

意に高値であった (46.8 ± 6.8 vs 2.62 ± 0.53 , $p < 0.001$ (pg/ml, 平均 \pm SEM))。ELISA に反応する LTB_4 類似物質の混入が考えられ、HPLC を加えるべきと考えられた。しかしながら、測定値同士の相関は有意にあり ($p = 0.0257$, $r = 0.748$)、昨年度示した LTB_4 が重症例で高値になる可能性を示した結論自体は妥当性があるものと考えられた。

EBC 中 LTB_4 について HPLC を加えた新しい方法論を用いて 26 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 (STEP1 または 2 vs STEP3 または 4: 1.22 vs 2.70 , $p = 0.002$ (pg/ml, 平均))。また、自然痰を採取した 15 症例について、好酸球、好中球との関連を見たところ、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 (スコア 0 または 1 vs スコア 3-5, $p = 0.0075$)。% FEV_1 とは弱い負の相関 ($r = -0.42$, $p = 0.044$) を認めたが、eNO、尿中 $LTBG$ との比較では、相関を認めなかった。

D. 考察

EBC 中 LTB_4 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 LTB_4 類似物質の混入が考えられた。ERJ の論文では唾液の混入によるものとしているが、以前の我々の検討では唾液の混入は考えにくく、むしろ ELISA に反応しうる何らかの LTB_4 類似物質の混入を考えさせる。いずれにしろ LTB_4 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 LTB_4 は、重症な症例で高値である傾向を認めた。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。今後症例を加え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。

喀痰中好酸球、好中球との関連を見たところ、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。気道の好中球

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いる。 LTB_4 を標的とした治療薬は今のところ存在しないが、開発されればステロイドに反応しにくい重症喘息の改善に寄与する可能性があり、本検査はその Responder を抽出するのに有用な可能性がある。

E. 結論

LTB_4 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。また、その方法論において測定した結果重症例で高い傾向があり、好中球増多を伴う症例で高い傾向を示した。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

粒来崇博、三田晴久、釣木澤尚実、秋山一男他
気管支喘息患者の呼気凝縮液中 cysteinyl Leukotriene 濃度測定と重症度 アレルギー 57(2) 2008 (in press)

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 cysLTs 濃度を用いた発作リスクの予測

第 19 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2007.6 月

3. その他 (総説など)

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 cysLTs 濃度と治療経過 第 3 回バイオマーカー研究会 2007.3 月
粒来崇博 秋山一男
気管支喘息とその臨床的評価 B 気道炎症のバイオマーカー 日本胸部臨床 66 S32-37 2007

呼気凝縮液を用いた気道炎症の評価に関する研究

－気管支喘息患者呼気中の増殖因子－

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。呼気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。当研究室では以前に呼気凝縮液中の増殖因子をELISAで測定し、PDGFとVEGFは検出不能であった。そこで本年度は、呼気凝縮液中の増殖因子の測定をLuminex Systemを用いて試みた。測定したPDGF-BB、VEGF、FGF basicは、喘息患者・健常人を含めたほぼ全例において検出可能であった。しかし、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気中増殖因子の濃度と、呼吸機能との関連を解析した。呼気中PDGF-BB濃度と%FEV₁の間には、有意な負の相関を認めた(相関係数:-0.387, p = 0.01)。またVEGF濃度と%FEV₁の間にも、有意な負の相関を認めた(相関係数:-0.473, p = 0.001)。これらの増殖因子は気道のリモデリングに深く関与しているが、今回の検討により呼気凝縮液中のPDGFやVEGF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。

当研究室では以前マウス喘息モデルを用いて、IGF-IやPDGFなど増殖因子の中和抗体を投与することにより気道リモデリングを抑制できることを明らかにした。そこで平成17年度はヒトでの役割を明らかにすべく、喘息患者呼気凝縮液中のIGF-I、PDGF-AA、VEGFの濃度をELISAにて測定した。IGF-Iは測定可

能であったものの、PDGF-AAとVEGFは検出限界以下であった。平成18年度の本研究ではLuminex Systemを用いて呼気凝縮液中のサイトカイン/ケモカイン濃度を網羅的に解析し、IP-10、GM-CSF、Eotaxin、IL-8、MIP-1 β などが検出可能であることが判明した。Luminex Systemは測定項目によってはELISAよりも感度が良いとされており、ELISAで測定不能であった項目が検出できるかどうかは検討されていない。

本年度はリモデリングマウスでの増殖因子の意義を踏まえ、喘息患者呼気凝縮液中の増殖因子の測定をLuminex Systemを用いて試みた。また患者パラメータとの関連を検討するために、呼吸機能との比較を行った。

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、同意を得て呼気の採取を行った。症例の内訳は、健常人 16 例、喘息患者 48 例であった。

(2) 呼気凝集液採取・測定

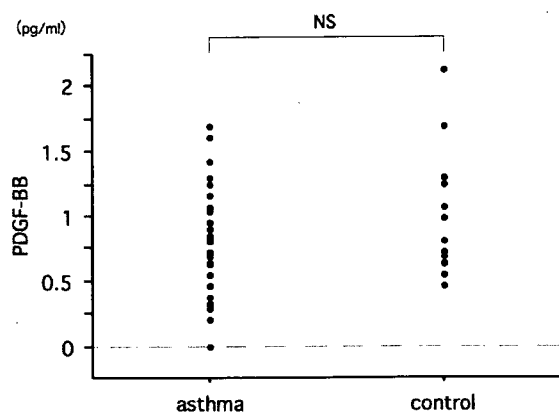
呼気凝集液の採取には、ECoScreen (JAEGER 社、ドイツ) を使用した。呼気の採取は 15 分行い、得られた凝縮液はサンプル測定時まで -80°C に保存した。採取した検体を凍結乾燥し、PBS で 10 倍濃縮したものを測定に使用した。濃縮したサンプル中のサイトカイン/ケモカインの測定には Luminex 200 (Luminex) を用い、測定キットとして Bio-Plex Cytokine Assay (Bio-Rad) を使用した。

