

subjects. These results, together with ours, suggest that in ECRS patients, the formation of NT can be related to the autotoxic NO mechanism, similar to the case with bronchial asthma [31].

In conclusion, the present study validates the role of oral and nasal FeNO measurements as a parameter for the classification and definition of different CRS subtypes in Japan. We consider that higher FeNO levels in ECRS patients closely correlate with augmented iNOS expression and are accompanied by the excretion of NO metabolites into the paranasal sinus mucosa. Further accumulation of a consensus regarding the standardization of reliable measurements and the possibility of using FeNO to monitor therapeutic effects would be desirable.

### Conflict of interest

None of the authors have any conflict of interest to declare in relation to this study.

### Acknowledgments

The authors thank Ms. Ai Kashima for her technical assistance. This study was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research, administered by the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Japan.

### References

- [1] Lundberg JO, Weitzberg E. Nasal nitric oxide in man. *Thorax* 1999;54:947–52.
- [2] Scadding G. Nitric oxide in the airways. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;15:258–63.
- [3] American Thoracic Society, European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:912–30.
- [4] Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, Irvin CG, Leigh MW, Lundberg JO, et al. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:602–15.
- [5] Lundberg JO, Farkas-Szallasi T, Weitzberg E, Rinder J, Lidholm J, Anggaard A, et al. High nitric oxide production in human paranasal sinuses. *Nat Med* 1995;1:370–3.
- [6] Barnes PJ, Dweik RA, Gelb AF, Gibson PG, George SC, Grasemann H, et al. Exhaled nitric oxide in pulmonary diseases: a comprehensive review. *Chest* 2010;138:682–92.
- [7] Sahin G, Klimek L, Mullol J, Hörmann K, Walther LE, Pfaar O. Nitric oxide: a promising methodological approach in airway diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;156:352–61.
- [8] Lindberg S, Cervin A, Runer T. Nitric oxide production in the upper airways is decreased in chronic sinusitis. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997;117:113–7.
- [9] Maniscalco M, Sofia M, Pelaia G. Nitric oxide in upper airways inflammatory diseases. *Inflamm Res* 2007;56:58–69.
- [10] Guida G, Rolla G, Badiu I, Marsico P, Pizzimenti S, Bommarito L, et al. Determinants of exhaled nitric oxide in chronic rhinosinusitis. *Chest* 2010;137:658–64.
- [11] Haruna S, Otori N, Moriyama H, Nakanishi M. Olfactory dysfunction in sinusitis with infiltration of numerous activated eosinophils. *Auris Nasus Larynx* 2006;33:23–30.
- [12] Takeno S, Hirakawa K, Ishino T. Pathological mechanisms and clinical features of eosinophilic chronic rhinosinusitis in the Japanese population. *Allergol Int* 2010;59:247–56.
- [13] Nakayama T, Yoshikawa M, Asaka D, Okushi T, Matsuwaki Y, Otori N, et al. Mucosal eosinophilia and recurrence of nasal polyps – new classification of chronic rhinosinusitis. *Rhinology* 2011;49:392–6.
- [14] Lund VJ, Mackay IS. Staging in rhinosinusitis. *Rhinology* 1993;31:183–4.
- [15] Sakuma Y, Ishitoya J, Komatsu M, Shiono O, Hiramama M, Yamashita Y, et al. New clinical diagnostic criteria for eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Auris Nasus Larynx* 2011;38:583–8.
- [16] Antus B, Horvath I, Barta I. Assessment of exhaled nitric oxide by a new hand-held device. *Respir Med* 2010;104:1377–80.
- [17] Takeno S, Noda N, Hirakawa K. Measurements of nasal fractional exhaled nitric oxide with a hand-held device in patients with allergic rhinitis: relation to cedar pollen dispersion and laser surgery. *Allergol Int* 2011;61:93–100.
- [18] Weschta M, Deutsche T, Riechelmann H. Nasal fractional exhaled nitric oxide analysis with a novel hand-held device. *Rhinology* 2008;46:23–7.
- [19] Ragab SM, Lund VJ, Saleh HA, Scadding G. Nasal nitric oxide in objective evaluation of chronic rhinosinusitis therapy. *Allergy* 2006;61:717–24.
- [20] Arnal JF, Flores P, Rami J, Murrís-Espín M, Bremont F, Pasto I, et al. Nasal nitric oxide concentration in paranasal sinus inflammatory diseases. *Eur Respir J* 1999;13:307–12.
- [21] Noda N, Takeno S, Fukui T, Hirakawa K. Monitoring of oral and nasal exhaled nitric oxide in eosinophilic chronic rhinosinusitis: a prospective study. *Am J Rhinol Allergy* 2012;26:255–9.
- [22] Meltzer EO, Hamilos DL, Hadley JA, Lanza DC, Marple BF, Nicklas RA, et al. Rhinosinusitis: developing guidance for clinical trials. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:S17–61.
- [23] Galli J, Montuschi P, Passali GC, Laruffa M, Parrilla C, Paludetti G. Exhaled nitric oxide measurement in patients affected by nasal polyposis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2012;147:351–6.
- [24] Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ, et al. The use of exhaled nitric oxide to guide asthma management: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:231–7.
- [25] Naraghi M, Deroee AF, Ebrahimkhani M, Kiani S, Dehpour A. Nitric oxide: a new concept in chronic sinusitis pathogenesis. *Am J Otolaryngol* 2007;28:334–7.
- [26] Ho LP, Innes JA, Greening AP. Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide. *Thorax* 1998;53:680–4.
- [27] Van Crombruggen K, Zhang N, Gevaert P, Tomassen P, Bachert C. Pathogenesis of chronic rhinosinusitis: inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:728–32.
- [28] Sejima T, Holtappels G, Kikuchi H, Imai Y, Ichimura K, Bachert C. Cytokine profiles in Japanese patients with chronic rhinosinusitis. *Allergol Int* 2012;61:115–22.
- [29] Kang BH, Huang NC, Wang HW. Possible involvement of nitric oxide and peroxynitrite in nasal polyposis. *Am J Rhinol* 2004;18:191–6.
- [30] Bernardes JF, Shan J, Tewfik M, Hamid Q, Frenkiel S, Eidelman DH. Protein nitration in chronic sinusitis and nasal polyposis: role of eosinophils. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;131:696–703.
- [31] Berry MA, Shaw DE, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ, Pavord ID. The use of exhaled nitric oxide concentration to identify eosinophilic airway inflammation: an observational study in adults with asthma. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1175–9.

# Monitoring of oral and nasal exhaled nitric oxide in eosinophilic chronic rhinosinusitis: A prospective study

Noriaki Noda, M.D., Sachio Takeno, M.D., Ph.D, Takashi Fukuiri, M.D., and Katsuhiko Hirakawa, M.D., Ph.D

## ABSTRACT

**Background:** We aimed to examine the effect of different therapeutic modalities on levels of fractional concentrations of exhaled nitric oxide (FeNO) in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS).

**Methods:** Thirty-six ECRS patients with nasal polyps were treated either medically or surgically. Oral and nasal FeNO levels were measured using an electrochemical NO analyzer initially and at 1 and 6 months. The mRNA expression and localization of nitric oxide synthase (NOS) isoforms in sinus mucosa and nasal polyps were analyzed by real-time polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemistry.

**Results:** The mean oral FeNO levels in the surgical group had decreased significantly from 50.9 to 36.8 ppb 6 months after endoscopic sinus surgery. All patients in this group showed significantly higher nasal FeNO levels after treatment. The mean nasal FeNO levels were 62.3 ppb at 1 month and 93.6 ppb at 6 months. Mean oral and nasal FeNO levels in the medical group after treatment remained unchanged when compared with the baseline levels. Positive immunoreactivity of inducible NOS (iNOS) was observed in both epithelial cells and submucosal inflammatory cells. Real-time PCR analysis showed significant up-regulation of iNOS and IL-5 mRNA expression.

**Conclusion:** A combination of oral and nasal FeNO measurements is useful to monitor the extent of inflammation in CRS patients. The increase in nasal FeNO in the surgical group indicates prompt recovery of NO release from healed sinus mucosa through the opened sinus ostia. Reduction of oral FeNO levels may reflect a cessation of the underlying lower airway inflammation that is characteristic of ECRS.

(Am J Rhinol Allergy 26, 255–259, 2012; doi: 10.2500/ajra.2012.26.3772)

The human paranasal sinuses are the major source of nitric oxide (NO) production and make a large contribution to the NO levels detected in the nasal cavity.<sup>1</sup> In this sense, the monitoring of fractional concentrations of exhaled NO (FeNO) has the potential to be a reliable and noninvasive marker of inflammatory conditions in human nasal airways.<sup>2–5</sup> Nasal NO levels are reported to be decreased in most patients with chronic rhinosinusitis (CRS), but some contradictions remain in the findings, and the results are often heterogeneous.<sup>6–10</sup>

In the present study, we prospectively examined changes in oral and nasal FeNO levels in patients with eosinophilic CRS (ECRS) after different therapeutic modalities. ECRS was summarized as an entity of intractable chronic sinus inflammation accompanied by the infiltration of numerous activated eosinophils in the paranasal sinus mucosa and nasal polyps.<sup>11,12</sup> The phenotype of ECRS is applicable for CRS with nasal polyps in Europe and the United States.<sup>13</sup> There is so far limited information available for changes in FeNO levels after medical or surgical treatment in ECRS patients. We also carried out a molecular analysis of paranasal sinus mucosa. The mRNA expression of three NO synthase (NOS) isoforms and interleukin-5 (IL-5) was quantitatively analyzed by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the immunohistological localization of inducible NOS (iNOS) and endothelial NOS (eNOS) was examined. We found that a combination of the oral and nasal FeNO measurement described here was useful to monitor the clinical course of CRS patients.

## METHODS

### Patients

Thirty-six ECRS patients were recruited into a prospective study of medical ( $n = 12$ ) versus surgical ( $n = 24$ ) therapy. Thirty-two age-matched normal volunteers served as controls. The diagnosis of ECRS was based on the clinical symptoms, endoscopic examination, and CT scanning, in accordance with criteria proposed by the Japanese Rhinological Society.<sup>11,12</sup> All patients had shown multiple nasal polyps and characteristic mucus secretion with high viscosity. None of the patients had received topical or systemic steroids for at least 4 weeks before initial visits. Patients who had undergone previous sinus surgery were excluded. The CT images were subjected to radiological grading using the Lund-Mackay system.<sup>14</sup> The total sinus scores were calculated bilaterally (range from 0 to 24). In the medical group, all patients received a 6-month course of oral antileukotrienes and intranasal corticosteroid preparations. Endoscopic sinus surgery (ESS) was performed on patients in the surgical group under general anesthesia. After the surgery, all patients were prescribed antibiotics for 5–7 days. After discharge, they received the same treatment as the medical group on an outpatient basis. Evaluation of postoperative endoscopic appearance was performed on patients in the surgical group at 6 months.<sup>11</sup> They were classified based on the condition of ethmoid sinus mucosa, *i.e.*, well healed or containing edematous regions. The study protocol was approved by the Institutional Review Board at the Hiroshima University School of Medicine.

