

C. 結果

1) 喘息死患者の臨床的特徴

喘息死患者は 1973 年から 1998 年に死亡し、患者の年齢は 5 から 79 才で平均は 44.4 ± 7.4 才であった。興味深いことに 12 名中 5 名が 24 時間以内に死亡していた。喘息の罹患期間は 10 ヶ月から 50 年と大きく差があったが 9 名が 6 年以上の罹患期間を持っていた。14 名中 8 名が死亡時にステロイドの全身投与を受けていた。2 名のみが吸入ステロイド beclometasone dipropionate (BDP) を使用していた (Table 1)。喘息死患者の肺機能は不明であった。

非喫煙者の軽症喘息及び非喫煙健常人の平均年齢はそれぞれ 66.8 ± 4.1 、 62.5 ± 4.9 才であった。軽症喘息の 5 名中 3 名が吸入ステロイド fluticasone propionate (FP) を服用していた。非喫煙者の軽症喘息では FEV1/FVC % が低下していた (Table 2)。

2) 喘息死患者の病理学的特徴

本研究では喘息死患者の中樞気道 (気管支) の病変を得ることがほとんどできなかった。そこで我々は喘息死患者の 10mm 以下の細気管支を検討した。喘息死では気道 (細気管支) への著明な炎症細胞浸潤がみられた (Figure 1)。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。検討した 12 名のすべての症例で著明な気道リモデリングと炎症細胞浸潤が認められた。また明らかな感染症は認められなかった。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。メイ・ギムザ染色により喘息死患者の気道に好酸球とリンパ球が増加していたことが判明した。炎症細胞を計測したところ喘息死患者の気道では好酸球とリンパ球は軽症喘息及び非喫煙健常人に比べ有意に増加していたが好塩基球は有意

な増加は認めなかった。好中球は喘息死患者の気道では非喫煙健常人に比べ有意に増加していた (Figure 2)。

3) 喘息死患者の肺病変部では CD8 陽性 T 細胞は軽症喘息に比べ著明に増加

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 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 をほぼ 100% 産生していた (Figure 3)。

D. 考察

この研究の興味深い発見は全喘息死患者で著明な気道リモデリングと炎症細胞浸潤が認められたことと思われる。我々が検討した 12 名の喘息死患者はすべて 1998 年以前の症例であったため、そのほとんどが日本における吸入ステロイドの普及以前の症例であった。死亡時には 12 名中 7 名がステロイドの全身投与を受けており、2 名のみ吸入ステロイド beclometasone dipropionate (BDP) を使用していた。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。軽症喘息の 5 名すべてコントロールが良好で、3 名が吸入ステロイド fluticasone propionate (FP) を服用していた。これらの結果は 1) 喘息死の病因に気道のリモデリングが関与し 2) 吸入ステロイドは気道のリモデリングを抑制することが示唆された。12 名中 5 名が 24 時間以内に死亡していた。この結果は IgE、肥満細胞や好塩基球を介した I 型アレルギー、即時型アレルギーの関与を示唆する。肥満細胞や好塩基球から放出された生理活性物質が急激な気道攣縮を起し致命的な気道閉塞を来した可能性がある。現在この点について検討中である。

喘息の罹患期間は 10 ヶ月から 50 年と大きく差

があつたが9名が6年以上の罹患期間を持っていた。これらの結果は気道リモデリングの樹立には比較的長い罹病期間が必要と考えられる。しかしながら症例4の5歳児は2年の罹病期間しかないが肺病変部には著明な気道リモデリングが認められた。小児の場合は比較的短い時間で気道リモデリングが樹立する可能性がある。さらなる検討が必要である。

本研究では、中枢気道を得ることが困難であり、比較的末梢の10mm以下の細気管支について検討した。過去の報告で、喘息は一般的に中枢気道の炎症、リモデリングが特徴とされているが、今回の検討で、喘息死では比較的末梢の気道においても著明な気道炎症、リモデリングがみられることが示唆された。

喘息死の気道ではCD4陽性T細胞が健常人より増加していた。しかしながらCD4陽性T細胞の増加は軽症喘息と同等の増加であった。しかしながらこれまでの研究報告と違い喘息死の気道ではCD8陽性T細胞は著明に増加しており、CD4/CD8比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。これまでの研究で重症のCOPDの末梢気道は気道リモデリングが著明で、好酸球やCD8陽性T細胞が増加することが知られている。我々の最近の研究で重症COPDの末梢気道のCD8陽性T細胞は炎症性サイトカインIL-18を産生することが判明した。難治性喘息と重症COPDではステロイドの治療に抵抗するといった共通点がある。また以上の結果は喘息死の気道に増えているCD8陽性T細胞は気道リモデリング形成に関与していることが示唆される。

E. 結論

喘息死の病因には気道リモデリング、好酸球及び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。好酸

球、CD8陽性T細胞及び炎症性サイトカインIL-18は重症喘息の気道リモデリング形成に関与している可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

英文論文

1. Izuhara K, Ohta S, Shiraishi H, Suzuki S, Taniguchi K, Toda S, Tanabe T, Yasuo M, Kubo K, Hoshino T, Aizawa H. The mechanism of mucus production in bronchial asthma.. *Curr Med Chem*. 2009;16:2867-75.
2. Kitasato Y, Tao Y, Hoshino T, Tachibana K, Inoshima N, Yoshida M, Takata S, Okabayashi K, Kawasaki M, Iwanaga T, Aizawa H. Comparison of *Aspergillus galactomannan* antigen testing with a new cut-off index and *Aspergillus precipitating antibody* testing for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. *Respirology*. 2009;14:701-8.
3. Yokoyama T, Toda R, Kimura Y, Mikagi M, Aizawa H. Addison's disease induced by miliary tuberculosis and the administration of rifampicin. *Intern Med*. 2009;48:1297-300.
4. Kashiwara M, Azuma K, Kawahara A, Basaki Y, Hattori S, Yanagawa T, Terazaki Y, Takamori S, Shirouzu K, Aizawa H, Nakano K, Kage M, Kuwano M, Ono M. Nuclear Y-box binding protein-1, a predictive marker of prognosis, is correlated with expression of HER2/ErbB2 and HER3/ErbB3 in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2009;4:1066-74.
5. Hoshino T, Toda R, Aizawa H.

