

また Churg-Strauss syndrome (CSS)は気管支喘息の経過中に発症する全身性壊死性血管炎である。多くは喘息またはアレルギー性鼻炎が先行し好酸球増多、続いて全身の血管炎症状が出現する。CSSは多彩な血管炎症状を呈し、特に心臓、腎臓、消化管、中枢神経の血管炎を有する症例は予後不良であるため早期診断、早期治療が重要である。しかしCSSの発症原因は未だに不明であり、血管炎発症前の喘息の臨床象についても十分には解明されていない。これらの背景と初年度の結果に基づいて代表的な重症喘息の臨床像を呈するCSSの発症・予知因子についての研究を2年目、3年目に行った。2年目の研究では血管炎発症前の喘息の臨床像を喘息初診時の末梢血好酸球数とACh気道過敏性をretrospectiveに解析した。また最近、アレルギー疾患、自己免疫疾患では制御性T細胞であるCD25+CD4+ T細胞が病態の抑制的調節を担っているといわれており、成人喘息においては制御性T細胞が病態生理に関与しているとの報告もみられる。CSSではまだ報告は認めないが、その関与は充分に予想されることである。この観点からCSS発症時、治療後安定期、再燃時と一般喘息についてCD25+CD4+ T細胞、CD25-CD4+ T細胞およびIL-5産生T細胞についてFACSにて解析し、CSSの病態生理と一般喘息の差違について、制御性T細胞が関与しているかについて検討した。さらに3年目の研究ではCSSを発症する喘息群は一般的に重症例が多く、また血管炎発症前に一過性の肺浸潤（好酸球性肺炎：PIE症候群）を来すことが知られている。その一方で好酸球性肺炎を併発しながらその後もCSSを発症しない喘息群も存在する。これらの2つの臨床的特徴の差異から好酸球性肺炎(PIE症候群)を併発しながらその後もCSSを発症しない喘息群と一般喘息およびCSS症例の発症時、治療後安定期、再燃時のCD25+CD4+T細胞、CD25-CD4+ T細胞およびIL-5、IL-10産生T細胞をFACS解析し将来のCSS発症の予知が可能

かどうかについて検討した。

B. 研究方法

初年度研究

- (1) 当院外来受診中の成人喘息患者を対象とし、同一患者に対してACh、Histを用いた標準法による気道過敏性検査を（一週間以上の間隔を空け、一ヶ月以内に）施行しHistPC₂₀/AChPC₂₀を、またFEV1とMMFのPC₂₀の比を測定し、両方で比較した。さらに同時期に血清中のECPを測定した。
- (2) ACh、Hist標準法による気道過敏性検査を複数回受検した275名を対象とし、初診時気道過敏性(PC₂₀)、ICS（主にBDP）使用後の気道過敏性変化率について、病型別、発症年齢別に比較検討した。

2年目の研究

- (1) 対象：血管炎発症前（喘息期）から経過を追跡できたCSS 24症例を対象とし、喘息群は当院外来通院中の成人喘息患者152名を対象とした。また健康者23名を正常対象群とした（control）。
- (2) 喘息の重症度分類：喘息重症度分類はGINAのガイドラインに準拠した。吸入ステロイド(ICS)用量をBDP換算でStep 1 (BDP<200mg), Step 2 (BDP≤500mg), Step 3 (BDP≤1000mg), Step 4 (BDP>1000mg)とし、Step1, 2を軽症群、Step 3を中等症群、Step 4はICS群（重症、吸入群）と経口ステロイド(OCs)併用群（重症、経口併用群）の2群に分類した。
- (3) 気道過敏性測定 アセチルコリン、ヒスタミン気道過敏性測定を標準法で行った。ACh 156 mg/mlから20000 mg/mlまで2倍希釈系列を作成しスパイログラムを用いてFEV1を測定し、負荷前の

FEV1%が80%以下に低下するまでの濃度を AchPC₂₀、HistPC₂₀ mg/mlとして計算した

- (4) 末梢血好酸球およびリンパ球の解析 末梢血採血より好酸球数およびリンパ球数を測定した。次に末梢血へパリン採血より、全血から好酸球、顆粒球、単核球 20 mg/10⁶ 細胞に FITC ラベルした anti-human CD4 (BD PharMingen San Diego, CA, USA)、PE 標識の anti-human CD25 monoclonal antibody (mAb) (PharMingen) を室温で 30 分間反応させ、Lyse buffer で赤血球を溶解、除去した。検体を 4⁰ C で 5 分間 430g で遠心し、洗浄し細胞を回収した後 FACS で解析した。

3年目の研究

- (1) 対象: 喘息経過中に発症し血管炎症状のない好酸球性肺炎群 (PIE 群) 15 例 (ABPM 除く)、CSS19 例、一般喘息 (BA) 23 例、健常人 6 例を対象とした。CSS は末梢血好酸球および血管炎症状の増悪を指標として、安定期 (ステロイド治療後)、不安定期 (発症時、再燃時) に分類した。
- (2) 採血に際し、検査の必要性和リスクを十分に説明しインフォームドコンセントを得られた症例よりへパリン採血を施行した。PIE 群は BAL, TBLB、胸部 CT 画像などで好酸球性肺炎を診断した。
- (3) 末梢血全血より好酸球数およびリンパ球数を測定し、活性化好酸球 (CD69+CCR3+) と活性化リンパ球 (CD69+CD4+, CD25+CD4+T 細胞) の発現頻度を FACS で解析した。CSS 症例では治療前後で比較、PIE 群は自然経過を追跡した。
- (4) さらに PMA+Ionomycin 刺激後の CD25+CD4+ と CD25-CD4+陽性 T 細胞を別々に細胞内に存在する IL-5、IL-10 の産生頻度を FACS で解析した。

C. 研究結果

初年度研究

- (1) 一週間以上の間隔を空け、一ヶ月以内に ACh、Hist 検査を行い、ほぼ同時期に 2 種の気道過敏性検査を施行した。HistPC₂₀/AchPC₂₀ の検討ではほとんどが 1 以下であり、Hist は ACh と比較してより鋭敏な過敏性の指標となりうると考えられた。また MMF-PC₂₀/FEV1-PC₂₀ の検討では Hist が ACh と比較して有意に低値であり、このことから Hist 気道過敏性はより末梢の気道病変を示唆していると考えられた。さらに好酸球性炎症の指標である血清中 ECP 値は AchPC₂₀ と負の相関を認めたが、HistPC₂₀ は相関を認めなかった。

- (2) 患者の内訳は成人発症 187 名 (アトピー型 (A 型) 113 名、非アトピー型 (NA 型) 74 名)、成人再発型 53 名、小児発症 35 名であった。結果、初診時 AchPC₂₀ は成人発症 NA 型が A 型、再発型、小児発症と比較して高く気道過敏性軽度であった。初診時 HistPC₂₀ は小児発症が成人発症 NA 型と比較して低値であった。ICS を使用しない場合は病型、発症年齢別に拘わらず、気道過敏性の有意な改善を認めなかった。また ICS (ほとんどが BDP 使用である) を使用した場合には成人発症、成人再発型では AchPC₂₀ が約 7 倍に改善したが小児発症では約 3 倍の改善であり臨床的に有意な改善を認めなかった。成人発症喘息では特に A 型が有意に改善した。HistPC₂₀ は病型、発症年齢別に拘わらず、ICS 治療後も有意な改善を認めなかった。

2年目の研究

- (1) 喘息臨床像および気道過敏性。CSS 発症前の喘息重症度は 93% が Step 4 の重症喘息であった。ま

た一般喘息では重症度に比例して AchPC₂₀ は低下したが、発症前 CSS は AchPC₂₀ が高値でありアセチルコリン気道過敏性は軽度であった。ヒスタミン気道過敏性は喘息群、CSS 発症前群ともに有意差を認めなかった。

- (2) 一般喘息では重症度にかかわらず、初診時の末梢血好酸球数には有意差を認めないが、CSS 発症前の喘息初診時の末梢血好酸球数は 18.8% と喘息群の 7.7% と比較して有意に高値であった。
- (3) 一般喘息全体では control と比較して CD25+CD4+T 細胞数が高値であるが、CSS 発症時は低値であった。
- (4) CSS 発症時には CD25+CD4+T 細胞数低値であるのに対し、治療後安定期には CD25+CD4+T 細胞数増加した。また再燃時には CD25+CD4+T 細胞数低下した。

