

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、本研究班においては特に脂質メディエータに注目し、平成 20 年度では、EBC 中 LTB₄は有意に重症群で高値、喀痰好中球が多いほど高値になる傾向があったこと、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、FEV₁低下率と EBC 中 cysLTs 増加量は有意な正の相関を示すこと、平成 21 年には、IPF 対象ではあるが、BALF との比較で Tyrosine が補正マーカーとして有望であること、気管支喘息症例においてヒスタミンを用いた気道過敏性と 15-HETE 様物質が相関することを示した。本年度では希釈率に影響されない IL-10 と相関する酵素として注目されている indoleamine-2,3-dioxygenase(IDO)活性について、EBC で測定し検討を行った。

B. 方法

(1) 対象

当院アレルギー科に受診中の患者のうち、十分な説明の後文書での同意を得た方を対象とした。当院アレルギー科外来受診中の気管支喘息患者のうち、同意を得られた気管支喘息患者および喘息類似の非喘息慢性咳嗽患者 (n=24)を対象とした。呼気一酸化窒素濃度 (FeNO)、スパイログラム、気道過敏性検査を行い、EBC を採取した。

(2) 気管支喘息重症度分類

重症度分類は JGL2009 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 分の安静呼気を行い、呼気を連続的に機器内で -20°C に冷却、EBC を採取した。

(4) EBC 中の IDO 活性測定

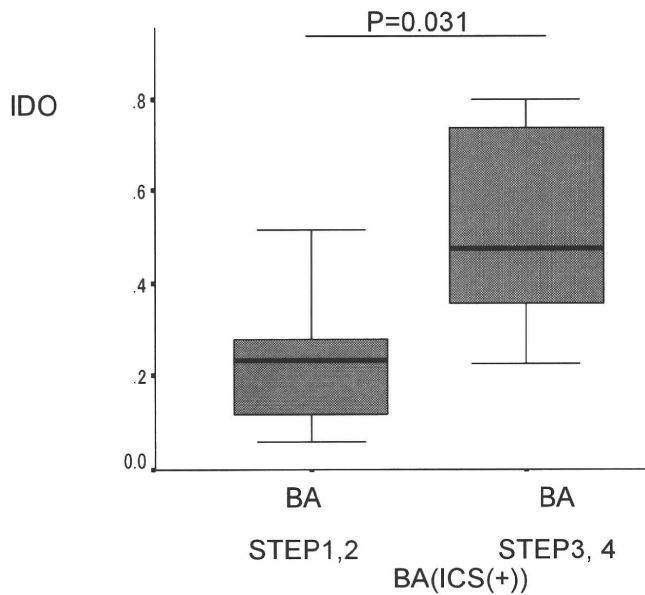
IDO はトリプトファン (w) をキヌレニン (kyn) に代謝する酵素であるため、IDO 活性は d5-w と d5-w から合成した d4-Kyn を内部標準として EBC に添加し、GC-M-NCI にて W 濃度、Kyn 濃度を定量し (検出限界 kyn0.1ng, W0.5ng)、両者の比率で IDO 活性を表示した。

(5) FeNO、気道過敏性検査

呼気 NO 濃度はオフライン法で測定した。SIEVERS 社オフラインキットを用い、最大吸気から一定流量 (10[cmH₂O]、70[ml/sec]) で呼出、死腔分を排気後ミラーバックに回収した。回収後 18 時間以内に SIEVERS 社 NO analyzer (280NOA) で測定した。気道過敏性検査は、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。

C. 結果

EBC における IDO 活性は GC-M-NCL で測定可能であった。慢性咳嗽群 (0.35+/-0.88) に比べて未治療喘息群では比較的低値 (0.24+/-0.66) になり、治療中喘息では慢性咳嗽群と同様のレベル (0.35+/-0.61) であることが示唆された。ICS 治療中喘息群で解析すると、ICS 少量群 (0.28+/-0.16) に比較し ICS 大量群 (0.48+/-0.22) で有意に高値であった。既報告では喀痰上清中 IDO 活性と喀痰好酸球比率は逆相関するが、今回の症例群では FeNO との関連は見出せなかった。また、IDO 活性は呼吸機能、気道過敏性、EBC 中 cysLTs 濃度、尿中 LTE4 濃度とは相関せず、単なる重症度やロイコトリエン産生能とは違った側面をみている可能性を示唆した。



D. 考察

EBCは水による希釈が大きく、またEBC中物質の安定度が測定の際問題となっているため、今回のような酵素比率の試みは、サンプル間のばらつきを最小限にすることができる。前年度のTyrosineでの蛋白濃度補正にくわえ、今回の酵素活性を比率で測定する試みは、EBC中の物質におけるサンプリングの影響や希釈度の違いを考慮せずに判定することが可能であるため、EBCの弱点を考慮せずに判定する方法として期待される。IDO活性測定の結果としては未治療では低値、治療レベルが高くなるにつれて高値となっており、気管支喘息が治療の効果で制御性T細胞由来のIL-10が増加していることを示していると考えられたが、基礎的研究においてもIDO活性の喘息に対する影響は一致しておらず、さらなる検討を要すると考えられた。

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、脂質メタボリズ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

- Tsurikisawa N, Akiyama K, et al. Bronchial hyperresponsiveness to histamine correlates with airway remodelling in adults with asthma. *Respir Med*;104(9):1271-7. 2010
- Tsurikisawa N, Akiyama K, et al. Bronchial reactivity to histamine is correlated with airway remodeling in adults with moderate to severe asthma. *J Asthma*;47(8):841-8. 2010
- Ono E, Akiyama K, et al. CD203c expression on human basophils is associated with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol*;125(2):483-489 e3.
- Horiguchi Y, Akiyama K, et al. (123)I-MIBG imaging detects cardiac involvement and predicts cardiac events in Churg-Strauss syndrome. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*.
- Higashi N, Akiyama K, et al. Profile of eicosanoid generation in aspirin-intolerant asthma and anaphylaxis assessed by new biomarkers. *J Allergy Clin Immunol*;125(5):1084-1091 e6.
- Fukutomi Y, Akiyama K, et al. Nationwide cross-sectional population-based study on the prevalences of asthma and asthma symptoms among Japanese adults. *Int Arch Allergy Immunol*;153(3):280-7, 2010.
- 福富友馬, 秋山一男ほか. 本邦における病院通院成人喘息患者の実態調査 国立病院機構ネットワーク共同研究 *アレルギー*59(1):37-46, 2010.
- Matsunaga K, Hirano T, Kawayama T, Tsuburai T, Nagase H, Aizawa H, Akiyama K, Ohta K, Ichinose M. Reference Ranges for Exhaled Nitric Oxide Fraction in Healthy Japanese Adult Population. *Allergol Int*. 2010 Aug 25;59(4) (in press).

