

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業免疫アレルギー研究分野)
分担研究報告書

乳幼児気管支喘息の非侵襲的診断方法に関する研究
尿中ロイコトリエン E4 について

研究協力者	森川 昭廣	群馬大学名誉教授 社会福祉法人希望の家附属北関東アレルギー研究所所長
	荒川 浩一	群馬大学大学院医学系研究科小児科学教授
	滝沢 琢己	群馬大学大学院医学部研究科小児科学准教授
	田端 雅彦	医療法人恵洋愛会どんぐりこども診療所院長
	小山 晴美	群馬大学大学院医学系研究科小児科学
	佐藤 幸一郎	群馬大学大学院医学系研究科小児科学

研究要旨

乳幼児喘鳴患者早期診断とその予後を予測するために質問事項を設けて、クラスター解析をするとともに、鑑別診断のための非侵襲的なマーカーの候補として、尿中ロイコトリエン E4 の測定を行い、次の成果を得た。

1. 乳幼児喘鳴患者についてクラスター解析を試行し、4つのクラスターに分類された。
2. 乳幼児で初めて喘鳴を呈し、RSウイルス感染を否定できた患児について尿中ロイコトリエン E4 を測定したところ、刺激薬に反応のない児(非RSウイルス性細気管支炎の疑い)では高値を示し、一方、反応のある児(乳児喘息の疑い)ではコントロール群と有意差はなかった。
3. 尿中ロイコトリエン E4 は間欠型の喘息では、1episode-A 群に比して、有意に低値であるが、対照群とは有意差はなく、また必ずしも高値を示さなかった。
4. 初回喘鳴群について、その予後予測のためクラスター解析を行うとともに、その他のマーカーを検討する必要がある。

A. 研究目的

乳幼児期には喘鳴性疾患が多く、その鑑別と予後予測は小児科医にとって重要な課題である。

乳幼児喘息においては、近年気道炎症がその本態であることが判明し、気道のリモデリング形成前の早期診断、早期治療が重要であることが言われている。しかし、この時期の喘鳴は種々の疾患で観察され、その鑑別や予後予測は必ずしも容易ではない。現在では、「気道感染の有無に関わらず、明らかな呼気性喘鳴を3エピソード以上繰り返した場合」を、広義の乳児喘息と診断している。

広義の乳児喘息は、喘息のみならず、ウイルス感染に伴った喘鳴群を含む可能性があり、総IgE、特異的IgE抗体、好酸球数などのマ

ーカー測定が望まれるが、年齢的に検査が困難な場合が少なくない。我々は本研究の中で、尿中ロイコトリエン測定の方法を確立した。

本年は喘鳴児のクラスター解析の検討を行うとともに、非侵襲的に採取できる尿中ロイコトリエン E4 測定が喘鳴を有する児の鑑別診断に使用し、さらにその測定方法について検討した。

B. 研究方法

1) 喘鳴患児のクラスター解析

研究協力者 MT の診療所を平成 23 年 10 月から平成 24 年 3 月までに受診した乳幼児喘鳴疾患患者についてクラスター解析のための質問事項を表 1 のように定め、検討を行った。

今回対象になった患児について、アンケート方式により以下の事項について解答してもらい検討した。年齢、性別、喘息の家族歴、兄弟の有無等、生下時体重、在胎週数、分娩様式、保育園・幼稚園通園状況、初めて風邪をひいた月齢、「ゼイゼイ」「ヒューヒュー」の既往、細気管支炎の既往、予防接種と接種時期、ペットの有無と種類ならびに飼育場所、家族の喫煙状況

2) 尿中 LTE4 の測定方法

尿中ロイコトリエン E4 は本研究班において、平成 24 年度に報告した方法により測定した。すなわち、従来の方法に、)除蛋白、)尿へのフリーラジカスキャベンジャー使用、)メタノールによる親水化、)ELISA の使用、等を考慮し、図 1 の方法で資料を調整し、測定は ELISA Kit (Cysteny1 Leukotriene Express EIA Kit) で行った。また、クラスター解析については表 1 (本報告書末に掲載)を保護者に渡して回答してもらった。

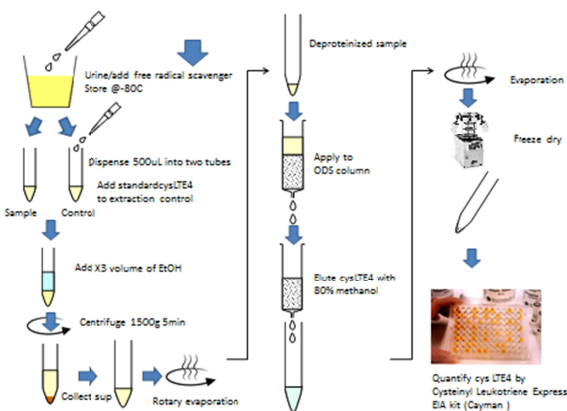


図 1. 尿中ロイコトリエン E4 測定資料調整方法

3) 初回喘鳴児における尿中 LTE4 の検討

初回呼気性喘鳴群 1(刺激薬非改善群、図 2 で 1 episode-A と表記): 1 回の喘鳴のエピソードがあり、RS ウイルス陰性かつ家族歴で喘息・アトピー性皮膚炎、花粉症またはアレルギー性鼻炎がある患者 (13 名)。平均年齢は 1 歳 2 か月 (M:F、8:5)。

