

Fig. 6. Effects of proteasomal inhibitor MG132 and a specific NF- κ B inhibitor, caffeic acid phenethyl ester (CAPE), on peroxynitrite-augmented α -SMA expression and TGF- β_1 release in HFL-1. Cultured cells were treated with various concentrations of MG132 in the presence (filled bars) or absence (open bars) of 10^{-5} M peroxynitrite for 48 h. α -SMA expression was analyzed by Western blotting (A) and quantified by densitometry (B). Each α -SMA band intensity was normalized with the corresponding β -actin band intensity. All values are expressed as means \pm SE for 4–6 separate experiments. Cultured cells were treated with various concentrations of CAPE in the presence (filled bars) or absence (open bars) of 10^{-5} M peroxynitrite for 48 h. α -SMA expression was analyzed by Western blotting (C) and quantified by densitometry (D). Each α -SMA band intensity was normalized with the corresponding β -actin band intensity. All values are expressed as means \pm SE for 4 separate experiments. Media were assayed for total TGF- β_1 by ELISA (E). All values are expressed as means \pm SE for 4 separate experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01, compared with the values of control. † P < 0.05, †† P < 0.01, compared with the values of vehicle-pretreated peroxynitrite-exposed group.

with 10^{-5} M peroxynitrite, the translocation of NF- κ B p65 was clearly enhanced at 60 min, and the fluorescence intensity of NF- κ B p65 in the nucleus was diminished at 120 min (Fig. 5A). The enhanced nuclear translocation of NF- κ B p65 was also confirmed by Western blotting. The amount of NF- κ B p65 in the nucleus was significantly increased at 60 min compared with the control (2.7-fold increase; P < 0.01; Fig. 5, B and C) and decreased at 120 min (Fig. 5, B and C). To investigate whether NF- κ B is related to α -SMA expression in HFL-1 cells, the effects of MG132, a proteasomal inhibitor and CAPE, a specific NF- κ B inhibitor, on the α -SMA expression were evaluated. The peroxynitrite-augmented α -SMA expression was completely inhibited by both inhibitors (Fig. 6, A–D). Furthermore, CAPE completely inhibited the peroxynitrite-augmented TGF- β_1 release (at 3 μ g/ml, 315 ± 28 vs. 99 ± 21 pg/ml; P < 0.01; Fig. 6E).

To clarify the mechanistic role of TGF- β_1 in peroxynitrite-mediated α -SMA expression in HFL-1 cells, we investigated the effect of neutralizing anti-TGF- β antibody on α -SMA expression. Neutralizing anti-TGF- β antibodies significantly reduced the peroxynitrite-augmented α -SMA expression compared with the control IgG-treated group (at 10^{-5} M, 2.4-fold increase vs. 1.3-fold increase; P < 0.01; Fig. 7, A and B).

To determine whether peroxynitrite stimulates the production of ECM proteins, the release of fibronectin and expression of collagen I were assessed by ELISA and Western blotting, respectively. Peroxynitrite significantly augmented the fibronectin (at 10^{-5} M, $2,178 \pm 176$ vs. 698 ± 41 ng/ml; P < 0.01; Fig. 8A) and collagen I production (at 10^{-5} M, 2.0-fold increase; P < 0.01; Fig. 8, B and C) in a concentration-dependent manner. Neutralizing anti-TGF- β antibodies significantly inhibited the peroxynitrite-augmented production of fibronectin (at 10^{-5} M, $1,958 \pm 65$ vs. 816 ± 49 ng/ml; P <

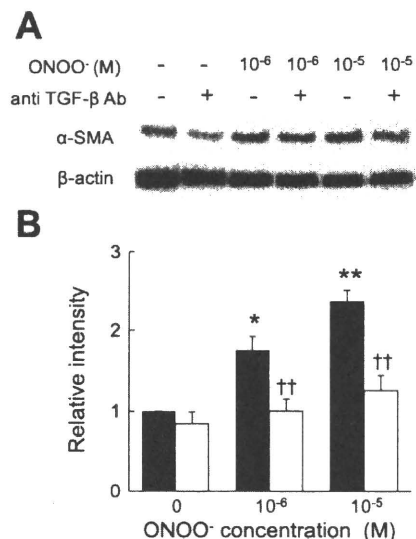


Fig. 7. Effect of neutralizing anti-TGF- β antibody (Ab) on the peroxynitrite-augmented α -SMA expression in HFL-1. Cultured cells were treated with 10^{-6} to 10^{-5} M peroxynitrite in the presence of neutralizing anti-TGF- β antibody (filled bars) or control IgG (open bars) for 48 h. α -SMA expression was analyzed by Western blotting (A) and quantified by densitometry (B). Each α -SMA band intensity was normalized with the corresponding β -actin band intensity. All values are expressed as means \pm SE for 4 separate experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01, compared with the values of control. †† P < 0.01, compared with the values of control IgG-treated group.

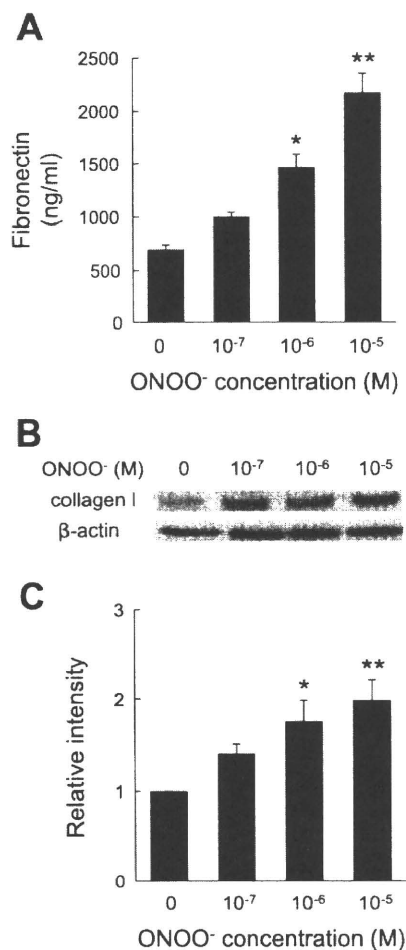


Fig. 8. Effect of peroxynitrite on fibronectin release and collagen I expression in HFL-1. Cultured cells were treated with various concentrations of peroxynitrite for 48 h. After 48 h, media and cells were harvested. Media were assayed for fibronectin by ELISA (A). Collagen I expression was analyzed by Western blotting (B) and quantified by densitometry (C). Each collagen I band intensity was normalized with the corresponding β-actin band intensity. All values are expressed as means ± SE for 5 separate experiments. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, compared with the values of control.

0.01; Fig. 9A) and collagen I (at 10⁻⁵ M, 2.1-fold increase vs. 1.3-fold increase; *P* < 0.01; Fig. 9, B and C) compared with the control IgG-treated group.

DISCUSSION

The present study demonstrated that peroxynitrite significantly augmented α-SMA expression in HFL-1 and NHLF cells. Peroxynitrite enhanced TGF-β₁ release by HFL-1 and NHLF cells and also promoted the translocation of NF-κB p65 into the nucleus. A proteasomal inhibitor, MG132, and a specific NF-κB inhibitor, CAPE, completely inhibited the peroxynitrite-augmented α-SMA expression. In addition, CAPE diminished the peroxynitrite-augmented TGF-β₁ release. Neutralization of TGF-β significantly inhibited the peroxynitrite-augmented α-SMA expression. Furthermore, fibronectin and collagen I production were significantly enhanced by peroxynitrite, which was inhibited by neutralizing anti-TGF-β antibody. These data suggest that RNS can induce the differentiation of lung fibroblasts to myofibroblasts and the

excessive production of ECM protein via a NF-κB-TGF-β₁-dependent pathway.

It has been reported that the differentiation of lung fibroblasts to myofibroblasts plays a pivotal role in the development of airway remodeling in asthma (14). In fact, Schmidt et al. (30) also described that the accumulation of circulating fibrocytes was observed in the airways of asthmatic patients and that these were precursors of bronchial myofibroblasts. Brewster et al. (6) showed that more myofibroblasts were observed in the subepithelial basement membrane-collagen layer of asthmatic airways compared with healthy subjects. In the current study, we clearly showed that peroxynitrite, which is one of the RNS and is an excessively produced NO-related molecule in the airways of asthmatic patients, augmented the differentiation of lung fibroblasts to myofibroblasts.

TGF-β₁ is reported to be a key mediator of airway remodeling (17, 22), and the gene expression of TGF-β₁ is reportedly regulated by NF-κB (7, 18, 19) and AP-1 (11, 19). Broide et al.

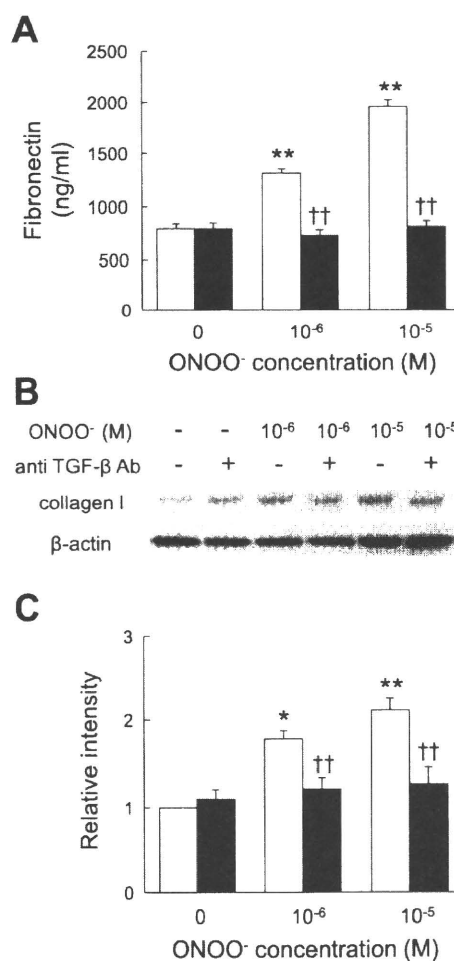


Fig. 9. Effect of neutralizing anti-TGF-β antibody on peroxynitrite-augmented fibronectin release and collagen I expression in HFL-1. Cultured cells were treated with 10⁻⁶ to 10⁻⁵ M peroxynitrite in the presence of neutralizing anti-TGF-β antibody (filled bars) or control IgG (open bars). After 48 h, media and cells were harvested. Media were assayed for fibronectin by ELISA (A). Collagen I expression was analyzed by Western blotting (B) and quantified by densitometry (C). Each collagen I band intensity was normalized with the corresponding β-actin band intensity. All values are expressed as means ± SE for 5 separate experiments. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, compared with the values of control. ††*P* < 0.01, compared with the values of control IgG-treated group.

