

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

呼気凝縮液を用いた気管支喘息の  
気道炎症評価法の確立と臨床応用に関する研究

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 一ノ瀬 正 和

平成 18 (2006) 年 3 月

## 目 次

I . 研究班名簿 .....	1
II . 総括研究報告書	
呼気凝縮液を用いた気管支喘息の気道炎症評価法の確立と 臨床応用に関する研究 主任研究者 一ノ瀬 正和 .....	3
III . 分担研究報告書	
1. 呼気凝縮液中炎症関連物質と気管支喘息病態の関連についての検討 一ノ瀬 正和 .....	11
2. 呼気凝縮液と各種臨床的パラメーターとの比較 秋山 一男 .....	15
3. 呼気中増殖因子の検討 大田 健 .....	18
4. 凝縮液の生化学的検討：遺伝子操作動物での基礎的検討 長瀬 隆英 .....	21
IV . 研究報告会（平成 18 年 1 月 31 日）発表資料 .....	25
V . 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	43
VI . 研究成果の刊行物 .....	45

# I. 研究班名簿

呼吸凝縮液を用いた気管支喘息の気道炎症評価法の  
確立と臨床応用に関する研究

研究班名簿

	氏名	所属	役職	所属住所
主任研究者	一ノ瀬 正和	和歌山県立医科大学 内科学第三講座	教授	〒 641-8509 和歌山県和歌山市紀三井寺 811-1
分担研究者	秋山 一男	独立行政法人国立病院機構 相模原病院臨床研究センター	センター長	〒 228-8522 神奈川県相模原市桜台 18-1
	大田 健	帝京大学医学部内科学講座 呼吸器・アレルギー	教授	〒 173-8606 東京都板橋区加賀 2-11-1
	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	〒 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
研究協力者	南方 良章	和歌山県立医科大学 内科学第三講座	助教授	〒 641-8509 和歌山県和歌山市紀三井寺 811-1
	山縣 俊之	和歌山県立医科大学 内科学第三講座	講師	〒 641-8509 和歌山県和歌山市紀三井寺 811-1
	松永 和人	和歌山県立医科大学 内科学第三講座	講師	〒 641-8509 和歌山県和歌山市紀三井寺 811-1
	中西 正典	和歌山県立医科大学 内科学第三講座	助手	〒 641-8509 和歌山県和歌山市紀三井寺 811-1
	平野 綱彦	和歌山県立医科大学 内科学第三講座	助手	〒 641-8509 和歌山県和歌山市紀三井寺 811-1
	粒来 崇博	独立行政法人国立病院機構 相模原病院臨床研究センター	医員	〒 228-8522 神奈川県相模原市桜台 18-1
	三田 晴久	独立行政法人国立病院機構 相模原病院臨床研究センター	分子生物学 研究室室長	〒 228-8522 神奈川県相模原市桜台 18-1
	鈴木澤 尚実	独立行政法人国立病院機構 相模原病院臨床研究センター	医員	〒 228-8522 神奈川県相模原市桜台 18-1
	谷口 正実	独立行政法人国立病院機構 相模原病院臨床研究センター	気管支喘息 研究室室長	〒 228-8522 神奈川県相模原市桜台 18-1
	前田 裕二	独立行政法人国立病院機構 相模原病院臨床研究センター	情報推進 研究室室長	〒 228-8522 神奈川県相模原市桜台 18-1
	大友 守	独立行政法人国立病院機構 相模原病院臨床研究センター	治験管理室 室長	〒 228-8522 神奈川県相模原市桜台 18-1
	押方 智也子	独立行政法人国立病院機構 相模原病院臨床研究センター	医員	〒 228-8522 神奈川県相模原市桜台 18-1
	小野 恵美子	独立行政法人国立病院機構 相模原病院臨床研究センター	医員	〒 228-8522 神奈川県相模原市桜台 18-1
	足立 哲也	帝京大学医学部内科学講座 呼吸器・アレルギー	講師	〒 173-8606 東京都板橋区加賀 2-11-1
	長瀬 洋之	帝京大学医学部内科学講座 呼吸器・アレルギー	助手	〒 173-8606 東京都板橋区加賀 2-11-1

## II. 総括研究報告書

## 呼気凝縮液を用いた気管支喘息の気道炎症評価法の確立と臨床応用に関する研究

主任研究者：一ノ瀬正和（和歌山県立医科大学内科学第三講座 教授）

### 研究要旨

気管支喘息の本態は慢性気道炎症であり、その評価法の確立は気管支喘息の管理向上に不可欠である。しかし、従来の手法は侵襲を伴うものが多く、一般臨床で簡便に繰り返して施行することは困難である。本研究では無侵襲かつ簡便な呼気凝縮液を用いた気道炎症評価法の確立と一般臨床への応用に関する検討を行った。サイトカインアレーキットを用いた検討では、呼気凝縮液中の9種の炎症関連物質の発現が気管支喘息患者で増加しており、3種類の物質では生理学的指標との関連が示された。ELISAによる定量評価では IGF-1 濃度が測定可能で、気管支喘息患者で有意に増加していた。呼気凝縮液中の CysLTs も気管支喘息患者で増加しており、重症度との関連が示唆された。遺伝子操作動物を用いた検討では、CGRP、LTB<sub>4</sub> がいずれも気道過敏性に関与することが示された。これらの結果から、呼気凝縮液は気管支喘息の気道炎症や病態を評価する簡便かつ非侵襲的な方法として、極めて有用である可能性が示唆され、今後の一般臨床への応用にむけて、今回検出された種々の炎症関連物質の定量化の確立や、治療反応性等の検討により、炎症関連物質の喘息病態における特異度の評価が重要である。

### 分担研究者

秋山一男

独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター  
センター長

大田 健

帝京大学医学部内科学講座教授

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

浄液などが用いられてきたが、いずれも侵襲性が高く、繰り返しての評価は困難であった。近年、誘発喀痰を用いた炎症細胞（好酸球など）や上澄成分の分析が広く行われているが、まったくの無侵襲ではなく、また処理が煩雑なため、研究目的以外の一般臨床ではあまり行われていない。一方、最近開発された呼気凝縮液は無侵襲、一般臨床でも応用可能であり、気道炎症の新しい評価法として有用な可能性があるが、含有される成分が微量で再現性についての評価が十分になされていない、あるいは従来の気道炎症評価法との比較検討が十分になされていない、などの課題がある。さらに気道過敏性などの呼吸生理パラメーターとの関連性についても詳細に検討した報告は少ない。

