

一性炎症における好塩基球の機能に関して研究を行ってきた。その結果、ヒト好塩基球が IL-16 や M-CSF 産生細胞の一つであることが明らかとなり、好塩基球の活性化が、IL-16 や M-CSF の発現を介して CD4 陽性 T 細胞や単球・マクロファージの関与する免疫・アレルギー反応を調節し、Th2 免疫応答の増強やリモデリング・血管新生に関与している可能性が示唆された。今回は、好塩基球における抗原提示能について検討を行った。

B. 方法

(1) 気管支喘息患者 339 名ならびに健常者 15 名を対象に、NIOX MINO® (Aerocrine AB) を用いて呼気 NO 濃度を測定した (表 1)。喘息患者については JGL2006 の重症度分類による症状ステップ別、治療ステップ別に検討した。さらに、症状がコントロールされている症状 Step1 の患者について、治療ステップ別の呼気 NO 濃度を比較し、試案の難治基準 (PSL5mg 以上/日) との関連を検討した。

(2) 健常者の末梢血から、比重遠心法により単核球を分離し、IL-3 (10 ng/ml) の存在下、非存在下で 24 時間培養した。この単核球を用いて、好塩基球 (活性化) マーカーとされる CD203c (PE 標識) と HLA-DR、CD80、CD86 (FITC 標識) との 2-color flow cytometry を行い、好塩基球における HLA-DR、CD80、CD86 の発現を検討した。

C. 結果

(1) 健常者 (15 名) の呼気 NO は平均 16 ppb、喘息患者 (339 名) の呼気 NO は平均 38 ppb であり、喘息患者の呼気 NO は、治療下においても健常人に比べて有意に高値であった (図 1)。喘息患者において JGL2006 の重症度分類に基づく症状ステップ別に呼気 NO を検討したところ、症状 Step1、Step2、Step3、Step4 における平均呼気 NO は各々 37.9 ppb、37.8 ppb、26.9 ppb、48.6 ppb であった (図 2)。症状 Step4 の呼気 NO は Step3 に比して有意に高値であり、また Step1、Step2 と比較して有意差はないものの高値の傾向であった。次に、治療ステップ別に呼気 NO

を検討したところ、治療 Step1、Step2、Step3、Step4 における平均呼気 NO は各々 36.0 ppb、35.0 ppb、37.8 ppb、44.3 ppb であった (図 3)。治療 Step4 群において呼気 NO が高値の傾向であったが、各群に有意差を認めなかった。さらに、症状 Step1 症例において、試案の重症度別に呼気 NO 濃度を検討した (表 2)。すなわち、治療 Step4 をさらに経口 PSL 5 mg/日未満の治療 Step4a 群、経口 PSL5mg/日以上 10 mg/日未満の治療 Step4b 群、経口 PSL 10 mg/日以上の治療 Step4c 群の 3 群に分けて検討したところ、治療 Step4a 群で呼気 NO が高値の傾向であったが、統計学的に有意差はなかった (表 3、図 4)。また、高値を示した患者比率も各治療 Step 群で差は認められなかった。

(2) 健常者の末梢血単核球を IL-3 (10 ng/ml) の存在下で 24 時間培養すると、CD203c 陽性細胞 (好塩基球分画) における CD203c 発現強度は増強した (図 5、図 6)。同時に、CD203c 陽性細胞における HLA-DR の発現が誘導された (図 5、白矢印)。一方、CD80 や CD86 に関しては明らかな発現の誘導はみられなかった (図 6)。

D. 考察

(1) 呼気 NO 濃度の測定は簡便かつ非侵襲的で繰り返し検査を行うことができる。さらに、ベッドサイドで直ちに結果がわかることが最大のメリットである。呼気 NO は未治療の気管支喘息においては COPD などとの鑑別診断に有用であること、治療によって呼吸機能との間に負の相関を示しながら呼気 NO が低下することが報告されている。我々は、治療下での喘息症例を対象に呼気 NO 濃度を測定し、症状ステップ、治療ステップ、試案の難治基準 (PSL5mg 以上/日) との関連を検討した。その結果、喘息患者の呼気 NO は、治療下においても健常人に比べて有意に高値を示した。症状ステップ別の検討では、症状 Step4 群において呼気 NO が有意に高値であり、治療ステップ別の検討では、治療 Step4 群において呼気 NO が高値の傾向であった。症状 Step1 症例において試案の重症度別に検討したところ、治療 Step4a 群で呼気 NO が高値の傾向であった。

従って、呼気 NO 値は治療状況が加味されたコントロール状態を反映しており、十分な抗炎症療法が重症化予防に重要と考えられた。我々は既に呼気凝縮液中の nitrite や nitrate が呼吸機能 (FEV1、PEFR) と有意な負の相関を認めることを報告したが、呼気凝縮液中の nitrite や nitrate は呼気 NO に関連するものと考えられることから、日常臨床において呼気 NO のモニタリングは喘息コントロール状態の把握に有用であると言えよう。試案の難治基準(経口 PSL 5 mg 以上/日)と呼気 NO との関連については、PSL 5 mg/日以上 10 mg/日未満の症例(治療 Step 4b)が 3 例、PSL 10 mg/日以上(治療 Step 4c)の症例が 4 例と少なく、これらの平均呼気 NO 値は治療 Step1-4a と比べると有意差はないものの低値であった。経口 PSL 5 mg 以上/日の難治症例については、呼気 NO は治療(全身性ステロイド)の影響を強く受けていることが想定され、ステロイド薬(抗炎症薬)の影響を受けずに難治病態を反映するような指標があるか否かについては今後の検討課題である。そのためには、治療 Step 4b ならびに 4c の症例を集積する必要がある。

(2) 好塩基球は遅発相の気道局所に集積し、エフェクター細胞としてアレルギー性炎症の慢性化・重症化に関与していると考えられていた。しかしながら、近年の研究から免疫・アレルギー反応を調節する細胞として捉えられるようになってきた。我々もこれまで好塩基球が Fc ϵ RI を介する反応で IL-16 や M-CSF を産生することを明らかにし、これらのサイトカイン発現を介して CD4 陽性 T 細胞や単球・マクロファージの関与する免疫・アレルギー反応を調節し、Th2 免疫応答の増強やリモデリング・血管新生に関与している可能性を報告した。今回は、好塩基球の抗原提示能について検討した。好塩基球は本来 HLA-DR 陰性で抗原提示能を持たない細胞とされていたが、興味深いことに IL-3 で活性化されると HLA-DR の発現が誘導されることが判明した。今後、HLA-DR の発現を誘導する他の因子、MLR による抗原提示能の確認、健常人と喘息患者における差異などの検討が必要である。

いずれにせよ、好塩基球はアレルギー性炎症のイニシエーターとしても機能し、気管支喘息の慢性化・重症化に関与している可能性がある。

E. 結論

呼気 NO は喘息患者の治療下でのコントロール状態を反映し、重症化抑制指標の一つとなり得る。

活性化好塩基球は抗原提示細胞として気管支喘息の病態に関与している可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 高橋 清. 成人気管支喘息とその自然経過. アレルギー・免疫 16;478-488, 2009.
- 2) 高橋 清. 高齢者喘息調査における課題. アレルギーの臨床 29;599-604, 2009.
- 3) 高橋 清, 山中隆夫. 重症喘息とは 定義と実態. アレルギー・免疫 16;1503-1513, 2009.
- 4) 高橋 清. 成人気管支喘息の自然経過. 臨床免疫・アレルギー科 52;292-299, 2009.
- 5) 宗田 良, 高橋 清. 高齢者喘息の特徴. アレルギーの臨床 29;502-506, 2009.
- 6) 岡田千春, 高橋 清. 重症喘息, 成人および高齢者重症喘息の管理の現状. Progress in Medicine 29;19-23, 2009.
- 7) 谷本 安, 高橋 清. 特集 気管支喘息: 診断と治療の進歩. V. 喘息の亜型・特殊型 4. 重症難治性喘息. 日内会誌 98: 3103-13, 2009.
- 8) 谷本 安, 高橋 清. 14 急性増悪(発作)への対応 C. 急性増悪時の家庭での対応 福田健編: よくわかる気管支喘息-その診療を極める- 永井書店, 大阪, 233-35, 2009.
- 9) 平野 淳, 高橋 清. 喘息コントロール問題点と対策 長期管理薬の使い方 成人. 医薬ジャーナル 45;1369-1371, 2009.
- 10) 岡田千春. 高齢者喘息患者の診断とその留意点. Progress in Medicine 29;2985-2988,

2009.

11) 岡田千春. 喘息の分子マーカーの意義 基礎と臨床. 呼吸器科 15 ; 533-537, 2009.

2. 学会発表

1) 福富友馬, 小林章雄, 中村裕之, 西村正治, 河岸由起男, 谷口正実, 高橋 清, 烏帽子田彰, 小田嶋博, 中川武正, 秋山一男, 赤澤晃. 気管支喘息 診断と管理 疫学と実態調査 日本語版ECRHS調査票を用いた全国成人喘息有病率調査. 第59回日本アレルギー学会総会, 秋田, 2009.

2) Okada C, Hirano A, Kimura G, Tanimoto Y, Kanehiro A, Soda R, Takahashi K. The interaction of PBMC from asthmatics and cultured bronchial epithelial cells showed enhanced MMP-9 and TGF-β1 production in difficult asthma. ATS, San Diego, 2009.

3) Okada C, Hirano A, Tanimoto Y, Kimura G, Miyahara N, Kanehiro A, Soda R, Takahashi K. The PBMC of severe asthmatics showed enhanced candida antigen induced IL-5, IL-13 and TARC production and this enhancement was inhibited by dendritic cell depletion. ERS, Wien, 2009.