(7) reported that TGF- β_1 release was increased in ovalbumin-challenged mice, whereas the TGF- β_1 level in I κ B kinase knockout mice was decreased compared with wild-type mice, and the airway remodeling was ameliorated. These findings suggest that NF- κ B plays a key role in the regulation of TGF- β_1 gene expression. In a variety of cells, peroxynitrite is reported to enhance NF- κ B DNA binding activity (2, 3, 16, 21). In the current study, peroxynitrite promoted the translocation of NF- κ B p65 into the nucleus in HFL-1 cells and stimulated TGF- β_1 release, which was inhibited by a NF- κ B inhibitor. Taken together, peroxynitrite could augment TGF- β_1 release by lung fibroblasts through NF- κ B activation.

The possible mechanism for the activation of NF- κ B by peroxynitrite is as follows: according to a previous study, peroxynitrite nitrates tyrosine 181 residues of I κ B α , which consequently leads to the dissociation of intact I κ B α from NF- κ B (38). Peroxynitrite itself has also been reported to activate NF- κ B without preactivation by proinflammatory mediators such as TNF- α and LPS (2, 3, 16, 21). However, the regulation of NF- κ B by nitrate stress has not been fully elucidated. Therefore, further study is needed.

Excessive deposition of ECM proteins crucially contributes to airway remodeling. It has been reported that myofibroblasts can produce greater amounts of ECM proteins compared with undifferentiated fibroblasts (13). However, the precise effect of RNS on ECM production in HFL-1 cells remains unknown. TGF- β reportedly induces myofibroblast differentiation and subsequent ECM protein synthesis (20). The current study demonstrated that peroxynitrite augmented the α -SMA expression and ECM production by HFL-1 cells. This augmentation was inhibited by neutralizing anti-TGF- β antibody, and our data support the previous study (1). Taken together, RNS can enhance the myofibroblast differentiation and ECM production via a TGF- β_1 -dependent pathway.

Although peroxynitrite has a very short half-life (~ 1.5 s), TGF- β_1 was accumulated in the media in a time-dependent manner (data not shown). The possible reason is as follows: the gene expression of TGF- β_1 was triggered after NF- κ B activation, and subsequently the produced TGF- β_1 induced myofibroblast differentiation. Differentiated myofibroblasts can produce greater amounts of TGF- β_1 , and this positive feedback would be related to TGF- β_1 accumulation in the media.

Because fetal lung fibroblasts may not respond to peroxynitrite the same way as postnatal lung fibroblasts, we investigated the effects of peroxynitrite on the α -SMA expression and TGF- β_1 release in NHLF. As shown in Fig. 4, peroxynitrite had similar effects on the protein production in fetal fibroblasts and adult fibroblasts. These results are compatible with those of our previous study (34).

High doses of peroxynitrite have cytotoxic effects. In this study, we used noncytotoxic doses of peroxynitrite ($\sim 10^{-5}$ M) as shown in Supplemental Fig. 1C. A concentration of 10^{-5} M peroxynitrite has no proliferative effect (Supplemental Fig. 1D). Furthermore, ebselen, a peroxynitrite scavenger, diminished the peroxynitrite-mediated profibrotic response. These data suggest that peroxynitrite directly altered lung fibroblasts to the profibrotic phenotype.

Peroxynitrite can enhance the production of IL-8 and TNF- α via NF- κ B activation (16, 21). Recently, we showed that 3-nitrotyrosine, a footprint of RNS production, was excessively produced in the sputum cells from refractory asthmatic patients

compared with well-controlled asthmatic patients (32). In addition, the amount of 3-nitrotyrosine was well-correlated with the degree of airflow limitation in the asthmatic patients. Although the possible mechanisms by which RNS are related to the pathogenesis of refractory asthma are still unclear, peroxynitrite-mediated tissue remodeling may be involved in the refractoriness of asthma.

In conclusion, the current study shows that RNS can enhance NF- κ B activation and TGF- β_1 release in HFL-1 cells, and consequently myofibroblast differentiation and excessive ECM production are induced. Therefore, the NF- κ B-TGF- β_1 pathway is thought to play a pivotal role in the differentiation of lung fibroblasts to myofibroblasts. Our data suggest that the modulation of this pathway may have therapeutic potential for airway remodeling.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Brent Bell for reading this manuscript. We thank Satoru Fukinbara for excellent assistance in statistical analysis.

REFERENCES

1. Alcorn JF, Rinaldi LM, Jaffe EF, van Loon M, Bates JH, Janssen-Heininger YM, Irvin CG. Transforming growth factor-beta1 suppresses airway hyperresponsiveness in allergic airway disease. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 974-982, 2007.
- 1a. American Thoracic Society. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 2341-2351, 2000.
2. Bar-Shai M, Hasnis E, Wiener-Megnazi Z, Reznick AZ. The role of reactive nitrogen species and cigarette smoke in activation of transcription factor NF-kappaB and implication to inflammatory processes. *J Physiol Pharmacol* 57: 39-44, 2006.
3. Bar-Shai M, Reznick AZ. Peroxynitrite induces an alternative NF-kappaB activation pathway in L8 rat myoblasts. *Antioxid Redox Signal* 8: 639-652, 2006.
4. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1620-1624, 1990.
5. Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342: 1350-1358, 2000.
6. Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, Roche WR. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3: 507-511, 1990.
7. Broide DH, Lawrence T, Doherty T, Cho JY, Miller M, McElwain K, McElwain S, Karin M. Allergen-induced peribronchial fibrosis and mucus production mediated by IkappaB kinase beta-dependent genes in airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 17723-17728, 2005.
8. Busse WW, Banks-Schlegel S, Wenzel SE. Pathophysiology of severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 106: 1033-1042, 2000.
9. Busse W, Elias J, Sheppard D, Banks-Schlegel S. Airway remodeling and repair. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1035-1042, 1999.
10. Carroll NG, Perry S, Karkhanis A, Harji S, Butt J, James AL, Green FH. The airway longitudinal elastic fiber network and mucosal folding in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 244-248, 2000.
11. Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, Puri RK, Kitani A. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat Med* 12: 99-106, 2006.
12. Flood-Page P, Menzies-Gow A, Phipps S, Ying S, Wangoo A, Ludwig MS, Barnes N, Robinson D, Kay AB. Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics. *J Clin Invest* 112: 1029-1036, 2003.
13. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 200: 500-503, 2003.
14. Holgate ST, Davies DE, Lackie PM, Wilson SJ, Puddicombe SM, Lordan JL. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 105: 193-204, 2000.

15. Ichinose M, Sugiura H, Yamagata S, Koarai A, Shirato K. Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 701–706, 2000.
16. Jozsef L, Khreiss T, El Kebir D, Filep JG. Activation of TLR-9 induces IL-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils. *J Immunol* 176: 1195–1202, 2006.
17. Kenyon NJ, Ward RW, Last JA. Airway fibrosis in a mouse model of airway inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol* 186: 90–100, 2003.
18. Lee KY, Ho SC, Lin HC, Lin SM, Liu CY, Huang CD, Wang CH, Chung KF, Kuo HP. Neutrophil-derived elastase induces TGF-beta1 secretion in human airway smooth muscle via NF-kappaB pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35: 407–414, 2006.
19. Lee KY, Ito K, Hayashi R, Jazrawi EP, Barnes PJ, Adcock IM. NF-kappaB and activator protein 1 response elements and the role of histone modifications in IL-1beta-induced TGF-beta1 gene transcription. *J Immunol* 176: 603–615, 2006.
20. Makinde T, Murphy RF, Agrawal DK. The regulatory role of TGF-beta in airway remodeling in asthma. *Immunol Cell Biol* 85: 348–356, 2007.
21. Matata BM, Galinanes M. Peroxynitrite is an essential component of cytokines production mechanism in human monocytes through modulation of nuclear factor-kappa B DNA binding activity. *J Biol Chem* 277: 2330–2335, 2002.
22. McMillan SJ, Xanthou G, Lloyd CM. Manipulation of allergen-induced airway remodeling by treatment with anti-TGF-beta antibody: effect on the Smad signaling pathway. *J Immunol* 174: 5774–5780, 2005.
23. Minshall EM, Leung DY, Martin RJ, Song YL, Cameron L, Ernst P, Hamid Q. Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 326–333, 1997.
24. Morishima Y, Nomura A, Uchida Y, Noguchi Y, Sakamoto T, Ishii Y, Goto Y, Masuyama K, Zhang MJ, Hirano K, Mochizuki M, Ohtsuka M, Sekizawa K. Triggering the induction of myofibroblast and fibrogenesis by airway epithelial shedding. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 1–11, 2001.
25. Natarajan K, Singh S, Burke TR Jr, Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9090–9095, 1996.
26. Plante S, Semlali A, Joubert P, Bissonnette F, Laviolette M, Hamid Q, Chakir J. Mast cells regulate procollagen I (alpha 1) production by bronchial fibroblasts derived from subjects with asthma through IL-4/IL-4 delta 2 ratio. *J Allergy Clin Immunol* 117: 1321–1327, 2006.
27. Sadeghi-Hashjin G, Folkerts G, Henricks PA, Verheyen AK, van der Linde HJ, van Ark I, Coene A, Nijkamp FP. Peroxynitrite induces airway hyperresponsiveness in guinea pigs in vitro and in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 1697–1701, 1996.
28. Saleh D, Ernst P, Lim S, Barnes PJ, Gaiad A. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEB J* 12: 929–937, 1998.
29. Schmidt M, Sun G, Stacey MA, Mori L, Mattoli S. Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. *J Immunol* 171: 380–389, 2003.
30. Sugiura H, Ichinose M, Oyake T, Mashito Y, Ohuchi Y, Endoh N, Miura M, Yamagata S, Koarai A, Akaike T, Maeda H, Shirato K. Role of peroxynitrite in airway microvascular hyperpermeability during late allergic phase in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 663–671, 1999.
31. Sugiura H, Komaki Y, Koarai A, Ichinose M. Nitrate stress in refractory asthma. *J Allergy Clin Immunol* 121: 355–360, 2008.
32. Sugiura H, Liu X, Duan F, Kawasaki S, Togo S, Kamio K, Wang XQ, Mao L, Ahn Y, Ertl RF, Bargar TW, Berro A, Casale TB, Rennard SI. Cultured lung fibroblasts from ovalbumin-challenged “asthmatic” mice differ functionally from normal. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37: 424–430, 2007.
33. Sugiura H, Liu X, Kobayashi T, Togo S, Ertl RF, Kawasaki S, Kamio K, Wang XQ, Mao L, Shen L, Hogaboam CM, Rennard SI. Reactive nitrogen species augment fibroblast-mediated collagen gel contraction, mediator production, and chemotaxis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 592–599, 2006.
34. van der Vliet A, Eiserich JP, Shigenaga MK, Cross CE. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract: epiphenomena or a pathobiologic mechanism of disease? *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1–9, 1999.
35. Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Merendino A, Pace E, Rizzo A, la Rocca AM, Bellia V, Bonsignore G, Bousquet J. Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 591–599, 1997.
36. Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, Borok Z. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 166: 1321–1332, 2005.
37. Yakovlev VA, Barani IJ, Rabender CS, Black SM, Leach JK, Graves PR, Kellogg GE, Mikkelsen RB. Tyrosine nitration of IkappaBalpha: a novel mechanism for NF-kappaB activation. *Biochemistry* 46: 11671–11683, 2007.

