

当院内科外来に受診中の気管支喘息患者のうち、十分な説明の後同意を得た 19 名を対象とした。また健常コントロール 8 名、アトピー性皮膚炎患者 1 名、間質性肺炎患者 4 名を対照とした。

(2) 呼気凝集液採取の実際

呼気凝集液の採取には、RTube (Respiratory Research 社、米国) と ECoScreen (JAEGER 社、ドイツ) の二通りを試みた。RTube はディスポーザルの呼気採取管の周りに冷却した金属の筒を装着し、被験者が片手で持ちながら口に加えて呼気を採取する。一方 ECoScreen は冷却装置が -30°C に保たれる特性を備えた呼気凝縮液採取専用機器である。被験時にはノーズクリップを着用し、15 分の安静呼気を行って凝集液を採取した。また同一被験者が続けて双方の機器を使用する場合には被験者の負担・機器の特性を考慮し、RTube で 5 分、ECoScreen で 10 分の呼気採取を行った。回収した呼気凝集液は -80°C で保管、分析した。

(3) 呼気凝集液の解析法

まず呼気凝集液中のタンパク濃度を、Lowry 法にて測定した。次に cysteinyl leukotriene (CysLTs), IL-8, IP-10, eotaxin, TARC, MDC, 8-isoprostane の測定を試みた。使用した ELISA kit は、以下の通りである。

CysLTs, 8-isoprostane:

Cayman Chemical, Ann Arbor, MI

IL-8, IP-10, eotaxin, TARC, MDC:

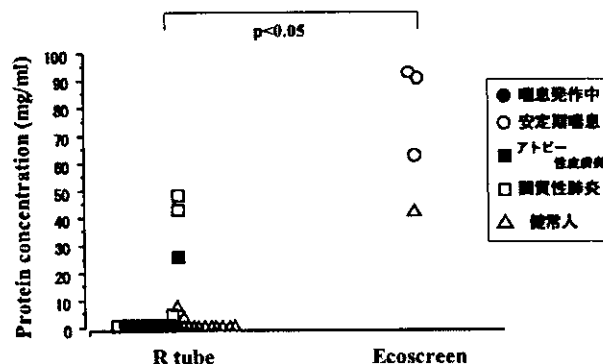
R&D system, Minneapolis, MN

C. 研究結果

(1) 呼気凝集液中のタンパク濃度

RTube で測定した呼気凝縮液中のタンパク濃度は、喘息患者ではほとんどが測定限界以下であった。むしろ間質性肺炎の 2 例とアトピー性皮膚炎の 1 例において、それぞれ 49, 43, 26 mg/ml と比較的高値であった。一方

ECoScreen では、喘息安定期のサンプルにて全例 50 mg/ml 以上であった。同一患者での比較は行っていないが、少なくとも喘息患者の呼気凝縮液中タンパク濃度は、ECoScreen を用いた方が RTube よりも有意に高値であることがわかった。



(2) CysLTs 濃度

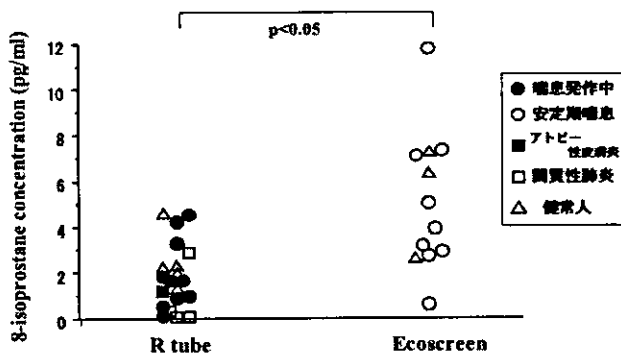
CysLTs の測定を試みたが、いずれもサンプルも測定限界以下であった。

(3) IL-8, IP-10, eotaxin, TARC, MDC 濃度

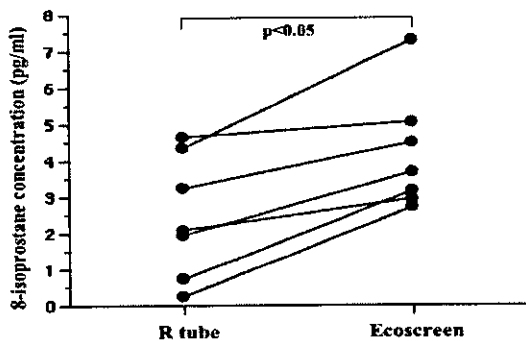
IL-8, eotaxin, TARC に関しては、いずれも測定限界以下であった。IP-10 も、全例で 3 pg/ml 以下であった。MDC に関しては、症例によっては 100 pg/ml 前後の値をとるものがあつたが、ELISA kit の測定感度が悪く (最低閾値: 125 pg/ml)、RTube と ECoScreen との間ではっきりとした差異を見いだすには至らなかった。

(4) 8-isoprostane 濃度

8-isoprostane の濃度は以下に示す通り、10 pg/ml 前後で測定可能な症例が多かった。喘息患者のみに絞ってみると、RTube は 2.0 ± 1.6 pg/ml ($n = 14$), ECoScreen は 5.0 ± 3.3 pg/ml ($n = 9$) と、ECoScreen で採取した方が有意に高値であった ($p < 0.05$)。



更に同一の症例を用いて、両機器の間に 8-isoprostane の濃度の差があるかどうかを検討した。RTube では 2.5 ± 1.7 pg/ml, ECoScreen では 4.2 ± 1.6 pg/ml と、ECoScreen の方が有意に高値であった ($n = 7, p < 0.05$)。



D. 考察

RTube は持ち運びが容易であり、例えば被験者が自宅 で採取することも可能であるという長所がある。しかし 金属の冷媒が呼気の採取を開始してから約 5 分で温く なり、十分な検体量の採取が困難であるという欠点が指 摘されている。一方 ECoScreen は安定したサンプルの回 収が可能であるが、機器の大きさから移動が困難である という難点がある。

呼気凝縮液中タンパク濃度は、RTube では測定限界以 下の症例が大半であったものの ECoScreen では 50 mg/ml 以上の例が散見され、ECoScreen の有用性が示唆 された。その機序については明らかではないが、一定し