### Measurements of NO

Measurements of the FeNO level were performed using a handheld electrochemical analyzer (NObreath, Bedfont Scientific, Ltd., Rochester, U.K.) according to the American Thoracic Society/European Respiratory Society guidelines.<sup>15,16</sup> For oral FeNO measurements, subjects first inhaled ambient air with a nose clip and then exhaled for 16 seconds at a constant flow rate of 50 mL/s through a disposable mouthpiece. For nasal FeNO measurements, subjects were advised to exhale transnasally with their mouth closed into the device with a nose adaptor as described elsewhere.<sup>17</sup> Each measurement was performed in triplicate, and the mean value was used for analysis. The

From the Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Division of Clinical Medical Science, Programs for Applied Biomedicine, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

Funded in part by Grants-in-Aid for Scientific Research, administered by the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Japan (No. 22591900)

The authors have no conflicts of interest to declare pertaining to this article

Address correspondence and reprint requests to Sachio Takeno, M.D., Ph.D., Department of Otolaryngology, Hiroshima University School of Medicine, Kasumi 1-2-3, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan

E-mail address: takeno@hiroshima-u.ac.jp

Copyright © 2012, OceanSide Publications, Inc., U.S.A.

Table 1 Background and baseline characteristics of the study population

	Normal Control	ECRS Patients	
		Medical Group	Surgical Group
No.	32	12	24
Age	50 (30–78)	57.9 (44–77)	56.2 (32–75)
Asthma	—	9	14
CT score	—	14.2 (7–21)	16.9 (10–24)
Oral FeNO (ppb)	14.8 (2–40)	40.1 (8–116)*	50.9 (7–103)*
Nasal FeNO (ppb)	45.4 (15–98)	59.3 (30–123)	50.6 (12–130)

Data are shown as mean with ranges in parenthesis.

\* $p < 0.01$  indicates significant difference compared with the control group. Oral and nasal FeNO values in ECRS patients were measured before treatment. ECRS = eosinophilic chronic rhinosinusitis; FeNO = fractional exhaled nitric oxide.

patients in both groups were examined at pretreatment and 1 and 6 months after treatment.

### Immunohistochemistry

Mucosal specimens from ethmoid sinuses and nasal polyps were obtained from 12 patients in the surgical group at the time of surgery. In each case, the specimens were divided and either fixed in 4% paraformaldehyde for immunohistochemistry or, alternatively, immersed in RNA later solution (Ambion, Austin, TX) for real-time RT-PCR. Punch biopsies from the inferior turbinate were also performed for PCR analysis. Anti-human iNOS (NOS2) mouse monoclonal antibody (clone 2D2-B2) was from R & D Systems (Minneapolis, MN), and anti-human eNOS (NOS3) rabbit polyclonal antibody was from Thermo Scientific (Fremont, CA).

Immunostaining was performed on 5- $\mu$ m-thick cryostat sections. For antigen retrieval, sections were immersed in Histo VT One (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) at 70°C for 40 minutes. The sections were then incubated overnight at 4°C in the presence of the primary antibodies. The color development was performed using the streptavidin-biotin amplification technique (ChemMate EnVision kit; Dako, Glostrup, Denmark). Peroxidase activity was visualized by the diaminobenzidine solution. Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin. Negative controls were performed omitting the primary antibody or using an isotype control antibody from the same species.

### Quantitative Real-Time RT-PCR Analysis

Cellular RNA was isolated using RNeasy mini kits (Qiagen, Valencia, CA). For cDNA synthesis, total RNA was reverse transcribed to cDNA using a High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the instructions supplied by the manufacturer. Gene expression was measured on a 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems) using TaqMan Gene Expression Assays. PCR primers for neuronal NOS (NOS1; Hs00167223\_m1), iNOS (NOS2; Hs01075529\_m1), eNOS (NOS3; Hs01574659\_m1), and IL-5 (Hs00174200\_m1) were used. PCR primers for GAPDH (Hs99999905\_m1) were used as the reference gene. The results were analyzed using the comparative cycle threshold (Ct) method ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). PCR cycles were run in triplicate for each sample. The Ct values for NOS1, NOS2, NOS3, and IL-5 were normalized to the value of GAPDH by calculating the change in Ct ( $\Delta Ct$ ). The mRNA expression levels were then quantified by calculating  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  to account for the exponential amplification of the PCR. For quantification of mRNA levels, the average values obtained from the inferior turbinate were designated as one arbitrary unit.

### Data Analysis

For multiple comparisons, screening of data for differences was first performed using ANOVA. If the analysis gave a significant result, further comparison was performed by the Mann-Whitney U

test for between-group analysis. The comparison between each visit was assessed with the Wilcoxon rank sum test. A value of  $p < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

### Change in FeNO Levels

The baseline characteristics of the study population are summarized in Table 1. No significant difference between the medical and the surgical groups was found in the baseline data of age distribution, proportion of asthma, or total CT scores. The ECRS patients in both groups showed significantly higher oral FeNO levels at pretreatment as compared with the normal group. On the other hand, there was no significant difference in nasal FeNO levels among the three groups.

Oral and nasal FeNO levels were assessed preoperatively and at 1 and 6 months after treatment (Figs. 1 and 2). The mean oral FeNO levels in the medical group after treatment were 44.3 ppb for 1 month and 36.3 ppb for 6 months and did not show a statistically significant difference when compared with the baseline levels. The mean oral FeNO levels in the surgical group were 46.4 ppb at 1 month and 36.8 ppb at 6 months. Twenty of 24 patients in this group showed a reduction in the oral FeNO level at 6 months, and the differences at these postoperative visits were both statistically significant. The mean nasal FeNO levels in the medical group were 59 ppb at 1 month and 62.8 ppb at 6 months and did not show a significant difference when compared with the baseline levels. On the other hand, nasal FeNO levels gradually increased after the ESS procedure in the surgical group. The mean nasal FeNO levels in this group were 62.3 ppb at 1 month and 93.6 ppb at 6 months, and the differences at these visits were both statistically significant. All patients in this group showed higher nasal FeNO levels at the 6-month follow-up when compared with the baseline levels.

In the surgical group, the endoscopic examination revealed edematous mucosa in most patients 1 month after surgery. The findings showed gradual improvement at the 6-month checkup. We compared the findings for the endoscopic appearance and the degree of postoperative FeNO changes in this group (Fig. 3). The examination of the ethmoid sinus mucosa at 6 months revealed 15 patients who were well healed and 9 patients with edematous regions. Well-healed patients tended to show a pronounced reduction in the oral FeNO levels and an increase in the nasal FeNO levels. However, the difference was not significant ( $p = 0.11$  for oral FeNO;  $p = 0.18$  for nasal FeNO).

### Immunohistological Findings

Figures 4 and 5 show representative immunohistological images of the distribution of iNOS<sup>+</sup> and eNOS<sup>+</sup> cells in the ethmoid sinus mucosa and nasal polyps. In general, positive iNOS immunoreactivity was distinctly observed in ciliated epithelial cells, mainly in their

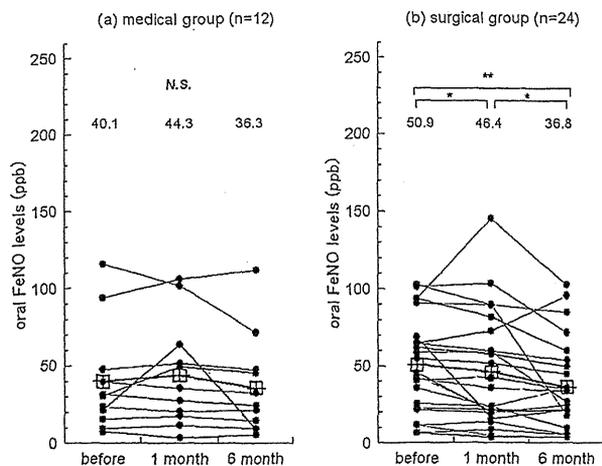


Figure 1. Time-course changes in the level of oral fractional concentration of exhaled nitric oxide (FeNO) in eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS) patients in the (a) medical group and (b) in the surgical group before and at 1 and 6 months after treatment. Time-dependent changes in each patient are indicated by connecting the individual points. Bars indicate mean values. \* $p < 0.5$ ; \*\* $p < 0.01$ .

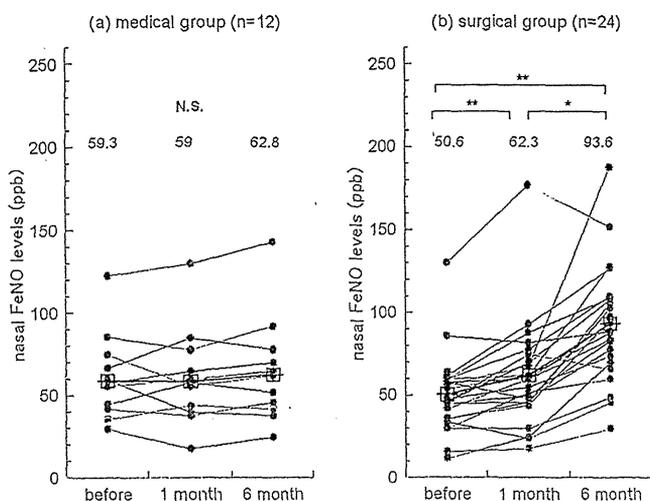


Figure 2. Time-course changes in the level of nasal fractional concentration of exhaled nitric oxide (FeNO) in eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS) patients (a) in the medical group and (b) in the surgical group before and at 1 and 6 months after treatment. Time-dependent changes in each patient are indicated by connecting the individual points. Bars indicate mean values. \* $p < 0.5$ ; \*\* $p < 0.01$ .

cytoplasm. A number of inflammatory cells, more or less widespread in the submucosal area, with eosinophils being predominant in the ethmoid sinus mucosa, also revealed positive staining. On the other hand, eNOS expression was constantly found to be positive in ciliated epithelial cells and endothelial cells around the capillary vessels. No significant eNOS staining was observed in submucosal inflammatory cells.

### Real-Time RT-PCR Analysis

Quantitative real-time PCR was conducted to determine three NOS isoforms and IL-5 mRNA levels (Fig. 6). The ECRS patients showed significant up-regulation of iNOS and IL-5 mRNA expression in both ethmoid sinus mucosa and nasal polyps when compared with the inferior turbinate. On the other hand, mRNA levels for neuronal NOS (nNOS) and eNOS showed similar profiles to those of the inferior turbinate. In addition, a statistically significant difference was seen in

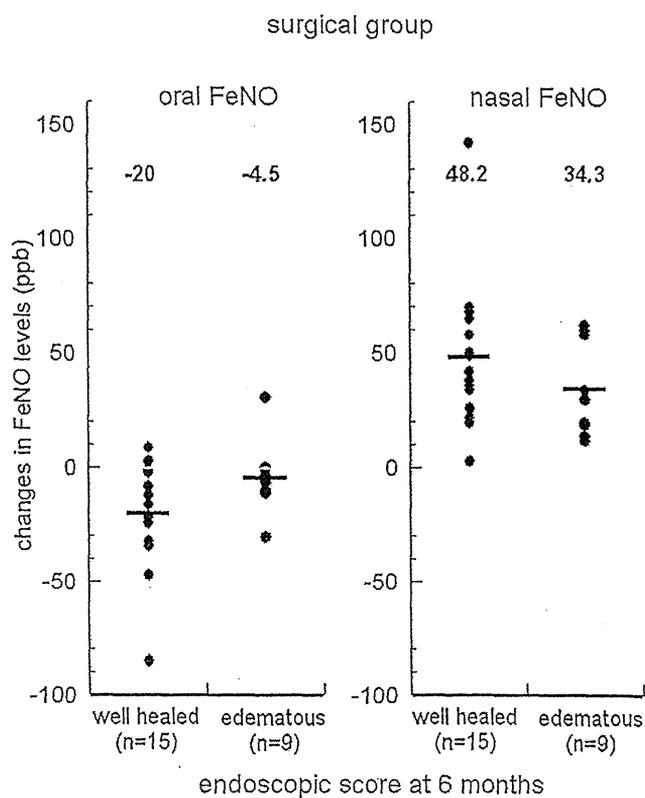


Figure 3. Comparison of the endoscopic appearance and the degree of post-operative fractional concentration of exhaled nitric oxide (FeNO) changes in the surgical group. Bars indicate mean values.

the level of iNOS mRNA expression from these patients, with ethmoid sinus mucosa showing higher levels of mRNA expression compared with nasal polyps.

