

- ルギー学会秋季学術大会、アレルギー 56 : 1184, 2007 (横浜)
- 27) Yamaoka, K., Okayama, Y., Kaminuma, O., Katayama, N., Mori, A., and Hiroi, T.: A proteomic approach to study signal transduction of mast cell activation by Fc $\cdot$ RI aggregation. 第 37 回日本免疫学会総会、Proc. Jap. Soc. Immunol. 37: 193, 2007 (東京)
- 28) Kaminuma, O., Kitamura, F., Miyatake, S., Kitamura, N., Mori, A., and Hiroi, T.: ヒト末梢血 T 細胞における Th1/Th2 分化の不完全性、第 37 回日本免疫学会総会、Proc. Jap. Soc. Immunol. 37: 240, 2007 (東京)
- 29) 北村紀子, 清河信敬, 片桐洋子, 板垣光子, 宮川世志幸, 大喜多肇, 森晶夫, 藤本純一郎: 小

児悪性リンパ腫における Granulysin 発現の解析、第 49 回小児血液学会抄録集 p. 289、2007 (仙台)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

「重症難治性喘息の機序解明と臨床分類に基づく治療法の確立に関する研究」

分担研究者 高橋 清（独）国立病院機構南岡山医療センター 院長

研究協力者 宗田 良・岡田千春（国立病院機構南岡山医療センター内科）  
木村五郎・平野 淳（国立病院機構南岡山医療センターアレルギー科）  
金廣有彦・谷本 安（岡山大学病院血液・腫瘍・呼吸器内科）  
片岡幹男（岡山大学大学院保健学研究科）

研究要旨

喘息難治化の要因を解明する目的で、JGL2006 と本研究試案の重症度分類を基に臨床と基礎の両面から検討した。本年度は簡便、非侵襲的で繰り返しの採取が可能な気道の各種炎症指標を喘息重症度別に比較し、CRP および Albumin、各種 Cytokine は重症よりも軽症や中等症持続型が高値であり、治療の影響を加味すると、重症に至る前の段階で炎症指標を基にして症状に惑わされず確実に抑制する抗炎症療法を継続することが、重症化の予防に最も重要であると考えられた。なお、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、Nitrite/Nitrate は気道閉塞の指標にも有用である。重症化に関わる炎症細胞の役割の基礎研究により、ヒト好塩基球は IgE を介する M-CSF 産生によりリモデリングや血管新生に関与する可能性が判明した。またリンパ球と気道平滑筋細胞の相互作用についての検討では、気道局所において気道上皮細胞と浸潤してきたリンパ球からの MMP-9、TGF- $\beta$ 1 等の酵素、サイトカイン、ケモカインや多種の炎症細胞が相互に関係して重症難治化する可能性が示唆された。

A. 研究目的

難治性喘息の予防と治療の対策を目的として、臨床と基礎の両面から検討した。(1) JGL2006 等の各ガイドラインを参考にして見直した難治性喘息の臨床（重症度）分類に従って、今年度は気道の炎症指標から重症度基準との関連性を検証した。またかかる病態に重要な役割を果たす気道の炎症細胞の関与については、(2)遅発相の気道局所に集積してアレルギー性炎症の慢性化・重症化に関与していると考えられる好塩基球が、近年アレルギー性炎症のエフェクター細胞としての機能以外に免疫・アレルギー反応の調節作用も担っていることが示唆されている。かかるヒト好塩基球が IL-16 の産生細胞の一つであり、CD4 陽性 T 細胞の浸潤、活性化の増強に寄与していることを平成 18 年度の研究で報告したが、M-CSF は単球・マクロファージの分化や活性化を誘導するサイトカインであり、ヒト単球においては VEGF の産生を誘導し、リモデリングや血管新生に関与することが知られている。そこで、今年度

は好塩基球における M-CSF の発現について検討した。また、(3)ステロイド薬に抵抗性を示す難治性喘息患者の発症機序を解明する目的で、末梢血リンパ球の難治化への関わりを検討してきたが、気道局所での反応をより詳しく解析するため培養気道上皮細胞との相互関係を検討した。

B. 方法

(1) 対象には、表 1 に示す JGL2006 の重症度分類に従う各ステップの喘息患者症例〔軽症間歇型 27 名、軽症持続型 14 名、中等症持続型 17 名、重症持続型 (4a : PSL 内服量 5mg 未満)31 名と(4b : PSL 内服量 10mg 未満)1 名〕の合計 90 名を対象に、既報の方法<sup>1)</sup>により呼気水を採取した。また、健常者 61 名、喫煙者 7 名、上気道感染者 9 名からも呼気水を採取した。気道の炎症指標となる pH（アルゴンガスにより呼気中の CO<sub>2</sub> を除去する前後の双方で測定）、CRP、Alb、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、Nitrite/Nitrate、および各種 Cytokine の測定を行い、試案の難治基準(PSL5mg 以

上/日)を含めた重症度との比較検討を行った。

表1 対象者の内訳

対象	人数	(男/女)
健常者	61	(12/49)
喫煙者	7	(6/1)
上気道感染	9	(0/9)
気管支喘息患者	90	(46/44)
軽症間欠型	27	(13/14)
軽症持続型	14	(7/7)
中等症持続型	17	(8/9)
重症持続型(4a)	31	(17/14)
重症持続型(4b)	1	(1/0)

(2) 既報の如く、悪性リンパ腫や肺癌の治療において末梢血幹細胞移植の目的で採取された幹細胞を豊富に含む末梢血単核球の一部をIL-3 (5ng/ml)の存在下で3週間培養し、immunomagnetic beads (Basophil Isolation Kit, Miltenyi Biotec) を用いた negative selection により高純度(95%以上)の好塩基球を得た。かかる培養好塩基球を用いて、M-CSF の mRNA については RT-PCR により、また蛋白の発現を confocal microscopy ならびに flow cytometry にて検討した。

(3) リンパ球と気道上皮細胞との相互作用の検討：培養気道上皮細胞は図1の実験方法に示すようにセミコンフルエントの状態まで培養し喘息患者末梢血 PBMC と 96 時間 Co-culture した。リンパ球活性化は Flow Cytometry で、サイトカイン、ケモカイン産生パターンを ELISA 法で測定することにより、気道炎症の重要細胞である気管支上皮細胞とリンパ球との相互反応を解析した。今年度は昨年までの MMP-9 の検討に加え気管支喘息の難治化の要因の一つであるリモデリングに関係している TGF- $\beta$ 1 を ELISA 法で測定した。

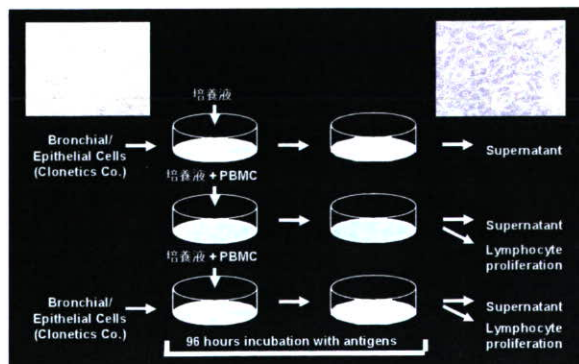


図1. 実験方法

### C.結果

(1) 喘息患者は健常者に比してCRP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Nitrite/Nitrateが上昇しており、有意差はないものの、Albuminは健常者では半数が測定限界以下の値であったのに比し、喘息患者では大半が測定可能で、健常者よりも高い傾向が認められた。また喘息患者における重症度別の比較では、軽症持続型は他の重症度に比し、pHが有意に低く、CRP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Nitrateが有意に高値であり、Albuminは中等症持続型、軽症持続型が他の重症度より有意に高値であった(図2)。Cytokineについては、Th<sub>2</sub>サイトカインをはじめ各種Cytokineの上昇が認められ、軽症持続型あるいは中等症持続型にピークを持つものが多かった(図3)。またH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Nitrite/NitrateはFEV<sub>1</sub>/PEFRと有意の負の相関が認められた(図4)。

