

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5908884号
(P5908884)

(45) 発行日 平成28年4月26日(2016.4.26)

(24) 登録日 平成28年4月1日(2016.4.1)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 31/136	(2006.01)
A 61 K 9/12	(2006.01)
A 61 K 9/08	(2006.01)
A 61 P 11/00	(2006.01)
A 61 P 29/00	(2006.01)
A 61 K	31/136
A 61 K	9/12
A 61 K	9/08
A 61 P	11/00
A 61 P	29/00

請求項の数 10 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-500079 (P2013-500079)
(86) (22) 出願日	平成23年3月8日(2011.3.8)
(65) 公表番号	特表2013-522295 (P2013-522295A)
(43) 公表日	平成25年6月13日(2013.6.13)
(86) 國際出願番号	PCT/US2011/027494
(87) 國際公開番号	W02011/115778
(87) 國際公開日	平成23年9月22日(2011.9.22)
審査請求日	平成26年3月4日(2014.3.4)
(31) 優先権主張番号	61/416,353
(32) 優先日	平成22年11月23日(2010.11.23)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/313,877
(32) 優先日	平成22年3月15日(2010.3.15)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	512239686 ヴァージニア コモンウェルス ユニヴァ ーシティ VIRGINIA COMMONWEAL TH UNIVERSITY
(74) 代理人	100071526 弁理士 平田 忠雄
(74) 代理人	100098597 弁理士 角田 賢二
(74) 代理人	100119208 弁理士 岩永 勇二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 気道炎症及び粘液線毛輸送機能異常治療用のエアロゾル化したダブソン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エアロゾル投与装置内の気体媒質に浮遊し接触する薬学的有効量のエアロゾル化したダブソン粒子を含有することを特徴とする、

気道炎症の予防又は治療を必要とする患者の気道炎症を予防又は治療するための吸入投与用医薬組成物。

【請求項 2】

水溶液中に薬学的有効量のダブソンを含有することを特徴とする、

気道炎症の予防又は治療を必要とする患者の気道炎症を予防又は治療するための吸入投与用医薬組成物。

【請求項 3】

前記患者は、囊胞性線維症、気管支拡張症、閉塞性細気管支炎、肺気腫、慢性気管支炎、慢性鼻副鼻腔炎、吸引毒性傷害、慢性閉塞性肺疾患、特発性肺線維症、喘息及び慢性気道炎症からなる群から選ばれる疾病又は疾患を患っている請求項1又は2に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記水溶液は、前記水溶液のエアロゾルの噴霧化により投与される請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記医薬組成物は、1日1回投与される請求項1～4のいずれか1項に記載の医薬組成

物。

【請求項 6】

前記医薬組成物は、均等な時限的投薬量で1日に2～12回投与される請求項1～4のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記医薬組成物の投与量は、1回の投与につき体重1kgあたり0.5mgから体重1kgあたり5.0mgである請求項1～5のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記医薬組成物の投与量は、1回の投与につき体重1kgあたり1.0mgから体重1kgあたり4.0mgである請求項7に記載の医薬組成物。

10

【請求項 9】

前記医薬組成物の投与量は、1回の投与につき体重1kgあたり1.5mgから体重1kgあたり3.0mgである請求項8に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記医薬組成物の投与量は、1回の投与につき体重1kgあたり2.0mgである請求項9に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に、気道炎症の、及び、気道炎症の特徴がある疾患又は疾病的治療に関する。特に、本発明は、哺乳類の生体内に投与した場合に気道炎症を軽減するエアロゾル化したダブソン（又は、ダブソンの水性製剤）を提供する。

20

【背景技術】

【0002】

気道の炎症、特に喘息、囊胞性線維症、肺気腫及び慢性閉塞性肺疾患などの慢性炎症性疾患に関連する疾患は、往々にして衰弱性であり、複雑であり、治療に費用がかかる。一般的に好中球支配性炎症の特徴があるこれら疾病に対する現在の治療の選択肢は、免疫系の過剰活動を抑制するためのステロイドの使用及びマクロライド系抗生物質の投与を含む。しかし、これらの治療には、いずれも欠点がある。ステロイドは一般に免疫系を抑制するため、その使用により患者の感染症（例えば、日和見感染症）のリスクが高くなる。マクロライド系抗生物質の使用は、マクロライド耐性菌の進化を危険なほど高めることになる。明らかに、気道炎症治療のための改善された方策が必要である。

30

【0003】

合成スルホンであるダブソン（ジアミノジフェニルスルホン）は、ハンセン病、ニューモシスチス・ジロヴェチ（旧：ニューモシスチス・カリニ）肺炎及びマラリアなど様々な疾病的治療に使用され、奏効している。ダブソンは抗炎症剤としても認められており、好中球支配性炎症、例えば、疱疹状皮膚炎の特徴がある皮膚疾患を治療するため、全身及び局所的のいずれにおいても使用されている（2001年、Zhu et al.）。

【0004】

Berlow et al.（1990年）は、経口投与型ダブソンを用いたステロイド依存性喘息の治療を記載している。ステロイド依存性喘息が表れている患者は、病徵の再発を伴わずにステロイド投与を停止することは不可能であり、反面、特に長期間にわたるステロイド使用によって副作用を発症する危険性がある。研究の結果は、10人中9人の患者が、ダブソンを服用しながら実質的にステロイド摂取を減量又は停止することができたことを示している。しかし、経口（従って、全身）投与では、10人中9人の患者が著しい貧血を起こしている。

40

【0005】

Chougule et al.（2008年）は、ダブソンの噴霧乾燥リポソームドライパウダー吸入器用製剤の開発を研究しており、そのような製剤によるニューモシスチス・カリニ感染症治療の可能性について述べている。研究の目的は、体外における噴霧乾燥製剤の沈着を

50

評価することにある。結果は、専用拡散セルを用いて評価した場合に、セロファン膜を介した持続放出（16時間まで）を示すダブソンの噴霧乾燥製剤を研究者らが開発できたことを示している。市販のアンダーセンカスケードインパクタ装置を用いて、エアロゾル性能も評価している。研究者らによれば、「前途有望」と思われる結果であった。しかし、これらの結果は非常に予備的なものである。生体内試験を試みることなく、炎症に対する効果が実証も示唆もされていないからである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

このように、先行技術では、エアロゾル化したダブソン製剤を用いた好中球支配性気道炎症の治療法を提供するには全く至っていない。10

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、ダブソンのエアロゾル化した（又は、水性）製剤を用いた、気道炎症、特に、好中球支配性炎症の治療方法を提供する。本発明は、この方法のようにダブソンを哺乳類に投与した場合、患者の気道の好中球支配性炎症に伴う症状を解消（例えば、軽減、低下又は低減）することを実証する初めてのものである。また、本発明は、免疫抑制剤としてよりも免疫変調成分として機能するというダブソンの作用形態の初めての実証も含む。従って、炎症を治療するために、例えば、ステロイドの代わりにダブソンを投与することで、治療を受けている患者の感染症リスクが高まりにくくなる。更に、化合物が微生物に選択圧を加えることがないため、ダブソンの使用が抗生物質耐性菌株の増加に寄与することはない。特に重要なのは、本明細書で実証されるように、ダブソンは、経口及びエアロゾルのいずれにおいてもLPS誘導性上皮内好中球蓄積を減少させたが、エアロゾルのダブソンでの治療のみが（しかも、経口投与に求められる低濃度で）粘液線毛輸送機能を正常な状態に回復させたことである。更に、ダブソンの投与に的を絞ったこのやり方であれば、経口の全身ダブソン投与に起因する厄介な副作用（例えば、貧血）が発生しにくい。20

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1A - 1C】図1A～1Cは、NHE培養細胞からのIL-8分泌に対するダブソンの作用を示す。増殖因子をLPS又はダブソンの暴露の24時間前に培地から引き上げ、上清をLPS刺激の24時間後に採取した。図1A：10μg/mlのLPSでIL-8が大幅に増加し、0.3、1又は10μg/mlのダブソンがこの効果を抑制した。図1B：1μg/mlのダブソンでは、24、48及び72時間の時点で基礎IL-8分泌に影響はなかった。図1C：1μg/mlのダブソンが、24及び72時間の時点でLPS誘導性のIL-8分泌を対照群レベルにまで抑制した。値は、平均値±標準誤差(SE)である。n=6である。対照群(Cont)との比較で、*P<0.05、***P<0.001である。LPS単体との比較で、#P<0.05、##P<0.01である。30

【図2A - 2D】図2A～2Dは、気液界面条件下で培養されたNHE培養細胞からのLPS誘導性の頂端側（図2A及び2C）又は側底側（図2B及び2D）IL-8分泌に対するダブソン及びデキサメタゾン（DEX）の作用を示す。NHE細胞を、1μg/mlのダブソン（図2A及び2B）又は0.1μg/mlのDEX（図2C及び2D）の存在及び非存在下において媒地中で培養し、24時間にわたり頂端(AP)又は側底(BL)側から10μg/mlのLPSで刺激した。図2A：AP側LPSが、頂端側IL-8分泌を大幅に増加させ、ダブソンによりこの作用が抑制された。図2B：AP側及びBL側LPSが、側底側IL-8分泌を大幅に増加させ、ダブソンによりこの作用が抑制された。値は、平均値±SEであり、ダブソンにおいてn=6である。対照群との比較で、***P<0.001である。LPS単体との比較で、#P<0.05、###P<0.001である。図2C：AP側LPSが、頂端側IL-8分泌を大幅に増加させた。DEXが、LPS誘導性のIL-8分泌と共に基礎IL-8レベルを抑制した。図2D：AP側及びBL側LPSが、側底側IL-8分泌を大幅に増加させ、DEXによりこの作用が抑制された。値は、平均40