### DISCUSSION

In this study, both upper and lower airway FeNO levels were measured sequentially in a short period of time using a handheld analyzer. Several reports indicate that nasal exhaled NO tends to decrease in patients with acute and chronic sinusitis, mainly because of hampered ventilation of gaseous NO through occluded sinus ostia.<sup>6,18,19</sup> Weschta *et al.*<sup>19</sup> recently assessed oral and nasal FeNO levels in CRS patients using a handheld NO analyzer. They found that, in CRS patients, mean oral FeNO (23.9 ppb) was higher than in controls (15.6 ppb), whereas CRS patients with nasal polyps had lower nasal FeNO levels (19.7 ppb) than did healthy controls (40.3 ppb). The results of previous studies on FeNO levels are in line with those of the present study. We also found significantly higher oral FeNO levels at pretreatment in the ECRS patients when compared with those in normal subjects. On the other hand, there was no significant difference in the nasal FeNO levels among the three groups. We consider that the unchanged nasal FeNO levels in ECRS patients despite impaired sinus ostial patency before treatment might be related to augmented NO production in the inflamed paranasal sinus mucosa. This idea is supported by the present immunohistological and RT-PCR findings, which indicated the consistent expression of increased iNOS activity in the sampled specimens. Elevated levels of oxidized NO metabolites such as nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), and peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) have been detected in CRS patients.<sup>20</sup> Such an amount of NO metabolites could be autotoxic for the surrounding epithelium and lead to persistency of the disease.

The beneficial outcomes of ESS have been well described in ECRS patients.<sup>21</sup> In addition, to prevent disease recurrence, supplementary

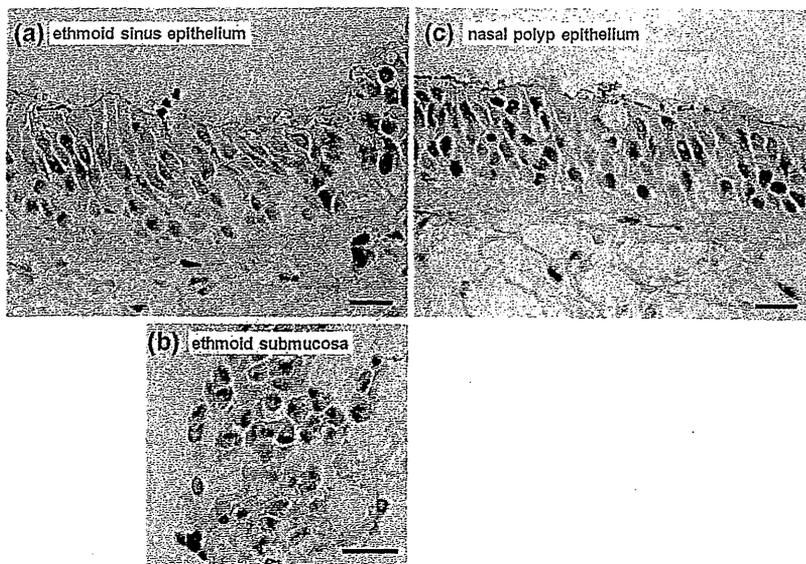


Figure 4. Immunohistological photographs of inducible nitric oxide synthase (iNOS; NOS2) expression in the ethmoid sinus mucosa and nasal polyps sampled from a patient in the surgical group. Ciliated epithelial cells and inflammatory cells are stained positively. (b) Note that iNOS<sup>+</sup> inflammatory cells are scattered predominantly in the ethmoid sinus mucosa (scale bar = 20  $\mu$ m).

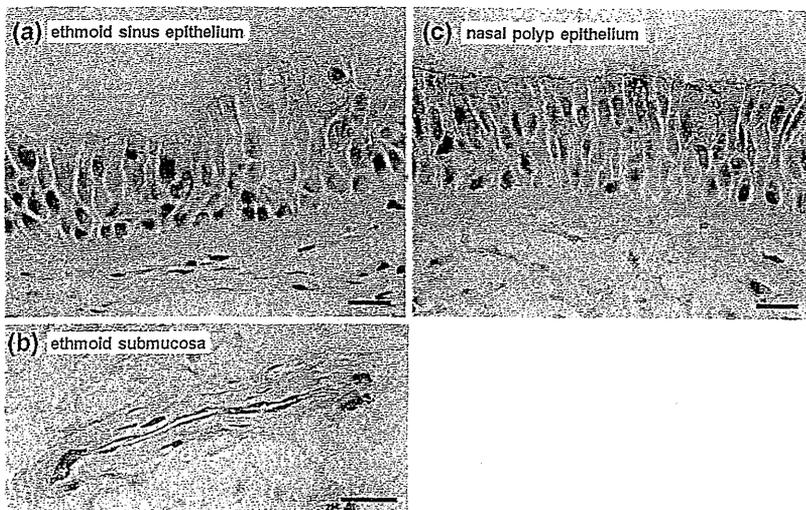


Figure 5. Immunohistological photographs of endothelial nitric oxide synthase (eNOS; NOS3) expression in the ethmoid sinus mucosa and nasal polyps sampled from a patient in the surgical group. (a and c) Ciliated epithelial cells and (b) vascular endothelial cells are stained positively (scale bar = 20  $\mu$ m).

medical treatment such as the use of topical steroids and antileukotrienes is often necessary. Therefore, the time course measurement of FeNO levels may provide an objective tool for evaluating the therapeutic response of ECRS. Ragab *et al.*<sup>22</sup> found an inverse correlation between nasal NO levels and the extent of sinus disease in untreated CRS patients. In their study, after both medical and surgical treatment, the percentage rise in nasal NO levels correlated with changes in symptom scores, endoscopic changes, and surgical scores. However, there was no significant correlation with age, sex, smoking status, or allergy. In the present study, the nasal FeNO levels in the ECRS patients also increased as a consequence of a combination of medical and surgical therapies, thus suggesting that treatment may result in recovery of a high output NO level from constitutive sources.<sup>8</sup> It could be anticipated that the ciliated epithelium of the paranasal sinuses regained its normal ability to produce NO that passed through the sinus ostia.

The higher prevalence of bronchial asthma in ECRS patients was associated with increased oral FeNO levels than those in normal controls (mean, 46.8 ppb versus 14.8 ppb). This represents a larger production of endogenous NO derived from lower airways in these patients. Interestingly, the mean oral FeNO levels in the surgical group showed a significant reduction of >20% at 6 months. The results are consistent with a recent study by Delclaux *et al.*<sup>23</sup> showing improvement in nasal polyposis after treatment not only to increase

nasal but also to decrease bronchial NO concentrations. The interpretation of oral FeNO levels for clinical applications is a topic gaining a lot of attention. The recent American Thoracic Society guidelines suggest a reduction of at least 20% or >10 ppb in FeNO to indicate a significant response to anti-inflammatory therapy from one visit to the next.<sup>24</sup> However, further studies are required to objectively assess time-course changes in the lower airway function in these patients.

In the present study, ECRS patients showed increased iNOS and IL-5 mRNA expression. On the other hand, mRNA levels for constitutive NOS isoforms appeared to be unchanged. NO in human paranasal sinuses is mainly produced by iNOS activities by the ciliary epithelium under normal conditions and by inflammatory cells in inflammation. The epithelial iNOS expression seems to be necessary for maintaining ciliary beat frequency at a level sufficient for optimal mucociliary clearing function.<sup>1,20,25</sup> Naraghi *et al.*<sup>25</sup> propose that in rhinosinusitis, iNOS expression in epithelial cells decreases, but NO production by iNOS in inflammatory cells increases significantly. In such a process, the local deposition of NO and its metabolites tends to increase Th2 cells that promote adherence and accumulation of eosinophils through the release of IL-4 and IL-5.<sup>26,27</sup> We hypothesize that pathological events that occur in ECRS may be partly related to this mechanism. As previously described, a high amount of NO may dissolve and metabolize in the acidic aqueous environment of the sinuses.<sup>25</sup>

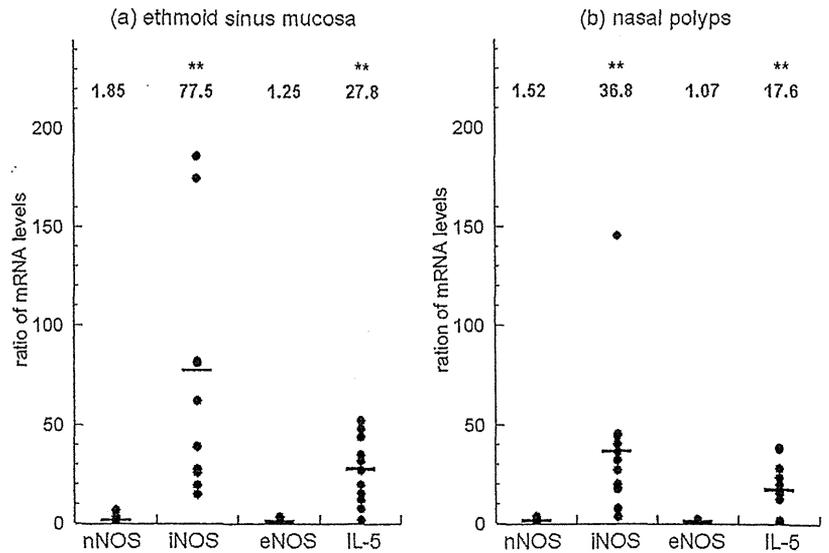


Figure 6. Comparison of mRNA expression in ethmoid (a) sinus mucosa and (b) nasal polyps from eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS) patients by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The mRNA levels of nNOS (NOS1), inducible nitric oxide synthase (iNOS; NOS2), l NOS (eNOS; NOS3), and interleukin (IL)-5 are normalized to GAPDH and expressed as ratios relative to controls (inferior turbinate mucosa; bars indicate mean values; \*\* $p < 0.01$ ).

The results of the present study imply a variety of roles of NO in the human nose and paranasal sinuses relevant to airway defense mechanisms, as well as being an inflammatory mediator. The establishment of standardized nasal NO measurements in CRS patients will be of great value to assess healing processes in relation to the underlying inflammatory status.

## CONCLUSION

We prospectively examined the effect of different therapeutic modalities on FeNO levels in ECRS patients. The patients in the surgical group showed a significant increase in nasal FeNO levels from the baseline, indicating the prompt recovery of NO release from healed sinus mucosa. The reduction of oral FeNO levels in this group may also reflect a cessation of the underlying inflammation in the lower airway that is characteristic of ECRS.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Ai Kashima for the technical assistance.