た呼気の冷却により回収効率が上がることが推測され る。また未処理の呼気凝縮液では、CysLTs は測定限界 以下であった。これらの脂質メディエーターの測定に際 しては、同班の秋山らが施行しているように、サンプル のメタノール処理・濃縮などの調整が必要であると考え られる。サイトカイン・ケモカインの中では、MDC が喘 息患者の呼気中で上昇するとの報告がある (Clin Exp Allergy 34: 786, 2004)。事実今回の検討でも測定可能 なサンプルが散見されたが、正確な評価のためにはもう 少し鋭敏な ELISA kit の開発が待たれるところである。 8-isoprostane は酸化ストレスのマーカーであり、喘息 患者の呼気中で上昇している (Am J Respir Crit Care Med 160: 216, 1999)。今回の検討では ECoScreen を使 用した方が 8-isoprostane の濃度は有意に高値であり、 喘息患者のモニタリングを呼気で行う際の測定機器の 選定には注意が必要である。

E. 結論

以上より、呼気凝集液の測定機器間の差異については さらに詳細な検討が必要と考えられる。個々の機器には それぞれの長所・短所があり、それらの特性を生かした 使い分けが必要である。そういった特徴をふまえた使用 により、気道炎症モニタリングのツールとして今後ますます 利用価値が高まると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1・論文発表

なし

2・学会発表

なし

凝縮液の生化学的検討： 遺伝子操作動物での基礎的検討

分担研究者：長瀬隆英（東京大学大学院医学系研究科呼吸器内科学 教授）

研究要旨 気管支喘息の発症機序については未解明の部分が多く、その解明には関連遺伝子の探索を含めた研究が必須と考えられる。近年、遺伝子改変マウスが次々と開発され疾患関連遺伝子の解明に有用であることが報告されている。また気管支喘息の発症分子機序の解明についても、実験動物としての遺伝子改変マウスを用いた研究が重要であることが考えられる。本研究では、気道過敏性に関連するバイオマーカーを明らかにするため、近年、その生理学的意義が注目されている脂質性メディエーターや CGRP ファミリーなどの炎症関連メディエーターの遺伝子改変マウスを作成し、実験的検討を行った。今回の研究結果により、CGRP、PAF、LTB₄はいずれも気道過敏性に関与することが示された。一方、好酸球浸潤については、LTB₄は強く関与するものの、CGRP、PAFは影響を与えないことが示唆された。また、呼気凝縮液成分を反映する BALF の解析において、気道過敏性にリンクすることが推察される炎症メディエーターの検討が進められた。ヒトおよびマウスゲノムがほぼ解読された現在、ノックアウトマウスは遺伝子機能解析において主要な役割を果たしつつある。今後、遺伝子改変マウスを活用することにより、さらに各々の遺伝子・蛋白系の生理的意義・重要性が解明され、呼吸器臨床医学への貢献が期待される。

A. 研究目的

気管支喘息は極めて多数の因子から病像が形成されており、その発症機序については未だ解明されていないことも多い。気管支喘息の病態的・生理学的特徴として、慢性的な気道炎症・気道過敏性・可逆的な気流制限の3つが挙げられる。気道過敏性の機序はこれまで不明の部分が多かったが、喘息特有の気道炎症に起因していることが明らかになってきた。気道炎症の機序は、炎症細胞と気道構成細胞が放出する炎症メディエーター・サイトカインなどの生理活性物質が相互反応を繰り返す炎症カスケードであると考えられている。しかしながら、気管支喘息の発症機序については未解明の部分が多く、その解明には関連遺伝子の探索を含めた研究が必須と考えられる。一方、近年、遺伝子改変マウスが次々と開発されており、疾患関連遺伝子の解明に有用であることが報告されている。気管支喘息の発症分子機序の解明についても、実験動物としての遺伝子改変マウスを用いた研究が重要であることが考えられる。本研

究では、気道過敏性に関連するバイオマーカーを明らかにするため、近年、その生理学的意義が注目されているアラキドン酸代謝物などの脂質性メディエーター（図1）や、CGRP ファミリー（図2）などの炎症関連メディエーターの遺伝子改変マウスを作成し、実験的検討を行った。

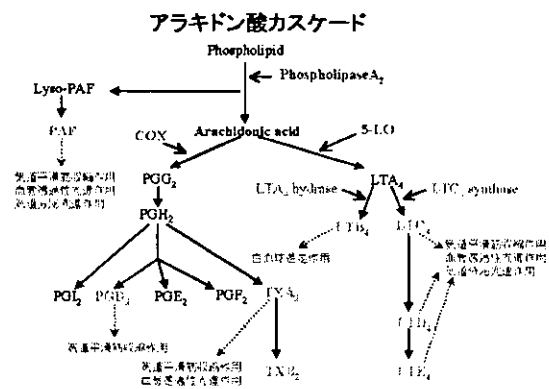


図1 アラキドン酸カスケードの模式図

Comparison of amino acid sequence of human AM with human CGRP, CGRP II, and amylin (CGRP family)

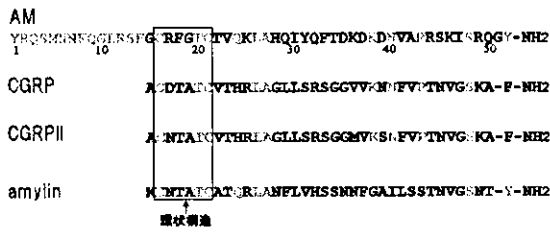


図2 CGRPファミリーペプチド群のアミノ酸配列

B. 研究方法

遺伝子改変マウスとして、

- 1) CGRP ノックアウトマウス、
 - 2) PAF 受容体ノックアウトマウス、
 - 3) ロイコトリエン B₄ (LTB₄) ノックアウトマウス
- を独自に作成した。

実験には、ホモ接合体ノックアウトマウスと、その littermate コントロールの野生型マウスを用いた。アレルギー性気管支喘息モデルとして、ovalbumin による抗原感作・吸入負荷を施行し、気道反応性試験・気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 採取を施行した。

