

4 (n=30)を比較すると、FeNO (図4: 26.0 ± 4.2 vs 42.6 ± 6.9 ppb), IL-1ra (図5: 0.24 ± 0.11 vs 1.03 ± 0.34 pg/ml), IL-1 β (図6: 0.09 ± 0.03 vs 0.13 ± 0.03 pg/ml)がStep4で高値傾向を示した。IP10には有意差を認めなかった(図7)。VEGF(図8: 0.03 ± 0.06 vs 0.02 ± 0.01 pg/ml)はStep4で有意に低値であった。TC症例の特徴として、VEGF高値、IL-1 β 低値が示唆された。

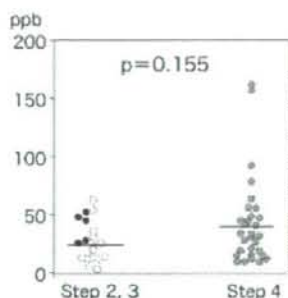


図4. 呼気NO濃度 (●: TC症例)

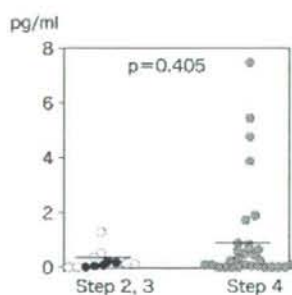


図5. 呼気凝縮液 IL-1ra 濃度 (●: TC例)

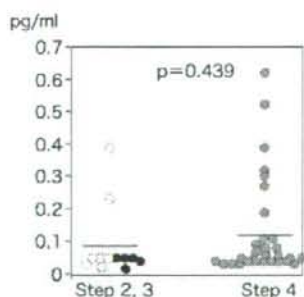


図6. 呼気凝縮液 IL-1β 濃度 (●: TC例)

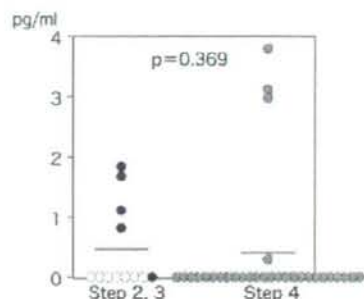


図7. 呼気凝縮液 IP10 濃度 (●: TC症例)

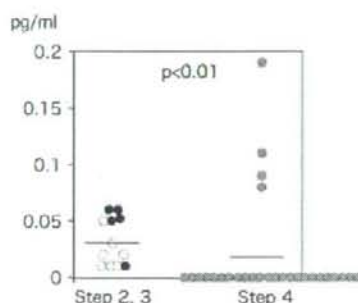


図8. 呼気凝縮液 VEGF 濃度 (●: TC例)

(平成20年度)

(1) 低用量 ICS (フルチカゾン 200 μ g 相当)+気管支拡張薬で3ヶ月間 TC を達成している6例において、気管支拡張薬を中止した。中止後も5例で TC、1例で Well Control (WC) を達成した。中止前後で、FeNO や EBC 中の各種液性因子濃度に有意な変化は認めなかった。

(2) 低用量 ICS 単独治療で3ヶ月間 TC を達成している7例において、ICS を中止した。中止後3ヶ月までの時点で、4例が増悪して治療を再開し、3例が TC を維持した(図9)。増悪までの中間期間は5週(1-15週)であった。増悪しても、救急/予定外受診は無く、ICS 再開と SABA 屯用で改善した。

ICS 中止時の FeNO は、増悪群では TC 達成例に比して高値傾向であった(図10: 70.4 vs 21.1 ppb, $p=0.07$)。一部に overlap も認められたが、中止時に 50 ppb を超えている例では全例増悪した。増悪例では、ICS 中止後に FeNO は増加傾向を示し、FeNO 増加は症状増悪に先行していた(図11)。そこで、中止時あるいは中止後2週の FeNO 値のうち高値をとった FeNO について、cut off を 50 ppb とすると増悪例を全例予測できた(図12)。

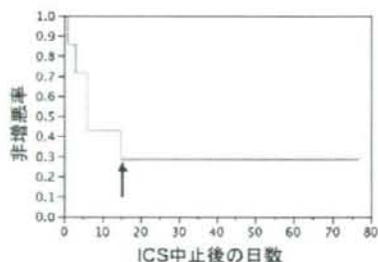


図9. ICS 中止後、増悪までの期間

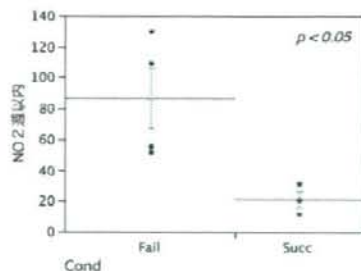


図12: ICS 中止時および2週後のうち高値をとった FeNO
Fail: 増悪群, Succ: 成功群

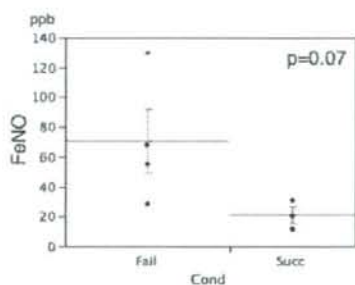


図10. ICS 中止時の FeNO
Fail: 増悪群, Succ: 成功群

EBC の検討では、ICS 中止時の各因子濃度において、増悪/成功群で群間有意差はなかった。コントロール良好時に高値傾向をとることを以前示した IP10 は、増悪/成功群とも測定可能であったが、群間有意差を認めなかった (図 13)。同様にコントロール良好時に高値傾向をとることを以前示した VEGF は、群間有意差は認めなかったが、低値例では 2 例とも増悪した (図 13)。その他のマーカーとしては、コントロール不良時に高値傾向をとることを以前示した、IL-1 β 、IL-1ra は、増悪/成功群ともに低値であり、有意差を認めなかった。

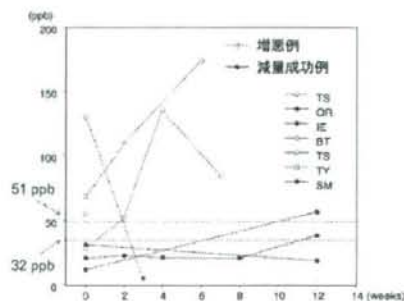


図11. ICS 中止後の FeNO の時間経過

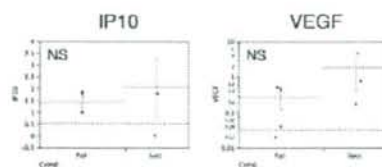


図13. ICS 中止時の EBC 中液性因子

D. 考察

平成 18 年度には、成人気管支喘息患者を対象とした、治療ステップダウンの方策を確立するための病態評価の手段として、EBC 中の測定可能なターゲットのスクリーニングを行った。VEGF を含む複数の分子が評価可能であることが判明した。

平成 19 年度には、重症度別の FeNO や EBC 中液性因子濃度の比較を行い、IP10 : TC > 非 Step 4 =

Step 4, VEGF : TC > 非 Step 4 > Step 4, IL-1β : TC < 非 Step 4 < Step 4 の傾向を得たことから、TC 症例の特徴として、IP10 高値、VEGF 高値、IL-1β 低値が示唆された。

これらの結果をふまえ、平成 20 年度には、ICS 中止時の気道炎症マーカーで増悪を予測可能かどうか検討した。増悪/成功群を比較すると、EBC では群間有意差を認めた指標はなかったものの、前年度までの検討で、TC 症例で高値傾向をとることが示された VEGF については、低値であった 2 例は ICS 中止後に増悪した (図 13)。

一方 ICS 中止時の FeNO は、増悪群では成功群に比較して高値傾向をとり、50 ppb を超えていれば全例で増悪したが (図 10)、overlap も認められた。しかし、ICS 中止後 2 週の FeNO 値も検討し、中止時と 2 週後のうち、高値である方の FeNO 値を採用すれば、増悪群を Cut off 50 ppb で鑑別できた (図 12, $p < 0.05$)。

既報では、小児における ICS 中止後の再発予測因子として、中止後 4 週の FeNO 49 ppb を cut off として提唱している。しかしながら、FeNO は年齢と共に上昇することが報告されており、成人における検討が必要である。また、今回 2 例が中止後 1 週、3 週で各々増悪したことから、4 週より早期に FeNO をモニターすることも必要と考えられる。この点で、今回中止 2 週後の FeNO も検討し、50 ppb を超えた時点で ICS 再開を検討する方針が示唆されたことは、有意義な知見と考えられた。

E. 結論

3 年間にわたる本分担研究では、1) EBC 中の複数の液性因子が Luminex システムを用いて測定可能なこと、2) 喘息コントロール状態と気道炎症マーカーとの関連については、TC 症例の特徴として、IP10 高値、VEGF 高値、IL-1β 低値が示唆されたこと、3) ICS 中止可能性を予測するための気道炎症マーカーとして、FeNO および EBC 中液性因子濃度を検討したが、即時性、感度/特異度を考慮すると FeNO の優位性が示唆されたこと、などの成果を得た。

これらの総括として、ICS 中止を考慮したとき、FeNO > 50 ppb では ICS 継続を考慮し、中止した場合でも 2 週後に FeNO をモニターし、50 ppb を超えるようなら ICS 再開を考慮する診療モデルが提唱された。FeNO 測定は比較的簡便であり、即時に

