

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461144

研究課題名(和文) 吸入剤による呼吸筋収縮増強効果の検討とその機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of inhalation effects and mechanisms on diaphragm muscle contractility

研究代表者

進藤 千代彦 (Shindoh, Chiyohiko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10216228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、吸入製剤である吸入ステロイド(ICS)と長時間作動性 2刺激薬(LABA)の合剤、および長時間作動性抗コリン製剤(LAMA)の横隔膜筋への収縮特性に与える効果を検討した。ICS/LABA配合剤は吸入1時間後に横隔膜筋張力を増加させ、またエンドトキシンによる筋収縮力低下に対して防御した。一方、LAMAを吸入させた場合は、吸入4時間後に横隔膜筋張力を増加させ、同様にエンドトキシンの4時間後の筋収縮力低下に対して防御した。また一酸化窒素(NO)の産生を抑制し、抗炎症性を示していた。両吸入剤ともに、横隔膜筋収縮力を高めて呼吸筋疲労を防御し、呼吸器疾患における吸入療法の有用性が証明された。

研究成果の概要(英文)：We investigated inhalation effects on diaphragm muscle contractility using a combination of inhaled corticosteroid (ICS) and long-acting 2-agonist (LABA), and a long-acting muscarinic antagonist (LAMA). The ICS/LABA inhalation significantly increased force-frequency (F/f) curves at 1 h after inhalation. Endotoxin injection resulted in a downward shift in F/f curves at 4 h and induced NO production, however ICS/LABA inhalation prevented endotoxin effects. These results indicate that the inhalation of ICS/LABA potentiates diaphragm muscle contractility, and it seems a benefit for the patients with bronchial asthma. We also investigated inhalation effects of long-acting muscarinic antagonist (LAMA). LAMA inhalation induced an increase of muscle contractility at 4 h after its inhalation and inhibited the effects of endotoxin by reducing NO production. These results indicate that LAMA is beneficial for the patients with COPD because it helps prevent diaphragm muscle weakness.

研究分野：呼吸器内科学、呼吸生理学

キーワード：吸入ステロイド剤(ICS) 長時間作動性交感神経刺激剤(LABA) 一酸化窒素(NO) 気管支喘息 慢性閉塞性肺疾患(COPD) 横隔膜筋

1. 研究開始当初の背景

(1)ICS/LABA 配合剤は、吸入ステロイド剤と受容体刺激薬の合剤として、その相互効果によりステロイド単独投与よりも一秒率 (FEV₁%) を改善することが報告され (N Engl J Med 1997;337:1405-1411)、更にステロイド剤単独の高用量吸入と比較し、ピークフローをより多く維持することが知られている (Chest 2006;129:246-256)。また、ICS/LABA 配合剤はそれぞれの単独吸入時より気管支喘息の増悪を有意に抑制すると報告 (Lancet 2006;368:744-753) されており、気管支喘息治療において重要な位置を占めるに至っている。先行研究の結果からであるが、短時間作動性受容体刺激薬 (SABA) である、procaterol を吸入後の張力 - 周波数曲線への効果を検討したもので、約 30 分後に上方にシフトし、張力が増加していることが判明した (Allergol. Int. 2007;56:285-291)。これより、長時間作動性 (LABA) である Formoterol についても、横隔膜筋の増強作用が期待されるがこれまで検討されていない。更に、ICS である Budesonide についても横隔膜筋の収縮特性に影響を与えるかについては、十分検討されていない。又両者を同時投与する場合についても十分検討されていない。

(2)短時間作動性抗コリン製剤 (SAMA) である oxitropium を吸入後の、張力 - 周波数曲線への効果を検討したものであるが、1 時間後に上方にシフトし、張力が増加したが、2、4 時間後は無吸入のコントロール (Allergol. Int. 2011;60:365-372) と同様であった。抗コリン製剤には横隔膜筋を疲労抵抗性にする効果が認められ、COPD 患者の易疲労性を改善できる可能性があり、抗コリン製剤の意義は大きい。これに続く吸入剤として、長時間作動性抗コリン製剤 (LAMA) Tiotropium が近年市販され、COPD 患者の治療剤として注目されているが、この製剤の横隔膜筋収縮特性への効果及び NO 産生等については十分検討されていない。

このような背景から、ICS/LABA 配合剤、LAMA による横隔膜筋の収縮特性に与える影響、及び筋線維内の NO 産生の発現を検討する本研究を企画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、吸入製剤である吸入ステロイド配合剤、抗コリン製剤の呼吸筋への収縮特性に与える機序を解明することである。