## REFERENCES

- Lundberg JO, Farkas-Szallasi T, Weitzberg E, et al. High nitric oxide production in human paranasal sinuses. *Nat Med* 1:370-373, 1995.
- Kharitonov SA, and Barnes PJ. Exhaled biomarkers. *Chest* 130:1541-1546, 2006.
- Pizzimenti S, Bugiani M, Piccioni P, et al. Exhaled nitric oxide measurements: Correction equation to compare hand-held device to stationary analyzer. *Respir Med* 102:1272-1275, 2008.
- Barnes PJ, Dweik RA, Gelb AF, et al. Exhaled nitric oxide in pulmonary diseases: A comprehensive review. *Chest* 138:682-692, 2010.
- Bukstein D, Luskin AT, and Brooks EA. Exhaled nitric oxide as a tool in managing and monitoring difficult-to-treat asthma. *Allergy Asthma Proc* 32:185-192, 2011.
- Lindberg S, Cervin A, and Runer T. Nitric oxide production in the upper airways is decreased in chronic sinusitis. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 117:113-117, 1997.
- Rolla G, Guida G, Heffler E, et al. Diagnostic classification of persistent rhinitis and its relationship to exhaled nitric oxide and asthma: A clinical study of a consecutive series of patients. *Chest* 131:1345-1352, 2007.
- Scadding G. Nitric oxide in the airways. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 15:258-263, 2007.
- Maniscalco M, Sofia M, and Pelaia G. Nitric oxide in upper airways inflammatory diseases. *Inflamm Res* 56:58-69, 2007.
- Guida G, Rolla G, Badiu I, et al. Determinants of exhaled nitric oxide in chronic rhinosinusitis. *Chest* 137:658-664, 2010.
- Haruna S, Otori N, Moriyama H, et al. Olfactory dysfunction in sinusitis with infiltration of numerous activated eosinophils. *Auris Nasus Larynx* 33:23-30, 2006.
- Takeo S, Hirakawa K, and Ishino T. Pathological mechanisms and clinical features of eosinophilic chronic rhinosinusitis in the Japanese population. *Allergol Int* 59:247-256, 2010.
- Meltzer EO, Hamilos DL, Hadley JA, et al. Rhinosinusitis: Developing guidance for clinical trials. *J Allergy Clin Immunol* 118:S17-S61, 2006.
- Lund VJ, and Mackay IS. Staging in rhinosinusitis. *Rhinology* 31:183-184, 1993.
- American Thoracic Society; European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 171:912-930, 2005.
- Antus B, Horvath I, and Barta I. Assessment of exhaled nitric oxide by a new hand-held device. *Respir Med* 104:1377-1380, 2010.
- Takeo S, Noda N, and Hirakawa K. Measurements of nasal fractional exhaled nitric oxide with a hand-held device in patients with allergic rhinitis: Relation to cedar pollen dispersion and laser surgery. *Allergol Int* 61:93-100, 2012.
- Lundberg JO, Maniscalco M, Sofia M, et al. Humming, nitric oxide, and paranasal sinus obstruction. *JAMA* 289:302-303, 2003.
- Weschta M, Deutschle T, and Riechelmann H. Nasal fractional exhaled nitric oxide analysis with a novel hand-held device. *Rhinology* 46:23-27, 2008.
- Schlosser RJ, Spotnitz WD, Peters EJ, et al. Elevated nitric oxide metabolite levels in chronic sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 123:357-362, 2000.
- Haruna S, Shimada C, Ozawa M, et al. A study of poor responders for long-term, low-dose macrolide administration for chronic sinusitis. *Rhinology* 47:66-71, 2009.
- Ragab SM, Lund VJ, Saleh HA, et al. Nasal nitric oxide in objective evaluation of chronic rhinosinusitis therapy. *Allergy* 61:717-724, 2006.
- Delclaux C, Malinvaud D, Chevalier-Bidaud B, et al. Nitric oxide evaluation in upper and lower respiratory tracts in nasal polyposis. *Clin Exp Allergy* 38:1140-1147, 2008.
- Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, et al. An official ATS clinical practice guideline: Interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *Am J Respir Crit Care Med* 184:602-615, 2011.
- Naraghi M, Deroee AF, Ebrahimkhani M, et al. Nitric oxide: A new concept in chronic sinusitis pathogenesis. *Am J Otolaryngol* 28:334-337, 2007.
- Berry MA, Shaw DE, Green RH, et al. The use of exhaled nitric oxide concentration to identify eosinophilic airway inflammation: An observational study in adults with asthma. *Clin Exp Allergy* 35:1175-1179, 2005.
- Abba AA. Exhaled nitric oxide in diagnosis and management of respiratory diseases. *Ann Thorac Med* 4:173-181, 2009. □

# 難治性副鼻腔炎における アレルギー性ムチンより検出された真菌菌種の検討

石野 岳志      竹野 幸夫      平川 勝洋

広島大学大学院 医学部 病態制御医科学講座 耳鼻咽喉科学

Fungus species isolated from allergic mucin in intractable sinusitis.

Takashi ISHINO, Sachio TAKENO, Katsuhiko HIRAKAWA

Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University

Although the diagnostic significance of eosinophilic inflammation has been studied in intractable sinusitis, including both allergic fungal rhinosinusitis and eosinophilic sinusitis, little is known about the mechanisms by which fungal species induce eosinophilic inflammation. In this study, we examined the association between the isolated fungus species and disease prevalence of another mycosis. Fourteen fungus species, including 6 *Aspergillus* sp, were isolated from the cultures of 32 samples of allergic mucin from 9 patients. These included 12 funguses (85.7%) that contain pathogens related to other sicknesses, including 3 skin mycosis and 9 upper and/or inferior respiratory sickness pathogens. The 9 funguses that are correlated with upper and/or inferior respiratory sickness included 7 funguses which induce allergic bronchopulmonary mycosis and 6 funguses that were recognized by the antigen and *Alternaria alternate*, whose protease has been recognized as an eosinophilic activator and degranulator. These results suggested that most of the isolated funguses (85.7%) containing pathogens and the 9 funguses (64.2%) that correlated with upper and/or inferior respiratory sickness had direct and/or indirect abilities to induce eosinophilic inflammation. Researching the pathogen-inducing mechanisms by these funguses will be a key to revealing the molecular-biological mechanisms by which eosinophilic inflammation is induced in intractable sinusitis.

## はじめに

難治性副鼻腔炎として、好酸球性鼻副鼻腔炎、アレルギー性真菌性鼻副鼻腔炎が鼻科学的に近年話題となっているが、これら疾患において好酸球性炎症が病態形成に深く関与していることが知ら

れている<sup>1) 2)</sup>。これら難治性副鼻腔炎ではアレルギー性ムチンを認めるのが特徴的であり、好酸球性炎症がその病態形成に関与していることが知られている。その好酸球性炎症が誘導される機序はまだ詳細には解明されていないものの、複数の

因子が関与するとされ<sup>3) 4)</sup>, 真菌もその一因であることが報告されている<sup>5) 6)</sup>. しかしながら, 健康人の鼻内にも真菌が普遍的に認められることも知られており<sup>7)</sup>, 真菌がこれら難治性副鼻腔炎の病態にどうかかわっているか, 現在までまだ詳細な機序は不明なままである. 一方, 真菌による好酸球性炎症の誘導は上気道だけではなく, 下気道においても認められており, 下気道において関連する疾患としては気管支喘息, アレルギー性気管支肺真菌症があげられ, 病態も上気道病変であるアレルギー性鼻炎, 好酸球性鼻副鼻腔炎, アレルギー性真菌性鼻副鼻腔炎に類似している. このため, 今回これら難治性副鼻腔炎に認められるアレルギー性ムチンから真菌培養を行い, 培養された真菌が他の真菌症で過去に報告された起炎菌であるかどうか, さらに好酸球性疾患発症との関連性があるかどうかについて検討を行い, 真菌の難治性副鼻腔炎への病態形成の可能性について検討および考察した.

## 方 法

通常の治療に抵抗性の難治性副鼻腔炎症例9例(男性4人, 女性5人, 29 - 71歳)におけるアレルギー性ムチン32検体を用い, 培養方法により培養されにくい真菌が存在することも考慮し, 3種類の 방법으로真菌培養を行った. 培養方法: ①Ponikauらの方法<sup>8)</sup>に準じ, アレルギー性ムチンを同量の10% sputolysin 溶液(Calbiochem: dithiothreitol)で溶解し, 30分ボルテックスで攪拌した後, 1500回転5分間遠心分離を行い, 上清液を培地に播種. ②アレルギー性ムチンを直接培地に塗布. ③鼻汁を同量の0.1mM EDTA(Sigma), 0.1% Collagenase(WAKO), 0.5% Tween80(Sigma) PBS溶液に懸濁し, 1500回転5分間遠心分離し, 上清液を培地に播種. 培養はサブロー培地, ポテトアガロース培地, M40Yの3種の培地で行い, 95% air, 5% CO<sub>2</sub>, 38度にて最大4週間まで培養を行った. この際単一の真菌が増殖することで病態を形成することを想定し, 偶然の

真菌の付着を否定するために, 同一形態を呈するコロニーが複数認められた場合のみ, 関与が疑われる真菌と判断することにした. 培養された真菌は千葉大学真菌医学研究センター(ファーストラボラトリーズ)に送付し, 真菌菌種の同定を行った.

## 結 果

同定できた真菌菌種は14種で, 菌種としてはアスペルギルス属が多数を占めた(6/14: 42%) (Table 1). また真菌の病原性につき, 他科での報告と比較検討すると, 菌種の多く(12/14: 85.7%)が多部位での感染症に関与することが認められた. これらのうち3種(21.4%)は皮膚真菌症に関連する真菌<sup>9) 10) 11)</sup>で, 9種(64.2%)は上気道あるいは下気道疾患と関連する真菌であった. さらに培養真菌のうち, アレルギー性気管支肺真菌症(ABPM)で報告された真菌<sup>12) 13)</sup>: 7種, アレルゲンとして認められている真菌<sup>14-18)</sup>: 6種認められ, 上気道あるいは下気道疾患と関連する真菌9種はこれら真菌と一致していた. また産生されるプロテアーゼ, フィターゼがアレルゲンとして認められている真菌<sup>14) 15) 17)</sup>は4種であった.

## 考 察

今回の真菌培養で同定できた真菌菌種は14種で, 菌種としては *Aspergillus* 属が多数を占めた(6/14: 42%). この *Aspergillus* 属に属する真菌は約200種あることが知られており<sup>19) 20)</sup>, 空気中に認められる主な一般真菌であるとされる. 今回アレルギー性ムチンから培養できた *Aspergillus* 属以外の真菌も, 空気中に存在する一般真菌であり, 今回の培養で認められた真菌の多くは空気中の一般真菌が由来であると考えられた. これは健康人における鼻洗浄液で認められる真菌の由来と同様でもあり<sup>7)</sup>, この結果のみではこれら真菌が難治性副鼻腔炎に対して, 病原性を示す証拠とはなりえないと考えられる. しかしながら, *Aspergillus* 属は空気中に存在する主な一般真菌であるにも関わらず, 病原性を示すものは約200

Table 1 Fungus species cultured from allergic mucin in intractable sinusitis.

No fungus was detected in two patients. 12 funguses had the pathogens to the other mycosis and sickness and 9 funguses concerning with upper and/or inferior respiratory sickness may induces allergic sickness. ABPM, allergic broncho-pulmonary mucosis; AFRS, allergic fungal rhinosinusitis; AR, allergic rhinitis.

