

- 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 気道でのキサントシ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。

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 押方智也子

谷口正実 前田裕二 大友守 小野恵美子 関谷潔史 福富和馬 谷本英則

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ため、疾患の評価に気道炎症の指標が有用である可能性が高い。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、注目されている。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、臨床に応用するにはさらなる検討が必要である。平成17年度では、EBC回収の実際の方法論、Cysteinyl Leukotriene(cysLTs)は疾患の重症度と関連があることについて報告した。今年度は、cysLTs濃度を測定した患者のその後の経過との比較、及び気管支喘息の重症化に重要である好中球性炎症に関連するLeukotriene B<sub>4</sub>(LTB<sub>4</sub>)の濃度について検討した。EBC中cysLTsを測定した気管支喘息患者52例をその後一年経過観察したところ、32例で治療の増量もしくは発作治療を必要とした。増悪例33例と非増悪例19例と比較したところEBC中cysLTs(p=0.036)、logAchPC<sub>20</sub>(p=0.007)、logHistPC<sub>20</sub>(p=0.044)で有意な差を認めた。EBC中cysLTsについてcut offは1.75pg/mlが最も妥当と考えられた(感度77.7%、特異度73.3%)。また、EBC中LTB<sub>4</sub>は27例で測定し、重症な症例で高値である傾向を認めた(平均値として、STEP1:1.93, STEP2: 2.99, STEP3: 3.29, STEP4: 4.68 (pg/ml))が尿中LTB<sub>4</sub>glucuronide(LTBG)濃度とは相関を認めなかった。EBCにおいて、cysLTs濃度は気管支喘息の増悪の予測因子となりうることが示唆された。LTB<sub>4</sub>については、重症例で高い傾向があった。次年度で更なる検討を加え、EBC中LTs測定の臨床上の有用性について評価する予定である。

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。また、平成 17 年度においては EBC 回収時の方法論についての検討を行い、また、Cysteinyl Leukotriene (cysLTs)は疾患の重症度と関連し、尿中との比較では相関を認めず、全身の LT 産生量と気道内との矛盾があることを報告した。今年度は、cysLTs 濃度を測定した患者のその後の経過との比較、及び気管支喘息の重症化に重要である好中球性炎症に関連する Leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>)の濃度について検討した。

## 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 52 名を対象とした。EBC 中 cysLTs、気道過敏性(Ach、Hist)、eNO、呼吸機能測定後一年間経過観察した。また、他の気管支喘息患者 27 症例について EBC 中 LTB<sub>4</sub> 及び尿中 LTBG について測定した。

### (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 Step1-4 に分類した。悪化の基準は小発作以上の発作、もしくは Step2 以上の症状のため治療薬の増量が必要と判断された場合とした。

### (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℃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℃で保管、分析した。

### (4)EBC 中の leukotriene 濃度の定量

cysLTs と LTB<sub>4</sub> 濃度は微量のため以下の方法で濃縮して測定した。

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、LTB<sub>4</sub> ELISA Kit (Cayman)で測定

### (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[cmH<sub>2</sub>O]、70[ml/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、PC<sub>20</sub>を指標とした。

### (6)尿中 LTE<sub>4</sub>、LTBG 濃度の測定

EBC 採取と同時に尿を採取し LTE<sub>4</sub>、LTBG を三田らの報告に基づき、測定した。

1. 尿から脂溶性物質を Empore C18 カラムで抽出
2. HPLC で LTE<sub>4</sub> 分画あるいは LTBG を含む分画を分取し、Empore C18 カラムで再度抽出。
3. LTE<sub>4</sub> は抽出液を濃縮して CysLTs ELISA kit で測定した。一方、LTBG 分画はβ-glucuronidase で加水分解して生成した LTB<sub>4</sub> を HPLC で分取したのち LTB<sub>4</sub> ELISA kit (ともに Cayman)で測定した。測定値は creatinine の濃度で補正した。

## C. 結果

EBC 中 CysLTs を測定した気管支喘息患者 52 例をその後一年経過観察したところ、33 例で治療の増量もしくは発

作治療を必要とした。増悪例 33 例と非増悪例 19 例で eNO, %FEV<sub>1</sub>, EBC 中 cysLTs、尿中 LTE<sub>4</sub>, AchPC<sub>20</sub>, HistPC<sub>20</sub> の前値を比較したところ、EBC 中 cysLTs(p=0.036)、logAchPC<sub>20</sub> (p=0.007), logHistPC<sub>20</sub> (p=0.044)で有意な差を認めた。EBC 中 cysLTs について増悪予測についての cut off を検討したところ、1.75pg/ml が最も妥当と考えられ、感度 77.7%、特異度 73.3%であった。喘息が増悪した割合は、cysLTs>1.75pg/ml の症例で 78%、cysLTs<1.75pg/ml の症例で 27%であった。

また、EBC 中 LTB<sub>4</sub> は 27 例で測定したところ、重症な症例で高値である傾向を認めたが、統計学的な検討は症例が少なく困難であった(平均値として、STEP1:1.93, STEP 2: 2.99, STEP3: 3.29, STEP4: 4.68 (pg/ml))。eNO, %FEV<sub>1</sub>, 気道過敏性(Ach, Hist)それぞれで相関は認めなかった。尿中 LTBG との比較では、相関を認めなかった。