C. 研究結果

1) CGRP ノックアウトマウスの検討: 感作されたノックアウトマウス群は、野生型群と比べて MCh 気道反応性が低下していることが示唆された。BALF 細胞分画解析において、感作により著明な eosinophilia が認められたが、野生型・ノックアウトマウス両群間において有意差は認めなかった。BALF CysLTs (LTC₄/D₄/E₄) に関しては、感作された野生型群で、saline 群に比べ有意に上昇しており、本研究に用いたアレルギー性気管支喘息実験モデルにおいて肺内 CysLTs (LTC₄/D₄/E₄) が増加することが示唆された。一方、感作され

たノックアウトマウス群は、対照となる野生型群と比べて有意に CysLTs (LTC₄/D₄/E₄) が低下していた。

2) PAF 受容体ノックアウトマウスでの検討: 感作されたノックアウトマウス(KO)群は、野生型(WT)群と比べて MCh 気道反応性が有意に低下していることが示唆された(図3)。

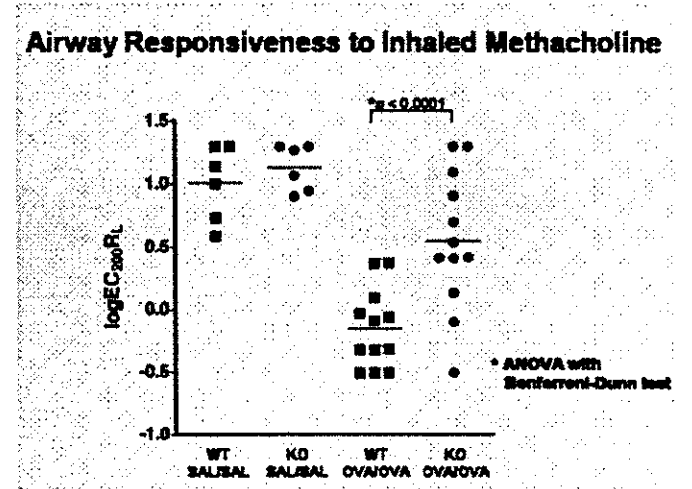


図3 MCh 気道反応性の結果

BALF 細胞分画解析において、感作により著明な eosinophilia が認められたが、野生型・ノックアウトマウス両群間において有意差は認めなかった(図4)。

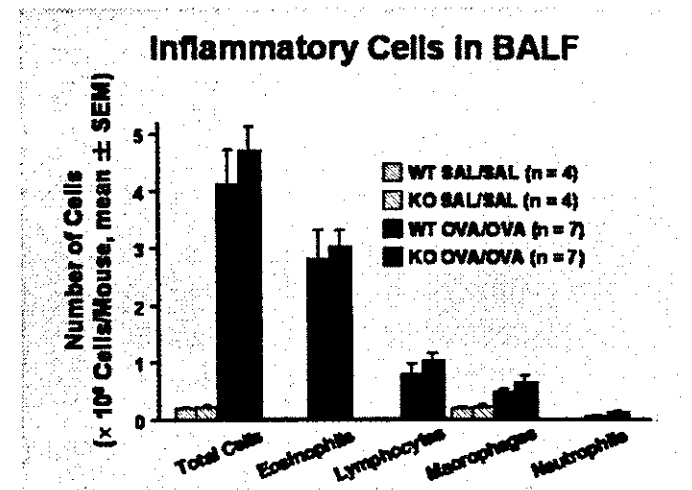


図4 BALF 細胞分画解析の結果

3) LTB₄ ノックアウトマウスでは、感作されたノックアウトマウス群は、野生型群と比べて MCh 気道反応性が低下していることが示唆された。BALF 解析において、ノックアウトマウス群では eosinophilia が著明に軽減していることが認められた。BALF 中の Th2 サイトカイン(IL-5、IL-13)もノックアウトマウス群では eosinophilia が著明に軽減していた。

D. 考察

気管支喘息は、炎症を病態の特徴としており、その発症には多数の生理活性物質の関与が想定される。気管支喘息に関わる候補物質・遺伝子を評価する手段として、遺伝子改変マウスが有望とされている。今回の研究結果により、CGRP、PAF、LTB₄ はいずれも気道過敏性に関与することが示された。一方、好酸球浸潤については、LTB₄ は強く関与するものの、CGRP、PAF は影響を与えないことが示唆された。また、呼気凝縮液成分を反映する BALF の解析において、気道過敏性にリンクすることが推察される炎症メディエーターの検討が進められた。

ヒトおよびマウスゲノムがほぼ解読された現在、ノックアウトマウスは遺伝子機能解析において主要な役割を果たしつつある。今後、遺伝子改変マウスを活用することにより、未知の病態生理の発見、新薬開発の展望など、呼吸器臨床医学への貢献が期待される。気管支喘息に関しても、気道過敏性の病態機序は未だに明らかではなく、速やかな解明が望まれている。気道過敏性発症機序の解明に向けては、分子生物学などを駆使したトランスレーショナル・リサーチとしての研究アプローチが必須であり、ノックアウトマウスは極めて重要なツールとなることが期待されている。

E. 結論

呼気凝縮液成分を反映する BALF の解析により、気道過敏性への関与が示唆される炎症メディエーターの検討が遺伝子改変マウスを用いて検討された。今後、さらに各々の

遺伝子・蛋白系の生理的意義・重要性が解明されることにより、気管支喘息に対する有効な治療法・管理法の開発および実用化が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ishii S, Nagase T, Shindou H, Takizawa H, Ouchi Y, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor develops airway hyperresponsiveness independently of airway inflammation in a murine asthma model. *J Immunol* 2004; 172: 7095-7102.

2) Takai D, Nagase T, Shimizu T. New therapeutic key for cystic fibrosis: a role for lipoxins. *Nature Immunol* 2004; 5: 357-8. (News and Views) (論文解説)

3) Jo T, Nagata T, Iida H, Imuta H, Iwasawa K, Ma J, Hara K, Omata M, Nagai R, Takizawa H, Nagase T, Nakajima T. Voltage-gated sodium channel expressed in cultured human smooth muscle cells: Involvement of SCN9A. *FEBS Lett* 2004; 567: 339-43.