Fungus species	No. of Patients	Associated diseases				Antigen	Eosinophilic-inflammation inducer
		ABPM	AFRS	Asthma or AR	Other mycosis		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	○				○ (protease)	
<i>Aspergillus terreus</i>	1	○					
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	1				otomycosis		
<i>Aspergillus versicolor</i>	1	○				○ (protease)	
<i>Aspergillus niger</i>	1	○	○			○ (phytase)	
<i>Aspergillus sydowii</i>	2				onychomycosis		
<i>Alternaria alternata</i>	1		○	○		○	○
<i>Fusarium incarnatum</i>	1						
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	○	○			○ (protease)	
<i>Schizophyllum commune</i>	1	○					
<i>Phialophora richardsiae</i>	1				phaeohyphomycosis		
<i>Paecilomyces variotii</i>	1	○					
<i>Acremonium sp</i>	1			○		○	
<i>Eutypella sp</i>	1						

種のうちの一部であることが知られ、下気道疾患で認められた *Aspergillus* の95%以上はこれら病原性を有するものであったことも報告されている<sup>21-29)</sup>。このため、今回培養できた真菌を病原性の有無の観点で検討を行なったところ、14種中12種(85.7%)が真菌症の起炎菌であることが判明し、培養された真菌の多くが病原性を有していることが認められた。この結果から、難治性副鼻腔炎のアレルギー性ムチンから培養される真菌は、必ずしも空气中に普遍的に認められる真菌であるとはいえず、むしろある種の病原性を有したものがアレルギー性ムチン内に定着したのか、あるいは、これら真菌が病原性を有するために難治性副鼻腔炎を引き起こした可能性が考えられた。さらに、これらのうち3種(21.4%)は皮膚真菌症に関連する真菌で、9種(64.2%)は上下気道疾患

と関連する真菌であった。この上下気道疾患と関連する真菌9種のうち、アレルギー性気管支肺真菌症(ABPM)で報告された真菌は7種、アレルゲンとして認められている真菌は6種認められ、これらに属さない真菌は認められなかったことから、培養された上下気道疾患と関連する真菌9種は、いずれも好酸球性炎症と関連する真菌であることが認められた。また、アレルゲンとして認識される真菌のうち4種は真菌から産生されるプロテアーゼ、フィターゼが抗原となることが報告されており、*Alternaria alternata* においてはプロテアーゼが好酸球の活性化や脱顆粒を誘導することで好酸球性炎症に影響を及ぼすことも報告されている<sup>30)</sup>。これらのことから、今回の培養真菌について検討すると、アレルギー性ムチン内に認められた真菌は、好酸球性炎症と関連する

真菌が多く、その病原性を考慮すると、これら真菌が偶然ムチン中に定着したと考えるより、これら真菌が難治性副鼻腔炎を引き起こしている可能性が高いことが想定された。この真菌による病態形成においては、真菌からのプロテアーゼなどの産生産物が抗原として好酸球炎症に関与するとともに、間接的にも好酸球性炎症の増悪に関与している場合があると考えられ、難治性副鼻腔炎に認められる真菌の多くは直接的にあるいは間接的に好酸球性炎症を誘導することで、病態を形成していることが想定された。また、過去には今回の培養菌種とは異なる真菌においてではあるが、真菌からの産生産物によっては、スーパー抗原と類似の反応を引き起こすものがあることも報告されており<sup>31)</sup>、好酸球性炎症と関連のない真菌においても、真菌種によっては産生産物がスーパー抗原と類似の反応などを引き起こして病状を増悪させている可能性も考えられた。このため、難治性副鼻腔炎における病態を解明するためには、真菌感染の側面でも、さらに検討を行う必要があると考えられる。しかしながら、プロテアーゼなどの真菌からの産生産物の産生能は真菌の培養環境に左右されること<sup>32)</sup>や真菌の属種が同一であっても株により異なることが知られているため、実際に真菌が難治性副鼻腔炎の病態形成に関与するかどうかを検討するためには、検体から分離された真菌株を用いて好適環境で培養を行って検討を行う必要があると考えられる。現在までのところ、このような側面を考慮した検討が未だ行っていないため、難治性副鼻腔炎に対する真菌の関与については詳細がまだ不明なままであるが、今回の培養において、分離された真菌の85.7%が病原性を有し、さらに好酸球性炎症に関連する真菌が培養真菌の64.2%を占めていたことなどから、分離真菌の多くがなんらかの形で病態形成に関与することが想定され、これら真菌による病態形成機構をさらに検討することが難治性副鼻腔炎の病態解明の一助となると考えられた。

## 参 考 文 献

- 1) Fokkens W, Lund V, Mullol J. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007. *Rhinol Suppl*; (20): 1-136. 2007
- 2) Takeno S, Hirakawa K, Ishino T. Pathological mechanisms and clinical features of eosinophilic chronic rhinosinusitis in the Japanese population. *Allergol Int*; 59(3): 247-56. 2010
- 3) Schubert MS. A superantigen hypothesis for the pathogenesis of chronic hypertrophic rhinosinusitis, allergic fungal sinusitis, and related disorders. *Ann Allergy Asthma Immunol*; 87(3): 181-8. 2001
- 4) Kern RC, Conley DB, Walsh W, et al. Perspectives on the etiology of chronic rhinosinusitis: an immune barrier hypothesis. *Am J Rhinol*; 22(6): 549-59. 2008
- 5) Inoue Y, Matsuwaki Y, Shin SH, et al. Non-pathogenic, environmental fungi induce activation and degranulation of human eosinophils. *J Immunol*; 175(8): 5439-47. 2005
- 6) Collins M, Nair S, Smith W, et al. Role of local immunoglobulin E production in the pathophysiology of noninvasive fungal sinusitis. *Laryngoscope*; 114(7): 1242-6. 2004
- 7) Braun H, Buzina W, Freudenschuss K, et al. 'Eosinophilic fungal rhinosinusitis': a common disorder in Europe? *Laryngoscope*; 113(2): 264-9. 2003
- 8) Ponikau JU, Sherris DA, Kern EB, et al. The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis. *Mayo Clin.Proc*; 74: 877-84. 1999
- 9) Harima N, Inoue T, Kubota T, et al. A case of otomycosis caused by *Aspergillus sclerotiorum*. *J Dermatol*; 31(11): 949-50. 2004
- 10) Takahata Y, Hiruma M, Sugita T, et al. A case of onychomycosis due to *Aspergillus*

- sydowii diagnosed using DNA sequence analysis. *Mycoses* ; 51(2) : 170-3. 2008
- 11) Tam M, Freeman S. Phaeohyphomycosis due to *Phialophora richardsiae*. *Australas J Dermatol* ; 30(1) : 37-40. 1989
  - 12) Tashiro T, Izumikawa K, Tashiro M, et al. Diagnostic significance of *Aspergillus* species isolated from respiratory samples in an adult pneumology ward. *Med Mycol* ; 49(6) : 581-7. 2011
  - 13) Akhunova AM. Infectious-allergic bronchopulmonary paecilomycosis. *Ter Arkh* ; 63(10) : 19-24. 1991
  - 14) Shen HD, Tam MF, Tang RB, et al. *Aspergillus* and *Penicillium* allergens: focus on proteases. *Curr Allergy Asthma Rep* ; 7(5) : 351-6. 2007
  - 15) Doekes G, Kamminga N, Helwegen L, et al. Occupational IgE sensitisation to phytase, a phosphatase derived from *Aspergillus niger*. *Occup Environ Med* ; 56(7) : 454-9. 1999
  - 16) Beezhold DH, Green BJ, Blachere FM, et al. Prevalence of allergic sensitization to indoor fungi in West Virginia. *Allergy Asthma Proc* ; 29(1) : 29-34. 2008
  - 17) Chou H, Tam MF, Lee LH, et al. Vacuolar serine protease is a major allergen of *Cladosporium cladosporioides*. *Int Arch Allergy Immunol* ; 146(4) : 277-86. 2008
  - 18) An P, Barron-Casella EA, Strunk RC, et al. Elevation of IgE in children with sickle cell disease is associated with doctor diagnosis of asthma and increased morbidity. *Allergy Clin Immunol* ; 127(6) : 1440-6. 2011
  - 19) Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* ; 22 : 447-465. 2009
  - 20) Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, et al. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud Mycol* ; 59 : 1-10. 2007
  - 21) Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* ; 26 : 781-803. 1998
  - 22) Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, et al. *Aspergillus flavus* : human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* ; 153 : 1677-1692. 2007
  - 23) Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH. *Aspergillus flavus* : an emerging non-*fumigatus* *Aspergillus* species of significance. *Mycoses* ; 52 : 206-222. 2009
  - 24) Hachem RY, Kontoyiannis DP, Boktour MR, et al. *Aspergillus terreus* : an emerging amphotericin B-resistant opportunistic mold in patients with hematologic malignancies. *Cancer* ; 101 : 1594-1600. 2004
  - 25) Baddley JW, Pappas PG, Smith AC, et al. Epidemiology of *Aspergillus terreus* at a university hospital. *J Clin Microbiol* ; 41 : 5525-5529. 2003
  - 26) Saraceno JL, Phelps DT, Ferro TJ, et al. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: approach to management. *Chest* ; 112 : 541-548. 1997
  - 27) Severo LC, Geyer GR, Porto NS, et al. Pulmonary *Aspergillus niger* intracavitary colonization. Report of 23 cases and a review of the literature. *Rev Iberoam Micol* ; 14 : 104-110. 1997
  - 28) Walsh TJ, Groll AH. Overview: non-*fumigatus* species of *Aspergillus* : perspectives on emerging pathogens in immunocompromised hosts. *Curr Opin Investig Drugs* ; 2 : 1366-1367. 2001
  - 29) Baddley JW, Marr KA, Andes DR, et al. Patterns of susceptibility of *Aspergillus* isolates recovered from patients enrolled in the Transplant-Associated Infection Surveil-

lance Network. J Clin Microbiol ; 47 : 3271-3275. 2009

- 30) Matsuwaki Y, Wada K, White TA, et al. Recognition of fungal protease activities induces cellular activation and eosinophil-derived neurotoxin release in human eosinophils. J Immunol ; 183(10) : 6708-16. 2009
- 31) Devore-Carter D, Kar S, Vellucci VJ, et al. Superantigen-like effects of a Candida albicans polypeptide. Infect Dis ; 197(7) : 981-9. 2008
- 32) Talabardon M, Yang ST. Production of GFP and glucoamylase by recombinant Aspergillus niger: effects of fermentation conditions on fungal morphology and protein secretion. Biotechnol Prog ; 21(5) : 1389-400. 2005