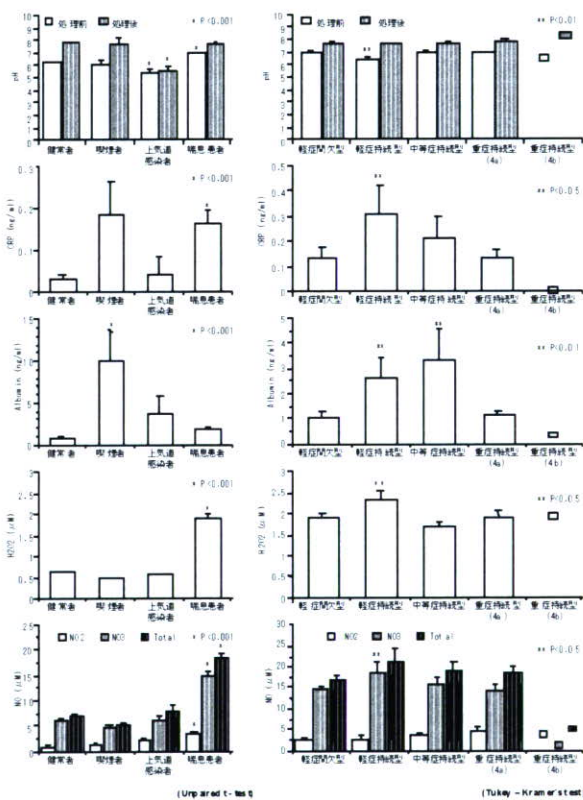


図2. 健常者、喫煙者、上気道感染者並びに喘息患者の重症度別における呼気水中各種成分の測定値について

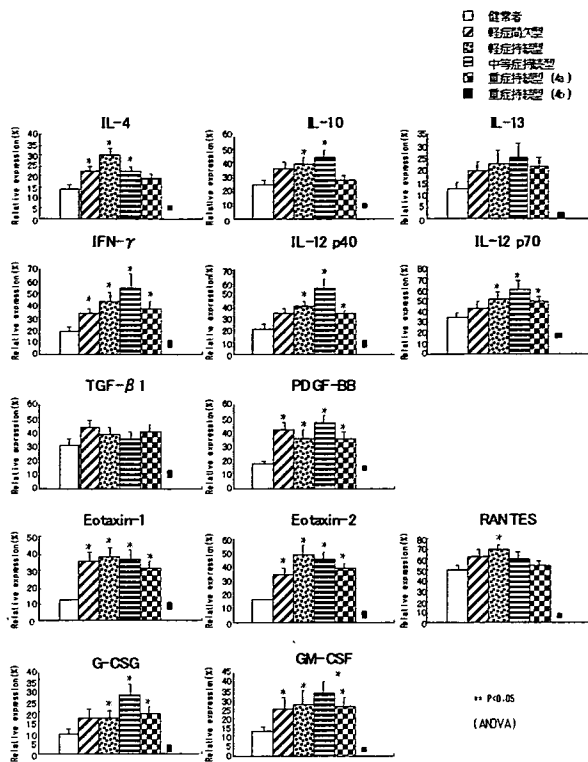


図3. 喘息の重症度（ステップ分類）別にみた呼気水中の各種サイトカイン濃度

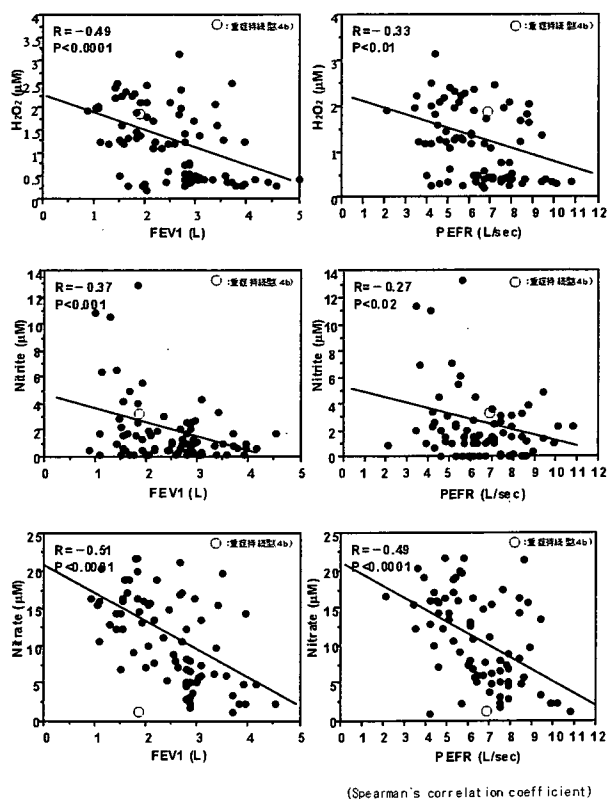


図4. 喘息患者呼気水中の各種成分と肺機能 (FEV1, PEFR) の相関

(2) Gene Chip を用いて培養好塩基球に発現して遺伝子を網羅的に解析した結果、M-CSF 遺伝子が恒常的に発現しており、さらにIgE 刺激によって発現が増強することが示唆された (図 5)。real-time RT-PCR により培養好塩基球における M-CSF の mRNA を定量したところ、その発現が知られている他の細胞株である fibroblast や KU812 と同等あるいはそれ以上の恒常的な発現を認めた。なお、末梢血好塩基球においても同程度の発現がみられた (図 6)。また、IgE 刺激によって培養好塩基球の M-CSF mRNA 発現は増強し、そのピークは刺激後 2 時間であった (図 7)。M-CSF には分泌型と膜型の isoform の存在が知られているが、培養好塩基球には分泌型、膜型、いずれの mRNA も恒常的に発現していた (図 8)。confocal microscopy による検討では培養好塩基球には M-CSF 蛋白も発現していることが確認された (図 9)。2 種類の抗 M-CSF 抗体を用いた flow cytometry による検討では、細胞内ならびに細胞表面における蛋白の発現が認められ、分泌型、膜型両者の M-CSF 蛋白の存在が示唆された (図 10)。

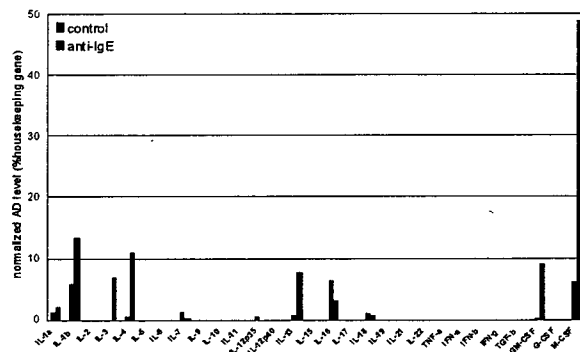


図5 培養好塩基球におけるサイトカインの遺伝子発現 (GeneChipを用いた解析)

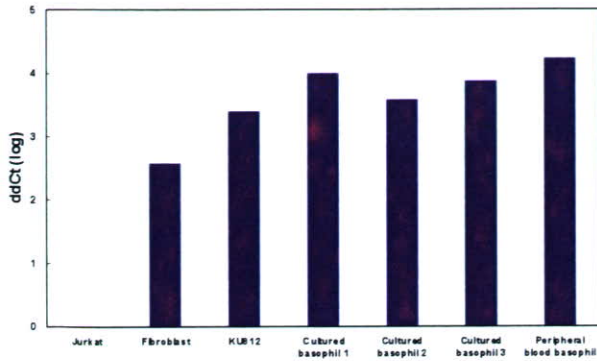


図 6 培養好塩基球におけるM-CSF mRNA 発現 (real-time RT-PCRによる)

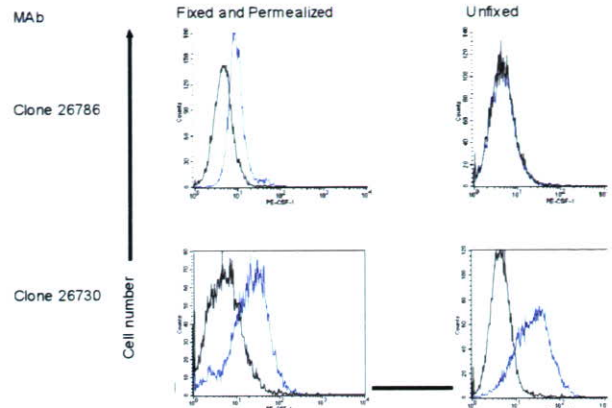


図 10 培養好塩基球における細胞内および細胞表面の M-CSF 蛋白発現

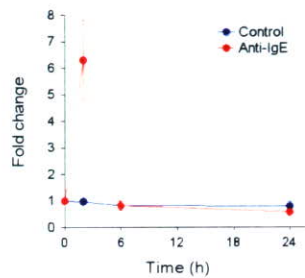


図 7 IgE 刺激による培養好塩基球の M-CSF mRNA 発現増強 (real-time RT-PCRによる)

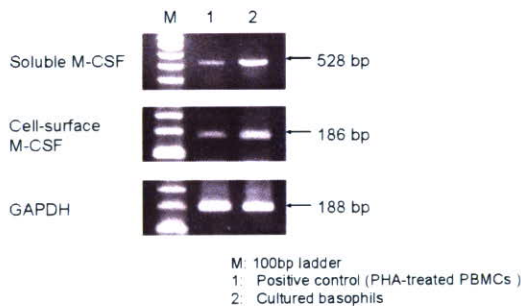


図 8 培養好塩基球における分泌型および膜型 M-CSF mRNA 発現

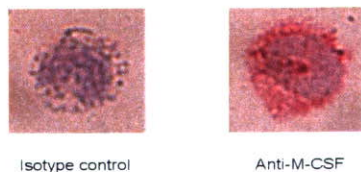


図 9 培養好塩基球における M-CSF 蛋白発現

(3) リンパ球と気道上皮細胞との相互作用の検討: 昨年度は難治性喘息群においてそれ以外の喘息群に比較して培養気管支上皮細胞と喘息患者PBMCとの相互作用でMMP-9の産生が増加していることを示した。しかし、難治性喘息群以外の症例でのMMP-9の産生に重症度による差があることが認められ、今年度は症例数を増やして各治療ステップ毎のMMP-9の産生量を検討した。その結果、図11に示すように喘息患者PBMCからのMMP-9産生能は治療ステップ4の群でもっとも高値を示し、ついで治療ステップ2, 3で、続いて難治性喘息群で高値を示した。しかしながら、喘息患者末梢血PBMCに気管支上皮培養細胞を追加し相互作用を検討すると、MMP-9産生の増加率は難治性でもっとも高値であった。同様に図12にTGF- $\beta$ 1産生に関する結果を示す。TGF- $\beta$ 1では、治療ステップ4でもっとも産生が高値である点はMMP-9産生とも同様の結果であったが、さらにTGF- $\beta$ 1では難治性喘息群でも産生が高値であり、気管支上皮培養細胞を追加した際の相互作用は難治群において顕著であった。