2. 学会発表

1) ロイコトリエン研究：最近の進歩。第16回日本アレルギー学会春季臨床大会（発表者：長瀬隆英、教育講演），2004.

2) アレルギーの臓器特異性と臓器過敏性：気道領域。第54回日本アレルギー学会総会（発表者：長瀬隆英、シンポジウム），2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特許取得、実用新案登録、その他ともなし。

IV. 研究報告会（平成 17 年 2 月 1 日）
発表資料

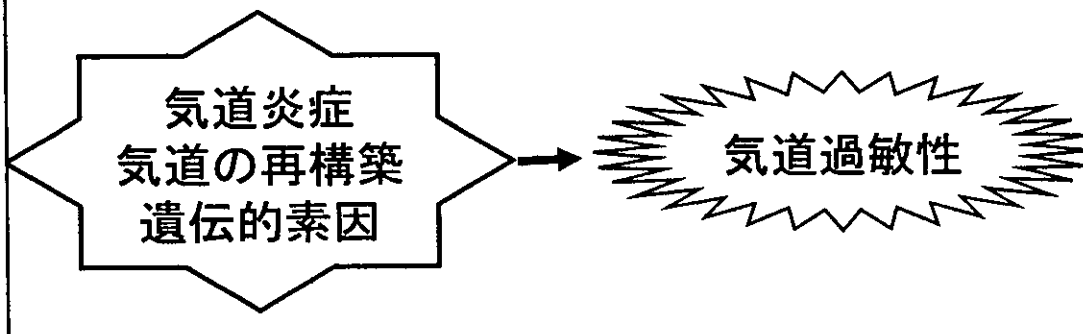
気道過敏性の簡便な診断法開発と その応用による 喘息管理向上に関する研究

和歌山県立医科大学内科学III
相模原病院臨床研究センター
東京大学呼吸器内科
帝京大学内科学講座

一ノ瀬正和
秋山 一男
長瀬 隆英
大田 健

目的

1. 気道過敏性検査を日常臨床で簡便に測定できる方法の開発
→生理学的アプローチの再考
2. 気道過敏性に代わるパラメーターの開発
→生化学的アプローチの検討



班編成の方針

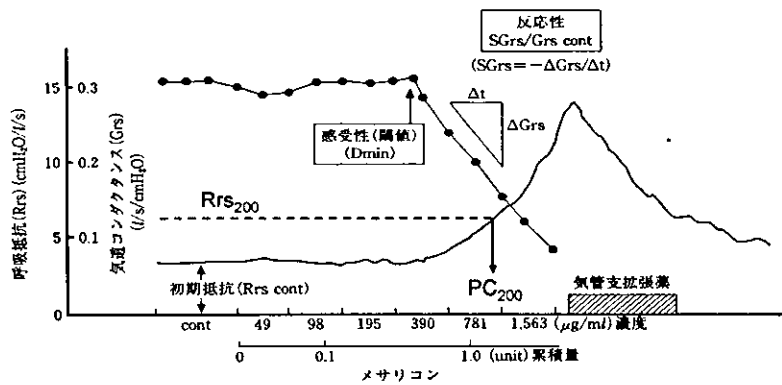
1. できるだけ多くの喘息患者の臨床データに基づいた検討
(一ノ瀬、秋山、大田)
2. 遺伝子操作動物モデルと臨床検討の有機的結合
(長瀬、一ノ瀬)

研究計画

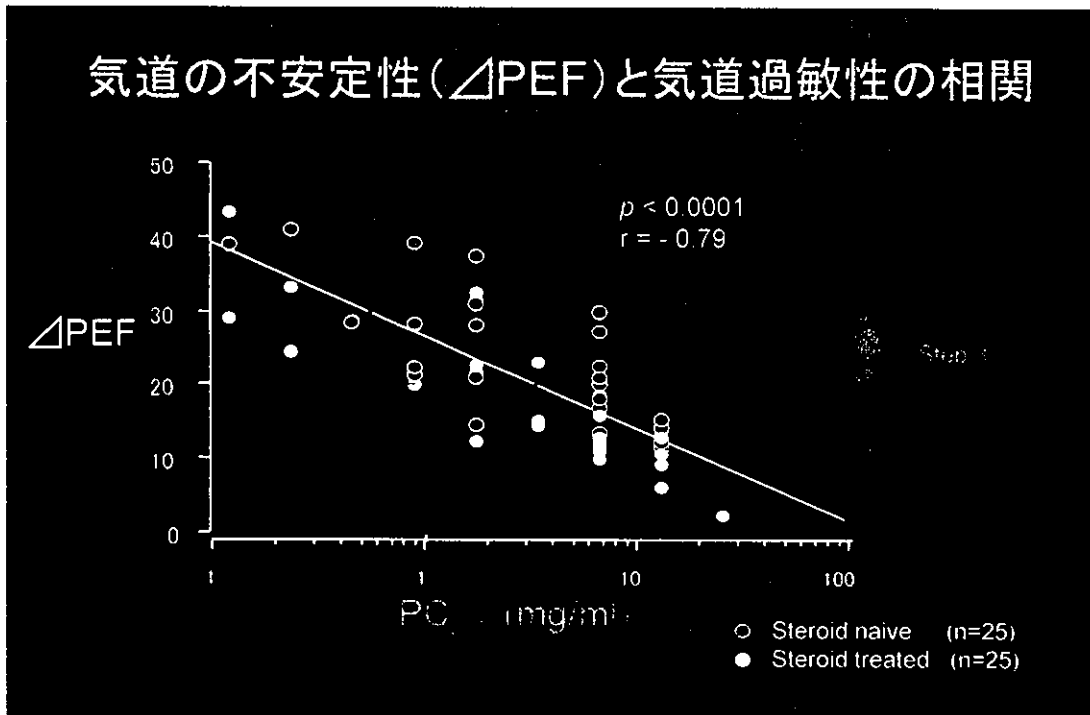
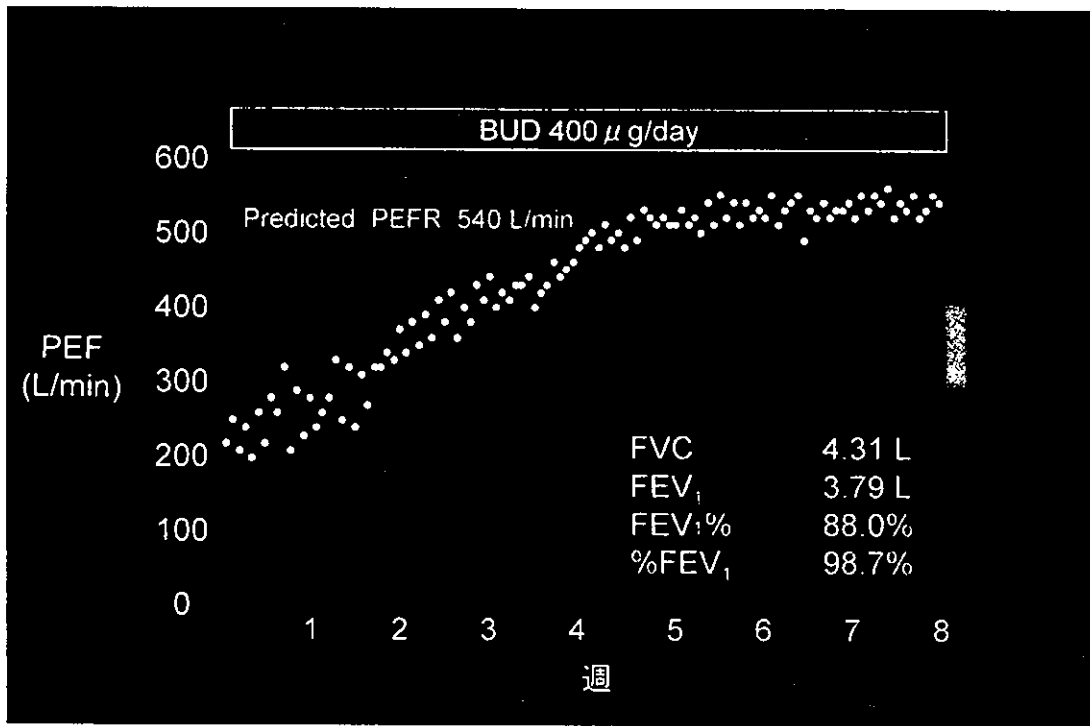
1. 気道過敏性に対する生理学的アプローチの再考
2. 呼気凝縮液分析による気道過敏性検査の代用
方法論の確立:安全性・妥当性・他の検査との比較
気道過敏性検査との関連性
分析物質の絞込み