- Pharmacological treatment in asthma and COPD. *Allergol Int.* 2009;58:341-6.
6. Imaoka H, Hoshino T, Okamoto M, Sakazaki Y, Sawada M, Takei S, Kinoshita T, Kawayama T, Kato S, Aizawa H. Endogenous and exogenous thioredoxin 1 prevents goblet cell hyperplasia in a chronic antigen exposure asthma model. *Allergol Int.* 2009;58:403-10.
 7. Okamoto M, Azuma K, Hoshino T, Imaoka H, Ikeda J, Kinoshita T, Takamori S, Ohshima K, Edakuni N, Kato S, Iwanaga T, Aizawa H. Correlation of decreased survival and IL-18 in bone metastasis. *Intern Med.* 2009;48:763-73.
 8. Toda R, Hoshino T, Kawayama T, Imaoka H, Sakazaki Y, Tsuda T, Takada S, Kinoshita M, Iwanaga T, Aizawa H. Validation of "lung age" measured by spirometry and handy electronic FEV1/FEV6 meter in pulmonary diseases. *Intern Med.* 2009;48:513-21.
 9. Inoue Y, Kawayama T, Iwanaga T, Aizawa H. High plasma brain natriuretic peptide levels in stable COPD without pulmonary hypertension or cor pulmonale. *Intern Med.* 2009;48:503-12.
 10. Fukuyama S, Nakano T, Matsumoto T, Oliver BG, Burgess JK, Moriwaki A, Tanaka K, Kubo M, Hoshino T, Tanaka H, McKenzie AN, Matsumoto K, Aizawa H, Nakanishi Y, Yoshimura A, Black JL, Inoue H. Pulmonary suppressor of cytokine signaling-1 induced by IL-13 regulates allergic asthma phenotype. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179:992-8.
 11. Hoshino T, Okamoto M, Sakazaki Y, Kato S, Young HA, Aizawa H. Role of Proinflammatory Cytokine IL-18 and IL-1{beta} in Bleomycin-induced Lung Injury in Humans and Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009; 41, 6611-70.
 12. Azuma K, Sasada T, Kawahara A, Hattori S, Kinoshita T, Takamori S, Ichiki M, Imamura Y, Ikeda J, Kage M, Kuwano M, Aizawa H. Expression of ERCC1 and class III beta-tubulin in non-small cell lung cancer patients treated with a combination of cisplatin/docetaxel and concurrent thoracic irradiation. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009 ;64:565-73.
 13. 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].
 14. 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].
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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].

18. 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.
19. 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.

和文論文

1. 相澤久道, 関塚友美, 石井秀宣: 治療 主要疾患の予防・治療・管理 喘息. 日本臨牀. 2009;67(11):2115-2119.
2. 相澤久道: ミニシンポジウム「最新のガイドラインをめぐって」 1. ACP (American College of Physicians) ガイドライン. 呼吸. 2009;28(10):1022-1023.
3. 大森久光, 岩崎 榮, 福地義之助, 工藤翔二, 山門 實, 相澤久道: 日本人間ドック学会会員施設における呼吸機能検査に関する実態調査. 人間ドック 2009;23(5):44-49.
4. 相澤久道: 最新の COPD 治療-大規模臨床試験の結果から サルメテロール/フルチカゾン配合剤の大規模臨床試験-TORCH 試験などの結果. 医学のあゆみ 2009;231(4):277-281.
5. 相澤久道, 御鍵麻記子, 時任高章: COPD(慢性閉塞性肺疾患)診断と治療のためのガイ

ドライン第2版. 成人病と生活習慣病 2009;39(6):667-670.

6. 相澤久道, 名取宏記, 御鍵麻記子: 呼吸機能検査ガイドライン 活用法. 呼吸器科 2009;15(3):255-260.
7. 相澤久道: Q&A 高齢者喘息の鑑別のポイント. 日本医事新報 2009;4429:94-95.
8. 相澤久道, 末友仁, 武岡宏明, 松岡昌信: 吸入ステロイド/ β_2 刺激薬合剤の意義と使いかた. Medical Practice 2009;26(3):461-463.
9. 相澤久道: 呼吸の生理 ⑩臨床的な肺機能検査の応用. 呼吸 2009;28(2):144-150.
10. 相澤久道: COPD の免学と病態. 臨床画像 2009;25(2):6-12.
11. 相澤久道: 安定期の喘息と COPD の類似点と相違点. 呼吸と循環 2009;57(2):135-140.
12. 相澤久道: ガス交換の仕組みから見た呼吸の機能. 呼吸器疾患診察マニュアル 2009;137(2):30-31.
13. 相澤久道: 呼吸機能の年齢変化と疾患による異常. 呼吸器疾患診察マニュアル 2009;137(2):34-35.
14. 相澤久道: 呼吸器系への喫煙の影響. 呼吸器疾患診察マニュアル 2009;137(2):36-37.
15. 相澤久道: 「肺年齢」スクリーニングの役割. 呼吸器疾患診察マニュアル 2009;137(2):134.
16. 相澤久道: COPD(肺気腫、慢性気管支炎). 呼吸器疾患診察マニュアル 2009;137(2):218-222.
17. 相澤久道, 中村雅之, 福島徳子: 考慮するべきさまざまな側面. 呼吸器内科 2010;18(5):437-442.
18. 相澤久道, 松本恵太, 佐々木潤: 高齢者喘息と COPD: 実地臨床でのとらえ方. 呼吸器内科 2010;18(3):279-281.
19. 相澤久道: 気管支喘息の外来診療. 呼吸器

- 内科 2010;18:101-106.
20. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 相澤久道, 園部伸恵：喫煙と肺年齢. 呼吸器内科 2010;17:482-486.
 26. 相澤久道, 伊藤光佑：10. COPDの管理と治療. ①管理の目標. 慢性閉塞性肺疾患
 27. 相澤久道, 伊藤光佑:10. COPDの管理と治療. ①管理の目標. 慢性閉塞性肺疾患(COPD)のマネジメント改訂版 72-78,2010.
 28. 相澤久道, 伊藤光佑:1. COPDとは. 慢性閉塞性肺疾患(COPD)のマネジメント改訂版 10-15,2010.
 29. 相澤久道:5 呼吸器疾患. 呼吸器疾患 最近の動向. 今日の治療指針 私はこう治療している 226-230,2010.
2. 学会発表
- 国際学会
1. K. Matsunaga, T. Kawayama, R. Toda, Y. Imamura, T. Hoshino, H. Aizawa. Effects of fluticasone and ciclesonide on pulmonary function and airway inflammation in stable mild asthmatics. European Respiratory Society Annual Congress 2009, Vienna, Austria, September 12-16, 2009.
 2. M. Sawada, R. Toda, Y. Sakazaki, T. Kawayama, T. Hoshino, H. Aizawa. Detection and evaluation severity of COPD by ipag questionnaires: evaluation of ipag questionnaires in COPD in Japan. European Respiratory Society Annual Congress 2009, Vienna, Austria, September 12-16, 2009
 3. T. Hoshino, M. Okamoto, Y. Sakazaki, M. Sawada, H. Imaoka, T. Kinoshita, R. Toda, T. Kawayama, H. Aizawa. Role of proinflammatory cytokines IL-18 and IL-1 β in bleomycin-induced lung injury in humans and mice. European Respiratory Society Annual Congress 2009, Vienna, Austria, September 12-16, 2009
 4. Y. Sakazaki, T. Hoshino, M. Sawada, T. Kawayama, Y. Kitasato, S. Takata, M. Yoshida, S. Kato, H. Aizawa. Characteristics of fatal asthma: CD8 positive T cells producing IFN- γ and IL-18 were recruited into small airways in fatal asthma. European Respiratory Society Annual Congress 2009, Vienna, Austria, September 12-16, 2009
 5. 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.
 6. 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.
7. M. Sawada, T. Hoshino, Y. Sakazaki, H. Oda, T. Kawayama, H. Aizawa. Overproduction of IL-18 in the lungs, and results in airway hyperresponsiveness and pulmonary inflammation. American Thoracic Society international conference 2010, New Orleans, USA, May 14-19, 2010.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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: What's 肺年齢? -呼吸状態の理解に役立つ新しいキーワード-. 第22回日本臨床内科医学会学術集会, 長崎市, 2008. 9. 15
2. 木下 隆、東 公一、岡元昌樹、今村陽平、池田二郎、藤本公則、相澤久道: 当院における間質性肺炎合併肺癌の予後と治療検討. 第49回日本肺癌学会総会, 北九州市, 2008. 11. 13-14
3. 相澤久道: 成人喘息の立場から-難治病態の解析-. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2008. 11. 27
4. 相澤久道: 高齢者喘息の病態および合併症

