

## Angiotensin-converting enzyme (ACE) 阻害薬誘発性の咳嗽発現と ACE 遺伝子型、 血漿中ブラジキニン、サブスタンス P 及び ACE 阻害薬濃度との関連性

奥村博美,<sup>\*,a</sup> 西村恵里子,<sup>a</sup> 假家 悟,<sup>a</sup> 大谷道輝,<sup>a</sup> 内野克喜,<sup>a</sup>  
 深津 徹,<sup>b</sup> 小田中順,<sup>b</sup> 高橋 剛,<sup>b</sup> 渡辺 潔,<sup>b</sup> 伊藤 敬,<sup>b</sup>  
 橋口正行,<sup>c</sup> 越前宏俊,<sup>c</sup> 力久忠昭<sup>c</sup>  
 東京通信病院薬剤部,<sup>a</sup> 同循環器科,<sup>b</sup> 明治薬科大学<sup>c</sup>

## No Relation between Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibitor-Induced Cough and ACE Gene Polymorphism, Plasma Bradykinin, Substance P and ACE Inhibitor Concentration in Japanese Patients

Hiromi OKUMURA,<sup>\*,a</sup> Eriko NISHIMURA,<sup>a</sup> Satoru KARIYA,<sup>a</sup> Michiteru OHTANI,<sup>a</sup> Katsuyoshi UCHINO,<sup>a</sup>  
 Tohru FUKATSU,<sup>b</sup> Jun ODANAKA,<sup>b</sup> Tsuyoshi TAKAHASHI,<sup>b</sup> Kiyoshi WATANABE,<sup>b</sup> Takashi ITOH,<sup>b</sup>  
 Masayuki HASHIGUCHI,<sup>c</sup> Hirotochi ECHIZEN,<sup>c</sup> and Tadaaki RIKIHISA<sup>c</sup>  
*Departments of Hospital Pharmacy<sup>a</sup> and Cardiology,<sup>b</sup> Tokyo Postal Services Agency Hospital,  
 2-14-23 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8798, Japan and Meiji Pharmaceutical  
 University,<sup>c</sup> 2-522-1, Nojio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan*

(Received October 6, 2000; Accepted December 27, 2000)

Persistent dry cough is well known as the most common side-effect of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors. We examined the relationship between a cough and ACE gene polymorphism, plasma bradykinin (BK), substance P (SP) and ACE inhibitor concentrations in patients with hypertension or chronic nephritis. First, ACE genotyping was carried out in 96 patients, 42 with coughs and 54 without coughs, which had been treated with various kinds of ACE inhibitors. However, no significant difference in the ACE genotypes was observed between the two groups. Second, the plasma concentrations of BK, SP and ACE inhibitor were measured in 12 patients, which were treated with trandolapril at a daily dose of 1 mg for 4—33 weeks. In 3 patients, the cough was induced during the trandolapril therapy, while it was induced not in 9 patients. The plasma levels of BK and SP did not significantly change after trandolapril administration in the patients with and without coughs. Between the two groups, there were no significant differences in the plasma levels of BK and SP either before or after the trandolapril therapy. Also the plasma concentrations of trandolapril and trandolaprilat, the active metabolite of trandolapril, did not significantly differ between the two groups. These results suggest that there is no significant relationship between the ACE inhibitor-induced cough and ACE gene polymorphism, plasma BK, SP and ACE inhibitor concentrations in patients with hypertension or chronic nephritis.