C. 研究結果

(1) 呼気凝集液中の増殖因子濃度

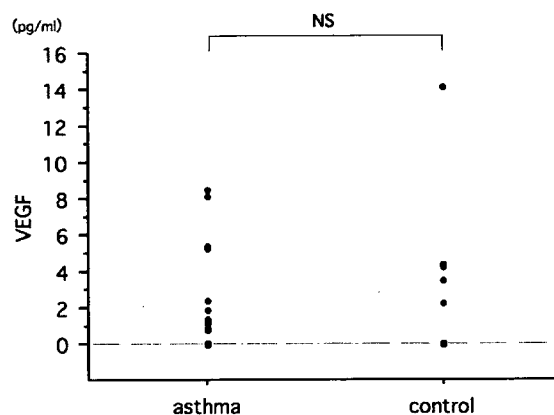
気道炎症を評価する増殖因子の項目として、PDGF-BB, VEGF, FGF basic を選択した。いずれも大半の検体で、呼気凝縮液中の検出が可能であった。呼気中 PDGF-BB の濃度は、喘息患者で 0.76 ± 0.35 pg/ml、健常人では 0.99 ± 0.46 pg/ml と、有意な差を認めなかった(図1)。

図1 呼気凝縮液中 PDGF-BB 濃度



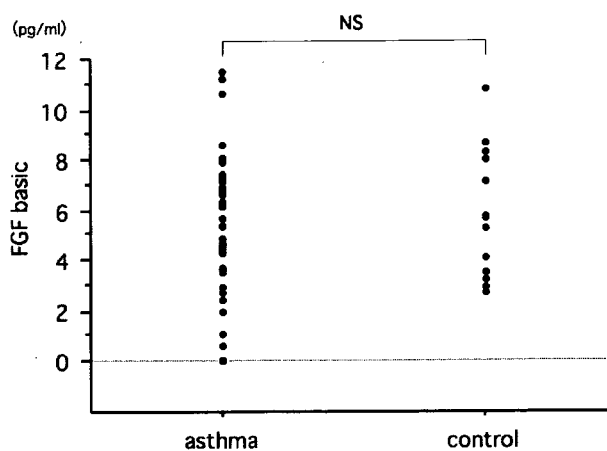
呼気中 VEGF の濃度は、喘息患者で 0.77 ± 1.97 pg/ml、健常人では 2.04 ± 3.69 pg/ml と、有意な差を認めなかった(図2)。

図2 呼気凝縮液中 VEGF 濃度



呼気中 FGF basic の濃度は、喘息患者で 5.13 ± 2.92 pg/ml、健常人では 6.00 ± 2.49 pg/ml と、有意な差を認めなかった(図3)。

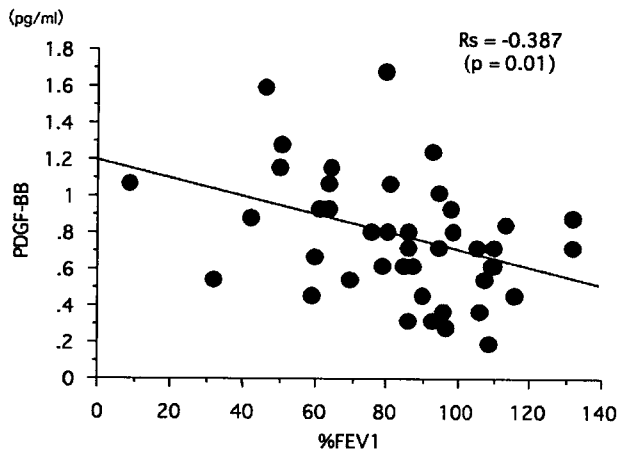
図3 呼気凝縮液中 FGF basic 濃度



(2) 呼気中増殖因子濃度と呼吸機能

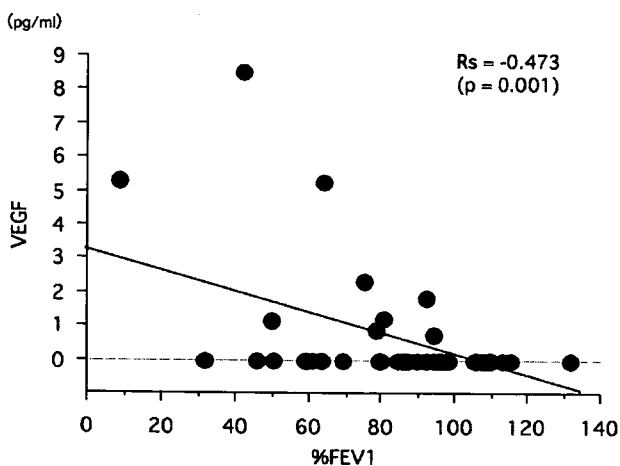
次に喘息患者呼気凝縮液中のパラメーターと呼吸機能との関係を検討した。図4に示すように、呼気中PDGF-BB濃度と%FEV₁は、有意な負の相関を認めた(相関係数:-0.387, p = 0.01)。

