

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 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 一ノ瀬正和

平成 20 (2008) 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. ステロイド反応性の評価およびサイトカイン定量化に関する検討 一ノ瀬 正和	7
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. 気管支喘息患者呼気中の増殖因子 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	22
IV. 研究報告会（平成 20 年 1 月 29 日）発表資料	25
V. 研究成果の刊行に関する一覧表	41
VI. 研究成果の刊行物	43

I . 研究班名簿

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

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	〒173-8605 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	准教授	〒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
	杉浦 久敏	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
	平野 綱彦	和歌山県立医科大学 内科学第三講座	助教	〒641-8509 和歌山県和歌山市紀三井寺 811-1
	小荒井 晃	和歌山県立医科大学 内科学第三講座	助教	〒641-8509 和歌山県和歌山市紀三井寺 811-1
	市川 朋宏	和歌山県立医科大学 内科学第三講座	大学院生	〒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
	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
	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	治療管理室 長	〒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
	関谷潔史	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
	福富和馬	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	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	〒173-8605 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	講師	〒173-8605 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

気道炎症は気管支喘息の最も重要な病態で主たる治療標的であり、喘息管理の向上のためには非侵襲的かつ客観的な気道炎症評価法を確立する必要がある。これまでの研究で、呼気凝縮液分析は安全かつ妥当な気道炎症評価法であることを明らかにした。また呼気凝縮液中の評価分子と生理学的パラメータの関連を検討し、喘息病態の評価における有用性を示した。平成 19年度の研究では、呼気凝縮液を用いた気道炎症評価法の臨床応用に向け、1) ステロイド治療による炎症物質発現の変化と喘息病態との関連、2)呼気凝縮液中の評価分子の定量化、に関する検討を行った。呼気凝縮液分析で喘息気道においてステロイドにより抑制できる分子と抵抗性を示す分子とを弁別することが可能であり、治療によるIL-4とRANTES発現の変化は気流制限および気道反応性の変化と相関することを明らかにした。呼気凝縮液を用いIP-10、MCP-1、MIG、IL-8、RANTES、CysLTC₄/D₄/E₄、LTB₄、IGF-1、FGF、PDGF、VEGFの11種の分子が定量可能であり、呼気凝縮液RANTES、PDGF、VEGF濃度は気流制限の程度と相関を示した。またLTB₄濃度は軽症喘息と比べ重症喘息において高値であり、喀痰中にて好中球が多い症例ほど呼気中LTB₄濃度が高値となる傾向を示した。呼気凝縮液検査は安全かつ妥当な気道炎症評価法であり、喘息病態の評価における臨床的有用性が明らかにされた。

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

であり気道炎症の簡便な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あること、従来の気道炎症評価法との比較検討といった妥当性の評価が十分になされていない、などの課題がある。さらに気道過敏性やピークフローの日内・週内変動といった従来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。

我々は、平成 17年度から 18 年度における検討で、1) 気管支喘息患者では、呼気凝縮液中の IL-4、IL-8、IL-17、TNF- α 、RANTES、IP-10、TGF- β 、MIP-1 α 、MIP-1 β の発現が健常人と比較して有意に亢進していること、2) このうち RANTES の発現レベルが気流制限の程度と、TNF- α や TGF- β の発現レベルが気道過敏性やピークフローの変動性の程度と関連すること、3) 呼気凝縮液中 Cysteinyll

A. 研究目的

気道炎症の簡便な評価法の確立とその臨床応用は気管支喘息管理の向上に不可欠である。呼気凝縮液は非侵襲で繰り返し採取が可能なことから、日常臨床にも応用可能

Leukotriene (CysLTs) 濃度は喘息の重症度と関連すること、4) 呼気凝縮液中の IGF-1 が検出可能で、喘息患者では健康人に比べ有意に高値であること、5) 遺伝子改変マウスによる検討で、CGRP や LTB_4 はいずれも気道過敏性に関与すること、などを明らかにした。さらに平成18年度の検討で、1) 唾液由来の成分が呼気凝縮液分析に及ぼす影響は極めて小さいこと、2) 呼気凝縮液の Eotaxin 濃度は、閉塞性障害の程度と関連すること、3) 呼気凝縮液中の CysLTs 濃度は喘息増悪の予測因子となる可能性があること、4) Adrenomedullin (AM) や LTB_4 はいずれも気道反応性に関与し、とくに内因性の AM がより強く気道過敏性亢進に関与すること、などを明らかにした。

これらの結果をふまえて、平成19年度では、①呼気凝縮液の有用性の評価のため、検体中の炎症関連物質のステロイド反応性と喘息病態との関連について検討を行うこと(一ノ瀬班)、②臨床応用に向け、定量測定が可能な呼気凝縮液中のサイトカイン、ケモカイン、成長因子の探索を行なうこと(一ノ瀬班、大田班)、③唾液混入の影響を受ける可能性が報告されている呼気凝縮液中 LTB_4 濃度の測定方法について再検討すること(秋山班)、④定量評価が可能と評価された炎症関連物質と喘息の病態との関連について検討を行うこと(一ノ瀬班、秋山班、大田班)、④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を行うこと(長瀬班)、を目的とした。

B. 研究方法

1) 呼気凝縮液中炎症物質に対するステロイドの効果と喘息病態との関連についての検討(一ノ瀬班)