#### D. 考察

増悪群、安定群で有意な差があったのは EBC 中 CysLTs、気道過敏性であった。従来気道過敏性亢進状態は気管支喘息発作のリスクとなると考えられており、今回の結果はこれと一致する。EBC 中 CysLTs については、前年度の結果上気管支喘息の重症度と関連している可能性を報告したが、今回 CysLTs 高値の症例では増悪の可能性が高く、増悪予測因子となりうることが示唆された。一方、群間で有意差がなかった eNO, %FEV<sub>1</sub> については、ステロイド治療後改善しやすく、気管支喘息が測定時に治療が奏効しているというこの判定には有用であると考えられる。相補的な特徴を持つ各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。また、対象症例を詳細に検討すると、EBC 中 CysLTs が測定限界以下であった 12 症例中 4 例で増悪した。このことは、CysLTs 高値は増悪の危険因子になるが、必ずしも CysLTs が関与しているわけではないことを示唆している。これは、ロイコトリエン受容体拮抗薬が responder では効果的

な薬剤である反面、non-responder が存在し全ての症例において有効ではないという臨床上的現象と一致する。それらのことを考慮し総合的に判定する必要はあるが、CysLTs 高値については増悪予測因子となりうることが示唆された。

また、EBC 中 LTB<sub>4</sub> は統計学的な検討は症例が少なく困難であったが、重症な症例で高値である傾向を認めた。eNO, %FEV<sub>1</sub>, 気道過敏性(Ach, Hist)それぞれで相関は認めず、尿中 LTBG との比較では、相関を認めなかったが、これらの結果は CysLTs の場合と一致する。一方、EBC 中 LTB<sub>4</sub> については近年唾液の混入による過大評価の可能性が指摘されており、BAL との比較などの検討が必要である。これについては次年度に検討評価する予定である。

好中球性炎症は特に重症喘息、ステロイド抵抗性に関与するとされており、LTB<sub>4</sub> は臨床上重要であるため、次年度にさらに症例を重ねて検討していく予定である。

#### E. 結論

以上より、EBC において、CysLTs 濃度は気管支喘息の増悪の予測因子となりうることが示唆された。LTB<sub>4</sub> については、重症例で高い傾向があった。尿との比較では CysLTs と同様に尿中 LTBG との比較では相関を認めず、全身の LT 産生量と気道内との矛盾があった。以上より呼気凝縮液の位置づけについてはさらに詳細な検討が必要であるが、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りうる。

#### 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、秋山一男、他

気管支喘息患者における呼気凝縮液(EBC)中の cysteinyl  
Leukotriene(CysLTs)測定の実際

第18回日本アレルギー学会春季臨床大会 2006.5月

3.その他(総説)

粒来崇博 三田晴久 秋山一男

呼気凝縮液の原理と臨床応用－呼気凝縮液の検査の現状  
と今後の発展性について－ 喘息 vol.19 no.1 2006

呼吸凝縮液を用いた気道炎症の評価に関する研究  
—呼吸凝縮液中サイトカイン/ケモカインの検討—

分担研究者:大田 健(帝京大学医学部内科学教授)

研究協力者:足立哲也(帝京大学医学部内科学講師)、長瀬洋之(帝京大学医学部内科学講師)

**研究要旨** 気管支喘息の病態は気道の慢性炎症であり、炎症の程度が重症度を規定すると考えられている。特に気道炎症が遷延するとリモデリングに至り、喘息難治化の要因として重用視されている。呼吸凝縮液は気道病態を評価する新たな方法として、近年注目されている。本研究では、喘息患者における呼吸凝縮液中のサイトカイン/ケモカインの測定を Luminex system を用いて試みた。IP-10 は喘息患者・健常人を含めたほぼ全例、GM-CSF と Eotaxin は喘息患者 48 例中 15 例前後と健常人 16 例中 2-3 例、IL-8 と MIP-1 $\beta$  は喘息患者 1-2 例においてのみ検出可能であったが、いずれも喘息患者と健常人との間で有意差を認めなかった。そこで喘息患者における呼吸凝縮液中サイトカイン/ケモカイン濃度と、呼吸機能との関連を解析した。呼吸凝縮液中 Eotaxin 濃度と%FEV<sub>1</sub>との間には、有意な負の相関を認めた(相関係数:-0.477, p = 0.001)。呼吸凝縮液中 GM-CSF, IP-10 は、呼吸機能と相関がなかった。Eotaxin は好酸球特異的なケモカインであるが、今回の検討により呼吸凝縮液中の Eotaxin は喘息病態のマーカーとなる可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

気管支喘息の有病率は、近年増加の一途を辿っている。その病態は気道の慢性炎症であり、炎症の程度が重症度を規定すると考えられている。気道の慢性炎症はやがて非可逆的な変化であるリモデリングに至り、喘息難治化の有力な原因と考えられている。その一連の過程には様々なサイトカイン/ケモカインが関与し、それぞれが適材適所で役割を遂行することで、複雑な喘息の病態を形成している。

気道病態を評価する手段として現在まで頻用されているものには、喀痰採取や気管支鏡下での肺生検・気管支肺胞洗浄などがあげられる。しかし気管支鏡は患者にとって侵襲的検査であり、喘息発作中の患者には施行困難である。逆に喀痰は非侵襲的で発作時には採取が比較的容易であるものの、むしろ安定期には喀痰が少なくなりその採取

