

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

わが国における NSAIDs 過敏喘息（アスピリン喘息）の頻度と臨床像に関する前向き研究

研究代表者 谷口正実 国立病院機構相模原病院 外来部長
（アレルギー科医長・臨床研究センター気管支喘息研究室長併任）
研究協力者 東 憲 孝 国立病院機構相模原病院臨床研究センター 特別研究員
福 富 友 馬 国立病院機構相模原病院臨床研究センター 研究員
粒 来 崇 博 国立病院機構相模原病院アレルギー科 医師
三 井 千 尋 国立病院機構相模原病院アレルギー科 医師
谷 本 英 則 国立病院機構相模原病院アレルギー科 医師
関 谷 潔 史 国立病院機構相模原病院アレルギー科 医師
小野恵美子 ハーバード大学 研究員
秋 山 一 男 国立病院機構相模原病院臨床研究センター センター長

研究要旨：

NSAIDs 過敏喘息（アスピリン喘息、AIA）は成人喘息の約10%と世界的に報告されているものの、国内でのその頻度や臨床像は不明な点が多い。新規受診した成人発症喘息患者735例すべて、問診と負荷試験により NSAIDs 過敏を検討した結果、その頻度は9.1%と判明した。さらに臨床像を非AIAと比較検討した。その結果、AIAでは、有意に重症が多く、好酸球副鼻腔炎、中耳炎、胃腸炎、肺炎、異型狭心症などの好酸球性臓器病変の合併が多いことが確認された。さらにAIAの臨床像は大きく変化しており、好酸球性肺炎をのぞく、好酸球性中耳炎、胃腸症、好酸球性狭心痛は増加しており、その増加に吸入ステロイドが影響している可能性が示唆された。

A. 研究目的

背景：NSAIDs 過敏喘息（アスピリン喘息、AIA）は成人喘息の約10%と世界的に報告されているものの、国内でのその頻度や臨床像は不明な点が多い。

目的：日本人成人喘息、特に成人発症におけるAIAの頻度と臨床像を明らかにする。

床像の解析を行った。さらに非AIA確定例と比較検討した。

（倫理面への配慮）

- ・倫理委員会の審査了解を得るのはもちろん、十分な倫理的配慮と個人情報保護に努める。
- ・患者へは十分な説明をした上で、文書同意を得る。

B. 研究方法

5つの呼吸器科内科専門施設（国立病院機構2施設、公立病院1施設、民間病院2施設）に受診した成人発症喘息患者に対し NSAIDs 過敏の間診を詳細に行った。さらに一部には負荷試験を行い、その確定診断を行い正確な診断と臨

C. 研究結果 ・ D. 考察

新規に受診した成人後に発症した喘息患者735例中、問診で NSAIDs 誘発歴があったのは、51例（6.7%）であった。このうち精査（負荷試験）が行われ AIA と確定したのは7

7%であった。これにより補正したAIAの頻度は、5.4%であった。ただし過去の報告では、本症の40-50%が過去の誘発歴がない潜在例のため、その補正を加えると、日本人成人発症喘息におけるAIAの実際の頻度は、9.1%と推定された。今回抽出されたAIA例と以前に診断が確定した例も含めたAIA131例を非AIAと確定している成人発症喘息100例と比較したのが、表上である。AIAでは、AIAに比し、有意に重症が多く、好酸球副鼻腔炎、中耳炎、胃腸炎、肺炎、異型狭心症などの好酸球性臓器病変の合併が多いことが確認された（*推計学的有意差あり）。これらの結果のうち、重症度や喘息発症年齢、好酸球性副鼻腔炎合併率は、欧米報告とほぼ一致しているが、その他の好酸球性病変の合併率は他国での報告はほとんどなく、わが国独自の可能性がある。また表2に示したように、国立病院機構相模原病院におけるAIAの臨床像は大きく変化しており、好酸球性肺炎をのぞく、好酸球性中耳炎、胃腸症、好酸球性狭心痛は増加しており、その増加に吸入ステロイドが影響している可能性が示唆された。

	AIA 確定例 (n=131)	非AIA 確定例 (n=100)
重症喘息（ステップ4）*	51%	15%
喘息発症年齢	34歳	39歳
好酸球性副鼻腔炎*	97%	13%
好酸球性中耳炎*	38%	5%
（好酸球性）胃腸炎*	21%	1%
（好酸球性）狭心症*	7%	0%
（好酸球性）肺炎	8%	1%
蕁麻疹	7%	5%

表2: 単一施設におけるAIAの臨床像の変化 *
増加する好酸球性中耳炎、胃腸炎、狭心痛

	1990-1998	2000-2004	2009-2010
ICS 使用率	100% (BDP)	100% (FP,BUD)	100% (FP,BUD,etc.)
経口CS運用率	41%	15%	18%
鼻茸	97%	100%	96%
好酸球性中耳炎	13%	29%	58%
好酸球性胃腸炎	6%	15%	30%
PIE症候群	7%	7%	4%
好酸球性狭心痛	2%	7%	16%

E. 結論

- 1) 日本人のアスピリン喘息の頻度は、成人発症喘息の9%を占める。
- 2) これらの臨床像は、重症が約半数で、副鼻腔炎や好酸球性中耳炎の合併例が非常に多いことが確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

「総合研究報告書」

G. 研究発表 1. 論文発表 参照のこと

2. 学会発表

「総合研究報告書」

G. 研究発表 2. 学会発表 参照のこと

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等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

NSAIDs 過敏喘息は最も強い難治化因子であり、それにはロイコトリエンが関与している

研究代表者	谷口正実	国立病院機構相模原病院 外来部長 (アレルギー科医長・臨床研究センター気管支喘息研究室長併任)
研究協力者	福富友馬	国立病院機構相模原病院臨床研究センター 研究員
	関谷潔史	国立病院機構相模原病院アレルギー科 医師
	谷本英則	国立病院機構相模原病院アレルギー科 医師
	三井千尋	国立病院機構相模原病院アレルギー科 医師
	三田晴久	国立病院機構相模原病院臨床研究センター分子生物学研究室 研究員
	梶原景一	国立病院機構相模原病院臨床研究センター分子生物学研究室 研究員
	東憲孝	国立病院機構相模原病院臨床研究センター 特別研究員
	小野恵美子	ハーバード大学 研究員
	秋山一男	国立病院機構相模原病院臨床研究センター センター長
	粒来崇博	国立病院機構相模原病院アレルギー科 医師