**Key words**—angiotensin-converting enzyme inhibitor; cough; genetic polymorphism; bradykinin; substance P; trandolapril

### 緒 言

Angiotensin-converting enzyme (ACE) 阻害薬の服用患者に乾性の咳嗽が生じることが知られている。<sup>1)</sup> ACE は、内因性の血管収縮作用を有するアンジオテンシン (AT) I から ATII への変換に関与する酵素であるが、内因性物質の bradykinin (BK) や substance P (SP) の分解に関与するキニナーゼ II と同一であることが明らかとなっている。したがって、ACE 阻害薬誘発性の咳嗽の発現機序の一

因として、キニナーゼ II の阻害により蓄積した BK 又は SP が気管支の求心性無髄 C-線維を刺激し、反射性の咳嗽を発現させる機序が推定されている。<sup>2)</sup>

咳嗽誘発物質の分解に関係すると想定される ACE には II, ID, DD 型の 3 つの遺伝子型が存在し、<sup>3)</sup> その酵素活性は II 型 < ID 型 < DD 型の順に高いことが知られている。<sup>3,4)</sup> したがって、BK や SP が ACE 阻害薬誘発性の咳嗽に関与しているとすれば、咳嗽の発現頻度は、II 型の ACE 遺伝子を有す

る患者で他の遺伝子型を有する患者よりも高い可能性がある。咳嗽発現と ACE の遺伝子型との関連性については、咳嗽発現群における II 型の頻度が咳嗽非発現群に比べて高いとする報告<sup>5)</sup>と両者に差異を認めないとする報告<sup>6-8)</sup>があり、明確な結論は出していない。

そこで本研究では、既に ACE 阻害薬により咳嗽を発現した既往のある患者の ACE 遺伝子型を調べ、咳嗽が発現しなかった患者群と対比することにより、ACE 阻害薬誘発性の咳嗽発現と ACE 遺伝子型との関連を検討した。さらに、トランドラプリルを服用した患者を対象として、咳嗽発現と服用開始前後の血漿中 BK, SP 濃度及び服用後の血漿中薬物 (トランドラプリル, トランドラプリラート) 濃度との関連性についても検討した。

## 実験の部

本研究のプロトコールは、東京通信病院倫理委員会において承認を得た後、被験者に対して文書を用いて説明を行い、文書同意を得た上で行った。

### 1. 咳嗽発現と ACE 遺伝子型との関連性の検討

1) 対象患者 ACE 阻害薬誘発性の咳嗽発現の有無が既知の患者 1615 名<sup>9)</sup>から、無作為に 96 名 (咳嗽発現者 42 名, 咳嗽非発現者 54 名) を抽出し対象とした。咳嗽発現の判定基準としては、咳嗽を発現する可能性のある疾患 (呼吸器系感染症, 慢性呼吸器系疾患, 心不全) のない患者で、乾性の咳嗽が発現し、医師により ACE 阻害薬の副作用であると判断された症例を副作用による咳嗽発現ありとした。対象患者の背景因子を Table 1 に示す。患者が服用していた ACE 阻害薬は計 7 種類であった。

2) 試薬及び機器 Polymerase chain reaction (PCR) に用いたプライマー (primer 1; 5'CTGGA GACCACTCCCATCCTTTCT3', primer 2; 5'GAT GTGGCCATCACATTCGTCAGAT3') は、アマシ

ャム・ファルマシア・バイオテック株式会社 (東京) より購入した。Proteinase K はベーリンガー・マンハイム株式会社 (東京) より、Taq polymerase (TaKaRa Ex Taq), ミネラルオイル及び電気泳動の分子量マーカー ( $\phi$ X174-Hinc II) は宝酒造株式会社 (京都) より、水飽和フェノール, 1 M Tris-HCl buffer (pH 8), 0.5 M EDTA, エチジウムブロマイド液 (10 mg/ml) は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。その他の試薬は、すべて市販の特級品を使用した。