- COPD をふまえて-. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2008. 11. 28
5. 太田昭一郎、岡元昌樹、内田 賢、星野友昭、白石裕士、大島孝一、相澤久道、出原賢治：特発性間質性肺炎における細胞外マトリクス分子 periostin 発現解析の意義. 第 55 回日本臨床検査医学会学術集会, 名古屋市, 2008. 11. 27-30
 6. 中尾栄男、東 公一、枝國信貴、池田二郎、川山智隆、相澤久道：ゲフィチニブ投与歴のある非小細胞肺癌に対するエルロチニブ投与に関する第Ⅱ相試験. 第 49 回日本呼吸器学会総会学術講演会, 2009. 6. 12
 7. 木下 隆、川山智隆、池堂ゆかり、坂崎優樹、今村陽平、星野友昭、相澤久道：COPD 診断における呼気吸気胸部単純 X 線の有用性. 第 49 回日本呼吸器学会総会学術講演会, 2009. 6. 12-14
 8. 戸田玲子、富岡竜介、向野達也、木下 隆、坂崎優樹、澤田昌典、川山智隆、星野友昭、相澤久道：一般市民を対象とした肺年齢と IPAG 質問票の有用性の検証. 第 49 回日本呼吸器学会総会学術講演会, 2009. 6. 12-14
 9. 枝國信貴、戸田玲子、関塚友美、中村雅之、平原奈奈、藤本公則、相澤久道：CT ガイド下気管支鏡検査による肺病変の診断：CT ガイド下肺生検法、テレビ透視下気管支鏡との比較. 第 49 回日本呼吸器学会総会学術講演会, 2009. 6. 12-14
 10. 相澤久道：COPD の最新治療戦略—大規模臨床試験のエビデンス—. 第 50 回日本人間ドック学会学術大会, 東京, 2009. 9. 3
 11. 相澤久道：概念・ガイドラインから—『ガイドラインに基づく喘息と COPD の診療』. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田市, 2009. 10. 29
 12. 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
 13. 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
 14. 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
 15. 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
 16. 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
 17. 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
 18. 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
 19. 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
 20. 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

21. 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

Table 1

No.	Age	Sex	Year at autopsy	Therapy						Duration from onset
				Systemic steroid	ICS	Beta2-agonist	Theophylline	Anti-leukotriens	Ventilation	
1	32	M	1973	+	-	-	+	-	-	75 min
2	52	M	1974	+	-	-	-	-	-	5 days
3	5	M	1977	-	-	-	-	-	+	36 hrs
4	67	M	1980	-	-	-	-	-	-	60 days
5	43	M	1981	+	-	-	-	-	-	< 24hrs
6	75	M	1982	+	-	-	-	-	-	20 min
7	16	F	1984	-	-	+	+	-	-	DOA* (6 hrs)
8	79	F	1986	+	-	-	-	-	+	7days
9	57	M	1986	+	-	-	-	-	-	unknown
10	14	M	1994	-	-	-	-	-	-	DOA* (13 days)
11	24	M	1998	+	+	+	+	-	-	4 days
12	68	F	1998	-	+	-	-	-	+	7 days

*DOA: Death on arrival

Table 2

	Asthma death	mild asthma	control
n	12	5	10
age	44.4 ± 7.4	66.8 ± 4.1	62.5 ± 4.9
Sex			
Male	9	1	5
Female	3	4	5
Height	160.3 ± 3.9	152.2 ± 4.0	159.6 ± 3.1
Weight	53.2 ± 3.6	58.0 ± 4.9	59.5 ± 6.7
BMI	20.61 ± 1.0	25.0 ± 1.9	22.9 ± 1.8
VC % pred	ND	104.0 ± 7.6	108.7 ± 7.7
FVC % pred	ND	107.5 ± 6.7	107.3 ± 7.8
FEV1 % pred	ND	97.3 ± 11.0	103.3 ± 7.0
FEV1/FVC %	ND	66.2 ± 6.5	78.9 ± 2.8

ND: Not done

Figure 1

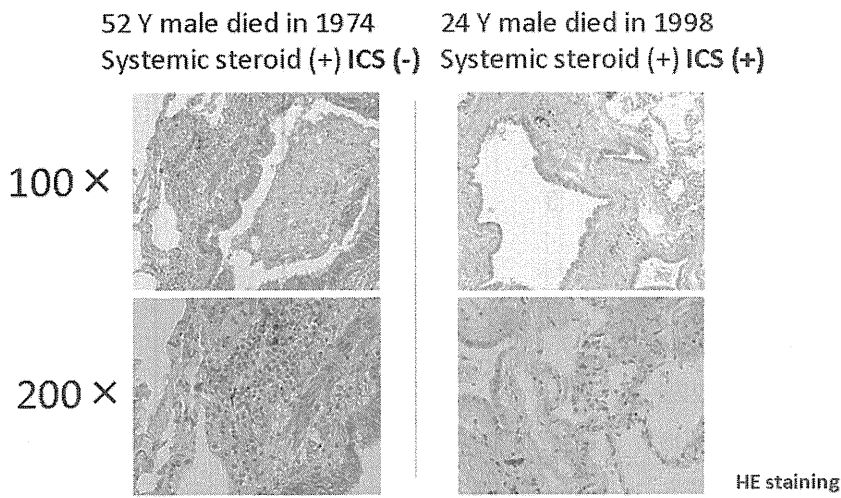
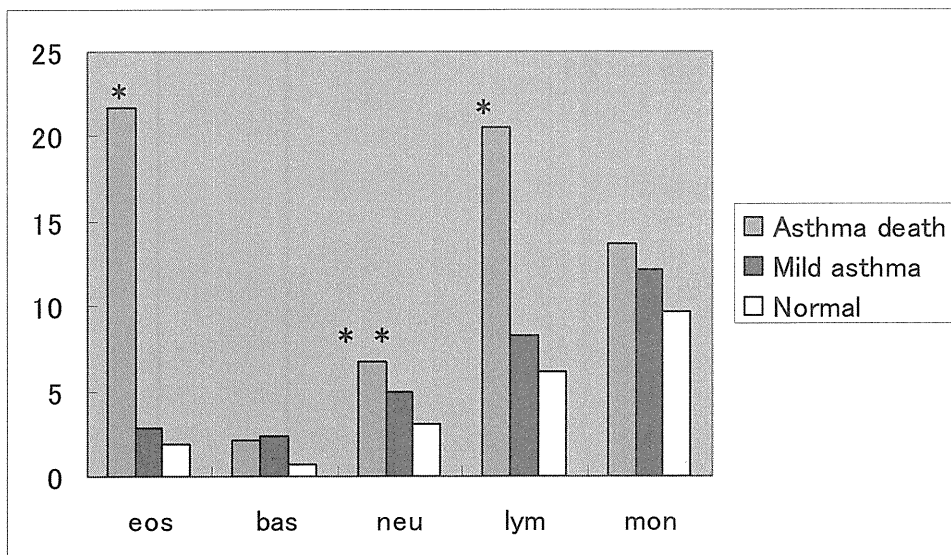