4) 岡田千春, 谷本 安, 保澤総一郎, 尾長谷靖, 金廣有彦, 佐藤利雄, 竹山博泰, 小崎晋司, 沖本二郎, 塩田雄太郎, 多田慎也, 高橋 清. 吸入ステロイド薬HFA-CICの服薬遵守状況と諸因子の検討. 第21回日本アレルギー学会春期臨床大会, 岐阜, 2009.

5) 岡田千春, 平野 淳, 高橋 清. 高齢者喘息とデバイスを考える 高齢者喘息の現状と課題. 第59回日本アレルギー学会総会, 秋田, 2009.

6) 岡田千春, 平野 淳, 木村五郎, 谷本 安, 高橋 清. One airway, one diseaseの病態と治療 成人喘息と鼻炎. 第59回日本アレルギー学会総会, 秋田, 2009.

7) 谷本 安, 佐久川亮, 井上由佳理, 斎藤博久, 高橋 清, 谷本光音. シンポジウム12 アレルギーと炎症細胞 (メディエーターも含む)

S12-2. 好塩基球 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会, 岐阜, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む) 特になし

1. 特許取得 特になし

2. 実用新案登録 特になし

3. その他 特になし

表 1 呼気NO濃度測定の対象

気管支喘息患者 : 339名 (男136名、女203名)			
年齢 : 7歳~88歳 (平均56歳)			
症状Step	Step1:217名	治療Step	Step1:114名
	Step2:77名		Step2:58名
	Step3:17名		Step3:59名
	Step4:5名		Step4:78名
健常者 : 15名 (男2名、女13名)			
年齢 : 30歳~54歳 (平均40歳)			

図1 健常者と喘息患者の呼気NO

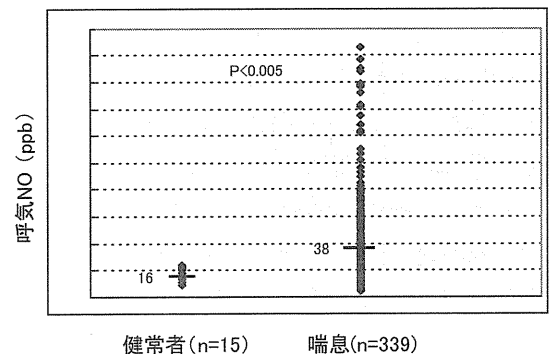


図2 症状ステップと呼気NO
(治療Stepは1～4まで含む)

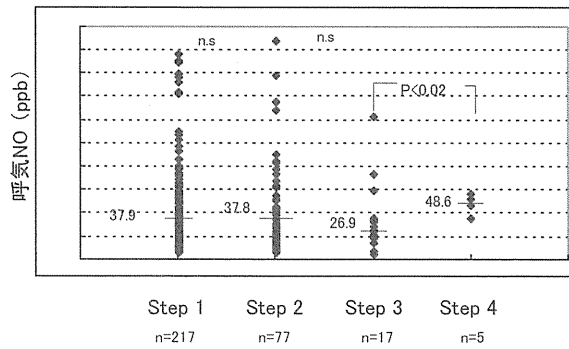


表3 症状Step1群における治療ステップ別の呼気NO
- 平均値と高値を示した比率 -

治療ステップ	呼気NO (ppb)	正常値 : 高値 (Cut off値 : 26 ppb)
Step 1	39.74 ± 33.82	29 : 39
Step 2	37.12 ± 34.71	25 : 25
Step 3	36.07 ± 23.70	21 : 24
Step 4a	43.05 ± 38.88	21 : 21
Step 4b	23.67 ± 11.93	1 : 2
Step 4c	26.75 ± 13.45	2 : 2

Step 4a: 0mg ≦ oral PSL < 5mg
Step 4b: 5mg ≦ oral PSL < 10mg
Step 4c: 10mg ≦ oral PSL

図3 治療ステップと呼気NO
(症状Stepは1～4まで含む)

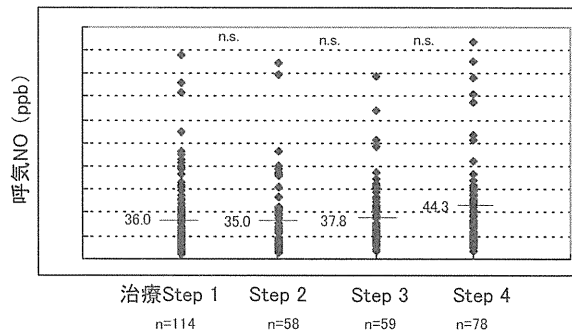


図4 症状Step1群における治療ステップ別の呼気NO
- 各患者の呼気NO濃度プロット -

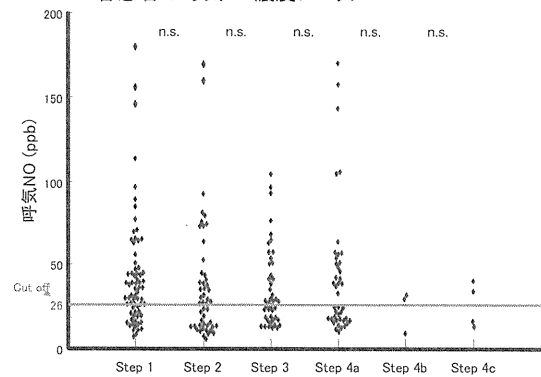


表2 症状Step1症例における治療ステップ

対象	症状Step1の喘息患者212名 (15~88歳、男:女=88:124)
治療Step1	68名
治療Step2	50
治療Step3	45
治療Step4a	42
治療Step4b	3
治療Step4c	4

Step 4a: 0mg ≦ oral PSL < 5mg
Step 4b: 5mg ≦ oral PSL < 10mg
Step 4c: 10mg ≦ oral PSL

試薬の難治基準: 5mg ≦ oral PSL

図5 末梢血好塩基球におけるHLA-DR発現

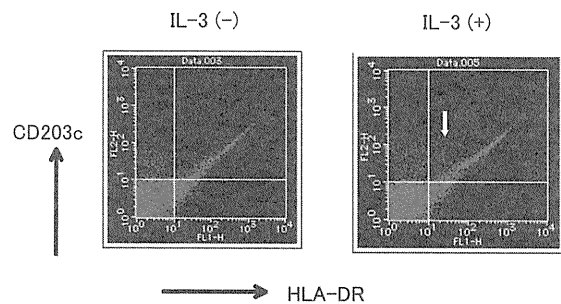
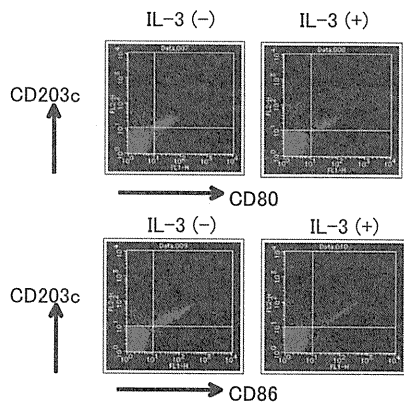


図6 末梢血好塩基球におけるCD80, CD86発現



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）
総合分担研究報告書

重症難治性喘息の臨床的特徴と炎症細胞からみた基礎的要因に関する研究

研究分担者 谷本 安（岡山大学病院呼吸器・アレルギー内科 講師）

研究協力者

高橋 清、宗田 良、木村五郎、平野 淳（国立病院機構南岡山医療センターアレルギー科）

岡田千春（国立病院機構本部人材育成キャリア支援室）

片岡幹男（岡山大学大学院保健学研究科）

能島大輔、早稻田公一、陳 妍妍（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科血液・腫瘍・呼吸器内科学）

宮原信明（岡山大学病院呼吸器・アレルギー内科）

研究要旨

難治性喘息の予防と治療の対策を目的として、臨床と基礎の両面から検討した。(1) 臨床面では、成人喘息患者における呼気 NO、呼気凝縮液 (EBC) 中の ECP ならびに IL-8、その他の炎症マーカーと重症度との関連について検討した。喘息患者の呼気 NO は、治療下においても健常人に比べて有意に高値であった。症状ステップ別の検討では、Step4 群で呼気 NO が高値であった。治療ステップ別の検討では、Step4 群で呼気 NO が高値の傾向であったが、各群に有意差を認めなかった。症状 Step1 症例において試案の重症度別に検討したところ、治療 Step4a 群で呼気 NO が高値の傾向であった。従って、呼気 NO 値は治療下での喘息コントロール状態を反映し、十分な抗炎症療法が重症化予防に重要と考えられた。EBC 中の ECP や IL-8 は、症状・治療ステップ・治療を考慮した重症度や呼吸機能との間に有意な相関を認めず、各々血清中の ECP や IL-8 との間にも相関がみられなかった。一方、EBC 中の ECP は IL-8 との間に強い負の相関を示した。最重症持続型喘息には、アトピー型、非アトピー型、EBC 中 ECP 高値例や EBC 中 IL-8 高値例といった様々なフェノタイプの存在が示唆された。血清中の IL-4 や TSLP は治療ステップと弱い負の相関を認めた。重症度と相関する因子は主に呼吸機能であった。(2) 炎症細胞からみた基礎的要因については、近年アレルギー性炎症のコンダクターとしての役割が示唆されている好塩基球の重症難治病態への関与を解明するために、好塩基球の抗原提示能について検討した。健常者の末梢血単核球を IL-3 や抗 IgE 抗体の存在下・非存在下で培養した後、フローサイトメトリーを用いて CD203c 陽性分画 (好塩基球分画) における HLA-DR、CD80、CD86 の発現を検討した。また、末梢血幹細胞培養好塩基球の HLA-DR 発現も調べた。さらに CD4+ T 細胞と同種 (末梢血幹細胞培養) 好塩基球との共培養による CD4+ T 細胞の増殖反応について検討した。末梢血好塩基球には IL-3 の 24 時間刺激によって HLA-DR ならびに CD80 の発現が認められ、異なるドナーでの再現性が確認された。24 時間の FcεRI 架橋刺激では HLA-DR の発現はみられなかったが、架橋後短時間 (30 分) で発現が誘導されている可能性が示唆された。末梢血幹細胞培養好塩基球にも HLA-DR の発現が認められ、CD4+ T 細胞との共培養により、CD4+ T 細胞の増殖反応を惹起した。以上から、(1) 成人喘息患者における呼気 NO や EBC 中の ECP と IL-8 は治療により修飾を受けるが、治療の反応性や病態の違いにより、ECP 高値・IL-8 低値群と ECP 低値・IL-8 高値群といった異なるフェノタイプの存在が示された。この知見は、多様な重症難治性喘息において至適な抗炎症療法を個別に考える上で有用と考えられる。また、治療薬等の影響で抑制される炎症物質の中では、呼気 NO が重症化抑制指標の一つとなり得ると考えられた。(2) ヒト好塩基球は抗原提示細胞として気管支喘息の病態に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