初回呼気性喘鳴群 2: i と同様であるが、2 刺激薬の吸入で改善が認められた者 (14 名)(図 2 で 1 episode-B と表記)。平均年齢

は 1 歳 6 か月 (M:F、10:4)。

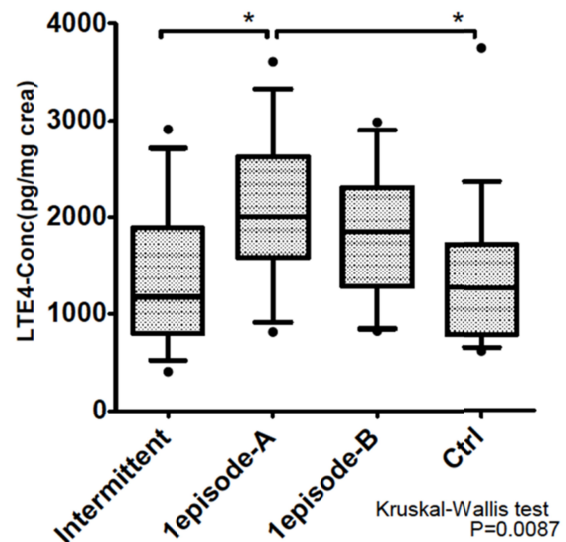


図 2. 非 RS ウイルス感染喘鳴群と対照群の比較

発熱対照群: 発熱はあるが、尿路感染や喘鳴のない者。RS ウイルスは陰性であり、家族歴に喘息・アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎のない者 (14 名)。平均年齢 6 か月 (M:F、10:4)(図 2 で Ctrl と表記)

間欠型喘息群: すでに JPGL2012 の乳幼児喘息の基準を満たし、その重症度は間欠型である者 14 名。平均年齢 6 歳 2 か月 (M:F、6:8)(図 2 で intermittent と表記)。これらの患児は採尿から 1 か月前までの服薬や吸入後の治療を行わず、また RS ウイルス陰性と確認できた者である。

(倫理面への配慮)

被験者ならびに保護者には事前にその内容、意義等について説明し、自由参加であることを述べ書面で承諾を得た。

C. 研究結果

1) 喘鳴患児のクラスター解析

クラスター解析について 55 例全例から回答を得た。これらを初回喘鳴群 1、2、発熱対照群、間欠型喘息群について検討した。すなわち、患者 21 名を性別・年齢を含む調査項目 (15 項目) を用いて階層的クラスター分析 (最遠隣法) を行った。結果は、デンドログラム及びヒートマップで示した。

患者は大きく 4 つのクラスターに分類され

た。B 群は、尿中ロイコトリエンが若干高い傾向がみられ、また A 群には、喘息と診断されなかった患者が多い傾向がみられた(図 3) (図 4、5)。

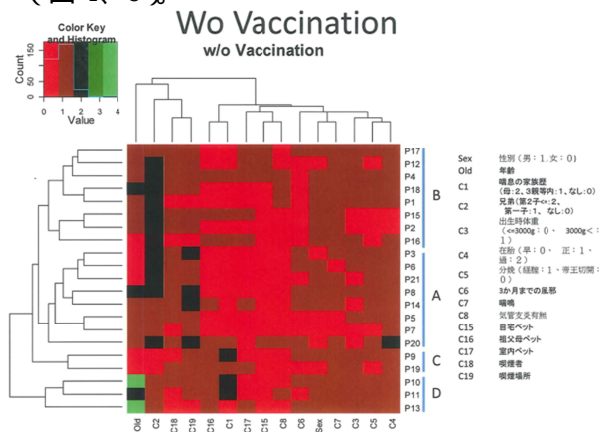


図 3. 喘鳴患児のクラスター解析結果

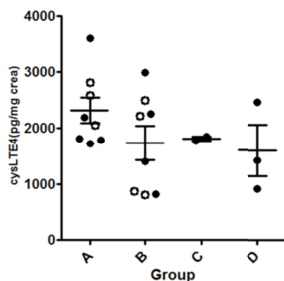


図 4. A,B,C,D 群の尿中ロイコトリエン量

W/O Vaccine	Hierarchical complete		
Group	No	Athma	Category
A	P5		01epsd-A
A	P6		01epsd-B
A	P7		01epsd-B
A	P14		01epsd-B
A	P3		11epsd-A
A	P8		11epsd-B
A	P20		11epsd-B
A	P21		11epsd-B
B	P12		01epsd-B
B	P16		01epsd-A
B	P18		01epsd-B
B	P1		11epsd-A
B	P2		11epsd-A
B	P4		11epsd-A
B	P15		11epsd-A
B	P17		11epsd-A
C	P9		11epsd-B
C	P19		11epsd-B
D	P10		11epsd-B
D	P11		11epsd-B
D	P13		11epsd-B