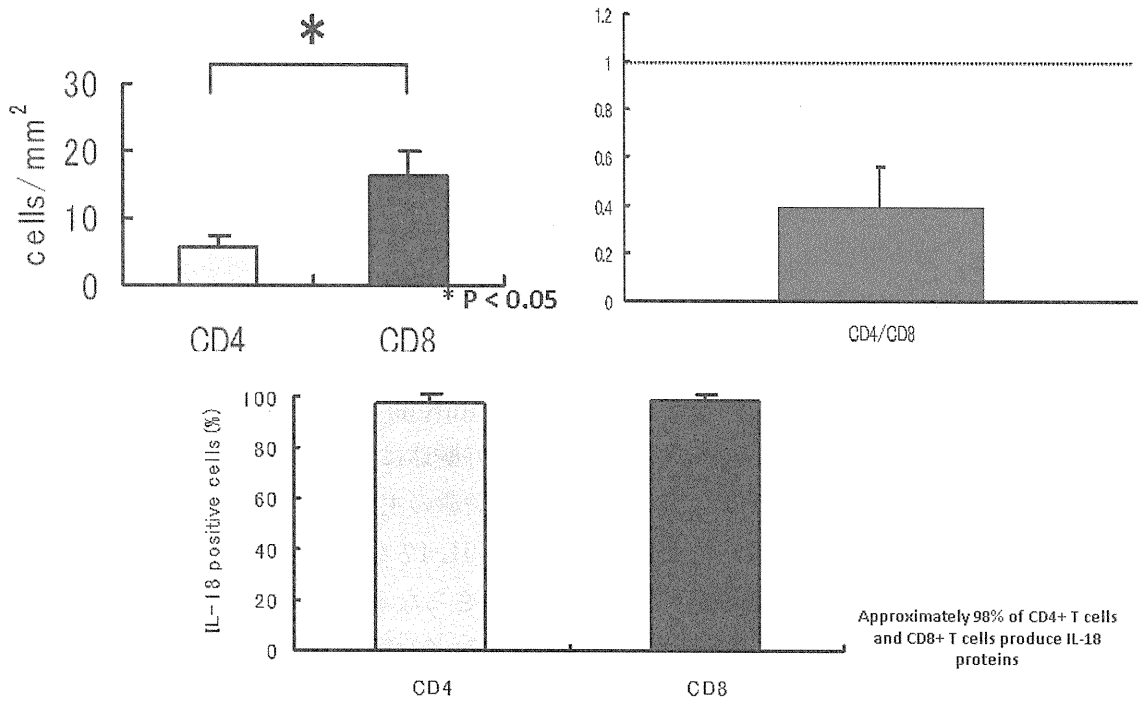
Figure 2



*: $P < 0.05$ vs. mild asthma, normal controls

** : $P < 0.05$ vs. normal controls

Figure 3



難治性好酸球性炎症の発症メカニズム解明による気管支喘息の重症化予防に関する研究

分担研究者 藤澤隆夫 国立病院機構三重病院臨床研究部長

研究要旨

重症喘息は正常な炎症終息機構の逸脱により、気道炎症が遷延化した状態が存在する。いくつかのサブクラスに分類されるが、いずれにしても好酸球は大きく関わっていると考えられており、好酸球性炎症の制御は重症喘息のコントロールを果たす上でも非常に重要である。本研究は大きく2つの骨子からなり、好酸球機能を中心に気管支喘息難治化の病態にある細菌感染、気道リモデリングへの関与を解析した。

まず、好酸球の細菌への反応性が菌種によって異なることを、高病原性の *Clostridium difficile* とプロバイオティクスの *Bifidobacterium bifidum* を用い確認した。そして重症喘息の一部に関与があると考えられている *Staphylococcus aureus* (SA) が好酸球機能に及ぼす作用について検討した。SA は PAF 受容体を介して好酸球に貪食され、好脱顆粒、活性酸素産生、およびファイブロネクチンへの接着など好酸球の主要なエフェクター機能を誘導することが明らかとなった。そして、IL-5 のみならず IL-17 もこれらの機能を増強し、Th17 型炎症においても、好酸球は細菌と反応して炎症のさらなる増悪に関わると考えられた。さらに、SA は好酸球から多種のサイトカイン・ケモカイン産生も誘導したが、その産生パターンは炎症性および線維化サイトカインが中心であった。今後、新たな PAF 受容体拮抗薬を開発することで、気道感染による喘息重症化を阻止できる可能性が考えられた。

近年線維症の研究で上皮間葉系移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition : EMT) が重要であることが報告され、気管支喘息でもそのメカニズムの存在が示唆されている。好酸球が、EMT にも直接関わる可能性について動物モデルならびに培養細胞系で検証した。マウスの気管に好酸球を投与することにより気道周囲の炎症細胞浸潤に加え、線維化、Type I collagen の発現増加が認められた。同時に BALF 中では TGF- β の有意な上昇がみられた。一方、気道上皮細胞は好酸球との共培養にて、形態が敷石状から紡錘状に変化、これにもなって上皮系マーカーである E-cadherin の低下と間葉系マーカーである vimentin の上昇が認められた。この系においても培養上清中の TGF- β の上昇がみられた。好酸球→TGF- β →EMT→線維化 (リモデリング) の経路が存在する可能性が考えられ、好酸球は EMT を介して気道リモデリングを引き起こす可能性がある。このプロセスの抑制は気道リモデリングの抑制に繋がる可能性があり、今後新たな治療ターゲットとなりえる。

研究協力者

臨床研究部

平口雪子 国立病院機構三重病院臨床研究部

研究員

A. 研究目的

細木興亜 国立病院機構三重病院

重症喘息は炎症の観点からは、高用量のステロ

イドによっても気道粘膜の著しい好酸球浸潤が制御しがたいタイプと、好中球などの他の炎症細胞浸潤が著しいタイプ、のふたつの亜型に分類できる。前者は、ステロイド不応となった好酸球動員機構を解明することが新規治療開発につながる。好酸球が関与しないかみえる後者においても好酸球が他の炎症細胞を誘導、あるいは器質的組織変化であるリモデリングを誘導することが報告されており、好酸球の制御は重症化の予防、並びに治療に直結する。本研究では喘息重症化の重要な要因である細菌感染、気道リモデリングに注目して、好酸球の細菌に対する反応性、気道リモデリングに果たす役割の解析を試みた。

近年喘息の発症、増悪、control に細菌の感染や colonization が関与しているという報告がなされ注目を集めている。好酸球は自然免疫を担っていることから、細菌感染と好酸球性炎症は関連性があると仮説をたて、重症喘息において高頻度に合併する鼻茸に関与するとされるブドウ球菌と好酸球の直接反応を中心に検討した。

線維症の発症機構の研究で上皮細胞が間葉系細胞に変化し細胞外基質を産生する上皮間葉系移行(Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT)が重要であることが報告され、気管支喘息でもそのようなメカニズムの存在が示唆されている。難治喘息における慢性炎症の中心的エフェクター細胞である好酸球は気管支喘息において TGF- β の major source であることから、好酸球が EMT にも直接関わる可能性について動物モデルならびに培養細胞系で検証した。