研究要旨：

喘息型 NSAIDs 不耐症（いわゆるアスピリン喘息(以下 AIA)は 臨床的に半数以上が重症難治性喘息であることが報告されている。この傾向に人種差はなく、欧州米国本邦いずれも同様の傾向であるが、成人喘息全体からみた AIA の位置づけは明らかでなく、どの程度重症化に関与しているかも不明であった。今回は①AIA が成人喘息の難治化因子や臨床的なりモデリング指標とされる気管支拡張薬吸入後の肺機能低下にどの程度関わっているかを、多数例の成人喘息の背景因子から統計学的手法を用いて証明した。また②AIA における重症化因子を多変量解析で証明した。その結果、1. 成人喘息の難治化因子として、喫煙、長期の罹病期間、女性の肥満と並んで、AIA は強い難治化因子であることが日本人でも確認された 2. その重症化に関与する因子として好酸球性炎症と U-LTE4 が有意因子と判明した。これらの成績は国際的にも初めてであり、非常に価値が有ると考える。また AIA が重症である機序の本質にせまる今後の研究の一助となる

A. 研究目的

喘息型 NSAIDs 不耐症（いわゆるアスピリン喘息(以下 AIA)は 臨床的に半数以上が重症難治性喘息であることが報告されている。この傾向に人種差はなく、欧州米国本邦いずれも同様の傾向である。成人喘息全体からみた AIA の位置づけは明らかでなく、どの程度重症化に関与しているかも不明である。今回は①AIA が成人喘息の難治化因子や臨床的なりモデリング指標とされる気管支拡張薬吸入後の肺機能低下

にどの程度関わっているかを、多数例の成人喘息の背景因子から統計学的手法を用いて検討する。また②AIA における重症化因子を多変量解析で証明する。

B. 研究方法

1. 対象：
国立病院機構相模原病院にて通院中の 2112 例の成人喘息間患者のうち JGL による重症度分

類が判明している 2012 例を対象とした。

2. 方法：

①難治化因子：step4 の治療をしても週に 1 回以上の喘息症状が持続する症例を難治性喘息と定義。難治性喘息とそれ以外の喘息症例の背景因子を比較する。

②AIA 7 2 例を用いてその背景と判事か因子を検討した。多重ロジスティック回帰分析で検討し、多因子の関与を検討した。

(倫理面への配慮)

- ・倫理委員会の審査了解を得るのはもちろん、十分な倫理的配慮と個人情報の保護に努める。
- ・患者へは十分な説明をした上で、文書同意を得る。

C. 研究結果

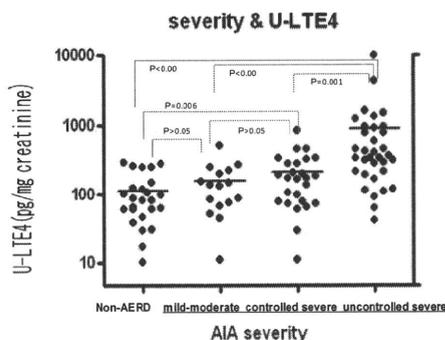
1. 成人喘息の難治化因子として、喫煙、長期の罹病期間、女性の肥満と並んで、AIA は強い難治化因子であることが日本人でも確認された (図 1)。

	男性			女性		
	青年期 15-44歳 N=140	中年期 45-64歳 N=136	高年期 65歳- N=140	青年期 15-44歳 N=216	中年期 45-64歳 N=224	高年期 65歳- N=196
罹病年数 (10年ごと)	3.08 (1.33-7.13)	1.65 (1.20-2.27)	1.41 (1.12-1.76)	1.81 (1.17-2.81)	1.72 (1.20-2.30)	1.42 (1.12-1.80)
AIA		3.48 (0.79-15.40)	6.03 (1.02-35.67)		6.14 (1.55-24.44)	3.54 (0.88-14.24)
BMI						
-18.5	4.36 (0.48-39.91)	1.48 (0.13-16.40)	0.46 (0.08-2.76)	0.50 (0.06-4.28)	0.88 (0.10-8.06)	3.75 (1.18-11.91)
18.5-25	1	1	1	1	1	1
25-30	0.18 (0.01-2.41)	1.91 (0.71-5.14)	0.57 (0.21-1.55)	0.37 (0.04-3.17)	0.38 (0.07-1.88)	3.84 (1.50-8.84)
30-	1.19 (0.09-15.27)	0.40 (0.04-4.18)	0.01 (0.00-10 ⁴⁷)	2.40 (0.40-14.36)	3.56 (0.75-16.89)	4.43 (0.86-22.80)
Smoking						
Nonsmoker	1	1	1	1	1	1
Past smoker	2.61 (0.42-16.26)	3.05 (0.86-10.83)	1.48 (0.63-3.51)	3.50 (1.01-12.11)	0.82 (0.21-3.24)	0.92 (0.27-3.08)
Current smoker	0.23 (0.02-2.22)	4.20 (1.01-17.51)	1.90 (0.57-6.33)	2.22 (0.62-7.99)	1.98 (0.55-7.21)	1.18 (0.27-5.22)

赤字・・・P<0.05 太字・・・P<0.10 Multivariate logistic regression

- 図 1 -

2. その重症化に関与する因子として好酸球性炎症と U-LTE4 が有意因子と判明した (図 2、3)



- 図 2 -

Eos. count and U-LTE4 were strong predictors of uncontrolled severe asthma in AERD, independently. (by multiple regression analysis)

	OR (95% CI)
Log [Eos (/μl)]	8.4 (1.1-65.0)
Log [U-LTE4 (pg/mg creatinine)]	7.3 (1.5-37.2)

- 図 3 -

D. 考察

成人喘息の難治化因子として、喫煙、長期の罹病期間、女性の肥満と並んで、AIA は強い難治化因子であることが初めて日本人でも確認された (国際誌投稿中)。さらに AIA では好酸球性炎症と CysLTs 過剰産生がその難治化に関与することが証明された。いずれもはじめての成績であり、非常に価値が高いと考える。今後は、この機序を明らかにする必要がある。また Cys-LTs 過剰産生の制御が本症の安定化に必須と考えられた。

E. 結論

成人喘息の難治化因子として、喫煙、長期の罹病期間、女性の肥満と並んで、AIA は強い難治化因子であることが初めて日本人でも確認された（国際誌投稿中）。さらに AIA では好酸球性炎症と CysLTs 過剰産生がその難治化に関与することが証明された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