図 5. A,B,C,D 群の喘鳴

2) 尿中 LTE4 の測定

間欠型喘息群では、尿中ロイコトリエン量は、1 episode-A 群や対照群に比して有意に低値であった。

その結果、ある程度の喘息発症予測は可能であるが、さらに質問事項を増やすことが必要であることが判明した。

3) 非 R A ウイルス感染喘鳴群と対照群の尿中ロイコトリエン E4 について (図 2)

図 2 に示したように、尿中ロイコトリエン量は、コントロール群に比して 1 episode-A 群が有意に高値を示した。A, B 両群の間に有意差は認められなかった。

D. 考察

喘鳴児のクラスター解析は予後予測や鑑別診断の参考になる可能性を持っているが、質問事項の選択については慎重な検討が望まれた。今後更に質問事項から得られる結果と非侵襲的マーカーで予後予測の精度が上げられることが期待される。

また、乳幼児で初めて喘鳴を呈し、RS ウイルス感染を否定できた未治療の患児について尿中ロイコトリエン E4 を測定し検討したところ、高値を示した児では 2 刺激薬に対する反応がなく、一方低値を示した群では反応がみられた。今後の検討にもよるが、喘鳴を呈する乳幼児の鑑別診断には、2 刺激薬の反応性に加えて尿中ロイコトリエン E4 もその参考項目になるものと思われた。

これらの成績にクラスター解析を加えて検討し、今後さらにこれらの患者を追跡し喘息発症との関連を観察する予定である。

E. 結論

アンケート調査によるクラスター分類や喘鳴を呈する乳幼児の ULT-E4 の測定を行った。喘鳴児のクラスターと ULT-E4 の測定は乳幼児の喘鳴の非侵襲的な鑑別診断に有用である可能性があると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Morikawa A. Think globally, act locally.

Asia Pac Allergy. 2013; 3(2):77-78

2) Kobayashi T, Kobayashi T, Morikawa A, Ikeda K, Seki M, Shimoyama S, Ishii Y, Suzuki T, Nakajima K, Sakamoto N, Arakawa H. Efficacy of intravenous immunoglobulin combined with prednisolone following resistance to initial intravenous immunoglobulin treatment of acute Kawasaki disease. *J Pediatr*. 2013; 163(2):521-526

3) 森川昭廣. 小児気管支喘息の内科医へのバトタッチとアレルギー専門医. 診断と治療. 2013; 101(12):1835-1838

4) 森川昭廣、Robert F. Lemanske Jr.、海老澤元宏、藤澤隆夫. 小児喘息の治療と管理. *International Review of Asthma & COPD*. 2013; 15(3):99-114

5) 八木久子、西田豊、小山晴美、滝沢琢己、荒川浩一、森川昭廣. ビワによる口腔アレルギー症候群の親子例. *アレルギー*. 2013; 62(3/4):424

6) 小田嶋博、松井猛彦、赤坂徹、赤澤晃、池田政憲、伊藤節子、海老澤元宏、坂本龍雄、末廣豊、西間三馨、森川昭廣、三河春樹、鳥居新平、日本小児アレルギー学会疫学委員会. MS7-9 喘息重症度分布経年推移に関する多施設検討~2013 年度報告~. *アレルギー*. 2013; 62(9/10):1293

2. 学会発表

1) 田端雅彦、他: 尿中ロイコトリエン E4 による乳幼児初回呼吸性喘鳴疾患群の検討. 第8回日本小児耳鼻咽喉科学会. 2013. 群馬

2) 八木久子、他. ビワによる口腔アレルギー症候群の親子例. 第8回日本小児耳鼻咽喉科学会. 2013. 群馬

3) 小田嶋博、他. 喘息重症度分布経年推移に関する多施設検討~2013 年度報告~. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2013. 東京

4) 西田豊、他. ビワによる口腔アレルギー症候群の親子例. 第58回群馬小児喘息研究会・食物アレルギー研究会. 2012: 群馬

5) 重田大輔、他. 運動誘発アナフィラキシーの1例. 第190回日本小児科学会群馬地方講話会. 2012. 群馬

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

なし

参考文献

1) Kobayashi Y, Morikawa A, Hatada I, Arakawa H, et al.: DNA methylation changes between relapse and remission of minimal change nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2012; 27(12): 2233-41