3年目の研究

- (1) 活性化好酸球 (CD69+CCR3+) 陽性頻度は重症喘息、PIE 群、CSS 不安定期群で増加した。
- (2) CD25+CD4+T 細胞は BA 群で高く、PIE 群、CSS 不安定期群で低下し、CSS 安定期群、自然軽快後 PIE 群で増加した。CD69+CD4+T 細胞は重症喘息群、PIE 群で増加し CSS 発症時に著明に増加し、自然軽快後 PIE 群、安定期 CSS 群では低下した。
- (3) IL-5 産生 CD25+CD4+T 細胞頻度は BA 群、PIE 群、CSS 群で有意差を認めないが、IL-5 産生 CD25-CD4+T 細胞は不安定期 CSS 群、PIE 群で有意に増加した。IL-10 産生 T 細胞頻度は CD25+CD4+T 細胞では安定期 CSS 群、PIE 群で多く、特に IL-10 産生 CD25-CD4+T 細胞は PIE 群で著明に増加した。
- (4) 経過を追跡できた PIE 群では全身ステロイド治療を行わず、好酸球数は低下し、胸部 x 線、CT においても肺浸潤は消失した。さらに好酸球正常

化に伴い徐々に CD25+CD4+T 細胞の増加、IL-10 産生 T 細胞頻度の低下を認めた。その後の経過では PIE の再燃を認めない症例では一般喘息と同様に IL-10 産生 T 細胞は検出されなくなった。

D. 考察

気道過敏性の存在は喘息の基本的病態のひとつであり喘息発症の必要条件である。気道過敏性検査は喘息の診断だけでなく、重症度を反映する。ACh、Hist の気道過敏性については heterogeneity があり、その生理学的な違いや意義については十分に解明されていない。当院では日常臨床で成人喘息を対象とし気道過敏性検査を行っており、発症年代別の差違や ICS 療法による治療反応性の差違についての臨床研究を継続しており、これらの結果から喘息の重症度や治療効果判定、予後などが解明されつつある。本研究班での研究ではこれまでの気道過敏性に関する研究結果に基づいて成人発症喘息における重症喘息の代表例である CSS の発症・予知因子について研究し、決して予後良好な疾患とは考えられない CSS の早期診断・早期治療に反映することを目的として研究を継続した。CSS は未だに発症素因、原因は不明であり、血管炎発症前の喘息の臨床像についても不明瞭である。そこで今回の研究では CSS 発症前 (血管炎症状出現前) の喘息期の気道過敏性、末梢血好酸球数について検討した。結果、CSS を発症する喘息群の臨床像はほとんどが重症 (Step4) であるが、アセチルコリン気道過敏性は軽症喘息と同様に軽度であった。また喘息初診時の末梢血好酸球数は一般喘息と比較して高値であった。この結果から CSS 発症前の重症喘息の臨床像は気道収縮が強いという意味での重症ではなく、気道の好酸球性炎症が強度であり気道の炎症細胞浸潤や浮腫により気道が狭窄しているということを示している可能性が考えられた。また好酸球性肺炎を併発しながらその後も

CSS を発症しない喘息群の特徴として末梢血の CD25+CD4+T 細胞の増加、CD25+CD4+T 細胞、CD25-CD4+T 細胞の双方からの IL-10 産生が認められ、一般喘息、CSS 発症時、治療後再燃時と明らかに異なる免疫能を呈した。この結果は CSS 発症を抑制しているのは制御性 T 細胞であり、CD25+CD4+T 細胞、CD25-CD4+T 細胞の双方から産生される IL-10 が発症を抑制している重要なサイトカインであることが示唆された。特にこれらの PIE 群の症例では全身ステロイドを使用せず、自然軽快したことから自然免疫が関与していることも推察された。今後、この IL-10 産生に関する trigger、産生の詳細なメカニズム、制御性 T 細胞との相互関係がより明確になることにより、CSS 発症予知が可能になる可能性がある。さらに臨床応用として、早期診断、早期治療が可能になり、良好な予後が期待されると考えられる。

E. 結論

気道過敏性の heterogeneity の解明が進み、喘息重症度や治療反応性などが明らかとなり、CSS 予備群と非予備群である PIE 症候群の免疫学的差違の解明により CSS の発症予知が可能になることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Naomi Tsurikisawa, Masami Taniguchi, Hiroshi Saito, Hideo Himeno, Akihiko Ishibashi, Shunsuke Suzuki, Kazuo Akiyama Treatment of Churg-Strauss syndrome with high-dose intravenous immunoglobulin. *Annals Allergy Asthma Immunol*, 92: 80-87, 2004
2. Naomi Tsurikisawa, Shunsuke Suzuki, Kazuo Akiyama

et al. Effects of a nitro compound patch on neuropathy in Churg-Strauss syndrome. *Allergy*. 58 :1, 2003.

2. 学会発表

1. 気道過敏性が正常化した成人喘息患者の検討- 背景因子および治療法について- 釣木澤尚実、秋山一男ほか。日呼学会誌 41 : 131、2003
2. 吸入ステロイド療法により気道過敏性が正常化した成人喘息ではどこまで減量、中止が可能か？ 釣木澤尚実、秋山一男、ほか。日呼学会誌 41 : 131、2003
3. 吸入ステロイド(ICS)療法により気道過敏性が正常化した成人喘息患者の背景因子の検討 2 釣木澤尚実、秋山一男ほか。アレルギー、52: 348, 2003
4. 吸入ステロイド療法により気道過敏性が正常化した成人喘息ではその減量、中止が可能か？ 2、釣木澤尚実、秋山一男、ほか。アレルギー、52: 862, 2003
5. 気道過敏性と環境因子、釣木澤尚実 秋山一男。喘息、メディカルレビュー社、16 (1): 33-39, 2003
6. 内科医からみた小児気管支喘息の予後、釣木澤尚実 秋山一男。小児科、金原出版社 44(11), 1830-1839, 2003
7. 吸入ステロイド療法により気道過敏性が正常化した成人喘息ではその減量、中止が可能か？ 2 釣木澤尚実、粒来崇博、森田園子、谷口正実、大友 守、宮崎恵理子、秋山一男。日呼学会誌 42 : 121、2004
8. 成人喘息患者の気管支粘膜組織における M2 受容体の発現とアセチルコリン気道過敏性 釣木澤尚実、粒来崇博、三富弘之、秋山一男、他。日呼学会誌 42 : 214、2004
9. Effect and limited response of treatment of Churg-Strauss syndrome with high-dose intravenous immunoglobulin. Naomi Tsurikisawa, Akihiko Ishibashi, Hiroshi Saito, Sonoko Morita, Takahiro Tsuburai, Akiyoshi Nishiyama, Masami Taniguchi, Yoriko Shimotsu, Kazuo Akiyama. *Am J Resp Crit Care*

Med 169: A575, 2004.5

10. Churg-Strauss syndrome の末梢神経障害に対する MIBG シンチの意義 釣木澤尚実、石橋章彦、堀口順子、粒来崇博、秋山一男、他。アレルギー、53: 131, 2004

11. Treatment of Churg-Strauss syndrome with high-dose intravenous immunoglobulin. Naomi Tsurikisawa, Masami Taniguchi, Hiroshi Saito, Sonoko Morita, Takahiro Tsuburai, Kazuo Akiyama . The 6th Asia Pacific Congress of Allergology and Clinical Immunology

12. 喘息経過中に発症する好酸球性肺炎 (EP) と Churg-Strauss syndrome (CSS) 発症のメカニズムに関する検討。釣木澤尚実、斉藤博士、富田君子、粒来崇博、豊田信明、森田園子、谷口正実、秋山一男。アレルギー、53: 893, 2004

13. Churg-Strauss syndrome (CSS) に対する IVIG (intravenous immunoglobulins) 療法。釣木澤尚実、谷口正実、斉藤博士、富田君子、粒来崇博、豊田信明、森田園子、秋山一男。アレルギー、53: 818, 2004

14. Autonomic nervous system is impaired in Churg-Strauss syndrome. Yukiko Morita, Naomi Tsurikisawa, Kazuo Akiyama, et al. 第 69 回日本循環器学会、2005.3.