DNA サーマルサイクラーは、Robo Cyclor TM Gradient 96 (フナコシ株式会社, 東京) を使用した。

3) ACE 遺伝子型の同定 被験者から採取した血液 2.5 ml から得た白血球を Proteinase K を用いて消化 (50°C, 15 hr) した後、フェノール抽出、エタノール沈殿により DNA を析出させた。次いで、Zee らの方法<sup>10)</sup>に準じて ACE 遺伝子を増幅した。すなわち、DNA 約 100 ng を 25 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8) 1  $\mu$ l に溶解し、PCR Buffer (200  $\mu$ M dNTP mixture, 0.2  $\mu$ M Primer 1 及び Primer 2, 25 U/ml Taq polymerase) 49  $\mu$ l を加えた後、PCR 法により ACE 遺伝子を増幅した。PCR の反応条件は、94°C 1 分, 58°C 1 分, 72°C 1 分を 1 サイクルとして、計 30 サイクルとした。次いで、増幅産物を 1.5% アガロースゲル電気泳動にて分離し、エチジウムブロマイドにより染色し、490 bp のシングルバンドを II 型, 190 bp のシングルバンドを DD 型, 490 bp と 190 bp のダブルバンドを ID 型と判定した。

4) 統計解析 咳嗽発現の有無と ACE 遺伝子型との関連性は  $\chi^2$  検定にて検定した。有意水準は 5% とした。

### 2. 咳嗽発現と血漿中 BK, SP 濃度及び薬物濃度との関連性の検討

1) 対象患者 過去 4 週間以内に ACE 阻害薬

Table 1. Characteristics of Patients Who did or did not Develop Cough by Administration of Various Kinds of ACE Inhibitors

Cough	Number of patients						Age (years) <sup>c)</sup>
	Total	Sex	ACE Inhibitors				
			Male/Female	enalapril	alacepril	cilazapril	
+	42	27/15	19	6	7	10 <sup>d)</sup>	60 ± 10
-	54	29/25	28	17	3	6 <sup>b)</sup>	59 ± 9

a) temocapril (n=4), captopril (n=3), imidapril (n=1), lisinopril (n=2), b) temocapril (n=1), captopril (n=5), c) Data are means ± S.D..

の服用歴がない<sup>11)</sup>高血圧症若しくは慢性腎炎の患者 12 名を対象とした。ただし、咳嗽発現の可能性のある疾患（呼吸器系感染症、慢性呼吸器系疾患、心不全）を有する患者、血中 BK 濃度又は SP 濃度を大きく変動させる疾患（急性膵炎、急性肝炎、甲状腺機能亢進症、慢性関節リウマチ）を有する患者は、対象から除外した。

2) 対象薬及び投与方法 患者は、トランドラプリル（オドリック®錠）1 mg を 1 日 1 回朝食後に服用した。

3) 採血 採血は、トランドラプリルの服用開始時及び開始後（咳嗽発現時又は服用開始 3 ヶ月後以降の受診時）の計 2 回行った。服用後の採血は受診時（トランドラプリル服用の 2 時間—7.5 時間後）に行った。血漿中 BK 濃度の測定用には、カリクレインインヒビター及びキニナーゼインヒビター添加の採血管を、血漿中 SP 濃度の測定用には EDTA 二ナトリウムとトラジロール添加の採血管を使用した。また薬物濃度の測定用にはヘパリン添加の採血管を使用した。いずれも採血した血液は遠心分離し、得られた血漿を  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

4) 血漿中 BK 及び SP 濃度の測定 トランドラプリル服用開始前及び服用中の血漿中 BK 及び SP 濃度は、株式会社 SRL にてラジオイムノアッセイポリエチレングリコール法で測定した。

5) 血漿中薬物濃度の測定 血漿中のトランドラプリル及びトランドラプリラート濃度は、ヘキスト・マリオン・ルセル社にて測定した。

6) 統計解析 咳嗽発現患者と非発現患者の血漿中 BK、SP 濃度及び血漿中薬物濃度の平均値の差の検定は、いずれも t 検定で行った。有意水準は 5 % とした。

## 結果及び考察

### 咳嗽発現と ACE 遺伝子型との関連性

96 名の患者を対象として、ACE 阻害薬誘発性の咳嗽発現と患者の ACE 遺伝子型との関連性を検討した。

咳嗽発現群 ( $n=42$ ) と咳嗽非発現群 ( $n=54$ ) の ACE 遺伝子型の内訳は、咳嗽発現群では II 型が 47.6%、ID 型が 38.1%、DD 型は 14.3% であり、非発現群では II 型が 35.2%、ID 型が 57.4%、DD 型は 7.4% であった (Table 2)。ACE 又はキニナーゼ II 活性の最も低い II 型の割合については、咳嗽発現群が非発現群と比較して高い傾向を示したが、両群の間で統計的に有意な差は認められなかった。また、I アレル (対立遺伝子) の発現率は、咳嗽発現群で 0.67、非発現群で 0.64 であり、両群間で有意な差は認められなかった。