「総合研究報告書」

G. 研究発表 1. 論文発表 参照のこと

2. 学会発表

「総合研究報告書」

G. 研究発表 2. 学会発表 参照のこと

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等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

アスピリン喘息の診断に関する研究

研究分担者	榊原博樹	藤田保健衛生大学医学部	呼吸器内科学 I	教授
研究協力者	齊藤雄二	藤田保健衛生大学医学部	呼吸器内科学 I	准教授
	磯谷澄都	藤田保健衛生大学医学部	呼吸器内科学 I	講師
	三重野ゆうき	藤田保健衛生大学医学部	呼吸器内科学 I	助教
	多田利彦	藤田保健衛生大学医学部	呼吸器内科学 I	助教

研究要旨：

アスピリン喘息 (AIA) の確定診断は非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) を用いた負荷試験によらざるを得ないが、診断感度、特異度ともに問題がある上に危険を伴うため、*in vitro* における AIA の診断方法が求められている。AIA の *in vitro* 診断に関する試みはいくつかあり、末梢血多核白血球のペプチドロイコトリエン産生¹⁾、15-HETE 産生、リポキシシン産生⁴などを指標とする方法が検討されてきたが、十分な追試・確認がされておらず、その有用性に関しては疑問である。好酸球は AIA の発症や病態に関与する中心的な炎症細胞であり、AIA 患者の体内でアスピリンにより活性化することが知られている。末梢血好酸球のレベルで AIA に特異な反応を見出すことができれば AIA の診断や臨床研究に有用である。そこで、好酸球の細胞膜表面に発現している接着分子 CD11b を指標にして、AIA の *in vitro* 診断の可能性について検討した。CD11b の測定は CD11b モノクロナール抗体を用いたフローサイトメトリーにより行った。その結果、AIA の末梢血好酸球においては、アスピリンの添加により特異的に CD11b 発現が増えることが確認された。この CD11b 発現増加はプロスタグランジン E2 (PGE2) の添加により抑制されたが、5-リポキシゲナーゼ阻害薬の影響は受けなかった。アスピリンによるシクロオキシゲナーゼ阻害→PGE2 減少が、CD11b 発現の原因と推定され、AIA の *in vitro* における診断に応用できる可能性がある。

Adenosine 5'-monophosphate (AMP) の吸入は気管支喘息患者に対して比較的特異的に気道収縮を誘発する。AMP 自体には気道平滑筋収縮作用がなく、体内で加水分解されて生成されたアデノシンが肥満細胞からヒスタミンなどの気道収縮性メディエータの遊離を惹起するための気道反応と推定されている。AIA の気道反応には肥満細胞が関与している証拠がある。そこで、AMP およびメサコリン吸入に対する気道反応を AIA と非アスピリン喘息 (非 AIA) で比較し、気道反応の感度から両者の鑑別が可能か否かを検討した。その結果、AMP およびメサコリン吸入に対する気道反応は、AIA と非 AIA の間に有意差がなかった。しかし、メサコリン吸入閾値に対する AMP 吸入閾値の比 (PC20-AMP/PC20-Mch) は AIA で有意に低く、AIA は AMP 吸入に対して過敏な喘息群であり、その病態に肥満細胞の関与が推定された。ただし、両群の差は有意であってもわずかであり、AIA の診断に応用できるほど特異性は高くなかった。

アスピリン喘息 (AIA) は非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) を投与されると、喘息発作を主体とする激しい過敏反応を起こし、死亡することもある。成人喘息の 10% を占め、典型例は重症で副鼻腔炎や鼻ポリープの合併頻度が高いなど、特異な臨床像をもつが、確定診断は困難なことが多い。診断されていない潜在患者は NSAIDs による発作の危険性に晒されており、医療者にとっても NSAIDs を処方する際の大きなストレスとなっている。従来、AIA の確定診断には NSAIDs を用いた経口負荷試験しかないと考えられているが、本試験は予期せぬ大発作を誘発する危険性がある上、安全に実施するためには数日間を要する。とても日常臨床に導入できる検査ではない。この研究は、1) アスピリン喘息の診断を末梢血を用いて *in vitro* で行う試みと、2) メサコリンと Adenosine 5'-monophosphate (AMP) の吸入に対する気道過敏性の特徴から AIA と非 AIA を弁別する試みからなる。

1. 末梢血好酸球の CD11b 発現を指標としたアスピリン喘息の *in vitro* 診断の試み

A. 研究目的

AIA は、アスピリン様の薬効をもつほとんど全ての酸性の NSAIDs で喘息発作が誘発される。これらの NSAIDs の共通した薬理作用であるシクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害作用が過敏反応の引き金になるものと考えられている。すなわち、AIA にはアラキドン酸代謝系路上あるいはアラキドン酸代謝産物に関わる生体反応に何らかの異常があり、それが NSAIDs の投与により顕在化し、過敏反応として現れてくるもの

と考えられる。

AIA の確定診断は NSAIDs を用いた負荷試験によらざるを得ないが、診断感度、特異度ともに問題がある上に危険を伴うため、*in vitro* における AIA の診断方法が求められている。AIA の *in vitro* 診断に関する試みはいくつかあり、末梢血多核白血球のペプチドロイコトリエン産生¹⁾、15-HETE 産生^{2, 3)}、リポキシン産生⁴⁾などを指標とする方法が検討されてきたが、十分な追試・確認がされておらず、その有用性に関しては疑問である。

好酸球は AIA の発症や病態に関与する中心的な炎症細胞であり、AIA 患者の体内でアスピリンにより活性化することが知られている⁵⁾。末梢血好酸球のレベルで AIA に特異な反応を見出すことができれば AIA の診断や臨床研究に有用である。そこで、好酸球の細胞膜表面に発現している接着分子 CD11b を指標にして AIA の *in vitro* 診断の可能性について検討した。

B. 研究方法

1) 対象：基礎的な検討のためには、外来通院中の症状の安定した非 AIA 患者 8 名 (男性 3 名、女性 5 名、平均年齢 41.3 ± 16.0 歳)、AIA 患者 8 名 (男性 4 名、女性 4 名、平均年齢 42.9 ± 10.1 歳) を対象とした。In vitro 診断法の検討に関しては、外来通院中の症状の安定した非 AIA 患者 19 名 (男性 9 名、女性 10 名、平均年齢 49.4 ± 4.8 歳)、AIA 患者 20 名 (男性 9 名、女性 11 名、平均年齢 51.1 ± 4.8 歳) を対象とした。