値±S Eであり、DEXにおいてn=4である。対照群との比較で、*P<0.05、**P<0.001である。LPS単体との比較で、#P<0.05である。

【図3】図3は、LPS誘導性IL-8 mRNA発現に対するダブソンの作用を示す。増殖因子は、LPS、ダブソン又はデキサメタゾン(DEX)の暴露の24時間前に培地から引き上げた。NHE細胞を、10μg/mlのLPS、0.3~10μg/mlのダブソン、0.1μg/mlのDEX又はその組み合わせで4時間にわたって刺激し、リアルタイムPCRを用いてIL-8 mRNA発現を評価した。1μg/mlのダブソンでは、基礎IL-8 mRNAレベルに影響はなかったが、DEXはこれを減少させている。10μg/mlのLPSがIL-8 mRNA発現を5倍を上回って増加させ、1及び10μg/mlのダブソンと0.1μg/mlのDEXによりこの作用が抑制された。データは、対照群と比較した倍率変化として表わされている。値は、平均値±S Eである。n=4である。対照群との比較で、*P<0.05、***P<0.001である。LPS単体との比較で、#P<0.05、##P<0.01である。

【図4】図4は、24時間にわたるLPS誘導性のMAPK活性化に対するダブソンの一時的作用を示す。増殖因子は、LPS又はダブソンの暴露の24時間前に培地から引き上げた。ウェスタンプロット法により、ERK1/2、p38及びJNKのトレオニンリン酸化及びチロシンリン酸化を計測した。NIH Image Jというソフトウェアで、バンド強度を計算した。10μg/mlのLPSでは[リン酸化(p)ERK1/2]/[ERK1/2]の比率が大幅に増加したが、[p-p38]/[p38]は増加しなかった。p-JNKは検出されなかった。1μg/mlのダブソンは、1時間の時点ではLPS誘導性のERK1/2リン酸化反応を抑制したが、4及び24時間の時点では抑制しなかった。値は、4回以上の個別の実験の平均値±S Eである。対照群(LPS-、ダブソン-、各回)との比較で、*P<0.05である。LPS単体との比較で、#P<0.05である。

【図5A-5B】図5A及び5Bは、LPS誘導性のERK1/2リン酸化反応(図5A)及びIL-8分泌(図5B)に対するPD98059(MEK阻害剤)の作用を示す。増殖因子は、LPSの暴露の24時間前に培地から引き上げた。20μMのPD98059を、LPS刺激の1時間前に添加した。図5A:LPSは、4時間の時点でERK1/2リン酸化反応を用量依存的に高め、PD98059によりこの作用が消滅した。値は、4回の個別の実験の平均値±S Eである。対照群(Cont)との比較で、*P<0.05、**P<0.01である。LPS単体との比較で、#P<0.05である。図5B:PD98059はLPS誘導性のIL-8分泌を抑制しなかった。値は、平均値±S Eであり、n=6である。対照群との比較で、***P<0.01である。

【図6A-6B】図6A及び6Bは、フェレットの気道におけるLPS誘導性好中球蓄積に対するダブソン治療の効果を示す。5日間毎日1日1回30分間、フェレットにLPS(10μg)被覆気管内チューブを挿管し、4日目~8日目には、経口又は噴霧形態でダブソンを投与した。9日目に気管を取り出し、組織学的分析を行った。4つの異なる部位からの試料ごとに8つのランダムな位置で150μm中の上皮内好中球の総数を数え、平均化した。図6A:経口のダブソンは、上皮内好中球数を減少させはしたが、大幅なものではなかった。数は、平均値±SDである。n=4である。図6B:噴霧化したダブソンは、好中球蓄積を大幅に抑制した。値は、平均値±SDである。賦形薬(vehicle)においてはn=4であり、ダブソンにおいてはn=5である。賦形薬(LPS+、ダブソン-)との比較で、*P<0.05である。

【図7A-7B】図7A及び7Bは、3mm断片上で測った、粘液線毛輸送機能(MCT)のLPS誘導性阻害に対するダブソン治療の効果を示す。図7A:経口のダブソンは、MCTを増進させはしたが、大幅なものではなかった(P=0.09)。値は、平均値±SDである。n=4である。図7B:噴霧化したダブソンは、正常レベルまでMCTを大幅に増進させた。値は、平均値±SDである。n=5である。賦形薬(LPS+、ダブソン-)との比較で、**P<0.01である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

10

20

30

40

50

本発明は、ダブソンのエアロゾル製剤投与による気道炎症の治療方法を提供する。理論により拘束されないが、ダブソンは、IL-8及びIL-13を抑制することにより、（免疫抑制に対立するものとしての）免疫調節効果を発揮すると思われる。システインXシステイン(CXC)ケモカインファミリーであるIL-8は、最も強力な好中球化学誘引物質の1つとして作用する。従って、IL-8活性の減衰は、炎症部位への好中球の動員を低下又は減少させ、これにより、その部位での好中球支配性炎症が減少又は低下する。IL-13は、喘息患者の杯細胞過形成を誘導することで知られており、この過程の抑制は、気道炎症の症状を制御するためにも役立つ。

【0010】

ステロイドが免疫抑制剤であり、その使用で炎症を抑えることができる一方で、その使用により免疫が抑制されてしまい、感染症（例えば、日和見感染症）のリスクが高くなることから、本発明の方法は、炎症に対するステロイドの使用と比べ、有利である。同様に、ダブソンの使用がマクロライド耐性菌の進化に寄与しないことから、ダブソンの使用は、マクロライド系抗生物質の使用と比べ、有利である。また、本明細書で実証されるように、ダブソンは、経口及びエアロゾルのいずれにおいてもLPS誘導性上皮内好中球蓄積を減少させたが、エアロゾルのダブソンでの治療のみが粘液線毛輸送機能を正常な状態に回復させている。（気道上皮に存在する纖毛によって行われる気管支の自浄機構である粘膜毛様体クリアランスは、気道表面の健康の目安である。）このように、この重要な機能の回復において、エアロゾル化したダブソンが経口投与されたダブソンよりも優れているという発見は、非常に重要である。

10

【0011】

別の実施の形態において、ダブソンは、以下に示すように、例えば、ダブソンからなる水性の生理学的に受容可能なキャリアを導入することで気道に投与される。

【0012】

本発明の方法を実施することで、エアロゾル化したダブソン調合剤を使った治療対象の気道炎症の症状が抑えられる。投与により、IL-8が抑制され、粘液線毛輸送機能及び粘膜毛様体クリアランスが回復する。完全に軽減（低減、改善、解消など）する（症状が完全になくなる）場合もあるが、常にそうであるとは限らない。例えば、患者が通常若しくはほぼ通常レベルで活動ができる水準まで症状が単に和らいだ又は部分的に改善した患者にとっては大いに有益であることを当業者は認識するであろう。当業者は、例えば、肺活量、気道閉塞の程度、血中酸素濃度の測定や、症状（例えば、喘鳴、咳など）の有無及び／又は頻度の観察、様々な撮像技術などによるこのような治療の効果についての評価と測定を熟知している。一般に、本発明の方法を実施することで、炎症の症状が、少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80又は90%、更には100%低減する。

20

【0013】

本発明の方法は、患者又は対象の呼吸器系への、生理学的に適合するダブソンのエアロゾル組成物（又は、別の実施の形態では、水溶性キャリア中のダブソン）の投与を伴う。「呼吸器系」という表現は、空気（通常、酸素を豊富に含む空気）の肺への又は肺からの搬送及びCO₂を多く含む空気の肺からの排出に関わる全ての開口部及び経路と、肺自体を含むよう意図される。例えば、鼻及び鼻腔、口、喉頭、気管、気管支及び細気管支との枝管、及び肺胞末梢気道（例えば、線維筋性壁を有する非軟骨性誘導気道である膜性細気管支、及び、線維筋性壁が部分的に胞状となった気道である呼吸細気管支）が含まれる。エアロゾル化したダブソンの投与ができる通常の2つの開口部とは鼻と口であり、これらのうちの一方又は双方を介した投与が、本発明に包含される。ただし、エアロゾルは、外科的に導入された開口（例えば、気管切開）を介して、また更には、例えば、挿管法により、例えば、肺へ直接投与してもよい。

30

【0014】

このように、経口吸入器（ドライパウダー吸入器、定量吸入器など）、フェイスマスク、経鼻又は気管内チューブ、ネブライザなどを含むが、これに限定されない多種多様な既

40

50

知のエアロゾル投与装置のいずれかを用いて投与を行うことができる。選択される装置の種類は、例えば、エアロゾルが患者により自己投与されるのかどうか、又は、例えば、急性発作又は発症の状況で、医療関係者により投与されるのかどうかなど、状況によって異なる。一般に、慢性疾患の治療に使用される装置は、患者の自己投与に適したものである。このような投与は、当分野で知られる幾つかの種類又は様式のエアロゾル投与装置のいずれかを用いて行うことができる。典型的な装置は、噴射剤（例えば、134a又は227などのフッ化炭素、圧縮空気、アルカンなど）が入った加圧キャニスター内の溶液（懸濁液もよい）中に最も一般的に薬剤が保存されている定量吸入器（metered-dose inhaler：MDI、例えば、「パッファー」）、1回分の薬を粉末エアロゾルとして放出するドライパウダー吸入器（dry powder inhaler：DPI）、及び、水性製剤から作られたエアロゾルとして薬剤を供給するネブライザを含むが、これに限定しない。装置は、例えば、単回投与又は反復投与、使い捨て又は再利用可能／詰め替え可能などでもよく、また、様々な材料から様々な形状で作られたものでもよく、また、様々な機構（例えば、息止め、呼吸駆動型など）により操作するものでもよい。

