

- 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 回日本アレルギー学会秋季学術大会，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
- 27) 一ノ瀬正和、寺本信嗣：去痰薬の本当の効果は何か？どこで使えばよいのか？第 46 回日本呼吸器学会学術講演会，東京，2006.06.01
- 28) 山縣俊之、一ノ瀬正和：慢性閉塞性肺疾患(COPD)．第 46 回日本呼吸器学会学術講演会，東京，2006.06.02
- 29) Yamagata T, Ichinose M: Recent Advances on Pharmacotherapy of COPD. The 46th Annual Meeting of The Japanese Respiratory Society, Tokyo, 2006.06.03
- 30) 一ノ瀬正和：酸素療法の合併症．第 16 回日本呼吸管理学会学術集会，札幌市，2006.07.28
- 31) 一ノ瀬正和：COPD の薬物療法－現状と将来展望－．第 16 回日本呼吸管理学会学術集会，札幌市，2006.07.29
- 32) 一ノ瀬正和：コントロールの現状と課題．第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会，東京，2006.11.03
- 33) 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サイトカイン発現と肺機能との関連．第 18 回日本アレルギー学会春季臨床大会，東京，2006.05.30
- 34) 赤松啓一郎、一ノ瀬正和、他：貼付型 β_2 刺激薬投与中の COPD 患者に対するチオトロピウム追加効果の検討．第 46 回日本呼吸器学会学術講演会，東京，2006.06.01
- 35) 中西正典、一ノ瀬正和、他：COPD 患者における呼気凝縮液中サイトカイン発現の検討．第 46 回日本呼吸器学会学術講演会，東京，2006.06.01
- 36) 上嶋千史、一ノ瀬正和、他：喀痰上清中の 3-ニトロチロシン定量測定における唾液混入の影響．第 46 回日本呼吸器学会学術講演会，東京，2006.06.01
- 37) 赤松啓一郎、一ノ瀬正和、他：一般内科外来患者に対

- する積極的呼吸機能検査施行の有用性. 第46回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2006.06.03
- 38) 中西正典、一ノ瀬正和、他: 喘息・COPDにおける呼気凝縮液中のサイトカイン発現と閉塞性障害との関連. 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2006.11.02
- 39) 市川朋宏、一ノ瀬正和、他: 唾液の呼気凝縮液解析に与える影響～サイトカインプロファイルによる検討～. 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2006.11.02
- 40) 松永和人、一ノ瀬正和、他: 吸入ステロイド療法で管理不十分な喘息患者の肺機能に対する second line drug の Add-on 効果. 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2006.11.02
- 41) 赤松啓一郎、一ノ瀬正和、他: 一般内科外来患者に対する積極的呼吸機能検査施行の有用性. 第72回閉塞性肺疾患研究会, 東京, 2006.01.21
- 42) 松永和人、一ノ瀬正和、他: 喘息気道のサイトカインと肺機能との関連. 第18回気道病態シンポジウム, 横浜, 2006.02.04
- 43) 柳澤 悟、一ノ瀬正和、他: COPD 患者における末梢血好中球インテグリンおよびケモカイン受容体発現の検討. 第2回呼吸器バイオマーカー研究会, 東京, 2006.03.18
- 44) 松永和人、一ノ瀬正和、他: 呼気凝縮液を用いた喘息気道の炎症関連物質の解析. 第73回閉塞性肺疾患研究会, 東京, 2006.07.15
- 45) 松永和人、一ノ瀬正和、他: 喘息気道における呼気凝縮液中の炎症関連物質の発現と肺機能との関連. 第15回 Airway Club in Sendai, 仙台, 2006.09.09
- 46) 山縣俊之、一ノ瀬正和、他: COPD 末梢血好中球の β_2 インテグリン、ケモカイン受容体発現と病態への関与についての検討. 第15回 Pneumo Forum, 東京, 2006.12.02
- 47) 一ノ瀬正和: COPD 薬物治療の新展開. 第102回日本内科学会講演会、大阪、2005.04.07
- 48) 南方良章、一ノ瀬正和: 炎症性肺・気道疾患における呼気ガス・凝縮液の有用性. 第45回日本呼吸器学会学術講演会、千葉、2005.04.14
- 49) 一ノ瀬正和: 気道炎症モニタリングの進歩. 第45回日本呼吸器学会学術講演会、千葉、2005.04.16
- 50) 山縣俊之、一ノ瀬正和: 気道過敏性に対する気道平滑筋と自律神経系の役割の重要性. 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会、岡山、2005.06.02
- 51) 松永和人、一ノ瀬正和: 気管支喘息治療による気道炎症と過敏性の改善. 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会、岡山、2005.06.03
- 52) 山縣俊之、一ノ瀬正和: 呼気ガスの測定と呼吸器疾患. 第28回日本呼吸器内視鏡学会総会、東京、2005.06.09
- 53) 一ノ瀬正和: COPD の薬物療法. 第28回日本呼吸器内視鏡学会総会、東京、2005.06.09
- 54) 一ノ瀬正和: 呼吸器疾患管理における気管支拡張薬の現状. 第47回日本平滑筋学会総会、仙台、2005.07.08
- 55) 平野綱彦、一ノ瀬正和: テオフィリンと抗炎症作用. 第47回日本平滑筋学会総会、仙台、2005.07.08
- 56) 平野綱彦、一ノ瀬正和、他: ミニシンポジウム: テオフィリンとPDE4阻害薬. 第71回閉塞性肺疾患研究会、東京、2005.07.16
- 57) 一ノ瀬正和: COPD バイオマーカー開発の現状. 東京 COPD シンポジウム 2005、東京、2005.07.23
- 58) 一ノ瀬正和: COPD 治療の現状と展望. 第3回呼吸器 Up to date OSAKA、大阪、2005.07.23
- 59) 山縣俊之、一ノ瀬正和: 炎症性肺疾患における呼気凝縮液、呼気ガス検査. 第55回日本アレルギー学会秋