気道炎症を評価する③

—呼気凝縮液を用いた検討—

The utility of exhaled breath condensate analysis to evaluate the airway inflammation

和歌山県立医科大学医学部内科学第3講座講師 松永 和人 *Kazuto Matsunaga*
和歌山県立医科大学医学部内科学第3講座 市川 朋宏 *Tomohiro Ichikawa*
和歌山県立医科大学医学部内科学第3講座教授 一ノ瀬正和 *Masakazu Ichinose*

Key words

気管支喘息、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、気流制限、気道過敏性

Summary

喘息やCOPDの病態生理には気道炎症が関連しており、簡便な気道炎症評価方法の確立は、これらの疾患の病態生理の解明に有用である。呼気凝縮液は安静換気時の呼気を冷却し、凝縮した液体を採取したものであり、非侵襲的な気道炎症のバイオマーカーとして注目されている。Protein array法を用いた呼気凝縮液分析では、喘息患者ではIL-4, IL-8, IL-17, TNF- α , RANTES, IP-10, TGF- β , MIP-1 α およびMIP-1 β の発現が、健康者と比較して有意に亢進していた。呼気凝縮液におけるRANTESの発現レベルは、気流制限の生理学的指標で

ある1秒量や呼吸抵抗と相関が認められた。またTNF- α とTGF- β の発現レベルは、気道反応性およびピークフロー変動性と相関が認められた。さらに呼気凝縮液を用いた炎症関連物質の分析において、唾液成分の混入は重要な影響を与える因子とはならないことが示された。呼気凝縮液を用いた炎症関連物質の解析は、喘息気道の状態をモニタリングする方法として有用であり、喘息の病態生理の解明や治療効果の判定に応用できる可能性がある。

はじめに

喘息や慢性閉塞性肺疾患(chronic obstructive pulmonary disease ; COPD)は気道の慢性炎症性疾患であり、その炎症には種々の炎症細胞や気道構築細胞、さらに細胞から産生されるサイトカイン、ケモカイン、成長因

子など多くの炎症性メディエーターが関与する¹⁾²⁾。これらの疾患では、気道炎症に関連した気流制限や気道過敏性亢進などの生理的機能障害が生じ、呼吸困難や喘鳴などの呼吸器症状が惹起される¹⁾。そのため、非侵襲的な気道炎症評価法を開発し、臨床応用することは疾患管理上、有用と考えられる。

従来、気道炎症は、気管支鏡を用いて採取する気管支生検組織・気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid ; BALF)や、高張食塩水の吸入後に採取する誘発喀痰などの検体を用いて評価されてきた。これらの方法は細胞由来の情報が得られるが、侵襲的であるため、同一症例に反復して行うことや

重症例に適用することは困難であった。そのため最近では、簡便で非侵襲的な気道炎症の検査法として、呼気一酸化窒素(nitric oxide ; NO)濃度測定や、呼気凝縮液(exhaled breath condensate ; EBC)分析が注目されている。本稿では、気管支喘息の気道炎症評価におけるEBC分析の有用性について、われわれの検討結果を踏まえて述べていきたい。

I EBC検査

呼気成分の大部分は水蒸気であるが、呼吸により気道に生じる乱流により、エアロゾル化された気道被覆液の成分も微量ながら含有される³⁾。EBCとは、安静換気時の呼気を冷却し、凝縮した液体を採取したものである。EBCは約15分程度の安静換気で1～3 mL程度の検体が非侵襲的に採取可能である。採取装置には据え置き型のもの(図1)に加え、携帯性に優れたポータブルタイプ(図2)もあり、在宅や外来での採取も可能である。EBC検査の長所は簡便で非侵襲的なことであり、喘息発作時や重症度の高い症例においても実施が可能である。また反復して採取することが容易であるため、気道炎症のモニタリングへの応用も期待されている。さらに、呼気NO濃度測定と異なり、換気パターンの影響を受けない。一方、短所としては検体中の物質含有量が微量であること、各物質が気道のどの部分に由来するかが特定できないこと、などが挙げられる³⁾。

喘息においては、これまで脂質メディエーターや酸化・窒素化ストレス

のマーカーなどがEBCを用いて測定されている。喘息気道における好酸球遊走や、気管支平滑筋収縮に関与する脂質メディエーターであるleukotriene (LT) C₄/D₄/E₄のEBC中の濃度は、喘息重症度に関連して増加することが報告されている⁴⁾⁵⁾。また酸化ストレスのマーカーであるH₂O₂ (hydrogen peroxide)や8-isoprostaneは、喘息患者より採取したEBCにおいて増加しており⁶⁾⁷⁾、EBC中のH₂O₂発現量は喀痰中の好酸球比率や気道過敏性と相関することが示されている⁶⁾。喘息の気道炎症における炎症細胞間のネットワークにおいて、炎症性メディエーターは重要な役割を果たしているが¹⁾、EBC中のサイトカインについては含有量が微量なこともあり、これまで十分に検討されていない。そこでわれわれは、喘息患者より採取したEBC中に含有されるサイトカイン、ケモカイ

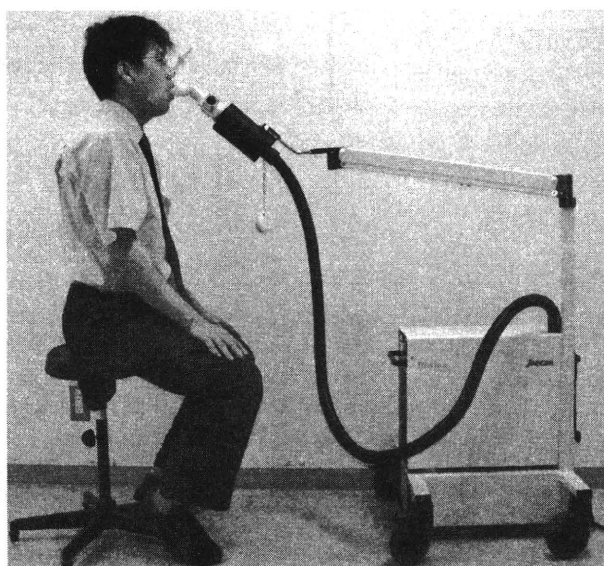


図1. 据え置き型のEBC採取装置エコスクリーン®(Jaeger社, ドイツ)

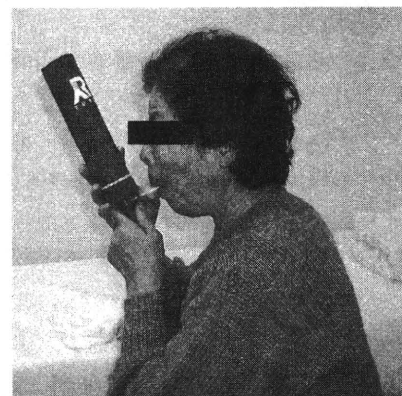


図2. ポータブルタイプのEBC採取装置(RTube™, Respiratory research Inc, アメリカ)

ン、成長因子をprotein array法を用いて網羅的に解析し、炎症関連物質の発現レベルと生理学的パラメーターとの関連について検討した⁸⁾。

II

喘息気道のサイトカイン
発現と肺機能の関連

未治療の安定期喘息患者16例および非喫煙健常者10例を対象に、据え置き型のEBC採取装置エコスクリーン®(Jaeger社, ドイツ)を用いて検体を採取した。喘息患者においては、スパイロメトリーによる努力性肺活量(forced vital capacity ; FVC)と1秒量(forced expiratory volume in one second ; FEV₁), およびアストグラフ(Chest Co, 日本)を用いたメサコリンに対する気道過敏性の閾値を測定した。気道過敏性の指標には、呼吸抵抗が初期呼吸抵抗の2倍となるまでのメサコリン累積濃度(PD₂₀₀ ; cumulative provocative dose of methacholine causing a 100% increase in respiratory resistance)を用いた。また2週間以上のピークフロー(PEF)モニタリングを行い、PEF変動性についても評価した。EBC中の炎症関連物質の発現はCytokine Protein Array (Human Inflammatory Antibody III ; Ray Biotech Inc, アメリカ)を用いて、40種類のサイトカイン、ケモカイン、増殖因子を網羅的に測定した。各炎症関連物質は化学発光法を用いて測定し、positive controlの発現レベルに対する各炎症関連物質の相対的な発現レベルを算出した。まず健常者と比べ、喘息気道において増加している炎症関連物質の同定を行い、さらに喘息患者における炎症関連物質の発現レベルと生理学的パラメーターとの関連性について検討した。

喘息患者のEBCにおいては、interleukin(IL)-4, IL-8, IL-17, tumor

necrosis factor(TNF)- α , regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES), inducible protein(IP)-10, transforming growth factor(TGF)- β , macrophage inflammatory protein(MIP)-1 α およびMIP-1 β 発現が健常者と比較して有意に亢進していた(図3)。喘息患者のEBC中におけるRANTESの発現レベルは、気流制限の生理学的指標であるFEV₁と呼吸抵抗の程度と相関していた(図4)。またTNF- α とTGF- β の発現レベルは、気道過敏性(図5)およびPEF変動率(図6)の程度と相関していた⁸⁾。

III

EBC分析における
唾液成分混入の影響

呼吸による気流が層流となるか乱流となるかはレイノルズ数に依存してい

るが、乱流は上気道から下気道まですべての気道において生じるため、EBCは口腔、咽喉頭、気道、肺胞などすべての気道由来のエアロゾル粒子を含有する⁹⁾。これまでの検討で、EBCには唾液中に検出されないタンパク質が存在すること¹⁰⁾や、EBCと唾液とでは電解質のプロファイルが異なること⁹⁾より、EBC成分の主たる由来は下気道であり、唾液成分混入は分析に重大な影響を与える因子ではないと考えられている³⁾。しかしながら、EBCを用いた炎症関連物質の分析において唾液成分の混入が及ぼす影響については十分に検討されていない。