押方智也子, 秋山一男ほか

呼気一酸化窒素濃度の気管支喘息診断カットオフ値への
喫煙およびアトピー素因の影響 日本呼吸器学会雑誌
48 巻 7 号 539-540, 2010.

粒来崇博, 秋山一男ほか 成人気管支喘息患者に置ける
簡便な呼気中一酸化窒素濃度測定法—オフライン法2法と
NIOXmino の比較—
アレルギー59(8):956-64, 2010.

Ono E, Akiyama K, et al. Increase in Salivary
Cysteinyl-Leukotriene Concentration in Patients with
Aspirin-Intolerant Asthma. Allergol Int. 2010 Nov 24;60(1)
in press.

厚生労働科学研究費補助金（免疫・アレルギー疾患予防・治療研究事業）
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
- 閉塞性肺疾患の鑑別における呼気一酸化窒素濃度（FeNO）の有用性の検証 -

分担研究者：大田 健 帝京大学医学部 呼吸器アレルギー内科教授
研究協力者：長瀬洋之（同准教授）、戸田貴子（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、一般臨床応用化することを目的としている。呼気一酸化窒素濃度（FeNO）は、気管支喘息で高値を示し、気道炎症マーカーとしての有用性が確立してきている。一方 FeNO は、慢性閉塞性呼吸器疾患（COPD）、気管支拡張症（BE）、間質性肺炎（IP）、睡眠時無呼吸症候群（SAS）でも高値をとることが報告されている。しかしながら、既報における FeNO 測定法は様々であり、健常人と比較した検討が多く、喘息と直接比較した報告は少ないため、実際の臨床現場で、喘息診断にどの程度支障を来す可能性があるのかについては十分に検討されていない。そこで本分担研究では、前年度の検討から、喘息との鑑別が問題になる COPD や BE 等に対象疾患を絞ってさらに症例を追加し、喘息と他の呼吸器疾患の FeNO を同一の方法で測定し、鑑別診断における有用性を明らかにすることを目的とした。さらに、FeNO 高値を示す呼吸器疾患における気道炎症プロファイル、気道可逆性も検討した。

B, C 方法と結果 当院呼吸器内科外来通院中の 141 名に対して、NIOX MINO を用いて FeNO 測定を行った。FeNO (ppb) は、吸入ステロイド薬（ICS）使用中の安定喘息（sBA, n=57, 48.0±5.7）、ICS 使用中の不安定喘息（usBA, n=15, 73.7±17.8）、ICS 未使用の喘息（utBA, n=15, 72.3±13.0）、COPD（n=18, 23.2±4.2）、SAS（n=15, 22.9±2.1）、IP（n=10, 21.2±2.9）、BE（n=11, 32.7±9.4）であり、COPD, IP, SAS では utBA, usBA に比して、有意に低値であった。ROC 曲線による解析では、utBA と BE/COPD を鑑別する閾値は、45 ppb であった（感度 73.3%、特異度 92.9%）。非喘息疾患 53 例で 45 ppb を超えたのは COPD の 1 例、BE の 2 例のみであり、これらの 3 例では喀痰好酸球が全例陽性であった。BE の 1 例は、気道可逆性陽性で、ICS で 1 秒量も改善した。FeNO<45 ppb では喀痰好酸球陽性例は COPD の 1/11 例、BE の 1/9 例のみであった。

D 考察 94.3% の非喘息性呼吸器疾患で、FeNO は 45 ppb 以下で、喘息に匹敵する高値を示さない事が明らかになり、喘息診断における FeNO 測定の有用性が示された。一方、COPD や BE の一部で FeNO は高値であり、喀痰好酸球の代替マーカーとなる可能性が示唆された。

E 結論 FeNO 測定は、気管支喘息を BE、COPD 等の他の閉塞性呼吸器疾患から鑑別するにあたり、有用であると考えられた。また、FeNO は COPD、BE において、即時に結果の得られる喀痰好酸球の代替マーカーとなることが示唆され、これらの疾患においても、気道可逆性検査、ICS の積極的導入を行うべき症例の選択に有用であると考えられた。

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、一般臨床応用化することを目的としている。呼気一酸化窒素濃度 (FeNO)は、気管支喘息で高値を示し、気道炎症マーカーとしての有用性が確立してきている。一方 FeNO は、慢性閉塞性呼吸器疾患 (COPD)、気管支拡張症 (BE)、間質性肺炎 (IP)、睡眠時無呼吸症候群 (SAS)でも高値をとることが報告されている。しかしながら、既報における FeNO 測定法は様々であり、健常人と比較した検討が多く、喘息と直接比較した報告は少ないため、実際の臨床現場で、喘息診断にどの程度支障を来す可能性があるのかについては十分に検討されていない。そこで本分担研究では、前年度の検討から、喘息との鑑別が問題になる COPDやBE等に対象疾患を絞ってさらに症例を追加し、喘息と他の呼吸器疾患の FeNO を同一の方法で測定し、鑑別診断における有用性を明らかにすることを目的とした。さらに、FeNO 高値を示す呼吸器疾患における気道炎症プロファイル、気道可逆性も検討した。

B. 研究方法

当院外来通院中の気管支喘息、COPD、睡眠時無呼吸症候群 (SAS)、種々の原因による間質性肺炎 (IP)、気管支拡張症 (BE)の計 141 例を対象とした。FeNO 測定は、NIOX MINO[®]を用いて行った。気管支喘息、COPD の診断はわが国の診療ガイドラインに準拠して行ったが、対象は胸部 CT にて気腫化を認める症例とした。気管支喘息症状については、FeNO 測定日に、処方の変更や追加が行われた症例を不安定喘息患者、処方変更が行われなかった症例を安定喘息患者とした。SAS は、無呼吸低呼吸指数 (AHI)が 40 回/h を超え、持続陽圧呼吸療法 (CPAP)を施行している患者を対象とした。間質性肺炎は、血清 KL-6 値が 500 U/ml を超え、かつ胸部 CT 間質性肺炎に合致する所見を認める患者を対象と

した。

喀痰細胞診は、自発喀痰を定性的に検討した。気道可逆性試験は、ベネトリン[®]吸入液を用いて、喘息予防・管理ガイドラインに則って施行し、1 秒量が 200 ml かつ 12%増加した場合に、有意な増加とした。

C. 結果

表 1, 図 1 に示す通り、FeNO は未治療喘息 (utBA)と不安定喘息 (usBA)で、コントロール群と比較して有意に高値であった。統計学的有意差には達しなかったが、安定喘息 (sBA)群では、FeNO の平均値は utBA 群や、usBA 群に比して低値であった。また、utBA 群では、COPD, IP, SAS 等の他の呼吸器疾患よりも有意に高値であった。非喘息疾患 53 例で 50 ppb を超えたのは COPD の 1 例、BE の 2 例のみであった。そこで、FeNO が上昇している症例の臨床的特徴を検討した。