B 研究方法

1) 細菌感染に対する好酸球の役割

1-1) 腸内細菌に対する反応性

好酸球は正常ボランティア及びアレルギー疾患患者の末梢血から CD16 negative selection 法により精製した。細菌に対する好酸球の反応性を解析するモデル確立のため、容易に入手しやすい腸内細菌である *Clostridium difficile*(CD)と *Bifidobacterium bifidum*(BB) を用いて先行実

験を行った。好酸球からの活性酸素産生、脱顆粒のマーカーとしての EDN 遊離、サイトカイン産生を定量した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて免疫染色による形態的観察も行った。加熱処理により細菌は死滅するが、細胞形態は保持されていることを確認した。

1-2) ブドウ球菌株に対する反応性

続いて重症喘息患者で高頻度に合併する鼻茸に colonize するブドウ球菌株 *Staphylococcus aureus* (SA) は、理研バイオソースセンターより入手した(JCM No. 2151, ATCC No. 6538)。それぞれの細菌は加熱処理を行い、各種濃度で添加して、好酸球からの活性酸素産生、脱顆粒のマーカーとしての EDN 遊離、サイトカイン産生を定量した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて免疫染色による形態的観察も行った。加熱処理により細菌は死滅するが、細胞形態は保持されていることを確認した。さらにブドウ球菌による好酸球エフェクター機能誘導の反応系に対して、EDTA、百日咳毒素、以下の分子に対する抗体 (dectin 1, CD18, CD35, CD36, TLR2, TLR4)、および PAF 受容体ブロッキングペプチドを添加して、抑制の有無を調べ、責任分子の同定をおこなった。

2) 気道リモデリングに対する好酸球の役割

2-1) マウスモデルでの検討

マウス骨髄細胞を stem cell factor, Flt3 ligand, IL-5 存在下で培養、得られた好酸球をマウスの気管内に反復投与して、21 日後に BALF 中の細胞数、サイトカインを測定、肺組織を Hematoxylin-Eosin, Masson trichrome で染色するとともに、Type I collagen 沈着を免疫組織学的に評価した。対象コントロールは生理食塩水を気管内投与した。

2-2) 培養気道上皮細胞での検討

健常成人ボランティアの末梢血より CD14, 16 negative selection 法にて分離した好酸球を気道上皮細胞株 BEAS-2B と共培養し、光学・蛍光顕

微鏡による形態学的評価を行うとともに、培養上清中サイトカインの測定、PCRによる気道上皮細胞の上皮・間葉系マーカー発現の定量をそれぞれ行った。

C. 研究結果

1) 細菌感染に対する好酸球の役割

1-1) 腸内細菌に対する反応性

A; 好酸球による細菌の貪食

好酸球と各種細菌を培養すると、これらを貪食することを観察した。まず、細菌の 16S rRNA に対して蛍光 in situ hybridization を行って標識 (Cy3)、好酸球は自家蛍光 (FITC) を利用して、共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、図 1 のように 2 時間の培養で好酸球が細菌を貪食することが観察された。用いたすべての菌で同様の所見が得られた。

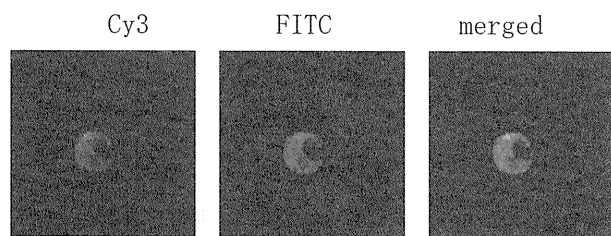


図 1 好酸球の細菌貪食

B; CD と BB による脱顆粒

次に、好酸球脱顆粒の指標として EDN 遊離を測定したところ、CD、BB ともに脱顆粒を誘導したが、CD は BB よりも有意に高値であった (図 2)。さらに、GM-CSF あるいは TNF- α によるプライミングによって、CD 誘導脱顆粒はさらに増強されるのに対して、BB 誘導脱顆粒は影響を受けなかった (図 3)。