8週間の吸入ステロイド療法後に呼気凝縮液を採取し、Cytokine antibody array 法を用いて炎症関連物質の測定を行い、ステロイド治療による呼気凝縮液中の炎症物質の発現の変化について検討するとともに、閉塞性障害や気道過敏性、ピークフロー変動性の改善の程度との関連につい

て検討した。気道過敏性検査はメサコリンの吸入刺激に対する気道の反応性で測定した。

2) 呼気凝縮液で定量可能なサイトカイン、ケモカイン、成長因子の探索(一ノ瀬班、大田班)

呼気凝縮液中のサイトカイン、ケモカインは Cytometric beads array 法を用い IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIG, IL-8, RANTES の11種について定量測定を行なった。成長因子は呼気凝縮液を凍結乾燥法により10倍濃縮した後、Bio-Plex Cytokine Assay 法を用い、FGFbasic, PDGF-BB, VEGF を定量した。

3) 呼気凝縮液 LTB_4 濃度の測定法に関する検討(秋山班)

呼気凝縮液をカラム法のみで濃縮したものとカラム法の濃縮と HPLC による精製を組み合わせたものに分け、 LTB_4 濃度を ELISA 法で測定した。また同時に LTB_4 の代謝産物である $LTBG$ を尿中で測定した。

4) 定量可能な評価分子と気管支喘息の病態との関連についての検討(一ノ瀬班、秋山班、大田班)

上記2)および3)の検討で検出された定量可能な炎症関連物質と、気管支喘息の重症度や喀痰中好酸球数・好中球数、呼気 NO 濃度、気道過敏性、閉塞性障害の程度との関連性について検討した。

5) 遺伝子操作動物モデルを用いた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)

遺伝子ノックアウトマウスとして、1) AM ノックアウトマウス、2) CysLT2 受容体ノックアウトマウスを作成した。実験には、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。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、気道反応性試験および気管支肺胞洗浄液(BALF)採取を施行した。

(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) 呼気凝縮液中炎症物質に対するステロイドの効果と喘息病態との関連についての検討(一ノ瀬班)

喘息患者の呼気凝縮液において発現が亢進していた炎症性メディエーターの中で、IL-4, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8 および IL-17 はステロイド治療により有意に発現が抑制されたが、TNF- α , IP-10 および TGF- β は治療に対し抵抗性を示した。治療に反応した分子の中で、ステロイドによるIL-4, RANTESの発現レベルの変化と気流制限および気道反応性の変化との間に相関が認められた。

2) 呼気凝縮液で定量可能なサイトカイン、ケモカイン、成長因子の探索(一ノ瀬班、大田班)

検討を行なった11種のサイトカイン、ケモカインの中で、IP-10, MCP-1, MIG, IL-8, RANTESの5つの分子が定量測定可能であった。また成長因子ではFGF, PDGF-BB, VEGFが評価可能な分子であることが明らかとなった。

3) 呼気凝縮液 LTB₄ 濃度の測定法に関する検討(秋山班)

呼気凝縮液中 LTB₄ の測定法として、HPLCによる精製を行うものを行わないもので測定したところ、HPLC精製により LTB₄ 濃度は約 1/20 の濃度になると考えられ、LTB₄ 様物質の混入を示唆した。また呼気凝縮液中の、LTB₄ 濃度と尿中 LTBG 濃度との間には相関を認めなかった。

4) 定量可能な評価分子と気管支喘息の病態との関連についての検討(一ノ瀬班、秋山班、大田班)

呼気凝縮液中の RANTES, PDGF-BB および VEGF 濃度と閉塞性障害の指標である%FEV1(予測値に対する実測の1秒量の割合)との間には、有意な負の相関が認められた。また呼気凝縮液中の LTB₄ 濃度と喘息重症度の関連において、比較的軽症(Step1 または 2)と比較的重症(Step3 または 4)では、有意に重症群で高値であった。また、喀痰中の

好酸球、好中球との関連では、好中球が多い症例ほど呼気中 LTB₄ が高値になる傾向を認めた。

5) 遺伝子操作動物モデルを用いた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)

AM ノックアウトマウスの検討においてホモ接合体では胎生致死が認められたため、ヘテロ接合体を AM ノックアウトマウスとして用いた。メサコリン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呼吸抵抗が上昇しており、メサコリン気道過敏性が示唆された。BALF 中の細胞分画解析において、感作により著明な好酸球増多が認められたが、野生型マウスとの比較では有意差を認めなかった。また肺組織標本をモルフォメトリーにより解析したところ、AM ノックアウトマウス感作群では有意に気管支平滑筋層が増大していることが認められた。

D. 考察

今回の検討で、ステロイド治療による喘息気道の炎症物質発現の変化は呼気凝縮液を用い評価でき、ステロイド治療に反応する分子と抵抗を示す分子を弁別することが可能であることが明らかにされた。ステロイドに反応する分子の中で、治療による発現レベルの変化と呼吸生理パラメーターの変化との間に相関が認められた IL-4 および RANTES は喘息の気流制限および気道過敏性亢進に重要な役割を果たす分子と考えられ、今後、喘息治療効果のモニタリングに応用できる可能性が示された。一方、治療に抵抗性を示した TNF- α , IP-10 および TGF- β については、ステロイド抵抗性喘息の病態に関与している可能性が示唆された。