季学術大会、盛岡、2005.10.20

- 60) 一ノ瀬正和: イントロダクション; 喘息・COPD の病態理解. 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会、盛岡、2005.10.21
- 61) 平野綱彦、一ノ瀬正和、他: COPD 患者気道に対するテオフィリンの窒素化ストレスの抑制作用. 第 45 回日本呼吸器学会学術講演会、千葉、2005.04.14
- 62) 山縣俊之、一ノ瀬正和、他: 慢性閉塞性肺疾患における喀痰上清中の 3-ニトロチロシン定量測定法の確立. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会、千葉、2005.04.15
- 63) 松永和人、一ノ瀬正和、他: 超高齢者気管支喘息における介助吸入ステロイド療法の有用性. 第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会、岡山、2005.06.02
- 64) 東田有智、一ノ瀬正和、他: 関西・北陸地区における喘息患者 QOL 調査結果. 第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会、岡山、2005.06.03
- 65) 松永和人、一ノ瀬正和、他: 気道過敏性の簡便な臨床指標の検索. 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会、盛岡、2005.10.22
- 66) 松永和人、一ノ瀬正和、他: 高齢者喘息における吸入介助の臨床的意義. 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会、盛岡、2005.10.22
- 67) 南方良章、一ノ瀬正和、他: 気道上皮被覆液を用いた COPD の炎症機序の解明に関する検討. 第 70 回閉塞性肺疾患研究会、東京、2005.01.22
- 68) 上嶋千史、一ノ瀬正和、他: 気道窒素化ストレスの定量評価の試み. 第 17 回気道病態シンポジウム、東京、2005.02.05
- 69) 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
- 70) 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

