

37) 杉浦久敏, 小荒井晃, 一ノ瀬正和: 難治性喘息における酸化・窒素化ストレスについて, 第4回バイオマーカー研究会, 東京, 2008.03.01

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。

「気道炎症モニタリングの一般臨床応用化:新しい喘息管理目標の確立に関する研究」

—呼気中の脂質メディエータ測定の喘息管理における臨床応用に関するデータ集積—

研究分担者 秋山一男 独立行政法人国立病院機構相模原病院副院長・臨床研究センター長

研究協力者 粒来崇博 三田晴久 小野恵美子 東 憲孝 鈴木澤尚美 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 龍野清香

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。そのため、気道炎症を評価する方法論が求められている。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を回収する方法が考案された(呼気凝縮液(exhaled breath condensate: EBC))。平成16年度に「気道過敏性の簡便な診断法開発とその応用による喘息管理向上に関する研究」班において気道過敏性を評価する簡便な方法としての EBC の可能性について報告した。また、平成 17-19 年度には「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」班において、EBC 回収時の方法論、EBC 中 Cysteinyl Leukotriene(cysLTs)の喘息重症度との関連、EBC 中 cysLTs 濃度の予後予測における有用性、EBC 中 Leukotriene B₄ (LTB₄)濃度が重症例で高値になることについて報告した。今年度より、呼気中の脂質メディエータ測定の喘息管理における臨床応用に関するデータ集積を目的とする。まず、LTB₄と好中球性気道炎症の関連について検討した。また、抗原吸入試験はアレルギーによる喘息発作を端的に評価する方法であるが、その際にマスト細胞、好酸球によるメディエータの動きが重要となるため、EBC 中メディエータの測定を抗原吸入前後で行い調査した。EBC 中 LTB₄は有意に重症群で高値であった。喀痰好中球が多いほど高値になる傾向があった。抗原吸入において即時反応陽性の群では EBC 中 cysLTs、EBC 中 PGD₂は有意に増加したのに対し、陰性群では増加しなかった。抗原吸入によるFEV₁低下率とEBC 中 cysLTs 増加量は有意な正の相関を示した。以上より呼気凝縮液の位置づけについてはさらに詳細な検討が必要であるが、患者に負担を強いることなく喘息の病態を判定できる検査になりうる。

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が増加しており、重症度との関連や、cytokine の変化がみられる等の報告が多数なされている。平成16年度に「気道過敏性の簡便な診断法開発とその応用による喘息管理向上に関する研究」班において気道過敏性を評価する簡便な方法としての EBC の可能性について報告した。また、平成 17-19 年度には「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」班において、EBC 回収時の方法論、EBC 中 Cysteinyl Leukotriene(cysLTs)の喘息重症度との関連、EBC 中 cysLTs 濃度の予後予測における有用性、EBC 中 Leukotriene B₄(LTB₄)濃度が重症例で高値になることについて報告した。しかしながら本邦での研究報告は未だ不足しており、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脂質メディエータに注目し、Leukotriene などアラキドン酸関連のメディエータを EBC で測定し、様々な病態における意味づけを行うため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 41 例において昨年度確立した 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。次に、アトピー型気管支喘息 31 例において、Derp1 による抗原吸入負荷試験を行い、前後で EBC と尿を測定比較検討した。

(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

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 分の安静呼吸を行い、呼吸を連続的に機器内で -20℃ に冷却、EBC を採取した。回収した EBC は -80℃ 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. ELISA Kit (Cayman) で測定

(5) FeNO、気道過敏性検査、抗原吸入負荷試験

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、ヒスタミン (His) に対する過敏性を標準法で評価し、PC₂₀ を指標とした。抗原吸入負荷試験は Derp1 を用いて標準法で行い、前後で EBC 及び尿の回収を行った。

(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、Hancei 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。

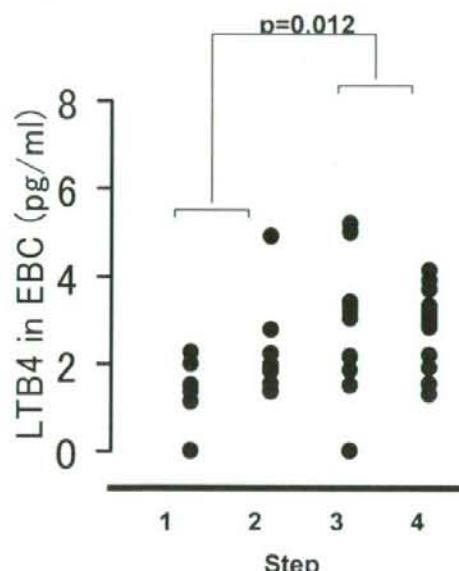
(8) PGD₂ の評価

EBC 中 PGD₂ は、Bond Elute C18 カラムで抽出、エチルアセテートで溶出後 ELISA で測定した。尿中では代謝産物である 9α 11β PGF₂ を抽出し ELISA 測定とした。

C. 結果

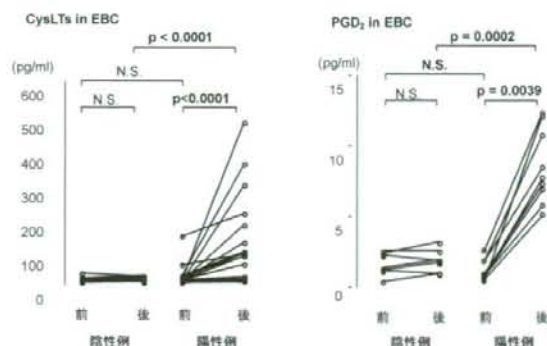
①EBC 中 LTB_4 濃度

41 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: 1.90 ± 0.29 vs 2.91 ± 0.24 (pg/ml), (pg/ml, 平均))。また、自然痰を採取した 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, $p=0.0075$)。FeNO との比較では相関を認めなかった。尿中 LTB_4 と相関を認めなかった。