【0015】

いくつかの実施の形態において、本発明で使用する吸入装置は、呼吸駆動型、即ち、エアロゾル化した製剤の投与が、患者の実際に吸入する時間に制限されるものである。本発明を実施するにあたり使用に適した呼吸駆動型の代表的な吸入装置の1つに、Aerogen社（カリフォルニア州サンベール）製のAerodose（商標）吸入器がある。この吸入器は、圧電発振器により作用する多孔質膜を用いてエアロゾルを発生させる。使用してもよい別の吸入器又はネブライザは、例えば、PARI LC PLUS（商標）ジェット式ネブライザ（PARI社、ドイツStamberg）などの従来のエアジェット式ネブライザ、及び、当分野で周知のその他のものを含む。エアロゾル投与用の様々なシステム、装置及び組成物が、例えば、内容全体が引用されることによりそれぞれ本明細書に取り込まれる以下の交付済み米国特許に記載されている。米国特許第7,740,463号、米国特許第7,683,029号、米国特許第7,497,214号、米国特許第7,223,381号、米国特許第7,163,014号、米国特許7,040,314号、米国特許第6,932,962号、米国特許第6,743,413号及び米国特許第6,575,162号。

【0016】

本明細書で使用される「エアロゾル」という用語は、気体媒質中の固体又は液体粒子の懸濁液を言う。本明細書において、この用語は、例えば、「ミスト」、「噴霧製剤」なども含む。本発明により投与される製剤は、治療を必要とする患者へのエアロゾル化投与に適している。従って、製剤は生理学的に適合するものである。少なくとも、製剤は、ダブソンに加え、生理学的／生物学的に適合した又は適切なキャリアを含む。製剤中のダブソンの量は変えてよいが、一般に、約1～99%（重量／体積）の範囲である。

【0017】

患者の肺への投与に適した製剤は、一般に、投与の際に気体媒質中に浮遊されたダブソンからなる固体粒子、又は、投与の際に気体媒質中に浮遊されたダブソンからなる液滴のいずれかからなる。ダブソンの商業的供給源は、当業者によく知られている。また、当業者は、活性薬剤のダブソンに加え、1つ以上の追加成分を含んでもよいこのような製剤の生産及び製造にも精通している。液体キャリアを使用する場合は、無菌食塩水又は生理学的に適合するpH（例えば、約6.5～8、通常約7.3～7.4）で緩衝した食塩水であってもよい。典型的な追加成分は、安定剤、保存剤、様々な有機物及び無機物の医薬品賦形剤（様々なポリマー、低分子量オリゴマー、自然産物など）、湿潤剤、及び界面活性剤、特に、非イオン性及びイオン性界面活性剤を含むが、これに限定されない。追加成分（表面改質剤でもよい）の代表的な例は、セチルピリジニウム塩化物、ゼラチン、カゼイン、レシチン（リン脂質）、デキストラン、グリセロール、アカシア・ゴム、コレステロール、トラガカント、ステアリン酸、塩化ベンザルコニウム、ステアリン酸カルシウム、グリセロールモノステアレート、セトステアリルアルコール、セトマクロゴール乳化ワックス、ソルビタンエステル類、ポリオキシエチレンアルキルエーテル類（例えば、セトマクロゴール1000などのマクロゴールエーテル類）、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体

10

20

30

40

50

類、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類（例えば、ポリソルベート20である商品名Tween20（米国登録商標）及びTween80（米国登録商標）（ICI Specialty Chemicals社）などの市販のTween類）、ポリエチレン・グリコール（例えば、Carbowaxs3350（米国登録商標）、1450（米国登録商標）及びCarbowax1934（米国登録商標）（Union Carbide社））、ドデシルトリメチルアンモニウムプロミド、ステアリン酸ポリオキシエチレン類、コロイド状二酸化ケイ素、リン酸塩類、ドデシル硫酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、ヒドロキシプロピルセルロース（HPC、HPC-SL及びHPC-L）、ヒドロキシプロピル・メチルセルロース（HPMC）、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、非結晶セルロース、ケイ酸アルミニウム・マグネシウム、トリエタノールアミン、ポリビニル・アルコール（PVA）、ポリビニルピロリドン（PVP）、酸化エチレン及びホルムアルデヒド含有4（1,1,3,3テトラメチルブチルフェノールポリマー（チロキサポール、スペリオン（superione）及びトリトンとしても知られる）、ポロキサマー類（例えば、酸化エチレン及び酸化プロピレンのブロックコポリマー類であるPluronics F68（米国登録商標）及びF108（米国登録商標））、ポロキサミン類（例えば、酸化プロピレン及び酸化エチレンのエチレンジアミンへの逐次付加に由来する四官能性ブロックコポリマーである、Poloxamine 908（米国登録商標）としても知られるTetronic 908（米国登録商標）（BASF Wyandotte Corporation社、ニュージャージー州パーシッパンニー））、ジミリストイルホスファチジルグリセロールなどの荷電リン脂質、スルホコハク酸ジオクチル（DOS）¹⁰、Tetronic 1508（米国登録商標）（T-1508）（BASF Wyandotte Corporation社）、スルホコハク酸ナトリウムのジアルキルエステル類（例えば、スルホコハク酸ナトリウムのジオクチルエステルであるAerosol OT（米国登録商標）（American Cyanamid社））、ラウリル硫酸ナトリウムであるDuponol P（米国登録商標）、スルホン酸アルキルアリールポリエーテルであるTriton X-200（米国登録商標）（Rohm and Haas社）、ステアリン酸スクロースとジステアリン酸スクロースの混合物であるCrodestas F-110（米国登録商標）（Croda社）、Olin 10G（米国登録商標）又はSurfactant 10-G（米国登録商標）²⁰としても知られるp-イソノニルフェノキシポリ-（グリシドール）（Olin Chemicals社、コネチカット州スタンフォード市）、Crodestas SL-40（米国登録商標）（Croda社）、及び $C_{18}H_{37}CH_2(CO(CH_3)-CH_2(CHOH)_4(CH_2OH)_2$ であるSA90HCO（Eastman Kodak社）、デカノイル-N-メチルグルカミド、n-デシル-D-グルコピラノシド、n-デシル-D-マルトピラノシド、n-ドデシル-D-グルコピラノシド、n-ドデシル-D-マルトシド、ヘプタノイル-N-メチルグルカミド、n-ヘプチル-D-グルコピラノシド、n-ヘプチル-D-チオグルコシド、n-ヘキシル-D-グルコピラノシド、ノナノイル-N-メチルグルカミド、n-ノイル-D-グルコピラノシド、オクタノイル-N-メチルグルカミド、n-オクチル-D-グルコピラノシド、オクチル-D-チオグルコピラノシドなどを含む。チロキサポールは、肺送達又は鼻腔内投与にとって、更には噴霧療法にとって特に好ましい表面改質剤である。これら化合物の多くは、医薬品賦形剤として知られており、特に本明細書に参考として組み込まれるアメリカ薬学会（American Pharmaceutical Association）及び英國薬学会（The Pharmaceutical Society of Great Britain）の共同出版による「医薬品賦形剤ハンドブック（Handbook of Pharmaceutical Excipients）」（1986年Pharmaceutical Press出版）に詳しく記載されている。これらは市販されており、及び/又は、当分野で既知の技術によって生成される。³⁰

【0018】

また、ダブソンのエアロゾルは、例えば、ステロイド、抗生物質（例えば、マクロライド）、充血除去剤、抗がん剤などの抗炎症性（又はその他の性質）を有するその他の化合物など、その他の生物学的活性成分を含んで処方されてもよい。あるいは、エアロゾルの⁴⁰⁵⁰

ダブソン製剤は、それらが同じ製剤に含まれなければ、そのような生物学的活性成分と併せて用いてもよい。

【0019】

患者（又は、患者の世話をする健康管理士）が守る投与スケジュールは、幾つかの要因、例えば、治療する疾病又は疾患、疾患の重症度、患者の年齢、性別及び体重、服薬遵守を達成又は最大化するためのスケジューリング利便性に応じて変更してもよい。一般に、投与は、毎日2～4回（例えば、約12時間毎、又は8時間毎、又は4時間毎）行われるが、場合によっては、頻度を減らしても（例えば、1日に1回のみ）又は増やしても（例えば、2時間毎）よい。各投与の継続期間は、投与される量、使用される装置の種類などに応じて異ならせててもよい。一般に、投与に要する時間は、約5～30分、例えば、約5、10、15、20、25又は30分である。10しかし、一部の短時間の投与装置では、たった数分（例えば、1～4分）で投与を完了できる。更に、一部の患者（例えば、急性喘息発作を起こしている患者）への投与は、例えば、患者が病院に搬送されるまで、又は、患者が医療機関において安定するまでなど、更に長期間にわたって連続的且つ継続的に行つてもよい。熟練した医療関係者（例えば、医者、呼吸療法士など）は、これらの要素をよく心得ており、それに応じて治療プロトコールを計画及び調整することができる。

【0020】

一服につき投与されるダブソンの量は、例えば、治療する疾病又は疾患、疾患の重症度、患者の年齢、性別及び体重、治療に対する患者の耐性などの様々な要因によっても変わる。一般に、吸入で投与される量は、体重1kgあたり約0.5～約5mgの範囲であり20、例えば、体重1kgあたり約0.5～約1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5又は5.0mgであり、1回の服用で体重1kgあたり約2mgであることが多い。

【0021】

本発明の方法で治療できる疾病は、様々な気道炎症、特に、中球支配性炎症を含み、これには、気管支が狭くなり、空気が肺へ、特に肺から移動し難くなる、例えば、慢性閉塞性肺疾患（COPD）や喘息（進行中の慢性喘息、重症喘息及び喘息の「発作」又は急性発作、特に好中球性の重症喘息）、囊胞性線維症、気管支拡張症、閉塞性細気管支炎、肺線維症（例えば、特発性肺線維症）、肺気腫、急性呼吸促迫症候群、気管支炎、慢性気管支炎、慢性副鼻腔炎、鼻副鼻腔炎及び慢性鼻副鼻腔炎、慢性気道感染症、毒性の吸入傷害などの様々な閉塞性肺疾患が含まれるが、これに限定されない。炎症を起こしうる多種多様な要因は、喫煙又は受動喫煙への曝露、炭坑、金鉱及び木綿工業で見られる労働現場の粉塵、カドミウムやイソシアネートなどの化学薬品及び溶接時の煙への職業的暴露、大気汚染（例えば、二酸化硫黄、一酸化炭素、煤などの微粒子、粉塵など）への暴露、例えば、調理時の煙や暖炉の煙に起因する屋内空気汚染、遺伝的感受性（例えば、アルファ1抗トリプシン欠乏症、及び自己免疫反応（例えば、自己抗体及び自己反応性T細胞を介した持続性炎症）、例えば、イエダニ、ペットのふけ、花粉、食品、虫刺されなどによつて引き起こされるアレルギー性免疫反応及び/又はアナフィラキシーなどを含むが、これに限定されない。30