図4 呼気凝縮液中PDGF-BB濃度と%FEV₁



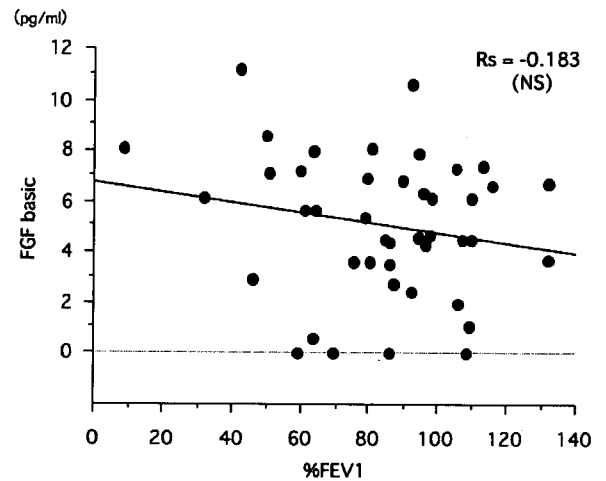
呼気中VEGF濃度と%FEV₁も、有意な負の相関を認めた(相関係数:-0.473, p = 0.001) (図5)。

図5 呼気凝縮液中VEGF濃度と%FEV₁



呼気中 FGF basic と%FEV₁の間には、有意な相関を認めなかった(図6)。

図6 呼気凝縮液中 FGF basic 濃度と%FEV₁



D. 考察

気管支喘息のリモデリングに関わる因子として、増殖因子(PDGF, TGF- β , IGF-I)があげられている。我々は以前マウス喘息モデルにおいて、これら増殖因子の中和抗体を投与することにより気道リモデリングを抑制できることを明らかにした(J Allergy Clin Immunol 107, 135-42, 2001; Cell Immunol 235, 85-91, 2005)。そこで平成 17 年度に呼気凝縮液中の増殖因子濃度を ELISA で測定したところ、IGF-I 以外の PDGF-AA, VEGF は検出不能であった。一方本年度 Luminex System を用いて同様に測定したところ、PDGF, VEGF とも測定可能であった。

呼気凝縮液中の増殖因子に関しては、小児において PDGF-AA, VEGF の報告がある(Int Arch Allergy Immunol 137; 66-72, 2005)。それによると、まず PDGF-AA に関しては小児喘息患者の呼気凝縮液中で 10-100 pg/ml 程度の検出が報告されている。健常人と喘息患者の間で有意差はなかったものの、%FEV₁

が80%未満の症例では80%以上の症例と比して有意に呼気中PDGF-AAの濃度が上昇していた。VEGFも呼気中で10-100 pg/ml程度検出されるも、健常人と喘息患者では有意差はなかったと報告されている。PDGF-BBはPDGF-AAと比して気道リモデリングへ深く関与していると考えられており、今回の検討により呼気中PDGF-BBと%FEV₁が負の相関を示したことは、PDGF-BBの喘息病態への関与をさらに裏付けるものと思われる。また今回PDGF-BBと同様にVEGFも呼吸機能との負の相関を認めており、小児喘息と成人喘息の病態の違いを推察させるものである。

E. 結論

本研究において我々は、喘息の炎症・リモデリングのモニタリングに有用なマーカーの模索を行った。以前の当研究室でのマウスでの検討を踏まえて呼気凝縮液を用いた臨床研究を行ったところ、マウスでのデータを支持する所見を得ることができた。喘息の有病率が増加する一方で、病態をモニタリングする有用なマーカーを選定することは、喘息死の撲滅や医療コストの削減など社会的な利益にもつながると考えられる。今後これら呼気凝縮液中の増殖因子が、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

Tashimo H, Yamashita N, Ishida H, Nagase H, Adachi T, Nakano J, Yamamura K, Yano T, Yoshihara H, Ohta K. Effect of procaterol, a β_2 selective adrenergic receptor agonist, on airway inflammation and hyperresponsiveness. *Allergol Int* 56: 241-7, 2007.

2・学会発表

足立哲也、花香里子、増田倫子、吉原久直、長瀬洋之、大田 健. 喘息モデルマウスにおけるTAT-PTENの気道炎症抑制効果. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会. 平成19年11月. 横浜市
長瀬洋之、山口正雄、矢野智湖、吉原久直、山村浩一、鈴木真穂、倉持美知雄、石田博文、足立哲也、大田 健. ウイルス性気道炎症におけるマスト細胞の生体防衛的役割の検討. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会. 平成19年11月. 横浜市

山村浩一、足立哲也、増田倫子、長瀬洋之、大田 健. Luminex systemを用いた好酸球細胞内タンパクリン酸化の網羅的検討. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会. 平成19年11月. 横浜市

矢野智湖、長瀬洋之、山村浩一、鈴木真穂、倉持美知雄、石田博文、足立哲也、大田 健. 低pHが気道上皮細胞からサイトカイン・ケモカイン分泌に及ぼす影響. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会. 平成19年11月. 横浜市