が困難になるという難点もある。近年こういった問題点を打開し新たに気道炎症を評価する方法として、呼吸凝縮液採取が注目されている。

本研究では喘息患者の気道炎症・リモデリング病態を評価する目的で、呼吸凝縮液中サイトカイン/ケモカインの測定を行った。

#### B. 研究方法

##### (1) 対象

健常人あるいは外来通院中の気管支喘息患者から、同意を得て呼吸凝縮液の採取を行った。症例の内訳は、健常人 16 例、喘息患者 48 例であった。

##### (2) 呼吸凝縮液採取・測定

呼吸凝縮液の採取には、ECoScreen (JAEGER 社、ドイ

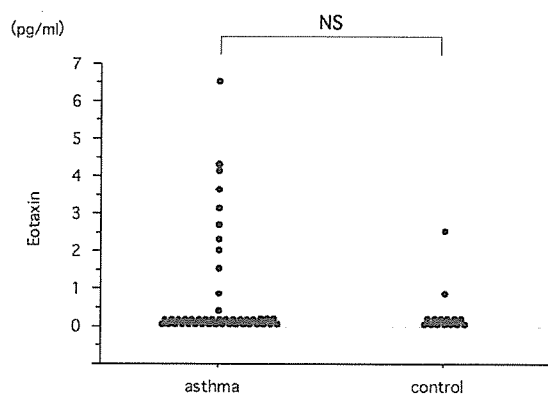
ツ)を使用した。呼気凝縮液の採取は 15 分行い、得られた凝縮液はサンプル測定時まで $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した。採取した検体を凍結乾燥し、PBS で 10 倍濃縮したものを測定に使用した。濃縮したサンプル中のサイトカイン/ケモカインの測定には Luminex 200 (日立ソフト) を用い、測定キットとして Bio-Plex Cytokine Assay (Bio-Rad) を使用した。

### C. 研究結果

#### (1) 呼気凝集液中のサイトカイン/ケモカイン濃度

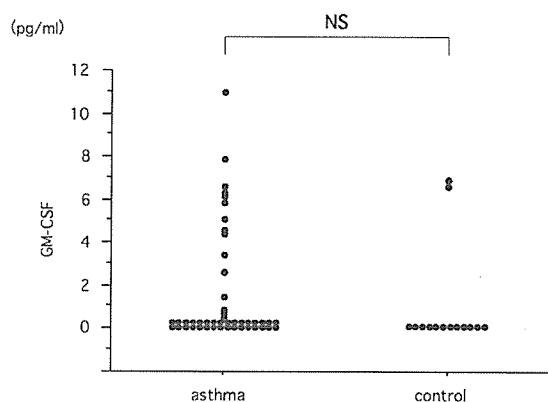
気道炎症を評価するサイトカイン・ケモカインの項目として、IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-15, IL-17, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , Eotaxin, RANTES, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IP-10 を選択した。呼気凝縮液中 Eotaxin の濃度は、健常人では  $0.27 \pm 0.68$  pg/ml であったのに対し、喘息患者で  $0.83 \pm 1.61$  pg/ml と高い傾向を認めたものの、検出限界以下の例が多く有意ではなかった(図 1)。

図 1 呼気凝縮液中 Eotaxin 濃度



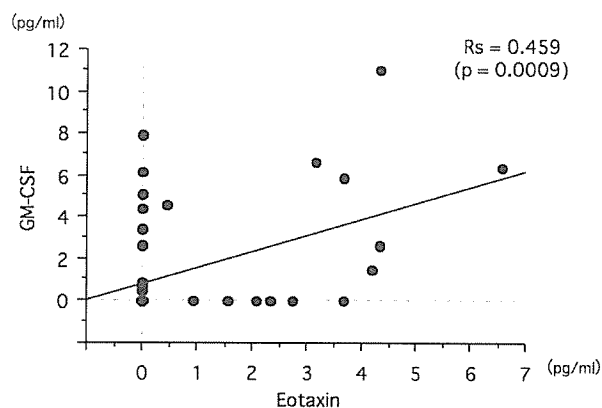
呼気凝縮液中 GM-CSF の濃度に関しても検出限界以下の例が多く、喘息患者で  $1.47 \pm 2.67$  pg/ml、健常人では  $1.71 \pm 3.05$  pg/ml と、有意な差を認めなかった。(図 2)。

図 2 呼気凝縮液中 GM-CSF 濃度



そこで喘息患者の呼気凝縮液中 GM-CSF と Eotaxin との関係を検討したところ、図 3 に示すような有意な相関を認めた(相関係数:0.459,  $p = 0.0009$ )

図 3 呼気凝縮液中の Eotaxin と GM-CSF の相関



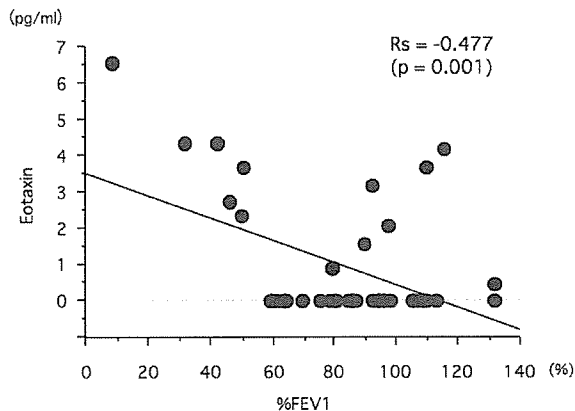
IP-10 は喘息患者・健常人を問わずほぼ全例において検出可能であったが、両者の間で差を認めなかった。その他 IL-8 と MIP-1 $\beta$  が喘息患者 1-2 例においてのみ検出可能であった以外、測定を試みたその他の項目はほぼ全例において測定限界以下の濃度であった。