呼気凝縮液中の種々の炎症物質の中で、サイトカイン、ケモカインとしては、IP-10, MCP-1, MIG, IL-8, RANTES が、成長因子としては FGF basic, PDGF-BB, VEGF が定量可能であることが示された。また呼気凝縮液 LTB₄ も定量評価可能であり、その測定感度は HPLC 精製を行なうことで向上することが明らかとなった。

特許取得、実用新案登録、その他ともなし。

呼気凝縮液で定量可能な炎症物質と喘息病態の関連の検討では、呼気凝縮液中の RANTES, PDGF-BB, VEGF 濃度と閉塞性障害の程度との間に有意な相関を認め、呼気中のこれらの分子は喘息病態のマーカーとなる可能性が示された。さらに呼気凝縮液中の LTB_4 濃度は喘息が重症化するほど高くなる傾向があり、喀痰細胞との比較検討では好中球増多と関連したことから、 LTB_4 は喘息重症化に繋がる好中球性炎症と関連すると考えられた。

遺伝子改変マウスを用いた検討では、AM が気道反応性および気管支平滑筋形態に関与することが示された。特に、内因性 AM の減少が、気道過敏性亢進および気管支平滑筋肥厚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た。

E. 結論

呼気凝縮液分析は安全でかつ妥当な気道炎症評価法である。呼気凝縮液中の種々のサイトカイン・ケモカイン・成長因子・脂質メディエーターが定量可能で、喘息病態の評価における有用性が明らかにされた。これらの呼気凝縮液を用いて定量可能な評価分子は、気管支喘息のモニタリングや病態解明におけるマーカーとして有望である。定量可能な評価分子が同定されたことから、今後は一般臨床応用に向けて呼気凝縮液を用いた炎症モニタリングシステムを確立し、喘息治療における気道炎症の管理目標を明確化していく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

各研究報告書に個々に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

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
—ステロイド反応性の評価およびサイトカイン定量化に関する検討—

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（准教授） 松永和人（講師） 杉浦久敏（講師） 平野綱彦（助教）

小荒井晃（助教） 市川朋宏（大学院生）

（和歌山県立医科大学内科学第三講座）

研究要旨

気道炎症に関与するメディエーターの簡便な評価法の確立とその臨床応用は、喘息管理の向上に不可欠である。これまでの研究で、呼気凝縮液分析は安全かつ妥当な気道炎症の評価法であることを明らかにした。また健常者に比べ喘息患者の気道で発現が亢進している炎症性メディエーターを同定し、RANTES 発現レベルと気流制限の程度、TNF- α 、TGF- β 発現レベルと気道過敏性の程度が相関することを示した。平成 19年度の研究では、呼気凝縮液を用いた気道炎症評価法の臨床応用に向けて、1) ステロイド治療による炎症関連物質発現の変化と呼吸生理パラメーターの変化との関連、2)呼気凝縮液中のサイトカイン・ケモカインの定量測定、について検討を行った。ステロイド治療により、呼気凝縮液のIL-4、IL-8、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、IL-17は有意に発現が抑制された。特にIL-4、RANTES発現レベルの変化と気流制限および気道反応性の変化との間には有意な相関が認められ、治療効果の判定に有望な指標と考えられた。一方、TNF- α 、IP-10、TGF- β はステロイド治療に対し抵抗性を示し、難治性喘息の予測に応用できる可能性が示された。定量可能な評価分子の検索においては、11種のサイトカイン・ケモカインのうち、IP-10、MCP-1、MIG、RANTES、IL-8が測定可能であり、呼気凝縮液中RANTES濃度は気流制限の程度と負の相関を示した。これらの定量可能な分子は、今後の臨床応用に向けて喘息のモニタリングや病態解明のマーカーとして有望な候補となると考えられた。

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、いずれも侵襲性が高く、経時的な評価は困難であった。また、誘発喀痰を用いた評価

も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17年度から18年度に行った本研究では、呼気凝縮液検査は安全かつ妥当な気道炎症の評価法であることを

明らかにした。さらに、健常者に比べ喘息患者の気道で発現が亢進している、呼気凝縮液中の9種の炎症性メディエーター(IL-4、IL-8、IL-17、TNF- α 、RANTES、IP-10、TGF- β 、MIP-1 α 、MIP-1 β)を同定し、RANTES発現レベルと気流制限の程度が、TNF- α 、TGF- β の発現レベルと気道反応性の程度が相関することを明らかにした。

平成19年度の研究では、呼気凝縮液を用いた気道炎症評価法の臨床応用に向けて、1)吸入ステロイド治療による炎症関連物質発現の変化と呼吸生理パラメーターの変化との関連、2)呼気凝縮液中のサイトカイン・ケモカインの定量測定し、定量可能な評価分子の発現レベルと喘息病態との関連性、についての検討を行った。

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を対象とした。吸入ステロイド治療の効果の検討では、軽症から中等症持続型の未治療気管支喘息患者18例を対象とし、8週間の吸入ステロイド投与前後に呼気凝縮液を採取し、ステロイド治療による呼気凝縮液中の炎症関連物質の発現の変化について検討するとともに、閉塞性障害や気道過敏性、ピークフロー変動性の改善の程度との関連について検討した。また定量測定が可能な評価分子の検索に関する検討では、24例の気管支喘息患者を対象とし、11種のサイトカイン、ケモカインの呼気凝縮液中における発現を定量するとともに、閉塞性障害やピークフロー変動性の程度との関連について検討した。