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 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。近年、気管支喘息の治療戦略として気道炎症の制御という概念が導入され、その有効性が評価されつつあるが、病態評価および治療的視点からも末梢気道炎症の正確な評価が重要となっている。このように、気管支喘息における末梢気道炎症の意義・重要性が強く認識されているが、そ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、遺伝子ノックアウト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、実験動物としてのノックアウト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・末梢気道炎症に関連するバイオマーカーを明らかにするため、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 Adrenomedullin (AM)などの炎症関連メディエーターの遺伝子ノックアウトマウスを作成し検討を行った。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・蛋白質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、アレルゲン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) 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: ホモ接合体では胎生致死が認められた。そのため、ヘテロ接合体を AM ノックアウトマウスとして用いた。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、BALF IL-4, IL-5, IFN- γ 濃度の有意差も認めなかった。一方、肺組織標本をモルフオメ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野生型群と比べて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。

Summary of histological patterns of each arms

	AM ^{+/S}	AM ^{+/S}	AM ^{+/O}	AM ^{+/O}
気管支上皮剥離	-	-	+	+
好酸球浸潤	-	-	+	+
杯細胞の増生	-	+	++	++
気管支平滑筋の増生、肥厚 基底膜の肥厚	-	-	+	++

Yamamoto H, J Appl Physiol 2007

図1 アレルギー性気管支喘息モデルにおける AM ノックア

ウトマウス肺組織解析のまとめ

2) 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。バッククロスによる遺伝的純化が完了し、アレルギー性気管支喘息モデルの用いた解析が進行中である。

Targeted Disruption of Mouse CysLT₂ Gene in C57BL/6 ES Cells

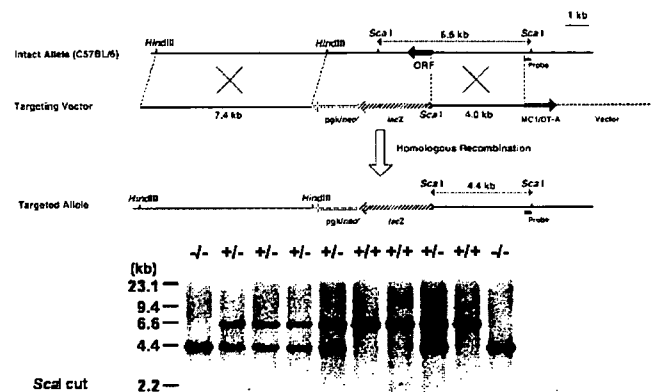


図2 CysLT2 受容体ノックアウトマウスの作成

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 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る。一方、好酸球浸潤については、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ノックアウト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** 2007; 292: C2141-9.
- 2). Yamamoto H, Nagase T, Shindo T, Teramoto S, Aoki-Nagase T, Yamaguchi Y, Yokomizo T, Nagai R, Kurihara H, Ouchi Y. Impaired innate adrenomedullin function deteriorates airway hyperresponsiveness in mice: possible roles of allergen-induced airway wall remodeling. **J Appl**

Physiol 2007; 102: 2361-8.

- 3). Aoki-Nagase T, Nagase T, Oh-hashii Y, Kurihara Y, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Nagata T, Kurihara H, Ouchi Y. Calcitonin gene-related peptide mediates acid-induced lung injury in mice. **Respirology** 2007; 12: 807-13.

2. 学会発表

- 1). 肺炎症における脂質性メディエーターに関して： 第 47 回日本呼吸器学会総会（発表者：長瀬隆英、特別講演），2007.
- 2). 高齢者COPDの臨床： 第 49 回日本老年医学会総会（発表者：長瀬隆英、教育企画），2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