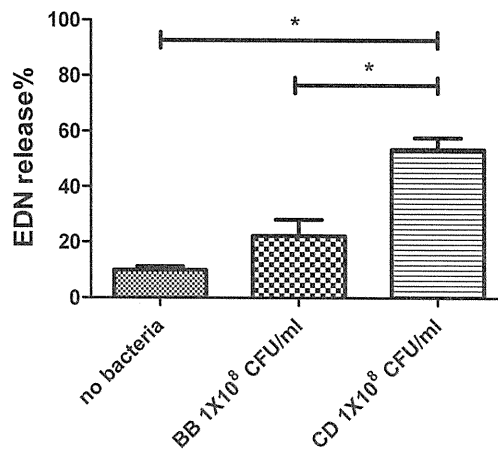


図 2 CD と BB による EDN 遊離

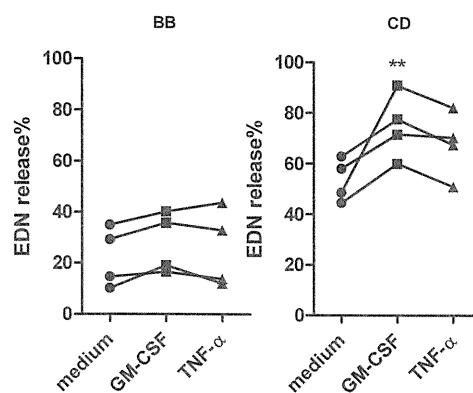


図 3 サイトカインによる EDN 遊離増強

1-2) ブドウ球菌株に対する反応性

A; SA による脱顆粒

好酸球と SA を 4 時間培養後、上清に遊離した好酸球顆粒蛋白 EDN を測定したところ、SA の濃度依存性に EDN 遊離 (=脱顆粒) が観察された。

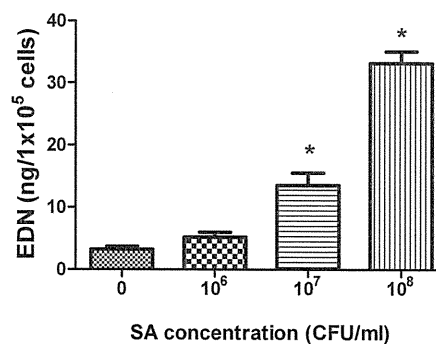


図 4 SA による好酸球脱顆粒

IL-5 はこの反応を有意に増強した (図 5)。逆

に、EGTA 添加で脱顆粒は完全に抑制され、カルシウムを動員する反応と考えられた。一方、百日咳毒素 (PTX) 添加で抑制されなかった (図 6)。

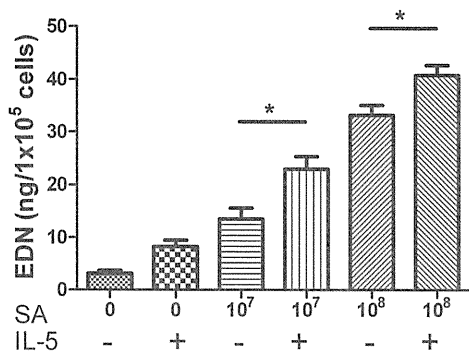


図 5 IL-5 による SA 誘導脱顆粒の増強効果

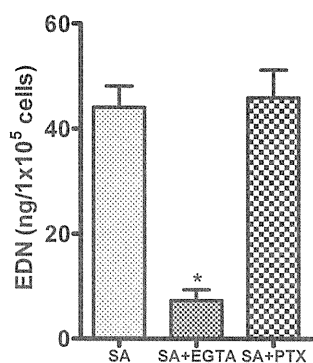


図 6 SA 誘発好酸球脱顆粒の抑制

B; SA による活性酸素産生

SA は好酸球からの活性酸素産生を誘導し (図 7)、IL-5、IFN- γ 、IL-17A はいずれもこれを有意に増強した (data not shown)。

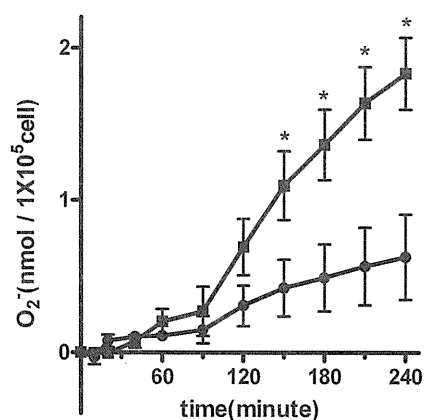
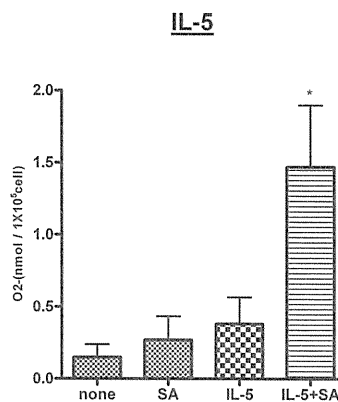


図 7 SA による活性酸素産生

とくに、IL-5 と IL-17A は反応早期 (90 分) の活性酸素産生を著しく増強した (図 8)。



IL-17A

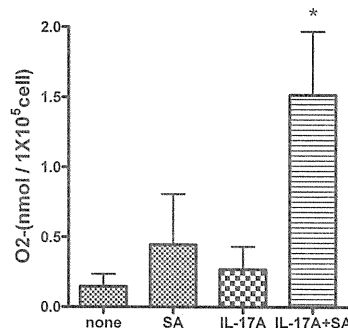


図 8 SA による活性酸素産生 : IL-5, IL-17A の増強作用

C; SA による細胞接着増強

ファイブロネクチンでコートしたプレートへの好酸球接着は SA 存在下で有意に増強された。この反応は CD49 に対する抗体を添加することにより抑制された (図 9)。

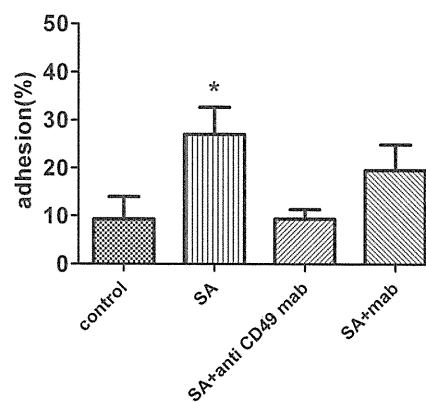


図 9 ファイブロネクチンへの接着

D; SAによるサイトカイン産生誘導

SAと好酸球を24時間培養後、上清中のサイトカイン・ケモカイン31種をマルチプレックスビーズアレイシステムで測定した。無刺激時との変化(何倍の増強か)を縦軸に、刺激後のサイトカイン濃度(絶対量)を横軸にとり、産生パターンを検討すると、Bに属する、すなわち無刺激か10倍以上の増加でかつ、100pg/ml以上で有意に産生がみられたサイトカイン群はIL-17

TNF- α , PDGF-bb, VEGF, FGF-basic、すなわち、Th17型の炎症に関与するサイトカインと線維化誘導に関与するサイトカインであった。一方、Th2サイトカインや抑制性サイトカインは主にCに属し、有意な産生は認められなかった。

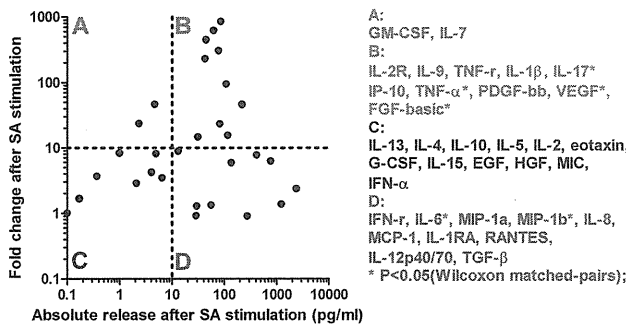


図10 SAによるサイトカイン産生パターン

E; PAF 受容体阻止ペプチドによる抑制

SAによる好酸球機能がいずれの分子を介するかを検討するために、dectin 1, CD18, CD35, CD36, TLR2, TLR4に対する抗体の存在下で、SAによる活性酸素産生、EDN遊離を検討したが、いずれも抑制は認められなかった。しかし、PAF受容体(PAFR)阻止ペプチドのEDN遊離、活性酸素産生、フィブロネクチン接着、サイトカイン産生(TNF- α)をいずれも有意に抑制した。

(図11, 12, 13, 14)

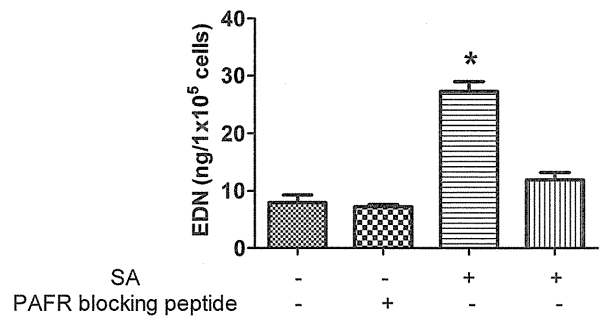


図11 PAFR抑制ペプチドによるEDN遊離抑制

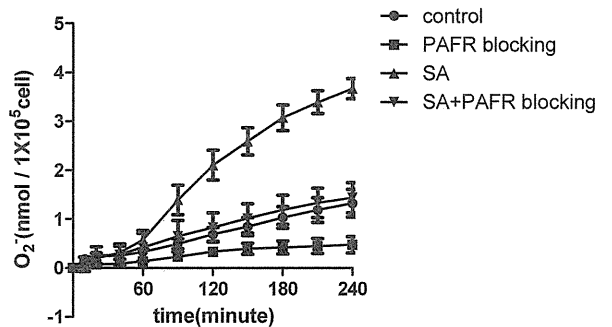


図12 PAFR抑制ペプチドによる活性酸素産生抑制

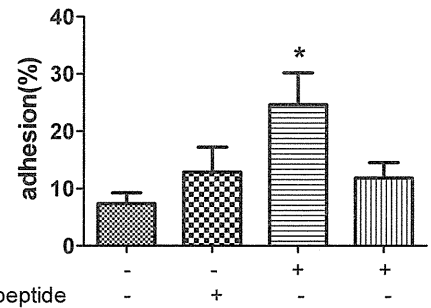


図13 PAFR抑制ペプチドによる接着抑制

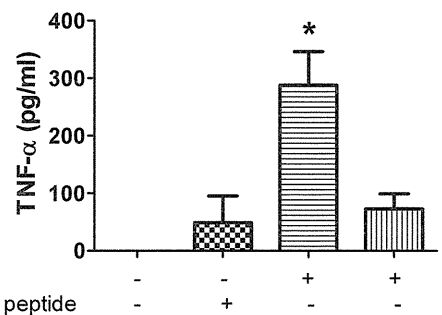


図14 PAFR抑制ペプチドによるTNF- α 産生抑制

以上より、SAによる好酸球のエフェクター機能

誘導は PAFR を介すると考えられた。

F; 好酸球の SA 貪食

SA の 16S rRNA に対して蛍光 in situ hybridization を行って標識 (Cy3 : 赤)、好酸球は自家蛍光 (FITC : 緑) を利用して、共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、2 時間の培養で好酸球が SA を貪食していることが観察されたが、PAFR 抑制ペプチドの添加により、貪食は抑制された。

