気管支喘息におけるリンパ球 Phosphodiesterase 活性値について

大川 健太郎, 山崎 公世, 原口 龍太
大石 光雄, 中島 重徳

Lymphocyte Phosphodiesterase Activity in Bronchial Asthma

Kentaroh Ohkawa, M.D., Kimiyo Yamasaki, M.D., Ryuta Haraguchi, M.D.,
Mitsuo Ohishi, M.D., and Shigenori Nakajima, M.D.

Fourth Department of Internal Medicine, Kinki University School of Medicine, Osaka

Phosphodiesterase is the only enzyme that catalyzes the hydrolysis of cyclic AMP to 5'AMP, and the relaxation of smooth muscle is the result of an intracellular increase in the level of cyclic AMP. It has been generally assumed that the bronchodilatory properties of theophylline in asthma therapy are due to its cyclic AMP-phosphodiesterase inhibitory capacity. In recent years, a number of studies on the action of theophylline have led to a general hypothesis which suggests that xanthine derivatives act as adenosine receptor antagonists. In the present study, we reported that the lymphocyte cyclic AMP level showed an obvious increase only in asthma patients after the administration of theophylline, while the level was the same in asthma patients and healthy adults before this administration.

The difference in phosphodiesterase activity between patients and healthy adults in one of the causes of the difference in the lymphocyte cyclic AMP level.

In this study, we examined lymphocyte phosphodiesterase activity and the following results were obtained.

- 1) The lymphocyte phosphodiesterase activity was higher in patients with bronchial asthma than in healthy adults.
- 2) The lymphocyte phosphodiesterase activity level showed an obvious decrease only in patients with asthma.

These results suggest that phosphodiesterase activity is related to the mechanism of bronchial asthma, and the hypothesis that theophylline is an inhibitor of phosphodiesterase is confirmed.

Key words : bronchial asthma, cyclic AMP, lymphocyte phosphodiesterase

I. 緒 言

Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase (以下 PDE) は, cyclic AMP (以下 cAMP) および cyclic GMP (以下 cGMP) を加水分解して, それぞれの 5'-nucleotide にする酵素であり, この反応が cyclic nucleotide を分解し,

つまり cyclic nucleotide 系での情報停止を行う唯一の酵素とされている。

1962年, Butcher と Sutherland が theophylline の cAMP 分解阻止, つまり cAMP を 5'-AMP へと分解する PDE を阻害するという知見を示して以来¹⁾, theophylline の気管支拡張作用はこの説に基づいてきた。しかしながら, 気道の平滑筋の PDE を阻害する theophylline の濃度は治療濃度を上回り²⁾, 臨床上有効な濃度では10~20%の PDE 阻害しか得られない³⁾ という知見より, アデノシン受容体に対する拮抗作用が, theophylline の気管支拡張作用を説明する一般的なものとなった。

ところが, アデノシン拮抗作用を有さずに, しかも, theophylline の5倍の気管支拡張作用を有する新しい xanthine の誘導体である enprofylline の登場により, アデノシン受容体に対する作用も確かなものではなくなった。これまでにわれわれは, 気管支喘息 (以下喘息) 患者と健常者の aminophylline の投与後のリンパ球 cAMP および cGMP の変化を検討し, 喘息患者では, 健常者に比べて, リンパ球 cAMP の増加率が有意に大きいことを報告した⁴⁾。この差は両者の PDE 活性の差による可能性を確認し, また theophylline の気管支拡張作用の一端を明らかにするために, 喘息患者と健常者のリンパ球 PDE 活性値について検討した。

II. 対 象

対象は, 喘息群50例 (男35例, 女15例, 年齢 45.0 ± 18.3 歳), 健常群20例 (男13例, 女7例, 年齢 39.7 ± 12.0 歳) の計70例である。両群の年齢には有意差はなかった。両群とも心不全, 腎不全, 肝機能障害を有する者は対象から除いた。また, マクロライド系抗生物質, H₂受容体拮抗剤, フェノバルビタール等の theophylline の臨床薬物動態値に影響を及ぼすと考えられる薬剤を服用している者も対象から除いた。