（出願準備中 1件）

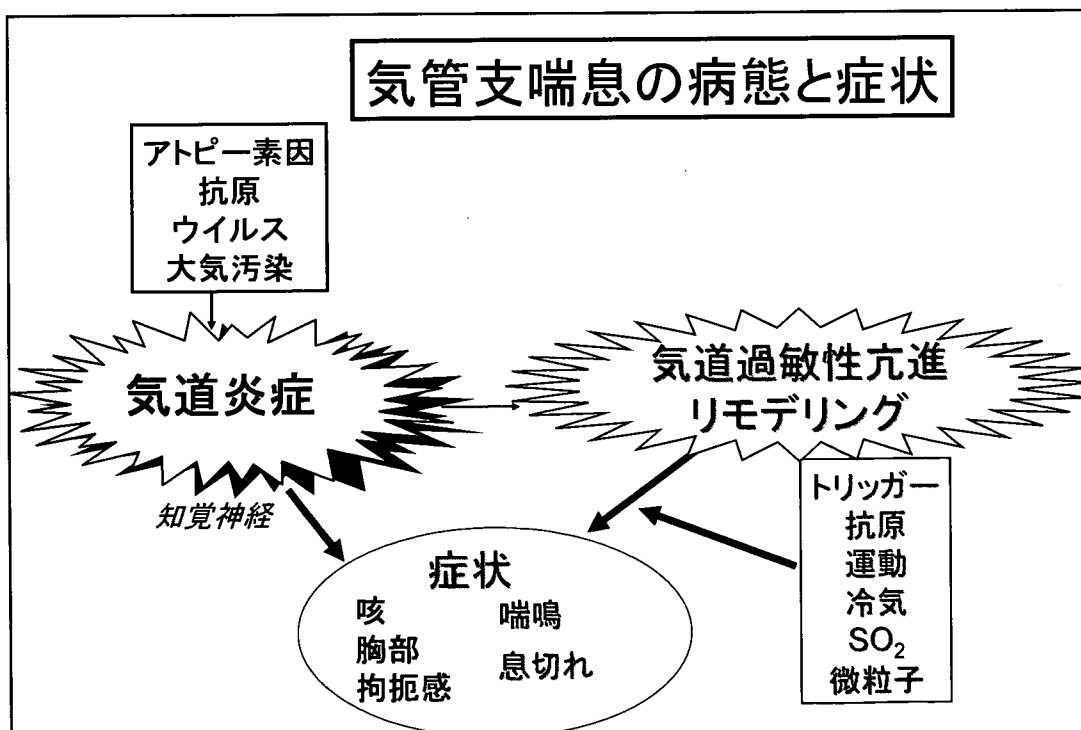
発明者：栗原裕基、大内尉義、長瀬隆英、山口泰弘

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

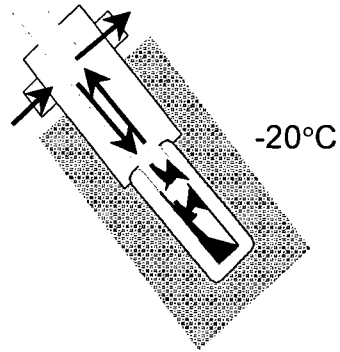
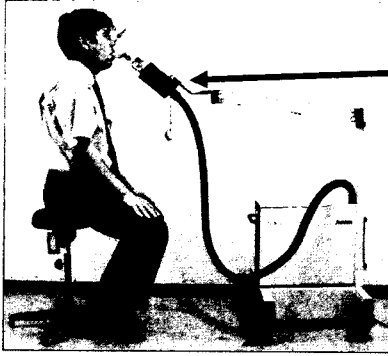
IV. 研究報告会（平成 20 年 1 月 29 日） 発表資料

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



呼気凝縮液検査

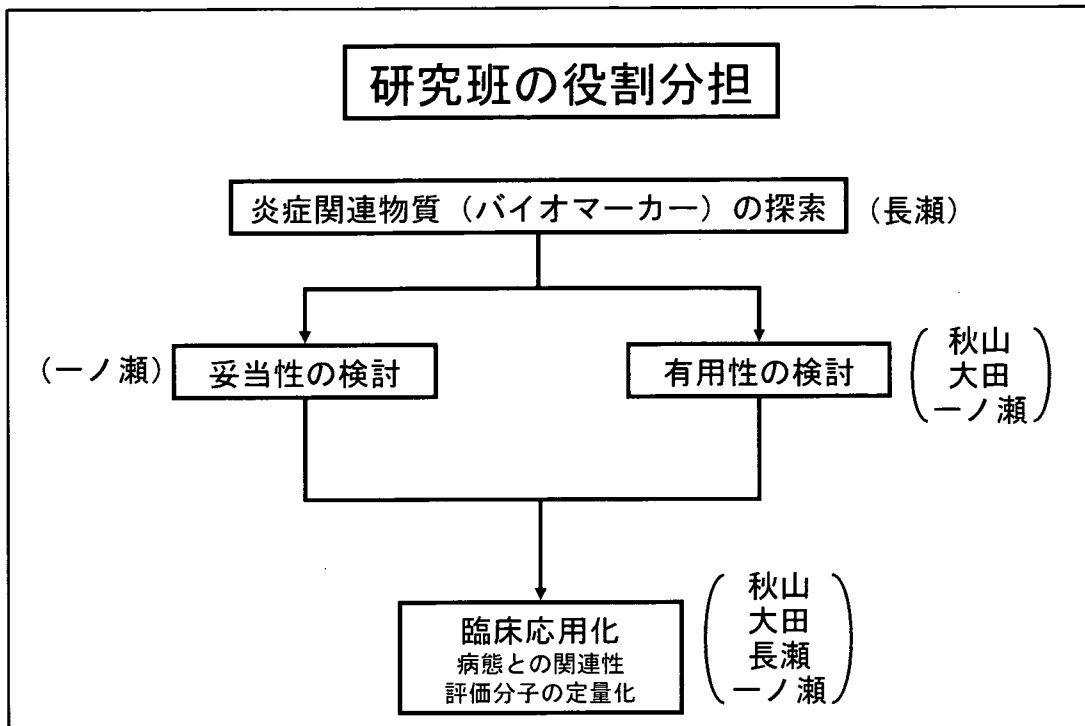


- 気道内の乱流による気道表面の液体成分のエロゾル化
- エロゾル化した液体成分の呼気の気流による排出
- 呼気の急速冷却による検体採取
- 10 - 20分の安静換気で3 - 4 mlの呼気凝縮液が得られる

目的

1. 呼気凝縮液分析の妥当性を検証する。
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および病態との関連性を検討し、臨床応用を目指す。

研究班の役割分担



前々年度（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 α , IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TGF- β 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- α , TGF- β 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。