表 2 に COPD と BE における、喀痰細胞診と気道可逆性試験の結果を示す。今回検討した、気腫化を伴う COPD 患者では、有意な気道可逆性を示した症例はなかったが、FeNO が 88 ppb と高値をとった症例 11 では、喀痰好酸球が陽性であった。一方、他の 10 症例では、喀痰好酸球陽性は 1 例のみであった。BE では、FeNO が 50 ppb を超えた 2 例 (症例 8, 9)では喀痰好酸球が陽性であり、うち 1 例では、気道可逆性も陽性であり、吸入ステロイド薬 (ICS)で 1 秒量も改善した。一方、他の 7 症例では、喀痰好酸球陽性は 1 例のみであった。

未治療喘息と COPD/BE を鑑別する閾値を ROC 曲線による解析で求めたところ、45 ppb であった (図 2, 感度 73.3%, 特異度 92.9%)。

表 1. 患者背景と FeNO 値 (平均値 ± 標準誤差)

| 診断 | n | M/F | 年齢 | FeNO (ppb) |
|---------|----|-------|----------|------------|
| Control | 7 | 3/4 | 33.6±5.6 | 13.2±2.5 |
| sBA | 57 | 30/27 | 56.4±2.0 | 48.0±5.7 |
| usBA | 15 | 4/11 | 47.9±3.8 | 73.7±17.8 |
| utBA | 15 | 11/4 | 50.4±3.8 | 72.3±13.0 |
| COPD | 18 | 16/2 | 71.7±3.5 | 23.2±4.2 |
| BE | 11 | 1/10 | 65.6±4.5 | 32.7±9.4 |
| IP | 10 | 7/3 | 71.3±4.7 | 21.2±2.9 |
| SAS | 15 | 12/3 | 59.9±3.8 | 22.9±2.1 |

sBA = 吸入ステロイド薬 (ICS)使用中の喘息患者 (stable BA);

usBA = ICS 使用中の不安定喘息患者 (unstable BA);

utBA = 未治療喘息患者 (untreated BA);

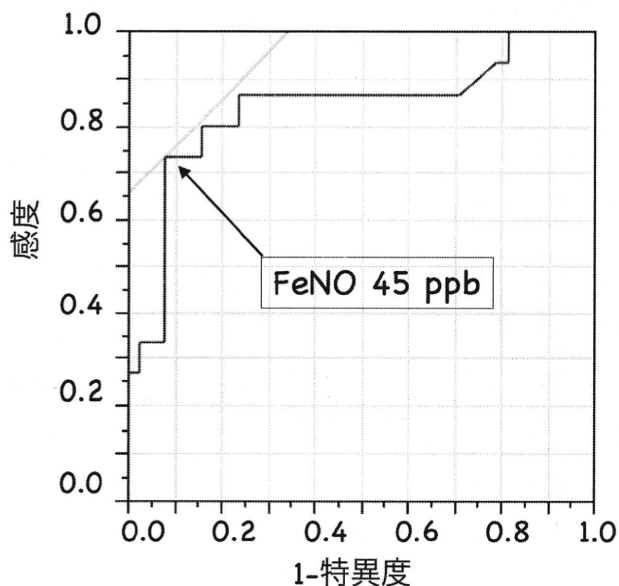
COPD = chronic obstructive pulmonary diseases;

BE = 気管支拡張症 (bronchiectasis);

IP = 間質性肺炎 (interstitial pneumonia);

SAS = 睡眠時無呼吸症候群 (sleep apnea syndrome).

図 2: 閉塞性呼吸器疾患を鑑別するための ROC 曲線

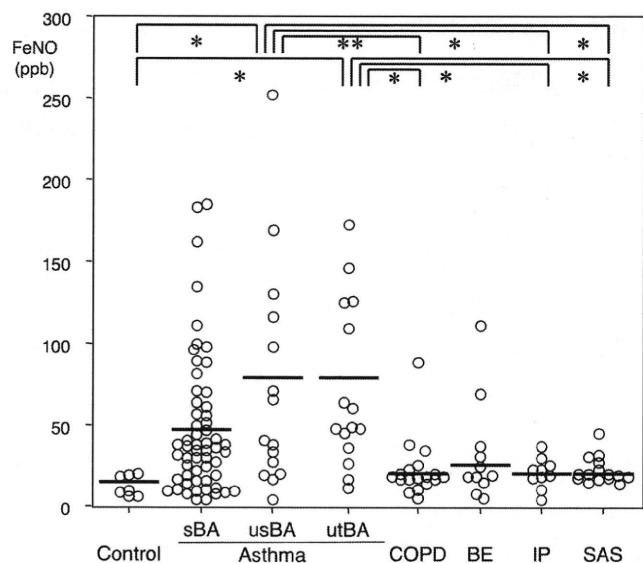


未治療喘息と COPD/BE を鑑別するための ROC 曲線。

感度 73.3%、特異度 92.9%、陽性的中率 84.6%

陰性的中率 86.7%、AUC = 0.846.

図 1. 種々の呼吸器疾患における FeNO (ppb)



バーは平均線を示す。** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

表 2. FeNO と喀痰好酸球との関連

| 症例 | FeNO (ppb) | 年齢 (y) | 性 | 気道可逆性 | | Post-BD % FEV1 | 血清 IgE (IU/mL) | 喀痰細胞診 | | |
|------|---------------|-----------|----|---------------|------|-------------------|----------------------|-------|-----|----|
| | | | | ΔFEV1 (mL) | % | | | Neu | Eos | |
| COPD | 1 | 9 | 60 | M | -60 | -3.0% | 67.9 | 58 | 1+ | - |
| | 2 | 11 | 59 | M | 140 | +6.9% | 82.2 | 233 | 1+ | - |
| | 3 | 14 | 73 | M | 30 | +1.2% | 119.7 | 476 | 2+ | 1+ |
| | 4 | 17 | 65 | M | 220 | +11.2% | 69.1 | 11 | 2+ | - |
| | 5 | 17 | 63 | M | -70 | -3.1% | 71.5 | 15 | 1+ | - |
| | 6 | 18 | 66 | F | 40 | +10.3% | 46.0 | 297 | 1+ | ± |
| | 7 | 19 | 69 | M | -100 | -11.1% | 38.2 | 32 | 1+ | ± |
| | 8 | 21 | 77 | M | 120 | +17.1% | 54.7 | 992 | 2+ | - |
| | 9 | 21 | 71 | M | 20 | +1.8% | 83.7 | 15 | 1+ | - |
| | 10 | 26 | 80 | M | 10 | +0.4% | 109.3 | ND | 2+ | ± |
| | 11 | 88 | 86 | M | 130 | +9.3% | 95.0 | 21 | 1+ | 1+ |
| BE | 1 | 6 | 49 | M | ND | | | 70 | 1+ | 1+ |
| | 2 | 8 | 75 | F | ND | | | 235 | 2+ | - |
| | 3 | 15 | 67 | F | ND | | | 145 | 1+ | - |
| | 4 | 19 | 73 | F | ND | | | 7 | 1+ | - |
| | 5 | 19 | 60 | F | ND | | | 27 | 2+ | - |
| | 6 | 20 | 60 | F | ND | | | 148 | 1+ | - |
| | 7 | 25 | 58 | F | ND | | | 8 | 2+ | - |
| | 8 | 69 | 65 | F | 80 | +4.3% | 101.6 | 2380 | 2+ | 1+ |
| | 9 | 111 | 58 | F | 270 | +14.8% | 94.6 | 205 | 2+ | 2+ |

post-BD %FEV1 = 気管支拡張薬吸入後の%FEV1 (FEV1/FEV1 予測値); ND = 測定せず;