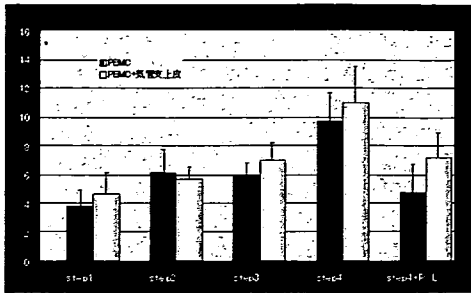


図11. 喘息の重症度（ステップ分類）別にみた培養気管支上皮細胞と喘息患者末梢血単核球から産生される MMP-9 濃度

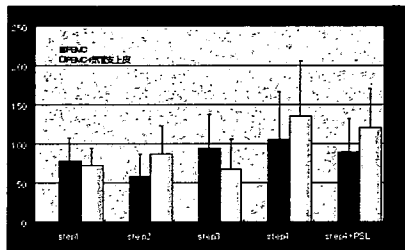


図 12. 喘息の重症度（ステップ分類）別にみた培養気管支上皮細胞と喘息患者末梢血単核球から産生される TGF-β1 濃度

#### D. 考察

(1)呼気水は簡便かつ非侵襲的である為に繰り返しの検査が可能なことと (Sont, J.K. et al. Thorax 1996;51:496) (Wong, H.H. et al. Am J Respir Crit Care Med 1997; 156: 299), 同時に各種炎症指標の測定を行うことが可能な点から、喘息気道病変をモニターする最適な検査法の一つと考えられる。かかる方法を用いて、呼気水による気道の各種炎症指標を喘息重症度別に比較すると、CRP および Albumin, Cytokine は、軽症持続型や中等症持続型が重症持続型 (PSL 投与量が 5mg 未満, 10mg 未満の双方で) よりも高値であるものが多かった。今回検討した喘息患者の大半は吸入ステロイド薬を使用しており、特に重症持続型では PSL の内服を併用している患者もいるなど、各種炎症指標の結果には治療の影響が反映されていることが想定される。従って、重症に至る前の段階にある軽症や中等症の症例においては、炎症指標を基にして症状に惑わされず確実に抑制する抗炎症療法を継続することが、重症化の予防に最も重要であると考えられた。また、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Nitrite/Nitrate は FEV<sub>1</sub>/PEFR と有意の負の相関が認

められたことから、これらの指標は気道閉塞の程度を把握するのに有用であるものと考えられた。

(2) 遅発相の気道局所に集積し、アレルギー性炎症の慢性化・重症化に関与していると考えられている好塩基球が FcεRI を介する反応で M-CSF を産生することを昨年度の研究で明らかにしたが、さらに今年度は培養好塩基球を用いた研究の結果、①分泌型および膜型の M-CSF の mRNA が恒常的に発現していること、②FcεRI 架橋刺激により M-CSF の mRNA 発現が増強すること、③細胞内ならびに細胞表面に M-CSF 蛋白も発現していることが明らかとなった。今後 FcεRI 架橋刺激によって M-CSF 蛋白の細胞表面への発現増強や細胞外分泌がみられるか否かが課題である。ヒト好塩基球は、IgE を介した免疫・アレルギー反応において M-CSF 産生細胞の一つであると考えられ、単球・マクロファージの関与する免疫・アレルギー反応を調節し、リモデリングや血管新生に関与している可能性が示唆された。

(3) 昨年度までのリンパ球と気道上皮細胞との相互作用の検討では、気道上皮細胞とリンパ球を主体とした単核球との相互作用は、難治性喘息でリモデリングに関与していると考えられる酵素 MMP-9 の産生亢進の傾向が認められた。この点を明確にするために、今年度は症例数を増やしなおかつ各治療ステップ毎の群間比較を行ったが、症例数を増やすことによって喘息患者末梢血 PBMC からの MMP-9 産生は治療ステップ 4 で最も高いことが判明した。しかしながら、培養気道上皮との相互反応を検討すると難治性群において MMP-9 の産生増加率が最も高く、気道炎症局所での相互反応は難治性喘息群でもっとも活性化されていることが示唆された。これは、ステロイドの全身投与により末梢血 PBMC の活性化はステップ 4 の重症群に比較して抑制されているが、気道局所では必ずしも抑制しきれていないことが考えられ、喘息の難治化の一つの要因である可能性がある。同様に、線維化に関与が強い TGF-β1 産生能についても検討結果が一致しておりこの推論を強めるものと考えられる。昨年度は、症例数が少ないながらもこれらの一連の反応に対してロイコトリエン受容体拮抗薬のモンテルカストが抑制傾向を示す結果が得られたが、残念ながら今年度はメカニズムの

検討に検体を集中したため追試ができなかった。このため次年度にはこのロイコトリエン受容体拮抗薬の効果判定を行う予定である。

## E. 結論

呼気水検査は簡便、非侵襲的で繰り返しの採取が可能な点から、喘息患者の病態および治療状況の把握が可能であり、気道炎症抑制の指標として有用と考えられた。今後、PSL5mg/日以上10mg/日未満の症例(4 b), PSL10mg/日以上(4 c)の症例数を増やし、PSL5mg/日未満(4a)以下との比較検討を行いたい。

気道のアレルギー反応における炎症細胞の重症化に関わる役割のうち、ヒト好塩基球はIgEを介するM-CSF産生によりモデリングや血管新生に関与する可能性が判明した。またリンパ球と気道平滑筋細胞の相互作用についての検討では、気道局所において気道上皮細胞と浸潤してきたリンパ球からのMMP-9, TGF- $\beta$ 1等の酵素, サイトカイン, ケモカインや多種の炎症細胞の相互関係を介して重症難治化する可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ueno, T. et al. Inflammatory Markers in Exhaled Breath Condensate from patients with Asthma. *Respirology in printing* (2008)
- 2) Ito W, Tanimoto M, Ono K, Mizuno S, Yoshida A, Koga H, Fuchimoto Y, Kondo N, Tanimoto Y, Kiura K, Matsumoto K, Kataoka M, Nakamura T, Gelfand EW, Kanehiro A. Growth Factors Temporally Associate with Airway Responsiveness and Inflammation in Allergen-Exposed Mice. *Int Arch Allergy Immunol* 145: 324-39, 2007.
- 3) Hirano A, Kanehiro A, Ono K, Ito W, Yoshida A, Okada C, Nakashima H, Tanimoto Y, Kataoka M, Gelfand EW, Tanimoto M. Pirfenidone modulates airway

responsiveness, inflammation, and remodeling after repeated challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35: 366-77, 2006.

4) 岡田千春: 注意すべき病態 難治性喘息 そのメカニズムと対策 *呼吸器科*: 11; 518-524, 2007.

5) 岡田千春: 知っておきたい治療のコツ 治療抵抗性喘息へのアプローチ. *Medicina*: 44; 1927-1929, 2007.

### 2. 学会発表

1) 岡田千春, 平野 淳, 木村五郎他: 喘息治療薬の選び方と使い方 高齢者喘息 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会, 横浜, 2007.6

2) 岡田千春, 平野 淳, 木村五郎他: 高齢者喘息・COPD の治療戦略と最近の話題 高齢者喘息の治療戦略 第47回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2007.

3) 岡田千春, 平野 淳, 木村五郎他: 倉敷市における成人喘息の有病率・罹病率及びQOLに関する疫学調査 第57回日本アレルギー学会総会, 横浜, 2007.

4) 岡田千春, 平野 淳, 木村五郎他: 難治性アレルギー疾患における真菌の役割 難治性喘息と真菌 第57回日本アレルギー学会総会, 横浜, 2007.11

5) 谷本 安, 高橋 清, 平野 淳他: 重症喘息の現状 重症喘息の現状と将来へのアプローチ 第57回日本アレルギー学会総会, 横浜, 2007.11

6) 平野 淳, 片岡幹男, 高橋 清他: 気管支喘息患者における呼気凝縮液(EBC)中炎症性パラメーターと重症度, 肺機能 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会, 横浜, 2007.6

7) 谷本 安, 高橋 清, 谷本光音他: 成人発症喘息における危険因子と発症予防の探索 -第2報- 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会, 横浜, 2007.6

8) 上野友愛, 片岡幹男, 高橋 清他: 気管支喘息患者における呼気凝縮液(EBC)中炎症性マーカーと重症度, 肺機能 第19回中国四国臨床アレルギー研究会, 岡山, 2007.8

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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)  
気管支喘息難治・重症化の病因・病態の解明に関する研究  
分担研究総合研究報告書  
平滑筋リモデリング機序の実験的検討

分担研究者 庄司 俊輔 (国立病院機構福岡病院 副院長)

研究要旨

基底膜下への間質コラーゲン・フィブロネクチンの沈着及び平滑筋の肥厚は難治性喘息における気道リモデリングの病理組織学的特徴である。本研究では気管支平滑筋細胞が気道リモデリングに伴い平滑筋から結合組織へと遊走するとの仮説を立て、培養正常ヒト細胞を用いてその遊走機序を検討している。本年度は気管支平滑筋細胞表面に発現しているβインテグリンとしてβ1及びβ2サブユニット、αインテグリンとしてα1, α2, α3, α4, α5及びαvサブユニットを確認した。更に肺線維芽細胞が気管支平滑筋細胞培養上清に対して遊走することも確認した。これらの知見は気管支平滑筋細胞が気道リモデリングに伴い平滑筋から結合組織へと遊走するとの仮説を支持し、その機序を解明することに繋がる。

研究協力者 岡元 孝二 (九州工業大学大学院生命体工学研究科 教授)  
西原 麻千子 (同上 大学院生)

A. 研究目的

難治性喘息患者に見られる気道の構造変化である「リモデリング」は気道が傷害から修復に向かう過程での1つの病態である。気道リモデリングの病理組織学的特徴として、平滑筋の肥厚や基底膜下への細胞外マトリックス蛋白質 (間質コラーゲン、フィブロネクチン) の沈着が挙げられる。このうち平滑筋の肥厚については、平滑筋を構成する平滑筋細胞の増殖及び肥大に起因すると考えられている。一方基底膜下への細胞外マトリックス蛋白質の沈着については、喘息の重症度だけでなく結合組織内のPR2D3免疫陽性/平滑筋αアクチン陰性細胞の増加と相関していることが報告されている (Brewster CE, et al, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 1990)。このPR2D3免疫陽性/平滑筋αアクチン陰性細胞は筋線維芽細胞であろうと考察されている。しかしPR2D3は筋線維芽細胞だけでなく平滑筋細胞にも陽性所見を与えることから、この細胞が平滑筋から遊走した平滑筋細胞である可能性も示唆されてきた。気道平滑筋細胞の遊走に関する報告はこれまで殆ど行われていなかったが、この3~4年増加してきた。