④抗原吸入試験における評価

抗原吸入において即時反応陽性の群では EBC 中 $cysLTs$, EBC 中 PGD_2 は有意に増加し、尿中でもそれらのメディエータの代謝産物が増加していたのに対し、陰性群では増加しなかった。Histamine は測定感度以下であった。抗原吸入による FEV_1 低下率と EBC 中 $cysLTs$ 増加量は有意な正の相関を示したが尿代謝産物とは相関しなかった。



D. 考察

EBC 中 LTB_4 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、 LTB_4 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。

抗原吸入試験はダニアレルゲンによる喘息の増悪発作を再現する最も実際の反応に近い検査であるため、試験によるメディエータ変化は臨床上きわめて重要である。Mast Cell が反応の主体であるのは明確であるため Histamine が評価できれば有用なはずであったが、感度以下であった。微量のため測定し得ないと考えられ、EBC を用いた評価では Mast Cell の活性化マーカー PGD_2 系統を測定評価することがよいと考えられ、予測通り陽性例でのみ明確な増加を認めた。また、Leukotriene は即時、遅発両反応で働くと考えられているが、 $CysLTs$ が反応で増加ししかも一秒量低下率と有意な相関を示すということは、即時反応において $CysLTs$ が重要な働きを示している傍証であり、また EBC 中 $CysLTs$ を評価に用いることでアレルゲンに対する気道内反応を評価しうる可能性を示している。

E. 結論

以上よりEBC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。今後さらに検討を加え、脂質メタボリックシンドローム測定での喘息評価における可能性を調査していく予定である。

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1・論文発表

粒来崇博, 三田晴久, 釣木澤尚実, 押方智也子, 小野恵美子, 福富友馬, 谷本英則, 関谷潔史, 大友守, 前田裕二, 谷口正実, 池原邦彦, 秋山一男 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 巻2号 121-129(2008.02)

Ono E, Mita H, Taniguchi M, Higashi N, Tsuburai T, Hasegawa M, Miyazaki E, Kumamoto T, Akiyama K. Increase in inflammatory mediator concentrations in exhaled breath condensate after allergen inhalation. J Allergy Clin Immunol. 2008 Oct;122(4):768-773.

2・学会発表

小野恵美子, 三田晴久, 粒来崇博, 秋山一男他. 抗原吸入試験の即時型喘息反応時の呼気凝縮液と尿中炎症メディエータの変化. 第20回日本アレルギー学会春季臨床大会 東京 2008

粒来崇博, 三田晴久, 小野恵美子, 秋山一男他. ワークショップ8『臨床:気管支喘息のモニタリングをめぐる』呼気凝縮液. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008.11月 東京

粒来崇博. 喘息管理の現状と課題ーバイオマーカーを用いた、新しい喘息長期管理の可能性ー. 第二回神奈川喘息長期管理研究会 2008.8月 横浜

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

気道炎症モニタリングの一般臨床応用化：新しい喘息管理目標の確立に関する研究

—呼気中の液性因子測定の喘息管理における臨床応用に関するデータ集積—

研究分担者：大田 健 帝京大学医学部内科学講座 呼吸器アレルギー内科教授

研究協力者：長瀬洋之（同講師）、鈴木真穂（リサーチレジデント）、原麻恵（同大学院生）、
小島康弘（同大学院生）、

研究要旨

A 研究目的 本研究班の研究目的は、気道炎症モニタリングに基づいた喘息管理を一般臨床応用することを目的としている。本分担研究では、呼気凝縮液中のサイトカイン・ケモカイン濃度と喘息コントロール状態との関連を明らかにし、難治性喘息の気道炎症の特徴や、治療ステップダウンの指標を抽出することを目的とした。

B 方法 当院外来通院中の気管支喘息患者 64 例を対象とした。呼気 NO 濃度（FeNO）測定、呼気凝縮液採取を行い、喘息コントロール状態を喘息コントロールテスト（ACT）で評価した。呼気凝縮液は凍結保存後に 10 倍濃縮し、27 種の液性因子濃度を Luminex システムで測定した。ACT 25 点（H 群, n=13）、20-24 点（M 群, n=29）、20 点未満（L 群, n=22）の 3 群に分類し、呼気凝縮液中液性因子濃度及び FeNO と ACT スコアとの関連を検討した。

C 結果 L 群では、有意に罹病期間が長く、H 群では、治療下での Step 分類が低かった。呼気 NO 濃度は、M、L 群で高い傾向を認めたが、有意差には至らなかった。測定可能であった分子は、IP10、VEGF、IL-1b、IL-1ra であった。IP10 は H 群で有意に高値で、ACT スコアとも有意な正相関を示した。IP10 が 0.7 pg/ml 以上の 15/16 症例が ACT 20 点以上であった。IL-1b、IL-1ra は有意差に達しなかったが、L 群で高値をとった。IL-1ra が 1 pg/ml 以上の 5/10 症例が、IL-1b が 0.08 pg/ml 以上の 9/16 症例が ACT20 点未満であった。L 群で高値傾向をとった、NO、IL-1b、IL-1ra 間には有意な正相関を認めた。

D 考察 IP10 は Th1 系ケモカインであり、IP10 上昇は、Th1/Th2 バランスにおける Th1 への偏倚傾向を示唆し、コントロール良好状態を反映している可能性が考えられた。また、IL-1b はアレルギー性疾患に特異的分子ではないが、線維芽細胞の活性化作用を持つなど、リモデリングへの関与が想定される分子であり、IL-1b 上昇とコントロール不良状態との関連が示唆された。

E 結論 Th1 系ケモカイン IP10 は喘息コントロール良好マーカー、炎症性サイトカイン IL-1b は喘息コントロール不良マーカーと考えられた。

A. 研究目的

本邦における喘息管理は吸入ステロイドの普及により大きく進歩しているが、未だに喘息死は2778名を数えており、さらなる管理向上が望まれている。本研究班では、気道炎症モニタリングに基づいた喘息管理を一般臨床応用することを目的としているが、本分担研究では、呼気中の気道炎症マーカーの中でも、呼気凝縮液中のサイトカイン・ケモカイン濃度と喘息コントロール状態との関連を明らかにし、難治性喘息の気道炎症の特徴や、治療ステップダウンの指標を抽出することを目的とした。