全例に本研究検査の意義を説明し、同意を得た上で基礎肺機能検査および一般血液検査を施行後、末梢静脈より研究用採血を行った。

NSAIDs 過敏性の有無を診断するため、全例にトルメチンおよびスルピリン吸入負荷試験をおこなった。これらの吸入負荷試験にて陽性で、なおかつ NSAIDs による喘息発作の既往のある患者を AIA とした。これらの全てが陰性の場合に非 AIA とした。

2) 末梢血好酸球の分離

対象患者の末梢静脈より血液を約 20 ml 採取し、血液をモノ・ポリ分離溶液（大日本製薬、大阪）を用いた比重遠心法により多核白血球（PMN: polymorphonuclear cells）を分離した。Phosphate buffered saline (PBS)にて洗浄後、10% fetal bovine serum (FBS)添加 RPMI1640 培養液 (Sigma, St Louis, MO, USA)にて 2×10^6 個/ml に細胞数を調整した。

3) CD11b 発現量の測定

分離した PMN 浮遊液に $10^{-4}M \sim 10^{-7}M$ の濃度のアスピリンを加え、30 分間、 $37^{\circ}C$ にてインキュベートした。遠心後 PBS を加え、FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識 CD11b モノクローナル抗体および PE (phycoerythrin) 標識 CD16 モノクローナル抗体を用いて氷冷下にて 45 分染色を行った。最後に 1%パラホルムアルデヒドにて固定後、フローサイトメトリー (Becton Dickinson, USA)を用いて CD16 発現の有無により好酸球分画 (CD16 陰性) と好中球分画 (CD16 陽性) に分け、CD11b の発現量を mean fluorescence intensity (MFI)にて表した。また、vehicle のみを添加した無刺激状態をコントロールとした。さらに、アスピリンによる CD11b 発現増加の機序を検討するために以下の研究を行った。

A) プロスタグランジン E₂ ($10^{-7} \sim 10^{-5} M$) が CD11b 発現に及ぼす影響について検討した。

B) 5-リポキシゲナーゼ (5-LO) 阻害薬 (AA861) が CD11b の発現に及ぼす影響について検討した。

4) 統計

一部を除き、は $mean \pm S.E.$ で表記した。フローサイトメトリーの測定結果はコントロールを 100%として変化率を以下のように求めた。すなわち、 $変化率 = (対象 MFI - コントロール MFI) / コントロール MFI$ 、である。統計処理は Mann-Whitney U 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

(倫理面への配慮)

上記のとおり、被験者には研究の目的や方法、意義に関して説明し、同意を得た上で研究対象とした。NSAIDs 過敏症の確定のためにスルピリンおよびトルメチン吸入負荷試験を実施したが、当科では気管支喘息患者に対してほぼルーチンに実施している検査であり、通常臨床行為の範囲内に止まるものである。

C. 研究結果

1. 無刺激状態における好酸球 CD11b の基礎発現量の比較

無刺激状態の CD11b の MFI は、非 AIA 147.3 ± 12.1 、AIA 130.4 ± 4.7 であり、両者の間に有意な差を認めなかった。

2. CD11b の発現量に対するアスピリン添加の影響

好酸球の CD11b の発現は、アスピリン 10^{-7}M 添加にて、非 AIA $-5.7 \pm 3.2\%$ 、AIA $6.1 \pm 3.1\%$ ($p < 0.05$)、 10^{-6}M で非 AIA $-3.5 \pm 2.2\%$ 、AIA $9.9 \pm 3.1\%$ ($p < 0.05$)、 10^{-5}M で非 AIA $-1.2 \pm 2.2\%$ 、AIA $7.3 \pm 3.1\%$ ($p = 0.07$)、 10^{-4}M で非 AIA $-8.0 \pm 2.6\%$ 、AIA $7.7 \pm 2.8\%$ ($p < 0.05$) であった。いずれのアスピリン濃度でも AIA では CD11b の発現が増加し、逆に非 AIA では減少し、両群間に有意な差または傾向を認めた。

3. アスピリンによる CD11b の発現増加に及ぼすプロスタグランジン E2 の効果

アスピリン 10^{-4}M による AIA 群の好酸球の CD11b 発現増加は、PGE2 を添加すると濃度依存性に抑制される傾向を認めた。(PGE2 10^{-7}M $0.2 \pm 2.9\%$ 、 10^{-6}M $-0.6 \pm 2.9\%$ 、 10^{-5}M $-3.5 \pm 4.0\%$ で、PGE2 非添加時 $5.2 \pm 2.4\%$ と 10^{-5}M 添加時の間には $p = 0.07$ と有意差のある傾向がみられた)。非 AIA 群に関しては明らかな変動は認めなかった。

4. アスピリンによる CD11b の発現増加に及ぼす 5-LO 阻害薬 (AA861) の効果

AIA にみられたアスピリンによる CD11b 発現の増加に対して、AA861 は明らかな影響を及ぼさなかった。

5. アスピリンによる末梢血好酸球の CD11b 発現を指標にした AIA の in vitro 診断の可能性

末梢血好酸球にアスピリン 10^{-4}M を添加したときに CD11b 発現が増加した場合を陽性と判定すると、AIA 群 20 例中 19 例が陽性(感度 95.0%)、非 AIA 群では 19 例中 1 例のみ陽性(特異度 94.7%) であった。

D. 考察

AIA の in vitro 診断に関する試みはいくつかあり、末梢血多核白血球のペプチドロイコトリエン産生、15-HETE 産生、リポキシン産生などを指標とする方法が検討されてきたが、ロイコトリエンに関しては否定的な成績が多く^{1, 6)}、その他に関しては十分な追試・確認がされておらず、その有用性に関しては疑問である。本研究では末梢血好酸球の接着分子 CD11b 発現を指標にして、AIA の in vitro 診断の可能性を検討した。

CD11b 発現をフローサイトメトリーで測定することにより、AIA 群と非 AIA 群を弁別することが可能であった。すなわち、アスピリンの添加により、AIA の好酸球では CD11b の発現が増加したが、非 AIA ではかえって減少した。AIA の末梢血好酸球にみられるアスピリンによる CD11b 発現増加は PGE2 の添加により消失した。一方、5-LO 阻害薬に関しては影響がみられなかった。このことから、アスピリンによる CD11b の発現増加には PGE2 の減少が関与していると推定される。

本法により CD11b 発現が増加した場合を陽性と判定すると、AIA 群 20 例中 19 例が陽性(感度 95.0%)、非 AIA 群では 19 例中 1 例のみ陽性(特異度 94.7%) であった。AIA の診断のためには、病歴の聴取と in vivo での NSAIDs の負荷試験に頼らざるを得ないのが現状である

が、本法はフローサイトメトリーを要するもの
の手技を簡素化することにより、末梢血を用い
た in vitro における AIA の診断法として応用
できる可能性がある。

E. 結論

AIA の末梢血好酸球はアスピリンの添加によ
り特異的に CD11b 発現が増える。AIA の in
vitro における診断に応用できる可能性があ
る。

引用文献

1) Pierzchalska M, Mastalerz L, Sanak M, et
al: A moderate and unspecific release of
cysteinyl leukotrienes by aspirin from
peripheral blood leukocytes precludes its
value for aspirin sensitivity testing in
asthma. Clin Exper Allergy 30: 1785-1791,
2000.