【0022】

本発明の方法は、気道炎症に苦しむ患者への、ダブソンのエアロゾル化した製薬の投与を伴う。このような患者は、一般に、哺乳類、通常人間であるが、常にそうであるとは限らない。この技術の獣医学的用途も考えられる。40

【0023】

本発明の方法は、一般に、気道炎症又は粘液線毛輸送機能（MCT）障害（例えば、通常又は基礎レベルのMCTより遅い）、特に、好中球が関与する炎症の特徴がある又はそれにより引き起こされる疾病又は疾患を患有患者の特定を含む。典型的な疾患としては、囊胞性線維症、気管支拡張症、閉塞性細気管支炎、肺気腫、慢性気管支炎、慢性鼻副鼻腔炎、吸引毒性傷害、慢性閉塞性肺疾患、特発性肺線維症、喘息及び慢性気道炎症を含むが、これに限定されない。この方法は、罹患者の気道に、例えば、気道上皮細胞、特に、50

上皮纖毛に接触するようにダプソンを投与することにより行われる。本発明の方法は、一般に、IL-8の過剰発現を低減又は軽減する（例えば、方法は、正常レベル、規制レベル又は基礎レベルを超えるレベルのIL-8 mRNA発現を防止する）。これにより、IL-8の過剰発現に伴う疾病を患う患者の、そのような過剰発現で起こる病徵が和らげられる。例えば、粘液線毛輸送機能が、正常又はほぼ正常レベルに回復する。当業者は、例えば、呼吸特性、肺及び気道の画像解析、酸素やCO₂などの血中濃度、患者の自己報告、生体組織検査、痰分析などの特定のパラメータを観察及び／又は測定することにより、そのような患者を判断、特定及び／又は診断する方法及び試験に精通している。一旦エアロゾルのダプソン治療の対象となりそうな患者が特定されると、医療専門家は、通常、患者への服用量及び／又は投与計画を処方するとともに、吸入器の使用の指示を与え、おそらくはそれに関する指導又はその実演を行う。その後、医療専門家は、エアロゾル投与の成果を監視する。服用量及び／又は服用回数は、治療に対する患者の反作用又は反応と、疾病の臨床症状の調整又は解消に向かった進展に応じて調節してもよい。治療期間は、患者ごとに、又は、一人の患者でもその時々により異なってもよく、短期でも長期でもよい。治療する疾患の慢性的性質により、エアロゾルのダプソン治療はしばしば長期間となり、例えば、数週間、又は数ヶ月、又は数年、更には患者の残りの人生にわたって継続される。

【0024】

当業者は、患者の気道への活性薬剤の投与が、常にエアロゾル化した製薬を用いて行われる必要はないことを認識するであろう。例えば、薬の導入（例えば、気管切開チューブ、鼻腔チューブなどの既存の導管を介した）には、例えば、生理学的に受容可能な液体キャリア中のダプソンといった、水性製剤の使用が必要となる場合がある。当業者は、エアロゾルに関して上述したようなエアロゾル調剤薬と多くの性質を共有するそのような製剤の調合に通じている（例えば、調剤薬中に存在する活性薬剤や賦形剤の量、pH、治療する疾病、患者の特定、診断及びモニタリング、投与スケジュール、別の薬剤と併せた投与など）。しかし、そのような調剤薬は「ドライパウダー」ではなく、液体である。そのような製剤の投与経路と方法は、例えば、手動で投与された鼻用ミスト又はスプレー（例えば、容器又は装置を手で圧迫又はポンプを押すことによる投与）を介した、又は、点鼻薬若しくは鼻洗浄を介するなどした導入を含むが、これに限定されない。

【実施例】

【0025】

実施例1：ダプソンは、LPSで刺激されたヒト気管支上皮細胞からのIL-8分泌を抑制し、フェレットの気道炎症を解消する。

【0026】

序説

気道を、患者の体内環境を外部から隔てる上皮細胞で覆う。気道上皮は、外的刺激及び細菌に対する機械的バリアであるだけでなく、先天性且つ後天性免疫応答、及び、気道炎症に積極的に関与している。細菌が侵入すると、粘膜毛様体クリアランスが活性化され、炎症性メディエータ及びサイトカインが防衛として分泌されるが、これらもまた気道を損傷しうる。上皮由来の多面的サイトカインの中で、ステインXシスティン(CXC)ケモカインファミリーの1つであるIL-8は、最も強力な好中球走化性因子の1つとして作用する。好中球支配性炎症は、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、びまん性汎細気管支炎(diffuse panbronchiolitis: DPP)及び囊胞性線維症(cystic fibrosis: CF)の特性を示す。IL-8は、気道上皮細胞により作られる。痰及び気管支肺胞洗浄(bronchial lavage: BAL)液中の増量したIL-8は、DPP及びCFの重症度に関連するものであり、重症喘息及びCOPDを患う対象の気管支上皮内のIL-8遺伝子発現が増加する。

【0027】

炎症誘発性サイトカイン、細菌性フラジエリン及びリボ多糖体(lipopolysaccharide:LPS)は、正常ヒト気管支上皮(normal human bronchial epithelial:NHBE)細

10

20

30

40

50

胞によるIL-8生成を増加させ得る。有機塵中に存在する様々な物質の中で、LPSは、炎症反応の主な誘導因子である。LPSは、核因子B(nuclear factor-

-)経路、ホスファチジルイノシトール3キナーゼ(phosphatidylinositol 3-kinase: PI3K)及びマイトジエン活性化プロテインキナーゼ(mitogen-activated protein kinase: MAPK)経路を含む細胞内シグナル伝達経路を活性化させるToll様受容体4(toll-like receptor 4:TLR4)と結合する。IL-8遺伝子発現に寄与する3つのMAPK経路は、細胞外シグナル制御プロテインキナーゼ(extracellular-regulated protein kinase: ERK)、c-Jun NH₂末端タンパク質キナーゼ(c-Jun NH₂-terminal protein kinase: JNK)及びp38MAPKカスケードである。これら経路のそれぞれの活性化の相対的度合いと機能的結果は、細胞の種類と実験システムにより異なる。

【0028】

マクロライド系抗生物質は、DPIBを患う対象のBAL中の好中球及びIL-8濃度、及び、CF患者における痰IL-8濃度を減少させる。マクロライドは、ERK又は-の不活性により、培養液中の気道上皮細胞からのIL-8放出を抑制することができる。

【0029】

ダブソンは、刺激された気道細胞によるIL-8分泌を抑制するという仮説を我々は立てた。従って、我々は、LPSにより刺激されたNHE細胞からのIL-8分泌に対するダブソンの作用を研究し、更に、関連するシグナル伝達経路を調査した。そして、我々は、気道がLPSに暴露された(LPSにより炎症を起こした)フェレットに経口又はエアロゾルとして投与した場合の、気道への好中球動員を抑えるとともに粘膜毛様体クリアランスを持続させるダブソンの有効性の評価を行った。

【0030】

材料及び方法

試薬

ダブソン(4,4'-ジアミノジフェニルスルホン)、LPS(大腸菌血清型O111:B4)及びその他の全ての試薬は、特に記載しない限り、Sigma-Aldrich社(ミズーリ州セントルイス)から購入した。MAPK/ERKキナーゼ(MEK、ERK1/2の上流のキナーゼ)阻害剤であるPD98059は、Calbiochem社(カリフォルニア州ラ・ホーラ)から入手した。リン酸化及び非リン酸化特異的ERK1/2、抗p38MAPK、抗SAPK/JNK、リン酸化特異的NF-B p65(Ser536)及び抗ウサギIgG-HRP抗体は、Cell Signaling Technology社(マサチューセッツ州ベリリー)から購入した。DMSO(ジメチルスルホキシド)をダブソンの溶媒として用い、最終的濃度が0.01%(v/v)を超えないようにした。体外での予備実験は、0.01%のDMSO媒体では、72時間までの細胞の生存率及びIL-8分泌に対し著しい作用がなかったことを示した(データ不掲載)。

【0031】

NHE細胞培養

NHE細胞(Lonza Walkersville社、メリーランド州ウォーカービル)を、抗生物質を含まずSingle Quot(米国登録商標)キット(Lonza社)が補充された気管支上皮細胞増殖培地(bronchial epithelial cell growth medium: BEGM)で、1cm²あたり3500個の細胞を培養皿に播種し、37℃の5%CO₂培養器内で培養した。全ての実験で、無エンドトキシン培地(0.005単位/ml未満のエンドトキシン)と第2継代細胞を使った。細胞を、密集するまで6日間増殖させた。その後、抗生物質を含まない培養液を、1型ラット尾コラーゲンでコーティングした6ウェルプレート又は35mm培養皿に移し、1cm²あたり3500個の細胞を播種した。24時間おきに培地を交換した。細胞シグナリングとIL-8分泌に対する増殖因子の影響を避けるため、刺激する前の24時間の間、補充物無しの気管支上皮細胞用基礎培地(bronchial epithelial cell basal medium: BEM)内で細胞を培養した。細胞成熟が細胞シグナリングとサ

10

20

30

40

50

イトカイン分泌に影響を及ぼす可能性があり、密集の際に全ての細胞が同様の成長段階にあることから、細胞の相対数に標準化するのではなく、細胞密集時の細胞応答を評価した。