Furuya ら<sup>5)</sup>は、日本人の高血圧症患者及び心疾患患者 102 名を対象として、ACE 阻害薬誘発性の咳嗽発現と ACE 遺伝子型との関係を検討し、咳嗽非発現群と比較して咳嗽発現群において II 型が有意に多いという結果を報告した。しかし彼らの報告では、咳嗽発現群と非発現群の被験者数の比が約 3 : 7 と偏りがあった。一方、Kreft-Jais ら<sup>7)</sup>はフランス人を対象に、ほぼ同数の患者の咳嗽発現群と非発現群を対象として同様の検討を行い、両群の ACE 遺伝子型の分布に差がないという結果を報告した。Kreft-Jais らは、Furuya らの報告と合致しない結果が得られた原因として、人種差又は Furuya らの研究では比較の対象となった両群の被験者数に大きな偏りがあったことを指摘している。そこで、本研究では Furuya らと同様に日本人を対象とし、両群の被験者数をほぼ同数として検討を行った。その結果、本研究で得られた結果は、咳嗽発現と

Table 2. ACE Genotypes and Allelic Frequency of Patients Who did or did not Develop Cough during the Administration of ACE Inhibitors

Cough	Number of patients			Allelic frequency		
	Total	Genotypes			I	D
		II	ID	DD		
+	42	20 (47.6%)	16 (38.1%)	6 (14.3%)	0.67	0.33
-	54	19 (35.2%)	31 (57.4%)	4 (7.4%)	0.64	0.36

Values in parentheses represent the % incidence of each genotype within the groups.

ACE 遺伝子型との間に関連性がないとする報告<sup>6-8)</sup>を支持するものであった。

#### 咳嗽発現と血漿中 BK, SP 濃度及び薬物濃度との関連性

新規にトランドラプリルの服用を開始する患者 12 名 (全員男性) を対象として, 咳嗽発現とトランドラプリル服用開始前後の血漿中 BK, SP 濃度及び服用中の血漿中薬物濃度との関連性を検討した。対象患者のうち, 咳嗽発現者は 3 名 (25%) であった。

トランドラプリル服用開始前後の血漿中 BK 濃度を Fig. 1 に示した。トランドラプリルの服用開始前及び服用中の血漿中 BK 濃度は, 咳嗽発現群と咳嗽非発現群との間で有意な差は認められなかった。また血漿中 BK 濃度は, 両群いずれにおいても, トランドラプリル服用開始前と服用中で有意な変動を示さなかった。トランドラプリル服用開始前後の血