### A. 研究目的

気管支喘息の本態は慢性的な気道炎症であり、管理（治療）の目標は気道炎症の制御にある。従って、気道炎症の評価法の確立は気管支喘息治療の向上に不可欠である。従来、気道炎症の評価法として気道生検や気管支肺胞洗

平成16年度の「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」班における検討で、

呼気凝縮液中の蛋白濃度は気管支喘息群では健常人群の約 2 倍で、種々の炎症関連物質の存在が示唆されること、サイトカインアレーキットによる検討で、呼気凝縮液中にいくつかのサイトカインやケモカイン、増殖因子が定性的に検出できる可能性があること、呼気凝縮液中のプロモチロシンやクロロチロシンはヒスタミンによる気道過敏性と関連すること、などについて報告した。

本研究では一般臨床においてアレルギー性気道炎症を迅速かつ簡便に定量的に評価しうる方法を確立するとともに、気管支喘息の気道炎症に関与する物質を明らかにし、臨床における疾患の重症度や治療効果の評価、増悪の予知などのモニタリングとして有用なバイオマーカーを確立し、ひいては難治性喘息の病態解明や、新たな治療法開発、および気管支喘息発作やリモデリングの機序解明などにおける有用性についても検討することを目的とした。本年は3年間の研究の初年度であり、到達目標を呼気凝縮液で測定可能なバイオマーカーの確立、さらにこれらのバイオマーカーと気道過敏性や閉塞性障害などの生理的指標との関連性の検討とした。具体的には、①呼気凝縮液中炎症物質の種々の炎症関連物質の検出と、喘息病態との関連についての検討(一ノ瀬班、秋山班、大田班)、②遺伝子操作動物モデルを用い、呼気凝縮液に応用可能な生化学的バイオマーカーの検討(長瀬班)、を今回の目的とした。

## B. 研究方法

1) 呼気凝縮液中の炎症関連物質の検出と、喘息病態との関連についての検討(一ノ瀬班、秋山班、大田班)

呼気凝縮液の採取は据え置き型のエコスクリーン(Jaeger社)、またはポータブル型の RTube (Respiratory Research社)を用いて採取した。具体的には健常者、吸入ステロイド未治療の気管支喘息患者で15分の安静換気により採取した。採取した呼気凝縮液中の各種炎症物質の蛋白発現を Human Cytokine Array (RayBiotech社)を用いて測定した。

また呼気凝縮液中の増殖因子(IGF-1、PDGF-AA、VEGF)の蛋白濃度を ELISA kit (R&D System社)を用いて測定した。さらに、呼気凝縮液を濃縮し、システニルロイコトリエン(CysLTs)量を ELISA kit (Cayman社)を用いて測定した。

上記で測定した種々の炎症関連物質について、健常者と気管支喘息患者で比較を行った。またこれら呼気凝縮液中の炎症関連物質と、気管支喘息の重症度、閉塞性障害の程度や気道過敏性などの関連について検討した。

気道過敏性検査はメサコリンやアセチルコリン、ヒスタミン吸入刺激に対する気道の反応性で測定した。

2) 遺伝子操作動物モデルを用い、呼気凝縮液に応用可能な生化学的バイオマーカーの検討(長瀬班)

遺伝子改変マウスとして、① CGRP ノックアウトマウス、②ロイコトリエン B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) 受容体 (BLT1) ノックアウトマウス、を独自に作成し、ovalbumin による抗原感作、吸入負荷を施行し、気道反応性試験および気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症細胞、各種メディエーターやサイトカインを測定し比較検討した。

(倫理面への配慮)

検査内容、得られる結果、予測される危険性の項目について文書で説明の上、同意を取得した患者のみ対象とした。またデータは部外者が接触できないよう厳重に管理した。加えて参加者の氏名等、本人が確認できるような形の公表は行わないよう配慮した。

## C. 結果

1) 呼気凝縮液中の炎症関連物質の検出と、喘息病態との関連についての検討(一ノ瀬班、秋山班、大田班)

a. サイトカインアレーキットによる測定(一ノ瀬班)

呼気凝縮液を Human Cytokine Array を用いて解析した結果、気管支喘息患者では、IL-4、IL-8、IL-17、TNF- $\alpha$ 、

RANTES、IP-10、TGF- $\beta$ 1、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ の発現が、健常人と比較して有意に亢進していた。このうち、RANTESの発現レベルは1秒量や初期呼吸抵抗といった閉塞性障害の程度と有意な相関を示した。またTNF- $\alpha$ やTGF- $\beta$ 1の発現レベルはメサコリンによる気道過敏性やピークフローの週内変動性といった気道の不安定性の程度と有意な相関を示した。

#### b. 呼気凝縮液中増殖因子の定量測定(大田班)

増殖因子では呼気凝縮液中のIGF-1は検出可能であったが、PDGF-AAとVEGFはほぼ全ての検体で検出限界以下であった。呼気凝縮液中IGF-1の濃度は、健常人では $81.7 \pm 22.8$  pg/mlであったのに対し、安定期と発作時の気管支喘息患者ではそれぞれ $118.9 \pm 53.5$  pg/ml、 $132.8 \pm 43.1$  pg/mlであり、健常人に比べ有意に高値であった(健常人 vs 安定期、 $p = 0.0394$ ; 健常人 vs 発作時、 $p = 0.0074$ )。呼気凝縮液中IGF-1濃度と気管支喘息のステップ別重症度や閉塞性障害の程度(%1秒量)、血清IgE値との間には相関関係を認めなかった。

#### c. 呼気凝縮液中のCysLTsの測定(秋山班)

呼気凝集液中CysLTs量は重症な症例で高値である傾向を認めた(ステップ1、2 =  $3.23$  pg/ml、ステップ3、4 =  $5.12$  pg/ml、 $p < 0.04$ )。しかし、1秒量やアセチルコリンまたはヒスタミンによる気道過敏性、呼気ガス中NO濃度、尿中LTE4濃度などとの間に有意な相関を認めなかった。

#### 2) 遺伝子操作動物モデルを用い、呼気凝縮液に応用可能な生化学的バイオマーカーの検討(長瀬班)

感作されたCGRPノックアウトマウス群は、野生型群と比べてメサコリン気道反応性が低下し、BALF中CysLTs濃度の上昇抑制が認められた。しかし、BALF中への好酸球浸潤は両群で有意差を認めなかった。