そこでわれわれは10例の喘息患者よりEBCと唾液を同時に採取し、各々の検体におけるタンパク濃度および炎症関連物質の発現を測定し、比較検討を行った。さらに気管支鏡検査を施行する患者からinformed consentを

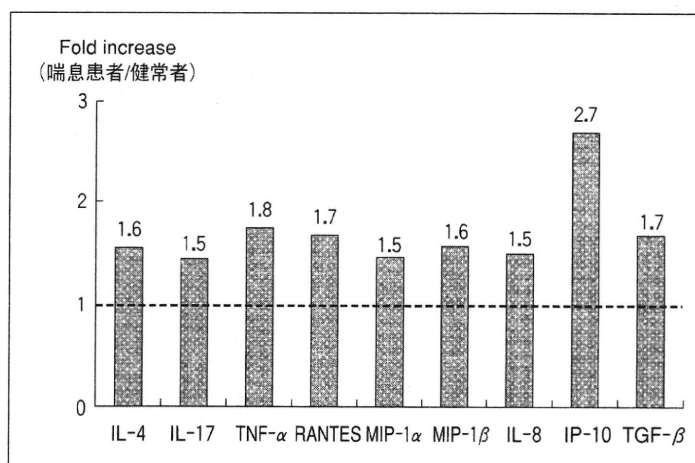


図3. 喘息患者より採取したEBCにおいて発現が亢進している炎症関連物質

図で示した9種の炎症関連物質のEBC中の発現は健常者(controls)と比べ、喘息患者(asthma)で1.5~2.7倍、有意に亢進していた。

(文献8より引用・一部改変)

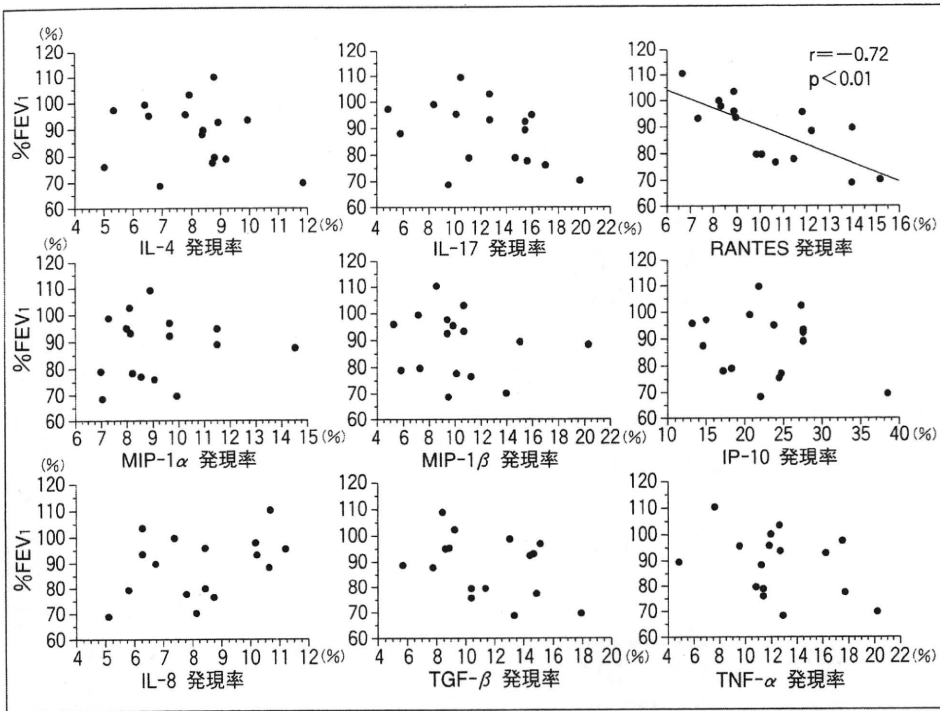


図4. 喘息におけるEBC中のサイトカイン発現レベルと気流制限の関連
喘息患者のEBC中におけるRANTESの発現レベルは、気流制限の生理学的指標であるFEV₁の程度と相関が認められた。
(文献8より引用、一部改変)

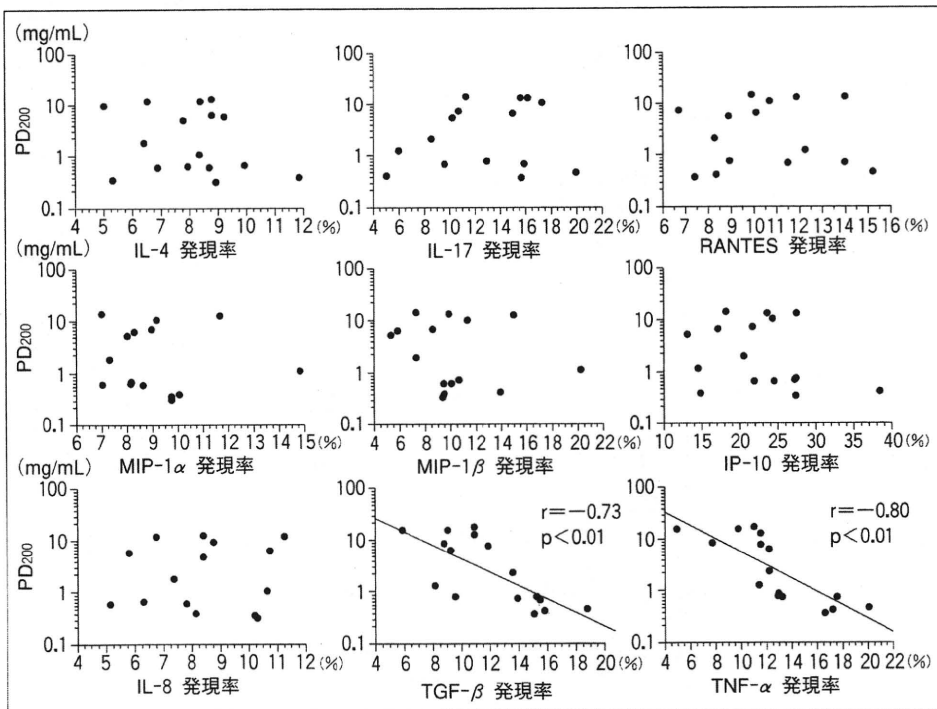


図5. 喘息におけるEBC中のサイトカイン発現レベルと気道過敏性の関連
喘息患者のEBCにおけるTNF- α とTGF- β の発現レベルは、気道過敏性の程度と相関が認められた。
(文献8より引用、一部改変)

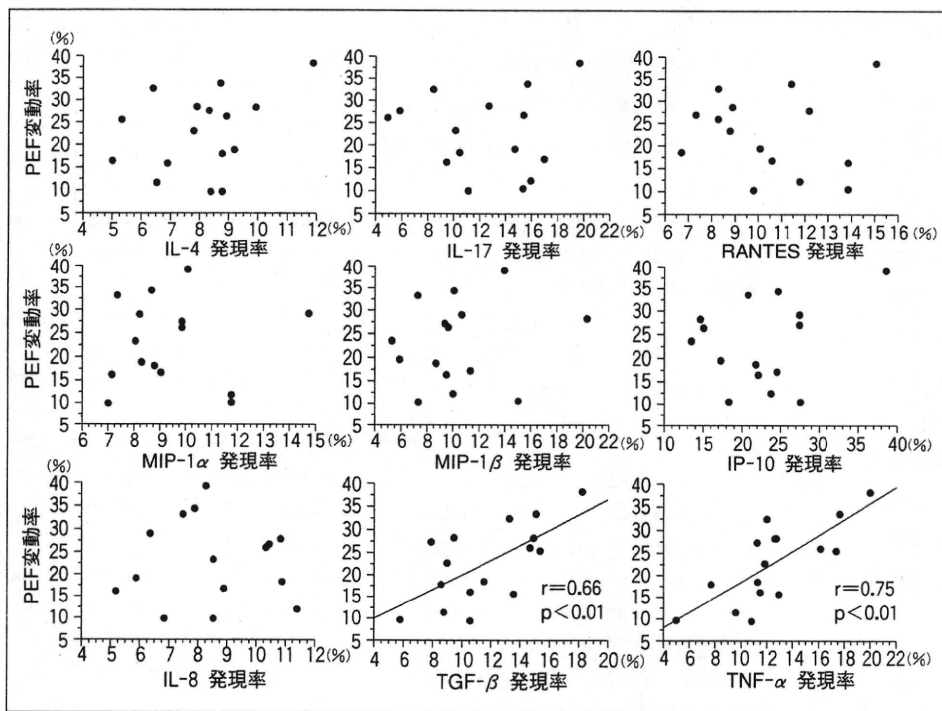


図6. 喘息におけるEBC中のサイトカイン発現レベルと気道不安定性の関連
喘息患者のEBCにおけるTNF- α とTGF- β の発現レベルは、気道不安定性の指標であるPEF変動率の程度と相関が認められた。
(文献8より引用、一部改変)

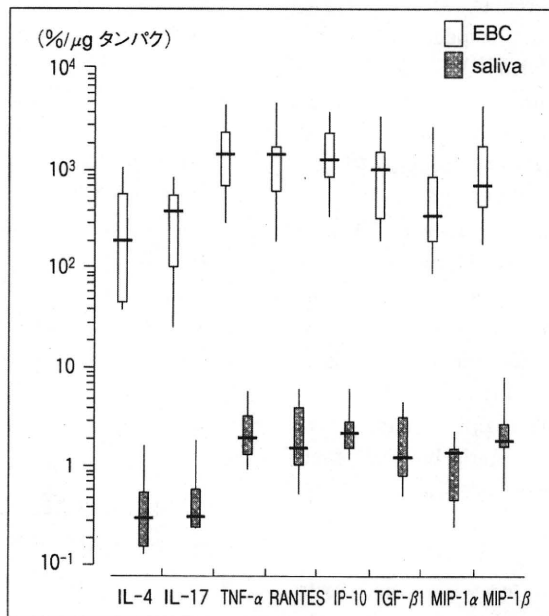


図7. タンパク補正後のEBCと唾液における炎症関連物質の発現レベル
唾液(saliva)中の炎症関連物質の発現レベルは、EBCの1/200以下の水準であった。

(文献11より引用)