気道過敏性と生理パラメーターに関する検討
(一ノ瀬)

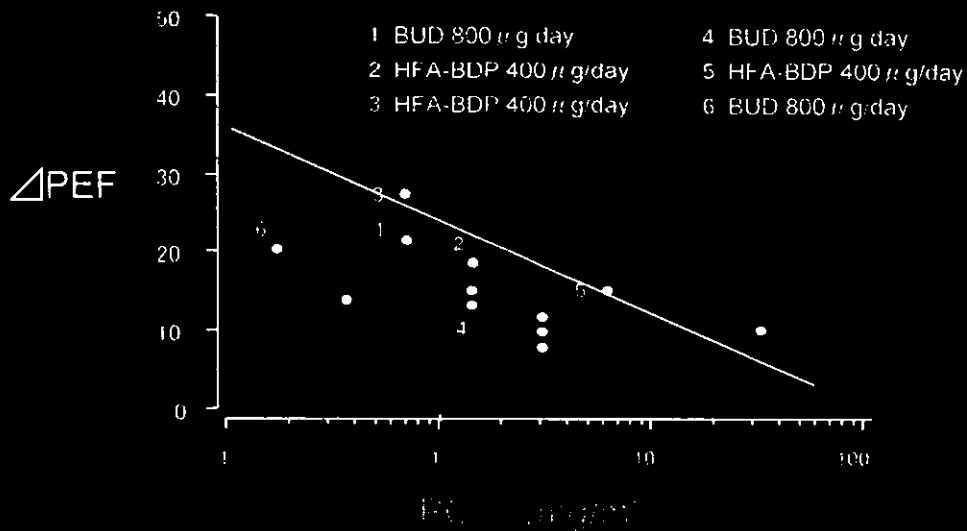
Number	50 (F/M = 32/18)
FVC (L)	3.28±0.79
FEV _{1.0} (L)	2.55±0.73
FEV _{1.0} % (%)	77.4±10.1
%FEV _{1.0} (%)	95.6±16.6



アストグラフ法による気道過敏性測定例



生理パラメーターのノモグラムと治療による変化



今年度の研究成果

1 気道過敏性に対する生理学的アプローチの再考

1. メサコリン吸入刺激による気道過敏性はより簡便な生理学的指標であるピークフローの週内変動性と相関が認められた。
2. さらに症例数を加えた、より正確なノモグラムは治療薬の効果判定に有用な手段となると考えられた。

研究計画

1. 気道過敏性に対する生理学的アプローチの再考
2. 呼気凝縮液分析による気道過敏性検査の代用
方法論の確立:安全性・妥当性・他の検査との比較
気道過敏性検査との関連性
分析物質の絞込み

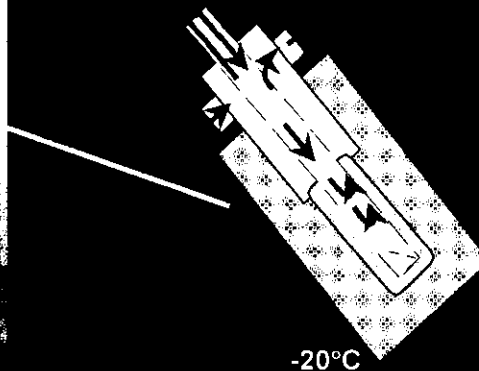
呼気凝縮液の原理

1. 呼気中の水蒸気、霧状粒子を急速冷却により採取
2. 呼吸により、細かく分岐する気道に乱流を発生
3. 乱流により気道表面の液体をエロゾル化
4. エロゾル化された液体を呼気の気流により排出

呼気凝縮液採取機器(据え置き型)



- 10-20分の安静換気
- 3-4 mlの呼気凝縮液

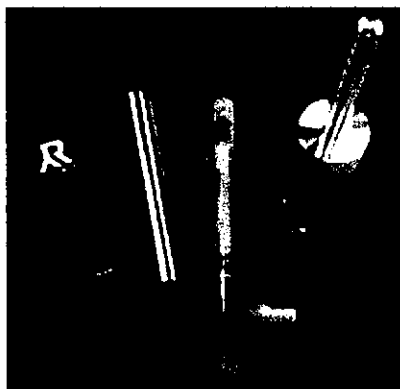


-20°C

ECo-Screen
(Jaeger)

呼気凝縮液採取機器(ポータブル)

採取装置



RTube™
(RESPIRATORY RESEARCH, Inc.)