結果が得られるため、日常臨床でも十分応用可能であると考えられた。今後も実際の診療へ応用するために、症例を増やして検討し、できるだけ簡便な診療モデルを構築していきたいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

【英文論文】

1. 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 S1:28-34, 2006.
2. Okugawa S, Yanagimoto S, Tsukada K, Kitazawa T, Koike K, Kimura S, Nagase H, Hirai K, Ota Y: Bacterial flagellin inhibits T cell receptor-mediated activation of T cells by inducing suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1). *Cell Microbiol* 8(10):1571-80, 2006.
3. Adachi T, Hanaka S, Masuda T, Yoshihara H, Nagase H, Ohta K: Transduction of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 into eosinophils attenuates survival, chemotaxis, and airway inflammation. *J Immunol*. 2007;179:8105-11.
4. Tashimo H, Yamashita N, Ishida H, Nagase H, Adachi T, Nakano J, Yamamura K, Yano T, Yoshihara H, Ohta K: Effect of procaterol, a beta2 selective adrenergic receptor agonist, on airway inflammation and hyperresponsiveness. *Allergol Int* 2007;56:241-7.
5. Suzukawa M, Iikura M, Koketsu R, Nagase H, Tamura C, Komiya A, Nakae S, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Yamaguchi M: An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor. *J Immunol* 181(9):5981-9, 2008.
6. Suzukawa M, Koketsu R, Iikura M, Nakae S, Matsumoto K, Nagase H, Saito H, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Yamaguchi M: Interleukin-33 enhances adhesion, CD11b expression and survival in human eosinophils. *Lab Invest* 88(11):1245-53, 2008.

【和文論文】

1. 長瀬洋之, 野田幸一, 吉原久直, 山村浩一, 矢野智湖, 植木重治, 石田博文, 大林王司, 中島幹夫, 足立哲也, 山口正雄, 大田 健: ウイルス

性気道感染におけるマスト細胞の生体防衛的役割の検討 呼吸 26 (2S): S13-S15, 2007.

2. 学会発表

【国際学会】

1. Nagase H, Yamashita N, Adachi T, Nakano J, Ohta K: Toll-like Receptor 3 (TLR3) Ligand Exacerbates Pre-existing Allergic Airway Inflammation in Murine Asthma Model, 63rd American Academy of Allergy Asthma & Immunol Annual Meeting (AAAAI), Miami, USA, March, 2006.

2. Nagase H, Noda K, Yamaguchi M, Yoshihara H, Yamamura K, Yano T, Ueki S, Ishida H, Ohbayashi O, Nakajima M, Adachi T, Ohta K: Diminished Airway Inflammation against Double-stranded RNA in Mast Cell-Deficient Mice. 64th AAAAI, San Diego, USA, Feb, 2007.

3. Yano T, Nagase H, Nakano J, Yoshihara H, Yamamura K, Ueki S, Ohbayashi O, Nakajima M, Adachi T, Ohta K: The Effect of Proton Pump Inhibitor on the Exhaled Breath Condensate pH and QOL in QUEST Questionnaire-Positive Asthmatics. 64th AAAAI, San Diego, USA, Feb, 2007.

4. Nagase H, Takano H, Inoue K, Hara A, Kojima Y, Suzukawa M, Kuramochi M, Ishida H, Adachi T, Suzuki N, Ohta K: The Effect of Diesel Exhaust Particles on Pathogen-associated Molecular Patterns-induced Cytokine Generation from Bronchial Epithelial Cells. 2009 AAAAI, Washington DC, USA, March, 2009.

5. Hara A, Nagase H, Kojima Y, Suzukawa M, Kuramochi M, Ishida H, Adachi T, Suzuki N, Ohta K: The relationships between the levels of cytokines and chemokines in exhaled breath condensate and the control status of asthma. 2009 AAAAI, Washington DC, USA, March, 2009.

【国内学会】

1. 長瀬洋之, 大田 健: シンポジウム 9: アレルギー性炎症病態の多様性: Toll-like receptor によるアレルギー性炎症の調節 第 18 回日本アレルギー学会春期臨床大会 東京 2006 年 6 月

2. 長瀬洋之, 大田 健: シンポジウム 7: アレル

ギー治療戦略の基礎的検証: Toll-like 受容体を標的としたアレルギー治療戦略

第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会 横浜 2007 年 11 月

3. 長瀬洋之, 山下直美, 榎澤伸之, 足立哲也, 山口正雄, 小林信之, 庄司俊輔, 塩原哲夫, 棟方充, 西村正治, 近藤直実, 大田 健: 喘息管理に要する吸入ステロイド用量と MIF G-173C 多型との関連 第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京 2006 年 11 月

4. 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

ウイルス性気道感染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 横浜 2007 年 11 月

5. 小島康弘, 長瀬洋之, 原 麻恵, 矢野智湖, 鈴木真穂, 石田博文, 中野純一, 足立哲也, 鈴木直仁, 大田 健: ミニシンポジウム 10 喘息患者におけるピーズアレイシステムを用いた呼気凝縮液の検討. 第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会 東京 2008 年 6 月

6. 原 麻恵, 長瀬洋之, 小島康弘, 倉持美知雄, 石田博文, 足立哲也, 鈴木直仁, 大田 健: ミニシンポジウム 8 気管支喘息-診断と管理 喘息コントロール状態と気道炎症マーカーとの関連. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京 2008 年 11 月

7. 長瀬洋之, 大田 健: シンポジウム 9 アレルギー疾患の発症, 悪化, 自然経過に関する遺伝子多型の検討. 第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 東京 2008 年 6 月

8. 長瀬洋之, 大田 健: ワークショップ 8 呼気ガス 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京 2008 年 11 月

9. 長瀬洋之, 大田 健: シンポジウム 1-4 遺伝子型研究とリモデリングから

第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京 2008 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

喘息治療薬の中止方法確立のための指標に関する臨床的研究

研究分担者 永田 真（埼玉医科大学呼吸器内科教授）

研究要旨

喘息における薬物の減量・中止の規定因子の検討を目的に、臨床背景の検討ならびに気道過敏性検査・誘発喀痰採取により、喘息の寛解あるいはその逆に再燃因子の候補因子の検討を行った。まず健常人と比較して、喘息患者の誘発喀痰では好酸球比率が上昇していた。重症と軽症では好酸球比率の有意な差はなかったが、重症では有意に好中球比率が上昇していた。喀痰中 CXC ケモカインで、ENA-78 と GRO- α は、喀痰中濃度は健常人、軽症喘息、重症喘息の間で差はなかったが、IL-8 は、重症喘息患者群で有意に増加していた。次に軽・中等症喘息における治療の減量・中止に伴い、11 例のうち 9 例（81.8%）で気道過敏性の増悪が観察され、うち 5 例（45.4%）で喘息症状の再燃が認められた。症状が再燃した 5 例のうち、4 例（80%）はいずれもダニに感作されていた。ペット（ネコ）を飼育中の 4 例のうち、ネコへの特異抗体を有する 2 例ではいずれも気道過敏性が増悪した。ダニ・アレルゲンに対し特異抗体を有する 8 例にのみ注目してみると、7 例（87.5%）で気道過敏性の増悪、3 例（37.5%）で喘息再燃が認められた。誘発喀痰を前後で比較することができた 8 例のうち、6 例では気道過敏性が増悪し、5 例（83.3%）で関連した喀痰中好酸球数の増加が確認された。以上、重症化ひいては治療の重厚化に好中球炎症が関与する可能性が示唆され、また軽症例で生活環境アレルゲンへの感作は治療中止を困難にする因子であると推定された。

A. 研究目的

気管支喘息の治療は、吸入ステロイド薬（Inhalational corticosteroid, ICS）などの開発と普及によりめざましい進歩を遂げ、喘息患者の病状コントロールは著しく改善した。しかし、一方で、改善した病状に応じていかに治療薬を減量、さらには中止するかに関しては、いまだ明確な基準は確立されていない。そこで本研究では、吸入ステロイド等の治療により喘息の長期コントロール状態が得られた患者における薬物の減量・中止の方法を確立することを目的とした。また、特に本分担研究では、気道過敏性検査や誘発喀痰により気道炎症病態を解析し、治療薬の円滑な減量に寄与する、あるいはこれを阻害する因子を

見出だすことを目的とした。

B. 研究方法

まず、気道炎症病態の把握を目的に、当院外来に通院中の喘息患者のうち、重症持続型喘息（ステップ 4）、軽症持続型喘息（ステップ 2）と健常人を対象として、 β 2 受容体刺激薬吸入後に超音波ネブライザーで高張性食塩水を吸入させて喀痰を採取した。得られた誘発喀痰を DTT にて融解処理し染色（基本的にメイギムザ染色）した後に、喀痰中細胞成分の検索と一部ではサイトカイン・ケモカイン濃度の測定を行い、誘発喀痰を用いて気道炎症病態を検討した。

続いて、喘息薬の減量・中止可能症例を対

象としてその臨床経過と気道炎症の推移につき検討した。ICS を使用し、喘息のコントロールが良好（トータルコントロール）と判断され、本臨床試験に参加の同意が得られた患者を対象として、ICS を中心とした治療薬をガイドラインに準じて減量または中止して12週間観察し、さらに良好なコントロールが続いていればステップダウン、もしくは ICS 中止を継続していくこととした。12 週毎に誘発喀痰の採取ならびに日本アレルギー学会標準法に準じた気道過敏性検査を行った。臨床経過、気道過敏性、痰中好酸球の推移と、臨床経過に関連する寄与因子を検討した。