- 71) 駒木祐一、一ノ瀬正和、他: COPD 気道でのキサンチンオキシデース活性上昇とサイトカインの関与. 第 2 回 Bronchoscopic Micro Sampling 研究会、東京、2005.07.15
- 72) 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
- 73) 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 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。そこで、本研究においては特に Leukotriene に注目し、①EBC中のcysLTs及びLTB₄濃度測定における方法論の確立、②既存の気管支喘息の指標との比較、③全身と局所を比較するための尿中とEBC中のLT濃度の比較、④臨床における位置づけ、の解明を目的とした。結果として、EBCは完全に非侵襲的と考えられた。また、唾液混入は可能性が低いと考えられた。回収は安静換気にすべきで、濃縮法、測定法については、cysLTsについてはカラムを用いた濃縮法のみでよく、LTB₄測定においては、ELISAに反応するLTB₄類似物質の混入が考えられHPLCを行う必要があると考えられた。既存の指標との比較では、cysLTs、LTB₄ともに短期的な指標との相関は見出せなかったが、重症例で有意に高値であり、特にcysLTsについてはその後の増悪を予測しうる可能性が示唆された。また、LTB₄については、喀痰中好中球增多症例で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おり、本検査はこうした重症化しうる例を抽出するのに有用な可能性がある。以上よりEBC中cysLTs、LTB₄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。今後は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。しかしながら本邦での研究報告は不足しており、今後臨床応用可能かどうかについては十分な検討を要する。そこで、本研究においては特に Leukotriene に注目し、①EBC 中の cysLTs 及び LTB₄ 濃度測定における方法論の確立、②既存の気管支喘息の指標との比較、③全身と局所を比較するための尿中と EBC 中の LT 濃度の比較、④臨床における位置づけ、の解明を目的とし以下のような検討を行った。

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°C に冷却、EBC を採取した。終了後スパイログラムを施行した。回収した EBC は -80°C で保管、分析した。

(4) EBC 中の cysLTs および LTB₄ 濃度の定量

LT 濃度は微量のため以下の方法で濃縮して測定した。HPLC を用いるべきかどうかについて同一検体で測定、検証した。

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 cysLTs または 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。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、PC₂₀ を指標とした。

(6) 尿中 LTE₄、LTBG 濃度の測定

EBC 採取と同時に尿を採取し LTE₄、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 LTE₄ 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. LTE₄ 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 LTB₄ を HPLC で分取したのち LTB₄ ELISA kit (ともに Cayman) で測定し、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

① 方法論についての検討

EBC は 15 分検査施行下で 1-1.5ml 回収できた。60 例における検討で検査前後で一秒量の低下は認めず (%FEV₁ (%), mean ± SD); 検査前 93.09 ± 16.7 → 検査後 96.9 ± 4.30; NS)、安全に施行しえた。また、17 名で α アミラーゼ (アミラーゼテ

ストワコー、和光純薬)を測定したが、全例で検出されなかった。安静換気と強制換気での比較は、4例中1例で回収量が強制換気で多かったが、回収したEBC中cysLTs濃度はほぼ同じであり、強制換気による一秒量低下は認めなかったが苦痛が著しかった。濃縮法の検討では、7例での比較で凍結乾燥法ではカラムを用いた濃縮法より2.33倍に濃度が高かったが有意差はなかった。HPLC精製については、cysLTsについては6例の比較でHPLCの有無にかかわらず測定値は一致した。LTB₄測定においては、7例でHPLCを行うと1/20の濃度になり有意に低値であった(p<0.001)。

②気管支喘息の既存のパラメーターとの比較

EBC中cysLTs濃度は、71例の比較において、吸入ステロイド治療群において、Step1または2の比較的軽症群とStep3または4の比較的重症群の比較では有意差を認めた(Step 1 or 2 vs. 3 or 4, 3.23 vs 5.12 (pg/ml), p<0.05)。同時期に測定した呼気NO濃度、%FEV₁、気道過敏性(AchPC₂₀, HistPC₂₀)それぞれとは相関を認めなかった。

EBC中LTB₄については、26例での検討で、重症な症例で有意に高値であった(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、自然痰を採取しえた15症例について、好酸球とは関連せず、好中球が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)。%FEV₁とは弱い負の相関(r=-0.42, p=0.044)を認めたが、eNOとの比較では相関を認めなかった。

③尿中とEBC中のLT濃度の比較

全身でのロイコトリエン産生増多と局所における濃度を比較するため、尿との比較を行った。cysLTsにおいては、尿中LTE₄との比較で、35例の検討で有意な相関は見出せなかった。また、LTB₄測定においては、15例で尿中LTBGと相関を認めなかった。

④臨床における位置づけ

短期的な指標との相関は見出せなかったため、長期予後での検討をする目的で、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。増悪例33例と非増悪例19例で比較したところEBC中cysLTs(p=0.036)、logAchPC₂₀(p=0.007)、logHistPC₂₀(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%)。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。