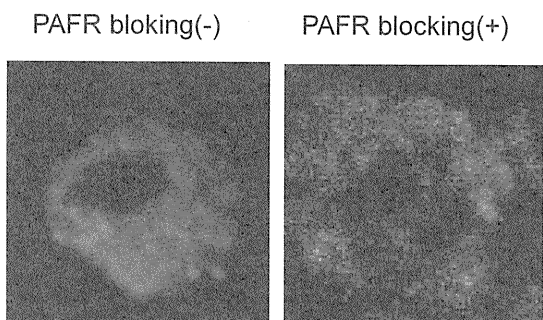


図 15 好酸球の SA 貪食

(PAFR 抑制ペプチド非存在下では、SA が細胞質内に取り込まれている (黄色) が、存在下では細胞外に SA が存在 (赤) している)

2) 気道リモデリングに対する好酸球の役割

2-1) マウスモデルでの検討

A; 好酸球気管内投与による炎症細胞浸潤

マウスの気管に好酸球を投与することにより BALF 中の細胞数が増加した (図 16A)。その内訳は主にマクロファージとリンパ球だった (図 16B)

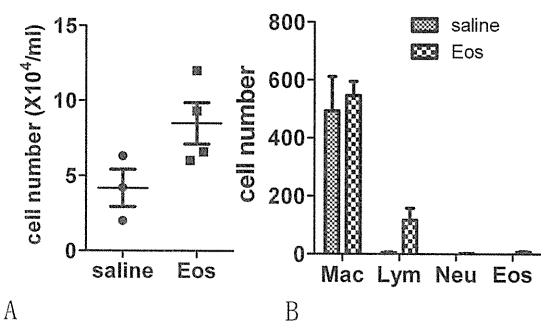


図 16 ; BALF 中細胞

A ; BALF 中細胞数、B ; BALF 中細胞分画

B; 好酸球気管内投与による BALF 中サイトカイン増加

BALF 中サイトカインは好酸球投与群において上昇しており (図 17A; IFN- γ 、図 17B; IL-13、図 17C; TGF- β)、特に TGF- β は統計学的にも有意であった。

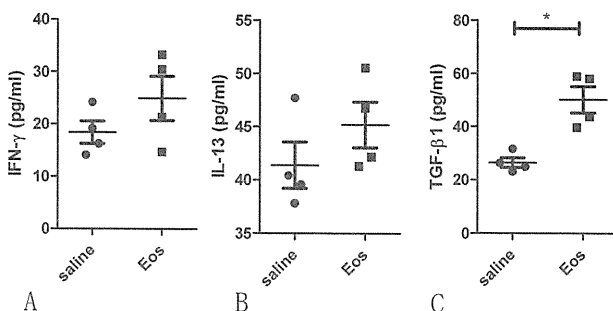


図 17 ; BALF 中サイトカイン

A; IFN- γ 、B; IL-13、C; TGF- β

C; 好酸球気管内投与による組織変化

組織学的検討では、気道周囲の炎症細胞浸潤に加え (図 18 ; Hematoxylin-Eosin 染色)、気道周囲の線維化 (図 19 ; Masson trichrome 染色) と Type I collagen の発現増加 (図 20 ; 免疫染色) が認められた。

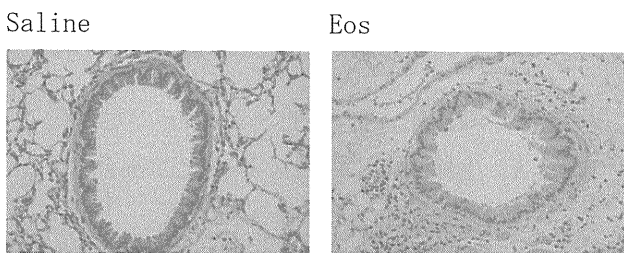


図 18 ; 肺組織 Hematoxylin-Eosin 染色

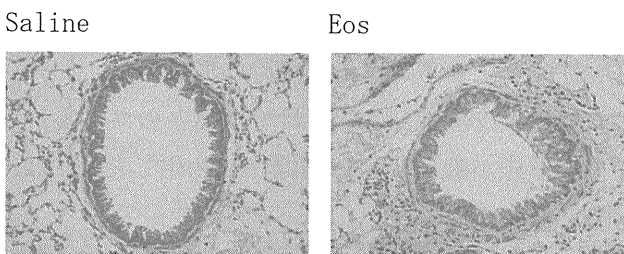


図 19 ; 肺組織 Masson trichrome 染色

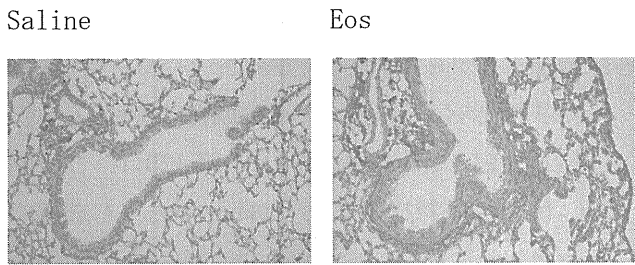
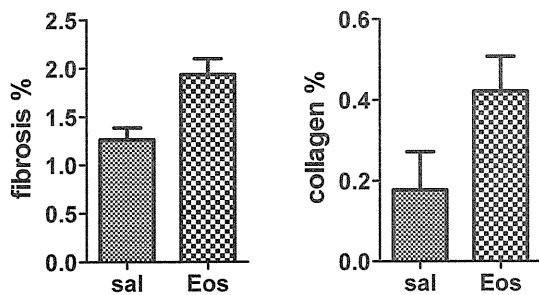


図 20 ; 肺組織 Type I collagen 染色

画像解析ソフト (WinROOF) を用いて取得した生検画像に 2 値化処理を行い、生検組織における線維化、Type I collagen の割合を定量化したところ、好酸球投与群で線維化、Type I collagen の割合は高い傾向を認めた (図 21)。



A

B

図 21 ; 線維化、Type I collagen の定量化

A; 生検組織における線維化の割合
(Masson trichrome 染色)

B; 生検組織における Type I collagen の割合
(Type I collagen 染色)