【0032】

N H B E 細胞分化のため、1型ラット尾コラーゲンでコーティングした直径6.5 mm、細孔径0.4 μm及び厚さ10 μmのポリカーボネートインサート(Costar Transwell Clear、アメリカ・マサチューセッツ州ケンブリッジ)上に1 cm²あたり2.0 × 10⁵個の細胞を播種し、ITS-Aを含む無血清D M E M / F 1 2 培地(1.0%、Invitrogen社、カリフォルニア州カールスバッド)、上皮細胞増殖因子(epidermal growth factor: E G F)(0.5 ng / mlの遺伝子組換えヒトE G F、Invitrogen社)、トリヨードチロニン(10 ng / ml、MP Biomedicals社、オハイオ州ソロン)、ヒドロコルチゾン(0.5 μg / ml、MP Biomedicals社)、オールトランス型レチノイン酸(1.0 × 10⁻⁷ M、Sigma-Aldrich社)、ウシ血清アルブミン(2.0 μg / ml、Sigma-Aldrich社)及びウシ下垂体抽出物(30 μg / ml、Invitrogen社)で培養した。密集がなされた後、頂端側培地を除去し、気液界面(air-liquid-interface: A L I)法で細胞を培養した。48時間おきに培地を交換し、10~14日間37°の5%CO₂下で細胞を維持した。

【0033】

細胞毒性アッセイ

生存細胞数を判別するため、Cell Counting Kit-8(C C K - 8、株式会社同仁堂、日本熊本)を用いて、ホルマザン色素の生成を測定した。C C K - 8アッセイ溶液で処理した細胞を2時間培養し、マイクロプレートリーダーで450 nmの吸光度を測定した。データは、ダプソンに暴露されなかった対照細胞に対する%として表わした。

【0034】

I L - 8 分泌の測定

培養上清を採取し、200×gで5分間遠心分離機にかけ、分析がされるまで-20°で保管した。E L I S A(Beckman Coulter社、カリフォルニア州ブレア)を用い、製造元の使用説明書に従ってI L - 8を測定した。各サンプルの濃度を、標準曲線から補間して得た後、サンプル希釈の結果の平均として計算した。

【0035】

免疫プロット法

刺激を行った後、播種した細胞を冷P B Sで洗浄し、その後、改良放射線免疫沈降緩衝液(1%のノニデットP-40、1%のデオキシコール酸ナトリウム、150 mMのNaCl、10 mMのTris(pH 7.5)、5 mMのピロリン酸ナトリウム、1 mMのNaVO₄、5 mMのNaF、1 μg / mlのアプロチニン、1 μg / mlのロイペプチド及び0.1 mMのPMSF)中で15分間氷上で溶解させ、そして、培養皿からこすり取った。27ゲージ注射針に溶解物を通してDNAを剪断し、20,000 gを4°で15分間遠心分離することで不溶性物質を除去した。得られた上清のタンパク質濃度を、DCプロテインアッセイ(Bio-Rad社、カリフォルニア州ハーキュリーズ)により測量した。同量のタンパク質抽出物を、それぞれ12%のSDS-PAGE用ミニゲルに載せ、ニトロセルロース膜(Bio-Rad社)に移した。膜は、5%の脱脂粉乳を含むブロッキング緩衝液(150 mMのNaCl、20 mMのTris及び0.1%のTween 20(pH 7.6))を用い、4°で一晩ブロッキングした。その後、膜をすすぎ、以下の一次抗体で、室温で2時間培養した。リン酸化された(p)p44/42 MAPK(Thr202/Tyr204)(希釈1:2000)、p-p38 MAPK(Thr180/Tyr182)(希釈1:1000)、p-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185)(希釈1:1000)又はリン酸化したNF-B p65ウサギポリクローン抗体グロブリンG(IgG)(希釈1:1000)(Cell Signaling Technology社)。そして、膜を室温で1時間、抗ウサギIgG-HRP二次抗体(希釈1:2000)で培養し

10

20

30

40

50

た。その後、プロット膜を、化学発光基質過酸化物 LumiGLO (Cell Signaling Technology社)で成長させた。

【0036】

30で30分間かけて、ストリッピング緩衝液(100mMの2-メルカプトエタノール、2%のSDS及び62.5mMのTris/HCl(pH6.7))で膜を剥離した。プロットは、抗p44/42MAPK、抗p38MAPK又は抗SAPK/JNK抗体(それぞれ希釈1:1000)、それに続き抗ウサギIgG-HRP二次抗体(希釈1:2000)で再プロープした。NFBp65を載せる際のわずかな違いを補正するため、プロットを剥離し、抗ヒトアクチン抗体(希釈1:5000)と引き続き抗マウスIgG-HRP二次抗体(希釈1:5000)で再プロープした。ウェスタンプロット画像をスキャンし、画像解析ソフトNIH image J(1.8)で解析した。

10

【0037】

リアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応

IL-8 mRNA発現の相対的定量化において、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)の発現が、内在性コントロールの役割を果たした。DNAインターラーカー色素としてEvagreenを用い、増幅したDNAの定量化を監視し、各サンプルの閾値サイクル(Ct)値を得るため、CFX Manager(商標)ソフトウェア(Bio-Rad社)によりリアルタイム定量的PCR曲線を分析した。定量化は、標準曲線に基づいて行った。適切なIL-8及びGAPDHのフォワード及びリバースプライマーを用いた。

20

【0038】

動物実験

成フェレットの雄(体重1.3~2.0kg)20匹を、Marshall Farms(ニューヨーク州ローズ)から入手した。フェレットに40mg/kgのケタミンと5mg/kgのキシラジンで麻酔をかけ、300μlの水溶性K-Yゼリー(Johnson & Johnson社、ニュージャージー州ニューブランズウィック)に混合された10mgのLPSでコーティングした3.0カフなし気管内チューブ(ETT)を挿管することにより、5日間毎日1日1回30分間エンドトキシンに暴露した(2009年Abanses et al.)。対照群として、2匹のフェレットには、LPSを含まないK-Yゼリーを用いた。

【0039】

30

経口投与用に、最終的濃度が3mg/mlで、5%(v/v)のエタノール/5%(v/v)のジメチルスルホキシド(DMSO)/0.5%(w/v)のメチルセルロース溶液の賦形剤中にダブソノを調合した。噴霧形態で投与するため、0.67%(v/v)のDMSO/生理食塩水に、0.5mg/mlの濃度でダブソノを溶解させた。LPS処置されたフェレット18匹を無作為に選び、4日目(LPS処置の3日後)から5日間ダブソノ治療を行い、5日間継続した。経口投与の際、経鼻胃チューブを通して、2mg/kgのダブソノ(n=4)又は賦形剤のみ(n=4)が毎日与えられた。これは、皮膚病患者の治療に用いる経口投与量に相当する。エアロゾル吸引の際、フェレットには、喉頭下1cmまでETTを浅く挿管した。毎日1日1回15分間、ジェット式ネブライザPari Master(PARI Respiratory Equipment社、バージニア州リッチモンド)を用い、霧状にした0.5mg/mlのダブソノ(n=5)又は0.67%のDMSO/生理食塩水(賦形剤)(n=5)でフェレットの治療を行った。フェレット(体重1.5kg)の肺胞被覆液の総体積は、0.3~0.4mlである。したがって、肺に送達される投与量は、報告されている噴霧効率を考えると、このシステムにおいては0.1~1.0μgと推定される。

40

【0040】

9日目に、ダブソノ治療したフェレットと賦形剤での対照分のフェレットとに犠牲になってもらい、気管を取り出した。各気管切片を10%ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋し、光学顕微鏡(CKX41、オリンパス社、日本東京)を用いた組織学的分析用に処理され、及びデジタルカメラ装置(AxioCam ICC 1、Carl Zeiss社、ニュー

50

ヨーク州ソーンウッド)を用いた写真撮影がなされた。組織を4 μmの厚さにカットし、スライドをヘマトキシリン及びエオシンで染色した。炎症細胞の蓄積と炎症の全体的重症度を測るため、上皮内好中球の総数を、4つの異なる部位からの試料ごとにランダムな8か所で150 μmにわたって数え、平均化した。

【0041】

摘出した気管切片を、気管の粘液線毛輸送(MCT)速度を測定するためにも用いた。纖毛によって口へと運ばれた、例えば、異物や微生物を含む粘液は、そこで咳を介して飲み込まれるか吐き出される。炎症状態においては、線毛細胞がその運輸機能を中断するため、細菌性の胚のコロニー形成、更なる刺激及び炎症が容易に引き起こされる。

【0042】

相対湿度が95～100%に保たれ、温度が22～24に保たれたチャンバ内で、リンガー溶液を染み込ませたガーゼ片上に気管切片を置いた。MCTは、十字線(グリッド線)付き接眼レンズを有する顕微鏡下で気管切片に焦点を合わせ、気管上皮上に載せられた非常に細かいプラスチックの削りくずの先端の輸送時間を記録することによって測定した。3mmの粒子を輸送する時間を、MCT(mm/分)を計算するために用いた。各気管切片につき、5回繰り返し測定を行った。この研究は、バージニア コモンウェルス大学の動物実験委員会により認可されている。

【0043】

統計

結果を、平均値±SE又は必要に応じて±SDで表わしている。統計パッケージStatview 5(SAS Institute社、ノースカロライナ州ケアリー)でデータの統計分析を行った。2つのグループの比較は、2標本t検定により行った。多重比較については、FisherのPLSDテストを用いた一元配置分散分析により行い、0.05未満のP値を有意であるとした。

【0044】

結果

NHBE細胞の生存率に対するダブソンの作用

培養したNHBE細胞の総数がダブソン治療に影響されなかったことを確認するために、CCK-8(株式会社同仁堂)を用いて細胞の生存率を評価した。96ウェルプレート(1ウェルにつき3000細胞)上に播種したNHBE細胞を、37で72時間培養した(70%までの密集)。濃度0.3、1又は10 μg/mlのダブソンを、24又は72時間の間添加した。結果は、ダブソンで治療した細胞では、生存細胞の総数が、72時間以上治療のなかった対照群と同様であったことを示した(図示せず)。

