

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月12日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659139

研究課題名（和文） 生体内性鎮咳物質は生体でどんな役割をもつのか？—難治性咳との関わり

研究課題名（英文） Does an endogenous antitussive substance possess any physiological role in living body? : In relation to intractable coughs

## 研究代表者

高濱 和夫 (TAKAHAMA KAZUO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：80150548

## 研究成果の概要（和文）：

ヒト血漿タンパク質ファクターXIa (F-XIa) は、モルモットの様々な難治性咳嗽反射モデル、すなわち、ACE 阻害薬処置モデル、亜急性気管支炎モデル、および GERD 様モデルなどにおいて発現する難治性咳嗽を、ng/kg の極微量の静脈内投与で強力に抑制した。F-XIa の鎮咳作用は、F-XIa 自身が活性をもち、かつ F-XIa の血液凝固活性が関わることを示唆された。さらに、F-XIa の鎮咳作用の作用点は末梢性であることが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

A human coagulation factor XIa (F-XIa) at intravenous dose levels of ng/kg caused a potent antitussive activities on intractable coughs such as coughs occurring in ACE-inhibitor treated, sub-acute bronchitic or GERD-like models of guinea pigs. It was suggested that F-XIa itself may have a potent antitussive activity and that its activity may be associated with a coagulation activity of F-XIa. In addition, it was suggested that the site of action of F-XIa may be in the periphery.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：ヒト血漿タンパク質、鎮咳作用、難治性咳嗽、血液凝固、鎮咳薬、コデイン、モルモット

## 1. 研究開始当初の背景

研究開始当初において、ヒト血漿タンパク質 (F-XIa) をモルモット静脈内に投与したとき、強力な鎮咳活性をもつことは明らかにしていた。しかし、F-XIa は血液凝固カスケードに関わるタンパク質であるため、F-XIa 自身が鎮咳活性をもつ

か、他の血液凝固因子が鎮咳活性をもつのかははっきりしていなかった。また、様々な、他の難治性咳モデルに対して鎮咳活性をもつのかについても十分明らかでなかった。当然、鎮咳作用のメカニズムも不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、F-XIaが生体内鎮咳物質として、咳反射の調節に関わっているのか、それとも、内在性物質であるF-XIaがそのような役割は持たずに、単に、鎮咳活性をもっているのに過ぎないのかを明らかにする基盤を構築するために、以下の研究を実施した。

- (1) 様々な難治性咳嗽を含む様々な咳嗽動物モデルに対するF-XIaの鎮咳作用を調べ、F-XIaの鎮咳作用のプロファイルを明らかにする。
- (2) F-XIaは血液凝固カスケードに関与するので、他の血液凝固関連因子に鎮咳活性があるのか否か、関連して、F-XIaの鎮咳作用がその凝固活性によるのか否かについて、動物モデルで明らかにする。
- (3) 作用点が末梢性か中枢性かを含めて、鎮咳作用のメカニズムを電気生理学的に追求する。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

#### ① 正常モルモット

体重 300~400g の Hatley 系雄性モルモットを用いた。

#### ② ACE阻害薬処置モルモット

クエン酸吸入の30分前にアンジオテンシン変換酵素阻害薬のエナラプリル10mg/kgを皮下に投与して作成した。

#### ③ 亜硫酸ガス暴露気管支炎モルモット

亜硫酸を濃度 500 ppm で 1 日 2 時間、7 日間連続して曝露し、作製した。亜硫酸曝露モルモットは気道反応性と粘液貯留の亢進や好酸球浸潤という気管支炎病態像の特徴に加え、本モデルにおける咳はコデインに抵抗性を示すという特徴を併せ持つ。

#### ④ 胃食道逆流症 (GERD) 様モルモット

既報に基づき塩酸を食道内に投与することで作製した。1N 塩酸 0.2 mL を食道内処置すると 0.04 M クエン酸噴霧による咳の反射数は有意に増加した。

### (2) 咳刺激法

#### ① クエン酸噴霧による咳誘発法

無麻酔のモルモットをbody

plethysmographに入れ、容器の前面上部からクエン酸を超音波ネブライザーにより5 分間噴霧し(約0.4 g/min)、噴霧開始時から30分間における咳の発現回数を調べた。咳嗽音をマイクロフォンで確認するとともに、密閉した体部用 box の内圧の変化を、気流抵抗管及び差圧トランスデューサーを介して流速を測定し、呼吸用アンプにて増幅後、ペンレコーダー上に記録した。薬物の作用は噴霧開始から30分間に惹起された咳反射の回数を測定した。なお、正常モルモットを用いる実験においては、クエン酸溶液は0.1 Mを、ACE阻害薬処置モルモットおよび気管支炎モルモットでの実験では、クエン酸溶液は0.04Mの濃度のものを用いた。