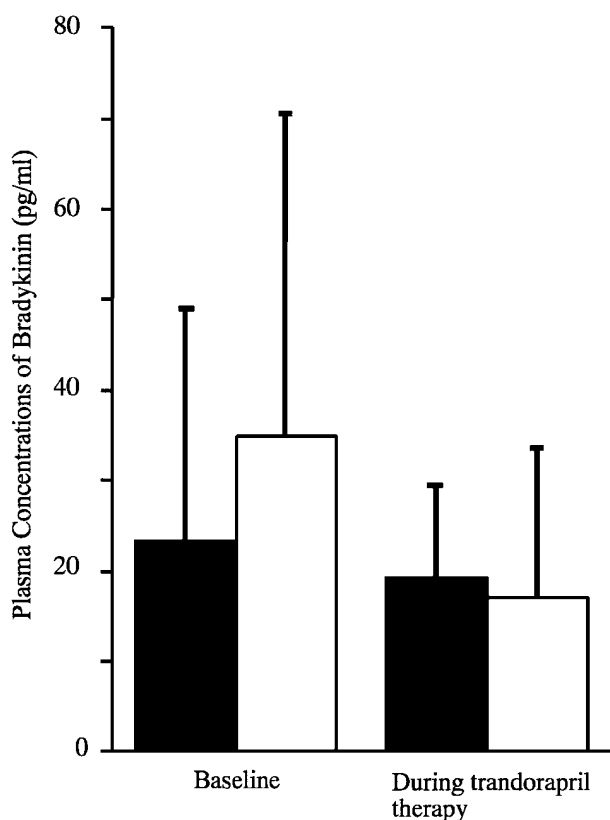


Fig. 1. Plasma Concentrations of Bradykinin before and during the Trandolapril Therapy in Patients Who Developed Cough (■,  $n=3$ ) and Patients Who did not (□,  $n=9$ )

Values are expressed as means  $\pm$  S.D.. No significant differences were observed in the mean plasma bradykinin concentrations within and between the patients who did or did not develop ACE inhibitor-induced cough at baseline and during the trandolapril therapy.

漿中 SP 濃度に関する BK と同様の結果であった (Fig. 2)。

ACE 阻害薬服用中の血漿中 BK 及び SP 濃度に関しては, Sunaga ら<sup>12)</sup>が 12 名の高血圧症患者を対象としてエナラプリルの単回投与試験を行い, エナラプリル投与後の血漿中 BK と SP の濃度はいずれも, プラセボ投与時と比較して有意な差が認められなかったと報告している。トランドラプリルの連続投与で得られた本研究の結果も, 彼らの結果と同様であったことから, ACE 阻害薬誘発性の咳嗽発現の有無と血漿中 BK 及び SP 濃度との間には関連性は認められないと考えられた。ACE が循環血液中以外に血管内皮細胞や組織中 (肺, 腎など) にも存在することを考慮すると, 血漿中以外の BK や SP が ACE 阻害薬誘発性の咳嗽発現に関連している可能性がある。しかし現段階では, ヒトで組織内の生理活性物質濃度を測定することは不可能であること

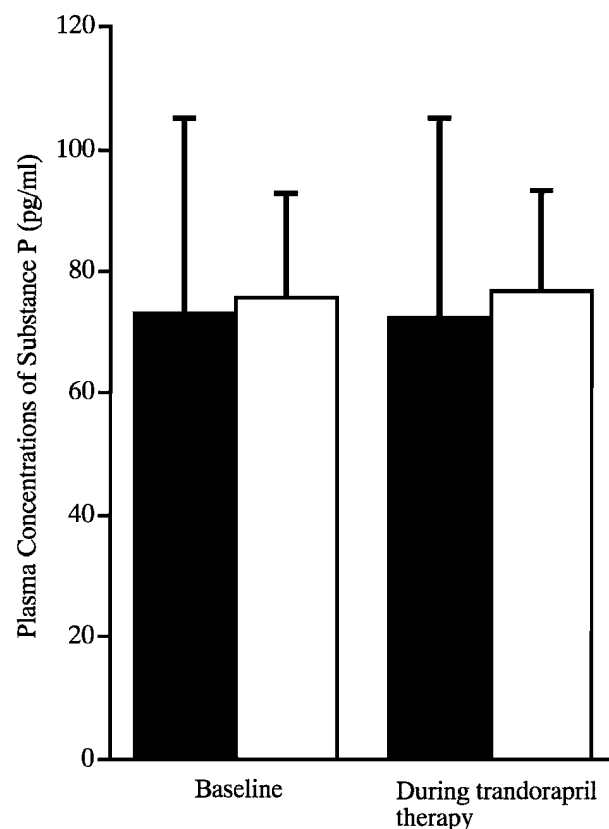


Fig. 2. Plasma Concentrations of Substance P before and during the Trandolapril Therapy in Patients Who Developed Cough (■,  $n=3$ ) and Patients Who did not (□,  $n=9$ )

Values are expressed as means  $\pm$  S.D.. No significant differences were observed in the mean plasma substance P concentrations within and between the patients who did or did not develop ACE inhibitor-induced cough at baseline and during the trandolapril therapy.

