



# Modulation of airway responsiveness by anionic and cationic polyelectrolyte substances

八幡, 知之

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2006-03-07

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2866

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002866>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 6 6 】

氏 名・（本 籍）	八幡 知之 （ 兵庫県 ）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博ろ第1965号
学位授与の 要 件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の 日 付	平成18年3月7日

【 学位論文題目 】

Modulation of airway responsiveness by anionic and cationic  
polyelectrolyte substances  
(陰性および陽性荷電物質による気道反応性の調節)

審 査 委 員

主 査	教 授	杉村	和朗
	教 授	尾原	秀史
	教 授	大北	裕

## 【はじめに】

気管支喘息において、即時型喘息反応（IAR）後の活性化した肥満細胞は platelet-activating factor（PAF）、LTB<sub>4</sub>、好中球遊走因子、好酸球遊走因子等を遊離し、気道内に単球、好中球、好酸球、好塩基球を遊走させる。

このときに好酸球から major basic protein（MBP）や eosinophil cationic protein（ECP）が産生される。PAF、MBP、ECP は陽性荷電物質であり、気道上皮傷害、気道反応亢進、気道炎症を引き起こす。また人工的陽性荷電物質である poly-L-lysine（P-L-L）の気道内注入や吸入は気道反応亢進、気道上皮傷害をもたらす。陰性荷電物質であるヘパリンはこれらの陽性荷電物質の作用を抑制する。これら荷電物質同士の反応、つまり“charge interaction”が喘息反応において重要な要因ではないかと考えられるが、不明な点も多い。本研究では ovalbumin（OA）感作モルモットにおける抗原曝露後の気道収縮反応に荷電物質がどのような影響を及ぼすかを検討した。

## 【方 法】

### 1. 動物

4週齢の雄および雌のハートレー系モルモットを使用した。

### 2. 抗原感作

感作は1%OAを1日1回10分間超音波ネブライザーで連続10日間吸入曝露させた。対照はOAの代わりに生理食塩水を用いた。

### 3. 呼吸抵抗の測定

Meadらのオシレーション法を改変して測定した。即ち、モルモットの頸部以下をchamberに入れ、後部より30Hzのsine wave圧力波を加えた。モルモットの口・鼻は円錐形のマスクで覆った。呼吸流量コントロールボックス、差圧トランスデューサー、多用途増幅器を用いて、chamber内圧と呼吸流量を測定し、これらより呼吸抵抗を計測した。

### 4. 抗原吸入曝露による気道収縮反応に対する荷電物質の影響

#### a. 吸入効果の検討

OA吸入1時間前に生理食塩水または低分子ヘパリン（LMWH）、poly-L-glutamic acid（P-L-G）、P-L-L、デキストラン（Dx）のいずれかを吸入させた。

#### b. 内服効果の検討

OA吸入曝露前1週間、水道水または dalteparin sodium（DS）含水道水を飲ませた。

### c. 抗原曝露

超音波ネブライザーで2%OAを10分間吸入曝露し、曝露24時間後まで経時的に呼吸抵抗を測定した。曝露後1時間までに初期呼吸抵抗の2倍以上呼吸抵抗が上昇したものを即時型気道反応（IR）、曝露4時間～24時間後に30%以上呼吸抵抗が再上昇した場合を遅延型気道反応（LR）とした。尚、抗原曝露前に致死的气道狭窄を防ぐためヒスタミンH<sub>1</sub>受容体拮抗薬である pyrilamine maleate を腹腔内投与した。

### 5. 非特異的気道収縮反応に及ぼす荷電物質の影響

生理食塩水、LMWH、P-L-G、P-L-L、Dx、を吸入し、その6時間後にメサコリンを低濃度より順次30秒ずつ呼吸抵抗が初期の2倍以上になるまで吸入させた。P-L-L吸入1時間前にLMWHの吸入を追加した群も設定した。メサコリン濃度-反応曲線より呼吸抵抗が初期値の2倍になる濃度を求め、PC<sub>100</sub>として気道反応性の指標とした。

## 【結 果】

### 1. 抗原吸入曝露による気道収縮反応に対する荷電物質吸入の影響

LMWH吸入前処置は、生理食塩水前処置に比べて有意にIRおよびLRを抑制した。P-L-G吸入前処置も生理食塩水前処置に比べて、有意にIRおよびLRを抑制したが、IR抑制効果はLMWHより弱かった。P-L-L吸入前処置によりIRは亢進し、Dx吸入前処置は、IR、LRに対し有意な影響を及ぼさなかった。