2-2) 培養気道上皮細胞での検討

A; 好酸球による気道上皮細胞の形態変化

気道上皮細胞 BEAS-2B は好酸球との共培養にて、形態が敷石状から紡錘状に変化した (図 22、23)。

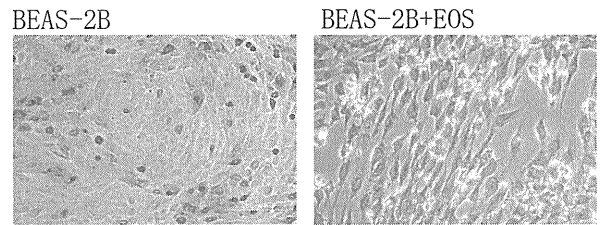


図 22 ; 気道上皮細胞単独 (左) と好酸球と共培養後の気道上皮細胞 (右) (光学顕微鏡)

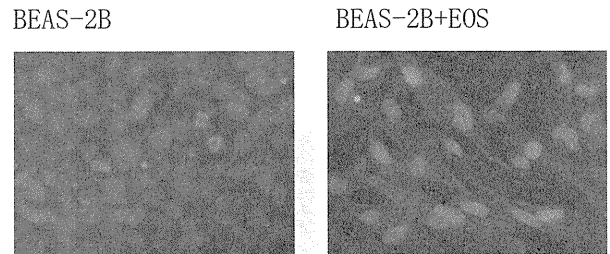


図 23 ; 気道上皮細胞単独 (左) と好酸球と共培養後の気道上皮細胞 (右) (蛍光顕微鏡)

Nuclei : DAPI staining (blue)

F-actin : Phalloidin staining (red)

B; 好酸球と気道上皮細胞の共培養上清中 TGF-β

気道上皮細胞 BEAS-2B と好酸球の共培養群は、気道上皮細胞単独群、好酸球単独群と比較して、明らかな培養上清中の TGF-β 濃度上昇がみられた (図 24)。

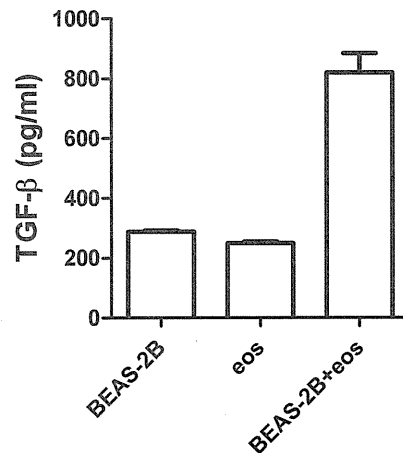


図 24 ; 培養上清中の TGF-β

これにともなって気道上皮細胞 BEAS-2B と好酸球の共培養群では、上皮系マーカーである

E-cadherin の低下 (図 25) と間葉系マーカーである Vimentin の上昇 (図 26) が認められた。

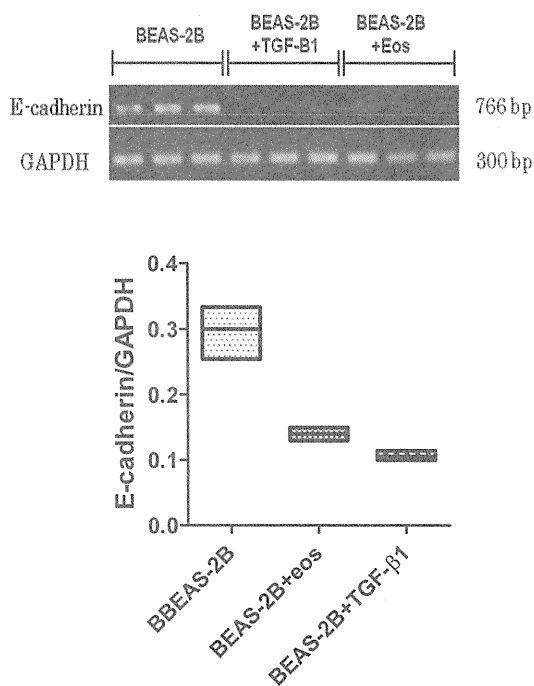


図 25; 気道上皮細胞の E-cadherin 発現 (PCR)

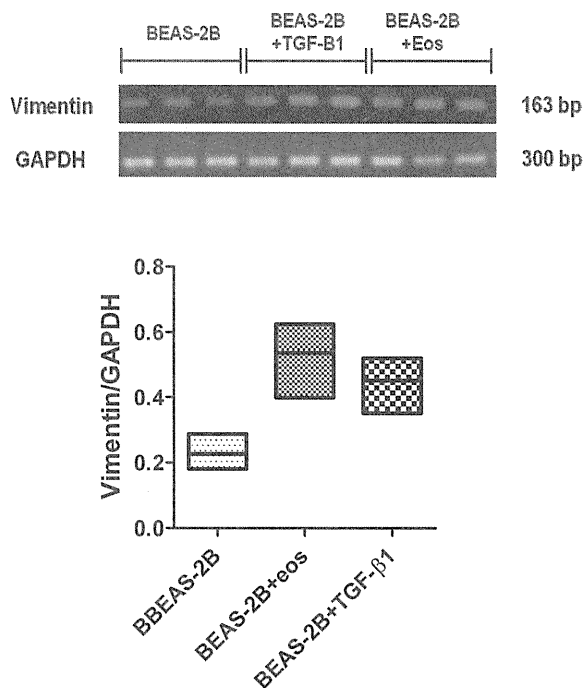


図 26; 気道上皮細胞の Vimentin 発現 (PCR)

D. 考察

ウイルス感染が喘息の増悪に関与することは

よく知られているが、細菌感染も重要な役割を果たすことが考えられる。しかし、いくつかの疫学データは菌の種類により異なるアウトカムがおこることを示されている。好酸球は気道炎症のエフェクターであるとともに、第一線の自然免疫機構の中で、喘息の増悪あるいは生体防御に機能する可能性がある。そこで、各種細菌と好酸球の相互作用を *in vitro* で検討し、自然免疫における好酸球の役割、喘息病態への関与について明らかにすること、とくに難治性喘息に認められる遷延性の好酸球性炎症発症機構を細菌感染の面から解明するために、検討を行った。

まず、腸管における病原性の *Clostridium difficile* とプロバイオティクスである *Bifidobacterium bifidum* の比較を行ったところ、両者が脱顆粒を誘導するが、病原性の CD がより強く誘導することを明らかとした。好酸球は異なる細菌に対して、異なる機能を発現することを示す結果であり、興味深い。腸内細菌叢のバランスが免疫反応に及ぼす影響の一端を明らかにできたと考える。

SA に関するこれまでの報告をみると、まず、思春期年齢で、SA に対する IgE 抗体が高値であるほど喘息のリスクが高いこと、また重症喘息では多くの例で鼻茸を合併しているが、鼻茸には多くの SA が存在することが明らかにされており、かつ好酸球の浸潤も著しい。

本研究では SA が好酸球に直接作用して、細胞接着、脱顆粒、活性酸素産生、炎症性 (IL-17, TNF- α) ならびに線維化サイトカイン産生を引き起こすことを明らかにした。この事実は、ブドウ球菌が好酸球を介して、重症喘息にみられる Th17 型炎症およびリモデリング増強に関与していることを示唆する。さらに、IL-5 および IL-17 が活性酸素産生を著しく増強することは、これらの反応が Th2 環境 (アトピー型喘息に相当)、Th17 環境 (非アトピー型喘息に相当) いずれにあっても、増強されることを示している。とくに、難治例では Th2 型の炎症だけでなく、Th17 型反応も関与しているといわれるが、感染時に Th17 リンパ球