感作されたBLT1ノックアウトマウス群でも、野生型群と比べてメサコリン気道反応性が低下していた。さらに、BALF中の好酸球浸潤やTh2サイトカイン(IL-5、IL-13など)濃度についても、BLT1ノックアウトマウス群では著明に減少していた。

#### D. 考察

今回の検討で、呼気凝縮液中の種々の炎症物質の発現を網羅的に測定可能であることが示され、健常人と比較して気管支喘息患者で発現が亢進している9種の炎症関連物質が同定された。これらの炎症関連物質の発現亢進は気管支肺胞洗浄液などによる従来報告とも合致しており、呼気凝縮液は気道被覆液における炎症関連物質の発現を反映する可能性が示された。またこれらの炎症物質の中で、RANTESは1秒量や初期呼吸抵抗で示される閉塞性障害の程度と、TNF- $\alpha$ やTGF- $\beta$ 1は気道過敏性やピークフローの週内変動性などで示される気道の不安定性とそれぞれ相関が認められ、これらの物質の呼気凝縮液中発現が、気管支喘息の病態を反映している可能性が示唆された。

増殖因子の中では、PDGF-AA、VEGFは測定感度以下であったものの、IGF-1は測定可能で、健常人と比べ、安定期や発作期の気管支喘息患者で増加が認められた。IGF-1は気管支喘息におけるリモデリングに関与すると考えられており、今回の検討により呼気中のIGF-1は気管支喘息病態を知る有用な指標のひとつとなりうる可能性が示唆された。

脂質メディエーターでは、呼気凝縮液を濃縮することでCysLTs濃度が測定可能で、気管支喘息の重症度と関連している可能性が示唆された。呼気凝縮液中CysLTs濃度は、1秒量や気道過敏性、呼気中NO濃度とは相関を示さなかったが、CysLTsは呼気NOと異なりステロイド治療による影響を受けにくいとされており、ステロイドに反応しにくい患者などにおける気道炎症の病態を反映するかもしれない。



遺伝子改変マウスを用いた研究結果からは、CGRP や LTB<sub>4</sub> が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、LTB<sub>4</sub> は強く関与するものの、CGRP では影響を与えないことが示唆された。さらに呼気凝縮液成分を反映する BALF の解析において、IL-5、IL-13 などの気道過敏性にリンクすることが推察される炎症物質の検討が進められた。このような遺伝子改変マウスを用いた解析により、呼気凝縮液を反映する BALF 中において、気管支喘息の病態に関わる炎症関連物質が同定されれば、呼気凝縮液を用いた測定による一般臨床への応用も可能となることが考えられる。

#### E. 結論

呼気凝縮液を用いた種々の炎症関連物質の検討により、気管支喘息の気道炎症を評価し、病態を反映するいくつかの物質が同定された。しかし、これらの物質が治療反応性のモニタリングとして有用な可能性、あるいはこれらの物質の発現変化と生理学的指標の変化との関連、などの点について、従来法との比較検討も含めたさらなる詳細な検討が必要である。今後の一般臨床への応用に向けての定量化の検討により簡便性を追求すること、さらに個々の物質と生理学的パラメーターなどとのより詳細な比較検討や、ステロイドによる反応性の検討により、これらの物質の喘息病態における特異性を追求することが、次年度以降の課題である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

英文論文

1) Minakata Y, Ichinose M, et al: Microvascular

hyperpermeability in chronic obstructive pulmonary disease airways. *Thorax* 60: 882, 2005

- 2) Komaki Y, Ichinose M: Cytokine-mediated xanthine oxidase upregulation in chronic obstructive pulmonary disease's airways. *Pulm Pharm Ther* 18: 297-302, 2005
- 3) Yamagata T, Ichinose M: Angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinaemia accompanied by pleural effusion. *Respirology* 10: 124-127, 2005
- 4) Fukuchi Y, Ichinose M, et al: Clinical Efficacy and Safety of Transdermal Tulobuterol in the Treatment of Stable COPD: An Open-Label Comparison with Inhaled Salmeterol. *Treat Respir Med.* 2005; 4(6):447-55.
- 5) Yamagata T, Ichinose M: Agents against cytokine synthesis or receptors *Eur J Pharmacol* 533(1-3): 289-301, 2006

和文論文

- 1) 山縣俊之、一ノ瀬正和: テオフィリンの COPD 気道炎症に対する抗炎症効果. *呼吸* 24: 35-36, 2005
- 2) 平野綱彦、一ノ瀬正和: 安定期 COPD 患者の肺機能に及ぼすサルメテロールとツロブテロール(貼付)の効果の比較検討. *呼吸* 24: 36-37, 2005
- 3) 一ノ瀬正和編: COPD 診療マニュアル. 南江堂、2005
- 4) 一ノ瀬正和: 慢性閉塞性肺疾患(肺気腫症/慢性気管支炎). *今日の治療指針* 2005. 医学書院、206-207、2005
- 5) 一ノ瀬正和: COPD(慢性閉塞性肺疾患)診断と治療のためのガイドライン. *今日の治療指針* 2005. 医学書院、1513-1517、2005
- 6) 平野綱彦、一ノ瀬正和: β<sub>2</sub> 刺激薬の使用法. *気管支喘息診療ハンドブック*. 永井厚志編, 中外医学社, 117-126、2005