得て、気管支の気道被覆液を採取し、タンパク濃度の測定を行った¹¹⁾。EBCのタンパク濃度は4.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、EBC：唾液：気道被覆液のタンパク濃度の比率は、約1：500：3,000であった。また、EBCと唾液のサイトカイン発現プロファイルは全く異なっており、IL-1 β やIL-8などはEBCよりも唾液中で発現が亢進していたが、唾液のタンパク濃度がEBCより500倍程度高いにもかかわらずエオタキシン、顆粒球単球コロニー刺激因子(granulocyte macrophage colony-stimulating factor ; GM-CSF)など、EBCにおいて唾液よりも発現レベルが高い炎症性分子も認められた。タンパク濃度の比率から、EBCは水蒸気などにより気道被覆液が約1/3,000程度に希釈されたものと推測されたため、唾液も同

程度に希釈されるものと仮定し、EBCと唾液のサイトカイン発現レベルをタンパク濃度で補正し比較検討した。タンパク濃度で補正した場合、すべての炎症関連物質は唾液よりもEBCにおいて発現が亢進しており、健常者との比較で喘息患者のEBCにおいて有意な発現の亢進を認めた炎症関連物質についても、唾液中の分子の発現レベルはEBC中の発現レベルに比べて約1/200以下であった(図7)。これらの結果より、EBC分析により検出される炎症関連物質は主に下気道由来であり、唾液成分混入は分析に重要な影響を与える因子とはならないと考えられた¹¹⁾。

おわりに

今回の検討で、非侵襲的に採取可能なEBCにおける炎症関連物質の発現は網羅的に測定が可能であり、健常者と比較して喘息患者において発現が亢進している9種の炎症関連物質が同定された。またEBC中の炎症関連物質の分析において、唾液の混入は重要な影響を与える因子とはならないことが示された。喘息気道におけるこれらの炎症関連物質の発現亢進は、BALFを解析した従来の報告とも合致しており、今回の検討においてEBC中のサイトカイン発現レベルと生理学的パラメーターとの間に関連が認められたことから、EBCを用いた炎症関連物質の解析は、喘息気道の状態をモニタ

リングする方法として有用と考えられた。今後、EBCを用いた気道炎症の評価が、喘息の病態生理の解明や薬物療法の効果判定に応用できる可能性がある。

文 献

- 1) Global initiative for asthma, global strategy for asthma management and prevention. Bethesda : National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute ; updated 2006.
- 2) Global initiative for chronic obstructive lung disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease NHLBI/WHO workshop report. Bethesda : U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services, National Institute of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute, updated 2006.
- 3) Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, et al : Exhaled breath condensate ; methodological recommendations and unresolved questions. Eur Respir J 2005 ; 26 : 523-48.
- 4) Montuschi P, Barnes PJ : Exhaled leukotrienes and prostaglandins in asthma. J Allergy Clin Immunol 2002 ; 109 : 615-20.
- 5) Antczak A, Montuschi P, Kharitonov SA, et al : Increased exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in aspirin-induced asthma. Am J Respir Crit Care Med 2002 ; 166 : 301-6.
- 6) Hovarth I, Donnely LE, Kiss A : Combined use of exhaled hydro-
- gene peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. Am J Respir Crit Care Med 1998 ; 158 : 1042-6.
- 7) Montuschi P, Corradi M, Ciabattoni G, et al : Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled breath condensate of asthma patients. Am J Respir Crit Care Med 1999 ; 160 : 216-20.
- 8) Matsunaga K, Yanagisawa S, Ichikawa T, et al : Airway cytokine expression measured by means of protein array in exhaled breath condensate ; correlation with physiologic properties in asthmatic patients. J Allergy Clin Immunol 2006 ; 118 : 84-90.
- 9) Effros RM, Hoagland KW, Bosbous M : Dilution of respiratory solutes in exhaled breath condensates. Am J Respir Crit Care Med 2002 ; 65 : 663-9.
- 10) Griese M, Noss J, von Bredow C : Protein pattern of exhaled breath condensate and saliva. Proteomics 2002 ; 2 : 690-6.
- 11) Ichikawa T, Matsunaga K, Minakata Y, et al : Possible impact of salivary contamination on cytokine analysis in exhaled breath condensate. Analytical Chemistry Insights 2007 ; 2 : 85-92.

松永 和人

平成3年 和歌山県立医科大学卒業

現在, 和歌山県立医科大学内科学

第3講座講師

専門分野 : 呼吸器内科学, アレルギー内科学

治療法に関するエビデンス

喘息治療効果のモニタリング法

柳澤 悟, 一ノ瀬正和 ●和歌山県立医科大学第三内科
Yanagisawa Satoru Ichinose Masakazu

Point

- 本稿では、一般的に用いられているモニタリング法を示すとともに、最近になり有用性が明らかとなった呼気 NO や呼気凝縮液にもふれ、各検査法の特徴と今後の展望について示す。
- ピークフローメーターは日常診療で最も普及し、また知見が集積されている検査法であり、病状の把握や患者教育において簡便な指標として必要性が高い。
- 誘発喀痰中の好酸球数は喘息の重症度と相関を示し、急性増悪の予見・予防にも役立つ。
- 呼気 NO 濃度は喘息の種々の指標と有意な相関を示し、診断や病態の把握に有用である。ポータブル型呼気 NO 測定装置により、日常診療への普及が進むものと考えられる。
- 呼気凝縮液採取法は、低侵襲で、幅広い患者に応用できることに加えて、気道環境における炎症病態を直接評価することが可能である。
- ピークフローメーターや喀痰好酸球による評価に加えて、呼気 NO や呼気凝縮液といった低侵襲の検査を組み合わせることで、より個々の患者に応じた喘息管理が可能となる。

喘息治療においては、臨床症状のみならず、その病態の中心をなす気道炎症・気道過敏性・構築変化 (remodeling) の各項目を適切に評価しながら、治療の step-up/step-down を行うことが重要である。治療効果に客観性をもたせることは、経験則に陥りがちな診療に普遍性を与え、同時に患者に主体的な治療への参加を促すことを可能にする。本稿では、一般的に用いられているモニタリング法を示すとともに、最近になり有用性が明らかとなってきた呼気 NO や呼気凝縮液にも触れ、現実応用可能なモニタリング法の展望について概説する。

ピークフローメーター (PEF)

Peak Expiratory Flow (PEF) は閉塞性障害の簡便な指標となり、安価であるという利点から、

臨床現場で最も広く普及しているモニター法である。1日1~4回、努力呼気を行って呼気流速を計測し、①自己最良値との比較、②予測値 (年齢・身長から算出) との比較、および③日内変動の程度、の3点を鑑みて重症度や管理状態を判定していく。「PEFの自己最良値はどの程度か?」ということがしばしば問題になるが、一般的に、①1日2~4回の測定を2~3週間記録し、なおかつ②十分な治療による症状安定後に得られた最良値を、治療効果モニターの基準値とする¹⁾(Level 5)。使用する PEF 測定器によって得られる PEF の値が少しずつ変わること、また気管支拡張薬の有無によっても PEF が変化することを踏まえ、できるだけ条件をそろえた状態で過去の値と比較していくことが望ましいといえる²⁾。

ピークフローを指標とした管理群と、症状に基

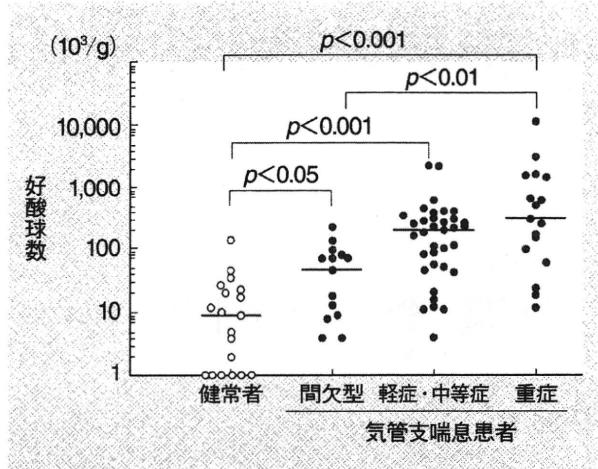
づく管理群を比較し、両者で包括的マネジメントに有意差を認めなかったとするいくつかの報告もある^{3,4)}。しかし、これらは比較的診断からの時間が経ち、病状への理解が得られている症例群における検討であり、気管支喘息を診断した病初期には、やはり一定期間、継続的なPEFモニタリングが必要であるといえる。

誘発喀痰

気管支喘息では気道における好酸球の増加が特徴的であり、誘発喀痰中の好酸球数と気管支喘息の重症度は相関を示す(①)⁵⁾(Level 3)。事実、健康非喫煙者の喀痰中好酸球は0.4~1.1%程度であるのに対し、ステロイド未治療・喘息患者の80%、ステロイド治療・喘息患者でも50%において好酸球数が正常範囲を超える。喀痰中好酸球1%を気管支喘息診断のcut-offとすると感度80%以上・特異度95%とされるが、現実的には喀痰中好酸球が3%以上で「好酸球数増多」と判断しているのが臨床の実情と思われる。

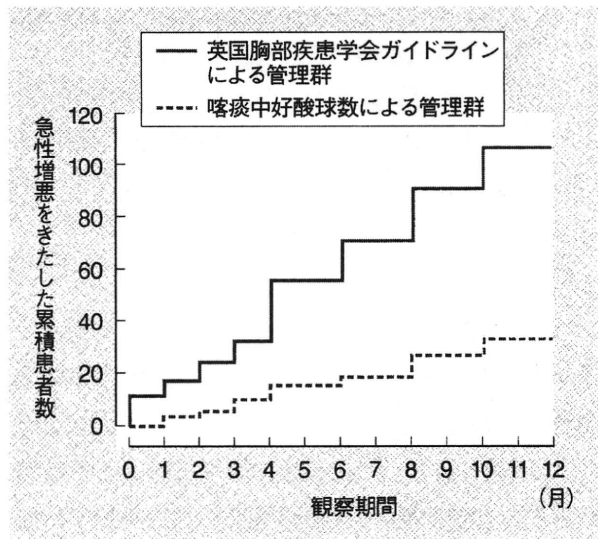
喀痰中の好酸球はステロイド治療により減少し、気流閉塞や気道過敏性の改善とも相関するため、治療効果の有用な指標となる⁶⁾(Level 4)。一方で、気管支喘息が明らかに存在する患者であっても、喀痰中の好酸球が同定できない患者も25~55%おり、こういった患者ではステロイド反応性が悪いことがわかっている。このため治療前の喀痰中好酸球がステロイド反応性・治療反応性を反映する最も鋭敏な指標とする報告もある⁷⁾(Level 4)。