連絡先：石野岳志

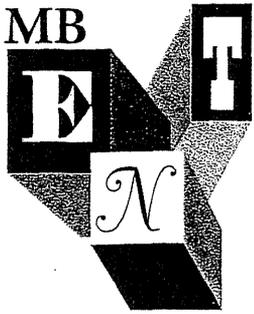
〒734-8551

広島市南区霞1-2-3

広島大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室

TEL 082-257-5252 FAX 082-257-5254

E-mai takashiishino@hotmail.com



◆特集・副鼻腔気管支症候群と喘息との違いは？

# 喘息に伴う慢性副鼻腔炎の病態と治療

竹野幸夫\*<sup>1</sup> 樽谷貴之\*<sup>2</sup>

**Abstract** 気管支喘息と副鼻腔炎の間には、one airway one disease の観点からも両者の発症には深い関連があり、副鼻腔炎を加療することにより喘息は改善すると AAAAI でも報告されている。増悪要因としては、粘液線毛輸送機能の障害、好酸球関連サイトカインの産生亢進、生理的鼻呼吸の障害、などがある。好酸球性副鼻腔炎は、副鼻腔粘膜に著明な好酸球浸潤を伴う易再発性の慢性副鼻腔炎の総称であり、喘息に合併する副鼻腔炎の代表である。全国調査の解析結果から診断基準に有用な項目として、両側性の副鼻腔罹患、鼻茸の存在、嗅覚障害の合併、血液好酸球率、画像陰影の重症度、合併疾患としての中耳炎、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、薬物アレルギーなどの存在が判明している。本疾患に対しては薬物療法と同時に、手術療法である内視鏡下副鼻腔手術(ESS)が施行される場合も多く、術後の呼吸機能やステロイド使用量の変化などの観点から喘息に対する一定の評価もなされつつある。

**Key words** 気管支喘息(bronchial asthma), 副鼻腔炎(rhinosinusitis), 好酸球性副鼻腔炎(eosinophilic chronic rhinosinusitis), 内視鏡下鼻内手術(ESS), 薬物療法(medical treatment), one airway one disease

## 気管支喘息患者における慢性副鼻腔炎病態

鼻副鼻腔は上気道を構成する呼吸器官であり、下気道の気管支・肺病変との間でお互いに影響を及ぼしあう可能性については従来から指摘されており、“one way one disease” の概念が確立している。気管支喘息と副鼻腔炎の関連性について American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (AAAAI) によるレポートでは、因

果関係の機序は不明であるが喘息と鼻茸を伴う副鼻腔炎の発症には深い関連があり、副鼻腔炎を加療することにより喘息は改善する、と報告されている<sup>1)</sup>。

気管支喘息は発作性の気道収縮と吸入刺激に対する気道の過敏性により特徴づけられる慢性の気道炎症疾患と定義される。副鼻腔炎病態が下気道に影響し気管支喘息の発症や増悪因子となる機序としては、これまでに表1のようなものが提唱さ

表 1. 副鼻腔炎病態が下気道に影響する機序

1. 粘液線毛輸送機能(mucociliary clearance system)の障害による、気管・気管支の輸送排泄機能の低下
2. 副鼻腔粘膜で産生されているサイトカインやアラキドン代謝産物が、好酸球の分化成熟に好都合な微小環境を創造し、下気道への浸潤を促進
3. 神経原性反射の存在(鼻気管支反射: nasal bronchial reflex)
4. 後鼻漏の下気道への流入による影響
5. 鼻閉などによる生理的鼻呼吸の障害

\*<sup>1</sup> Takeno Sachio, 〒734-8851 広島市南区霞 1-2-3 広島大学大学院医歯薬総合研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科, 准教授

\*<sup>2</sup> Taruya Takayuki, 同科

れている。粘液線毛輸送機能(mucociliary clearance system)の観点からみても、気管支喘息患者では正常人に比較して、気管・気管支粘膜上皮における輸送機能の低下が報告されており、特に発作期にはその障害が増悪する。また慢性副鼻腔炎患者における粘液輸送機能の低下は、洞内病変を遷延化させる重要な因子である。両者の合併例では、組織学的に粘膜上皮の杯細胞化生と著明な好酸球浸潤が特徴的であり、臨床的に非常に粘稠な貯留液を伴い吸引除去に難渋することが多い<sup>2)</sup>。また両疾患における病態の中心となる好酸球性炎症に関しては、副鼻腔局所で産生されているサイトカインやアラキドン代謝産物が、好酸球前駆細胞の分化成熟に好都合な微小環境を創造し、他の気道粘膜への浸潤を促進している可能性も指摘されている<sup>3)4)</sup>。さらに慢性的な鼻閉などで鼻呼吸障害を生じ、生理的な吸気の加湿・加温や防塵機能の低下により下気道の保護作用が妨げられる点も指摘されている。

本稿では喘息に伴う慢性副鼻腔炎の病態と治療という主題で、その病態生理と疫学的特徴を踏まえつつ、①好酸球性副鼻腔炎という臨床概念とその病態背景、②気管支喘息と副鼻腔炎の疫学、③好酸球性副鼻腔炎の薬物療法、④喘息症状に対する手術療法の効果について、に関して当科の成績を交えつつ紹介していきたいと思う<sup>5)</sup>。

### 好酸球性副鼻腔炎の概念

気管支喘息に合併する副鼻腔炎の代表が好酸球性副鼻腔炎である。本疾患は、「副鼻腔粘膜または鼻ポリープに著明な好酸球浸潤を伴う易再発性の慢性副鼻腔炎の総称である」と総括されている。その臨床像としては、①著明な副鼻腔粘膜への好酸球浸潤を特徴とする、②成人発症で両側罹患例が多い、③浮腫状の鼻茸の多発と粘稠な鼻汁がしばしば存在する、④アレルギー性鼻炎(アトピー素因)の関与は問わない、⑤解剖学的構造異常よりむしろ篩骨洞を中心とした粘膜病変が主体である、⑥下気道病変の合併が多い、⑦病状早期より、

嗅覚障害を訴える、などが挙げられている<sup>5)6)</sup>。このように好酸球性副鼻腔炎は従来型の化膿性副鼻腔炎とは異なる多くの臨床症状を有している。また下気道病変の合併については、下気道過敏性試験や呼気中NO濃度などによる評価で、喘息と確定診断されていなくても有意に過敏性が亢進している症例がしばしば存在している。

好酸球性副鼻腔炎は疫学的にも患者数の増加傾向が全国的に報告されている。これに対して、平成22年度より厚生労働省の難治性疾患克服研究事業(藤枝班)の「好酸球性副鼻腔炎の疫学、診断基準作成等に関する研究」が始まっており、全国13施設の協力の下で副鼻腔炎手術症例の組織学的解析やデータベースの作成などが行われている<sup>7)</sup>。この調査によると、2007～2009年度における手術対象症例3,015症例の中で好酸球性副鼻腔炎症例は822例(28%)を占めていた。そして臨床背景の解析の結果から診断基準作成に有用な項目として、副鼻腔罹患洞が両側性である点、鼻茸の存在、嗅覚障害の合併、血液中好酸球率、画像陰影の重症度、などが挙げられている。また特徴的な合併疾患として好酸球性中耳炎、気管支喘息(アスピリン不耐症を含む)、アレルギー性鼻炎、薬物アレルギーも観察されている。また好酸球性副鼻腔炎という疾患群の中においても、さらに治療に抵抗する予後不良な亜群の存在が近年提唱されている。これらの予後に影響する因子として、気管支喘息の合併、全身の高度な好酸球浸潤(eosinophilia)、などが挙げられている。

好酸球性副鼻腔炎の範疇の中でも、喘息合併例では非合併例に比較して、①ESS術前の末梢血中の好酸球比率が高値である、②アトピー素因の有無とは関連性が薄い、③術前のCT画像スコアは重症タイプが多い、④術後の薬物療法へのresponseが不良である、⑤風邪症状などを契機として再増悪を生じやすい、などの臨床的特長が観察されている<sup>8)</sup>。また一般的に末梢血中の好酸球比率が高値(6%以上)の症例ではESS術後の経過が不良である場合が多いとされている<sup>9)</sup>。また活



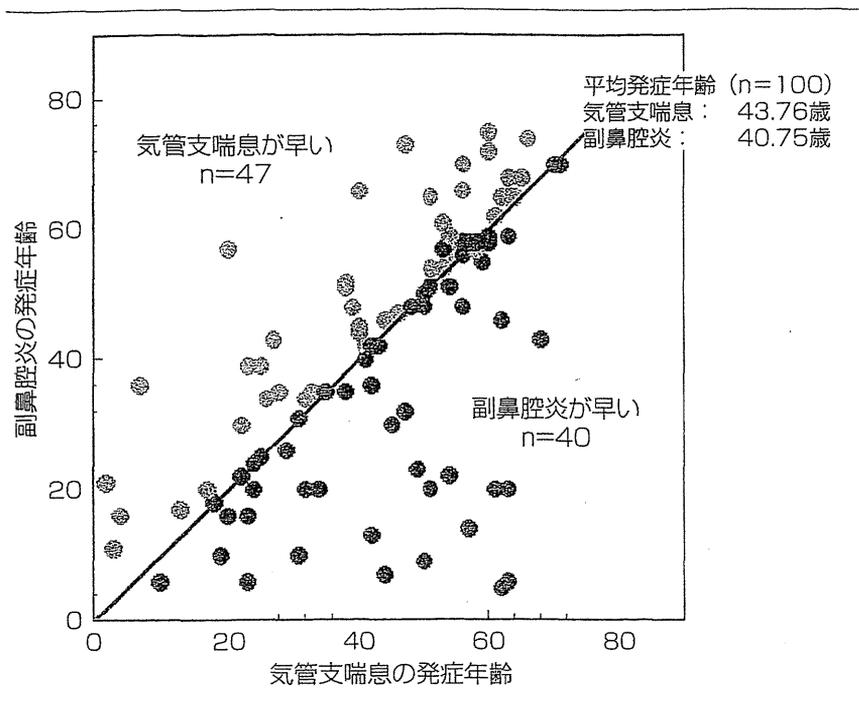


図 2.  
副鼻腔炎を合併した気管支喘息症例における、それぞれの疾患の発症年齢 (n=100)