重症難治性喘息の予防と治療の対策を目的として、その臨床的特徴と炎症細胞からみた基礎的要因について検討した。(1) 臨床面では、成人喘息患者における呼気 NO、呼気凝縮液 (EBC) 中の ECP ならびに IL-8、その他の炎症マーカーと重症度との関連について検討した。(2) 炎症細胞からみた基礎的要因については、近年アレルギー性炎症のコンダクターとしての役割が示唆されている好塩基球の重症難治病態への関与を解明するために、好塩基球の抗原提示能について検討した。

B. 方法

(1) 気管支喘息患者 339 名ならびに健常者 15 名を対象に、NIOX MINO® (Aerocrine AB) を用いて呼気 NO 濃度を測定した (表 1)。喘息患者については JGL2006 の重症度分類による症状ステップ別、治療ステップ別に検討した。さらに、症状がコントロールされている症状 Step1 の患者について、治療ステップ別の呼気 NO 濃度を比較し、試案の難治基準 (PSL5mg 以上/日) との関連を検討した。

(2) 外来通院治療中、書面で同意の得られた成人喘息患者 (81 名) を対象に、非発作時に R-tube (Respiratory Research, Inc) を用いた EBC の採取 (10 分間) と採血、呼吸機能検査を施行した。血清ならびに EBC 中の ECP、IL-8、IL-4、TSLP、TNF- α 、histamine 等を測定し、JGL2009 に基づいた症状、治療ステップ、治療を考慮した重症度、呼吸機能 (%FEV1.0) との関連を検討した。

(3) 健常者の末梢血から比重遠心法により単核球を分離し、IL-3 や抗 IgE 抗体の存在下・非存在下で培養した。この単核球を用いて、好塩基球 (活性化) マーカーとされる CD203c (PE 標識) と HLA-DR、CD80、CD86 (FITC 標識) との 2-color flow cytometry (MACS Quant, Miltenyi Biotec) を行い、好塩基球 (CD203c 陽性分画) における HLA-DR、CD80、CD86 の発現を検討した。異なるドナーを用いた再現性について検討し、また、

末梢血幹細胞培養好塩基球の HLA-DR 発現も調べた。末梢血幹細胞培養好塩基球は、既報のごとく悪性リンパ腫や肺癌の治療において末梢血幹細胞移植の目的で採取された幹細胞を豊富に含む末梢血単核球の一部を IL-3 (5 ng/ml) の存在下で 3 週間培養し、immunomagnetic beads (Basophil Isolation Kit II, Miltenyi Biotec) を用いた negative selection により高純度の好塩基球を得た。さらに CD4+ T 細胞と同種 (末梢血幹細胞培養) 好塩基球との共培養による CD4+ T 細胞の増殖反応について検討した。健常者の末梢血単核球から immunomagnetic beads を用いた positive selection により CD4+ T 細胞を分離し、carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (10 μ M) を標識した後、IL-3 (10 ng/ml) の存在下で 5 日間、同種の末梢血幹細胞培養好塩基球と同数の細胞数で共培養した。その後、flow cytometry を用いて CD4+ T 細胞の増殖反応を解析した。

C. 結果

(1) 健常者 (15 名) の呼気 NO は平均 16 ppb、喘息患者 (339 名) の呼気 NO は平均 38 ppb であり、喘息患者の呼気 NO は、治療下においても健常人に比べて有意に高値であった (図 1)。喘息患者において JGL2006 の重症度分類に基づく症状ステップ別に呼気 NO を検討したところ、症状 Step1、Step2、Step3、Step4 における平均呼気 NO は各々 37.9 ppb、37.8 ppb、26.9 ppb、48.6 ppb であった (図 2)。症状 Step4 の呼気 NO は Step3 に比して有意に高値であり、また Step1、Step2 と比較して有意差はないものの高値の傾向であった。次に、治療ステップ別に呼気 NO を検討したところ、治療 Step1、Step2、Step3、Step4 における平均呼気 NO は各々 36.0 ppb、35.0 ppb、37.8 ppb、44.3 ppb であった (図 3)。治療 Step4 群において呼気 NO が高値の傾向であったが、各群に有意差を認めなかった。さらに、症状 Step1 症例において、試案の重症度別に呼気 NO 濃度を検討した (表 2)。すなわち、治療 Step4 をさらに経口 PSL 5 mg/日未満の治療

Step4a 群、経口 PSL5mg/日以上 10 mg/日未満の治療 Step4b 群、経口 PSL 10 mg/日以上の治療 Step4c 群の 3 群に分けて検討したところ、治療 Step4a 群で呼気 NO が高値の傾向であったが、統計学的に有意差はなかった (表 3, 図 4)。また、高値を示した患者比率も各治療 Step 群で差は認められなかった。

(2) 呼気凝縮液 (EBC) 中の炎症マーカーについて検討した成人喘息症例は 81 例 (男性 32 例、女性 49 例) であり、年齢の中央値は 61 歳、最重症持続型は 8 例と全体の約 10% を占めた (表 4)。呼吸機能、特に %FEV1.0 と重症度との関連を検討したところ、当然ながら重症例では %FEV1.0 が低値であった (図 5)。しかしながら、EBC 中の ECP と重症度との間に相関はみられず、最重症持続型では ECP 高値例も低値例も存在した (図 6-a)。なお、最重症持続型 8 例のうち、6 例が非アトピー型であったが、アトピー型、非アトピー型における一定の傾向はみられなかった。EBC 中の ECP と症状 (図 6-b) ならびに治療ステップ (図 6-c) との間にも関連は認められず、症状のない、あるいは軽度の症例や治療ステップ 4 の症例においても ECP 高値例が存在した。EBC 中の ECP と %FEV1.0 との間には有意な相関はなく、最重症持続型の 8 例に関しても同様であった (図 6-d)。さらに、EBC 中の ECP と血清 ECP との間にも相関は認められなかった (図 6-e)。

次に EBC 中の IL-8 についても ECP と同様の検討を行った。EBC 中の IL-8 と重症度との間に関連はみられず、最重症持続型では IL-8 高値例も低値例も存在した (図 7-a)。なお、最重症持続型 8 例のうち、非アトピー型とアトピー型との差異はなかった。EBC 中の IL-8 と症状 (図 7-b)、治療ステップ (図 7-c) との間にも相関はなく、症状のない、あるいは軽度の症例や治療ステップ 4 の症例においても IL-8 高値例が存在した。さらに、EBC 中の IL-8 と %FEV1.0 との間にも相関はみられなかった (図 7-d)。EBC 中の IL-8 と血清 IL-8 との間には正の相関傾向がみられたが、有意ではなかった (図 7-e)。

EBC 中の ECP と EBC 中の IL-8 との関連をみた

ところ、両者には強い負の相関 ($r = -0.741$, $p < 0.001$) が認められた (図 8-a)。この傾向はアトピー型、非アトピー型にかかわらず認められた。そこで、ECP と IL-8 を各々 0.4 ng/ml、10 pg/ml を境界として低値、高値の 2 群に分けると、ECP 高値・IL-8 低値群と ECP 低値・IL-8 高値群に大別可能であった (図 8-b)。なお、ECP、IL-8 とともに高値の群は 5 例であり、最重症持続型はこれらの 3 群いずれにも存在した。

EBC 中の ECP は、血清ヒスタミンや末梢血白血球数と正の相関を、EBC 中の IL-8 とは強い負の相関を、血清中の IL-8 や TNF- α とは弱い負の相関を認めた (表 5)。EBC 中の IL-8 については、血清 TNF- α と正の相関を、血清ヒスタミンや末梢血白血球数とは負の相関を認めた (表 6)。血清中の IL-4 や TSLP は治療ステップと弱い負の相関を、呼吸機能は治療ステップと負の相関を認めた。また、末梢血白血球数は治療ステップと正の相関を認めた (表 7)。重症度と相関する因子は主に呼吸機能であり、末梢血白血球数は重症度と弱い正の相関を認めた (表 8)。

(3) 未刺激下の末梢血好塩基球には HLA-DR の発現はみられず (図 9)、IL-3 (10 ng/ml) の 30 分刺激でも HLA-DR 発現は誘導されなかった (図 10)。一方、IL-3 の 24 時間刺激では HLA-DR の発現が IL-3 濃度依存性に認められ、0.1~10 ng/ml の濃度で有意であった (図 9-a, b)。IL-3 (10 ng/ml) の 72 時間刺激では HLA-DR のさらなる発現増強はみられなかった (図 10-a, b)。CD80 の発現も HLA-DR と同様に IL-3 刺激後 24 時間ならびに 72 時間で誘導された (図 11-a, b)。IL-3 刺激による HLA-DR ならびに CD80 の発現については、異なるドナーでの再現性が確認された。CD86 の発現については IL-3 刺激 72 時間後まで有意な発現は認められなかった (図 12-a, b)。24 時間の Fc ϵ RI 架橋刺激では HLA-DR の発現はみられなかったが、架橋後短時間 (30 分) で発現が誘導されている可能性が示唆された (図 13-a, b)。末梢血幹細胞培養好塩基球 (純度 > 98%) には HLA-DR の発現が認められた (図 14)。なお、末梢血好塩基球と異なり CD80 の明らかな発現はみられなかった。CD4+ T 細胞と同