【0045】

LPS誘導性IL-8分泌に対するダブソンの作用

NHBE細胞からのIL-8分泌に対するダブソンの作用を評価するため、LPSとともに添加されたダブソンの存在下又は非存在下において、LPSでの刺激から24時間後に細胞上清を採取した。細胞成熟が細胞シグナリングとサイトカイン分泌に影響を及ぼす可能性があり、密集の際に全ての細胞が同様の成長段階にあることから、細胞の相対数に標準化するのではなく、細胞密集時の細胞応答の評価を選んだ。LPSは、10 μg/mlで、NHBE細胞からのIL-8分泌を大幅に増加させたが(P<0.001)、ダブソンは、0.3、1又は10 μg/mlで、これを抑えた(それぞれP<0.01)(図1A)。1 μg/mlのダブソンでは、48及び72時間での基礎IL-8分泌に影響はなかった(図1B)。1 μg/mlのダブソンの存在下では、LPS誘導性のIL-8分泌が、最大72時間まで大幅且つ持続的に減少した(図1C)。

【0046】

ALI調整したNHBE細胞におけるダブソンの作用

ダブソンのIL-8抑制効果が分化した細胞にも見られるかどうかを確認するため、14日間ALI調整下で培養したNHBE細胞を用いた。ALIの細胞については、サンプルを、フィルタ上で成長した細胞の頂端側チャンバ及び側底側チャンバの双方から採取し

10

20

30

40

50

た。頂端側チャンバから細胞を採取するため、 $150\text{ }\mu\text{l}$ のハンクス平衡塩類溶液（HBS、Lonza Walkersville社）を頂端側に添加した。頂端側のIL-8濃度は、側底側培地の体積 $600\text{ }\mu\text{l}$ と等しくなるような4倍希釀値として表わした。

【0047】

LPSで、頂端側から（AP-LPS）又は側底側から（BL-LPS）、24時間NHE細胞を刺激し、両チャンバにおけるIL-8分泌レベルを測定した。ダブソンは、側底側培地にのみ添加した。図2Aに示すように、頂端側IL-8レベルは、AP-LPSにより大幅に増加し（P < 0.001）、ダブソンがこの反応を抑制した（P < 0.05）。同様に、側底側IL-8レベルは、AP 又は BL-LPSにより大幅に増加し（それぞれP < 0.001）（図2B）、ダブソンが頂端側及び側底側両方の反応を抑制した（AP-LPSではP < 0.001、BL-LPSではP < 0.01）。

【0048】

コルチコステロイドと比較するため、LPS誘導性のIL-8分泌に対するデキサメタゾン（DEX）の作用を調べた。DEXは、頂端側及び側底側の双方において、基礎IL-8レベルを抑止した（それぞれP < 0.05）（図2C及び2D）。また、DEXは、AP-LPS又はBL-LPS誘導性のIL-8の増加を大幅に抑制した（それぞれP < 0.05）。

【0049】

LPS誘導性IL-8 mRNA発現に対するダブソンの作用

IL-8 mRNAに対するダブソンの作用を調べるため、LPS、ダブソン、DEX又はその組み合わせでの刺激から4時間後に細胞からRNAを抽出し、リアルタイム定量PCR用に準備した。図3に示すように、 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のダブソンでは、基礎IL-8 mRNAレベルに影響はなかったが、 $0.1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のDEXは、これを~40%まで減少させている（P < 0.05）。 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のLPSは、IL-8 mRNAレベルを対照群の5倍を超えて増加させた（P < 0.001）。 1 及び $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のダブソンは、LPS誘導性IL-8 mRNAの過剰発現を大幅に抑制した（それぞれP < 0.05）。また、DEXも $0.1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ でこれを抑制した（P < 0.01）。

【0050】

MAPKのLPS誘導性リン酸化反応に対するダブソンの作用

MAPKシグナリングは、IL-8合成において重要な経路である。NHE細胞内におけるERK1/2、p38及びJNKのLPS誘導性リン酸化反応に対するダブソンの作用を評価した。 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のLPSは、1、4及び24時間の時点でERK1/2を大幅にリン酸化したが（それぞれP < 0.05）、p38及びJNKはそうではなかった（図4）。 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のダブソンは、1時間の時点でLPS誘導性のERK1/2リン酸化反応を抑制したが（P < 0.05）、4時間後にはこの効果は消えた。そこで、選択的細胞透過性のMEK阻害剤であるPD98059（2'アミノ3'メトキシフルボン）の効果を評価した。図5Aに示すように、LPSは、用量依存的にERK1/2のリン酸化反応とIL-8分泌を増加させ、PD98059は $20\text{ }\mu\text{M}$ で $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のLPSで誘導されたERK1/2のリン酸化反応を消滅させた。しかし、この濃度のPD98059では、IL-8分泌は抑制されなかった（図5B）。

【0051】

NF-B p65のLPS誘導性リン酸化反応に対するダブソンの作用

LPSはTLR4を刺激し、NF-B経路を介してIL-8を誘導するので、NHE細胞内におけるNF-B p65のリン酸化反応に対するダブソンの作用を調べた。増殖因子は、LPS又はダブソンの暴露の24時間前に培地から引き上げた。NF-B p65のトレオニンリン酸化を、ウェスタンプロッティング法により測定した。バンド強度は、NIH image Jソフトウェアで計算した。

【0052】

結果は、LPSは $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ で、NF-B p65のリン酸化反応を15分の時点で大幅に増加させ（P < 0.01）、この効果は最大2時間まで持続した（P < 0.05）

10

20

30

40

50

)ことを示した。ダブソンは $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ で、LPS誘導性NF-B p65リン酸化反応を対照レベルまで大幅に抑えた(15及び30分では $P < 0.01$ 、1及び2時間では $P < 0.05$)。更に、この抑制作用は、用量依存的である($0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ のダブソンで $P = 0.16$ 、また、1及び $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のダブソンで $P < 0.01$)。

【0053】

フェレットの活動及び体重に対するダブソンの存在下又は非存在下における気管LPSの作用

フェレットをLPSで5日間刺激し、5日間のダブソン治療又は賦形剤のみの投与を行った(検査した各時点で、賦形剤は $n = 8$ 、ダブソン群は $n = 9$)。フェレットの活動又は食欲に対してダブソンの存在下又は非存在下におけるLPSの計測可能な作用はなく、これら2つのグループを比較した際、9日間にわたって体重の差もなかった(図示せず)。

【0054】

LPSで炎症を起こしたフェレットの気管における上皮内好中球蓄積

ダブソンの生体内での効果を評価するにあたり、好中球を動員し、麻酔下にあり自発呼吸するフェレットの気管に炎症を起こさせるため、局所的にLPSをコーティングした気管内チューブ(ETT)を使用した(2009年Abanses et al.)。水溶性ゼリー(他のグループではLPSの賦形剤として使用)のみをコーティングしたETTを挿管した対照のフェレットは、 $3 / 150 \mu\text{m}$ 未満のわずかな上皮内好中球を示した。LSPで気管が炎症を起こし、噴霧化した賦形剤で治療された1匹のフェレットは、6日目に死亡したことから実験を終了できず、この動物については、更なる分析から除外した。LPS暴露で、フェレットの気管上皮に著しい好中球蓄積を誘発し、ダブソン治療で上皮内好中球数を減少させた(図示せず)。経口投与したダブソンは、好中球動員を抑制する傾向があり($p = 0.3$)(図6A)、噴霧化したダブソンは、好中球蓄積を大幅に抑制した($P < 0.05$)(図6B)。

【0055】

摘出した気管切片の粘液線毛輸送機能(MCT)

粘液線毛輸送機能(又は「粘膜毛様体クリアランス(mucociliary clearance: MCC)」)は、気道表面の健全性及び完全性の全般的尺度である。 3 mm の切片におけるMCTの時間を測った。LPSは、MCTを $1 \sim 3 \text{ mm}/\text{分}$ まで劇的に遅くした(通常、およそ $7 \text{ mm}/\text{分}$ である)。経口のダブソンはMCTを増進させたが、その伸び率は著しいものではなかった($P = 0.09$)。しかし、エアロゾルのダブソンは、図7A及び7Bに示すように、ほぼ通常速度でMCTを持続させた($6 \text{ mm}/\text{分}$ 、LPS対照との比較で $P = 0.007$)。

【0056】

考察

ダブソンがLPSで刺激されたNHE細胞からのIL-8分泌を抑制することを示してきた。ダブソンは、皮膚疾患、とりわけ好中球浸潤を伴ったものの治療に用いられる。ダブソンは、高い日和見感染リスクもなく炎症箇所の好中球走化性と機能を減じる、と仮定してきた。これは、免疫調節とは一致するが、免疫抑制とは一致しない。

【0057】

ダブソンは、有毒な活性酸素種、ミエロペルオキシダーゼ及びエラスターーゼの局所産生を抑制するが、これは主な作用形態ではなさそうである。ダブソンに対する臨床反応が、好中球数が減少することにより特徴づけられるからである。別の研究者らは、ダブソンは、体外で接着分子CD11b/CD18の活性化を妨げることで、好中球走化性を減じる可能性があることを示している。しかし、これには、生体内で用いられる治療レベルよりも高濃度のダブソンが必要であると思われる。本研究において用いたダブソンの濃度は、治療に必要とされる血清レベル $0.5 \sim 5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲内である(2001年Zhu et al.)。 $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ の低濃度のダブソンが、LPS誘導性のIL-8分泌を抑制したが、この効果が、生存細胞数を尺度とした細胞毒性によるものではなかったことを発見