Neu = 好中球; Eos = 好酸球.

D. 考察

非喘息呼吸器疾患における FeNO は、未治療喘息に比して有意に低値であり、鑑別における有用性が示された。

非喘息呼吸器疾患での FeNO に関する報告をまとめると、COPD では、増悪期には増加するとする報告があるものの、安定期では正常か、わずかな上昇に留まるとする報告が多い。SAS では正常か微増、間質性肺疾患についての報告は少ないが、肺線維症や強皮症に伴う肺線維症では増加、BE では慢性気道感染の有無、線毛運動不全の有無により結果が分かれるが、低下するとする報告が多い。

これらの報告では、主として健常人との比較がなされており、喘息と直接比較はされていない。さらに測定時の呼気流速や測定機器が様々であり、疾患間で直接比較した報告は少ない。今回、気管支喘息と直接比較すると、種々の呼吸器疾患における FeNO は有意に低値であることが示され、気管支喘息において最も著明にかつ特異的に上昇していることが示された。

日常診療で、喘息との鑑別に苦慮する可能性がある疾患として、胸部単純 X 線写真で粗大な病変を認めず、かつ閉塞性障害を来し、喘鳴を聴取しうる、COPD や BE があげられる。今回の検討では、喘息とこれらの疾患を鑑別する閾値は 45 ppb であり、感度、特異度とも優れていた。喘息診断のためのカットオフ値は 20-40 ppb と報告されており、今回の検討では、これらの報告より高値であったが、比較対象が健常人ではなく、COPD/BE 患者であったためと考えられる。

さらに、今回の検討では、FeNO 高値を呈した COPD 症例では、喀痰好酸球が陽性であったが、FeNO 低値の 10 症例で喀痰好酸球陽性であったのは 1 例のみであった。喀痰好酸球陽性の COPD ではステロイド反応性が良好であることが報告されており、FeNO と喀痰好酸球

数には相関がみられることも報告されている。喀痰好酸球の結果は即時には得られないが、FeNO は 100 秒で測定できることから、COPD 患者における ICS の適応を考慮するための検査として有用な可能性がある。

FeNO 高値を呈する BE 症例の臨床的特徴には不明な点が多いが、今回の検討では、FeNO 高値を呈した 2 例で、やはり喀痰好酸球陽性であり、FeNO と喀痰好酸球の間に関連が有ることが示唆された。BE における ICS 反応性と FeNO との関連は今後の検討課題である。

また、BE において喀痰好酸球陽性であれば、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 (ABPA) が疑われる。BE における FeNO 測定は ABPA のスクリーニングとして有用な可能性を想定し、アスペルギルス抗体を検討した。今回 FeNO 高値を呈した BE の 2 例では、アスペルギルス沈降抗体は陰性であり、ABPA の診断基準は満たさなかったものの、アスペルギルス特異的 IgE 抗体は双方で陽性であった。しかしながら、既報では、嚢胞性線維症においては、ABPA を合併すると FeNO は低値をとると報告されており、今後の検討が必要である。

E. 結論

FeNO は、気管支喘息を BE、COPD 等の閉塞性呼吸器疾患から鑑別するにあたり、有用であると考えられた。また、FeNO は COPD、BE において、即時に結果の得られる喀痰好酸球の代替マーカーとなることが示唆され、これらの疾患においても、気道可逆性検査、ICS の積極的導入を行うべき症例の選択に有用であると考えられた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Toda T, Yamaguchi M, Nakase Y, Sugimoto N, Suzukawa M, Nagase H, Ohta K. A case of anaphylactic reaction following matsutake mushroom ingestion: demonstration of histamine release reaction of basophils.

Allergol Int. 2010;59:417-9.

- 2) Suzukawa M, Nagase H, Ogahara I, Han K, Tashimo H, Shibui A, Koketsu R, Nakae S, Yamaguchi M, Ohta K. Leptin Enhances Survival and Induces Migration, Degranulation, and Cytokine Synthesis of Human Basophils.

J Immunol. 2011;186:5254-5260.

2. 学会発表

- 1) 戸田貴子, 長瀬洋之, 原麻恵, 小河原郁子, 鈴木真穂, 小島康弘, 倉持美知雄, 田下浩之, 新井秀宜, 山口正雄, 鈴木直仁, 大田 健
呼気一酸化窒素濃度(FeNO)の疾患特異性の検証
第50回日本呼吸器学会学術講演会 京都 2010年4月
- 2) 原 麻恵, 長瀬洋之, 鈴木真穂, 小河原郁子, 戸田貴子, 小島康弘, 倉持美知雄, 田下浩之, 新井秀宜, 山口正雄, 鈴木直仁, 大田 健
シリカによる慢性肺線維化モデル確立のための長期検討
第50回日本呼吸器学会学術講演会 京都 2010年4月
- 3) 長瀬洋之, 倉持美知雄, 保科孝行
バレニクリンによる禁煙成功予測因子の検討
第 50 回日本呼吸器学会学術講演会 京都 2010 年 4 月
- 4) 内山千登世, 長瀬洋之, 鈴木真穂, 大田 健, 斉藤恵美子, 岩田 力, 渋谷紀子
アトピー性皮膚炎乳児に対する乳酸菌製剤の有効性と免疫学的パラメーターの変化についての検討
第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会
京都 2010 年 5 月