B. 研究方法

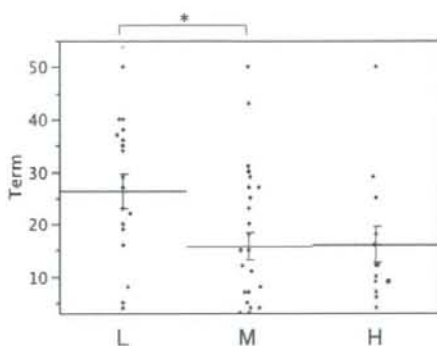
当院外来通院中の気管支喘息患者64例を対象とした。呼気NO濃度 (FeNO) 測定、呼気凝縮液採取を行い、同時に喘息コントロール状態を喘息コントロールテスト (ACT) で評価した。呼気凝縮液はエコスクリーン (Jaeger社) を用い、15分程度の安静換気を行い、呼気を急速冷却することにより検体を採取した。凍結保存後に10倍濃縮し、サイトカイン・ケモカイン27種の濃度をLuminexシステムで測定した。ACT 25点 (H群, n=13)、20-24点 (M群, n=29)、20点未満 (L群, n=22)の3群に分類した。呼気凝縮液中液性因子濃度及びFeNOとACTスコアとの関連を検討した。

C. 結果

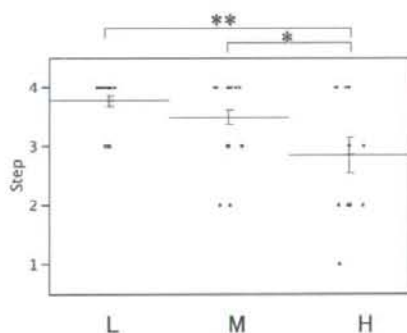
L群では、有意に罹病期間が長く (図1: H:M:L=15.9:15.7:26.2年)、H群では、治療下でのStep分類が低かった (図2: H:M:L=2.84:3.48:3.77)。各群間には、年齢、性別、喫煙における有意差はなかった。呼気NO濃度は、M、L群で高い傾向を認めたが、有意差には至らなかった (図3: H:M:L=28.8:42.3:44.3 ppb)。

(図1) 重症度別の罹病期間

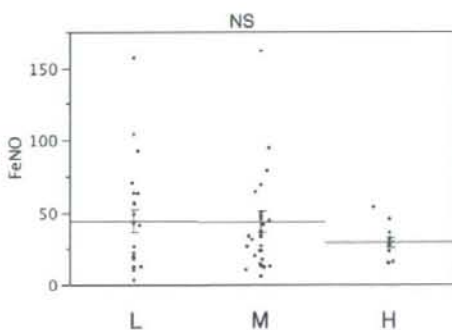
L群: ACT20点未満, M群: 20-24点, H群: 25点



(図2) 治療下における Step 分類

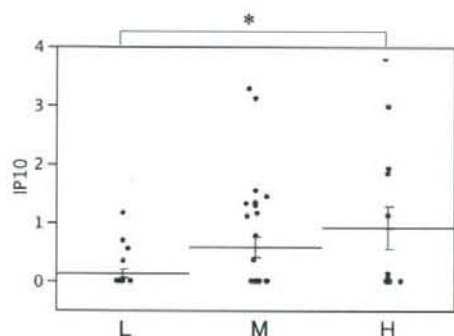


(図3) 呼気 NO 濃度



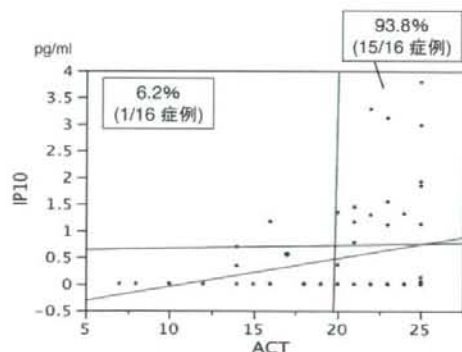
測定可能であった分子は、IP10、VEGF、IL-1b、IL-1raであった。IP10はH群で有意に高値で(図4: H:M:L=0.91: 0.58: 0.13 pg/ml)、ACTスコアとも有意な正相関を示した(図5)。IP10が0.7 pg/ml以上の16症例のうち、15症例(93.8%)がACT20点以上であった(図5)。

(図4) 呼気凝縮液中 IP10 濃度



(図5) IP10 濃度と ACT スコアとの相関

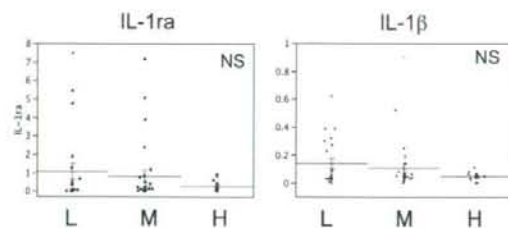
$$IP10 = -0.58 + 0.053 \times ACT, R^2=0.073, p=0.0312$$



IL-1b (H:M:L= 0.05: 0.10: 0.14 pg/ml)、IL-1ra (0.26: 0.81: 1.06 pg/ml)は有意差に達しなかったが、L群で高値をとった(図6)。IL-1raが1 pg/ml以上の10症例のうち5症例(50%)が、IL-1bが0.08 pg/ml以上の16症例のうち9症例(56.3%)がACT20点未満であった(図