種の末梢血幹細胞好塩基球との共培養により、CD4+ T 細胞の増殖反応が惹起された (図 15)。

D. 考察

(1) 喘息患者の呼気 NO は、治療下においても健康人に比べて有意に高値であり、JGL2006 の重症度分類による症状ステップ別の検討では、Step4 群において呼気 NO が高値であった。治療ステップ別の検討では、Step4 群において呼気 NO が高値の傾向であったが、各群に有意差を認めなかった。症状 Step1 症例において試案の重症度別に検討したところ、治療 Step4a 群で呼気 NO が高値の傾向であった。従って、呼気 NO 値は治療下での喘息コントロール状態を反映し、十分な抗炎症療法が重症化予防に重要と考えられた。しかしながら、炎症の病態は多様であることが想定されることから、個々の病態に応じた抗炎症療法を考える必要がある。

近年、喘息のフェノタイプ分類が注目されており、好酸球性炎症が主体か否か、あるいは好酸球性炎症が残存しているのか否か、といった観点から、治療の対策を考えることは意義がある。そこで、治療下の成人喘息症例 (81 例) を対象に、EBC 中の ECP と IL-8 を測定した。その結果、非発作時に採取した EBC 中の ECP や IL-8 は、JGL2009 に基づく症状・治療ステップ・治療を考慮した重症度や呼吸機能 (%FEV1.0) との間に関連を認めなかった。全体の約 10% を占めた最重症持続型では ECP 高値例も低値例も、また IL-8 高値例も低値例も存在した。症状のない、あるいは軽度の症例や治療ステップ 4 の症例においても ECP 高値例や IL-8 高値例が存在した。さらに、各々血清中の ECP や IL-8 との間にも相関がみられなかった。興味深い事に EBC 中の ECP は IL-8 との間に強い負の相関を示した。治療下での成人喘息において、EBC 中 ECP 高値・IL-8 低値群と ECP 低値・IL-8 高値群の 2 群に大別できた。なお、ECP、IL-8 とともに高値の群は 5 例であり、最重症持続型はこれらの 3 群いずれにも存在した。米国の Severe Asthma Research Program (SARP) をはじめとして、複雑な重症喘息の病態をいくつかのタイプに分類

(クラスター解析) し、それぞれに最適な治療や指導を行っていく必要があるという考えが近年注目されている。我々の得た EBC 中の ECP と IL-8 に関する結果からは、好酸球性炎症が残存しているタイプ、好酸球性炎症は抑えられているタイプ (この中には好中球性炎症が主体のものも含まれる) に大別されることが分かった。従って、EBC 中の好酸球と好中球の活性度を調べることは、ステロイド薬を増量すべきか、むしろ減量して他の抗炎症療法等を追加すべきかの判断を可能とし、重症喘息の治療・管理に役立つかもしれない。以上、まとめると、成人喘息患者における EBC 中の ECP と IL-8 は治療により修飾を受けるが、治療の反応性あるいは病態の違いにより、ECP 高値・IL-8 低値群と ECP 低値・IL-8 高値群の 2 つのフェノタイプが存在する可能性が示唆された。今後、特に最重症持続型の症例を増やして、EBC 中の ECP と IL-8 を含めた臨床的特徴を明らかにし、テーラーメイドの治療介入をめざすことが必要と考える。血清中の IL-4 や TSLP は治療ステップと弱い負の相関を認めた。EBC 中の ECP は血清ヒスタミン、末梢血白血球数と正の相関を、EBC 中ならびに血清中の IL-8、血清 TNF- α とは負の相関を認めた。EBC 中の IL-8 は血清 TNF- α と正の相関を、EBC 中の ECP、血清ヒスタミン、末梢血白血球数とは負の相関を認めた。重症度と相関する因子は主に呼吸機能であり、末梢血白血球数は治療ステップ、重症度と正の相関を認めた。これらの結果は、炎症の質的多様性、治療効果、治療不足、治療薬の反応性低下などが複雑に絡み合っていることを反映しているものと考えられた。今後、治療 (ステロイド) 抵抗性の炎症マーカーについても探索していく必要がある。

(2) 好塩基球は遅発相の気道局所に集積し、アレルギー性炎症におけるエフェクター細胞と考えられていたが、免疫・アレルギー反応を調節する細胞としても捉えられるようになってきた。我々もこれまで好塩基球が IL-16 や M-CSF を産生することを明らかにし、これらを介して CD4 陽性 T 細胞や単球・マクロファージの関与する免疫・アレルギー反応を調節し、Th2 免疫応答

の増強やリモデリング・血管新生に関与している可能性を報告した。さらに近年、アレルギー性炎症のコンダクターとしての役割も注目されている。好塩基球の抗原提示能について検討したところ、IL-3 による 24 時間の刺激では濃度依存性に HLA-DR の発現が誘導されることが判明した。また、CD80 に関しても軽度の発現が認められた。さらに、末梢血幹細胞培養好塩基球にも HLA-DR の発現が確認され、CD4+ T 細胞との共培養により、CD4+ T 細胞の増殖反応を惹起した。今後、CD4+ T 細胞の増殖反応が Th2 免疫応答の増強につながるものであるかどうか、また、健常人と喘息患者における差異なども検討する必要がある。いずれにせよ、IL-3 で活性化された末梢血好塩基球や末梢血幹細胞培養好塩基球には、抗原提示に必要な細胞表面分子、特に HLA-DR の機能的発現が認められた。好塩基球はアレルギー性炎症のイニシエーター・コンダクターとしても機能し、気管支喘息の慢性化・重症化に関与している可能性がある。

E. 結論

(1)成人喘息患者における呼気 NO や EBC 中の ECP と IL-8 は治療により修飾を受けるが、治療の反応性あるいは病態の違いにより、ECP 高値・IL-8 低値群と ECP 低値・IL-8 高値群といった異なるフェノタイプが存在することが示された。この知見は、多様な重症難治性喘息において至適な抗炎症療法を個別に考える上で有用と考えられる。また、治療薬等の影響で抑制される炎症物質の中では、呼気 NO が重症化抑制指標の一つとなり得ると考えられた。

(2)ヒト好塩基球は抗原提示細胞として気管支喘息の病態に関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fukutomi Y, Taniguchi M, Nakamura H, Konno S, Nishimura M, Kawagishi Y, Okada C,

Tanimoto Y, Takahashi K, Akasawa A, Akiyama K. Association between Body Mass Index and Asthma among Japanese Adults: Risk within the Normal Weight Range. *Int Arch Allergy Immunol* 157: 281-7, 2012.

2) Fuchimoto Y, Kanehiro A, Miyahara N, Koga H, Ikeda G, Waseda K, Tanimoto Y, Ueha S, Kataoka M, Gelfand EW, Tanimoto M.

Requirement for CCR5 in the Development of Allergen-Induced Airway Hyperresponsiveness and Inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011 Jul 14. [Epub ahead of print]

3) Waseda K, Tanimoto Y, Hasegawa K, Miyahara N, Nojima D, Ikeda G, Kanehiro A, Okada C, Kimata Y, Tanimoto M. Churg-Strauss syndrome with necrosis of toe tips. *Acta Med Okayama* 65: 215-8, 2011.

4) Waseda K, Miyahara N, Kanehiro A, Ikeda G, Koga H, Fuchimoto Y, Kurimoto E, Tanimoto Y, Kataoka M, Tanimoto M, Gelfand EW. Blocking the leukotriene B4 receptor 1 inhibits late-phase airway responses in established disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45: 851-7, 2011.

5) 尾長谷 靖, 金廣有彦, 谷本 安, 宮原信明, 岡三喜男, 江田良輔, 窪田哲也, 横山彰仁, 若林規良, 竹山博泰, 岡田千春, 木村五郎, 宗田 良, 高橋 清, 谷本光音. 吸入ステロイド治療を継続中の喘息患者の吸気流速と背景因子の関連性調査 — 中国, 四国地区多施設研究. *アレルギー* 60:1621-9, 2011.

6) 谷本 安. One airway, one disease (喘息・鼻炎合併患者) の包括的治療 総編集: 山口徹, 北原光夫, 福井次矢. *今日の治療指針 2011 年版 私はこう治療している* pp. 705-6, 医学書院, 東京, 2011.

7) 谷本 安, 谷本光音. 特集 難病への取り組み 希少呼吸器疾患の治療・管理. *岡山医誌* 123: 49-52, 2011.

8) Matsuo T, Ichimura K, Sato Y, Tanimoto Y, Kiura K, Kanazawa S, Okada T, Yoshino T.