実際の採取

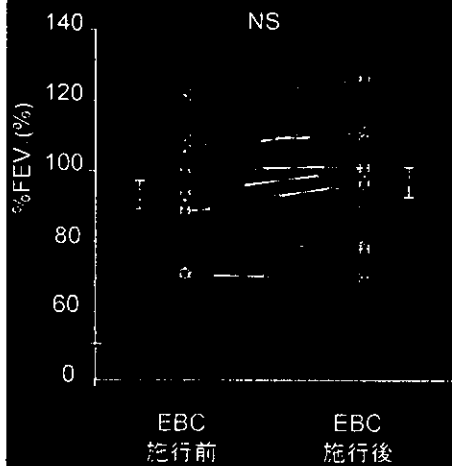


安静換気10~20分間で
2~3mlの検体採取

呼気凝縮液検査の利点

1. 操作が簡便
2. 非侵襲的
3. 小児や高齢者でも可能
4. 繰り返しての採取が可能
5. 簡易型では携帯可能
6. 外来や在宅でも施行可能

呼気凝縮液検査の安全性と妥当性 (秋山)



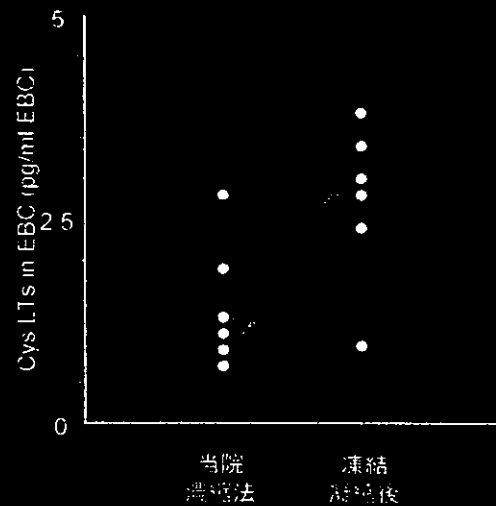
- 呼気水前後での一秒量の低下(一)
= 呼気水採取は完全に非侵襲性
- 呼気水中アミラーゼ
測定した17例全例で検出量以下
= 唾液の混入は無い

呼気凝縮液検査の妥当性：濃縮方法 (秋山)

相模原病院の濃縮法

- 1 Empore C18 カラムにEBCを通す
- 2 水、ヘキサンで洗った後メタノール0.5mlで拍出
- 3 拍出液を0.05mlまで減圧下で濃縮
- 4 CysLTs ELISA kit (Cayman)で測定

Cf 凍結凝集法 (Barnesら)



呼気凝縮液検査の妥当性：測定可能分子 (大田)