前年度（2年目）の研究における主な成果

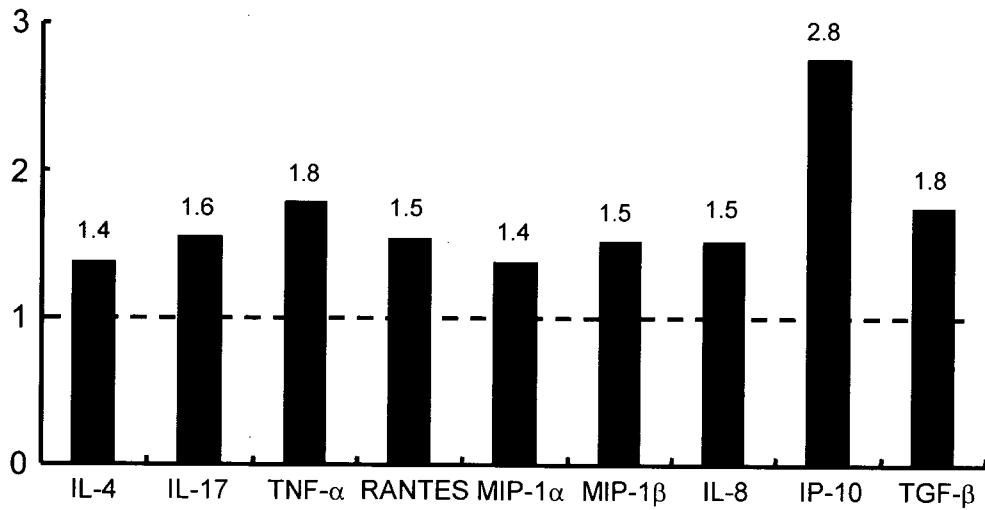
1. 妥当性
 - 唾液成分の呼気凝縮液解析に及ぼす影響は無視しうる。
2. 有用性
 - Cys LTs濃度は発作の予測因子となる可能性が示された。
 - 生理パラメータとの関連では、RANTES, IL-4, TNF- α , TGF- β を凌駕するものは無かった。
3. 臨床応用（評価分子の定量化と病態との関連性）
 - Cytometric Beads ArrayによりIP-10、MCP-1、MIG、RANTES、IL-8が定量化できた。
 - Multiplex Immunoassayでは、eotaxin、GM-SCF、IP-10が定量化できた。

当該年度の各班の検討課題

1. 妥当性
2. 有用性
3. 臨床応用化
 - 1) 病態との関連性
 - ステロイド治療との関連性 (一ノ瀬班)
 - 2) 評価分子の定量化
 - 脂質メディエーター (秋山班)
 - 成長因子 (大田班)
 - サイトカイン・ケモカイン (一ノ瀬班)

喘息気道で発現が増加している物質

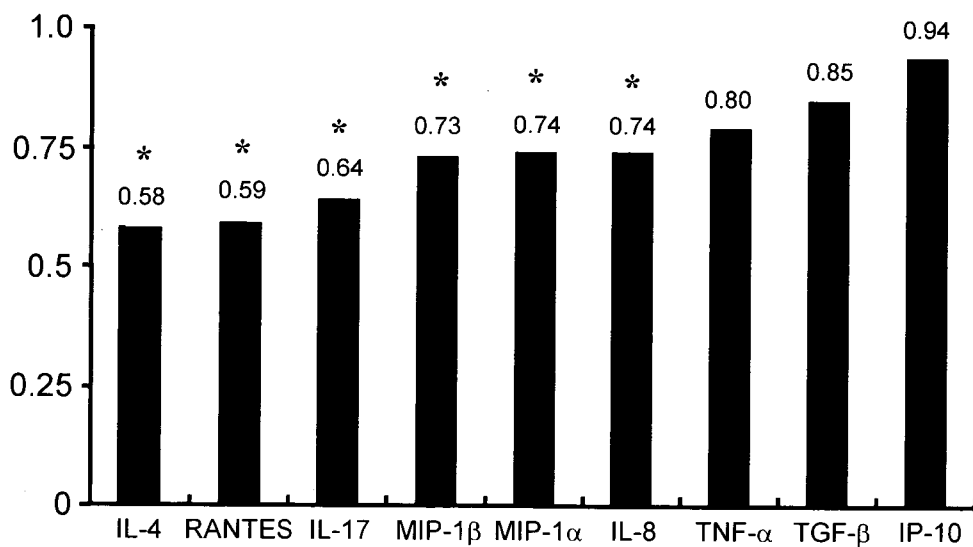
Fold increase



(Matsunaga K, Ichinose M et al. J. Allergy Clin. Immunol 118, 84-90: 2006)

吸入ステロイドによる呼気凝縮液中サイトカイン発現の変化

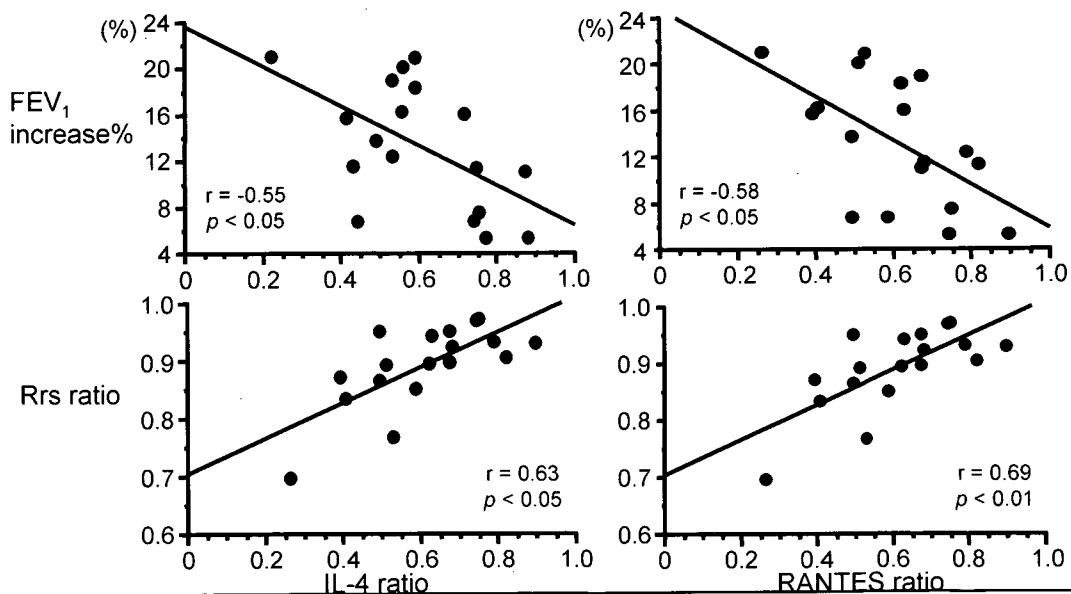
Cytokine ratio (post / pre)