D. 考察

EBCは完全に非侵襲的と考えられた。また、唾液混入は可能性が低いと考えられた。回収は安静換気にすべきで、濃縮法、測定法については、cysLTsについてはカラムを用いた濃縮法のみでよく、LTB₄測定においては、ELISAに反応するLTB₄類似物質の混入が考えられHPLCを行う必要があると考えられた。既存の指標との比較では、cysLTs、LTB₄ともに短期的な指標との相関は見出せなかったが、重症例で高値になる傾向にあり、特にcysLTsについてはその後の増悪を予測しうる可能性が示唆された。また、LTB₄については、喀痰中好中球増多症例で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おり、本検査は重症例の抽出に有用である可能性がある。また、LTB₄を標的とした治療薬は現在無いが、こうした薬剤はステロイドの効き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

以上よりEBC中cysLTs、LTB₄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。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。

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

第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会 岡山 2005

粒来崇博:呼気凝縮液検査の標準化に向けて

第 1 回呼吸器バイオマーカー研究会学術講演会 2005

粒来崇博、三田晴久、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

粒来崇博、三田晴久、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、三田晴久、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 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

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
－呼気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教授）

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

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。本研究では喘息の病態モニタリングに有用なマーカーを模索する目的で、喘息患者呼気凝集液中のサイトカイン/ケモカインの測定をELISAまたはLuminex Systemを用いて試みた。呼気中IGF-Iの濃度は、健常人と比して喘息患者において有意に高値であった。その他Eotaxin, GM-CSF, IP-10, PDGF-BB, VEGFなどが呼気凝縮液中で測定可能であったが、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。そこで喘息患者パラメーターとしての%FEV₁と比較したところ、Eotaxin, PDGF-BB, VEGFとの間にそれぞれ有意な負の相関を認めた。呼気中IGF-I, GM-CSFは、%FEV₁と相関を認めなかった。Eotaxinは好酸球活性化ケモカインであり、好酸球は近年気道リモデリングへの関与が示唆されている。PDGFやVEGFなどの増殖因子も、リモデリングに重要な役割を有する。今回の検討により、呼気凝縮液中のこれらの因子は喘息の炎症・リモデリング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。特に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)。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

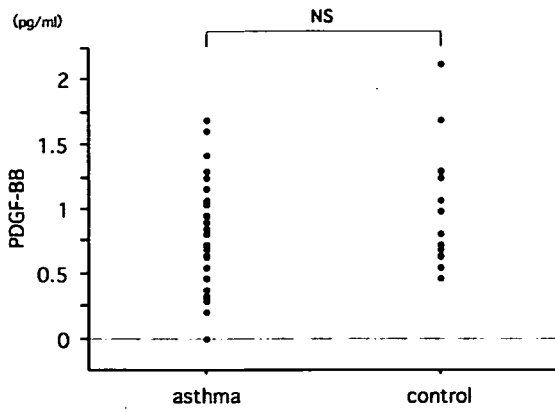
は施行困難である。逆に喀痰は非侵襲的で発作時には採取が比較的容易であるものの、むしろ安定期には喀痰が少なくなりその採取採取が困難になるという難点もある。近年こういった問題点を打開し新たに気道炎症を評価する方法として、呼気凝縮液採取が注目されている。

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、呼気凝集液中増殖因子の測定を行った。

B. 研究方法

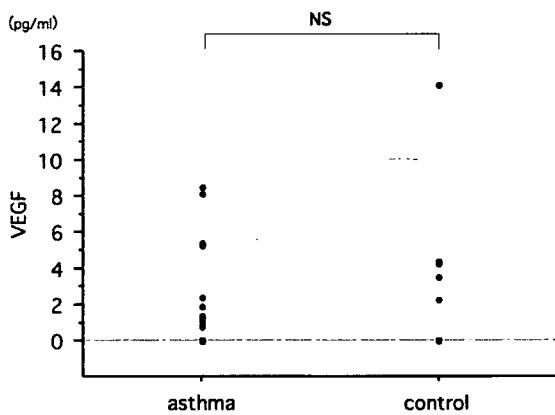
(1) 呼気凝集液採取

健常人あるいは外来通院中の気管支喘息患者から、文書に同意を得て呼気の採取を行った。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10分行い、得られた凝縮液はサンプル測定時まで-80℃に保存した。