#### (2) 呼気凝縮液中サイトカイン/ケモカイン濃度と呼吸機能

次に呼気凝縮液中パラメーターと呼吸機能との関係を検討した。図 4 に示すように、呼気凝縮液中 Eotaxin 濃度

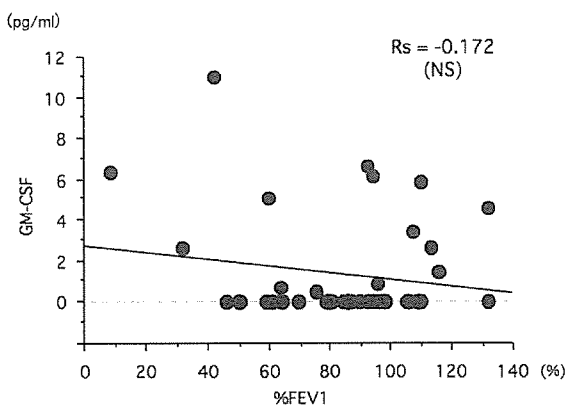
と %FEV<sub>1</sub> は有意な相関を認めた(相関係数:-0.477, p = 0.001)。

図 4 呼気凝縮液中 Eotaxin 濃度と %FEV<sub>1</sub>



喘息患者呼気凝縮液中 GM-CSF と %FEV<sub>1</sub> との間には、有意な相関を認めなかった(図 5)。

図 5 呼気凝縮液中 GM-CSF 濃度と %FEV<sub>1</sub>



#### D. 考察

成人喘息患者呼気凝縮液中の Eotaxin に関しては、Ko らが報告している(Clin Exp Allergy 36; 44-51, 2006)。それによると、吸入ステロイド依存性喘息患者の凝縮液中 Eotaxin 濃度は平均 18.5 pg/ml であった。また凝縮液中 Eotaxin 濃度と %FEV<sub>1</sub> との間には有意な負の相関が見られたとしており、今回の我々の検討結果と合致するものである。

Eotaxin は好酸球遊走性のケモカインであるが、好酸球は気道リモデリングにも関与するとされている。呼気凝縮液中 Eotaxin 濃度と呼吸機能との間に見られることは、喘息病態における気道炎症・リモデリングに Eotaxin が重要な役割を担うことを示唆する。一方呼気凝縮液中の GM-CSF に関しては、現在までのところ喘息患者で有意に高いという報告はない。

#### E. 結論

今回の検討により呼気凝縮液中の Eotaxin は喘息病態のマーカーとなりうる可能性が示唆された。今後同一患者でのモニタリング項目として有用かどうかなど、更なる検討を行う必要があると思われる。

#### 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

吉原久直、足立哲也、矢野智湖、山村浩一、植木重治、田下浩之、新井秀宜、大林王司、中島幹夫、長瀬洋之、大田健。気管支喘息患者呼気凝縮液中における増殖因子の測定。第46回日本呼吸器学会総会。平成18年6月。東京都

Yoshihara H, Adachi T, Nagase H, Yamashita N, Ohta K. Role of insulin-like growth factor (IGF-I) in human and experimental asthma. 2007 AAAAI Annual Meeting. San Diego



## 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

### －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** 臓器としての呼吸器は絶えず外気と接触していることが特徴であり、気道を経路として、アレルギーに曝されるリスクが高い。この臓器的特徴から、呼吸器におけるアレルギー性疾患の占める位置は極めて重要である。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。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 ファミリーである Adrenomedullin (AM) や LTB<sub>4</sub> 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、LTB<sub>4</sub> は強く関与するものの、AM 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。近年、遺伝子改変マウスが次々と開発され、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と考えられる。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・蛋白系の病態生理学的意義・重要性が解明され、気管支喘息治療への貢献が期待される。

#### A. 研究目的

臓器としての呼吸器は絶えず外気と接触していることが特徴であり、気道を経路として、アレルギーに曝されるリスクが高い。この臓器的特徴から、呼吸器におけるアレルギー性疾患の占める位置は極めて重要である。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。

#### B. 研究方法

遺伝子改変マウスとして、

- 1) AM 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
- 3) CysLT2 受容体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) AM ノックアウトマウスの検討: MCh 気道反応性において、感作された AM ノックアウトマウス群は、野生型群と比べて有意に肺抵抗が上昇しており、MCh 気道過敏性が示唆された。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。また両群間で BALF IgE 濃度の有意差は認めず、抗原感作レベルも同等であることが示唆された。

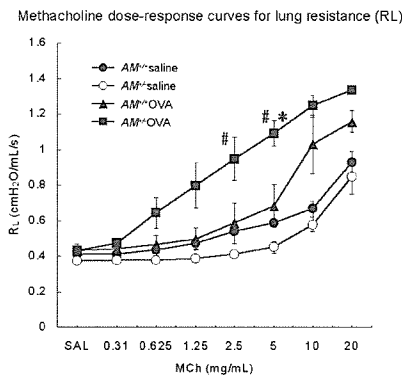


図1 Methacholine (MCh) 投与における肺抵抗の反応  
MCh 吸入投与において、ovalbumin (OA) 感作・AM ノックアウトマウス群は、肺抵抗 ( $R_L$ )が他群よりも有意に高い。  
# $P < 0.05$  vs the other groups.