性別, 年齢, 喘息重症度, 喘息の型におけるリンパ球 PDE 活性値の比較には, β_2 刺激剤, ステロイド剤の影響を除くために, 徐放性 theophylline 製剤 (Theo-Dur[®] 400 mg) のみを内服している者を対象とした。

なお, 今回の実験については, 健常群, 喘息

群の各被検者に実験内容の詳細を説明し, aminophylline 静注, terbutaline 皮下注, ならびに採血に関して承諾を得た上で施行した。

III. 方 法

Theophylline の投与は, aminophylline 250 mg を20%ブドウ糖20 ml とともに肘静脈よりゆっくりと静脈内投与し, aminophylline 投与前, 30分後, 60分後に対側肘静脈より普通採血およびヘパリン加採血を施行した。 β_2 刺激剤の投与は terbutaline sulfate を上腕伸側に皮下注射し, 注射前, 30分後, 60分後に採血した。血清 theophylline 濃度は fluorescent immunoassay 法にて測定し, また血清 terbutaline 濃度は, ガスクロマトグラフィーにて測定した。リンパ球 cAMP の測定は, 試料をサクシニル化することにより測定感度を著しく高めた radio immuno assay kit (YAMASA) により実施した。リンパ球の採取は Boyum の方法に準じて行い, HClO₄ 添加処理後, KOH で中和したものを検体とした。

リンパ球 PDE 活性値の測定は, Pösch の方法を用いて測定した。反応液は³H-cAMP 1.3×10^{-8} M, MgSO₄ 3×10^{-3} M, Tris-HCl 緩衝液 1.25×10^{-2} M, 5'-AMP 2×10^{-3} およびリンパ球浮遊液からなる 1 ml である。基質を除く反応液を10分間プレインキュベーションし, その後 37°C で30分間インキュベーションした。氷冷した 1.7×10^{-1} M Ba(OH)₂ 0.2 ml で反応停止し, 1×10^4 rpm で10分間遠沈し, 上清の 1 ml を検体とした。これをアトモライト 10 ml と混和して, PACKARD TRI-CARB 460 Liquid scintillation system (PACKARD INSTRUMENT CO, INC) にて³H-cAMP 量を求めた。

次に, 煮沸して酵素活性を失わせたリンパ球を用いて, 同様の操作を行い, 最終段階で得られた上清の³H-cAMP 量をコントロールとした。このコントロールと検体の³H-cAMP 量の差を PDE 活性値とし, リンパ球浮遊液蛋白 1 mg 当たり, インキュベーション 1 時間当たりの nmole (nmol/mg prot./h) で表した。

³H-3', 5'-cyclic AMP は, New England Nuclear により購入し, MgSO₄, Ba(OH)₂, ZnSO₄ は和光純薬工業より購入した。また 5'

AMP は SIGMA 社より購入した。

IV. 結 果

1. 気管支喘息患者における, 性別, 年齢, 喘息重症度, 喘息の型とリンパ球 PDE 活性値について

図 1 は, 性別, 年齢とリンパ球 PDE 活性値を示しているが, 男性 0.81 ± 0.30 nmol/mg prot./h, 女性 0.81 ± 0.37 nmol/mg prot./h, また年齢

では, 20歳 から40歳が 0.81 ± 0.37 nmol/mg prot./h, 40歳から60歳が 0.74 ± 0.32 nmol/mg prot./h, 60歳以上が 0.77 ± 0.32 nmol/mg prot./h と, 性別, 年齢では PDE 活性値に差は見られなかった。

次に発作の程度に関しては, 発作のない者 0.85 ± 0.41 nmol/mg prot./h, 中発作 0.80 ± 0.25 nmol/mg prot./h で, 大発作はなかったが, 発作の程度と PDE 活性値の間には明らか

図 1 性別, 年齢によるリンパ球 PDE 活性値
リンパ球 PDE 活性値には, 性, 年齢により差はみられなかった。

図 2 ステロイドのリンパ球 PDE 活性値への影響
ステロイド依存喘息患者と非依存患者の間にリンパ球 PDE 活性値の差はみられなかった。

な関係はなかった。また、喘息の型別でみると、アトピー型 0.81 ± 0.31 nmol/mg prot./h, 感染型 0.82 ± 0.36 nmol/mg prot./h, 混合型 0.61 ± 0.22 nmol/mg prot./h と各型の間に明らかな差は認められなかった。