- 5) 長瀬洋之, 戸田貴子, 杉本直也, 中瀬裕子, 神山麻恵, 吉原久直, 倉持美知雄, 田下浩之, 新井秀宜, 山口正雄, 鈴木直仁, 大田 健
喘息管理・コントロール状態の評価 JGL2009、GINA、EPR3、喘息コントロールテスト(ACT)における喘息コントロール評価の比較
第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会
東京 2010 年 10 月
- 6) 戸田貴子, 長瀬洋之, 神山麻恵, 中瀬裕子, 杉本直也, 鈴木真穂, 吉原久直, 倉持美知雄, 田下浩之, 新井秀宜, 中野純一, 山口正雄, 鈴木直仁, 大田 健
非喘息性呼吸器疾患における呼気一酸化窒素濃度(FeNO)測定の意義
第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会
東京 2010 年 10 月
- 7) 長瀬洋之, 古賀一郎, 太田康男, 大田健
新型インフルエンザと喘息について多面的に考える
成人領域における新型インフルエンザの臨床
第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会
東京 2010 年 10 月
- 8) 長瀬洋之, 小島康弘, 戸田貴子, 原麻恵, 倉持美知雄, 田下浩之, 新井秀宜, 山口正雄, 鈴木直仁, 大田 健
帝京大学内科における非小細胞肺癌症例の治療成績
第 107 回日本内科学会総会 東京 2010 年 4 月
- 9) 戸田貴子, 長瀬洋之, 原 麻恵, 鈴木真穂, 倉持美知雄, 田下浩之, 新井秀宜, 山口正雄, 鈴木直仁, 大田 健
呼気一酸化窒素濃度 (FeNO)の疾患特異性の検証
第 20 回 Interasma Japan 東京 2010 年 7 月
- 10) H Nagase, T Toda, A Kamiyama, Y Nakase, N Sugimoto, H Yoshihara, M Kuramochi, H Tashimo, H Arai, M Yamaguchi, N Suzuki, K Ohta
Usefulness of measuring the level of fractional exhaled nitric oxide (FeNO) in various respiratory diseases.

2011 American Academy of Allergy Asthma & Immunol Annual Meeting (AAAAI), San Francisco, USA, March, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況: なし。

誘発喀痰および末梢血を用いた気管支喘息における気道炎症抑制機序に関する検討

分担研究者: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（准教授） 松永和子（助教）

坂崎優樹（大学院生） 澤田昌典（大学院生） 小田華子（大学院生） 竹中慎一（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。喘息における気道炎症が慢性化および難治化する機序は不明な点が多い。さらに、気道炎症と全身炎症およびその制御との関連についても完全には解明されていない。喘息患者を管理するうえで、炎症とその制御の機序を解明することは重要な課題と言える。また、制御機構を検討することによって、喘息管理における有用なバイオマーカーの発見に貢献すると考えられる。

安定期非喫煙アトピー型軽症喘息患者と非喫煙非アトピー健常人を対象に、誘発喀痰および末梢血中の好酸球および好中球炎症と炎症制御性 T リンパ球との関連を検討した。誘発喀痰中制御性 T 細胞(CD4⁺CD25^{high}Foxp-3⁺、CD4⁺CD25^{high}CTLA-4⁺および CD4⁺CD25^{high}Foxp-3⁺CTLA-4⁺Tリンパ球)分画は、喘息患者で有意に低下していたが(p<0.05)、末梢血制御性 T 細胞は健常人と有意差は無かった(p>0.05)。誘発喀痰中制御性 T 細胞のうち Foxp-3⁺と CTLA-4⁺分画は健常人のみ正の相関が見られた(r=0.58, p<0.05)。また、喀痰中好酸球分画は喘息患者で有意に高かった(p<0.05)。

喘息における気道炎症評価としてのバイオマーカーの研究は重要であるが、炎症抑制のバイオマーカーの検討も必要であると考えられた。

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 21 年度までに、誘発喀痰中の好酸球数は喘息患者において健常人に対して有意に多く、好酸球数 (Log) は喘息の重要な病態のひとつである気道過敏性 (PC₂₀) と相関し、吸入ステロイドによって気道炎症抑制および肺機能や気道過敏性の改善を認めることを報告した。

さらに、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、正常健常人に比較して低値であり、アレルゲン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。また、吸入ステロイドによって誘発喀痰中の好酸球は低下し、CTLA-4 陽性 CD25⁺CD4⁺T 細胞が回復することを証明した。さらに、吸入ステロイドの抗炎症効果には、抗炎症性サイトカインの IL-10 が関与していることも報告した。

平成 22 年度の研究では、更なる簡便で正確な気管支喘息の病状を把握できるバイオマーカーの検索を目的に誘発喀痰および末梢血における炎症性バイオマーカーあるいは制御性バイオマーカーの検討を行った。

B. 研究方法

1) 対象

非喫煙アトピー型軽症喘息患者 13 名 [メサコリンに対する気道過敏性試験 (PC₂₀) <8mg/mL、血清総 IgE 値高値あるいはアレルゲン特異的 IgE 陽性] および非喫煙健常人 11 名から文書による同意を得た後に、安定期に、血清総 IgE 値、アレルゲン特異的 IgE、末梢血好酸球数および分画、誘発喀採取、スパイロメトリーおよびメサコリンに対する気道過敏性試験 (PC₂₀ を測定した) を行った。

2) 誘発喀痰の採取

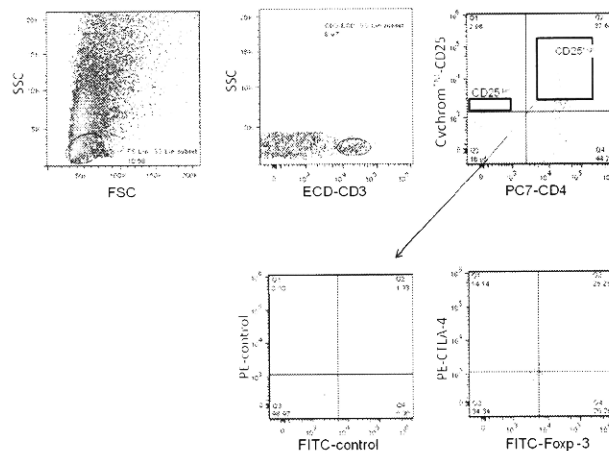
短時間作用型β₂ 刺激薬吸入 15 分後に、ネブライザー

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。

誘発喀痰の細胞数を測定した後に 1.0x10⁶/mL に調整し、サイトスピンスライドを作成し、メイギムザ染色を用いて、細胞分画を算出した。

3) Flowcytometry を用いた制御性 T 細胞分画の測定

末梢血は Lymphprep™ を用いて、単核球 (PBMC) とした。PBMC と喀痰の残りの細胞は、6well の Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) および Ionomycin (IOM) 存在下または非存在下で 4 時間培養後に、Flowcytometry を用いて、CD3⁺CD4⁺、CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25^{high}CTLA-4⁺、CD4⁺CD25^{high}Foxp-3⁺ および CD4⁺CD25^{high}CTLA-4⁺Foxp-3⁺ T 細胞分画を測定した。ただし、各 Isotype control は 2% 未満とした。