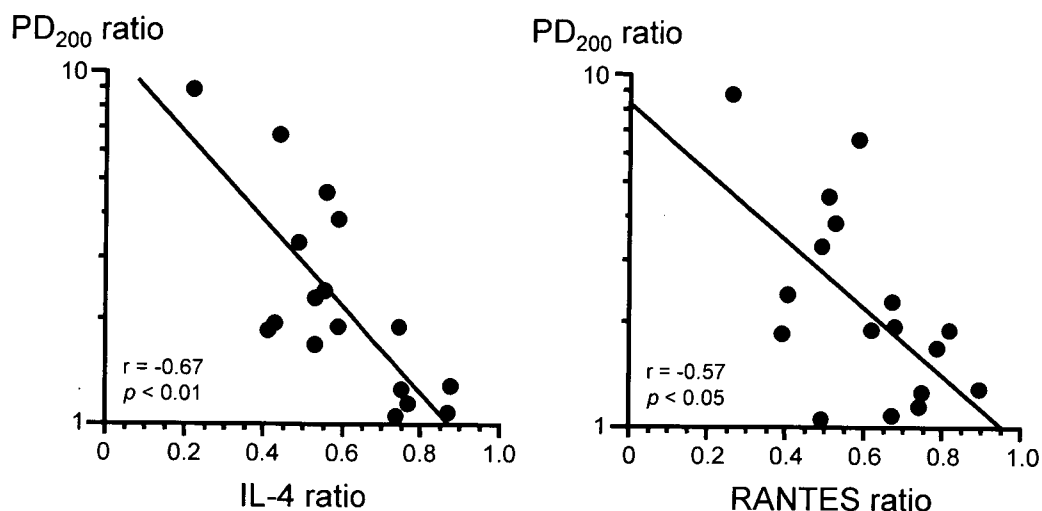
吸入ステロイドによるサイトカイン発現と呼吸機能の変化

Cytokine ratio	FEV ₁ increase %	Rrs ratio	PD ₂₀₀ ratio	ΔPEF ratio
IL-4	r = -0.55 (p < 0.05)	r = 0.63 (p < 0.05)	r = -0.67 (p < 0.01)	r = 0.42 (p = 0.08)
IL-17	r = -0.34 (p = 0.12)	r = 0.45 (p = 0.06)	r = -0.47 (p = 0.06)	r = 0.12 (p = 0.63)
RANTES	r = -0.58 (p < 0.05)	r = 0.69 (p < 0.01)	r = -0.57 (p < 0.05)	r = 0.45 (p = 0.06)
MIP-1α	r = -0.04 (p = 0.88)	r = -0.27 (p = 0.29)	r = 0.46 (p = 0.06)	r = 0.04 (p = 0.87)
MIP-1β	r = -0.25 (p = 0.32)	r = 0.02 (p = 0.94)	r = -0.05 (p = 0.86)	r = 0.20 (p = 0.44)
IL-8	r = -0.25 (p = 0.32)	r = 0.06 (p = 0.82)	r = 0.06 (p = 0.81)	r = 0.02 (p = 0.81)

IL-4、RANTESの減少は閉塞性障害の改善と相関する



IL-4、RANTESの減少は気道過敏性の改善と相関する



呼気凝縮液検査の臨床応用化

1) 吸入ステロイド治療前後での検討

- 呼気凝縮液中IL-4、IL-8、IL-17、RANTES、MIP-1 α 、MIP1 β はステロイド反応性で、IL-4とRANTESの減少の程度は閉塞性障害や気道過敏性の改善の程度と有意な相関を認めた。
→ 治療の効果判定に有用
- ステロイド抵抗性分子はTNF- α 、TGF- β 、IP-10であった。
→ 難治性喘息の予側への応用

当該年度の各班の検討課題

1. 妥当性

2. 有用性

3. 臨床応用化

1) 病態との関連性

ステロイド治療との関連性 (一ノ瀬班)

2) 評価分子の定量化

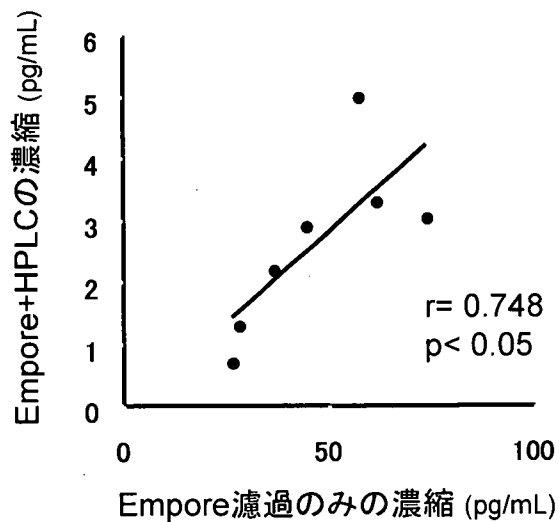
脂質メディエーター (秋山班)