15. I-123 MIBG Imaging is Useful in Assessment of Cardiac Involvement in Churg-Strauss syndrome. Yukiko Morita, Yoriko Horiguchi, Naomi Tsurikisawa, Kazuo Akiyama, et al. 第 69 回日本循環器学会、2005.3

16. 全身ステロイド治療前後の CSS 患者に対するアセチルコリン (Ach) 気道過敏性と気管支平滑筋上に発現する M2 受容体に関する検討。釣木澤尚実、秋山一男、他。日呼学会誌 43: 245, 2005

17. Churg-Strauss syndrome (CSS) に対する g グロブリン大量療法 (IVIG) —その効果持続における検討—。

釣木澤尚実、粒来崇博、秋山一男、他。アレルギー、54: 342, 2005

18. Churg-Strauss syndrome (CSS) の肺病変に対する MIBG シンチの意義。釣木澤尚実、石橋章彦、粒来崇博、堀口順子、秋山一男、他。アレルギー、54: 342, 2005

19. Evaluation of cardiac involvement and therapeutic effect with I-123 MIBG Imaging in Churg-Strauss syndrome. Yoriko Horiguchi, Yukiko Morita, Naomi Tsurikisawa, Kazuo Akiyama, et al. Society of Nucler Med. 2005.6

20. g グロブリン大量療法 (IVIG 療法) により痴呆症状が改善した Churg-Strauss 症候群 (CSS) の一症例。釣木澤尚実、秋山一男、他。第 16 回日本末梢神経学会、p8, 2005

21. Churg-Strauss syndrome (CSS) に対する g グロブリン大量療法 (IVIG) —免疫学的機序に対する検討—。釣木澤尚実、秋山一男、他。アレルギー、54: 1103, 2005

22. Churg-Strauss syndrome (CSS) の病態と治療 —免疫グロブリン大量療法—。釣木澤尚実。第 24 回北関東胸部疾患研究会 2005.7

23. Prognosis of adult asthmatics after normalization of bronchial hyperresponsiveness (BHR) by inhaled corticosteroids (ICS) therapy. Naomi Tsurikisawa, Sonoko Morita, Takahiro Tsuburai, Kazuo Akiyama, et al. Am J Resp Crit Care Med 172: A923, 2005

H. 知的財産権の出願・登録

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし

気管支喘息の慢性化・難治化の予防を目指す、
早期介入療法のための早期診断法の確立に関する研究
- 呼気NOおよび呼気凝縮液の有用性に関する検討 -

分担研究者： 棟方 充 (福島県立医科大学呼吸器科学講座 教授)
研究協力者： 大塚義紀 (福島県立医科大学 助教授) 石田 卓 (同 講師)、
斎藤純平 (同 助手)、渡辺香奈 (同 助手)、菅原 綾 (同 助手)、
吉川素子 (同 助手)、井上恵一 (同 大学院生)、王 新涛 (同 研究生)、
佐藤 俊 (同 研究生)、石井妙子 (同 研究生)、室井美穂 (同 研究生)

研究要旨：

【背景と目的】気管支喘息難治化は、慢性気道炎症の持続に伴って生じる、気道リモデリングが原因となっている可能性が高い。したがって、難治化予防のためには、気管支喘息を早期に診断し、早期に薬物による治療介入(Early Intervention)を行うことが重要である。本研究では、まず、気管支喘息ならびにアレルギー性気道炎症を検知するための既存の指標(喀痰好酸球、血清サイトカイン・ケモカイン)、ならびに新たな指標(呼気NO、呼気濃縮液)の有用性を評価する。さらに、この評価により有用と判断された指標を用いて、臨床的な前向き研究を行い、その有用性を判断することを研究目的とした。

【方法】気管支喘息ならびにアレルギー性気道炎症を検知するための既存の指標として、誘発喀痰好酸球、血清サイトカイン・ケモカインを選定した。また新たな指標として、呼気NO、呼気濃縮液中のサイトカイン・ケモカインを選定した。呼気NOについては、一般集団での検討が重要と考えられたため、学童として小学5年、6年の一般学童、成人としては健康診断受診者を対象とした検討も行った。さらに、前向き研究では、早期喘息患者を高率に含むと考えられる持続性咳嗽患者を対象とした。

【結果】誘発喀痰中好酸球は慢性咳嗽患者においても半数程度にしか上昇を認めず、早期喘息患者を過小評価する可能性が高いと判断された。多くの早期喘息患者を非喘息患者として捉えてしまう可能性が高いと考えられた。血清サイトカイン・ケモカインでは、血清TARC値がアレルギー性気道炎症の指標として有用である可能性が明らかになった。しかし、血清採取・測定時間・費用などを考慮すると日常臨床での応用には課題が残された。呼気NOは、学童・成人いずれにおいても、各種I型アレルギーの指標と強い相関を示すのみならず、気道病変の指標となる%FEV1とも相関を認め、多変量ロジスティック解析結果からもアレルギー性気道炎症の指標として有用であると考えられた。呼気濃縮液では、サイトカイン・ケモカインは検出限界以下であり、臨床応用は難しいと判断された。

呼気NOを指標とした、早期喘息患者を高率に含む遷延性咳嗽患者を対象として前向き研究では、呼気NOは咳症状に気道過敏性と好酸球気道炎症を伴う早期喘息患者群で有意な上昇を認めた。また、咳症状に好酸球性気道炎症は伴うが、気道過敏性を伴わないアトピー性咳嗽患者や早期喘息以外の咳嗽患者では全く上昇を認めなかった。これらの結果から、呼気NOは早期喘息検出のための非侵襲的、かつ、鋭敏な指標であることが明らかになった。

【結語】呼気NOは気管支喘息の早期診断のための非侵襲的、かつ、鋭敏な臨床指標となる。

A. 研究目的

気管支喘息難治化は、慢性気道炎症の持続に伴って生じる、気道リモデリングが原因となっている可能性が高い。したがって、難治化予防のためには、気管支喘息を早期に診断し、早期に薬物による治療介入(Early Intervention)を行うことが重要である。現在、喘息早期診断に用いることが可能と考えられる指標から、以下理由で4指標を選択し、今回の検討対象とした。

①喀痰中好酸球：喘息は好酸球性気道炎症を特徴とする疾患である。このため、誘発喀痰中好酸球が喘息早期診断の指標となる可能性がある。

②血清 TARC 値：TARC (Thymus and Activation Regulated Chemokine)は Th2 細胞の集積と活性化に関連すると考えられている。これらの血中濃度が早期のアレルギー性気道炎症の指標となる可能性がある。

③呼気一酸化窒素(呼気 NO)：喘息患者気道上皮では一酸化窒素合成酵素(NOS)発現が増強し、喘息患者では呼気 NO の上昇が報告されている。このため、呼気 NO が喘息の早期診断の指標となる可能性がある。

④呼気濃縮液中のサイトカインならびに各種気道特異的蛋白：最近、呼気中の水分を急速冷却しサンプルすることが可能となった。この濃縮液中には種々の蛋白が含まれている。呼気濃縮液中に存在する喘息に特異的な蛋白を測定することにより、喘息ならびにアレルギー性気道炎症を早期に診断できる可能性がある。

さらに、上記の検討結果から有用性が高いと考えられる指標を用いて、早期喘息症状として最も多い、遷延性・慢性咳嗽患者を対象とした、前向き研究を企画した。

B. 対象と方法

1) 誘発喀痰中の好酸球：

咳喘息は、気管支喘息で主要症状が咳嗽であり、喘鳴や呼吸困難などの症状をほとんど伴わない患者である。これらの患者には高率に発症する。このため、早期の喘

息患者がこの咳喘息患者に含まれると考えられている。今回は、気道過敏性を伴い8週間以上持続する咳嗽(慢性咳嗽)を主訴とする患者を対象とし、誘発喀痰を採取し、炎症細胞分画を測定した。喀痰好酸球比率10%以上の者を好酸球増多群、10%未満の者を好酸球非増多群とし、これらの2群間で気道過敏性の程度、血清総IgE値、抗原特異的IgE、吸入ステロイド(ICS)による治療反応性などを比較した。

2) 血清 TARC 値：小学5、6年(10-12歳)の学童234名を対象とし、血中TARC値をELISA法により測定し、喘息症状、呼吸機能、血清総IgE、抗原特異的IgE、eNOとの関連を検討した。

3) 呼気一酸化窒素(呼気 NO)：

①学童：10-12歳の学童278名(男138名、女140名)を対象とし、ATS質問表による喘息症状、呼吸機能、血清総IgE、抗原特異的IgE、呼気NOの測定をおこなった。喘息疑い例を反復する喘鳴症状を持つ者(2年以内に2回以上の喘鳴)と定義した。各指標の関連を検討するとともに、反復喘鳴群と非喘鳴群間の比較、ならびに多変量ロジスティック解析により反復喘鳴群を抽出するために有用な指標を検討した。

②成人：成人健康診断受診者280名(男113名、女167名)を対象とし、ATS質問表による喘息症状、呼吸機能、血清総IgE、抗原特異的IgE、呼気NOの測定をおこなった。喘息疑い例を反復する喘鳴症状を持つ者(2年以内に2回以上の喘鳴)と定義した。各指標の関連を検討するとともに、反復喘鳴群と非喘鳴群間の比較、ならびに多変量ロジスティック解析により反復喘鳴群を抽出するために有用な指標を検討した。