4) 呼吸機能の測定

スパイロメトリーは電子スパイロメトリーを用いて、3 回測定し、最も良い値を採用した。

5) 気道過敏性試験

安静時のスパイロメトリー (Baseline) 後に、0.9% 食塩水を 2 分間吸入負荷し、再度スパイロメトリーを行った。さらに、メサコリンを 0.03 から 16mg/mL の 10 段階 2 倍希釈液を 2 分間吸入後に、それぞれスパイロメトリーを行い、1

秒量が baseline から 20%低下した際のメサコリン濃度を PC₂₀とした。

C. 結果

1) 喘息および健常人群の被験者背景

年齢および性別では両群間に差はなく、喘息群では有意にアトピー保有者が多かった (Fisher Exact test, $p < 0.0001$)。肺機能では、健常人群は喘息群に比較して、努力性肺活量 (FVC) が高かったが、1 秒量 (FEV₁) は両群間に差は無かった。気道過敏性は喘息群で、PC₂₀ が 16mg/mL 以下 (geometric mean 0.1 ± 0.0 mg/mL) であった。誘発喀痰中および末梢血中好酸球分画は喘息群に有意に高値であった ($p < 0.0001$ および $p = 0.0006$)。血清総 IgE 値は喘息群で高い傾向にあった。

| | Asthma | Control | p value |
|--------------------------------|------------------|-----------------|---------|
| Number | 13 | 11 | |
| Age, years | 32.1 ± 9.0 | 31.4 ± 4.6 | NS |
| Gender, M/F* | 7/6 | 7/4 | NS |
| Atopy, non-atopy* | 13/0 | 2/9 | 0.0001 |
| Lung Functions | | | |
| %FVC predicted, % | 108.1 ± 3.8 | 131.2 ± 4.1 | 0.0006 |
| %FEV ₁ predicted, % | 91.4 ± 3.4 | 94.6 ± 15.2 | NS |
| PC ₂₀ , mg/mL | 0.1 ± 0.0 | 16 | |
| Eosinophils | | | |
| %sputum, % | 13.6 ± 2.1 | 0.9 ± 0.4 | 0.0001 |
| %blood, % | 7.4 ± 1.3 | 2.1 ± 0.3 | 0.0006 |
| Serum total IgE, IU/mL | 1.189 ± 37.4 | 41 ± 13 | 0.0561 |

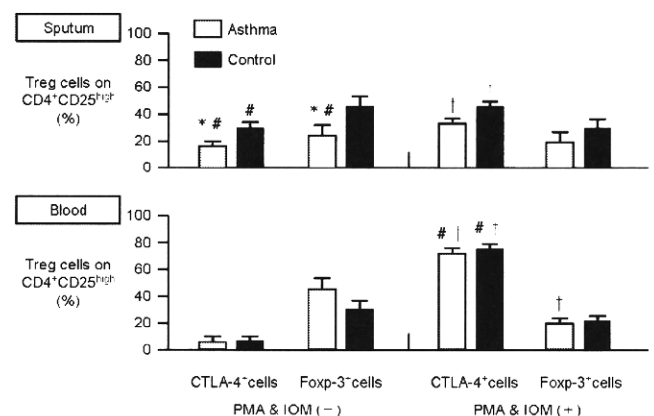
2) 誘発喀痰および末梢血中制御性 T 細胞分画と PMA および IOM が及ぼす影響

誘発喀痰および末梢血における CD4⁺CD25^{high}T 細胞に対する CTLA-4 陽性あるいは Foxp-3 陽性細胞分画を PMA および IOM 非刺激下あるいは刺激下で検討した。非刺激下では、喘息群における誘発喀痰中の CTLA-4 および Foxp-3 陽性制御性 T 細胞分画は、いずれも健常人群に比較して有意に低かった ($*p < 0.05$)。しかし、末梢血においては、CTLA-4 および Foxp-3 陽性制

御性 T 細胞分画は、いずれも両群間に差は認められなかった。

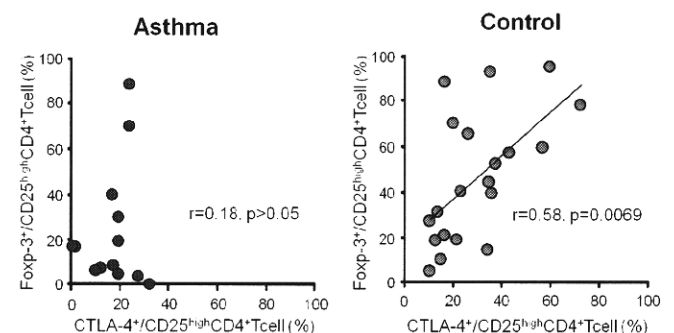
喘息群および健常人群ともに、誘発喀痰と末梢血の制御性 T 細胞分画が有意に異なっていた ($\#p < 0.05$)。

CTLA-4 陽性制御性 T 細胞は、PMA および IOM 刺激下で喘息群および健常人群の誘発喀痰および末梢血において、有意に増加した。また、増加率は、喘息群および健常人群において有意差はなかった (結果は示さず)。しかし、Foxp-3 陽性細胞分画は喘息の末梢血のみにおいて有意に増加した ($\dagger p < 0.05$)。



3) 誘発喀痰中制御性 T 細胞分画における CTLA-4 および Foxp-3 陽性細胞の相関について

制御性 T 細胞には、CTLA-4 あるいは Foxp-3 陽性細胞の phenotype が存在するが、健常人群では両細胞は正の相関が認められたが ($r = 0.58$, $p = 0.0069$)、喘息群では相関は認められなかった ($r = 0.18$, $p > 0.05$)。



4) 誘発喀痰中制御性 T 細胞分画とその他の喘息パラメーターとの関連について

誘発喀痰中の制御性 T 細胞分画と気道過敏性、肺機能(%1秒量)および喀痰中好酸球数(Log表記)との相関はいずれも認められなかった。誘発喀痰中 Log 好酸球数は気道過敏性(PC₂₀)と有意な相関を認めた(r=0.73, p<0.01)。

| | PC ₂₀ | FEV ₁ pred | Log numbers of eosinophils | %CTLA-4 ⁺ Treg cells | %Foxp-3 ⁺ Treg cells |
|---|-------------------|-----------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| %Foxp-3 ⁺ CTLA-4 ⁺ Treg cells | r=-0.17 NS | r=0.11 NS | r=-0.04 NS | r=0.39 NS | r=0.90 p<0.0001 |
| %Foxp-3 ⁺ Treg cells | r=0.05 NS | r=0.08 NS | r=-0.25 NS | r=0.18 NS | |
| %CTLA-4 ⁺ Treg cells | r=0.08 NS | r=0.48 NS | r=-0.16 NS | | |
| Log number of eosinophils | r=-0.73 p<0.01 | r=-0.28 NS | | | |
| FEV ₁ pred | r=0.37 NS | | | | |