7)。L群で高値傾向をとった、NO、IL-1b、IL-1ra間には有意な正相関を認めた(図8)。

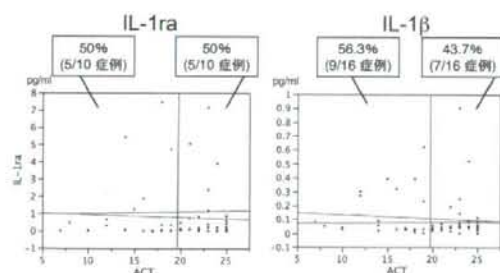
(図6) 呼気凝縮液中 IL-1ra および IL-1b 濃度



(図7) IL-1ra および IL-1b 濃度と ACT スコアとの相関

$$IL-1ra = 1.11 - 0.016 \times ACT, R^2=0.0020, p=0.72$$

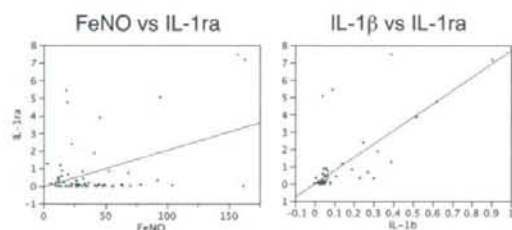
$$IL-1b = 0.16 - 0.0028 \times ACT, R^2=0.066, p=0.52$$



(図8) IL-1ra, IL-1b, FeNO 間の相関

$$\text{IL-1ra} = -0.06 + 0.02 \times \text{FeNO}, R^2=0.19, p=0.0003$$

$$\text{IL-1ra} = -0.020 + 7.70 \times \text{IL-1b}, R^2=0.54, p<0.0001$$



D. 考察

IP10 発現は健常人に比して、肺アレルギー性気道炎症で上昇していることや (Medoff D. et al., *J Immunol*, 2002;168:5278)、喘息呼気凝縮液では IP10 濃度が上昇していることが報告されており (Matsunaga K. et al, *JACI*, 2006;118:84)、喘息気道炎症において、悪玉であることも示唆されている。一方、今回の検討においては呼気凝縮液中 IP10 濃度と ACT は正相関しており、喘息患者を母集団とした場合コントロール良好状態を反映するマーカーであることが示唆された。IP10 は Th1 選択的に遊走を惹起する Th1 系ケモカインとされており、IP10 上昇は、Th1/Th2 バランスにおける Th1 への偏倚傾向を示唆し、コントロール良好状態を反映している可能性が考えられた。しかし、既報では有意差を認めないものの、一秒量とは負の相関を示すことが報告されており、測定方法も今回の方法とは異なることから、今後の検証が必要である。

IL-1b はアレルギー性疾患に特異的な分子ではないが、線維芽細胞の活性化作用を持つなど、リモデリングへの関与が想定される分子である。既報においても、喘

息患者由来の気道上皮細胞からは IL-1 β 、IL-1ra 産生が亢進していることが報告されている (Sousa AR et al. *AJRCCM*, 1996;154:1061)。今回の検討では、ACT 低値群で高値傾向をとったことより、コントロール不良状態を反映するマーカーであることが示唆された。また、これらのサイトカインと呼気 NO 濃度は有意な正相関を示したことより、簡便な指標としての呼気 NO 濃度の有用性も示唆された。

E. 結論

呼気凝縮液中 IP10 濃度は喘息コントロール良好マーカー、IL-1b 濃度は喘息コントロール不良マーカーと考えられた。今後、これらの分子の生物学的意義や、臨床的指標として実際に用いられるかどうかについて、さらに検討が必要である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

英文論文

1) An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor. Suzukawa M, Iikura M, Koketsu R, Nagase H, Tamura C, Komiya A, Nakae S, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Yamaguchi M.

J Immunol 181(9):5981-9, 2008.

2) Interleukin-33 enhances adhesion, CD11b expression and survival in human eosinophils.

Suzukawa M, Koketsu R, Iikura M, Nakae S, Matsumoto K, Nagase H, Saito H, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Yamaguchi M.

Lab Invest 88(11):1245-53, 2008.

和文論文

1) 竹澤智湖：気管支喘息と胃食道逆流との関連についての臨床的・実験的検討 QUEST問診票に基づく胃食道逆流診断と治療的介入の効果

帝京医学雑誌 31(2)：75-86, 2008.

2) 長瀬洋之：アスリートの喘息にかかわる諸問題、喘息と運動能力 臨床スポーツ医学 26(1)：75-7, 2009.

3) 長瀬洋之、大田 健：IGF-1 と呼吸器疾患 Annual Review呼吸器 2008、中外医学社、東京、40-43、2008.

2. 学会発表

国際学会

1) Nagase H, Yoshihara H, Yamana K, Kojima Y, Suzukawa M, Ishida H, Adachi T, Nakano J, Ohta K The Effect of KGF-expressing Plasmid Vector on Silica-induced Lung Injury American Thoracic Society Annual Meeting, Toronto, Canada, May, 2008

2) Kojima Y, Nagase H, Yoshihara H, Suzukawa M, Ishida H, Adachi T, Nakano J, Ohta K. Suppression of Lung Inflammation Induced with Silica in Apolipoprotein E-deficient Mice American Thoracic Society Annual Meeting, Toronto, Canada, May, 2008

国内学会

1) 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ルギー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

2) 原 麻恵、長瀬洋之、小島康弘、鈴木真穂、石田博文、中野純一、足立哲也、鈴木直仁、大田 健：ポスターセッション40 重症持続型喘息における胃食道逆流、睡眠時無呼吸症候群、心身症合併とQOLとの相関. 第20回日本アレルギー学会春季臨床大会 東京 2008年6

月

3) 小林信之、工藤宏一郎、飯倉元保、大田 健、長瀬洋之、永田 眞、上村光弘：ミニシンポジウム8 成人喘息患者における吸入ステロイドの中止基準に関する検討 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京 2008年11月

4) 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

5) 長瀬洋之、高野裕久、井上健一郎、原 麻恵、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14 菌体成分による気道上皮細胞からのサイトカイン産生に及ぼすディーゼル排気微粒子 (DEP) の効果 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京 2008年11月

6) 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

7) 長瀬洋之：イブニングシンポジウム10-3. 喘息急性増悪の治療体系とそのエビデンス- JGL とGINA の比較-. 第48回日本呼吸器学会学術講演会. 神戸 2008年6月