③小児・成人での喘息早期診断のための呼気NOの正常基準値とcutoff値：対象は、小児539名(男271名、女268名)、成人280名(男113名、女167名)。ATS問診表の記載をお願いした後、呼気NOと呼吸機能検査を施行。その後採血を行い、総IgE・抗原特異的IgE測定を

行った。反復喘鳴症状を持つ者を喘息疑い群、喘息様症状(咳嗽・喀痰・呼吸困難・喘鳴)及びアトピー(総 IgE ≥ 250 IU/ml または抗原特異的 IgE $\geq 0.69U_A$ /ml) のない対象(成人では非喫煙者)を健常群として、呼気 NO の正常基準値及び喘息の有無を鑑別するための呼気 NO の cutoff 値を解析した。

4) 呼気濃縮液のサイトカインならびに各種気道特異的蛋白: 各種サイトカイン、蛋白の測定可能か否かを検討するため、外来受診した気管支喘息患者より呼気濃縮液を採取し、IL5, Eotaxin, TARC, Ugrp1 などの測定を試みた。

5) 喘息早期診断手法開発のための前向き研究: 上記の検討から、呼気 NO が非侵襲的で、最も鋭敏な指標であることが判明したため、早期喘息患者が効率に含まれている遷延性咳嗽患者の鑑別診断における呼気 NO の意義を検討した。遷延性咳嗽を主訴に来院する患者を対象とした。呼気 NO、呼吸機能検査、採血(末梢血好酸球・総 IgE・抗原特異的 IgE)、気道過敏性検査、誘発喀痰による好酸球の有無の測定を治療開始前に行った。呼気 NO とその他の指標の比較、喘息群・咳喘息群・アトピー咳嗽群・その他の疾患群の間での呼気 NO 値の比較を行った。

C. 結果

1) 誘発喀痰中の好酸球: 37 例の対象患者を得た。喀痰好酸球増多($>10\%$)を認めたのは 14 例(37.8%)であった。好酸球増多群では総 IgE 値が有意に高く($p<0.01$)、抗原特異的 IgE 陽性者が有意に多かった($p<0.01$)が、気道過敏性の指標に差はなかった。ICS 治療を行った好酸球増多群 11 例では全例(100%)で有効性が認められた。しかし、好酸球非増加例でも ICS 治療を行った 12 例中 9 例(75%)で有効性が認められ、両群間に有意差を認めなかった。したがって、喀痰好酸球は気管支喘息を過大評価

する可能性があると考えられた。

2) 血清 TARC 値: 血清 TARC は、血清総 IgE と有意な正の相関($p<0.0001$)、末梢血好酸球数と有意な正の相関($p<0.002$)を認めると共に、呼気 NO とも有意な正の相関($p<0.0001$)を認めた。また、喘息群では血清 TARC は有意に高値($p<0.001$)であった。さらに、アトピー性皮膚炎患者を除くと、血清 TARC は FEV1%と有意な負の相関を認めた。したがって、血清 TARC 値は気管支喘息早期診断に応用可能と考えられた。

3) 呼気一酸化窒素(呼気 NO):

①学童: 学童において、呼気 NO は総 IgE, ダニ特異的 IgE と強い正の相関を認め($p<0.001$)、一秒率(FEV1%)と有意な負の相関を認めた($p<0.05$)。総 IgE, ダニ特異的 IgE と呼吸機能には相関がなかった。反復喘鳴群では呼気 NO が有意に高く($p<0.001$)、FEV1%が有意に低値($p<0.05$)。多変量解析では、反復喘鳴症状の指標として呼気 NO が最も優れていた(OR=24.9, $p<0.05$)。学童ではアレルギー性気道炎症の指標として呼気 NO が優れていることが明らかになった。

②成人: 呼気 NO は、学童と同様、血清総 IgE 値、抗原特異的 IgE 値(ダニ、スギ、ネコ)と有意な正の相関を認め、呼吸機能の閉塞性障害の指標(一秒率)とは有意な負の相関を認めた。また、医師により喘息と診断された者では有意に呼気 NO が高かった。また、反復喘鳴を指標とした多変量解析では、呼気 NO と一秒率が有意な指標として選択され、特に呼気 NO の関与が大きかった。したがって成人においても呼気 NO はアレルギー性気道炎症の良い指標として用いられることが明らかになった。

③喘息早期診断のための呼気 NO の正常基準値と cutoff 値: 健常群における呼気 NO の平均値は、小児: 15.9 (95% C.I.: 14.5-17.3) ppb、成人: 19.7 (95% C.I.: 18.2-22.2) であった。小児・成人(喫煙の有無に関らず)ともに喘

息疑い群では健常群に比べて有意に呼気 NO は高く、その cutoff 値は、小児では 37 ppb (感度: 81%、特異度: 65%)、成人非喫煙群では 38 ppb (感度: 81.8%、特異度: 85.7%) と同程度であった。成人喫煙群は 32.9 ppb (感度: 66.7%、特異度: 80.3%) で若干低値であった。

4) 呼気濃縮液のサイトカインならびに各種気道特異的蛋白: 気管支喘息患者から採取した呼気濃縮液をサンプルとし、IL5, Eotaxin, TARC の ELISA キット、ならびに、我々が開発した Ugrp 1 測定 ELISA 系での測定を試みたが、検出感度以下例がほとんどであり、臨床的指標として用いることは難しいことが判明した。

5) 喘息早期診断手法開発のための前向き研究: 対象の内訳は、喘息群: 21 名、咳喘息群: 10 名、アトピー咳嗽群: 6 名、その他の疾患群: 14 名であった。呼気 NO と気道過敏性 (Dmin) の間には有意な負相関を認めた。呼気 NO と FEV_{1%} の間に有意な相関はなかったが、呼気 NO が高いほど FEV_{1%} は低い傾向にあった (p=0.009)。呼気 NO はアトピー咳嗽群・その他の疾患群と比較して喘息・咳喘息群 (早期喘息患者と考えられる) で有意に高値を示した (p<0.01)。喘息・咳喘息とその他の疾患を鑑別するための呼気 NO の cutoff 値は、38.8ppb で感度 71%、特異度 100% であった。

D. 考察

平成 15~17 年の 3 年間、本研究では、気管支喘息ならびにアレルギー性気道炎症を検知するための既存の指標 (喀痰好酸球、血清サイトカイン・ケモカイン) ならびに新たな指標 (呼気 NO、呼気濃縮液) の有用性を評価した。誘発喀痰中好酸球は、早期喘息患者を高率に含むと気道過敏性を伴う慢性咳嗽患者においても、半数程度にしか上昇を認めず、早期喘息患者を過小評価する可能性が高いと判断された。血清サイトカイン・ケモカインでは、血清 TARC 値がアレルギー性気道炎症の

指標として有用である可能性が明らかになった。しかし、血清採取が必要なこと、測定に時間を要することなどから、日常臨床での応用にはいくつかの課題が残された。呼気 NO は、各種 I 型アレルギーの指標と強い相関を示すのみならず、気道病変の指標となる %FEV₁ とも相関を認め、多変量ロジスティック解析結果からもアレルギー性気道炎症の指標として有用であるが明らかになった。呼気濃縮液については、アレルギー関連のサイトカイン・ケモカインなどはほとんど検出限界以下であり、臨床応用は難しいと判断された。

以上の結果から、気管支喘息早期診断の指標としては呼気 NO の有用性が最も高いと考えられたため、呼気 NO を指標とし、早期喘息患者を高率に含む遷延性咳嗽患者を対象として前向き研究を行った。その結果、呼気 NO は、咳症状に気道過敏性と好酸球気道炎症を伴う早期喘息患者群で有意な上昇を認めた。また、咳症状に好酸球性気道炎症は伴うが、気道過敏性を伴わないアトピー性咳嗽患者では全く上昇を認めなかった。また、それ以外の感染後咳嗽、副鼻腔気管支症候群、胃食道逆流に伴う咳嗽などの患者でも上昇は認められなかった。これらの結果から、呼気 NO は、早期喘息検出のための非侵襲的で、かつ、鋭敏な指標であることが明らかになった。

E. 結論

呼気 NO は気管支喘息の早期診断のための非侵襲的で、かつ、鋭敏な臨床指標となる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saito J, et al., Exhaled nitric oxide as a marker of airway inflammation for an epidemiologic study in school