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5)。

図5 呼気凝縮液中VEGF濃度

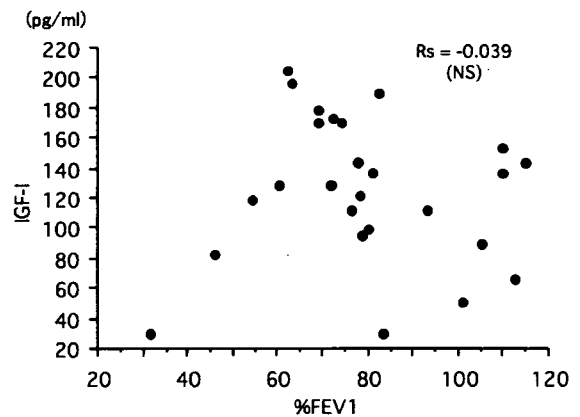


IP-10やFGF basicも喘息患者・健常人を問わずほぼ全例において検出可能であったが、両者の間で差を認めなかった。IL-1 β 、IL-8、MIP-1 β は、喘息患者1-2例においてのみ検出可能であった。その他測定を試みたIL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-12 p70、IL-13、IL-15、IL-17、IFN- γ 、TNF- α 、RANTES、MCP-1、MIP-1 α に関しては、ほぼ全例において測定限界以下の濃度であった。

(2) 呼気中サイトカイン/ケモカイン濃度と呼吸機能

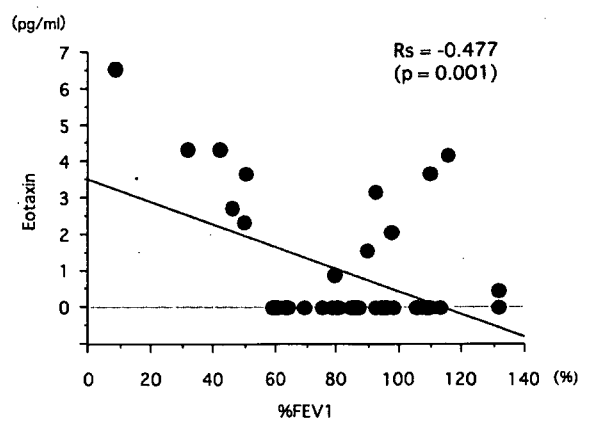
喘息患者における呼気中IGF-I濃度が健常人と比して有意に高値であることがわかったため、次に呼吸機能との関係を検討した。図3に示すように、呼気中IGF-I濃度と%FEV₁は有意な相関を認めなかった(相関係数:-0.039)(図6)。

図6 呼気中IGF-I濃度と%FEV₁



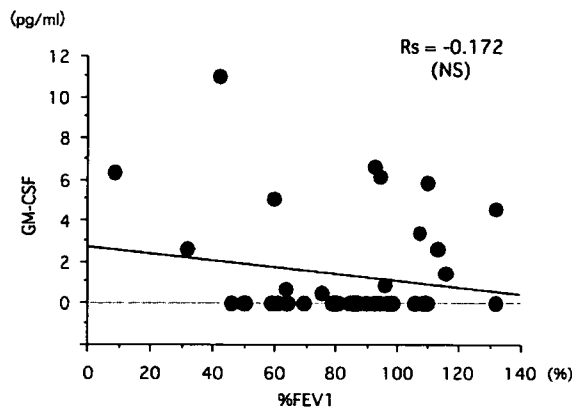
呼気中Eotaxin濃度と%FEV₁は、有意な負の相関を認めた(相関係数:-0.477, p = 0.001)(図7)。

図7 呼気凝縮液中Eotaxin濃度と%FEV₁



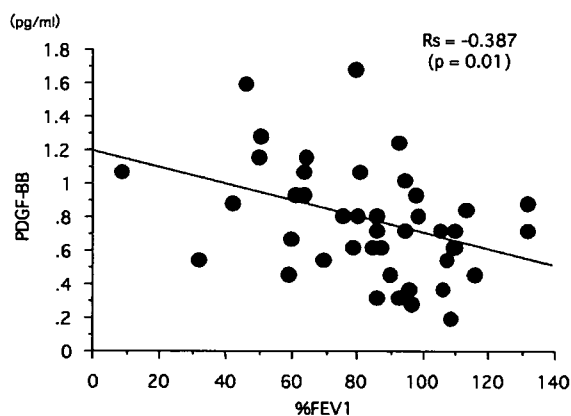
喘息患者呼気中GM-CSFと%FEV₁の間には、有意な相関を認めなかった(図8)。