8) 長瀬洋之、大田 健：ランチョンセミナー6：アスリートと喘息 第19回日本臨床スポーツ医学会学術集会 千葉 2008年11月

9) 長瀬洋之、大田 健：ワークショップ8 1 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

10) 長瀬洋之、大田 健：シンポジウム1-4 遺伝子型研究とモデリングから 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。

気管支喘息における誘発喀痰中の制御性T細胞および抗炎症サイトカインの
バイオマーカーとしての意義に関する検討
—吸入ステロイドの治療効果による反応—

研究分担者：相澤久道（久留米大学医学部内科学講座呼吸器・神経・膠原病内科部門教授）

研究協力者：川山智隆（講師） 星野友昭（講師） 松永和子（助教） 戸田玲子（助教）

田尻守拓（助教） 坂崎優樹（大学院生） 澤田昌典（大学院生）

（久留米大学医学部内科学講座呼吸器・神経・膠原病内科部門）

研究要旨

喘息は慢性気道炎症を主体とした疾患で、気道炎症の病態を把握することは、喘息治療に重要なことである。これまでの研究で、誘発喀痰採取による気道炎症細胞および喀痰上清中ケミカルメディエーター測定は、喘息の病態を把握する上で簡便かつ安全で、有用な検査法であることを報告してきた。誘発喀痰中のCTLA-4陽性CD25+CD4+T細胞が、健常者に比べ喘息患者の気道で低下しており、喘息患者におけるアレルギー吸入負荷試験でCTLA-4陽性CD25+CD4+T細胞が低下した。CTLA-4陽性CD25+CD4+T細胞が炎症を抑制する制御性T細胞であると考えられた。平成20年度の研究では、誘発喀痰を用いた気道炎症評価法の臨床応用に向けて、1) ステロイド治療による誘発喀痰中CTLA-4陽性CD25+CD4+T細胞の変化と呼吸生理パラメーターの変化との関連、2) 喀痰上清中のサイトカイン・ケモカインの定量測定、について検討を行った。ステロイド治療により、誘発喀痰中CTLA-4陽性CD25+CD4+T細胞は有意に増加し、喀痰上清中の抗炎症サイトカインであるIL-10も増加した。誘発喀痰中CTLA-4陽性CD25+CD4+T細胞と好酸球は負の相関を示したが、呼吸生理パラメーターの変化との相関は認められなかった。一方、IL-10、TGF-βはステロイド治療では変化なかった。これらの細胞あるいはケミカルメディエーターは、今後の臨床応用に向けて喘息のモニタリングや病態解明のマーカーとして有望な候補となると考えられた。

A. 研究目的

気管支喘息（以下、喘息）の病態の主体は慢性気道炎症である。気道炎症には、好酸球、肥満細胞、リンパ球や抗原提示細胞などの多くの炎症細胞が関与している。さらに、これらの炎症細胞から産生されるサイトカインやケモカインが複雑なネットワークを形成している。従来、気道炎症の

把握として、気管支内視鏡を用いた気管支生検組織や気管支肺胞洗浄液あるいは手術や解剖における摘出標本などを用いた病理学的が行われてきたが、侵襲性が高く、経時的な評価は困難であった。

一方、誘発喀痰は、高調食塩水を吸入した後に喀痰を採取する方法で、喘息患者のみならず健常人からの検体

採取も可能である。また、同一被験者から反復して採取でき、経時的な評価も可能である。しかも、適切に処理すれば、炎症細胞および喀痰中のサイトカインやケモカインなどのケミカルメディエーターの測定できる利点がある。

平成19年度までに、誘発喀痰中の制御性T細胞のひとつであるCTLA-4陽性CD25+CD4+T細胞が、アトピー型喘息患者において、正常健康人に比較して低値であり、アレルギー吸入負荷試験において、CTLA-4陽性CD25+CD4+T細胞が低下することを明らかにした。

平成20年度の研究では、誘発喀痰を用いた気道炎症評価法の臨床応用に向けて、1)ステロイド治療による誘発喀痰中CTLA-4陽性CD25+CD4+T細胞の変化と呼吸生理パラメーターの変化との関連、2)喀痰上清中のサイトカイン・ケモカインの定量測定、について検討を行った。

B. 研究方法

1) 対象

軽症喘息患者11名から文書による同意を得た後に、14日間の吸入ステロイド（プロピオン酸フルチカゾン400 μ g/day）療法の前後において、誘発喀採取、スパイロメトリーおよびメサコリンによる気道過敏性試験（PC₂₀）を行なった。21日の薬物洗い出し期間を設けた二重盲検・クロスオーバー試験で、プラセボとの比較を行なった。誘発喀痰中CTLA-4陽性CD25+CD4+細胞、好酸球分画および抗炎症サイトカインおよびケモカイン（IL-10、IL-13 およびTGF- β 1）を測定し、これらの炎症性マーカー、肺機能PC₂₀の変化率との相関も検討した。

2) 誘発喀痰の採取

短時間作用型 β_2 刺激薬吸入15分後に、ネブライザーを用いて3%、4%および5%の高調食塩水をそれぞれ7分間吸入し、自己喀出痰を採取した。喀痰採取中の喘息発作の確認のため、各高調食塩水吸入後に1秒量を測定した。

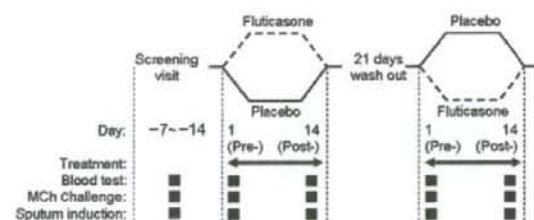
3) 誘発喀痰中の細胞成分および喀痰上清中サイトカインおよびケモカインの測定

誘発喀痰は肉眼的に唾液成分から分離し、0.1%ジチオトレイトールで処理した後に、細胞成分および喀痰上清成分に分離した。細胞成分は、総細胞数およびサイトスピンプレパートのメイギムザ染色による細胞分画の測定を行なった。各種リンパ球サブセットおよびCTLA-4陽性CD25+CD4+T細胞分画はフローサイトメトリーを用いた（FACScan, Becton, Dickinson社）。喀痰上清中の各種サイトカインおよびケモカインの定量は、ELISA kit（Quantikine, R&D systems）を用いて測定した。