2) Kowalski ML, et al: Differential effects
of aspirin and misoprostol on
15-hydroxyeicosatetraenoic acid generation
by leukocytes from aspirin-sensitive
asthmatic patients. J Allergy Clin Immunol
2003;112:505-512.

3) Kowalski M, et al: Aspirin-triggered
15-HETE generation in peripheral blood
leukocytes is a specific and sensitive
Aspirin-Sensitive Patients Identification
Test (ASPIITest). Allergy 2005;60:
1139-1145.

4) Sanak M, et al: Aspirin-tolerant
asthmatics generate more lipoxins than
aspirin-intolerant asthmatics. Eur Respir J
2000;16:44-49.

5) Cowburn AS, et al.: Overexpression of
leukotriene C4 synthase in bronchial
biopsies from patients with
aspirin-intolerant asthma. J Clin Invest
1998;101:834-846.

6) Bavbek S, Dursun AB, Birben E, et al:
Cellular allergen stimulation test with
acetylsalicylic acid-lysine is not a useful
test to discriminate between asthmatic
patients with and without acetylsalicylic
acid sensitivity. Int Arch Allergy Immunol
149:58-64, 2009.

2. アスピリン喘息の気道過敏性 :

Adenosine 5' -monophosphate (AMP)

吸入の有用性

A. 研究目的

Adenosine 5' -monophosphate (AMP) の吸入
は気管支喘息患者に対して比較的特異的に気
道収縮を誘発する^{1, 2)}。AMP は直接的な平滑筋
収縮作用を持たないが、吸入された気道局所で
直ちに加水分解されてアデノシンとなり^{3, 4)},
気道粘膜に存在する肥満細胞上のアデノシン
受容体に結合してヒスタミンやロイコトリエ
ンの遊離を惹起する^{5, 6)}。AMP による気道収縮
は肥満細胞の脱顆粒を介する間接的な反応と
考えられている。すでに筆者らは、AMP 吸入試

験に関する基礎的な検討を行い、気道反応（気道収縮と回復）の時間経過や安全性の確認を行い、気管支喘息の診断に関してメサコリン吸入試験と同等の感度と特異度を有することを示した⁷⁾。アスピリン喘息（AIA）の症状発現には肥満細胞の活性化が関与していると推定されている⁸⁾。そこで、AMP 気道過敏性を非アスピリン喘息（非 AIA）と比較し、AIA に特異な反応がみられるか否かを検討し、さらに AIA の診断に応用できるかどうかについても検討した。

B. 研究方法

対象とする喘息患者は FEV₁ 0% が 70% 以上あり、メサコリン気道過敏性閾値と性、および年齢をあらかじめマッチさせた AIA 群（9 例：男性 2 名、女性 7 名）と非 AIA 群（14 例：男性 3 名、女性 11 名）である。非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）による喘息発作誘発歴、スルピリン吸入試験、トルメチン吸入試験、その他の NSAID 負荷試験の 4 項目のうち 2 項目以上満たす者を AIA とした。AMP 吸入液の濃度は 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400mg/ml とした。メサコリン吸入試験はアレルギー学会の標準法に従った。FEV₁ が 20% 低下する薬剤濃度をそれぞれ PC20-AMP, PC20-Mch と表した。

（倫理面への配慮）

検査のほとんどは保険診療として認められているが、実施する際は検査の目的と方法、意義を説明して同意を得た。

C. 研究結果

AIA 患者は平均年齢 37.3 歳、アトピー陽性 6 名、血清 IgE 値 282±286U/ml、喫煙群 2 名、Smoking Index (pack-years) は 4.4±10.1 であった。非 AIA 患者は平均年齢 41.5 歳、アトピー陽性 10 名、血清 IgE 値 431±433U/ml、喫煙群 4 名、非喫煙群 10 名、Smoking Index (pack-years) は 1.1±2.0 であった。PC20-AMP と PC20-Mch に関しては AIA 群と非 AIA 群で有意差は認めなかった。しかし、PC20-Mch に対する PC20-AMP の比、すなわち log(PC20-AMP/PC20-Mch) に関しては、非 AIA 群に比べ AIA 群で有意に低下していた (P<0.01)。更に logPC20-Mch に対する logPC20-AMP の回帰直線の傾きについても、AIA 群では非 AIA 群に比べて有意に低値であった。

D. 考察

すでに筆者らは、AMP 吸入負荷試験はメサコリン吸入負荷試験と同様に気道過敏性を評価する上で有用であることを示した⁷⁾。しかし、メサコリン気道過敏性との臨床的な意義の差異に関しては明らかでなかった。今回、AIA がアデノシンに対してより過敏な喘息群である可能性が示唆され、AIA の病態における肥満細胞の重要性を示している可能性がある。しかし、AIA 群と非 AIA 群の AMP 吸入閾値の差はわずかであり、両群を鑑別できるほどの特異性はみられなかった。今後、AMP 吸入閾値に及ぼす重症度、性別、年齢、アトピーなどの影響を明らかにすることで、AIA における AMP 気道過敏性の臨床的な意義を明らかにすることはできるであろう。

E. 結論

AIAはAMPに対してより過敏な喘息群であり、AIAの病態における肥満細胞の関与を示唆している。しかし、AIAと非AIAを鑑別できるほどには特異性が高くなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 榊原博樹, 齊藤雄二: アスピリン喘息, 発症機序を中心にした最近の話題. 呼吸と循環 2008;56:165-174.

2) 榊原博樹, 小橋保夫: アスピリン喘息. 成人病と生活習慣病 2008;38:327-334.

3) 榊原博樹, 齊藤雄二: アスピリン過敏症. 臨床と研究 2008;85:233-238.