2) 呼気凝縮液の採取

呼気凝縮液は据え置き型のエコスクリーン(Jaeger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により検体を採取した。

3) 呼気凝縮液中の炎症関連物質の測定

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。また定量測定の検討においては、呼気凝縮液中の炎症物質を、Cytometric beads array(Becton, Dickinson社)を用いフローサイトメーターで定量測定した。

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 6800TM, Vitarograph社)を用いて測定した。

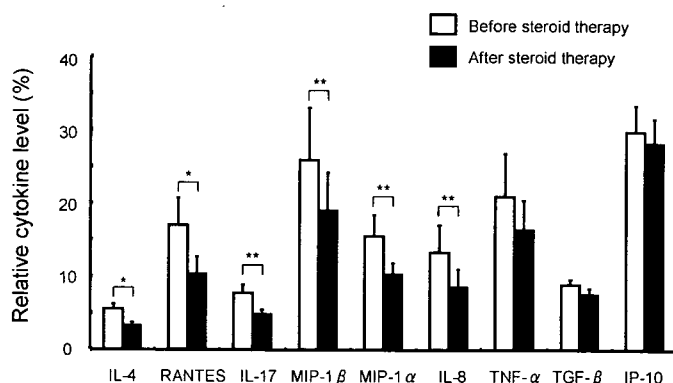
気道過敏性はメサコリン吸入刺激に対する気道反応性でアストグラフ法にて測定し、呼吸抵抗が初期抵抗の2倍になったときの累積濃度PC₂₀₀を指標とした。

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。

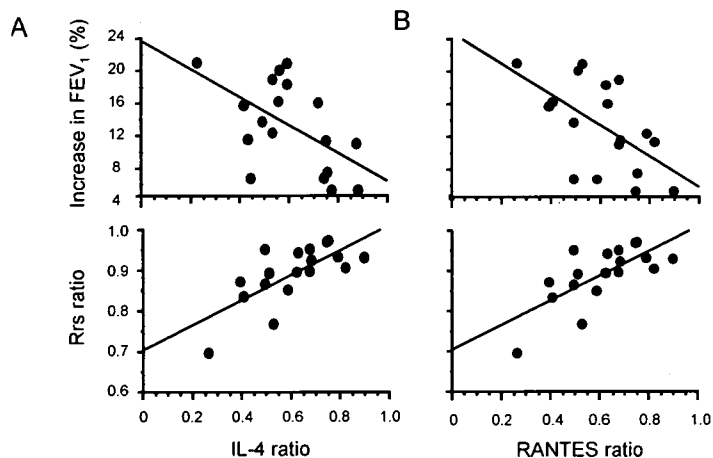
C. 結果

1) 吸入ステロイドによる炎症物質発現と肺機能の変化

喘息患者の呼気凝縮液において発現が亢進していた9種の炎症関連物質の中で、IL-4、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、IL-17、IL-8は、8週間の吸入ステロイド治療により有意に発現が抑制されたが、TNF- α 、IP-10、TGF- β はステロイド治療に対し抵抗性を示した。



ステロイド治療に反応した分子の中で、IL-4、RANTES の発現レベルの変化は、1 秒量の予測値に対する割合 (%FEV₁) や初期呼吸抵抗などの気流制限の程度の変化や、気道反応性の変化との間に有意な相関が認められた。



3) 定量可能な評価分子と肺機能の関連性

Cytometric beads array 法を用いて、IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIG, IL-8, RANTES の 11 種のサイトカイン・ケモカインの定量を行ない、IP-10, MCP-1, MIG, RANTES, IL-8 の 5 つの分子が定量測定可能であった。これらの分子のうち、呼気凝縮液中の RANTES 濃度は閉塞性障害の程度と有意に相関した。

D. 考察

今回の検討で、治療による喘息気道の炎症性メディエーター発現の変化は呼気凝縮液分析により評価することが可能であり、ステロイド治療に反応する分子と抵抗を示す分子が同定された。ステロイドに反応する分子の中で、IL-4、RANTES の発現レベルの変化は気流制限および気道反応性の変化といった呼吸生理パラメーターの変化との間に相関が認められ、これらの分子が喘息の気流制限および気道過敏性の亢進に重要な役割を果たしていると考えられた。一方、ステロイドに抵抗性を示した TNF- α , IP-10, TGF- β については、高用量の吸入ステロイドや経ロステロイドを投

与してもコントロールが不良な、難治性喘息の病態に関与している可能性が示唆された。

また呼気凝縮液中の炎症物質でいくつかの分子は定量測定可能であり、特に RANTES の発現レベルは閉塞性障害の程度と相関し、半定量法で得られた結果とも合致していた。今後、呼気凝縮液中のこれらの炎症関連物質の発現と喘息病態との関連についての解明を進め、喘息状態の評価や治療効果判定などにおける呼気凝縮液分析の有用性についてさらなる検討を行なう必要がある。また評価分子の中には安定した定量値が得られる水準に至っていないものもあり、今後の臨床応用に向けては定量測定法のさらなる改良も重要な課題である。