10

20

30

40

50

した。Schmidt et al. (2001年)は、治療濃度のダブソンが、培養された正常ヒト表皮角化細胞 (NHEK) からの水疱性類天疱瘡 IgG 媒介性の IL-8 放出を抑制し、ダブソンが基礎 IL-8 レベルを低下させることはなかった、と報告している。これらのデータは、NHB E 細胞を使った本発明の結果と類似している。

【0058】

気道上皮は機能的に二極化されており、上皮細胞が双方向にサイトカインを分泌できるとことが証明されている。分化し、二極化した気道上皮モデルにおけるダブソンの作用形態をより理解するため、NHB E 細胞を ALI で培養した (2001年、Kanol et al.)。ダブソンの存在下においては、LPS 刺激によって誘導された IL-8 分泌は大幅に減少する一方で、構成的 IL-8 放出はダブソンでは抑えられることはなかった。興味深いことに、頂端側から刺激した場合 (気道感染時に起こるよう)、NHB E 細胞は、IL-8 を頂端側及び側底側に向かって分泌したが、側底側から刺激した場合には、側底側に向かってのみ分泌している。フィルタ上で成長し、頂端側で黄色ブドウ球菌によって刺激された気道上皮細胞は、T 細胞に頂端側への走化性を起こしたが、底側の上清には起こさなかった (2006年、Escotte et al.)。頂端側に方向づけられた化学誘引物質勾配の存在は、上皮表面全域で好中球やリンパ球のような免疫細胞を動かせるために必要である可能性がある (2007年、Chin et al.)。また、培養細胞系において、作用の強力な合成コルチコステロイドであるデキサメタゾン (DEX) の作用をテストした。DEX は、NHB E 細胞からの IL-8 放出を抑制すると報告されており、DEX がダブソンよりも IL-8 mRNA 発現を抑制したことを確認した。しかし、ダブソンとは異なり、DEX が基礎 IL-8 レベル及び LPS 誘導性の増加も抑制したことから、DEX が免疫抑制性であるのに対し、ダブソンは免疫調節性であることを意味している。
10

【0059】

ダブソンが IL-8 を抑制する細胞内シグナル伝達経路については、あまり明らかにされていない。MAPK が気道上皮細胞における IL-8 遺伝子発現を制御することから、これら経路に対するダブソンの作用を評価した。LPS は、NHB E 細胞におけるリン酸化反応を ERK1/2 では用量依存的に増進させるが、JNK 及び p38 では増進させず、少なくとも 24 時間の間継続的に p-ERK1/2 レベルを上昇させたことがわかった。ERK1/2 の持続的活性化は、刺激されていない NHB E 細胞からの基礎 IL-8 分泌に必要であること、及び、IL-8 は、特定の MEK 阻害剤の PD98059 では抑制されるが、JNK 又は p38 の薬理学的阻害剤では抑制されないことをこれまでに示してきた。PD98059 での前治療が、1 及び 2 時間の時点で ERK1/2 の LPS 誘導性リン酸化反応を抑制することを示す者もいる。現在の研究においては、PD98059 の抑制効果が、4 時間の時点でさえ確認されている。しかし、PD98059 は、LPS 誘導性の IL-8 分泌を減少させなかつた。ダブソンが 1 μg/ml では、1 時間の時点での p-ERK1/2 は抑制されたが、4 時間後は抑制されなかつた。総合すれば、ERK1/2 の抑制だけで LPS で刺激された細胞内の IL-8 を抑制するとは考えにくく、よって、ダブソンによる一時的な ERK1/2 の抑制は、IL-8 に対する効果のうちには入らない。
30

【0060】

そこで、NF-B 活性化に対するダブソンの効果を調べた。NF-B は、気道上皮細胞内において炎症性メディエータ及びサイトカインの遺伝子発現を誘導することができ、LPS は、TLR4 を介して NF-B を活性化させることができる。基礎 NF-B 複合体は、Rel ファミリー・タンパク質のうちの 2 つである p50 と p65 (RelA) の二量体である。いずれのサブユニットも DNA と接触するが、p65 のみが、転写装置と直接接觸する C 末端領域内にトランス活性化ドメインを含んでいる。NF-B p65 は、その転写活性を促進し、核転座に関わるリン酸化反応により活性化される。10 μg/ml の LPS が、刺激のあと 15 分 ~ 2 時間で、NHB E 細胞内に著しい NF-B p65 リン酸化反応を誘発したことを示した。LPS に応じた同様の反応が、ネズミ腸筋線維芽細胞に見られ、NF-B p65 のリン酸化反応が LPS 処理の 30 分以内に検知され
40
50

、4時間かけてゆっくりと減少した。ダブソン $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ で、LPS誘導性のNF-B p65リン酸化反応が2時間かけて基礎レベルまで抑制されることを発見した。これは、ダブソンが、NF-B p65リン酸化反応をブロッキングすることによりIL-8分泌の誘導を抑制する可能性があることを意味する。また、リン酸化NF-B p65に対する用量依存的な抑制効果は、IL-8 mRNA発現での実験結果と一致する。よって、ダブソンの作用は、少なくとも部分的に、遺伝子転写においてIL-8を下方調整することによるものである。しかし、 $0.3\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のダブソンでは、NF-B p65活性化を大幅に抑制することはない一方で、同じ濃度のダブソンがIL-8放出を強く抑制している。LPS誘導性のIL-8 mRNA発現を抑制するためには、 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ を超えるダブソンが必要であった。Schmidt et al. (28)は、ダブソンは、mRNA濃度に影響を与えることなく、転写後レベルでNHEKからのIL-8放出を抑制する、という仮説をたてた。
10

【0061】

これらの免疫調節効果は、エリスロマイシン、クラリスロマイシン及びアジスロマイシンなどのマクロライドの免疫調節効果に似ていた。クラリスロマイシンは、NHE細胞におけるERK1/2リン酸化反応を調節し、アジスロマイシンは、CF細胞株内のNF-B活性化を抑制し、結果、IL-8を調整する。ダブソンは、IL-8の調節を介して気道炎症も調節すると思われる。

【0062】

局所的に適用されたLPSを用いてフェレットに気管炎症を誘導した後、上皮の完全性の総合的尺度である好中球炎症及びMCTに対する5日間にわたる経口又はエアロゾルのダブソンの効果を評価した。経口のダブソンは、上皮内好中球蓄積を減少させたが、統計的に著しいものではなかった。ダブソンが、好中球性皮膚病の治療にクリームとして局所的に使用した場合に効果的であると認識したことから、エアロゾルのダブソンの投与量を更に下げてLPS誘導性の気管炎症を抑制する可能性を評価した。噴霧化したダブソンは、気道の好中球浸潤を大幅に抑制し、LPS暴露にも関わらず、MCTを維持又は回復させた。気道への正確な投与量を計算することは難しいが、たとえ総投与量の10%が気管(38)に効率的に送達されたとしても、投与されるダブソンは、 0.3 mg のみであった。この投与量は、 1.5 kg のフェレットに経口による全身投与量のおよそ10分の1である。
20

【0063】

要するに、ダブソンは、刺激をしていない(基礎)IL-8分泌には影響を及ぼさなかった。頂端側のLPS刺激は、頂端側及び側底側の双方のIL-8を誘導したが、側底側のLPSは、側底側のIL-8のみを増加させた。ダブソンは、ALI調整した細胞からの二極化したIL-8分泌を抑制した。また、ダブソンは、LPS誘導性IL-8 mRNAレベルを減少させた。LPSによるリン酸化反応は、細胞外シグナル制御キナーゼ(ERK)1/2では起こったが、p38 MAPK又はc-Jun N端末キナーゼでは起こらなかった。LPSは、NF-B p65リン酸化反応も誘導し、その作用はダブソンにより抑制された。ダブソンは、経口でもエアロゾルでもLPS誘導性の上皮内好中球蓄積を減少させたが、エアロゾルのダブソン治療でのみ粘液線毛輸送機能が正常に回復した。
30

【0064】

総合すると、これらのデータは、ダブソンは、MCTを維持しながら、ヒト気道細胞におけるIL-8及び生体内の炎症を起こした哺乳類の気管における好中球動員を抑制することを示している。エアロゾルのダブソンは、囊胞性線維症、慢性気管支炎及び重症喘息などの慢性気道炎症性疾患治療のための有望な治療法である。よって、全身に、特にエアロゾルとして与えられるダブソンは、好中球性気道炎症の治療において有用となろう。
40

【0065】

実施例2：ダブソンのIL-13抑制特性

杯細胞は円柱状の上皮細胞であり、その唯一の機能が、水に溶解して粘液を形成するムチンの分泌である。杯細胞過形成は、喘息患者の気管支上皮細胞によって生じる病理学的
50

分泌過多に関与するものであり、IL-13は、喘息の生体内及び生体外モデルのいずれにおいても、胚細胞過形成を調整する中心的役割を果たすことで知られる。杯細胞過形成を抑制するダプソンの能力は、生体外で実験した。杯細胞過形成の生体外モデルは、気液界面（ALI）条件下で培養した正常ヒト気管支上皮（NHBEC）細胞を用いて発達させた。細胞分染及び顕微鏡法を用いて分析した対照実験は、ダプソン（3 µg / ml）では、ALI調整したNHBEC細胞の成長に対する計測可能な作用はなかったことを示した（図示せず）。しかし、IL-13を用いて杯細胞過形成を誘導した場合、ダプソン（10 µg / ml）は、対照細胞培養よりも、杯細胞過形成の量と範囲を軽減した（図示せず）。このように、ダプソンは、IL-13で誘導された杯細胞過形成を抑制することによっても、炎症回復に有益な効果を発揮する可能性がある。

10

【0066】

参考文献

Abanses JC, Arima S, Rubin BK. Vicks VapoRub induces mucin secretion, decreases ciliary beat frequency, and increases tracheal mucus transport in the ferret trachea. *Chest* 2009;135: 143-148

Berlow, BA, Liebhader, MI, Zeb, D and Spiegel, TM. *J Allergy Clin Immunol.* 1991 Mar;87(3):710-715.