C. 研究結果

健康人と比較して、気管支喘息患者の誘発喀痰では好酸球比率が上昇していることが観察された。重症持続型喘息と軽症持続型喘息では好酸球比率の有意な差はなかった。一方で、喀痰中の好中球は、健康人と喘息患者での差が認められなかったが、重症持続型喘息では有意に誘発喀痰中好中球比率が上昇していることが観察された。喀痰中 CXC ケモカインについて検討した結果、ENA-78 と GRO- α については、その喀痰中濃度は健康人、軽症喘息、重症喘息の間で差は認められなかったが（図 1、図 2）、IL-8 に関しては、重症喘息患者群の誘発喀痰中濃度が、健康人ならびに軽症喘息患者群のそれと比較して有意に増加していた（図 3）。また、喀痰中好中球比率は、TNF- α 濃度と正の相関を示した。重症喘息で経口ステロイドを内服している患者群においては、誘発喀痰中の好中球出現比率は、好酸球の出現比率と相関性を示すことが観察された。この機序と関連した基礎的研究として、好中球・好酸球組織集積の連関性についての検討も行った。IL-8 を用いて細胞特異的に活性化させた好中球の存在下においては、好酸球遊走物質がまったく存在しない実験条件下においても、好酸球の基底膜通過遊走が著明

に誘導されることを観察した。この反応は臨床濃度のテオフィリン薬によって抑制されることを見出した。さらにその逆に、CC ケモカインで細胞特異的に活性化させた好酸球の存在下において、好中球の基底膜通過は誘導されなかった。

喘息薬の減量・中止可能症例を対象とした臨床経過の検討では、治療の減量・中止に伴い、11 例のうち 9 例（81.8%）で気道過敏性の増悪が観察され、うち 5 例（45.4%）で喘息症状の再燃が認められた。症状が再燃した 5 例のうち、4 例（80%）はいずれもダニに感作されていた。ペット（ネコ）を飼育中であった 4 例のうち、ネコへの特異抗体を有する 2 例では、いずれも気道過敏性が増悪した（図 4）。ダニ・アレルゲンに対し特異抗体を有する 8 例に注目すると、7 例（87.5%）で気道過敏性の増悪、3 例（37.5%）で喘息症状の再燃が認められた。8 例で、誘発喀痰を治療の減量・中止前後で比較することができた。うち 6 例で気道過敏性が増悪し、5 例（83.3%）でいずれも連関して喀痰中好酸球数の増加が確認された（図 5、図 6）。

D. 考察

喘息患者では、健康者と比較して気道に好酸球性炎症が存在していること、さらに重症例では好中球性炎症も存在することが改めて再確認された。

持続型喘息患者では ICS の減量・中止に伴って症状自体が再燃するケースは多くないが、サブクリニカルには気道過敏性の悪化を生じるケースが多い。生活環境アレルゲンであるダニ、また飼育中のネコに感作されているケースでは、ほとんどの場合に ICS 減量・中止に伴って気道過敏性の悪化を認めており、基礎病態の悪化が想定される。事実、症例数は少ないものの、かかる治療中止に伴う気道過敏性の悪化は、好酸球性気道炎症の悪化と連関していることが観察された。これらの成績

は、誘発痰中好酸球の残存例では吸入ステロイドの中止が困難であること、また重症喘息では好中性性気道炎症が既存の治療によってコントロールされずに存在するケースがあり、かかる所見を示す場合には治療の減量が困難な可能性が示唆される。

なお、重症喘息における好中球の集積に対する寄与因子として、CXC ケモカインのうちENA-78 と GRO- α ではなく、唯一重症喘息患者群で健常群ならびに軽症喘息患者群のそれと比較して有意に増加していた IL-8 が重要な役割を果たしているものと推測された。また重症喘息では TNF- α 濃度と連関する好中性性気道炎症の存在も確認され、かかる所見を示す場合には治療の強化あるいは機序のことなる薬物の併用療法等を考慮すべきことが示唆される。また、重症喘息ではステロイド投与にも関わらず、好中球・好酸球の連関性がみられ、その機序としては好中球側が遊走する過程で好酸球の組織集積段階を調節する可能性があると考えられた。

E. 結論

喘息治療薬の中止もしくは減量後の経過不良因子として、環境アレルゲンであるダニ、また飼育中の有毛ペットへの感作が考えられる。臨床レベルで喘息症状が再燃していなくとも気道過敏性の悪化は高頻度に認められており、ICS の減量・中止後には長期的でかつ慎重な観察が必要と考えられる。

F. 研究発表

1. Kikuchi I, Kikuchi S, Kobayashi T, Hagiwara K, Sakamoto Y, Kanazawa M, Nagata M. Eosinophil trans-basement membrane migration induced by interleukin-8 and neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol*;34:760-5, 2006.
2. Kikuchi S, Kikuchi I, Hagiwara K, Kanazawa M, Nagata M. Association of

tumor necrosis factor1- α and neutrophilic inflammation in severe asthma. *Allergology International*. 54:621-625, 2005.

3. Kikuchi S, Nagata M, Kikuchi I, Hagiwara K, Kanazawa M. Association between neutrophilic and eosinophilic inflammation in patients with severe persistent asthma. *Int Arch Allergy Immunol*; 137(suppl1): 7-11, 2005.
4. Kobayashi T, Kikuchi I, Takaku Y, Soma T, Hagiwara K, Kanazawa M, Nagata M. Eosinophils do not enhance the trans-basement migration of neutrophils. *Int Arch Allergy Immunol*; 141(suppl1): 38-43, 2007.
5. Kikuchi S, Kikuchi I, Takaku Y, Kobayashi T, Hagiwara K, Kanazawa M, Nagata M. Neutrophilic Inflammation and CXC Chemokines in Patients with Refractory Asthma. *Int Arch Allergy Immunol* (in press.)

G. 知的所有権の出現・取得状況 なし

図 1 : 喀痰中 GRO- α は各群で差はない

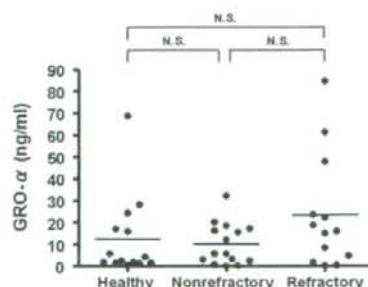


図 2 : 喀痰中 ENA-78 は各群で差はない

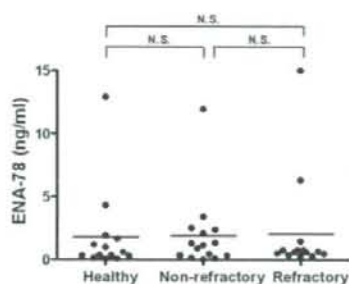


図 3 : 喀痰中 IL-8 は Refractory asthma で増加

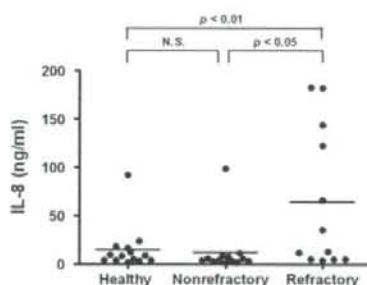


図 4 : 対象症例背景

症例 No	性	年齢	ダニ感作	ペット感作	前 PC20-Mch	後 PC20-Mch
1	女	67	なし	なし	過敏性なし	4500 μ g/ml
2	男	60	なし	なし	過敏性なし	過敏性なし
3	男	71	なし	なし	154 μ g/ml	生食で気分不快
4	女	64	あり	ネコ	4375 μ g/ml	812 μ g/ml
5	女	44	あり	ネコ	過敏性なし	4750 μ g/ml
6	男	59	あり	なし	1812 μ g/ml	924 μ g/ml
7	男	30	あり	なし	過敏性なし	14000 μ g/ml
8	男	63	なし	なし	844 μ g/ml	1125 μ g/ml
9	男	53	あり	なし	2375 μ g/ml	5000 μ g/ml
10	女	30	あり	なし	2812 μ g/ml	1850 μ g/ml
11	男	34	あり	なし	624 μ g/ml	再燃(未実施)

* 症例 4、6、11 で喘息再燃

図 5 : ダニアレルギー・ネコ飼育ネコアレルギー患者での気道過敏性の推移

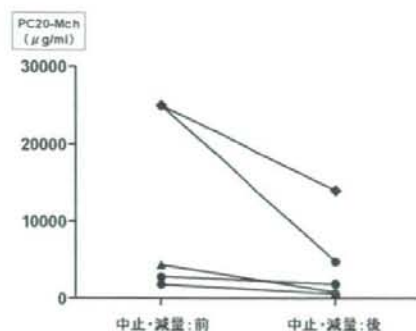
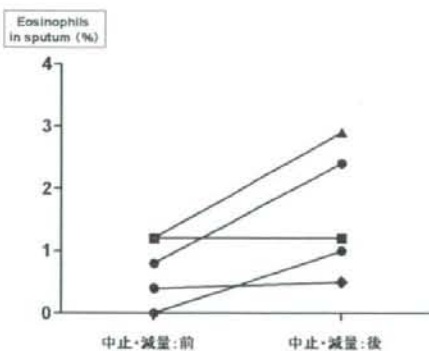