4) 呼吸機能の測定

肺機能検査は、電子スパイロメーター（Cestgraph Jr HI-101, Chest社）を用いて測定した。

気道過敏性はメサコリン吸入刺激に対する気道反応性で一回換気法にて測定した。1秒量がメサコリン吸入前の値から20%低下したメサコリン濃度（PC₂₀）を指標とした。

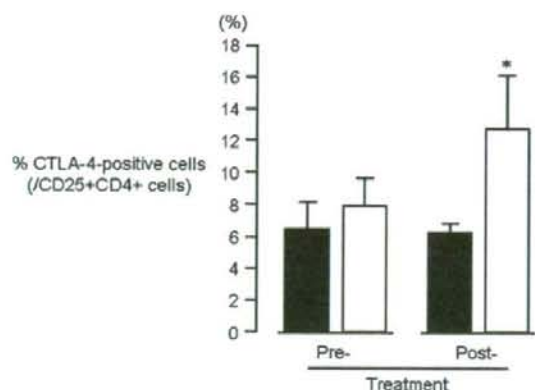


C. 結果

1) 吸入ステロイドによる喀痰中炎症細胞成分の変化

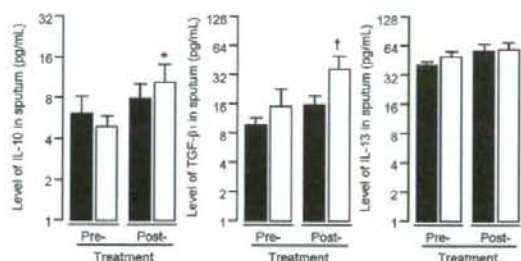
吸入ステロイドは、誘発喀痰中の好酸球分画を12.2%から7.4%へ有意に低下させた（ $p < 0.05$ ）が、プラセボ群では変化がなかった。喀痰中CD3（T細胞）、CD19（B細胞）、CD4（ヘルパーT細胞）、CD8（サブプレッサーT細胞）およびCD25陽性CD4（活性化T細胞）のリンパ球サブセット分画は、吸入ステロイドおよびプラセボ群ともに変化がなかった。

が、吸入ステロイドは有意に喀痰中 CTLA-4 陽性 CD25+CD4+細胞を増加させた ($p < 0.05$)。



2) 吸入ステロイドによる喀痰上清中サイトカインおよびケモカインの変化

吸入ステロイドによって誘発喀痰中の IL-10 の発現レベルが有意に増加したが ($p = 0.037$)、IL-13 ($p > 0.05$) や TGF- β ($p = 0.087$) の発現は変化しなかった。



3) 喀痰中の炎症細胞および喀痰上清中のサイトカイン・ケモカインと肺機能の関連性

吸入ステロイド治療前後の変化において、喀痰中の好酸球と気道過敏性は有意な負の相関を認めた ($r = -0.59$, $p < 0.01$)。しかし、喀痰中 CTLA-4 陽性 CD25+CD4+細胞分画は、気道過敏性を含めて、あらゆる呼吸機能パラメーターとの相関を認めなかった。喀痰上清中の IL-10 の変化は、気道過敏性 (PC_{20}) の変化率と正の相関傾向を認められた

が ($r = 0.44$, $p = 0.053$)、IL-13 や TGF- β には相関関係は認められなかった。

D. 考察

今回の研究において、アレルギー疾患である喘息の病態に、制御性 T 細胞のひとつである気道内の CTLA-4 陽性 CD25+CD4+細胞の低下が関与し、軽症の気管支喘息患者においては、吸入ステロイドによって、同細胞の増加が期待できることがわかった。しかし、CTLA-4 陽性 CD25+CD4+細胞の変化は呼吸機能や気道過敏性との相関は認められなかった。つまり、気道内の CTLA-4 陽性 CD25+CD4+細胞喘息の主要病態のひとつである気道過敏性にはあまり関与していない可能性がある。おそらく、吸入ステロイドは、直接的に CTLA-4 陽性 CD25+CD4+細胞に作用して、IL-10 などの抗炎症サイトカインを放出することによって、好酸球をアポトーシスに導く経路が存在すると考えられる。しかし、今回の検討では、その経路を証明できなかった。

また、誘発喀痰中の IL-13 や TGF- β は吸入ステロイド治療に抵抗性を示した。これらのサイトカインやケモカインは難治性喘息や治療抵抗性喘息の病態に関与している可能性がある。

今後、*in vitro* や動物モデルの実験系を用いて、CTLA-4 陽性 CD25+CD4+細胞と抗炎症反応および IL-13 や TGF- β の関連について検討していく必要がある。

E. 結論

誘発喀痰法は、喘息の病態解明および治療効果判定に使用できる簡便かつ有用な検査法である。しかし、気道の組織内の炎症細胞分画との相違も指摘されている。今後は、より有用な臨床応用に向けて、誘発喀痰のケミカルメディエーターとその他の呼気ガスや肺組織における炎症性バイオマーカーとの相違および相同性を確認していく必要がある。