- Immunoglobulin G4 (IgG4)-positive or -negative ocular adnexal benign lymphoid lesions in relation to systemic involvement. *J Clin Exp Hematopathol* 50: 129-142, 2010.
- 9) Fukutomi Y, Nakamura H, Kobayashi F, Taniguchi M, Konno S, Nishimura M, Kawagishi Y, Watanabe J, Komase Y, Akamatsu Y, Okada C, Tanimoto Y, Takahashi K, Kimura T, Eboshida A, Hirota R, Ikei J, Odajima H, Nakagawa T, Akasawa A, Akiyama K. Nationwide cross-sectional population-based study on the prevalences of asthma and asthma symptoms among Japanese adults. *Int Arch Allergy Immunol* 153: 280-7, 2010.
- 10) Iio K, Ueno-Iio T, Okui Y, Ichikawa H, Tanimoto Y, Miyahara N, Kanehiro A, Tanimoto M, Nakata Y, Kataoka M. Experimental pulmonary granuloma mimicking sarcoidosis induced by *Propionibacterium acnes* in mice. *Acta Med Okayama* 64: 75-83, 2010.
- 11) 谷本 安, 高橋 清. 好塩基球・好酸球機能検査 図説・臨床看護医学 デジタル版 09: 免疫・アレルギー pp. 1-3, エディターシップ, 東京, 2010.
- 12) 能島大輔, 谷本 安. 特集 アレルギーと炎症細胞 アレルギー性炎症における好塩基球の役割. *臨床免疫・アレルギー科* 53: 486-90, 2010.
- 13) 谷本 安. 特集 One airway, one disease One airway, one diseaseの治療戦略ーアレルギー免疫療法ー. *喘息* 23: 50-5, 2010.
- 14) 谷本 安, 能島大輔. アレルギー性炎症における好塩基球のあらたな役割. ー好塩基球は免疫・アレルギー反応を調節する細胞であるー. *医学のあゆみ* 233: 61-5, 2010.
- 15) 岡田千春. 増加するアレルギー疾患 内科医にとっての最良のアプローチとは 成人喘息への理解と対応 最新の知識 成人喘息長期管理の基本戦略 中等症、重症喘息管理のポイント. *内科* 105: 628-631, 2010.
- 16) 岡田千春. 高齢者のアレルギー疾患 高齢者アレルギー疾患診断の難しさ、問題点と対処法. *アレルギー・免疫* 17: 377-382, 2010.
- 17) 福富友馬, 谷口正実, 粒来崇博, 岡田千春, 下田照文, 尾仲章男, 坂英雄, 定金敦子, 中村好一, 秋山一男. 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* 59:37-46, 2010.
- 18) Yu H, Fujita J, Higa F, Yamadori I, Hibiya K, Yara S, Tateyama M, Tanimoto Y, Tanimoto M, Li H. Nonspecific interstitial pneumonia pattern as pulmonary involvement in human T-cell lymphotropic virus type 1 carriers. *J Infect Chemother* 15: 284-7, 2009.
- 19) 谷本 安. 高橋 清. 特集 気管支喘息: 診断と治療の進歩. 喘息の亜型・特殊型. 4 重症難治性喘息. *日内会誌* 98: 3103-13, 2009.
- 20) 谷本 安. 高橋 清. 14 急性増悪 (発作) への対応 C. 急性増悪時の家庭での対応 福田 健編: よくわかる気管支喘息ーその診療を極めるー 永井書店, 大阪, 233-5, 2009.

2. 学会発表

- 1) 谷本 安, 谷口暁彦, 能島大輔, 栗本悦子, 早稲田公一, 古賀 光, 宮原信明, 木浦勝行, 宗田 良, 片岡幹男, 谷本光音. オキサリプラチンアレルギーを獲得した大腸癌患者に対する減感作によるオキサリプラチン再投与の検討 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 (東京), 2011.
- 2) 谷本 安, 高橋 清, 岡田千春, 平野 淳, 山中隆夫, 木村五郎, 宗田 良, 佐藤利雄, 有田真知子, 谷本光音. シンポジウム12 増加するアレルギー疾患への対策を考える 気管支喘息を診療する医師の立場から (成人) 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会 (千葉), 2011.
- 3) 谷本 安, 陳 妍妍, 張 丹, 瀧川奈義夫, 能島大輔, 早稲田公一, 平野 淳, 木村五郎, 岡田千春, 宗田 良, 高橋 清, 片岡幹男, 谷本光音. 成人気管支喘息における呼気凝縮液中のECP、IL-8と喘息コントロール状態に関する検討 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会 (千葉),

- 2011.
- 4) 谷本 安, 高橋 清, 能島大輔, 早稲田公一, 平野 淳, 木村五郎, 岡田千春, 宗田 良, 片岡幹男, 谷本光音. シンポジウム4 重症および治療困難な成人喘息の原因の多様性と対策 S4-4 非アトピー型喘息 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 (東京), 2010.
- 5) 谷本 安, 平野 淳, 尾長谷 靖, 有田真知子, 佐藤利雄, 高橋 清, 谷本光音. 喘息治療におけるフルチカゾン・サルメテロール配合剤の服薬アドヒアランスに関する検討 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会 (京都), 2010.
- 6) 今野 哲, 福富友馬, 谷口正実, 中村裕之, 小林章雄, 河岸由紀夫, 岡田千春, 谷本 安, 高橋 清, 烏帽子田彰, 小田嶋博, 中川武正, 秋山一男, 西村正治, 赤澤 晃. 本邦のアレルギー性鼻炎有病率とその危険因子 日本語版 ECRHS調査票による疫学調査. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 (東京), 2010.
- 7) 能島大輔, 谷本 安, 栗本悦子, 早稲田公一, 宮原信明, 金廣有彦, 岸本卓巳, 片岡幹男, 高橋清, 谷本光音. ヒト好塩基球の抗原提示能に関する検討 -IL-3で活性化された好塩基球はHLA-DRを発現する-. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 (東京), 2010.
- 8) 宮原信明, 武田勝行, 宮原聡子, 早稲田公一, 栗本悦子, 池田元洋, 古賀 光, 谷口暁彦, 能島大輔, 澁本康子, 谷本 安, 金廣有彦, 片岡幹男, Gelfand E, 谷本光音. 動物モデルを用いた喘息病態と治療法開発 アレルギー性気道反応における経口免疫寛容の効果. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 (東京), 2010.
- 9) 福富友馬, 谷口正実, 中村裕之, 小林章雄, 今野 哲, 西村正治, 河岸由紀夫, 岡田千春, 谷本 安, 高橋 清, 烏帽子田彰, 小田嶋博, 中川武正, 赤澤 晃, 秋山一男. 本邦の成人喘息有病率とその危険因子 日本語版 ECRHS調査票による Nationwide cross-sectional population-based study. 第50回日本呼吸器学会学術講演会 (京都), 2010.
- 10) Tanimoto Y, Ogata Y, Kuyama S, Takao K, Kishi T, Nojima D, Waseda K, Fuchimoto Y,

Takigawa N, Tanimoto M. Clinical study of bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP) syndrome primed by radiation therapy for breast cancer. 14th Congress of the APSR, Seoul, 2009.

- 11) 谷本 安, 佐久川亮, 井上由佳理, 斎藤博久, 高橋 清, 谷本光音. シンポジウム12 アレルギーと炎症細胞 (メディエーターも含む) S12-2. 好塩基球 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会 (岐阜), 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む) 特になし

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

表 1 呼気NO濃度測定の対象

気管支喘息患者: 339名 (男136名、女203名)	
年齢: 7歳~88歳 (平均56歳)	
症状Step	治療Step
Step1: 217名	Step1: 114名
Step2: 77名	Step2: 58名
Step3: 17名	Step3: 59名
Step4: 5名	Step4: 78名
健常者: 15名 (男2名、女13名)	
年齢: 30歳~54歳 (平均40歳)	

図 1 健常者と喘息患者の呼気NO

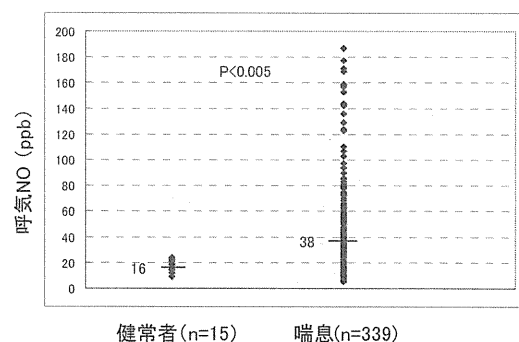


図2 症状ステップと呼気NO
(治療Stepは1~4まで含む)

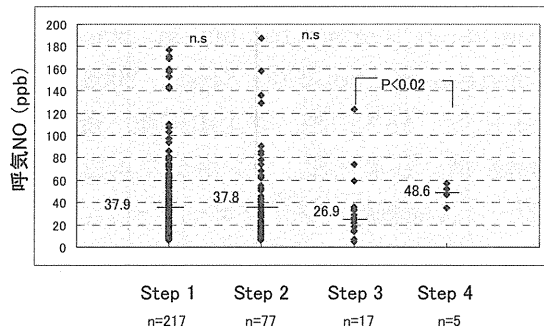


表3 症状Step1群における治療ステップ別の呼気NO
- 平均値と高値を示した比率 -

治療ステップ	呼気NO (ppb)	正常値 : 高値 (Cut off値: 26 ppb)
Step 1	39.74 ± 33.82	29 : 39
Step 2	37.12 ± 34.71	25 : 25
Step 3	36.07 ± 23.70	21 : 24
Step 4a	43.05 ± 38.88	21 : 21
Step 4b	23.67 ± 11.93	1 : 2
Step 4c	26.75 ± 13.45	2 : 2

Step 4a: 0mg ≤ oral PSL < 5mg
Step 4b: 5mg ≤ oral PSL < 10mg
Step 4c: 10mg ≤ oral PSL

図3 治療ステップと呼気NO
(症状Stepは1~4まで含む)