分担研究者はこれまでにヒト正常気管支平滑筋細胞がウシ気管支上皮細胞、ヒト胎児2倍体線維芽細胞株(HFL-1)、ヒト正常肺微小血管内皮細胞、ヒト正常肺線維芽細胞及びヒト正常気管支平滑筋細胞の培養上清や細胞外マトリックス蛋白質であるラミニン、フィブロネクチン、I及びIV型コラーゲンに対して遊走することを報告している。更に正常ヒト肺線維

芽細胞及びヒト正常気管支平滑筋細胞の培養上清については、抗フィブロネクチン抗体を用いたウエスタンブロッティングでバンドを認めている。これらの研究結果は喘息患者の気管支にて平滑筋細胞がリモデリングに伴い上皮細胞・線維芽細胞・血管内皮細胞より産生・放出された細胞外マトリックス等の遊走因子により平滑筋から結合組織へと遊走した後、そこで更に平滑筋細胞遊走因子を産生・放出して近傍の平滑筋細胞を結合組織へと遊走・集簇させる可能性を示している。このうち気管支平滑筋細胞培養上清に対する気管支平滑筋細胞の遊走機構を更に検討したところ、本上清に含まれるフィブロネクチンが気管支平滑筋細胞に対する遊走因子として作用する可能性や、本上清中のフィブロネクチンに対する気管支平滑筋細胞の遊走に関与している受容体がβ1サブユニットを有するインテグリンである可能性が示唆された。そこで本年度は市販のインテグリン解析キットを用い、気管支平滑筋細胞表面に発現しているインテグリンのα及びβサブユニットを検討した。また肺線維芽細胞に対する気管支平滑筋細胞培養上清の遊走活性も検討したので、併せて報告する。

B. 研究方法

正常ヒト気管支平滑筋細胞及び正常ヒト肺線維芽細胞 (瑞国 Lonza 社) を培養した。その後気管支平滑筋細胞は細胞培養上清の採取及びインテグリン発現の解析に使用し、肺線維芽細胞は遊走実験の標的



細胞に使用した。

気管支平滑筋細胞に発現している各種  $\alpha$  及び  $\beta$  インテグリン・サブユニットを Integrin  $\alpha/\beta$ -Mediated Cell Adhesion Array Combo Kit (米国 Chemicon 社) で解析した。本キットは各種インテグリンのサブユニット或いはヘテロダイマーを認識する抗体をプレートウェル底面に結合させたものである。これらのウェルに細胞を同量ずつ播種した後、抗体を介して底面に接着した細胞のみを染色・溶解し吸光度測定 (波長 540 nm) することにより、ウェル抗体に対応するインテグリン・サブユニットの細胞での発現を解析した。

更に気管支平滑筋細胞培養上清に対する肺線維芽細胞の遊走を 48 穴ボイデンチャンバーにより測定した。チャンバーの下室には気管支平滑筋細胞培養上清、上室には  $1 \times 10^6$  cells/ml に調整した肺線維芽細胞の浮遊液を入れ  $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$  条件下で 6 時間インキュベートした。インキュベート終了後、遊走膜の下室側に遊走した細胞のみを Diff-Quik で染色した。この染色細胞を倍率 400 倍に設定した光学顕微鏡にて 10 視野測定し、その合計数を遊走活性とした。

### C. 結果

- 1) 気管支平滑筋細胞上の  $\beta$  インテグリンとして  $\beta 1$  及び  $\beta 2$  サブユニットが発現していた。同細胞上の  $\alpha$  インテグリンについては、 $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5$  及び  $\alpha v$  サブユニットの発現が確認できた。
- 2) 気管支平滑筋細胞培養上清は肺線維芽細胞に対する遊走活性を有していた。肺線維芽細胞に対する本上清の遊走活性は、濃度及び上清回収までの細胞培養時間依存的に上昇した。

### D. 考察

平滑筋細胞は収縮型から合成型へと形質転換することで平滑筋  $\alpha$  アクチンの発現を大幅に減少させると共に、増殖能、遊走能及び細胞外マトリックス産生能を大きく亢進する。また平滑筋細胞の形質転換に伴うこれらの能力の亢進が動脈硬化などの病態形成に寄与することも広く知られている。更にアレルゲン暴露後の喘息患者より採取した気管支生検の電子顕微鏡像において、筋線維芽細胞は平滑筋細胞に似た超微細構造を有するとの報告がある (Gizycki MJ, et al, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 1997)。これらの報告は喘息患者の気管支において、平滑筋細胞が平滑筋から結合組織へと遊走する可能性を支持するものである。

分担研究者はこれまでに気管支平滑筋細胞培養上清にフィブロネクチンが含まれ、これが気管支平滑筋細胞に対する遊走因子として作用すること、気管

支平滑筋細胞培養上清に対する気管支平滑筋細胞の遊走が抗  $\beta 1$  インテグリン抗体による細胞前処理で抑制されることを報告している。更に本年度、この気管支平滑筋細胞表面に  $\beta$  インテグリンの  $\beta 1$  及び  $\beta 2$  サブユニットや  $\alpha$  インテグリンの  $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5$  及び  $\alpha v$  サブユニットが発現していることを確認した。血管平滑筋細胞においては、フィブロネクチンへの遊走に  $\beta 1$  及び  $\beta 3$  インテグリンが関与している可能性が報告されている (Clyman, R.I, et al, *Exp. Cell Res.*, 200, 272-284 (1992))。抗  $\beta 3$  インテグリン抗体による細胞前処理が抗  $\beta 1$  インテグリン抗体による前処理の様に気管支平滑筋細胞培養上清に対する気管支平滑筋細胞の遊走を抑制しなかったのは、遊走細胞上の  $\beta 3$  インテグリン発現が  $\beta 1$  に比べて僅かであることが原因となっているかもしれない。

分担研究者は更に本年度の研究にて、肺線維芽細胞が気管支平滑筋細胞培養上清に対して遊走することも確認した。肺線維芽細胞培養上清にフィブロネクチンが含まれることは既に報告している。気管支のリモデリングにおいて、線維芽細胞は創傷治癒を目的とした上皮方向の遊走だけではなく平滑筋方向にも遊走・集簇し、そこでフィブロネクチンを分泌することで平滑筋細胞の結合組織への遊走を誘導しているかもしれない。

### E. 結論

気管支平滑筋細胞表面にインテグリンの  $\beta 1$  及び  $\beta 2$  サブユニットや  $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5$  及び  $\alpha v$  サブユニットが発現していることを確認した。更に肺線維芽細胞が気管支平滑筋細胞培養上清に対して遊走することを確認した。

### F. 研究発表

1. 論文発表  
無し
2. 学会発表  
・ 気管支喘息のリモデリング形成における平滑筋細胞と線維芽細胞の相互作用  
第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2007 年 11 月)

### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 無し
2. 実用新案登録 無し
3. その他 無し

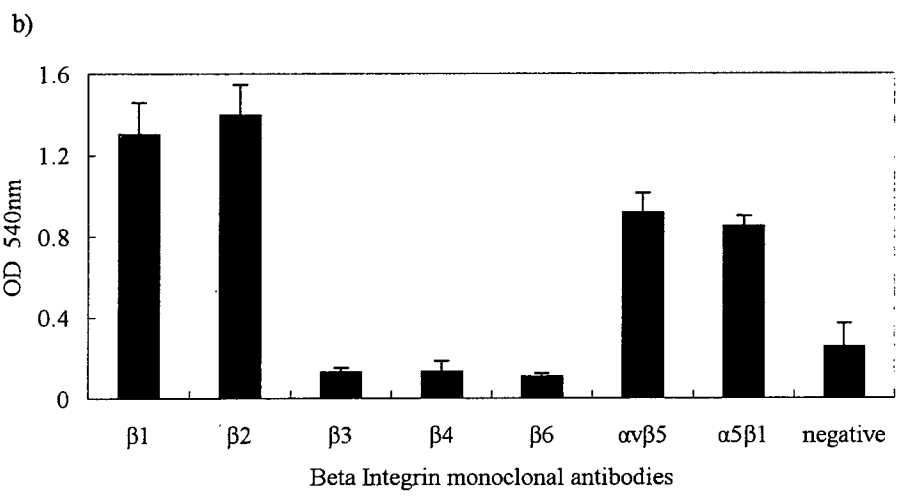
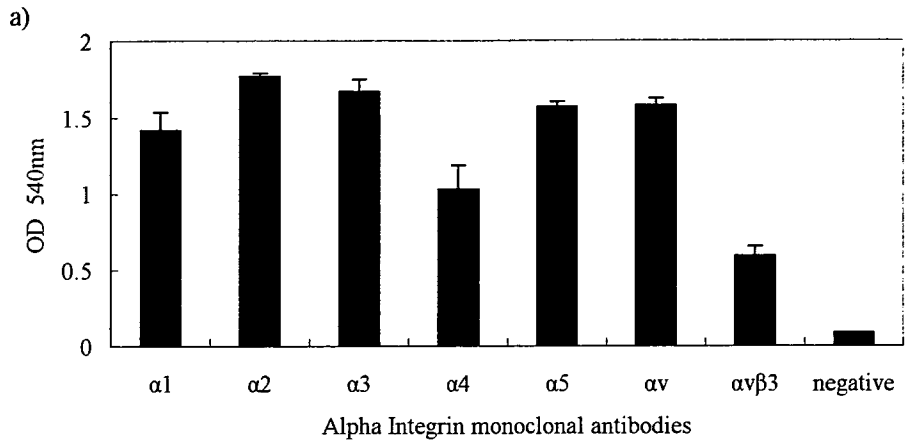