図 6 : ダニアレルギー・ネコ飼育ネコアレルギー患者での喀痰中好酸球割合の推移



成人喘息における臨床的寛解の免疫学的解析

研究分担者 森 晶夫（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
先端技術開発研究部長）
研究協力者 山口美也子（同センター研究員）
北村紀子（同センター研究員）
大友隆之（同センターリサーチレジデント）

研究要旨

成人喘息の臨床的寛解メカニズムについて、T細胞サイトカイン産生の観点から解析した。吸入ステロイドの効果は、気管支粘膜局所の炎症抑制のみならず、血中 T 細胞の活性化状態にも及ぶことが明らかになった。一部の気道過敏性が消失した著効例においては、吸入ステロイド中止後も、サイトカイン産生抑制効果が持続していた。アレルゲン減感作療法により、臨床的寛解が得られた症例は、免疫学的見地からは 4 グループに分類可能で、免疫学的非寛解群に加えて、「免疫学的寛解」とも呼ぶべき症例群が存在することも明らかになった。「免疫学的寛解」では、気道過敏性も著しく改善が認められていた。

A. 研究目的

適切な喘息治療が奏効し、やがて寛解の状態となることが経験されるが、吸入ステロイド薬減量や治療中止を可能とする予測因子についてはほとんど検討されていない。本研究においては、寛解を規定・予測する因子の解明を目指して、3年間薬物治療を行わず無症状を持続できた臨床的寛解群、喘息治療により気道過敏性の消失がみられた症例群について、T細胞サイトカイン産生を解析した。

B. 方法

- 喘息、アレルギー症例のサイトカイン産生解析
- 1) 当院受診中の喘息症例で、インフォームドコンセントの得られた症例より採血し、末梢血単核球 (PBMC) を得た。AIM-V 培地に懸濁後、24 well culture plate にて、抗原非特異的活性化刺激として 20 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) + 1 μ M ionomycin (IOM)、固相化抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体を加え、48 時間培養した。抗原特異的活性化刺激としてダニ粗抗原等と 6 日間培養した。上清を回収後、 -20°C で保存し、IL-2、IL-4、IL-5、IL-13、IFN- γ 濃度を、特異的サンドイッチ ELISA にて測定した。
- 2) インフォームドコンセントの得られた症例を対象に、アセチルコリン (Ach)、ヒスタミン (His) による

吸入負荷試験をアレルギー学会標準法に従い実施し、PC₂₀ Ach および PC₂₀ His を算出した。

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮として、患者を対象とする調査、検査において、また、ヒト由来の細胞、組織等の試料を用いる場合には、ヘルシンキ宣言を遵守するとともに、わが国のヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）、疫学研究に関する倫理指針（平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号）、臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）を遵守した。インフォームドコンセントを徹底するとともに、症例はコード化し、プライバシーの保護に万全を期した。実施に先立って施設内倫理委員会の承認を得たうえで、倫理規定に従って実施した。

C. 結果 および D. 考察

これまでの研究から、未治療時における IL-5 産生の亢進は、気道過敏性の有無と関連することが明らかになっている (data not shown)。有症状の喘息症例では、健常者に比して、PBMC の IL-5 産生が有意に亢進していたが、吸入ステロイドの開始後速やかに低下した (図1)。

本研究において臨床的寛解は、減感作療法以外の薬物治療なしで、3年間無症状を継続しているとの条件で判定された。Group 1: 抗原非特異的サイトカイン産生と抗原特異的サイトカイン産生の両者が低下した群、Group 2: 抗原非特異的サイトカイン産生が低下し、ダニ抗原特異的サイトカイン産生が持続する群、Group 3: 抗原非特異的サイトカイン産生が持続しているが、ダニ抗原特異的サイトカイン産生が低下した群、Group 4: サイトカイン産生は持続している群、の少なくとも4群に分けられることが明らかになった。トータル24症例中に、各々、10、5、4、5症例分布していた。気道過敏性は、1) < 2), 3) < 4)の順に亢進していた。特に、Group 1では、acetylcholine PC20が10,000 µg/mlに近く、Group 4の600 µg/mlと比較して10倍以上改善していることを考慮すると、Group 1を免疫学的寛解群と呼ぶことが可能と考えられる。呼吸機能データにおいても、FEV₁%が平均で74.3%と、4群の中では最も良かった。

残りの3群は、免疫学的には非寛解群と位置づけられるが、Group 4は、T細胞のサイトカイン産生レベルが治療前の水準が維持されていること、FEV₁%が平均で67.6%と4群の中では最も悪かったことを考慮すると、症状のレベルでは3年間再発がみられていないものの、細胞性免疫レベルでの異常は持続しており、恐らく気道炎症も残存している可能性が考えられる。この中では、再発予備軍と位置づけられるものと考えられる。

Group 2、3については、気道過敏性はGroup 1と4の中間で、呼吸機能データはGroup 1と同等に良好であった。Group 4から、Group 2、3を経由して、Group 1(寛解)に向かう中間の病態なのか、あるいは、Group 2、3は、別個の病態なのか、興味を持たれる。他のアレルギー疾患、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎の合併などについて、詳細な解析を要する。

E. 結論

臨床的寛解は、T細胞反応性と気道過敏性の観点から論じると、免疫学的寛解群に加えて、他の要因に基づくheterogeneousな集団から構成されることが示唆される。減感作療法は、成人喘息に免疫学的寛解をもたらす、有効な治療法と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Umezū-Goto, M., Kajiyama, Y., Kobayashi, N., Kaminuma, O., Suko, M., and Mori, A. 2007. IL-9 production by peripheral blood mononuclear cells of atopic asthmatics. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 143 (suppl 1):76-79.
2. Mori, A., Ogawa, K., Someya, K., Kunori, Y., Nagakubo, D., Yoshie, O., Kitamura, F., Hiroi, T., and Kaminuma, O. 2007. Selective suppression of Th2-mediated airway eosinophil infiltration by low-molecular weight CCR3 antagonists. *Int. Immunol.* 19:913-921.
3. Yoshioka, M., Sagara, H., Takahashi, F., Harada, N., Nishio, K., Mori, A., Ushio, H., Shimizu, K., Okada, T., Ota, M., Ito, Y., Nagashima, O., Atsuta, R., Suzuki, T., Fukuda, T., Fukuchi, Y., Takahashi, K. 2009. Role of multidrug resistance-associated protein 1 in the pathogenesis of allergic airway inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 296:L30-L36.
4. Kitamura, N., Kaminuma, O., and Mori, A. 2009. Evaluation of cysteinyl leukotriene-induced contraction of human cultured bronchial smooth muscle cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)
5. Kaminuma, O., Kitamura, F., Miyatake, S., Yamaoka, K., Miyoshi, H., Inokuma, S., Tatsumi, H., Nemoto, S., Kitamura, N., Mori, A., and Hiroi, H. 2009. T-bet is responsible for distorted Th2 differentiation in human peripheral CD4⁺ T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* (in press)
6. 粒来崇博、釣木澤尚美、森田園子、押方智也子、小野恵美子、大友 守、前田裕二、森 晶夫、池原邦彦、谷口正実、秋山一男：気管支喘息患者における、抗原吸入試験の即時反応に伴う呼気一酸化窒素濃度 (Exhaled Nitric Oxide) の変化、アレルギー 56(5) : 470-476, 2007.
7. 森 晶夫：ステロイド抵抗性の分子機構、呼吸器科; 13(4) : 568-573, 2008
8. 森 晶夫：非アトピー型喘息反応と真菌アレルギー、アレルギー・免疫; 15 (9) : 1198-1203, 2008
9. 森 晶夫：最近の喘息研究の動向—非アトピー機序へのフォーカス、アレルギー・免疫; 16 (2) : 7-8, 2009