成長因子 (大田班)

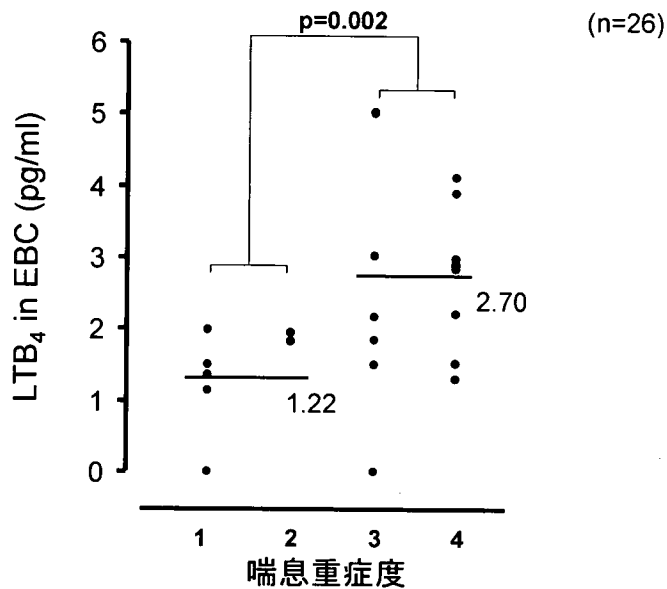
サイトカイン・ケモカイン (一ノ瀬班)

精製処理法によるEBC中LTB₄濃度の違い (秋山)

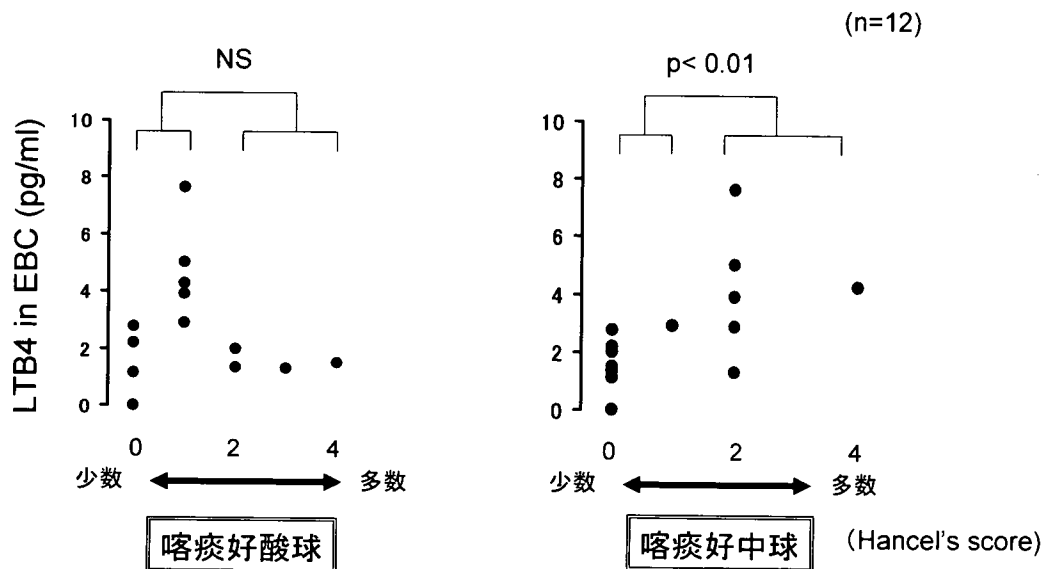
(n=7)



呼気凝縮液中LTB₄濃度と喘息重症度
(秋山)



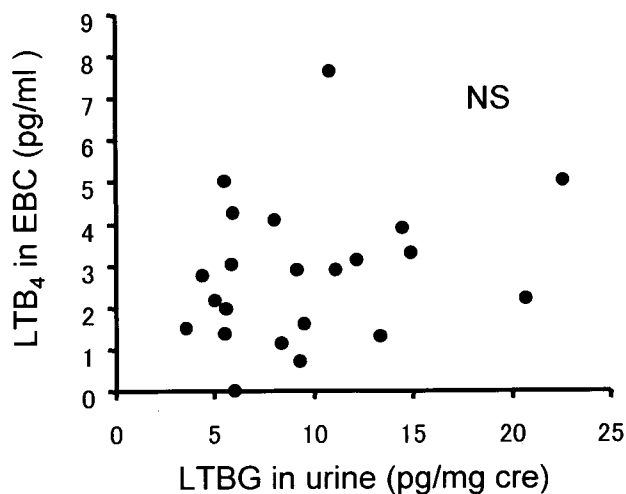
EBC中LTB₄濃度と喀痰中好酸球、好中球数
(秋山)



EBC中LTB₄濃度と尿中LTBGとの関連

(秋山)

(n=13)



LTBG: LTB₄ glucuronide

Multiplex Immunoassay、Luminex System

(大田)

測定原理

- 別々のプローブを固定したLuminexビーズのセットを用意する。
- このビーズセットと蛍光物質で標識したサンプル中のターゲットとをチューブの中で反応させる。
- 反応後、Luminexビーズのセットをフローサイトメトリーで流し、赤色レーザーでビーズの直径とビーズ番号の識別を、緑色レーザーでビーズ表面の蛍光物質量を測定する。

今回の測定項目

- 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- γ 、TNF- α 、Eotaxin、RANTES、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、IP-10