図8 呼気凝縮液中GM-CSF濃度と%FEV₁



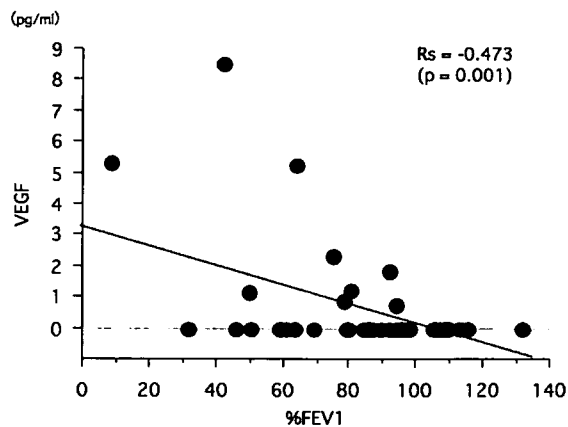
呼気中PDGF-BB濃度と%FEV₁は、有意な負の相関を認めた(相関係数:-0.387, p = 0.01)(図9)。

図9 呼気凝縮液中PDGF-BB濃度と%FEV₁



呼気中VEGF濃度と%FEV₁は、有意な負の相関を認めた(相関係数:-0.473, p = 0.001)(図10)。

図10 呼気凝縮液中VEGF濃度と%FEV₁



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%FEV₁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。呼気中Eotaxin濃度と呼吸機能との間に関連が見られることは、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に関しては測定の報告がほとんどなく、少なくとも現在までのところ喘息患者で有意に高いという報告もない。

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。本検討でも呼気凝縮液中PDGF-AAをELISAにて測定したが、ほぼ全ての検体で検出限界以下であった(データ呈示せず)。一方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伺わせる。呼気中のIGF-Iについても現在までのところ報告がなく、健常人と比して喘息患者で有意に高値であることは、IGF-Iが喘息の炎症性マーカーとなりうることを示唆するものである。

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。以前当研究室では喘息マウスモデルにおける増殖因子の役割に注目し、IGF-Iが卵白アルブミン感作による気道過敏性・好酸球浸潤・基底膜下肥厚に関与していること、またPDGFがディーゼル粒子曝露による気道過敏性・基底膜下肥厚に関与することを報告した(J Allergy Clin Immunol 107, 135-42, 2001; Cell Immunol 235, 85-91, 2005)。これらのin vivo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マーカーが、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. 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. Yamashita N, Tashimo H, Matsuo Y, Ishida H, Yoshiura K, Sato K, Yamashita N, Kakiuchi T, Ohta K. Role of CCL21 and CCL19 in allergic inflammation in the ovalbumin-specific murine asthmatic model. J Allergy Clin Immunol 117, 1040-6, 2006.
3. Yamashita N, Tashimo H, Ishida H, Matsuo Y, Tamauchi H, Terashima M, Yoshiwara I, Habu S, Ohta K. Involvement of GATA-3-dependent Th2 lymphocyte activation in airway hyperresponsiveness. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 290, L1045-51, 2006.
4. Adachi T, Hanaka S, Yano T, Yamamura K, Yoshihara H, Nagase H, Chihara J, Ohta K. The role of platelet-derived growth factor receptor in eotaxin signaling of eosinophils. Int Arch Allergy Immunol 140 (suppl 1), 28-34, 2006.
5. Nakano J, Yano T, Yamamura K, Yoshihara H, Ohbayashi O, Yamashita N, Ohta K. Aminophylline suppress the release of chemical mediators in treatment of acute asthma. Respir Med 100, 542-50, 2006.
6. Meng J, Thongngarm T, Nakajima M, Yamashita N, Ohta K, Bates CA,

Grunwald GK, Rosenwasser LJ.
Association of transforming growth
factor- β 1 single nucleotide
polymorphism C-509T with allergy and
immunological activities. *Int Arch
Allergy Immunol* 138: 151-60, 2005.