- 7) 平野綱彦、一ノ瀬正和: 呼気凝縮液による病態解明. Annual Review 呼吸 2005, p85-91、2005
- 8) 山縣俊之、一ノ瀬正和: テオフィリンの臨床効果 (COPD). 喘息治療におけるテオフィリン薬, p263-277、2005
- 9) 平野綱彦、一ノ瀬正和、他: 長時間作用型抗コリン薬 (Long-acting anticholinergic agent). 呼吸と循環 52: 1247-1255、2004
- 10) 一ノ瀬正和: COPD の薬物療法. Medical Academy News 925: 4、2005
- 11) 一ノ瀬正和: 難治性喘息. 喘息 18: 76-80、2005
- 12) 一ノ瀬正和: <COPD 治療薬>臭化チオトロピウム「スピリーバ」. 医学ジャーナル 41: 137-141、2005
- 13) 一ノ瀬正和: 新規薬剤による治療の趨勢. 臨床医 31: 10-14、2005
- 14) 山縣俊之、一ノ瀬正和: 呼気と気道炎症のパラメーター. アレルギーの臨床 25: 79-82、2005
- 15) 一ノ瀬正和: 呼吸器疾患管理におけるモニタリング. Leading article. 呼吸 24: 130、2005
- 16) 一ノ瀬正和: COPD の薬物療法—JRS2004 年ガイドラインを中心に. クリニカル プラクティス 24: 287-289、2005
- 17) 南方良章、一ノ瀬正和: II. 病態 2) 気道組織と肺機能の特徴. アレルギー・免疫 12: 22-27、2005
- 18) 一ノ瀬正和: 気管支喘息の病態理解と治療の実際. 今月の治療 13: 29-35、2005
- 19) 一ノ瀬正和: 巻頭言: Real World. 呼吸と循環 53: 345、2005
- 20) 平野綱彦、一ノ瀬正和、他: 4. 呼気凝縮液による病態解明. Annual Review 呼吸器 2005: 85-91、2005
- 21) 一ノ瀬正和: 慢性閉塞性肺疾患: 外来でどのような管理を進めるか. 和歌山県医師会医学雑誌 34: 1-4、2005
- 22) 山縣俊之、一ノ瀬正和: PDE4 阻害薬. THE LUNG perspectives 13: 74-78、2005
- 23) 南方良章、一ノ瀬正和: COPD の治療: 気管支拡張薬. 化学療法の領域 21: 117-124、2005
- 24) 南方良章、一ノ瀬正和: 慢性閉塞性肺疾患の理解. Clinical Study 26: 45-50、2005
- 25) 一ノ瀬正和: COPD の発症メカニズムと診断. Therapeutic Research 26: 811-812、2005
- 26) 山縣俊之、一ノ瀬正和: 長時間作用性  $\beta$ -刺激薬とは? 長時間作用性  $\beta$ -刺激薬と短時間作用性  $\beta$ -刺激薬ではどう違うのですか? Q&A でわかるアレルギー疾患 1: 58-60、2005
- 27) 一ノ瀬正和: 長時間作用型抗コリン薬に関する新たな知見. COPD FRONTIER 4: 63-66、2005
- 28) 山縣俊之、一ノ瀬正和: 咳喘息とその周辺疾患の治療. 呼吸と循環 53: 595-602、2005
- 29) 南方良章、一ノ瀬正和: 簡易型スパイロメーター. 呼吸 24: 515-521、2005
- 30) 一ノ瀬正和: 喘息治療における末梢気道炎症の重要性. アレルギーの臨床 25: 16、2005
- 31) 松永和人、一ノ瀬正和: 末梢気道炎症の治療吸入ステロイドデバイス. アレルギーの臨床 25: 38-43、2005
- 32) 一ノ瀬正和: COPD の見つけ方. Medical Practice 22: 1261、2005
- 33) 松永和人、一ノ瀬正和: 高齢者における気管支喘息、COPD の臨床上的問題点、留意点. アレルギー科 20: 1-9、2005
- 34) 南方良章、一ノ瀬正和: 急性増悪時における気管支拡張薬とステロイドの使い方. COPD FRONTIER 4: 27-32、2005
- 35) 南方良章、一ノ瀬正和: 呼気ガス・呼気凝縮液による閉塞性肺疾患 (COPD・喘息) の評価. Pharma

Medica 23: 23-27、2005

- 36) 山縣俊之、一ノ瀬正和: 炎症性気道・肺疾患における呼気ガス分析. 呼吸 24: 694-699、2005
- 37) 一ノ瀬正和: COPD 薬物療法の新展開. 日本内科学会雑誌 94: 1794-1798、2005
- 38) 松永和人、一ノ瀬正和: 気管支喘息. 呼吸と循環 53: 907-914、2005
- 39) 山縣俊之、一ノ瀬正和: 誘発喀痰を用いた気道・肺の炎症の評価. 呼吸 24: 774-779、2005
- 40) 平野綱彦、一ノ瀬正和: 薬物治療. 医学と医薬 54: 441-448、2005
- 41) 松永和人、一ノ瀬正和: 吸入ステロイド薬使用困難例における介助吸入療法. アレルギー・免疫 12: 478-483、2005
- 42) 山縣俊之、一ノ瀬正和: シクレソナイド. 呼吸 24: 932-937、2005
- 43) 山縣俊之、一ノ瀬正和: 呼気温度測定の原理. 呼吸 24: 938-942、2005

## 2. 学会発表

### 国際学会

- 1) Hirano T, Ichinose M, et al: Theophylline Reduces Nitrosative Stress in COPD Airways. ATS 2005 International Conference, 2005.05.22, San Diego, USA
- 2) Hirano T, Ichinose M, et al: Inhibition of reactive nitrogen species production in COPD airways: comparison between steroid and theophylline. European Respiratory Society 15<sup>th</sup> Annual Congress, 2005.09.19 Copenhagen, Denmark
- 3) Minakata Y, Ichinose M, et al: Plasma leakage is elevated in COPD airways. European Respiratory Society 15<sup>th</sup> Annual Congress, 2005.09.19 Copenhagen, Denmark

### 国内学会

- 1) 一ノ瀬正和: COPD 薬物療法の新展開. 第 102 回日本内科学会講演会、大阪、2005.04.07
- 2) 南方良章、一ノ瀬正和: 炎症性肺・気道疾患における呼気ガス・凝縮液の有用性. 第 45 回日本呼吸器学会学術講演会、千葉、2005.04.14
- 3) 一ノ瀬正和: 気道炎症モニタリングの進歩. 第 45 回日本呼吸器学会学術講演会、千葉、2005.04.16
- 4) 山縣俊之、一ノ瀬正和: 気道過敏性に対する気道平滑筋と自律神経系の役割の重要性. 第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会、岡山、2005.06.02
- 5) 松永和人、一ノ瀬正和: 気管支喘息治療による気道炎症と過敏性の改善. 第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会、岡山、2005.06.03
- 6) 山縣俊之、一ノ瀬正和: 呼気ガスの測定と呼吸器疾患. 第 28 回日本呼吸器内視鏡学会総会、東京、2005.06.09
- 7) 一ノ瀬正和: COPD の薬物療法. 第 28 回日本呼吸器内視鏡学会総会、東京、2005.06.09
- 8) 一ノ瀬正和: 呼吸器疾患管理における気管支拡張薬の現状. 第 47 回日本平滑筋学会総会、仙台、2005.07.08
- 9) 平野綱彦、一ノ瀬正和: テオフィリンと抗炎症作用. 第 47 回日本平滑筋学会総会、仙台、2005.07.08
- 10) 平野綱彦、一ノ瀬正和、他: ミニシンポジウム: テオフィリンと PDE4 阻害薬. 第 71 回閉塞性肺疾患研究会、東京、2005.07.16
- 11) 一ノ瀬正和: COPD バイオマーカー開発の現状. 東京 COPD シンポジウム 2005、東京、2005.07.23
- 12) 一ノ瀬正和: COPD 治療の現状と展望. 第 3 回呼吸器 Up to date OSAKA、大阪、2005.07.23
- 13) 山縣俊之、一ノ瀬正和: 炎症性肺疾患における呼気凝縮液、呼気ガス検査. 第 55 回日本アレルギー学会秋