2) Papadopoulos NG, Arakawa H, Morikawa A, Nieto A, Paramesh H, Pawankar R, Pohunek P, Pongracic J, Price D, Robertson C, Rosario N, Rossenwasser LJ, Sly PD, Stein R, Stick S, Szeffler S, Taussig LM, Valovirta E, Vichyanond P, Wallace D, Weinberg E, Wennergren G, Wildhaber J, Zeiger RS. International consensus on (ICON) pediatric asthma. *Allergy*. 2012; 67(8): 976-97

3) Kobayashi T, Arakawa H, Morikawa A, et al. Efficacy of immunoglobulin plus prednisolone for prevention of coronary artery abnormalities in severe Kawasaki disease (RAISE study): a randomised, open-label, blinded-endpoints trial. *Lancet*. 2012; 379(9826):1613-20

4) Seki M, Morikawa A, Arakawa H, et al.: External validation of a risk score to

predict intravenous immunoglobulin resistance in patients with kawasaki disease. :Pediatr Infect Dis J. 2011; 30(2):145-7

- 5) Kondo N, Morikawa A, et.al. Japanese pediatric guidelines for the treatment and management of bronchial asthma 2008. Pediatr Int. 2010; 52(2):319-26
- 6) Kobayashi T, Inoue Y, Otani T, Morikawa A, Kobayashi T, Takeuchi K, Saji T, Sonobe T, Ogawa S, Miura M, Arakawa H. Risk stratification in the decision to include prednisolone with intravenous immunoglobulin in primary therapy of Kawasaki disease. Pediatr Infect Dis J. 2009; 28(6): 498-502
- 7) Tadaki H, Arakawa H, Sugiyama M, Ozawa K, Mizuno T, Mochizuki H,

Tokuyama K, Morikawa A. Association of cord blood cytokine levels with wheezy infants in the first year of life. Pediatr Allergy Immunol. 2009; 20(3): 227-33

- 8) Tadaki H, Arakawa H, Mizuno T, Suzuki T, Takeyama K, Mochizuki H, Tokuyama K, Yokota S, Morikawa A. Double-stranded RNA and TGF-alpha promote MUC5AC induction in respiratory cells. J Immunol. 2009; 182(1): 293-300
- 9) Ikeuchi Y, Kobayashi Y, Arakawa H, Suzuki M, Tamra K, Morikawa A. Polymorphisms in interleukin-4-related genes in patients with minimal change nephrotic syndrome. Pediatr Nephrol. 2009; 24(3): 489-95

表 1

当院では喘鳴のある患者様について調査をしています。差支えなければご協力ください。
 なお、この調査は患者様の今後と喘息発症機序を検討するもので、個人情報公表されません。
 (カルテ No.)

喘鳴のある患者様についての調査

1 . 年齢は何歳ですか _____ 歳

2 . 性別 男 ・ 女

3 . 喘息のかたが家族におられますか
 いいえ ・ はい (両親 ・ 兄弟 ・ 祖父母)

4 . 兄弟がいますか はい ・ いいえ

5 . はいの場合、本人は第何子ですか
 第一子 ・ 第二子 ・ 第三子 ・ その他

6 . 生下時体重と在胎週数
 体重 _____ グラム 不明
 在胎週数 _____ 週 不明
 経膈分娩 (普通分娩) ・ 帝王切開

7 . 保育園、幼稚園に通園していますか
 いいえ ・ はい (何歳から入園していますか _____ 歳)

8 . はじめて風邪をひいたのはいつ頃ですか _____ ヶ月頃

9 . 「ゼイゼイ・ヒューヒュー」したことがありますか
 いいえ ・ はい
 (いつ頃ですか _____ ヶ月頃)

10 . 細気管支炎といわれたことがありますか
 はい ・ いいえ

11 . 今までに終了しているワクチンと接種時期について
 _____ ヶ月頃
 _____ ヶ月頃
 _____ ヶ月頃
 _____ ヶ月頃
 _____ ヶ月頃

12 . ご自宅にペットがいますか。
 または、普段生活をしている場所にペットがいますか。
 いぬ ・ ねこ ・ その他 ()
 自宅以外でペットと一緒に普段生活をしている場所はどこですか。
 祖父母宅 ・ 知人宅 ・ その他 ()
 ペットで「いぬ」と答えた方に：犬種は何ですか
 ()
 かっている場所はどこですか
 室内 ・ 屋外 ・ その他 ()

13 . ご家族 (一緒に住んでいるかた) に喫煙するかたがいますか
 父 ・ 母 ・ その他 ()
 吸っている場所はどこですか
 室内 ・ 専用の喫煙室 ・ 屋外