(1)ICS/LABA 配合剤はステロイド剤 (ICS) と長時間作動性受容体刺激薬 (LABA) を同時に投与することで、前者は主に抗炎症性作用、後者は気管支拡張作用が得られることから、気管支喘息の吸入療法に広く用いられている。

(2)長時間作動性抗コリン製剤 (LAMA) は慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の吸入治療薬として用

いられている。

これらの代表的な吸入剤の横隔膜筋に与える効果については、これまで十分に検討されておらず、本研究においては筋収縮力への影響を解明するとともに、気管支喘息や COPD 患者に見られる呼吸筋疲労からの防御機構の解明をめざす。

3. 研究の方法

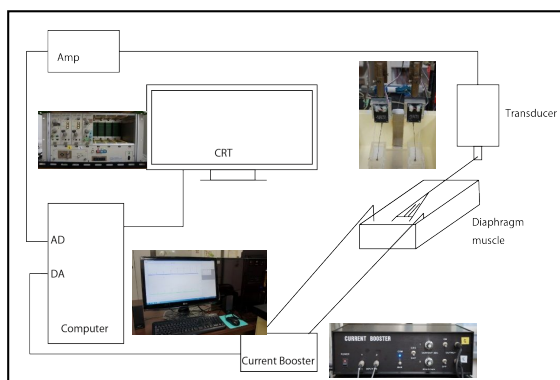
(1)ICS/LABA 配合剤では、張力 - 周波数曲線、単一収縮などの収縮特性を測定し、また NO 産生では NADPH diaphorase 染色、各製剤の単独吸入、及び同時吸入による効果を検討し、incubation により直接効果について検討する。ICS/LABA 配合剤の吸入による、横隔膜筋への効果について重点的に実験を遂行する。ICS/LABA 配合剤は、Budesonide/Formoterol (以下 BUD/FOR) の配合剤を使用する。この吸入剤は市販されているものを購入し、吸入装置からその粉体を取り出し、1 回吸入量 200 µg を計量して用いる。その粉体成分として BUD 36 µg と FOR 1 µg を含有している。動物への吸入は、MSL 社製のエアポンプを用いて、粉体をエアポンプにある途中のチャンバーに装填し、200 µl のエアで経気道的に吸入をさせる。軽麻酔下に動物は自発呼吸をしているので、喉頭部に噴霧することにより投与した。

(2)長時間作動性抗コリン製剤 (LAMA) の一つである、Tiotropium の吸入時の効果を検討する。Tiotropium は市販されている吸入器 (Soft mist) を購入し、動物への吸入は、軽麻酔下に動物は自発呼吸をしているので、喉頭部に噴霧することにより投与した。この吸入器の使用及び経気道投与については、十分練習して習熟している。吸入後、吸入直後 (0 時間)、1、2、4 時間後に横隔膜筋を摘出し、張力 - 周波数曲線、単一収縮等の収縮特性を測定する。同様に各時間設定で NADPH diaphorase 染色を行。LAMA の効果が、これまでの short acting と同等かどうかを検討することで、この吸入剤の優位性を評価する。

(3)エンドトキシン腹腔内投与と ICS/LABA 配合剤、抗コリン製剤吸入を施行し、NO 産生の検討により、筋収縮とフリーラジカルの関与を解明する。エンドトキシン (20 mg/kg) の腹腔内投与と同時に ICS/LABA 配合剤、抗コリン製剤の吸入を行い、直後 (0 時間)、1、2、4 時間後の横隔膜筋収縮力への影響について実験する。また対照としては、エンドトキシンのみを腹腔内投与し、同様の時間帯で測定された収縮特性、NO 産生を測定する。これまでに、エンドトキシン刺激により、横隔膜筋組織内にフリーラジカルが産生されることや、炎症性サイトカインが誘導されることが知られているが、ICS/LABA 配合剤や抗コリン製剤がスカベンジャーとして作用するかどうか、最終的にこれらの吸入剤が横隔膜筋収

縮特性に対して防御効果をもっているかを検討する。

(4) 筋収縮特性の検討：マウス(BALB/c Cr Slc)を用い、エーテル麻酔下後に断頭し、直ちに開腹して横隔膜を摘出し、Krebs-Henseleit バッファー内で、幅約3mmの筋小片を作製し、95% O₂ + 5% CO₂ でバブリングされた Organ bath 内に置く。筋小片の肋骨側をピンで固定し、中心腱側を張力トランスジューサーに接続する。一定電流(Constant current)にて電気刺激を行い、張力-周波数関係、単一パルス刺激による単一張力、収縮時間、半弛緩時間の測定を行う。更に反復刺激(20Hz, 60/min, 3分間)による筋疲労度などを測定し、横隔膜筋の収縮特性の変化を検討する。下図は測定系を示し、電気刺激等はコンピューター内にプログラミングされており、すべての測定はそれ従った。