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

英文論文

- 1) Yokoyama T, Aizawa H, et al: Multiple myeloma presenting initially with pleural effusion and a unique paraspinal tumor in the thorax. Intern Med 47: 1917-1920, 2008
- 2) Kawayama T, Aizawa H, et al: Effects of inhaled fluticasone propionate on CTLA-4-positive CD4+CD25+ cells in induced sputum in mild asthmatics. Respirology 13: 1000-1007, 2008
- 3) Hoshino T, Aizawa H, et al: Redox-regulated mechanisms in asthma. Antioxid Redox Signal 10: 769-783, 2008
- 4) Imaoka H, Aizawa H, et al: Interleukin-18 production and pulmonary function in COPD. Eur Respir J 31: 287-297, 2008
- 5) Inoue H, Aizawa H, et al: High levels of serum IL-18 promote cartilage loss through suppression of aggrecan synthesis. Bone 42: 1102-1110, 2008
- 6) Adachi M, Aizawa H, et al: Comparison of salmeterol/fluticasone propionate (FP) combination with FP+sustained release theophylline in moderate asthma patients. Resp Med 102: 1055-1064, 2008
- 7) Furumoto A, Aizawa H, et al: Additive effect of pneumococcal vaccine and influenza vaccine on acute exacerbation in patients with chronic lung disease. Vaccine 26: 4284-4289, 2008
- 8) Kawayama T, Aizawa H, et al: Effect of add-on therapy of tiotropium in COPD treated with theophylline. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 3: 137-147, 2008
- 9) Kawayama T, Aizawa H, et al: Validation of symptom-based COPD questionnaires in Japanese subjects. Respirology 13: 420-426, 2008
- 10) Minakata Y, Aizawa H, et al: Efficacy and Safety of Formoterol in Japanese Patients with COPD. Intern Med 47: 217-223, 2008
- 11) Minami S, Aizawa H, et al: Clinical efficacy of the transdermal tulobuterol patch in patients with chronic obstructive pulmonary disease:a comparison with slow-release theophylline. Intern Med 47: 503-509, 2008
- 12) Takeoka H, Aizawa H, et al: A hybrid lesion of lung cancer and aspergillosis. Clinical Medicine:Oncology 2: 115-118, 2008
- 13) Nakao I, Aizawa H, et al: Identification of pendrin as a common mediator for mucus production in bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. J Immunol 180: 6262-6269, 2008
- 14) Takata S, Aizawa H, et al: Burden among caregivers of patients with chronic obstructive pulmonary disease with long-term oxygen therapy. IMJ 15: 53-57, 2008

和文論文

- 1) 川山智隆, 相澤久道, 他: COPD患者の「肺年齢」とチオトロピウムの効果. 呼吸 27: 185-189, 2008
- 2) 岩永知秋, 相澤久道, 他: COPD疫学調査後のプライマリケア医診療の追跡調査と診療上の問題点. 呼吸 27: 71-77, 2008
- 3) 梶山智子, 相澤久道, 他: 80歳以上の高齢者非小細胞肺癌へのゲフィチニブ(イレッサR)投与に関する臨床的検討. 呼吸と循環 56: 527-532, 2008

- 4) 柏木宏子, 相澤久道, 他: 過換気症候群にて救急外来頻回受診中に、気管支喘息の合併を診断しえた2症例. 日本呼吸器学会雑誌 46: 374-375, 2008
- 5) 岩永知秋, 相澤久道, 他: 誤嚥性肺炎. 医学と薬学 59: 731-734, 2008
- 6) 相澤久道: 呼吸機能を考える 実地医家と専門医のための呼吸機能. 呼吸と循環 56: 237-238, 2008
- 7) 相澤久道: COPDの地域連携-福岡県モデル-. 治療地域医療連携実践ガイドブック. 90:1226-1232, 2008
- 8) 相澤久道: Q&A 喘息 吸入ステロイドを使うと肺炎になりやすい?. Q&Aでわかるアレルギー疾患 4: 296-300, 2008
- 9) 相澤久道: 特集 慢性閉塞性肺疾患(COPD):診断と治療の進歩 III. 治療の進歩 1. ガイドラインに基づく治療. 日本内科学会雑誌 97:57-61, 2008
- 10) 相澤久道: 「肺年齢」新しい指標による呼吸機能検査の普及推進. 呼吸と循環 56: 609-616, 2008
- 11) 横山俊伸, 廣川雅士, 相澤久道: HIV感染合併呼吸器感染症. 呼吸と循環 56: 299-304, 2008
- 12) 相澤久道, 中尾栄男, 高城 暁: 禁煙以外の外的因子とCOPD. COPDのすべて 30-33, 2008
- 13) 相澤久道: オランダ仮説とCOPD. COPDのすべて 38-39, 2008
- 14) 相澤久道: COPD質問票. COPDのすべて 116-117, 2008
- 15) 相澤久道: 検診におけるスパイロメトリーの異常値の取り扱い. COPDのすべて 154-155, 2008
- 16) 相澤久道, 中尾栄男, 富永芳和: 喀痰調整薬の意義. COPDのすべて 212-213, 2008
- 17) 相澤久道, 高城 暁: COPDをいかに診断するか: 見逃さないために. 診断と治療 96: 1041-1045, 2008
- 18) 相澤久道: 抗コリン薬(スピリーバと短時間作用性). 21世紀の吸入療法 高橋敬治監修 191-197, 2008.
- 19) 相澤久道: 気管支喘息とは. 気管支喘息の診療ポイントガイド 実地医家のための日常診療の手びき 相澤久道編著 1-3, 2008
- 20) 相澤久道: 気管支喘息の診断 診断の手順-フローチャートによる診断. 気管支喘息の診療ポイントガイド 実地医家のための日常診療の手びき 相澤久道編著 5-11, 2008
- 21) 相澤久道: 気管支喘息の診断 呼吸機能検査. 気管支喘息の診療ポイントガイド 実地医家のための日常診療の手びき 相澤久道編著 22-26, 2008
- 22) 相澤久道: 日常診療における薬物療法 吸入ステロイド薬. 気管支喘息の診療ポイントガイド 実地医家のための日常診療の手びき 相澤久道編著 46-56, 2008
- 23) 相澤久道: 発作時の治療法 発作重症度の判断. 気管支喘息の診療ポイントガイド 実地医家のための日常診療の手びき 相澤久道編著 89-96, 2008
- 24) 相澤久道: 医療連携のポイント. 気管支喘息の診療ポイントガイド 実地医家のための日常診療の手びき 相澤久道編著 133-144, 2008
- 25) 相澤久道: 付録 気管支喘息に使用されるおもな薬剤一覧. 気管支喘息の診療ポイントガイド 実地医家のための日常診療の手びき 相澤久道編著 145-148, 2008
- 26) 相澤久道: [管理1] 慢性安定期の治療. COPDハンドブック 桑平一郎編 41-48, 2008
2. 学会発表
国際学会
- 1) Imaoka H, Aizawa H, et al: IL-18 Production and Pulmonary Function in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: IL-18 Producing CD8+ T Cells Are Increased in Lungs of COPD. ATS 2008 International