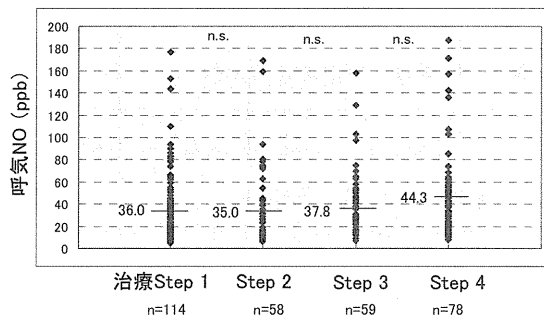


図4 症状Step1群における治療ステップ別の呼気NO
- 各患者の呼気NO濃度プロット -

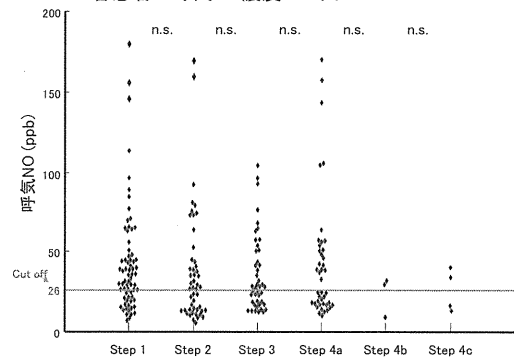


表2 症状Step1症例における治療ステップ

対象	症状Step1の喘息患者212名 (15~88歳、男:女=88:124)
	治療Step1 : 68名
	治療Step2 : 50
	治療Step3 : 45
	治療Step4a: 42
	治療Step4b: 3
	治療Step4c: 4
	Step 4a: 0mg ≤ oral PSL < 5mg
	Step 4b: 5mg ≤ oral PSL < 10mg
	Step 4c: 10mg ≤ oral PSL
	試案の難治基準: 5mg ≤ oral PSL

表4 患者背景

(対象) 成人喘息患者: 81名(男性32名、女性49名)
年齢: 20歳~89歳(中央値61歳)

症状	0/1なし/軽症間歇型相当: n=46	治療ステップ	1: n=6
	2 軽症持続型相当: n=24		2: n=26
	3 中等症持続型相当: n=9		3: n=24
	4 重症持続型相当: n=2		4: n=25

重症度	1 軽症間歇型: n=5
	2 軽症持続型: n=23
	3 中等症持続型: n=14
	4 重症持続型: n=31
	5 最重症持続型: n=8

(JGL2009)