加えて、急性発作が発症する前に喀痰中の好酸球数が増加することが報告されている^{8,9)}(Level 1)。このため、喀痰中の好酸球を正常範囲にするように治療的介入を行うことで、急性増悪の頻度や入院回数を減少させることができ、コストの削減にもつながる(②)。すなわち、急性増悪の予見、およびその予防においても喀痰中の好酸球のモニ



① 気管支喘息患者における誘発喀痰中好酸球数

健常者に比べて、気管支喘息患者では有意に誘発喀痰中の好酸球数の増加を認め、重症ではより顕著な好酸球数の増加が認められる。(Louis R, et al. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 9-16⁵⁾より引用)



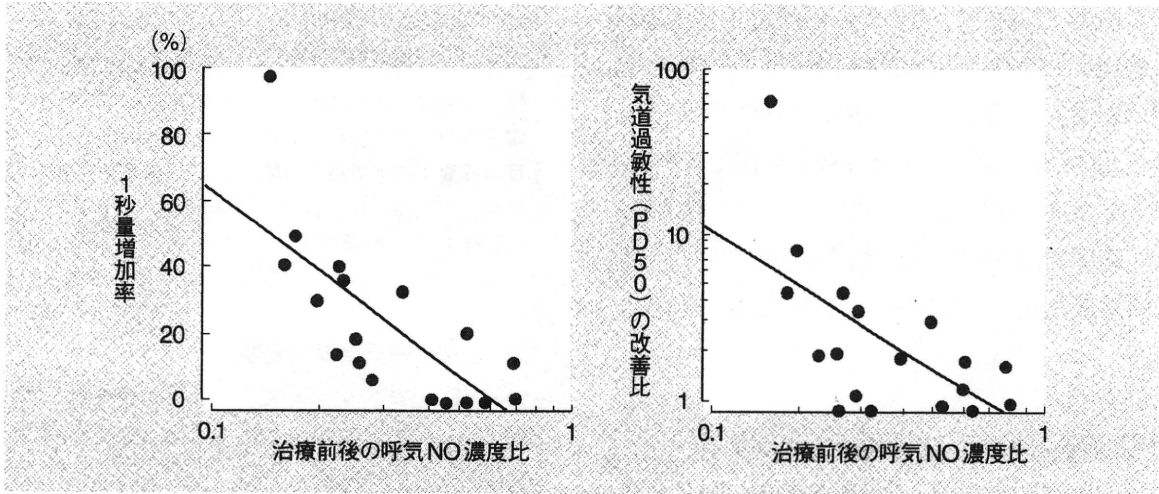
② 英国胸部疾患学会ガイドラインによる管理と喀痰による管理における気管支喘息急性増悪累積患者数の比較

気管支喘息を喀痰中の好酸球を指標に管理した群では、英国胸部疾患学会ガイドラインに沿った管理群に比べて、急性増悪累積患者数が有意に少ない(35人 vs 109人, $p=0.01$) (Green RH, et al. Eur Respir J 2006; 27: 1144-51⁶⁾より引用)

タリングが有用である。

呼気ガス—呼気NOは気道炎症を反映

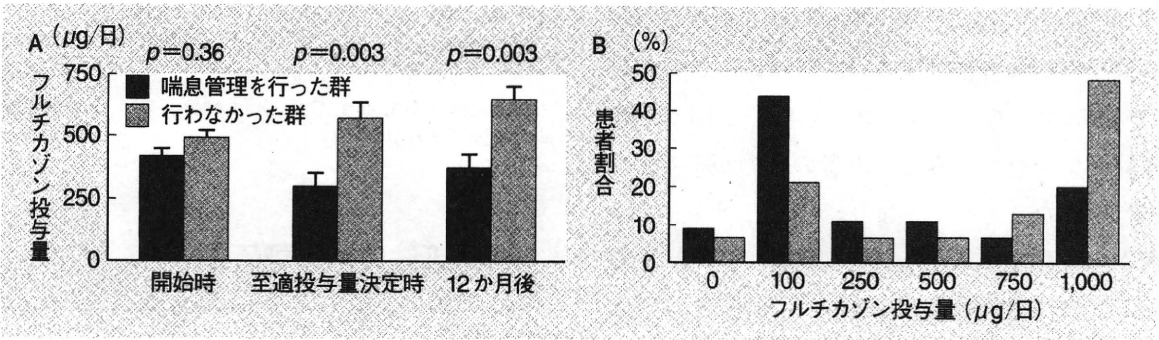
呼気ガス分析は侵襲が低く、以前より呼気中の



③ 呼気NO濃度と閉塞性障害・気道過敏性の関連

気管支喘息患者ではステロイド治療により呼気NO濃度が減少するが、その減少の程度は閉塞性障害の改善（1秒量の増加）や気道過敏性の改善の程度と有意に相関する。

(Ichinose M, et al. Eur Respir J 2000; 15: 248-53⁶⁾より引用)



④ 呼気NOを目安として喘息管理を行った場合と、そうでない場合の比較

Aに示したように呼気NOを目安として治療した群のほうが最終観察日での吸入ステロイド量は少なくてすむ。Bは呼気NOモニタリング群と対照群との治療最終日の吸入ステロイド量の分布を示したものの。

(Smith AD, et al. N Engl J Med 2005; 352: 2163-73¹³⁾より引用)

一酸化炭素 (CO) や一酸化窒素 (NO) をはじめ、さまざまな揮発性物質が気道炎症を反映することが報告されてきた。なかでも、NOは喘息の炎症関連物質の一つとしても重要であり、気道上皮や炎症細胞が炎症時に産生する誘導型・一酸化窒素合成酵素 (iNOS) により産生される。気管支喘息患者の呼気NO濃度は健常人に比べて有意に増加しており^{10, 11)} (Level 3), ① 気流制限や、② 気道過敏性の程度、③ 喀痰中好酸球浸潤の程度、および④ 喘息の重症度と有意な相関を示し、疾患の診断や病態把握に有用である (③)⁶⁾ (Level 4)。最近の報告では、呼気NOが47 ppbを超える気管支喘息

患者では、より良好なステロイド反応性が期待できることがわかっており¹²⁾ (Level 3)、また、ステロイド治療により呼気NOが減少することから、治療反応性の指標としても呼気NOが有用である可能性も示されている。実際、呼気NO濃度を指標として気管支喘息の治療を行った場合、GINA2002 (Global Initiative for Asthma 2002) に基づく治療と比べ、より少ない吸入ステロイドで同等の患者管理が得られたとの報告もあり、ステロイド治療を行う際の客観的な指標になると考えられている (④)¹³⁾ (Level 1)。

従来、測定機器が高価であるために測定可能施

設が限られていたが、近年、ポータブル型の呼気 NO 測定器 (NIOX MINO[®]; Aerocrine 社製) が低価格で開発・発売された。NIOX MINO[®] は、フィルター付きの測定部をくわえ深吸気・深呼気を 1 回ずつ行うだけで呼気 NO 濃度の測定が可能であるため、肺機能検査や気道過敏性検査への協力が難しい小児でも施行可能であり、臨床現場に普及しつつある。

呼気凝縮液—より侵襲の低い検査

呼気時には、気道の分岐部などで生じる乱流により気道被覆液が巻き上げられてエアロゾル化される。この呼気に混じって体外に排出されてくるエアロゾルを急速に冷却・液化して回収する方法が呼気凝縮液検査法である。呼気凝縮液の採取法は、一方向弁付きのチューブをくわえて 15 分程度の安静換気を行うのみで、患者の協力が不十分でも施行可能なことから、より幅広い年代・病状の患者から検体を採取することが可能である。呼気凝縮液には揮発性物質のみならず、気道被覆液に含まれる種々の液性分子が含まれ、*in vivo* に近い状況で、気道環境や気道の炎症病態を直接評価することが可能であると考えられている。本法の特徴を ⑤ に示す。その操作の簡便性・再現性の高さから多くの炎症関連物質の測定がなされており、⑥ に示すような種々の物質が喘息患者において増加していることが示されている¹⁴⁾ (Level 3)。最近、われわれは気管支喘息患者における呼気凝縮液中のサイトカインや増殖因子を蛋白アレイによって網羅的に解析したが、喘息患者ではこれらの発現は健常者に比べて有意に増加しており、喘息の本態である気道過敏性や気道閉塞の程度とも有意な相関を示すことを見出した¹⁵⁾ (⑦) (Level 3)。なお、吸入ステロイド治療により、これらの発現は有意に低下することから、難治性喘息との鑑別や、治療効果判定の手法としての応用が期待される。

⑤ 呼気凝縮液の特徴

長所	短所
操作が簡便・非侵襲的	由来する気道部位が不明
増悪期や小児で施行可能	得られる物質が微量
反復検査や在宅で検査可能	測定に濃縮が必要な場合も
再現性が喀痰よりも高い	ある
換気パターンに影響されない	

⑥ 喘息患者呼気凝縮液変動

		安定期	不安定期
脂質メディエーター	LTB ₄ , LTC ₄ /D ₄ /E ₄	↑	↑↑
酸化ストレス	H ₂ O ₂	↑	↑↑
	8-イソプロスタニン	↑	↑↑↑
窒素化ストレス	NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻	↑	↑↑
	ニトロタイロシン	↑	?
サイトカイン	IL-4, TNF-α, IL-6	?	?