Fig.1 抗体プレートキットによる気管支平滑筋細胞表面のインテグリン解析

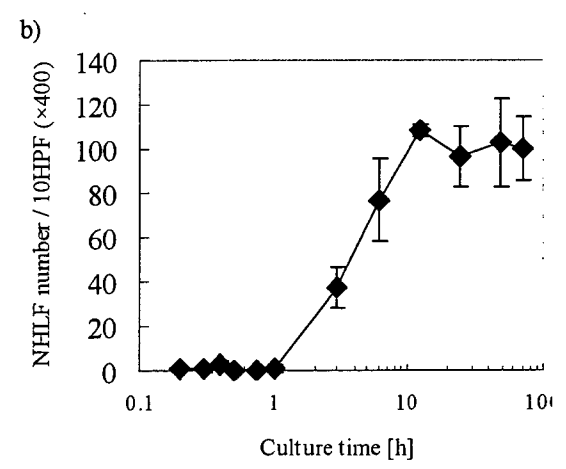
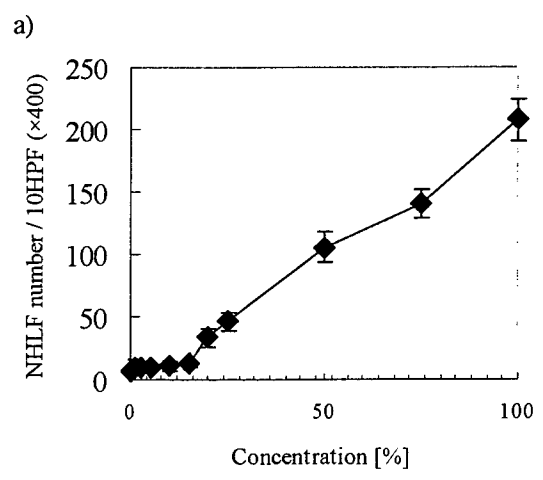


Fig.2 肺線維芽細胞に対する気管支平滑筋細胞培養上清の遊走活性

研究要旨

重症喘息では好中球性炎症が主病像であり、好酸球の関与は少ないと考えられているが、最近では喀痰の好中球数と好酸球由来メディエーター濃度が相関するなどの報告もみられ、両炎症細胞の相互作用が重症化の要因を形成している可能性がある。そこで、本研究ではこの複合型炎症のメカニズムを明らかにするために、好中球由来のプロテアーゼ類が好酸球機能に及ぼす作用を解析した。末梢血から CD16 negative selection 法により分離した好酸球を好中球プロテアーゼであるエラスターゼ、カテプシン G 及び PR3 (proteinase 3) と反応させ、活性酸素産生量をチトクロム C 還元法にて測定した。さらにサイトカイン・ケモカインの産生をビーズアレイシステムにて定量、リアルタイム PCR による遺伝子発現定量も行った。一部の実験ではエラスターゼ阻害薬 sivelestat とセリンプロテアーゼ阻害薬の効果を検討した。その結果、好中球プロテアーゼは好酸球からの活性酸素産生を濃度依存性に誘導、中でもエラスターゼが最も強力であった。さらに、これら 3 種のプロテアーゼはいずれも好中球遊走活性をもつ IL-8, GRO- $\alpha$ 、炎症性サイトカインである IL-6, TNF- $\alpha$  の産生を誘導した。以上の結果は好中球由来のプロテアーゼがそれら自身の組織障害活性に加え、好酸球のエフェクター機能を増強するとともに、好酸球が産生し得る多種のサイトカイン・ケモカインのなかでも、とくに好中球浸潤・活性化に関わる分子の産生を誘導して、好中球→好酸球→好中球という炎症の増悪サイクルに関与している可能性を示すものと考えられた。このような重症化病態に対しては、好中球エラスターゼ阻害薬など好中球を標的とする治療も視野にいれるべきであろう。

A. 研究目的

重症喘息では、正常な炎症終息機構の逸脱により、気道炎症が遷延化した状態が存在するが、この病態は主に 2 つの亜型に分類できると考えられる。高用量のステロイドによっても気道粘膜の著しい好酸球浸潤が制御しがたいタイプと、好中球などの他の炎症細胞浸潤が著しいタイプである。前者については、ステロイド不応となった活性性好酸球の性質を解明することが新規治療開発につながり、好酸球が関与しないかにみえる後者に対しても、早期介入による好酸球制御を行えば、好酸球が誘導するリモデリングや好中球炎症への進展を防ぎ、重症化の予防が可能である。

一方、好中球性炎症が主病像となった重症喘息で好酸球性炎症との相互関係も示唆されている。European network study for understanding mechanisms of severe asthma ( ENFUMOSA ) によると、喀痰中の好中球数と好酸球メディエーター濃度が相関する、すなわち好中球性炎症が好酸球の活性化を引き起こしている可能性がある。好中球

は様々なメディエーターを産生するが、なかでもエラスターゼをはじめとするプロテアーゼ類は感染防御に重要である一方、COPD、急性肺障害などの炎症病態では働く細胞障害性分子として機能する。喘息においても、気管支肺胞洗浄液でのエラスターゼ濃度の上昇が報告されている。そこで本研究では難治性喘息の病態形成に果たす好中球と好酸球の相互作用を明らかにすることを目的として、好中球由来プロテアーゼが好酸球機能に及ぼす作用を検討した。好酸球と好中球の複合的炎症のメカニズム解明によって、難治性喘息に対する新しい治療開発が期待できる。

B. 研究方法

好酸球は正常ボランティアの末梢血から CD16 negative selection 法により精製した。分離した好酸球を各種好中球由来エラスターゼ、カテプシン G 及び PR3 (proteinase 3) と反応させ、活性酸素産生量をチトクロム C 還元法にて経時的に測定した。さらに、この反応系に好中球エラスターゼ特異的阻害

薬である sivelestat sodium hydrate またはセリン  
 エステラーゼ阻害薬 phenylmethylsulphonyl fluoride  
 (PMSF)を加えて、同様に活性酸素産生を検討した。  
 Fluo-3AM を用いて、エステラーゼによる好酸球のカル  
 シウム流入を蛍光分光光度計にて測定した。

サイトカイン産生については、好酸球を前記三種  
 のプロテアーゼ存在下で 24 時間培養した後上  
 清を採取して、ビーズアレイシステム (Luminex; 日  
 立ソフト) により 20 種のサイトカイン・ケモカイン  
 を測定した。IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8,  
 IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and GM-CSF, eotaxin, GRO- $\alpha$ ,  
 IP-10, MCP-1, RANTES, MCP-2, MCP-3, MIP-1 $\alpha$ ,  
 MIP-1 $\beta$ , and MIG である。蛋白産生が認められたサ  
 イトカインについてはそれぞれの遺伝子発現を ABI  
 PRISM 7000 sequence detection system (Applied  
 Biosystems) を用いた定量的 PCR 法によって解析し  
 た。

### C. 研究結果

好中球由来プロテアーゼのうち、エステラーゼと  
 カテプシン G は好酸球から濃度依存的に活性酸素  
 産生を誘導した (図 1)。なかでもエステラーゼが  
 最も強力であり、PR3 は効果を持たなかった。

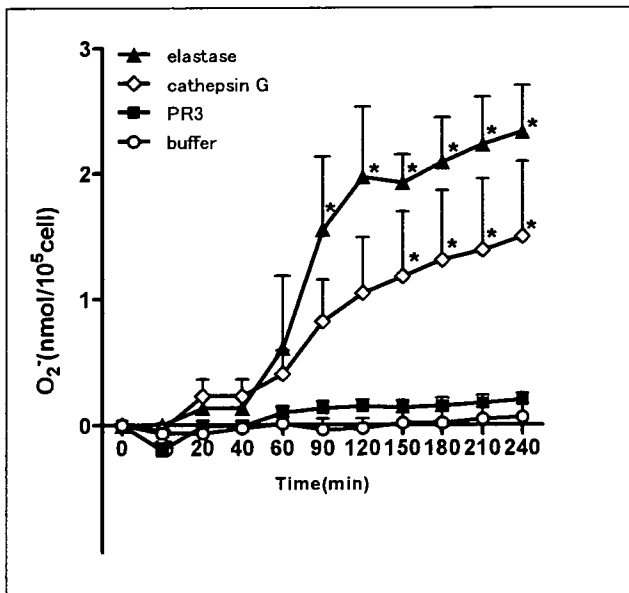


図 1 好中球由来プロテアーゼによる好酸球活性酸素産生

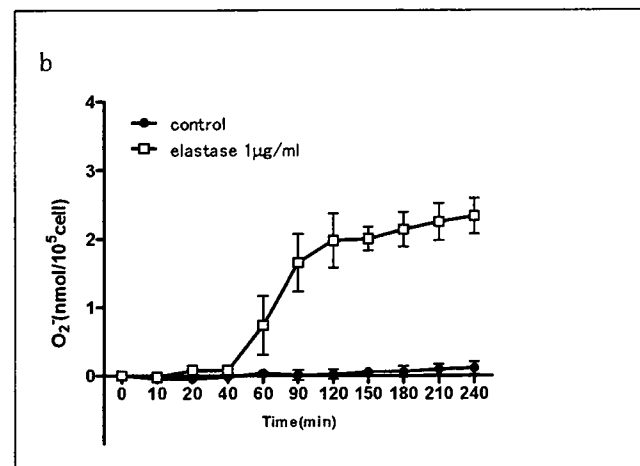
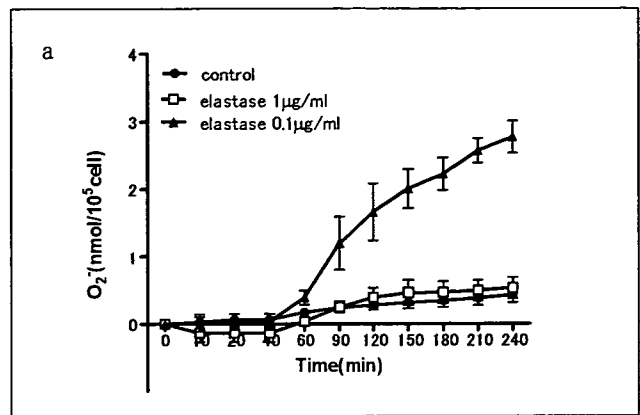


図 2 エラストラーゼによる好酸球活性酸素産生

一方、エステラーゼに対する反応はドナーにより差  
 を認め、図 2 のように、0.1  $\mu$ g/ml が至適濃度の例  
 と 1  $\mu$ g/ml が至適濃度の例が存在した。そこで、以  
 下の検討では、ドナーにより最大の反応を示す濃度  
 を用いることとした。