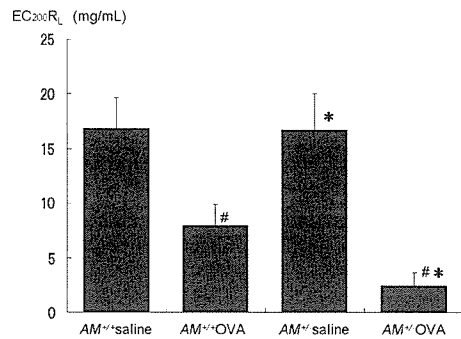


図2 Methacholine (MCh) 気道反応性。  
OA 感作・AM ノックアウトマウス群は、気道反応性が他群よりも有意に高い。  
# $P < 0.05$  vs saline groups.

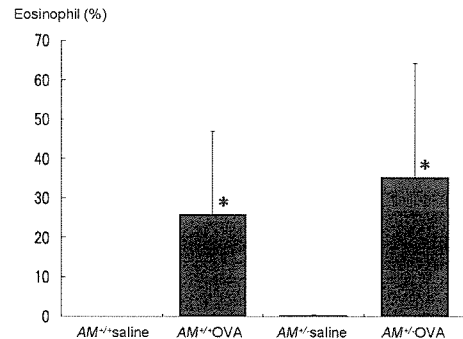


図3 OA 感作による肺内好酸球浸潤。BALF 好酸球は、OA 感作群で、saline 群に比べ有意に上昇していた。一方、野生型・ノックアウトマウス群の両群間に有意差は認められなかった。  
\* $P < 0.05$  vs the saline groups.

2) BLT-1 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)濃度やリガンドとしてのLTB<sub>4</sub>濃度も感作ノックアウトマウス群では感作野生型に比べ著明に低下していた。一方、PGE<sub>2</sub>濃度は両群間に有意差が認められなかった。

3)CysLT2ノックアウトマウスは胎生致死が認められず、ホモ接合体の生存個体が得られた。現在、バッククロスによる遺伝的純化が進行中である。

#### D. 考察

気管支喘息は、気道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、AMやLTB<sub>4</sub>はいずれも気道反応性に関与することが示された。特に、内因性AMの減少が、気道過敏性の亢進に関与することが明らかにされ、AMの気道防御的な生理機能が示唆される。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、AM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、気道過敏性・末梢気道炎症に関与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。またCysLT2受容体は、肺・気管支に多量に存在することが示唆されているが、その機能はほとんど解明がなされていない。今回ホモ接合体の生存個体が得られたことにより、気道過敏性・末梢気道炎症への関与を検証することが可能となった。

#### 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・末梢気道炎症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。気道過敏性・末梢気道炎症発症機序の解明に向けては、分子生物学・発生工学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有用と思われる。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). Yamaguchi Y, Nagase T, Tomita T, Nakamura K, Fukuhara S, Amano T, Yamamoto H, Ide Y, Suzuki M, Teramoto S, Asano T, Kangawa K, Nakagata N, Ouchi Y, Kurihara H. Beta-defensin overexpression induces progressive muscle degeneration in mice. **Am J Physiol Cell Physiol** (in press). (On-line, 2007 Jan 10; Epub ahead of print)

##### 2.学会発表

- 1).炎症性呼吸器疾患とアラキドン酸カスケード：第46回日本呼吸器学会総会（発表者：長瀬隆英、教育講演）、2006.
- 2).脂質性メディエーター関連分子：第46回日本呼吸器学会総会（発表者：長瀬隆英、ワークショップ）、2006.
- 3).末梢気道炎症の評価法：第56回日本アレルギー学会総会（発表者：長瀬隆英、教育セミナー）、2006.

#### C. 知的財産権の出願・登録状況

（出願準備中 1件）

発明者：栗原裕基、大内尉義、長瀬隆英、山口泰弘  
発明の名称：筋ジストロフィー症の病態モデル哺乳動物、及びその製造方法

IV. 研究報告会（平成19年1月30日）  
発表資料

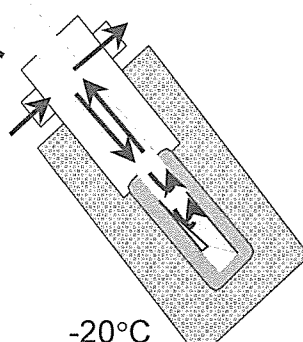
## 呼気凝縮液を用いた気管支喘息の気道炎症評価法の 確立と臨床応用に関する研究

和歌山県立医科大学内科学第三講座 一ノ瀬正和  
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 秋山 一男  
帝京大学医学部内科学講座 大田 健  
東京大学医学部呼吸器内科 長瀬 隆英

