価に有用であることが示された。

SCCA1 と SCCA2 は SERPIN と呼ばれるプロテアーゼインヒビターのファミリーに属し、アミノ酸レベルで 92% 同一であり、おそらく単一の遺伝子から派生したと考えられている。しかし、最近の解析では SCCA1 と SCCA2 は性質が異なり、阻害するプロテアーゼも異なっていると考えられている。SCCA1 はシステインプロテアーゼインヒビターであり、カテプシン K、L、S、パバインなどの酵素活性を阻害する一方で、SCCA2 はセリンプロテアーゼインヒビターであり、カテプシン G、マスト細胞キマーゼなどの酵素活性を阻害することが示されている。現時点では気管支喘息における SCCA の役割については不明である。しかし、外因性あるいは内因性のプロテアーゼの活性を阻害することで、気管支喘息の発症に対し、防御的に働いている可能性が考えられる。今後、これらの点を明らかにすることにより、気管支喘息発症の分子的機序が解明されることが考えられる。さらには、そのことが気道モデリングあるいは薬剤反応性の解明にもつながると期待される。

#### E. 結論

気管支喘息患者の病変部位、あるいは血中において SCCA1、SCCA2 の産生が増強されており、気管支喘息の発症と何らかの関連が存在することが示唆された。これらの分子の機能解析を進めていくこと

により、気道リモデリング、薬剤反応性の分子機序が明らかとなっていくことが期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Akaiwa M, Yu B, Umeshita R, Terada N, Suto H, Koga T, Arima K, Matsushita S, Saito H, Ogawa H, Furue M, Hamasaki N, Ohshima K, Izuhara K:

Localization of Human Interleukin-13 Receptor in Non-Hematopoietic Cells.

Cytokine 13, 75-84, 2001

2) Ohshima K, Akaiwa M, Umeshita R, Suzumiya J, Izuhara K, Kikuchi M:

Interleukin-13 and interleukin-13 receptor in Hodgkin's disease: Possible autocrine mechanism and involvement in fibrosis.

Histopathology 38, 368-375, 2001

3) Ikizawa K, Kajiwara K, Izuhara K, Yanagihara Y:

PKC $\delta$  and  $\zeta$  mediate IL-4/IL-13-induced germline e transcription in human B cells: a putative regulation via PU.1 phosphorylation.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 288, 34-41, 2001

4) Izuhara K, Arima K, Yasunaga S, Yokoi F, Sakata Y, Tanaka T, Yang Q:

The importance of interleukin-13 in the pathogenesis of bronchial asthma.

Recent Research Development, in press

5) 出原賢治:

輸血医学における分子生物学 (サイトカイン情報伝達経路における遺伝子多型とアレルギー疾患), 220-228, エフ・コピント・富士書院, 2001

6) 出原賢治:

分子生物学・免疫学キーワード辞典 第2版 (インターロイキン 4, インターロイキン 4 レセプター, インターロイキン 13),

医学書院, 印刷中

7) 出原賢治:

Annual Review 呼吸器 2002 (IL-13 をめぐって), 中外医学社, 印刷中

8) 出原賢治:

喘息に関する細胞の分子医学. リンパ球 現代医療 93: 66-70, 2001

9) 出原賢治:

## IL-13.

分子呼吸器病 5 : 11-17, 2001

10)有馬和彦、白川太郎、Klaus A. Deichmann、阿部義人、山下哲次、榎本雅夫、嶽良博、佐々木聖、赤岩美奈、于彬、濱崎直孝、Julian M. Hopkin、出原賢治 :

IL-13 の遺伝的多型と気管支喘息との相関。

呼吸 20 : S18-S20, 2001

11)湯山則子、赤岩美奈、松井慶子、吉田寧、前田都、有馬和彦、于彬、濱崎直孝、杉田雄二、出原賢治 :

ヒト気道上皮細胞と気管支平滑筋における IL-4, IL-13 による発現変動遺伝子の同定。

呼吸 20 : S34-S35, 2001

12)出原賢治 :

インターロイキン 4, 13 とアレルギー疾患の発症。

臨床病理 49 : 360-364, 2001

13)出原賢治 :