10. 森 晶夫：喘息と CD8⁺細胞 (CTL)、Annual Review 呼吸器 2009 (工藤翔二、土屋了介、金沢実、大田健編)、中外医学社、東京 p. 84-90, 2009
2. 学会発表
 1. Mori A, Kitamura N, Hashimoto T, Taniguchi M, Otomo M, Maeda Y, Hasegawa M, Akiyama K. 2007. IL-5 production in response to *Candida albicans* secretory aspartic protease 2 is associated with isolated late-phase bronchial response upon inhalation challenge. 2007 American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology Annual Meeting. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119:S44 (San Diego) 2007/2/22-28
 2. Mori A. 2008. IgE-independent asthmatic response: a possible cause of nonatopic asthma. The 1st Asthma Meeting in Tokyo. Session 2. Pathophysiology of bronchial asthma. Abstract p.11, Tokyo, Japan. 2008/5/24
 3. 森 晶夫、神沼 修、前田裕二、谷口正実、大友 守、長谷川眞紀、三田晴久、秋山一男：非アトピー型喘息反応への *Candida* 抗原の関与、第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会シンポジウム 15「難治性アレルギー疾患における真菌の役割」、アレルギー 56:999, 2007. 11. 3 (横浜)
 4. 森 晶夫、北村紀子、大友隆之、前田裕二、谷口正実、大友 守、長谷川眞紀、秋山一男、神沼修：喘息における寛解と治癒の病態、第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム 6「アレルギーの寛解から治癒を目指す治療戦略」、アレルギー 57:301, 2008. 6. 13 (東京)
 5. 小野恵美子、粒来崇博、谷口正実、谷本英則、福富友馬、押方智也子、関谷潔史、鈴木澤尚美、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：咳喘息の鑑別診断に呼気 NO は有用か、第 19 回日本アレルギー学会春季臨床大会、アレルギー 56:333, 2007. 6. 10-12 (横浜)
 6. 前田裕二、福富友馬、小野恵美子、谷本英則、押方智也子、関谷潔史、粒来崇博、鈴木澤尚美、森 晶夫、大友 守、谷口正実、長谷川眞紀、秋山一男：低肺機能、“潜行型”喘息について—その頻度と背景について—、第 48 回日本呼吸器学会学術講演会、日本呼吸器学会雑誌 46:308, 2008. 6. 17 (神戸)
 7. 谷本英則、谷口正実、関谷潔史、福富友馬、小野恵美子、押方智也子、粒来崇博、鈴木澤尚美、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：高用量 ICS でも低肺機能が持続する重症喘息—全身ステロイドによる気道可逆性の評価、第 18 回国際喘息学会日本北アジア部会、抄録集 p. 64, 2008. 7. 12 (大阪)
 8. 福富友馬、谷口正実、粒来崇博、龍野清香、谷本英則、押方智也子、小野恵美子、関谷潔史、鈴木澤尚美、東 憲考、中澤卓也、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：成人喘息患者 455 例における持続的気流閉塞の危険因子、第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 57:1450, 2008. 11. 27 (東京)
 9. 関谷潔史、谷口正実、福富友馬、谷本英則、龍野清香、小野恵美子、押方智也子、粒来崇博、鈴木澤尚美、中澤卓也、東 憲考、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：自覚症状が軽症間欠型の若年成人喘息における臨床的検討、第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 57:1451, 2008. 11. 27 (東京)
- G. 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

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

成人喘息の寛解を目指した治療薬の減量・中止に関する研究
-咳喘息・咳優位性喘息における検討-

研究分担者 上村光弘（国立病院機構災害医療センター呼吸器科医長）
研究協力者 飯倉元保（国立病院機構災害医療センター呼吸器科技官）
濱元陽一郎（国立病院機構災害医療センター呼吸器科技官）

研究要旨

全量の粒子を一回の努力吸気で吸い込むMDI、DPIに対し、ネブライザーは粒子が反復移動するため気管を含めた中枢気道へも満遍なく粒子が沈着するという利点があると思われる。過去、われわれは従来の吸入ステロイド療法でも残存する咳嗽に対しデカドロン・リンデロンのネブライザーによる吸入ステロイド療法を試みたところ有効であった一群の存在を確認した。残存する咳嗽には気管炎の存在が関与していること、ネブライザーでより効果的な気管炎の制御が達成できるのではないかと考察した。そこで今回は従来の吸入ステロイド療法に対して、ブデソニド・ネブライザーによる吸入ステロイドの有用性の検討を2つの研究をとおして行った。「1. 咳喘息・咳優位性喘息におけるネブライザーによる吸入ステロイド療法の検討」では、従来の治療法ではおさえられない症状を有しているものを対象にネブライザーによる吸入ステロイドに変更する群と従来使用していた吸入ステロイドの量を倍増する群とにわけ比較検討した。「2. 重症気管支喘息・咳喘息におけるネブライザーによる吸入ステロイドの有用性の検討」では、ステロイド依存性喘息を含むステップ4の重症喘息患者において従来の高用量吸入ステロイドをネブライザーによる吸入ステロイド療法に変更し、改善するかどうかを観察、改善群における背景因子を検討した。使用するステロイドネブライザー薬は、ブデソニド（パルミコートレスビュール）であり、1日1000 μ g/日を用いた。いずれの研究でもトータルコントロールを得られる患者の割合、薬剤減量・中止が可能かどうかを評価した。両研究でネブライザー治療に変更することにより咳嗽症状の改善が得られる症例が存在した。ネブライザーの吸入効率率は低く、スプレーを使用したMDIのおよそ4分の1から8分の1といわれている。吸入効率率は低い気管粘膜はよりカバーするであろうネブライザーの方が有効である一群が存在することより、気管炎が咳嗽主体の喘息の病態に関与していると思われる。

A. 研究目的

吸入療法のデバイスの中でネブライザーは、pMDIやDPIにうまく対応できない乳幼児や高齢者を対象に使用されてきた。一方、成人重症喘息に対してもネブライザーを使用した吸入ステロイド療法が試みられている。その用量はステロイド依存性喘息におけるステロイド減量効果に対してブデソニド（以下、BUD）4000~8000 μ g/日であり、急性増悪時の使用に対しては12000 μ g/日や20000 μ g/日である。即ちステロイド全身投与と同等の効果を期待するためにはかなり高用量の吸入ステロイドが必要と思われる、成人喘息におけるネブライザーによる吸入ステロイドの位

置づけは限られたものとされてきた。が、pMDIやDPIとネブライザーでは粒子の沈着過程において大きな相違があると考えられる。従来のpMDIやDPIによる吸入ステロイドは、決められた量を1回のみ吸気で吸い込むわけであるが、直線円筒構造である気管内では慣性によって粒子が飛び去るため、粘膜への付着は乏しいものと思われる。吸気の気管モデルにおける粒子の沈着実験では声門直下2cmでは粒子沈着がみられるが、それ以下では気管分岐部まで沈着量は減少することが報告されている。一方、呼気での粒子沈着実験では気管の下部における沈着量の増加が証明されている。呼気にも粒子量が多いネブライザーでは

粒子が何回も気管内を往復するため気管粘膜へのより均等な粒子沈着が得られると考えられる。その仮説に基づいた過去の研究においてデカドロン・リンデロンによる吸入ステロイド療法が従来のカニスターやドライパウダーによる吸入療法よりも有効である一群の症例が存在する事を証明した。残存する咳嗽には気管炎の存在が関与していること、ネブライザーでより効果的な気管炎の制御が達成できるのではないかとと思われる。今回われわれは新しく発売されたブデソニド・ネブライザー液を用い、従来の吸入ステロイド療法に対する、ネブライザーによる吸入ステロイドの有用性の検討を2つの研究をとおして行った。「1. 咳嗽・咳優位性喘息におけるネブライザーによる吸入ステロイド療法の検討」および「2. 重症気管支喘息・咳喘息におけるネブライザーによる吸入ステロイドの有用性の検討」である。

一方、上記の補助研究として、気管支喘息・咳喘息で気管炎が存在するであろう事を別のアプローチで評価してみた。ひとつは咳嗽を有する喘息患者におけるステロイドの頸部気管に対する経皮的投与であり、もうひとつは頸部気管に対する機械的刺激による咳嗽誘発試験の試みである。

B. 対象と方法

「1. 咳嗽・咳優位性喘息におけるネブライザーによる吸入ステロイド療法の検討」

対象：咳喘息、咳優位性喘息のうち DPI-BUD を 400 から 800 $\mu\text{g}/\text{日}$ 、およびテオフィリン徐放製剤・ロイコトリエン受容体拮抗薬・長時間作用型 β_2 刺激薬のいずれか 1 剤、あるいは複数を併用、すなわちステップ 3 レベルの薬剤でも咳嗽症状が持続する症例を対象とした。4 週間以上治療が継続されていて、エントリー直前 2 週間の症状がプラトー、あるいは増悪傾向にあるもの、すなわち改善しつつある過程にないこと、Cough scoring system において日中あるいは夜間の点数が少なくともどちらかで 3 点以上 4 点以下のものをエントリーした。

方法：従来使用していた中等量の吸入ステロイドを倍量にする群（パルミコート・タービュヘイラー 800-1600 $\mu\text{g}/\text{日}$ ）と Nebulizer BUD1000 $\mu\text{g}/\text{日}$ に変更する群の 2 群にわけた。吸入効率から計算した肺内沈着率は、およそパルミコートネブライザー 1000 μg ：パルミコート粉末吸入 800 μg ：パルミコート粉末吸入 1600 μg = 5：8：16 程度である。4 週間後に有効、無効の判定を行った。有効群はそのままの治療を継続した。無効群はネブライザー群の場合、DPI 倍量へ変更し、DPI 倍量群の場合、ネブライザーへ変更した。コントロールが得られればステップダウンを考慮した。4 週間

に治療を変更した群も同様である。吸入ステロイドを含め 3 剤以上使用している場合、吸入ステロイド以外の 1 剤より減量中止した。吸入ステロイドを含め 2 剤、あるいは 3 剤以上使用しており、その後減量中止により吸入ステロイドを含む 2 剤となった場合は、吸入ステロイドを先に減量するか、他剤を先に減量するかは主治医の判断にゆだねるが、吸入ステロイド以外の薬剤の単独使用は行わないものとした。吸入ステロイドは DPI の場合、1600 $\mu\text{g}/\text{日}$ から 800 $\mu\text{g}/\text{日}$ 、400 $\mu\text{g}/\text{日}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{日}$ 、0 と少なくとも 2 週間以上の期間をあけて減量、中止とした。ネブライザー BUD の場合、1000 $\mu\text{g}/\text{日}$ から 500 $\mu\text{g}/\text{日}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{日}$ 、0 と同様に少なくとも 2 週間以上の間隔をあけて減量、中止とした。吸入ステロイド以外の薬剤も 2 週間以上の間隔をあけて中止した。1、2、4、8、12、24 週後の症状を cough symptom score・VAS を用いて比較した。コントロールが得られるまでの期間と比率、トータルコントロールが得られるまでの期間と比率を評価した。24 週後試験終了時、呼吸機能検査、喀痰中好酸球、気道過敏性試験を施行した。薬剤を中止できた場合、その後の再発率を 1 年間にわたって追跡した。