4. 研究成果

(1) 図1は、ICS/LABA 配合剤の吸入時の横隔膜筋収縮を表している。ICS/LABA 配合剤はブデソニド/フォルモテロールの合剤を用いた。横軸は刺激周波数を表し、縦軸は発生張力を示しており、これを張力/周波数曲線と言う。上方に変位した場合は収縮力が増したことをあらわし、下方に変位した場合は収縮力が低下したことを意味する。吸入直後(ICS/LABA0)に比較して吸入1時間後(ICS/LABA1)には上方に変位していることが判明した。一方、ICS(ブデソニド)すなわち吸入ステロイドには増強効果は見られなかった。従ってこの早期の増強は、主にLABAによってもたらされていることが伺われた。

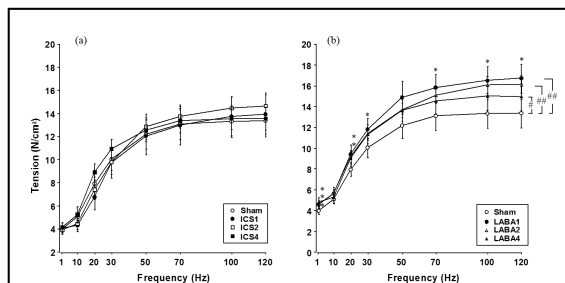


図1 ICS/LABA 配合剤の吸入効果(発表論文より引用)

(2) 図2は、エンドトキシンと ICS/LABA 配合剤の競合を検討したものである。エンドトキシン投与直後(E0)では、ほぼ正常であるが、4時間後(E4)では下方にシフトし筋収縮力が低下する。この時 NADPH 染色を行うと筋線維の横断面は濃染し、NO 産生が増加している。エンドトキシンと ICS/LABA 配合剤を同時に投与し、4時間後(E-ICS/LABA 4)に測定すると E0 よりも有意に上方にシフトしていることが分かり、エンドトキシンの効果を防御していた。同時に NADPH 染色では、淡染だけで NO 産生をブロックすることから、抗炎症を示していた。このように ICS/LABA 配合剤にはエンドトキシンの効果を抑制する効果があることが判明した。

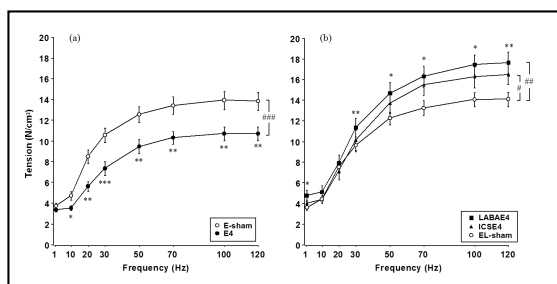


図2 エンドトキシン前投与に対する ICS/LABA 配合剤の吸入効果(発表論文より引用)

(3) 図3は、LAMA を吸入直後(LAMA0)に対して、4時間後(LAMA4)には上方に変位して筋収縮力が増強している事が認められた。ICS/LABA 配合剤に比べて、やや時間がたつてからの増強であった。この時間的差は、LABA の効果が極めて早く発現してくるのに対して、LAMA ではやや時間がかかることを示している。

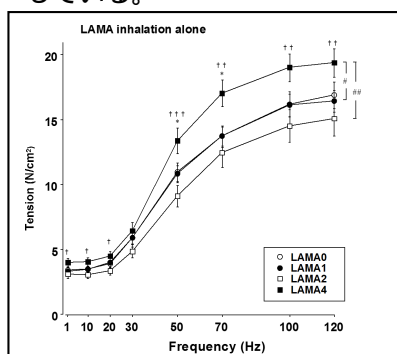


図3 LAMA の吸入効果(発表論文より引用)

(4) 図4は、エンドトキシンと LAMA との競合を検討したものである。エンドトキシン投与直後(E0)に比べて4時間後(E4)には下方に変位しているが、これに LAMA 吸入を加えて4時間後(E-LAMA4)では、ほぼ E0 の正常状態に戻っていて、エンドトキシンの効果を防御していた。また、データには示していないが、NADPH 染色を行うと、E4 では濃染して NO 産生が増強していたが、E-LAMA4 では淡染となり NO 産生の抑制していた。LAMA 吸入で抗炎症性が見られることは、LAMA 吸入