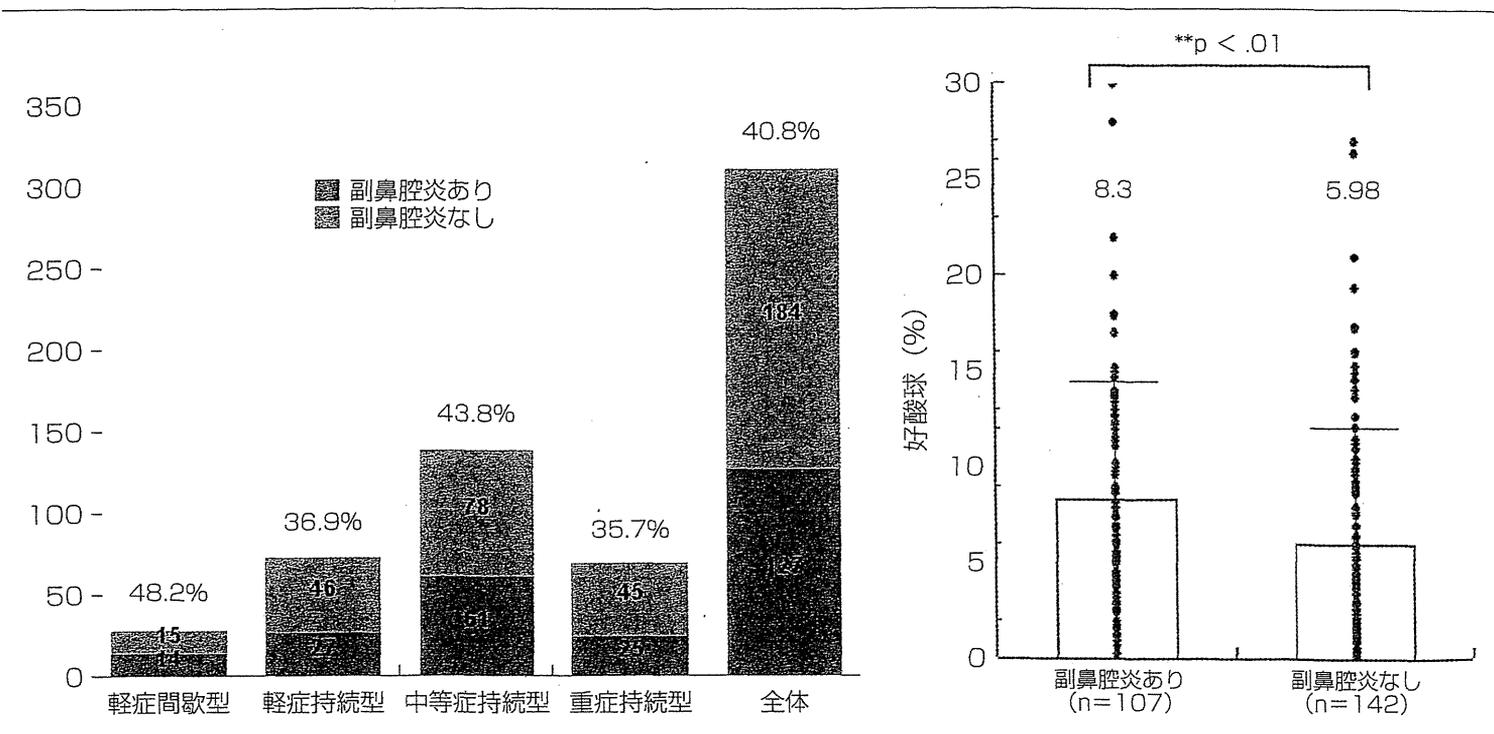


図 3.

- a : 気管支喘息の臨床病型と副鼻腔炎合併の割合  
b : 副鼻腔炎合併の有無と末梢血好酸球の割合

a|b

我々の教室でも以前、多施設共同研究の形で、呼吸器内科の先生方に協力していただきアンケートを行い、気管支喘息患者における副鼻腔炎の有病率についての実態調査を行ったのでその内容を紹介させていただく<sup>14)</sup>。アンケート内容を図1に示す。対象は喘息患者332名(性別は男性112名、女性218名、不明2名。年齢分布は16~88歳、平

均58.3歳)である。このうちで慢性副鼻腔炎合併については、合併ありが130名(39.1%)、合併なしが185名(57.2%)、不明が17名であった。さらに副鼻腔炎合併の有無から、気管支喘息の発症時期と罹病期間について検討してみた。すると発症時期は合併ありが平均44.3歳、合併なしが平均43.7歳と差異を認めなかったが、罹病期間に関し

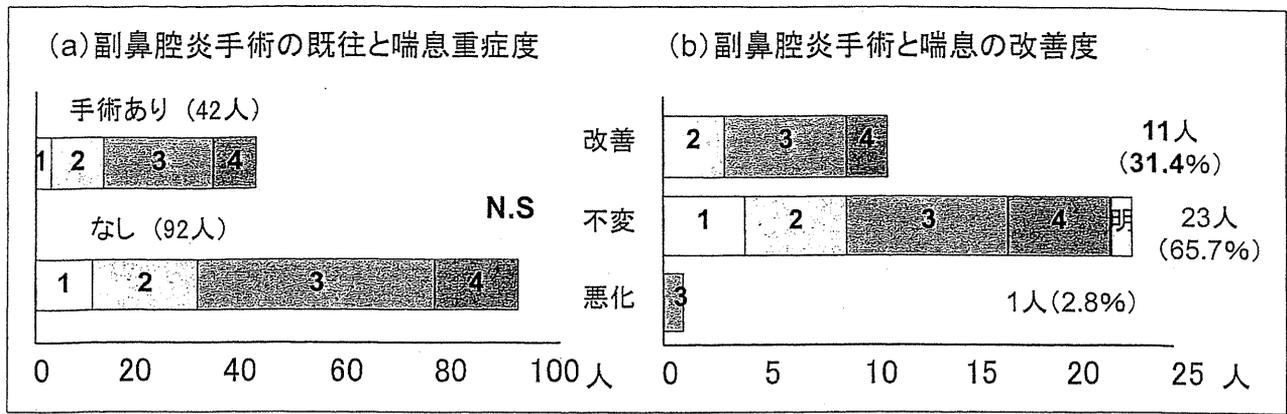


図 4.

グラフ中の数値は、1. 軽症間欠型、2. 軽症持続型、3. 中等症持続型、4. 重症持続型を表している

ては合併ありが平均 13.5 年、合併なしが平均 11.4 年と、前者で病歴が長期化している傾向が認められた。次に副鼻腔炎合併例について、それぞれの疾患の発症年齢について検討してみたところ、喘息が先に発症が 47 例 (47%)、副鼻腔炎が先に発症が 40 例 (40%) とほぼ同じ割合であった (図 2)。また臨床的な喘息重症度と副鼻腔炎の合併率について検討してみたが、特徴的な傾向というものは認められなかった (図 3-a)。これに対して、末梢血好酸球割合については副鼻腔炎合併例の方が有意に高値であった (8.3% vs 5.98, 図 3-b)。最後に、副鼻腔炎手術の喘息症状に対する有効性を検討してみた。手術既往のある割合は、42 例 / 134 例 (31.3%) であったが、喘息重症度による相違は認められなかった (図 4-a)。副鼻腔炎手術後の喘息症状について回答が得られた 35 例では、改善が 11 例 (31.4%) で、不変が 23 例 (65.7%)、悪化が 1 例 (2.8%) であり、全体の手術症例の約 3 割で改善効果を認めたとの結果であった (図 4-b)。今回の結果では約 6 割については病状が不変であったと、他の報告に比べてやや改善症例の割合が低いものとなった。これについては、アンケートの実施時期が手術実施時期と離れた時点でのものであった点、慢性の病状経過をたどる喘息自体の病態を反映している点、などの要因を考えている。

#### 好酸球性副鼻腔炎の薬物療法

従来よりの副鼻腔炎治療の主体であるマクロライドと粘液調整剤の併用療法は、罹患した副鼻腔

各洞粘膜の粘液線毛輸送機能の回復と調整作用に主目的が置かれていた。これに対して、好酸球性副鼻腔炎における薬物治療の主役としては、病態の難治化因子の主役である好酸球浸潤の軽減を直接標的としたものに期待が持たれている<sup>5)</sup>。

#### 1. ステロイド製剤

ステロイドは glucocorticoid 受容体 (GR) を介して、各種サイトカイン、炎症性メディエーターなどの発現と産生を転写・遺伝子レベルにて抑制することにより、強力な抗炎症・抗アレルギー作用を発現する。同時に好酸球に対しても、アポトーシス誘導作用や増殖抑制作用を有することから好酸球性副鼻腔炎に対する直接的な有効性が期待できる。

好酸球性副鼻腔炎に対するステロイド製剤の使用は、一義的には局所投与を基本としている。局所ステロイド製剤による薬物療法は、直接副鼻腔粘膜に薬剤を到達できるため、全身的な副作用を回避しつつ、少量の薬剤でも効率的に効果を発揮する利点を有している。また近年頻用されているフルチカゾンフランカルボン酸エステル (アラミスト<sup>®</sup>) やモメタゾンフランカルボン酸エステル (ナゾネックス<sup>®</sup>) は、いずれも生物学的利用率が 1% 以下と極めて低く、気管支喘息合併例などや全身への影響を懸念する必要性が低い。2005 年度の EAACI position paper による鼻茸サイズによる指針でも、鼻腔を占拠するほど大きい場合 (grade 3) は手術あるいは短期間のステロイド全身投与が必要な場合が多いが、小または中等度サイズ (grades 1 and 2) の場合は局所ステロイドの

使用が初期治療として有用であると総括されている<sup>15)</sup>。

一方でステロイド内服については、術直後から早期に粘膜状態の正常化を図る目的や、経過観察中に生じる急性増悪時の病変のコントロールの場合に、しばしば考慮される。また術前患者に対する術前1~2週間の経口ステロイド製剤の処方では、粘膜腫脹の軽減と鼻茸の縮小が期待でき、これにより手術操作が容易になることが多い。本邦でも周術期におけるベタメタゾンとマレイン酸クロルフェニラミン合剤(セレスタミン®)投与により、血液中と中鼻道粘膜表層におけるECP濃度の有意な低下と、臨床所見の改善が報告されている<sup>16)</sup>。上記のEAACI position paperでは、成人の中等症・重症鼻茸に対する保存的療法としての経口ステロイドの使用は1クール2週間、年間3クールを限度として、3ヶ月以上の間隔をあけるべきであると述べている。

## 2. ロイコトリエン(LT)受容体拮抗薬とトロンボキサン(TX)受容体拮抗薬

ロイコトリエン(Cys-LT)には、鼻粘膜や鼻腺からの分泌促進作用、粘膜の腫脹作用、好酸球に対する強力な集積促進と活性化作用を有しており、LT受容体拮抗薬も、好酸球性副鼻腔炎の薬物療法で優れた有用性が報告されている<sup>17)</sup>。喘息合併症例における好酸球性副鼻腔炎の手術後には、高濃度のCys-LTsを含んでいた鼻茸組織が摘出されるため、尿中に排泄されるLTE<sub>4</sub>(U-LTE<sub>4</sub>)が低下することが報告されている<sup>4)</sup>。またAIA症例では安定期においても、非AIA喘息症例に比較してU-LTE<sub>4</sub>が約3倍高値であることが報告されている。そしてAIA患者(好酸球性副鼻腔炎)の鼻茸組織自体でも、臨床症状の重症度に応じたLTC<sub>4</sub>S mRNAと5-lipoxygenase mRNAの発現亢進と、LTC<sub>4</sub>、LTD<sub>4</sub>、並びにLTE<sub>4</sub>の産生亢進が観察されている。さらに興味深いことに、同組織では炎症防御に作用するプロスタノイドであるPGE<sub>2</sub>量の減少と、その受容体であるEP<sub>1</sub>、EP<sub>2</sub>受容体の発現低下も報告されている<sup>18)</sup>。

トロンボキサン(TX)受容体拮抗剤の臨床効果も近年、注目されてきつつある。本剤の薬理作用としてはユニークなものがあり、①鼻粘膜血管上のトロンボキサン受容体(TP)に対する拮抗作用による鼻閉の軽減、②PGD<sub>2</sub>受容体の一つでありTh2型T細胞などに発現するCRTH2受容体に対するアンタゴニストとしての作用、がある。このため鼻アレルギーにとどまらない好酸球性炎症に対する幅広い抑制効果が期待されている<sup>19)</sup>。好酸球性副鼻腔炎に対する臨床効果の評価についてはこれからだと思われるが、自験例では外用ステロイド剤やLT受容体拮抗剤を用いてのコントロール不良例に投与したところ粘膜状態の改善を認めた症例を経験している。

## 喘息症状に対する手術療法の効果

### 1. 手術療法の意義

好酸球性副鼻腔炎に対して、中長期的に保存的な薬物療法単独では安定した寛解状態を維持するのは困難といえるため、手術療法である内視鏡下副鼻腔手術(ESS)が選択される場合も多い。現時点では手術療法に関する明確な適応基準は確立されていない。しかしながらその基本戦略としては、副鼻腔各洞の粘膜を温存しつつ、その換気機能と排泄路の状態を改善するというESSの基本概念と同時に、好酸球浸潤を伴う病的な粘膜病変自体への処置も同時に行う点といえる。従って手術時には、たとえ副鼻腔病変が軽度でも、原則として両側の全ての副鼻腔の開放と洞内の観察と同時に鼻腔形態の矯正術も併用するなどして、術後管理を容易にしておくことが望ましいと考えている<sup>16)</sup>。