「2. 重症気管支喘息・咳喘息におけるネブライザーによる吸入ステロイドの有用性の検討」

対象：8 週間以上、高用量の吸入ステロイド（フルタイド 800 μg 、パルミコート 800 μg 以上、キュバル 800 μg ）を使用している喘鳴・咳嗽などの症状が持続する症例。あるいは吸入ステロイドに加え経口ステロイドの使用継続を必要としている症例を対象とした。

方法：使用していた吸入ステロイドをパルミコートレスビュール 1000 $\mu\text{g}/\text{日}$ （500 $\mu\text{g} \times 2$ ）へ変更し、症状（喘鳴、咳嗽）、ピークフロー値、レスキュー薬（短時間作用型 β_2 刺激薬）の使用量の変化をみた。4 週間継続し改善が得られた群と得られなかった群を比較検討した。有効であれば、さらに 8 週間継続し、薬剤減量が可能か検討した。無効であれば、もとの吸入ステロイドに戻す。薬剤減量が可能な症例数、トータルコントロールが得られる割合やその背景因子を検討した。

（倫理面への配慮）

対象となった個人には、治療の医学的根拠およびブデソニドによるネブライザー療法は日本では小児のみ保険医療適応であること、また海外では成人喘息にも認められている国が存在すること、研究への参加は自由意志であることを文書により十分説明のうえ、文書による同意を得た。個人情報保護に十分留意した。

C. 結果

我々が以前行ったパイロット・スタディであるデカドロンによるネブライザー療法では、従来の高用量 DPI 使用群 12 例中、8 例が有効であった。特筆すべきこととして当時、個人輸入で入手したブデソニド・ネブライザーを使用した 1 症例を経験したが、デカドロン・ネブライザーよりもさらに有効であったことがあげられる。また、内服ステロイド依存性の重症喘息では 6 例中 2 例で有効であった。

補助研究として行ったものとして以下に結果を簡単に記載する。

・「咳喘息・咳優位性喘息に対する頸部経皮ステロイド療法の検討」

頸部気管は下気道の中で唯一体表から触れ得る場所であり、その炎症の場合は皮膚から至近距離である。下気道への新たなステロイド投与のルートとして頸部気管の経皮ステロイド療法を試み、その有用性を検討した。副作用で吸入ステロイドが使用できない、あるいは使用しているにもかかわらず咳嗽症状が持続している 28 人の患者に頸部気管にステロイドを塗布したところ 12 人に症状の改善が得られた。改善群では、持続していたのどもとの掻痒感の改善が全例で得られた。印象としてネブライザーによる吸入ステロイドより効力は落ちるものの、経皮的にステロイドが気管まで作用した可能性が考えられ、気管炎の関与がより明確に示唆されたものと思われた。局所の掻痒感も気管炎の症状と解釈された。

・「音叉を使用した咳嗽誘発試験の試み」

Phonation (会話、電話、笑い、歌う、など) による咳嗽出現の機序として、声帯から生じる振動の気管粘膜への刺激と仮定した。そこで頸部気管に音叉で振動を与えることにより咳嗽を誘発しえると考えた。また他の頸部気管への機械的刺激として気管圧迫 (気管を体表より指で圧迫)、気管伸展 (頸を後屈することで気管を長軸に伸展) も同時に検討した。咳嗽を有する 252 人が対象となった。いずれの検査も約 30% で咳嗽が誘発され、局所の掻痒感の出現・増悪も含めると約 50% で誘発された (表 1)。誘発症状は治療が入り、症状が改善するとともにみられなくなった (表 2)。喘息患者では β_2 刺激剤の吸入で誘発症状の改善・消失がみられる症例も存在した。同現象は気管そのものを刺激しており、炎症により過敏になった咳受容体が関与していると考えられ、気管炎の存在を支持するものと考えられる。これらの音叉振動・気管圧迫・気管伸展による咳嗽・頸部掻痒感の誘発を本研究の観察項目として評価した。

・咳喘息・咳優位性喘息におけるネブライザーに

よる吸入ステロイド療法の検討

ネブライザー群にエントリーした 3 例において、全例、1 週目で VAS による咳嗽症状の改善が得られた (表 3)。全例で頸部気管の機械的刺激による咳嗽誘発がみられ、ネブライザー導入後、2 例で気管伸展刺激による誘発咳嗽が消失し、1 例で気管圧迫および音叉刺激による誘発咳嗽が消失した。1 例は口腔内不快感の副作用の出現で中止となり、2 例は感冒の罹患で症状は増悪し、トータルコントロールの維持は達成できなかった。

・重症気管支喘息・咳喘息におけるネブライザーによる吸入ステロイドの有用性の検討

エントリーした 4 例中、3 例で 4 週目の改善が得られた (表 4)。有効であった 3 例中 2 例で気管伸展による誘発咳嗽がネブライザー導入前に存在しており、導入 1 週後に消失した。同様に 1 例で音叉による誘発咳嗽がネブライザー導入前に存在しており、導入 1 週後に消失している。経過上、感冒の罹患や内服ステロイド減量などにより症状は増悪し、トータルコントロールの維持は達成できなかった。12 週間の試験期間終了後、2 例は DPI に戻すことにより症状の増悪をみた。

D. 考察

a. ネブライザーの吸入効率

吸気時のみ薬物が噴霧されるブレス・シンクロナイザーを用いて測定されたブデソニド・ネブライザーの肺内沈着率は 14~16% である。今回の検討ではブレス・シンクロナイザーは使用しておらず、吸気と呼気が 1 対 1 と仮定すると 7~8% が肺内沈着することになる。ブデソニド・ネブライザー 1000 μ g/日を使用した場合、その肺内沈着率を 8% とすると 80 μ g が沈着したこととなり、バルミコート・タービュヘラー (肺内沈着率 30%) に換算すると 250 μ g/日の吸入に相当することになる。高用量の DPI による吸入ステロイドでも改善しなかった咳症状がより低用量のネブライザー療法で症状が抑制されたことになる。

b. 作用機序・気管炎の関与

より低用量の吸入ステロイドでも投与方法をネブライザーとした場合、さらに咳嗽が改善することは、気管炎が関与すること、ネブライザー療法では従来の DPI 療法と比較して気管壁への粒子沈着の増加が得られるのではないかということが示唆されると考えた。特に重症気管支喘息・咳喘息におけるネブライザーによる吸入ステロイドの有用性の検討において気管刺激による誘発咳嗽がネブライザー導入により速やかに消失したことは、気管における炎症による咳受容体の過敏反応を制御したことが示唆される。しかし、ネブライザーによるステロイド吸入療法は、短期

的な効果がみられることはあったが、その 長期的維持は必ずしも達成されるわけではない。ネブライザーの粒子沈着率は DPI に比べ低いため気道全体に対する抗炎症効果は低下することが原因であると考えられた。

E. 結論

粒子が気道内を反復往復するネブライザーによる吸入ステロイドが有効である咳嗽、咳優位性喘息の一群が存在することより、同疾患群における気管炎の関与が考えられた。気管炎の効率的な制御により、より効果的に症状改善、薬剤減量を達成しうるであろう一群の存在が示唆された。

F. 研究発表

論文発表

・ Kamimura M, Izumi S, Hamamoto Y, Morita A, Toyota E, Kobayashi N, Kudo K. Superiority of nebulized corticosteroids compared to dry powder inhaler in patients with cough variant asthma and cough predominant asthma. (submitted)

学会発表

・ 上村光弘、森田あかね、濱元陽一郎：咳喘息・咳優位性喘息に対する頸部経皮ステロイド療法の検討。第 18 回日本アレルギー学会春季臨床大会、東京、2006。

・ 上村光弘、毛利篤人、濱元陽一郎、飯倉元保：音叉を使用した咳嗽誘発試験の試み。第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会、横浜、2007。

・ 上村光弘、毛利篤人、濱元陽一郎、飯倉元保：頸部気管に対する振動刺激による咳嗽誘発試験の試み。第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会、東京、6 月、2008。

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

表 1. 頸部気管に対する機械的刺激により症状が誘発される頻度

	搔痒感	咳嗽	計
音叉振動	38 (15.1%)	81 (32.1%)	119 (47.2%)
気管圧迫	65 (25.8%)	65 (25.8%)	130 (51.6%)
気管伸展	34 (13.5%)	92 (36.5%)	126 (50.0%)

表 2. 治療前と喘息治療により症状がほぼ消失したときにおける誘発咳嗽・搔痒感

(a) 喘息

n=47	音叉振動	気管圧迫	気管伸展
改善前	37	37	37
改善後	10	11	7

(b) 咳喘息

n=40	音叉振動	気管圧迫	気管伸展
改善前	26	34	27
改善後	5	4	5

表 3. VAS による咳嗽の評価 (咳喘息・咳優位性喘息)

