

1. 気道粘膜からの吸収に関する実験的研究 ——特にヒト血清ガンマグロブリンについて——

稲垣政志、坂倉康夫、三井 洋
原田輝彦、三吉康郎 (三重大)

経気道薬物投与は気道の種々の病変に対する局所薬物療法として日常臨床で広く用いられている。気道粘膜に吸収能力のあることは以前より多くの報告が有るが、その機序に関する基礎的知識は日常臨床に応用できるほど十分に蓄積されているとは言えない。そこで今回我々は、気道粘膜に投与した薬物が：1)どの程度、2)どこを通過して、3)どの様な型で吸収されるかを検討した。

本研究で主に検討を加えたヒスタグロビンは作用機序よりみて、本剤を鼻アレルギー患者の局所にネブライザーによって投与した場合、同様の効果が期待される。故に本剤の局所応用の可能性を検討する研究の一環としてヒト血清ガンマグロブリンの気道粘膜からの吸収をウサギ気管粘膜を用いて実験した。

実験方法はdouble chamber法を用い、ウサギ気管から採取した気管壁片約5×5mmを、図1の如く上下のchamberの間に密封し、upper chamberに検定薬剤を入れ、3時間、4℃あるいは37℃でincubateし、lower chamberへ移行した薬物量を微量定量した(図2)。定量法には、イムノ・フローヒトIgG用蛍光イムノアッセイ・キット(図2)を用いた。まず検体液に0.5mlのIgGイムノビーズ試薬を加え攪拌し、37℃1時間半保温し、次に25ulのIgGフルオレスセント試薬を加え攪拌し、37℃にて再び1時間保温する。2mlの0.15M NaCl 0.01Mリン酸緩衝液を加え攪拌し、1700Gで8分間遠沈し上清を除く。2度同様の操作をくり返した後、同じ緩衝液3mlを加え、日立204型蛍光分光光度計で蛍光測定した。また、吸収経路は組織片をcold ethanolで固定し、蛍光抗体法によって観察した。

DOX、Bekanamycin、CEZは分子量がそれぞれ513、483、476であるが、気管壁を通過してupper chamberからlower chamberに移行しており、その移行濃度は 10^{-3} ~ 10^{-4} であった。一方ヒスタグロビン中のヒトIgGも極めて微量であったがlower chamberへの移行が認められた(表1)。前3者とIgGとの移行を比較すると著明な差が認められるが、これはDOXら低分子物質とIgGの様な高分子物質とでは吸収経路に差異があることが推測される。そこで、この移行がエネルギー代謝を伴うものかどうかを見るために、4℃と37℃で各々incubateし移行濃度を見てみた。DOXは4℃で移行濃度5.0mcg/ml、37℃で6.3mcg/mlでこの両者には有意な差は認められなかった。しかしIgGでは、4℃の時の移行濃度が0.1mcg/ml以下であり、37℃では0.5414mcg/mlで明らかに有意な差を認め、4℃の時のIgGの移行は抑制されている(表2)。

蛍光抗体法による免疫組織学的実験にて、その吸収経路を観察した。気管上皮のDOXによる蛍光は主として上皮細胞細胞間隙に観察され、上皮細胞の細胞質中には殆んど存在しない。ヒスタグロビンをを用い37℃3時間incubateした気管上皮では、低倍率では上皮細胞表面の繊毛の上に蛍光が認められる。高倍率では、上皮細胞表面と上皮細胞細胞質、細胞間隙に蛍光を見ることが出来る。又基底膜直下の結合組織内にも蛍光物質の沈着が認められた。

そこで我々は、低分子物質であるDOX等と高分子物質であるヒトIgGの気管上皮での移行について次の様に推測した。DOX等の低分子物質の吸収経路で、温度による変化がないことから見て、これらの吸収はエネルギー消費を伴わない拡散によるものと考えることが出来る。ヒトIgGの吸収経路は、その吸収温度依存性が強いことから上皮細胞のエネルギー代謝を必要とする吸収が考えられる(図3)。即ち、分子量150000のヒトIgGの様な高分子物質の吸収はエネルギー依存性の吸収過程bulk transport(endocytosis)と推察され、DOXの吸収と全く異なった機序で行なわれることを示している。

Upper chamberに入れた6mcg/mlのヒスタグロビンは極めて低濃度であったがlower chamberに移行したので、生体内でも鼻粘膜より吸収されると推測される。又endocytosisにてヒスタグロビン自体が代謝されずに通過しているか否かをdisk electrophoresisにて確認したが、泳動上IgGが認められ恐らく代謝されずに

通過しているものと考えられた。

以上ヒトIgGの気管上皮での吸収についてヒスタグロビンをを用い検討したので報告した。

図1 Double chamber method

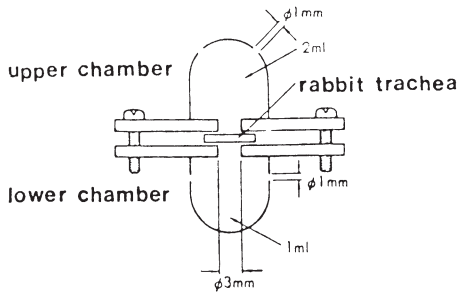
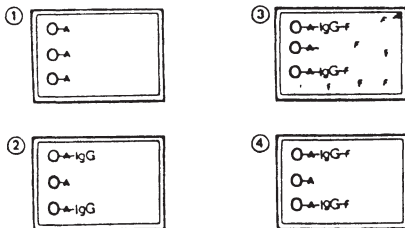


図2 Principle of Immuno-flour



O; Anti human IgG coupled to small beads
F; Fluorescently labeled anti human IgG

図3 The model of mucosal absorption in rabbit trachea

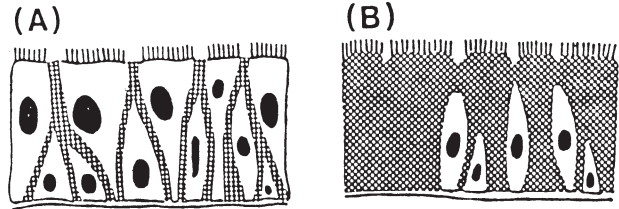


表1 Mucosal absorption of drugs and human IgG

	No.	Concentration (mcg/ml) ± S.D.	M.w.
DOX	29	5.5 ± 4.2	512.94
Bekanamycin	14	7.3 ± 4.5	483.5
CEZ	24	7.5 ± 5.4	476.49
human IgG	76	0.5414 ± 0.4929	150000

表2 Temperature-controlled study of mucosal absorption

	No.	Concentration (mcg/ml) ± S.D.
DOX	4°C	18 5.0 ± 2.7
	37°C	11 6.3 ± 6.0
human IgG	4°C	12 less than 0.1
	37°C	76 0.5414 ± 0.4929