4) 榊原博樹: 喘息の亜型・特殊型, 2. アスピリン喘息. 日本内科学会誌 2009;98:101-107.

5) 榊原博樹: NSAIDs 不耐症の機序と対応. 内科 105: 599-602, 2010.

2. 学会発表

1) 磯谷澄都, 井水ひろみ, 米田有希子, 他: アスピリン喘息7例のエトドラク内服試験における尿中LTE4の検討. 第20回日本アレルギー学会春期臨床大会, 東京, 2008年6月.

2) 加藤 敦, 岡村拓哉, 小橋保夫, 他: 当院におけるアスピリン内服負荷試験の検討. 第60回日本アレルギー学会秋期学術大会, 東京, 2010年11月.

3) 磯谷澄都, 榊原博樹: アスピリン喘息と難治性喘息の関わり. アスピリン不耐症・難治性喘息研究会 2011, 東京, 2010年11月.

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等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

NSAIDs 過敏喘息では内因性 PGE₂ 低下が本質的な病態である

研究代表者 谷口正実 国立病院機構相模原病院 外来部長
(アレルギー科医長・臨床研究センター気管支喘息研究室長併任)
研究協力者 東 憲孝 国立病院機構相模原病院臨床研究センター 特別研究員
三田晴久 国立病院機構相模原病院臨床研究センター分子生物学研究室
研究員
梶原景一 国立病院機構相模原病院臨床研究センター分子生物学研究室
研究員

研究要旨：

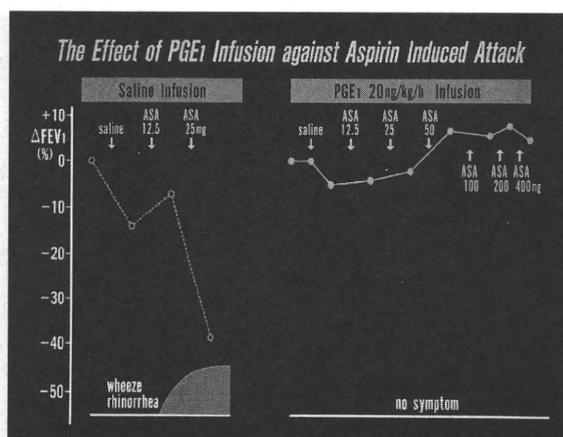
喘息型 NSAIDs 不耐症（いわゆるアスピリン喘息（以下 AIA）は COX-1 阻害を有するすべての NSAIDs 投与により、気道収縮反応を誘発する。しかし、意外にも全身の PGE₂ 低下については明らかでない。我々は、以前ごく少量の PGE₁ を持続点滴下にアスピリン負荷を行うとアスピリン過敏反応が完全に消失することを見出した。今回は、アスピリン喘息における内因性 PGE₂ 産生量を明らかにすることを目的とした。

その結果、安定期において、アスピリン喘息では顕著に PGE₂ 産生が低下していることが判明した（JACI 2010 掲載）。これらの成績は国際的にも初めてであり、非常に価値があると考える。また AIA 機序の本質にせまる今後の研究の一助となる。

A. 研究目的

喘息型 NSAIDs 不耐症（いわゆるアスピリン喘息（以下 AIA）は COX-1 阻害を有するすべての NSAIDs 投与により、気道収縮反応を誘発する。しかし、意外にも全身の PGE₂ 低下については明らかでない。我々は、以前、以下の図のようにごく少量の PGE₁ を持続点滴下にアスピリン負荷を行うとアスピリン過敏反応が完全に消失することを見出した。

この経験から、アスピリン喘息の全身の PGE₂ の産生低下を明らかにすることを目的とした。



B. 研究方法

1) 国立病院機構相模原病院アレルギー科受診患者のうち、病歴から AIA が疑われた 18 名を対象に、診断目的で行われたアスピリン負

荷試験を行った。負荷試験の結果、AIA10名と非AIA8名であった。アナフィラキシー(AN)発作群8名も同様に検討した

2) 安定期の尿を用いて、すべてHPLCによる精製・抽出後 PGE₂, PGF₂・・・ent-PGF₂についてEIAにて測定した。

(倫理面への配慮)

- ・倫理委員会の審査了解を得るのはもちろん、十分な倫理的配慮と個人情報の保護に努める。
- ・患者へは十分な説明をした上で、文書同意を得る。

C. 研究結果

すでに JACI2010 に掲載されたとおり、アスピリン喘息では ATA やアナフィラキシー患者の発症期の状態より、有意に PGE₂ 産生が低下していた。

Group	AIA	ATA	Anaphylaxis
PGE ₂	719 (43.0-181) †	313 (228-504)	202 (103-384)

Data are expressed as medians (interquartile ranges) picograms of milligram of creatinine.
†P<.05, and ‡P<.01 compared with baseline values in ATA group.

HIGASHI et al. J Allergy Clin Immunol 2010; 125: 1084-91

D. 考察

AIA においては エイコサノイドインバランスの根底に抗炎症作用の強い PGE₂ 産生低下が関与していることが示された。今後は、この機

序がいかんして生じているかを明らかにし、病態の解明に取り組みたい。

E. 結論

アスピリン喘息では全身的に PGE₂ 産生が低下し、それを補充することでアスピリン感受性も制御できることが初めて証明できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

「総合研究報告書」

G. 研究発表 1. 論文発表 参照のこと

2. 学会発表

「総合研究報告書」

G. 研究発表 2. 学会発表 参照のこと

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等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

AIA を唾液中のメディエーターで診断する試み

研究代表者 谷口正実 国立病院機構相模原病院 外来部長
(アレルギー科医長・臨床研究センター気管支喘息研究室長併任)
研究協力者 小野恵美子 ハーバード大学 研究員
東 憲 孝 国立病院機構相模原病院臨床研究センター 特別研究員
三田晴久 国立病院機構相模原病院臨床研究センター分子生物学研究室
研究員
梶原景一 国立病院機構相模原病院臨床研究センター分子生物学研究室
研究員

研究要旨：

すでに好酸球性走化性や活性化を強く有するメディエーターとして Cys-LTs と LTB4 が知られている。しかし、その測定は血中では失活が早く、尿中では不純物の混入で、不正確な値となり困難さがあつた。今回の研究では、極めて非侵襲的検体採取法として、唾液を用いて、その測定が可能か、またアスピリン喘息の診断に有用かを検討した。