VAS	前	1W	2W	4W	8W
35F	49.0			22.0	25.2
70F	12.5	5.0	8.6	中止	中止
71M	47.8	17.6	24.4	15.2	11.6

表 4. VAS による咳嗽の評価 (重症気管支喘息・咳喘息)

VAS	前	1W	2W	4W	8W
63F	6.7	7.0	10.3	10.3	17.6
72F	47.0	38.3	38.1	28.2	48.5
74F	14.3	8.7	7.8	8.5	16.6
35F	57.0	60.5	63.4	58.0	—

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Adachi T, Hanaka S, Yano T, Yamamura K, Yoshihara H, Nagase H, Chihara J, <u>Ohta K</u> .	The role of platelet-derived growth factor receptor in cotaxin signaling of eosinophils.	Int Arch Allergy Immunol	140(suppl1)	28-34	2006
Suzukawa M, Komiya A, Iikura M, Nagase H, Yoshimura-Uchiyama C, Yamada H, Kawasaki H, <u>Ohta K</u> , Matsushima K, Hirai K, Yamamoto K, Yamaguchi M.	Trans-basement membrane migration of human basophils: role of matrix metalloproteinase-9.	Int Immunol	18(11)	1575-83	2006
Adachi M, Aizawa H, Ishihara K, <u>Ohta K</u> , Sano Y, Taniguchi H, Nakashima M.	Comparison of salmeterol/fluticasone propionate (FP) combination with FP+sustained release theophylline in moderate asthma patients.	Respir Med.	102(7)	1055-64	2008
Suzukawa M, Iikura M, Koketsu R, Nagase H, Tamura C, Komiya A, Nakae S, Matsushima K, <u>Ohta K</u> , Yamamoto K, Yamaguchi M.	An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor.	J Immunol.	181(9)	5981-9	2008
Kikuchi I, Kikuchi S, Kobayashi T, Hagiwara K, Sakamoto Y, Kanazawa M, Nagata M.	Eosinophil trans-basement membrane migration induced by interleukin-8 and neutrophils.	Am J Respir Cell Mol Biol	34	760-5	2006
Kobayashi T, Kikuchi I, Takaku Y, Soma T, Hagiwara K, Kanazawa M, <u>Nagata M</u> .	Eosinophils do not enhance the trans-basement migration of neutrophils.	Int Arch Allergy Immunol	143(suppl1)	38-43	2007
Kobayashi T, Takaku Y, Yokote A, Miyazawa H, Soma T, Hagiwara K, Kanazawa M, and <u>Nagata M</u>	Interferon- β augments eosinophil adhesion-inducing activity of endothelial cells.	Eur Respir J.	32	1540-1547	2008
Soma T, Takaku Y, Kobayashi T, Hagiwara K, Kanazawa M, Uematsu K, <u>Nagata M</u> .	Inhibitory effect of budesonide alone and in combination with formoterol on IL-5 and RANTES production from mononuclear cells.	Int Arch Allergy Immunol	146(suppl1)	22-27	2008

Mori A, Ogawa K, Someya K, Kunori Y, Nagakubo, D, Yoshie O, Kitamura F, Hiroi T, and Kaminuma O.	Selective suppression of Th2-mediated airway eosinophil infiltration by low-molecular weight CCR3 antagonists.	Int Immunol	19	913-921	2007
足立満, 大田 健, 森川昭廣, 西間三馨, 徳永章二, Rachael L. DiSantostefano	本邦における喘息のコントロールと管理の変化—2000年度と2005年度の喘息患者実態電話調査(AIRJ)より—	アレルギー	57(2)	107-120	2008
大田 健, 石原享介, 足立満	成人気管支喘息におけるサルメテロール/プロピオン酸フルチカゾン配合剤(SFC)の長期投与. 患者の状態に応じた用量調節による実地医療に準じた治療の検討.	アレルギー・免疫	14(5)	635-647	2007
永田 真, 田部一秋, 内田由佳, 高久洋太郎, 萩原弘一, 金沢実, 坂本芳雄	気管支喘息患者末梢血単核球のthymus and activation regulated chemokine産生におよぼすアレルギー免疫療法の効果.	日本職業・環境アレルギー学会雑誌	14	46-51	2007
飯倉元保, 小林信之	喘息の難治化要因とその対策. 医師側の要因 不適切な治療.	呼吸器科	13(6)	505-510	2008
粒来崇博, 釣木澤尚美, 森田園子, 押方智也子, 小野恵美子, 大友守, 前田裕二, 森 晶夫, 池原邦彦, 谷口正実, 秋山一男	気管支喘息患者における, 抗原吸入試験の即時反応に伴う呼気一酸化窒素濃度 (Exhaled Nitric Oxide) の変化	アレルギー	56(5)	470-476	2007
工藤宏一郎	喘息治療とH5N1感染—Early interventionの提言.	アレルギー	58	97-102	2009

Eosinophil Trans-Basement Membrane Migration Induced by Interleukin-8 and Neutrophils

Izumi Kikuchi, Shinya Kikuchi, Takehito Kobayashi, Koichi Hagiwara, Yoshio Sakamoto, Minoru Kanazawa, and Makoto Nagata

Department of Respiratory Medicine, Saitama Medical School, Saitama, Japan; and Department of Allergy and Respiratory Medicine, Kanto Central Hospital of the Mutual Aid Association of Public School Teachers, Tokyo, Japan

Neutrophilic inflammation observed with severe asthma is often associated with interleukin-8 (IL-8). Neutrophils can secrete a variety of mediators that may augment the migration of eosinophils. We have reported a positive correlation between the concentrations of neutrophils and eosinophils in sputum from subjects with severe asthma, suggesting a possible role of neutrophils in regulating eosinophilic inflammation. The aim of this study was to investigate whether neutrophils stimulated with IL-8 modify the trans-basement membrane migration (TBM) of eosinophils. Eosinophils and neutrophils were isolated from peripheral blood drawn from healthy donors or subjects with mild asthma. The TBM of eosinophils in response to IL-8 was evaluated in the presence or absence of neutrophils using the chambers with a Matrigel-coated transwell insert. Neither IL-8 alone nor the presence of neutrophils alone induced the TBM of eosinophils. However, when eosinophils were cocultured with neutrophils and stimulated with IL-8, the TBM of eosinophils was significantly augmented. This augmented TBM of eosinophils was inhibited by a matrix metalloproteinase-9 inhibitor, a leukotriene B₄ receptor antagonist, platelet-activating factor antagonists, or an anti-TNF- α monoclonal antibodies. These results suggest that neutrophils migrated in response to IL-8 may lead eosinophils to accumulate in the airways of asthma and possibly aggravate this disease.

Keywords: eosinophils; growth-related oncogene- α ; interleukin-8; neutrophils; trans-basement membrane migration

Eosinophils, inflammatory cells predominantly found in the airways of patients with asthma, likely contribute to airway remodeling or airflow limitation observed with asthma (1–4). The mechanism by which eosinophils accumulate in the airways is a complex process that is mainly regulated by cytokines, chemokines, and adhesion molecules. This process is likely to be inhibited by corticosteroid treatment via the suppression of cytokines/chemokines productions from corticosteroid-sensitive cells such as Th2 cells. In a subgroup of patients, accumulation of neutrophils is found in their airways even in the absence of apparent infection. Asthma in such patients is often severe and chronic and is refractory to corticosteroid therapy (5–8). Based on a recent report from the European network study for understanding mechanisms of severe asthma (ENFUMOSA), patients with severe asthma have greater sputum neutrophilia and evidence of ongoing eosinophil-derived mediator release, compared with patients with mild to moderate asthma, suggesting that both neutrophilic and eosinophilic inflammation persists in the airways of severe asthma (9). In this context, we have recently reported a positive correlation between the concentrations of

neutrophils and eosinophils in induced sputum from patients with severe persistent asthma who are treated with medicines including systemic corticosteroid (10).

Functions of neutrophils are not effectively suppressed by corticosteroids (11, 12), suggesting that neutrophils may play a role in the pathophysiology of the disease in such patients. There are many reports which suggest that neutrophils are exposed to a variety of inflammatory mediators in the airways of patients with asthma. For example, interleukin-8 (IL-8), which acts as a chemoattractant for neutrophils, is found in bronchoalveolar lavage fluid and serum from patients with asthma (13–16). Concentration of IL-8 has been shown to be correlated with accumulation of neutrophils in the airways of asthma (6), and therefore this chemokine may be an essential molecule responsible for the development of neutrophilic inflammation in asthma. Activated neutrophils can secrete a variety of mediators (e.g., matrix metalloproteinases [MMPs], leukotriene B₄ [LTB₄], platelet-activating factor [PAF], and TNF- α) that can induce digestion of basement membrane, or migration or activation of eosinophils (17, 18), and may thus contribute to the pathophysiology of asthma.