2. 気管支喘息患者における、各種薬剤のリンパ球 PDE 活性値に及ぼす影響について

図 2 左は、プレドニン換算で 1 日投与量 10 mg 以上のステロイド依存の喘息患者と、そうでない者との比較であるが、リンパ球 PDE 活性値は両者に明らかな差は認められなかった。図 2 右は、検査直前の血清 theophylline 濃度とリンパ球 PDE 活性値との関係であるが、RTC 療法中の血清 theophylline 濃度とリンパ球 PDE 活性値の間には明らかな関係は見られなかった。

図 3 は、 β_2 刺激剤のリンパ球 PDE 活性値への影響を示したものである。 β_2 刺激剤は terbutaline sulfate 12 mg/day を少なくとも一か月間連用しているものを対象とした。Ter-

図 3 喘息患者と健常者のリンパ球 PDE 活性値
喘息患者において、テルブタリンを投与されている者のリンパ球 PDE 活性値が、投与されていない者より高値を示した。また喘息患者のリンパ球 PDE 活性値は、健常者より高値を示した。

butaline sulfate と Theo-Dur®併用群のリンパ球 PDE 活性値は 1.02 ± 0.28 nmol/mg prot./h, Theo-Dur®単独群 0.66 ± 0.23 nmol/mg prot./h と terbutaline sulfate と Theo-Dur®併用群が、theo-Dur®単独群より有意に低値を示した。

3. Aminophylline 投与後のリンパ球 cAMP とリンパ球 PDE 活性値の経時的変化について

図 4 は、aminophylline 投与後の血清 theophylline 濃度とリンパ球 cAMP との関係を示したものである。リンパ球 cAMP は、aminophylline 静注前、喘息群で 9.6 ± 4.7 pmol/ 10^7 cell, 健常群で 9.1 ± 3.4 pmol/ 10^7 cell と両群間に明らかな差はみられなかった。しかし、喘息群で aminophylline 静注後 30 分で 15.9 ± 9.1 pmol/ 10^7 cell, 60 分で 17.7 ± 10.0 pmol/ 10^7 cell と、静注前と比較して有意の上昇を示したが、健常群では明らかな変化を認めなかった。

次に、同時に測定したリンパ球 PDE 活性値の経時的変化を示す (図 5)。aminophylline 投

図 4 喘息患者と健常者における aminophylline 投与後の血清 theophylline 濃度とリンパ球 cAMP の経時的変化

喘息患者において aminophylline 投与によりリンパ球 cAMP は増加したが、健常者においては明らかな上昇は見られなかった。

与前のリンパ球 PDE 活性値は喘息群が 0.91 ± 0.41 nmol/mg prot./h, 健常群が 0.28 ± 0.06 nmol/mg prot./h と喘息群が健常群より有意に高い値を示した。そして喘息群において, aminophylline 投与後60分で 0.61 ± 0.27 nmol/mg prot./h と, 投与前と比較して有意に低い値を示した。前値と比較すると約33%の低下率であった。しかし健常群においては, aminophylline 投与によるリンパ球 PDE 活性値に明らかな変化は見られなかった。

4. B₂ 刺激剤 (Terbutaline sulfate) 投与によるリンパ球 PDE 活性値の経時的変化について

Terbutaline sulfate 皮下注前のリンパ球 cAMP 値は, 投与前では喘息群 7.1 ± 3.0 pmol/ 10^7 cell, 健常群 4.3 ± 1.9 pmol/ 10^7 cell と両群間に明らかな差は見られず, 投与後30分, 60分後には両群とも前値より高値を示した (図6)。次に, 同時に測定したリンパ球 PDE 活性値の経時的変化を示す (図7)。Terbutaline sulfate