その結果、唾液中の好酸球活性化メディエーターである Cys-LTs と LTB4 が十分に検出可能で、かつ AIA の診断に有用で有る可能性が見出せた。

A. 研究目的

ヒトにおける好酸球性炎症の指標は、末梢血好酸球数や血清 ECP、尿中 EDN などがある。しかし、いずれも病勢を十分反映しておらず、また処理により ECP や EDN は不確実な測定値となりがちである。すでに好酸球性走化性や活性化を強く有するメディエーターとして Cys-LTs と LTB4 が知られている。しかし、その測定は血中では失活が早く、尿中では不純物の混入で、不正確な値となり困難さがあつた。今回の研究では、極めて非侵襲的検体採取法として、唾液を用いて、その測定が可能か、また好酸球性気道炎症を反映しているかを検討した。

B. 研究方法

前研究として、HPLC 精製検体と未処理検体でのまず検討した。唾液で十分な感度を持って測定

可能と判明したため、好酸球性気道炎症例として、重度の好酸球性炎症であるアスピリン喘息（AIA）と中等度以下の好酸球性気道炎症である非 AIA、健常人の唾液を用いた。採取の方法は、約 4 ml の唾液を吸着しうるスポンジを口内に 5 分間含ませ、回収した。測定の詳細は、*Allergology International* 誌（Ono E, Taniguchi M, et al. *Allergol Int.* 2010, 24;60(1), 2010）を参照。

（倫理面への配慮）

- ・倫理委員会の審査了解を得るのはもちろん、十分な倫理的配慮と個人情報保護に努める。
- ・患者へは十分な説明をした上で、文書同意を得る。

C. 研究結果

図1: 唾液中LTC4, LTD4, LTE4濃度の比較

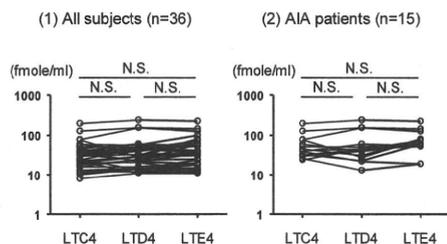


図1に示すように Cys-LTs のうち LTC4, D4, E4
いずれも同程度唾液中に検出可能であった。

図2: AIA患者、ATA患者、健康人における
唾液中CysLT濃度およびLTB4濃度の比較

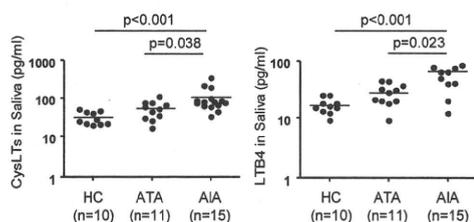


図2に示すように、AIAでは健康人やATAに比
し、有意に唾液中の Cys-LTs だけでなく、唾液中
中の LTB4 濃度も増加している。

D. 考察

唾液中の好酸球活性化メディエーターである
Cys-LTs と LTB4 が十分に検出可能であること
が証明された。また AIA では Cys-LTs と LTB4
が高値であることが証明された。今後は、この
手法を用いて、さらに症例数を集積し、AIA 診
断が可能かを検証する必要がある。

E. 結論

今回初めて唾液中の好酸球活性化メディエー
ターである Cys-LTs と LTB4 が十分に検出可能
で、かつ AIA 病態を反映していることが証明さ
れた。今後の臨床応用が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

「総合研究報告書」

G. 研究発表 1. 論文発表 参照のこと

2. 学会発表

「総合研究報告書」

G. 研究発表 2. 学会発表 参照のこと

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等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

発生病学を用いたアスピリン喘息発症機序に関する基礎的研究と病態解明

研究分担者 長瀬 隆英 東京大学大学院医学系研究科呼吸器内科学 教授
研究協力者 石井 聡 秋田大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：

NSAIDs 不耐症の一型であるアスピリン喘息は、発症頻度や緊急性・重篤性において極めて重大な疾患であり社会的にも注目されている。気管支喘息、特にアスピリン喘息の発症機序については未解明の部分が多く、その解明には関連遺伝子の探索を含めた研究が必須と考えられる。また、アスピリン喘息については、国内外において動物モデルが報告されていない。近年、遺伝子改変マウスが次々と開発されており、疾患関連遺伝子の解明に有用であることが報告されているが、気管支喘息の発症分子機序の解明についても実験動物としての遺伝子改変マウスを用いた研究が重要であることが考えられる。本研究では、炎症メディエーターに関する遺伝子改変マウスを作成し、喘息モデルを用いてアスピリン喘息発症機序に関する基礎的研究と病態解明を目指した。今後、遺伝子改変マウスを活用することにより、さらに各々の遺伝子・蛋白系の病態生理学的意義・重要性が解明され、NSAIDs 不耐症・気管支喘息・アスピリン喘息治療への貢献が期待される。

A. 研究目的

NSAIDs 不耐症の一型であるアスピリン喘息は、発症頻度や緊急性・重篤性において極めて重大な疾患であり社会的にも注目されている。気管支喘息の病態的・生理学的特徴として、慢性的な気道炎症・気道過敏性・可逆的な気流制限が挙げられる。気道過敏性の機序はこれまで不明の部分が多かったが、喘息特有の気道炎症に起因していることが明らかになってきた。気道炎症の機序は、炎症細胞と気道構成細胞が放出する炎症メディエーター・サイトカインなどの生理活性物質が相互反応を繰り返す炎症カスケードであると考えられている。しかしながら、気管支喘息、特にアスピリン喘息の発症機序については未解明の部分が多く、その解明には関連遺伝子の探索を含めた研究が必須と考えられる。また、アスピリン喘息については、世界

的にも動物モデルが報告されていない。近年、遺伝子改変マウスが次々と開発されており、疾患関連遺伝子の解明に有用であることが報告されている。気管支喘息の発症分子機序の解明についても、実験動物としての遺伝子改変マウスを用いた研究が重要であることが考えられる。本研究では、炎症メディエーターに関する遺伝子改変マウスを作成し、アスピリン喘息発症機序に関する基礎的研究と病態解明を目指す。

B. 研究方法

本研究では、本研究者らが独自に開発した遺伝子改変マウスを使用する。LTC₄/D₄/E₄ など cysteinyl LT は、気管支喘息における主要な炎症メディエーターであり、アスピリン喘息発症