E. 結論

呼気凝縮液分析は安全でかつ妥当な気道炎症評価法である。呼気凝縮液中の種々のサイトカイン・ケモカイン・増殖因子が測定可能で、喘息病態の評価における有用性が明らかにされた。定量測定が可能な評価分子が同定されたことから、喘息の一般臨床への応用に向けて呼気凝縮液を用いた炎症モニタリングシステムを確立し、喘息治療における気道炎症の管理目標を明確化していく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

英文論文

- 1) Ichikawa T, Ichinose M, et al: Possible impact of salivary contamination on cytokine analysis in exhaled breath condensate. Analytical Chemistry Insights 2: 85-92, 2007

- 2) Ichinose M: Advances in Pharmacotherapy for COPD. Intern Med 46: 81-84, 2007
 - 3) Yamagata T, Ichinose M, et al: Overexpression of CD-11b and CXCR1 on Circulating Neutrophils: Its Possible Role in COPD. Chest 132: 890-899, 2007
 - 4) Tomaki M, Ichinose M, et al: Decreased expression of antioxidant enzymes and increased expression of chemokines in COPD lung. Pulm Pharm Ther 20: 596-605, 2007
 - 5) Akamatsu K, Ichinose M, et al: Improvement of pulmonary function and dyspnea by tiotropium in COPD patients using a transdermal β_2 -agonist. Pulm Pharm Ther 20: 701-707, 2007
 - 6) Ueshima K, Ichinose M, et al: The Influence of Free 3-Nitrotyrosine and Saliva on the Quantitative Analysis of Protein-Bound 3-Nitrotyrosine in Sputum. Analytical Chemistry Insights 1: 1-7, 2007
- 和文論文
- 1) 一ノ瀬正和, Martin Crane, 他: 日本における慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者の大規模電話実態調査 -Confronting COPD Japan Survey-. 日呼吸会誌 45: 927-935, 2007
 - 2) 福地義之助, 一ノ瀬正和, 西村正治, 他: COPDの増悪に対するカルボシステインの臨床効果 (PEACE Study), 呼吸 26: 955-963, 2007
 - 3) 大林浩幸, 一ノ瀬正和, 安場広高, 他: Hydrofluoroalukan-Beclomethasone Dipropionate と Fluticasone Propionate の喘息気道炎症と健康関連 QOL 改善に対する多施設無作為比較試験結果. アレルギー 56: 577-586, 2007
 - 4) 松永和人, 一ノ瀬正和, 他: 気管支喘息における呼気凝縮液中の炎症関連物質発現と呼吸生理パラメーターとの関連. 呼吸 26: 2-4, 2007
 - 5) 南方良章, 一ノ瀬正和: COPD の病態. 工藤翔二, 土屋了介, 金沢 実, 大田 健編集, Annual Review 呼吸器. 中外医学社, p87-p97, 2007
 - 6) 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(第2版)の概略. 日野原重明, 高久史麿, 黒川 清編集, PTM 治療マニュアル ガイドラインダイジェスト. NIHON MEDIS, 2007
 - 7) 大田 健, 一ノ瀬正和: 呼吸器 common disease の診療 気管支喘息のすべて. 文光堂, p1-p394, 2007
 - 8) 一ノ瀬正和: 今日における喘息の定義. 工藤翔二監修, 大田 健, 一ノ瀬正和編集, 呼吸器 common disease の診療 気管支喘息のすべて. 文光堂, p16-p19, 2007
 - 9) 一ノ瀬正和: 呼吸機能からみた特徴. 工藤翔二監修, 大田 健, 一ノ瀬正和編集, 呼吸器 common disease の診療 気管支喘息のすべて. 文光堂, p20-p23, 2007
 - 10) 一ノ瀬正和: 気道内径の調節機構. 工藤翔二監修, 大田 健, 一ノ瀬正和編集, 呼吸器 common disease の診療 気管支喘息のすべて. 文光堂, p24-p25, 2007
 - 11) 一ノ瀬正和: 喫煙と薬物反応. 工藤翔二監修, 大田 健, 一ノ瀬正和編集, 呼吸器 common disease の診療 気管支喘息のすべて. 文光堂, p60-p61, 2007
 - 12) 一ノ瀬正和: NO の病態での位置づけ. 工藤翔二監修, 大田 健, 一ノ瀬正和編集, 呼吸器 common disease の診療 気管支喘息のすべて. 文光堂, p152-p153, 2007
 - 13) 一ノ瀬正和: 抗コリン薬の使用意義. 工藤翔二監修, 大田 健, 一ノ瀬正和編集, 呼吸器 common disease の診療 気管支喘息のすべて. 文光堂, p274-p275, 2007