剤が COPD だけでなく、気管支喘息ガイドラインの治療剤として組み込まれたことの一つの理由となっている。

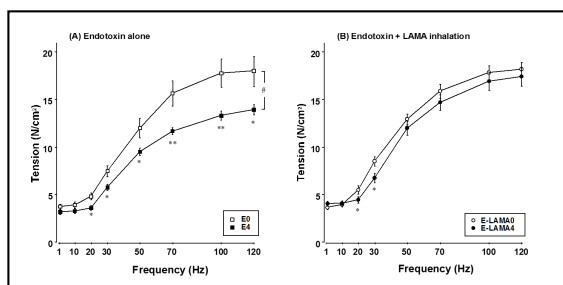


図 4 LAMA の吸入効果 (発表論文 より引用)

(5)これらの吸入剤の横隔膜筋への効果と呼吸機能との関与について述べる。ICS/LABA 配合剤も LAMA も吸入後横隔膜筋収縮力を上げることにより吸気量を増やすことに関わっていると考えられる。もし、胸郭の約 500cm² の断面積を 1cm 下方に吸うことができると、500ml の吸気量を増やし、呼吸運動の補助をされると考えられる。また収縮力を上げて肺疾患における呼吸筋疲労を防御しようと考えられる。ICS/LABA 配合剤も LAMA も抗炎症性を有していることは、気管支喘息の抗アレルギー性に働くだけでなく COPD においても抗炎症性により、疾患の進展抑制や急性増悪の予防に役立つことが予測される。なぜ吸入剤の薬物が呼吸筋に到達しているかという事は、これらの吸入時に肺内の気道、気管支のみならず、口腔や咽頭粘膜に沈着した薬剤が吸収されかつ経静脈性に循環し、横隔膜動脈を介して横隔膜筋に到達するものと考えられる。

(6)今回の検討により、これらの吸入剤は呼吸筋の収縮特性を増加させ、呼吸運動を補助し呼吸困難感を減少させるものと言える。また、エンドトキシン投与の横隔膜筋への効果を検討することで、ICS/LABA 配合剤、LAMA 製剤による抗炎症性を認めることができた。近年、喫煙の影響による COPD 患者の増加が世界的・国民的問題として捉えられているが、その患者に起こりうる呼吸筋不全状態に対して、ICS/LABA 配合剤、LAMA 製剤の臨床における意義は大きいと考えられる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

進藤千代彦、吸入剤による呼吸筋収縮増強効果の検討、アレルギーの臨床、査読無、36 巻 2 月号、2016、pp. 54-59

Masahito Miura, Tsuyoshi Nagano, Naomi Murai, Yuhto Taguchi, Tetsuya Handoh, Minami Satoh, Satoshi Miyata, Lawson

Miller, Chiyohiko Shindoh, Bruno D Stuyvers. Effect of carbenoxolone on arrhythmogenesis in rat ventricular muscle. Circulation Journal, 査読有, Vol.80 No. 1, 2016, pp. 76-84
DOI: 10.1253/circj.CJ-15-0401

Hiroyuki Yamamoto, Kyoko Yamamoto, Katsumi Yoshida, Chiyohiko Shindoh, Kyoko Takeda, Masami Monden, Hiroko Izumo, Hiroyuki Niinuma, Yutaro Nishi, Koichiro Niwa and Yasuhiro Komatsu. Modified cut-off value of the urine protein-to-creatinine ratio is helpful for identifying patients at high risk for chronic kidney disease: Validation of the revised Japanese guideline. Tohoku J. Exp. Med. 査読有, Vol.237, 2015, pp.201-207
DOI: 10.1620/tjem.237.201

Masahito Miura, Yuhto Taguchi, Tsuyoshi Nagano, Mai Sasaki, Tetsuya Handoh, Chiyohiko Shindoh. Effect of myofilament Ca²⁺ sensitivity on Ca²⁺ wave propagation in rat ventricular muscle. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 査読有, Vol. 84, 2015, pp.162-169
<http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.04.027>

Chiyohiko Shindoh, Rie Shishido, Natsu Narumi, Hiroshi Takano and Masahito Miura. Effects of Long-Acting β -Agonist and Corticosteroid Inhalation² on Diaphragm Muscle in Mice. Journal of Drug Metabolism & Toxicology, 査読有, Vol.5, 2015, pp.176-182
DOI: 10.4172/2157-7609.1000176

Kyoko Yamamoto, Hiroyuki Yamamoto, Katsumi Yoshida, Koichiro Niwa, Yutaro Nishi, Atsushi Mizuno, Masanari Kuwabara, Taku Asano, Kunihiro Sakoda, Hiroyuki Niinuma, Fumiko Nakahara, Kyoko Takeda, Chiyohiko Shindoh, Yasuhiro Komatsu. The total urine protein-to-creatinine ratio can predict the presence of microalbuminuria. PLOS ONE, 査読有, Vol. 9, issue 3, 2014, pp.e91067-e91073.