We framed a hypothesis that neutrophils stimulated with and migrated to IL-8 play roles in the regulation of eosinophilic inflammation in asthma. Trans-basement membrane migration (TBM) is one of the key processes by which circulating eosinophils accumulate in the airways of asthma. Here we report that a combination of IL-8 and neutrophils augment the TBM of eosinophils.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Anti-CD16 antibody-coated magnetic beads were purchased from Miltenyi Biotec (Auburn, CA). Percoll was purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden). HBSS was purchased from GIBCO BRL (Grand Island, NY). BIL260, an LTB₄ receptor antagonist, and WEB2086 and WEB2170, PAF receptor antagonists, were provided by Boehringer Ingelheim (Ridgefield, CT). MMP-9 inhibitor and GM1489, an MMP inhibitor, was purchased from Calbiochem (San Diego, CA). AA861, a 5-lipoxygenase (LO) inhibitor, and PBS were obtained from Wako (Osaka, Japan). IL-8, Growth-related oncogene- α (GRO- α), TNF- α , eotaxin, regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES), and anti-CXC chemokine receptor 2 (CXCR2) antibody were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). LTB₄ was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). PAF, Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), *o*-phenylenediamine (OPD), and BSA were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Anti-TNF- α monoclonal antibody (mAb) (clone Mab11, mouse IgG1) was purchased from Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ). Mouse IgG1, an isotype control for anti-TNF- α mAb, and newborn calf serum (NCS) were purchased from ICN Biomedicals, Inc. (Aurora, OH). The acetoxy methyl ester of 2'-7'-bis(2-carboxy-ethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF-AM) was purchased from Dojin Laboratory (Kumamoto, Japan).

Preparation of Neutrophils and Eosinophils

Neutrophils and eosinophils were isolated from peripheral blood collected from nonatopic healthy donors whose eosinophil content was < 5% of

(Received in original form August 4, 2005 and in final form January 18, 2006)

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Makoto Nagata M.D., Ph.D., Department of Respiratory Medicine, Saitama Medical School, Saitama, Japan. E-mail: favred4m@saitama-med.ac.jp

Am J Respir Cell Mol Biol Vol 34, pp 760–765, 2006

Originally Published in Press as DOI: 10.1165/rcmb.2005.0303OC on February 2, 2006

Internet address: www.atsjournals.org

their peripheral leukocytes. In some experiments, cells isolated from individuals with mild intermittent asthma were also used. The numbers of males and females were comparable among donors, with similar age distributions ranging from 20–38 yr. Informed consent was obtained before collection of each blood sample. Neutrophils and eosinophils were separated by the combination of Percoll density gradient centrifugation and negative immunomagnetic bead selection as previously described (19, 20). Briefly, 40 ml of dextran were added to 160 ml of heparinized blood, and erythrocytes were removed as sediment. The remaining suspension of leukocytes was layered onto Percoll gradients of 1.080, 1.085, and 1.090 g/ml in density. After centrifugation at $700 \times g$ for 20 min, neutrophils (purity exceeded 95%) were collected from 1.085/1.090 g/ml interface, and suspended in HBSS containing 0.2% BSA (HBSS/BSA buffer). After the removal of Percoll, the red blood cells in the pellet were lysed by hypotonic shock and removed by washing with cold PBS. The remaining cells were washed with 4°C HBSS supplemented with 2% NCS (HBSS/NCS), then incubated with anti-CD16 antibody-coated magnetic beads for 30 min at 4°C, and were then filtered with a column containing steel wool placed in a magnetic field (Miltenyi Biotec). Eosinophils (>98% purity and >99% viability), which passed through the column, were collected and washed, and the number of cells was adjusted to 2.5×10^6 cells/ml by using HBSS/BSA buffer.

TBM

The TBM of neutrophils and eosinophils was examined using a modified Boyden's chamber method (21). The study was conducted in duplicate. Briefly, neutrophils were suspended in loading buffer with BCECF-AM at a final concentration of $1 \mu\text{M}$ and incubated for 30 min at 37°C while shading the light (22, 23). The cells retain the label at least for 90 min (23) and superoxide anion generation in response to PMA (0.5 ng/ml) was not modified by BCECF-AM (our unpublished observation). Labeled neutrophils (0.5×10^6 cells), eosinophils (0.5×10^6 cells), or a combination thereof (0.5×10^6 cells plus 0.5×10^6 cells) in a 200- μl medium were added to the upper compartment of a chamber with a Matrigel-coated transwell insert (pore size 3 μm ; Becton Dickinson Labware). Either the control medium (500 μl) or a medium that contained one of activators (IL-8, GRO- α , eotaxin, RANTES, and LTB $_4$) was added to the lower compartment of the chamber. After a 2-h incubation in 5% CO $_2$ at 37°C, the medium in the upper compartment of the chamber and the inserts between the chambers were gently removed. The peroxidase activity of eosinophils in the medium in the lower compartment of the chamber was determined, and the number of migrated eosinophils was calculated from the activity of the standard media which contained known numbers (5×10^3 , 1.5×10^4 , 5×10^4 , 1.5×10^5 , and 5×10^5 cells) of eosinophils. To determine the peroxidase activity of eosinophils, the medium was incubated with a substrate (1 mM OPD, 1 mM H $_2$ O $_2$, and 0.1% Triton X-100 in Tris-HCl, pH 8.0) for 30 min at room temperature (21). The reaction was stopped by adding 100 μl of 4N H $_2$ SO $_4$ and absorbance at 490 nm was determined (21). The effect of neutrophils on the outer density value in this assay was negligible: 0.046 ± 0.002 for 0% control and 0.064 ± 0.006 for 100% control of neutrophils, respectively ($n = 4$). Similarly, addition of neutrophils to 100% control of eosinophils did not modify the outer density value (1.566 ± 0.023 by addition of 0% control versus 1.569 ± 0.012 by addition of 100% control of neutrophils ($n = 4$, $P = \text{n.s.}$). The numbers of migrated neutrophils were determined by the measurement of fluorescence in the medium using the Fluoromark (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) microplate fluorometer (23). The number of migrated neutrophils determined by this method was highly correlated with those counted by hemocytometer ($n = 13$, $P < 0.001$, $r = 0.9$, Pearson's correlation coefficient). The viability of both eosinophils and neutrophils after migration exceeded 98% by trypan blue exclusion.

Blocking Study

Both eosinophils and neutrophils were incubated in a medium containing BIL260, WEB2086, WEB2170 or AA861 for 15 min at 37°C, in a medium containing anti-TNF- α mAb (clone Mab11) or an isotype matched control mouse IgG1 for 15 min at ambient temperature, or in a medium containing MMP-9 inhibitor for 30 min at 37°C. The media containing the cells were then transferred to the upper compartment of the chamber, and the assay was performed as described above.

Statistical Analysis

Values are expressed as means \pm SEM. Student's t test was conducted to compare two groups, and repeated-measures ANOVA with Scheffé's constants were used to compare more than two groups. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Effects of Neutrophils on the TBM of Eosinophils

To investigate whether stimulated neutrophils affect the TBM of eosinophils, we cocubated a mixture of eosinophils and neutrophils in the presence or absence of IL-8, a CXC chemokine that selectively stimulates chemotactic response of neutrophils. Preliminary experiments confirmed that 10 nM of IL-8 is sufficient to induce the TBM of neutrophils (data not shown). Neither a cocubation with neutrophils nor IL-8 (10 nM) alone induced the TBM of eosinophils (migrated eosinophils: $0.9 \pm 0.4\%$ by medium control, $2.2 \pm 0.8\%$ by cocubation with neutrophils, $P = \text{n.s.}$; $1.9 \pm 0.5\%$ by IL-8 alone, $P = \text{n.s.}$; $n = 10$) (Figure 1). However, when eosinophils were cocubated with neutrophils and stimulated with IL-8, a significant TBM of eosinophils was observed (migrated eosinophils: $12.9 \pm 3.1\%$, $P < 0.01$ versus the other three conditions; $n = 10$) (Figure 1). Checkerboard analysis confirmed that the effect of IL-8 on the TBM of eosinophils cocubated with neutrophils is chemotactic ($n = 3$, data not shown). When the transigrations of neutrophils by IL-8 and eosinophils by a combination of IL-8 and neutrophils were simultaneously examined, the capacity of eosinophils to migrate was significantly correlated with the number of neutrophils that migrate ($P = 0.002$, $r = 0.54$, $n = 6$). The time-course profile of TBM of eosinophils traced that of neutrophils: the TBM of neutrophils reached a plateau within the first 15 min, whereas eosinophil TBM mainly occurs 15–60 min after the initiation of reaction ($n = 6$, data not shown). In selected experiments, where the effect of IL-8 and neutrophils on the TBM of eosinophils was examined using both eosinophils and neutrophils from donors with mild asthma provided similar results: only a combination of IL-8 and neutrophils induced the TBM of eosinophils ($n = 3$, data not shown). Furthermore, when eosinophils were cocubated with neutrophils from different donors, a similar phenomenon was observed: only a combination of IL-8 and neutrophils, but not IL-8 alone or neutrophils alone, induced the TBM of eosinophils ($n = 3$, data not shown). GRO- α (10 nM), another CXC chemokine, showed similar results: the TBM of

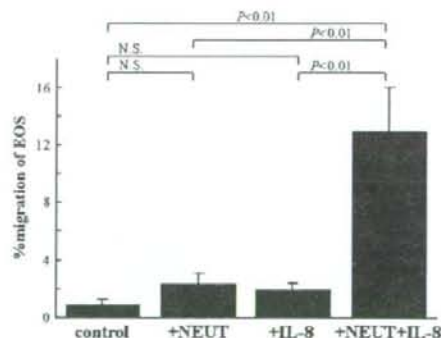


Figure 1. Effects of neutrophils and IL-8 (10 nM) on the TBM of eosinophils. The means \pm SEM of 10 experiments using cells from different donors are shown. N.S., not significant.