図5

重症度と呼吸機能

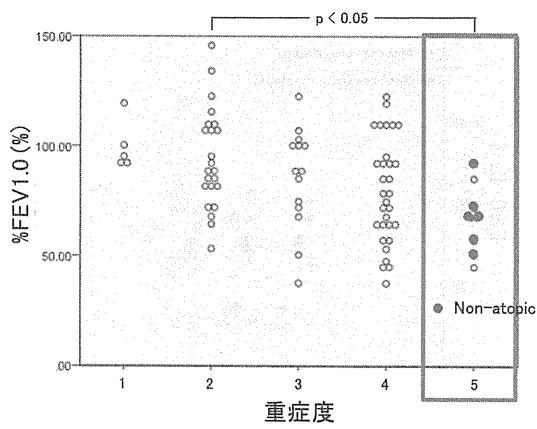


図6-c

治療ステップとEBC中のECP

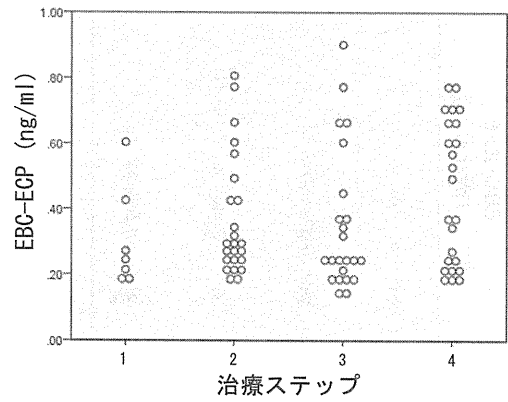


図6-a

重症度とEBC中のECP

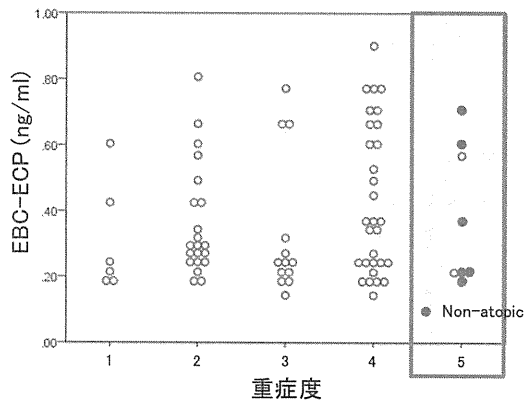


図6-d

呼吸機能とEBC中のECP

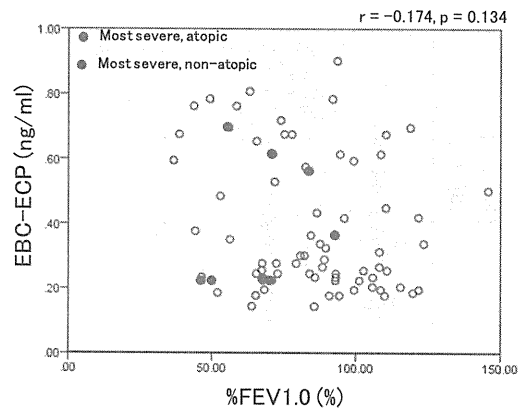


図6-b

症状とEBC中のECP

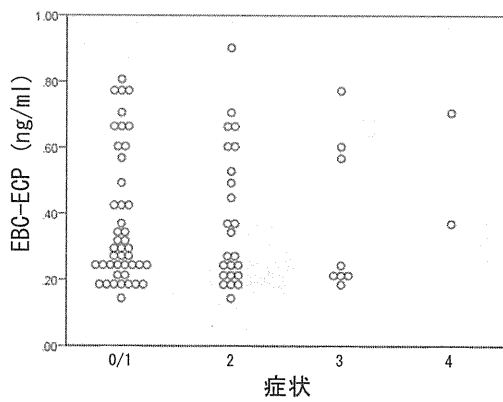


図6-e

血清ECPとEBC中のECP

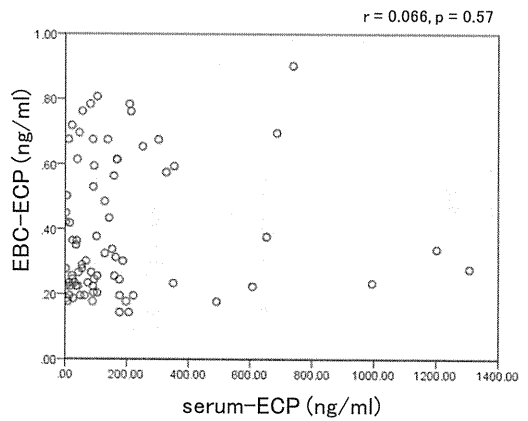


図7-a 重症度とEBC中のIL-8

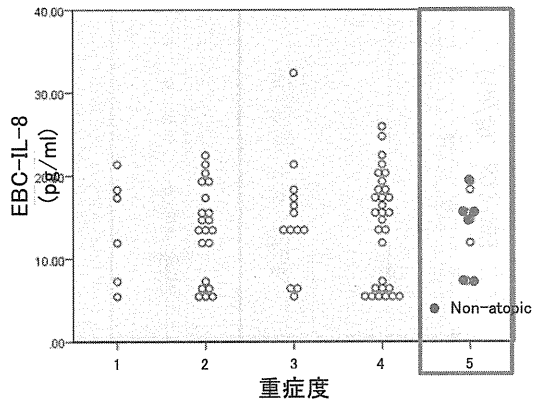


図7-d 呼吸機能とEBC中のIL-8

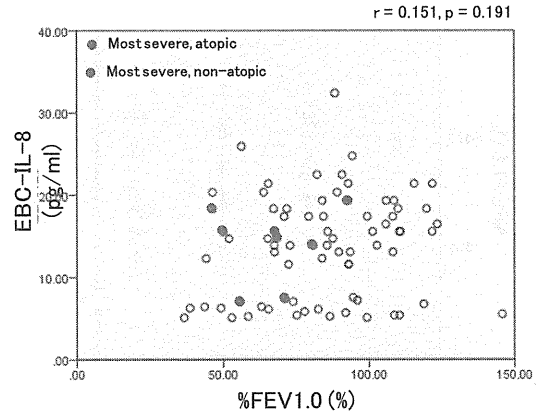


図7-b 症状とEBC中のIL-8

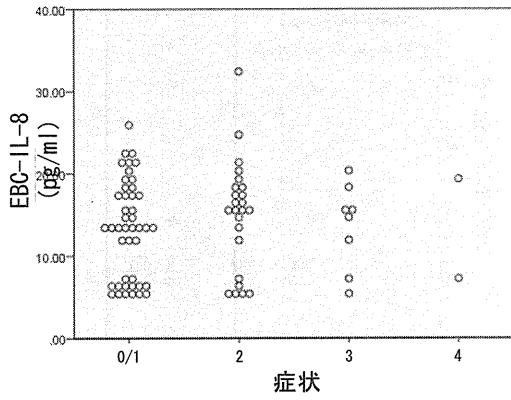


図7-e 血清IL-8とEBC中のIL-8

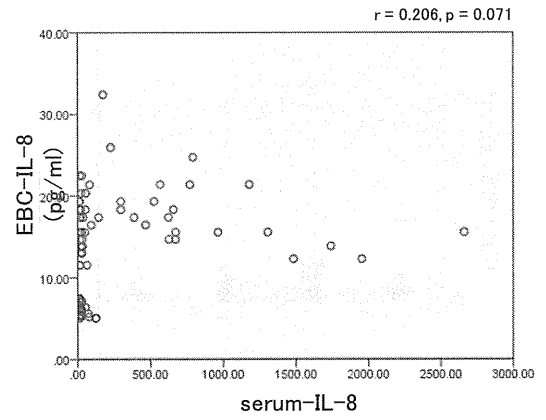


図7-c 治療ステップとEBC中のIL-8

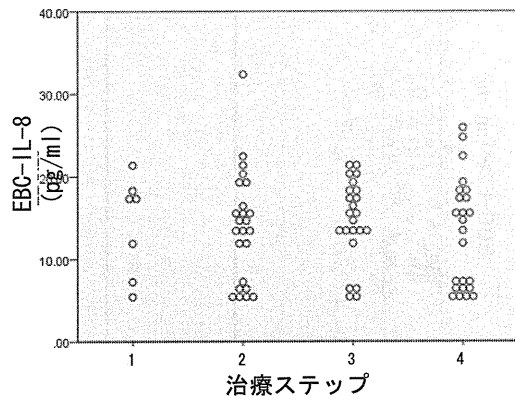


図8-a EBC中のIL-8とECPとの相関

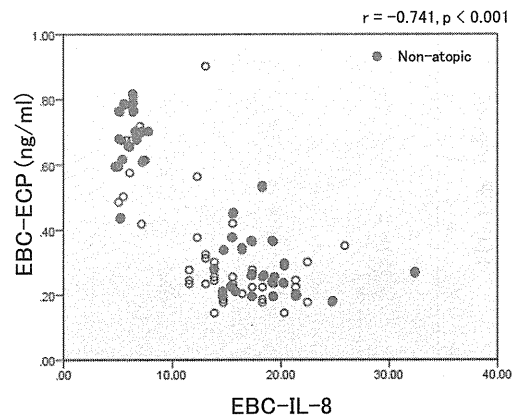


図8-b EBC中のIL-8とECPからみた喘息フェノタイプ

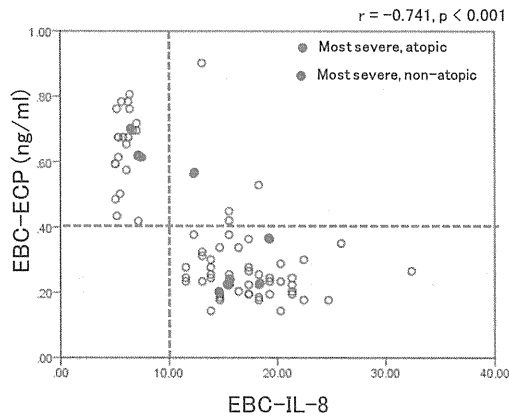


表7

治療ステップと相関する因子

s-TSLP	-0.281	$p < 0.05$
s-IL-4	-0.239	$p < 0.05$
WBC	0.301	$p < 0.01$
FEV1.0	-0.359	$p < 0.01$
PEF	-0.260	$p < 0.05$
V50	-0.337	$p < 0.01$
V25	-0.253	$p < 0.05$
ACT	-0.441	$p < 0.01$
LTRA	0.475	$p < 0.01$

表5

EBC-ECPと相関する因子

s-histamine	0.477	$p < 0.01$
s-IL-8	-0.244	$p < 0.05$
EBC-IL-8	-0.741	$p < 0.01$
s-TNF α	-0.258	$p < 0.05$
WBC	0.313	$p < 0.01$

表8

重症度と相関する因子

WBC	0.292	$p < 0.01$
FEV1.0	-0.374	$p < 0.01$
PEF	-0.297	$p < 0.01$
V50	-0.369	$p < 0.01$
V25	-0.302	$p < 0.01$
ACT	-0.692	$p < 0.01$
LTRA	0.422	$p < 0.01$

表6

EBC-IL-8と相関する因子

s-histamine	-0.495	$p < 0.01$
EBC-ECP	-0.741	$p < 0.01$
s-TNF α	0.324	$p < 0.01$
WBC	-0.324	$p < 0.01$