- 14) 一ノ瀬正和: 長時間作用型 β_2 刺激薬(LABA)とステロイド薬の合剤. 工藤翔二監修, 大田 健, 一ノ瀬正和編集, 呼吸器 common disease の診療 気管支喘息のすべて. 文光堂, p308-p311, 2007
- 15) 山縣俊之, 一ノ瀬正和: II. 喘息の診断の進め方, [B]診断につながる臨床検査所見, 3. 気道炎症の非侵襲的評価法をめぐる最近の動向. 工藤翔二監修, 大田 健, 一ノ瀬正和編集, 呼吸器 common disease の診療 気管支喘息のすべて. 文光堂, p148-p151, 2007
- 16) 松永和人, 一ノ瀬正和: 喘息治療の考え方 どんな薬物で治療するか? 2. 発作治療薬(リリーバー). 工藤翔二監修, 大田 健, 一ノ瀬正和編集, 呼吸器 common disease の診療 気管支喘息のすべて. 文光堂, p268-p273, 2007
- 17) 松永和人, 一ノ瀬正和: 喘息治療の考え方 発作時(急性増悪時)の治療指針 1. 発作強度と薬物療法の実際 成人の場合. 工藤翔二監修, 大田 健, 一ノ瀬正和編集, 呼吸器 common disease の診療 気管支喘息のすべて. 文光堂, p287-p291, 2007
- 18) 山縣俊之, 一ノ瀬正和: 1 章 呼吸器疾患, 気管支拡張薬. 大田 健, 奈良信雄編, 今日の診断基準. 南光堂, p19, 2007
- 19) 山縣俊之, 一ノ瀬正和: 1 章 呼吸器疾患, 嚢胞性線維症. 大田 健, 奈良信雄編, 今日の診断基準. 南光堂, p20, 2007
- 20) 山縣俊之, 一ノ瀬正和: 1 章 呼吸器疾患, Kartagener 症候群. 大田 健, 奈良信雄編, 今日の診断基準. 南光堂, p115, 2007
- 21) 山縣俊之, 一ノ瀬正和: 1 章 呼吸器疾患, immotile-cilia 症候群. 大田 健, 奈良信雄編, 今日の診断基準. 南光堂, p119, 2007
- 22) 上嶋千史, 南方良章, 一ノ瀬正和: 第 3 章 呼吸リハビリテーションに必要なアセスメント, 換気機能. 塩谷隆信編, 包括的呼吸リハビリテーション. 新興医学出版社, p153-p158, 2007
- 23) 市川朋宏, 一ノ瀬正和: 気管支拡張薬の最近の進歩. 工藤翔二, 中田絃一郎, 貫和敏博編, 呼吸器疾患最新の治療 2007-2009. 南江堂, p12-p17, 2007
- 24) 山縣俊之, 一ノ瀬正和: 慢性閉塞性肺疾患. 永井厚志, 吉澤靖之, 大田 健, 江口研二編, EBM 呼吸器疾患の治療 2008-2009. 中外医学社, p285-p291, 2007
- 25) 松永和人, 一ノ瀬正和: 高齢者における気管支喘息と COPD の臨床上の問題点・留意点. 相澤久道監修, 気管支喘息と COPD の類似点・相違点. メディカルレビュー社, p98-p108, 2007
- 26) 一ノ瀬正和: 放射線肺臓炎・放射線肺線維症. 杉本恒明, 矢崎義雄総編集, 内科学. 朝倉書店, p717-p718, 2007
- 27) 一ノ瀬正和: 薬物性肺臓炎. 杉本恒明, 矢崎義雄総編集, 内科学. 朝倉書店, p718-p720, 2007
- 28) 一ノ瀬正和: ガス・粉じんによる肺疾患. 杉本恒明, 矢崎義雄総編集, 内科学. 朝倉書店, p720-p723, 2007
- 29) 南方良章, 一ノ瀬正和: COPD. 呼吸 26: 48-53, 2007
- 30) 市川朋宏, 一ノ瀬正和: 呼気による気道炎症評価法. 呼吸器疾患 Ver.5: 134-136, 2007
- 31) 一ノ瀬正和: 慢性閉塞性肺疾患の薬物療法. 日本内科学会雑誌 96: 51-57, 2007
- 32) 一ノ瀬正和, 田村 弦: あらたな喘息診断法の可能性. 医学のあゆみ 220: 958-961, 2007
- 33) 杉浦久敏, 一ノ瀬正和: COPD の急性増悪の定義・病態・診断. 呼吸と循環 55: 381-386, 2007
- 34) 一ノ瀬正和: COPD と喘息の鑑別診断. クリニカル プラクティス 26: 495-498, 2007
- 35) 市川朋宏, 一ノ瀬正和: 誘発喀痰. 総合臨床 56:

- 1876-1881, 2007
- 36) 一ノ瀬正和: 慢性閉塞性肺疾患 (COPD). 総合臨床 56: 161-165, 2007
- 37) 一ノ瀬正和: 分子生物学時代のオランダ仮説. THE LUNG perspectives 15: 25-30, 2007
- 38) 一ノ瀬正和: ATS2007. 呼吸 26: 788-789, 2007
- 39) 足立 満, 一ノ瀬正和, 下田照文, 鈴木直仁, 永倉俊和: 喘息治療における吸入ステロイド薬の使い分け. 呼吸 26: 707-717, 2007
- 40) 松永和人, 一ノ瀬正和: 喘息コントロールのモニタリングとは? Q&A でわかるアレルギー疾患 3: 410-412, 2007
- 41) 一ノ瀬正和: 配合剤アドエア(長時間作用性 β_2 刺激薬/フルチカゾン)の可能性-喘息治療の新展開-. International Review of Asthma 9: 26-35, 2007
- 42) 一ノ瀬正和: COPD の病態. medicina 44: 1836-1839, 2007
- 43) 松永和人, 一ノ瀬正和: 気管支喘息とコリン作動性神経. アレルギー・免疫 14: 30-34, 2007
- 44) 山縣俊之, 一ノ瀬正和: ガイドラインに基づく COPD 治療. 成人病と生活習慣病 37: 1011-1016, 2007
- 45) 杉浦久敏, 一ノ瀬正和: COPDと喘息との比較 COPD と喘息はどう違うのか? Modern Physician 27: 1463-1468, 2007
- 46) 一ノ瀬正和: IgE の発見から 40 年を振り返って. IgE practice in Asthma: 20-21, 2007
- 47) 杉浦久敏, 一ノ瀬正和: 気道炎症と気道リモデリング. 喘息 20: 27-32, 2007
- 48) 杉浦久敏, 一ノ瀬正和: COPD-炎症性メディエーターの測定と気道炎症の評価-. 日胸 66: 917-923, 2007
- 49) 一ノ瀬正和: ERS2007. 呼吸 26: 1074-1076, 2007
- 50) 市川朋宏, 一ノ瀬正和: 気管支喘息と COPD-病態の類似点と相違点-. 日胸 66: S113-S120, 2007
- 51) 一ノ瀬正和: 増悪の管理. COPD FRONTIER 6: 74-78, 2007
- 52) 一ノ瀬正和: 薬物療法の新展開-生理的意義と新しい可能性-. 日本臨床 65: 689-695, 2007
2. 学会発表
国際学会
- 1) Matsunaga K, Ichikawa T, Ichinose M: Airway cytokine expression in exhaled breath condensate~Correlation with physiological properties in asthmatic patients~. Astrazeneca Emerging Leader Meeting in Respiratory Medicine 2007, 2007. 04.23, Lund, Sweden
- 2) Matsunaga K, Ichinose M, et al: Steroid responsiveness of inflammatory molecules in exhaled breath condensate: correlation with physiological properties in asthmatic patients. ATS 2007 International Conference, 2007.05.20, San Francisco, USA
- 3) Sugiura H, Ichinose M, et al: Inflammatory properties of refractory asthma: Neutrophilic inflammation and oxidative / nitrative stress. ATS 2007 International Conference, 2007.05.23, San Francisco, USA
- 国内学会
- 1) 山縣俊之, 一ノ瀬正和: COPDの診断. 第74回閉塞性肺疾患研究会, 東京, 2007.01.13
- 2) 一ノ瀬正和: COPD と喘息の鑑別診断. 第24回薬物吸入療法研究会, 東京, 2007.02.10
- 3) 一ノ瀬正和: テオフィリンの COPD・喘息治療における新しい知見. 慢性閉塞性肺疾患学術講演会, 仙台市, 2007.02.17
- 4) 一ノ瀬正和: 気管支喘息の病態と治療. 平成 19 年度

- 第1回日本内科学会生涯教育講演会 B セッション, 大阪, 2007.03.04
- 5) 松永和人、一ノ瀬正和: 呼気凝縮液による気道炎症モニタリング. 第47回日本呼吸器学会, 東京, 2007.05.10
 - 6) 杉浦久敏、一ノ瀬正和: COPD 急性増悪の病態生理. 第47回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2007.05.10
 - 7) 松永和人、一ノ瀬正和: Airway cytokine expression in exhaled breath condensate ~Correlation with physiological properties in asthmatic patients~. The 6th Asthma Forum Expert Meeting in Osaka 2007, Osaka, 2007.06.09
 - 8) 一ノ瀬正和: 気管支喘息の病態と治療. 平成19年度第2回日本内科学会生涯教育講演会 B セッション, 横浜, 2007.06.24
 - 9) 南方良章、一ノ瀬正和、他: 一般開業医におけるスパイロメリー施行の有用性の検討. 第47回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2007.05.10
 - 10) 山縣俊之、一ノ瀬正和、他: COPD 末梢血好中球のインテグリン、ケモカイン受容体発現亢進と閉塞性障害との関連. 第47回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2007.05.10
 - 11) Matsunaga K, Ichinose M, et al: English Mini-Symposium Bronchial Asthma 1. Steroid responsiveness of inflammatory molecules in exhaled breath condensate: correlation with physiological properties in asthmatic patients. The 47th Annual Meeting of The Japanese Respiratory Society, Tokyo, 2007.05.10
 - 12) 南方良章、一ノ瀬正和、他: 一般開業医におけるスパイロメリー施行の有用性の検討. 第47回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2007.05.11
 - 13) 市川朋宏、一ノ瀬正和、他: 唾液の呼気凝縮液に与える影響についての検討~サイトカインプロファイルによる比較~. 第47回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2007.05.11
 - 14) Yamagata T, Ichinose M, et al: Usefulness of aggressive spirometry in outpatients of general practice for COPD detection. The 47th Annual Meeting of The Japanese Respiratory Society, Tokyo, 2007.05.12
 - 15) 杉浦久敏、一ノ瀬正和、他: 難治性喘息における気道炎症の検討-酸化・窒素化ストレスに着目して. 第47回日本呼吸器学会総会, 東京, 2007.05.12
 - 16) 柳澤 悟、一ノ瀬正和、他: COPD 患者における末梢血好中球の Hck 発現と閉塞性障害との関連. 第47回日本呼吸器学会総会, 東京, 2007.05.12
 - 17) 山縣俊之、一ノ瀬正和、他: 呼気凝縮液を用いた解析法. 第30回日本呼吸器内視鏡学会学術集会, 東京, 2007.06.07
 - 18) 赤松啓一郎、一ノ瀬正和、他: 難治性喘息との鑑別を要した気管狭窄の二例. 第30回日本呼吸器内視鏡学会学術集会, 東京, 2007.06.07
 - 19) 松永和人、一ノ瀬正和、他: 呼気凝縮液中の炎症関連物質のステロイド反応性. 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会, 横浜, 2007.06.10
 - 20) 松永和人、一ノ瀬正和、他: 喘息患者の呼気凝縮液中における炎症関連物質のステロイド反応性と肺機能との関連. 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会, 横浜, 2007.06.10
 - 21) 松永和人、一ノ瀬正和、他: 高齢者喘息管理の実態調査. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会, 横浜, 2007.11.01
 - 22) 杉浦久敏、一ノ瀬正和、他: 難治性喘息における酸化・窒素化ストレスについて. 第57回日本アレルギー