季学術大会、盛岡、2005.10.20

- 14) 一ノ瀬正和: イントロダクション; 喘息・COPD の病態理解. 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会、盛岡、2005.10.21
- 15) 平野綱彦、一ノ瀬正和、他: COPD 患者気道に対するテオフィリンの窒素化ストレスの抑制作用. 第 45 回日本呼吸器学会学術講演会、千葉、2005.04.14
- 16) 山縣俊之、一ノ瀬正和、他: 慢性閉塞性肺疾患における喀痰上清中の 3-ニトロチロシン定量測定法の確立. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会、千葉、2005.04.15
- 17) 松永和人、一ノ瀬正和、他: 超高齢者気管支喘息における介助吸入ステロイド療法の有用性. 第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会、岡山、2005.06.02
- 18) 東田有智、一ノ瀬正和、他: 関西・北陸地区における喘息患者 QOL 調査結果. 第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会、岡山、2005.06.03
- 19) 松永和人、一ノ瀬正和、他: 気道過敏性の簡便な臨床指標の検索. 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会、盛岡、2005.10.22
- 20) 松永和人、一ノ瀬正和、他: 高齢者喘息における吸入介助の臨床的意義. 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会、盛岡、2005.10.22
- 21) 南方良章、一ノ瀬正和、他: 気道上皮被覆液を用いた COPD の炎症機序の解明に関する検討. 第 70 回閉塞性肺疾患研究会、東京、2005.01.22
- 22) 上嶋千史、一ノ瀬正和、他: 気道窒素化ストレスの定量評価の試み. 第 17 回気道病態シンポジウム、東京、2005.02.05
- 23) 山縣俊之、一ノ瀬正和: 炎症性肺疾患におけるバイオマーカーの up date. 第 1 回呼吸器バイオマーカー研究会学術講演会、東京、2005.03.19
- 24) 松永和人、一ノ瀬正和、他: 高齢者気管支喘息における介助吸入ステロイド療法の有用性. 第 21 回薬物吸入療法研究会、東京、2005.07.09
- 25) 駒木祐一、一ノ瀬正和、他: COPD 気道でのキサンチンオキシデース活性上昇とサイトカインの関与. 第 2 回 Bronchoscopic Micro Sampling 研究会、東京、2005.07.15
- 26) 松永和人、一ノ瀬正和、他: 気道過敏性の簡便な臨床指標の検討. 第 14 回 Airway Club in Sendai、仙台、2005.09.10
- 27) 南方良章、一ノ瀬正和、他: COPD 気道における微小血管透過性亢進. 14 回 Airway Club in Sendai、仙台、2005.09.10

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。

### III. 分担研究報告書

呼気凝縮液を用いた気管支喘息の気道炎症評価法の確立と臨床応用に関する研究  
－呼気凝縮液中炎症関連物質と気管支喘息病態の関連についての検討－

分担研究者：一ノ瀬正和（和歌山県立医科大学内科学第三講座 教授）

研究協力者：南方良章、山縣俊之、松永和人、中西正典、平野綱彦

（和歌山県立医科大学内科学第三講座）

研究要旨

気管支喘息の気道においては種々の炎症関連物質が増加しており、その濃度が喘息の重症度といった病態と関連することが報告されている。しかし、従来の手法は気管支生検、気管支肺胞洗浄、誘発喀痰など、侵襲を伴うものが多く、一般臨床で簡便に繰り返して施行することは困難である。一方、呼気凝縮液は非常に簡便かつ繰り返して採取が可能であり、一般臨床への応用は容易である。本研究では呼気凝縮液を用いて、気管支喘息の気道炎症に関与する種々のサイトカイン、ケモカイン、増殖因子などの発現をサイトカインアレイキットを用いて測定した。呼気凝縮液中では IL-4、IL-8、IL-17、TNF- $\alpha$ 、RANTES、IP-10、TGF- $\beta$ 1、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ の発現が健常人と比べて有意に増加していた。このうち、RANTES の発現レベルは 1 秒量や初期呼吸抵抗の程度と、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1 の発現レベルは気道過敏性やピークフローの週内変動性の程度と有意な相関が認められた。これらの結果は気管支肺胞洗浄液などを用いた従来の報告とも合致しており、呼気凝縮液が気管支喘息の気道炎症や病態を評価する簡便かつ非侵襲的な方法として、極めて有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

気管支喘息の本態は慢性の気道炎症であり、管理（治療）の目標は気道炎症の制御にある。従って、気道炎症の評価法の確立は気管支喘息の管理向上に不可欠である。従来、気道炎症の評価法としては気道生検、気管支肺胞洗浄液などが行われてきたが、いずれも侵襲製が高く、経時的な評価は困難であった。最近では誘発喀痰中の炎症細胞や上澄成分の分析が広く行われているが、まったくの無侵襲ではなく、また処理が煩雑なため、一般臨床において反復施行することは難しく、研究目的以外ではあまり行われていない。一方、最近開発された呼気凝縮液は、無侵襲で、一般臨床でも応用可能であり、気道炎症を評価する新しい方法として有用な可能性がある。平成16年度に行った「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」班における

検討で、呼気凝縮液中のいくつかの炎症関連物質が測定可能であることを報告した。本研究では、昨年の検討を踏まえて、呼気凝縮液中の種々の炎症関連物質の発現について、気管支喘息患者と健常人との比較検討を行い、非侵襲的に喘息の気道炎症を評価しうる有用なバイオマーカーを確立することを目的とした。また閉塞性障害の程度や気道過敏性などの生理学的パラメーターとの比較を行い、喘息病態との関連についての評価も行った。