図6 喘息患者と健常者における terbutaline 投与後の血清 terbutaline 濃度とリンパ球 cAMP 値の経時的変化

Terbutaline 投与後, 喘息患者と健常者の両群において, リンパ球 cAMP 値は増加した。

図5 喘息患者と健常者における aminophylline 投与後のリンパ球 PDE 活性値の経時的変化
喘息患者のリンパ球 PDE 活性値は健常者より高値を示した。また, 喘息患者らにおいてのみリンパ球 PDE 活性値は, aminophylline 投与後, 減少した。

図7 喘息患者と健常者における terbutaline 投与後の血清 terbutaline 濃度とリンパ球 PDE 活性値の経時的変化
terbutaline 投与後, 喘息患者と健常者の両群において, リンパ球 PDE 活性値は変化しなかった。

皮下注射前のリンパ球 PDE 活性値は, 喘息群 0.77 ± 0.11 nmol/mg prot./h, 健常群 0.28 ± 0.07 nmol/mg prot./h と喘息群が健常群より有意に高い値を示したが, 両群とも, terbutaline sulfate により, リンパ球 PDE 活性値は, 明らかな変化を示さなかった。

V. 考 察

これまでに, われわれは, 血漿およびリンパ球 cyclic nucleotides への theophylline の影響を検討し, 健常群と喘息群の間には theophylline に対するリンパ球 cAMP の反応に差があることを報告した⁴⁾。つまり, 今回の検討においても図 4 に示したように, theophylline 投与により喘息群では投与前と比較して有意にリンパ球 cAMP の増加が認められたが, 健常群では明らかな変化が見られなかった。この差は PDE 活性の差による可能性が予想されるわけであるが, 今回の検討において図 5 に示したように, 喘息群は健常群よりリンパ球 PDE 活性値は有意に高値であり, しかも theophylline の影響は喘息群においてのみ明らかであった。

無江ら⁵⁾は, 気管支喘息患者の非発作時は健常者よりも PDE 活性がやや低く, 発作時には非発作時よりも PDE 活性が明らかに上昇したと報告している。また岡部ら⁶⁾は, 気管支喘息患者の PDE 活性が健常者より高値を示したと報告している。

喘息患者の気道過敏性は自律神経の異常, 気道の炎症等, 様々なものがある原因と考えられているが, 気管支拡張作用は cAMP による myosin light chain kinase の不活性化が考えられており⁷⁾, その cAMP を分解する PDE が, 喘息患者において, 健常者より高値を示すことは理にかなっていると考えられる。

また喘息に対する RTC 療法中の, 血清 theophylline 濃度とリンパ球 PDE 活性値に相関が認められず, aminophylline の静注により喘息患者においてリンパ球 PDE 活性値の低下が見られたことは, PDE 活性の変化には急激な theophylline 濃度の変化が必要であることを示唆していると考えられる。

次に, terbutaline sulfate の長期投与群の PDE 活性が terbutaline 非投与群より高値を示

したのは, β 刺激剤と Xanthine 剤の併用により, cAMP の増加が Xanthine 単独群より大きいため, negative feedback 機構が働き, PDE 活性が高値を示したと考えられる。1972年に, Manganiello & Vaughan⁸⁾は, 線維芽細胞の低 Km PDE 活性が, メジウムの中への PGE_1 の添加によってほぼ 2 倍近くに増加するのを見出した。 PGE_1 の代わりに dibutyryl cAMP を用いても同様なことが生ずるため, PGE_1 による cAMP 濃度の上昇が PDE 活性化の引き金になったものと推定される。

その後, D'Armiento ら⁹⁾, Uzunov ら¹⁰⁾が同様のデータを示し, 垣内¹¹⁾は, これらのデータに共通してみられることは, 活性化されるのは膜結合性の低 Km cAMP-PDE であり, その過程は数時間から数十時間にわたるもので, 酵素の誘導が起きていると考えられることであると述べている。

今回のわれわれの検討において, terbutaline sulfate 長期投与群の PDE 活性は高値を示したが, terbutaline sulfate を皮下注射した後 60 分までの経過で, PDE 活性に変化がみられなかった (図 7) のは, 上記の理由による可能性がある。