Chin AC, Parkos CA. Pathobiology of neutrophil transepithelial migration: implications in mediating epithelial injury. *Annu Rev Pathol* 2007 ;2: 111-143

Chougule, M, Padhi, B and Misra, A. *AAPS PharmSciTech*, 9(1): 47-53

20

Schmidt E, Reimer S, Kruse N, Brocker EB, Zillikens D. The IL-8 release from cultured human keratinocytes, mediated by antibodies to bullous pemphigoid autoantigen 180, is inhibited by dapsone. *Clin Exp Immunol* 2001 ; 124: 157-162

Escotte S, Al Alam D, Le Naour R, Puchelle E, Guenounou M, Gangloff SC. T cell chemotaxis and chemokine release after *Staphylococcus aureus* interaction with polarized airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:348-354

Kanoh S, Kondo M, Tamaoki J, Kobayashi H, Motoyoshi K, Nagai A. Differential regulations between adenosine triphosphate (ATP)- and uridine triphosphate-induced Cl⁻ secretion in bovine tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001 ;25: 370-376

30

Zhu YI, Stiller MJ. Dapsone and sulfones in dermatology: overview and update. *J Am Acad Dermatol* 2001 ;45 :420-434

【0067】

本発明を好適な実施の形態に関して説明してきたが、当業者であれば、添付の請求項の精神及び範囲を逸脱することなく、本発明を変形例とともに実施できることを認識するであろう。よって、本発明は、上述した実施の形態に限定されるものではなく、本明細書に記載の精神と範囲を逸脱することなく、その全ての変形例及び均等物を更に含むものである。

【図 1 A - 1 C】

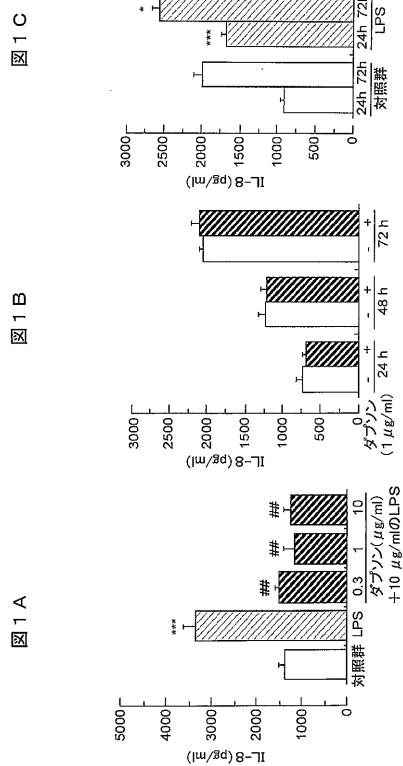


図 1 A

図 1 B

図 1 C

【図 2 A - 2 B】

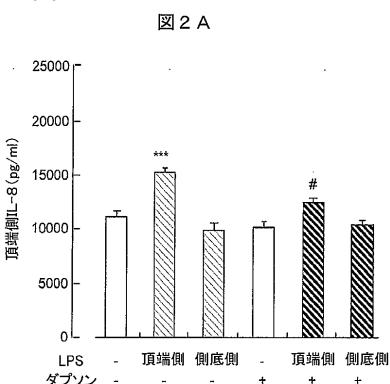


図 2 A

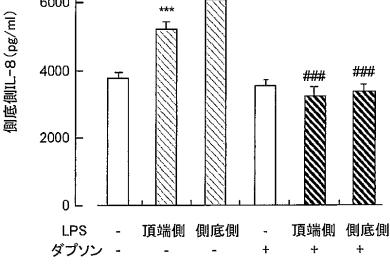


図 2 C

図 2 D

【図 3】

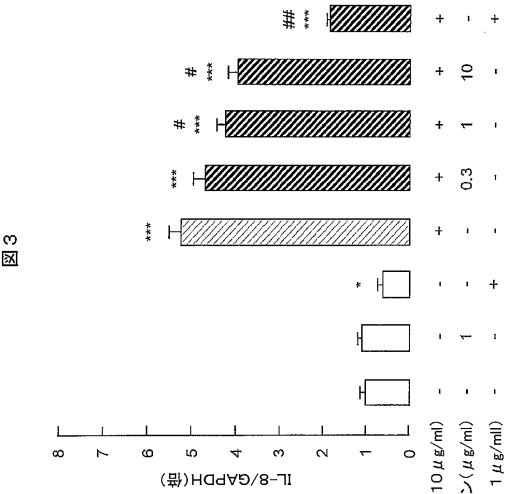
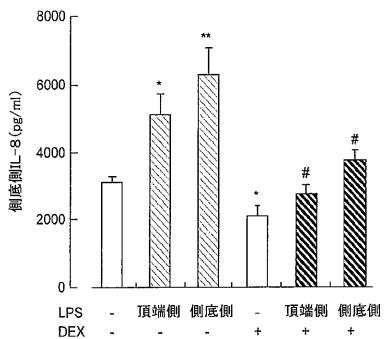


図 3



【図 5 A - 5 B】

図 5 A

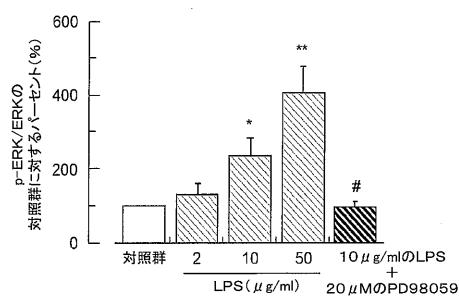
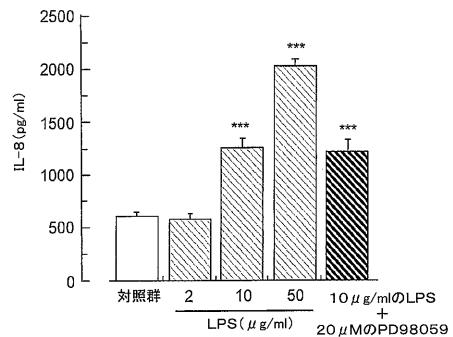


図 5 B



【図 6 A - 6 B】

図 6 A

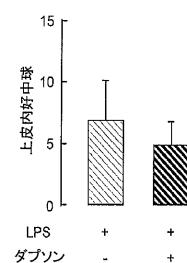
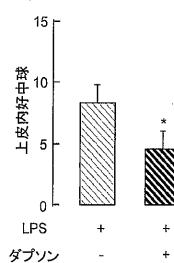


図 6 B



【図 7 A - 7 B】

図 7 A

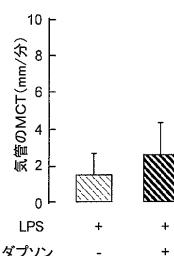
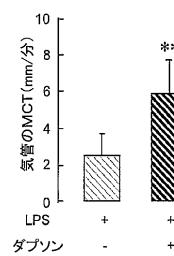
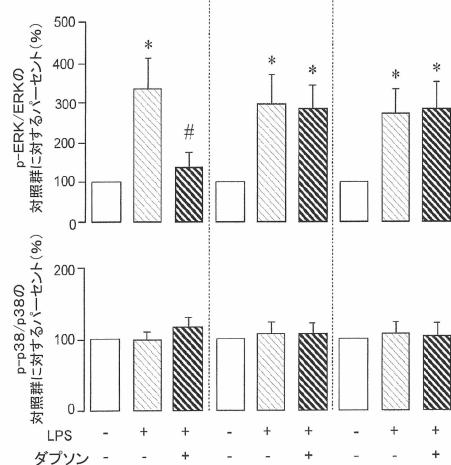
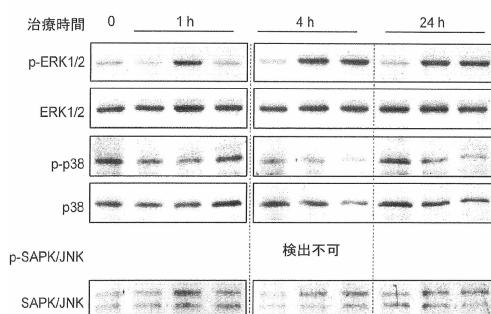


図 7 B



【図 4】

図 4



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 11/08 (2006.01) A 6 1 P 11/08
A 6 1 P 11/06 (2006.01) A 6 1 P 11/06

(74)代理人 100124235
弁理士 中村 恵子
(74)代理人 100124246
弁理士 遠藤 和光
(74)代理人 100128211
弁理士 野見山 孝
(74)代理人 100145171
弁理士 伊藤 浩行
(72)発明者 ルービン , ブルース , ケー .
アメリカ合衆国、ヴァージニア州 23233、リッチモンド、ロインズ ランディング レー
ン、2401
(72)発明者 叶 宗一郎
東京都杉並区桃井3-6-1-s913
(72)発明者 田名部 育
アメリカ合衆国、ヴァージニア州 23233-1159、リッチモンド、2017、キルバーン
サークル、3511

審査官 幸田 俊希

(56)参考文献 国際公開第2009/108147 (WO, A1)
特表2006-502150 (JP, A)
特表2006-500930 (JP, A)
特表2002-543122 (JP, A)
Chougule M, et al., AAPS PharmSciTech, 2008年, Vol.9, No.1, p.47-53
Schmidt E, et al., Clin Exp Immunol, 2001年, Vol.124, p.157-162
Abe M, et al., Clinical and Experimental Dermatology, 2008年, Vol.33, p.759-763
Debol SM, et al., Journal of Leukocyte Biology, 1997年, Vol.62, p.827-836
Kanoh S, et al., CHEST, 2011年, Vol.140, No.4, p.980-990

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 31 / 00
A 6 1 K 9 / 00
A 6 1 P 11 / 00
A 6 1 P 29 / 00
Caplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)
JSTplus / JMEDplus / JST7580 (JDreamIII)