大会秋季学術大会, 横浜, 2007.11.01

- 23) 市川朋宏、一ノ瀬正和、他: 気道リモデリングにおける酸化窒素化ストレスの影響. 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 横浜, 2007.11.01
- 24) 杉浦久敏、一ノ瀬正和、他: 気道窒素化ストレスの定量評価の試み. 第 74 回閉塞性肺疾患研究会, 東京, 2007.01.13
- 25) 杉浦久敏、一ノ瀬正和、他: 難治性喘息における気道炎症の検討-酸化・窒素化ストレスに着目して. 第 19 回気道病態シンポジウム, 東京, 2007.02.24
- 26) 市川朋宏、一ノ瀬正和、他: 呼気凝縮液分析における唾液成分分析影響に関する検討. 第 3 回呼吸器バイオマーカー研究会, 東京, 2007.03.03

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 小野恵美子 釣木澤尚実 押方智也子

谷口正実 前田裕二 大友守 関谷潔史 福富友馬 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)は疾患の重症度との関連、平成18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 B₄(LTB₄)の濃度について示した。しかしながら、ERJ2006において唾液の混入がEBC中のLTB₄濃度に影響し重症度と必ずしも関連しないことが報告され、方法論の確立が急務である。そのため、今年度はEBC中LTB₄濃度測定の実際、および確定した方法論を用いて喘息の難治化の要因である好中球性炎症との関係を検討した。EBC中LTB₄測定の方法論を再検討するため7例でHPLC精製の有無で比較測定したところ、HPLC無しで有意に高値であり、ELISAに反応するLTB₄類似物質の混入が考えられ、LTB₄測定時のEBC処理については、HPLCを加えるべきと考えられた。HPLCを加えた新しい方法論で測定したEBC中LTB₄は、重症な症例で有意に高値であった。喀痰好酸球、好中球との関連は、好酸球とは関連せず、好中球において比較的少数の群に比べ比較的多数の群において有意に高値を認めた。尿中LTBGとの比較では、相関を認めなかった。以上よりEBCは喘息の病態を判定できる検査になりうるが、今後多施設共同での検討による標準法の確立が必要と考えられる。

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(LT)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平成 18 年度は EBC 中 cysLTs 濃度高値の患者は増悪の頻度が高いこと、気管支喘息の EBC 中 Leukotriene B₄ (LTB₄) 濃度が重症例において高い傾向にあることを示した。しかしながら、Gaber らにより唾液の混入が EBC 中の LTB₄ 濃度に影響し重症度と必ずしも関連しないことが示され (ERJ 2006 28(6):1229-35)、方法論の確立が急務である。そのため、今年度は EBC 中 LTB₄ 濃度測定の実際、および確定した方法論を用いて喘息の難治化の要因である好中球性炎症との関係を検討した。

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 26 名を対象とした。まず 7 例において昨年度測定した方法と HPLC 精製を加えた方法で比較し、その後 HPLC 精製を加えた方法論で EBC 中 LTB₄ 及び尿中 LTBG について測定した。また、喀痰好酸球、好中球を 15 例で測定し比較した。

(2) 気管支喘息重症度分類

重症度分類は JGL2006 ガイドラインに準じ Step1-4 に分類した。

(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℃ 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 LTB₄ 濃度の定量

LTB₄ 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. HPLC を用いて LTB₄ を含む分画を分取
5. LTB₄ 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 [cmH₂O]、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。

(6) 尿中 LTBG 濃度の測定

EBC 採取と同時に尿を採取し 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 LTBG を含む分画を分取し、Empore C18 カラムで再度抽出。
3. LTBG 分画は β-glucuronidase で加水分解して生成した LTB₄ を HPLC で分取したのち LTB₄ ELISA kit (ともに Cayman) で測定した。測定値は creatinine の濃度で補正した。

(7) 喀痰好酸球、好中球

自然痰で採取し、Hancel 法で染色、専門の担当者が臨床情報無しで鏡検した。鏡検の結果を細胞が少ない順に 5 段階評価した。

C. 結果

EBC 中 LTB₄ 測定の方法論を再検討するため 7 例で HPLC 精製の有無で比較測定したところ、HPLC 無しで有