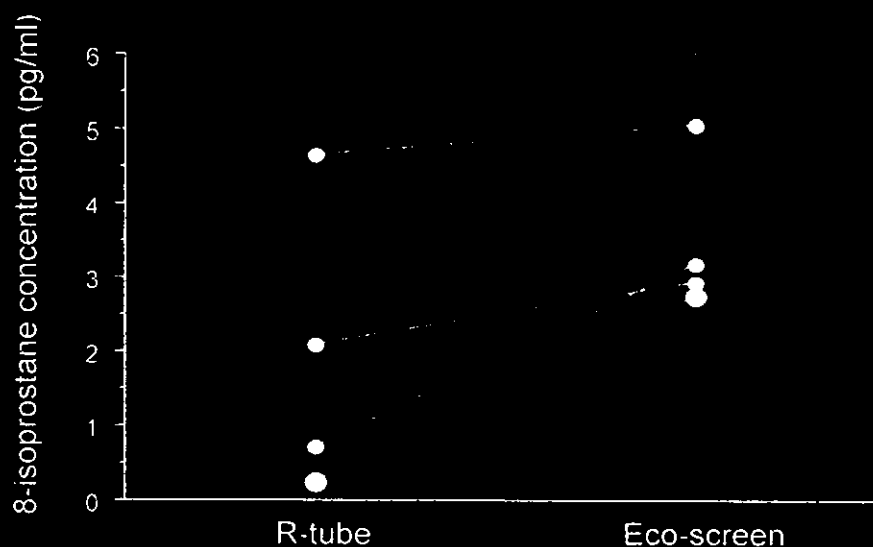
測定可能分子

IP-10、MDC、8-イソプロスタン

測定不可能分子

LTC₄、LTB₄、IL-8、Eotaxin、TARC

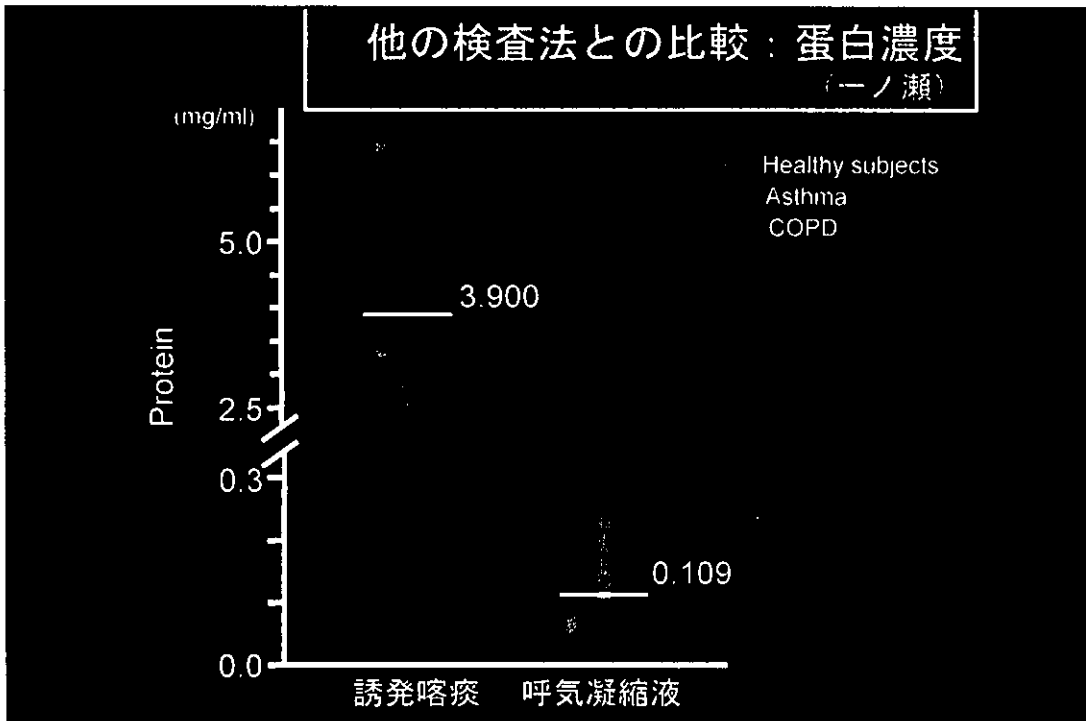
呼気凝縮液検査の妥当性: R-tube vs Eco-screen (大田)



呼気凝縮液検査と他の検査との比較: 対象 (一ノ瀬)

	Healthy subjects	Asthma	COPD
年齢	42.8 ± 6.7	45.6 ± 6.6	66.7 ± 2.0 [†]
性別 (M/F)	11 / 5	3 / 7	27 / 2
FVC (L)	3.70 ± 0.61	3.40 ± 0.32	2.79 ± 0.12 ^{**}
%FVC (%)	105.3 ± 5.7	100.8 ± 4.7	84.3 ± 3.4 [*]
FEV ₁ /FVC (%)	86.9 ± 2.1	83.5 ± 3.8	43.1 ± 2.4 [†]
%FEV ₁ (%)	114.2 ± 6.9	109.9 ± 8.8	52.5 ± 3.9 [†]

(†: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ vs Healthy subjects, Asthma, **: $p < 0.05$ vs Healthy subjects)



今年度の研究成果

II 呼気凝縮液分析による気道過敏性検査の代用

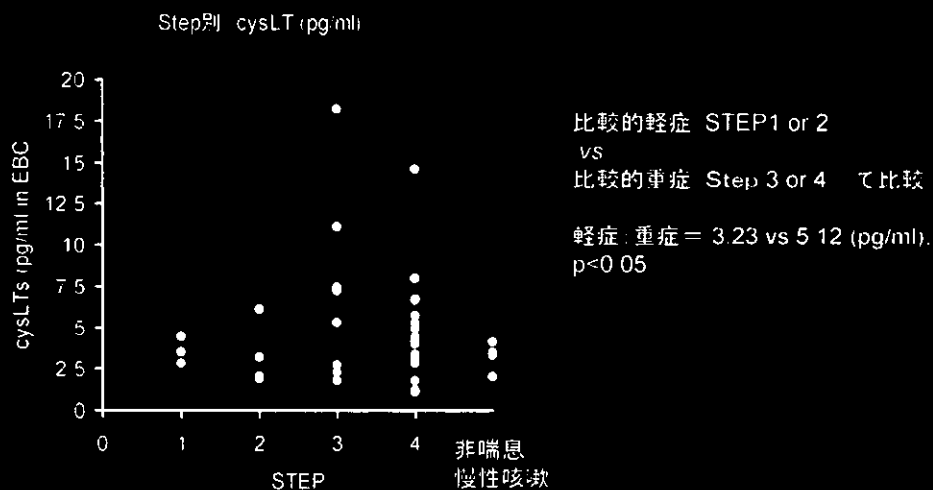
方法論の確立：安全性・妥当性・他の検査との比較

1. 呼気凝縮液はエコスクリーン、RTubeともに安全に10～15分の安静換気により約2 ml以上のサンプルを採取することができた。
2. 呼気凝縮液の蛋白濃度は誘発喀痰の約1/40であった。また気管支喘息患者で健常者の約3倍高値であった。
3. 喘息患者の呼気凝縮液中で、cysLTsに加え、IP-10、MDC、TNF- α 、酸化ストレス関連物質（8-イソプロスタン、カタラーゼ、グルタチオン）も測定可能であった。
4. 濃縮法による質量変化があるので比較には注意が必要。