気道上皮細胞と Th2 サイトカイン。

アレルギー科 11 : 366-373, 2001

14)出原賢治 :

アレルギー疾患と遺伝子変異。

Molecular Medicine 98 : 490-495, 2001

15)出原賢治 :

IL-4, IL-13 シグナリングとアトピー遺伝子。

Pharma Medica 20(Suppl.) : 17-24, 2001

16)出原賢治 :

マイクロアレイを用いた気管支喘息関連遺伝子検索の試み。

アレルギー・免疫 8 : 60-64, 2001

17)有馬和彦、出原賢治 :

気管支喘息と IL-13 遺伝子多型。

アレルギーの臨床 22 : 33-38, 2002

18)安永晋一郎、出原賢治 :

アレルギーの病態における遺伝子発現変化。

臨床検査 印刷中

## 2.学会発表

1)出原賢治、有馬和彦、白川太郎 :

喘息と IL-13 遺伝子多型

第51回日本アレルギー学会。2001. 10.. 30.

アレルギー 50 : 852.

2)中尾篤人、金丸裕、鈴木龍洋、奥村康、小川秀興、

羅智靖、松倉聡、出原賢治 :

TGF- $\beta$ 1 による気道上皮細胞における IL-13 誘導性エオタキシン発現の調節

第51回日本アレルギー学会。2001. 10.. 29.

アレルギー 50 : 899.

3)湯山則子、赤岩美奈、松井慶子、濱崎雄平、住浪義則、前田都、有馬和彦、岸文雄、加藤紘、只野壽太郎、杉田雄二、出原賢治 :

ヒト気管支上皮細胞における IL-4、IL-13 刺激による SCCA 発現の解析

第51回日本アレルギー学会。2001. 10.. 30.

アレルギー 50 : 962.

4)生澤公一、梶原景一、品澤美樹、柳原行義、出原賢治 :

IL-4/IL-13 による germline C $\epsilon$  mRNA と CD23 $\beta$  mRNA の発現誘導における PKC 依存性の差異

第51回日本アレルギー学会。2001. 10.. 30.

アレルギー 50 : 982.

5)梶原景一、生澤公一、品澤美樹、柳原行義、出原賢治 :

IL-4 反応性 B 細胞と IL-13 反応性 B 細胞における機能発現の比較検討

第51回日本アレルギー学会。2001. 10.. 30.

アレルギー 50 : 982.

6)生澤公一、梶原景一、出原賢治、柳原行義 :

IL-4/IL-13 による germline C $\epsilon$  transcript の発現誘導における PKC $\delta$ および $\zeta$ の役割

第31回日本免疫学会。2001. 12.. 11.

日免疫総会誌 31 : 25.

7)梶原景一、生澤公一、出原賢治、柳原行義 :

成熟 B 細胞における IL-4 応答性細胞と IL-13 応答性細胞の機能解析

第31回日本免疫学会。2001. 12.. 11.

日免疫総会誌 31 : 25.

8)有馬和彦、坂田資尚、HOPKIN Julian M、PURI Raj K、白川太郎、出原賢治 :

IL-13 の遺伝的多型 R110Q の機能的解析

第31回日本免疫学会。2001. 12.. 11.

日免疫総会誌 31 : 25.

9)中尾篤人、松倉聡、出原賢治、奥村康、小川秀興、羅智靖 :

気道上皮細胞におけるインターロイキン 13 誘導性エオタキシン産生のトランスフォーミング成長因子 $\beta$ 1による調節機序の解析

第31回日本免疫学会。2001. 12.. 11.

日免疫総会誌 31 : 31.

10)関則靖、鈴木涉、林克彦、出原賢治、久保允人 :

IL-4 シングル依存性 GATA-3 発現によるクロマチ

ンモデリングと Th2 細胞初期分化制御

第31回日本免疫学会. 2001. 12.. 11.

日免疫総会誌 31 : 52

11) Kenji Izuhara, Noriko Yuyama, Donna E. Davies, Keiko Matsui, Miyako Maeda, Ning Lu Yoshida, Yuji Sugita, Stephen T. Holgate :

Analysis of Novel Disease-Related Genes in Bronchial Asthma

Keystone symposia. 2002. 2.11.