次に、阻害薬の効果を検討したところ、エステ  
 ラーゼ阻害薬 sivelestat sodium hydrate はエラ  
 スターゼによる好酸球からの活性酸素産生を有意  
 に抑制した (図 3)。

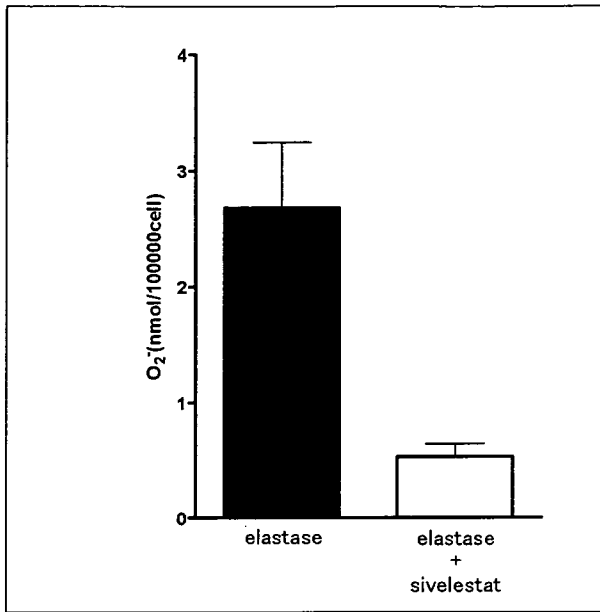


図3 エラスターゼ阻害薬による活性酸素産生抑制

セリンプロテアーゼ阻害薬 PMSF によっても有意な抑制を認めた。PMSF 自体の細胞毒性効果により、低濃度のみで用いたため、抑制作用は部分的であった。実験に用いたエラスターゼをはじめとする好中球プロテアーゼはセリンプロテアーゼであり、好酸球活性化のメカニズムとしては、Protease activated receptor 2 (PAR2)を介するものである可能性が考えられた。

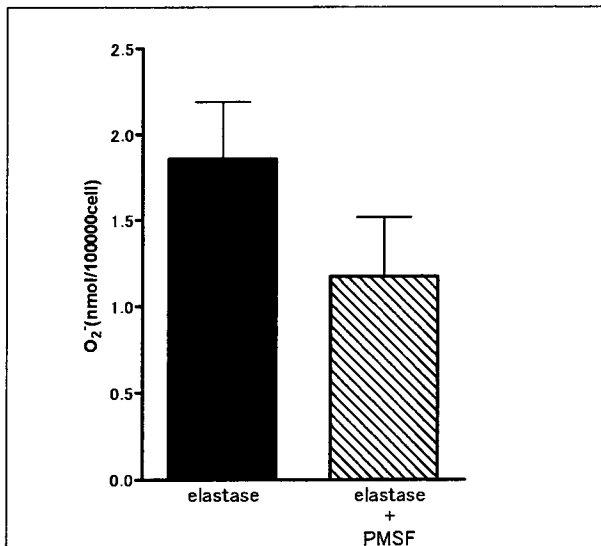


図4 セリンプロテアーゼ阻害薬による活性酸素産生抑制

エラスターゼが好酸球の細胞内カルシウムの上昇

を引き起こすことも確認した。

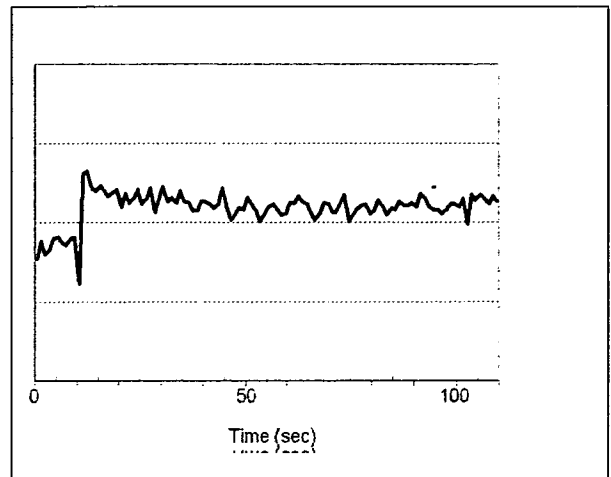


図5 エラスターゼによる細胞内カルシウムの変化

次に、好中球由来プロテアーゼによる好酸球からのサイトカイン及びケモカインの産生誘導作用について検討した。20種類のサイトカイン・ケモカインを同時に測定したが、有意な産生誘導が確認されたのはIL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-8、GRO- $\alpha$ のみであった(図6-9)。

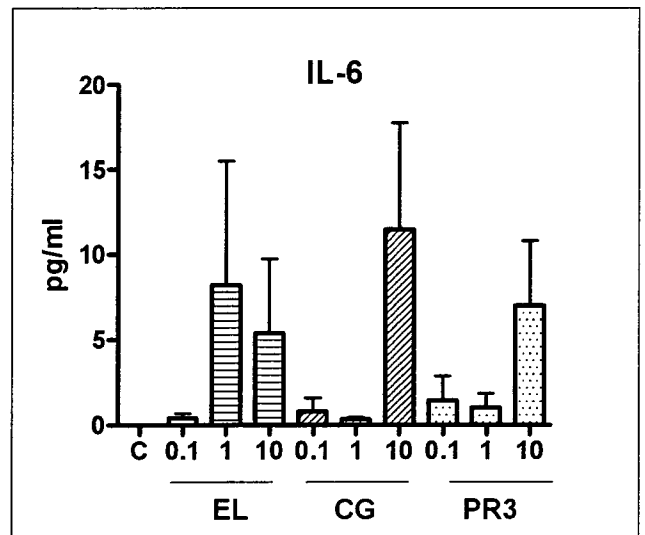


図6 好中球プロテアーゼによる好酸球からのIL-6産生

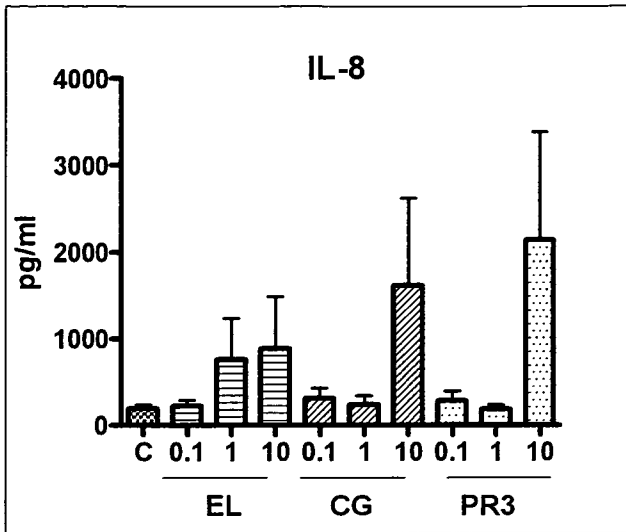


図7 好中球プロテアーゼによる好酸球からのIL-8産生

PR3は活性酸素産生を誘導しなかったにもかかわらず、サイトカインについてはその他のプロテアーゼと同様に産生を誘導した。

それぞれ蛋白が検出されたサイトカイン・ケモカインについては定量的PCR法にて遺伝子発現も確認した。

以上、好中球由来プロテアーゼは好中球の遊走および活性化に関与する分子の産生を特異的に誘導した。

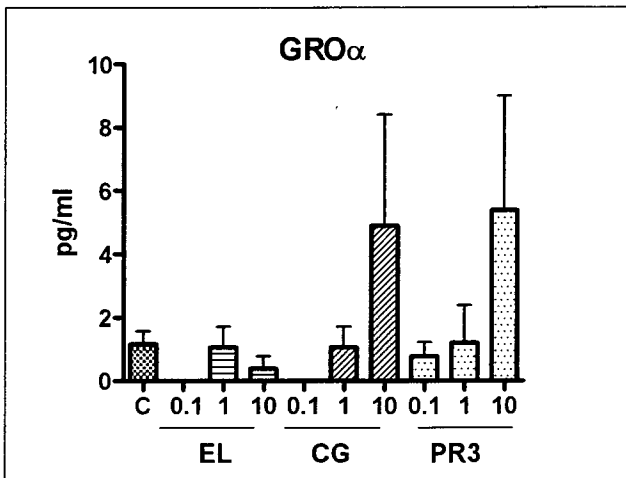


図8 好中球プロテアーゼによる好酸球からのGRO-α産生

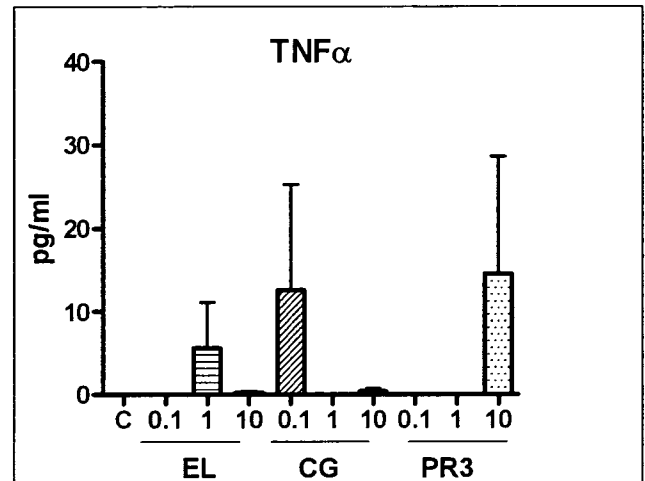


図9 好中球プロテアーゼによる好酸球からのTNF-α産生

### 考察

本年度の研究においては、第一に好中球由来のセリンプロテアーゼが好酸球の主要なエフェクター機能の一つである活性酸素の産生を誘導することを明らかとした。活性酸素は好酸球の組織傷害性メディエーターの中でもっとも重要なものであり、顆粒蛋白のEosinophil peroxidase (EPO)と共同して、蛋白、脂質、核酸などの変性をおこし、細胞機能を障害する。これまでの報告では、IL-5、GM-CSF、固相化IgG、固相化IgAなどが好酸球からの活性酸素産生をおこすとされてきたが、好中球由来メディエーターとくにエラスターゼによる誘導については我々が初めて観察した。これまで認められたTh2サイトカイン環境下だけではなく、好中球浸潤を招くTh1環境によっても好酸球が活性化を受け、組織傷害に関与することが考えられた。