### 呼気凝縮液採取機器（据え置き型）



- 気道粘膜の液体成分のエロゾル化（気道内の乱流による）
- エロゾルの呼気の気流による排出
- 呼気の急速冷却による再液体化



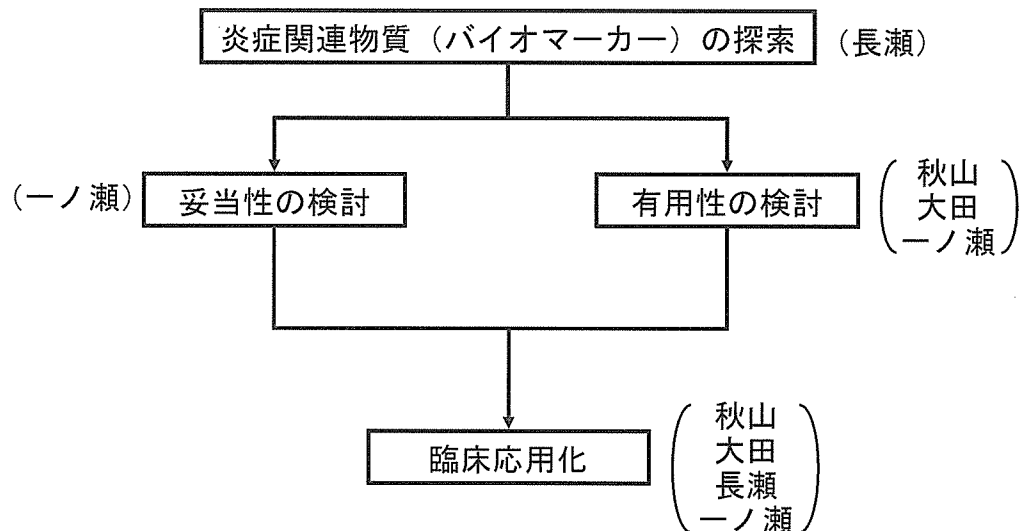
- 10 - 20分の安静換気
- 3 - 4 mlの呼気凝縮液

## 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

### 目的

1. 呼気凝縮液解析の妥当性を検討する。
2. 呼気凝縮液中の評価分子と生理学的パラメータの関連性を検討し、臨床における有用性を検討する。
3. 呼気凝縮液中の評価分子の定量化を行い臨床応用する。

### 研究班の役割分担



## 前年度（1年目）の研究における主な成果

### 1. 妥当性

呼気凝縮液検査の再現性、安全性の証明。

### 2. 有用性

- 喘息気道における11の分子（Cys LTS, IL-4, IL-8, IL-17, TNF  $\alpha$ , IP-10, MIP-1  $\alpha$ , MIP-1  $\beta$ , RANTES, TGF- $\beta$  1, IGF-1）の産生増加。
- RANTES産生増加と閉塞性障害の程度との相関。
- TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 増加と気道過敏性・気道径の変動性との相関。
- Cys LTs増加と喘息重症度との相関。

## 当該年度の各班の検討課題

### 1. 妥当性

検体への唾液混入の可能性の検討 （一ノ瀬班）

### 2. 有用性

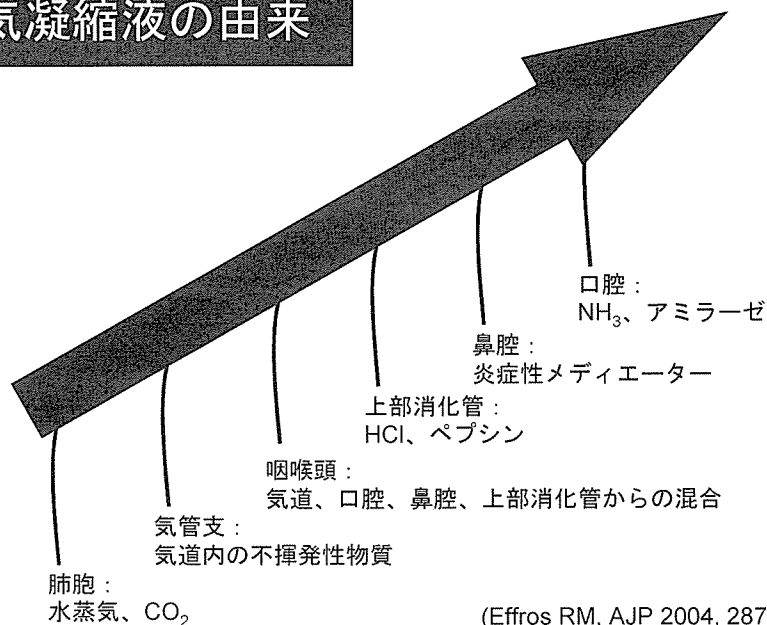
評価分子の検索 （長瀬班、秋山班、大田班）

ステロイド治療との関連性 （一ノ瀬班）

### 3. 臨床応用

評価分子の定量測定 （大田班、一ノ瀬班）

## 呼気凝縮液の由来



(Effros RM, AJP 2004, 287, L1073-1080)

## 呼気凝縮液と唾液のサイトカイン発現の比較

### 患者背景

症例数	10
年齢 (歳)	44.6±5.4
性別 (女性 / 男性)	5 / 5
FVC (L)	3.35±0.16
FEV <sub>1</sub> (L)	2.48±0.18
FEV <sub>1</sub> /FVC (%)	73.9±3.6
FEV <sub>1</sub> %predicted (%)	84.5±6.5