- children. *J Allergy Clin Immunol* 114:512-6, 2004.
- 2) Inoue K, et al., A kendo player with haemoptysis. *Lancet* 364:814, 2004.
 - 3) Takahashi K, et al., Diagnostic usefulness of bronchoalveolar lavage in Hermansky-Pudlak syndrome: A case with double lung cancers. *Int Med* 43:972-6, 2004.
 - 4) Konishi J, Yamazaki K, Kinoshita I, Isobe H, Ogura S, Sekine S, Ishida T, Takashima R, Nakadate M, Nishikawa S, Hattori T, Asahina H, Imura M, Kikuchi E, Kikuchi J, Shinagawa N, Yokouhi H, Munakata M, Dosaka-Akita H, Nishimura M. Analysis of the response and toxicity to gefitinib of non-small cell lung cancer, *Anticancer Res*, 25: 435-442, 2005.
 - 5) Wang X, Ohtsuka Y, Kimura K*, Muroi M, Ishida T, Saito J, Munakata M. Antithetical Effect of TNF- α Gene Promoter Polymorphism on Nodular Pneumoconiosis and PMF in Coal Workers. *Am J Ind Med*, , 48: 24-29, 2005.
 - 6) Liu Y, Endo Y, Iwaki D, Nakata M, Matsushita M, Wada I, Inoue K, Munakata M, Fujita T. Human M-ficolin is a secretory protein that activates the lectin complement pathway. *J Immunol*, 175: 3150-6, 2005.
 - 7) Munakata M, Harada Y, Nagabuchi A, Mataushita H, Koga N, Ohsaki M, Imagawa K, Shiratsuchi T. Molecular-based haplotype analysis of the b2-adrenergic receptor gene (ADRB2) in Japanese asthmatic and non-asthmatic subjects. *Allergol Int* (in press, 2006)
2. 学会発表
- 1) Saito J, et al., ENO as a noninvasive assessment of recurrent wheezers in school children. *Eur Respir J*, 22: 569s, 2004.
 - 2) Yoshikawa M, et al., Immuno-histo-chemical study on uterogloin-related protein 1 (UGRP1) expression in pulmonary carcinoma. *Lung Cancer*, 41: S255, 2003.
 - 3) 斉藤純平、他. 学童期のアレルギー性気道炎症の疫学的評価における呼気中 NO 値の検討. *アレルギー*, 52: 918, 2003.
 - 4) 渡辺香奈、他. 受動喫煙・母乳栄養は学童アレルギー発現のリスクファクターか? *アレルギー*, 52: 919, 2003.
 - 5) Watanabe K, et al., Environmental tobacco smoke (ETS) exposure and male gender are risk factors for atopy in school children. Annual Meeting of European Respiratory Society Scotland, 2004.
 - 6) Munakata M, et al., Development of new method for off-line measurement of exhaled NO (FENO) compatible to on-line method. Annual Meeting of European Respiratory Society, Scotland, 2004.
 - 7) Saito J, et al., Dose serum mannose binding lectin (MBL) influence allergic disorders? Annual Meeting of European Respiratory Society, Scotland, 2004.
 - 8) Saito J, et al., Exhaled nitric oxide (eNO) for an epidemiological study in school children. Asian Pacific Congress for Allergy and Clinical Immunology, 2004. 10, Tokyo, Japan.
 - 9) Inoue K, et al., Clinical significance of sputum eosinophilia in patients with chronic cough and airway hyperresponsiveness. Asian Pacific Congress for Allergy and Clinical Immunology, 2004. 10, Tokyo, Japan.
 - 10) Yoshikawa M, Sugawara A, Ishida T, Moriya H, Yamazaki K, Asano F, Inoue K, Saito J, Munakata M. Bronchoscopy with real-time virtual navigation under fluoroscopy is useful for diagnosis of small peripheral pulmonary lesions. The 11th World Conference on Lung Cancer. Spain, 2005

- 11) Sato S, Saito J, Hasnuma H, Ishimaru Y, Kanege H, Kudo S, Munakata M. Exhaled nitric oxide(eNO) as a noninvasive assessment of recurrent wheezers in adults. European Respiratory Society Annual Congress, Copenhagen, 2005
- 12) Saioto J, Hasunuma H, Ishimaru Y, Kanege H, Kudo S, Munakata M. Exhaled nitric oxide (eNO) for an epidemiological study in adults. European Respiratory Society Annual Congress, Copenhagen, 2005
- 13) 齊藤純平、棟方 充. 気管支喘息早期診断における呼気 NO の意義. シンポジウム、55 回日本アレルギー学会総会、盛岡、2005

H. 知的財産権の出願・登録

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし

気管支喘息の慢性化・難治化の予防を目指す、早期介入療法のための
早期診断法の確立に関する研究
-気道粘膜生検組織の免疫組織学的解析の有用性に関する検討-

分担研究者：福田 健（獨協医科大学 内科学（呼吸器・アレルギー）教授）

研究協力者：相良博典（獨協医科大学 内科学（呼吸器・アレルギー）講師）

杉山公美弥（獨協医科大学 内科学（呼吸器・アレルギー）講師）

研究要旨

気管支喘息の慢性化・難治化の予防のためには、いかに喘息を早期に診断しうるかということが重要である。これまでの3年間に喘息患者から得られた気管支粘膜生検組織の免疫組織化学的解析が早期診断に有用であるか否かを明らかにするために本研究を計画し検討した。喘息患者および非喘息患者における気管支粘膜生検標本における発症直後の喘息と他の気道疾患を区別できる候補分子として、線維化サイトカイン TGF- β の細胞内シグナル伝達を正/負に調節する分子である Smad 蛋白について検討し、smad 7 が発現しているものほど基底膜の厚さが正常に保たれていることを発見した。これらはマウス喘息モデルを用いた発症初期喘息と慢性喘息におけるリン酸化 Smad2/Smad7 発現パターンで、Smad7 発現は急性モデルに比し慢性モデルで明らかに弱く喘息患者におけるそれと類似していることを示した。従って Smad 7 蛋白の発現検出が喘息の早期診断につながる可能性がある。その検討の結果、発症1年未満の喘息患者において Smad 7 蛋白の発現が誘導され年数を重ねるに従って発現が減弱していることが示された。さらに、ステロイドで抑制され無い遺伝子の一つで、IgE 受容体 (Fc ϵ RI) の架橋によってヒトマスト細胞から産生される amphiregulin が気道上皮細胞におけるムチン mRNA の発現にどのように影響を与えているかについても検討を加えた。結果、気管支喘息患者においては中間値 30% 程度のマスト細胞が amphiregulin 陽性であり、約 80%以上の amphiregulin 陽性細胞がマスト細胞であることを見いだした。杯細胞の過形成と有意な相関関係も認めた。この検討では amphiregulin 発現の時期的な背景が分からないためマウスを用いた検討も行い、抗原曝露回数が増えるほど発現が増強することを見出した。これらの結果から気管支喘息発症直後の上皮下線維増生は顕著でない喘息患者では Smad7 の発現増強が特徴的な発現パターンである可能性がある事が示唆された。喘息患者の気道粘膜マスト細胞に特異的に amphiregulin を発現することを発見し、杯細胞の過形成と相関する事も見出した。またこれらは発症早期に発現を認めないことから喘息の早期診断、発症予知、治療薬減量の基準の確立に寄与し、良好な臨床経過が期待されると考えられた。

A. 研究目的

喘息の早期診断は気管支喘息の慢性化・難治化の予防のためには重要である。本研究は喘息患者から得られた気管支粘膜生検組織の免疫組織化学的解析が早期診断に有用であるか否かを明らかにするために本研究を計画した。気管支喘息の病態とは、好酸球、リンパ球を中心とした細胞浸潤を特徴とする気管支粘膜における慢性の炎症反応と現在理解されている。気道における粘膜免疫系において病的に Th2 タイプの免疫反応が誘導されていると考えられている。吸入によって気道粘膜に到達した抗原が抗原提示細胞を介してリン

パ球を刺激し、リンパ球は増殖する。T 細胞は Th2 タイプのサイトカイン (IL-4, IL-5, IL-13 など) を産生する Th2 細胞に分化し、B 細胞は、抗体産生細胞に分化し、抗原特異的 IgE を産生する。この抗原特異的 IgE はマスト細胞表面の高親和性 IgE 受容体 (Fc ϵ RI) に結合し、再び侵入してきた特異的抗原とマスト細胞表面の抗原特異的 IgE 抗体の結合により Fc ϵ RI は架橋されマスト細胞が活性化されると、細胞内の顆粒に蓄えられたヒスタミン、プロテアーゼなどのメディエーターのみならず、アランキドン酸から新たに産生されるプロスタグランジン D₂ (PGD₂)、ロイコトリエン C₄ (LTC₄)