#### ② 器械的刺激による咳誘発法

モルモットを 25% ウレタン (1.5 g/kg, i.p.) で麻酔した後、背位に固定し、気管を露出し、刺激毛を挿入するための 1.5 mm 四方ほどの小穴をあけた。刺激毛(ウサギ口周毛、長さ 3.5 cm)により気管分岐部周囲(分岐部)および輪状軟骨下縁部周囲(喉頭部)の気道粘膜を刺激することで咳を誘発させた。咳曲線は、腹部に設置したニューモグラフ、それに接続した気流抵抗管及び差圧トランスデューサーを介して流速を測定し、呼吸用アンプにて増幅後、ペンレコーダーに記録した

#### ③ 上喉頭神経電気刺激による咳刺激法

正常モルモットの上喉頭神経にパルス幅 1msec, 頻度 20 Hz, 電圧 4 V の矩形波を最大 20 秒間与え咳を誘発した。この咳は、気道の咳関連受容体を介さず、咳中枢の興奮により咳を起こすため、鎮咳作用が中枢性か末梢性かを検討する実験に用いることができる。(3) モルモット下気道求心性神経放電記録法モルモットを軽麻酔下で下気道求心性神経を露出させ、この中枢断端を白金の単極電極におき、求心性神経放電を記録した。また、咳刺激物質のブラジキニンを下気道の近接動脈内に投与し、この放電に対する作用を調べた。F-XIaは静脈内に投与した。

## 4. 研究成果

- (1) F-XIaは、正常モルモットにおいて、8 ng/kg の静脈内投与で 0.1 M クエン酸

誘発咳嗽、気管喉頭部側と分岐部側への器械的刺激誘発咳嗽をいずれも抑制した。さらに F-XIa は気管内投与した際にも 1 µg/kg で気管喉頭部側と分岐部側への器械的刺激誘発咳嗽をともに抑制した

- (2) 薬剤誘発性の難治性咳嗽モデルとして ACE 阻害薬前処置モデルを用いた。ACE 阻害薬エナラプリルにより 0.04 M クエン酸誘発咳嗽は有意に増強され、コデイン (1 mg/kg i.p.) によっては抑制されなかった。これに対し、F-XIa は 8, 16 ng/kg の静脈内投与でこの咳を用量依存的に抑制した。
- (3) 他の難治性咳嗽モデルとして亜硫酸曝露による亜急性気管支炎モデルを用いた。亜急性気管支炎モルモットにおいても、F-XIa は 0.04 M クエン酸誘発咳嗽を用量依存的に抑制した。
- (4) 1N 塩酸 0.2 mL を食道内処置すると 0.04 M クエン酸噴霧による咳の反射数は有意に増加した。この咳を F-XIa は 8 ng/kg の静脈内投与で有意に抑制した。一方、コデインは 1 mg/kg の静脈内投与では有意な抑制作用を示さなかった(Fig. 1)。

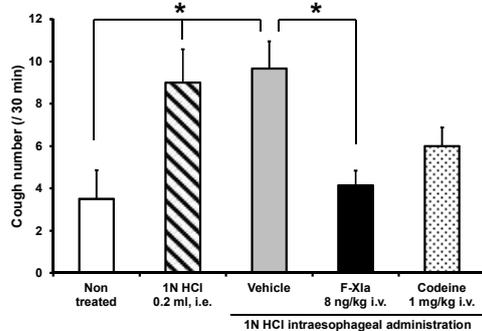


Fig. 1 食道逆流症 (GERD) 様モデルにおけるクエン酸誘発咳に対するF-XIaの鎮咳作用

\*: p<0.05.

- (5) F-XIa の中和抗体を用いてその酵素活性を阻害したところ、F-XIa の鎮咳活性はほぼ完全に消失した (Fig. 2)。これは F-XIa 自身が鎮咳活性を発現しており、その発現に F-XIa の酵素活性が必要であることを示唆している。

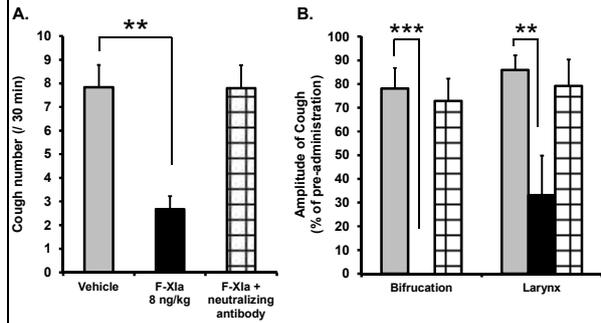


Fig. 2 F-XIa の鎮咳作用に対する中和抗体の影響

咳はモルモットの気管分岐部 (bifurcation) および喉頭部 (larynx) 近傍に対する器械的刺激により起こされた。

\*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001 vs. vehicle

- (6) 他の血液凝固因子 F-IXa, thrombin は正常モルモットにおけるクエン酸誘発咳嗽および気管喉頭部、分岐部器械的刺激誘発咳嗽を抑制せず (Fig. 3)、血液凝固因子の中で F-XIa のみが鎮咳活性を有していることが示唆された