Keystone symposia. Rethinking of the pathogenesis of asthma 63

12) Kazuhiko Arima, Taro Shirakawa, Kenji Izuhara

Up-regulation of IL-13 concentration *in vivo* by the IL-13 variant associated with bronchial asthma

Keystone symposia. 2002. 2.11.

Keystone symposia. Rethinking of the pathogenesis of asthma 56

## 2. 知的所有権の取得状況

特に記載すべき事なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者	書籍名	出版社	出版地	出版年	ページ
出原賢治	サイトカイン情報伝達経路における遺伝子多型とアレルギー疾患	池田久實	輸血医学における分子生物学	エフ・コピント・富士書院	札幌市	2001	220-228
出原賢治	インターロイキン4, インターロイキン4レセプター, インターロイキン13	永田和宏、宮坂昌之、宮坂信之、山本一彦	分子生物学・免疫学キーワード辞典 第2版	医学書院	東京	2002	印刷中
出原賢治	IL-13をめぐって	工藤翔二、土屋了介、金沢実、大田健	Annual Review of Respiratory Medicine 2002	中外医学社	東京	2002	27-31
小田嶋博	ステロイド吸入療法	足立満、永倉俊和	知って得する吸入療法のコツ	メデイカルレビュー社	東京	2001	30-35
松井猛彦	喘息死—小児科	森田寛、永倉俊和、宮地良樹、岡本美孝編集	アレルギーナビゲーター	メデイカルレビュー社	東京	2001	22-23
松井猛彦	気管支拡張薬	天野 暉監修	小児用医薬品集	薬事日報社	東京	2001	778-823
松井猛彦、古庄卷史、西間三馨	小児喘息の管理と治療	監修 宮本昭正	EBMに基づいた喘息治療ガイドライン	協和企画	東京	2001	107-141
中澤次夫、足立満、真野健次、松井猛彦	喘息死	監修 宮本昭正	EBMに基づいた喘息治療ガイドライン	協和企画	東京	2001	209-218
松井猛彦、荒井康男、岩崎栄作、梶沢靖弘、	思春期に喘息の君へ	監修 松井猛彦		協和企画	東京	2001	

勝呂 宏、中川 武正、駒瀬裕 子、西尾健、池 大久保公裕、池 沢善郎							
--	--	--	--	--	--	--	--



発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	頁	出版年
Akaiwa M, Yu B, Umeshita R, Terada N, Suto H, Koga T, Arima K, Matsushita S, Saito H, Ogawa H, Furue M, Hamasaki N, Ohshima K, Izuhara K	Localization of Human Interleukin-13 Receptor in Non-Haematopoietic Cells.	Cytokine	13(2)	75-84	2001
Ohshima K, Akaiwa M, Umeshita R, Suzumiya J, Izuhara K, Kikuchi M	Interleukin-13 and interleukin-13 receptor in Hodgkin's disease: Possible autocrine mechanism and involvement in fibrosis.	Histopathology	38(4)	368-375	2001
Ikizawa K, Kajiwara K, Izuhara K, Yanagihara Y	PKC $\delta$ and $\zeta$ mediate IL-4/IL-13-induced germ line E transcription in human B cells: a putative regulation via PU.1 phosphorylation.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	288(1)	34-41	2001
Izuhara K, Arima K, Yasunaga S, Yokoi F, Sakata Y, Tanaka T, Yang Q	The importance of interleukin-13 in the pathogenesis of bronchial asthma.	Recent Research Developments			
出原賢治	喘息に関与する細胞の分子医学. リンパ球	現代医療	33(2)	66-70	2001
出原賢治	IL-13.	分子呼吸器病	5(2)	11-17	2001
有馬和彦、白川太郎、Klaus A. Deichmann、阿部義人、山下哲次、榎本雅夫、嶽良博、佐々木聖、赤	IL-13の遺伝的多型と気管支喘息との相関.	呼吸	20(2)	S18-S20	2001