7. Yamashita N, Tashimo H, Ishida H,
Matsuo Y, Arai H, Nagase H, Adachi T,
Ohta K. Role of insulin-like growth
factor-I in allergen-induced airway
inflammation and remodeling. *Cell
Immunol* 235: 85-91, 2005.

呼吸凝縮液を用いた気管支喘息の気道炎症評価法の確立と臨床応用に関する研究
－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。気管支喘息の治療戦略としては気道炎症の制御という概念が導入され、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。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。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 B₄ (LTB₄)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、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、感作により顕著な 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。

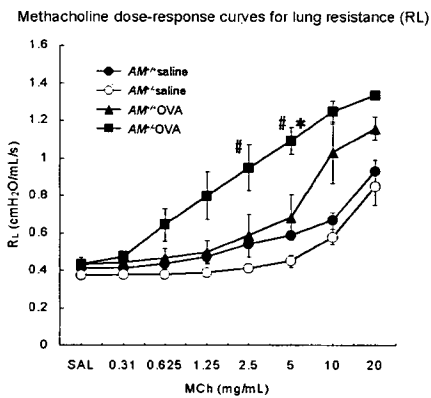


図1 Methacholine (MCh) 投与における AM ノックアウトマウス肺抵抗の反応

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 (RL) が他群よりも有意に高い。

#P<0.05 vs the other 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 LTB₄ 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、PGE₂ 濃度は両群間に有意差は認められなかった。

Reduced Methacholine Response in BLT1-null Mice

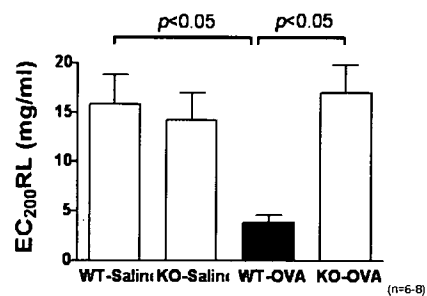


図2 BLT-1 ノックアウトマウスにおける MCh 気道反応性。OA 感作・野生型群で認められる気道過敏性が、OA 感作・BLT1 ノックアウトマウス群では有意に抑制されている。

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。

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

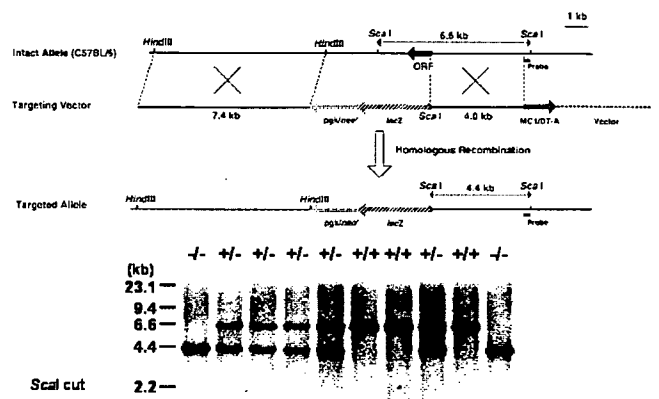


図3 CysLT2 受容体ノックアウトマウスの作成

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 や LTB₄ 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、LTB₄ 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. 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). Terawaki K, Yokomizo T, Nagase T, Toda A, Taniguchi M, Hashizume K, Yagi T, Shimizu T. Absence of leukotriene B4 receptor 1 confers resistance to airway hyperresponsiveness and Th2-type immune responses. **J Immunol** 2005; 175: 4217-25.

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.

4). 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.