B. 研究方法

1) 対象

当院呼吸器内科外来通院中で、文書による同意を得た気管支喘息患者12例、および健常者6例において呼気凝

縮液を採取した。対象者はいずれも非喫煙者で、気管支喘息患者は全例ステロイド未治療者であった。

## 2) 呼気凝縮液の採取

呼気凝縮液は2種類の採取装置、据え置き型のエコスクリーン (Jaeger 社)、またはポータブル型の RTube (Respiratory Research 社) を用い、15分程度の安静換気を行い、呼気を急速冷却することで検体を採取した。

## 3) 呼気凝縮液中の炎症関連物質の測定

気管支喘息患者および健常者において、呼気凝縮液中の各種サイトカイン、ケモカイン、増殖因子などの発現を、Human Cytokine Array kit (RayBiotech 社) を用いて測定した。

## 4) 呼吸機能の測定

閉塞性障害の程度はスパイロメーター (Vitalograph Pneumotrac 6800™, Vitarograph 社) を用いて測定した。

気道過敏性はメサコリン吸入刺激に対する気道反応性で測定し、呼吸抵抗が初期抵抗の2倍になったときの累積濃度 PC<sub>200</sub> を指標とした。

ピークフロー値の測定は Assess 社のピークフローメーターを用いて測定し、週内変動性の程度を算出した。

## C. 結果

### 1) 呼気凝縮液中の炎症関連物質発現

サイトカインアレイを用いた検討では、呼気凝縮液中の種々の炎症関連物質が検出可能で、その発現レベルは採取日を変えて採取した検体でも再現性は良好であった。

気管支喘息患者の呼気凝縮液中では、IL-4、IL-8、IL-17、TNF- $\alpha$ 、RANTES、IP-10、TGF- $\beta$ 1、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ の発現が、健常人と比べて有意に増加していた。

### 2) RANTES 発現と呼吸機能

気管支喘息患者の呼気凝縮液中 RANTES 発現レベルは、1秒量の%予測値や初期呼吸抵抗といった気道の閉塞性障

害の程度と有意な相関を示した (図1)。しかし、気道過敏性やピークフローの変動性の程度とは関連しなかった。

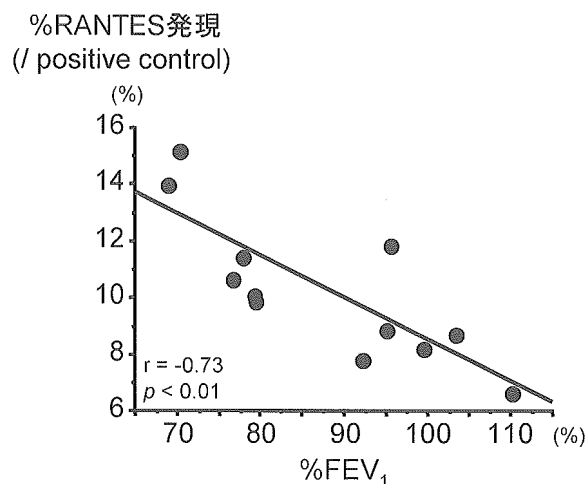


図1. 呼気凝縮液中 RANTES 発現と閉塞性障害

### 2) TNF- $\alpha$ 発現と呼吸機能

気管支喘息患者の呼気凝縮液中 TNF- $\alpha$  発現レベルは、気道過敏性やピークフローの週内変動性の程度と有意な相関を示した (図2)。しかし、閉塞性障害の程度とは関連しなかった。

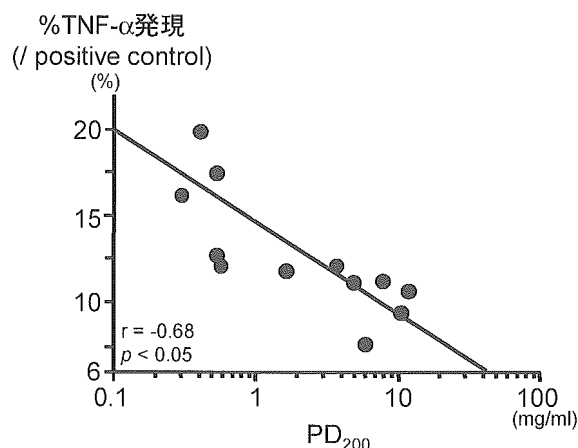


図2. 呼気凝縮液中 TNF- $\alpha$  発現と気道過敏性

### 3) TGF- $\beta$ 1 発現と呼吸機能

気管支喘息患者の呼気凝縮液中 TGF- $\beta$ 1 発現レベルは、気道過敏性やピークフローの週内変動性の程度と有意な相関を示した (図3)。しかし、閉塞性障害の程度とは関連

しなかった。

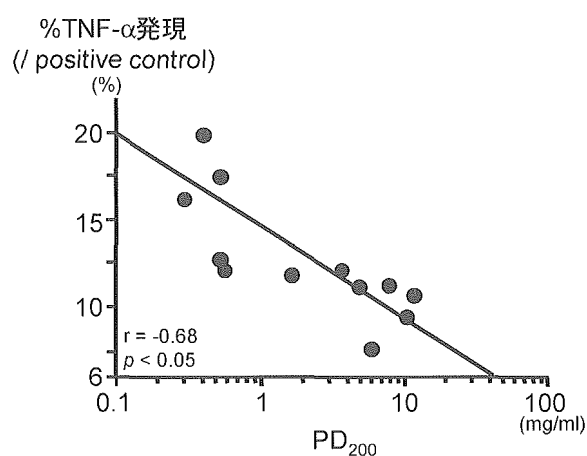


図3. 呼気凝縮液中 TGF-β1 発現と気道過敏性

#### D. 考察

今回の検討で呼気凝縮液中のサイトカイン、ケモカイン、増殖因子など、種々の炎症関連物質の検出が可能であることが示された。また、健常人との比較により、気管支喘息患者において有意に発現が亢進している9種の炎症関連物質が同定された。喘息気道におけるこれらの炎症関連物質の発現亢進は、気管支肺胞洗浄液などによる従来の報告とも合致しており、呼気凝縮液は気道の被覆液における炎症性メディエーターの発現を反映している可能性が示された。また喘息気道におけるこれらの炎症関連物質の発現レベルと生理学的指標との関連性の検討により、喘息病態の特徴である気道過敏性やピークフローの週内変動性といった気道の不安定性の程度とTNF-αや TGF-β1 の発現が、さら1秒量や初期呼吸抵抗といった閉塞性障害の程度と RANTES 発現が関与している可能性が示唆された。これら本年度の検討結果から、呼気凝縮液は気管支喘息の気道炎症の評価や、病態の把握に有用であり、一般臨床における喘息管理に応用できる可能性が示された。しかし、喘息病態とのより詳細な関連、治療効果との関連など、従来法との比較検討も含めたさらなる詳細な検討が必要であると考えられ、また、今後の臨床応用に向けては、呼気凝縮液中