岩美奈、于彬、濱崎直孝、Julian M. Hopkin、出原賢治	呼吸	20(2)	S34-S35	2001
湯山則子、赤岩美奈、松井慶子、吉田寧、前田都、有馬和彦、于彬、濱崎直孝、杉田雄二、出原賢治	ヒト気道上皮細胞と気管支平滑筋細胞におけるIL-4, IL-13による発現変動遺伝子の同定.			
出原賢治	臨床病理	49(4)	360-364	2001
出原賢治	アレルギー科	11(4)	366-373	2001
出原賢治	Molecular Medicine	38(5)	490-495	2001
出原賢治	Pharma Medica	19(Sup pl.)	65-71	2001
出原賢治	アレルギー・免疫	8(10)	60-64	2001
有馬和彦、出原賢治	アレルギーの臨床	22(1)	33-38	2002
安永晋一郎、出原賢治	臨床検査	46(2)	205-207	
Nakao F, Ihara K, Sasaki Y, Takabayashi A, Nishimura S, Hara T	J Allergy Clin Immunol	107	499-504	2001
K Ihara, S Ahmed, FNakao, N Kinukawa, R Kuromaru, N Matsuura, I Iwata, S Nagafu	Immunogenet		53455-467	2001

chi, H Kohno, K Miyako, <u>Hara T</u>	Epstein-Barr virus (EBV) load and cytokine gene expression in activated T cells of chronic active EBV infection.	J Infect Dis	183	1-7	2001
Ohga S, Nomura A, Takada H, Ihara K, Kawakami K, Yanai F, Takahata Y, Tanaka T, Kasuga N, <u>Hara T</u>	Association of CTLA-4 but not CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Japanese population.	Rheumatology	40	662-667	2001
Ahmed S, Ihara K, Kanemitsu S, Nakashima H, Otsuka T, Tsuzaka K, Takeuchi T, <u>Hara T</u>	High expression of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 in blast cells from patients with Down syndrome suffering from transient myeloproliferative disorder and organ fibrosis.	Brit J Haematol	115	472-475	2001
Hattori H, Matsuzaki A, Suminoe A, Ihara K, Nakayama H, <u>Hara T</u>	Contribution of the interleukin-4 gene to susceptibility to subacute sclerosing panencephalitis.	Arch Neurol			(in press)
Inoue T, Kira R, Nakao F, Ihara K, Bassuny W M, Kusuhara K, Nihei K, Takeshita K, <u>Hara T</u>	Association study between CD30 and CD30 ligand genes and type 1 diabetes in the Japanese population.	Gene & Immun			(in press)
Ahmed S, Ihara K, Wafaa MB, Kuromaru R, Kohno H, Miyako K, Matsuurara N, Iwata I, Nagafuchi S, <u>Hara T</u>	Functional analyses of cord blood natural killer	Exp Hematol	29	1169-1176	2001

in C, Tanaka T, Ohga S, Hara T	cells and T cells: a distinctive interleukin-18 response.					
Takahata Y, Takada H, Nomura A, Ohshima K, Nakayama H, Tsuda T, Nakano H, Hara T	Interleukin-18 in human milk.			50	268-272	2001
Hikino S, Nakayama H, Yamamoto J, Kinukawa N, Sakamoto M, Hara T	Food allergy and atopic dermatitis in low birth weight infants during early childhood.			90	850-855	2001
Ohga S, Kubo E, Nomura A, Takada H, Suga N, Ishii E, Suminoe A, Inamitsu T, Matsuzaki A, Kasuga N, Hara T	Quantitative monitoring of circulating Epstein-Barr virus DNA for predicting the development of posttransplantation lymphoproliferative disease.			73	323-326	2001
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 $\gamma$ gene but not with that of interferon $\gamma$ receptor $\alpha$ -chain / $\beta$ -chain and interferon regulatory factor-1 genes.			107	499-504	2001
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			40	34-36	2001
西城隆一郎, 間島雄一, 兵界, 国貞智弘, 阿部武史, 高野 頌	術後上顎洞篩骨洞へのエアロゾル沈着の検討ー鼻・副鼻腔モデルを用いてー,			44	38-43	2001
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			40	34-36	2001
西城隆一郎, 間島雄一,	術後上顎洞篩骨洞へのエアロゾル沈着の検討ー鼻・副			44	38-43	2001