G. 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物、及びその製造方法

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Komaki, Y Sugiura, H Koarai, A Tomaki, M Ogawa, H Akita, T Hattori, T Ichinose, M	Cytokine-mediated xanthine oxidase upregulation in chronic obstructive pulmonary disease's airways	Pulm Pharm Ther	18	297-302	2005
Minakata, Y Nakanishi, M Hirano, T Matsunaga, K Yamagata, T Ichinose, M	Microvascular hyperpermeability in chronic obstructive pulmonary disease airways	Thorax	60	882-883	2005
Fukuchi, Y Nagai, A Seyama, K Nishimura, M Hirata, K Kubo, K Ichinose, M Aizawa, H and the BAREC Research Group	Clinical Efficacy and Safety of Transdermal Tulobuterol in the Treatment of Stable COPD: An Open-Label Comparison with Inhaled Salmeterol	Treat Respir Med	4	447-455	2005
Yamagata, T Okamoto, Y Yamagata, Y Nakanishi, M Matsunaga, K Minakata, Y Ichinose, M	Angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinaemia accompanied by pleural effusion	Respirology	10	124-127	2005
一ノ瀬正和	難治性喘息	喘息	18	76-80	2005
一ノ瀬正和	気管支喘息の病態理解と治療の実際	今月の治療	13	29-35	2005
山縣俊之, 一ノ瀬正和	炎症性気道・肺疾患における呼気ガス分析	呼吸	24	694-699	2005

山縣俊之, 一ノ瀬正和	誘発喀痰を用いた気道・肺の炎症の評価	呼吸	24	774-779	2005
山縣俊之, 一ノ瀬正和	呼気温度測定の原理と有用性	呼吸	24	938-942	2005
南方良章, 一ノ瀬正和	呼気ガス・呼気凝縮液による閉塞性肺疾患 (COPD・喘息) の評価	Pharma Medica	23	23-27	2005
一ノ瀬正和	新規薬剤による治療の趨勢	臨床医	31	10-14	2005
松永和人, 一ノ瀬正和	気管支喘息	呼吸と循環	53	907-914	2005
山縣俊之, 一ノ瀬正和	咳喘息とその周辺疾患の治療	呼吸と循環	53	595-602	2005
山縣俊之, 一ノ瀬正和	呼気と気道炎症のパラメーター	アレルギーの臨床	25	79-82	2005
松永和人, 一ノ瀬正和	末梢気道炎症の治療吸入ステロイドデバイス	アレルギーの臨床	25	38-43	2005
Yamagata, T Ichinose, M	Agents against cytokine synthesis or receptors	Eur J Pharma	533	289-301	2006
Matsunaga, K Ichinose, M, et al:	Airway cytokine expression measured by means of protein array in exhaled breath condensate: Correlation with physiologic properties in asthmatic patients	J Allergy Clin Immunol	118	84-90	2006
Matsunaga, K Ichinose, M, et al:	Two cases of asthma in handicapped elderly persons in which assisted inhalation therapy was effective	Allergology International	55	347-351	2006
Hirano, T Ichinose, M, et al:	Inhibition of reactive nitrogen species production in COPD airways: comparison of inhaled corticosteroid and oral theophylline	Thorax	61	761-766	2006
K Matsunaga, Ichinose, M, et al:	Importance of assistance by caregivers for inhaled corticosteroid therapy in elderly patients with asthma	J Am Geriatric Soc	54	1626-1627	2006
Yamagata, T Ichinose, M	Agents against cytokine synthesis or receptors	European Journal of Pharmacology	533	289-301	2006
松永和人, 一ノ瀬正和	鼻炎合併喘息の治療とロイコトリエン受容体拮抗薬	喘息	19	2-6	2006

南方良章, 一ノ瀬正和	気道炎症の評価	内科	97	249-254	2006
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	呼吸	25	41-42	2006
市川朋宏, 一ノ瀬正和	喘息の発症機序に関わる因子-候補 遺伝子も含めて-	Medical Practice	23	267-269	2006
一ノ瀬正和	成人気管支喘息・COPD 治療における テオフィリンの位置づけ	Medical Postgraduates	44	1-6	2006
一ノ瀬正和	喘息治療の進歩と新しい管理目標	日本呼吸管理 学会誌	15	357-363	2006
山縣俊之, 一ノ瀬正和	呼気ガス分析	呼吸と循環	54	591-598	2006
山縣俊之, 一ノ瀬正和	気管支喘息	図解 呼吸器 内科学テキスト		149-152	2006
一ノ瀬正和	COPDと気管支喘息	呼吸	25	827-835	2006
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
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
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
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
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
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	5	134-136	2007
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