などが放出される。これらのメディエーターは、血管透過性の亢進、気道粘膜の浮腫、気道平滑筋収縮などを引き起こし、アレルギー反応の初期の病態が誘導されると考えられる。我々はこれまでに、喘息患者および非喘息患者における気管支粘膜生検標本における発症直後の喘息と他の気道疾患を区別できる候補分子として、線維化サイトカイン TGF- β の細胞内シグナル伝達を正/負に調節する分子である Smad 蛋白について検討し、smad 7 が発現しているものほど基底膜の厚さが正常に保たれていることを報告してきた。従って Smad 7 蛋白の発現検出が喘息の早期診断につながる可能性がある。また、従来マスト細胞は、主にこのような即時相に関与するエフェクター細胞と考えられてきた。さらに、近年、齧歯類のマスト細胞のみならず、ヒトのマスト細胞も種々のサイトカインを産生することが明らかとなった。マスト細胞から産生されるサイトカインが血管内皮細胞の接着因子の発現、顆粒球の遊走、活性化や生存延長を誘導することより、アレルギー反応の慢性化においても重要な役割を果たしていると考えられる。その中で高親和性 IgE 受容体 (Fc ϵ RI) の架橋によってヒトマスト細胞から産生されるステロイドに抑制され無い分子 amphiregulin は重症難治化に寄与している可能性がある。

これら分子が病期発症早期から慢性期において気道にどのように関与しているか、またこの分子の発現が与える影響など検討を加えた。

B. 研究方法

- (1) 対象：当院外来通院中の成人喘息患者を軽症から重症まで 34 例、6 例を正常対照群とした。
- (2) 喘息の重症度分類：喘息重症度分類は日本のガイドラインを参考に、吸入ステロイド (ICS) 使用量を BDP 換算で Step 1 (BDP < 200 μ g), Step

2 (BDP \geq 200 μ g), Step 3 (BDP \geq 400 μ g), Step 4 (BDP \geq 800 μ g) とし、Step 1, を軽症群、Step 2, 3 を中等症群、Step 4 は重症群とした。

- (3) インフォームドコンセントを得られた患者から気道粘膜組織生検を施行した。局所麻酔下に右上葉入口部および中葉入口部より生検を施行した。
- (4) マウスのモデル作成
アルミゲルを腹腔内投与し、感作成立後、抗原として卵白アルブミンを単回曝露、また複数回曝露 (7, 21 回) し、急性、亜急性、慢性モデルを作成した。
- (5) 免疫染色：得られた組織を compound にて包埋し液体窒素にて凍結した。その後薄切切片を作成し、HE, Elastica masson, APAP 法などを用いて染色を行った。Amphiregulin に関しては薄切連続切片を作成し、上の切片を抗 amphiregulin 抗体で染色し、下の切片を抗 tryptase 切片で染色する方法で評価を行った。また気道上皮に関しては杯細胞の過形成を検索する上で PAS/AB の二重染色を施行した。
- (6) vitro においては、ヒト肺 mucoepidermoid carcinoma cell line NCI-H292 細胞におけるムチン (MUC) 2, MUC5AmRNA の発現を rt-PCR を用いて検討した。

C. 研究結果

- (1) 発症初期の喘息患者ほど smad7 蛋白は発現が増強し、年数が経過するにつれてその発現が減弱していた。健常人ではその発現は軽微であった。またマウスモデルと同様に重症慢性化ほど smad7 蛋白の発現は弱いものであることが確認された。
- (2) 培養気道上皮細胞においては Th2 サイトカインの IL-5, GM-CSF で刺激を加えると smad7 蛋白の発現

は一部増強するものの高濃度では減弱が認められた。一方 Tr サイトカイン IL-10 は smad7 の発現を有意に促進し、混合培養で Th2 サイトカインで減弱した smad7 蛋白を誘導した。

(3) Mucus Score

mucus score について抗原感作成立後、溶媒の吸入曝露のコントロール群と抗原曝露群を比較したところ、気管においては 7 日間曝露群と 21 日間曝露群では有意に mucus score の上昇を認めた。肺においては、1 日、7 日間、21 日間全ての群で抗原曝露群で有意に mucus score の上昇を認めた。

(4) マスト細胞数

マスト細胞にも同様の検討を行った。気管および肺においては 1 日間、7 日間、21 日間全ての群で有意にマスト細胞の増加を認めた。また、末梢の肺泡レベルについても検討し 7 日間曝露群と 21 日間曝露群で有意にマスト細胞の上昇を認めた。

マスト細胞と mucus score との間には気管と肺とも有意な相関関係を認めた。

(5) Amphiregulin 発現

気管および肺においては 1 日間、7 日間、21 日間全ての群で有意に Amphiregulin 発現の増加を認めた。

肺泡においても全ての群で有意に Amphiregulin 発現の上昇を認めた。また抗原曝露群に Amphiregulin が特異的に発現されることが観察された。

(6) 組織学的変化

OVA 曝露群では経時的にマスト細胞の増加、杯細胞の過形成および Amphiregulin の発現の増強を認めた。

(7) Amphiregulin と AA1 陽性細胞は気管と肺とも有意な正の相関関係を認め Amphiregulin 発現は肥満細胞 dominant であることが示された。

Amphiregulin と mucus score との相関については、気

管と肺とも有意な正の相関関係認めた。

(8) MUC 蛋白の発現

ヒト肺 mucoepidermoid carcinoma cell line NCI-H292 細胞において amphiregulin 刺激によりムチン(MUC)2, MUC5AmRNA の発現が増強した。

(9) 早期喘息患者における amphiregulin 発現

Amphiregulin 発現は、慢性喘息では明らかに発現されていた。発症 2 年未満の早期喘息患者でも発現は認められたが、その程度は弱かった。疾患コントロールでは全く認められず、かなり喘息特異的マーカーである可能性が高いため、陽性であれば喘息である可能性が高いと言えると考えられた。

D. 考察

気管支喘息の慢性化・難治化に特に気道リモデリングの関与が重要であるが、その分子レベルでの形成機序は未だ不明な部分が多い。現象的には気道炎症の反復が原因になっていることは間違いないので、発症早期から十分な抗炎症療法を行うこと、原因アレルゲンないし物質が同定できる場合は可能な限り回避することが重要であるがなかなか困難である。動物実験では気道リモデリングを効果的に抑制する薬剤が幾つか見つかっているが、実際の臨床での有効性は未だ確認されていない。これらの形成過程に線維化サイトカインの TGF- β が重要であるがそのシグナル伝達分子 smad の役割が徐々に解明されてきた。今回の我々の結果からも smad の巧妙な制御機構が徐々に分かってきた。発症初期の段階ではその制御機構が働くために smad7 が過剰発現している事である。その時点で何らかの処置を講じれば重症・難治化を防げる可能性も示唆される。また、喘息において喀痰は安定期には見られなくとも、発作時には多量に認められることが多く、また、喘息発作を繰り返すことが気道リモデリングを助長させると考

えられており、これらの事実よりマスト細胞の活性化が喀痰産生や気道リモデリングの引き金になっている。FcεRI の架橋によってヒトマスト細胞において遺伝子の発現が増強し、グルココルチコイド薬によりその発現が抑制されない分子で epidermal growth factor のひとつである amphiregulin の発現をマウスモデルで経時的に検討した結果、抗原曝露により経時的に喀痰産生能に重要な杯細胞の増加を認め、また、マスト細胞も経時的に増加し、さらにマスト細胞から産生される amphiregulin の発現が相関することを見出した。またその amphiregulin は杯細胞の過形成と相関を認め、その発現は抗原曝露群に特異的に発現していることも分かった。今後、なぜ産生される多くのサイトカインのなかで amphiregulin がステロイドで抑制できないのか検討の必要があるが、EGF は産生されたのち細胞表面に存在し、Metalloproteinase (ADAM17 など)によって ectodomain shedding、つまり切り離されて遊離され受容体に結合し、作用を発揮すると報告されている。マスト細胞からも Metalloproteinase の産生の報告がありこれらの関与も想定される。

E・結論

気管支喘息の慢性化・難治化に smad 蛋白の発現が関与している事を発見した。発症初期には smad7 蛋白の発現が誘導されており健常人との間にも明らかに差があることが示され、診断の一助となり得る。マスト細胞と気道リモデリングの関係は今まであまり研究が行われてこなかった領域である。臨床においては発作の回数を減らし、気道の炎症のコントロールが気道リモデリングの発症を予防するための唯一の手段と考えられており、そのためには発症早期からの吸入ステロイドの導入が推奨されているが、一端できあがった気道リモデリングに関しては何ら手だてがないのが現状であ

る。今回の結果は抗原曝露により経時的にマスト細胞が増加しそれから産生される amphiregulin も相関を認めたことから発症早期の治療の重要性を示しているものと考ええる。今後マスト細胞と気道を構成している細胞との相関作用を検討し、気道リモデリングの薬剤標的を明らかにする必要がある。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

論文発表

1・論文発表

1. 太田真弓, 相良博典, 杉山公美弥, 成剛, 秋元一三, 青木裕見子, 岡田壮令, 中尾篤人, 福田健: TGF-β 細胞内シグナル伝達物質 Smad7 の気道内発現は抗原負荷の反復により低下する, 呼吸 23 : S19-S21, 2004.