LT: leukotriene

IL: interleukin

TNF-α: tumor necrosis factor-α

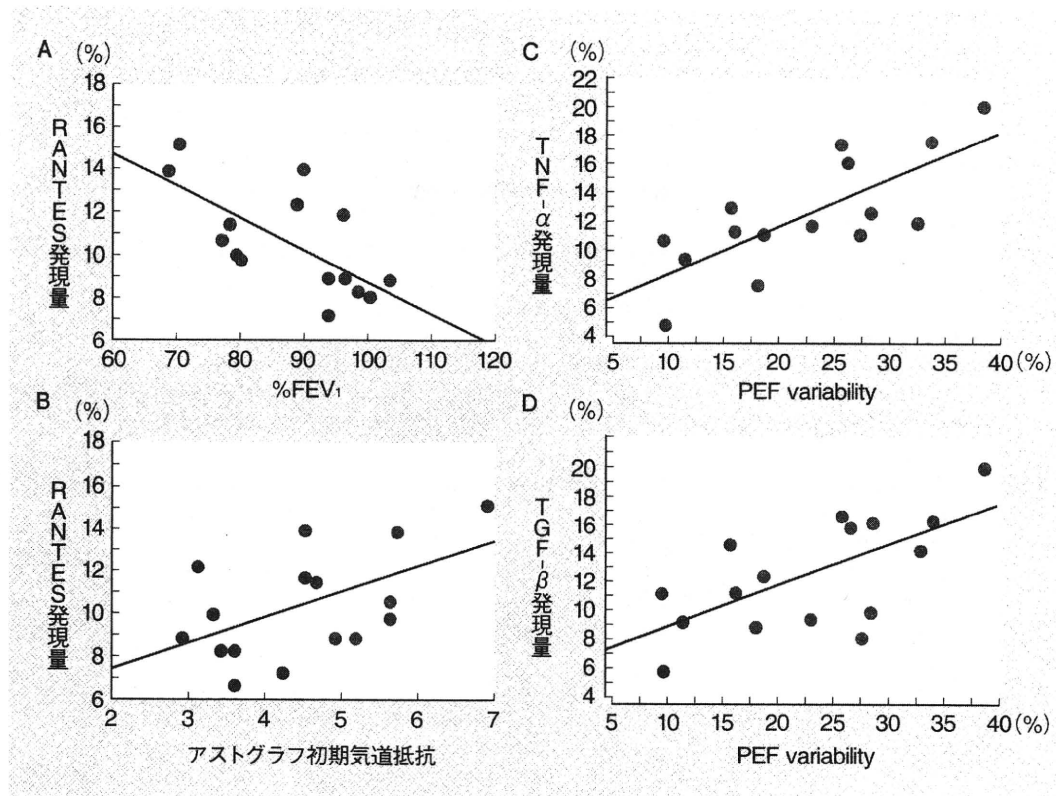
(Kharitonov SA, et al. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2001; 1: 217-24¹⁴⁾より引用)

質問紙法による評価法

上記にあげた評価法は、いずれもなんらかの検査器具を必要とするのに対して、より簡便に患者の実生活における ADL (activities of daily living) を複合的に評価する方法として、下記に示すような質問紙法による方法が開発・検討されている (Level 3)。

- Asthma Control Test
- Asthma Control Questionnaire
- Asthma Therapy Assessment
- Asthma Control Scoring System

これらの評価法により、患者の日常生活の評価・把握が可能となるのみならず、その簡便性から治療到達目標が明らかになること、患者自身による治療への自己評価・治療への動機づけに寄与すること、非専門医での治療経過が可能になること、などが期待されている。しかし、喘息患者は自ら



⑦呼気凝縮液中サイトカインと患者背景との相関

A, B: 呼気凝縮液中のRANTES発現量は1秒量の%予測値や初期気道抵抗と相関を示す。

C, D: TNF- α やTGF- β は気道過敏性やピークフローの変動性と有意な相関を示す。

RANTES: regulated upon activation, normal T-cell, and secreted

FEV₁: forced expiratory volume in 1st second

TGF- β : transforming growth factor- β

(Matsunaga K, et al. J Allergy Clin Immunol 2006; 118: 84-90¹⁵⁾より引用)

の症状を過小評価しがちであるため (Level 3)、
使用にあたっては十分な病状安定後の継続的なモニタリングにとどめることが現実的と思われる¹⁶⁾。

喘息は、その病態から気道炎症・気道過敏性・

構造変化 (remodeling) の各項目を経時的に評価する必要がある。従来から行われてきたPEF・喀痰好酸球による評価に加えて、呼気NOや呼気凝縮液といった侵襲性の低い検査法を組み合わせることで、よりキメの細かい患者管理も可能となる。

◎文献

1. National Institute of Health. Education and Prevention Program. Expert Panel Report II: Guidelines for the diagnosis and management of asthma. Pub No. 97-4051, 1997.
2. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2006.
3. Jones KP, Mullee MA, et al. Peak flow based asthma self-management: a randomised controlled study in general practice. Thorax 1995; 50: 851-7.
4. Buist AS, Vollmer WM, et al. A randomized clinical trial of peak flow versus symptom monitoring in older adults with asthma. Am J Respir Crit Care Med 2006; 174: 1077-87.
5. Louis R, Lau LC, et al. The relationship between airways inflammation and asthma severity. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 9-16.
6. Ichinose M, Takahashi T, et al. Baseline airway hyperresponsiveness and its reversible component: role of airway inflammation and airway calibre. Eur Respir J 2000; 15: 248-53.

7. Bacci E, Cianchetti S, et al. Low sputum eosinophils predict the lack of response to beclomethasone in symptomatic asthmatic patients. *Chest* 2006; 129: 565-72.
8. Green RH, Brightling CE, et al. Comparison of asthma treatment given in addition to inhaled corticosteroids on airway inflammation and responsiveness. *Eur Respir J* 2006; 27: 1144-51.
9. Green RH, Brightling CE, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 1715-21.
10. Persson MG, Zetterstrom O, et al. Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet* 1994; 343: 146-7.
11. Ichinose M, Sugiura H, et al. Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 701-6.
12. Smith AD, Cowan JO, et al. Exhaled nitric oxide: a predictor of steroid response. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 453-9.
13. Smith AD, Cowan JO, et al. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N Engl J Med* 2005; 352: 2163-73.
14. Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1: 217-24.
15. Matsunaga K, Yanagisawa S, et al. Airway cytokine expression measured by means of protein array in exhaled breath condensate: correlation with physiologic properties in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 84-90.
16. Kikuchi Y, Okabe S, et al. Chemosensitivity and perception of dyspnea in patients with a history of near-fatal asthma. *N Engl J Med* 1994; 330: 1329-34.

4. 気管支喘息の病態と治療

—ノ瀬正和

Key words : 気道炎症, 気道過敏性, リモデリング, 吸入ステロイド, add-on療法

はじめに

気管支喘息は罹患率が高く日常臨床でよく遭遇する。慢性的な気道の炎症が病態上重要であり、機能上の異常としては閉塞性障害を示す。この炎症には好酸球、肥満細胞、マクロファージ、リンパ球に加え気道上皮、微小血管、分泌腺等多彩な細胞群が関与している。こういった多くの細胞に作用点を持つグルココルチコイドの吸入療法が治療の第一選択とされ、ガイドラインの普及ともあいまって、喘息の治療効果はこの10年で大きく進展した。本稿では、こういった喘息の病態理解と治療について解説する。

1. 気管支喘息の病態

1) 気管支喘息の定義

気管支喘息は、繰り返し起こる喘鳴、呼吸困難等種々に変化する気道狭窄による気流制限を示す疾患である。以前は、抗原により刺激された肥満細胞から放出される化学伝達物質による気道平滑筋の過剰な収縮が重要視されてきた。その後気管支喘息の病態には慢性の気道炎症や構築変化(リモデリング)が関与することが、主として形態学的(或いは病理学的)検討によっ

て示されてきた¹⁾。その結果を踏まえ日本アレルギー学会では現在表1のように気管支喘息を定義している²⁾。

現在の喘息の定義は「これまでの気流制限、可逆性、気道過敏性といった生理学的所見に偏った定義」から脱却し、「喘息の発生機序(即ち気道炎症)に基づいた機能変化(気流制限や気道過敏性亢進)及び臨床症状を記載した定義」になっている。こういった定義の改良(進歩)は、病態理解を深め、正しい治療法の一般医療現場への広がりにもつながると思われる。

以下に現在の喘息の定義で強調される基本病態、すなわち炎症、気道過敏性、リモデリングのアウトラインについて簡略に触れる。

2) 気道の慢性炎症

喘息の気道炎症は図1に示したように多彩な細胞群が関与する³⁾。好酸球、リンパ球、肥満細胞といった「浸潤細胞」に加え、気道上皮、神経、気道平滑筋、分泌線などの「構築細胞」が当てはまる。例えば好酸球は気道平滑筋収縮作用や血管透過性亢進作用を示すロイコトリエンのような化学伝達物質に加え、顆粒蛋白を放出し気道上皮を剥離させる。上皮の剥離は知覚神経末端の露出をきたし、神経系(迷走神経反射や知覚神経の軸策反射)を介し炎症はさらに増強する。

3) 気道過敏性の亢進

気道過敏性とは、種々の刺激に対して気道が

いちのせ まさかず：和歌山県立医科大学内科学第三講座

表 1. 日本アレルギー学会による気管支喘息（成人喘息）の定義（文献1より引用）

成人喘息は気道の慢性炎症と種々の程度の気道狭窄と気道過敏性、そして、臨床的には繰り返して起こる咳、喘鳴、呼吸困難で特徴づけられる。気道狭窄は、自然に、あるいは治療により可逆性を示す。気道炎症には、好酸球、T細胞、肥満細胞などの炎症細胞、気道上皮細胞、線維芽細胞をはじめとする気道構成細胞、および種々の液性因子が関与する。持続する気道炎症は、気道傷害とそれに引き続く気道構造の変化（リモデリング）を惹起し、非可逆性の気流制限をもたらす、気道過敏性を亢進させる。