図9-a IL-3による末梢血好塩基球のHLA-DR発現

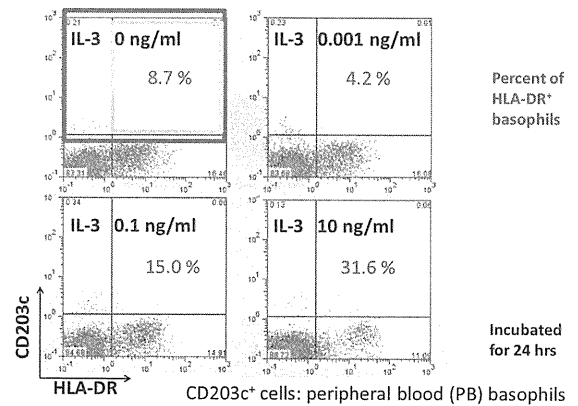


図9-b IL-3による末梢血好塩基球のHLA-DR発現

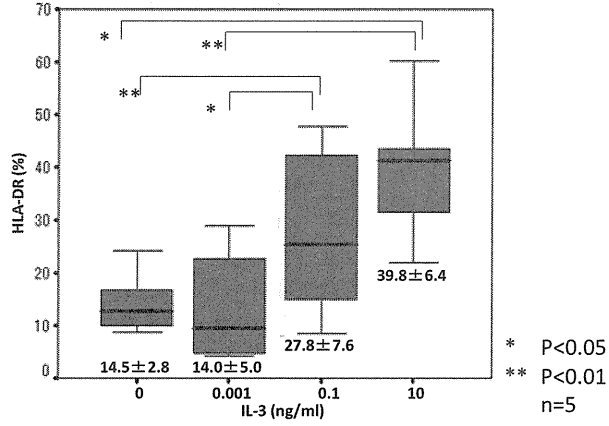


図11-a IL-3による末梢血好塩基球のCD80発現

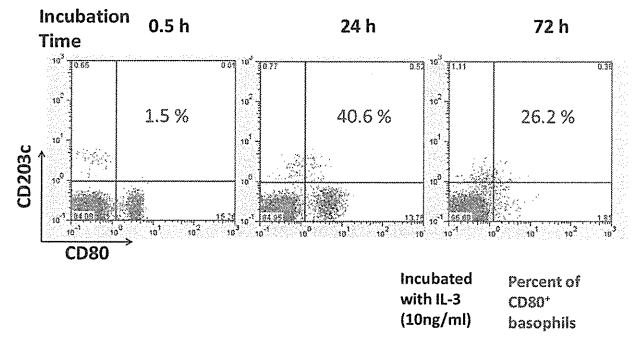


図10-a IL-3による末梢血好塩基球のHLA-DR発現

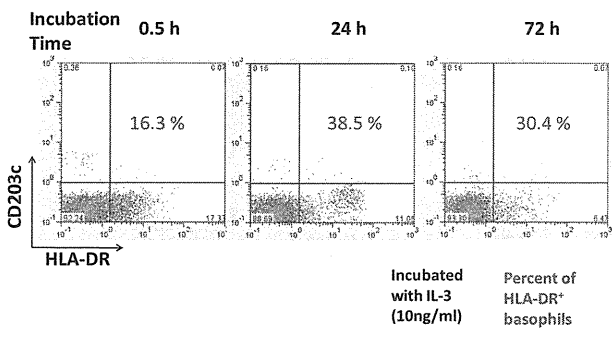


図11-b IL-3による末梢血好塩基球のCD80発現

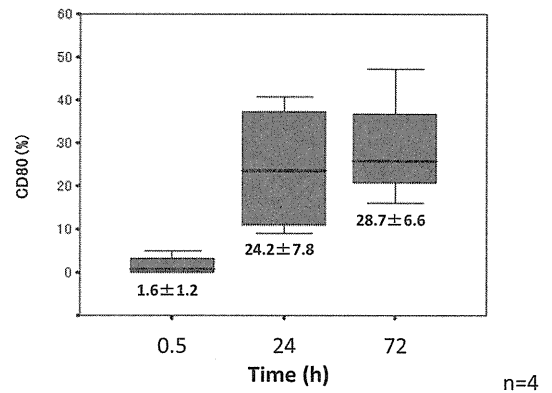


図10-b IL-3による末梢血好塩基球のHLA-DR発現

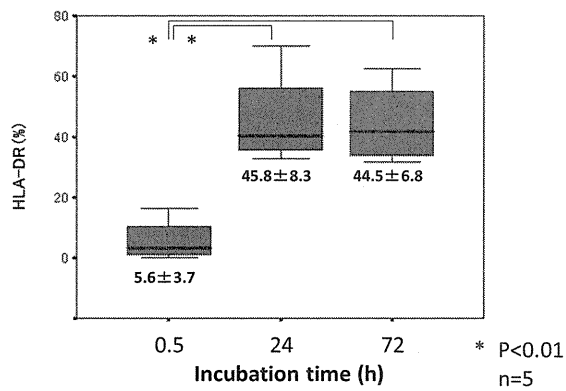


図12-a IL-3による末梢血好塩基球のCD86発現

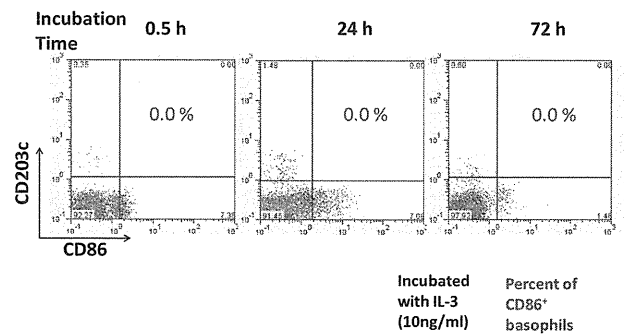


図12-b IL-3による末梢血好塩基球のCD86発現

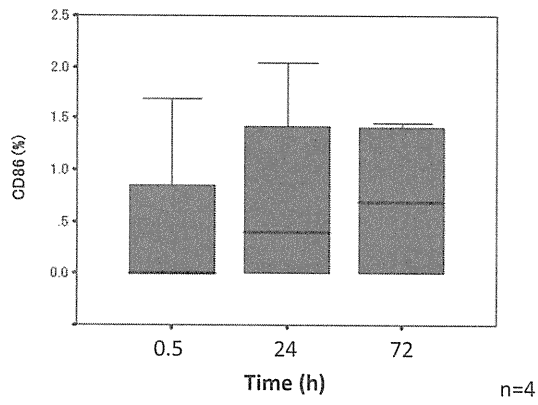


図14 末梢血幹細胞培養好塩基球におけるHLA-DR, CD80, CD86発現

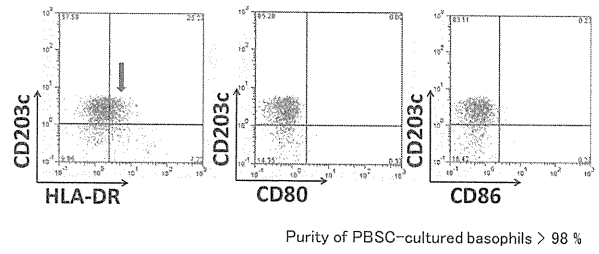


図13-a FcεRI架橋による末梢血好塩基球のHLA-DR発現

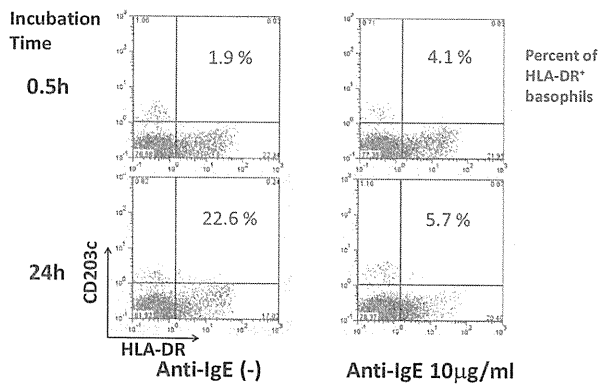


図15 同種好塩基球との共培養によるCD4+ T細胞の増殖反応

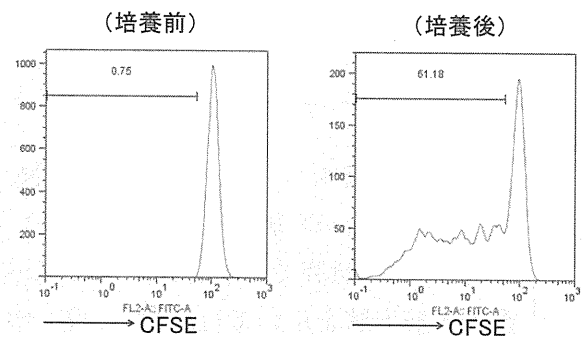
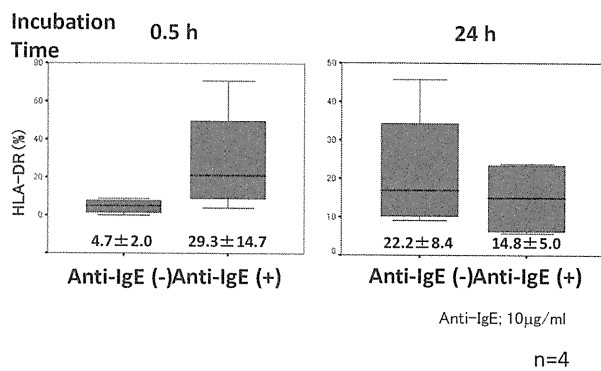


図13-b FcεRI架橋による末梢血好塩基球のHLA-DR発現



総合分担研究報告書

喘息死患者の気道リモデリングと炎症細胞の解析に関する研究

研究分担者 相澤 久道 久留米大学医学部内科学講座呼吸器・神経・膠原病内科部門教授
研究協力者：星野 友昭 久留米大学医学部内科学講座呼吸器・神経・膠原病内科部 講師
川山 智隆 久留米大学医学部内科学講座呼吸器・神経・膠原病内科部 講師
木下 隆 久留米大学医学部内科学講座呼吸器・神経・膠原病内科部 助教
坂崎 優樹 久留米大学医学部内科学講座呼吸器・神経・膠原病内科部 大学院生
武井 仁子 久留米大学医学部内科学講座呼吸器・神経・膠原病内科部 大学院生
澤田 昌典 久留米大学医学部内科学講座呼吸器・神経・膠原病内科部 大学院生
小田 華子 久留米大学医学部内科学講座呼吸器・神経・膠原病内科部 大学院生

研究要旨

喘息死は吸入ステロイドの普及で減少したが未だ 3000 人近くが喘息で死亡している。しかしながら肺病変部における T 細胞を含む炎症細胞の解明は殆ど行われていない。そこで本研究では喘息死患者の気道リモデリングと気道の炎症細胞の解析を喘息死患者の摘出肺を用いて行った。1973 年以降に久留米大学及びその関連病院で病理解剖を行った 12 人の非喫煙の喘息死患者から肺組織を得た。肺癌肺切除術を施行した軽症喘息 5 名及び非喫煙健常人 10 名の肺組織も併せて検討した。喘息死患者の気道は平滑筋の肥大、分泌腺過形成を伴った著明な気道リモデリング、粘液栓による気道の閉塞を認めた。一方軽症喘息及び非喫煙健常人では気道のリモデリングはほとんど認めなかった。喘息死では気道への著明な炎症細胞浸潤がみられた。メイ・ギムザ染色の結果、好酸球とリンパ球は軽症喘息や健常肺に比べ有意に増加していた。好中球は健常肺に比べ有意に増加していたが好塩基球は軽症喘息や健常肺に比べ有意な増加は認めなかった。喘息死の気道では、CD4 陽性 T 細胞は軽症喘息と同等に健常人より増加していた。一方 CD8 陽性 T 細胞は軽症喘息に比べ著明に増加しており、CD4/CD8 比約 0.4 と著明な低下を認めた。この CD8 陽性 T 細胞は炎症性サイトカイン IL-18 を産生していた。喘息死の病因には好酸球及び炎症性サイトカイン産生 CD8 陽性 T 細胞が関与している可能性が考えられた。著明な気道リモデリング、粘液栓による気道の閉塞が喘息死の直接の原因と考えられた。

A. 研究目的

古くから気管支喘息（以下喘息）の病因に Gell

Coombs らが提唱した IgE を介した I 型アレルギーが関与していることが知られている。これま

での研究で喘息の病態の主体は中枢気道中心の慢性気道炎症であることが判明している。気道炎症には好酸球、肥満細胞、抗原提示細胞、CD4陽性T細胞、またおそらくNKT細胞や制御性T細胞も関与している。これらの炎症細胞が活性化し産生される生理活性物質、Th2サイトカイン、炎症性サイトカイン、ケモカインが複雑なネットワークを形成している。長期にわたる気道炎症は非可逆性の気道リモデリングを起し、喘息の重症化に伴い中枢気道のリモデリングが進行することが知られている。

喘息死は吸入ステロイドの普及で減少したが未だ3000人近くが喘息で死亡している。40年ほど前の病理学的研究で喘息死においては粘液栓が大気管支(large bronchi)、小気管支(small bronchi)から終末細気管支、時には肺胞を塞ぐことが報告されている。この過剰な粘液栓の分泌が無気肺を引き起こすことが示唆されていた。1997年にCarrollらが喘息死の肺病変部に好酸球とリンパ球が増加していることを報告した。Faulらが喘息死の肺病変部にCD8陽性T細胞が増加していることを報告している。しかしながら喘息死の肺病変部におけるT細胞、好酸球や好中球を含む炎症細胞浸潤と炎症性サイトカインの役割は不明な点が多い。

一方、chronic obstructive pulmonary disease(COPD)の病態の主体は末梢気道中心の慢性気道炎症であることが判明している。また重症のCOPDの気道にも好酸球やCD8陽性T細胞が増加することが知られている。過去の喘息死の研究のほとんどは60年から70年代の古い研究である。加えて症例数が少ない、喫煙者を含む、症例の大半が50才以上の(比較的)高齢者であるという特徴を持つ。よって過去の喘息死の研究はCOPD患者を含んでいる可能性が高い。そこで本研究では昭和48年以降に久留米大学及びその関連病院で病理解剖を行った12人の非喫煙の喘息死患者から肺組織を得た。喘

息死の肺病変部におけるT細胞、好酸球や好中球を含む炎症細胞浸潤とこれら炎症細胞が産生する炎症性サイトカインの検討を行った。

B. 研究方法

1) 対象

昭和48年以降に久留米大学及びその関連病院で病理解剖を行った非喫煙者の12人の喘息死患者から肺組織を得た(Table 1)。明らかな感染症、COPD、心不全を合併した患者は除外した。肺切除術を施行した非喫煙者の軽症喘息5名及び非喫煙健常人10名の肺組織も併せて検討した(Table 2)。

2) 組織学的解析

摘出肺はホルマリン固定し、パラフィンブロックを作製した。パラフィンブロックから連続切片を作製しHE染色、メイ・ギムザ染色、PAS染色、EVG染色を行った。メイ・ギムザ染色した切片は400倍下で鏡検し好酸球、好塩基球、好中球、リンパ球を手動でカウントしmm²あたりの細胞数を算出した。

3) 免疫染色法

抗CD4、CD8モノクローナル抗体(ダコ製)、当教室で作製した抗IL-18モノクローナル抗体を用いた。LSAB2 kit/HRP(ダコ製)を用いて2重免疫染色を行った。発色の基質は3-3'-diaminobenzidine-4HCl(DAB), First Red®(ダコ製)を用いた。蛍光顕微鏡を用いてUV下でFirst Redを検出した。顕微鏡画像はCCDカメラ(DXM1200, Nikon Co.)を用いてコンピュータに取り込みNikon ACT-1(Nikon Co.)を用いて解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は久留米大学の倫理委員会の承認を得て行われた。