Table 3. Plasma Concentrations of Trandorapril and Trandoraprilat during the Trandolapril Therapy

Cough	Number of patients	Plasma concentration (pg/ml)	
		Trandorapril	Trandoraprilat
+	3	127 ± 132	2550 ± 390
-	8	227 ± 246	2528 ± 893

Values are expressed as means ± S.D., N.S.: No significant differences were observed between the two groups.

より, ACE 阻害薬誘発性の咳嗽の発現と気管支組織における BK や SP の関連を明確にすることは困難であると考えられる。

さらに, ACE 阻害薬誘発性の咳嗽発現と ACE 阻害薬の体内動態の個人差との関連を, トランドラプリルをモデル薬物として, 薬物服用の 2—4.5 時間後に採血を行った 11 名の患者を対象に検討した (Table 3). トランドラプリル服用中の血漿中トランドラプリル濃度及び ACE 阻害作用を有す本体である活性代謝物トランドラプリラート濃度は, いずれも, 咳嗽発現群と非発現群で有意な差は認められなかった. したがって, 血漿中薬物濃度も ACE 阻害薬誘発性の咳嗽発現の有無と関連性がないことが示された。

以上, 本研究の結果より, ACE 阻害薬誘発性の咳嗽発現は, 既知の ACE 遺伝子型, 血漿中 BK, SP 及び ACE 阻害薬濃度では説明されない未知の要因, 若しくは, 血漿中 BK 及び SP 濃度には反映されない気管支組織におけるこれらの因子の変動が原因であることが示唆された。

**謝辞** 本研究において, 血漿中トランドラプリル及びトランドラプリラート濃度を測定して頂いた株式会社ヘキスト・マリオン・ルセル社に感謝いたします。

## REFERENCES

- 1) Sesoko S., Kaneko Y., *Arch. Intern. Med.*, **145**, 1524 (1985).
- 2) Lacourciere Y., Lefebvre J., Nakhle G., Faison E. P., Snavely D. B., Nelson E. B., *J. Hypertension*, **12**, S49–S53 (1994).
- 3) Rigat B., Hubert C., Alhenc-Gelas F., Cambien F., Corvol P., Soubrier F., *J. Clin. Invest.*, **86**, 1343–1346 (1990).
- 4) Lee E. J. D., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **37**, 212–214 (1994).
- 5) Furuya K., Yamaguchi E., Hirabayashi T., Itoh A., Hizawa N., Ohnuma N., Kawakami Y., *Lancet*, **343**, 354 (1994).
- 6) Arima J., Ieiri I., Abe R., Yukawa E., Higuchi S., Urae A., Maruyama T., *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **28**, 159–160 (1997).
- 7) Kreft-Jais C., Laforest L., Bonnardeaux A., Dumont C., Plouin P-F., Jeunemaitre X., *Lancet*, **343**, 740 (1994).
- 8) Chadwick I. G., Yeo W. W., Higgins K. S., Jackson P. R., Ramsay L. E., Morice A. H., *Lancet*, **343**, 740–741 (1994).
- 9) Nishimura E., Hashiguchi M., Echizen H., Ogata H., Rikihisa T., Odanaka J., Watanabe K., Sekiguchi H., Itoh T., Fukuda N., Takahashi T., Matsuki T., Kariya S., Uchino K., *The Teishin Igaku*, **48**, 617–618S (1996).
- 10) Zee R. Y. L., Lou Y-K., Griffiths L. R., Morris B. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 9–15 (1992).
- 11) Yeo W. W., Chadwick I. G., Kraskiewicz M., Jackson P. R., Ramsay L. E., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **40**, 423–429 (1995).
- 12) Sunaga K., Fujimura A., Shiga T., Ebihara A., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **48**, 441–445 (1995).