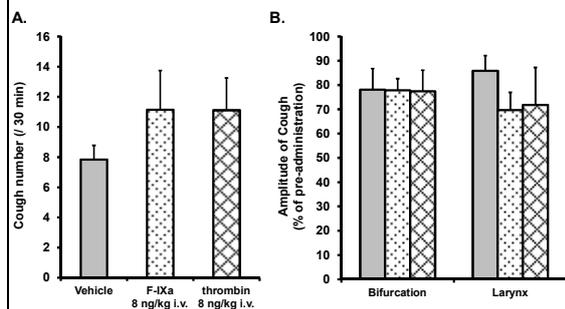


Fig. 3 他の血液凝固因子 F-IXa および thrombin の鎮咳作用

咳はモルモットの気管分岐部 (bifurcation) および喉頭部 (larynx) 近傍に対する器械的刺激により起こされた。

- (7) F-XIa は上喉頭神経の電気刺激により発現する咳を抑制しなかった。一方、中枢性鎮咳薬のコデインは、1mg/kg の静脈内投与で有意にこの咳を抑制した。また、気道内への直接の噴霧は鎮咳作用を示した。しかしながら、F-XIa は、下気道求心性神経のブラジキニン誘発放電

に対してほとんど作用を示さなかった。  
(8) F-XIa (8 ng/kg, i.v.) は正常マウスの  
0.1 秒率と気道抵抗に影響を与えなかつた。  
この成績は正常マウスの呼吸機能、  
中でも肺、横隔膜の弾性や呼吸筋の機能  
に影響を与えず、また下気道に狭窄を起  
こしていないことを示唆している。

以上の成績から、F-XIa は生体内在性の鎮咳  
活性物質であること、F-XIa の鎮咳活性は、  
コデインの奏功しない難治性の咳嗽反射も  
抑制すること、F-XIa の鎮咳作用は、この酵  
素活性に基づき、この F-XIa 自体が鎮咳活性  
を有していること、F-XIa の鎮咳作用は末梢  
性ではなく、中枢性に発現している可能性が  
あること、が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等 なし。

[雑誌論文] (計 1 件)

[学会発表] (計 6 件)

①Tetsuro Noguchi<sup>1)</sup>, Fumio Soeda<sup>1)</sup>, Tetsuya  
Shirasaki<sup>1)</sup>, Norio Akaike<sup>2)</sup>, Yushi Ito<sup>2)</sup>,  
Shintaro Kamei<sup>3)</sup> and Kazuo Takahama<sup>1)</sup>  
(Human coagulation factor F-XIa, but not  
other factors F-IXa and thrombin, has a  
potent antitussive activity in guinea  
pigs.)

第 86 回日本薬理学会年会, 2013, 3. 21-23.  
福岡国際会議場 (福岡市).

②野口哲郎<sup>1)</sup>、副田二三夫<sup>1)</sup>、白崎哲哉<sup>1)</sup>、  
赤池紀生<sup>2)</sup>、伊東祐之<sup>2)</sup>、亀井慎太郎<sup>3)</sup>、高  
濱和夫<sup>1)</sup>

(血液凝固因子 F-XIa のモルモット咳嗽反射  
に対する強力な鎮咳活性 - GERD 様モデルで  
の検討)

第 65 回日本薬理学会西南部会, 2012, 11. 23.  
熊本大学薬学部 (熊本市).

③高濱和夫<sup>1)</sup>、野口哲郎<sup>1)</sup>、亀井慎太郎<sup>2)</sup>、  
伊東祐之<sup>3)</sup>、赤池紀生<sup>3)</sup>

(血液凝固因子 F-XIa の強力な鎮咳活性)  
第 14 回咳嗽研究会, 2012, 11. 10. 三井ガー  
デンホテル (熊本市).

④高濱和夫<sup>1)</sup>、野口哲郎<sup>1)</sup>、亀井慎太郎<sup>2)</sup>、  
赤池紀生<sup>3)</sup>

(強力な生体内在性鎮咳物質の発見とその作  
用解析)

生体機能と創薬シンポジウム 2012, 8. 30-31.  
神戸学院大学 (神戸).

⑤K. Takahama<sup>1)</sup>, T. Noguchi<sup>1)</sup>, S. Kamei<sup>2)</sup>, T.  
Hamamoto<sup>2)</sup>, H. Maeda<sup>2)</sup>, M. Umehashi<sup>3)</sup>, Y.  
Ito<sup>3)</sup> and N. Akaike<sup>3)</sup>

(Discovery of a potent cough suppressant  
substance extracted from the plasma in  
humans)

7th International Symposium on Cough 2012,  
2012. 7. 5, (London)UK.

⑥T. Noguchi<sup>1)</sup>, F. Soeda<sup>1)</sup>, T. Shirasaki<sup>1)</sup>,  
N. Akaike<sup>2)</sup> and K. Takahama<sup>1)</sup>

(Further studies on properties of  
antitussive activity of human coagulation  
factor (f-XIa) in guinea pigs)

7th International Symposium on Cough 2012,  
2012. 7. 5, (London)UK.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高濱 和夫 (TAKAHAMA KAZUO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 80150548

(2) 研究分担者

白崎 哲哉 (SHIRASAKI TETSUYA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号: 30264047

副田 二三夫 (SOEDA FUMIO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号: 10336216