### 2. 抗原吸入曝露による気道収縮反応に対するDS内服の影響

DS内服時は、水道水内服時と比べて、LRが有意に抑制されたがIRは部分的に抑制されるにとどまった。

### 3. メサコリンに対する非特異的気道収縮反応に及ぼす荷電物質の影響

LMWHの吸入により、感作・非感作モルモットともメサコリンに対する気道反応性は有意に抑制された。P-L-Gの吸入では、感作モルモットでのみ、気道反応性は有意に抑制された。P-L-Lの吸入により、感作・非感作モルモットとも気道反応性は有意に亢進し、LMWHをP-L-Lの前に吸入させるとその気道反応亢進は認めなくなった。Dx吸入は、気道反応性に影響を与えなかった。

## 【考 察】

ヘパリンの抗炎症作用、抗アレルギー作用、抗原曝露後の IR および気道過敏性抑制効果に関する報告はいくつか認める。LMWH、P-L-G の吸入は、IR および LR を有意に抑制し、喘鳴の減弱も観察された。これは陰性荷電によるケミカルメディエーターや好酸球顆粒蛋白が中和されたためと考えられる。LMWH の方が P-L-G よりも IR をより強力に抑制したが、これは肥満細胞の  $IP_3$  受容体の拮抗作用やヒスタミンの遊離抑制作用等の肥満細胞脱顆粒抑制作用を LMWH が有するためと考えられる。そして両者とも LR を有意に抑制したが、これは前述の陰性荷電による中和作用のため、気道炎症、気道浮腫、気道上皮傷害が軽減したためと考えられる。また、LMWH、P-L-G ともに感作モルモットにおけるメサコリンに対する気道反応を抑制した。これは、 $M_2$  ムスカリン受容体の機能障害の修復作用のためと考えられる。非感作モルモットにおいても、LMWH が、抑制作用を示した機序は不明だが、ヘパリンの平滑筋に対する直接作用の可能性がある。

DS の内服は抗原曝露後の LR を有意に抑制したが、IR を抑制しなかった。DS の吸入により抗原曝露後の IR、および気道過敏性の亢進を抑制したという報告はあるが、内服による LR 抑制についての報告はこれまでにない。ヘパリンは胃から腸にかけて吸収されるが、陰性に帯電したままだと吸収率が悪いとの報告があり、これが吸入に比べて効果が弱かった理由の一つと考えられる。

P-L-L の吸入は、非感作・感作モルモットにおいて、メサコリンに対する気道反応性を有意に亢進させた。これは、陽性荷電物質により気道上皮傷害、および機能障害、そして炎症細胞の浸潤をきたしたためである。そして、陰性荷電物質の前吸入は、陽性荷電物質障害を打ち消した。

ヘパリン以外の陰性荷電物質、および陽性荷電物質の抗原曝露から 24 時間までの気道収縮反応に対する影響を検討したのは、我々のこの報告が最初である。今回の検討より、気管支喘息における IAR、遅延型喘息反応、および気道過敏性に関して“charge interaction”が非常に重要な要因であることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

受 付 番 号	乙 第 1962 号	氏 名	八幡知之
論 文 題 目 Title of Dissertation	<b>Modulation of airway responsiveness by anionic and cationic polyelectrolyte substances</b> 陰性および陽性荷電物質による気道反応性の調節		
審 査 委 員 Examiner	主 査 杉村和朗 Chief Examiner 副 査 尾原高史 Vice-examiner 副 査 大比 祐 Vice-examiner		
審 査 終 了 日	平成 / 8 年 / 月 4 日		

（要旨は 1, 0 0 0 字～2, 0 0 0 字程度）

気管支喘息において、即時型喘息反応（IAR）後の活性化した肥満細胞は platelet-activating factor（PAF）、LTB<sub>4</sub>、好中球遊走因子、好酸球遊走因子等を遊離し、気道内に単球、好中球、好酸球、好塩基球を遊走させる。このときに好酸球から major basic protein（MBP）や eosinophil cationic protein（ECP）が産生される。PAF、MBP、ECP は陽性荷電物質であり、気道上皮傷害、気道反応亢進、気道炎症を引き起こす。陰性荷電物質であるヘパリンはこれらの陽性荷電物質の作用を抑制する。これら荷電物質同士の反応、つまり“charge interaction”が喘息反応において重要な要因ではないかと考えられ、本研究で ovalbumin（OA）感作モルモットにおける抗原曝露後の気道収縮反応及び気道過敏性に対する荷電物質の影響を検討した。