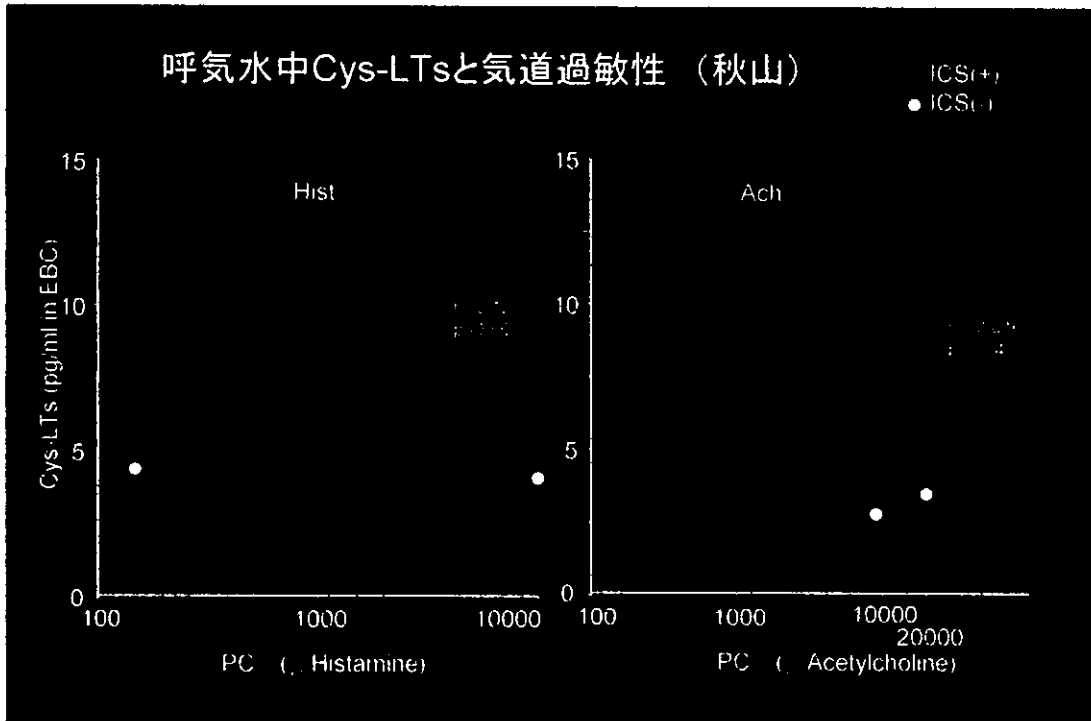
研究計画

1. 気道過敏性に対する生理学的アプローチの再考
2. 呼気凝縮液分析による気道過敏性検査の代用
方法論の確立: 安全性・妥当性・他の検査との比較
気道過敏性検査との関連性
分析物質の絞込み

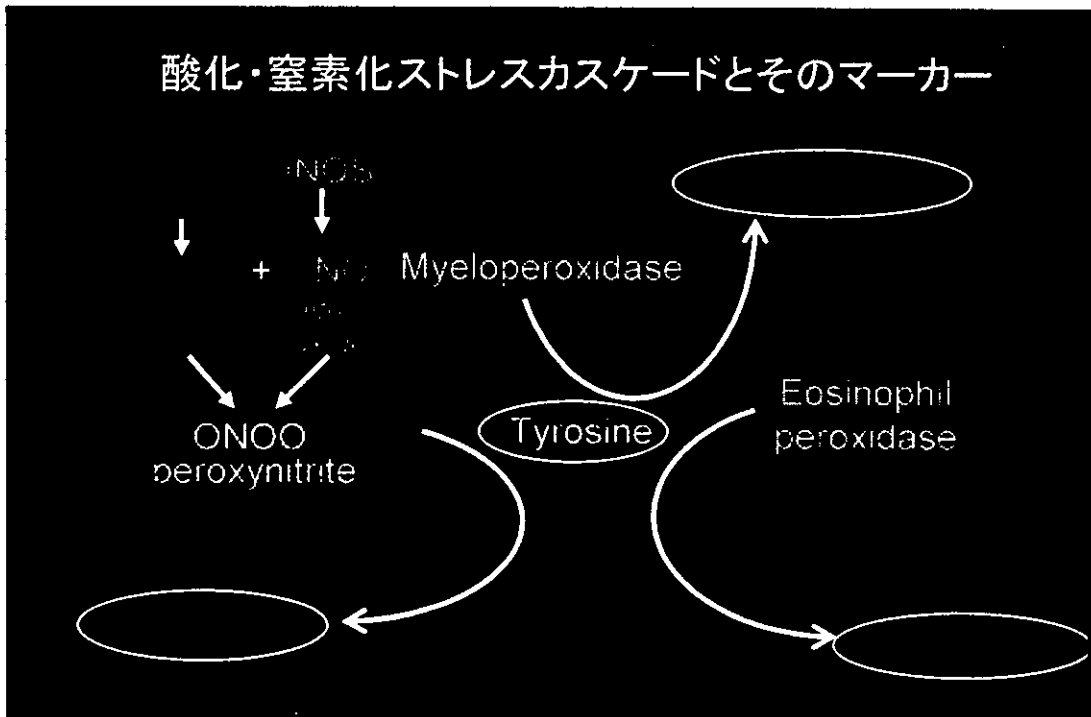
呼気水中cysLTsと重症度(Step) (秋山)



呼気水中Cys-LTsと気道過敏性 (秋山)

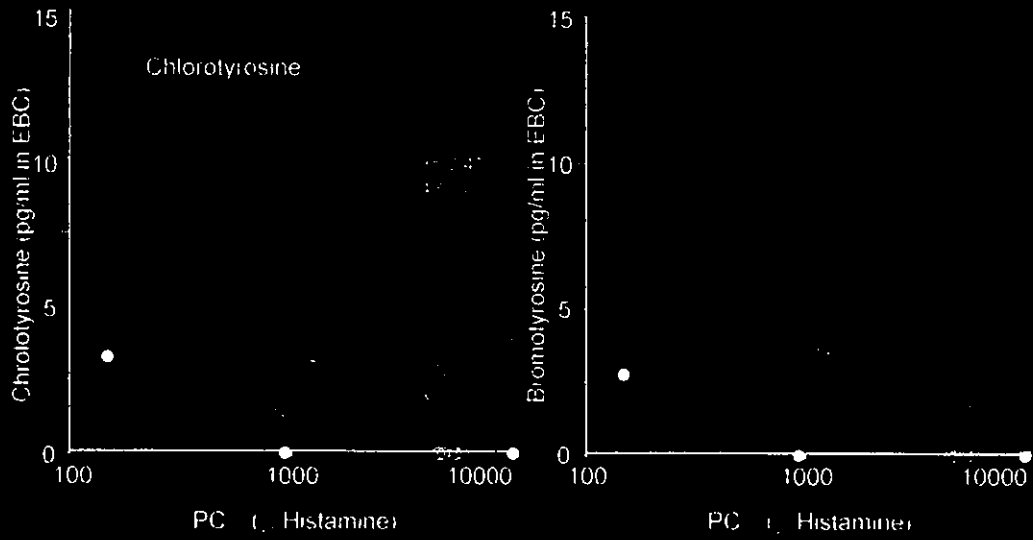


酸化・窒素化ストレスカスケードとそのマーカー



呼気凝縮液中Tyrosine代謝産物と
気道過敏性(Histamine) (秋山)

ICS(+)
●● ICS(-)



3-Nitrotyrosine の定量評価(HPLC-EC) (一ノ瀬)