Conference, 2008.05.21, Toront, Canada

- 2) Kawayama T, Aizawa H, et al: Comparison of the reliever effects of a full-and partial-short acting beta-2 agonist on methacholine-induced bronchoconstriction in asthma. ATS 2008 International Conference, 2008.05.22, Toront, Canada
- 3) Kawayama T, Iwanaga T, Aizawa H: Effects of Inhaled Fluticasone Propionate on CTLA-4 positive CD4+CD25+ Cells in Induced Sputum in Mild Asthmatics. The 18th Congress on Interasthma Japan/North Asia, 2008.07.11, Osaka, Japan
- 4) 相澤久道: 喘息における末梢気道の病態. 第 18 回国際喘息学会日本北アジア部会, 2008.07.22, 大阪

国内学会

- 1) 相澤久道: 健診にて行う COPD の診断とその後の管理. 日本総合健診医学会第 36 回大会, 神戸市, 2008.01.25
- 2) 今岡治樹, 相澤久道, 他: COPD の進行と持続する炎症機関に関する検討. 第 105 回日本内科学会総会・講演会, 東京, 2008.04.11
- 3) 木下 隆, 相澤久道, 他: 吸入ステロイドが喘息患者の喀痰中 CTLA-4 陽性 CD25+CD4+細胞に与える影響. 第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 東京, 2008.06.12
- 4) 今岡治樹, 相澤久道, 他: 肺での IL-18 強発現は、卵白アルブミン感作による好酸球浸潤を促進する. 第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 東京, 2008.06.14
- 5) 相澤久道: 非薬物療法. 第 48 回日本呼吸器学会学術講演会, 神戸市, 2008.06.15
- 6) 木下 隆, 相澤久道, 他: 当院における間質性肺炎合併肺癌の予後と治療についての検討. 第 48 回日本呼

吸器学会学術講演会, 神戸市, 2008.06.16

- 7) 井上 謙, 相澤久道, 他: COPD 患者における血中バイオマーカーの検討. 第 48 回日本呼吸器学会学術講演会, 神戸市, 2008.06.17
- 8) 岩田安弘, 相澤久道, 他: 特発性間質性肺炎(IPF, NSIP, COP)におけるレドックス活性蛋白 thioredoxin1 の発現の検討. 第 48 回日本呼吸器学会学術講演会, 神戸市, 2008.06.17
- 9) 岡元昌樹, 相澤久道, 他: 血清 IL-18 値の増加は進行性非小細胞肺癌における予後と骨転移の予測因子となりうる. 第 48 回日本呼吸器学会学術講演会, 神戸市, 2008.06.17

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。

IV. 研究報告会（平成 21 年 1 月 27 日）
発表資料

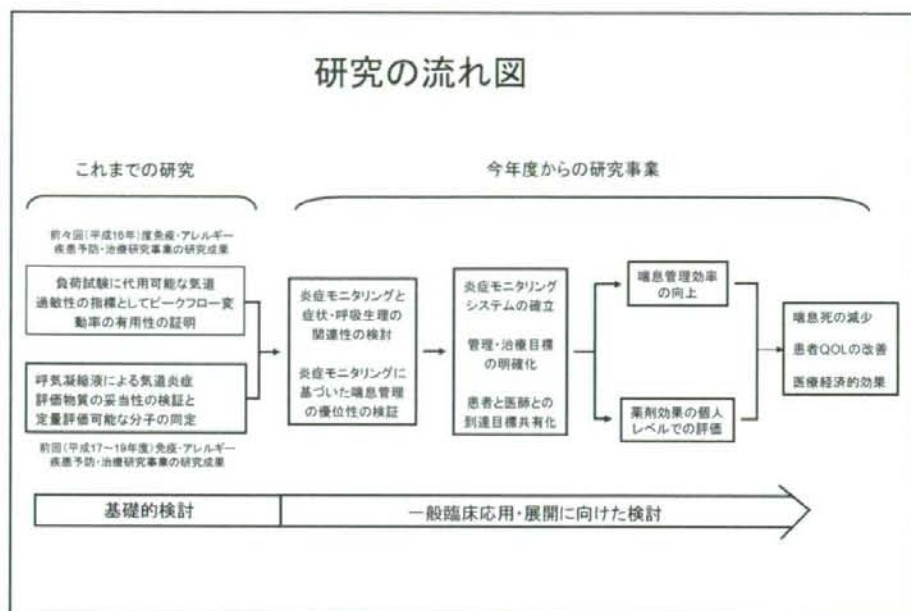
気道炎症モニタリングの一般臨床応用化： 新しい喘息管理目標の確立に関する研究

和歌山県立医科大学医学部 内科学第三講座	一ノ瀬正和
独立行政法人国立病院機構 相模原病院臨床研究センター	秋山 一男
帝京大学医学部内科学講座	大田 健
久留米大学内科学講座 呼吸器・神経・膠原病内科部門	相澤 久道

研究目的

これまで免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業における研究で証明してきた非侵襲的な呼気凝縮液や呼気ガスを用いた気道炎症評価を、現在行なわれている症状アンケートや呼吸機能検査に加えた喘息管理の新しい手段として確立し、気道炎症モニタリングを一般臨床の喘息管理へ応用展開する(3年計画の1年目)。

研究の流れ図



●喘息の呼吸機能評価 (H16年度研究)

閉塞性障害(スパイロメトリー)

気道過敏性(=ピークフローの変動値、Min%Max PEF<80%)

●気道炎症モニタリング (H17-19年度研究)

喀痰(好酸球数等)

呼気ガス(一酸化窒素、NO)

呼気凝縮液

気道被覆液(マイクロサンプリング)

●喘息症状評価

ACTスコア(5項目、25点満点)