に大きく関わることが想定される。cysteinyll LT の受容体(CysLT1-R, CysLT2-R)は肺・気管支に豊富に存在し、気管支喘息を含めた呼吸器疾患発症への関与が示唆される。特に、CysLT2-R は大きく注目されているが、その機能は未だに解明されていない。本研究では、この CysLT2-R を標的としたノックアウトマウスの新規作成に着手する。このような遺伝子改変マウスを用いて、脂質性メディエーターと気管支喘息（特にアスピリン喘息）との関連について評価・検討を加える。

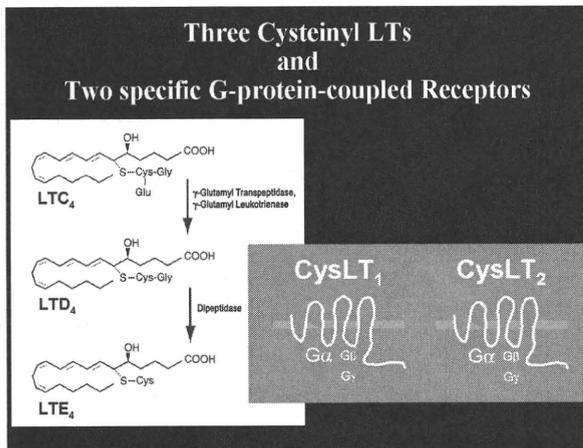


図1 CysLTs と CysLT 受容体の模式図

(倫理面への配慮)

本研究では、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究における危険の排除、説明と理解(インフォームドコンセント)について、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)に基づき、研究を進める。

本研究で行う予定の遺伝子組換え実験は、平成16年9月10日の東京大学医学部組換えDNA実験安全委員会において承認を受けた生化学分子生物学・細胞情報学講座「脂質メディエータ

ー受容体、合成酵素遺伝子欠損マウスならびにタンパク質過剰発現細胞を用いた脂質メディエーター機能の解明、セマフォリン遺伝子欠損マウスを用いた嗅覚系神経回路形成機構の解明」に含まれており、適切な拡散防止措置がとられる。

C. 研究結果

発生工学的手法により CysLT2-R ノックアウトマウスが作成された。

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

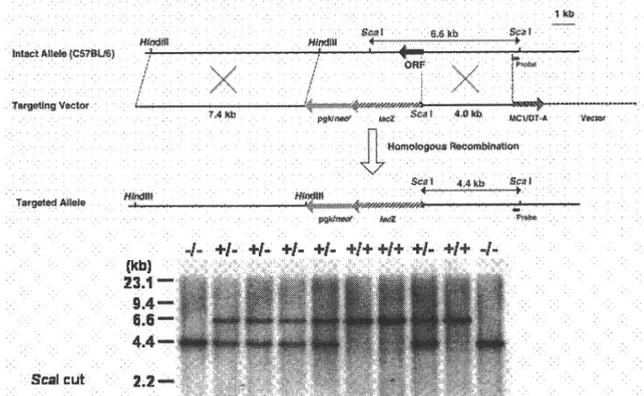


図2 CysLT2 受容体ノックアウトマウスの作成

発生工学的手法により CysLT2-R ノックアウトマウスが作成された。CysLT2-R ノックアウトマウスでは胎生致死が認められず、ホモ接合体の生存個体が得られた。また、外表所見上の著明な異常は認められず、発育・成長・生殖も正常と考えられた。また、アレルギー性気管支喘息モデルを用いた解析により、LTB₄ 受容体と cysteinyll LT 受容体は、異なる生理活性を示すことが示唆された。

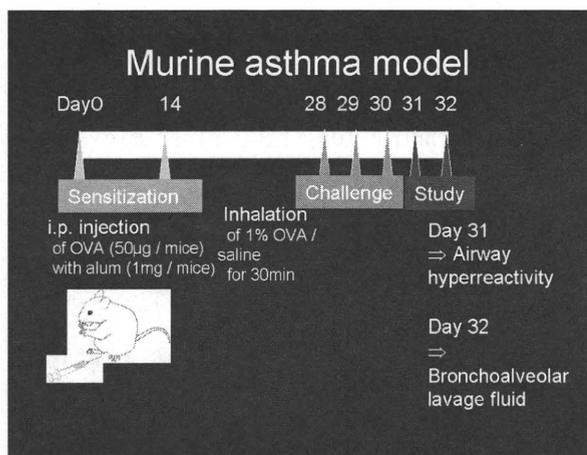


図3 アレルギー性気管支喘息モデルの作成

D. 考察

気管支喘息は、気道炎症を病態の特徴としており、その発症には多数の生理活性物質の関与が想定される。特に CysLT2 受容体は、肺・気管支に多量に存在することが示唆されているが、その機能はほとんど解明がなされていない。今回 CysLT2-R ノックアウトマウスのホモ接合体が得られたことにより、気管支喘息（特にアスピリン喘息）における気道過敏性・末梢気道炎症への関与を検証することが可能となった。気管支喘息・アスピリン喘息に関わる候補物質・遺伝子を評価する手段として、分子生物学・発生工学を駆使したトランスレーショナル・リサーチによる研究アプローチが有用と思われる。今後、さらに各々の遺伝子・蛋白質の生理的意義・重要性が解明されることにより、気管支喘息・アスピリン喘息に対する有効な治療法・管理法の開発および実用化が期待される。

E. 結論

発生工学的手法により CysLT2-R ノックアウトマウスが作成され、CysLT2 とアスピリン喘

息との関連について評価・検討を行うことが可能となった。また、アレルギー性気管支喘息モデルを用いた解析により、LTB₄ 受容体と cysteinyl LT 受容体は、異なる生理活性を示すことが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Makita R, Uchijima Y, Nishiyama K, Amano T, Chen Q, Takeuchi T, Mitani A, Nagase T, Yatomi Y, Aburatani H, Nakagawa O, Cobo-Stark P, Igarashi P, Murakami M, Tominaga J, Sato T, Asano T, Kurihara Y, Kurihara H. Renal tubular dysmorphogenesis leading to multicystic formation and lung emphysema in mice lacking TAZ. *Am J Physiol* 2008; 294: F542-553.

2) Nakajima T, Jo T, Meguro K, Oonuma H, Ma J, Kubota N, Imuta H, Takano H, Iida H, Nagase T, Nagata T. Effect of dexamethasone on voltage-gated Na⁺ channel in cultured human bronchial smooth muscle cells. *Life Sci* 2008; 82: 1210-1215.

3) Kawakami M, Matsuo Y, Yoshiura K, Nagase T, Yamashita N. Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema. *Biol Pharm Bull* 2008; 31: 1434-1438.