Appleman らは, PDE には大きく分けて 3 種類あり, cGMP-PDE, cyclic nucleotide PDE, cAMP-PDE に分類しているが, 垣内¹¹⁾は, 便宜的に type 1, type 2, type 3 と名付けている。今回の検討に用いた Pösch の方法は, ^3H -cAMP がリンパ球 PDE に分解されて放射活性が低下する, その減少分を PDE 活性値とみる方法であり, 測定している PDE は, cAMP を分解するものである。

この方法は, 阻害剤の効果をみるには最適の方法であり, 再現性も極めて良いものである。theophylline の PDE におよぼす影響は, 他の報告³⁾よりわずかに大きい 33% であったが, この事実のみでは, theophylline の作用機序が, PDE 阻害によるものであると即断はできない。今回使用した theophylline は, aminophylline 250 mg で, 測定した血清 theophylline 濃度は, 現在臨床上有効とされている $10 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ の範囲であり, また PDE の阻害率と気管支平滑筋の弛緩の割合が同じである必要はない。カプ

サイシンによる血管透過性亢進に対する theophylline の抑制効果の報告もあるが¹²⁾ Butcher と Sutherland¹⁾の説も、やはり完全に否定されるものではないと考えられる。

VI. 結 論

Theophylline のリンパ球 cAMP とリンパ球 PDE 活性値への影響を検討した結果, 以下の知見を得た。

1) リンパ球 PDE 活性値は, 性別, 年齢, 喘息の型によって明らかな差は見られなかった。

2) リンパ球 PDE 活性値は, 喘息群が健常群より有意に高値を示した。

3) リンパ球 cAMP は, aminophylline 静注後30分, 60分に喘息群において前値と比較して有意に増加したが, 健常群では, 明らかな変化は見られなかった。

4) リンパ球 PDE 活性値は, aminophylline 静注60分後, 喘息群において前値と比較して有意に低下したが, 健常群では明らかな変化は見られなかった。

文 献

- 1) Butcher, R.W., and Sutherland, E.W.: Adenosine 3'5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3'5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine-3'5'-phosphate in human urine. *J. Biol. Chem.*, 237: 1224-1250, 1962.
- 2) Lohmann, S.M., Miech, R.P., and Butcher, F. R.: Effects of cyclic nucleotide levels and relaxation of bovine tracheal muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, 499: 238-250, 1977.
- 3) Polson, J.B., Krzanowski, J.J., Goldmann, A. L., et al.: Inhibition of human pulmonary phosphodiesterase activity by therapeutic levels of theophylline. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 5: 536-539, 1978.
- 4) 大川健太郎, 山崎公世, 平池優子・他: 気管支喘息における theophylline 投与の内因性 cyclic nucleotides への影響について. *近畿大医誌*, 10: 43-49, 1985.
- 5) 無江季次, 伊勢忠男, 小野康夫・他: 気管支喘息患者白血球 phosphodiesterase について. *アレルギー*, 24: 490-496, 1975.
- 6) 岡部俊成, 山本正生, 鈴木美貴子・他: ホスホジエステラーゼ (PDE) 活性測定法の検討及び気管支喘息児における PDE 値について. *アレルギー*, 35: 867, 1986.
- 7) Adestein, R.S., and Hathway, D.R.: Role of calcium and cyclic adenosine 3'5' monophosphate in regulating smooth muscle. *Am. J. Card.*, 44: 783-787, 1979.
- 8) Maganiello, V., and Vaughan, M.: Prostaglandin E_1 effects on adenosine 3'5'-cyclic monophosphate concentration and phosphodiesterase activity in fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 269-273, 1972.
- 9) D'Armiento, M., Johnson, G.S., and Pastan, I.: Regulation of adenosine 3'5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase activity in fibroblasts by intracellular concentration of cyclic adenosine monophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 459-462, 1972.
- 10) Uzunov, P., Shein, H.M., and Weiss, B.: Cyclic AMP phosphodiesterase in cloned astrocytoma cells. *Science*, 180: 304-306, 1973.
- 11) 垣内史朗: ホスホジエステラーゼ活性の調節. *代謝*, 13: 813-820, 1976.
- 12) Erjefält, I., and Persson, C.G.: Pharmacologic control of plasma exudation into tracheobronchial airway. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 143: 1008-1014, 1991.