2. 太田真弓, 相良博典, 杉山公美弥, 青木裕見子, 岡田壮令, 福田健: 気管支喘息の病態形成における TGF-β シグナル伝達分子 Smad の役割. 呼吸 23 : 406-407, 2004.

3. Sagara H, Okumura S, Fukuda T, Saito H, Okayama Y. FcεRI-mediated amphiregulin production by human mast cells increases mucin gene expression in epithelial cells. J Allergy Clin Immunol 2005.

4. Masuda H, Manaka T, Masao Toda, Sagara H Antigen challenge-induced expression of amphiregulin by mast cells increases goblet-cell hyperplasia in a mouse model of asthma. Dokkyo J Med. Sci. 2005, in press

2・学会発表

1. 笛木直人: 気管支喘息患者から得られた喀痰が培養平滑筋細胞・線維芽細胞における TGF-β シグナルに及ぼす影響. 第31回関東喀痰研究会, 東京, 2004, 1.

2. 太田真弓, 相良博典, 杉山公美弥, 成剛, 秋元一三, 岡田壮令, 中尾篤人, 福田健: 慢性喘息病態における Smad 分子の関与. 第 44 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2004, 3.
3. 岡田壮令, 相良博典, 太田真弓, 福田健: 好酸球における Smad 分子発現におよぼすサイトカインの影響. 第 44 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2004, 3.
4. 相良博典, 太田真弓, 秋元一三, 岡田壮令, 杉山公美弥, 中尾篤人, 福田健: 喘息気道における上皮基底膜下線維増生に対する TGF- β シグナル伝達分子 Smad7 の役割. 第 1 回北関東信越呼吸器フォーラム, 東京, 2004, 4.
5. 相良博典: TGF- β シグナルに及ぼすテオフィリンの効果. 第 16 回日本アレルギー学会春期臨床大会 (イブニングシンポジウム), 前橋, 2004, 5.
6. 岡田壮令, 相良博典, 太田真弓, 福田健: 好酸球における smad 分子発現におよぼすサイトカインの影響. 第 16 回日本アレルギー学会春期臨床大会, 前橋, 2004, 5.
7. 笛木直人, 相良博典, 太田真弓, 秋元一三, 笛木真, 中尾篤人, 岡田壮令, 杉山公美弥, 牧野荘平, 福田健: IL-10 刺激が培養ヒト気管支上皮細胞の TGF- β シグナルに及ぼす影響. 第 16 回日本アレルギー学会春期臨床大会, 前橋, 2004, 5 大会, 前橋, 2004, 5.
8. 相良博典, 福田健: TGF- β シグナルと気道リモデリング. 第 54 回日本アレルギー学会総会(シンポジウム), 横浜, 2004, 11.

気管支喘息の慢性化・難治化の予防を目指す、早期介入療法のための 早期診断法の確立に関する研究

-呼気CTを用いた検討-

分担研究者：三嶋理晃 京都大学呼吸器内科教授

研究協力者：新実彰男 京都大学呼吸器内科院内講師 松本久子 京都大学呼吸器内科助手
上田哲也 京都大学呼吸器内科大学院生 竹村昌也 京都大学呼吸器内科医員

研究要旨

末梢気道病変を、air trapping を反映する HRCT の肺野濃度やその不均一性で評価する試みがなされている。

本研究ではまず予備的検討として、安定期喘息患者 29 例において、吸気および呼気の肺野 HRCT で定量的・半定量的に評価した末梢気道病変の諸指標（low attenuation area% (LAA%)、平均肺野濃度 (MLD)、モザイクパターン) を計測した。CT 指標の一部は健常者と有意差を示した。また特に LAA%、MLD の呼気値/吸気値の比は呼吸機能や重症度などと良い相関を示した。以上より、HRCT の末梢気道病変検出、評価における有用性を明らかにした。

続いて一部の例が典型的喘息に移行するため喘息の早期像と捉えることができる咳喘息の末梢気道病変を HRCT で評価し、喘息早期診断における HRCT の有用性を検討した。咳喘息患者 15 例、咳喘息以外の種々の原因による慢性咳嗽（非喘息性慢性咳嗽）患者 12 例、健常者 13 例を対象に、HRCT を両肺の 3 レベルで、最大吸気位・最大呼気位で撮影した（計 6 スライス）。末梢気道病変は同様に LAA%、MLD、モザイクパターンのスコアの呼気、吸気での値、さらに MLD、LAA% の呼気値と吸気値との比で評価した。ヘリカル CT 上の中枢気道の壁肥厚指標（壁面積/BSA）も解析に加えた。3 群の比較では、呼吸機能の V_{25} 、LAA% の呼気値/吸気値の比、壁面積/BSA が有意差を示した。各群間の比較では、 V_{25} は咳喘息群において健常者群、非喘息性慢性咳嗽群に比べて有意に低値、LAA% の呼気値/吸気値の比は咳喘息で健常者に比べて有意に高値であった（air trapping の存在を示唆）。壁面積/BSA は咳喘息群、非喘息性慢性咳嗽群の両方で健常者群と比べて有意に高値であった。呼気/吸気 HRCT を用いた air trapping の評価が喘息の早期診断に有用な可能性が示唆された。

A. 研究目的

喘息の早期診断における肺野 HRCT の有用性を検討する目的で、本研究を計画した。我々は従来より、中枢気道（区域支）の壁肥厚をヘリカル CT を用いて定量的に評価し、気道壁肥厚が喘息の重症度や気流閉塞の程度と関連することなどを報告してきた。また咳嗽のみを症状とする喘息の亜型である咳喘息（CVA）は、経過中にしばしば喘鳴が出現し典型的喘息に移行するため喘息の早期像ともみなすことができるが、咳喘息においても気

道壁肥厚が存在することも確認した。一方喘息における末梢気道病変の病態生理学的重要性が病理学的、生理学的検討で示されている。CVA でも気管支肺胞洗浄液中に好酸球が増加するため末梢気道病変の存在が示唆される。従って末梢気道病変の検出が喘息の早期診断につながる可能性がある。

CT で末梢気道の内腔狭窄や壁肥厚などを直接評価することは困難であるが、air trapping を示唆する平均肺野濃度 (MLD) の低下、低吸収域 (LAA) の増加やモザ

イクパターンなどの呼気 HRCT 所見が末梢気道病変の間接的評価に有用な可能性が種々の呼吸器疾患で報告されている。喘息でも同様の検討が行なわれ始めているが、種々の CT 指標の比較や、CT 指標と気道過敏性、気道炎症といった詳細な病態生理学的所見との関連の検討は行なわれていない。

そこでまず予備的研究として、安定期喘息患者 29 例と健常者 13 例において HRCT の諸指標を吸気、呼気の両方で検討した。その結果、喘息患者における MLD (HU)、LAA% (-960HU 未満のピクセル数の全体に占める比率) は、吸気での撮影では健常者と差がなく、呼気では LAA% のみで軽度の有意差を認めた。一方 MLD, LAA% の呼気値と吸気値の比は、健常者に比し強い有意差を持って大きかった (比が大きく 1 に近いほど air trapping が強いことを示す)。またこれらは喘息の重症度、FEV₁、MMF、残気率 (RV/TLC)、気道感受性などの指標と有意に相関した。以上より呼気/吸気 HRCT が喘息の末梢気道病変の検出、評価に有用であることを示した (論文投稿中)。

続いて本研究の本来の目的である喘息早期診断における HRCT の有用性を明らかにするため、CVA 患者、健常者 (HC) と、疾患コントロールとして CVA 以外の原因による慢性咳嗽 (NAC) 患者の計 3 群を対象に HRCT 所見を検討した。

B. 研究方法

対象は CVA15 例 (男 6、平均年齢 63 歳、罹病年中央値 0.6)、NAC12 例 (男 3、57 歳、1.1 年；副鼻腔気管支症候群 4、胃食道逆流 2、かぜ症候群後の咳嗽 1、不明または未確定 5)、HC13 例 (男 10、33 歳)。HRCT は、最大吸気位・最大呼気位の両方で、気管分岐部とその上下 4cm の 3 レベルで両肺を撮影し、MLD、LAA%、モザイクパターンを評価した。MLD、LAA% は自動解析プログラムを用いて計測し、モザイクパターンは、Hansell らの既

報に準じ視覚的に半定量スコア化した (スライス毎に 0-2 点、両肺 6 スライスで計 0-12 点)。MLD、LAA% は呼気/吸気比も算出した。さらに呼吸機能の諸指標と、ヘリカル CT 上の中枢気道 (右 B¹) の壁肥厚指標 (壁面積/BSA) も解析に加えた。