の炎症性メディエーターの定量的評価法を確立することも重要な課題である。

#### E. 結論

呼気凝縮液中の種々の炎症関連物質が再現性を持って検出可能であり、気管支喘息患者では9種類の物質が健常人と比べて有意に高値であった。また、このうち3種類は喘息患者の生理学的指標と明らかな関連が認められた。以上より、今後の課題として、個々の物質の定量的評価や、より詳細な病態との関連性の検討が必要ではあるが、呼気凝縮液は気管支喘息の気道炎症の評価や、病態の把握に有用であり、一般臨床における喘息管理に応用できる可能性が示唆された。

#### F.健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Komaki Y, Ichinose M, et al: Cytokine-mediated xanthine oxidase upregulation in chronic obstructive pulmonary disease's airways. *Pulm Pharm Ther* 18: 297-302, 2005
- 2) Fukuchi Y, Ichinose M, et al: Clinical Efficacy and Safety of Transdermal Tulobuterol in the Treatment of Stable COPD: An Open-Label Comparison with Inhaled Salmeterol. *Treat Respir Med*. 2005; 4(6):447-55.
- 3) Yamagata T, Ichinose M: Agents against cytokine synthesis or receptors *Eur J Pharmacol* 533(1-3): 289-301, 2006
- 4) 一ノ瀬正和: 難治性喘息. *喘息* 18: 76-80, 2005
- 5) 一ノ瀬正和: 気管支喘息の病態理解と治療の実際. *今月の治療* 13: 29-35, 2005



- 6) 一ノ瀬正和: 喘息治療における末梢気道炎症の重要性.  
アレルギーの臨床 25: 16、2005
- 7) 山縣俊之、一ノ瀬正和: 呼気と気道炎症のパラメーター.  
アレルギーの臨床 25: 79-82、2005
- 8) 松永和人、一ノ瀬正和: 気管支喘息. 呼吸と循環 53:  
907-914、2005

## 2. 学会発表

- 1) 一ノ瀬正和: 気道炎症モニタリングの進歩. 第 45 日本  
呼吸器学会学術講演会、千葉、2005.04.16
- 2) 松永和人、一ノ瀬正和: 気管支喘息治療による気道炎  
症と過敏性の改善. 第 17 回日本アレルギー学会春季  
臨床大会、岡山、2005.06.03
- 3) 山縣俊之、一ノ瀬正和: 呼気ガスの測定と呼吸器疾患.  
第 28 回日本呼吸器内視鏡学会総会、東京、  
2005.06.09
- 4) 山縣俊之、一ノ瀬正和: 炎症性肺疾患における呼気  
凝縮液、呼気ガス検査. 第 55 回日本アレルギー学会  
秋季学術大会、盛岡、2005.10.20
- 5) 一ノ瀬正和: イン트로ダクション; 喘息・COPD の病態理  
解. 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会、盛岡、  
2005.10.21

## 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。

呼気凝縮液を用いた気管支喘息の気道炎症評価法の確立と臨床応用に関する研究

—呼気凝縮液と各種臨床的パラメーターとの比較—

分担研究者 秋山一男（独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター センター長）

研究協力者 粒来崇博 三田晴久 釣木澤尚実 谷口正実 前田裕二 大友守 押方智也子

小野恵美子（独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター）

研究要旨 気管支喘息は好酸球性気道炎症を原因とし気道の過敏性が亢進、様々な刺激により可逆性の気道閉塞を来す疾患である。そのため、気道過敏性検査は診断に有用である他、治療の指標とすることでよりよいコントロールとリモデリングの抑制を得られるとされているが、完全に非侵襲的とはいえないため、より簡便で侵襲の少ない検査法が望まれている。一方で、近年呼気を冷却し凝縮する方法で気道炎症を簡便に測定できると報告され、呼気凝縮液中の炎症性物質の分析により気道炎症、過敏性の評価が簡便に出来ると予測される。平成16年度に「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」班において我々は気道過敏性を評価する簡便な方法としての呼気凝縮液の可能性について報告したが、いまだ研究段階の検査法で本邦での研究報告がほとんどない。そこで、本研究では呼気凝縮液分析と気管支喘息の各指標との関連を中心に検討した。呼気凝縮液は安全に回収しえた。呼気凝縮液の cysteinyl leukotriene (cysLTs) 濃度は気道過敏性とは相関はしないが、疾患の重症度と関連している可能性が示唆された。呼気凝縮液中の cysLTs は、疾患の重症度に関連している可能性があり、また、非侵襲的に回収できるので、患者に負担を強いることなく喘息の病態を判定できる検査になる可能性がある。病状とあわせ更なる検討をしていく予定である。

A 研究目的

気管支喘息は好酸球性気道炎症を原因とし気道の過敏性が亢進、様々な刺激により可逆性の気道閉塞を来す疾患である。現在気道で起きている炎症を評価するには気道上皮の情報が必要であるが、確立された簡便な方法はない。現在診療上行えるものとしては、気管支鏡を用いて直接気道上皮組織を採取し、また気管支肺胞洗浄で気道上皮被覆液を回収するのが最も精度が高いといえるが、侵襲が大きく、実際の日常診療における検査には適当ではない。一方で、今まで気管支肺胞洗浄でしか得ることができなかった気道上皮被覆液を非侵襲的に回収反映できる方法として、

呼気を冷却し凝縮液（呼気凝縮液：exhaled breath condensate: EBC）を回収する方法が考案された。EBC中に、Leukotrieneをはじめとした気管支喘息に直接関わるメディエーターが増加しており、重症度との関連や、cytokineの変化がみられる等の報告が多数なされている。平成16年度に「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」班において気道過敏性を評価する簡便な方法としてのEBCの可能性について報告したが、いまだ研究段階の検査法であり、EBC中の成分分析や実際の病態、今まで用いられてきた指標との比較が不可欠である。そこで、本研究では、EBC分析の標準的な方法の検討、