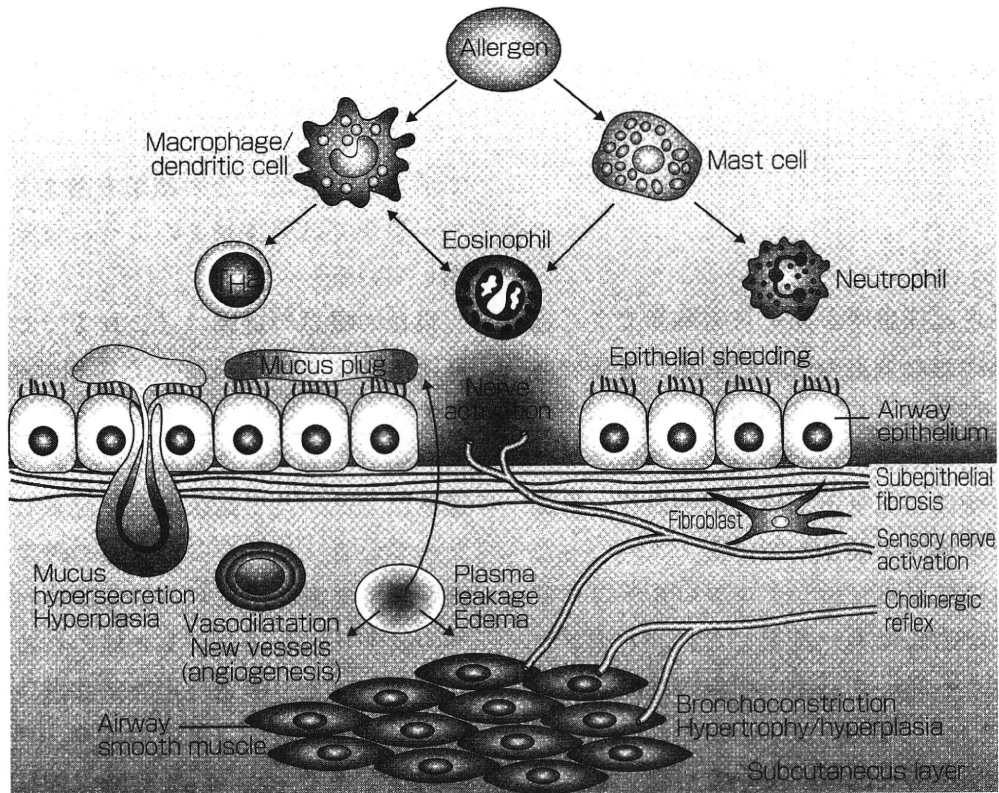


図 1. 現在考えられている気管支喘息の炎症

多くの炎症細胞（肥満細胞，好酸球，Th2 リンパ球等）や構築細胞（気道上皮，気道平滑筋，神経，微小血管等）が喘息の病態に関与する（文献4より引用）

反応する度合いのことであり、喘息患者では亢進している¹⁻³⁾。刺激には、気道平滑筋・血管を直接的に刺激して気道狭窄をおこすもの（アセチルコリン・ヒスタミン）と、肥満細胞のメディエーターや知覚神経刺激による神経伝達物質放出を介して二次的に狭窄をおこすもの（運動による気道粘膜面の高浸透圧刺激や知覚神経刺激）とがある。直接刺激に対する気道過敏性の亢進は気管支喘息だけでなく慢性閉塞性肺疾患（COPD）でも認められるが、間接刺激に対する

気道過敏性は喘息特異的であり、疾患の病態を考える上で重要な意味を持つ³⁾。気道過敏性亢進には気道炎症をはじめいくつかの因子が関与しているがそれらを表2に示す。

喘息患者の気道過敏性は、ウイルス感染、抗原曝露といった気道の炎症増強時にさらに亢進する。また、種々の治療薬の中で気道過敏性を最も強く抑制するものはステロイドである。これらのことは、喘息患者における気道過敏性の規定因子の中で、気道炎症が最も重要であるこ

表 2. 気道過敏性亢進に関する因子

- 1) 気道炎症
 - 炎症性サイトカインやメディエーターの放出、上皮剥離による知覚神経の露出は以下の各項に述べた機序で気道過敏性を亢進させる。
- 2) 初期気道内径
 - 気道抵抗は気道内径の4乗に逆比例する。予め気道平滑筋の収縮、気道壁の肥厚等で気道内径が狭くなっていれば、その後の刺激による気道の狭小化がより顕著に認められる。
- 3) 気道壁の浮腫及び内腔への液体成分漏出
 - 気道壁の浮腫は、炎症性メディエーターによる気管支動脈灌流領域の血管拡張（鬱血）、および血管透過性亢進によっておこる血漿成分の気道組織への漏出によって起こる。
 - 血管透過性亢進、気道分泌、上皮のイオントランスポート亢進によっておこる気道内腔への液体成分貯留は、液性成分の気道内腔占拠および、表面張力により気道過敏性亢進をきたす。
- 4) 神経系の異常
 - 気道は、①交感神経（アドレナリン作動性）、②コリン作動性神経、③興奮性非コリン非アドレナリン作動性（excitatory nonadrenergic noncholinergic, e-NANC）神経、④抑制性NANC（inhibitory NANC, i-NANC）神経の4つの神経系によって支配されている。
 - これら神経のうち、②・③の神経系の機能亢進或いは①・④の神経系の機能低下は、気道過敏性亢進を引き起こす。
 - iNANC神経の伝達物質はVIPとNOであるが、VIPの場合は肥満細胞から放出されるトリプテースにより分解され、NOは炎症細胞由来の活性酸素類により失活化する。
- 5) 気道上皮傷害
 - 気道上皮は吸入物質に対してバリアーとなるだけでなく、気道平滑筋拡張物質を放出する。また、上皮にはヒスタミン分解酵素（HMT）やサブスタンスPなどのタキキニン分解酵素（NEP）が密に存在している。さらに、上皮には知覚神経が豊富に分布している。つまり、喘息で認められる上皮の傷害・剥離は、①吸入した気道収縮物質の標的器官（気道平滑筋、血管）への到達の容易化、②内因性気道拡張物質の減弱化、③気道収縮物質（ヒスタミン、サブスタンスP）の分解機能不全等により、気道過敏性亢進をきたす。
- 6) 遺伝的因子

とを示している。

4) 気道のリモデリング

喘息における慢性の気道炎症は、基底膜、平滑筋細胞、線維芽細胞等に作用し、上皮下に線維化、気道血管床増生、平滑筋増生などを起こし気道の構造変化を引き起こす。好酸球などから産生されるTGF- β （transforming growth factor- β ）やPDGF（platelet-derived growth factor）といった増殖因子の作用により線維芽細胞や筋線維芽細胞が増殖、活性化し、そこから産生されたコラーゲン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックスが基底膜網状層に沈着が生じる。このような気道の構造変化が高度になれば、固定した気流閉塞の進行や気道過敏性亢進へと働くため、気道過敏性亢進や気管支喘息難治化の原因となる。

5) 喘息患者における基本病態と呼吸生理学的異常との関連性

以上述べたように、気管支喘息とは「慢性の

気道炎症」「気道過敏性亢進」「構築変化（リモデリング）」といった基本病態により、「気流制限」「過分泌」「知覚神経過敏状態」といった生理的異常が変動をもって生じる疾患である。この生理的異常とは症状で言えば「喘鳴」「呼吸困難」「喀痰」「咳」「胸部絞扼感」にあたる。

2. 気管支喘息治療

1) 吸入ステロイドが第一選択薬

喘息治療の目標は、気道炎症や気流制限を起こす因子（アレルゲンなど）の回避・除去に加え、適切な薬物療法を行い、可能な限り呼吸機能を正常化し、健常人と変わらない日常生活を送れるようにすることである。前述したように気管支喘息の病態が気道の慢性炎症であるとの知見に基づき、これら多彩な細胞群に広く作用点を持つ吸入ステロイドが第一選択薬とされる（図2）⁴⁾。慢性炎症状態にある喘息気道では、炎

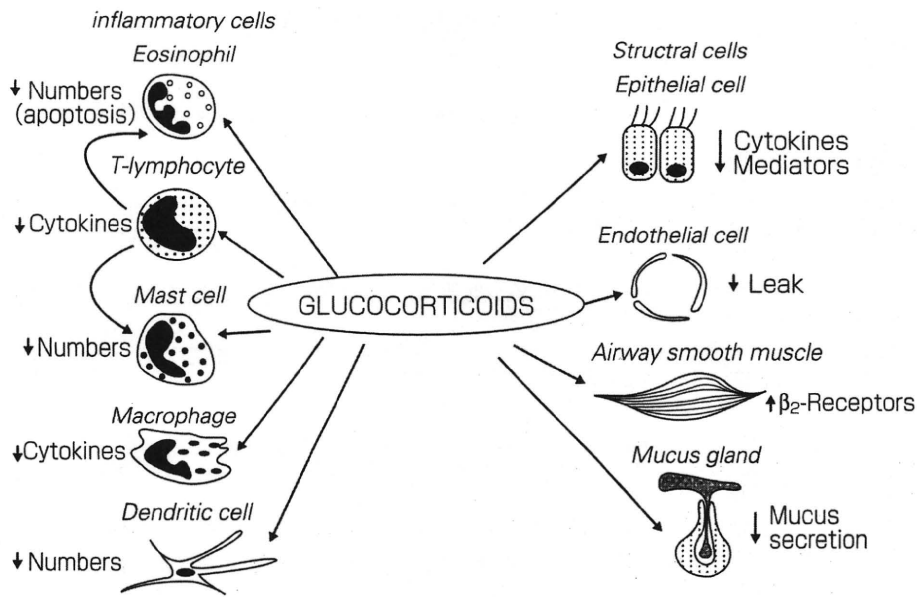


図2. 吸入ステロイドとその作用 (文献4より引用)。

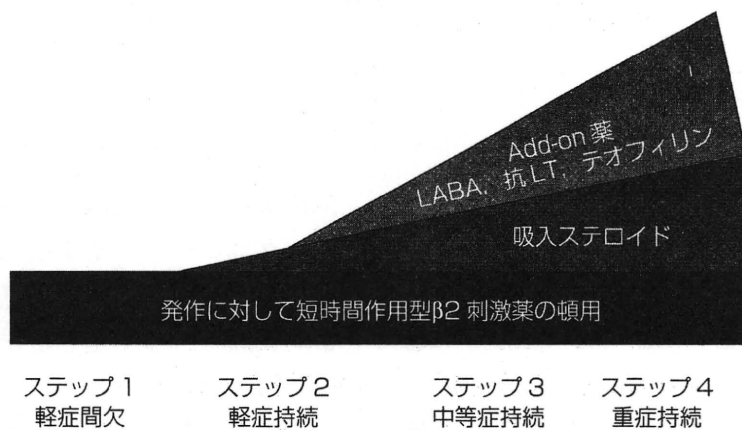


図3. 気管支喘息の治療法。

症性サイトカインにより転写因子の活性化を介し炎症に関与する酵素, 受容体, サイトカイン, 接着因子の発現が高まっているが, ステロイドはこういった炎症の増悪サイクルの抑制に有効である⁴⁾。実際, 呼気一酸化窒素 (NO) 濃度, 喀痰中の好酸球やメディエーター (ブラジキニン) 濃度で気道の炎症をモニタリングすると, 吸入ステロイドは各炎症パラメーターを大きく改善し, その抑制程度は気道の閉塞性障害や過敏性の改善程度とよく相関する⁵⁾。

ステロイドというと副作用が常に問題となる

が, 常用量の吸入ステロイドであれば, 発育や骨密度にも悪影響が無いことが報告されている。Haahela等の吸入ステロイドの導入時期を2年の間隔の早い遅いで検討した報告によれば, 遅れて吸入ステロイドを導入した場合は呼吸機能の改善が早期導入に比べ劣るとされており⁶⁾, 早期導入が推奨される。吸入ステロイドは喘息死を減らすことも報告されている。

2) add-on療法

一方, 吸入ステロイドで気道炎症が抑制されていても, ウイルス感染等により喘息発作は起