4 週齢の雄および雌のハートレイ系モルモットを用いた。感作は、1%OA を連続 10 日間吸入させた。呼吸抵抗は Mead らのオシレーション法を改変して測定した。抗原吸入曝露による気道収縮反応に対する荷電物質の影響を検討するために、抗原曝露（2%OA を 10 分間吸入）1 時間前に生理食塩水または、低分子ヘパリン

（LMWH）、poly-L-glutamic acid（P-L-G）、poly-L-lysine（P-L-L）、デキストラン（Dx）のいずれかを吸入させた。内服効果の検討では、抗原曝露前 1 週間、水道水または dalteparin sodium（DS）含水道水を飲ませた。抗原曝露後 24 時間まで経時的に呼吸抵抗を測定した。曝露後 1 時間までの呼吸抵抗の上昇を即時型気道反応（IR）、曝露 4~24 時間後の呼吸抵抗の再上昇を遅延型気道反応（LR）とした。気道過敏性に及ぼす荷電物質の影響を検討するために、生理食塩水、LMWH、P-L-G、P-L-L、Dx を吸入し、6 時間後にメサコリンを低濃度より順次吸入させた。呼吸抵抗が初期値の 2 倍になる濃度を PC<sub>100</sub> とし、気道反応性の指標とした。

抗原吸入曝露による気道収縮反応に対する荷電物質吸入の影響に関しては、LMWH 吸入は、生理食塩水に比べて有意に IR および LR を抑制した。P-L-G 吸入

も生理食塩水に比べて、有意に IR および LR を抑制したが、IR 抑制効果は LMWH より弱かった。P-L-L 吸入により IR は亢進し、DX 吸入は、IR、LR に対し有意な影響を及ぼさなかった。内服効果の検討では、DS 内服時は水道水内服時と比べて、LR が有意に抑制されたが IR は部分的に抑制されるにとどまった。

メサコリンに対する非特異的気道収縮反応に及ぼす荷電物質の影響に関しては、LMWH 吸入により、感作・非感作モルモットともメサコリンに対する気道反応性は有意に抑制された。P-L-G 吸入では、感作モルモットでのみ、気道反応性は有意に抑制された。P-L-L 吸入により、感作・非感作モルモットとも気道反応性は有意に亢進し、LMWH を P-L-L の前に吸入させるとその気道反応亢進は認めなかった。DX 吸入は、気道反応性に影響を与えなかった。

陰性荷電物質である LMWH、P-L-G の吸入が IR および LR を有意に抑制したのは、陰性荷電がケミカルメディエーターや好酸球顆粒蛋白を中和したためと考える。LMWH の方が IR をより強力に抑制したのは、肥満細胞の IP<sub>3</sub> 受容体の拮抗作用や肥満細胞脱顆粒抑制作用を LMWH が有するためと考える。両者とも LR を有意に抑制したのは、前述の陰性荷電による中和作用のため気道炎症、気道浮腫、気道上皮傷害が軽減したためと考える LMWH、P-L-G ともに感作モルモットのメサコリンに対する気道反応を抑制した。これは、ムスカリン M<sub>2</sub> 受容体の機能障害の修復作用のためと考える。DS の内服は LMWH 吸入に比べて効果が弱かった。ヘパリンは胃から腸にかけて吸収されるが、陰性に帯電したままだと吸収率が悪く、これが原因と考えられる。陽性荷電物質である P-L-L の吸入がメサコリンに対する気道反応性を有意に亢進させたのは、陽性荷電により気道上皮傷害及び機能障害、そして炎症細胞の浸潤をきたしたためであり、LMWH の前吸入は、その障害を打ち消した。

本研究は気管支喘息における即時型・遅発型喘息反応について感作モルモットを用いた生理実験を行い、種々の荷電物質の影響を検討したものであるが、従来ほとんど行われなかった、抗原曝露後の気道収縮反応において陰性荷電物質（マイナスイオン）の吸入及び内服の有用性について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。