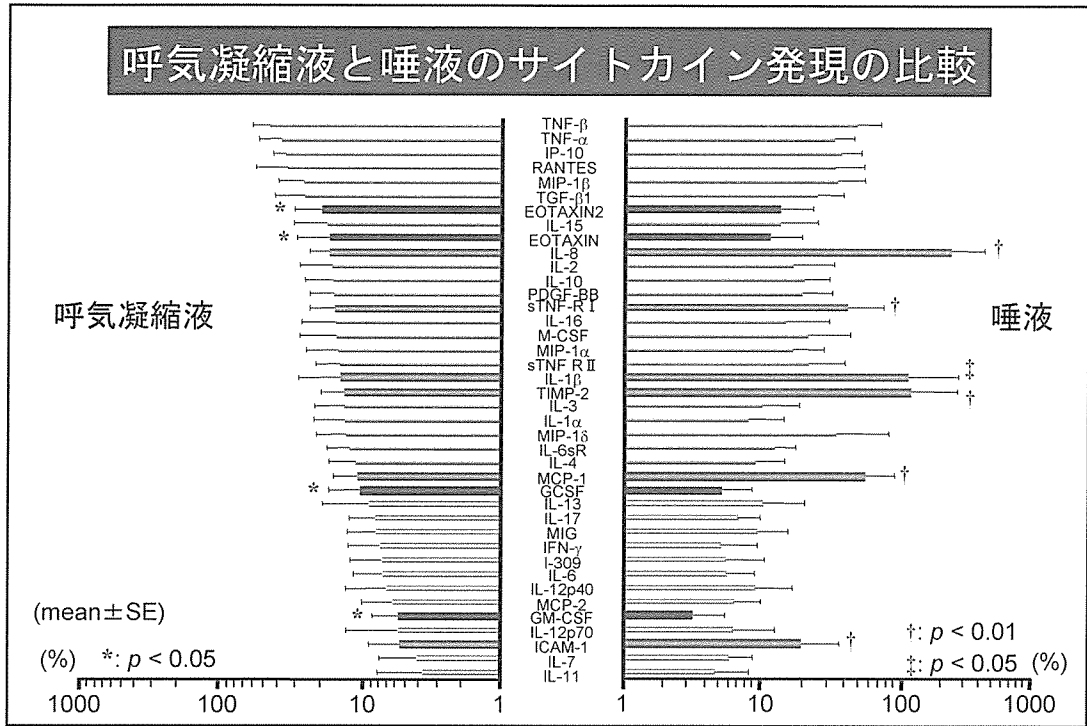
mean±SE

FVC: forced vital capacity

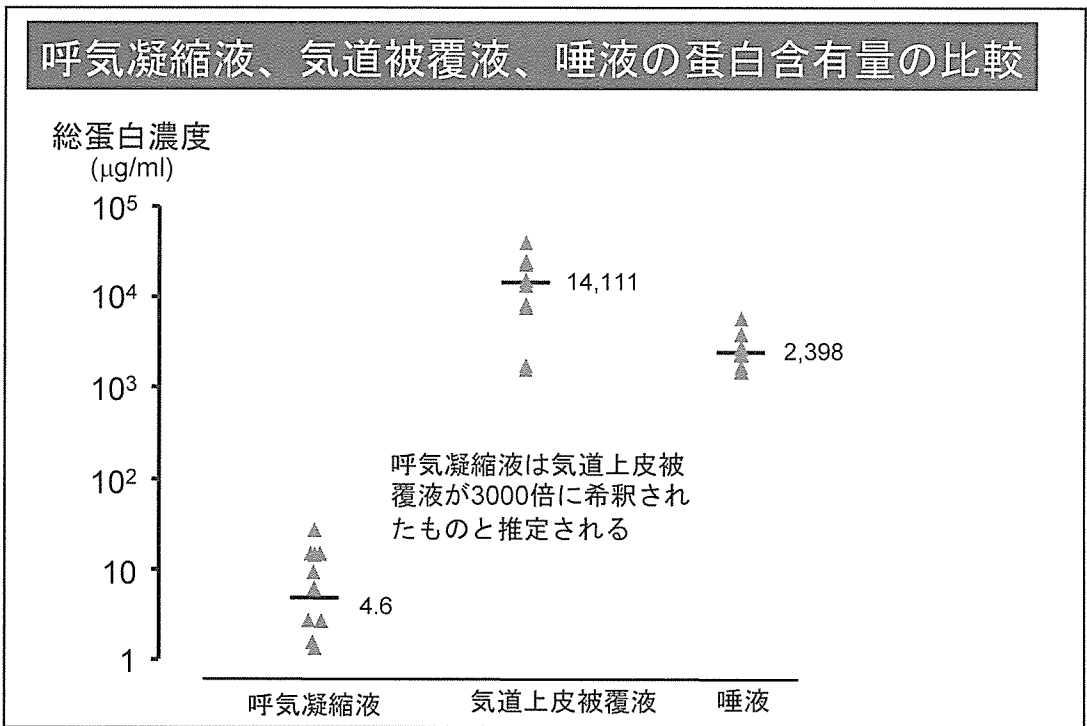
FEV<sub>1</sub>: forced expiratory volume in one second