気道過敏性検査との関連、気道炎症の指標として期待されている呼気一酸化窒素 (eNO) や喀痰好酸球との比較、などについて検討した。

## B. 方法

### (1) 対象

当院アレルギー科に受診中の気管支喘息患者のうち、十分な説明の後文書での同意を得た、気管支喘息患者 73 名を対象とした。

### (2) 気管支喘息重症度分類

重症度分類は JGL2003 ガイドラインに準じた。すなわち、吸入ステロイド治療群では吸入ステロイド量、経口ステロイド併用の有無で Step1-4 に分類した。吸入ステロイド未治療群は症状や呼吸機能の程度で分類した。

### (3) EBC 採取の実際

呼気一酸化窒素濃度 (NO)、スパイログラム、気道過敏性検査を施行後、EBC を採取した。EBC の採取には、汎用されている Jaeger 社 EcoScreen を用いた。ノーズクリップを着用し 15 分の安静呼気を行い、呼気を連続的に機器内で  $-20^{\circ}\text{C}$  に冷却、EBC を採取した。終了後スパイログラムを施行した。回収した EBC は  $-80^{\circ}\text{C}$  で保管、分析した。4 例において同時に強制換気と安静換気両方で採取し濃度を比較した。

### (4) EBC の解析法

Cysteinyl leukotriene (cysLTs) については、微量のため、以下の方法で濃縮測定した。

1. Empore C18 カラムに EBC を通す
2. 水、ヘキサンで洗った後 0.5ml の 95%メタノール溶液で抽出
3. 抽出液を 0.05ml まで減圧下で濃縮し、ELISA kit のアッセイ緩衝液で希釈。
4. CysLTs ELISA kit (Cayman) で測定

また、7 症例については EBC の半分を直接凍結乾燥し濃

縮した後に測定を行い、定量値を抽出法と比較した。

### (5) 呼気 NO 濃度測定及び気道過敏性検査

呼気 NO 濃度はオフライン法で測定した。SIEVERS 社オフラインキットを用い、最大吸気から一定流量 (10[ $\text{cmH}_2\text{O}$ ]、70[ $\text{ml}/\text{sec}$ ]) で呼出、死腔分を排気後ミラーバックに回収した。回収後 18 時間以内に SIEVERS 社 NO analyzer (280NOA) で測定した。気道過敏性検査は、アセチルコリン (Ach)、ヒスタミン (His) それぞれに対する過敏性を標準法で評価し、 $\text{PC}_{20}$  を指標とした。

### (6) 尿中 LTE<sub>4</sub> 濃度測定

EBC 採取と同時に尿中 LTE<sub>4</sub> を測定し、比較した。

1. Empore C18 カラムに尿を通す
  2. 水、ヘキサンで洗った後メタノール 0.5ml で抽出
  3. HPLC で LTE<sub>4</sub> の溶出分画を分取し、Empore C18 カラムで再度抽出。
  3. 抽出液を 0.05ml まで減圧下で濃縮し、アッセイ緩衝液で希釈し、CysLTs ELISA kit (Cayman) で測定
- Creatinine 1mg あたりで濃度を補正し測定値とした。

## C. 結果

EBC は 15 分検査施行下で 1-1.5ml 回収できた。60 例の検討で検査前後の比較では一秒量の低下は認めず、安全に施行しえた。安静換気と強制換気では、4 例中 1 例で回収量が強制換気で多かったが、回収した EBC 中 cysLTs 濃度はほぼ同じであった。尿中 LTE<sub>4</sub> は重症度と関係のないのに対し、EBC 中 cysLTs は重症な症例で高値である傾向を認めた (STEP1 or 2 vs. 3 or 4, 3.23 vs 5.12 (pg/ml),  $p < 0.04$ )。7 例での比較では、凍結乾燥法ではカラムを用いた濃縮法より 2.33 倍に濃度が高くなる傾向があったが、有意な差は認めなかった。71 例の比較において呼気 NO、一秒量、気道過敏性 (Ach, Hist) それぞれで相関は認めなかった。35 例における尿中 LTE<sub>4</sub> との比較では、相関を認めなかった。

#### D. 考察

アミラーゼの測定で EBC には唾液は混入していないことが確認できた。回収法については安静換気と強制換気どちらも良いが、患者の負担を考慮すると安静換気のほうが望ましいと考えられた。濃縮法については、カラムを用いたもしくは凍結乾燥による濃縮法どちらも良いが、以前より当院ではカラムを用いて cysLTs を破壊せずに効率に回収できると報告しており、当院の研究法の妥当性が示唆された。

CysLTs については気道過敏性とは相関はしないが、治療中の気管支喘息の重症度と関連している可能性が示唆された。現在気道炎症の指標として考えられている呼気 NO 濃度はステロイド治療後低下しやすく、また喀痰好酸球についても同様であるが、気管支喘息の治療において現時点で治療が奏効しているということの判定には有用であるが、予後の指標とはなりにくい。この点 cysLTs はステロイドの影響を受けにくいとされており、相関しない両指標の併用でよりきめ細やかな管理ができる可能性がある。これについては、次年度にかけて、その後の治療経過に影響があるか、予後予測因子になりうるか、その際どのような指標が関連するかを今後経時的に観察していく予定である。

また、尿中との比較では相関を認めず、全身の cysLT 産生量と気道内との矛盾があると考えられた。これについては、以前当院より喀痰中と尿中の cysLTs の濃度が必ずしも相関しないことを報告しており (Higashi et al. Clin. Exp. Allergy 2002)、今回の結果はこれと矛盾せず、血液中の環境と気道内環境の差があることを示唆する。これについても気管支喘息の病態解明の一助になる可能性があり、今後さらに症例を加え評価していく予定である。

#### E. 結論

以上より、EBC の評価法や結果の位置づけについてはさらに詳細な検討が必要と考えられるが、物質によっては疾

患の重症度や過敏性に関連している可能性があると考えられた。また、完全に非侵襲的に施行できるので、患者に負担を強いることなく繰り返し測定でき、喘息の病態をより正確に簡便に判定できる検査になる可能性がある。

#### 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

粒来崇博、三田晴久、釣木澤尚実、谷口正実、秋山一男：  
シンポジウム 10 気道炎症の臨床的指標 気道炎症の臨床的指標 呼気凝縮液(expired breath condensate:EBC)による気道炎症の評価と実際の問題点

第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会 岡山 2005

粒来崇博:呼気凝縮液検査の標準化に向けて

第 1 回呼吸器バイオマーカー研究会学術講演会 2005