Masahito Miura, Naomi Murai, Taiki Hattori, Tsuyoshi Nagano, Bruno D. Stuyvers, Chiyohiko Shindoh. Role of reactive oxygen species and Ca²⁺ dissociation from the myofilaments in determination of Ca²⁺ wave propagation in rat cardiac muscle. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 査読有, Vol. 56, 2013, pp. 97-105.

[学会発表] (計 12 件)

Chiyohiko Shindoh, Kazunobu Yamaguchi, Yurina Kato, Hiroshi Takano, Masahito Miura. Effects of the inhalations of ICS, LABA and LAMA on diaphragm muscle contraction. ISAM2015 (20th Congress of International Society for Aerosols in Medicine), June 3, 2015, Munich (Germany)

山口和宣、進藤千代彦、村山史秀、小椋香苗、高野 頌、進藤百合子、三浦昌人、OVA喘息モデルマウスにおける吸入ステロイド/₂刺激薬投与による横隔膜筋収縮特性、第64回日本アレルギー学会学術大会、May 27、2015、グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール（東京）

Y. Yamaguchi, C. Shindoh, Y. Kato, M. Miura. The Effect of Steroid/ β -Agonist Combination Inhalation on Diaphragm Muscle Contractile Properties in a Mouse Model of Asthma. American Thoracic Society International Conference 2015, May 19, 2015, Denver (USA)

Y. Yamaguchi, C. Shindoh, K. Kobayashi, M. Miura. Changes in Diaphragm Muscle Contractile Properties In A Mouse Model Of Asthma. American Thoracic Society International Conference 2014, May 20, 2014, San Diego (USA)

高野 頌、村山史秀、小椋香苗、進藤千代彦、ラクトース・キャリア型ドライパウダー吸入剤における非球状薬剤粒子の空気動力学的挙動解析、第26回日本アレルギー学会春季臨床大会、May 11, 2014、国立京都国際会館（京都）

山口和宣、進藤千代彦、村山史秀、小椋香苗、高野 頌、進藤百合子、三浦昌人、OVA喘息モデルマウスの横隔膜筋収縮特性、第26回日本アレルギー学会春季臨床大会、May 9, 2014、国立京都国際会館（京都）

高野 頌、大原誉士、正田祐数、玉置和也、村山史秀、小椋香苗、進藤千代彦、伊藤正行、ドライパウダー吸入剤の空気力学径と気道局所送達度の評価、第38回吸入療法研究会、Feb 22, 2014、大手町サンケイプラザ（東京）

進藤千代彦、山口和宣、村山史秀、小椋香苗、高野 頌、進藤百合子、三浦昌人、IL-17、IL-23の腹腔内投与による横隔膜筋収縮に対する効果、第63回日本アレルギー学会秋季学術大会、Nov 30, 2013、ホテルニューオータニ（東京）

村山史秀、朝井 慶、村山菊野、高野 頌、進藤千代彦、土居 悟、豊島協一郎、カスケ

ードインパクターを用いたブデソニドの気管支沈着率の検討（剤型・機種での違い）第37回吸入療法研究会、June 22, 2013、フクラシア東京ステーション（東京）

C. Shindoh, N. Narumi, T. Nagano, H. Takano, M. Miura, Effects of the inhalation of tiotropium mist on diaphragm muscle contraction. American Thoracic Society International Conference 2013, May 21, 2013, Philadelphia (USA)

進藤千代彦、鳴海奈津、村山史秀、小椋香苗、高野 頌、進藤百合子、三浦昌人、横隔膜筋収縮に対するLPS吸入とBUD/FM吸入効果の検討、第25回日本アレルギー学会春季臨床大会、May 12, 2013、パシフィコ横浜（横浜）

進藤千代彦、工藤純一、鳴海奈津、村山史秀、小椋香苗、高野 頌、進藤百合子、三浦昌人、カバノアナタケ抽出物による横隔膜筋収縮に対する効果の検討、第25回日本アレルギー学会春季臨床大会、May 11, 2013、パシフィコ横浜（横浜）

〔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
<http://www.med.tohoku.ac.jp/org/health/83/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

進藤 千代彦 (SHINDOH, Chiyohiko)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号：10216228