C. 研究結果

3 群の比較では、呼吸機能の V₂₅ (p=0.01)、LAA% の呼気値/吸気値の比 (p=0.03)、壁面積/BSA (p=0.0006) が有意差を示した。MLD、LAA% の吸気値、モザイクスコア (吸気・呼気とも)、FEV₁ には 3 群間で差がなかった。MLD、LAA% の呼気値と、MLD の呼気/吸気比には差のある傾向を認めたが統計学的な有意差には至らなかった。各群間の比較では、V₂₅ は CVA で NAC (p=0.03)、HC (p=0.007) に比し低値であったが後 2 者の間で差はなかった。LAA% の呼気/吸気比は CVA で HC に比し高値であったが (p=0.01) CVA、NAC 間には差がなかった。気道壁面積/BSA は HC に比し CVA (p=0.002)、NAC (p=0.0003) で高値であったが、後 2 者間に差はなかった。

D. 考察

典型的喘息において我々が確認したのと同様に、咳喘息患者における LAA% の呼気/吸気比は健常者に比し有意に低値であった。Air trapping を反映する他の CT 指標 (MLD・LAA% の呼気値、MLD の呼気/吸気比) も、有意差には至らなかったが咳喘息で末梢気道病変が強い傾向を示した。喘息を診断するための最も一般的な指標である FEV₁ と比較して、CT (末梢気道病変、中枢気道病変) や V₂₅ がより鋭敏な喘息病態の検出手段である可能性があると考えられる。これらの指標の中でどの指標が特に有用であるのか、他の検査とどのように組み合わせると診断の感度が上昇するのかについては今後検討を重ねる必要がある。

E. 結論

呼気/吸気 HRCT は、喘息の末梢気道病変を鋭敏に検出し、かつ病態を反映する優れた指標である。本検査が咳喘息の診断、ひいては喘息の早期診断に有用な可能性がある。

F. 健康危険情報

1 回の CT 検査における総被曝量は 1.9 mSv 程度と推定され、許容範囲内と判断される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Niimi A, Matsumoto H, Takemura M, Ueda T, Chin K, Mishima M. Relationship of airway wall thickness to airway sensitivity and airway reactivity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:983-8.

2. Niimi A, Matsumoto H, Ueda T, Takemura M, Suzuki K, Tanaka E, Chin K, Mishima M, Amitani R. Impaired cough reflex in patients with recurrent pneumonia. *Thorax* 2003;58:152-153.

3. Chin K, Nakamura T, Takahashi K, Sumi K, Ogawa Y, Masuzaki H, Muro S, Hattori N, Matsumoto H, Niimi A, Chiba T, Nakao K, Mishima M, Ohi M, Nakamura T. Effects of obstructive sleep apnea syndrome on serum aminotransferase levels in obese patients. *Am J Med* 2003;114:370-376.

4. Minakuchi M, Niimi A, Matsumoto H, Amitani R, Mishima M. Chronic eosinophilic pneumonia: treatment with inhaled corticosteroid. *Respiration* 2003;70:362-366, 2003.

5. Takemura M, Niimi A, Minakuchi M, Matsumoto H, Ueda T, Chin K, Mishima M. Bronchial dilatation in asthma: relation to clinical and sputum indices. *Chest* 2004;125:1352-1358.

6. Niimi A, Matsumoto H, Amitani R, Nakano Y, Sakai H, Takemura M, Ueda T, Chin K, Itoh H, Ingenito EP, Mishima M. Effect of short-term treatment with inhaled corticosteroid on airway wall thickening in asthma. *Am J Med* 2004;116:725-731.

7. Niimi A, Matsumoto H, Takemura M, Ueda T, Nakano Y, Mishima M. Clinical assessment of airway remodeling in asthma: utility of computed tomography. *Clin Rev Allergy Immunol* 2004;27:45-57.

8. Niimi A, Nguyen LT, Usmani O, Mann BS, Chung KF. Reduced pH and chloride levels in exhaled breath condensate of patients with chronic cough. *Thorax* 2004;59:608-612.

9. Groneberg DA, Niimi A, Dinh QT, Cosio B, Hew M, Fischer A, Chung KF. Increased expression of transient receptor potential vanilloid-1 in airway nerves of chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:1276-80.

10. Niimi A, Chung KF. Airway inflammation and remodelling changes in patients with chronic cough: do they tell us about the cause of cough? *Pulm Pharmacol Ther* 2004;17:441-6.

11. Ueda T, Tabuena R, Matsumoto H, Takemura M, Niimi A, Chin K, Mishima M. Successful weaning using noninvasive positive pressure ventilation in a patient with status asthmaticus. *Intern Med* 2004;43:1060-2.

12. Chin K, Fukuhara S, Takahashi, Sumi K, Nakamura T, Matsumoto H, Niimi A, Hattori N, Mishima M, Nakamura T. Response shift in perception of sleepiness in obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome before and after nCPAP treatment. *Sleep*

2004;27:490-493.

13. Matsumoto H, Niimi A, Takemura M, Ueda T, Minakuchi M, Tabuena RP, Chin K, Mio T, Ito Y, Muro S, Hirai T, Morita S, Fukuhara S, Mishima M. Relationship of airway wall thickening to an imbalance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in asthma. *Thorax* 2005;60:277-281.

14. Takahashi K, Chin K, Sumi K, Nakamura T, Matsumoto H, Niimi A, Ikai I, Mishima M. Resistant hepatic hydrothorax: a successful case with treatment by nCPAP. *Respir Med* 2005;99:262-4.

15. Niimi A, Torregro A, Nicholson AG, Cosio BG, Oates TB, Chung KF. Nature of airway inflammation and remodeling in chronic cough. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:565-70

Niimi A, Kihara Y, Sumita Y, Okano Y, Tambara K, Fujita M. Cough reflex by ventricular premature contractions. *Int Heart J* 2005;46:923-6.

16. Ito I, Nagai S, Handa T, Muro S, Hirai T, Tsukino M, Mishima M. Matrix metalloproteinase-9 promoter polymorphism associated with upper lung dominant emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:1378-82

17. Oga T, Nishimura K, Tsukino M, Sato S, Hajiuro T, Mishima M. Exercise capacity deterioration in patients with COPD: longitudinal evaluation over 5 years. *Chest* 2005;128:62-9

18. Matsumoto H, Niimi A, Takemura M, Ueda T, Tabuena R, Yamaguchi M, Matsuoka H, Hirai T, Muro S, Ito Y, Mio T, Chin K, Nishiyama H, Mishima M. Prognosis of cough variant asthma: a retrospective analysis. *J Asthma*, in press.

19. Takemura M, Matsumoto H, Niimi A, Ueda T, Matsuoka H, Yamaguchi M, Jinnai M, Muro S, Hirai T, Ito Y, Nakamura T, Mio T, Chin K, Mishima M. High sensitivity C-reactive protein in asthma. *Eur Respir J*, in press

20. 新実彰男. 慢性咳嗽の臨床: 咳喘息を中心に. 埼玉県医学雑誌 2005;40:121-124

21. 新実彰男、上田哲也、松本久子、平井豊博、三嶋理晃. 喘息における末梢気道病変の HRCT による評価. 気管支学 2005;27:626-9.

2. 学会発表

1. 竹村昌也 新実彰男 松本久子ほか. 咳喘息における RAST 陽性抗原と症状の季節性との関連. 第 15 回日本アレルギー学会総会 (2003 年 5 月開催)

2. 新実彰男、中野恭幸、松本久子、室繁郎、平井豊博、三嶋理晃. CT 画像による喘息と COPD の気道壁の比較. ワークショップ「炎症細胞、気道構成細胞と気道疾患」. 第 42 回日本呼吸器学会総会 (2003 年 3 月 13 日)

3. 松本久子, 新実彰男, 竹村昌也, 上田哲也, タブエナ・ローリン, 西山秀樹, 三嶋理晃: 咳喘息から喘息への移行に対する早期導入. 第 16 回日本アレルギー学会春季臨床大会イブニングシンポジウム「軽症喘息治療における early intervention の意義」(2004 年 5 月、前橋市)

4. 上田哲也、新実彰男、松本久子ほか. 喘息における Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) 遺伝子多型の病態への関与. 日呼吸会誌 42 (増刊号);84, 2004.

5. 松本久子、Tabuena R, 新実彰男ほか. 咳喘息, 非喘息性慢性咳嗽例における CT 所見について. 日呼吸会誌 42 (増刊号);128, 2004.

6. 新実彰男. 気道リモデリングの評価. イブニングシンポジウム “気道リモデリングは修復できるか?”