### 2. 手術成績と術後管理の重要性について

当教室における副鼻腔炎手術症例の統計を図5に示す<sup>20)</sup>。臨床背景についての検討では、好酸球性副鼻腔炎症例は31.3%(37例/118例)であった。鼻アレルギー合併率は42%であった。また好酸球性副鼻腔炎症例の中でも気管支喘息合併例は著明な好酸球浸潤(16/37例で平均56.1個/×400

a  
b

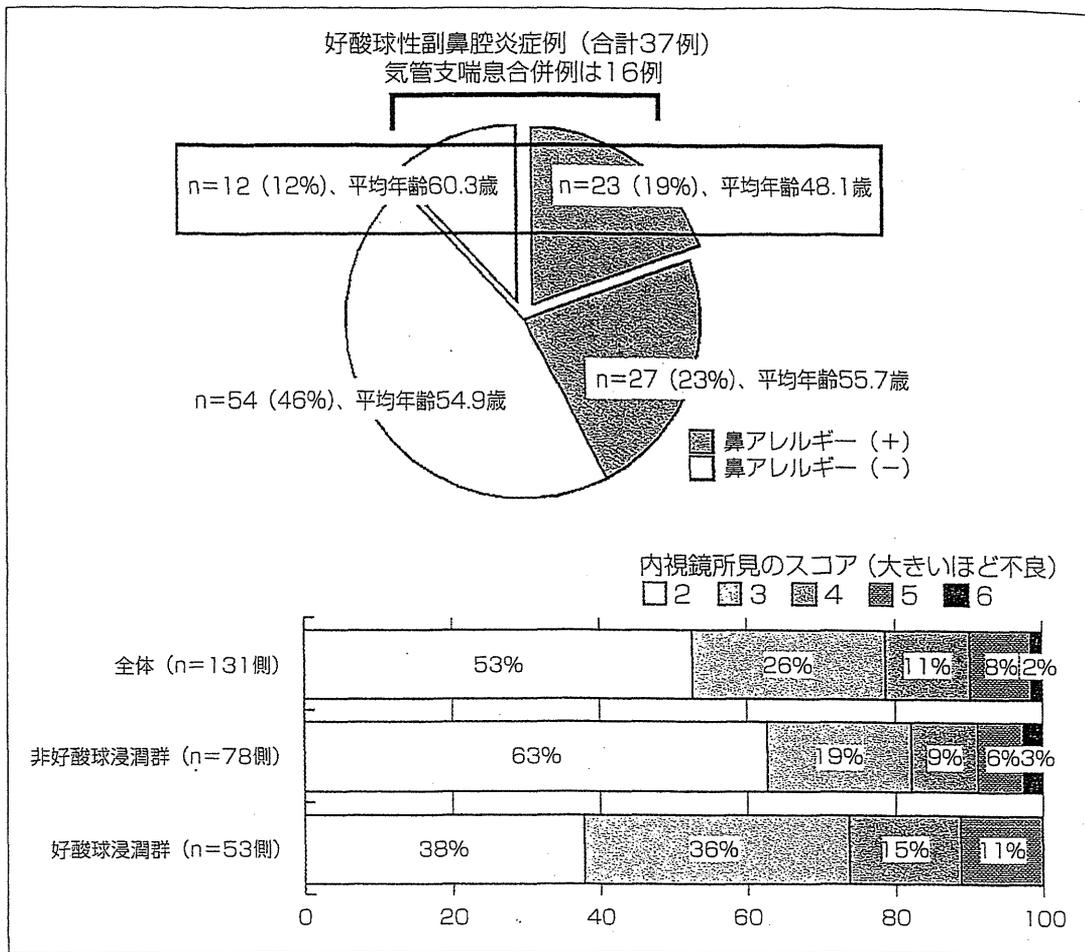


図 5. 当教室における副鼻腔炎手術症例の検討

- a : 組織学的検討が可能であった症例の臨床背景 (2007~10年, 118例)
- b : 内視鏡所見をもとに6ヶ月以上経過例を対象としたESS術後の改善効果 (2007~10年, 広島大学病院・中国労災病院(文献20より改変引用))

視野)を伴っていた。図5-bには鼻内内視鏡所見をもとにスコア3以下を良好としたESS術後の改善率を示している。好酸球性副鼻腔炎の改善率が74%、非好酸球性(化膿性)副鼻腔炎の改善率が82%であり、好酸球性副鼻腔炎の方がスコア4以上の粘膜不良状態が再燃するケースが多い傾向を認めた。このように好酸球性副鼻腔炎の手術後の再燃率は、諸家の報告でも化膿性副鼻腔炎に比較して高いものとしたものが多い<sup>16)</sup>。従って積極的に手術を行う場合においても、周術期の局所管理と術後における薬物療法の併用は必須であり、あらかじめ術前に患者サイドにもその旨を明確に説明しておく必要がある。

局所処置としての鼻(副鼻腔)洗浄は、副鼻腔開放後の粘膜のメンテナンスと再増悪した時のかわ状の分泌物のクリアランスに非常に有用である。通常は、生理食塩水程度の等張液、あるいは爽快感を得るために水溶性アズノール沫などを添加した液で、温度は40℃くらいが適温である。専用の洗浄器であるハナクリーンEX<sup>®</sup>と、洗浄剤であるサーレMP<sup>®</sup>(いずれも東京鼻科学研究所)も市

販されている。また抗凝固薬であるヘパリンも、分子中に多数含まれる硫酸基が負に帯電しているため、希釈して用いれば好酸球由来の粘稠ムチンの除去に有用であると近年報告がある。また我々は周術期の管理にhydroxypropyl cellulose (HPC)含有プロピオン酸ベクロメタゾン(リノコートパウダースプレー<sup>®</sup>)も併用し、良好な成績を得ている<sup>21)</sup>。通常の使用では各鼻腔内に1日2回噴霧する用法であるが、ESS術直後と術後一定間隔(約2週間)で局所鼻処置後、開放した副鼻腔各洞に直接噴霧している。1回に投与する薬剤量は本剤の気管支喘息における1日最大投与量である800 $\mu$ gを上限として症例に応じて調節している。

### 3. 手術加療による喘息症状の改善

気管支喘息に対する副鼻腔炎手術の有効性に関しては、これまでに術後の呼吸機能やステロイド使用量の変化などの観点から検討がなされている。我が国で21名の喘息患者を対象としてESSの有効性を検討した報告では、術後6ヶ月の時点で平均呼気ピークフロー値の改善を認めている<sup>22)</sup>。一方で、AIA患者12名においてESS施行

後の平均 19ヶ月で評価したところ、喘息症状の自覚的改善度は半数以上で良好なものであったが、術後の篩骨洞粘膜における好酸球浸潤密度には変化を認めなかったとの報告もある<sup>23)</sup>。また喘息患者 75 名に対して ESS を施行し、術前術後の 1 年間にわたって追跡調査を行った Palmer らの報告では、下気道症状の改善と同時に平均で 1300 mg/year の経口プレドニゾロンの減量が可能であったとしている<sup>24)</sup>。長期予後に関しても、Senior らは ESS 施行後 6.5 年においても 90% (27/30 名) が症状の改善を認めており、同時に半数以上の割合で吸入および経口ステロイドの使用が術前に比較して減少したと述べている<sup>25)</sup>。

上気道病変が下気道に及ぼす影響を考えると、好酸球性副鼻腔炎に伴う鼻閉と口呼吸、後鼻漏などの症状は喘息の悪化因子であることは事実である。そして薬物療法によっても副鼻腔炎の改善が認められない症例に対しては、上記のような手術的アプローチは重要な意義を有していると考えられる<sup>26)</sup>。

### 最後に

喘息症例における難治性副鼻腔炎の病態には、いわゆる one airway one disease の呼称に代表されるように、気道全体にわたる慢性好酸球性炎症といった診療科をまたぐ共通背景因子が存在するものと考えられる。従って耳鼻咽喉科で副鼻腔炎加療中に気道症状が遷延化あるいは頻回に増悪する場合は、呼吸器内科との連携を密にすすみやかに下気道の状態評価を仰ぐことが重要である。

### 参考文献

- 1) Slavin RG, Spector SL, Bernstein IL, et al : The diagnosis and management of sinusitis : a practice parameter update. J Allergy Clin Immunol, 116(6 Suppl) : S13-47, 2005.
- 2) 深見雅也, 柳 清, 鴻 信義ほか : 好酸球浸潤を指標に加えた慢性副鼻腔炎病態分類—内視鏡手術症例の組織学および免疫組織学的検討から—。日鼻誌, 38 : 53-62, 1999.

- 3) Braunstahl GJ, Overbeek SE, Fokkens WJ, et al : Segmental bronchoprovocation in allergic rhinitis patients affects mast cell and basophil numbers in nasal and bronchial mucosa. Am J Respir Crit Care Med, 164 : 858-865, 2001.
- 4) Higashi N, Taniguchi M, Mita H, et al : Clinical features of asthmatic patients with increased urinary leukotriene E<sub>4</sub> excretion (hyperleukotrienuria) : Involvement of chronic hyperplastic rhinosinusitis with nasal polyposis. J Allergy Clin Immunol, 113 : 277-283, 2004.
- 5) Takeno S, Hirakawa K, Ishino T : Pathological mechanisms and clinical features of eosinophilic chronic rhinosinusitis in the Japanese population. Allergol Int, 59 : 247-256, 2010.
- 6) 春名眞一, 鴻 信義, 柳 清ほか : 好酸球性副鼻腔炎 (Eosinophilic Sinusitis). 耳展, 44 : 195-201, 2001.  
**Summary** 本邦における好酸球性副鼻腔炎に関する臨床像について、独立した疾患概念として、初めて具体的に呈示した論文。
- 7) 「好酸球性副鼻腔炎の疫学、診断基準作成等に関する研究」厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業) 総合研究報告書 研究代表者 藤枝重治, 2010.  
**Summary** 全国 12 施設において過去 3 年間の内視鏡鼻副鼻腔手術のデータを収集・解析することにより、好酸球性副鼻腔炎の診断基準項目案を考案。
- 8) 川堀眞一, 渡邊昭仁, 長内洋史 : 慢性副鼻腔炎の病態 —喘息, アスピリン喘息および合併なし症例で比較検討—。日鼻誌, 40 : 124-131, 2001.
- 9) Zadeh MH, Bantia V, Anand VK, et al : Significance of eosinophilia in chronic rhinosinusitis. Am J Rhinol, 16 : 313-317, 2002.
- 10) 春名眞一, 鴻 信義, 柳 清ほか : 鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎における上皮細胞障害について —Eosinophil cationic protein との関連について—。日鼻誌, 39 : 352-358, 2000.
- 11) Kowalski ML, Makowska JS, Blanca M, et al : Hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)—classification, diagnosis and management : review of the EAACI/ENDA (#) and GA2LEN/HANNA\*. Allergy, 66 : 818-29, 2011.  
**Summary** NSAIDs 過敏症に関する最新の review. 疫学因子, 診断と分類, 治療方法など幅