D. 考察

今回の研究において、喘息における簡易で正確なバイオマーカーを炎症と炎症抑制の視点から検討を行った。末梢血では良いバイオマーカーの候補は得られず、やはり喘息は気道局所の炎症あるいは気道局所での炎症抑制のバイオマーカーを検討する必要性をあらためて確認した。

誘発喀痰中制御性 T 細胞は明らかに喘息群で低下しており、喘息の病態を反映していると思われたが、肺機能や気道過敏性との関連は認められなかった。炎症性のバイオマーカーとしての好酸球と制御性 T 細胞分画との関連も見いだせなかった。おそらく、制御性 T 細胞は喘息発症や重症化との指標のひとつとして重要であろうと思われたが、今回の研究では明らかにすることが出来なかった。

今後、非アトピー型喘息や重症喘息患者における気道炎症抑制の機序を検討し、より適切なバイオマーカーの探究する予定である。

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、方法論に煩雑なところもあり、更なる簡便化をする必要があると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

英文論文

- 1) Matsunaga K, Hirano T, Kawayama T, Tsuburai T, Nagase H, Aizawa H, Akiyama K, Ohta K, Ichinose M. Reference Ranges for Exhaled Nitric Oxide Fraction in Healthy Japanese Adult Population. Allergol Int. 2010 Aug 25;59. [Epub ahead of print].
- 2) Miura S, Shibata H, Kida H, Noda K, Toyama T, Iwasaki N, Iwaki A, Ayabe M, Aizawa H, Taniwaki T, Fukumaki Y. Partial SPAST and DPY30 deletions in a Japanese spastic paraplegia type 4 family. Neurogenetics. 2010 Sep 22. [Epub ahead of print].
- 3) Kurata S, Ishibashi M, Azuma K, Kaida H, Takamori S, Fujimoto K, Kobayashi M, Hirose Y, Aizawa H, Hayabuchi N. Preliminary study of positron emission tomography/computed tomography and plasma osteopontin levels in patients with asbestos-related pleural disease. Jpn J Radiol. 2010;28:446-52.
- 4) Miura S, Azuma K, Yamada K, Takamori S, Kawahara A, Noda K, Ayabe M, Kage M, Aizawa H,

- Taniwaki T. Combined treatment with prednisolone and tacrolimus for myasthenia gravis with invasive thymoma. *Acta Neurol Belg.* 2010;110:107-9.
- 5) Imamura Y, Azuma K, Kurata S, Hattori S, Sasada T, Kinoshita T, Okamoto M, Kawayama T, Kaida H, Ishibashi M, **Aizawa H**. Prognostic value of SUVmax measurements obtained by FDG-PET in patients with non-small cell lung cancer receiving chemotherapy. *Lung Cancer.* 2010 Apr 27. [Epub ahead of print].
- 6) Kawahara A, Yamamoto C, Nakashima K, Azuma K, Hattori S, Kashihara M, **Aizawa H**, Basaki Y, Kuwano M, Kage M, Mitsudomi T, Ono M. Molecular diagnosis of activating EGFR mutations in non-small cell lung cancer using mutation-specific antibodies for immunohistochemical analysis. *Clin Cancer Res.* 2010;16:3163-70.
- 7) Kawahara A, Azuma K, Hattori S, Nakashima K, Basaki Y, Akiba J, Takamori S, **Aizawa H**, Yanagawa T, Izumi H, Kohno K, Kono S, Kage M, Kuwano M, Ono M. The close correlation between 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and epidermal growth factor receptor activating mutation in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol.* 2010;41:951-9.
- 3) **相澤久道**, 澤田昌典, 園部伸恵: 日常診療におけるCOPD患者の状態評価-COPDアセスメントテスト(CAT)日本語版の利用-. *International Review of Asthma & COPD* 2010;12:39-46.
- 4) **相澤久道**: COPD急性増悪と喘息急性増悪との違い. *アレルギーの臨床* 2010;30:44-49.
- 5) **相澤久道**, 澤田昌典, 園部伸恵: COPDアセスメントテスト(CAT)日本語版. *吸入療法* 2010;2:18-23.
- 6) **相澤久道**, 澤田昌典, 園部伸恵: COPDの重症度と新しくなった薬物療法. *治療* 2010;92:1811-1816.
- 7) **相澤久道**, 園部伸恵: 喫煙と肺年齢. *呼吸器内科* 2010;17:482-486.

2. 学会発表

国際学会

和文論文

- 1) **相澤久道**: 気管支喘息の外来診療. *呼吸器内科* 2010;18:101-106.
- 2) **相澤久道**: 注目の新薬 シムビコート(ブデソニド・ホルモテロール配合剤). *診断と治療* 2010;98(9):1533-1537.
- 1) Y. Sakazaki, T. Hoshino, T. Kawayama, H. Imaoka, T. Kinoshita, M. Sawada, H. Oda, Y. Kitasato, T. Iwanaga, **H. Aizawa**. Severe airway remodeling and increased CD8+T cells and eosinophils in airways of asthma death. American Thoracic Society international conference 2010, New Orleans, USA, May 16, 2010.
- 2) T. Kinoshita, T. Hoshino, Y. Sakazaki, M. Sawada, H. Oda, T. Kawayama, **H. Aizawa**. Elastase-induced emphysematous change and pulmonary inflammation are attenuated in caspase-1 deficient mice. American Thoracic Society international conference 2010, New Orleans, USA, May 14-19, 2010.
- 3) M. Sawada, T. Hoshino, Y. Sakazaki, H. Oda, T. Kawayama, **H. Aizawa**. Overproduction of IL-18 in the lungs, and results in airway hyper responsiveness and pulmonary inflammation.