第二には、好中球由来セリンプロテアーゼが好酸球からとくに好中球の活性化と遊走に関与するサイトカイン・ケモカインの産生を誘導することを明らかとした。我々はこれまでの研究でダニ抗原が好酸球に直接作用してIL-9産生を誘導することを報告したが、好酸球がエフェクターとして機能するだけでなく、サイトカイン・ケモカインを産生して、免疫反応の修飾にも関わることを示す。今回の研究では、さらに好中球性炎症の環境下においては、好酸球が好中球由来のプロテアーゼを介して、好中球性炎症をさらに増強させるように機能しえること



を明らかにした。難治性炎症の病態に強く関わりと  
考えられた。

今回検討したプロテアーゼのうち、エラスターゼ  
は最も強力であると考えられたが、ステロイド不応  
性の難治性喘息ではエラスターゼをターゲットと  
した治療を検討すべきと考えられる。現在、臨床で  
用いることができるエラスターゼ阻害薬 sivelestat  
sodium hydrate は全身性炎症反応症候群に伴う急性  
肺障害のみの適応であるが、重症喘息の補助的薬剤  
としての効果も大いに期待できるかもしれない。好  
中球をターゲットとした治療では、すでに抗 TNF-  
 $\alpha$  療法がステロイド依存性の重症喘息に有効であ  
ると報告されている。しかし、この治療では著しい  
臨床効果とともに、結核の再燃など重篤な副作用も  
観察されている。TNF- $\alpha$  は感染防御にも機能するサイ  
トカインであるため、副作用としての易感染性誘  
発をどうしても避けられないのであろう。それに比  
べて、単一メディエーターたるエラスターゼを標的  
とする治療であれば、副作用発症の可能性を大いに  
減らすことが可能である。今後の臨床研究が待たれ  
るところである。

好酸球を介する好中球性炎症のさらなる増強サ  
イクルの存在が示唆される。

#### D. 結論

好中球由来プロテアーゼの好酸球機能に対す  
る作用の解析を行い、難治性喘息の特徴である好  
中球浸潤と好酸球との関連について検討した。好  
中球由来プロテアーゼは好酸球からの活性酸素  
産生とともに、好中球性炎症増強に関与するサイ  
トカイン・ケモカインの産生も誘導した。好酸球  
と好中球の複合的炎症が喘息難治化機序のひと  
つである可能性は高い。今後、好中球由来エラス  
ターゼを標的とした治療についても検討を進め  
るべきと考えられた。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文

- 1) 藤澤隆夫：小児アレルギー疾患における免疫調  
節療法の展望：スギ花粉症の急速減感作療法  
日本小児アレルギー学会誌 21(1):21-27, 2007
- 2) 藤澤隆夫：好酸球の基礎知識 呼吸器 common

disease の診療 気管支喘息のすべて p32-33 工  
藤翔二 監修 文光堂 (東京), 2007

- 3) 藤澤隆夫：炎症メディエーター 総合臨床  
56(5)1813-1820, 2007
- 4) 藤澤隆夫：学会サテライト聴講録 米国アレルギー・喘息・免疫学会 2007. International  
Review of Asthma 9(3):70-81, 2007
- 5) 藤澤隆夫：吸入ステロイドは喘息を治癒させる  
か？：2007 年の視点. 日本小児アレルギー学会  
誌 2007;21:169-180.
- 6) 長尾みづほ、藤澤隆夫 外来における喘息診療  
発作の外来治療 小児科診療 70  
(8):1242-1246, 2007
- 7) 藤澤隆夫：小児における気管支喘息とアレルギー  
性鼻炎との関わり ENTONI 82:47-54, 2007
- 8) 藤澤隆夫：好酸球増多性疾患について：好酸球  
研究の進歩から アレルギーの臨床 27(9):16,  
2007
- 9) Hiraguchi Y, Nagao M, Hosoki K, Fujisawa T.  
Neutrophil proteases activate eosinophil  
function *in vitro* Int Arch Allergy Immunol  
(in press)

##### 2. 学会発表

- 1) 藤澤隆夫 シンポジウム「ライフスパンからみ  
たアレルギーの特徴と治療」思春期 第 15 回小  
児臨床薬理・アレルギー・免疫研究会  
2007. 1. 27-28 (東京)
- 2) Masuda S, Fujisawa T, et al. High Prevalence  
of Sensitization to Japanese Cedar Pollen and  
House Dust Mite in Young Children in Japan.  
2007 Annual Meeting of American Academy of  
Allergy, Asthma and Immunology, San Diego,  
USA, March 3-7, 2007 J Allergy Clin Immunol  
119(1):s224, 2007
- 3) Noma Y, Nagao M, Fujisawa T Exhaled nitric  
oxide decreases during acetylcholine-induced  
bronchoconstriction in children with asthma.  
2007 Annual Meeting of American Academy of  
Allergy, Asthma and Immunology, San Diego,

USA, March 3-7, 2007 J Allergy Clin Immunol  
119(1):s87, 2007

- 4) Nagao M, Katsunuma T, Kim CK, Fujisawa T.  
Efficacy and safety of intravenous  
aminophylline in children with acute  
exacerbation of asthma: A multicenter  
randomized trial. 2007 Annual Meeting of  
American Academy of Allergy, Asthma and  
Immunology, San Diego, USA, March 3-7, 2007  
J Allergy Clin Immunol 119(1):s2, 2007
- 5) 長尾みづほ、藤澤隆夫、他；入院による食物経  
口負荷試験のシステム作りについて. 第110回  
日本小児科学会学術集会 2007. 4. 21 京都. 日  
本小児科学会雑誌 111(2):273, 2007
- 6) 長尾みづほ、藤澤隆夫；思春期における吸入ス  
テロイド中止後経過の検討. 第15回臨床喘息研  
究会 2007. 10. 20 札幌.
- 7) 長尾みづほ、藤澤隆夫 他；思春期における吸  
入ステロイド中止後経過の検討. 第57回日本ア  
レルギー学会秋期学術大会 2007. 11. 1-3 横浜.

F. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

研究協力者

野間雪子（国立病院機構三重病院臨床研究部）  
長尾みづほ（国立病院機構三重病院臨床研究部）

厚生労働科学研究補助金（研究事業）

分担研究報告書

気管支喘息の難治化の病態・機序の解明と難治化の予防・治療法の開発に関する研究

分担研究者	相 沢 久 道	久留米大学医学部呼吸器・神経・膠原病内科教授
研究協力者	井 上 博 雅	九州大学呼吸器科准教授
	星 野 友 昭	久留米大学医学部呼吸器・神経・膠原病内科講師
	川 山 智 隆	久留米大学医学部呼吸器・神経・膠原病内科講師
	木 下 隆	久留米大学医学部呼吸器・神経・膠原病内科
	今 岡 治 樹	久留米大学医学部呼吸器・神経・膠原病内科

研究要旨

喘息の難治化因子としては様々なものがあげられている。その中に、他疾患の合併や併存により喘息が悪化することが知られている。それらの疾患の中で特に多いものとして、COPD とアレルギー性鼻炎があげられる。そこで、今回 COPD とアレルギー性鼻炎の喘息に対する影響を検討した。その結果 1) 既に ICS+LABA で治療されているにもかかわらず重症である喘息患者において、長時間作用性抗コリン薬は呼吸機能を改善し、また長期間にわたって呼吸機能、自覚症状、気管支拡張薬の頓用回数を有意に改善した。2) 喘息患者のアレルギー性鼻炎合併率は約 50%であった。合併群では、鼻症状と喘息症状との間に有意の相関が見られた。また、鼻症状の悪化に伴い喘息症状も有意に悪化した。これらの成績より以下の結論が考えられた。1) COPD 合併が難治化因子となっている患者には、長時間作用性抗コリン薬の投与は有用である。2) アレルギー性鼻炎合併喘息患者では、アレルギー性鼻炎の治療により喘息も改善する可能性がある。

A. 研究目的

喘息の難治化因子としては様々なものがあげられている。その中に、他疾患の合併や併存により喘息が悪化することが知られている。それらの疾患の中で特に多い物として、COPD とアレルギー性鼻炎があげられる。そこで、今回 COPD とアレルギー性鼻炎の喘息に対する影響を検討した。

Study 1: 喘息死の 85%は 65 歳以上の高齢者であること、喘息・COPD ともに高齢者に多

い疾患であること、COPD 合併は喘息の増悪因子になること、などから COPD 合併喘息のコントロールは重要である。そこで今回、重症喘息に対して長時間作用性抗コリン薬の効果を検討した。

Study 2: 成人喘息患者の 70~80%は鼻炎や鼻過敏性亢進を合併していること、鼻炎患者の 30~40%は喘息を合併していること、アレルギー性鼻炎は喘息に先行することが多く、アレルギー性鼻炎は喘息の危険因子であ

ること、などが知られている。そこで今回、鼻炎合併喘息患者において、鼻炎の治療により喘息症状も改善するかを検討した。

## B. 方法

以下の2つの検討を行った。

Study 1: COPD を合併している重症喘息に対して長時間作用性抗コリン薬の効果を検討した。対象として、BDP  $\geq$  1200  $\mu\text{g}/\text{d}$  + LABA 使用していてもコントロール不良の喘息+COPD 患者で、喘息発作の病歴、可逆性、喘息の加療歴、喀痰中好酸球増多歴、喫煙歴 ( $\geq$  20 pack-year)、post-bd- $\text{FEV}_1/\text{FVC} < 70\%$ 、 $\% \text{DLco} < 80\%$ 、HR-CT にて LAA のある患者を選択した。n = 20 (平均年齢 64.6 歳、13 例はテオフィリン併用中)