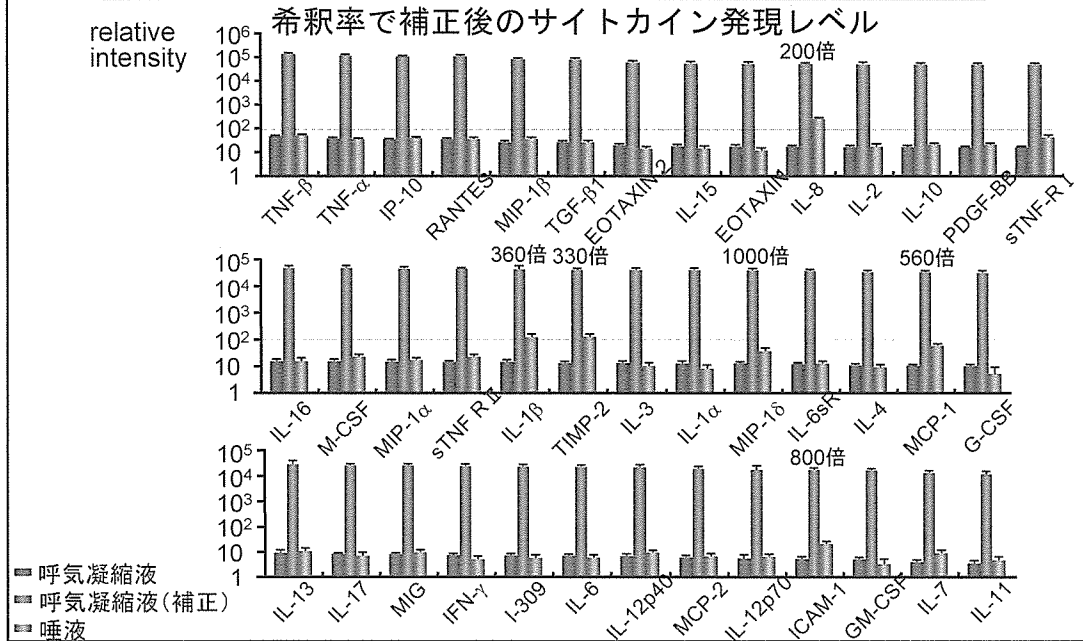
## 呼気凝縮液と唾液のサイトカイン発現の比較



## 呼気凝縮液、気道被覆液、唾液の蛋白含有量の比較



## 呼気凝縮液と唾液のサイトカイン発現の比較



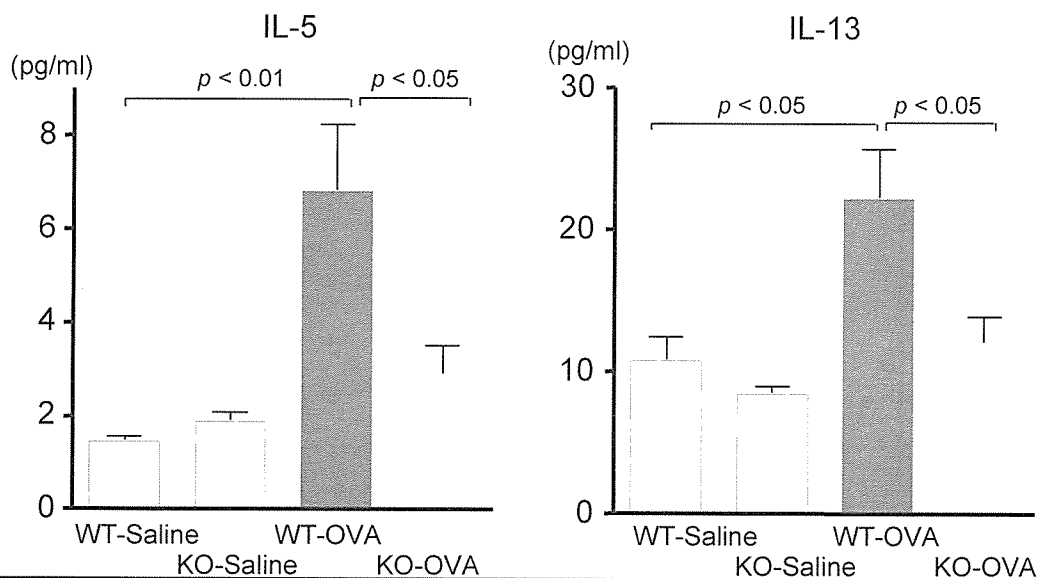
### 1. 妥当性に関する研究の成果

- Human cytokine array kitを用いて測定した呼気凝縮液中の炎症物質の発現プロファイルは、唾液中の炎症物質発現プロファイルとまったく異なっていた。
- 含有蛋白濃度で補正した炎症物質の発現レベルは、すべての測定分子において、唾液に比べ呼気凝縮液中で明らかに高値を示していた。
- よって呼気凝縮液への唾液成分の混入は無視しうる。

## 当該年度の各班の検討課題

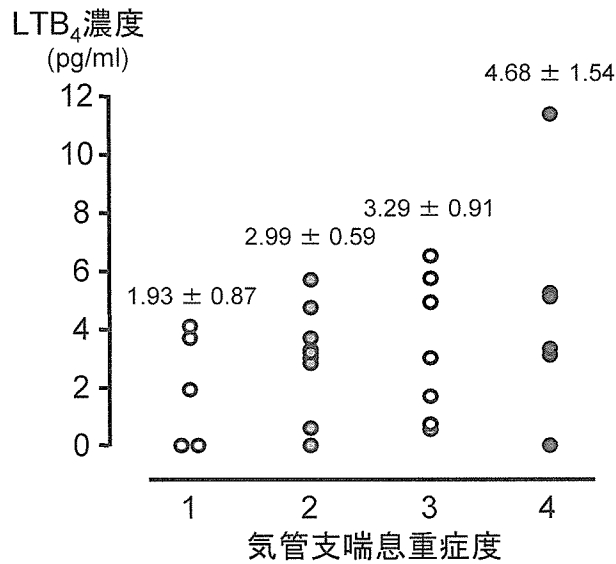
1. 妥当性  
検体への唾液混入の可能性の検討 (一ノ瀬班)
2. 有用性  
評価分子の検索 (長瀬班、秋山班、大田班)  
ステロイド治療との関連性 (一ノ瀬班)
3. 臨床応用  
評価分子の定量測定 (大田班、一ノ瀬班)

## LTB<sub>4</sub>受容体欠損によるアレルギー反応後のBALF中サイトカインの減少 (長瀬)



## 呼気凝縮液中LTB<sub>4</sub>濃度と気管支喘息重症度との関連

(秋山)



## 呼気凝縮液中LTB<sub>4</sub>濃度と呼気NO濃度、尿中LTBG濃度との関連

(秋山)