- American Thoracic Society international conference 2010, New Orleans, USA, May 14–19, 2010.
- 4) T. Sekizuka, T. Kawayama, H. Ishii, K. Ito, K. Matsunaga, T. Hoshino, **H. Aizawa**. Impairment of glucose tolerance in subjects with COPD in Japan. American Thoracic Society international conference 2010, New Orleans, USA, May 19, 2010.
- 5) K. Matsunaga, R. Toda, T. Kawayama, M. Tajiri, T. Hoshino, **H. Aizawa**. High prevalence of gastroesophageal reflux in patients with asthma. American Thoracic Society international conference 2010, New Orleans, USA, May 19, 2010.
- 6) T. Kawayama, K. Matsunaga, R. Toda, T. Hoshino, **H. Aizawa**. Heterogeneity of plasma brain natriuretic peptide levels and systemic inflammation in COPD with normal cardiac function. American Thoracic Society international conference 2010, New Orleans, USA, May 19, 2010.
- 7) **H. Aizawa**. Various Effects of Nitric Oxide (NO) on Airway Functions. 国際NO学会学術集会, Kyoto, Japan, June 14–18, 2010.
- 8) K. Matsunaga, T. Kawayama, K. Yamaguchi, T. Hoshino, **H. Aizawa**. Different profiles of lung and systemic regulatory T cells in mild asthmatics. European Respiratory Society annual congress, Barcelona, Spain, September 18, 2010.
- 9) Y. Sakazaki, T. Hoshino, T. Kawayama, H. Imaoka, T. Kinoshita, M. Sawada, H. Oda, S. Takenaka, Y. Kitasato, T. Iwanaga, **H. Aizawa**. Enhanced expression of IL-18 and increased CD8+ T cells and eosinophils in the airways of asthma death. European Respiratory Society annual congress, Barcelona, Spain, September 18, 2010.
- 10) H. Oda, T. Hoshino, S. Takenaka, M. Sawada, Y. Sakazaki, T. Kinoshita, **H. Aizawa**. Emphysematous change, weight loss, atrophy of the gastrocnemius and cor pulmonale in aging IL-18 transgenic mice: roles of IL-13 in mouse COPD model. European Respiratory Society annual congress, Barcelona, Spain, September 18, 2010.
- 11) Masanori Sawada, Tomoaki Hoshino, Yuki Sakazaki, H. Oda, S. Takenaka, T. Kawayama, **H. Aizawa**. Overproduction of IL-18 induces IL-13 producing CD4+ T cells in the lungs, and results in airway hyperresponsiveness and pulmonary inflammation in Balb/c mice. European Respiratory Society annual congress, Barcelona, Spain, September 18, 2010.

国内学会

- 1) **相澤 久道**: 日本語版CATプロジェクトの取り組みについて. 日本喘息・COPDフォーラム第7回総会, 東京, 2010.3.6
- 2) 坂崎 優樹、星野 友昭、川山 智隆、木下 隆、武井 仁子、澤田 昌典、小田 華子、北里 裕彦、岩永 知秋、**相澤久道**: 非喫煙喘息死患者の気道リモデリングと炎症細胞の解析. 日本内科学会, 東京, 2010.4.10
- 3) **相澤久道**: COPDと喘息. 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 京都, 2010.4.23–25
- 4) **相澤久道**: COPD Assessment Test (CAT) 日本語版の作成. 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 京都, 2010.4.23–25
- 5) Y. Sakazaki, T. Hoshino, M. Sawada, H. Oda, S. Takei, Y. Kitasato, M. Yoshida, T. Iwanaga, T. Kawayama, **H. Aizawa**. Characteristics of fatal asthma: CD8+ T cells and eosinophils were

- recruited into airways in fatal asthma. 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 京都, 2010.4.24
- 6) 木下 隆、星野 友昭、坂崎 優樹、澤田 昌典、小田 華子、川山 智隆、相澤 久道: Elastase誘導性気腫におけるCaspase-1の役割. 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 京都, 2010.4.23-25
- 7) 田尻 守弘、岡元 昌樹、川山 智隆、星野 友昭、相澤 久道: 当院における皮膚筋炎合併間質性肺疾患、特発性肺線維症の急性増悪の臨床的検討. 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 京都, 2010.4.23-25
- 8) M. Sawada, R. Toda, Y. Sakazaki, T. Kawayama, T. Hoshino, H. Aizawa. Detection and Evaluation of Severity of COPD using IPAG Questionnaires: Evaluation of IPAG Questionnaires for COPD in Japan. 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 京都, 2010.4.23-25
- 9) 相澤久道: 高齢者喘息: 病態の特徴と診断. 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会, 京都, 2010.5.8-9
- 10) 相澤久道: COPD共同研究について. 第3回KASCOM総会, 福岡, 2010.5.22
- 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
特記なし

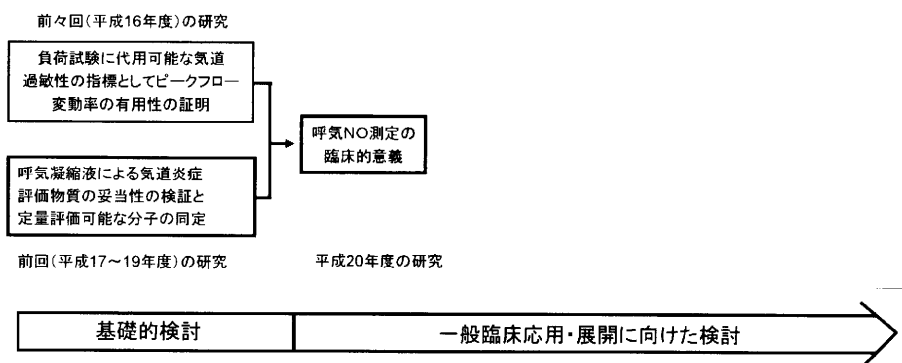
IV. 研究報告会（平成 23 年 1 月 25 日）
発表資料

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

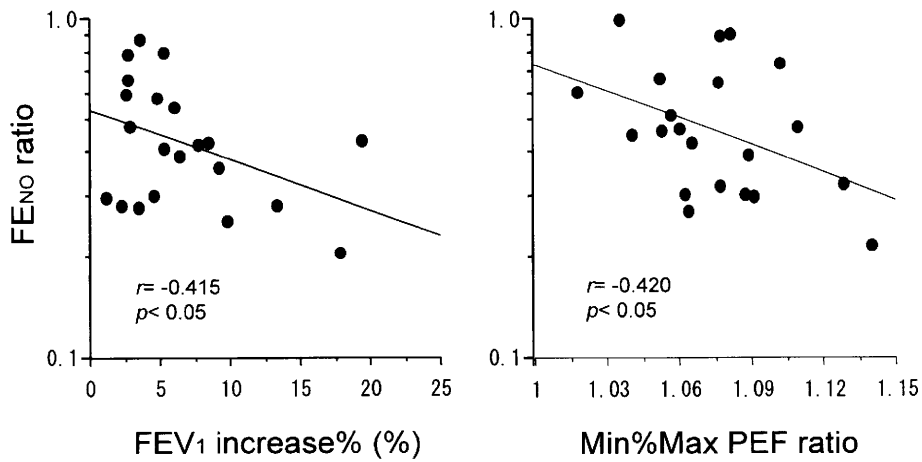
| | |
|-------------------------------|-------|
| 和歌山県立医科大学医学部 内科学第三講座 | 一ノ瀬正和 |
| 独立行政法人国立病院機構 相模原病院臨床研究センター | 秋山 一男 |
| 帝京大学医学部内科学講座 | 大田 健 |
| 久留米大学内科学講座 呼吸器・神経・膠原病内科部門 | 相澤 久道 |

研究の流れ図

当該研究事業(平成20-22年度)



呼気NO濃度の改善程度と 閉塞性障害・気道過敏性の改善程度との相関性



研究の流れ図

当該研究事業(平成20-22年度)