1) 急性効果として、Double blind, Crossover にて Placebo または Tiotropium 18  $\mu\text{g}$  を投与し、 $\text{FEV}_1$ 、 $\text{FVC}$ 、 $\text{PEFR}$ 、 $\text{IC}$  を測定した。

2) 長期効果: Open-label にて Tiotropium 18  $\mu\text{g}$  od, 12 weeks 投与し、 $\text{FEV}_1$ 、 $\text{FVC}$ 、 $\text{PEFR}$ 、 $\text{IC}$ 、喘息症状、PFR 自己測定、short-acting  $\beta_2$ -agonist の使用頻度、COPD 症状 (MMRC) を評価した。

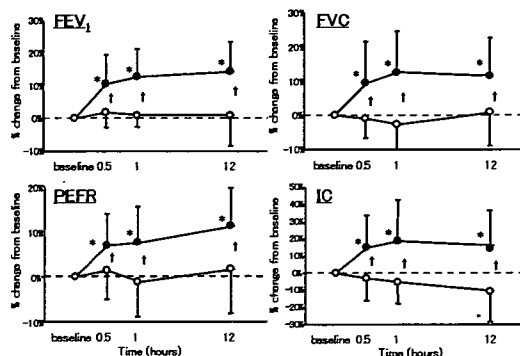
Study 2) 鼻炎の症状と喘息症状は関連するか、鼻炎の治療により喘息症状も改善するかを、九州沖縄地区 217 施設を対象に患者アンケート調査を実施した。調査項目には、喘息症状と治療内容、アレルギー性鼻炎の有無とその症状・治療内容を含む。2 回以上実施出来た患者では、その経過と治療内容も検討した。アンケート実施例数は 3270 例で、アンケート解析例数は 3014 例であった。

## C. 研究結果

Study 1:

①急性効果; 図 1. 高用量 ICS+LABA 併用中

の喘息+COPD 患者における Tiotropium add-on 療法



②長期効果; 図 2. 高用量 ICS+LABA 併用中の喘息+COPD 患者における Tiotropium add-on 効果

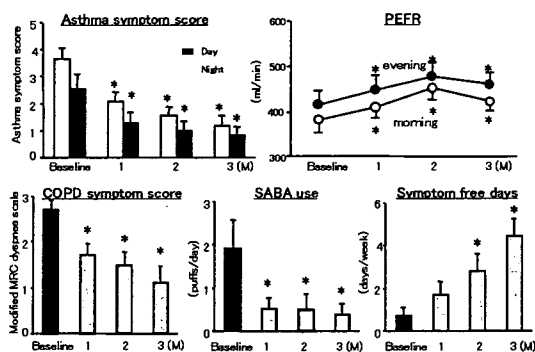
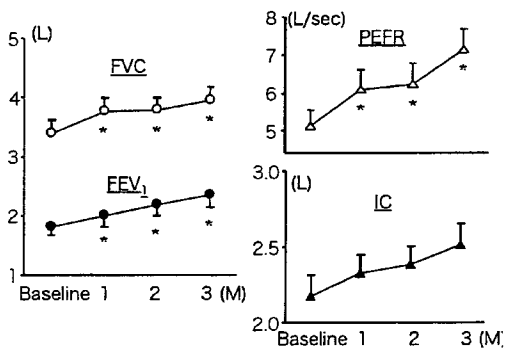


図 3. 高用量 ICS+LABA 併用中の喘息+COPD 患者における Tiotropium add-on 効果



Study 2: 福岡県 55 施設、佐賀県 21 施設、大分県 17 施設、長崎県 52 施設、熊本県 21 施設、宮崎県 30 施設、鹿児島県 14 施設、沖縄

県7施設で行った。

図4. 患者背景 (n=3014)

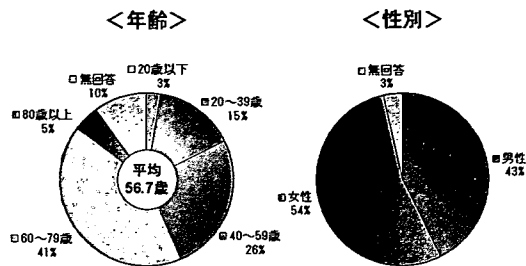


図5. 気管支喘息とアレルギー性鼻炎合併例の解析対象

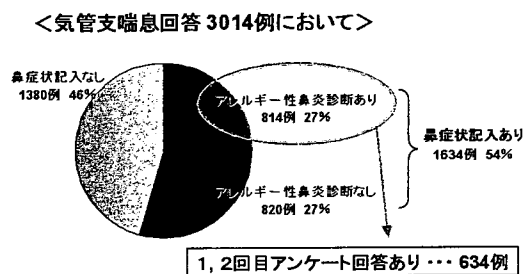


図6. 鼻の調子と喘息の調子の関係

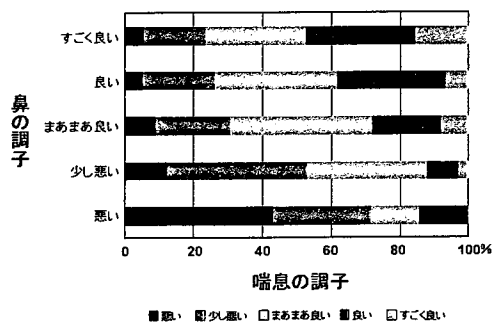


図7. 鼻症状の程度と喘息の調子の関係

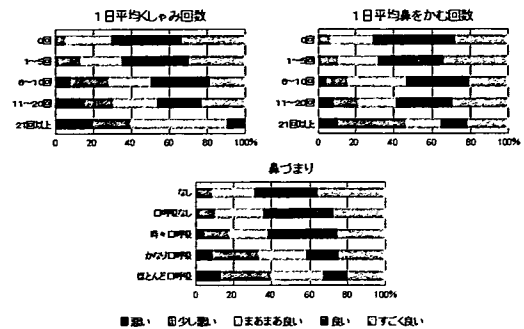
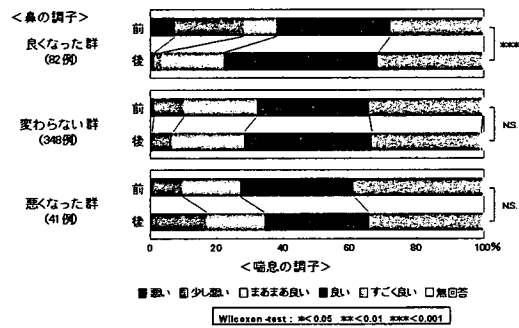


図8. 鼻の調子の変化と喘息の調子の変化の関係



D. 考察

Study 1: 既に ICS+LABA で治療されているにもかかわらず重症である喘息患者において、長時間作用性抗コリン薬は呼吸機能を急性に改善し、また長期間にわたって呼吸機能、自覚症状、気管支拡張薬の頓用回数を有意に改善した。

Study 2: 3270 例中解析可能例数は 3014 例であり、アレルギー性鼻炎合併率は約 50%であった。合併群では、鼻症状と喘息症状との間に有意の相関が見られた。また、鼻症状の悪化に伴い喘息症状も有意に悪化した。

これらの成績より、

1) COPD 合併が難治化因子となっている喘息患者に対する、長時間作用性抗コリン薬の投与は臨床的に有用である。

2) アレルギー性鼻炎合併喘息患者では、ア

アレルギー性鼻炎の治療により喘息も改善する可能性があると結論づけられた。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

1. Hoshino T, Kato S, Oka N, Imaoka H, Kinoshita T, Takei S, Kitasato Y, Kawayama T, Imaizumi T, Yamada K, Young HA, Aizawa H. Pulmonary inflammation and emphysema: role of the cytokines IL-18 and IL-13. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007, 176(1):49-52.
2. Koga T, Fujimoto K, Aizawa H. Effect of smoking on lifestyle interventions to prevent diabetes. *Lancet.* 2007;369:365; author reply 365-366.
3. Kinoshita T, Hoshino T, Imaoka H, Ichiki H, Okamoto M, Kawayama T, Yodoi J, Kato S, Aizawa H. Thioredoxin prevents the development and progression of elastase-induced emphysema. *Biochim. Biophys. Res Commun.* 2007;354:712-719.
4. Aizawa H. 3. COPD: non-pharmacologic treatment. *Internal medicine (Tokyo, Japan).* 2007;46:85-86.
5. Azuma K, Komohara Y, Sasada T, Terazaki Y, Ikeda J, Hoshino T, Itoh K, Yamada A and Aizawa H. Excision repair cross-complementation group 1 predicts progression-free and overall survival in non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Cancer Sci.* 2007, 1-8.
6. Fujiki R, Kawayama T, Ueyama T, Ichiki M, Aizawa H. The risk factors for mortality of community-acquired

pneumonia in Japan. *Infect Chemother.* 2007;13(3):157-165.

7. Imaoka H, Hoshino T, Takei S, Sakazaki Y, Kinoshita T, Okamoto M, Kawayama T, Yodoi J, Kato S, Iwanaga T, Aizawa H. Effects of thioredoxin on established airway remodeling in a chronic antigen exposure asthma model. *Biochim. Biophys. Res Commun.* 2007, 360(3):525-530.
8. Chen M, Hisatomi Y, Furumoto A, Kawasaki K, Masaki H, Nagatake T, Sueyasu Y, Iwanaga T, Aizawa H. Oishi K. Comparative Immune Responses of Patients with Chronic Plmonary Diseases during the 2 Year Period after Pneumococcal Vaccination. *Clinical and Vaccine Immunology.* 2007, 14(2):139-145.
9. Miura S, Kusumoto M, Noda K, Azuma K, Toda R, Honda S, Ayabe M, Aizawa H. Taniwaki T. Bell-shaped sensory impairments of all modalities in a neurosarcoidosis patient. *Clin Neuro Neurosurg.* Inpress.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし