

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業
（難治性疾患等実用化研究事業（免疫アレルギー疾患等実用化研究事業
免疫アレルギー疾患実用化研究分野）））

気管支喘息に対する喘息死の予防や 自己管理手法の普及に関する研究

平成 24～26 年度 総合総括・分担研究報告書

研究代表者 大田 健

平成 27（2015）年 5 月

<目次>

I. 総括研究報告

気管支喘息に対する喘息死の予防や自己管理手法の普及に関する研究

大田 健 1

II. 分担研究報告

1. 成人アトピー型喘息治療管理における

環境アレルゲンモニタリングに基づく環境整備の有用性についての研究

釣木澤尚美 15

2. 呼気一酸化窒素 (FeNO) を用いた気管支喘息管理手法の確立

棟方 充 40

3. 高齢者喘息の病態解明と治療・管理法の確立に関する研究

東田 有智 46

4. クラスター解析を用いた喘息病態の多様性の解明に向けた研究

檜澤 伸之 53

5. 乳幼児喘息の病態解明と治療法の確立に関する研究

近藤 直実 60

6. 日本における小児期発症気管支喘息のフェノタイプに関する研究

下条 直樹 66

7. 気管支喘息における気道炎症指標を含めた重症度別クラスター解析

-多施設共同研究の結果から-

長瀬 洋之 69

8. 喘息重症度と IgE の経年的変化に関する前向き研究

(黄色ブドウ球菌エンテロトキシン特異的 IgE 抗体と喘息の関係)

田中 明彦 77

9. 気管支喘息に関する医療連携システムの活用に関する研究

井上 博雅 83

10. 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、ならびに乳幼児の喘息予知テスト-

森川 明廣 90

11. 『喘息死ゼロ作戦』の軌跡とその成果に関する研究
　　『喘息死ゼロ』達成の基盤としての
　　薬剤師による患者吸入指導体制の確立に関する研究
　　　　大林 浩幸 ······ 96

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	····· 102
IV. 主な研究成果物	····· 103

**厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業
（免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野））
総合総括研究報告書**

気管支喘息に対する喘息死の予防や自己管理手法の普及に関する研究

研究代表者	大田 健	独立行政法人国立病院機構東京病院 院長
研究分担者	秋山一男	独) 国立病院機構相模原病院臨床研究センター センター院長
	鈴木澤尚実	独) 国立病院機構相模原病院アレルギー科 医師
	棟方 充	福島県立医科大学呼吸器内科学講座 教授
	東田有智	近畿大学医学部呼吸器・アレルギー内科 教授
	檜澤伸之	筑波大学大学院人間総合科学研究科呼吸器病態医学分野 教授
	近藤直実	岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 教授
	下条直樹	千葉大学大学院医学系研究院小児病態学 教授
	長瀬洋之	帝京大学医学部内科学講座呼吸器・アレルギー学 准教授
	田中明彦	昭和大学医学部内科学講座呼吸器・アレルギー内科 講師
	井上博雅	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科呼吸器内科学 教授
	森川昭廣	社会福祉法人希望の家附属北関東アレルギーセンター 所長
	大林浩幸	東濃中央クリニック 院長
	中村裕之	金沢大学医薬保健研究域医学系環境生態医学・公衆衛生学 教授

研究要旨

気管支喘息は、5～10%の国民が罹患し苦しんでいるアレルギー性呼吸器疾患である。喘息の病態解明と治療に関する進歩は、喘息が慢性の気道炎症を伴い、長期管理を必要とし、抗炎症薬として吸入ステロイドが有効であるということを明らかにした。そして適切な治療の普及と実行をめざす喘息予防・管理ガイドライン(JGL)が1993年以来改訂を重ねながら発刊されている。厚生労働省ではプロジェクト研究という位置付けで、平成18年度から「喘息死ゼロ作戦」の展開に着手し、本研究の申請者は「喘息死ゼロ作戦の実行に関する指針」を作成し具体的な戦略を提示した。疫学調査によると喘息死は1995年をピークに年次毎に減少している。とくに「喘息死ゼロ作戦」の取り組みが開始されたと考えられる2006年には前年の3198人から2778人へと減少し、最新の2013年は1728人まで減少している。しかし、喘息死をさらにゼロに近づけ喘息の予後を改善するためには、より有効な対策が必要である。そこで本研究では、気管支喘息に対する喘息死の予防や自己管理法の普及に資する成果を目指して研究を進め、2年目の成果として以下のような結果を得ている。1) 最新の喘息ガイドライン、JGL2012に統いて発刊されたアレルギー疾患ガイドライン、JAGL2013の内容も含めて「JGLのミニマムエンセンス」を作成する計画に変更し、作成方針を策定している。現在のところ薬物療法とは別に新たに加える項目として、ダニ抗原の環境からの除去的介入が喘息のコントロールを改善することから、環境整備介入を積極的に推奨する予定である。2) 喘息死の90%近くが65歳以上の高齢者であることから、高齢者を含む成人喘息の実態調査を行っている。抑うつの程度が服薬アドヒアランスや喘息コントロールに影響を及ぼすこと、コントロール不良喘息患者は安定喘息患者や健常者と比べてFeNOの日内・週内変動が有意に大きいこと、黄色ブドウ球菌エンテロトキシン(SA)特異的IgE抗体陽性群は喘息重症度との関連性を認めないことなどが示され、FEV₁、ACT、FeNO、IgEなどが実態調査の指標として重要であることが示された。3) 小児気管支喘息については、呼気性喘鳴1回エピソードでもアレルギー家族歴がある場合は早期

診断できる可能性が示唆され、実態調査の質問票に反映される結果が得られている。さらに尿中ロイコトリエン E4 の測定を行ったところ、非RAウイルス感染喘鳴群が対照群と比較して高値を示し、さらに鑑別診断における有用性が示唆された。4) 治療アドヒアランスの改善策の検討では、ほぼ全ての薬剤師が、患者吸入指導は重要と回答したが、薬剤師自身が正しい吸入方法の仕方の指導を受ける機会は少なく、その指導方法にも統一性が無く、自信を持って患者に吸入指導が行えている薬剤師は少数であり、改めて医薬連携体制の整備と強化の必要性が認識された。5) 各種フェノタイプを想定したクラスター解析(k-means 法)では、アトピーの分類による 4 群 (A 群 : ダニ・動物抗原感作群、B 群 : イネ科・樹木など多重抗原感作群、C 群 : スギ抗原のみ感作群、D 群 : 低感作群) が臨床的に特徴的な 4 つの喘息フェノタイプに対応することが明らかになった。さらに、小児期発症気管支喘息患者の検討では、気管支喘息発症年齢、末梢血好酸球数、ヤケヒヨウヒダニ特異的 IgE、コナヒヨウヒダニ特異的 IgE 値、スギ特異的 IgE 値を用いてクラスター分析(Ward 法)を行い、7 個のクラスターが得られている。成人と小児それぞれについて、さらに多施設でバイオマーカーを含む共通の指標を選択してデータを集積し、クラスター解析を開始しているが、成人喘息による予備検討では発症年齢、血清総 IgE、末梢血好酸球、ACT スコア、%FEV1、吸入ステロイドと経口ステロイド投与量を指標から 3 つのクラスターが得られた(Ward 法)。本研究班全体で協力して、最終年度にはより詳細に解析し、我が国のデータを示すことが可能となっている。

最終的な成果としては、「JGL のミニマムエッセンス」「自己管理法を含む喘息死ゼロ作戦の実行に関する指針」、「治療アドヒアランスの改善のための指針」「日本人喘息患者における喘息のフェノタイプとクラスター」などの文書化を目指している。患者からの検体収集は三省合同「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、患者の採血は倫理規定に基づいて文書で同意を得た上で実行する。

A. 研究目的

気管支喘息は、5~10%の国民が罹患し苦しんでいるアレルギー性呼吸器疾患である。喘息の病態解明と治療に関する進歩は、喘息が慢性の気道炎症を伴い、長期管理を必要とし、抗炎症薬として吸入ステロイドが有効であるということを明らかにした。そして適切な治療の普及と実行をめざす喘息予防・管理ガイドライン(JGL)が 1993 年以来改訂を重ねながら発刊されている。厚生労働省ではプロジェクト研究という位置付けで、平成 18 年度から「喘息死ゼロ作戦」の展開に着手し、本研究の申請者は「喘息死ゼロ作戦の実行に関する指針」を作成し具体的な戦略を提示した。疫学調査によると喘息死は 1995 年をピークに年次毎に減少している。とくに「喘息死ゼロ作戦」の取り組みが開始されたと考えられる 2006 年には前年の 3198 人から 2778 人へと減少し最新の 2013 年は 1728 人まで減少しており、7 年間で 1050 人の減少をみている。しかし、さらに喘息死をゼロに近づけ喘息の予後を改善するために、より有効な対策が

必要である。多数の喘息患者は非専門医であるかかりつけ医の診療を受けている。しかもかかりつけ医にとっては、JGL は実用性に欠けており、その重要な部分をコンパクトにまとめたものが所望されている。そこで本研究では、「JGL のミニマムエッセンス」を作成し、JGL をかかりつけ医が実行しやすくなるようにする。さらに、喘息死の 90% 近くが 65 歳以上の高齢者であること、小児での喘息死は一桁まで減少しているがその多くは入院率の改善に乏しい乳幼児であることを背景に、高齢者喘息と乳幼児喘息の実態に関する調査、高齢者喘息の予後改善の鍵と考えられる COPD 併存例への対策、小児を含む重症化・難治化のフェノタイプを決定する因子の探索とクラスター解析などの研究を行う。また長期管理の実行に関するアドヒアランスの向上に資する方策を提示する。このように、喘息の予後を一層改善する上で必要なことが十分に分析・探索され、実行すべきことを明確にすることこそ、実際の医療現場で求められていることであり、本研究は臨床に直結する成

果が得られると期待される。

B. 研究方法

日本アレルギー学会作成の喘息管理・予防ガイドライン(JGL)は、EBMに基づく喘息の治療の指針であり、「喘息死ゼロ作戦」で実行を推奨する治療内容である。しかしこれは診療の中で非専門であるかかりつけ医にとっては、JGLそのものは実用性に欠けており、JGLの重要な部分をコンパクトにまとめたものが所望されている。そこで、最新版のJGLの内容をかかりつけ医が実行できるように、必須項目を必要最小限にまとめた「JGLのミニマムエッセンス」を作成する(大田、長瀬)。また、喘息死の中で65歳以上の高齢者が90%近くを占めるという事実を踏まえて、高齢者を含む喘息の実態を調査するための調査表を作成し、クラスター解析に資する内容で集積する(本研究班の全内科医)。同様に6歳以上的小児喘息患者を対象に小児気管支喘息の実態を調査するための調査表を成人喘息との共通性も保ちながら作成し、クラスター解析に資する内容で集積する(近藤、下条、森川)。また、成人アトピー型喘息治療管理における環境アレルゲンモニタリングに基づく環境整備の有用性についての検討から、薬物療法とともに環境整備の有用性についても、Der 1量を高感度蛍光ELISA法を用いて測定して防ダニシーツと布団用掃除機ノズルの使用による環境整備をモニターして検討した(釣木澤、秋山)。さらに、小児での喘息死は一桁まで減少しているが、その多くは入院率の改善に乏しい乳幼児であることを考慮して、乳幼児喘息の早期診断のための質問票の作成、および乳幼児喘息そのものの軽快、治癒を目指した治療法の確立につき試案を作成し、その治療法を実践して評価する(近藤)。調査に際しては遺伝的な検索を視野に入れ、文書で同意が得られれば三省合同「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿って、成人、小児にかかわらず採血してDNAを分離し保存する(班員全員)。作成する調査表には、呼気NO(FeNO)は成人と小児の両方で施行し、成人では強制オッショーション試験(FOT)も原則として加える(長瀬、秋山、東

田、田中、檜澤、棟方、大田)。実態調査の結果をみるまでもなく、高齢者では治療アドヒアランスの改善策が重要であることから、吸入手技の評価や疾患・薬剤に関する認識度、処方率、その臨床的指標として身体活動量とQOLなどを評価する(東田)。そして調査結果を踏まえて、治療アドヒアランスを改善する方策とその実行計画について立案する(田中、長瀬、秋山、東田、大田)。また得られた成人と小児の実態調査結果を用いて、小児を含む重症化・難治化のフェノタイプを決定する因子の探索とクラスター解析を行う(長瀬、下条、檜澤、棟方、近藤、大田)。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言を遵守して遂行し、各施設の倫理委員会の承認を得て実行する。研究対象者に対する不利益、危険性を排除し、研究対象者からは同意を得た。遺伝的な検索においては、三省合同「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿って、成人、小児にかかわらず文書で同意を得て採血してDNAを分離し実行する。

C. 研究結果

1) 「JGLのミニマムエッセンス」の作成に向けた研究

平成24年11月29日に発刊された新しいJGL2012における改訂および2013年作成の「アレルギー総合ガイドライン」(JAGL2013)の要点を踏まえて、JGL2009ですでに作成されている「JGLのミニマムエッセンス」を高い実用性を念頭にして改訂している(大田、長瀬)。

2) 高齢者を含む成人喘息の実態調査に関する研究

FEV1の低下には70ml以下(急速進行型)もしくは30ml以上(通常型)の2種類が認められるが、年齢による影響は認められずコントロール状態に依存していた。そして、もう一つの状態が高齢者喘息の服薬アドヒアランスや喘息コントロールに影響を及ぼすという結果が得られた。疾患・薬剤に関する認識度調査の結果は、「疾患について」分かる:44%、「薬剤名・薬効について」分かる:14%、「吸入薬の用法・用量について」分かる:84%、

継続治療の必要性について」分かる：96%で、疾患や薬剤への理解は不十分であるが、治療の継続の理解度は高かった。吸入手技を評価すると、「吸入前の息吐き」ができていない患者は、DPI 製剤使用者で 52%、pMDI 製剤使用者で 55%と高かった。「DPI 製剤を強く深くスースと吸う」の出来ていない患者は 24%、「pMDI 製剤を深くゆっくり吸う」の出来ていない患者は 35%であった。さらに、「吸入後の息止め」の出来ていない患者は、DPI 製剤使用者で 32%、pMDI 製剤使用者で 55%であった。吸入後のうがいは、ほぼ 90%以上の患者でできていた。服薬率は、約半数の患者が 80%以上であった。吸入手技すべてのチェック項目の出来不出来を点数化し、各指標との相関関係を検討したところ、服薬率と身体活動量には相関関係が示唆されたが、QOL 評価とは、有意な相関を認めなかった(東田)。

呼気一酸化窒素濃度 (FeNO) の測定に関しては、喘息コントロールテスト (ACT) による喘息評価がよくても (ACT \geq 20) FeNO が高値 (FeNO \geq 40) だと過去 1 年間の喘息頻度が多いことがわかった。また、治療終了または自己中断直前の FeNO 値が高いとその後の再受診率が高いことが判明した。したがって、治療により自覚症状が改善しても気道炎症が残存している患者は、将来喘息発作を起こす可能性が高いことが示唆された。ハンディーな小型 FeNO 測定器 (NObreath®) を用いて昨年度に続き在宅で測定したところ、FeNO 値にも PEF 値と同様に日内変動があり、健常者でも朝の FeNO がより高いという日内変動があり、喘息患者の日内変動は治療 2 週間後に小さくなる傾向を示し ($p=0.05$)、FeNO 日内変動は喘息コントロール指標として有用である可能性が示唆された (棟方)。

患者背景因子の中で重症度と関連性が認められたのは女性とペット飼育であった。また、スギ花粉症のない患者とペットを飼育している患者では、経時的な IgE 値の変化 (Δ IgE) が対象群と比較し有意に高い傾向を示した。さらに黄色ブドウ球菌エンテロトキシン特異的 IgE 抗体 (SE-IgE) を測定すると SEA-IgE 陽性の喘息患者群は陰性患者群と比較して重症度が高い可能性を示した(田中)。

アレルギー性鼻炎は我が国の全国調査で成人喘息の 67.5%に合併し、しかも喘息の悪化因子であることが報告されていることから、アレルギー性鼻炎合併例におけるペリオスチンの測定値を解析し、鼻閉を有する鼻炎合併喘息で高値を示すことから、ペリオスチンの上下気道双方の病態への関与が示唆された(長瀬)。

以上の結果から、FeNO、IgE、SEA-IgE、ペリオスチンなどが実態調査に加える指標として有用であることが示された。

さらに成人アトピー型喘息治療管理における環境アレルゲンモニタリングに基づく環境整備には、防ダニシーツの使用が寝具、寝室の Der 1 量を減少させるためには必須であることが確認され、寝具への掃除機掛け、水拭きを含めた環境整備の継続には患者教育が重要であることが示された。そして、成人喘息においてダニアレルゲンモニタリングは喘息管理を良好にすることが示された(釣木澤、秋山)。

3) 小児気管支喘息の実態調査に関する研究

乳幼児喘息の早期診断のためには、“かぜでゼーゼー”、“運動でゼーゼー” および “家族の喘息歴” が重要項目であった(近藤)。間欠型喘息群では、尿中ロイコトリエン量が 1episode-A 群 (β 刺激薬非改善群、で 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) や対照群に比して有意に低値であった。喘息予知テスト (性別、年齢、最近 12 ヶ月での風邪をひかない状態での喘鳴および喘鳴回数と日常生活への影響、息切れ、咳き込み、アレルゲンとの接触による喘鳴や咳の誘発、湿疹、両親の既往歴などを含む) で得られる喘息予測点数を喘息発症と非発症群で比較すると喘息発症群で点数が優位に高値を示し、喘息を発症することを予知する上で有用であることが示唆された(森川)。

早期診断とともに乳幼児喘息の軽快、治癒を目指して、抗炎症薬等に加えて Th1/Th2 バランスを是正するとされる Th2 サイトカイン阻害薬を使用するプロトコールを作成して検討した。その結果、Th1/Th2 バランス

を是正するとされる Th2 サイトカイン阻害薬によって、制御性 T 細胞 (regulatory T cells; Treg) の重要な指標である Treg の比率と Th1/Th2 比率が増加傾向をした。Treg の比率は、アレルゲン免疫療法による生体の免疫系の改善の一つの重要な指標とされることから、今回の成績は重要な意味を持つ。Th1/Th2 バランスのは是正が示されると共に、アレルギー改善への方向が示唆された（近藤）。

4) 治療アドヒアラנסへの改善策の検討

一部専門医療機関と薬剤師との間で運用してきた「吸入薬に関する『服薬情報提供書』」は情報共有、教育の実効性向上に有用であることを報告してきた。従来、このシステムの中での「服薬情報提供書」は[処方医(専門医)→薬剤師→処方医]の往復書簡として運用してきたが、これを[薬剤師→処方医(非専門医)]に向けて発信することで、喘息治療に関する情報、教育を非専門一般医に拡大することを目指した。今年度、一部の協力薬剤師から試験的に開始されたこのシステムを発信した薬剤師、受信した処方医それぞれの立場から評価した。薬剤師からの評価では指導ツールおよび情報提供ツールとして 4 高評価が得られた。また、服薬指導時間は 92% が 2~10 分の範囲にあり「提供書」の使用により半数が「時間が長くなった」と回答したが、おおむね好意的に受け入れられていた。処方医からの評価では、「提供書」を確認した処方医は半数を超える、提供された情報の評価は「診療の参考になる」「処方変更の同期になる」など概ね良好な評価であった。ただし、吸入手技やアドヒアラنسに関して更なる情報が求められており、積極的な広報活動が求められていた。医療連携の拡大に非専門医、薬剤師間の情報共有が有用である可能性がある(井上、大田)。

5) 各種フェノタイプを想定したクラスター解析に関する研究

対象は、当研究班に参加している成人喘息診療施設の外来患者 657 例で、患者背景、併存症、呼吸機能検査、治療内容、喘息コントロールテスト (ACT)、気道炎症指標、強制オッショレーション法を検討した。患者背景(平

均値について記載する)は、年齢 58.1 才、男性 / 女性 : 62/38%、喫煙歴 (Never/Ex/Current) : 59.7/34.7/5.6%、アトピー型/非アトピー型 : 55.1/44.9%、BMI : 23.5、発症様態 (小児発症持続/小児発症再燃/成人発症) : 11.3/11.7/77.0%、罹患年数 : 18.2 年、併存症: アレルギー性鼻炎 68.2%, 胃食道逆流 34.7%, 副鼻腔炎 32.4%, アスピリン過敏症 7.5%, COPD 6.2%, 精神疾患 6.5%, 睡眠時無呼吸 1.7%。治療については、治療ステップ (1/2/3/4) : 5.3/22.0/44.0/28.7%、吸入ステロイド用量 : 552 μg/日 (FP 相当)、コントロール状態は、FEV1/FVC : 72.3%、%FEV1 : 89.4%、ACT 22.0 点、ACT 20 点未満/20~24 点/25 点: 18.8/46.3/34.9%、治療下での重症度は、軽症間欠型/軽症持続型/中等症持続型/重症持続型: 5.4/16.4/36.0/42.3%。炎症の指標は、FeNO 33.4 ppb、総 IgE 値 491.2 IU/ml、ペリオスチン 100.3 pg/ml、TGF-β 39.0 ng/ml、末梢血好酸球比率 4.56%、末梢血好酸球数 290.1/μl。治療下での重症持続型の特徴をまとめると、%FEV1 低値 (88.2%)、R5 高値 (気道抵抗: 7.72)、X5 低値 (リアクタンス: -0.95) であり、背景として罹患年数長期 (20.7 年)、BMI 高値 (24.2)、IgE 高値 (563 IU/ml) という特徴があった (長瀬、秋山、東田、田中、檜澤、棟方、大田)。

FOT で計測される 4 項目(呼吸抵抗 R5、R20、共振周波数までのリアクタンスの積分 ALX、共振周波数 Fres)を用いた 72 名でのクラスター解析(Ward 法)では、呼吸器システムの弾力性や慣性に関わる指標の呼吸リアクタンス (Xrs) と粘性抵抗の和である呼吸抵抗 (Rrs) のそれぞれの高低により 4 つの喘息群に分類された (A 群: 高 Xrs、低 Rrs、B 群: 低 Xrs、高 Rrs、C 群: 低 Xrs、低 Rrs、D 群: 高 Xrs、高 Rrs)。Xrs、Rrs のいずれもが高値を示すクラスター D 群は最も呼吸機能が低下し、さらに末梢気道の換気不均等を反映するとされる R5-R20 値が最も高い値を示した。一方、特に Xrs が高く、Rrs が正常のクラスター A 群においても 1 秒率低下、高い重症度、非アトピー、小さい気道可逆性などの重症喘息としての特徴が認められた。Xrs が正常、

Rrsが高いクラスターB群では1秒率が正常、低い重症度、大きい可逆性、若年発症アトピー型や肥満といった特徴が認められた。罹病期間はA群で平均27.5年、B群で15年と有意にA群で長かった。FOTによって得られたRrsとXrsを用いることにより、喘息は肺機能や重症度、アトピーの頻度が異なる4つのクラスターに分類された。喘息分子病態の多様性がFOTに反映されている可能性がある(檜澤)。

6才以上的小児期発症気管支喘息患者67名(男性46名、女性21名、年令6才-21才)を対象に、年令、性別、家族歴、肥満の有無、ペットの飼育歴、他のアレルギー疾患の合併、末梢血好酸球数、血清総IgE、15項目の吸入抗原特異的IgE、呼吸機能、FeNO、治療ステップ、治療コントロール状態などおよそ60項目の調査データを用いたクラスター分析(Ward法)を行い2つのクラスターを得た。クラスター2はクラスター1と比較して、有意に男児が多くアトピー性皮膚炎の合併が多く、家族歴では父親の気管支喘息およびアトピー性皮膚炎が多かった。また、末梢血好酸球数が多く、血清総IgE値、吸入抗原特異的IgE、呼気NO濃度が高かった。一方、クラスター間で年令、発症年令、肥満の有無、呼吸機能、治療ステップ、治療コントロール状態に差は認めなかった。クラスターの判別は、男児では血清総IgE値が1080以上の場合は100%がクラスター2であり、血清総IgE値が1080未満の場合は76%がクラスター1であった。一方、女児では血清総IgE値が2125以上の場合は100%がクラスター2であり、血清総IgE値が2125未満の場合は94%がクラスター1であった(下条)。

D. 考察

「JGLのミニマムエッセンス」の作成に向けた研究では、JGL2012とJAGL2013の内容を踏まえて、JGL2009すでに作成されている「JGLのミニマムエッセンス」を改訂し発刊する。配布は日本医師会の協力で行いたいと考えており、その評価は発刊後の次年度に行う。高齢喘息患者は、喘息という疾患をある程度認識し、薬剤名や薬効は分からない

が、吸入ステロイド薬の用法用量を守り、継続する必要性を理解しているという実態が判明した。しかしながら、患者にデモ器を用いて吸入手技を実演してもらったところ、「吸入前の息吐き」、「DPI製剤で強く深くスープと吸う」、「pMDI製剤で深くゆっくり吸う」、「吸入後の息止め」の出来ていない患者の割合が多くなった。過去に吸入指導を受けていても正しい方法で吸入薬を使用していない患者がいるため、日常診療においては、ときどき患者の吸入手技を確認し、もし出来ていなければ再指導することが必要であると考えられた。治療により自覚症状が改善してもFeNOが高値($FeNO \geq 40$)で気道炎症が残存する患者は、将来喘息発作を起こす可能性が高いことが示唆された。健常者のFeNO値にも日内変動があることがわかつたことは新規性にとんだ結果であった。未治療喘息患者において治療介入前後におけるFeNO値とPEF値(実測値・日内変動)の変化を検討した結果、FeNOに関しては実測値よりも日内変動が、PEFに関しては日内変動よりも実測値の方がより治療効果を反映する指標であることが示された。今後、どの程度の変動が良好な喘息コントロールを得るためのcutoff値であるか検討することで、その有用性について検証することが課題となる。IgEに関しては、ペットの飼育が ΔIgE を上昇させることが証明された。ペット飼育は重症度とも関連性が示されており、IgEと喘息重症度を考える上で重要な因子であると考えられる。SE-IgEを有する患者群では、男性、アトピー性皮膚炎に罹患している患者、ペットの保有者が多く認められ、これらより、SE-IgEの存在は環境因子特にアトピーを誘導するダニ抗原に強く影響を受ける可能性が示唆された。本研究では、SEA-IgEが喘息のコントロールに影響を及ぼすことが証明された。これはSEB-IgEがコントロールに影響を及ぼすアトピー性皮膚炎と異なる点であり、喘息においては世界で初めての報告となった。ペリオスチンは、鼻閉を有する鼻炎合併喘息で高値であり、上下気道双方の病態への関与が示唆された。昨年度の検討では、鼻閉を有する鼻炎合併喘息では喘息症状が重いことから、鼻閉喘息例に

おける病態マーカーや治療標的としてのペリオスチンの位置づけを追求する意義があると考えられる。今年度の研究結果から FeNO、IgE に加えて SEA-IgE やペリオスチンなどが喘息を評価する臨床的指標として有用であることが示された。臨床的指標についての検討は、喘息患者におけるコントロール状態と増悪の予知に有用な指標を明らかにし、自己管理の方法確立に寄与するものである。

小児気管支喘息に関する研究では、乳幼児喘息の早期診断のためには、“かぜでゼーゼー”、“運動でゼーゼー”および“家族の喘息歴”が重要項目であったが、さらに喘息予知テストと尿中ロイコトリエン量を加えることにより早期診断の精度が一層上がる可能性が示唆される結果であり、今後の検討により確証が得られるものと考えられる。これら成人および乳幼児を対象とする臨床研究の成果の集約は、喘息患者の実態調査における適切な調査指標を選択する上で重要な資料となるだけでなく、フェノタイプおよびクラスター解析に関連する基礎資料としても有用であり、将来にわたってさらにデータを集積することが必要である。

本研究班では、吸入療法を中心に問題点の分析とその解決策について検討を重ねている。これまでの結果、薬剤師との医薬連携を介した治療への介入が有効であることが示唆されており、その具体策として「服薬情報提供書」を利用した「喘息/COPD 医薬連携教育プログラム」が提案され「吸入薬に関する『服薬情報提供書』」は情報共有、教育の実効性向上に有用であることが明らかになった。従来、このシステムの中での「服薬情報提供書」は[処方医（専門医）→薬剤師→処方医]の往復書簡として運用してきたが、これを[薬剤師→処方医（非専門医）]に向けて発信することで、喘息治療に関する情報、教育を非専門一般医に拡大することを目指した。その結果、医療連携のさらなる拡大に非専門医、薬剤師間の情報共有が有用であることが示され、今後さらに連携システムを普及させることがアドヒアランスの改善に資するものと考えられる。

本研究の創造性を担保する各種フェノタイプを想定したクラスター解析に関する研究は、

倫理的な手続きを終えて参加施設全体で症例の集積が終了し、全体としてのクラスター解析が進められている。対象症例全例で炎症の指標として、FeNO、総 IgE 値、ペリオスチン、TGF- β 、末梢血好酸球比率、末梢血好酸球数を取り上げ、呼吸機能の項目に FOT を含めている点はこれまでの海外を含めた研究ではみられておらず、独創的であり新たな知見を得ることが期待される。個別には、FOT に焦点を絞った解析結果として、呼吸器システムの弾力性や慣性に関わる指標の呼吸リアクタンス (Xrs) と粘性抵抗の和である呼吸抵抗 (Rrs) のそれぞれの高低により 4 つの喘息群が得られ、さらに対象症例数を増やして得られた 4 群の喘息の臨床的特徴や病態の違いをより明確にすることで、FOT 測定の臨床的意義を明らかにできると考えられる。可能性が示された。また小児では、治療コントロール状態と呼吸機能に違いを認めないにも関わらず、呼気 NO 濃度に違いを認める 2 つのクラスターが得られ、コントロール状態や呼吸機能などの表現型は同一だが、アトピー素因や気道的好酸球性炎症などの病態が異なる 2 つのエンドタイプがあることが示唆された。班全体で得られた症例のクラスター解析の結果も含めて、本研究班の成果は、我が国の喘息に関するフェノタイプおよびエンドタイプの研究分野に大きく貢献することが期待される。

E. 結論

1) 達成度について

3 年間の成果は、班全体としては計画通りに「JGL のミニマムエッセンス」「自己管理法を含む喘息死ゼロ作戦の実行に関する指針」、「治療アドヒアランスの改善のための指針」「日本人喘息患者における喘息のフェノタイプとクラスター」という文書の作成により集大成され、計画のほぼ 100% に到達していると考えられる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

学術的には、重症喘息の個別化治療につながる病態解明とクラスター解析として、我が国ではじめて行われた横断的な試験として

位置付けられる。また国際的には、対象症例全例で炎症の指標として、FeNO、総IgE値、ペリオスチン、TGF- β 、末梢血好酸球比率、末梢血好酸球数を取り上げ、呼吸機能の項目にFOTを含めている点はこれまでの海外を含めた研究ではみられておらず、独創的であり新たな知見を得ることが期待される。我が国で中心的な役割を演じている喘息の専門家から構成される研究班の成果は、通常の施設では得られないものであり、

我が国における気管支喘息に対する喘息死の予防や自己管理手法の普及に大いに貢献することが期待できる。

3) 今後の展望について

クラスター解析の結果により重症喘息のフェノタイプを規定する因子が提示されるが、その結果を臨床に反映させるためには、個別化治療という概念を導入した治療に関する探索が課題となる。すなわち本研究班の成果は、さらにtranslational researchの側面からの研究として寄与するための研究課題が新たに明らかくなっている。そして、同時に喘息の診療で引き続き問題となる重症喘息に対してより良い治療戦略を確立するための研究を進める段階に到達していると考えられる。

4) 研究内容の効率性について

症例の集積により研究を進めていくためには十分な時間を要するが、研究班の構成が喘息患者を専門的に診察している施設からなっていることから、効率性は良好であったと考えられる。研究費の総額を考慮しても、各施設の設備が十分出ることから、研究費が研究そのものに有効に使用され、高レベルの内容の研究が実行できていると考えられる。

5) 総括

喘息死は2012年に1874人、そして2013年には1728人まで減少しているが、さらに喘息死をゼロに近づけるためには、より有効な対策が必要である。これまでの喘息死の減少には喘息のガイドライン(JGL)の普及と実行が役割を演じていることに疑いはなく、本研究班の役割も反映されているものと推察される。 本研究では、最新のJGLに沿った治療をかかりつけ医が実行しやすくなるように「JGLのミニマムエッセンス」を作成してい

る。さらに、喘息死の90%近くが65歳以上の高齢者であること、小児では乳幼児の予後が不良であることを考慮し、高齢者喘息と乳幼児喘息を含めて、喘息患者の実態に関する調査、高齢者喘息のCOPD併存例への対策、小児を含む重症化・難治化のフェノタイプを決定する因子の探索とクラスター解析などの研究を計画し実行してきた。最終年度となる3年目の平成26年度としては、研究計画の遂行に向けて、各研究分担者がこれまでの研究の経験と実績を生かしながら昨年度に続いて成果を上げつつある状況にある。とくに初年度から計画しながら実行に時間要する内容であった、小児を含む重症化・難治化のフェノタイプを決定する因子の探索とクラスター解析の研究が、種々の指標を揃えた症例の集積が完了し、研究期間内に解析結果が得られる状態になっていることは、本研究班の成功を意味するものであり大きな成果であることを強調したい。ただし、さらに本研究班の目標を完成するにはさらに検討を要することも事実である。

最終的には、「JGLのミニマムエッセンス」「自己管理法を含む喘息死ゼロ作戦の実行に関する指針」、「治療アドヒアランスの改善のための指針」「日本人喘息患者における喘息のフェノタイプとクラスター」などを文書化し本研究班の成果とする。これら一連の成果は、JGLに基づく治療の普及と実行に貢献し、自己管理法の確立、喘息死ゼロ作戦の推進、フェノタイプによる個別化医療の実現などを通じて、個人の負担のみでなく国の負担をも軽減し、現在の医療行政に求められている医療経済の視点からも満足できる喘息の医療体制の確立に資することができる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Tanaka Y, Nakase Y, Yamaguchi M, Sugimoto N, Ohara K, Nagase H, Ohta

- K. Allergy to Formaldehyde: Basophil Histamine-Release Test Is Useful for Diagnosis, *Int Arch Allergy Immunol* 2014; 164: 27-29
- 2) Nakase Y, Yamaguchi M, Sugimoto N, Nagase H, Ohta K. Suppression of human basophil desensitization by acetylsalicylic acid. *Allergol Int* 2014; 63(1): 127-128
- 3) 大田健. 新規気管支喘息治療薬 レルベア®エリプタ®. 診断と治療 2014; 102(9): 1421-1426
- 4) 大田健. 特集 高齢者の気管支喘息—若年・高齢者発症との違い— 気管支喘息. *日本胸部臨床* 2014; 73(8): 886-896
- 5) 小泉佑太、新井秀宜、長瀬洋之、加納誠也、立澤直子、佐川俊世、山口正雄、大田健. パンに含まれる亜麻の実を原因としてアナフィラキシーを発症した1例. *アレルギー* 2014; 63(7): 945-950
- 6) 大田健. 喘息に影響する種々の側面とその課題をめぐって. *PROGRESS IN MEDICINE* 2014; 34(6): 7-8
- 7) 大田健. 気管支喘息を合併したCOPDにどう対処するか. *Medical Practice* 2014; 31(4): 589-594
- 8) 大田健. 気管支喘息のnatural history. *呼吸と循環* 2014; 62(4): 356-362
- 9) 大田健. ガイドラインに沿った実地診療のポイントとテクニック 『気管支喘息を合併したCOPDにどう対処するか』. *Medical Practice* 2014; 31(4): 589-594
- 10) 吉村千恵、百瀬泰行、堀江健夫、駒瀬裕子、新実彰男、土橋邦生、藤本圭作、東田有智、大田健、足立満. 吸入療法における病診・病薬連携の現状～全国病院調査から～. *アレルギー* 2014; 63(2): 178-186
- 11) 大田健. 治療の進歩3－分子標的治療薬－ *日本呼吸器学会誌* 2014; 3(2): 179-185
- 12) 大田健. 重症喘息の定義、診断、疫学. アレルギーの臨床. 2014; 34: 18-21
- 13) 大田健. 難治性喘息に対する生物学的製剤治療 抗IgE抗体の有用性と新約展望. *Medical Tribune* 2014; 47(28): 8
- 14) Koketsu R, Yamaguchi M, Suzukawa M, Tanaka Y, Tashiro H, Arai H, Nagase H, Matsumoto K, Saito H, Ra C, Yamamoto K, Ohta K. Pretreatment with Low Levels of FcεRI-Crosslinking Stimulation Enhances Basophil Mediator Release. *Int Arch Allergy Immunol* 2013; 161(12): 23-31
- 15) Okamoto T, Miyazaki Y, Ogura T, Chida K, Kohno N, Kohno S, Taniguchi H, Akagawa S, Mochizuki Y, Yamauchi K, Takahashi H, Johkoh T, Homma S, Kishi K, Ikushima S, Konno S, Mishima M, Ohta K, Nishioka Y, Yoshimura N, Munakata M, Watanabe K, Miyashita Y, Inase N. A nationwide epidemiological survey of chronic hypersensitivity pneumonitis in Japan. *Respir Invest*. 2013; 51: 191-199
- 16) Ohta K, Jean Bousquet P, Akiyama K, Adachi M, Ichinose M, Ebisawa M, Tamura G, Nagai A, Nishima S, Fukuda T, Morikawa A, Okamoto Y, Kohno Y, Saito H, Takenaka H, Grouse L, Bousquet J. Visual analog scale as a predictor of GINA-defined asthma control. The SACRA study in Japan *J Asthma* 2013; 50: 514-521
- 17) Sugimoto N, Yamaguchi M, Tanaka Y, Nakase Y, Nagase H, Akiyama H, Ohta K. The basophil activation test identified carminic acid as an allergen inducing anaphylaxis *J Allergy Clin Immunol: In Practice* 2013; 20(4): 197-199
- Nagase H, Ohta K. Adherence to asthma treatment. Cezmi A, Akdis, Ioana Agache. *Global atlas of asthma*. European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Switzerland. 2013. 115-117

- 18)大田健. 最新の成人喘息ガイドライン JGL2012. アレルギア 2013; 42: 5-10
- 19)大田健、東田有智、足立満.日本人成人気管支喘息に対するホルモテロール用量設定試験—第Ⅱ相プラセボ対照並群間比較試験—. アレルギー・免疫 2013; 20 (11): 105-118
- 20)大田健、東田有智、足立満. 日本人成人気管支喘息患者を対象としたフルチカゾン/ホルモテロール配合剤(フルティフォームエアゾール)の有効性及び安全性の検討—フルチカゾン単剤を対照とした第Ⅲ相比較試験—. アレルギー・免疫 2013; 20 (11): 119-133
- 21)大田健、東田有智、足立満. 日本人成人気管支喘息患者を対象としたフルチカゾン/ホルモテロール配合剤(フルティフォームエアゾール)の長期投与時における安全性及び有効性の検討—第Ⅲ相長期投与試験—. アレルギー・免疫 2013; 20(11): 134-151
- 22)足立満、大田健、東田有智、堀口高彦. 喘息の長期管理における今後の展望—I CS/LABA 配合剤の選択基準を考える—. アレルギー・免疫 2013; 20(11): 153-162
- 23)井上恵理、妹尾真実、長山直弘、益田公彦、松井弘稔、田村厚久、永井英明、赤川志のぶ、豊田恵美子、大田健. 肺 Mycobacterium Kansasii 症と肺結核症における「拡がり 1」の画像の比較・検討. 結核. 2013; 88(8): 619-623
- 24)大田健. COPD 研究の Milestone 喘息と COPD の関連. 呼吸 2013; 32(7): 21-22
- 25)長瀬洋之、大田健. 分子標的治療をめぐって. アレルギー・免疫 2013; 20(7): 76-82
- 26)大田健. 治療法—現況と最近の進歩 2 気管支喘息治療薬の最新の進歩. 別冊・医学のあゆみ 呼吸器疾患—state of arts. 2013; 6: 103-106
- 27)大田健. 喘息病態の修飾因子・難治化因子 総説 呼吸と循環 2013; 6 (6):509-51
- 28)大田健. 特集気管支喘息：診断と治療の進歩 1. 概念 2. 日本と世界のガイドライン. 日本内科学会雑誌 2013; 102(6): 1333-1342
- 29)大田健. 成人気管支ぜんそくの難治化要因とその対策 I 総論～難治性喘息のフェノタイプとエンドタイプ～. アレルギー・免疫 2013; 20(4): 12-17
- 30)大田健. 特集Ⅱ重症喘息の背景因子と治療戦略 抗ヒト IgE 抗体療法の臨床評価. 臨床免疫・アレルギー科 2013; 59(3): 354-360
- 31)長瀬洋之、大田健. 抗体療法をめぐる現状と動向 Vita 2013; 30(2): 32-373
- 32)大田健. 「喘息予防・管理ガイドライン 2012」のワンポイント解説(成人).アレルギー 2013; 62(2): 139-143
- 33)大田健. 『喘息予防・管理ガイドライン 2012』改訂のポイント International Review of Asthma & COPD 2013; 15(1): 34-38
- 34)大田健. アレルギー性疾患、免疫不全症. 内科学書 改訂第 8 版. 2013; 12: 252-285
- 35)大田健. 好酸球性肺炎 気管支肺胞洗浄 [BAL]法の手引き第 1 版第 3 刷 2013: 78-81. 克誠堂出版株式会社. 東京
- 36)職業性アレルギー疾患診療ガイドライン 2013 作成委員(大田健、秋山一男、足立満、他) 職業性アレルギー疾患診療ガイドライン 2013. 協和企画. 東京. 2013
- 37)大田健. 気管支喘息. 浦部晶夫、大田健、川合眞一、島田和幸、菅野健太郎. 今日の処方改訂第 5 版. 南江堂. 東京. 2013. 194-204
- 38)大田健. 好酸球性肺炎. 浦部晶夫、大田健、川合眞一、島田和幸、菅野健太郎. 今日の処方改訂第 5 版. 南江堂. 東京. 2013. 228-231
- 39)大田健. 血清病. 浦部晶夫、大田健、川合眞一、島田和幸、菅野健太郎. 今日の処方改訂第 5 版. 南江堂. 東京. 2013. 651-652
- 40)大田健. 好酸球性肺炎. 日本呼吸器学会びまん性肺疾患学術部会、厚生労働省難治性

- 疾患克服研究事業びまん性肺疾患調査研究班. 気管支肺胞洗浄[BAL]法の手引き第1版第3刷. 克誠堂出版. 東京. 2013. 78-81
- 41)大田健. アレルギー性疾患、免疫不全症. 小川聰、他. 内科学書改訂第8版 中山書店. 東京. 2013. 2: 252-285
- 42)大田健. アレルギー性疾患の薬物療法. 矢崎義雄. 内科学 第10版. 朝倉書店. 東京. 2013; 1344-1345
- 43)足立満、大田健、東田有智、森川昭廣、西間三馨、向井功. 日本における喘息患者実態電話調査 2011—Asthma Insights and Reality in Japan 2011: AIRJ 2011. アレルギー・免疫 2012; 19(10): 60-68
- 44)大田健. ガイドラインとその活用のしかた. Medical Practice 2012; 29: 543-550
- 45)大田健. 国際ガイドライン(GINA)アップデート. 最新医学 2012; 6: 1225-1228
- 46)鈴川真穂、大田健. レプチンと好塩基球機能. 臨床免疫・アレルギー科 2012; 58(1): 99-104
- 47)大田健. GINA 改訂のポイント. International Review of Asthma & COPD 2012; 14(2): 34-37
- 2.学会発表
- 1)大田健. 喘息治療の変遷と未来～喘息治療のガイドラインを踏まえて～. 第19回東京吸入療法研究会. 2014.10. 東京
- 2)大田健. 最新のガイドラインに沿った喘息の治療戦略. 第14回岐阜呼吸フォーラム 2014.10. 岐阜県
- 3)大田健. 鼻炎合併喘息のメカニズムと疫学調査(SACRA Study)より. 予防医療プレスセミナー. 2014.9. 東京
- 4)大田健. 喘息 COPD オーバーラップ症候群(ACOS)をめぐって. 第8回相模原臨床アレルギーセミナー. 2014.8. 相模原市
- 5)大田健. 喘息治療の最前線. 第52回全国大学保健管理協会 関東甲信越地方部会研究会. 2014.8. 東京都
- 6)大田健. COPD 診断治療における最近の話題. 南東北COPDトータルマネジメント講習会. 2014. 宮城県
- 7)大田健. GINA2012-重症喘息への対応について. GINA World Asthma Day 2014. 2014. Japan
- 8)Ohta K. Once-Daily Tiotropium Respimat Is Well Tolerated And Efficacious Over 52 Weeks In Japanese Patients With Symptomatic Asthma Receiving Inhaled Corticosteroids (ICS) ±Long-Acting β 2-Agonist (LABA) : A Randomized, Double -Blind, Placebo-Controlled Study. American Thoracic Society International Conference 2014.5 San Diego, USA
- 9)Ohta K. The Relationship Between The Type And Numbers Of Rhinitis Symptoms And Asthma Control. American Thoracic Society International Conference 2014.5 San Diego, USA
- 10)大田健. 生物学的製剤がもたらした喘息の新たな治療戦略. 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2014.5. 京都
- 11)大田健. ホルマリンを原因として歯根治療後に発疹を生じた1例. 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2014.5. 京都
- 12)大田健. 染毛剤によりアナフィラキシーショックを呈した1例. 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2014.5. 京都
- 13)大田健. 平成24年度以降に検査を行ったアナフィラキシー等の成人 130症例のまとめ. 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2014.5. 京都
- 14)大田健. アレルギー疾患の新しい治療 気管支喘息の吸入療法第20回アレルギー週間記念企画中央講演会. 2014.5. 東京
- 15)長瀬洋之、杉本直也、高橋美圭、小泉佑太、田中祐輔、中瀬裕子、田宮浩之、小島康弘、吉原久直、倉持美知雄、新井秀宜、

- 山口正雄、横山直之、大田健. 強制オッショーション指標と動脈硬化指標との関連. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会. 2014.4. 大阪
- 16)山口正雄、田中祐輔、中瀬裕子、杉本直也、高橋美圭、小泉佑太、田宮浩之、小島康弘、吉原久直、鈴川真穂、倉持美知雄、新井秀宜、長瀬洋之、大田健. 低分子抗原によるヒト好塩基球活性化に対して、抗原の蛋白結合性が及ぼす影響の解析. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会. 2014.4. 大阪
- 17)赤司俊介、松井弘稔、斎藤美奈子、赤羽朋博、小林宏一、門田宰、大島信治、廣瀬敬、赤川志のぶ、大田健. 陳旧性肺結核患者における強制オシレーション法の有用性について. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会. 2014.4. 大阪
- 18)大田健. Total allergist としての成人喘息治療第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2013. 東京
- 19)大田健. アレルギー疾患ガイドライン第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2013. 東京
- 20)大田健. 喘息治療のベストアンサーを考える第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2013. 東京
- 21)Ohta K. Interim analysis of post-marketing surveillance of omalizumab in Japan. European respiratory society annual congress 2013. 2013.9. Barcwlona, Spain
- 22)大田健. 最新のガイドライン JGL2012 に沿った喘息の治療戦略. 第 7 回相模原臨床アレルギーセミナーランチョンセミナー. 2013.8. 神奈川
- 23)鈴川真穂、田下浩之、大田健. omalizumab による好塩基球感作抑制を利用した in vitro での IgE 関与の証明. 第 43 回日本職業・アレルギー学会総会・学術大会. 2013.7. 神奈川
- 24)大田健. One airway one disease からみた職業アレルギー. 第 43 回日本職業・アレルギー学会総会・学術大会. 2013.7. 神奈川 19)田下浩之、大田健. 喘息 COPD 合併疑い例における肺拡散能の解析. 第 23 回国際喘息学会日本・北アジア部会. 2013.6. 東京
- 25)田下浩之、大田健. 鼻炎関連症状の症例数・種類と喘息症状との関連. 第 23 国際喘息学会日本・北アジア部会. 2013.6. 東京
- 26)鈴川真穂、田下浩之、大田健. I 型アレルギーにおける omalizumab を用いた in vitro での IgE 関与の証明. 第 23 国際喘息学会日本・北アジア部会. 2013.6. 東京
- 27)大田健. Risk factors for viral respiratory infections and asthma. 第 23 国際喘息学会日本・北アジア部会. 2013.6. 東京
- 28)Ohta K, Tashimo H. Relationship Between Respiratory Reactance and CT Honeycombing Score In International Lung Diseases, Evaluated By Colored3-Dimensional Analyses. American Thoracic Society 2013 International Conference. 2013.5. Pennsylvania, USA
- 29)Koyama K, Ohshima N, Oshitani Y, Kawashima M, Kobayashi K, Akagawa S, Matsui H, Nagai H, Tamura A, Ohta K. Clinical Impact Of Emphysema In Patients With Mycobacterium Tuberculosis Infection. American Thoracic Society 2013 International Conference. 2013.5. Pennsylvania, USA
- 30)Akatsuka S, Matsui H, Okuda K, Ishida M, Yoshida K, Akagawa S, Ohta K. Efficacy And Safety Of Dexmedetomidine For Sedating Patients With Acute Exacerbation Of Chronic Respiratory Failure During And After Non-Invasive Ventilation. American Thoracic Society 2013 International Conference. 2013.5.

Pennsylvania, USA

- 31) Ohta K. Anti-IL-6 Receptor Antibody Attenuates Neutrophilic Airway Inflammation In ROR γ -overexpressing Mice. American Thoracic Society 2013 International Conference. 2013.5. Pennsylvania, USA
- 32) 大田健. 最新のガイドライン JGL 2012 に沿った喘息治療戦略. 第 53 回日本呼吸器学会. 2013.4. 東京
- 33) 田下浩之、大田健. 低分子抗原によるヒト好塩基球活性化に対して、抗原の蛋白結合性が及ぼす影響の解析. 第 53 回日本呼吸器学会. 2013.4. 東京
- 34) 田下浩之、大田健. 間質性肺疾患におけるインパルスオシレーション所見と画像所見の対比. 第 53 回日本呼吸器学会. 2013.4. 東京
- 35) 大田健. 喫煙衝動および禁断症状の時間経過を用いた禁煙治療成功の予測. 第 53 回日本呼吸器学会. 2013.4. 東京
- 36) 大田健. 高齢化社会の COPD 治療. 第 53 回日本呼吸器学会. 2013.4. 東京
- 37) 大田健. 喘息予防・管理ガイドライン 2012 の変更点と今後の展望. 第 53 回日本呼吸器学会. 2013.4. 東京
- 38) 大田健. Syndrome としての喘息病態. 第 53 回日本呼吸器学会. 2013.4. 東京
- 39) 大田健. 鼻炎関連症状の症状数・種類と喘息症状との関連. 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2013.4. 横浜
- 40) 大田健. 成人喘息とウィルス感染. 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2013.4. 横浜
- 41) 大田健. 重症喘息の病態と治療戦略: 抗 Ig E 抗体療法 Update. 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2013.4. 横浜
- 42) 大田健. GINA2012 - 改訂のエッセンス. GINA 世界喘息デー/日本 2013. 2013. 石川
- 43) 大田健. 喘息ガイドラインの将来像.

GINA 世界喘息デー/日本 2013. 2013. 石川

- 44) 大田健. 喘息吸入療法の今後について—新規ICS/LABA と LAMA の将来展望 喘息吸入療法研究会. 2013
- 45) 大田健. 最新の喘息予防・管理ガイドライン JGL2012 に沿った喘息の治療戦略. 第 121 回日本結核病学会東海地方会・第 103 回日本呼吸器学会東海地方会. 2013. 名古屋
- 46) 大田健. 最新のガイドライン JGL2012 に沿った成人喘息の治療戦略. 気管支喘息シンポジウム 2013. 2013.3. 北海道
- 47) 大田健. 最新のガイドライン JGL2012 に沿った喘息治療. 小平医師会講演会. 2013.3. 東京
- 48) 大田健. トップアスリートの呼吸機能の経年変化は一般人より大きいか? 第 23 回日本臨床スポーツ医学学会学術集会 2012.11. 神奈川
- 49) 長瀬洋之、大田健. The clinical and genetic factors for predicting the response to inhaled corticosteroids. 2012.10. Sweden
- 50) 大田健. 喘息の診断と治療における新しい潮流—現状と将来展望—. 第 125 回薬事エキスパート研修会. 2012.10. 東京
- 51) 大田健. ガイドライン企画 最新の喘息予防・管理ガイドライン (JGL2012) - 改訂のポイント. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012.10. 大阪
- 52) 中瀬裕子、長瀬洋之、杉本直也、田中祐輔、小島康弘、吉原久直、倉持美知雄、田下浩之、新井秀、山口正雄、大田健. 病院と薬局の双方から吸入手技・指導の実態調査 (1) 薬局側. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012.10. 大阪
- 53) 長瀬洋之、中瀬裕子、杉本直也、田中祐輔、小島康弘、吉原久直、倉持美知雄、田下浩之、新井秀、山口正雄、大田健. 病院と薬局の双方から吸入手技・指導の実態調査 (1) 薬局側. 第 62 回日本アレル

- ギー学会秋季学術大会 2012.10. 大阪
- 54)田中祐輔、中瀬裕子、杉本直也、戸田貴子、小島康弘、神山麻恵、吉原久直、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、川上綾子、梶山浩、長瀬洋之、山口正雄、大田健. 市販の飲料を原因としてアナフィラキシーを発症し好塩基球活性化試験 (BAT) が原因特定に有用であった 1 例. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012.10. 大阪
- 55)庄司俊輔・橋本充恵・大島信治・檜垣直子・川島正裕・大田健. 気管支平滑筋細胞由来因子による気道上皮細胞の遊走. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012.10. 大阪
- 56)杉本直也、長瀬洋之、中瀬裕子、田中祐輔、小島康弘、吉原久直、倉持美知雄、田下浩之、新井秀、山口正雄、大田健. 喘息・COPD 合併疑い例における肺拡散能の解析. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012.10. 大阪
- 57)大田健、庄司俊輔. 喘息患者におけるカルボシステインの増悪抑制効果 (GAIA Study). 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012.10. 大阪
- 58)大田健. 喘息死ゼロに向けた新たなアプローチ. 筑豊 SYM 講演会. 2012.9. 福岡
- 59)大田健. シンポジウム 2 「成人喘息の治療」. 第 22 回国際喘息学会日本・北アジア部会. 2012.7. 福岡
- 60)セッション I での特別発言及びセッション II での特別講演「喘息死ゼロに向けた新たなアプローチ」. 第 13 回南大阪呼吸器フォーラム 2012.6. 大阪
- 61)大田健. 喘息とその修飾因子 SACRA Study から学んだ事. 沖縄喘息治療フォーラム 2012.6. 沖縄
- 62)大田健. 喘息とその修飾因子 SACRA Study から学んだ事. 広島内科医会学術講演 2012.5. 広島
- 63)大田健. 教育講演 成人の喘息予防治療ガイドラインの改訂に向けて. 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2012.5. 大阪
- 64)大田健. GINA 世界喘息デー 2012/日本ガイドラインの活用術. 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2012.5. 大阪
- 65)大田健. シンポジウム 1 気管支喘息とアレルギー性鼻炎. 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2012.5. 大阪
- 66)大田健. 気管支喘息と関連疾患. 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2012.5. 大阪
- 67)大田健. 特別講演 気管支喘息一病態の解明と治療の変遷. 第 52 回日本呼吸器学会総会 2012.4. 兵庫

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

**厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業
（免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野））
総合分担研究報告書**

**成人アトピー型喘息治療管理における環境アレルゲンモニタリングに基づく
環境整備の有用性についての研究**

研究分担者 釣木澤尚実 独立行政法人国立病院機構相模原病院アレルギー科

研究協力者 齋藤明美、押方智也子、中澤卓也、安枝 浩、秋山一男

独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター

研究要旨

成人アトピー型喘息の原因抗原の多くはダニアレルゲンであり、成人喘息の治療・管理についてはICSを含めた薬物治療介入が重要ではあるが、環境中アレルゲンの回避はその前提として考慮すべき問題である。当センターではこれまでの基礎研究からダニアレルゲン(Der 1)定量について比色法を蛍光法に改良し、二次抗体をマウスモノクローナル抗体からウサギポリクローナル抗体に変更することでDer 1量が1pg/mlまで測定可能な高感度蛍光ELISA法を確立した。また従来の掃除機法による室内塵採取を、テープ法を用いた皮膚・寝具表面の抗原採集や室内空気中の浮遊堆積塵を採集するシャーレ法によるサンプリングに変更しその有用性を立証した(齋藤明美、他。アレルギー2012;61:1657-64)。本研究ではこの測定法を臨床応用し成人ダニ感作喘息において環境中アレルゲンのモニタリングが喘息管理に有用であるかについて検討した。研究1・2009年エントリー症例を対象として無作為環境調整・整備介入試験によるDer 1量と臨床症状の変化について検討し、超極細繊維敷フトン・枕カバー(ミクロガード®；防ダニシーツ)使用および7項目による環境整備指導を行う介入群では翌秋の寝具、寝室(床)のDer 1量は減少したが、非介入群では変化しないこと、介入群では喘息症状点数が減少し、%PEF値が有意に増加したことを報告した(Tsurikisawa N, et al. Allergy Asthma Clin Immunol 2013;9:44-53)。研究2・2009-2011年エントリー症例を対象とし環境整備介入方法の違いにより、介入1、2年後のDer 1量の変化と実際に実施した環境整備内容を解析すると、寝具への直接の掃除機掛けや掃除機掛け前の水拭きを施行していない症例ではシーツ介入1年後の翌秋のDer 1量は減少するが介入2年後にはDer 1量は増加し、介入前と変わらなくなることが明らかになった。研究3・有効性の高い環境整備方法に関する検討では、冬季の寝室の湿度管理を50%以下にすること、秋季だけではなく、冬季においても環境整備を十分に行うことが重要であること、寝室Der 1量が減少するために有効な室内環境整備内容についての多変量解析では①週1回以上の寝具への掃除機かけを行う、②床がフローリングである、③掃除機をかける前に床の水拭きをする、④床の乾拭きをする、の順に重要であることが明らかとなつた。研究4・防ダニシーツ使用+環境整備指導を行い、翌秋の寝具Der 1量 <20 ng/m²かつ寝室Der 1量 <100 ng/m²/weekを満たし、さらに重症度が中等症以下で無症状期間が6か月以上有する症例においてはICSのStepdownを試みることが可能である。研究5・環境整備に関する患者意識調査では当研究に参加している成人喘息患者さんの多くは環境整備の重要性を十分理解している症例が多いことが明らかとなったが成人では生活様式の多様性から環境整備の継続が難しい場合があること、また環境整備の実施の継続に影響を及ぼす自我状態についての検証では環境整備後Der 1量が減少、リバウンドせず減少状態が持続する症例ではエゴグラムの「大人の自我状態」、「自由な子供の自我状態」の点数が高値であった。

研究・6以上の結果をもとに室内環境整備の教育プログラムとしての手引きを作成した。成

人アトピー型喘息においてもダニアレルゲンモニタリングにより喘息管理が良好になることが明らかとなった。しかし、成人では生活様式の多様性から環境整備の継続が難しい場合があるが、個人の特性に合わせた環境整備指導を行うことより将来のテラーメイド医療に貢献し、成人アトピー型喘息の予後を改善させる可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年の喘息研究の進歩に伴い ICS(inhaled corticosteroid)が抗炎症薬の第一選択薬であるという認識は一般的になり、ICS 治療が普及するにつれ成人喘息の治療・管理が比較的容易になった。しかし、成人アトピー型喘息の原因抗原の多くはダニアレルゲンであり、喘息の治療・管理は薬物治療だけではなく、環境中アレルゲンの回避も重要である。これまでに我々は早期治療介入のための指針の策定を目的とするとともに、薬物治療介入を前提とした上での環境調整・整備の指標として、環境中アレルゲンの曝露量をモニタリングする方法を検討している。従来の掃除機法は必ずしも個人曝露量を反映しているとは限らず、ダニアレルゲンは気道や皮膚を介して体内に入るので空気中や皮膚表面のアレルゲン量を測定する必要があり、そのためには ELISA の高感度化が必要である。我々は従来の ELISA 法において比色法を蛍光法に変更し、さらに二次抗体をマウスモノクローナル抗体からウサギポリクローナル抗体に変更することでダニアレルゲン (Der 1) 量を 1pg/ml まで測定することが可能な高感度蛍光 ELISA 法を確立した。また空気中のアレルゲンは床面や寝具から空气中に一度浮遊したアレルゲン粒子を堆積塵として採集する方法：シャーレ法

(Petri dish 法) を用いて採取し、Der 1 量を定量する方法を確立した (齋藤明美、他。アレルギー 2012;61:1657-64)。ダニアレルゲン感作喘息、特に小児では環境中アレルゲンの回避が喘息症状、投薬内容、予後を改善させるという報告があるが成人では十分に検証された報告は少ない。また成人では掃除機法により室内塵を定量したものが多く、皮膚や寝具などの抗原の個人曝露量と対比させた研究は少ないため、環境中アレルゲンの回避が成人喘息の臨床症状や予後を改善させるかどうかについては明確にはされていない。

本研究ではこの測定法を臨床応用し成人ダニ感作喘息において環境中アレルゲンのモニタリ

ングが喘息管理に有用であるかについて研究

1・成人アトピー型喘息症例を対象とし無作為環境調整・整備介入試験による Der 1 量と臨床症状の変化について検討、研究 2・防ダニシート使用および環境整備指導を行い、実際に実施した整備内容と抗原量の変化を解析、研究 3・有効性の高い環境整備方法に関する検討、研究 4・防ダニシート使用+環境整備指導を行うことで ICS の減量が可能かについて、研究 5・環境整備に関する患者意識調査、自我状態の解析を行い、研究 6・室内環境整備の教育プログラムとしての手引きを作成した。

B. 研究方法

研究 1・2009 年エントリー症例による環境調整・整備の無作為介入試験；成人ダニ感作喘息患者 25 症例を対象とし、2009 年 8-10 月に皮膚、寝具、寝室の Der 1 量を測定した。25 症例は無作為に介入群、非介入群に分類した。介入群は超極細繊維敷フトン・枕カバー（ミクロガード®）を使用し、湿気対策、ダニの発生源を減らす、寝具全般の管理、効率よく合理的な掃除法など、合計 32 項目の室内環境整備指導

〔各々の項目について、はい：2 点、いいえ：0 点、どちらともいえない：1 点、合計 64 点満点で評価（表 1）〕を行った。非介入群はこれらの環境整備、指導を行わず、自然経過を追跡した。翌年 2010 年 8-10 月の同一時期（2009 年度測定時期と 1 ヶ月以内）に同様に検体を採取した。臨床所見の評価としてシャーレ設置期間中の PEF 測定値（喘息日記より）の検討、オフライン法を用いて呼気 NO 測定を行った。臨床症状点数については咳嗽、喀痰、喘鳴、発作性呼吸困難、くしゃみ（埃の曝露によるもの）、鼻汁（埃の曝露によるもの）、SABA 使用、予定外の外来受診、入院のそれぞれ（各 9 項目）について；なし→0 点、ときどきあり→1 点、頻回にあり→2 点 とし、合計点数（0~18 点）で評価した。以上の評価項目と抗原暴露量の変化を比較検討した。寝具表面、皮膚表面アレルゲンはテ

ープ法を用いて、また寝室内のアレルゲンは床面や寝具から空気中に一度浮遊したアレルゲン粒子を堆積塵として採集するシャーレ法 (Petri dish 法) を用いて採取した。テープ法では起床時の頸部左右の皮膚および寝具表面 2 箇所にテガダーム TM を貼付し、BSA/PBST、室温、16 時間で抽出、シャーレ法では寝室の床面および床面から高さ約 1m にシャーレを 2 週間静置し、BSA/PBST、室温、2 時間で抽出、それぞれ高感度蛍光 ELISA 法で Der 1 量を測定した。

研究 2・環境整備介入方法の違いによる環境整備の有効性の検証 ; 2009 年から 2011 年にエントリーした成人ダニアレルゲン感作喘息患者 68 症例を対象として、防ダニシーツ（超極細繊維フトン・枕カバー：ミクロガード®）を使用する 47 症例（シーツ介入群）と布団用掃除機ノズル使用する 21 症例（ノズル介入群）に無作為に分類し環境整備指導を実施、介入前、介入 1 年後、2 年後の秋季（8-10 月）に Der 1 量を測定した。寝具への掃除機掛けと水拭きの施行別に、Der 1 量と臨床所見（症状点数、%PEF、呼気 NO）の関係を比較検討した。

研究 3・環境整備における基礎検討

1・寝室の湿度管理；成人ダニアレルゲン感作喘息患者 61 症例を対象として、秋季（8-10 月）、冬季（12-翌年 2 月）に研究 1 と同様 Der 1 量を測定、同時期に寝室の温度・湿度を測定し、温湿度と抗原曝露量の関係を解析した。

2・冬季の環境整備の有用性；2009 年から 2012 年までの秋季と冬季（12-2 月）に Der 1 量を測定することができた成人ダニアレルゲン感作喘息患者 77 例を対象とし、非介入時 Der 1 量を測定後、シーツ介入群、ノズル介入群に分類し、同様な環境整備指導を実施した。秋季から冬季への Der 1 量変化と秋季の Der 1 量の関係を解析して、効果的な環境整備について検証した。

3・環境整備チェックリストにおける多変量解析；成人ダニアレルゲン感作喘息患者 63 症例を対象として、防ダニシーツまたは布団用掃除機ノズルを使用し研究 1 同様環境整備指導を行った。介入前、介入 1 年後に研究 1 同様 Der 1 量を測定し、介入 1 年後の Der 1 量を介入前の Der 1 量で除した値が 1 以下（1 年後/前 Der 1 量 <1）を減少群、1 以上を増加群と定義し、Der

1 量が減少することに影響する環境整備チェックリストの 32 項目の優先順位について多変量解析を用いて解析した。

研究 4・環境整備介入により長期管理の抗炎症薬としての ICS の減量が可能かについての検討 ; 成人ダニアレルゲン感作喘息患者 79 症例を対象として、防ダニシーツまたは布団用掃除機ノズルを使用、研究 1 同様環境整備指導を行った。無症状期間 6 ヶ月以上の症例は ICS を 1/2 量に減量 (ICS:FP200□g[換算]以下は中止) し、併用薬は継続して、1 年間の臨床経過を追跡した。臨床症状の悪化の基準は①臨床症状が週 1 回以上ある、②吸入口刺激薬使用が週 1 回以上ある、③運動を含む活動制限がある、④%FEV または%PEF が 80%未満である、⑤%PEF 週内変動が 20%以上である、項目のうち 1 つ以上当てはまる症例と定義した。研究 1 と同様に介入前、介入 1 年後、ICS 減量または中止 1 年後に Der 1 量を測定して抗原曝露量と臨床所見の関係を比較検討した。

研究 5・環境整備に関する患者意識調査とモチベーション維持に関する検討

1・患者意識調査；防ダニシーツ・カバーを使用し環境整備介入を 1 年以上継続している 35 例を対象とし、2011 年春季に面談による 32 項目の環境整備指導と患者意識調査を実施した。モチベーションを持続するため 3 ヶ月毎（雨季、秋季）に郵送や面談形式により同調査を実施し、環境整備点数や Der 1 量の変化との関係を解析した。環境整備指導の効果は「環境整備チェックリスト」（表 1）を用いて問診を行いその結果を点数化して評価した。また同時に患者意識調査アンケート（表 2）を行った。

2・環境整備の実施の継続に影響を及ぼす自我状態についての検証；患者自身が環境整備を実施し自己成長エゴグラム（Self Grow-up Egogram ; SGE）に回答した 57 症例を対象とした。シーツ介入またはノズル介入を行い、全症例に環境整備指導を行った。2010 年秋（8-10 月）と 2011、2012 年の秋（8-10 月）の同一時期（1 ヶ月以内）に研究 1 同様に Der 1 量を測定した。2013 年春（4-6 月）に SGE による調査を実施、Der 1 量の変化から介入 1 年後と介入 2 年後を比較し Der 1 量が継続して減少している群をリバウンドなし群、介入 2 年目に抗原

量が増加しているリバウンドあり群に分けてSGEの結果を比較した。

エゴグラムは各自我状態である批判的な親の自我状態 (Critical Parent ; CP)、大人の自我状態 (Adult ; A)、自由な子供の自我状態 (Free Child ; FC)、養護な親の自我状態 (Nurturing Parent ; NP)、従順な子供の自我状態 (Adapted Child ; AC) の点数パターンからへ型：円満パターン (アベレージ)、N型：献身パターン (ナイチンゲール)、逆N型：自己主張パターン (ドナルドダック)、V型：葛藤パターン (ハムレット)、W型：苦悩パターン (ウェルテル)、M型：明朗パターン (アイドル)、右下がり型：頑固パターン (ボス) に分類した (表3)。

研究6・将来の臨床応用を目指した室内環境整備の教育プログラム (手引き作成)

これまでの種々の研究結果を基にして患者教育用の環境整備プログラムを作成した。

(倫理面への配慮)

以上の研究はヘルシンキ宣言遵守して遂行し、研究対象者に対する不利益、危険性を排除し、同意を得た。また当院の倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

研究1・①調査時年齢は介入群 (N=13) : 平均 45.8±11.0 歳、非介入群 (N=12) : 平均 46.5±16.1 歳、介入群：男性 5 症例、女性 8 症例、非介入群：男性 4 症例、女性 8 症例であった。喘息の発症年齢は介入群：平均 23.4±19.7 歳、非介入群：平均 35.5±17.0 歳と有意差を認めなかつた。喘息重症度は Step1/2/3/4 が介入群で 0/2/4/7、非介入群で 0/3/5/4 と有意差は認めなかつた。また血清総 IgE 値、ダニ特異的 IgE 値、末梢血好酸球数は喘息初診時、調査時ともに介入群、非介入群で有意差を認めなかつた。②環境整備前後 (2009年8-10月と2010年8-10月) の各試料中の Der 1 量は皮膚では介入群、非介入群の統計学的有意差は認めないが寝具および寝室 (低位) の Der 1 量は介入群で有意に減少 ($p<0.01$) したが非介入群は変化しなかつた (図1)。③臨床所見の評価については介入群では臨床症点数が有意に減少 ($p<0.05$) (図2) し、シャーレ設置期間中の最低%PEF 値が有意に増加した ($p<0.01$) (図3)。また介入後/介入

前の寝室の Der 1 量変化率は介入後/介入前の呼気 NO 比と正の相関 ($p<0.01$, $rs=0.68$) を、最低%PEF 変化率と負の相関 ($p=0.05$, $rs=-0.40$) を認めた。

研究2・寝具 Der 1 量はシーツ介入群において寝具の掃除機掛け施行例では 1、2 年後有意に減少した ($p<0.01$) が、非施行例では 1 年後減少 ($p<0.01$) したが 2 年後には増加し、介入前の Der 1 量と有意差は認めなかつた (図4)。寝室 (シャーレ 100cm) の Der 1 量はシーツ介入群において水拭き施行例では 1、2 年後有意に減少した (1 年後 ; $p<0.02$ 、2 年後 ; $p<0.01$) が、非施行例では 1 年後有意に減少 ($p<0.05$) したが、2 年後には増加し、介入前と有意差を認めなかつた (図5)。寝室 (床) の Der 1 量は、シーツ介入群において水拭き施行例では 1、2 年後有意に減少 ($p<0.01$) したが、非施行例では 1、2 年後ともに減少しなかつた (図6)。ノズル介入群において寝具の掃除機掛け施行例、寝室の水拭き施行例でそれぞれ寝具、寝室の Der 1 量が減少傾向であったが統計学的有意差は認めなかつた (図4-6)。

研究3・1・寝室の湿度管理 : ①秋から冬への湿度はシャーレ設置期間中の最高湿度、最低湿度、朝平均湿度、夕平均湿度いずれも有意 ($p<0.001$) に低下したが、冬季に上昇する寝室も存在した。またダニの成育ができないと言われている湿度 50%以下の寝室が秋には 1 例も認めなかつた (図7)。②秋から冬への Der 1 量は皮膚 ($p<0.05$)、寝室 (100cm) ($p<0.01$)、寝室 (床) ($p<0.01$) で有意に低下したが寝具 (敷布団) では有意差がなく、冬季に Der 1 量が 10 倍以上増加する寝具も認められた (図8)。③冬季の寝室の湿度と Der 1 量の関係を検討すると、寝室の湿度 50%以下の症例は 50%以上の症例に比べ、皮膚 ($p<0.01$)、敷布団 ($p<0.01$) の Der 1 量が有意に低かつた (図9)。④秋から冬への湿度変化と冬の Der 1 量の関連については、秋から冬に低下し冬が 50%以下の群、低下するが冬 50%以上の群、秋よりも増加し冬 50%以上の群、この 3 群の間で皮膚 ($p<0.01$)、敷布団 ($p<0.01$) の Der 1 量に有意な関係が認められた。すなわち、秋から冬にかけて湿度が増加しさらに冬の湿度が 50%以上の症例では Der 1 量が高値であることが示された (図10)。

2・冬季の環境整備の有用性；冬季を挟んだ前後（翌年秋）のDer 1量増加率を秋季から冬季にかけてのDer 1量が減少した群と増加した群で比較すると、特に寝具では冬季にDer 1量が減少すると秋季増加率が有意に低い($p<0.01$)ことが明らかとなった（図11）。また冬季減少率と秋季増加率との相関では冬季にDer 1量が減少した症例ほど翌年の秋季の増加率が低いことが明らかである（図12）。具体的な症例を提示する。症例1は冬季にDer 1量が減少し、その後の秋季、冬季のDer 1量が徐々に減少している。症例2は冬季に増加し、翌秋はそれに上乗せするかのようにDer 1量が増加し、その後も徐々に増加している（図13）。この結果から一般の日本家屋においてはDer 1量は秋季に増加し冬季に減少する傾向があるが、冬季にDer 1量が減少しない場合、翌秋に自然増加するDer 1量が加算されるような形で徐々に増加する傾向があることが明らかになった。一方で冬季のDer 1量が十分に低下していると翌年以降の秋季のDer 1量増加も抑制できることが明らかとなり環境整備はDer 1量が最多になる秋季だけでなく、冬季も十分に行うことが重要であると考えられる。

3・環境整備チェックリストにおける多変量解析；①寝室Der 1量減少に関与する因子に対する単変量解析では1・週に1回以上、寝具に直接掃除機をかける、2・掃除機をかける前に床の拭き掃除をするが有意な因子として抽出された($p<0.05$)。多変量解析では1・週に1回以上、寝具に直接掃除機をかける($p<0.01$)、2・床はフローリングである($p<0.05$)、3・掃除機をかける前に床の拭き掃除をする($p<0.05$)、4・床を化学雑巾やモップで乾拭きをする($p<0.05$)が有意な因子として抽出された（表4）。②寝具Der 1量減少に関与する因子に対する単変量解析では32項目の環境整備チェックリスト内の項目では有意差のある因子は抽出できなかった。多変量解析で検討すると1・週に1回以上、寝具に直接掃除機をかける($p=0.015$)、2・窓を数回開けて換気する($p<0.01$)、3・床を化学雑巾やモップなどで乾拭きをする($p=0.01$)、4・ベッドメイキング時に窓を開放する($p<0.05$)、5・布製のソファは置いてない($p<0.05$)、6・カーテンや壁にも月に2~3回掃除機をかける

($p<0.05$)が有意な因子として抽出された（表5）。

研究4・①成人ダニアレルゲン感作喘息患者79症例を対象として、1年間以上Der 1量の測定が可能であった症例は63症例であった。6ヶ月以内に臨床症状があり、ICSの減量が不可能であると判断した症例は26症例（減量不可能群：41.3%）で、6ヶ月間以上臨床症状を認めない37症例の内、ICS未使用の1例を除き、36症例はICS量を1/2量に減量、低用量のICS使用症例は中止とした。1年間の経過観察のうち1例が脱落し、1年内に臨床症状の悪化を認めた悪化群15症例（42.9%）、臨床症状の悪化を認めない非悪化群20症例（57.1%）を解析対象とした（図14）。②現年齢は悪化群、非悪化群、減量不可能群でそれぞれ平均 52.2 ± 13.4 歳、平均 45.4 ± 14.0 歳、平均 51.0 ± 14.6 歳であった。性差はなく、喘息発症年齢は悪化群、非悪化群、減量不可能群でそれぞれ平均 28.5 ± 20.3 歳、平均 25.5 ± 16.6 歳、平均 33.8 ± 22.1 歳であった。また罹病期間は悪化群、非悪化群、減量不可能群でそれぞれ平均 21.8 ± 17.8 歳、平均 19.1 ± 13.2 歳、平均 17.4 ± 16.2 歳と有意差は認めなかつた。喘息重症度はStep1/2/3/4が悪化群0/3/8/4、非悪化群0/9/7/4、減量不可能群0/6/7/13と減量不可能群でStep4が多い傾向があつた。③減量前のICS一日使用量は減量不可能群で有意に高用量であった（図15）。各試料中のDer 1量の経過では悪化群は皮膚、寝具、寝室とともにDer 1量が減少しなかつた。非悪化群は寝具、寝室のDer 1量が介入1年後有意に減少し、ICS減量後も持続していた。減量不可能群は寝室のDer 1量が減少していたが、臨床症状点数は減少したもののが残存しICS減量ができなかつた（図16）。

研究5・1・患者意識調査；・①患者意識調査では2011年春季面談時には「環境整備指導が役に立っている」と回答した症例は100%であったが雨季72%、秋季68%と時間がたつにつれ減少した。また「環境整備指導を時々受けたい」「電話や文書による指導をしてほしい」「直接口頭で指導してほしい」のいずれかを希望した症例は春季82.9%、雨季40.0%、秋季40.0%へと減少した（表6）。一方で「なかなか思うように実地できない」と回答した症例は春季37.1%、

雨季 48.0%、秋季 48.0%と半数近くの症例に存在した。②春季の面談時に「なかなか思うように実施できない」と回答した症例についてさらに検討した結果、「発生源を減らす」項目の点数が有意に低く、環境整備チェックリストの中で実施できない項目数が有意に多かった(図 17)。③また秋季の寝具(敷布団、掛布団)、寝室(100cm、床)のDer 1量が有意に高値であった(図 18)。④その理由を解析すると「仕事が忙しい」「家族の介護がある」「体調が悪い」などの理由が多かった。一方で環境整備が大変だが継続している理由として「発作が起きなくなった」と回答している症例があり、環境整備により直接臨床症状の改善した実感が得られた症例はその後も環境整備の継続が可能であることが明らかとなった(表 7)。以上の結果から当研究に参加している成人喘息患者さんの多くは環境整備の重要性を十分理解している症例が多いことが明らかとなつたが、思うように整備が継続できない症例も多く、特に成人の場合には、仕事や家族の事など社会的要因を優先するため環境整備の継続が難しい事が明らかになった。

2・環境整備の実施の継続に影響を及ぼす自我状態についての検証；介入 1年後に Der 1量が減少、2年後に Der 1量が増加した「リバウンド群」と、1、2年後も減少した「リバウンドなし群」で比較した。2群間のDer 1量の経時的变化を示す(図 19)。リバウンドの有無別のエゴグラムパターンの比較では「リバウンドなし群」において SGE の自己肯定型のへ型、M型、逆 N型、右下がり型が多く、W型が少なかつた(図 20)。リバウンドの有無別のエゴグラムの解析では、「リバウンドなし群」で「大人の自我状態」、「自由な子供の自我状態」の点数が有意に高値であった($p<0.05$) (図 21)。この結果から成人喘息患者における環境整備による抗原回避はストレスに対する適応性が高い自我状態にある人に対してより効果的で有効性が高い可能性があること、環境整備の継続にエゴグラムを活用した患者の気づきを促す患者教育が有用である可能性があることが明らかとなった。

研究 6・秋季に寝具(マットレス等、使用している全ての寝具)と寝室のDer 1量を測定し、寝具Der 1量 >50 ng/m² または寝室Der 1量 >200 ng/m²/week である症例は防ダニシ

ーツを使用し、面談による個別環境整備指導を行う。翌秋にDer 1量が減少しない症例はさらに布団用掃除機ノズルを併用し、環境整備指導(特に受診毎に①寝具への掃除機掛けの頻度、②寝室の掃除機掛け頻度、③水拭き頻度)を確認し、再指導する。一方、翌秋のDer 1量が寝具Der 1量 <20 ng/m²かつ寝室Der 1量 <100 ng/m²/weekを満たし、また重症度が中等症以下で無症状期間が6か月以上有する症例においてはICSのStepdownを試みてもよい。上記をフローチャートにまとめた(図 22)。

D. 考察

アレルゲン回避が臨床症状を改善すると一般的には考えられているにも関わらず、特定の一つの物理的または化学的対策の利用を支持するエビデンスは非常に少ない。特に成人における鼻炎や喘息に関してはマットレスカバー、高性能粒子空気フィルタを利用するだけの、ダニアレルギーおよびペットアレルギー対策は推奨できないと考えられている。Platts-Millsの総説では90%以上の抗原回避は臨床的に有効であると考えられているが、成人においては生活の多様性や環境整備の継続による長期的な抗原量の減少が維持できることによると考えられる。また微量な抗原曝露量を正確に測定する技術的な問題もある。我々の施設では高感度ELISA法を用いることで微量なDer 1量の測定を可能にした。また従来の掃除機法によるサンプリングを簡便なテープ法やシャーレ法による採集方法で抗原の定量性を確立した(齋藤明美、他。アレルギー2012;61:1657-64)。その臨床応用として成人アトピー型喘息を対象とし、ICS治療介入を前提とした上で防ダニシーツ使用および環境整備指導を行うと、非介入群と比較して寝具、寝室のDer 1量が減少し臨床症状が改善し、肺機能(%PEF)が上昇することを明らかにした(Tsurikisawa N, et al. Allergy Asthma Clin Immunol 2013;9:44-53)。過去の海外報告では成人アトピー型喘息についてはこのような環境整備によるinterventionは否定的な研究成果が多い。我々の研究では従来の掃除機法ではなく、就寝中に抗原を吸入することを想定した抗原の定量法としてのテープ法や寝室全体の抗原量を反映するシャーレ法を用いて抗原を採取し、高

感度ELISA法を用いることで微量なDer 1量を定量したことにより得られた結果であると考えられる。また我々の結果にも示したように防ダニシーツを使用するだけでは寝具の抗原量を減少させることは難しく、寝室全体の環境整備を同時にすることで寝具の抗原量が減少することが明らかとなった。検体の採取法、測定法が厳密であることが臨床的効果を反映したと考えられる。

成人のダニ感作喘息で喘息重症度が中等症以下の症例では環境整備介入によりDer 1曝露量が減少かつ維持できる症例においてはICSの減量・中止が可能であることが示された。重症喘息では抗原回避により喘息症状が軽減しても長期間消失に至らないこともあり、ダニアレルゲン曝露以外の誘因による喘息発作もあることから、抗原回避によりDer 1量が減少した後もICSの減量が難しいことも推測される。

これまでの我々の研究結果から抗原回避の方法として防ダニシーツ使用のみでは寝具、寝室のDer 1量は減少しないことが明らかとなった。さらなるダニ抗原を減少させる効率のよい整備方法の開発として、ふとん用掃除機ノズルを使用、環境整備指導を行ってきた。今回の結果から布団用掃除機ノズルの使用により寝具Der 1量を減少させる可能性があるが、寝具の掃除機かけを長期間継続する必要性が示唆された。成人はさまざまな環境で生活しており、今回の対象となった成人喘息の患者さんは全例が抗原回避、環境整備の重要性を理解していたが、実際には環境整備は「なかなか思うように実施できない」と実感している症例も多く、その理由として「仕事が忙しい」「家族の介護がある」など、成人では生活形態の多様性から環境整備の継続が難しい症例が存在すること、また環境整備指導に対するモチベーションは時間とともに維持できなくなる症例が多いことも明らかとなった。成人においても抗原量が減少し、かつ減少した状態が維持できる症例では臨床症状の改善や抗炎症薬であるICSの減量が可能であるが、抗原量がリバウンドする症例も多いため、喘息の管理としての環境整備を推奨する意見が少ないのかもしれない。本年度のエゴグラムの解析ではDer 1量が介入1年後に減少、2年後にも減少してリバウンドしない症例群では自己肯定型

のへ型、M型、逆N型、右下がり型が多くW型が少ないと、「大人の自我状態」、「自由な子供の自我状態」の点数が高値であることなどが明らかとなり、この結果から成人においては環境の変化による心理的、肉体的負担が増加した際にストレス回避が柔軟にできる症例が環境整備を継続できる可能性が示唆された。これらの情報を基に成人アトピー型喘息患者を対象とした日常臨床においては患者一人ひとりに適した指導を行うこと、環境整備指導は繰り返し行うこと、環境整備の意識づけを行うことの必要性が明らかになった。また将来の目標が見える環境整備の教育プログラムを普及させ日常臨床に応用することが期待される。

E. 結論

成人アトピー型喘息では薬物治療介入がなされてもダニ抗原曝露の影響を受けることが明らかとなった。成人では生活形態の多様性から環境整備の継続が難しい場合があるが、エゴグラムの解析から一人ひとり適した指導を行い、環境整備の気づきを促すことが重要であることが明らかとなるとともに環境整備の手引きを日常臨床で応用することで成人喘息における将来のテラーメイド医療に発展する可能性がある。

G. 研究発表

1.論文発表

- 1)齋藤明美、釣木澤尚実、押方智也子、中澤卓也、安枝 浩、秋山一男。日本における空気中ダニアレルゲン測定法としてのシャーレ法の評価。アレルギー 2012; 61: 1657-64
- 2)Tsurikisawa N, Saito A, Oshikata C, Nakazawa T, Yasueda H, Akiyama K. Encasing bedding in covers made of microfine fibers reduces exposure to house mite allergens and improves disease management in adult atopic asthmatics. Allergy Asthma Clin Immunol 2013; 9: 44-53
- 3)Tsurikisawa N, Oshikata C, Tsuburai T, Mitsui C, Tanimoto H, Takahashi K, Sekiya K, Nakazawa T, Minoguchi K,

- Otomo M, Maeda Y, Saito H, Akiyama K. Markers for Step-down of Inhaled Corticosteroid Therapy in Adult Asthmatics. *Allergol Int* 2012; 61: 419-429
- 4) Tsurikisawa N, Saito H, Oshikata C, Tsuburai T, Akiyama K. High-dose intravenous immunoglobulin treatment increases regulatory T cells in patients with eosinophilic granulomatosis with polyangiitis. *J Rheumatol* 2012; 39: 1019-25
- 5) Oshikata C, Tsurikisawa N, Takigawa M, Omori T, Sugano S, Tsuburai T, Mitomi H, Takemura T, Akiyama K. An adult patient with Henoch-Schönlein purpura and non-occlusive mesenteric ischemia. *BMC Res Notes*. 2013; 6: 26. doi: 10.1186/1756-0500-6-26
- 6) Tsurikisawa N, Saito H, Oshikata C, Tsuburai T, Akiyama K. Decreases in the numbers of peripheral blood regulatory T cells, and increases in the levels of memory and activated B cells, in patients with active eosinophilic granulomatosis and polyangiitis. *J Clin Immunol* 2013; 33: 965-976
- 7) Oshikata C, Tsurikisawa N, Saito A, Watanabe M, Kamata Y, Tanaka M, Tsuburai T, Mitomi H, Takatori K, Yasueda H, Akiyama K. Fatal pneumonia caused by *Penicillium digitatum*: a case report. *BMC Pul Med* 2013; 13: 16-19
- 8) Oshikata C, Tsurikisawa N, Takigawa M, Omori T, Sugano S, Tsuburai T, Mitomi H, Takemura T, Akiyama K. An adult patient with Henoch-Schönlein purpura and non-occlusive mesenteric ischemia. *BMC Res Notes*. 2013; 6: 26-31
- 9) Saito H, Tsurikisawa N, Oshikata C, Tsuburai T, Akiyama K. Increased interleukin-27 production by antigen-presenting cells promotes regulatory T cell differentiation and contributes to inducing a remission in patients with eosinophilic granulomatosis with polyangiitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013; 161 S2: 66-74
- 10) Horiguchi Y, Tsurikisawa N, Harasawa A, Oshikata C, Morita Y, Saitoh H, Saito I, Akiyama K. Detection of Pulmonary Involvement in Eosinophilic Granulomatosis with Polyangiitis (Churg-Strauss, EGPA) with 18F-fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography. *Allergol Int*. 2014; 63: 121-3
- 11) Tsurikisawa N, Saito H, Oshikata C, Tsuburai T, Ishiyama M, Mitomi H, Akiyama K. An increase of CD83+ dendritic cells ex vivo correlates with increased regulatory T cells in patients with active eosinophilic granulomatosis and polyangiitis. *BMC Immunol*. 2014; 15: 32
- 12) Tsurikisawa N, Saito H, Oshikata C, Tsuburai T, Akiyama K. High-dose intravenous immunoglobulin therapy for eosinophilic granulomatosis with polyangiitis. Clinical and Translational Allergy 2014; 4: 38
- 13) Oshikata C, Tsurikisawa N, Saito A, Yasueda H, Akiyama K. Occupational asthma from exposure to rye flour in a Japanese baker. *Respirol Case Rep*. 2014; 2: 102-104
- 14) Dobashi K, Akiyama K, Usami A, Yokozeki H, Ikezawa Z, Tsurikisawa N, Nakamura Y, Sato K, Okumura J; Committee for Japanese Guideline for Diagnosis and Management of Occupational Allergic Diseases; Japanese Society of Allergology. Japanese guideline for occupational allergic diseases 2014. *Allergol Int*. 2014; 63: 421-42
- 15) 押方智也子、釣木澤尚実、他。多発囊胞性陰影を呈した human T-cell leukemia virus I 関連気管支肺胞症/細気管支肺胞異常症の 1

- 剖検例。日本呼吸器学会誌 2012;1:78-82
- 16)釣木澤尚実、押方智也子、齋藤明美、秋山一男。室内環境アレルゲンと対応のコツ。薬局。2014; 65: 451-456
 - 17)釣木澤尚実、押方智也子、齋藤明美、秋山一男。室内環境アレルゲンと対応のコツ。薬局。2014; 65: 451-456
 - 18)釣木澤尚実、押方智也子、齋藤明美、秋山一男。室内環境アレルゲンと対応のコツ。薬局。2014; 65: 451-456
 - 19)釣木澤尚実、押方智也子、齋藤明美。アレルゲン診断と対応・気管支喘息一思春期・成人。小児科診療 2014;10:1281-1289
 - 20)釣木澤尚実、押方智也子、齋藤明美。アレルゲン感作と発症一発症・増悪に与える環境整備の効果。喘息 2014;27:141-146

2.学会発表

- 1)齋藤明美、釣木澤尚実、押方智也子、中澤卓也、安枝 浩、秋山一男。アトピー型成人喘息における環境中ダニアレルゲン回避の意義 1基礎。第 52 回日本呼吸器学会学術大会
- 2)押方智也子、釣木澤尚実、齋藤明美、中澤卓也、安枝 浩、秋山一男。アトピー型成人喘息における環境中ダニアレルゲン回避の意義 2 臨床。第 52 回日本呼吸器学会学術大会
- 3)押方智也子、釣木澤尚実、齋藤明美、中澤卓也、安枝 浩、秋山一男。ダニ感作成人喘息患者における環境中ダニアレルゲン回避に関する環境整備 1 継続効果。第 24 回日本アレルギー学術春季臨床大会
- 4)齋藤明美、釣木澤尚実、押方智也子、中澤卓也、安枝 浩、秋山一男。ダニ感作成人喘息患者における環境中ダニアレルゲン回避に関する環境整備 2 患者意識調査。第 24 回日本アレルギー学術春季臨床大会
- 5)押方智也子、釣木澤尚実、齋藤明美、中澤卓也、安枝 浩、秋山一男。室内環境整備による環境中ダニアレルゲン回避は成人喘息患者の臨床症状を改善する 1 臨床 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会
- 6)齋藤明美、釣木澤尚実、押方智也子、福富友馬、安枝 浩、秋山一男。室内環境整備による環境中ダニアレルゲン回避は成人喘息患者の臨床症状を改善する 2 基礎 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会
- 7)押方智也子、釣木澤尚実、齋藤明美、中澤卓也、安枝 浩、秋山一男。冬季の環境中ダニアレルゲン量増加はアトピー型成人気管支喘息の冬季の臨床症状悪化と関連する。第 43 回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会
- 8)押方智也子、釣木澤尚実、齋藤明美、粒来崇博、渡井健太郎、南崇史、林浩昭、谷本英則、伊藤潤、関谷潔史、大友守、前田裕二、安枝浩、秋山一男。環境中ダニアレルゲン曝露回避によるダニ感作成人喘息患者の臨床症状改善には環境整備の継続が必要である。1. 臨床。第 53 回日本呼吸器学会学術大会。2013.4.19-21. 東京
- 9)齋藤明美、釣木澤尚実、押方智也子、福富友馬、安枝浩、秋山一男。環境中ダニアレルゲン曝露回避によるダニ感作成人喘息患者の臨床症状改善には環境整備の継続が必要である。2. 患者意識調査。第 53 回日本呼吸器学会学術大会
- 10)押方智也子、釣木澤尚実、齋藤明美、渡井健太郎、南崇史、林浩昭、谷本英則、伊藤 潤、関谷潔史、粒来崇博、大友守、前田裕二、長谷川眞紀、安枝浩、秋山一男。環境中ダニアレルゲン曝露回避のための効果的な環境整備に自我状態が及ぼす影響。第 25 回日本アレルギー学術春季臨床大会。2013.5.11-12. 横浜
- 11)齋藤明美、釣木澤尚実、押方智也子、福富友馬、安枝浩、秋山一男。防ダニシーツまたは布団用掃除機ノズル使用による室内環境整備の効果。1 基礎。第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会。2013.11.29 東京
- 12)押方智也子、釣木澤尚実、齋藤明美、粒来崇博、渡井健太郎、福原正憲、南崇史、林浩昭、谷本英則、伊藤潤、関谷潔史、前田裕

- 二、安枝浩、秋山一男. 防ダニシーツまたは布団用掃除機ノズル使用による室内環境整備の効果. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013.11.29. 東京
- 13)釣木澤尚実、押方智也子、粒来崇博、渡井健太郎、福原正憲、南崇史、林浩昭、谷本英則、伊藤潤、関谷潔史、前田裕二、斎藤博士、秋山一男. ICS 減量過程において LABA はいつまで必要か? 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2013.11.29. 東京
- 14)押方智也子、釣木澤尚実、齋藤明美、粒来崇博、前田裕二、安枝 浩、秋山一男. ダニ感作成人喘息患者における環境整備効果に寝室掃除機掛け回数が及ぼす影響. 第 44 回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会. 2013.7.6. 相模原
- 15)齋藤明美、釣木澤尚実、押方智也子、福富友馬、安枝浩、秋山一男. 寝室の温度・湿度と環境中ダニアレルゲン量の関係. 第 44 回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会. 2013.7.6. 相模原
- 16)釣木澤尚実、押方智也子、粒来崇博、渡井健太郎、南崇史、林浩昭、谷本英則、伊藤潤、関谷潔史、大友守、前田裕二、斎藤博士、秋山一男. モストグラフ法における強制オッショレーション法は気道過敏性正常域の喘息症例の末梢気道病変を検出しうる. 第 53 回日本呼吸器学会学術大会. 2013.4.19-21. 東京
- 17)押方智也子、釣木澤尚実、齋藤明美、粒来崇博、前田裕二、安枝浩、秋山一男. 環境改善が治療として奏効した *Penicillium* 属によるアレルギー性気管支肺真菌症の一例. 第 44 回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会. 2013.7.6. 相模原
- 18)押方智也子、釣木澤尚実、齋藤明美、安枝 浩、秋山一男. 繰り返しの環境調査が有用であった *Aspergillus niger* による職場関連過敏性肺炎の一例. 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会. 2013.9.27-28. 東京
- 19)押方智也子、釣木澤尚実、齋藤明美、粒来崇博、渡井健太郎、福原正憲、南 崇史、林 浩昭、谷本英則、伊藤 潤、関谷潔史、前
- 田裕二、安枝浩、秋山一男。ダニアレルゲン感作成人喘息患者に対する有益性の高い室内環境整備指導内容の検討. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会 2014.4.25-27 大阪
- 20)釣木澤尚実、齋藤明美、押方智也子、粒来崇博、渡井健太郎、南 崇史、林 浩昭、谷本英則、伊藤 潤、関谷潔史、前田裕二、安枝 浩、秋山一男。室内環境整備による環境中ダニアレルゲン量回避は成人喘息患者の長期管理薬 ICS の減量を可能にするか? 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2014.5.9-11 京都
- 21)押方智也子、釣木澤尚実、齋藤明美、粒来崇博、渡井健太郎、林 浩昭、伊藤 潤、関谷潔史、前田裕二、安枝 浩、秋山一男。環境中ダニアレルゲンの持続的な低減化に自我状態が及ぼす影響. 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2014.5.9-11 京都
- 22)齋藤明美、釣木澤尚実、押方智也子、福富友馬、安枝 浩、秋山一男。ダニアレルゲン量を減少させるための環境整備の効果を上げるには. 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2014.5.9-11 京都
- 23)押方智也子、釣木澤尚実、齋藤明美、渡辺麻衣子、長 純一、石田雅嗣、小林誠一、矢内勝、鎌田洋一、寺嶋淳、安枝 浩、秋山一男。東日本大震災後に仮設住宅に居住することによって発症したアレルギー性気管支肺アスペルギルス症の一症例. 第 45 回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会 2014.6.28-29 福岡
- 24)釣木澤尚実、押方智也子、渡井健太郎、福原正憲、南 崇史、林 浩昭、谷本英則、伊藤 潤、関谷潔史、粒来崇博、前田裕二、斎藤明美、齋藤博士、秋山一男。成人喘息の臨床的寛解の基準に対する検討. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会 2014.4.25-27 大阪
- 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

表1・環境整備チェックリスト

寝室・寝具の環境整備 チェックリスト		寝室・寝具の環境整備 チェックリスト	
湿気対策	窓を数回開けて換気している	20-1 和式 21-1 布団 22-1 天日干しした後、寝具に掃除機をかけている	カバーは寝室以外ではずしている
	寝室では開放型暖房機器を使用していない	20-2 ベッド 21-2 マットレスの裏表に掃除機をかけている	時々天日干しして、叩いている
	押し入れやクローゼットの中に隙間がある	22-2 ベッドパッド 23 窓を開放して掃除している	マットレスをたてかけて風通しをしている
	押し入れやクローゼットの中に除湿剤を使用している	24 効率 25 高いところから順番に水拭きをしている	マットレスの裏表に掃除機をかけている
	植物や水槽、洗濯物、加湿器など水分の発生するものはない	26 掃除機をかける前に床の拭き掃除をしている	ベッドパッドは2~3ヶ月に一度丸洗いしている
	すみかを減らす	27 床を化学雑巾やモップなどで乾拭きしている 28 床を水拭きをしている	窓を開放して掃除している
	高密度繊維でできた布団カバーで寝具をつつんでいる	29 家具や装飾品を移動して掃除している	週に1回以上、掃除をしている
	床はフローリングである	30 寝室の掃除に5分以上かけている	高いところから順番に水拭きをしている
	カーペットやジュウタンは使用していない	31 カーテンや壁にも月に2~3回掃除機をかけている	掃除機をかける前に床の拭き掃除をしている
	布製のソファは置いてない	32 カーテンは年に2~3回丸洗いしている	床を化学雑巾やモップなどで乾拭きしている
	クッションやぬいぐるみは置いてない	評価	床を水拭きをしている
	家具は作りつけである		家具や装飾品を移動して掃除している
	布団の上げ下げやベッドメイキング時に窓を開放している		寝室の掃除に5分以上かけている
寝具全般	月に1~2回、カバーやシーツの洗濯をしている		カーテンや壁にも月に2~3回掃除機をかけている
	毛布、タオルケットなどは年に2~3回丸洗いしている		カーテンは年に2~3回丸洗いしている
	週に1回以上、寝具に直接掃除機をかけている		はい○：2点
	寝具の裏表に掃除機をかけている		いいえ×：0点
	収納してあった寝具は丸洗いしてから使用している		どちらとも言えない△：1点
12	収納してあった寝具は天日干ししてから使用している		
13	収納してあった寝具は掃除機をかけてから使用している		

表2・患者意識調査

ご感想をお聞かせ下さい（当てはまること全てに○印を付けて下さい）
<input type="checkbox"/> 環境整備指導は役に立っている <input type="checkbox"/> 環境整備は大変である <input type="checkbox"/> 環境整備はそれほど大変ではない <input type="checkbox"/> 環境整備はもうやめたい <input type="checkbox"/> 環境整備をきちんと実施している <input type="checkbox"/> 指導内容のできることだけは実施している <input type="checkbox"/> なかなか思うように実施できない <input type="checkbox"/> 環境整備指導を時々受けたい <input type="checkbox"/> 環境整備指導は受けなくて良い <input type="checkbox"/> 電話や文書による指導をしてほしい <input type="checkbox"/> 直接口頭で指導してほしい

その他ご意見がございましたらご自由にお書き下さい

表3・自己成長エゴグラム；代表的パターン分類

- ① ヘ型：円満パターン（アベレージ）：最も円満と言われるパターン。思いやりの心であるNPを頂点とし、適度に責任感を表すCPと冷静客観的な判断力を表すAを兼ね備え、人と温かく交わることができ、節度を持ち一歩は慣れて物事を観察することができる。自分が楽しむFCが人に気を遣うACに比し高いため、ストレスにも上手につきあうことができる。
- ② N型：献身パターン（ナイチンゲール）：自己犠牲を美德とする人。思いやりの心であるNPが高いため人と温かく交わされるが、自分が楽しむFCが人に気を遣うACに比し低いため、苦しくても無理をして人に尽くしがちであり、人と協調することにおいては右に出るものがない程である。
- ③ 逆N型：自己主張パターン（ドナルドダック）：CPとFCが高いため、目標を持ち楽しんで実行していく人。リーダーに多いパターンであり、ストレスとは縁遠い。しかし、マイペースな側面があるため自分では気づかぬうちに周りにストレスを与えている可能性がある。
- ④ V型：葛藤パターン（ハムレット）：高い要求水準を掲げ（CP）、結果に満足できずに反省するACとの間で葛藤しやすい人。自身を肯定するFCがあまりに低い場合は、自らを叱咤激励し続け、その結果うつ病になる可能性がある。
- ⑤ W型：苦悩パターン（ウェルテル）：冷静な判断力であるAが高いため、FCで感情を感じる前にAで考えることを先行させて自身をコントロールし、辛い気持ちを表現せずにストレス状態に陥っていることが多く、胃潰瘍などの身体疾患への罹患を検査で指摘されるまで気づかないこともある。
- ⑥ M型：明朗パターン（アイドル）：思いやりのNPと遊び心のFCが高いため、人と温かく交われる人。Aが適度に備わっていれば、ヘ型同様にストレスに陥りにくい望ましいパターンである。
- ⑦ 右下がり型：頑固パターン（ボス）：責任感を表すCPを頂点としており、面白みには欠けるかもしれないが人から頼りにされる人。あまりにACが低く急峻な右下がりである場合は、頑なで柔軟性に欠け、人の言うことに耳を貸さない行動変容が最も難しいパターンとなる。

表4・寝室Der 1量減少に影響を及ぼす因子の解析—ロジスティック解析—

		Exponent	95%confidence interval	p-value
↑	ベッドメイキング時に窓を開放	0.800	0.113-5.676	0.82
寝具全般	月に1~2回、カバーやシーツの洗濯	2.994	0.210-42.704	0.42
	週に1回以上、寝具に直接掃除機をかける	0.094	0.019-0.453	<0.01
	収納寝具は丸洗い後に使用	1.159	0.270-4.984	0.84
↓	収納寝具は天日干し後に使用	1.119	0.076-16.427	0.93
発生源	床はフローリングである	0.152	0.030-0.779	<0.05
↑	高いところから順番に水拭きをする	2.887	0.62-13.449	0.18
効率	掃除機をかける前に床の拭き掃除をする	0.198	0.047-0.836	<0.05
↓	床を化学雑巾やモップで乾拭きをする	5.192	1.035-26.055	<0.05

表5・寝具Der 1量減少に影響を及ぼす因子の解析—ロジスティック解析—

		Exponent	95%confidence interval	p-value
湿気対策	窓を数回開けて換気	0.001	0.0000517-0.175	<0.01
	寝室では開放型暖房機器の使用がない	15.827	0.510-491.2	0.12
	植物や水槽、洗濯物、加湿器がない	0.474	0.03-1.397	0.60
発生源	高密度繊維でできた布団カバー使用	0.06	0.003-1.397	0.80
	布製のソファは置いてない	0.000013	0.00000077-0.230	<0.05
	クッションやぬいぐるみは置いてない	0.34	0.12-4.619	0.34
↑	ベッドメイキング時に窓を開放	29123.4	4.95-1714927	<0.05
寝具全般	月に1~2回、カバーやシーツの洗濯	0.924	0.035-24.601	0.96
	週に1回以上、寝具に直接掃除機をかける	0.017	0.001-0.451	0.015
	収納寝具は丸洗い後に使用	2.469	0.280-21.78	0.42
↓	収納寝具は天日干し後に使用	91.12	0.0000013-612809	0.57
和	カバーは寝室以外ではずしている	10.996	0.510-237.1	0.13
↑	窓を開放して掃除している	0.005	0.00048-57278	0.52
効率のよい掃除	高いところから順番に水拭きをする	25.291	0.659-970.5	0.08
	掃除機をかける前に床の拭き掃除をする	0.111	0.009-1.378	0.09
	床を化学雑巾やモップなどで乾拭きをする	506.3	4.023-63732.8	0.01
	床を水拭きをしている	9.797	0.389-246.9	0.17
	家具や装飾品を移動して掃除する	0.124	0.007-2.084	0.15
↓	カーテンや壁にも月に2~3回掃除機をかける	0.012	0.000216-0.648	<0.05

表 6・患者意識調査の結果

	n	春季面談時	雨季	秋季試料採取時
		35	25	25
1 役に立っている		35(100)	18(72.0)	17(68.0)
2 大変である		22(62.9)	14(56.0)	15(60.0)
3 それほど大変ではない		11(31.4)	4(16.0)	4(16.0)
4 もうやめたい		3(8.6)	1(4.0)	1(4.0)
5 きちんと実施している		3(8.6)	3(12.0)	3(12.0)
6 できることだけは実施している		23(65.7)	16(64.0)	19(76.0)
7 なかなか思うように実施できない		13(37.1)	12(48.0)	12(48.0)
8 指導を日々受けたい		25(71.4)	10(40.0)	10(40.0)
9 指導は受けなくてよい		0(0.0)	1(4.0)	2(8.0)
10 電話や文書による指導をして欲しい		6(17.1)	2(8.0)	2(8.0)
11 直接口頭で指導してほしい		21(60.0)	6(24.0)	3(12.0)
8,10,11 いずれか		29(82.9)	10(40.0)	10(40.0)

春季面談時には全例が「環境整備指導は役に立っている」と回答したが、22例(63%)は「大変である」と回答した。また29例(83%)が「指導を受けたい」と回答した。春季面談時以降10例がドロップアウトした。

表 7・環境整備の継続が難しい理由

「なかなか思うように実施できない」理由

- 仕事が忙しい
- 家族の介護がある
- 体調が悪い（腰痛、手のしびれ）
- 花粉症があるので窓はほとんど開けない
- 築年数が長い
- 子供の世話を優先となる
- 家族が掃除をしている
- 寝室を共有している

「大変」だが継続している理由

- 役に立っている
- 必要だと思う
- また苦しい思いをしたくない
- 発作が起きなくなった
- 子供もアレルギーがある
- 自分のためだから

仕事や家族のことなど社会的要因を優先するため環境整備がなかなか思うようにできないが、必要性を感じており大変だが継続していることが解った。

図 1・環境整備前後の各試料中 Der 1 量

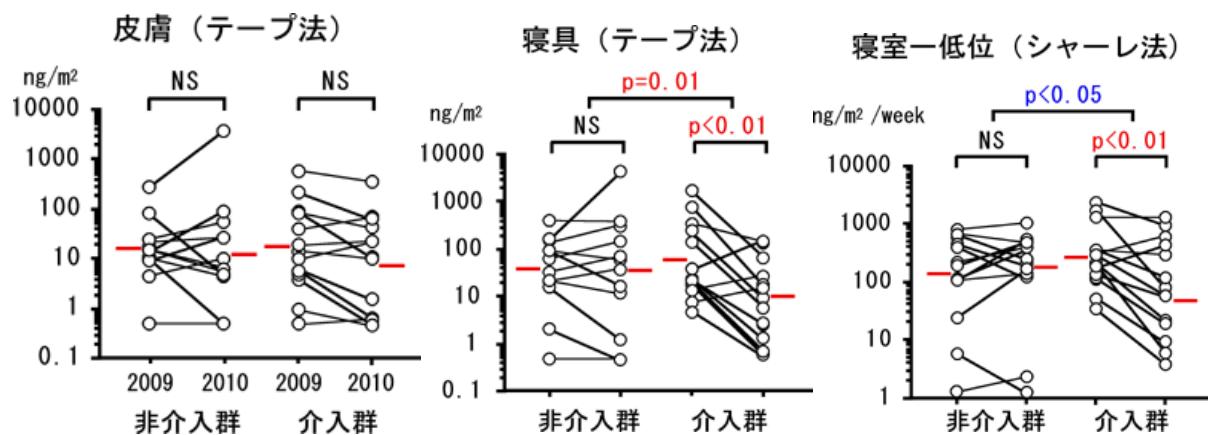


図2・介入前後の症状点数の変化

臨床症状（咳嗽、喀痰、喘鳴、発作性呼吸困難、くしゃみ（埃の暴露によるもの）、鼻汁（埃の暴露によるもの）、SABA 使用、予定外の外来受診、入院）のそれぞれ（各9項目）について；なし→0点、ときどきあり→1点、頻回にあり→2点とし、合計点数（0～18点）で評価

図3・環境整備前後の%PEF値の変化

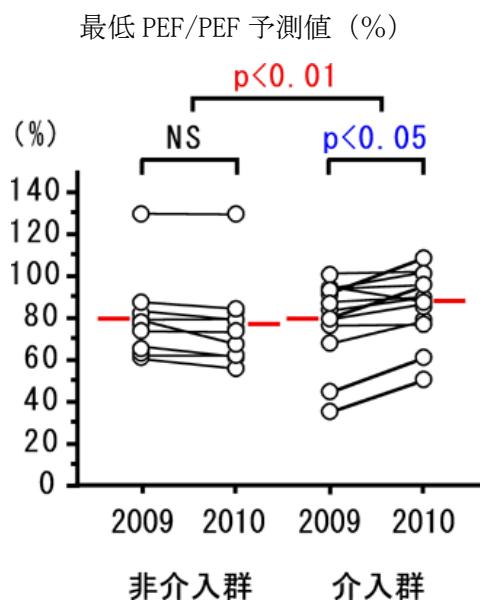


図4・寝具Der 1量の変化

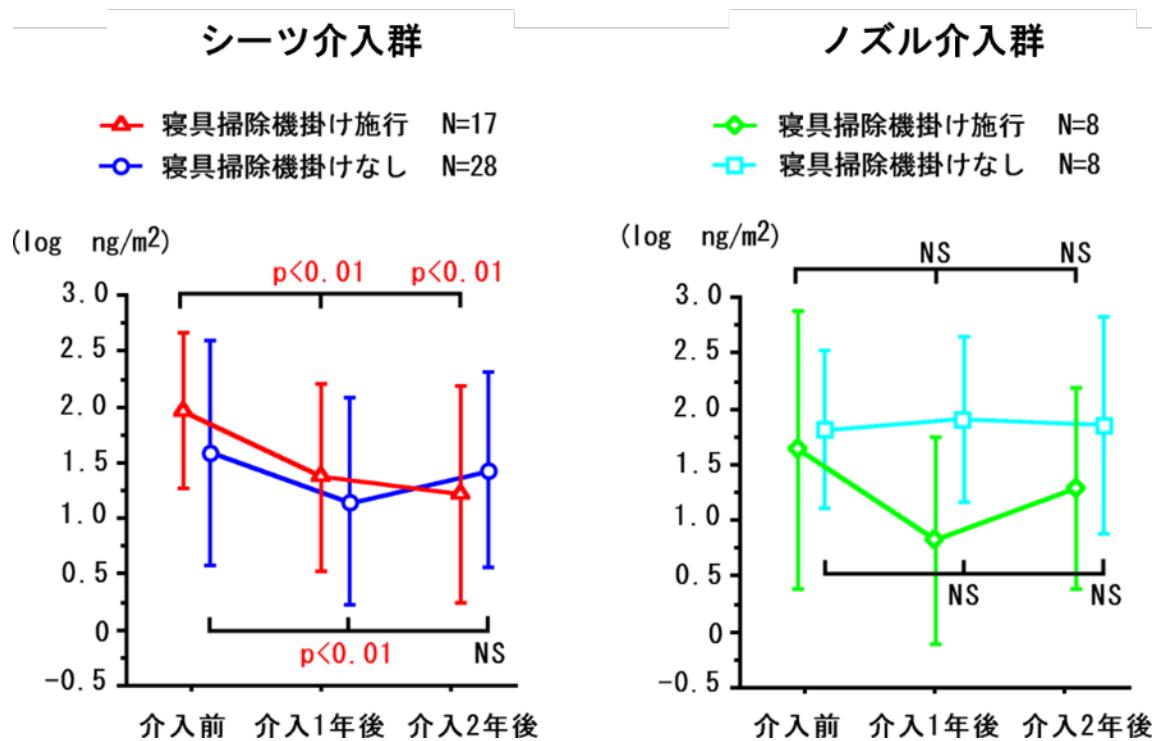


図5・寝室 (シャーレ 100cm) のDer 1量の変化

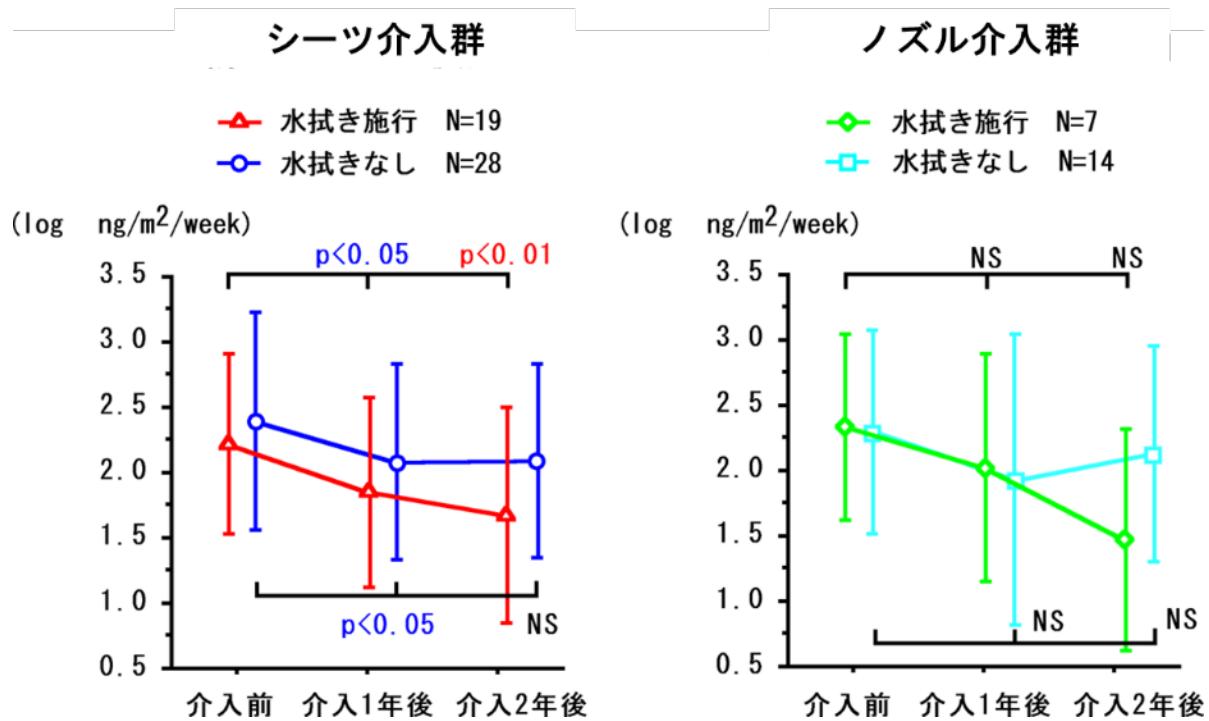


図6・寝室（シャーレ床）のDer 1量の変化

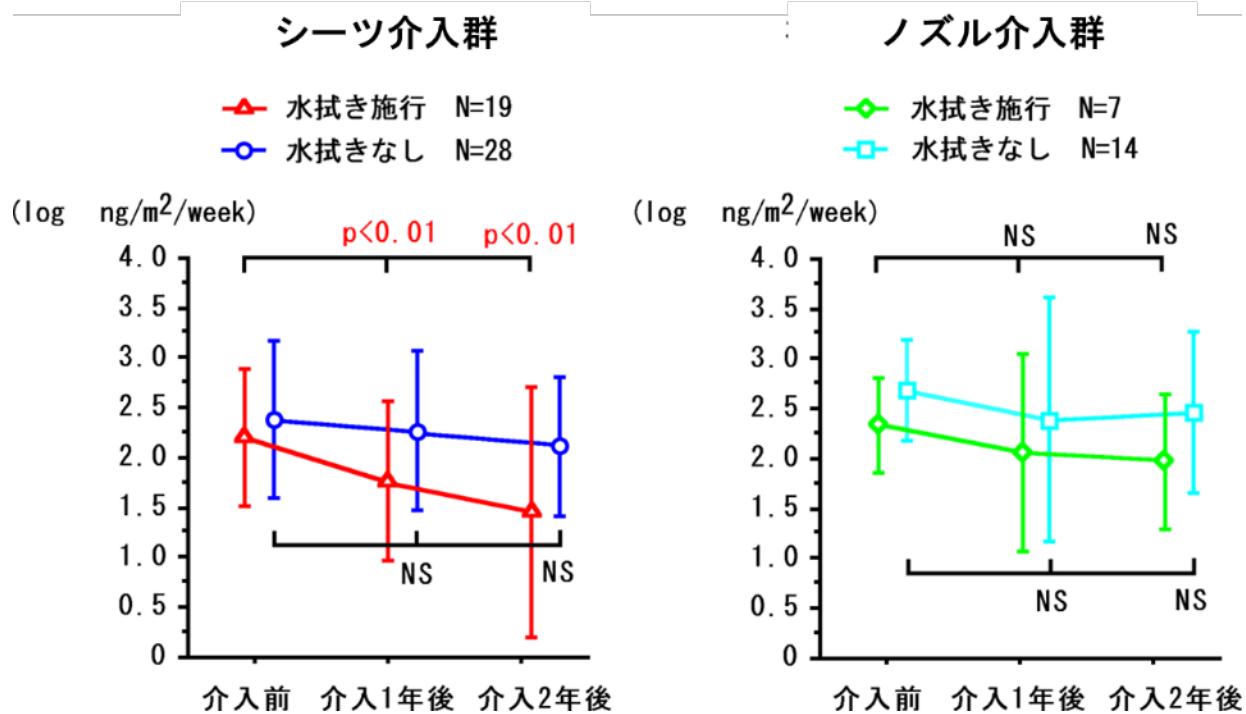


図7・秋から冬への湿度変化

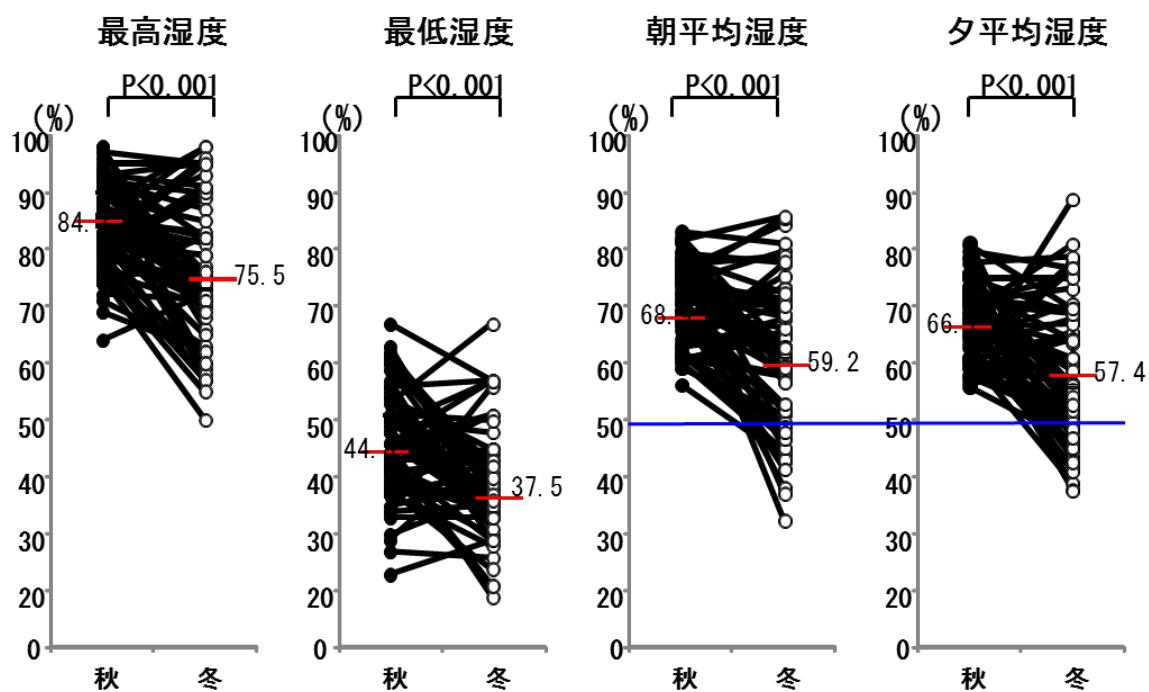


図8・秋から冬へのDer 1量変化

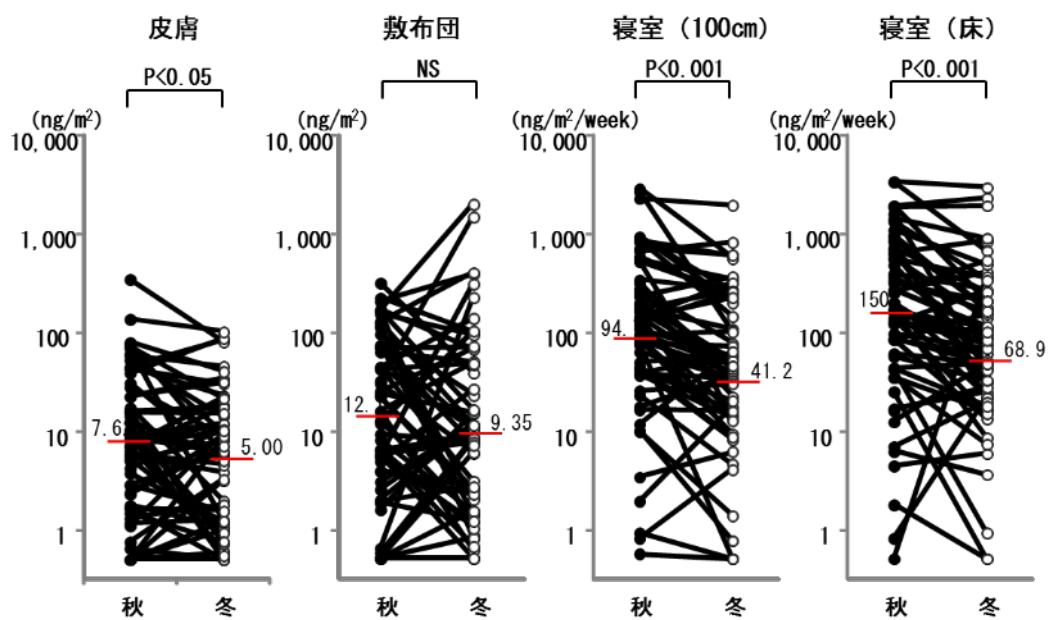


図9・寝室の湿度とDer 1量 (冬)

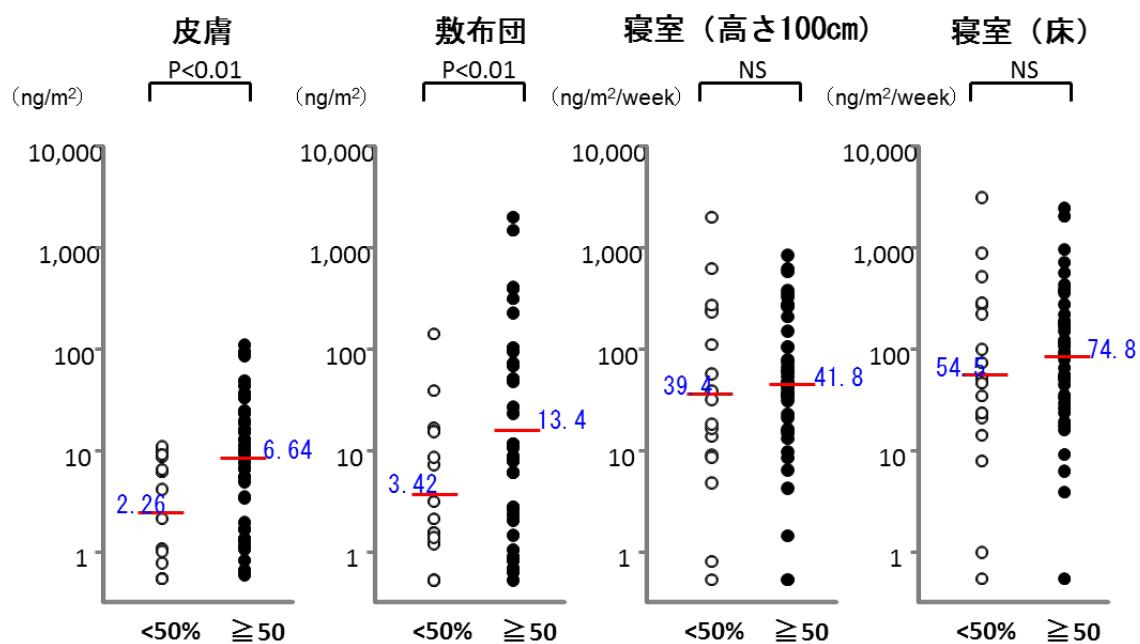


図10・秋から冬への湿度変化と冬のDer 1量

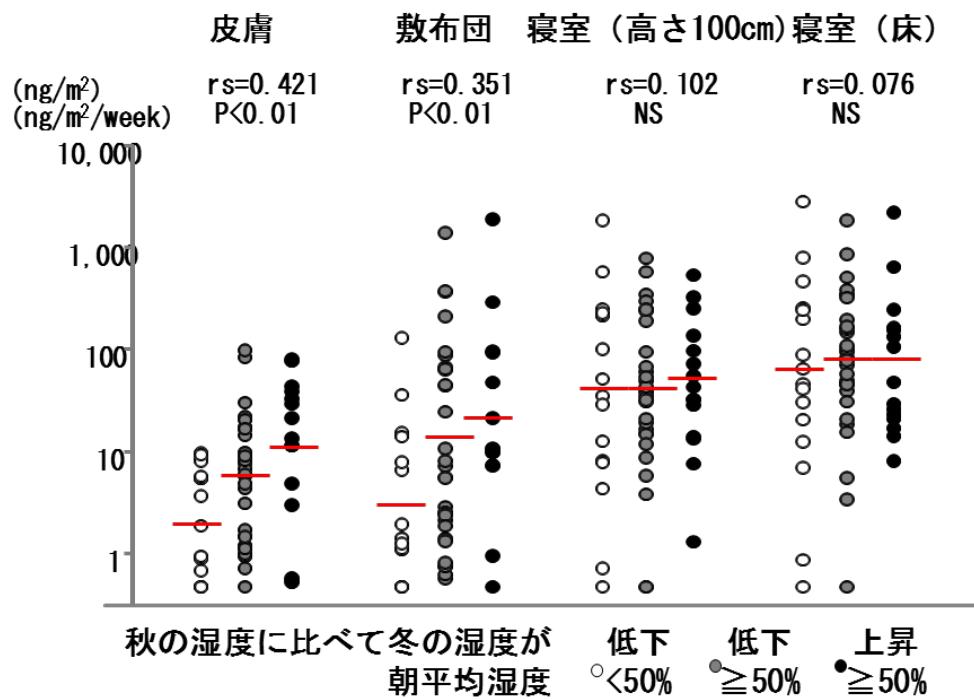


図11・非介入時の冬季減少群と増加群の秋のDer 1量の比較

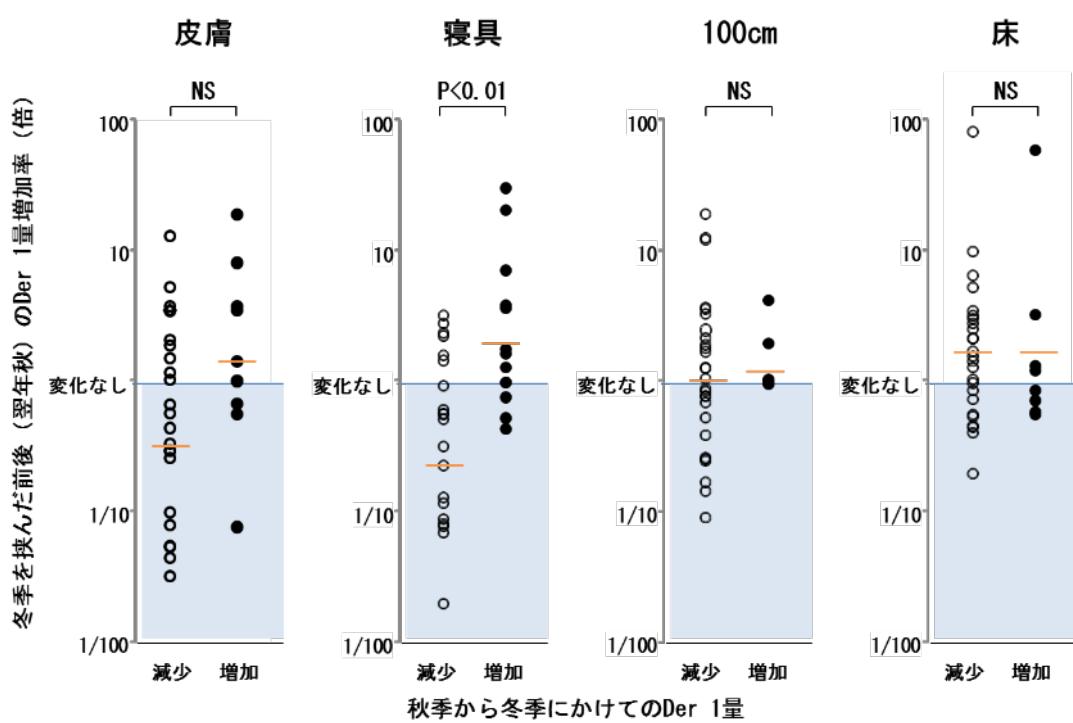


図12・冬季減少率と秋季増加率の関係（シーツ介入群）

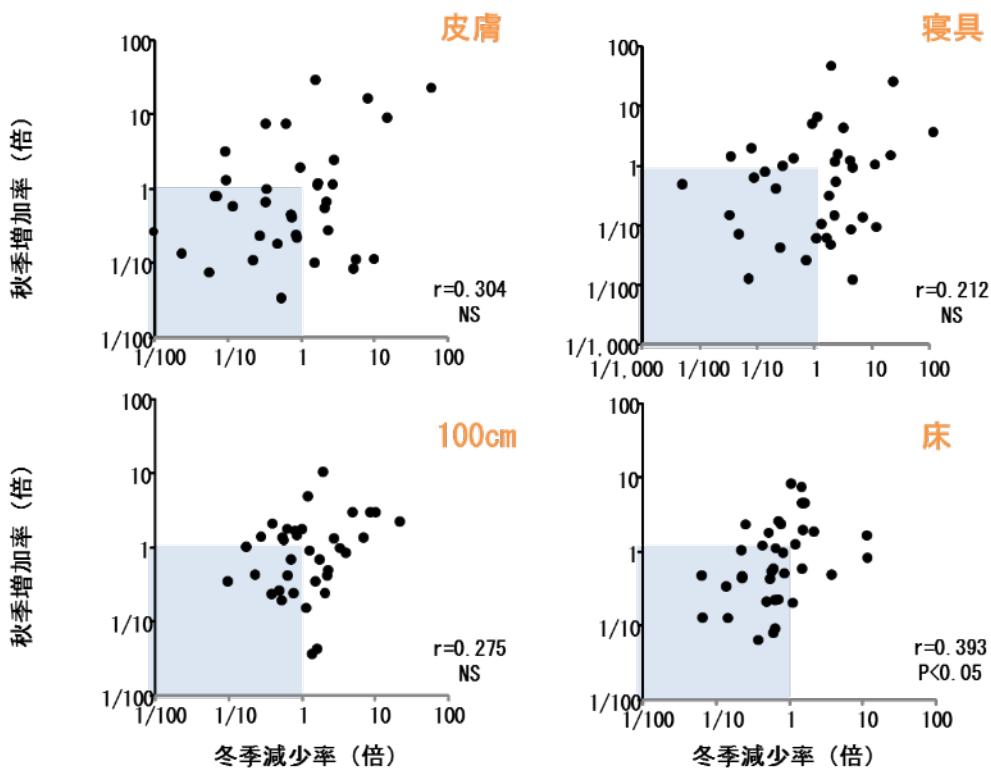
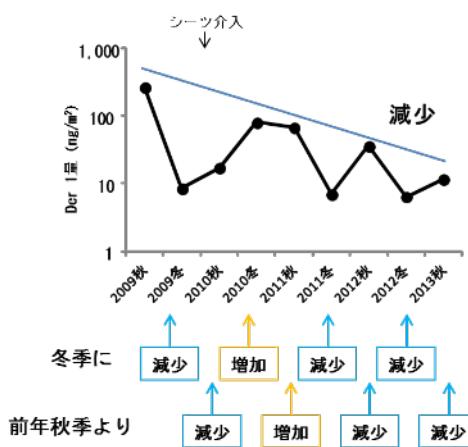


図13・症例提示

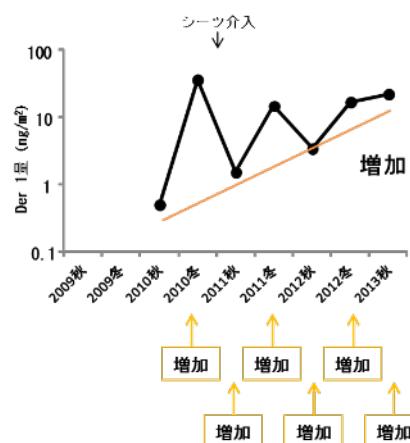
症例 1 (60代女性)

冬季寝室湿度 (30~40%) , 床 (畳), 和式布団,
ミクロガード (敷), 寝具掃除かけ (なし)
寝室掃除 (2回以上/週), 掃除機掛け前水拭きまたは乾拭き



症例 2 (70代男性)

冬季寝室湿度 (30~40%) , 床 (畳), 和式布団,
ミクロガード (敷, 掛), 寝具掃除かけ (なし)
寝室掃除 (1回以下/週), たまに乾拭き



冬季Der 1量減少が続ければ秋季Der 1量も減少する。

図14・解析対象症例

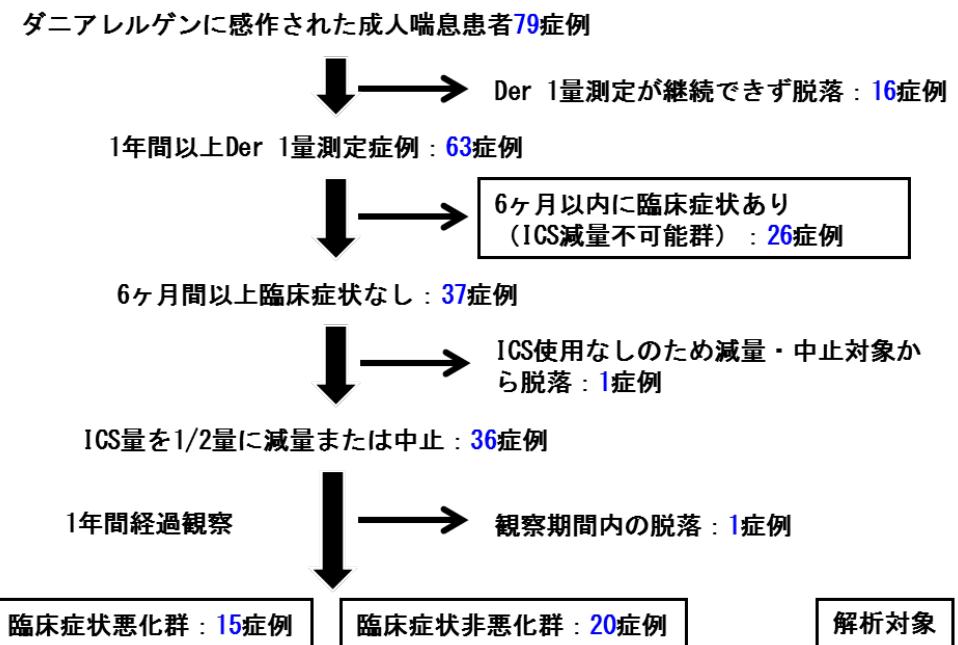


図15・減量前のICS使用量 (CFC-BDP換算)

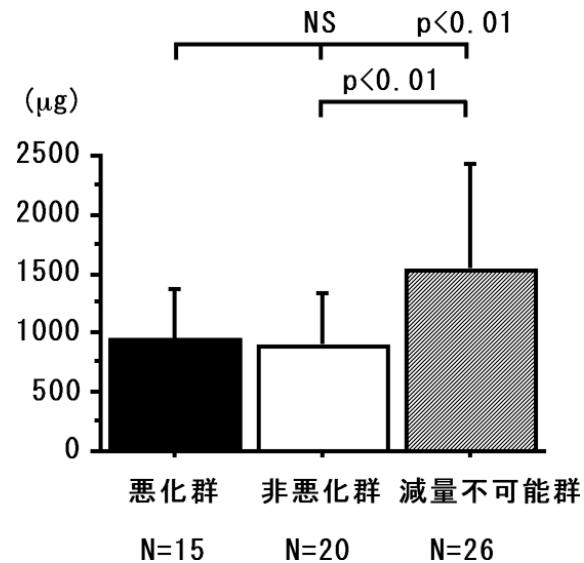


図16・各試料中のDer 1量の経過

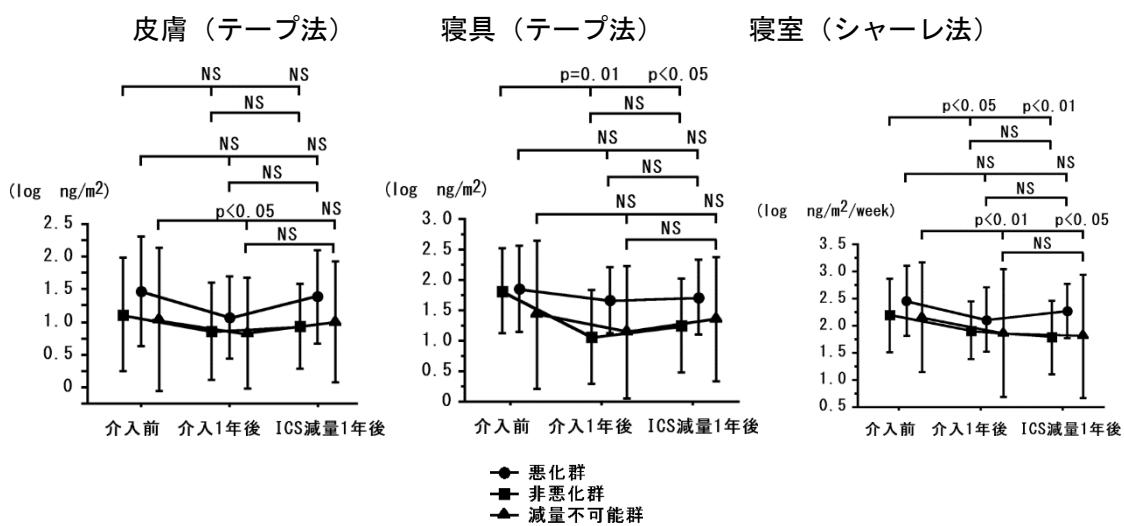
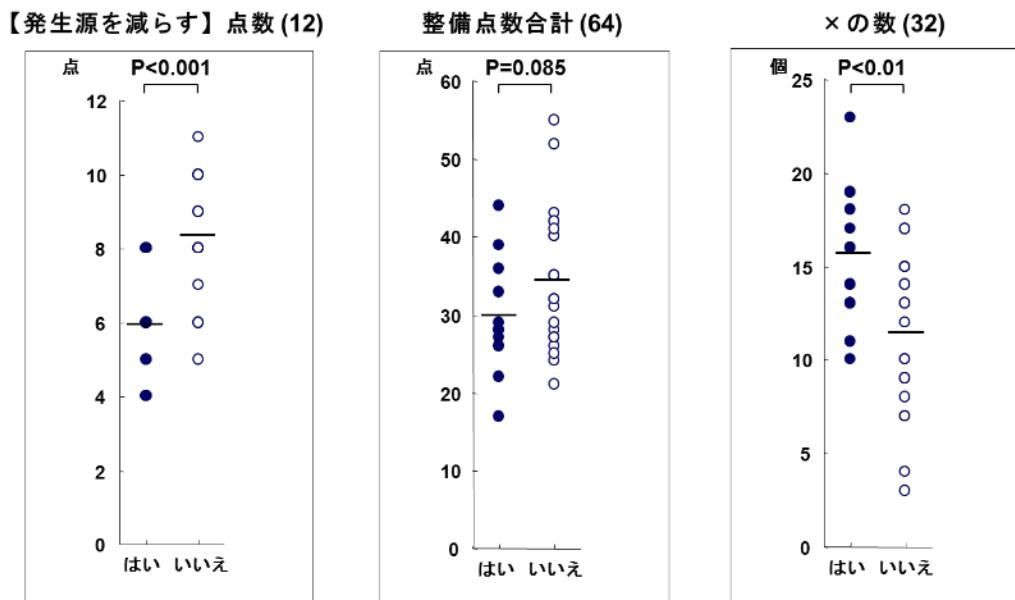
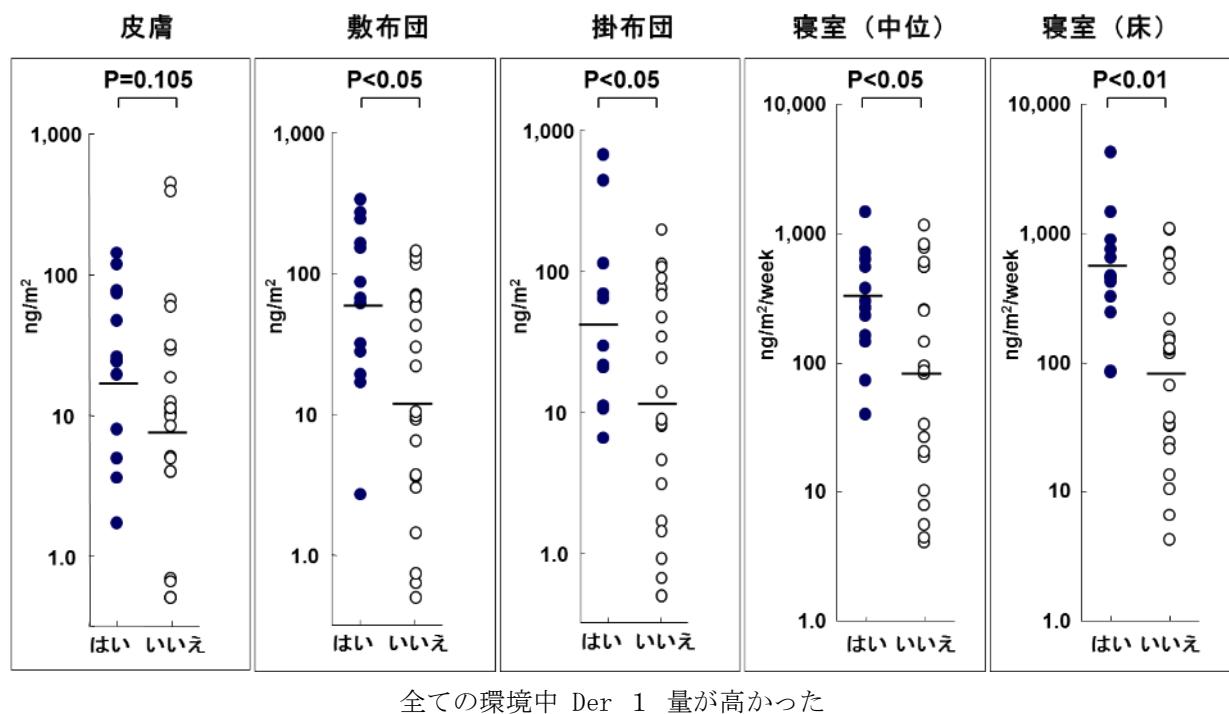


図17・春季に「なかなか思うように実施できない」と回答した症例の環境整備点数



環境整備のできていない項目（×）数が多く、特に【発生源を減らす】点数が低かった

図18・春季に「なかなか思うように実施できない」と回答した症例の秋季のDer 1量



全ての環境中 Der 1 量が高かった

図19・リバウンドの有無別のDer 1量の経時的变化

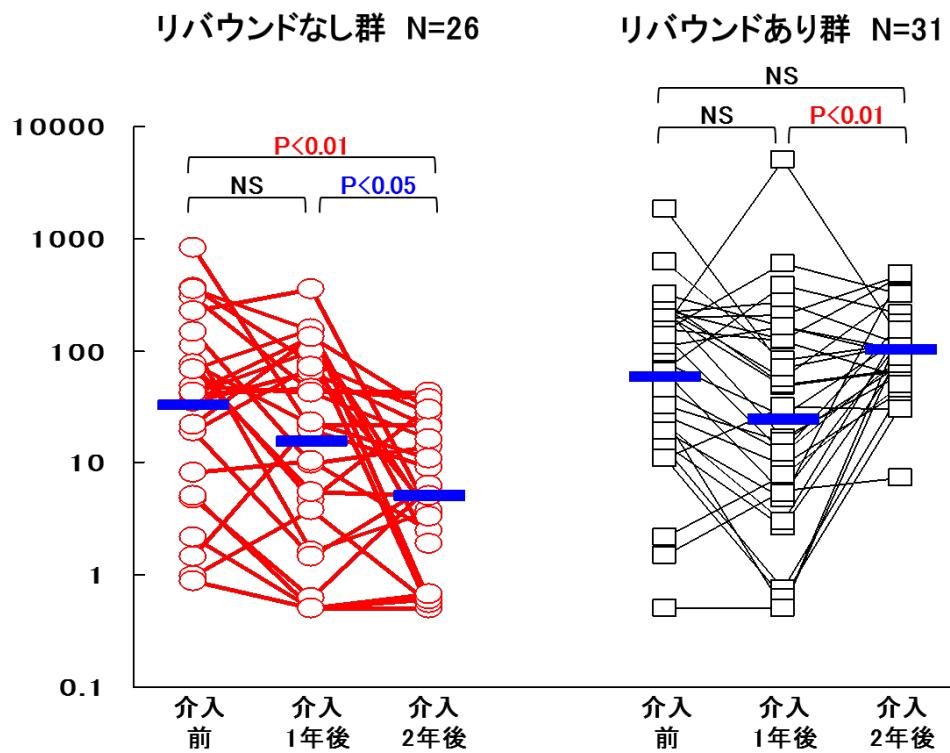


図20・リバウンドの有無別のエゴグラムパターンの比較

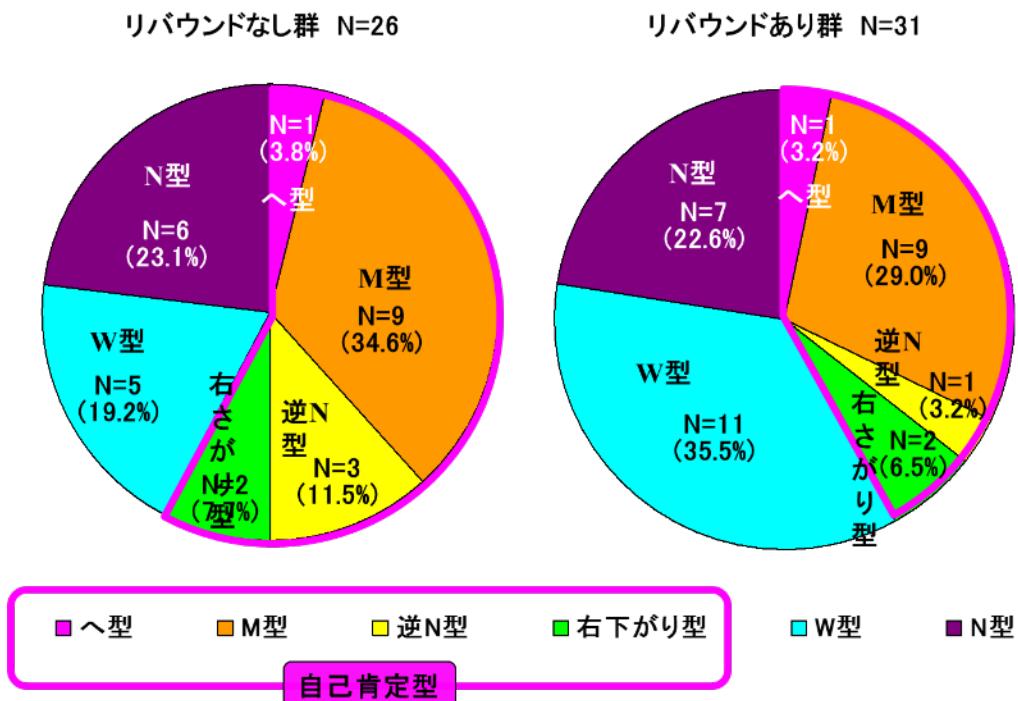


図21・リバウンドの有無別のエゴグラム

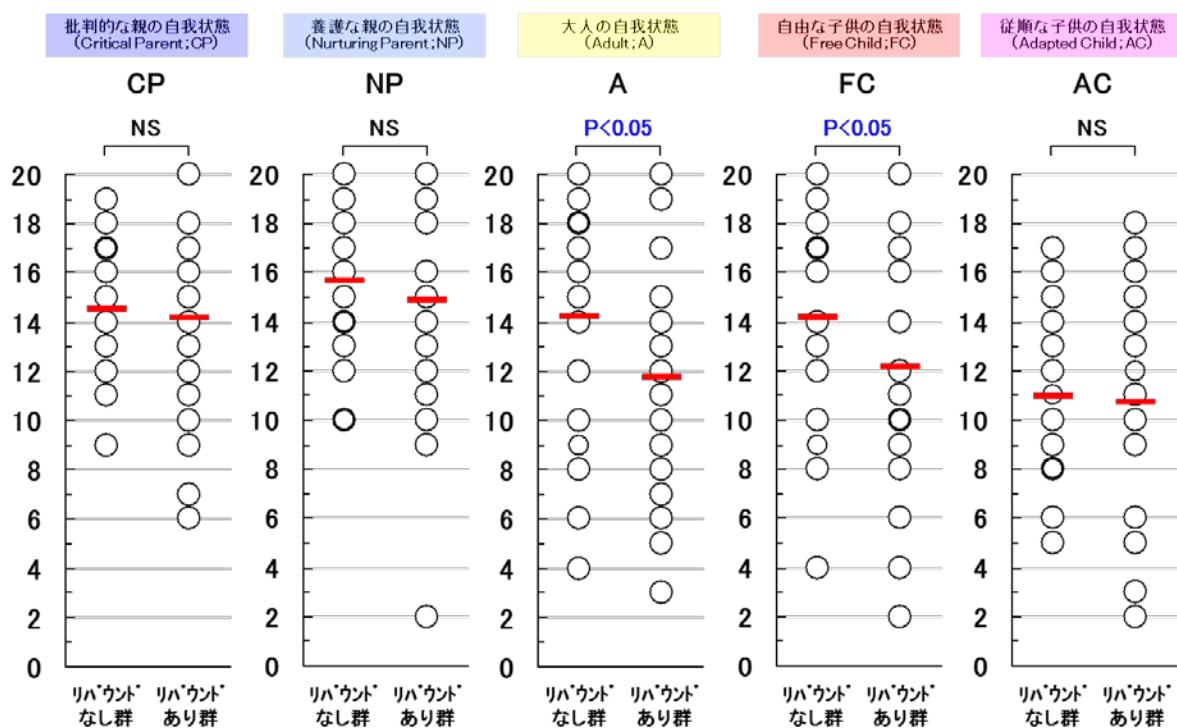
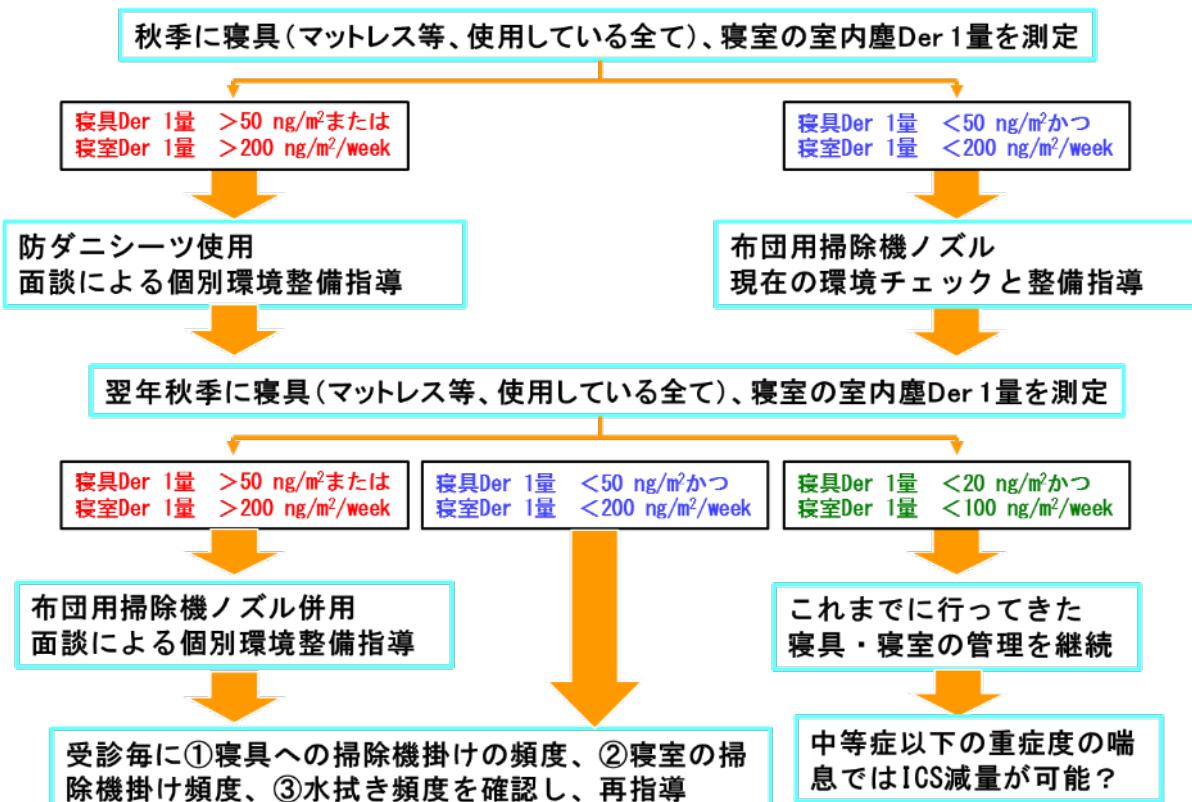


図22・寝具・寝室のDer 1量を減少させるための教育プログラム（手引き作成）



**厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業
（免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野））
総合分担研究報告書**

呼気一酸化窒素（FeNO）を用いた気管支喘息管理手法の確立

研究分担者	棟方 充	福島県立医科大学呼吸器内科学講座	教授
研究協力者	斎藤 純平	福島県立医科大学呼吸器内科学講座	講師
	佐藤 俊	福島県立医科大学呼吸器内科学講座	学内講師
	福原 敦朗	福島県立医科大学呼吸器内科学講座	助教
	植松 学	福島県立医科大学呼吸器内科学講座	助手
	鈴木 康仁	福島県立医科大学呼吸器内科学講座	大学院生

研究要旨

ガイドラインに基づいた喘息コントロールを行っても 20～50%の患者はコントロールが不十分である。そこで、新たな喘息コントロール指標として呼気一酸化窒素（FeNO）の有用性が期待されている。まず我々は、①喘息コントロールテスト（ACT）と FeNO の cut off 値をそれぞれ 20 点、40ppb とし、対象を 4 群に分類して年間の増悪頻度を検討したところ、コントロール良好（ACT≥20）の対象であっても FeNO 高値（≥40ppb）の対象では低値の対象と比べて増悪頻度が高かった。②喘息治療を終了または自己中断した対象における最終 FeNO 値は、再受診群の方が未受診群と比べて有意に高値であった。この事から、治療にて自覚症状が改善しても気道炎症が残存（FeNO 高値）している患者は将来的に喘息発作を起こす可能性が高いことが示唆された。続いて、③健常者および喘息患者に対して、FeNO 測定をピークフロー（PEF）測定のように在宅で 2 週間、朝・夕測定し、その日内変動および週内変動を検討した結果、健常者において PEF と同様 FeNO 値に若干の日内変動を認めることができた。加えて、コントロール不良喘息患者は定期喘息患者と比べて日内・週内変動幅が有意に大きいことがわかった。最後に、④未治療喘息患者に対して治療前後の FeNO と PEF の日内変動を検討したところ、治療前と比べて治療後の FeNO 日内変動は小さい傾向にあった。以上の結果から、FeNO 連日測定による変動を見ることは、新たな喘息コントロール指標として有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

喘息コントロールの最終目標は、呼吸機能が正常で、喘息症状や発作がなく、健常人と変わらぬ日常生活を営めることである。通常は自覚症状と呼吸機能検査を用いてコントロール状態を評価し治療を組み立てるが、それでも 20～50% の患者はコントロール不良であると報告されている(Cazzoletti L, et al. JACI 2007)。よって、新たな喘息管理指標が望まれており、FeNO がその一指標として期待されている。最近では、ハンディーな小型 FeNO 測定器も開発され、FeNO をピークフロー（PEF）メーターのように自宅で測定することも可能となった。これまで我々は、FeNO を実測値よりも変化量で見たほうが喘息コントロール指標として有用である

ことを報告した(Saito J et al J Asthma 2013)。また、気道炎症の指標である FeNO と自覚症状の指標である ACT の変化量との相関が弱いことから、両者は喘息病態の異なる側面を見ている可能性があることもわかった。そこで、今回の研究では、①ACT に FeNO を追加して喘息コントロールを行う意義（研究 1）、②在宅 FeNO 測定における変化（日内・週内変動）を見るこの意義について検討した（研究 2）。

B. 研究方法

研究 1-1:喘息患者を対象に、ACT および FeNO の cutoff 値をそれぞれ 20 点、40ppb として 4 群に分類した時の各群における増悪頻度について検討した。

研究 1-2:喘息患者を対象に、主治医判断によ

る治療終了もしくは自己中断直前の FeNO 値と再受診の関係について後ろ向きに検討した。

研究 2-1：健常対象者に在宅にて FeNO(NObreath)およびPEF(PIKO)を2週間、食前に5回測定してもらい、再現性・信頼性の検討を行った。

研究 2-2：健常対象者において FeNO 値及び PEF 値に日内変動があるか否かについて検討した。

研究 2-3：喘息患者を対象に FeNO および PEF を自宅にて 2 週間、朝夕食前・服薬前に測定してもらい、日内変動および週内変動の有無と喘息コントロールの関係について検討した。

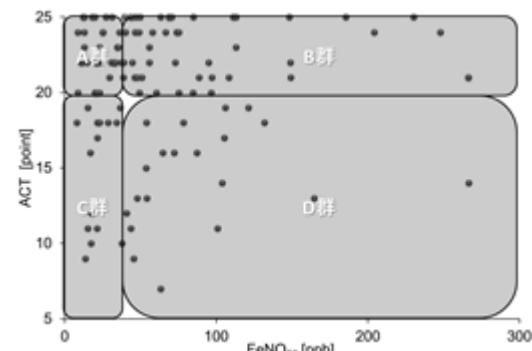
研究 2-4：未治療の喘息患者を対象に、治療前後における FeNO 及び PEF の日内変動の変化について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は本学倫理委員会において承認されており、被検者の同意を得て施行された。

C. 研究結果

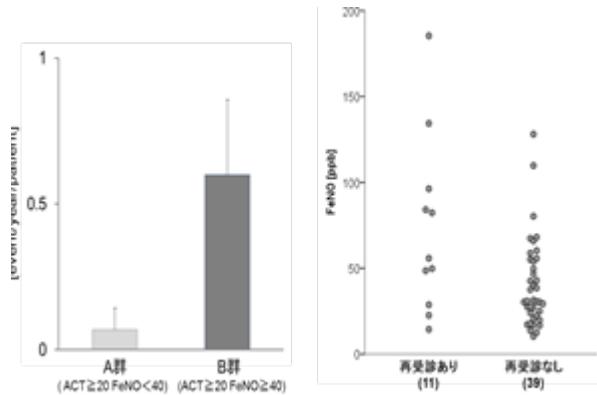
研究 1-1：喘息患者 88 人を対象に ACT および FeNO の cutoff 値をもとに 4 群に分類した (A 群 : 27 名、B 群 : 35 例、C 群 : 12 例、D 群 : 14 例) (図 1)。



(図 1) 喘息治療中の FeNO と ACT の分布

A 群は D 群と比較して増悪の有無及び 1 年間の増悪回数が有意に少なかった。A 群と B 群 (ACT でコントロール良好群) の比較では、B 群の方が治療を考慮した喘息重症度が有意に重症であり、年間の増悪頻度も多い傾向にあった (A 群 : 0.07 回/年/人 vs B 群 : 0.60 回/年/人 ; p=0.05) (図 2)。

研究 1-2：対象喘息患者 50 名 (男性 24 名、女性 26 名、平均年齢 : 44.7 歳)。症状再燃による再受診患者は 11 名で、再受診までの期間は平均 8.6 か月であった。治療終了時の FeNO 値は再受診群において有意に高値であった (再受診群 72.9 ± 51.5 ppb vs 非再受診群 40.6 ± 25.7 ppb, p=0.03) (図 3)。

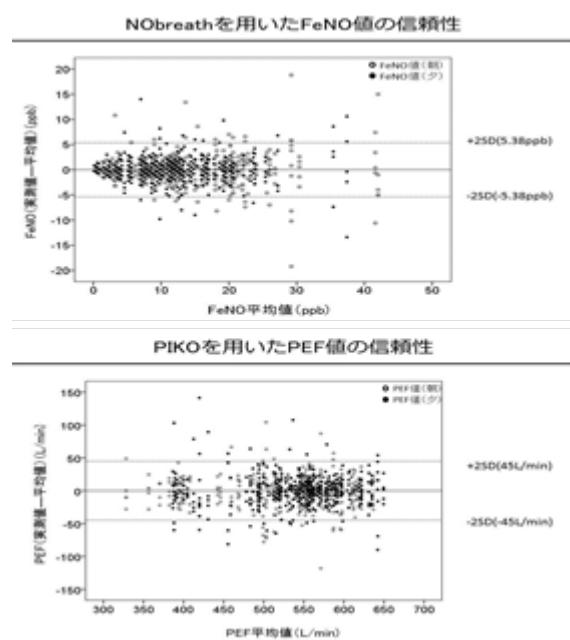


(図 2) 増悪頻度の比較

(図 3) 再受診と FeNO 値の

関係

研究 2-1：健常者 7 名に自宅で朝夕の FeNO、PEF 測定を 5 回ずつ行ってもらった。Bland-Altman の結果から、NObreath®・PIKO®ともに 5.1% の外れ値 ($>\pm 2SD$) を呈したのみで、大きなばらつきなく測定可能であることがわかった (図 4)。また、2 週間の測定値の信頼性を Intraclass Correlation Coefficient (ICC) analysis を用いて行ったところ、FeNO 朝:0.91、FeNO 夕:0.96、PIKO 朝:0.94、PIKO 夕:0.97 であり、再現性の高い測定が可能であった。



(図 4) FeNO 及び PEF の再現性・正確性

研究 2-2：健常者 16 名の検討では、朝の FeNO 値 (15.7 ± 5.90 ppb) は夕の FeNO 値 (12.7 ± 5.72 ppb) に比べて有意に高値であった ($p=0.002$)。同様に朝の PEF 値 (508 ± 95.6 L/min) は夕方の PEF 値 (522 ± 95.1 L/min) に比べて有意に低値であった ($p=0.002$) (図 5)。

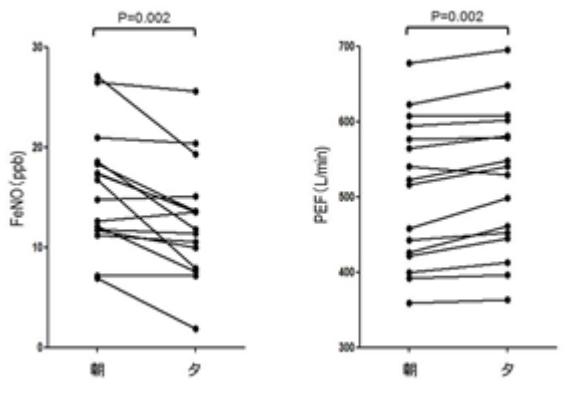
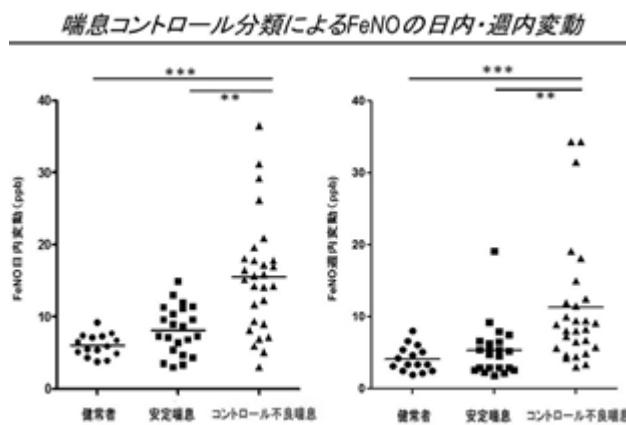
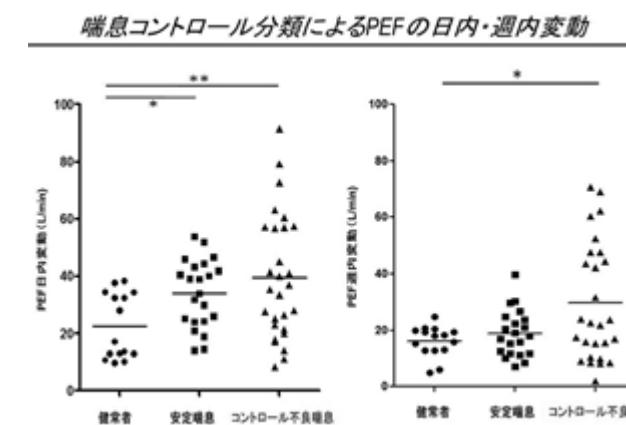


図 5) FeNO および PEF の日内変動

研究 2-3: コントロール不良喘息患者は安定喘息患者や健常者と比べて FeNO 日内・週内変動が有意に大きかった ($p<0.01$) (図 6)。しかし、PEF の日内・週内変動幅に関しては喘息コントロール状態によって有意差はなかった (図 7)。



(図 6) FeNO の日内・週内変動



(図 7) PEF の日内・週内変動

研究 2-4 : 喘息治療（吸入ステロイド and/or β 刺激薬）後 2 週間の時点の FeNO 日内変動幅は治

療前と比べて小さくなる傾向にあった ($p=0.05$)。一方、PEF の日内変動幅は治療前後で差はなかった (図 8)。

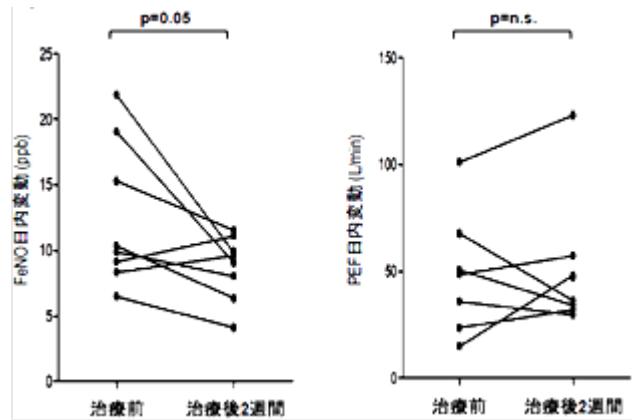


図 8) 治療介入前後の FeNO 及び PEF の日内変動

D. 考察

平成24年度の検討では、ACTによる喘息評価がよくても (ACT ≥ 20) FeNOが高値 (FeNO ≥ 40) だと過去1年間の喘息頻度が多いことがわかった。また、治療終了または自己中断直前のFeNO値が高いとその後の再受診率が高いことが判明した。これらの検討から、治療により自覚症状が改善しても気道炎症が残存している患者さんは、将来喘息発作を起こす可能性が高いことが示唆された。

平成25～26年の検討では、従来のFeNO実測値を用いた喘息コントロール研究から視点をかえ、FeNOの日内変動と週内変動が喘息コントロールに与える影響について検討した。まず、再現性の検討結果から、携帯型FeNO測定器のNObreath®および携帯型PEF測定器のPIKO®は、自宅で大きなばらつきなく、患者自ら測定が可能であることが検証された。また、これまで健常者におけるPEFの日内変動は知られていたが、健常者のFeNO値にも日内変動がある可能性が示唆された点は新規性に富んでいる。今後、健常者のFeNO日内変動が生じるメカニズムについては更なる検討が必要であると考える。次に、喘息患者における日内・週内変動の検討では、コントロール不良喘息患者は安定喘息患者と比べてFeNO日内・週内変動幅が有意に大きかった。このことは、FeNO連日測定が新たな喘息コントロール指標として有用である可能性を示唆している。本邦におけるFeNO測

定は平成25年6月に保険適応となったが、機器自体はまだ高価である。よって、現状に当てはめると、本研究のように病院が数台の機器を保有し、レンタルにて2週間程度FeNO測定を行ってもらうことでコントロール状態が把握できれば、今後の喘息診療に大きなプラスになると考えられた。そこで、最終年度では、喘息治療介入前後におけるFeNO日内変動について検討した。症例数が少なく傾向のみであったが、治療前と比べて治療後のFeNO日内変動幅は小さくなつた ($p=0.05$)。今後症例数を増やして検討していく必要があると考える。

(評価)

1) 達成度について

今回の研究に対する目的はおおむね達成された。在宅測定による FeNO 日内変動を用いた喘息管理の有用性について明らかにすることことができたことは新規性に富んでいいると考える。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

今回の研究では、FeNO の変化（日内変動・週内変動）が FeNO 実測値よりも喘息コントロールの指標として有用であることを初めて証明できた。FeNO 測定は平成 25 年 6 月に保険適応となり、日常診療において広く利用されるようになってきた。今後、在宅にて PEF のように自己管理ができる指標としての有用性が期待される。

今後、本研究結果は、国内・国際学会にて発表し、論文投稿を行う予定である。

3) 今後の展望について

今回の研究から、在宅自己管理の一指標として FeNO 測定が利用可能であることがわかつた。今後、FeNO 日内変動の Cutoff 値を求め、それをもとに治療のステップアップまたはステップダウンを行うことで、より良好な喘息コントロールが得られるかどうかを前向きに検証することが必要と考える。

また、健常者および喘息患者を対象に FeNO 日内変動のメカニズムについても検証していくことが必要であると考える。

4) 研究内容の効率性について

当科では据置型 FeNO 測定器 1 台および携帯型 FeNO 測定器 7 台、電子 PEF 測定器 10 台を所有している。よって、外来受診時の FeNO 測

定および在宅での 2 週間の FeNO および PEF 測定は比較的効率よく可能であった。また、その他の呼吸機能検査、ACT などの問診票は日常診療範囲内で行っており、経済的かつ効率よく本研究が遂行できた。なお、今回行われた研究 2 はすべて前向きの臨床研究であり、レベルの高いエビデンスが得られたと考えている。

唯一の問題点として FeNO 測定器のキャリブレーションおよびセンサー交換に費用がかかる点が挙げられる。今後、より安価な携帯型 FeNO 測定器が開発され、在宅における FeNO 測定の保険適応が認められることを期待したい。

E. 結論

在宅FeNO測定およびPEF測定による日内・週内変動は喘息コントロールの新たな指標として有用である可能性が示唆された。今後、従来法（症状とPEF）とFeNO法（症状+FeNO日内変動）を用いた無作為化2重盲検比較試験を行うことで、在宅 FeNO測定の有用性を更に検証していきたい。

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Munakata M. Exhaled nitric oxide (FeNO) as a non-invasive marker of airway inflammation. Allergol Int. 2012; 61(3): 365-372
- 2) Fukuhara A, Sato S, Uematsu M, Misa K, Nikaido T, Inokoshi Y, Fukuhara N, Wang X, Kanazawa K, Tanino Y, Ishida T, Munakata M. Impacts of the 3/11 disaster in fukushima on asthma control. Am J Respir Crit Care Med 2012; 186(12): 1309-1310
- 3) Saito J, Sato S, Fukuhara A, Sato Y, Nikaido T, Inokoshi Y, Fukuhara N, Saito K, Ishii T, Tanino Y, Ishida T, Munakata M. Association of Asthma Education with Asthma Control Evaluated by Asthma Control Test, FEV(1), and Fractional Exhaled Nitric Oxide. J Asthma 2013; 50(1): 97-102

- 4) Saito J, Zhang Q, Hui C, Gibeon D, Macedo P, Menzies-Gow A, Bhavsar PK, Chung KF. Sputum hydrogen sulfide (H₂S) as novel biomarker of obstructive neutrophilic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2013; 131: 232-234
- 5) Ogata H, Yatabe M, Misaka S, Shikama Y, Sato S, Munakata M, Kimura J. Effect of oral L-arginine administration on exhaled nitric oxide (NO) concentration in healthy volunteers. *Fukushima J Med Sci* 2013; 59: 43-48
- 6) Saito J, Gibeon D, Macedo P, Menzies-Gow A, Bhavsar PK, Chung KF. Domiciliary diurnal variation of fractional exhaled nitric oxide for asthma control. *Eur Respir J.* 2014 43: 474-484
- 7) Saito J, Mackay AJ, Rossios C, Gibeon D, Macedo P, Sinharay R, Bhavsar PK, Wedzicha JA, Chung KF. Sputum-to-serum hydrogen sulfide ratio in COPD. *Thorax* 2014; 69: 903-909
- 8) Wang X, Tanino Y, Sato S, Nikaido T, Misa K, Fukuhara N, Fukuhara A, Saito J, Yokouchi H, Ishida T, Fujita T, Munakata M. Secretoglobin 3A2 Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Inflammation Through Inhibition of ERK and JNK Pathways in Bronchial Epithelial Cells. *Inflammation.* 2014 in press
- 9) 佐藤俊, 棟方充. 炎症病態の診療上の意義とその評価. *Medical Practice.* 2012 ; 29(4) : 591-594
- 10) 佐藤俊, 棟方充. NO など客観的指標を用いた吸入ステロイド療法のモニタリング. *喘息.* 2012 ; 25(2) : 50-55
- 11) 佐藤俊、斎藤純平、棟方充. FeNO の診断・治療評価における有用性. *喘息* 2013; 26: 26-31
- 1) Saito J, Gibeon D, Macedo P, Menzies-Gow A, Bhavsar P, Chung KF. Domiciliary diurnal variation of fractional exhaled nitric oxide (FeNO) to monitor asthma control. Annual Congress of European Respiratory Society, Barcelona, Spain, 2013.
- 2) Saito J, Zhang Q, Hui C, Gibeon D, Macedo P, Menzies-Gow A, Bhavsar PK, Munakata M, Chung KF. Endogenous hydrogen sulfide (H₂S) in serum and sputum as novel biomarker of asthma. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology, Yokohama, Japan, 2013.
- 3) Saito J, Mackay AJ, Rossios C, Gibeon D, Macedo P, Sinharay R, Bhavsar PK, Munakata M, Wedzicha AJ, Chung KF. Hydrogen sulfide (H₂S) in sputum and serum as a novel biomarker of COPD. Annual Congress of European Respiratory Society, Munich, Germany, 2014.
- 4) Uematsu M, Saito J, Suzuki Y, Fukuhara A, Sato S, Misa K, Nikaido T, Fukuhara N, Wang X, Tanino Y, Ishida T, Munakata M. Concomitant use of fractionalexhaled nitric oxide (FeNO) and asthma control test (ACT) as markers for predicting asthma exacerbation. Annual Congress of European Respiratory Society, Munich, Germany, 2014.
- 5) 棟方充. 気管支喘息の診断と治療. 第 47 回日本内科学会四国支部生涯教育講演会 : 松山. 2012.12.2 : 高松
- 6) 棟方充. 喘息研究 22 年間の歩み. 第 22 回北海道喘息研究会. 2012.10.30 : 札幌
- 7) 棟方充. 成人喘息に残された課題 : 成人喘息の発症機序. 第 32 回六甲カンファレンス. 2012.7.28 : 京都
- 8) 佐藤俊, 王新涛, 福原敦朗, 斎藤純平, 植松学, 美佐健一, 二階堂雄文, 福原奈緒子, 谷野功典, 石田卓, 棟方充. iNOS 遺伝子多

2.学会発表

- 型が気管支喘息患者の呼気 NO に及ぼす影響(続報). 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会. 2012.4.22 : 神戸
- 9) 佐藤俊, 福原敦朗, 植松学, 斎藤純平, 美佐健一, 二階堂雄文, 福原奈緒子, 王新濤, 谷野功典, 石田卓, 棟方充. 喘息治療終了時における呼気 NO は症状再燃を予測するか? 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2012.11.30 : 大阪
- 10) 福原敦朗, 佐藤俊, 王新濤, 植松学, 美佐健一, 二階堂雄文, 福原奈緒子, 谷野功典, 石田卓, 棟方充. 喘息患者における iNOS プロモーター領域での SNP による比較検討. 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2012.5.13 : 大阪
- 11) 植松学, 佐藤俊, 福原敦朗, 斎藤純平, 美佐健一, 二階堂雄文, 猪腰弥生, 福原奈緒子, 王新濤, 谷野功典, 石田卓, 棟方充. 喘息コントロールにおける呼気 NO の検討. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会. 2012.4.22 : 神戸
- 12) 斎藤純平、Chung KF、棟方充. 咳痰硫化水素 (Hydrogen sulfide ; H₂S) は閉塞性好中球性気管支喘息の新たな指標となる. 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 横浜、2013.5.
- 13) 植松学、佐藤俊、福原敦朗、斎藤純平、美佐健一、二階堂雄文、福原奈緒子、王新濤、谷野功典、石田卓、棟方充. 福島県立医科大学医学部呼吸器内科. 気管支喘息コントロールにおいて呼気 NO と ACT を併用する意義の検討. 第 53 回日本呼吸器学会. 東京、2013.4.
- 14) 斎藤純平、棟方充、Chung KF. 呼気一酸化窒素 (FeNO) の日内変動は喘息コントロール指標として有用である. 第 21 回臨床喘息研究会. 三重、2013.10.
- 15) 鈴木康仁、佐藤俊、斎藤純平、福原敦朗、植松学、美佐健一、二階堂雄文、福原奈緒子、王新濤、谷野功典、石田卓、棟方充. 福島県立医科大学医学部呼吸器内科. 診断時の呼気 NO と喘息患者の治療予後の検討. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 東京、2013.11.
- 16) 斎藤純平, Mackay A, Wedzicha J 棟方充, Chung K. 血清・喀痰硫化水素濃度は COPD の新たな急性増悪予測指標となる. 第 54 回日本呼吸器学会総会. 大阪、2014.4.
- 17) 佐藤俊、斎藤純平、福原敦朗、植松学、鈴木康仁、美佐健一、二階堂雄文、福原奈緒子、王新濤、谷野功典、石田卓、棟方充. 福島県立医科大学医学部呼吸器内科学講座. COPD における安定期 FeNO 値の検討. 第 54 回日本呼吸器学会総会. 大阪、2014.4.
- 18) 斎藤純平、棟方充、Chung KF. 呼気一酸化窒素 (FeNO) の日内変動は喘息コントロール指標として有用である. 第 26 回日本アレルギー学会. 京都、2014.05.

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

**厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業
（免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野））
総合分担研究報告書**

高齢者喘息の病態解明と治療・管理法の確立に関する研究

研究分担者 東田有智	近畿大学医学部呼吸器・アレルギー内科 教授
研究協力者 岩永賢司	近畿大学医学部呼吸器・アレルギー内科 准教授
佐野博幸	近畿大学医学部呼吸器・アレルギー内科 准教授

研究要旨

人口の高齢化を反映して高齢喘息患者数が増加傾向にあり、高齢者喘息対策は非常に重要なテーマである。高齢者喘息の特徴を検討すると、治療下においても若年者と比較して FEV1 年間低下量は増加する。また、高齢喘息患者は吸入ステロイド薬の用法用量を守り、継続する必要性を理解している一方、吸入手技が出来ていないことが多く、抑うつの程度が服薬アドヒアラנסや喘息コントロールに影響を及ぼす。日常臨床において、高齢者喘息のコントロールを良好に維持し、QOL を高めるためには、注意深く個々の患者における服薬アドヒアラנסの障壁を探り、吸入手技をチェックすることが必要である。

A. 研究目的

昨今の吸入ステロイド薬の普及により、喘息の治療・管理は飛躍的に改善した。それに伴い、年間喘息死数は 1995 年の 7253 名をピークに、2011 年には、2060 名にまで減少した。しかしながら、喘息死の約 90% は高齢者で占められており、人口の高齢化を反映して、高齢喘息患者数が増加傾向にある現状を踏まえると、高齢者喘息対策は医療者にとって非常に重要なテーマであると考える。

よって我々は、本事業における分担研究として、高齢者喘息の病態解明と治療・管理法の確立に関する検討を行うこととした。病態解明研究の一つとしては、高齢喘息患者の呼吸機能低下に関する検討を行い、治療・管理法の確立に関しては、服薬アドヒアラنسや喘息コントロールに影響する因子について、特に抑うつや認知機能との関連性の検討を行うとともに、吸入手技と身体活動性も検討することで、高齢者喘息の特徴を浮き彫りにして、高齢者喘息対策の向上に結び付けることを目的とした。

B. 研究方法

平成 24 年度：近畿大学医学部附属病院呼吸器・アレルギー内科通院中の喘息患者で毎年 1 回定期的に 4 年以上スピロメトリーや気

道可逆性試験、呼気一酸化窒素 (FeNO) 濃度測定を行っている症例を対象に、後ろ向きに検討した。

平成 25 年度：近畿大学医学部附属病院呼吸器・アレルギー内科通院中である 65 歳以上の喘息患者を対象とした。呼吸機能検査として、スピロメトリー、気道可逆性、強制オシレーション法 (インパルスオシレーションシステム : IOS) を施行した。SDS、やる気スコア、長谷川式簡易知能評価 (Mini-mental State Examination : MMSE ハイブリッド版) などで抑うつや認知機能の評価を行った。ACT (喘息コントロールテスト) で喘息のコントロール状況を把握し、FeNO で気道炎症を評価した。服薬アドヒアラנסは ASK-20 (Adherence Starts with Knowledge) にて判定した。

平成 26 年度：当科外来通院中で、25 年度研究に参加いただいた 65 歳以上の喘息患者のうち、本年度の研究に参加の承諾が得られた 74 名を対象とした (近畿大学医学部倫理委員会承認済)。

身体活動量は国際標準化身体活動質問票 (IPAQ 日本語版) を用いて測定された。吸入ステロイド薬吸入手技の評価や疾患・薬剤に関する認識度は、日本喘息・COPD フォーラム (JASCOM) の病葉連携ツール吸入指導評価票と、各製葉企業で製作されている吸入デモ器を用いて調査した。服薬率は、処方実数と必要とするべき本数で算出した。QOL は、Mini Asthma Quality of Life Questionnaire (Mini AQLQ) (日本語版) で

評価した。服薬アドヒアランスは、25年度研究で用いた ASK-20 (Adherence Starts with Knowledge) の結果を用いた。

(倫理面への配慮)

研究対象者のデータや検体から氏名等の個人情報を削り、代わりに新しく符号又は番号をつけて匿名化を行った。研究対象者とこの符号（番号）を結びつける対応表は外部に漏れないよう厳重に保管した。

C. 研究結果

平成 24 年度：患者背景は、総数 189 例、男/女：95/94、平均年齢： 61.5 ± 14.6 歳、罹患年数： 21.1 ± 14.6 年、喘息重症度：軽症 113 例 (59.8%)、中等症 51 例 (27.0%)、重症 25 例 (13.2%) であった（表 1）。

表 1：平成 24 年度研究対象患者背景

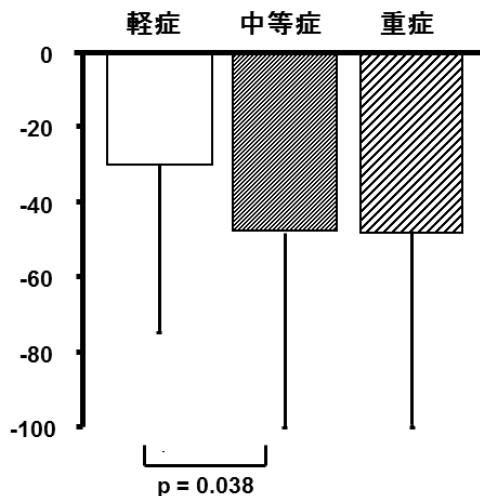
総 数 (n)	Flow limitation (n)
189	
性別 男／女 (n) 95/94	軽 症： FEV ₁ $\geq 80\%$ 113 (59.8%)
年 齡 (歳) 61.5 ± 14.6	中等症： $60\% \leq \text{FEV}_1 < 80\%$ 51 (27.0%)
観 察 年 数 (年) 6.2 ± 1.1	重 症： $\text{FEV}_1 < 60\%$ 25 (13.2%)
喫煙状況 (n) Current/Ever/Never 34/45/110	吸入ステロイド投与量 (HFA-BDP 換算) 434 \pm 233 $\mu\text{g}/\text{日}$
アレルギー性鼻炎 (n) 110 (58.2%)	軽 症 377 \pm 214 $\mu\text{g}/\text{日}$
罹 患 年 数 (年) 21.1 ± 14.0	中等症： 492 \pm 227 $\mu\text{g}/\text{日}$
% pred FEV ₁ (%) 83.5 ± 21.1	重 症： 676 \pm 279 $\mu\text{g}/\text{日}$
FEV ₁ % (%) 63.9 ± 13.0	ロイコトリエン拮抗薬投与 (n) あり 123 (65.1%)
Vdot50/Vdot25 4.2 ± 1.6	長時間作用性 β 2 刺激薬投与 (n) あり 87 (46.0%)
気道可逆性 (%) 7.9 ± 8.1	テオフィリン薬投与 (n) あり 55 (29.1%)
FeNO (ppb) 48.2 ± 37.1	プレドニゾロン投与 (n) あり 6 (3.2%)

FEV₁ 年間低下量は、男性 40.8 ± 57.8 ml、女性 34.4 ± 41.7 ml と、特に性別での有意差は認められなかった（図 1. 標準低下量は日本呼吸器学会の日本人正常予測式より算出した）。年齢、罹患年数、%FEV₁、気道可逆性などと FEV₁ 年間低下量は有意な相関関係を呈した。

FEV₁ 年間低下量に及ぼす喫煙状況の違いは

認められなかった（表 2）。

図 1：FEV₁ 年間低下量（性別）



軽 症: $-30.5 \pm 45.0 \text{ ml/yr}$
中 等: $-48.0 \pm 51.9 \text{ ml/yr}$
重 症: $-48.0 \pm 64.9 \text{ ml/yr}$

表 2：FEV₁ 年間低下と各因子の相関

相関係数	p
年齢	0.160
罹患年数	0.171
FeNO	0.132
%FEV1	0.167
FEV1%	0.001
V50/V25	0.103
気道可逆性	0.328
	< 0.001

FEV₁ 年間低下量をヒストグラムに表すと、70 ml 以下（急速進行型）もしくは 30 ml 以上（通常型）をピークとする二峰性分布を呈した（図なし）。各々の平均年齢は、通常型で 62.9 ± 13.5 歳、急速進行型で 57.7 ± 16.3 歳と有意差を認めた。さらに、急速進行型に寄与する因子を解析したところ、%FEV₁ (< 80%)、気道可逆性 (≥ 10%)、FeNO (≥ 50 ppb) の 3 因子が有意に寄与していたが、年齢因子 (60 歳以下) は有意に寄与していないかった。

平成 25 年度：表 3 に、対象患者背景をまとめた。

表 3 : 平成 25 年度対象患者背景

症例数	107(例)
性別	男:女 = 47:60(例)
平均年齢	73.9±6.0(歳)
平均罹病期間	15.4(年)
喫煙歴	現喫煙:6 過去喫煙:38 無:63(例)
合併症	アレルギー性鼻炎:32 アレルギー性結膜炎:7 慢性副鼻腔炎:32 高血圧:56 狹心症:7 糖尿病:25 脂質異常症:32 高尿酸血症:10 (例)
治療ステップ	1:5例、2:39例、3:46例、4:18例

ASK-20 と認知症関連スコアとの間には有意な相関関係を認めなかつた(表 4 相関係数)。また、ACT と認知症関連スコアとの間にも有意な相関関係を認めなかつた(表 5 相関係数)。

表 4 : ASK-20 と認知症関連スコアとの相関

	合計点	ライフスタイル	意識	他人からのサポート	医療関係者との話し合い	服薬	治療に対する行動
HDSR	-0.127	-0.053	0.087	0.116	-0.181	-0.153	-0.116
MMSE	-0.020	0.026	0.081	0.167	-0.148	-0.151	0.069

表 5 : ACT と認知症関連スコアとの相関

	ACT
HDSR	0.104
MMSE	0.065

一方、ASK-20 と SDS・やる気スコアとの間にある程度の相関を認めた(*: p < 0.05、**: p < 0.005) (表 6 相関係数)。ACT と SDS との間に、ある程度の相関が認められた(表 7 相関係数)。

表 6 : ACT と SDS・やる気スコアとの相関

	合計点	ライフスタイル	意識	他人からのサポート	医療関係者との話し合い	服薬	治療に対する行動
SDS	0.350**	0.273**	0.288**	-0.078	0.251*	0.230*	0.078
やる気スコア	0.315**	0.216*	0.141	0.035	0.168	0.237*	0.178

表 7 : ACT と SDS・やる気スコアとの相関

	ACT
SDS	-0.224*
やる気スコア	-0.154

さらに、SDS・やる気スコアと呼吸機能検査、IOS などの生理機能検査との相関を検討したところ、FeNO、R5 (全気道抵抗)、R20 (中枢気道成分) との間である程度の相関が認められた(表 8 相関係数)。

表 8 : ASK-20 と ACT との相関

	SDS	やる気スコア
%FEV ₁	0.025	-0.075
Vdot50/Vdot25	0.148	0.113
可逆性	0.083	0.135
FeNO	-0.103	-0.218*
R ₅	0.227*	0.211*
R ₂₀	0.213*	0.261*
R ₅ -R ₂₀	0.182	0.114
X ₅	-0.096	-0.013
Fres	0.120	0.110

抑うつや認知機能が喘息コントロールと服薬アドヒアランスに対する影響を多変量解析したところ、ASK-20 に影響するのは SDS、ACT に影響するのは X₅ (IOS の指標で、末梢の弾性抵抗を表すと SDS であった(表 9、10))。

表 9 : 服薬アドヒアランス (ASK-20) を被説明変数とする重回帰分析

説明変数	β	r
SDS	0.290	0.290*

表 10 : 喘息コントロール (ACT) を被説明変数とする重回帰分析

説明変数	β	r
X ₅	0.326	0.326**
SDS	-0.278	-0.221*

平成 26 年度：表 11 に対象の背景を示す。

表 11：平成 25 年度対象患者背景

症例数	74
性別(例)	男:女 = 32:42
年齢(平均±SD 歳)	73.4±5.4
罹病期間(平均±SD 年)	15.2±16.2
喫煙歴(例)	現:5 過去:26 無:43
合併症(例)※重複有	アレルギー性鼻炎:23 慢性副鼻腔炎:18 高血圧:31 狹心症:5 糖尿病:17 脂質異常症:24 高尿酸血症:5
治療ステップ(例)	1, 2, 3, 4:5, 27, 31, 11

疾患・薬剤に関する認識度調査の結果は、「疾患について分かる」は、(MDI 製剤・pMDI 製剤) (分かる : 56%・47%、やや分かる・分からぬ : 44%・53%)、「薬剤名・薬効が分かる」は、(分かる : 13%・13%、やや分かる・分からぬ : 87%・87%)、「吸入薬の用法・用量が分かる」は、(分かる : 86%・77%、やや分かる・分からぬ : 14%・23%)、「継続治療の必要性が分かる」は、(分かる : 100%・87%、やや分かる・分からぬ : 0%・13%) であった (図 3, 4)。喘息とはどういう疾患かはあまり分からず、使用している吸入薬名や薬効もほとんど知らないが、用法用量は覚えており、定期的に使用する必要性は理解していることが見受けられた。

図 3 疾患・薬剤に関する認識度 (DPI 42例)

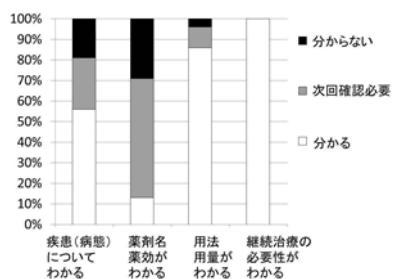
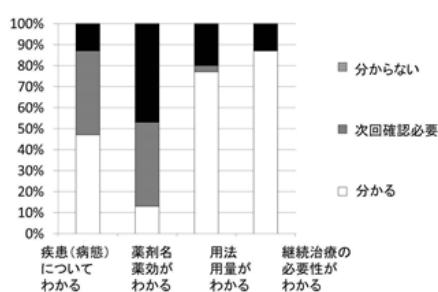


図 4 疾患・薬剤に関する認識度 (pMDI 32例)



吸入手技を評価すると、「吸入前の息吐き」が出来ていない（もしくは次回確認が必要）患者は、DPI 製剤使用者で 51%、pMDI 製剤使用者で 53% と高かった。また、「DPI 製剤を強く深くスースと吸う」の出来ていない（もしくは次回確認が必要）患者は 25%、「pMDI 製剤を深くゆっくり吸う」の出来ていない（もしくは次回確認が必要）患者は 41% であった。さらに、「吸入後の息止め」の出来ていない患者は、DPI 製剤使用者で 50%、pMDI 製剤使用者で 56% にのぼった。吸入後のうがいは、ほぼ 90% 以上の患者でできていた。PMDI 製剤使用者で「振る」の出来ていない（もしくは次回確認が必要）割合が 69% と高値であったが、薬品によっては、振らなくてもよいのがあるためと考えられた（キュバール®、オルベスコ®）(図 5, 6)。

図 5 吸入手技の確認 DPI 42例

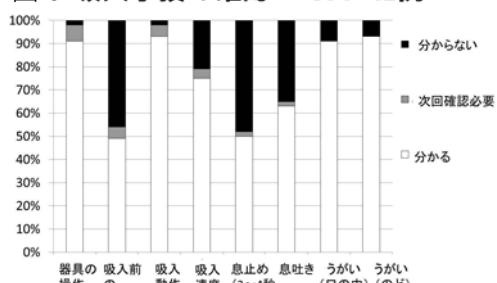
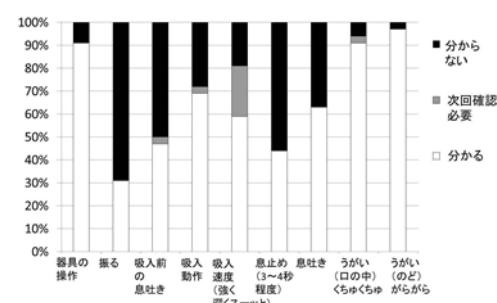
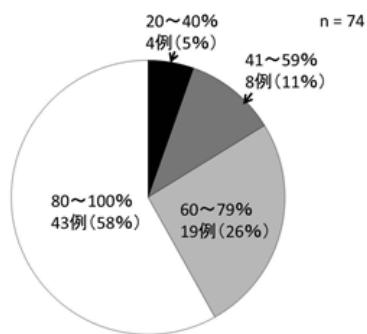


図 6 吸入手技の確認 pMDI 32例



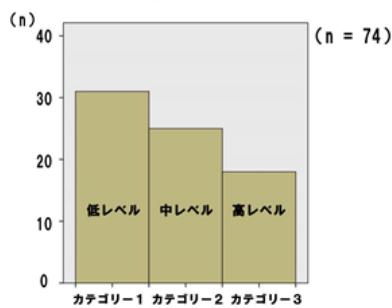
服薬率は、20~40% : 5%、41~59% : 11%、60~79% : 26%、80~100% : 58% と、約半数の患者が 80% 以上であった (図 7)。

図 7 服薬率
(必要な処方数と実処方数より算出)



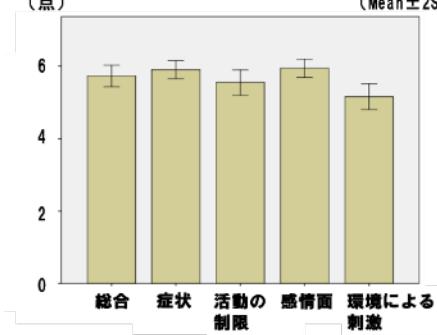
身体活動度レベルは、カテゴリー1（低レベル）：42%、カテゴリー2（中レベル）：34%、カテゴリー3（高レベル）：24%と、約半数で低レベルの身体活動度であった（図8）。

図 8 身体活動度のレベル
(歩行、中等度、強い活動量の合計)



Mini AQLQ は、総合：5.7、症状：5.9、活動の制限：5.6、感情面：5.9、環境による刺激：5.2 であった（図9）

図 9 Mini AQLQスコア
(点) (n = 74) (Mean±2SE)

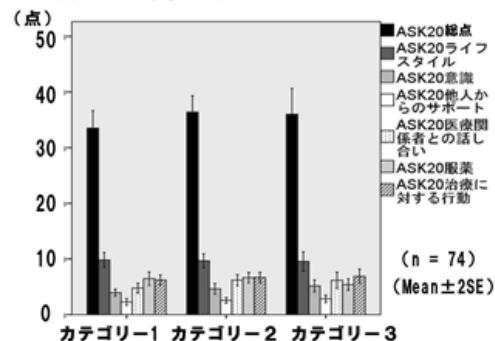


身体活動度レベルと吸入手技（吸入手技すべてのチェック項目の出来不出来を点数化）との関連性を検討すると、DPI 製剤使用者および pMDI 製剤使用者とともに、それらの間に有意

な関連性は認められなかった。

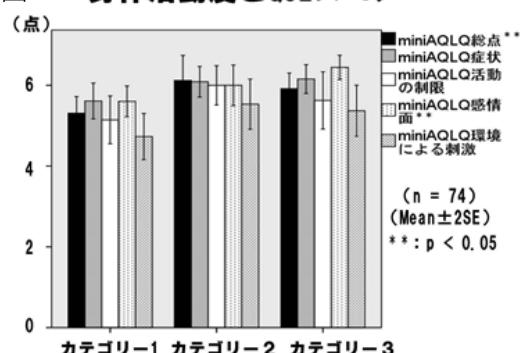
ASK-20 による服薬アドヒアラנס点数が高いほど、アドヒアラنسの障壁が大きいか、アドヒアラанс行動に問題があることを示す。身体活動度と ASK-20 総点や各ドメインとの間には有意な関連性は認められなかった（図10）。

図 10 身体活動度と服薬アドヒアラанс



身体活動度と mini AQLQ による QOL との関連性の検討では、身体活動のカテゴリーが上がるにつれて QOL スコアのうち、総点と感情面の上昇が認められた（図11）。

図 11 身体活動度とQOLスコア



D. 考察

平成 24 年度：

喘息患者では、治療下においても加齢に伴って FEV1 年間低下量は増加することが分かった。

また、気道可逆性が残存し、FeNO が高値の患者は気道炎症が残存し、FEV1 年間低下量が 70 ml 下（急速進行型）となることが考えられた。日常臨床上、このような症例には十分注意する必要がある。

平成 25 年度：

抑うつの状態が高齢者喘息の服薬アドヒアランスや喘息コントロールに影響を及ぼすと

いう結果が得られた。服薬アドヒアランスの指標として今回用いた ASK-20 と ACT の間には、「服薬」において負の相関を認め、「1 日複数回の服薬」、「吸入薬が使用しづらい」という服薬アドヒアランスの障壁が喘息コントロールに影響する可能性が示唆された。しかしながら、喘息患者において服薬アドヒアランスの評価には実際の服薬率や吸入手技を確認する必要があり、ASK-20 による評価だけでは限界があると考える。

平成 26 年度：

疾患・薬剤に関する認識度調査や吸入手技確認のために使用した JASCOM 病薬連携ツールの吸入指導チェック項目シートは、シンプルかつ最低限吸入指導に必要な項目で構成されている。本シートを用いた調査結果より、高齢喘息患者は、喘息という疾患有る程度認識し、薬剤名や薬効は分からぬが、吸入ステロイド薬の用法用量を守り、継続する必要性を理解しているという実態が判明した。しかしながら、服薬率は、一般的に良好といわれている 80% を達成していた患者の割合は 58% と低いという実態が明らかになった。

高齢喘息患者にデモ器を用いて吸入手技を実演してもらったところ、「吸入前の息吐き」、「DPI 製剤で強く深くスープと吸う」、「pMDI 製剤で深くゆっくり吸う」、「吸入後の息止め」の出来ていない患者の割合が多かった。過去に吸入指導を受けていても正しい方法で吸入薬を使用していない患者がいるため、日常診療においては、ときどき患者の吸入手技を確認し、もし出来ていなければ再指導することが必要であると考えられた。しかしながら、実際の吸入手技を観察した高齢喘息患者の中には、上記の手技のうち、「DPI 製剤で強く深くスープと吸う」、「pMDI 製剤で深くゆっくり吸う」といった手技の出来ない場合や、手先の器用さが衰えたり、理解力不足のためなど、どうしても吸入薬が使用できない場合がある。このような場合には、家族や介護者の元で吸入薬を使用したり（例：スペイサー付きの pMDI 製剤）、時にはネブライザーを用いることも有用ではないかと考えられる。さらには経口薬、貼付薬を選択せざるを得ないことも考えられる。

26 年度の研究では、身体活動と吸入手技や服薬アドヒアランスとの間には有意な関連性を認めなかった。吸入手技ができるかどうか、服薬アドヒアランスの障壁が大きいかどうか、アドヒアランス行動に問題があるかどうかは、日常の身体活動度には左右されないと示唆された。

身体活動度と喘息 QOL との間には関連性が認められ、身体活動度が高いほど、喘息 QOL が良好であることが分かった。喘息治療ステップと喘息 QOL との関連性も検討したが、特に有意な関連性は認められなかつたので、喘息の重症度が高くなつても、身体活動度が保たれておれば、QOL は良好であることが考えられた。

服薬アドヒアランスと吸入手技・服薬率との相関関係も検討したが、有意な関連性は認められなかつた。よって、日常の臨床では、個々の高齢喘息患者における服薬アドヒアランス、吸入手技、服薬率を観察しながらコントロールを良好に保つ必要がある。

E. 結論

高齢者喘息では、治療下においても若年者と比較して FEV1 年間低下量は増加する。また、高齢喘息患者は、吸入ステロイド薬の用法用量を守り、継続する必要性を理解している一方、吸入手技が出来ていないことが多い。また、抑うつの程度が服薬アドヒアランスや喘息コントロールに影響を及ぼす。日常臨床において、高齢者喘息のコントロールを良好に維持し、QOL を高めるためには、注意深く個々の患者における服薬アドヒアランスの障壁を探り、吸入手技をチェックすることが必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 東田有智. 喘息患者のステロイド薬療法とコントロール評価. 日本医事新報 2012; 4589 : 56-57
- 2) 岩永賢司、東田有智: 喘息と末梢気道病変. 日本胸部臨床 2012; 71: 51-55

- 3) 東田有智、東本有司. 喘息を合併した COPD の治療. 臨床と研究 2012; 89: 1061-1065
- 4) Iwanaga T, Tohda Y, Sano H, et al. Age-related changes in airway resistance using an impulse oscillation system in patients with asthma. Acta Med Kinki Univ 2012; 37:71-76
- 5) Iwanaga T, Tohda Y. Bronchial asthma: progress in diagnosis and treatments. Topics: I. Basic knowledge; 3. Asthma in the elderly. Nihon Naika Gakkai zasshi. The Journal of the Japanese Society of Internal Medicine 2013; 102: 1343-1351
- 6) 岩永賢司、東田有智. 末梢気道病変を意識した吸入ステロイド療法. 喘息 2012; 25: 164-169
- 7) 岩永賢司、東田有智. チオトロピウムの今後の展望. 吸入療法 2013; 5: 50-58
- 8) 富森洋子、岩永賢司、谷内麻寿美、東田有智. 吸入指導における病棟看護師の役割 吸入療法 2013; 5: 100-103
- 9) 岩永賢司、東田有智. 喘息と COPD の合併アレルギーの臨床 2013;33: 624-628
- 10) 岩永賢司、東田有智. 吸入手技の重要性－いかに吸入指導を行うか－ 喘息医療連携の現状－吸入指導の観点から－ Respiratory Medical Research 2014; 2: 60-62
- 11) 岩永賢司、東田有智. 患者教育に役立つ喘息の基本病態について. Apo Talk 2014; 36:12-13
- 12) 岩永賢司、東田有智.高齢者喘息と治療アドヒアランス.アレルギーの臨床 2014; 34: 41-44
- 2.学会発表
- 1) 東田有智. 高齢者喘息の問題点：第 52 回 日本呼吸器学会学術講演会 教育講演. 2012. 神戸
- 2) 佐野博幸、東田有智.喘息の難治化要因とその対策：加齢と GERD の影響：第 52 回日本呼吸器学会学術講演会 シンポジウム. 2012. 神戸
- 3) 岩永賢司、東田有智.喘息の病態に与える鼻副鼻腔炎の影響：第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会 ミニシンポジウム. 2012. 大阪
- 4) 佐野博幸、東田有智.重症気管支喘息の病態解明と治療戦略：難治化への加齢の影響と対策：第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 イブニングシンポジウム. 2012. 大阪
- 5) Iwanaga T、Tohda Y. Adherence to medication in patients with asthma、in Japan : 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 国際シンポジウム. 2012. 大阪
- 6) 東田有智、久米裕昭. 気道炎症から見た喘息と COPD の接点：第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会シンポジウム. 2012. 大阪
- 7) 岩永賢司、東田有智. 高齢者喘息の服薬アドヒアランスとコントロールに影響する因子の検討：第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2014 年 : 京都
- 8) Sho Saeki、Takashi Iwanaga. Influence on medication adherence and disease control in elderly patients with asthma. 第 24 回国際喘息学会日本・北アジア部会 2014 年 : 名古屋
- 9) Takashi Iwanaga、Hiroyuki Sano、Yuji Tohda Age-related changes in airway resistance and reactance using an impulse oscillation system in patients with asthma. APSR 2013 in Yokohama.
- 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

**厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業
（免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野））
総合分担研究報告書**

クラスター解析を用いた喘息病態の多様性の解明に向けた研究

研究分担者 檜澤伸之 筑波大学医学医療系呼吸器内科 教授

研究要旨

喘息は発症年齢の違いやアトピーの有無、呼吸機能、さらには治療に対する反応性の違いなどによって極めて多様な臨床像を呈する。環境因子と遺伝因子との交互作用により形作られる分子病態の多様性を理解することは、個々の分子病態に基づいた喘息の診断や治療の実施に繋がり、特に吸入ステロイドを含む既存の薬剤では十分なコントロールを得ることが困難な難治性喘息においては極めて重要な課題である。今回、我々は IgE 反応性を指標にクラスター解析を用いることで臨床的に特徴的な 4 つの喘息フェノタイプを同定した。総 IgE 高値、ダニなどの室内アレルゲンへの強い感作を特徴とする喘息群が存在し、喘息の重症化と関連する可能性がある。一方、アレルゲン感作の関与が少ない成人喘息の発症と機能的な TSLP 遺伝子多型との間に有意な関連が認められ、喫煙を介した TSLP の発現亢進が特定の喘息病態に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。また強制オシレーション法 (FOT) によって得られた呼吸抵抗 (Rrs) と呼吸リアクタンス (Xrs) を用いたクラスター解析では、喘息は肺機能や重症度、アトピーの頻度が異なる 4 つのクラスターに分類された。喘息分子病態の多様性が FOT に反映されている可能性が考えられた。

A. 研究目的

喘息は発症年齢の違いやアトピーの有無、呼吸機能、さらには治療に対する反応性の違いなどによって極めて多様な臨床像を呈する。環境因子と遺伝因子との交互作用により形作られる分子病態の多様性を理解することは、個々の分子病態に基づいた喘息の診断や治療の実施に繋がり、特に吸入ステロイドを含む既存の薬剤では十分なコントロールを得ることが困難な難治性喘息においては極めて重要な課題である。

吸入抗原感作は喘息病態の重要な要素の一つである。我々はこれまでに外来刺激に対する自然免疫センサーであり、向アレルギー性の作用を有する thymic stromal lymphopoietin (TSLP) の遺伝子多型が喘息発症と関連すること、さらには喫煙の影響を受けながら、吸入アレルゲンに対する感作パターンと関連することを報告した。本研究では、吸入アレルゲンに対する感作パターンに基づいた喘息のフェノタイプ分類（アトピー分類）を行い、

その臨床的特徴を明らかにすること、さらに各フェノタイプと TSLP 遺伝子との関連を喫煙の有無によって層別化し検討することである。一方、呼吸抵抗 (Rrs) は気道抵抗や組織抵抗等の呼吸器系全体の粘性抵抗の和を表し、呼吸リアクタンス (Xrs) は呼吸器システムの弾力性や慣性に関わる指標である。強制オシレーション法 (FOT) は Rrs と Xrs を安静換気で評価することができ、既に喘息の診断や治療に幅広く応用されている。本研究では FOT の指標を用いた喘息のクラスター分類を行い、各喘息クラスターの臨床的特徴を明らかにすることで、喘息診療における FOT 測定の意義を明確にすると同時に、分子病態の多様性を反映するような喘息表現型の同定を試みた。

B. 研究方法

茨城県および上士幌町在住の成人喘息患者 (N=294)、非喘息健常者 (N=1571) を対象に問診、血清総 IgE、multiple antigen simultaneous test (MAST)-26® および呼吸

機能測定を行い、茨城地区(N=1651)、上士幌地区(N=214)でこれらの因子を用いてクラスター解析(k-means法)を行い、アトピーを4群(A群:ダニ・動物抗原感作群、B群:イネ科・樹木など多重抗原感作群、C群:スギ抗原のみ感作群、D群:非感作群)に分類した。次に、これらの感作パターンによって分類された喘息の臨床的表現型について比較検討した。さらに、TSLPの転写活性の亢進と関連し、既に喘息発症との強い関連が報告されている機能的な一塩基多型(rs3806933、rs2289276)における遺伝子型を決定し、非喘息健常人1565名を対照として多項ロジスティック解析を行った。

また、筑波大学附属病院通院中の喘息患者72名を対象に、FOT(モストグラフ)で計測される4項目(5Hz, 20Hz)のそれぞれの呼吸抵抗R5、R20、共振周波数までのリアクタンスの積分ALX、共振周波数Fres)を用いてクラスター解析を行った。年齢、発症年齢、BMI、末梢血好酸球数、呼気NO、総IgE値、アレルゲン特異的IgE抗体、BMI、喫煙行動、重症度などの臨床的な特徴を、各クラスター間で比較検討した。肺コンプライアンスが変化していると考えられる肺気腫、肺線維症、胸郭の変形のある陳旧性肺結核などの疾患、気管支拡張症のような気道内腔が変形している疾患については検討から除外した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトの遺伝子解析を主要課題として実施された。資料の提供者、その家族と血縁者、その他関係者の人権及び利益保護のために、三省合同で作成された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき、説明書と同意書を作成した。筑波大学及び北海道大学の「医の倫理委員会」に審査を申請し、承認された。

C. 研究結果

感作パターンによる喘息のクラスター分類: 喘息A群はダニに強く感作され(lumicount中央値99.9)、年齢中央値が41歳と若年で血清logIgE値が 2.62 ± 0.55 IU/mlと高く、陽性吸入抗原数は 5.05 ± 2.43 と比較的多く認められた。アレルギー性鼻炎の罹患率は50.6%であった。喘息B群は、オオアワガエリに強く感作され(lumicount中央値80.2)、上士幌地区ではヨモギなどの屋外草木抗原にも幅広く感作され、陽性抗原数は 6.36 ± 2.92 と最も多く認められた。アレルギー性鼻炎の合併も78.6%と多かった。喘息C群はスギ花粉のみに強く感作された群で(lumicount中

央値63.6)、アレルギー性鼻炎を高率(81.8%)に合併しているが、陽性吸入抗原数は 2.72 ± 2.76 と喘息B群より少なかった。また男性の割合が36.4%と少なかった。喘息D群は年齢中央値が57歳と最も高く、陽性吸入抗原数は 0.96 ± 1.39 と少ない。また血清logIgE値が 1.90 ± 0.59 IU/mlと低値で、アレルギー性鼻炎の罹患率も25.3%と低かった。呼吸機能に関しては、%FEV1値は、喘息A群とC群、喘息A群とD群との比較で、いずれも喘息A群が有意に低値であった(それぞれ、P=0.0417, P=0.0007)。遺伝的な検討では、非喫煙者ではいずれの喘息フェノタイプも、TS defense rs2289276、rs3806933との関連は認められなかった。一方、喫煙者では低IgE反応で特徴づけられる喘息D群において、rs2289276ではOR 2.11 [95%CI 1.36-3.30; P=0.001]、rs3806933ではOR 2.11 [1.34-3.33; P=0.001]といずれのSNPにおいてもTS defense 高発現と関連する対立遺伝子が有意に高頻度で認められた。

呼吸メカニクスによる喘息のクラスター分類: FOTを施行した喘息患者全体(N=76)ではXrsとRrsには強い正の相関($r>0.9$, $p<0.0001$)が認められた。しかし、低肺機能や重症度はRrsではなくXrsとより強く関連した。一方、クラスター解析ではXrsとRrsのそれぞれの高低により4つの喘息群に分類された(A群:高Xrs、低Rrs、B群:低Xrs、高Rrs、C群:低Xrs、低Rrs、D群:高Xrs、高Rrs)。Xrs、Rrsのいずれもが高値を示すD群は最も呼吸機能が低下し、さらに末梢気道の不均等換気を反映するとされるR5-R20値が最も高い値を示した。一方、特にXrsが高く、Rrsが正常のA群においても1秒率低下、重症度が重い、非アトピー、気道可逆性が小さい、などの重症喘息としての特徴が認められた。Xrsが正常、Rrsが高いB群では1秒率が正常、重症度が軽く、可逆性が大きく、若年発症アトピー型や肥満が多いといった特徴が認められた。罹病期間はA群で平均27.5年、B群で15年と有意にA群で長かった。

D. 考察

喘息患者を対象とし、IgE反応性の違い（MAST-26のlumicount値および血清総IgE値）によって喘息を対象としたクラスター解析を行い、年齢、性別、喫煙状況、アレルギー性鼻炎の有無、抗原感作数、血清IgE値、呼吸機能についてのデータを比較し、アレルゲン感作パターンに基づいた、臨床的に特徴的な4つの喘息フェノタイプの存在を明らかにした。また、喫煙者においてTSLP遺伝子とIgE反応性が最も弱い喘息D群との間に統計学的に有意な関連が認められた。本研究の結果は、少なくともIgE反応性の弱い成人喘息においては、喫煙による気道からのTSLP産生誘導がその発症のリスクにつながっている可能性が示唆された。

また、FOTによって得られたXrsとRrsの指標のみを用いて、臨床的に異なる特徴を有する4つの喘息クラスターの存在を明らかにした。特に、高Xrs、低Rrsで特徴づけられるA群と、低Xrs、高Rrsで特徴づけられるB群とでは、罹病期間が大きく異なっており、気道リモデリングの違いを反映している可能性が考えられた。リモデリングについては、気道壁の肥厚と周辺肺の構造の変化を伴うため、肺の弹性抵抗に大きな影響があると考えられる。一方、好酸球性炎症の指標とされているFeNOは一秒率とは有意に関連したもの、Xrs、Rrsとの関連ではなく、喘息クラスター間でも有意な違いを認めなかつた。モストグラフの各指標が直接的には気道炎症の程度を反映していないことを示唆している。今後は対象症例数を増やし、今回同定した4群の喘息の臨床的特徴の違いをより明確にすることで、FOT測定の臨床的意義を明らかにできる可能性がある。

E. 結論

アトピー分類によって臨床的に特徴的な4つの喘息フェノタイプが同定された。総IgE高値、ダニなどの室内アレルゲンへの強い感作を特徴とする喘息フェノタイプが存在し、喘息の重症化と関連する可能性がある。一方、アレルゲン感作の関与が少ない成人喘息の発症には、喫煙を介したTSLPの発現亢進が重

要な役割を果たしている可能性がある。FOTによって得られたRrsとXrsを用いることにより、喘息は肺機能や重症度、アトピーの頻度が異なる4つのクラスターに分類された。喘息分子病態の多様性がFOTに反映されている可能性がある。

G. 研究発表

1.論文発表

- 1)清水薫子, 今野 哲, 木村孔一, 荻 喬博, 谷口菜津子, 清水健一, 伊佐田朗, 服部健史, 檜澤伸之, 谷口正実, 赤澤 晃, 西村正治. 北海道上士幌町における成人喘息、アレルギー性鼻炎有病率の検討—2006年、2011年の比較—.アレルギー 2014; 63(7): 928-937
- 2)飯島弘晃, 山田英恵, 谷田貝洋平, 金子美子, 内藤隆志, 坂本透, 増子裕典, 広田朝光, 玉利真由美, 今野哲, 西村正治, 檜澤伸之. アレルゲン特異的 IgE 反応性から分類した喘息フェノタイプ—Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) 遺伝子と喫煙の役割—. アレルギー 2014; 63(1): 33-44
- 3)檜澤伸之. [気管支喘息:診断と治療の進歩] 病因と病態 喘息関連遺伝子. 日本内科学会雑誌 2013; 102(6):1365-1369
- 4)Yatagai Y, Sakamoto T, Yamada H, Masuko H, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Konno S, Nishimura M, Hizawa N. Genomewide association study identifies HAS2 as a novel susceptibility gene for adult asthma in a Japanese population. Clin Exp Allergy 2014; 44(11): 1327-34
- 5)Nanatsue K, Ninomiya T, Tsuchiya M, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N, Arinami T, Noguchi E. Influence of MILR1 promoter polymorphism on expression levels and the phenotype of atopy. J

- Hum Genet 2014; 59(9): 480-3
- 6) Taniguchi N, Konno S, Isada A, Hattori T, Kimura H, Shimizu K, Maeda Y, Makita H, Hizawa N, Nishimura M. Association of the CAT-262C>T polymorphism with asthma in smokers and the nonemphysematous phenotype of chronic obstructive pulmonary disease. Ann Allergy Asthma Immunol 2014; 113(1): 31-36
 - 7) Konno S, Hizawa N, Makita H, Shimizu K, Sakamoto T, Kokubu F, Saito T, Endo T, Ninomiya H, Iijima H, Kaneko N, Ito YM, Nishimura M. J-Blossom Study Group. The effects of a Gly16Arg ADRB2 polymorphism on responses to salmeterol or montelukast in Japanese patients with mild persistent asthma. Pharmacogenet Genomics 2014; 24(5): 246-55
 - 8) Taniguchi N, Konno S, Hattori T, Isada A, Shimizu K, Shimizu K, Shijubo N, Huang SK, Hizawa N, Nishimura M. The CC16 A38G polymorphism is associated with asymptomatic airway hyper-responsiveness and development of late-onset asthma. Ann Allergy Asthma Immunol 2013; 111(5): 376-381
 - 9) Hizawa N. Pharmacogenetics of chronic obstructive pulmonary disease. Pharmacogenomics 2013; 14(10):1215-25
 - 10) Iijima H, Kaneko Y, Yamada H, Yatagai Y, Masuko H, Sakamoto T, Naito T, Hirota T, Tamari M, Konno S, Nishimura M, Noguchi E, Hizawa N. A distinct sensitization pattern associated with asthma and the thymic stromal lymphopoitin (TSLP) genotype. Allergol Int 2013; 62(1):123-30
 - 11) Kaneko Y, Masuko H, Sakamoto T, Iijima H, Naito T, Yatagai Y, Yamada H, Konno S, Nishimura M, Noguchi E, Hizawa N. Asthma phenotypes in Japanese adults - their associations with the CCL5 and ADRB2 genotypes. Allergol Int 2013; 62(1):113-21
 - 12) Ano S, Morishima Y, Ishii Y, Yoh K, Yageta Y, Ohtsuka S, Matsuyama M, Kawaguchi M, Takahashi S, Hizawa N. Transcription factors GATA-3 and ROR γ t are important for determining the phenotype of allergic airway inflammation in a murine model of asthma. J Immunol 2013; 190(3): 1056-65
 - 13) Tomita K, Sakashita M, Hirota T, Tanaka S, Matsuyama K, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Hizawa N, Kubo M, Nakamura Y, Tamari M. Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. Allergy 2013; 68(1): 92-100
 - 14) Morishima Y, Ano S, Ishii Y, Ohtsuka S, Matsuyama M, Kawaguchi M, Hizawa N: Th17-associated cytokines as a therapeutic target for steroid-insensitive asthma. Clin Dev Immunol 2013; 2013: 609395
 - 15) Kaneko Y, Yatagai Y, Yamada H, Iijima H, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N. The search for common pathways underlying asthma and COPD. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2013; 8: 65-78
 - 16) Teramoto S, Hida N, Ishikawa H, Hizawa N: Inverse U shape of the trachea during an asthma attack. Intern Med 2013; 52(19): 2289-90
 - 17) Ano S, Morishima Y, Ishii Y, Kawaguchi M, Matsuno Y, Hizawa N: Defecation-related asthma. Intern Med 2013; 52(6): 685-7
 - 18) Yatagai Y, Sakamoto T, Masuko H, Kaneko Y, Yamada H, Iijima H, Naito T,

- Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Imoto Y, Tokunaga T, Fujieda S, Konno S, Nishimura M, Hizawa N. Genome-wide association study for levels of total serum IgE identifies HLA-C in a Japanese population. *PLoS One*. 2013; 8(12): e80941
- 19) Nagai K, Tahara-Hanaoka S, Morishima Y, Tokunaga T, Imoto Y, Noguchi E, Kanemaru K, Imai M, Shibayama S, Hizawa N, Fujieda S, Yamagata K, Shibuya A. Expression and function of Allergin-1 on human primary mast cells. *PLoS One* 2013; 8(10): e76160
- 20) Kaneko Y, Yatagai Y, Yamada H, Iijima H, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N: The search for common pathways underlying asthma and COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2013; 8: 65-78
- 21) Ano S, Morishima Y, Ishii Y, Yoh K, Yageta Y, Ohtsuka S, Matsuyama M, Kawaguchi M, Takahashi S, Hizawa N. Transcription Factors GATA-3 and ROR γ t Are Important for Determining the Phenotype of Allergic Airway Inflammation in a Murine Model of Asthma. *J Immunol.* 2013; 190(3):1056-65
- 22) Tomita K, Sakashita M, Hirota T, Tanaka S, Masuyama K, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Hizawa N, Kubo M, Nakamura Y, Tamari M. Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. *Allergy* 2013; 68(1): 92-100
- 23) Iijima H, Kaneko Y, Yamada H, Yatagai Y, Masuko H, Sakamoto T, Naito T, Hirota T, Tamari M, Konno S, Nishimura M, Noguchi E, Hizawa N. A Distinct Sensitization Pattern Associated with Asthma and the Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) Genotype. *Allergol Int.* 2013; 62(1):123-30
- 24) Kaneko Y, Masuko H, Sakamoto T, Iijima H, Naito T, Yatagai Y, Yamada H, Konno S, Nishimura M, Noguchi E, Hizawa N: Asthma Phenotypes in Japanese Adults - Their Associations with the CCL5 and ADRB2 Genotypes. *Allergol Int.* 2013; 62(1):113-21
- 25) Hizawa N. Associating Serum Biomarkers with Genetic Susceptibility to Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Step towards Improved Diagnosis and Therapy? *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186(12):1201-2
- 26) Hizawa N. The search for genetic links in NSAID-induced acute urticaria and the arachidonic acid pathway. *Clin Exp Allergy* 2012; 42(12):1660-3
- 27) Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Tanaka S, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Noguchi E, Sakamoto T, Hizawa N, Ebe K, Saeki H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M. Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet.* 2012; 44(11): 1222-6
- 28) Fujita J, Kawaguchi M, Kokubu F, Ohara G, Ota K, Huang SK, Morishima Y, Ishii Y, Satoh H, Sakamoto T, Hizawa N: Interleukin-33 induces interleukin-17F in bronchial epithelial cells. *Allergy* 2012; 67(6):744-50
- 29) Konno S, Hizawa N, Fukutomi Y, Taniguchi M, Kawagishi Y, Okada C,

- Tanimoto Y, Takahashi K, Akasawa A, Akiyama K, Nishimura M: The prevalence of rhinitis and its association with smoking and obesity in a nationwide survey of Japanese adults. *Allergy* 2012; 67(5):653-60
- 30) Kaneko Y, Masuko H, Sakamoto T, Iijima H, Naito T, Hizawa N. The opposite effect of the CCL5 gene on asthma and baseline FEV(1) in nonasthmatic healthy adults. *Allergol Int.* 2012; 61(1): 177-8
- 31) Hirai Y, Iyoda M, Shibata T, Kuno Y, Kawaguchi M, Hizawa N, Matsumoto K, Wada Y, Kokubu F, Akizawa T. IL-17A stimulates granulocyte colony-stimulating factor production via ERK1/2 but not p38 or JNK in human renal proximal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012; 302(2):F244-50
- 32) Hattori T, Konno S, Shigemura M, Matsuno K, Shimizu C, Shigehara K, Shijubo N, Hizawa N, Yamaguchi E, Nishimura M: Total serum IgE levels and atopic status in patients with sarcoidosis. *Allergy Asthma Proc* 2012; 33(1): 90-4
- 2.学会発表
- 1) 檜澤伸之. 喘息のエンドタイプにもとづく治療の可能性 シンポジウム 中高年発症喘息のフェノタイプ, エンドタイプ. 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会 2014 : 京都
 - 2) 檜澤伸之. エビデンスからの SMART 療法イブニングシンポジウム 4 今後の喘息・COPD 治療～ICS/LABA の有用性～: 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2014: 京都
 - 3) 檜澤伸之. 気道炎症をターゲットとした喘息の治療戦略: 教育セミナー14: 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2013: 横浜
 - 4) Y Yatagai, T Sakamoto, H Yamada, H Masuko, H Iijima, T Naito, E Noguchi, T Hirota, M Tamari, N Hizawa. Genome-Wide Association Study Identifies Hyaluronan Synthase 2 (HAS2) As A Susceptibility Gene For Adult Asthma In A Japanese Population. ATS 2014 International Conference San Diego, USA
 - 5) H Yamada, Y Yatagai, H Masuko, T Sakamoto, H Iijima, T Naito, E Noguchi, T Hirota, M Tamari, N Hizawa. The Role Of Lung Function Genes In The Development Of Asthma. ATS 2014 International Conference San Diego, USA
 - 6) 檜澤伸之. 成人喘息のフェノタイプ: クラスター解析と遺伝因子: 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム 8, 2013: 横浜
 - 7) 檜澤伸之. Phenotypeに基づく喘息診療: 第53回日本呼吸器学会総会イブニングシンポジウム 1 気管支喘息・COPD 治療へのアプローチ～ICS/LABA 配合剤の可能性, 2013: 東京
 - 8) Hizawa N. Asthma phenotypes in Japanese adults and their associations with the CCL5 and ADRB2 genotypes: The 53rd Annual Meeting of the Japanese Respiratory Society 2013 International Symposium “Phenotype to genotype of asthma and COPD”
 - 9) Y Yatagai, H Masuko, H Yamada, Y Kaneko, T Sakamoto, H Iijima, T Naito, E Noguchi, T Hirota, M Tamari, Y Imoto, T Tokunaga, S Konno, M Nishimura, N Hizawa. Genome-Wide Association Study Of Serum Total IgE Levels In The Japanese Population Identifies A Novel Responsible Locus In HLA Class I Region. ATS 2013 International Conference, Denver, USA
 - 10) H Yamada, Y Yatagai, H Masuko, Y

- Kaneko, T Sakamoto, H Iijima, T Naito, E Noguchi, T Hirota, M Tamari, N Hizawa. A Genomewide Association Study In Healthy Japanese Adults Replicated The Previously Reported Susceptibility Genes To Airflow Limitation. ATS 2013 International Conference, Denver, USA
- 11) 檜澤伸之. 喘息難治化における遺伝因子の役割, 第 23 回国際喘息学会日本・北アジア部会シンポジウム 4 喘息難治化因子とその対策, 2013: 東京
- 12) 檜澤伸之. 遺伝的要因から見た喘息と COPD の分子病態. 第 52 回日本呼吸器学会総会教育講演, 2012 年 : 神戸
- 13) 檜澤伸之. 気管支喘息の多様性. 成人喘息病態の多様性. 第 52 回日本呼吸器学会総会イブニングシンポジウム 2012 年 : 神戸

戸

- 14) 檜澤伸之, 阿野哲士, 森島祐子. ステロイドの作用機序と治療抵抗性のメカニズム. 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会 シンポジウム 2012 年 : 大阪
- 15) 檜澤伸之. アレルギー疾患の遺伝子解析 —その臨床的意義を考える—. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 シンポジウム 2012 : 大阪

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

**厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業
（免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野））
総合分担研究報告書**

乳幼児喘息の病態解明と治療法の確立に関する研究

研究分担者	近藤直実	岐阜大学 名誉教授/平成医療短期大学 学長
研究協力者	松井永子	岐阜大学医学部附属病院小児科 臨床准教授
	加藤善一郎	岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科 教授
	寺本貴英	岐阜大学医学部 非常勤講師
	大西秀典	岐阜大学医学部附属病院小児科 講師
	川本典生	岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 併任講師
	金子英雄	国立病院機構長良医療センター臨床研究部 部長
	後藤加寿美	揖斐厚生病院 小児科
	篠田紳司	郡上市民病院 副院長
	鹿野博明	大垣市民病院 小児科
	福富 悅	福富医院 院長
	多賀俊明	市立長浜病院 院長
	木全かおり	かわしまファミリークリニック 小児科

研究要旨

乳幼児喘息の病因病態の解明、乳幼児喘息早期診断のための質問票の作成、および乳幼児喘息の治療法の確立を目的とする。(1) 乳幼児喘息早期診断のための質問票作成では、“かぜでゼーゼー”、“運動でゼーゼー”および“家族の喘息歴”が重要項目であった。(2) 乳幼児喘息そのものの軽快、治癒を目指した治療法の確立につき試案（両輪療法—近藤）を作成し、その治療法を実践して評価した。その結果、制御性 T 細胞の一つの重要な指標である Treg の比率は, Th2 サイトカイン阻害薬の使用前に比べて、使用後 1 か月 (day 30) で、増加する傾向がみられた。すなわち 1 例中 7 例で増加した。一方、IgG4 値は 11 例中 2 でしか増加しなかった。IgE 値は全例で減少し、増加する症例はなかった。さらに、遺伝子型でみると LTC4S (A-444C) 遺伝子が野生型の方が、変異型に比べて Treg 比率の増加が大きい傾向が示された。また、IL-13 (R110Q) 遺伝子が野生型の方が、変異型に比べて IgG4 の増加傾向がみられた。次に、別の症例 11 例で、使用後 3~6 か月(day 90-180)でみたところ、Th1/Th2 比が増加する症例が多くあった。特に LTC4S A-444C の変異型、IL-13 R110Q の野生型で上昇する症例が多かった。Th1/Th2 バランスのは正が示されると共に、アレルギー改善への方向が示唆された。

A. 研究目的

乳幼児喘息の病因病態の解明、乳幼児喘息早期診断のための質問票の作成、および乳幼児喘息の治療法の確立を目的とする

を実践して評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は倫理審査委員会において承認を得て、患者あるいは保護者の同意を得、十分に個人情報保護などに配慮して行った。

B. 研究方法

(1) 乳幼児喘息の早期診断のための質問票を作成した。(2) 乳幼児喘息そのものの軽快、治癒を目指した治療法の確立につき試案（両輪療法—近藤、図 1）を作成し、その治療法

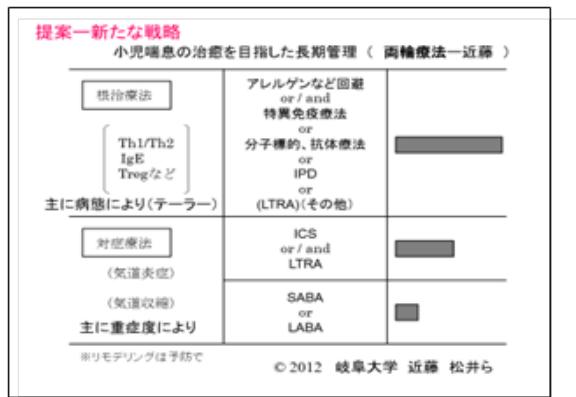


図 1 両輪療法一近藤

C. 研究結果

- (1) 乳幼児喘息早期診断のための質問票作成では、“かぜでゼーゼー”、“運動でゼーゼー”および“家族の喘息歴”が重要項目であった。
- (2) 乳幼児喘息の軽快、治癒を目指して、抗炎症薬(吸入ステロイド等)に加えて Th1／Th2 バランスを是正するとされる Th2 サイトカイン阻害薬を使用するプロトコールを作成して、検討した(表 1、図 2)。

表 1 対象および方法

対象および方法	
対象: 気管支喘息として 1か月以上何らかの長期管理薬で治療されている児	
方法:	
来院 (day -14)	<ul style="list-style-type: none"> ④説明文書による説明と同意書取得 ⑤喘息日誌の交付
来院 (day 0)	<ul style="list-style-type: none"> ⑥採血 Th1/Th2 Treg: CD4, CD25, FoxP陽性細胞 Th17 IgG4 IgE 追伝子検索(LTC4S -444, IL-13 R110Q) ⑦IPD(6mg/kg/day 分2)で投与。定期来院
来院 (day 30 or 90-180)	<ul style="list-style-type: none"> ⑧採血 Th1/Th2 Treg: CD4, CD25, FoxP陽性細胞 Th17 IgG4 IgE ⑨喘息日誌の回収

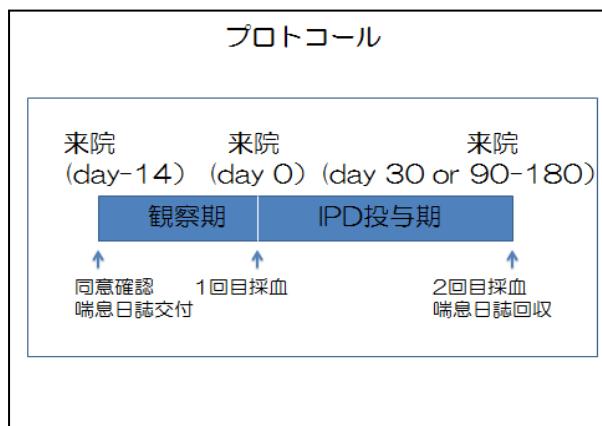


図 2 プロトコール

そのプロトコールは、気管支喘息として 1か月以上何らかの長期管理薬を使用している小児を対象とし、Th2 サイトカイン阻害薬を追加処方し、臨床症状の経過および前後のパラメーターの比較を行った。パラメーターとしては、Th1/Th2, Treg(CD4, CD25, FoxP 陽性細胞), Th17, IgG4, IgE とした。また、薬剤反応性確認のため、喘息日誌の記載、有効性と遺伝子多型(ロイコトリエンC4 合成酵素、インターロイキン 13)との関連性についても検討した。

倫理委員会の承認を得て、まず、11 例で使用 1か月(day 30)で検討された。その結果(表 2, 3)、制御性 T 細胞の一つの重要な指標である Treg の比率は、Th2 サイトカイン阻害薬の使用前に比べて、使用後 1か月で、増加する傾向がみられた。すなわち 11 例中 7 例で増加した。一方、IgG4 値は 11 例中 2 でしか増加しなかった。IgE 値は全例で減少し、増加する症例はなかった。

さらに、遺伝子型でみると LTC4S (A-444C) 遺伝子が野生型の方が、変異型に比べて Treg 比率の増加が大きい傾向が示された。また、IL-13 (R110Q) 遺伝子が野生型の方が、変異型に比べて IgG4 の増加傾向がみられた。

次に、別の症例 11 例で、使用後 3～6 か月(day 90-180)でみたところ、Th1/Th2 比が増加する症例が多かった(表 4, 5)。特に LTC4S A-444C の変異型、IL-13 R110Q の野生型で上昇する症例が多かった。

表 2 Th2 サイトカイン阻害薬投与前後の変化(倍) 1か月

Th2サイトカイン阻害薬投与前後(1か月)の変化(倍)									
LTC4S (A-444C)	IgE	IgG4	Th1	Th2	Th1/Th2	Th17	Treg (CD4) (%)	Treg (CD4) (%)	
野生	AA	0.74	1.00	0.65	0.65	1.00	1.64	1.36	1.14
	AA	0.93	0.92	1.00	1.35	0.75	1.22	0.78	0.67
	AA	0.97	0.55	1.04	2.5	0.42	1.04	1.10	1.19
	AA	0.96	0.94	0.94	0.92	1.02	1.51	1.20	1.27
	AA	0.84	0.94	0.67	0.74	0.90	0.97	1.54	1.27
	AA	0.79	1.21	1.17	0.85	1.34	1.05	1.00	0.99
平均		0.87	0.93	0.91	1.17	0.91	1.24	1.16	1.09
変異	CC	0.97	0.92	0.78	0.86	0.89	1.08	1.14	1.10
	AC	0.95	0.82	1.09	1.17	0.94	1.26	1.00	1.06
	AC	0.90	0.86	1.21	1.24	0.97	1.33	1.16	1.10
	CC	0.76	0.86	0.86	2	0.42	0.68	0.69	0.78
	AC	0.57	1.33	0.83	0.85	1.25	0.73	1.11	1.13
平均		0.82	0.94	0.96	1.19	0.89	1.04	1.02	1.03

表3 Th2サイトカイン阻害薬投与前後の変化(倍)1か月

Th2サイトカイン阻害薬投与前後(1か月)の変化(倍)									
IL-13 (R110Q)	IgE	IgG4	Th1	Th2	Th1/ Th2	Th17 (%Gated)	Treg (CD4) (%Gated)	Th17 (%Total)	Treg (CD4) (%Total)
野生	GG	0.74	1.00	0.65	0.65	1.00	1.64	1.36	1.14
	GG	0.98	0.92	1.00	1.35	0.75	1.22	0.78	0.67
	GG	0.97	0.82	0.78	0.86	0.89	1.08	1.14	1.10
	GG	0.58	1.33	0.88	0.65	1.25	0.73	1.11	1.18
	GG	0.79	1.21	1.17	0.85	1.34	1.05	1.00	0.99
平均		0.79	1.06	0.89	0.87	1.05	1.14	1.08	1.00
変異	GA	0.97	0.55	1.04	2.5	0.42	1.04	1.10	1.19
	GA	0.96	0.94	0.94	0.92	1.02	1.51	1.20	1.27
	GA	0.95	0.82	1.09	1.17	0.94	1.36	1.00	1.06
	GA	0.90	0.86	1.21	1.24	0.97	1.33	1.16	1.10
	AA	0.76	0.86	0.85	2	0.42	0.68	0.59	0.78
	AA	0.84	0.94	0.67	0.74	0.90	0.97	1.54	1.27
平均		0.98	0.83	0.97	1.43	0.78	1.15	1.11	1.11

表4 Th2サイトカイン阻害薬投与前後の変化(倍)3-6か月

Th2サイトカイン阻害薬投与前後(3-6か月)の変化(倍)									
LTC4S (A-444C)	IgE	IgG4	Th1/ Th2	Th1	Th2	Treg (%Gated)	Treg (CD4) (%Gated)	Th17 (%Total)	Th17 (%Gated)
野生	AA	1.31	1.20	0.90	1.18	1.31	0.73	0.78	1.04
	AA	0.68	1.00	0.34	1.00	3.00	0.89	0.96	1.40
	AA	0.29	1.06	1.33	1.21	0.91	0.95	0.87	0.43
	AA	0.84	0.97	1.12	0.88	0.80	1.02	1.14	1.00
	AA	1.04	1.75	1.15	0.95	0.79	1.41	1.09	0.51
平均		0.94	1.16	0.96	1.08	1.35	0.98	0.945	0.95
変異	AC	0.53	2.34	0.86	1.11	1.27	0.87	0.87	1.20
	AC	0.60	0.83	1.59	0.94	0.58	0.97	0.95	0.88
	AC	1.62	0.92	1.03	0.91	0.88	0.69	0.63	1.74
	AC	1.53	0.91	1.18	1.47	1.25	0.74	0.73	0.32
	AC	1.40	0.86	1.81	0.98	0.55	1.26	1.39	5.83
平均		1.14	1.17	1.29	1.08	0.91	0.91	0.914	1.99

表5 Th2サイトカイン阻害薬投与前後の変化(倍)3-6か月

Th2サイトカイン阻害薬投与前後(3-6か月)の変化(倍)									
IL-13 (R110Q)	IgE	IgG4	Th1/ Th2	Th1	Th2	Treg (%Gated)	Treg (CD4) (%Gated)	Th17 (%Total)	Th17 (%Gated)
野生	GG	0.68	1.00	0.34	1.00	3.00	0.89	0.96	1.40
	GG	0.60	0.83	1.59	0.94	0.58	0.97	0.95	0.88
	GG	0.29	1.06	1.33	1.21	0.91	0.95	0.87	0.43
	GG	1.62	0.92	1.03	0.91	0.88	0.69	0.63	1.74
	GG	1.04	1.75	1.15	0.95	0.79	1.41	1.09	0.51
平均		0.96	1.08	1.10	1.08	1.24	0.94	0.87	0.88
変異	GA	1.31	1.20	0.90	1.18	1.31	0.73	0.78	1.04
	GA	0.53	2.34	0.86	1.11	1.27	0.87	0.87	1.20
	GA	0.84	0.97	1.12	0.88	0.80	1.02	1.14	1.00
	GA	1.40	0.86	1.81	0.98	0.55	1.26	1.39	5.83
	GA	1.50	1.00	0.94	1.24	1.31	0.87	0.83	1.00
平均		1.12	1.27	1.13	1.08	1.05	0.95	1.00	2.08

D. 考察、E. 結論

(1) 乳幼児喘息早期診断のための質問票作成では、“かぜでゼーゼー”、“運動でゼーゼー”および“家族の喘息歴”が重要項目であった。

(2) 乳幼児喘息の軽快、治癒を目指して、抗炎症薬に加えて Th1/Th2 バランスを是正するとされる Th2 サイトカイン阻害薬を使用するプロトコールを作成して、検討を開始した。制御性 T 細胞は、アレルゲン免疫療法による生体の免疫系の改善の一つの重要な指標とされていることから、Th1/Th2 バランスを是正するとされる Th2 サイトカイン阻害薬によって、制御性 T 細胞の一つの重要な指標である Treg の比率が増加傾向をしたこと、および、Th1/Th2 比率が増加傾向を示したことは重要な意味を持つ。Th1/Th2 バランスのは正が示されると共に、アレルギー改善への方向が示唆された。

なお、ロイコトリエン受容体拮抗薬の軽快、治癒への効果についても検討をすすめている。

G. 研究発表

1.論文発表

- Kondo N, Kuwabara M, Matsui E, Kodama H, Kumada M, Kondo K, Nagata T, Toida S, Mishina H, Iwasaki J, Matsuno Y, Furuta Y, Shinoda A, Yoshizaki S, Tanaka C, Akita A, Taguchi K, Hirano K. Personalized Medicine for bronchial asthma and allergies. Personalized Medicine Universe 2014; 3: 11-14
- Yamamoto T, Tsutsumi N, Tochio H, Ohnishi H, Kubota K, Kato Z, Shirakawa M, Kondo N. Functional assessment of the mutational effects of human IRAK4 and MyD88 genes. Mol Immunol 2014; 58: 66-76
- Kubota K, Ohnishi H, Teramoto T, Kawamoto N, Kasahara K, Ohara O, Kondo N. Clinical and Genetic Characterization of Japanese Sporadic Cases of Periodic Fever, Aphthous

- Stomatitis, Pharyngitis and Adenitis Syndrome from a Single Medical Center in Japan. *J Clin Immunol* 2014; 34: 584-593
- 4) Katayama I, Kohno Y, Akiyama K, Aihara M, Kondo N, Saeki H, Shoji S, Yamada H, Nakamura K. Japanese guideline for atopic dermatitis 2014. Japanese Society of Allergology. *Allergol Int* 2014; 63: 377-398
- 5) Hamasaki Y, Kohno Y, Ebisawa M, Kondo N, Nishima S, Nishimuta T, Morikawa A. Japanese guideline for childhood asthma 2014. Japanese Society of Allergology; Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical Immunology. *Allergol Int* 2014; 63: 335-356
- 6) Funato M, Uemura O, Ushijima K, Ohnishi H, Orii K, Kato Z, Yamakawa S, Nagai T, Ohara O, Kaneko H, Kondo N. A Complement Factor B Mutation in a Large Kindred with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *J Clin Immunol* 2014; 34: 691-695
- 7) Kimura T, Tsutsumi N, Arita K, Ariyoshi M, Ohnishi H, Kondo N, Shirakawa M, Kato Z, Tochio H. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of human IL-18 and its extracellular complexes. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 2014; 70: 1351-1356
- 8) Hamasaki Y, Kohno Y, Ebisawa M, Kondo N, Nishima S, Nishimuta T, Morikawa A, Aihara Y, Akasawa A, Adachi Y, Arakawa H, Ikebe T, Ichikawa K, Inoue T, Iwata T, Urisu A, Ohya Y, Okada K, Odajima H, Katsunuma T, Kameda M, Kurihara K, Sakamoto T, Shimojo N, Suehiro Y, Tokuyama K, Nambu M, Fujisawa T, Matsui T, Matsubara T, Mayumi M, Mochizuki H, Yamaguchi K, Yoshihara S. Japanese pediatric guideline for the treatment and management of bronchial asthma 2012. *Pediatr Int* 2014; 56: 441-450
- 9) Tsutsumi N, Kimura T, Arita K, Ariyoshi M, Ohnishi H, Yamamoto T, Zuo X, Kondo N, Shirakawa M, Tochio H, Kato Z. The structural basis for receptor recognition of human interleukin-18. *Nat. Commun* 2014; 5:5340 doi: 10.1038/ncomms6340
- 10) 近藤直実. 【小児の治療指針】免疫・アレルギー 症候群を伴うよく定義された症候群. 小児科診療増刊 2014; 77: 231-234
- 11) 近藤直実, 桑原愛美, 小玉ひとみ, 熊田ますみ, 近藤邦代, 長田登美子, 桶田小百合, 三品弘司, 岩崎淳子, 松野ゆかり, 古田弥生, 篠田晃子, 吉崎純夫, 田中千絵, 秋田明子, 田口幸太郎, 平野喜美子. IgG サブクラス欠損症. 呼吸 2014; 33: 486-494
- 12) Kubota K, Ohnishi H, Teramoto T, Matsui E, Murase K, Kanoh H, Kato Z, Kaneko H, Seishima M, Kondo N: In vitro analysis of the functional effects of an NLRP3 G809S variant with the co-existence of MEFV haplotype variants in atypical autoinflammatory syndrome. *J Clin Immunol* 2013; 33: 325-334
- 13) 近藤直実. IgE 抗体産生のメカニズム : 遺伝素因と環境の影響 (特集 アレルギー疾患における特異抗体の意義) -- (免疫学的側面). アレルギー・免疫 2013; 20: 14-23
- 14) 近藤直実. アレルギー疾患に対する免疫療法の基礎的背景 (特集 アレルギー疾患に対する免疫療法の効果と展望). 臨床免疫・アレルギー科 2013; 60: 161-168
- 15) Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kawamoto N, Kimura T, Kubota K, Yamamoto T, Funasaka T, Nakano H,

- Wong RW, Shirakawa M, Kondo N. TRAM is involved in IL-18 signaling and functions as a sorting adaptor for MyD88. *PLoS One* 2012; 7:e38423
- 16) Nada M, Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kimura T, Kubota K, Yamamoto T, Kamatari YO, Tsutsumi N, Shirakawa M, Kondo N. Molecular analysis of the binding mode of Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain proteins during TLR2 signaling. *Mol Immunol* 2012; 52:108-116
- 17) Kawamoto N, Fukao T, Kaneko H, Hirayama K, Sakurai S, Arai T, Kondo M, Kawamoto M, Matsui E, Teramoto T, Kasahara K, Bai C, Zhang G, Omoya K, Matsukuma E, Morimoto M, Suzuki H, Aoki Y, Kimura T, Nada M, Morita H, Tokumi T, Takemura M, Seishima M, Shiraki M, Iwasa S, Kondo N: Risk factors for infantile atopic dermatitis and recurrent wheezing. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2012; 22: 116-125
- 18) Ohnishi H, Teramoto T, Iwata H, Kato Z, Kimura T, Kubota K, Nishikomori R, Kaneko H, Seishima M, Kondo N: Characterization of NLRP3 variants in Japanese cryopyrin-associated periodic syndrome patients. *J Clin Immunol* 2012; 32:221-229
- 19) Morita H, Kaneko H, Ohnishi H, Kato Z, Kubota K, Yamamoto T, Matsui E, Teramoto T, Fukao T, Kasahara K, Kondo N: Structural property of soybean protein P34 and specific IgE response to recombinant P34 in patients with soybean allergy. *Int J Mol Med* 2012; 29:153-158
- 2.学会発表
- 1) 松井永子, 川本典生, 鹿野博明, 篠田紳司, 浅野 勉, 後藤加寿美, 金子英雄, 福富 悅, 木全かおり, 深尾敏幸, 近藤直実: 小児気管支喘息を対象とした Th2 サイトカイン阻害薬の追加投与前後のパラメーターの比較に関する研究. 日本小児アレルギー学会(第 51 回) (2014 年 11 月 8 日, 四日市)
- 2) 木村 豪, 堤 尚孝, 有田恭平, 有吉眞理子, 大西秀典, 白川昌宏, 近藤直実, 栎尾豪人, 加藤善一郎: アレルギー、自己免疫、自己炎症疾患治療薬に向けた IL-18 受容体高次複合体の構造解析. 日本小児アレルギー学会(第 51 回) (2014 年 11 月 9 日, 四日市)
- 3) 桑原愛美, 堀信宏, 近藤直実: 気管支喘息のテーラーメイド的予知と予防 Personalized prediction and prevention for bronchial asthma. 国際個別化医療学会学術集会(第 19 回) (2014 年 11 月 15 日, 東京)
- 4) 松井永子: S1-4. アレルギー発症のテーラーメイド予知予防. 日本アレルギー学会春季臨床大会(第 25 回)(2013 年 5 月 11 日～12 日, 横浜)
- 5) 近藤直実: SS7-2. 小児喘息の治癒を目指した新たな戦略—根治療法と対症療法の両輪療法. 日本アレルギー学会春季臨床大会(第 25 回)(2013 年 5 月 11 日～12 日, 横浜)
- 6) 松井永子: ES2-1. 発症予防の遺伝子ターゲット. 日本アレルギー学会春季臨床大会(第 25 回)(2013 年 5 月 11 日～12 日, 横浜)
- 7) 近藤直実: 喘息・アレルギーのテーラーメイド医療. 日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会(第 30 回)(2013 年 6 月 8 日～9 日, つくば市)
- 8) 近藤直実: アレルギー診療の連携 臨床各分野間の相互理解と現状 小児喘息から成人喘息治療への移行. 日本アレルギー学会春季臨床大会(第 24 回) (2012 年 5 月 12 日～13 日, 大阪)
- 9) 松井永子, 木全かおり, 篠田紳司, 金子英雄, 加藤善一郎, 近藤直実: 気管支喘息のテーラーメイド的予知および予防指

- 導の試み. 日本アレルギー学会春季臨床大会 (第 24 回) (2012 年 5 月 12 日～13 日, 大阪)
- 10) 川本典生, 深尾敏幸, 金子英雄, 川本美奈子, 松井永子, 平山耕一郎, 岩砂眞一, 近藤直実 : 脘帶血を用いた出生コホート研究 3 歳のアレルギー性鼻炎の発症に関わる因子の検討. 日本アレルギー学会春季臨床大会 (第 24 回) (2012 年 5 月 12 日～13 日, 大阪)
- 11) 近藤直実 : 小児気管支喘息の寛解と治癒を獲得するために 新たな戦略. 日本小児アレルギー学会 (第 49 回) (2012 年 9 月 15 日～16 日, 大阪)
- 12) 川本典生, 山本崇裕, 大西秀典、大塚博樹, 寺本貴英, 森本将敬, 伊藤裕子、後藤加寿美, 畠井新治, 久保田一生, 加藤善一郎, 近藤直実 : 末梢血のサイトカインプロファイルから見た高 IgE 症例のスクリーニングについての検討. 日本小児アレルギー学会 (第 49 回) (2012 年 9 月 15 日～16 日, 大阪)
- 13) Norio Kawamoto, Hidenori Ohnishi, Naomi Kondo and Jack Strominger. The Role of Myeloid Cells in the Generation of Regulatory T cells Induced by Amino Acid Copolymers. Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respirology & Immunology (2012 年 10 月 19 日～21 日, 台湾)
- 14) Hidenori Ohnishi, Naotaka Tsutsumi, Takahiro Yamamoto, Hidehito Tochio, Zenichiro Kato, Kazuo Kubota, Masahiro Shirakawa and Naomi Kondo. The Functional Assessments of Mutational Effect of Human IRAK4 and MyD88 Gene Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respirology & Immunology 2012 (2012 年 10 月 19 日～21 日, 台湾)

- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

**厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業
（免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野））
総合分担研究報告書**

日本における小児期発症気管支喘息のフェノタイプに関する研究

研究分担者	下条 直樹	千葉大学大学院医学研究院小児病態学教授
研究協力者	井上 祐三郎	千葉大学大学院医学研究院小児病態学 助教
	佐藤 泰憲	千葉大学医学部附属病院臨床試験部 講師
	木村 博一	国立感染症研究所・ウイルス学・生体防御学 室長
	山出 史也、山本 健	千葉大学医学部附属病院小児科
	星岡 明、富板 美奈子、山出 晶子、秋葉 靖、三角 祥子	千葉県こども病院アレルギー・膠原病科
	渡邊 博子、佐藤 一樹、鈴木 修一	国立病院機構下志津病院小児科
	有馬 孝恭、千葉 浩輝	君津中央病院小児科
	中野 泰至東	千葉メディカルセンター小児科

研究要旨

小児期発症気管支喘息をクラスター分析により分類し、新たなフェノタイプを明らかにすることを目的として検討を行った。

呼吸機能低下と関連するフェノタイプの検討では、発症年齢、末梢血好酸球数、ヤケヒヨウヒダニ特異的 IgE、コナヒヨウヒダニ特異的 IgE 値、スギ特異的 IgE 値を変数として、Ward 法によるクラスター解析を行った。年少発症で複数の吸入アレルゲンに対する特異的 IgE が低値であるクラスターでは、%1 秒量が低かった。

好酸球性気道炎症に関連するフェノタイプの検討では、6 才以上の小児期発症気管支喘息患者 67 名において、年令、性別、家族歴、肥満の有無、ペットの飼育歴、他のアレルギー疾患の合併、末梢血好酸球数、血清総 IgE、15 項目の吸入抗原特異的 IgE、呼吸機能、呼気 NO 濃度、治療ステップ、治療コントロール状態などおよそ 60 項目を同時期に調査し、Ward 法によるクラスター解析により 2 つのクラスターを同定した。クラスター間で治療コントロール状態と呼吸機能に違いを認めないにも関わらず、呼気 NO 濃度に違いを認めた。また、性別と血清総 IgE 値により 2 つのクラスターの判別が可能であることが示唆された。

3 つの小児気管支喘息特異的血清 microRNA(miR)を用いたクラスター解析では、小児気管支喘息患者は 4 個のクラスターに分類された。この中でも、血清 miR-144 と血清 miR-185 が高く、血清 miR-486 が低いクラスターは、末梢血好酸球数や血清総 IgE 値が低く、呼気 NO 濃度も低かった。miR 発現を含めたフェノタイプは、病態を反映した新たなエンドタイプである可能性があり、今後検討を進める必要があると考えられる。

A. 研究目的

近年、成人喘息においては、喘息の症状・重症度・悪化因子・薬剤に対する治療反応性・予後などに多様性があることが明らかとなっている。異なる表現型（フェノタイプ）の背景には、異なる病態がある可能性があり、そのような病態を反映したフェノタイプ（エン

ドタイプ）を明らかにしていくことで、より適切な治療介入が可能になると考えられている。一方、小児気管支喘息のフェノタイプやエンドタイプについての検討は少ない。

クラスター分析は、多変量解析の一つであり、多数の変数で評価したサンプルの関係を視覚化することが可能であり、従来の分類で

は分からぬ、より有意義な分類を発見できる可能性がある。そこでわれわれは、小児期発症気管支喘息患者を、臨床症状、所見、アレルギー検査、呼吸機能検査などの多数の因子によりクラスター解析し、新たなフェノタイプを明らかにすることを目的として検討を行った。

B. 研究方法

千葉大学医学部附属病院、千葉県こども病院、国立病院機構下志津病院の小児科外来に通院中の小児期発症気管支喘息患者を対象に以下の検討を行った。

1) 呼吸機能低下と関連するフェノタイプの同定

平成 24 年度は 141 名、平成 25 年度は 184 名の患者において、発症年齢、末梢血好酸球数、ヤケヒヨウヒダニ特異的 IgE、コナヒヨウヒダニ特異的 IgE 値、スギ特異的 IgE 値を変数として、Ward 法によるクラスター解析を行った。得られたクラスター間において、呼吸機能に差異を認めるか検討した。

2) 好酸球性気道炎症に関連するフェノタイプの同定

6 才以上の小児期発症気管支喘息患者 67 名（男性 46 名、女性 21 名、年令 6 才-21 才）を対象とし、年令、性別、家族歴、肥満の有無、ペットの飼育歴、他のアレルギー疾患の合併、末梢血好酸球数、血清総 IgE、15 項目 の吸入抗原特異的 IgE、呼吸機能、呼気 NO 濃度、治療ステップ、治療コントロール状態などおよそ 60 項目を同時期に調査し、Ward 法によるクラスター解析を行った。

また、分担研究者らがこれまで同定した 3 つの 小児気管支喘息特異的 血清 microRNA(miR)の発現を用いて、クラスター解析を行った。

（倫理面への配慮）

それぞれの検討は、ヘルシンキ宣言を遵守し、千葉大学の倫理委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

1) 呼吸機能低下と関連するフェノタイプの同定

平成 24 年度の検討では 6 つのクラスターが同定され、複数の吸入アレルゲンに対する特異的 IgE が高値であるクラスターは、他のクラスターと比較して、気管支喘息の重症度は低かった。また、年長発症で特異的 IgE が

低いクラスターでは、%1 秒量が低かった。

平成 25 年度の検討では、7 つのクラスターが同定され、年少発症で複数の吸入アレルゲンに対する特異的 IgE が低値であるクラスターでは、%1 秒量が低かった。

2) 好酸球性気道炎症に関連するフェノタイプの同定

平成 26 年度の検討では 2 つのクラスターが同定された。

クラスター 2 はクラスター 1 と比較して、有意に男児が多く、アトピー性皮膚炎の合併が多かった。家族歴では、父親の気管支喘息およびアトピー性皮膚炎が多かった。また、末梢血好酸球数が多く、血清総 IgE 値、吸入抗原特異的 IgE、呼気 NO 濃度が高かった。一方、クラスター間で年令、発症年令、肥満の有無、呼吸機能、治療ステップ、治療コントロール状態に差は認めなかった。クラスターは、性別と血清総 IgE 値により良好に判別可能であった。

3 つの小児気管支喘息特異的血清 miR を用いたクラスター解析では、小児気管支喘息患者は 4 個のクラスターに分類された。この中でも、血清 miR-144 と血清 miR-185 が高く、血清 miR-486 が低いクラスターは、末梢血好酸球数や血清総 IgE 値が低く、呼気 NO 濃度も低かった。

D. 考察

1) 呼吸機能低下と関連するフェノタイプの同定

多くの小児期発症気管支喘息の患者は、吸入抗原に対する特異的 IgE が陽性であり、アトピー型と判定されるが、特異的 IgE の多寡には多様性がある。本研究では、特異的 IgE が陽性ではあるが低く、閉塞性呼吸障害を認めるフェノタイプがあることが示唆された。

2) 好酸球性気道炎症に関連するフェノタイプの同定

治療コントロール状態と呼吸機能に違いを認めないにも関わらず、呼気 NO 濃度に違いを認めることから、好酸球性気道炎症の程度が異なるフェノタイプの存在が示唆された。

また、小児気管支喘息特異的血清 miR を用いたクラスター解析で明らかとなった、血清

miR-144 と血清 miR-185 が高く、血清 miR-486 が低いクラスターは、末梢血好酸球数や血清総 IgE 値が低く、呼気 NO 濃度も低いことから、軽症喘息のフェノタイプを呈すると考えられた。このような miR 発現を含めたフェノタイプは、病態を反映した新たなエンドタイプである可能性があり、今後検討を進める必要があると考えられる。

E. 結論

小児期発症気管支喘息には、アレルゲン感作パターン、性別と血清総 IgE、あるいは血清 miR 発現プロファイルにより判別され、呼吸機能低下や好酸球性気道炎症の多寡と関連するフェノタイプが存在する。これらのフェノタイプが、成人喘息への進展とどのように関連するか、今後の検討が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inoue Y, Shimojo N. Epidemiology of virus-induced wheezing/asthma in children. *Front Microbiol* 2013; 4:391
- 2) 井上祐三朗. 小児科－乳幼児反復性喘鳴（乳児喘息）へのエンドタイプを用いた早期介入 [Pro/Pro]. *日本医事新報* 2015; 4737

2. 学会発表

- 1) 井上祐三朗、山本健、山出史也、有馬孝恭、鈴木洋一、下条直樹、河野陽一. 小児期発症気管支喘息のクラスター解析によるフェノタイプ調査. 第 63 回日本アレルギ

一学会秋季学術大会. 2013: 東京

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

**厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業
（免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野））
総合分担研究報告書**

**気管支喘息における気道炎症指標を含めた重症度別クラスター解析
-多施設共同研究の結果から-**

長瀬洋之^{1,2}、釣木澤尚実^{1,3}、岩永賢司^{1,4}、田中明彦^{1,5}、谷田貝洋平^{1,6}、斎藤純平^{1,7}、鈴川真穂^{1,8}、東元一晃^{1,9}、井上博雅^{1,9}、棟方 充^{1,7}、檜澤伸之^{1,6}、相良博典^{1,5}、東田有智^{1,4}、秋山一男^{1,3}、出原賢治¹⁰、中村裕之^{1,11}、大田 健^{1,8}

厚生労働科学研究 喘息死の予防や自己管理手法の普及に関する研究班¹、帝京大学医学部附属病院²、国立病院機構相模原病院³、近畿大学医学部附属病院⁴、昭和大学病院⁵、筑波大学医学部附属病院⁶、福島県立医科大学病院⁷、国立病院機構東京病院⁸、鹿児島大学医学部附属病院⁹、佐賀大学 分子生命科学¹⁰、金沢大学大学院医学研究科社会医学系¹¹

要 旨

【目 的】 いまだに約 1,500 人/年の喘息死が発生しており、喘息死に到りうる重症化の背景因子を同定し、対策を講じる必要がある。本研究は、クラスター解析を用いて重症喘息の背景因子を検討し、今後の管理指針を考察した。

【方 法】 吸入ステロイド薬 (ICS)を 1 年以上使用し、喘息専門施設受診中の 645 例を対象に、呼吸機能、治療内容、コントロール状態、呼気一酸化窒素濃度や血清ペリオストインを含む気道炎症指標等の、40 指標を収集した。相互に相関の少ない 28 指標を選択し、Ward 法を用いてクラスター解析を行った。軽症群 (Low 群: n=134)と、中等症・重症群 (High 群: n=511)の 2 群にわけて解析した。

【結 果】 Low 群は 3 クラスターに分類されたが、クラスター間で背景因子の差が乏しかった。High 群は 5 クラスターに分類された。ICS 量が多いが ACT スコアが低い、コントロール不良クラスターが 2 つ存在した。High 群の 41.4%を占めるクラスター 2 は、最も増悪が多く、中等度の 2 型炎症を有していた。クラスター 5 は、次いで増悪が多く、2 型炎症が最も強かつたが、重症群の 2.9%を占める小クラスターであった。

【結 論】 重症群の 4 割を占め、最も入院率が高いクラスター 2 への適切な対応が今後の喘息死や医療経済負荷を低減する上で重要である。本クラスターは、2 型炎症を標的とした分子標的薬の恩恵をうける背景を有しているが、高価であるために患者が使用を躊躇する場面が多い。社会的支援を含めた今後の対策も必要である。

A. 研究目的・背景

喘息死は減少傾向にあるが、いまだに約1,500人/年の喘息死が発生している。さらに、種々の疫学調査からは、喘息コントロールが良好である患者は半数に満たないことも明らかになっている。

最近の喘息診療の進歩として、既に保険適応となっている呼気一酸化窒素濃度(FeNO)を含めたバイオマーカーの確立があげられる。そして、バイオマーカー研究により、重症喘息患者の気道炎症には多様性があることも明らかとなっており、病態のタイプに応じた層別化医療が、さらなる管理の向上につながる可能性が示唆されている。

本研究の目的は、気管支喘息の難治化・重症化因子を同定することを通じて、喘息死減少に寄与することである。近年、臨床表現型(フェノタイプ)をバイアス無く分類可能なクラスター解析が、喘息研究にも応用されており、欧米やわが国の数グループからの報告がある。本研究班では、クラスター解析を用いて喘息のフェノタイプ分類を行い、背景の重症化・難治化因子を同定し、コントロール改善のための対策を考察することを目的とした。

また、気道炎症指標は、吸入ステロイド薬(ICS)の影響を大きく受けるが、既報のクラスター解析では、ICS使用の有無が混在している解析が大多数であった。そこで、本研究では、実臨床への寄与を考慮し、対象をICS使用例に限定して検討した。

B. 研究方法

本研究計画(UMIN000013697)は、国立病院機構東京病院倫理委員会にて承認され

(第130024号)、次いで各研究施設で承認された。

【対象】

当研究班を構成する成人喘息診療施設に通院中で、ICSを1年以上使用している外来患者645例を対象とした。診療施設は、帝京大学医学部附属病院(n=243)、国立病院機構相模原病院(n=154)、近畿大学医学部附属病院(n=79)、昭和大学病院(n=72)、筑波大学医学部附属病院(n=65)、福島県立医科大学病院(n=19)、国立病院機構東京病院(n=15)、鹿児島大学医学部附属病院(n=7)、の8施設であった。

【評価指標】

Index dateを2010年3月から2014年4月の間に設定し、index dateにおける患者背景、併存症、治療、呼吸機能、気道炎症指標について、40指標の情報を収集した。Index dateは、定期的に設定して臨床情報を収集した。予定外受診、救急受診、全身ステロイド屯用、入院については、index date前1年間の情報を収集した。

収集した指標から、Pearson相関係数をもとに、相関の強い指標が重複しないように28指標を選択してクラスター解析を行った。クラスター解析に用いた指標に下線をつけて下に示す。

- 患者背景: 年齢, 性別, BMI, 喫煙歴, 発症経過, 発症年齢, 罹患年数, 家族歴, ペット飼育歴, 病型(アトピー/非アトピー)
- 併存症: GERD(F scale問診票(FSSG)), アレルギー性鼻炎(SACRA問診票), 副鼻腔炎, COPD, アスピリン過敏症, 精神疾患
- 治療: 治療ステップ, ICS量, LABA・LTRA・テオフィリン・抗IgE抗体・経口ステロイド使用

- ・ 喘息コントロール: ACT (喘息コントロールテスト)スコア, 治療下重症度, 予定外, 救急受診, 全身ステロイド屯用, 入院
- ・ 呼吸機能: スピロメトリー (FEV1/FVC, %FEV1), 強制オシレーション (R5, X5, Mostgraph or Masterscreen IOS)
- ・ 気道炎症: FeNO, 末梢血好酸球数・比率, 血清ペリオスチン, 血清TGF- β
- ・ アトピー素因: 血清総IgE, HD・ヤケヒヨウヒダニ・スギ特異的IgE (クラス)

【測定】

ELISA法にて、血清ペリオスチン(シノテスト)と血清TGF- β (R&D)を測定した。FeNOは複数の測定機器と方法が用いられていたため(NIOX MINO(Chest), 280i NOA(Sievers, オンライン法とオフライン法))、以下の換算式でNIOX MINOの測定値に換算した。

$$\text{FeNO (NIOX)} = 0.848 \times \text{FeNO (Sievers offline)}$$

$$\text{FeNO (NIOX)} = (1.034 \times \text{FeNO (Sievers online)} - 2.621) / 1.278$$

強制オシレーション法は、2種の測定機器が用いられたため(Mostgraph-01(Chest), Masterscreen IOS(Fukuda))、3段階にスコア化して解析した。

【解 析】

治療下の重症度が、軽症間欠型・持続型(Low群(n=134: 軽症間欠型(n=30)+軽症持続型(n=104))と、中等症・重症持続型(High群(n=511: 中等症持続型(n=225)+重症持続型(n=286)))の2群にわけて解析した。クラスター解析は、金沢大学にてSPSSを用いてWard法で解析した。

C. 研究結果

【患者背景】

各指標の平均値を記載する。

- 1) 年齢 58.1 才、男性/女性: 62/38%、喫煙歴(Never/ Ex/ Current): 59.7/ 34.7/ 5.6%、アトピー型/非アトピー型: 55.1/ 44.9%、BMI: 23.5。
- 2) 発症様態(小児発症持続/ 小児発症再燃/ 成人発症): 11.3/ 11.7/ 77.0%、罹患年数: 18.2年。
- 3) 併存症: アレルギー性鼻炎 448例(68.2%)、胃食道逆流症 228例(34.7%)、副鼻腔炎 213例(32.4%)、アスピリン過敏症 49例(7.5%)、COPD 41例(6.2%)、精神疾患 43例(6.5%)、睡眠時無呼吸 11例(1.7%)。
- 4) 治療: 治療ステップ(1/ 2/ 3/ 4): 5.3/ 22.0/ 44.0/ 28.7%、ICS用量(フルチカゾン相当): 552 $\mu\text{g}/\text{日}$ 。
- 5) コントロール状態: FEV₁/FVC: 72.3%、%FEV₁: 89.4%、ACT 22.0点、ACT 20点未満/ 20~24点/ 25点: 18.8/ 46.3/ 34.9%。治療下での重症度: 軽症間欠型/ 軽症持続型/ 中等症持続型/ 重症持続型: 5.4/ 16.4/ 36.0/ 42.3%。
- 6) 炎症指標: FeNO: 33.4 ppb、総IgE値: 491.2 IU/ml、血清ペリオスチン: 100.3 pg/ml、TGF- β : 39.0 ng/ml、末梢血好酸球比率: 4.56%、末梢血好酸球数: 290.1/ μl 。

【クラスター解析】

Low群は3クラスターに、High群は5クラスターに分類されたが、クラスター3はn=3であったため、表示していない(図1、表1)。

まず患者背景については(表1)、Low群では、年齢とアトピー型、副鼻腔炎合併、

血清総 IgE、テオフィリン使用を除き、クラスター間で患者背景についての差異が少なかった。一方、High 群では、性別、喫煙歴、罹患年数、アトピー型、鼻炎合併、アスピリン過敏症合併、アトピー素因、治療内容に有意差が認められた。クラスター2 は ICS 量が最多で、経口ステロイド連用率、高 IgE 抗体使用率が最も高かった。

次に、喘息コントロール状態については(表 2)、Low 群ではクラスター間で有意差を認めず、一定のコントロールは保たれていた。一方、High 群では、クラスター2 (ACT 20.8)とクラスター5 (ACT 19.7)のコントロールが不良であった。クラスター2 では予定外・救急受診、入院、全身ステロイド屯用のいずれも最多であった。クラスター5 もそれに次いで全身ステロイド屯用が多かった。

呼吸機能については(表 2)、High 群で Low 群より%FEV₁ が低い傾向にあったが、いずれの群でもクラスター間に有意差は認めなかった。

気道炎症指標については(図 1、表 2)、High 群、Low 群ともにクラスター間で有意な差を認めた。High 群では、クラスター5 は FeNO、末梢血好酸球数、血清ペリオストチンが最も高く、2 型炎症が最も優勢であった。一方、もうひとつのコントロール不良であるクラスター2 では、2 型炎症は中等度であった。Low 群ではクラスター3 で、2 型炎症が最も優勢であった。

High 群のクラスター2 とクラスター5 の特徴を表 3 に示す。クラスター2 は 212 人からなる大きなクラスターで、中等度の 2 型炎症を有し、女性・成人発症優位のクラスターである。経口ステロイド連用率と屯

用率や入院率が最も高い。クラスター5 は高度の 2 型炎症を有し、少数が属するクラスターで、若年発症、男性優位、鼻炎合併が多いが、経口ステロイド使用は少なく、入院は認めなかった。

最後に、血清総 IgE と末梢血好酸球数の各クラスターにおける特徴をプロットし、図 2 に示す。多くのクラスターは IgE と好酸球数に正の相関が認められるが、Low 群のクラスター2 やクラスター3 では、これらの乖離がみられた。クラスター3 は副鼻腔炎合併が多く、好酸球数のみが高値であり、クラスター2 は鼻炎合併が少なく、IgE のみが高値であったが、いずれも喘息コントロールは保たれていた。

D. 考察

本研究の特徴として、専門施設の多施設共同研究であり、症例数が多く、質の高いデータが集積され、全例で FeNO、血清ペリオストチン等の気道炎症マーカーを測定したことがあげられる。また、重症持続型症例を 42.3% 含んでおり、難治化対策を目指す本研究班の目的に合致した検討が可能な母集団であった。

クラスター解析では、Low 群のコントロールは概ね良好であり、臨床背景のクラスター間での差異は少ない一方、炎症背景には個性が認められ、2 型炎症指標がいずれも低～中等度のクラスター1、IgE 優位のクラスター2、好酸球優位のクラスター3 が同定された。炎症背景に個性は認められるものの、低用量の ICS で、分子標的薬の使用なくコントロールが保たれていた。

一方 High 群では、臨床背景と炎症背景の双方について、クラスター間で差異を認

めた。クラスター1とクラスター4は、一定の増悪を認めるものの、 $400\text{ - }600\mu\text{g}$ のICSでACTは22点台に保たれ、2型炎症も中等度であり、クラスター1ではIgEが低値であった。これらのクラスターは、完全にはコントロールされていないが、従来治療で管理可能な範疇と推察された。一方、クラスター2は212人からなる大きなクラスターで、中等度の2型炎症を有し、経口ステロイド連用率と屯用率や入院率が高かつた。末梢血好酸球数は $355/\mu\text{l}$ 、血清総IgEは342IU/mlであり、IgEおよび好酸球を標的とした分子標的薬の適応範囲に入る症例も多いことが推察される。今後至適な分子標的薬の使用で、コントロールが改善しうる可能性が想定された。クラスター5は最も高度の2型炎症を有し、15人という少數が属するクラスターであるが、クラスター2と比較して、経口ステロイド使用は少なく、入院は認めなかった。オマリズマブが使用されていない理由として、血清IgE値が高値であるため、適応範囲外であった可能性が想定される。本検討時は好酸球性炎症を標的としたメポリズマブやベンラリズマブの保険収載前であり、クラスター5においても、新規分子標的薬によってコントロールが改善することが期待される。

E. 結論

重症群の41.4%を占め、入院率が最も高いクラスター2への適切な対応が今後の喘息死や医療経済負荷を低減する上で重要であることが示唆された。中等度の2型炎症を有する本クラスターは、現在使用できるオマリズマブ、メポリズマブ、ベンラリズマブに加えて、将来臨床適応が近いと想定

されている、IL-4受容体α抗体であるデュピルマブ、TSLP抗体であるテゼペルマブにより、コントロールが改善する可能性が高い。今後の課題は、高価であるこれらの分子標的薬を、いかに適切に臨床現場で用いていくかにある。高価であるために患者が使用を躊躇する場面が多いため、真に喘息死のリスクが高く、生産年齢にも関わらず社会活動を営めない症例に対しては、社会的支援の充実も必要と考える。

図1. クラスター別のコントロール状態と炎症背景

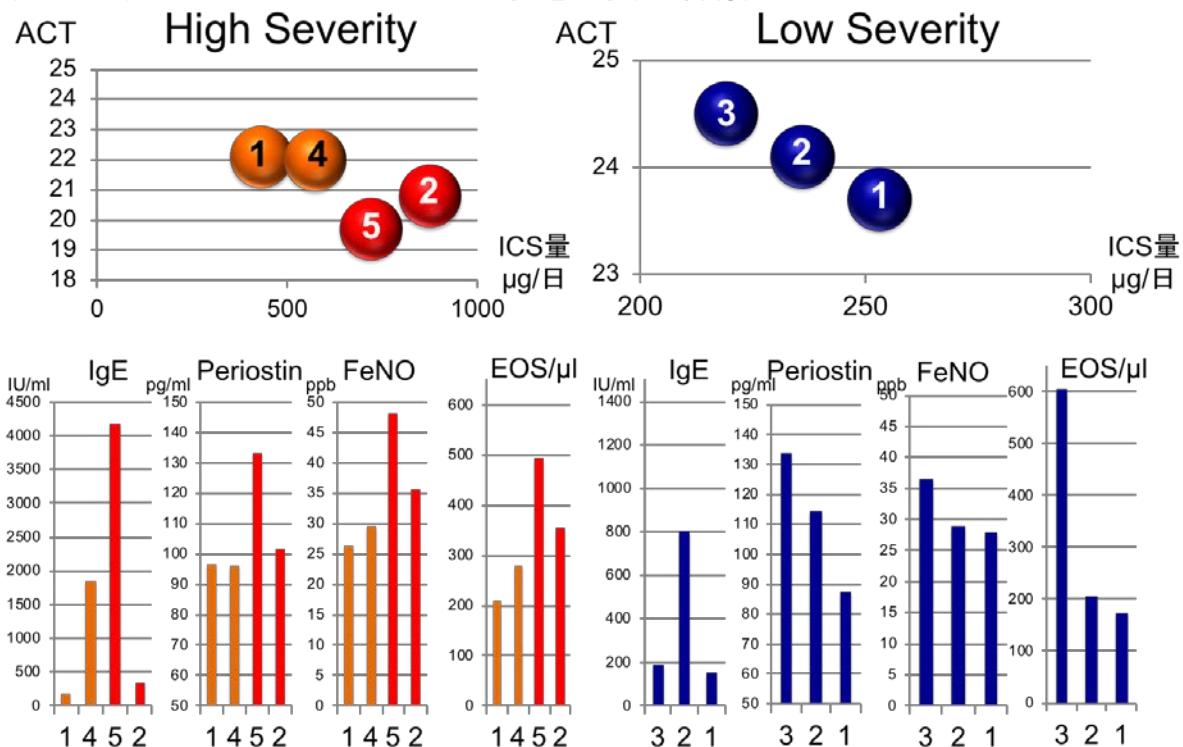
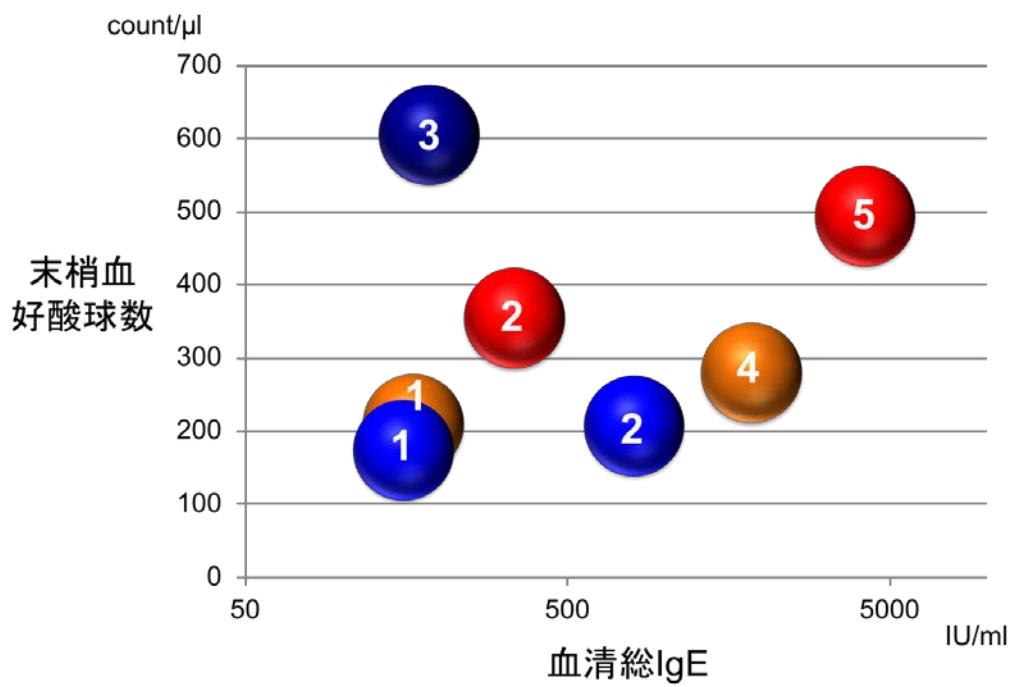


図2. クラスター別の炎症背景の特徴



	クラスター	High Severity					Low Severity				
		1	2	4	5	合計	1	2	3	合計	
	症例数	251	212	33	15	511	88	14	32	134	
患者背景	年齢	58.6	58.5	56.2	54.3	58.3	56.9	55.5	63.3	58.3	
	性別 (女性)	61.4%	64.6%	57.6%	40.0%	61.5%	67.0%	50.0%	62.5%	64.2%	
	BMI	23.4	23.9	23.3	22.2	23.6	23.5	23.7	22.7	23.3	
	Never	59.4%	59.0%	36.4%	66.7%	57.8%	65.9%	64.3%	65.6%	65.7%	
	Current	8.0%	2.8%	15.2%	13.3%	6.6%	2.3%	0.0%	0.0%	1.5%	
	Ex Smoker	32.7%	38.2%	48.5%	20.0%	35.6%	31.8%	35.7%	34.4%	32.8%	
	喫煙指數	189	196	289	151	198	136	86	178	141	
	小児発症持続	9.2%	11.8%	12.1%	20.0%	10.9%	10.2%	21.4%	6.3%	10.4%	
	小児発症再燃	11.2%	12.7%	9.1%	26.7%	12.1%	11.4%	7.1%	3.1%	9.0%	
	成人発症	79.7%	75.5%	78.8%	53.3%	77.0%	78.4%	71.4%	90.6%	80.6%	
	発症年齢	41.5	37.2	41.8	35.2	39.6	40.4	35.8	47.3	41.6	
	罹患年数	16.8	21.1	14.3	19.1	18.4	16.6	19.8	16.1	16.8	
	喘息家族歴 (両親)	19.1%	22.6%	9.1%	13.3%	19.8%	19.3%	21.4%	28.1%	21.6%	
	イヌ飼育	17.9%	12.7%	18.2%	26.7%	16.0%	12.5%	21.4%	21.9%	15.7%	
併存症	イヌ飼育	9.6%	10.8%	21.2%	13.3%	10.9%	9.1%	21.4%	15.6%	11.9%	
	アトピー型	68.9%	73.6%	90.9%	100.0%	73.2%	81.8%	85.7%	62.5%	77.6%	
	GERD	37.8%	36.3%	18.2%	33.3%	35.6%	31.8%	14.3%	34.4%	30.6%	
	鼻炎	64.5%	69.8%	72.7%	93.3%	67.9%	71.6%	50.0%	68.8%	68.7%	
	副鼻腔炎	31.1%	36.3%	18.2%	40.0%	32.5%	25.0%	28.6%	59.4%	33.6%	
	COPD	7.6%	4.7%	12.1%	0.0%	6.6%	3.4%	14.3%	6.3%	5.2%	
アトピー素因	アスピリン過敏症	4.8%	9.9%	9.1%	0.0%	7.2%	8.0%	14.3%	9.4%	9.0%	
	精神疾患	6.4%	6.6%	9.1%	0.0%	6.4%	4.5%	14.3%	3.1%	5.2%	
	血清総IgE (IU/ml)	166	342	1855	4174	519	155	804	186	230	
	HD IgE (クラス)	1.04	1.27	2.7	4.6	1.36	1.41	1.93	1.09	1.39	
治療	ヤケヒヨウヒダニ IgE (クラス)	1.08	1.37	3	4.67	1.45	1.51	2	1.31	1.51	
	スギ IgE (クラス)	1.7	1.78	2.73	3.33	1.85	2.09	2.36	1.5	1.98	
	治療ステップ	2.93	3.75	3.24	3.4	3.3	1.76	1.64	1.72	1.74	
	ICS (FP換算 μg)	431	875	573	720	632	253	236	219	243	
	LABA	81.7%	87.7%	81.8%	100.0%	84.8%	36.4%	28.6%	50.0%	38.8%	
テオフィリン	LTRA	60.2%	75.5%	63.6%	66.7%	67.1%	17.0%	7.1%	12.5%	14.9%	
	抗IgE抗体	27.9%	55.2%	24.2%	33.3%	39.3%	4.5%	7.1%	18.8%	8.2%	
	経口ステロイド	1.2%	8.5%	0.0%	0.0%	4.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
		4.0%	12.3%	6.1%	6.7%	7.6%	1.1%	0.0%	0.0%	0.7%	

表1. クラスター別の患者背景
群間で有意差を認める指標はマークを記載し、
最高値は橙色で、最低値は薄緑で記載した。

	クラスター	High Severity					Low Severity				
		1	2	4	5	合計	1	2	3	合計	
	症例数	251	212	33	15	511	88	14	32	134	
コントロール状態	ACT	22.1	20.8	22	19.7	21.5	23.7	24.1	24.5	24	
	予定外受診(>2回/年)	4.8%	16.5%	3.0%	0.0%	9.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
	救急外来受診	5.2%	10.8%	0.0%	0.0%	7.0%	1.1%	7.1%	3.1%	2.2%	
	全身ステロイド屯用(>2回/年)	11.6%	30.2%	9.1%	13.3%	19.1%	2.3%	7.1%	0.0%	2.2%	
	入院(>1回/年)	2.8%	9.0%	0.0%	0.0%	5.1%	1.1%	0.0%	0.0%	0.7%	
呼吸機能	FEV1/FVC (%)	71.7	72.9	71.2	67.5	72	73.9	71.7	68.6	72.4	
	%FEV1	89.3	88.5	87	80.7	88.5	92.7	87.2	92.7	92.1	
	R5(スコア)	2.07	1.94	1.79	1.8	1.99	2.08	2.5	2	2.1	
	R5-R20(スコア)	2.03	1.94	1.79	2.07	1.98	2.02	2.36	2.13	2.08	
気道炎症	X5(スコア)	1.92	2.11	2.03	2.27	2.02	1.89	1.79	1.84	1.87	
	FeNO(ppb)	26.4	35.6	29.6	48	31.2	28	28.8	36.5	30.1	
	末梢血好酸球比率(%)	3.6	5.5	4.6	7	4.6	3.1	3.8	8.4	4.4	
	末梢血好酸球数(/μl)	210	355	280	494	283	174	207	605	280	
	血清ペリオストチン(pg/ml)	96.4	101.5	98.2	133.4	99.8	87.6	114.4	133.9	101.5	
	血清TGFβ(pg/ml)	38.8	39.4	38.7	46.2	39.2	37.4	38.7	38.7	37.8	

表2. クラスター別のコントロール状態と気道炎症
群間で有意差を認める指標はマーカーを記載し、最高値は橙色で、最低値は薄緑で記載した。

	クラスター	2		5	
		症例数	212	症例数	15
コントロール	ACT	20.8		19.7	
	全身ステロイド屯用(>2回/年)	30.2%		13.3%	
	入院(>1回/年)	9.0%		0.0%	
患者背景	年齢	58.5		54.3	
	性別(女性)	64.6%		40.0%	
	BMI	23.9		22.2	
	Never Smoker	59.0%		66.7%	
	成人発症	75.5%		53.3%	
	罹患年数	21.1		19.1	
併存症	アトピー型喘息	73.6%		100.0%	
	鼻炎	69.8%		93.3%	
治療	副鼻腔炎	36.3%		40.0%	
	ICS(FP換算μg/日)	875		720	
	抗IgE抗体	8.5%		0.0%	
呼吸機能	経口ステロイド連用	12.3%		6.7%	
	%FEV1	88.5		80.7	
気道炎症	末梢血好酸球数(/μl)	355		494	
	FeNO(ppb)	35.6		48	

表3. High群のクラスター2とクラスター5の比較
群間で有意差を認める指標はマーカーを記載した。

**厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業
(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野)))**
総合分担研究報告書

**日本における小児期発症気管支喘息のフェノタイプに関する研究
(黄色ブドウ球菌エンテロトキシン特異的 IgE 抗体と喘息との関係)**

研究分担者	田中 明彦	昭和大学医学部内科学講座呼吸器アレルギー内科部門	講師
研究協力者	相良 博典	昭和大学医学部内科学講座呼吸器アレルギー内科部門	教授
	大田 進	昭和大学医学部内科学講座呼吸器アレルギー内科部門	助教

研究要旨

過去に我々は、平成 21～23 年度厚生労働科学研究費補助金研究（大田班）にて、総 IgE 値が経年的に上昇する患者群では重症患者が多いことを後方視的試験によって証明した。本研究では、同結果を前方視的試験によって検証した（研究①）。その結果、総 IgE の変化値 (Δ IgE) は各喘息重症度間で差を認めなかった。同様に、観察期間中に急性増悪のあった群となかった群においても Δ IgE に差を認めなかった。以上より今回の前方視的試験では総 IgE 値の経時的变化と重症度には関連性が認められなかった。

諸外国から報告されている黄色ブドウ球菌エンテロトキシン特異的 IgE 抗体 (SE-IgE) に対する特異的 IgE と喘息コントロールとの関係について検討した（研究②）。その結果、SEA-IgE 陽性群の喘息コントロールは陰性群よりも喘息コントロールが悪いことが判明した。また、SEA-IgE 陽性群では呼気 NO が陰性群と比較し有意に高値を示していた。以上より、SEA-IgE は気道炎症を悪化させることにより喘息コントロールを悪化させる可能性が示唆された。

A. 研究目的

研究①：過去に我々は、平成 21～23 年度厚生労働科学研究費補助金研究（大田班）にて、総 IgE 値が過去 10 年間において経年的に上昇する患者群では重症患者が多いことを後方視的試験によって証明した（Respir Res. 2014 Nov 20; 15(1): 144）。そこで今回、我々は同結果を検証するために前方視的試験を行った。

研究②：黄色ブドウ球菌から産生されるエンテロトキシン (*Staphylococcus aureus* enterotoxin) に対する IgE 抗体 (SE-IgE) は、重症の喘息患者群において非重症喘息患者群より上昇していることが欧米から報告されている（J Allergy Clin Immunol. 2003; 111: 1131-2.）。しかし、本邦の喘息患者における SE-IgE と喘息病態に関する詳細な報告はない。そこで我々は、当院に通院加療中の喘息患者における、SE-IgE 陽性患者の患者背景を調査し、加えてそのサブタイプ

(SEA-IgE と SEB-IgE) と喘息コントロールレベルとの関連性について検討した。

B. 研究方法

そこで今回、我々は同結果を検証するために前方視的試験を行った。

研究①：昭和大学病院に定期的に通院中の喘息患者 141 名を対象とした。平均年齢は 58.3 ± 14.0 歳で、男性が 61 名 (43.02%) であった。対象患者を登録時に血液検査、呼吸機能検査などを実施し、3 年後に再度血液検査を行い経時的な IgE 値の変化 (Δ IgE) について検討を行った。

研究②：昭和大学病院に定期的に通院中の喘息患者 172 名から末梢血を採取し SEA-IgE と SEB-IgE を測定した。SEA-IgE および SEB-IgE ともにクラス 1 以上 (> 0.35 kU/L) を陽性とし、それぞれ陽性群と陰性群を比較検討した。喘息コントロールは過去 1 か月間の GINA のコントロール評価表に準じて評価

を行った。

研究①および②：有意差検定は JMP10 (SAS Institute Inc.) を用いて実施し、有意水準は 5%以下として評価した。

(倫理面への配慮)

臨床情報に関しては、個人を識別できる情報（氏名、住所、生年月日、電話番号など）を削除し独自記号を付しており、個人の特定は不能とした。

C. 研究結果

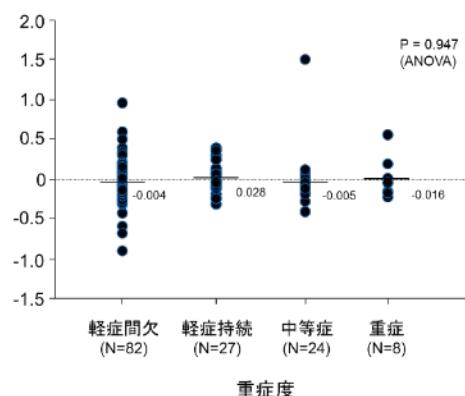
研究①：各種患者背景因子と重症度との関連性を表 1-1 に示す。(症状のみの) 重症度が軽症持続型以上を示した患者を重症としたところ、関連性を認めたものは性別（女性）であった。また、ペットも有意差は得られなかつたが高いオッズ比 (OR = 2.28) を示した。

表1-1. 患者背景因子と重症度（ロジスティック回帰分析）

	OR	95%CI	p value
年齢	0.98	0.95 to 1.01	0.318
BMI	1.06	0.95 to 1.18	0.301
性別(女性)	2.79	1.31 to 6.14	0.008
アレルギー性鼻炎	0.83	0.40 to 1.74	0.631
スギ花粉症	1.55	0.75 to 3.22	0.234
ペットあり	2.28	0.99 to 5.35	0.051
非アトピー型	1.11	0.49 to 2.46	0.805

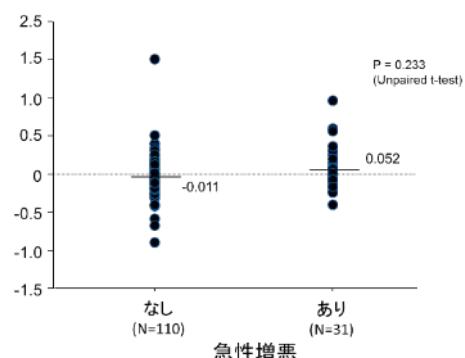
血清総 IgE 値を log 変換した値の 3 年間における変化値 ($\Delta \log \text{IgE}$) を (症状のみの) 重症度別に示す (図 1-1)。過去の我々の報告とは異なり、各群間に有意差は認められなかった。軽症間欠型と軽症持続型以上の 2 群に分けた場合、 $\Delta \log \text{IgE}$ は軽症間欠型が -0.004 で軽症持続型以上が 0.013 であったが、同様に有意差は得られなかった。

図1-1. 重症度別 $\Delta \log \text{IgE}$



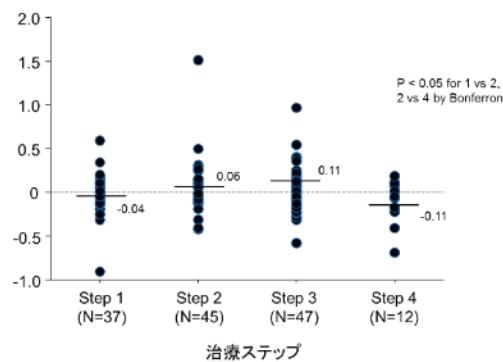
予約外の受診、救急センターの受診、全身性ステロイドの 3 日以上の連續投与を急性増悪と定義した場合、観察期間（3 年間）における急性増悪あり群の $\Delta \log \text{IgE}$ の平均値は 0.052 で、なし群の -0.011 と比較し高い傾向を示したが有意差は認めなかった (図 1-2)。

図 1-2. 急性増悪の有無と $\Delta \log \text{IgE}$ の関連性



治療ステップ別の $\Delta \log \text{IgE}$ を図 1-3 に示す。その結果、Step 1 と Step 4 で治療されている患者群では $\Delta \log \text{IgE} < 0$ を示したが、一方、Step 2 と Step 3 で治療されている患者群では $\Delta \log \text{IgE} > 0$ を示した。また、Step 1 と Step 2 の $\Delta \log \text{IgE}$ と、Step 2 と Step 4 の $\Delta \log \text{IgE}$ に関しては有意に Step 2 の $\Delta \log \text{IgE}$ が高値であった。

図 1-3. 治療ステップ別 $\Delta \log \text{IgE}$



研究②：対象患者 172 名中 28 名が SEA-IgE 陽性を示し、38 名が SEB-IgE 陽性を示した。それぞれ陽性群と陰性群を背景因子で比較すると、SEA-IgE 陽性群は平均年齢が若く、アトピー性皮膚炎・ペットを飼育している患者が多く、総 IgE 値も高値を示した（表 2-1）。一方、SEB-IgE 陽性群は性別で男性が多く、アトピー性皮膚炎を合併している患者が多く、総 IgE 値も高値を示した（表 2-2）。

表2-1. SEA-IgE陽性患者群と陰性患者群の背景因子

	SEA IgE 陽性 (n=28)	SEA IgE 陰性 (n=144)	p value
年齢 (歳), 平均±SD	49.5±2.8	57.5±1.2	0.01
男性, n (%)	15 (53.6)	57 (39.6)	n.s.
BMI, 平均±SD	23.4±0.6	22.7±0.3	n.s.
発症年齢 (y), 平均±SD	21.9±3.8	34.2±1.7	n.s.
罹患年数 (y), 平均±SD	27.2±3.2	23.2±1.4	n.s.
アレルギー性鼻炎, n (%)	14 (50.0)	68 (47.2)	n.s.
花粉症, n (%)	11 (39.2)	73 (50.7)	n.s.
アトピー性皮膚炎, n (%)	9 (32.1)	8 (5.6)	0.033
喫煙, curr / ex / never (%)	14.3 / 32.1 / 53.6	5.5 / 26.4 / 68.1	n.s.
Pet飼育 (%)	12 (42.7)	35 (24.7)	0.043
総 IgE	3538.4±405.1	3484.4±178.6	<0.001
好酸球比率	6.4±0.8	5.4±0.3	n.s.

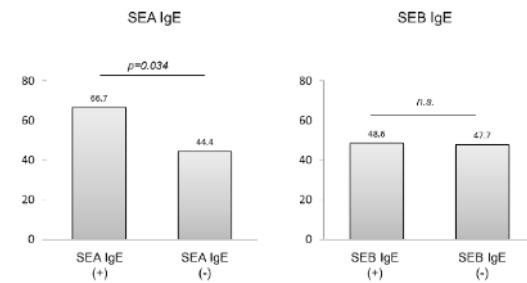
表2-2. SEB-IgE陽性患者群と陰性患者群の背景因子

	SEB IgE 陽性 (n=38)	SEB IgE 陰性 (n=134)	p value
年齢 (歳), 平均±SD	56.3±2.5	56.2±1.3	n.s.
男性, n (%)	22 (57.9)	50 (37.3)	0.023
BMI, 平均±SD	23.3±0.6	22.8±0.3	n.s.
発症年齢 (y), 平均±SD	28.4±3.3	33.3±1.8	n.s.
罹患年数 (y), 平均±SD	27.6±2.7	22.9±1.4	n.s.
アレルギー性鼻炎, n (%)	21 (55.3)	61 (45.5)	n.s.
花粉症, n (%)	15 (39.5)	69 (51.5)	n.s.
アトピー性皮膚炎, n (%)	8 (21.1)	9 (6.7)	0.009
喫煙, curr / ex / never (%)	10.5 / 34.2 / 55.2	5.9 / 25.3 / 68.7	n.s.
Pet飼育 (%)	15 (39.4)	32 (23.9)	n.s.
総 IgE	2670.2±365.1	3566.4±194.4	<0.001
好酸球比率	5.5±0.7	5.6±0.4	n.s.

喘息コントロールレベルを比較すると、SEA-IgE 陽性患者群では陰性群と比較して

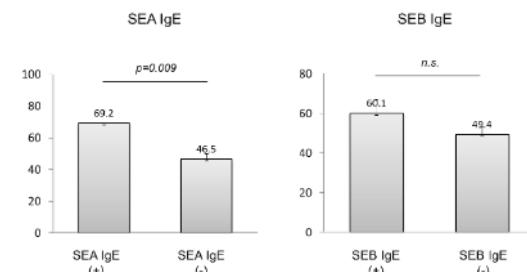
喘息コントロール不十分および不良の患者が多かったが、SEB-IgE に関しては陽性群と陰性群とで有意な差を認めなかった（図 2-1）。多変量解析を行っても SEA-IgE は喘息コントロール不良と関連性を認めたが SEB-IgE では認めなかつた（図表なし）。

図 2-1. 喘息コントロール不十分および不良の割合



SEA-IgE 陽性患者群では陰性群と比較して呼気中 NO 濃度が有意に高値を示した（図 2-2）。一方、SEB-IgE 陽性患者群と陰性患者群では有意差は認められなかつた。

図2-2. 呼気NO (ppb)



D. 考察

研究①：本研究では過去に我々が前方視的研究で得られた現象の検証は出来なつた。原因の一つとして治療との関連が考えられる。過去の治療と近年の治療を比較し、抗炎症効果に関しては著しい進歩がある。今回の患者群では、ステップ 4 の治療を受けていた患者の $\Delta \log \text{IgE}$ は他の群と比較し低いものであり、これは強度な抗炎症治療が IgE 値を低下させたと考えられる。また、本研究ではペットの飼育が $\Delta \log \text{IgE}$ を上昇させることが証明された。ペット飼育は重症度とも関連性が示されており、IgE (の変化) と喘息重症度を考える上で重要な因子であると考えられる。

研究②：本調査では、SE-IgE を有する患者群では、男性、アトピー性皮膚炎に罹患している患者、ペットの保有者が多く認められ、これらより、SE-IgE の存在は環境因子特にアトピーを誘導するダニ抗原に強く影響を受ける可能性が示唆された。実際、SE-IgE はアトピー性皮膚炎の罹患と関係があり、重症度と相関することが報告されている (Allergy 2000; 55, 641-646)。本研究では、SEA-IgE が喘息のコントロールに影響を及ぼすことが証明された。これは SEB-IgE がコントロールに影響を及ぼすアトピー性皮膚炎と異なる点であり、喘息においては世界で初めての報告となった。同様に、喘息コントロールレベルのみでなく、ACT スコアも SEA-IgE 陽性群と陰性群では有意差を持って陽性群が低下しており、一方、SEB-IgE 陽性群と陰性群では有意差を認めなかった。

今回の調査では、SEA-IgE 陽性患者群では陰性群と比較して呼気中 NO 濃度が有意に高値を示した。今回、喀痰中の好酸球を測定できなかつたため、傍証は得られていないが、SEA-IgE 陽性患者群では陰性群と比較して気道の好酸球性炎症が強いことが示唆された。このことが、コントロール不十分に関連している可能性が考えられる。

E. 結論

喘息患者において、黄色ブドウ球菌から産生されるエンテロトキシン (*Staphylococcus aureus* enterotoxin) に対する IgE 抗体 (SE-IgE)、特に SEA-IgE は喘息症状コントロールに影響を及ぼす可能性が示唆される。特に、気道炎症に関連していると考えられる。また、総 IgE 値の経時的变化と重症度には関連性が認められなかつた。その原因としては、治療の進歩、特に抗炎症治療の進歩が関与していると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka A, Jinno M, Hirai K, Miyata Y, Mizuma H, Yamaguchi M, Ohta S, Watanabe Y, Yamamoto M, Suzuki S,

Yokoe T, Adachi M, Sagara H. Longitudinal increase in total IgE levels in patients with adult asthma: an association with poor asthma control. *Respir Res.* 2014; 15(1):144

- 2) 山口宗大, 田中明彦, 横江琢也, 橋本直方, 山本真弓, 渡部良雄, 大田進, 水間紘子, 大脇理子, 足立満. 喘息コントロールに影響を与える季候についての検討. *アレルギー* 2013; 62(2): 171-178
 - 3) 田中明彦, 足立満. 【気管支喘息:診断と治療の進歩】 概念 治療の変遷. *日本内科学会雑誌* 2013; 102(6): 1327-1332
 - 4) Homma T, Kurokawa M, Matsukura S, Yamaguchi M, Adachi M. Anti-IgE therapy for allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Microbiol Immunol Infect.* 2013; pii: S1684-1182
 - 5) 田中明彦, 横江琢也, 橋本直方, 山本真弓, 渡部良雄, 大田進, 山口宗大, 水間紘子, 大脇理子, 足立満. ガイドラインに基づく軽症喘息患者の治療目標の設定. *呼吸* 2012; 31(12): 1148-1154
 - 6) 足立満、田中明彦. 気管支喘息治療最近の話題 一抗 IgE 抗体治療を中心として-. *日本内科学会雑誌* 2012; 101(3): 689-93
 - 7) Tanaka A, Minoguchi K, Pawankar R, Adachi M. Asthma in Patients With Japanese Cedar Pollinosis. *World Allergy Organization Journal* 2012; 5: S218-S222
2. 学会発表
- 1) 田中明彦, 神野恵美, 平井邦朗, 宮田祐人, 水間紘子, 山口宗大, 大田進, 山本真弓, 渡部良雄, 鈴木慎太郎, 横江琢也, 相良博典. 喘息患者の長期管理における増悪予知因子に関する検討. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会. 2014 年. 大阪
 - 2) 平井邦朗, 田中明彦, 神野恵美, 宮田祐人, 水間紘子, 山口宗大, 大田進, 山本真弓, 渡部良雄, 鈴木慎太郎, 横江琢也, 相良博典. *Staphylococcus aureus* 特異的 IgE 抗

- 体と喘息重症度との関係. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会. 2014 年. 大坂
- 3)神野恵美, 田中明彦, 平井邦明, 宮田祐人, 水間紘子, 山口宗大, 大田進, 山本真弓, 渡部良雄, 鈴木慎太郎, 横江琢也, 相良博典. 喘息重症度と IgE の経年の変化に関する前向き研究. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会. 2014 年. 大坂
- 4)宮田祐人, 田中明彦, 神野恵美, 平井邦朗, 水間紘子, 山口宗大, 大田進, 山本真弓, 渡部良雄, 鈴木慎太郎, 横江琢也, 相良博典. 喘息患者の血清中サイトカイン濃度. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会. 2014 年. 大坂
- 5)田中明彦, 平井邦朗, 神野恵美, 宮田祐人, 水間紘子, 山口宗大, 大田進, 山本真弓, 渡部良雄, 鈴木慎太郎, 横江琢也, 相良博典. 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン特異的 IgE 抗体と喘息との関係. 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2014 年. 京都
- 6)田中 明彦, 相良 博典. Back to the basic: ステロイドの力価・特徴からみた喘息治療戦略. 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2014 年. 京都
- 7)Tanaka A, Jinno M, Hirai K, Miyata Y, Mizuma H, Yamaguchi M, Ohta S, Yamamoto M, Watanabe Y, Suzuki S, Yokoe T, Sagara H. Longitudinal changes of IgE are related to severity in patients with asthma. International Conference, American Thoracic Society. 2014 年. San Diego
- 8)田中明彦, 神野恵美, 平井邦朗, 宮田祐人, 水間紘子, 山口宗大, 大田進, 山本真弓, 渡部良雄, 鈴木慎太郎, 横江琢也, 相良博典. 喘息患者の長期管理における増悪予知因子に関する検討. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2013 年. 東京
- 9)宮田祐人, 田中明彦, 神野恵美, 平井邦朗, 水間紘子, 山口宗大, 大田進, 山本真弓, 渡部良雄, 鈴木慎太郎, 横江琢也, 相良博典. 喘息患者の血清中サイトカイン濃度と重症度との関連. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2013 年. 東京
- 10)鈴木慎太郎, 田中明彦, 平井邦朗, 神野恵美, 宮田祐人, 山口宗大, 水間紘子, 大木康成, 村田泰則, 本間哲也, 大田進, 山本真弓, 渡部良雄, 石田博雄, 安藤浩一, 白井崇生, 横江琢也, 黒川真嗣, 大西司, 相良博典. 喘息患者における寄生虫抗原の関与についての検討. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2013 年. 東京
- 11)神野恵美, 田中明彦, 平井邦朗, 宮田祐人, 水間紘子, 山口宗大, 大田進, 山本真弓, 渡部良雄, 鈴木慎太郎, 横江琢也, 相良博典: 喘息重症度と IgE の経年の変化に関する前向き研究. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2013 年. 東京
- 12)田中明彦, 横江琢也, 橋本直方, 山本真弓, 渡部良雄, 大田進, 山口宗大, 田崎俊之, 足立満. 軽症喘息患者の治療目標に関する検討. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会, 2012 年. 神戸
- 13)田中明彦. アレルギー性炎症病態からみる抗 IgE 抗体療法の最新の知見. 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2012 年. 大阪
- 14)田中明彦, 足立 満: 重症気管支喘息に対するオマリズマブの有効性. 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2012 年. 大阪
- 15)水間紘子, 田中明彦, 山口宗大, 大田進, 本間哲也, 山本真弓, 渡部良雄, 橋本直方, 横江琢也, 松倉聰, 足立満. 喘息患者における IgE の経時的变化と重症化に関する検討. 第 43 回日本職業・環境アレルギー学会. 2012. 東京
- 16)田中明彦, 水間紘子, 山口宗大, 大田進, 本間哲也, 山本真弓, 渡部良雄, 橋本直方, 横江琢也, 松倉聰, 足立満. 喘息コントロールに影響を与える季候についての検討 (第二報). 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2012 年. 大阪
- 17)田中明彦. 抗 IgE 抗体療法の現状と今後の課題. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学

術大会. 2012 年. 大阪

- 18) 山口宗大、田中明彦、横江琢也、橋本直方、山本真弓、渡部良雄、大田進、本間哲也、水間紘子、松倉聰、黒川正嗣、足立満. クロレラ抽出物のマウス喘息モデルにおける気道炎症に与える影響. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2012 年. 大阪
- 19) 水間紘子、田中明彦、山口宗大、大田進、本間哲也、山本真弓、渡部良雄、橋本直方、横江琢也、松倉聰、足立満. 喘息患者における IgE の経時的变化と重症化に関する検討. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2012 年. 大阪
- 20) 熱田了、田中明彦、大田進、伊藤潤、原田紀宏、松倉聰、高橋和久、足立満. 喘息患者に対する臭化チオトロピウム追加投与

群の臨床効果と有効群の背景因子の検討.
第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会.
2012 年. 大阪

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

**厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業
（免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野））
総合分担研究報告書**

気管支喘息に関する医療連携システムの活用に関する研究

研究協力者 井上 博雅 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科呼吸器内科学 教授
東元 一晃 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科呼吸器内科学 講師

研究要旨

本研究の主目的は「喘息医療・医薬連携システムの機能強化及び拡大と喘息患者の吸入手技/疾患教育の充実」をはかることである。我々はこれまで専門医と非専門医、薬剤師との医療連携をシステムとして構築してきた。とくに「吸入服薬情報提供書」を用いた薬剤師との連携により、吸入指導に関する情報共有、教育の実効性が向上し、その有効性が確立しつつある。このシステムを普及・拡大していくうえで、従来のシステムの中で薬剤師および患者におけるそれぞれの課題を検証し、さらに試行を開始した調剤薬局から非専門医に向けて発行する「吸入服薬情報提供書」の有用性を検証する目的で、以下の検討を行った。

<検討①> 6か月以上呼吸器外来通院、定期吸入薬使用中の患者 53 人を対象に、薬剤理解、吸入手技に関する自己評価と薬剤師の評価とを比較検討した。患者の理解、手技は、とも良好に保たれており、自己評価と薬剤師評価は概ね一致していた。高齢者の手技に関する自己評価はより低く評価する傾向にあったが、薬剤師評価は十分に担保されていた。

<検討②> 薬剤師 280 名を対象とし、喘息診療に関する意識および現状の調査を行い、4 年前の調査（180 名対象）とも比較検討した。また、吸入指導に必要な知識・技術についても自己評価を行った。吸入指導は 81.5% が「薬剤師が行うべき」と回答し、4 年前とほぼ同様。「実際の吸入器を用いた指導」は増加したが、多くが依然「初回のみ」の指導であった。薬剤師の指導スキル自己評価（5 段階）は「薬剤理解」については多くが自信をもって指導できるものの、「吸入手技」を「自信をもって指導できる」との回答は少数であった。これらのデータの解析により、薬剤師のもつ「自信」が「吸入指導を繰り返し行う」ことと関連することも明らかとなった。

<検討③> 従来、一部の専門医と薬剤師との間の往復書簡として運用していた「吸入服薬情報提供書」を、調剤薬局薬剤師から非専門一般医に向けて発行する試行を開始し、その有用性について薬剤師、処方医の双方からの評価を行った。いずれも 5 段階評価（点数が高いほど高評価）で、薬剤師からは、指導ツールとして 4.33 ± 0.85 、情報提供ツールとして 4.08 ± 0.95 と、高評価が得られた。また、処方医側は、「診療の参考になる」 4.33 ± 0.74 、「処方変更の動機になる」 4.17 ± 0.76 と概ね良好な評価であった。また、17 例(94.4%)が吸入手技に関して、13 例(72.2%)がアドヒアラנסに関して更なる情報を求めており、より積極的な情報活用の意欲がみられた。

喘息医療連携システムの充実・拡大のためには多職種の参画を促し、かつそれぞれの職種の知識・技術を向上させ、また、職種間の連携を円滑化することで、より実効性のあるものへと発展させていく必要がある。また、これらのシステムを利用した繰り返しかつより丁寧な指導・教育とともに、より多くの喘息患者に対する医師・薬剤師の情報共有が図られることで、投薬と教育の適正化がもたらされる可能性がある。

A. 研究目的

本研究の主目的は「喘息医療・医薬連携シ

ステムの機能強化及び拡大と高齢者を含む喘息患者の吸入手技/疾患教育の充実」を図ること

とある。

われわれはこれまでに専門医と非専門医、薬剤師との医療連携をシステムとして構築してきた。とくに「吸入薬に関する『服薬情報提供書』」を用いた薬剤師との連携により、とくに吸入指導に関する情報共有、教育の実効性が向上し、その有効性が確立しつつある。

この3年間の班研究は、上記目的を達成するためこれら医療連携システムの充実を図りつつ、それを検証するために、主に3つの検討を行った。

- ・服薬指導および医薬連携を行う上で薬剤師の現状と意識にみられる問題点は何か。また、それを解決するための方策を立てることができるか。
 - ・吸入手技自己評価と薬剤師による吸入確認（指導）を比較し、その差異および背景要因について検討することで、高齢患者における追加的な教育支援策を立案できるか。
 - ・試行を開始した調剤薬局薬剤師から非専門医にむけて発する「服薬情報提供書」を利用した＜薬局ぜんそくケアプログラム＞の本格実現のための課題は何か。

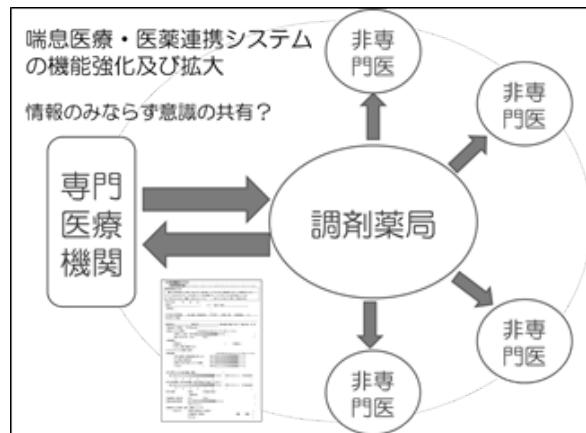


図1. 「服薬情報提供書」を利用した <薬局ぜんそくケアプログラム>

B. 研究方法

【検討1】吸入薬に関する理解・手技の患者自己評価／薬剤師評価の比較

6か月以上呼吸器外来通院、定期吸入薬使用中の患者53人を対象に、薬剤理解（使い分け、服薬時間、作用・効果）、吸入手技（吸入操作・吸入動作の適切さ）に関する評価票を

5段階で<自己評価>として記入してもらつた。薬剤師からの「服薬情報提供書」で確認された<薬剤師評価>と比較し、その背景因子を検討した。

＜対象患者背景＞

年齢 平均 68.6 ±17.1 歳

男/女 34/19

喘息/COPD（含、オーバーラップ症候群）29/24

吸入薬（デバイス）

ディスカス	21 例
タービュヘラー	15 例
レスピマット	10 例
pMDI	4 例
ブリーズヘラー	3 例
ハンディヘラー	2 例

※一部重複あり

【個人登録の範囲に関する自己評価】	
個人登録がされている患者の蓄積へ	
本調査機関やCDPの治療において個人登録の使い方などについて患者さん自身で自己評価するための問題です。	
該章までの操作時間に、以下の項目についてご自分の程度でチェックをお願いいたします。 どちらともあれば、普通と回答御願いおねがいください。	
今日の日付	年 月 日
性別 <input checked="" type="checkbox"/> 女性 <input type="checkbox"/> 男性	
◎患者について	
<input checked="" type="checkbox"/> 本日のあなたの患者 老弱病弱者であることをあなたは認識していません <input type="checkbox"/> 本日のあなたの患者 老弱病弱者であることをあなたは認識しています <input type="checkbox"/> 本日に対する不安 口なし 口あり	
◎診療の経験について、先発泡入法（アドエア、シムピコート、フルタイドなど）は使っていますか？	
<input type="checkbox"/> 1回以上使っている <input checked="" type="checkbox"/> 1回も使っていない（1本以内）	
◎おくすりの副作用や効果について	
<input checked="" type="checkbox"/> 用意を怠ると副作用や効果がない 十分理解している□ <input type="checkbox"/> 〇回答がない <input type="checkbox"/> 用意を怠ると副作用や効果がない 十分理解している□ <input checked="" type="checkbox"/> 〇回答がない <input type="checkbox"/> おくすりの副作用や効果について 十分理解している□ <input checked="" type="checkbox"/> 〇回答がない	
◎個人登録のときは？（個人登録上手に最後まで操作できますか？）	
<input checked="" type="checkbox"/> 完全にできる <input type="checkbox"/> 5 4 3 2 1 0 <input checked="" type="checkbox"/> 異常がない	
◎個人登録の使い方は？（おくすりを先に輸入後、先着の患者で古い順）のできますか？）	
<input checked="" type="checkbox"/> 完全にできる <input type="checkbox"/> 5 4 3 2 1 0 <input checked="" type="checkbox"/> 異常がない	
◎おくすりの副作用等と書かれるとどうおれますか？	
<input checked="" type="checkbox"/> 口なし 口あり	
◎おくすりのことと医師の診察時間に重なることで困ったことがありますか？これがなければ普通ですか？（普通ならどちらの口なし 口あり	
回答ありがとうございました。	

図2. 吸入薬の薬剤理解および吸入手技に関する自己評価票

【検討2】喘息患者指導と医療連携に関する薬剤師の現状および意識調査

- ・喘息診療の現状および意識に関する 23 問からなる質問票を作成（図 3）。
 - ・「服薬情報提供書」のシステムに求められる

吸入指導・教育に関する知識および技術について 5 段階の自己評価（指導における自信）として質問する項目も設定した。

- 喘息講演会（2013 年 9 月）に参加した薬剤師 280 名に対して配布。匿名にて回答、回収した。
- 4 年前に行った同様の調査（薬剤師 180 名を対象）にある共通問題については得られた結果について比較検討を行った。

このアンケートはできるだけ誠実なご回答をお願いします。アンケートは全部で3ページあります。
気管支喘息の診療に関するアンケート（薬剤師の先生用）
このアンケートは、喘息治療現状では医師が患者に対して、さまざまな医療の観点での医療や診療の現状について調査を行うことになります。
ご了承しては、アンケートを作成しましたのでご回答をお願いいたします。以下の質問に対して、該当する項目に□を付けてください。
このアンケートで尋ねられる情報は、喘息患者における現状の現状の上に設立しているといふべきです。複数回答は、複数の選択肢を複数選択して下さい。複数選択肢、複数回答肢の「なし」が最も多く回答を取った場合に最も多かった場合に最も多くある場合に該当する場合は複数選択肢に複数の「あり」に対する回答の一部として行っております。
必ず、先生に自身のことについてお答えください。
1. 先生の年齢・性別は?
年齢 () 歳代 性別 口男 □女
2. 基礎疾としての経歴について。
・先ほどの通りである () 歳 基礎疾としての既往歴 () 歳
・既往の歴史内容?
□既往基礎疾患 □既往基礎疾患 □その他の () 歳/月
・1 の月当たりの吸込回数が多い時は?
□ () 回/月
次に問題の範囲ガイドラインについてお聞きします。
3. 「喘息予防・管理ガイドライン 2009」が発行されていることを知っていますか。
□ ない (一箇所 4 ページ) □ いいえ (一箇所 8 ページ)
4. 「喘息予防・管理ガイドライン 2009」は最初に何でお知りになりましたか。
□ 医薬品の販売業者 □ 薬剤師会のパンフレット □ 薬機関会社の販売会員会の情報
□ 読売新聞や読売 □ 知り合いの医師から □ 知り合いの薬剤師から
□ その他の ()
5. 「喘息予防・管理ガイドライン 2009」の冊子を実際に見たことがありますか。
□ ない □ いいえ
6. 「喘息予防・管理ガイドライン 2009」を活用して、患者さんに対して、指導・説明をなさざりますか。
□ ない □ いいえ
7. 「喘息予防・管理ガイドライン 2009」に記載されている「喘息の重症度」、「治療ステップ」をご活用ですか。
□ 良く使っている (患者に利用している) □ 内容まであまり使っていない
□ 見たこと、聞いたことはある □ ほとんど知らない
喘息の症状把握（吸入装置）について。
8. 患者さんに対する吸入装置は、どのくらいの割合の患者さんに対して行っていますか。
□ 10%以下 □ 10~30% □ 30~60% □ 60~80% □ 80%以上
次のページへ

図 3. 哮息診療の現状および意識に関する 23 問からなる質問票

【検討 3】<使用媒体>当システムで作成した「服薬情報提供書」（以下「提供書」）；吸入薬に関する「残薬」「薬剤理解」「吸入操作」「吸入動作」各項目の 5 段階評価票。指導および情報連携に使用。

<実施期間>2014 年 10 月初旬の 2 週間
<対象>薬剤師：協力に同意した調剤薬局 10 施設の勤務薬剤師 14 名（吸入指導セミナー受講修了者）
处方医：薬剤師より発行された「服薬情報提供書」の発送先として記載された医師 18 名を対象とした。

<方法>上記協力薬局に来局した吸入薬を処

方された患者に対して、「提供書」の手順に則って服薬指導を行い、その結果情報を患者の同意を得て、処方医へ FAX で発信した。

期間中に発信されたすべての「提供書」コピーを期間終了後に回収した。その際「提供書」に関する薬剤師からの評価（使用感およびそれによる服薬指導、処方医との連携への有用性）を記す調査票にも回答してもらった。次に、回収した「提供書」をもとに発信先処方医を確認し、処方医からも本「提供書」に関して評価（情報源としての有用性、診療あるいは処方への影響など）してもらうため、調査票を発送、回答を依頼した。

（倫理面への配慮）

服薬情報提供書、自己評価票は患者の同意のもとに作成され、データの解析にあたっては個人情報に配慮し匿名化したうえで行った。また、薬剤師や処方医による調査票は匿名（無記名）でおこなった。

C. 研究結果

【検討 1】吸入薬に関する理解・手技の患者自己評価／薬剤師評価の比較

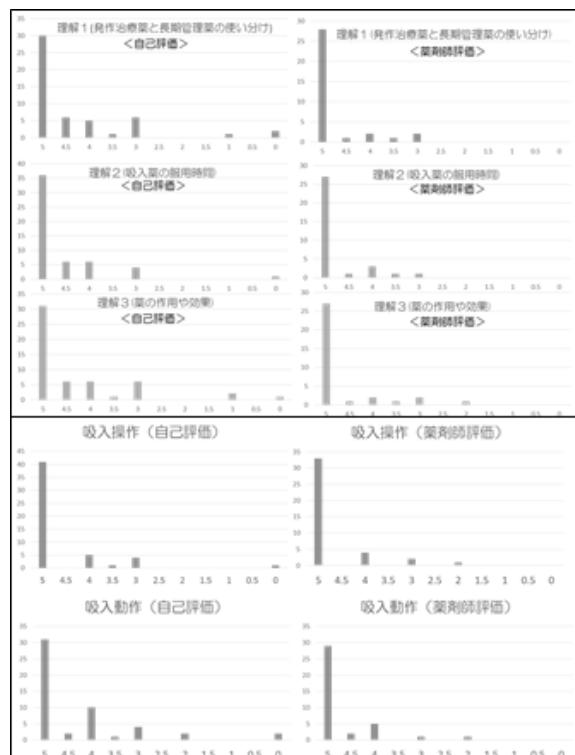


図 4. 吸入薬剤に関する理解と吸入手技（操作および動作）の自己評価と薬剤師評価の

比較

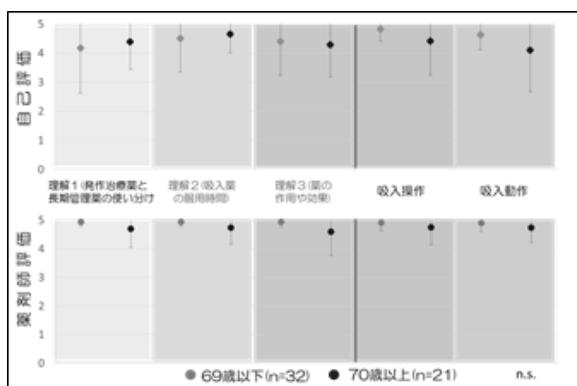


図5. 年齢による吸入薬の薬剤理解および吸入手技評価の自己および薬剤師評価の比較

- ・長期間（6か月以上）の定期外来通院中の喘息/COPD患者の薬剤理解/吸入手技（操作・動作）は概ね良好であった。
- ・自己評価と薬剤師の評価は概ね一致しており薬剤理解、吸入手技とも、年齢による差異は少ない。
- ・とくに高齢者は、吸入手技に関して多少自信が持てなくなるものの、薬剤師評価は悪くはなく、十分に習得できている。
- ・高齢者でも、長期繰り返しの指導を受けている患者は薬剤理解、吸入手技ともに維持されている。

【検討2】

・吸入指導を担当すべき職種に関する質問に対して、81.5%が「薬剤師が行うべき」と回答し、4年前とほぼ同様であった。

・吸入指導の際に「実際の吸入器を用いた指導」を行っている薬剤師は88%と前回の73%に比較して、大きく増加したが、タイミングは多くが「初回のみ」で「処方ごとに毎回指導」はほぼ前回並みの3.4%にとどまった。（図6）

・ガイドライン（喘息予防管理ガイドライン2013）は46%が認識しているがほとんどが実の指導には利用していないかった。

・医薬連携は「重要である」との認識はあるものの、処方医との実際の情報交換は半数以下。

・指導スキル自己評価（5段階）として薬剤理解は4点以上が半数を超えたが、吸入手技

の指導に自信を持てるとして、4点以上と回答したのは操作39%、動作18%と極めて低かった。

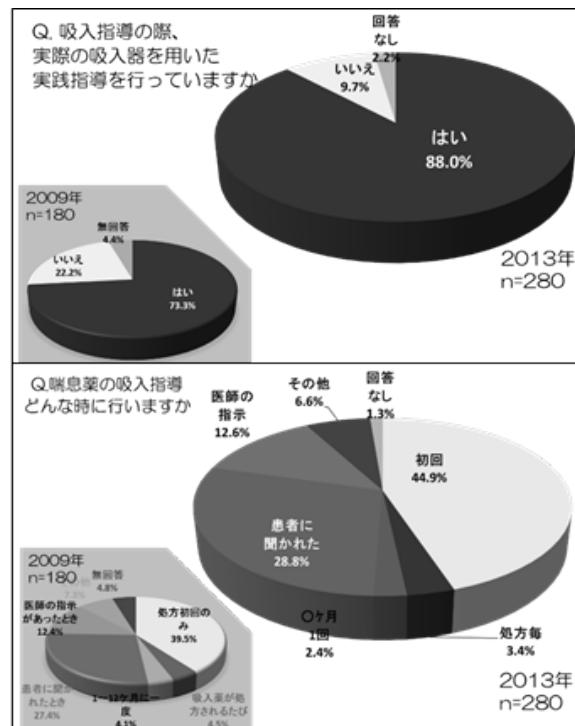


図6. 薬剤師の喘息治療に関する現状；吸入指導の手法とタイミング

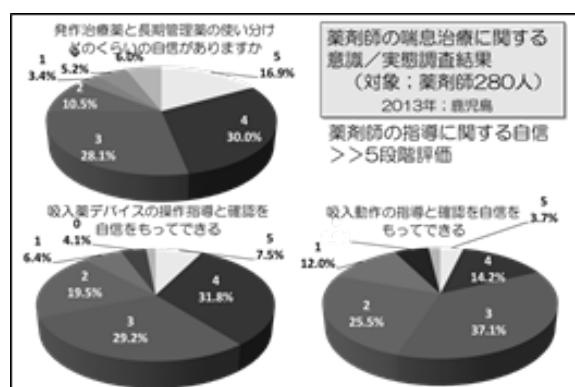


図7. 薬剤師の喘息治療に関する意識；吸入手技指導に関する自信

【検討3】

期間内に発信され回収された「提供書」は49通。評価調査票の回収率は薬剤師：対象14名中12件(85.7%)、医師：18名中17件(94.4%)であった。

<薬剤師からの評価>

いずれも 5 段階評価（点数が高いほど高評価）で、指導ツールとして 4.33 ± 0.85 、情報提供ツールとして 4.08 ± 0.95 と、ともに高評価が得られた。また、服薬指導時間は 92% が 2~10 分の範囲にあったが、「提供書」の使用により半数が「時間が長くなった」と回答した。しかしながら「時間がかかるでも抜けがなく効率的に指導ができる」との自由記載もあり、おおむね好意的に受け入れられていた。また「処方医からの反応があった」との回答は期間を短かったためか、1 件に留まった。

＜処方医からの評価＞

調査期間内に受信した「提供書」を確認した処方医は半数を超える（53%）ていた。提供された情報の評価（5 段階）は「診療の参考になる」 4.33 ± 0.74 、「処方変更の動機になる」 4.17 ± 0.76 と概ね良好な評価であった。また、17 例（94.4%）が吸入手技に関して、13 例（72.2%）がアドヒアラנסに関して更なる情報を求めており、より積極的な情報活用の意欲が感じられた。

D. 考察

自己の適正な評価は教育の効果を高めるために重要である。吸入薬に関する理解・手技は繰り返しの教育によって定着されつつあり、適切に自己評価されていた。適切な指導がなされることで、吸入薬に関する理解と手技を向上、維持することは十分に可能であると考えられる。

また、薬剤師の喘息診療に関する意識は高く、医薬連携への参画の使命感もみられるが、指導や教育に関するスキルは、いまだ十分でなく、専門医あるいは薬剤師相互の教育体制の確立が必須であると考えられた。

喘息医療プログラムにおいては、薬剤師が役割を担うことが、医療の実効性において効果的であることが、種々報告されている。

医薬連携をもとにした多職種が参画する教育プログラムは患者教育において有効である可能性があるが、Williams らによると、医師に対する服薬アドヒアラנסの情報提供は必ずしも患者の ICS 使用を改善しないことが示されており、情報共有のみならず、意識の共

有も実効性を担保する上では重要であることが指摘されている。

今後、「服薬情報提供書」などの情報共有ツールを用いて専門医、非専門医と薬剤師のコミュニケーションを強化するとともに薬剤師から非専門医にむけて情報を発信するうえでは、薬剤師の知識や技術の向上を図るとともに、非専門医の関心をいかに高め、意識の共有を図るシステムが構築できるかが重要であろう。

これまでに本研究課題において構築してきた「気管支喘息に関する医療連携システム」のなかで、薬剤師自身の相互教育によって、薬剤師の指導スキルと自信は向上してきた。また当システムで作成した「服薬情報提供書」書式に則った指導により標準的な吸入指導および確認が可能となった。これらの服薬指導に自信を持った薬剤師はさらに介護職への教育も開始するなど、連携システム強化拡大が図られつつある。また、薬剤師から処方医に向けて発信する「服薬情報提供書」については、受信した処方医（専門医／非専門医）の半数以上が「提供書」を到着早期に確認しており、また診療や処方の情報源として積極的に受け入れていることが明らかとなった。

このシステムをより広く確立させるためには発信元の調剤薬局薬剤師の意識と技術を向上させ、指導の自信をつけさせることが重要である。そのため薬剤師の相互教育「薬剤師のための吸入指導セミナー」を各地域で開催している。

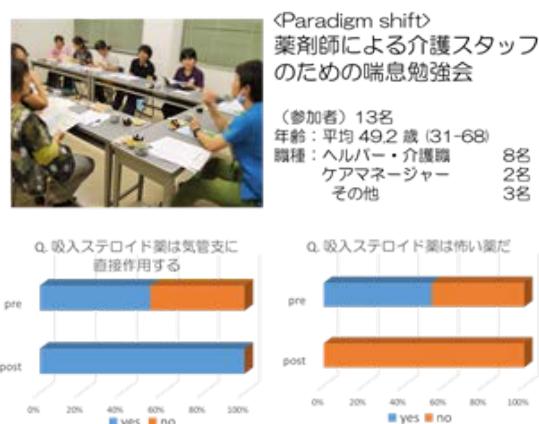
薬剤師のための吸入薬指導セミナー



また、とくに高齢患者への診療を充実させるためには、医師、薬剤師のみならず、看護・

介護スタッフの参画も重要であり、多職種相互の教育、連携を拡大させていく。

これらを踏まえて、今後は吸入指導スキルと自信の向上が、実際に臨床現場での繰り返し指導につながるかどうか、また、患者の吸入薬に関するアドヒアランス、理解、手技の改善が図れるかどうか、さらにこれらのシステムが全体の喘息診療の質を向上させていくことができるかを追跡し明らかにしていくことが今後の課題である。



E. 結論

この3年間の研究および活動によって、「喘息医療・医薬連携システムの機能強化及び拡大と喘息患者の吸入手技/疾患教育の充実」の目的を達成するための基礎はできつつあると思われる。

教育を提供する側の薬剤師の喘息診療に関する意識は非常に高く、医療連携への参画にも高い使命感が見受けられたが、具体的な指導や教育に関するスキルについての十分な知識や情報が届いておらず、医薬連携の発展拡大には、専門医と薬剤師の知識や情報の共有、薬剤師相互の教育体制の確立が必須である。

喘息医療連携システムの充実・拡大のためには多職種の参画を促し、かつそれぞれの職種の知識・技術を向上させ、また、職種間の連携を円滑化することで、より実効性のあるものへと発展させていく必要がある。

開始した薬剤師から非専門医にむけて発する「服薬情報提供書」を利用したく薬局ぜんそくケアプログラムは、試行の段階ではあるが、薬剤師、処方医双方ともに有用性につ

いて高評価を得ており、拡充していくことに期待が持てる。

また、これらのシステムを利用した繰り返しかつより丁寧な指導・教育とともに、より多くの喘息患者に対する医師・薬剤師の情報共有が図られることで、投薬と教育の適正化がもたらされる可能性がある。

このプログラムの実現のためには、薬剤師のみならず、非専門医、看護師、介護士など多職種の知識・技術の向上を図るための相互教育システムの充実も必要と考えられる。

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) 東元一晃、井上博雅 「喘息死ゼロ作戦」における取り組み International Review of Asthma and COPD 2012; 14(4): 185-90

2.学会発表

- 1) 東元一晃 : WS2-3 喘息医療連携の現状～吸入指導の観点から～. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2012 年 : 大阪
- 2) Higashimoto I, Shinmura M, Inoue H. Impact of Pharmaceutical Asthma Educational Program using Medication Adherence Reporting Note. The 22nd Congress of Interasthma/ North-Asia. 2012: Fukuoka
- 3) 新村昌弘、東元一晃、田上寛容、井上博雅. 喘息・COPD における医薬連携：「服薬情報提供書」を利用した連携教育プログラムの有用性に関する検討. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会. 2012 年 : 神戸
- 4) 東元一晃. 吸入薬に関する理解・手技の患者自己／薬剤師評価；「服薬情報提供書」を用いた医薬連携システムの教育効果 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2014 年 : 京都
- 5) 東元一晃 : 喘息患者指導と医療連携に関する薬剤師の現状および意識調査 (4 年間の変化と指導スキルの自己評価) 第 26 回

- 日本アレルギー学会春季臨床大会 2014
年：京都
- 6) 東元一晃：薬剤師発「吸入服薬情報提供書」の喘息指導および医薬連携に対する有用性の検討 第64回日本アレルギー学会学術大会. 2015年：東京
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし

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

**厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業
（免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野））
総合分担研究報告書**

**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、ならびに乳幼児の喘息予知テスト—**

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件研究科小児科学 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 医員
佐藤 幸一郎 群馬大学大学院医学系研究科小児科学医員

研究要旨

気管支喘息の非侵襲的マーカーの候補としての尿中ロイコトリエン E4 濃度測定の精度改善を検討した。また、乳幼児喘息患者の早期診断、予知のために喘息等のアンケートを作成して、996 名の呼吸器症状を呈する患者について調査後経過観察を行ない、喘息発症とアンケート調査の点数について検討を行い、次の成果を得た。

1. 尿中ロイコトリエン E4 の新しいハイスクループットな測定方法として、MALDI-TOF/TOF を採用した。さらに、ロイコトリエンの誘導体化のプロセスを加えた結果、1-256 pg/ml の間で直線性が見られ、測定感度の上昇に有用であった。
2. 呼吸器症状を有する乳幼児 996 名を対象に喘息予知テストを施行し、経過観察を行った。その結果 25 例が喘息を発症し、発症群と非発症群の点数に差異がみられた。

A. 研究目的

乳幼児期には喘鳴疾患が多く、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。また、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。さらにこの時期の気管支喘息自体は成人期の COPD の危険因子となっている。

しかし、この時期の喘息主要症状である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、その診断については、「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」を広義の乳幼児喘息と診断している。また予知については、諸外国で問診によりプロバリティーが検討されている。

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、喘鳴のマーカーとして、尿中ロイコトリエン測定の方法を検討した。

また、喘息発症については、Pescatore らによる問診票の日本版を作成し、予知のプロバビリティーを検討した。

さらに、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 との比較を行った。

B. 研究方法

1) 尿中 LTE4 の測定方法とその改善

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てきた。すなわち、従来の方法に i) 除蛋白

白、ii) 尿へのフリーラジカルスカベンジャー使用、iii) メタノールによる浸水化、iv) ELISA の使用、等を考慮し、測定は ELISA Kit(Cystenyl leukotriene Express EIA kit)で行った。その後、平成 25、6 年よりハイスクレーブットな測定ができる質量分析法(MALDI-TOF/TOF)を採用し、その測定を試みた。

なお、対象は下記患児として、i) 初回呼気性喘鳴群 1 (β 刺激薬非改善群、図 1 で 1episode-A と表記) ii) 初回呼気性喘鳴群 2 : i と同様であるが、 β 2 刺激薬の吸入で改善が認められた者(14 名)。(図 1 で 1episode-B と表記)。iii) 発熱対照群：発熱はあるが、尿路感染や喘鳴のない者。RS ウィルスは陰性であり、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)。(図 1 で ctrl と表記) iv) 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)。(図 1 で intermittent と表記)。

これらの患児は採尿から 1 か月前での服薬や吸入との治療を行わず、また RS ウィルス陰性と確認できた者である。

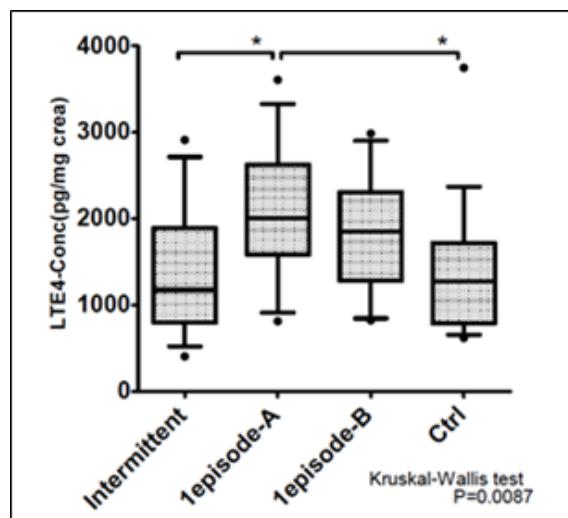


図 1

2) 喘息予知テスト

研究者 MT の診療所を平成 24 年 2 月から平成 24 年 10 月までに受診した乳幼児で呼吸器症状を呈する患者について別紙アンケート

を行った(表 1)。

表 1

喘息予知テスト(asthma prediction tool)

1. おさんの性 口女児(0点) 口男児(1点)
 2. おさんの現在の年齢 口1歳(0点)、口2歳(1点)、口3歳(2点)
 3. ここ12ヶ月で、おさんは風邪をひいて 口いいえ(0点)、口はい(1点)
 いないのにヒュウヒュウいましたか?
 4. ここ12ヶ月で、何回ヒュウヒュウしましたか?
 口0-3回(0点)、口3回以上(2点)
 5. ここ12ヶ月でヒュウヒュウして、おさんの日常生活が乱れましたか?
 口いいえ(0点)、口少し(1点)、口3歳(2点)
 6. ヒュウヒュウして 口いいえ(0点)、口時々(1点)、口しばしば(3点)
 息切れましたか?
 7. ここ12ヶ月で、運動(遊び、ランニング)、大笑いや泣くこと、興奮したりしてヒュウヒュウしたりせき込みましたか? 口いいえ(0点)、口はい(1点)
 8. ここ12ヶ月で、ホコリ、雑草花粉、ペットやほかの動物に触れてヒュウヒュウしたり、咳しましたか? 口いいえ(0点)、口はい(1点)
 9. おさんはこれまでに湿疹がありましたか? 口いいえ(0点)、口はい(1点)
 10. ご両親にこれまでヒュウヒュウしたり、喘息または細気管支炎にかかりましたか?
 口いいえ(0点)、口母(1点)、口父(1点)、口両親とも(2点)

合計 点

3) 喘鳴患児のクラスター解析

平成 24 年の研究において、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。

(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) 尿中 LTE4 の測定

前記方法の採用により ELISA での直線性の範囲が広がった。すなわち、図 2 に示すようにロイコトリエンの derivatization(誘導体化)を行った後、図 3 に示す MALDI-TOF/TOF 法を用いて測定し、図 4 の結果を得た。これにより、尿中ロイコトリエン量が 1~256 pg/ml の範囲で直線性が得られ、尿中ロイコトリエン測定に十分な感度が得られた。

間欠型喘息群では、尿中ロイコトリエン量は 1episode-A 群は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った(図 1)。

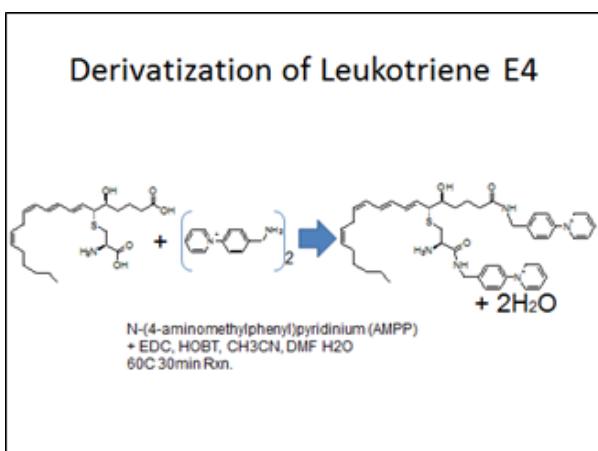


図 2

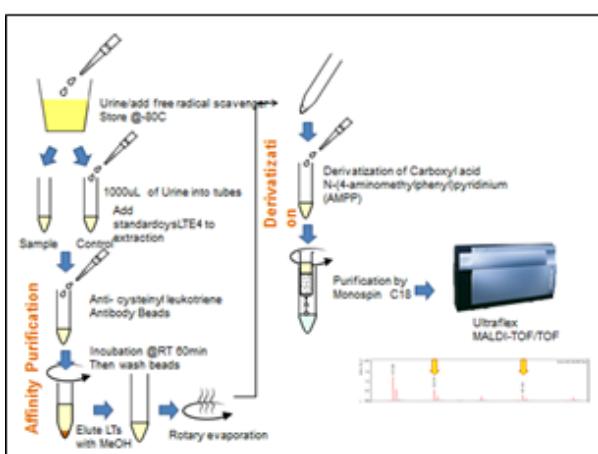


図 3

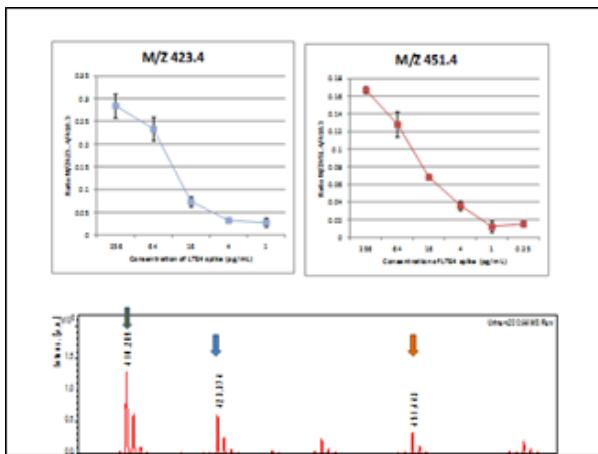


図 4

5 に示すように、喘息発症群で点数が優位に高値を示した。感度・特異度の ROC 曲線を図 6 に示した。

表 2

年齢	人数(人)	喘息と診断
0	217	0
1	299	3
2	231	4
3	249	18
合計	996	25

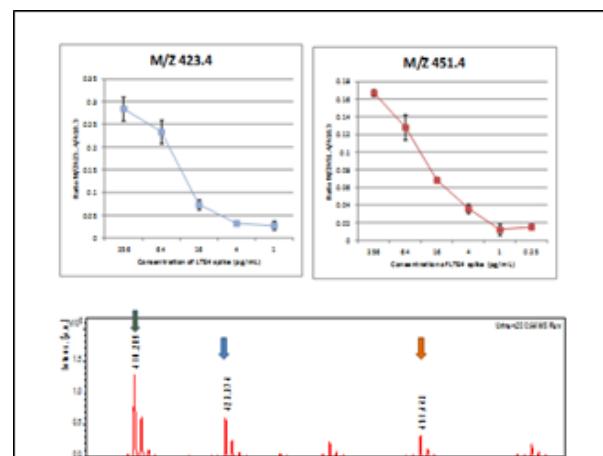


図 4

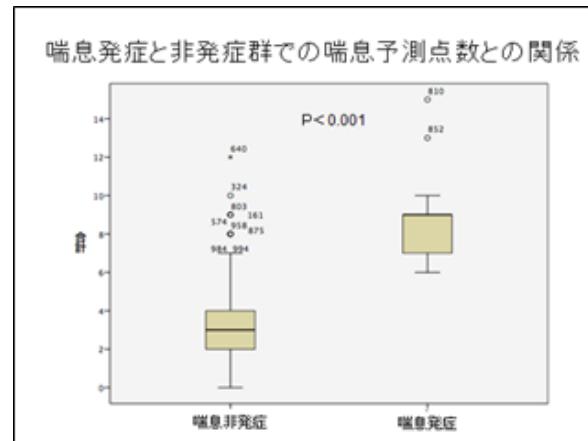


図 5

2) 喘息予知テスト

表 1 に示した喘息予知テストを現在までに 996 名に施行し、その後経過観察を行った結果、25 例が発症した（表 2）。喘息発症と非発症群での喘息予測点数との関連をみると、図

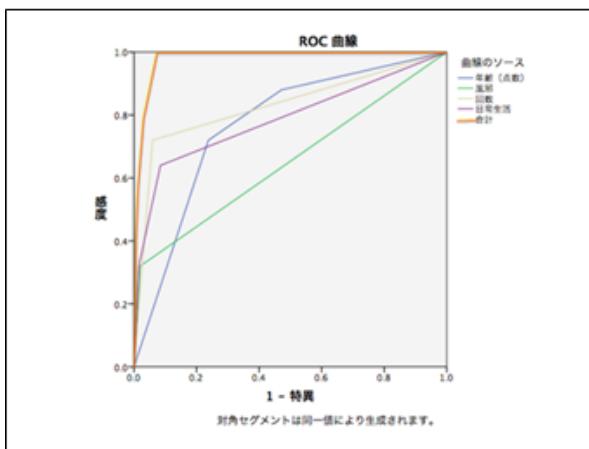


図 6

3) 喘鳴児のクラスター解析について

結果はデンドログラム及びヒートマップで示した（図 7）。

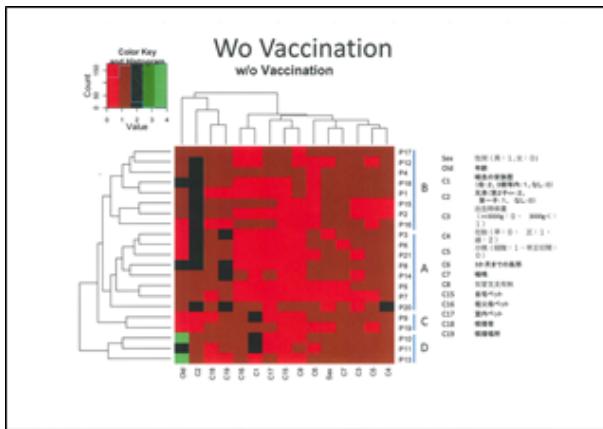


図 7

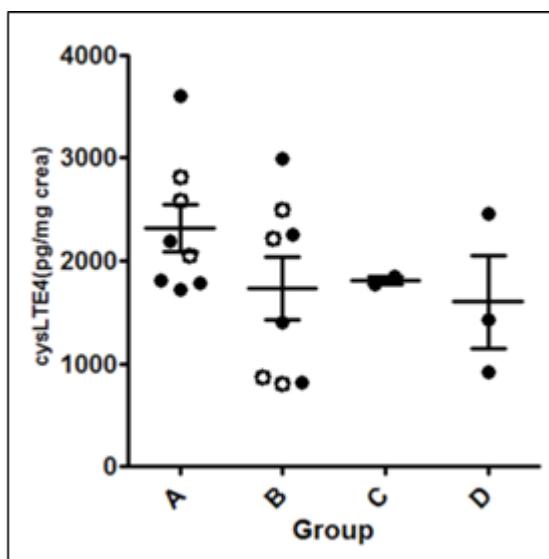


図 8

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つた患者が多い傾向がみられた（図 8）。

D. 考察

1) ロイコトリエン C4、D4 はアレルギー性疾患において、重要な chemical mediator であり、尿中にはその最終代謝産物であるロイコトリエン E4 として排泄される。小児・成人ぜんそく患者について、その測定値は重症度、肺機能と相関が報告してきた。しかしながら平成 24 年より改良を行ってきた測定方法には、ある程度のばらつきがあることが知られている。

今回、試料の derivatization (誘導体化) を行うことにより、MALDI-TOF/TOF を用いての測定が可能であることがわかった。今後は、この方法を確立するとともに、従来測定してきた病型についての尿中ロイコトリエン E4 量について検討したい。

2) 乳幼児については、喘息発症予知と正確な診断が早期治療に重要である。一方で侵襲的な検査や努力を要する検査は困難である。診断に有用な情報を得るために、非侵襲的かつ客観的検査と詳細な問診事項の確立が重要である。今後、尿中ロイコトリエン E4 濃度ならびに予知アンケート結果を総合的に検討することで、乳幼児喘鳴児の喘息発症予知や早期診断に向けた有用な知見が得られると期待される。

3) クラスター解析と尿中ロイコトリエン E4 について、今回の検討では、喘鳴患者 55 名での解析であり、明瞭な結果は得られなかった。しかし、全体の 4 つのクラスターに分類しうること、各群で臨床的バックグラウンドと各クラスター、尿中ロイコトリエンを比較することに何等かの傾向がみられるので、今後検討したい。

E. 結論

平成 24 年～26 年に表記の研究を行った。
 ①尿中ロイコトリエンがその測定方法の改善に種々工夫を要し、最終年にはほぼ満足でき

る測定方法の確立ができた。

②アンケート調査による喘息予知は現在も良好な結果が得られているが、小児喘息の90%が発症する6歳まであと3~4年の経過観察が必要である。

1) 達成度について

①喘鳴児における尿中LTE4

乳幼児期の喘鳴群は種々の疾患を含むが、それらを3型にわけ、コントロール群と比較した。各々の群で13~14名のサンプルが得られ、 β 刺激薬非改善群（RS以外のウイルス性喘鳴患者群）にコントロールに比して高値を示した。しかし、間欠型喘鳴群や β 刺激薬非改善群では、有意差はみられなかった。すなわち、ウイルス性喘鳴群は高値を示すことが考えられた。

②測定方法の改善

上記測定については、従来の方法にフリーラジカルスカベンチャーを加えて、MALD1-TOF/TOFを採用して、測定値の安定を計ったが、いまだ不十分であったが、最終年に新しい方法を確立できた。今後、この方法を用いて測定を行いたい。

③喘鳴児のクラスター解析

55例の喘鳴患者は大きく4つのクラスに分類され、A群に喘息と診断されたもののが多かった。今後、更に例数を増加させ、尿中ロイコトリエンとの比較や経過観察が必要である。

④喘息の予知

これらについてはすでに約1,000名について、経過観察を行っており、かつROC曲線から信頼すべき方法であることが示唆されているので、今後さらに継続したい。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

乳幼児喘鳴の鑑別と喘息発症のメカニズム、危険因子、予知は治療法の確立にも関わらず不十分である。また、国際的にも種々の取り組みがなされていたが、いまだ結論を得ていない。

近年、早期診断、早期治療はその予後に関連すること、その予後に関連すること、さらには小児期の気道感染や難治性喘息が成人期のCOPD発症にも関与すると報告されている。

以上のこと考慮すると、今回のプロジェクトの結論を出すことは、将来の喘息の予後改善やCOPD発症阻止に重要なインパクトを与えるのみならず、高齢化する国民にも福音となりうる。

3) 今後の展望について

これらの成果をさらに確実なものとして、国際的雑誌に発表するとともに、一般臨床の場で役立てたい。

4) 研究内容の効率性について

対象となる患児は第一線のクリニックを受診する場合が多く、一方尿中ロイコトリエン測定は研究機関での検討が必要である。今回は研究協力者に第一線の小児科医を配し、さらに彼等が臨床上の判断をしていくことで、ばらつきを少なくすることができた。また、採尿等や経過観察が継続的にできた。

一方、クラスター解析やu-LTE4測定は研究機関で行い、さらにコーディネーターとして森川が入り、複数回の検討会議を行うことができた。

以上、アンケート調査によるクラスター解析と喘息予知テストを行い、同時に尿中ロイコトリエンE4の測定を新しい方法で行うことができた。喘鳴児のクラスター解析と尿中ロイコトリエンE4の測定は喘鳴における鑑別診断に有用である可能性が考えられた。また、喘息の予知については高率に予知できると思われた。

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Morikawa A. Think globally, act locally. Asia Pac Allergy. 2013; 3(2):77-8
- 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):521-6

- 3)森川昭廣. 小児気管支喘息の内科医へのバトン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：P-150 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):424-424
- 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):1293-1293

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気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 2.学会発表

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

**厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業
（免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野）））
総合分担研究報告書**

**『喘息死ゼロ作戦』の軌跡とその成果に関する研究
『喘息死ゼロ』達成の基盤としての薬剤師による患者吸入指導体制の確立に関する研究**

研究協力者 大林浩幸 東濃中央クリニック 院長、東濃喘息対策委員会 委員長
山田秀樹 岐阜県薬剤師会理事 前東濃支部支部長、東濃喘息対策委員会幹事委員
奥村昌彦 岐阜県薬剤師会 恵那支部前支部長、東濃喘息対策委員会幹事委員
石川正武 いきいき健康薬局 薬局長、東濃喘息対策委員会幹事委員

研究要旨

厚労省の『喘息死ゼロ作戦』を受け、岐阜県東濃地区に立ちあがった東濃喘息対策委員会は、独自の医療連携システムを構築し活動している。特に、喘息治療の核となる吸入ステロイド薬の普及と安定した治療継続には、薬剤師と連携した患者吸入指導が重要である。当委員会では、薬剤師対象の吸入指導セミナーを継続して開講し、全国初の委員会認定吸入指導薬剤師の体制を整備し、すでに約6年が経過した。本報告は、東濃地区の認定吸入指導薬剤師らが纏めた、患者吸入指導の調査報告を行う。また、他県で薬剤師アンケート調査を行ったので、報告する。

A. 研究目的

厚生労働省が提唱した『喘息死ゼロ作戦』の達成のため、2009年7月に組織された東濃喘息対策委員会（岐阜県）は、あらゆる医療職種が連携する独自の連携システムを構築し、現在も活動している。その中でも、医薬連携の構築を最重要課題と位置付け、活動を行っている。喘息治療の主軸となる吸入ステロイド薬（配合剤含む）は、患者の吸入器具（デバイス）の誤操作（ピットホール）が多く、治療効果や患者のアドヒアランスにも大きな影響を及ぼす。そのため、吸入薬の処方の受け皿となる、薬剤師における患者吸入指導は非常に重要である。東濃喘息対策委員会は、東濃地区内の全調剤薬局薬剤師を対象に、市販の全吸入器具（デバイス）を直接手にして、その使用法や特性を実地で学ぶ機会を提供する吸入指導セミナーを行ってきた。これまで、東濃地区全165薬局の100%受講率を達成し、継続している。さらに、岐阜県薬剤師会の東濃地区薬剤師会と恵那地区薬剤師会の全面的な協力と許可を受けて、受講した薬剤師対象に、吸入指導に関する検定試験を行ってきた。患者吸入指導を行う上で、十分な知識と技量が身についているか、検定試験を

実施し、薬剤師の認定化を行ってきた。東濃地区すでに、149名の認定吸入指導薬剤師が誕生し、現在、その内109名が更新試験を受け、活動している（図1）。

今回、その認定吸入指導薬剤師によって行われている患者吸入指導は効果があるかを検討する。

さらに、東濃喘息対策委員会が認定吸入指導薬剤師養成時に、デバイス名の呼称の間違いが多いことに気が付いた。患者指導する基礎として、デバイス名を正しく呼称できるることは当然であるが、この現象は他県もあるのかを調査した。

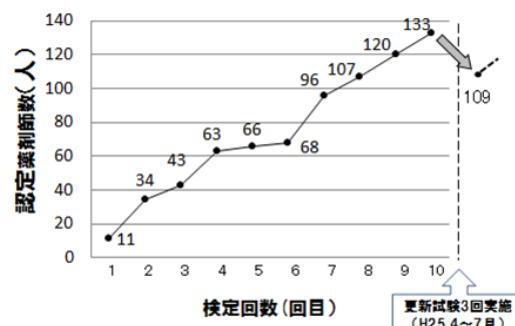


図1. 認定吸入指導薬剤師数の推移（岐阜県東濃地区）

B. 研究方法

【研究 1】薬剤師アンケート調査：薬剤師はデバイス名を間違いなく呼称できるか？

東濃喘息対策委員会委員長が招致された日本各地の講演会で、患者指導体制のシステムが未だ十分に整備出来ていないと考えられる地区において、当該地区的薬剤師会の許可と協力の下、講演会に聴講参加する薬剤師を対象に各種吸入器具の写真を見てそれらの名称が正しく答えられるか、呼称名の小テストを行った。調査期間は2013年2月～11月とし、北海道、岩手県、新潟県、茨城県、栃木県、静岡県、愛知県、岐阜県(東濃地区外)、三重県、岡山県、香川県の11県の中にある、地区薬剤師会で調査を実施した。

【研究 2】認定吸入指導薬剤師による吸入指導で、患者の理解はより深まるかの調査検討
対象：東濃地区の認定吸入指導薬剤師の在籍する薬局において患者吸入指導を行い、その後再来した患者を対象とした。

方法：処方医による吸入指導後、認定吸入指導薬剤師の在籍薬局にて再度吸入指導することで患者の理解が深まったかを無記名アンケート調査した。調査期間：2014年6月～7月とした。

【研究 3】認定吸入指導薬剤師によるエリプタ®の吸入誤操作（ピットホール）の検討
対象：エリプタ®の処方箋を認定吸入指導薬剤師在籍薬局に持ち込み、吸入指導を受けた患者

方法：処方時に医師から行われた吸入指導後に、認定吸入指導薬剤師が吸入指導し、ピットホールが発生していないかを検討した。その後、2週間と4週間目も認定吸入指導薬剤師がピットホールの発生がないかを詳細に検討した。

調査期間：2013年12月～2014年6月とした。

【研究 4】認定吸入指導薬剤師によるフルティフォーム®の吸入誤操作（ピットホール）の検討

対象：エリプタ®の処方箋を認定吸入指導薬剤師在籍薬局に持ち込み、吸入指導を受けた患者

方法：処方時に医師から行われた吸入指導後に、認定吸入指導薬剤師が吸入指導し、ピットホールが発生していないかを検討した。その後、2週間と4週間目も認定吸入指導薬剤師がピットホールの発生がないかを詳細に検討した。

調査期間：2014年5月～2014年8月とした。

(倫理面への配慮)

アンケートは無記名とし、結果等は個人情報として管理し、厳格に扱った。

C. 研究結果

【研究 1】薬剤師アンケート調査：薬剤師はデバイス名を間違いなく呼称できるか？

アンケート回答結果：11県合計で441名の薬剤師から有効回答を得た。

問 1) 患者さんにどのような方法の吸入指導をされていますか？：50.1%が自らが模範を示し患者も実践する双方性の指導をしていたが、33.6%は模範を示したのみ、11.8%は説明書を見ながら患者が実践したのみ、1.6%は添付説明書を読むように促すのみであった。2.9%は吸入指導を行っていないと回答した。

問 2) 自信を持って患者へ吸入指導ができますか？：3.2%が非常に自信がある、25.6%が自信があると回答した。一方、30.2%はなんとなく自信が無い、5.2%は全く自分が無い、35.6%はどちらでもないと回答した。

問 3) 薬剤師が行う、患者吸入指導の役割は重要と考えますか？：68.5%が非常に重要、30.4%が重要と回答した。0.7%はどちらでもないと回答した。重要でないと回答は0.0%であった。

問 4) 先生ご自身が、これまで正しい吸入方法の仕方の、指導を受けたことはありますか？：33.1%がこれまで一度もない、24.0%が過去に1度あったと回答し、複数回あったとの回答は39.2%であった。

問 5) これまで間違った（曖昧な）吸入指導をしていたと、講演会後に感じましたか？：43.5%が非常に感じたと回答し、40.6%は少し感じたと答えた。9.4%はどちらでもないと回答したが、感じないと回答は2.5%であった。

今回の調査11県で、365名の薬剤師が、デバ

イス名呼称の小テストに答えた。正しい名称を答えた薬剤師の割合(%)は、ディスカス: 81.9 ± 13.7 、ディスクヘラー: 21.3 ± 20.2 、タービュヘイラー: 48.8 ± 17.9 、ツイストヘラー: 26.7 ± 15.5 、ブリーズヘラー: 21.1 ± 20.6 、クリックヘラー: 25.0 ± 14.2 、ハンディヘラー: 27.0 ± 19.4 、レスピマット: 56.2 ± 19.3 であった。ディスカスの呼称正答率は、調査11県間の格差は少なかった。一方、他のデバイスは、地域間で正答率に大きな格差があった。ディスクヘラー: $0.0 \sim 62.9\%$ 、タービュヘイラー: $24.0 \sim 74.3\%$ 、ツイストヘラー: $6.8 \sim 54.3\%$ 、ブリーズヘラー: $0.0 \sim 60.0\%$ 、クリックヘラー: $7.1 \sim 50.0\%$ 、ハンディヘラー: $8.2 \sim 62.9\%$ 、レスピマット: $25.0 \sim 100.0$ と、正答率自体に大きな格差があつた。

【研究2】認定吸入指導薬剤師による吸入指導で、患者の理解はより深まるかの調査検討期間中、認定吸入指導薬剤師の指導を受けた患者102名(男:女=49名:53名)が無記名アンケート調査に回答した。病院、医院で医師から吸入指導を受けた患者の中で、ピットホールを含めしっかりと理解できていた患者が48%であったが、認定吸入指導薬剤師による吸入指導後に、62%に増加していた。

【研究3】認定吸入指導薬剤師によるエリプタ[®]の吸入誤操作(ピットホール)の検討
いずれの年齢層においても、医師の処方と吸入指導後に行った、薬局での吸入指導時に(0週間)、ピットホールはほとんど発生していなかったが、2週間後の再確認時に新たなものが多く発生した。これらのピットホールは、2週間目の吸入指導後、4週間後には著明に減少した。特に、高齢患者では、ピットホールの発生が多く、4週間目でも改善できていないものがある。

		0W	2W	4W
ピットホール1	吸入前に薬剤残量カウンターを確認していない	1	0	1
ピットホール2	カバーをカチン音がするまで開けてない	0	2	2
吸入時				
ピットホール3	通気口を指で塞いで、吸入している	0	2	0
ピットホール4	吸入時に、デバイスに息を吹きかけている	0	0	1
ピットホール5	薬剤を深く力強く吸入していない	2	12	2
ピットホール6	吸入時に、口角が開いたままになっている	1	17	2
ピットホール7	吸入時に、吸入口を舌で塞いでいる	0	0	1
ピットホール8	吸入後に十分な息止めが出来ていない	1	4	2
吸入後				
ピットホール9	吸入後にカバーをしっかりと閉めていない	0	0	0
ピットホール10	吸入後にしっかりとうがいをしていない	1	2	3
		6	39	14

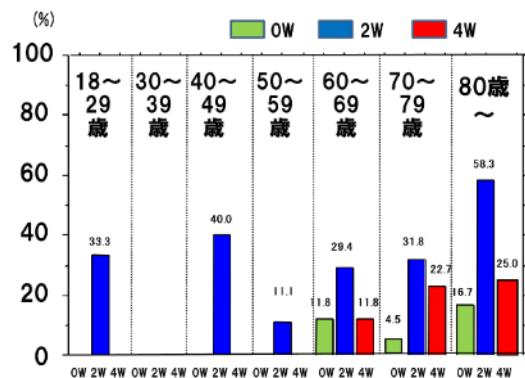


図. 年代別のピットホール発生率の推移 (4週間)

【研究4】認定吸入指導薬剤師によるフルティフォーム[®]の吸入誤操作(ピットホール)の検討

切換え時の吸入指導直後に、「ボンベが固くて押し難い」、「呼吸同調が困難」、「キャップが開けにくい」等のピットホールが各々25.0%、25.0%、20.0%の患者に認めたが、2週間後には各々2.5%、7.5%、7.5%まで減少した(図2)。一方、「吸入前の振り忘れ」のピットホールが、2週間後に5.0%から10.0%へ增加了。

D. 考察

【研究1】薬剤師アンケート調査：薬剤師はデバイス名を間違なく呼称できるか？

今回の調査により、対象のほぼ全ての薬剤師が、患者吸入指導は重要と回答したが、その一方、薬剤師自身が正しい吸入方法の仕方の指導を受ける機会は少なく、その指導方法にも統一性が無く、自信を持って、日々の患者吸入が行えている薬剤師は、少数であることが明らかとなった。吸入指導の講演会後に、8

割以上の薬剤師がこれまで自ら行ってきた吸入指導が間違った、あるいは曖昧なものであったと回答している。その実情は、講演会前に行ったデバイス名呼称の小テストにも表れている。薬剤師は当然吸入薬をよく知っているだろうと一般に予想される中、デバイス名さえも正しく認識できていない薬剤師が非常に多いという、驚愕な実態が明らかとなった。このことは、特定の県の中ではなく、日本全国の様々な地域において、同じように見られる現象である。今回の調査対象は、吸入指導の講演会に参加した薬剤師であり、吸入指導に比較的興味がある、あるいは携っている薬剤師を母集団としたものである。にもかかわらず、このような深刻な結果となり、市中一般の調剤薬局薬剤師では、さらに事態は厳しいものであろうと予想できる。同じデバイスであっても、その呼称正答率は、地域間で大きな格差があることも、今回得られた特徴的な結果の1つである。全てのデバイスに触れたことがある薬剤師は、かなり少数派であり、これまで吸入指導したことが無い薬剤の処方箋が突然持ち込まれて、説明書のみを頼りに、曖昧な自信が無い吸入指導が行われている現象が、日本全国各地で生じている。

【研究2】認定吸入指導薬剤師による吸入指導で、患者の理解はより深まるかの調査検討
認定吸入指導薬剤師による吸入指導で、患者の理解はより深まると言える。

【研究3】認定吸入指導薬剤師によるエリプタ®の吸入誤操作（ピットホール）の検討
処方医により、吸入指導が行われ、その後の薬剤師の吸入指導で、吸入操作が正しく確認が行われた場合であっても、2週間後に様々なピットホールが発生した。2週間後に、再度吸入指導を行うことで、4週間後に、その多くが改善できた。しかし、高齢患者ではピットホールが多く、4週間後にも改善できないものがあり、継続的な吸入指導が必要である。

【研究4】認定吸入指導薬剤師によるフルティフォーム®の吸入誤操作（ピットホール）の検討

フルティフォーム®の吸入手技操作は簡便

で、切換え時のピットホールの多くは、吸入指導後、短期間で改善できる。切換えで喘息コントロールが有意に改善し、臨床的にも有用である。患者自身がピットホールに気付かない場合や、新規発生例があり、特に高齢者では、継続的な吸入指導が必要である。

E. 結論

東濃喘息対策委員会は、これまで東濃地区内で、均一で良質な吸入指導体制の整備と維持を行い、喘息死がほぼゼロになるなどの、一定の成果を挙げてきた。しかし、当委員会がこの活動を行う以前の東濃地区内の実態は、今回の11県のアンケート結果とほぼ同様であり、患者に対する指導内容も不均一で曖昧なものが多々、地区内で大きな格差があった。今回の調査で、日本の各地での実態が明らかとなり、今後、東濃喘息対策委員会が行ってきた活動は、1つのモデルケースとして参考になり、この現状を改善出来る可能性があると考える。

東濃喘息対策委員会で行ってきた、薬剤師対象の吸入指導セミナーによる吸入指導方法と、それを基盤とした検定システムは、他地区の薬剤師の吸入指導方法の定着化に有効である。

G. 研究発表

1.論文発表

- 1)大林 浩幸. 臨床現場における患者吸入指導のコツとそこに潜むピットホール. 日本薬学会誌 ファルマシア. 2012, 48(4):209-295.
- 2)大林 浩幸. 岐阜県東濃地区の『喘息死ゼロ作戦』(均一で良質な吸入指導体制の確立に向けて). 日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会誌. 2012, 10(1):7-12.
- 3)大林 浩幸. 中等度喘息患者における、喘息テレメディシンシステムのアドヒアラント改善効果. アレルギー・免疫. 2012, 19(4):95-102.
- 4)大林 浩幸.『吸入デバイス操作のピットホール』—添付説明書だけで本当に的確な

- 吸入が出来るのか？—』 喘息. 2012, 25(2):1-4.
- 5)大林 浩幸. 吸入指導のコツとピットホール クリニシアン. 2012,692: 151-156.
- 6)大林 浩幸. 成人気管支喘息の難治化要因とその対策 II. 各論 2.治療に対する理解やアドヒアランスの低さ. 一吸入指導はなぜ必要か?、どのような指導が最も効果的か？—. アレルギー免疫. 2013, 20(4):27-36.
- 7)大林 浩幸. 喘息の難治化要因とその対策. 患者側の要因:服薬アドヒアランスと吸入手技(難治性喘息とみなされる吸入デバイス誤操作). 呼吸器内科. 2013, 23(2):139-145.
- 8)大林 浩幸. 薬局活用で治療効果アップ！ 日経メディカル. 2013, 3月号. 36-37.
- 9)大林 浩幸. 吸入指導のポイントやコツ. 日経DI.2013年6月号.
- 10)大林 浩幸. 『DPI と pMDI のこれだけは 守らせたい吸入指導のポイント』. 吸入療法. 2013, 5(2):104-112.
- 11)大林 浩幸. 薬剤師の職能を活かす！吸入指導のコツ① 吸入指導とは何をすることか？ApoTalk. 2013, 32: 12-13.
- 12)大林 浩幸. 薬剤師の職能を活かす！吸入指導のコツ② 吸入指導ナビゲーションが出来る薬剤師の養成. ApoTalk 2013, 33:12-13.
- 13)大林浩幸. 新規 MDI 型製剤フルティフォーム®における吸入手技操作のピットホールと患者習得度の検討. アレルギー・免疫. 2014,21:124-132.
- 14)大林浩幸. 新規 MDI 型製剤フルティフォーム®による末梢気道炎症改善効果(無作為オーブン並行群間試験による検討)』アレルギー・免疫. 2014,21:134-142.
- 15)石川 正武,大林 浩幸. 調剤薬局における吸入指導－認定吸入指導薬剤師と医薬連携の試み－. Respiratory Medical Research. 2014, 2(1):57-60.
- 16)大林浩幸. ピットホール実例から見た、喘息・COPD における継続的な吸入指導の重要性. Clinical Respiration 2015 年 4 月号印刷中
- 17)大林浩幸. 成人喘息治療とアドヒアランス. 喘息、2015 ; 28 (1) :印刷中
- 18)大林浩幸. よりよい服薬指導のための基礎知識. 喘息/COPD. 患者さんは吸入薬をきちんと使っていますか. クレデンシャル. 2015,62:24-30.
- 2.学会発表
- 1) Ohbayashi H, M.Adachi M. Preventative effects of aerosol-type salmeterol/fluticasone combination on residual asthmatic inflammation in distal airway of patients with moderate asthma. ATS 2012, Session: C34, Asthma Therapy, San Francisco.
 - 2) Ohbayashi H. Improved effects of aerosol-type fluticasone propionate/formoterol combination on residual asthmatic inflammation in distal airways of patients with moderate asthma. ERS2014, Munich.
 - 3) Ohbayashi H, Setoguchi Y, Fukuchi Y, Shibata K, Sakata Y, Arai T. Pharmacological effect of lysozyme for COPD and bronchial asthma with sputum: a randomized, placebo-controlled, cross-over study. ERS2014, Munich.
 - 4) 大林 浩幸、奥村 昌彦、山田 秀樹. 岐阜県東濃地区における患者吸入指導体制構築の試み. 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2012, 大阪.
 - 5) 大林 浩幸. 「患者吸入指導のコツと吸入デバイス操作法のピットホール」. 第 56 回日本薬学会関東支部大会 ランチョンセミナー. 2012.10.13, 東京.
 - 6) 大林 浩幸. 「地域で築く医療ネットワーク」岐阜県東濃地区の医薬連携による患者吸入指導体制整備の試み. 第 56 回日本薬学会関東支部大会 シンポジウム 2.

- 2012, 東京.
- 7) 大林 浩幸. 『効率的な吸入指導を行うための Q and A』. 教育講演 5、第 24 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2012.9, 大阪.
- 8) 大林 浩幸. Establishment of certified inhalation guidance pharmacists to enhance patients' adherence. 国際シンポジウム 2、第 24 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2012, 大阪.
- 9) 大林 浩幸. 吸入デバイスに対する市中調剤薬局薬剤師の実態調査. 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2013、横浜.
- 10) 大林 浩幸. 患者さんの視点に立った吸入指導を目指して. 第 23 回日本医療薬学会講演. ランチョンセミナー. 2013、仙台.
- 11) 大林 浩幸. 薬剤師は吸入デバイス名を正しく答えられるか(薬剤師対象アンケート調査結果より). 第 63 回アレルギー学会. 2013、東京
- 12) 大林浩幸. フルティフォームの末梢気道炎症改善効果の検討(中間報告). 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2014, 京都.
- 13) 大林浩幸. フルティフォームにおける吸入手技操作のピットホールと習得度の検討. 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2014, 京都

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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻(号)	ページ	出版年
Saito J, Sato S, Fukuhara A, Sato Y, Nikaido T, Inokoshi Y, Fukuhara N, Saito K, Ishii T, Tanino Y, Ishida T, Munakata M	Association of Asthma Education with Asthma Control Evaluated by Asthma Control Test, FEV(1), and Fractional Exhaled Nitric Oxide.	J Asthma	50(1)	97-102	2013
Munakata M	Exhaled nitric oxide (FeNO) as a non-invasive marker of airway inflammation.	Allergol Int	61(3)	365-372	2012
Yamamoto T, Tsutsumi N, Tochio H, Ohnishi H, Kubota K, Kato Z, Shirakawa M, Kondo N	Functional assessment of the mutational effects of human IRAK4 and MyD88 genes	Mol Immunol	58	66-76	2014
Inoue Y, Shimojo N	Epidemiology of virus-induced wheezing/asthma in children.	Front Microbiol	4	391	2013

IV. 主な成果物

自己管理法を含む喘息死ゼロ作戦の 実行に関する指針

平成24～26年厚生労働科学研究費補助金
免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

「気管支喘息に対する喘息死の予防や自己管理法の
普及に関する研究」研究班作成

目 次

1. 現状と課題	2
2. 喘息死ゼロ作戦とは	5
3. 実行のための組織	6
4. 実施内容の実際	6
(1) モデル医療圏における診療体制の確保及び医療連携事例集の作成	6
(2) 病院や診療所等の医療関係者を対象とした研修の実施	8
(3) 患者カードの配布の促進並びに患者自己管理の普及	12
(4) 喘息診療担当医師名簿の作成等による医療機関情報の提供	13
(5) 地域の喘息患者の実態把握を目的とした分析調査の実	14
(6) 事業実施の評価	14
資料 喘息の疾患としての特徴（医療関係者向け資料）	15
1. 喘息の病態	15
2. 喘息の疫学	16
3. 喘息の臨床	20
4. 治療	23

平成24～26年厚生労働科学研究費補助金
免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業
「気管支喘息に対する喘息死の予防や自己管理法の
普及に関する研究」研究班作成

研究代表者 大田 健
独立行政法人国立病院機構東京病院 院長

研究分担者

棟方 充 福島県立医科大学医学部呼吸器内科学講座 教授
東田有智 近畿大学医学部内科学講座呼吸器アレルギー内科部門 教授
檜澤伸之 筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻
呼吸器病態医学分野 教授
近藤直実 岐阜大学 名誉教授／平成医療短期大学 学長
下条直樹 千葉大学大学院医学研究院小児病態学 准教授
田中明彦 昭和大学医学部内科学講座呼吸器・アレルギー内科 講師
長瀬洋之 帝京大学医学部内科学講座呼吸器・アレルギー学 准教授

平成26年11月3日まで

秋山一男 独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター
センター長

平成26年11月4日から

釣木澤尚実 独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター 医師

研究協力者

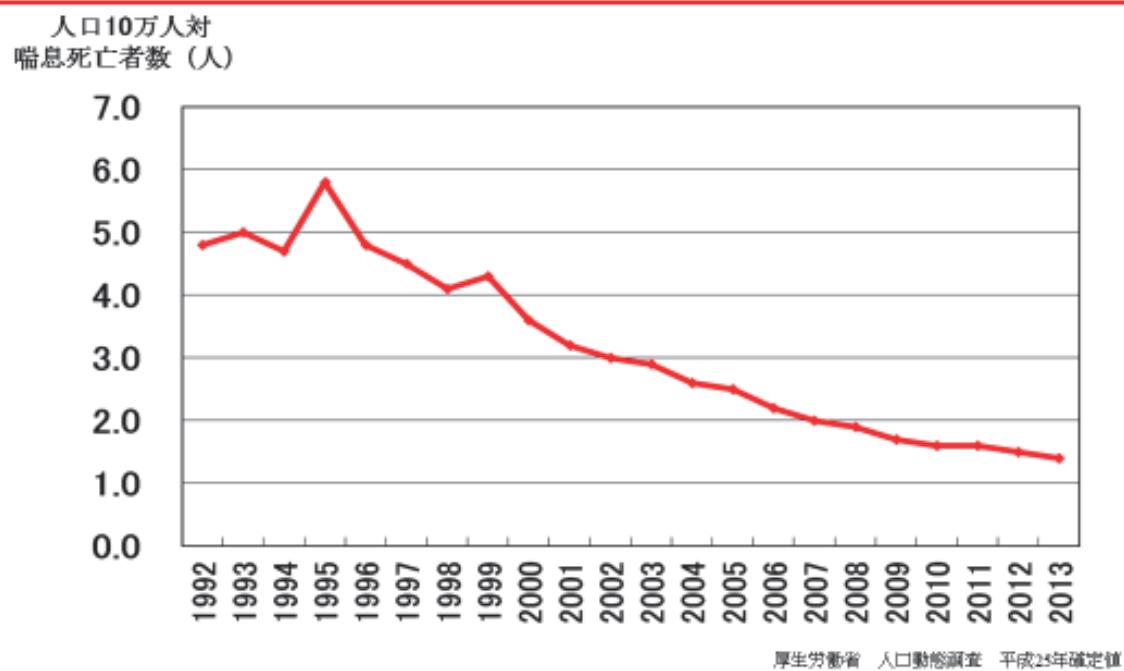
井上博雅 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科呼吸器内科学 教授
大林浩幸 東濃中央クリニック 院長／東濃喘息対策委員会 委員長
森川昭廣 社会福祉法人希望の家附属北関東アレルギー研究所 所長
中村浩之 金沢大学医薬保健研究域医学系環境生態医学・公衆衛生学 教授

1. 現状と課題

厚生労働省人口動態調査によると、5～34歳の年齢階級別喘息死亡率は、1995年には10万人当たり0.7人であったが、1996年以降減少し始め2001年には0.3人まで減少し、2007年からは総数0.1、男0.1、女0.1以下となり、さらに低下して、わが国の5～34歳の年齢階級喘息死亡率は国際的には最も低い群に属するに至っている。

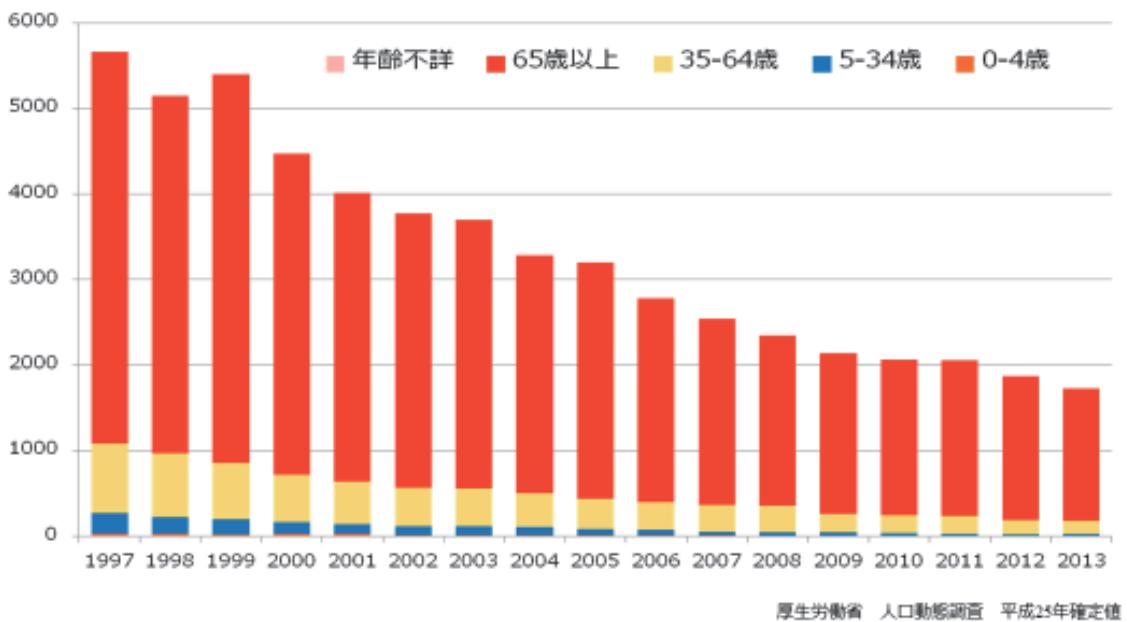
また、全年齢における喘息の死亡数は、1995年7,253人とピークを示した後1996年5,926人と減少し、2000年4,427人、2004年3,283人と順調に減少してきた。そして、「喘息死ゼロ作戦」の取り組みが開始された2006年には前年の3,198人から2,778人へと減少し、2013年には1,728人（10万人当たり1.4人）まで減少して7年間で1,050人の減少をみている（図1）。

図1 喘息死亡率（人口10万人対） 全国



しかし、さらに喘息死をゼロに近づけ喘息の予後を改善するためには、より有効な対策が必要である。なお、死亡患者の年齢は、小児の喘息死亡率は減少して低率となり、2011年の19歳以下の喘息死亡数（総数）は5人であるが、成人では65歳以上の高齢者が毎年80～90%を占めており、高齢者喘息への対応が今後の課題である（図2）。

図2 年齢別 喘息死

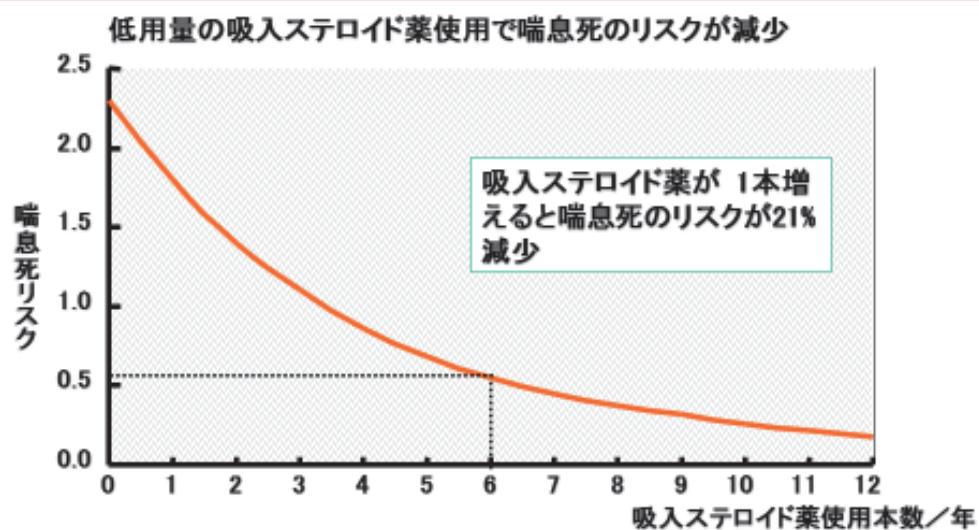


死亡に至る原因是、重篤な発作による窒息死である。そして、重篤な発作の誘因としては、気道感染が最も多く、過労、ストレスがこれに続き三大誘因をなしている。その他には、治療薬の中止、短時間作用性吸入 β_2 刺激薬の過剰使用、副腎皮質ステロイド(ステロイド)の中止・減量、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)の投与によるアスピリン喘息の誘発、 β_2 遮断薬の使用(降圧薬、点眼薬)などが挙げられている。成人喘息死では、発作開始後1時間以内が13.6%、3時間以内と合わせると29.7%となり、急死が多い。発作から死亡までの状況は、突然の発作で急死が29.8%、不安定な発作の持続後の急死が16.2%、不連続な発作後の急死が17.2%で、重い発作で苦しみながら悪化して亡くなる(21.2%前後)よりも圧倒的に急死が多い。しかし、喘息死の解剖による検討では、臨床的には急死でも気道では慢性に炎症が存在し、悪化した結果であることが示されている。すなわち日常の喘息の管理が不十分な状態で生活していることが、喘息死を来すような重篤な発作を誘発する原因であるとされている。

したがって、喘息死の予防には、炎症を鎮静し維持するための治療、すなわち炎症を標的とした長期管理の治療の実行が有効と考えられる。そして、吸入ステロイドは、炎症を抑制する効果が最も強力で確実な薬剤として位置付けられている。すなわち、吸入ステロイドをベースにした長期管理を実行することにより、気道の炎症は抑えられ、良好な喘息コントロールがもたらされる。吸入ステロイドの使用が喘息死を予防することは、吸入ステロイドの普及率と喘息死とが反比

例することから広く認められている。ある報告では、吸入ステロイドの使用本数が年に1本増える毎に喘息死のリスクが21%減少すると概算している（図3, Suissa et al: N Engl J Med 343: 332, 2000）。

図3 吸入ステロイド薬使用量と喘息死リスク



対象：カナダの健康保険データベースに登録されていて、1975～91年の間に喘息薬を使用した者について97年末まで追跡調査し、喘息死亡例66例（喘息死亡群）を特定。この喘息死亡群に対し年齢と性別が合致する生存喘息患者2,681例（コントロール群）をデータベースから抽出。

方法：喘息死亡群とコントロール群で、使用薬剤と喘息死リスクとの関連を分析した。

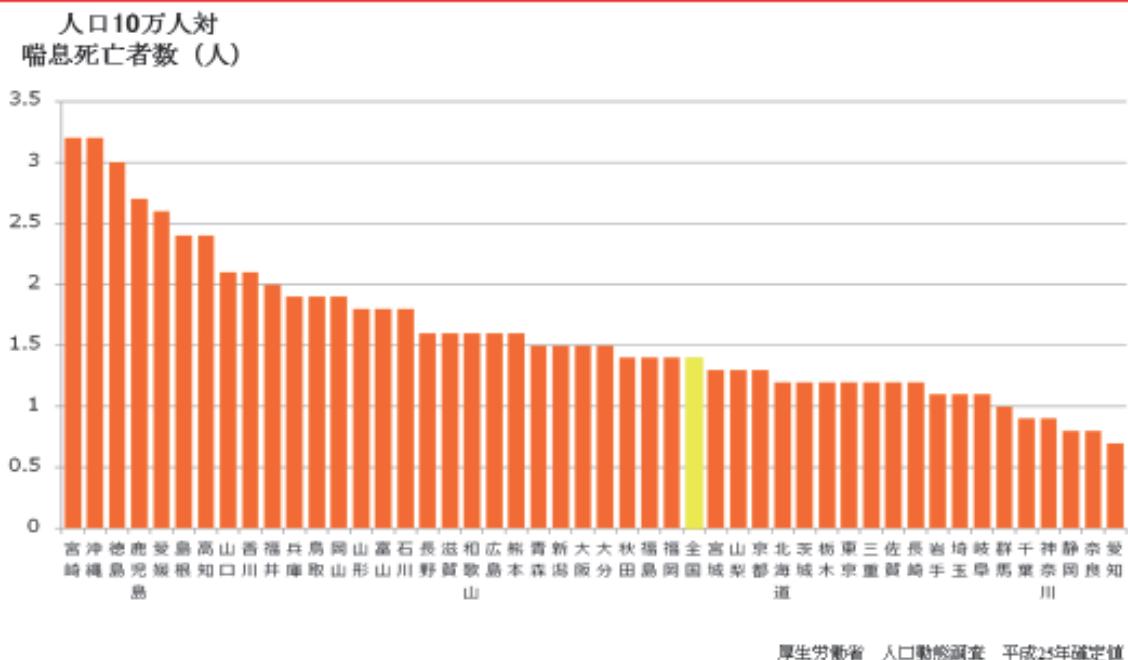
Suissa S. et al.: N Engl J Med 343 (5); 332, 2000

このような背景から、喘息死は、吸入ステロイドをベースに患者の重症度により治療を組み立てる喘息予防・管理ガイドライン 2012 (JGL2012)、さらに最新の情報を加えたアレルギー総合ガイドライン 2013 (JAGL2013) 等に示された標準的な長期管理を普及し実行することにより予防できると考えられる。また重篤な発作に至っても、発作への対応が十分かつ適切に施行できれば、喘息死を減少させることは可能であると考えられる。

そこで、各都道府県は、全国で喘息死ゼロを実現するために、本作戦に参加することを強く望まれている。

これまでの調査で、都道府県別の喘息の死亡率には、大きなばらつきがみられている（図4）。2013年の調査で、10万人あたりの死亡率の全国平均1.4人に対して、2.5人以上の所は、多い順に宮崎県、沖縄県、徳島県、鹿児島県、愛媛県である。さらにそれに次いで2.0人を超えてるのは島根県、高知県、山口県、香川県である。このような疫学調査の結果は、毎年多少は変化しているが、以上のような自治体あるいは全国平均を上回る自治体では、より積極的に喘息死ゼロ作戦に参加し、本作戦を実行することが望まれる。

図4 喘息死亡率(人口10万人対) 2013年



2. 喘息死ゼロ作戦とは

喘息死ゼロ作戦とは、予防できる死亡である「喘息死」をゼロにすることを目指として、地域の関係者が連携して病診連携の構築や普及啓発、患者の自己管理の徹底等を図り、医療の質の向上を図るための取り組みである。

そして喘息死をゼロ作戦における最も重要な取り組みは、EBM (evidence based medicine) をベースに作成されたガイドラインに沿った喘息治療の普及である。わが国のガイドライン JGL2009においては、吸入ステロイド (ICS) を第一選択薬とする長期管理をかかりつけ医において実施すること、患者が普段から自己管理を行うこと、さらに適切な急性増悪（発作）への対応を行うことが標準的な治療とされている。

喘息死を予防するためには、現実の喘息の診療において次のような課題がある。

- ・喘息の病態には、慢性の気道炎症が重要であることの認識が不十分
 - ・慢性の気道炎症を標的とする長期管理の実行が不十分
 - ・長期管理の第一選択薬である吸入ステロイド（ICS）についての理解と使用が不十分
 - ・喘息の状態の客観的な評価が不十分
 - ・喘息死の約90%を占める高齢者喘息についての認識が不十分
 - ・喘息発作に対する救急体制の整備が不十分
 - ・専門医と非専門医との連携、医師とコメディカル（看護師、薬剤師、救命救急士など）との連携、病診連携などの医療現場での協力体制の整備が不十分

3. 実行のための組織

都道府県に診療所、病院、保健所、その他の医療関係者、関係市区町村、患者会等からなる地域医療連絡協議会を設置し、自治体の現状に即した喘息死ゼロ作戦を実行する。

なお、本研究班においては、日本アレルギー学会および日本アレルギー協会の各支部会の協力のもと、喘息診療におけるオピニオンリーダーの医師から構成される「喘息死ゼロ作戦推進委員会」を設置しており、作戦が効果的に遂行されるよう各地の地域医療連絡協議会を支援する。「喘息死ゼロ作戦推進委員会」の委員に、地域における専門家として、各自治体の地域医療連携協議会の委員として参画を求めることも考えられる。

喘息死ゼロ作戦推進委員会 委員

北海道：西村正治（北海道大学）

東北：田村 弦（仙台気道研究所）

関東・甲信越：土橋邦夫（群馬大学）

北陸：藤村政樹（国立病院機構七尾病院）

中部・東海：新美彰男（名古屋市立大学）

近畿：東田有智（近畿大学）

中国：宗田 良（国立病院機構南岡山医療センター）

四国：横山彰仁（高知大学）

九州：興梠博次（熊本大学）

4. 実施内容の実際

（1）モデル医療圏における診療体制の確保及び医療連携事例集の作成

都道府県と地域医療連絡協議会は、地域医師会、救急医療機関等、専門医療機関等の協力を得て、地域の状況に応じた病診連携システムを構築する。

診療体制の構築に当たっては、喘息患者が発作時に受診するだけではなく、ガイドラインに従った長期管理を適切に実施できる体制が求められる。

このため、かかりつけ医、救急医療機関、専門医療機関が連携したうえ、

- ①かかりつけ医において、ガイドラインに基づく標準治療を広く実施する
- ②かかりつけ医において、喘息の診断未確定で診断に難渋する例や、難治例を専門医療機関に紹介する
- ③救急医療機関における発作（急性増悪）時の診療後に、かかりつけ医等における長期管理に結びつける
- ④診断確定後、症状が安定している例については、長期管理が適切に行われるよう、専門医療機関からかかりつけ医への、いわゆる「逆紹介」を行う

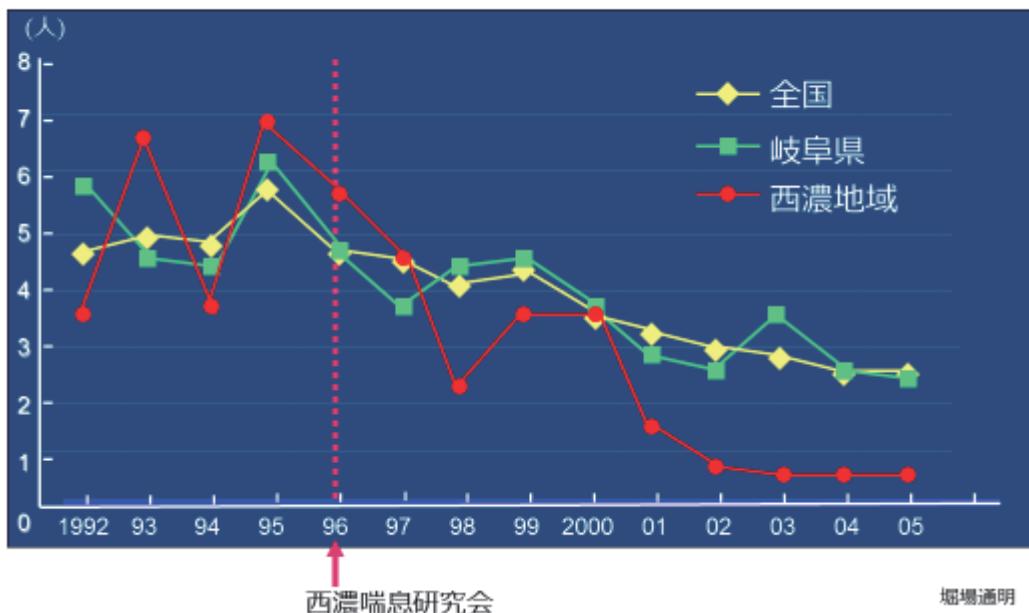
などの取り組みを推進する。それぞれの医療機関において、喘息の長期管理の重要性と、ガイドラインに基づく治療方法を理解し実施するとともに、患者カード（後述）の使用等、治療内容に関して相互の情報提供をスムーズに実施するとともに、患者に対し適切な指導を行い、アドヒアランスの向上を図ることが重要である。

また、喘息死ゼロ作戦においては、このような連携をモデル的な地域で推進し、事例を集積したうえ、他の地域での普及につなげることが期待される。

■事例1：これまでに、喘息の医療を改善するプログラムに関して、国全体として高く評価されている例は、フィンランドである。その内容はヘルシンキ大学のHaahtela教授を筆頭者に昨年英國の呼吸器学会誌である Thorax に報告されている (Thorax 2006; 61:663-670)。1994年から2004年の10年間に国全体で取り組んだ喘息診療の改善プログラムの成果から、プログラムの自己評価を行なっている。そして今後の目標を喘息死ゼロの達成に置いており、これまでに構築したシステムを基盤として、2008年を比較の対象にその後の3年間（2009-2011年）で目標達成を目指す計画を立てている（個人的情報）。実施されたプログラムの骨子は、喘息が炎症性疾患であることの理解を広める教育、専門医と非専門医（GPs）との連携の構築によるガイドラインの実施であり、個人および国家の喘息による負担の軽減を目標に設定したものである。これまでの成果は、入院日数、喘息死および救急受診の減少、薬剤への経費と定期受診の増加、そして結果として得られる喘息に対する医療費の減少である。国の規模、医療体制、社会の構造、文化や習慣などの違いは無視できないが、その内容はわが国がこれから実行しようとしていることに類似しており、参考となるものである。まず成功の鍵となるのは、実現を目指すための強い意欲と機能的な組織作りであることを強調している。そして国家のサポートを必須とし、共通の治療方針を理解し実行するための組織作りの重要性を示している。

■事例2：わが国における成功例としてよく知られているのが、岐阜県大垣市における取り組みである。大垣市民病院の呼吸器科部長であった堀場通明医師により推進された当地での医療体制の整備では、基幹病院を中心とする病診連携の強化、非専門医への徹底した啓発活動、薬剤師や看護師などのコメディカルへの啓発活動、患者の教育と診療カードの携行励行、救急医療体制における喘息発作への適切な対処の啓発などが実行された。その結果、該当する西濃地域における喘息死は、活動開始時の1996年には10万人当たり5.7人であったのが、2001年には1.6人、2003年には0.62人程度にまで減少した（図5）。このほか、ガイドラインの普及率の改善などの成果がみられた。この方法は、示唆に富むものであり、本作戦の参考になるものである。

図5 全国、岐阜県および西濃地域の喘息死者数(対10万人口)



(2) 病院や診療所等の医療関係者を対象とした研修の実施

都道府県は、地域医療連絡協議会を中心に、診療ガイドラインの実践に向けた啓発活動として、地域ごとの状況に応じた講演会等を積極的に展開する。

研修の重要性が高いテーマとして次のようなテーマが考えられ、地域における普及状況を勘案して必要な研修を実施する。

○ 喘息および小児喘息のガイドラインに基づいた標準的治療方法

喘息予防・管理ガイドライン 2012 (JGL2012) 及び小児気管支喘息治療・管理ガイドライン 2012 (JPGL2012)、さらに最新の情報を含むアレルギー総合ガイドライン 2013 (JAGL2013)、そしてガイドラインに基づいて成人喘息治療のポイントをまとめた本研究班の成果物である「成人気管支喘息治療のミニマムエッセンス」等に示された標準的治療を医療関係者が正しく理解し実行することが重要である。

○ 患者教育の方法

患者が自己管理を継続的に行うためには、発作治療薬と長期管理薬の相違、ステロイド等の吸入薬の正しい吸入法、喘息の悪化の兆候把握や発作の予防法、ピークフローモニタリングなどを患者が正しく理解することが必要であり、医療関係者にとっても患者教育のスキルが求められる。医師だけでなく、看護師、保健師、薬剤師等の連携も重要である。

また、喘息の重症度や改善の可能性を、ピークフローを測定するよりも簡便に

把握するために、イージーアズマプログラム、喘息コントロールテストが開発されており、研修の一環としてこれらの普及をすすめることも有効である。

【イージーアズマプログラムの活用】

啓発するJGL2012の実行については、すでにパイロットスタディーで成果を示したイージーアズマプログラム（EAP; Easy Asthma Program）が効果的である。図6に示した基準となる3つの評価項目からなる質問票を用いて患者の状態（重症度）を把握し、JGL2012に沿ったICSの投与量を含めた治療を施行するものである。その効果は、新潟県と香川県でパイロット研究が実施され、その有効性が実証されている（図7）。

Easy Asthma Program

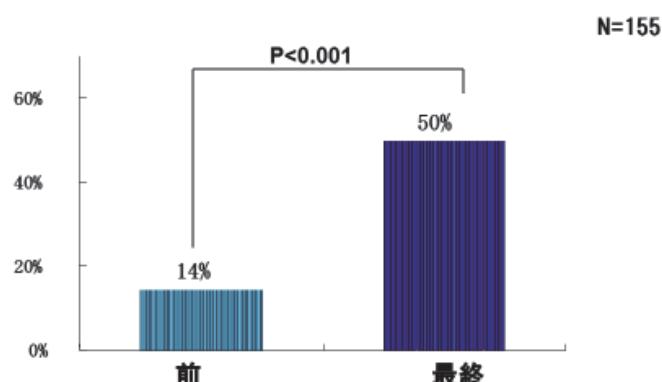
図6 基準となる評価項目

夜間症状	日常生活の状態	喘息症状の頻度
1. まったくなし	1. まったく支障なし	1. まったくなし
2. たまにあり	2. ほとんど支障なし	2. 週1-2回まで
3. 時々あり	3. 少し支障あり	3. 週2回以上
4. たびたびあり	4. ときどき支障あり	4. 慢性的に症状がある
5. ほとんどいつも	5. たびたび支障あり	5. ほぼ毎日持続
6. ぜんそくのせいで 眠れなかった	6. 非常に支障あり	7. まったくできない

EAP Pilot 成人

Easy Asthma Program

図7 導入前後における「3項目全くなし」の患者比率



EAP Pilot 成人

【喘息コントロールテストの活用】

患者の状態を把握する手段としては、患者自身が実行するピークフロー（PEF; peak expiratory flow）の測定とともに、喘息コントロールテスト（ACT; Asthma Control Test）が有用である。ACT は患者への 5 つの質問に対する解答から点数をつけ（表 1）、その点数によって患者の喘息コントロールを評価するもので（図 8）、すでに科学的な検証が行なわれ、その信頼性と有用性が有意であると評価されている。本作戦では両方を用いることを理想とするが、これまでの調査で PEF の測定の普及率が低いことから（図 9）、少なくとも ACT により患者の状態を簡便に把握することとする。

表 1 ACT —総合点数による評価—
5 項目の質問（1）

-
1. この 4 週間に、喘息のせいで職場や学校、家庭で思うように仕事や勉強がはかどらなかつたことは時間的にどの程度ありましたか？
- いつも：1 点　かなり：2 点　いくぶん：3 点　少し：4 点
全くない：5 点
2. この 4 週間に、どのくらい息切れがしましたか？
- 1 日に 2 回以上：1 点　1 日に 1 回：2 点　1 週間に 3～6 回：3 点
1 週間に 1、2 回：4 点　全くない：5 点
3. この 4 週間に、喘息の症状（ゼイゼイする、咳、息切れ、胸が苦しい・痛い）のせいで夜中に目が覚めたり、いつもより朝早く目が覚めてしまうことがどのくらいありましたか？
- 1 週間に 4 回以上：1 点　1 週間に 2、3 回：2 点　1 週間に 1 回：3 点
4 週間に 1、2 回：4 点　全くない：5 点

表 1 ACT —総合点数による評価—
5 項目の質問（2）

-
4. この 4 週間に、発作止めの吸入薬（サルタノール® やメプチンなど）をどのくらい使いましたか？
- 1 日に 3 回以上：1 点　1 日に 1、2 回：2 点　1 週間に 数回：3 点
1 週間に 1 回以下：4 点　全くない：5 点
5. この 4 週間に、自分自身の喘息をどの程度コントロールできたと思しますか？
- 全くできなかった：1 点　あまりできなかった：2 点
まあまあできた：3 点　十分にできた：4 点　完全にできた：5 点

図8 ACT点数による喘息コントロール評価

- 25点(満点)

完全に喘息がコントロールされている状態
(TOTAL Control)

- 20～24点

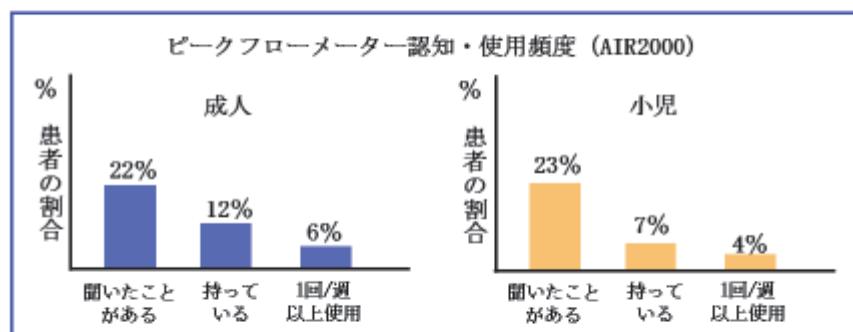
喘息が良好にコントロールされている状態
(WELL Control)

- 20点未満

喘息がコントロールされていない状態

図9 ピークフローメーターの普及状況

喘息コントロール状態の指標には呼吸機能が最も適している
が特に非専門医におけるピークフローの普及は十分ではない。



喘息コントロールのさらなる改善のためには、
より簡便な評価ツールが必要

喘息コントロールテスト

(3) 患者カードの配布の促進並びに患者自己管理の普及 (患者カードの配布)

患者個人の治療内容と急性増悪時の対応、主治医を含めた連絡先などの必要事項を記入した個人の診療情報カード（ぜん息カード）を作成し、各患者が携行することにより、主治医と急性増悪時に受診する医療機関との連携を密にすることができる。喘息カードは、既存のものを参考に全国的に使用できるよう作成した（図10）。

図10 患者カード（ぜん息カード）

現在の 日常の治療薬 (長期管理薬)	薬剤名	投与量
吸入ステロイド薬 (有・無)		μg/日 分
β ₂ 刺激薬 (有・無)		
テオフィリン錠剤製剤 (有・無)		
ロイコトリエン受容体 拮抗薬 (有・無)		
その他		

緊急治療薬	薬剤名	投与量
抗利尿薬 (有・無)		
テオフィリン薬 (有・無)		
経口ステロイド薬 (有・無)		

救急時(中発作以上)の治療と注意点		
アスピリン喘息 (有・無)	薬剤アレルギー (有・無)	
点滴液		
ステロイド		
アミノフィリン		
吸入	○投与	
その他		
治療における注意点		

（自己管理の普及）

患者の自己管理を促すためには、医療関係者が適切な指導を行うことが必要である。このため、「(2) 病院や診療所等の医療関係者を対象とした研修の実施」に掲げたように、医師、看護師、保健師、薬剤師等が患者教育のスキルを向上し効果的な指導を行うことが重要である。

また、患者が正確な情報にアクセスできるための普及啓発活動を行う。

§ 日本アレルギー協会

患者様向けの提供および公開資料等

- 「アレルギー電話相談」の開設。<http://www.jaanet.org/>
- 協会で発行している小冊子がダウンロードできるほか、患者会情報等も掲載。
<http://www.jaanet.org/contents/index.html>
- 東北支部のホームページには、「Q&A」等が設けられている。
http://plaza.umin.ac.jp/thk_jaa/

4. 関東支部欄には「関東支部だより」が掲載されている。

http://www.jaanet.org/aboutus/4_index_msg.html

5. 九州支部のホームページには、広報欄に「アレルギー・喘息教室」のご案内等が掲載されている。

<http://www.allergy-fk.com/>

§ ラジオ放送による啓発活動

関西支部では、

ラジオ大阪（OBC）にて「アレルギー診察室」毎週日曜日6：45～7：00

http://www.abc1314.co.jp/timetable_all.html

中国支部では、

山陽放送（RSK）にて「アレルギー談話室」毎週日曜日8：45～9：00

<http://www.rsk.co.jp/radio/allergy/index.html>

九州支部では、

九州朝日放送（KBC）にて「アレルギー談話室」毎週日曜日6：30～6：45

<http://www.allergy-fk.com/keihatu/for-peaple/for-peaple3.htm>

§ 独立行政法人 環境再生保全機構

「成人気管支ぜん息患者の重症度等に応じた健康管理支援、保健指導の実践及び評価手法に関する調査研究」研究班が作成したテキストを入手できる。
喘息の診断がついた時点で喘息の病態と治療の実際について本テキストを用いて説明する。通常は、5分前後で説明できる。

<http://www.erca.go.jp>

（4） 喘息診療担当医師名簿の作成等による医療機関情報の提供

アレルギー疾患の診療を専門的に行う医療機関や医師の名簿としては、

○日本アレルギー学会における認定施設の一覧

<http://www.jsaweb.jp/ninteishisetsu/index.html>

○日本アレルギー協会における専門医名簿

http://www.jsaweb.jp/ninteilist_general/index.html

が利用可能である。

このほか、医師会の協力のもと、喘息死ゼロ作戦に参加し、専門的な医療

機関と連携して、ガイドラインに基づく喘息治療を行う医師のリストを作成し、利用に供することが望ましい。

これらのリストをもとに、自治体や医療従事者団体等において、適切な喘息診療を行う医療機関の情報を提供することが望ましい。

（5）地域の喘息患者の実態把握を目的とした分析調査の実施

上記の施策を実施するに当たっては、地域の実態を評価することで、地域における問題点を施策の展開に活かすとともに、事業実施の評価にもつなげることができる。

実態把握のための指標としては、人口動態調査による喘息による死者数の推移や、年齢別の死亡率等の、既存の統計を活用することができる。また、地域での喘息診療の実態を調査する場合には、中核的な医療機関の協力を得て、喘息発作による救急外来受診患者数・入院患者数の推移、救急外来受診者の普段の治療内容、喘息による死亡例の解析（発症の時期、病型、長期管理、発作時の治療、死亡前の状態、死亡の場所など）等を評価することにより、問題点を具体的に明らかにすることができます。

このほか、喘息の標準的な治療の普及状況を経年的に把握するためのその他の指標としては、製薬企業からの提供が得られる場合には、吸入ステロイドや短時間作用性 β_2 刺激薬の売り上げ（ガイドラインに基づく治療が普及すれば、吸入ステロイドの処方数が増加し、短時間作用性 β_2 刺激薬の処方数が減少することが予想される）、地域の消防において把握している場合には、若年の呼吸器疾患に対する救急車の出動回数の推移、あるいは、医師や患者の喘息に関する知識、JGL2012の内容の認知と実行などの状況をアンケート調査することなどが考えられる。

これらに基づき、問題点の把握を行い、喘息死ゼロ作戦の実施に活かすことが望ましい。

（6）事業実施の評価

事業実施中に事業のアウトプット、アウトカムや、様々な問題点、改善すべき点に関する評価を行い、創意工夫に結びつけて改善を図ることが重要である。

「（5）地域の喘息患者の実態把握を目的とした分析調査の実施」に掲げた各種の調査は、作戦実施後に再度実施することにより、事業の評価に活用することができる。

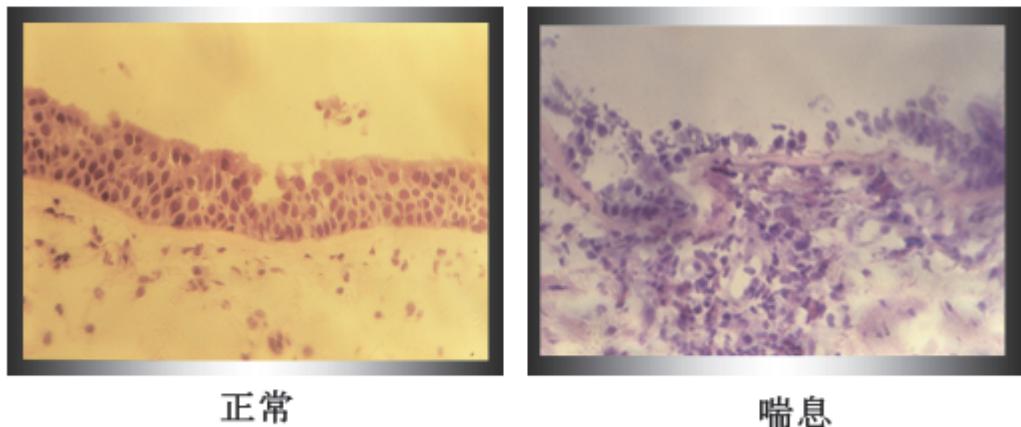
資料 喘息の疾患としての特徴 (医療関係者向け資料)

喘息死ゼロ作戦の実行にあたっては、喘息がどのような特徴をもつ疾患であるかを知っておくことが必要である。そのような観点から、まず喘息の病態、喘息死を含む疫学、喘息の臨床について概説する。

1. 喘息の病態

喘息は古代ギリシャ、ヒポクラテスの時代 (BC4~5世紀) からすでに記載のある古い疾患である。発作性の喘鳴 (ゼーゼーヒューヒュー)、呼吸困難などの症状が特徴であり、場合によっては死につながる程の重い発作を起こす可能性があるため油断の出来ない疾患として位置付けられる。これまでには、呼吸機能検査の結果から、薬物治療や自然経過で気道が閉塞している状態が正常化する可逆性の気道閉塞と種々の刺激により気道の閉塞が起こり易い状態である気道過敏性が喘息の特徴とされてきた。しかし、近年気管支鏡により喘息の気道粘膜を生検し検討したところ、喘息の気道には、症状はなくても慢性に炎症という状態が気道に存在することが明らかになった (図 11)。

図11 気管支粘膜生検像



炎症には多くの細胞と液性因子が関与して気道粘膜を傷害しており、とくに喘息の炎症では赤く染まる顆粒をもつ好酸球が多くみられるのが特徴とされている。つまり喘息の病態は、可逆性の気道閉塞、気道過敏性と慢性の気道炎症から成り立っている。

では、気道炎症はどのように惹起されるのであろうか。喘息の患者にアレルギ

一の検査をすると、約 70%で室内塵（ハウスダスト）の主成分であるチリダニに對して陽性の結果が得られる。すなわちチリダニに対する免疫グロブリン E (IgE) 抗体が陽性で、チリダニによりアレルギー反応が誘導される状態にある。したがって、喘息になる要素の 1 つとして、アレルギー体质と生活環境におけるチリダニをはじめとする喘息の原因物質（抗原）への曝露が挙げられる。

次に、喘息を発症する要因として、気道が過敏性になり易い体质も重要である。IgE 抗体があつてアレルギー反応が起こつても、気道が閉塞しなければ喘息の症状は出ない。喘息に結びつくアレルギーの発症には、生まれた直後から乳幼児期にかけての生活環境の衛生状態と感染の有無も後天的な要素として関与し、むしろ不衛生な環境への曝露が予防的という仮説も唱えられ、注目されている。喘息は、遺伝子と環境を背景に発症する疾患であると考えられる。

2. 喘息の疫学

喘息の気道には慢性の炎症が存在していることが明らかになったが、幸いにも喘息を診断する上で決め手となるのは、これまで通り呼吸生理学的な検査であり、症状としては呼吸困難、喘鳴、咳嗽であることに変わりはない。つまり、喘息の概念に慢性の気道炎症が組み込まれる以前と以後とで、同一の質問表による疫学的なデータの比較が可能である。

1) 喘息の有症率

小児喘息の疫学調査は、同一地域の小学生を対象に定期的な定点観察が可能であり、経年的な変化を反映している。例えば福岡市での検討では、1981-1983 年が 5.7%に対して 1993-1995 年は 7.7%と有意な増加を示している。一方、成人喘息では、異なる研究グループによる各地域での単回調査の結果が報告されている。その結果をみると、喘息の有症率は、1960 年代は 1~1.2%、1970 年代後半から 1980 年代前半は 1~2%となっており、1985 年の静岡県藤枝市の調査結果が 3.14%であることから、有症率の増加が示された。さらに、我々が 1998 年に静岡県藤枝市で行った住民に対するアンケート調査から有症率 4.14%が得られ、全国の罹患者数は 400~500 万人に達している可能性もある。

患者数の増加には、住宅環境の変化（アルミサッシ、絨毯、空調設備）によるチリダニの増加、衛生状態の過剰な改善（無菌化）、食生活、喫煙、大気汚染など種々の因子が関与していると考えられる。そして、疫学調査では、人口密度が有症率と最も密接な相関を示した。また、厚生労働省により報告された有病率をみると、喘息の死亡率とともに都道府県により較差がみられており、有病率に較差を来たす背景因子を検討することは、発症のメカニズムや発症を予防する方法を解明する上で有用と考えられる。当面の課題とは言えないが、今後の課題として

は重要である。

各都道府県で地域の代表的な基幹病院を数カ所選定し、現在受診中の患者を対象にした調査と、その地域全体の調査とを組み合わせることが方法として考えられる。そして、例えば、住宅環境として絨毯の使用、建築歴、家族構成と喫煙者の有無、ペットの有無と種類、掃除の回数、市街地か郊外かなど、家族歴として喘息やアレルギー疾患の有無などを含む統一した質問表を用いた調査を施行し、各都道府県で分析し、全国的に比較検討する。一方で文化的背景として特徴が明らかで、喘息の発症に関係する可能性が考えられる事柄については、仮説を立て検証するのも別の方法として推奨される。

2) 喘息の臨床像

小児喘息は、乳児期に多く発症する。一方、成人喘息では、1989年の厚生労働省の実態調査によると、年齢構成のピークは50歳代で24%、次いで60歳代23%、40歳代20%となり、発症年齢は40歳代19%、50歳代18%、30歳代17%の順であった。また、発症時の男女比は、乳児期（生後1カ月から1年未満）で2.8、幼児期（満1歳から5歳）で1.5、10歳以後では1.0以下で、喘息患者全年齢での男女比はほぼ1であった。

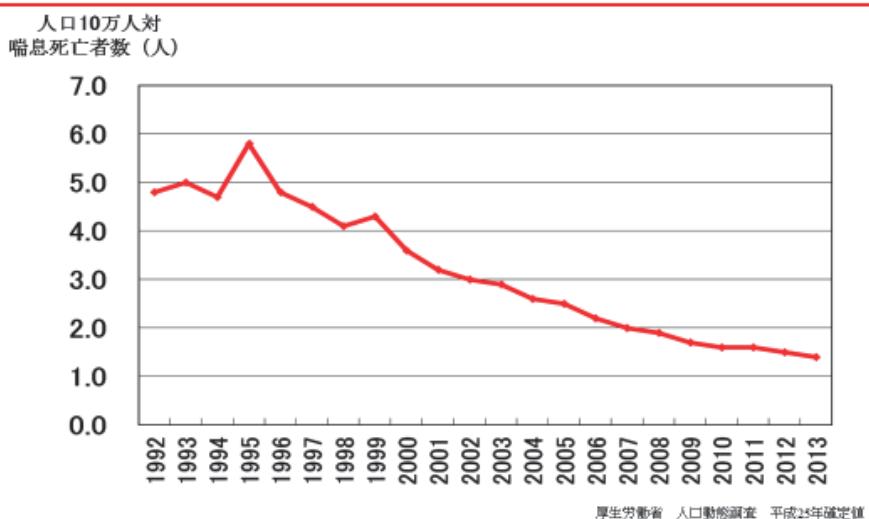
喘息の病型は、環境アレルギーに対する特異的IgE抗体が存在するものをアトピー型、IgE抗体が存在しないものを非アトピー型とすると、アトピー型が成人喘息では約70%、小児喘息では90%以上となる。

3) 喘息死

喘息死の動向は、厚生労働省人口動態調査により知ることができる。死亡診断書をもとに喘息死とほぼ正確に判定される5～34歳の年齢階級喘息死亡率は、1995年には10万人当たり0.7人であったが、1996年以降減少し始め2001年には0.3人にまで減少し、好ましい傾向にある。

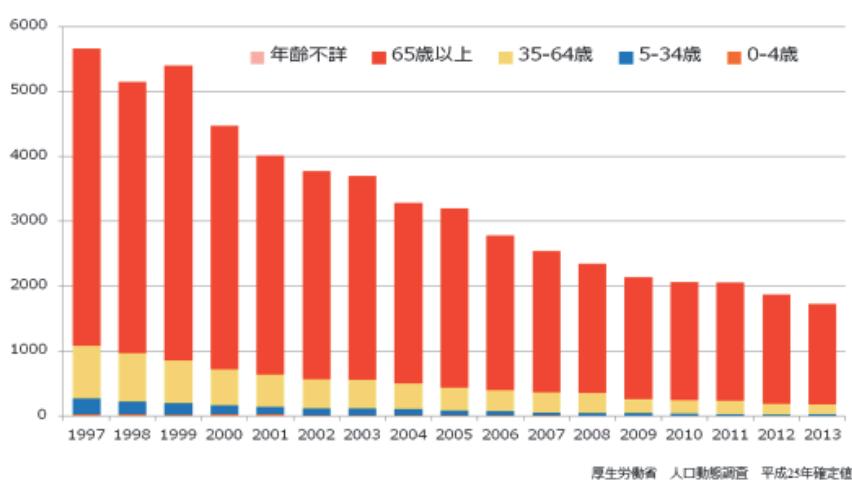
また、成人喘息における死亡数は、1995年7,149人とピークを示した後、1996年には5,926人と減少し、2000年4,427人、2004年3,243人と順調に減少し、とくに「喘息死ゼロ作戦」の取り組みが開始されたと考えられる2006年には前年2005年の3,198人から2,778人へと減少し、最新の2013年は1,728人、10万人当たり1.4人まで減少している（図1）。

図1 喘息死亡率(人口10万人対) 全国



そして、年齢分布では、65歳以上の高齢者が毎年90%近くを占めており、高齢者喘息への対応が求められている（図2）。

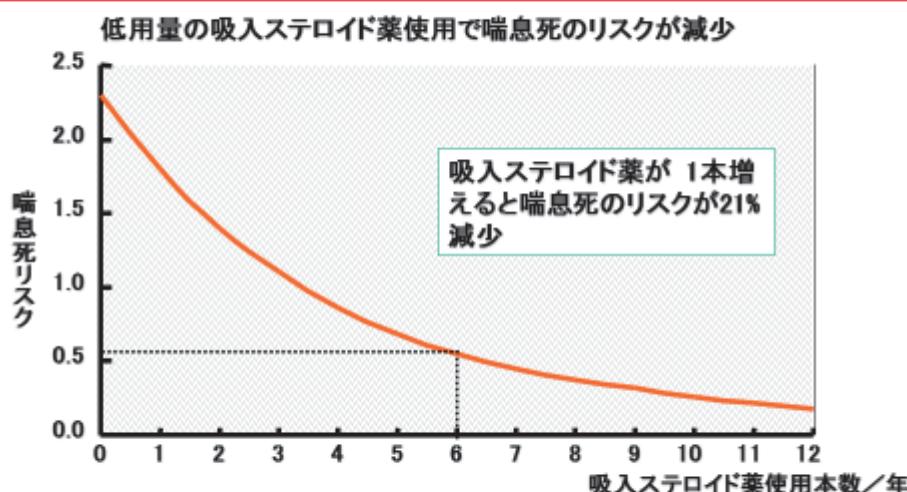
図2 年齢別 喘息死



喘息死は、まだゼロには程遠い数字であるが、上述のように1995年のインフルエンザの流行によると思われるピークを境に経年に減少している。この喘息死の低下には、1992年に初版が作成され、2006年以降3年ごとに改訂され発刊された「喘息予防・管理ガイドライン」が大いに貢献していると考えられる。したがって、喘息死ゼロ作戦の戦略として現時点で最新のガイドライン、JGL2012に沿った治療を広めて実行することが、妥当であると考えられる。後述するように、喘息は発作時あるいは症状のある時に治療するだけでなく、慢性の気道炎症を念頭にした長期の管理が重要である。JGL2012で推奨する吸入ステロイド薬（ICS）を第一選択薬とする長期管理は、多くのエビデンスで支えられている。例えばあ

る報告では、吸入ステロイド薬を使用していない患者では、吸入ステロイド薬の使用が1年に一本増える毎に喘息死のリスクが21%ずつ減少するという推計結果が示されている（図3）。

図3 吸入ステロイド薬使用量と喘息死リスク



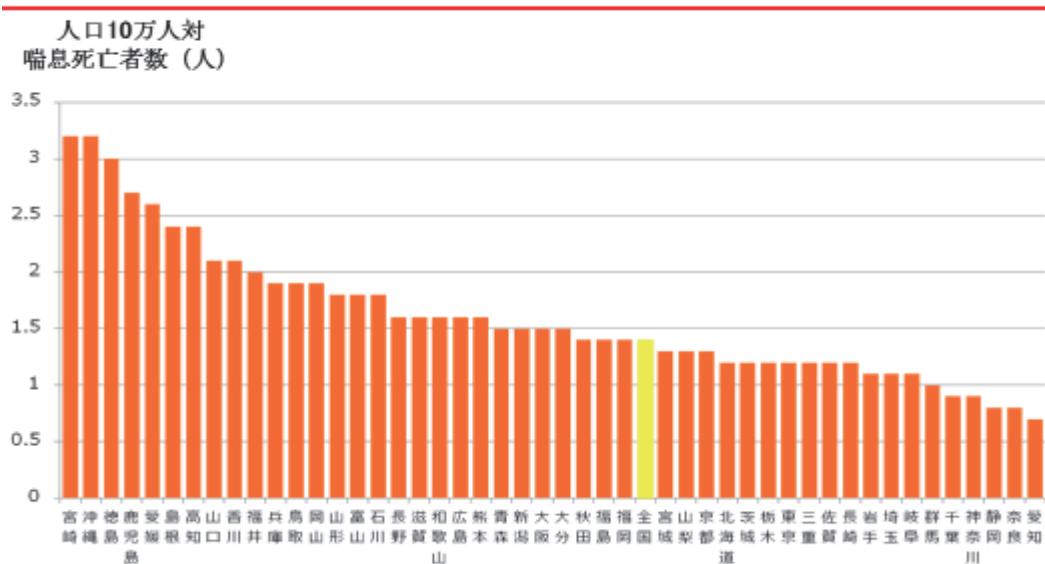
対象：カナダの健康保険データベースに登録されていて、1975～91年の間に喘息薬を使用した者について97年末まで追跡調査し、喘息死亡例66例（喘息死亡群）を特定。この喘息死亡群に対し年齢と性別が合致する生存喘息患者2,681例（コントロール群）をデータベースから抽出。

方法：喘息死亡群とコントロール群で、使用薬剤と喘息死リスクとの関連を分析した。

Suissa S. et al.: N Engl J Med 343 (5); 332, 2000

また、喘息の死亡率を都道府県別に示すと、有病率でもみられたように、都道府県毎に大きなばらつきがみられている（図4）。

図4 喘息死亡率（人口10万人対） 2013年



厚生労働省 人口動態調査 平成25年確定値

3. 喘息の臨床

喘息の臨床の規範としてJGL2012を用いるにあたり、喘息死ゼロ作戦の理解を深めるために、とくに成人喘息についてその内容の要点を解説する。

1) 診断

発作中に来院すれば、喘息の診断は比較的容易であるが、非発作時や他の呼吸器疾患、とくに慢性閉塞性肺疾患（COPD）を合併する場合には、診断が困難なこともある。

喘息の診断基準は、公式には確立されていないが、JGL2012の「成人喘息での診断の目安」は、診断への指針として簡便で有用である（表2）。

表2 成人喘息での診断の目安（1）

-
1. 発作性の呼吸困難、喘鳴、咳（夜間、早朝に出現しやすい）
の反復
 2. 可逆性気道閉塞：自然に、あるいは治療により寛解する。PEF値の日内変動20%以上、 β_2 刺激薬吸入により1秒量が12%以上増加かつ絶対量で200ml以上増加
 3. 気道過敏性の亢進：アセチルコリン、ヒスタミン、メサコリンに対する気道収縮反応の亢進

表2 成人喘息での診断の目安（2）

-
4. アトピー素因：環境アレルゲンに対するIgE抗体の存在
 5. 気道炎症の存在：喀痰、末梢血中の好酸球数の増加、ECP高
値、クレオラ体の証明、呼気中NO濃度上昇
 6. 鑑別診断疾患の除外：症状が他の心肺疾患によらない

この表の項目 1、2、5 を満足すれば喘息の診断が強く示唆され、また非発作時の場合で 1 秒量 (FEV₁) やピークフロー (PEF; peak expiratory flow) が正常で可逆性気道閉塞が検出できない時は、1、3、5 を満足しても診断を支持すると考えられる。ただし気道過敏性試験が、喘息で例外なく陽性とは限らないこと、またこの施設でもできる検査ではない点で、さらに別の指標を考案する余地を残している。

a) 症状（表 2 の項目 1）

臨床症状として、喘鳴、咳、呼吸困難（息切れ）、胸苦しさ（chest tightness）、喀痰などがみられる。また、しばしば鼻炎、副鼻腔炎、鼻茸やアトピー性皮膚炎の合併を見る。喘息の呼吸器症状には発作性の消長がみられ、夜間から早朝にかけて出現することが多い。

b) 呼吸機能検査（表 2 の項目 2 と 3）

スパイロメトリーによる 1 秒量、努力性肺活量 (FVC; forced vital capacity)、フローボリューム (FV; flow-volume) 曲線が有用である。

i) 可逆性気流制限

1 秒量は、気道閉塞を評価するゴールドスタンダードであり、FV 曲線は、末梢気道の状態を把握する良い指標となる。また PEF は、1 秒量とともに気道閉塞を検出することができ、喘息の日常管理に有用である。

ii) 気道過敏性の亢進

気道の過敏性の評価には、アセチルコリンやその誘導体のメサコリン、あるいはヒスタミンといった気道収縮薬による気道過敏性試験を施行する。方法は、気道収縮薬の吸入により、1 秒量の低下を指標とする標準法と、呼吸抵抗の上昇を指標とするアストグラフ法が用いられている。標準法では、1 秒量が 20% 以上の低下を示す気道収縮薬の最低濃度（閾値）か、反応曲線から 1 秒量を 20% 低下させる濃度である PC₂₀ を求めて評価する。喘息患者では気道過敏性試験でより低濃度の閾値、あるいは PC₂₀ を示すことになる。特に咳のみや胸痛のみを主訴とする cough variant asthma や chest pain variant asthma の診断には、必須の検査である。

c) その他の検査所見（表 2 の項目 4、5、6）

i) アトピー素因

アトピー型では、血清総 IgE 値の上昇がみられ、同時に抗原特異的 IgE 抗体も陽性である。抗原特異的 IgE 抗体は、皮膚反応試験（プリックテスト、皮内テストなど）か、血清反応試験（RAST; radioallergosorbent test や CAP 法、

MAST 法など)により検出される。感度の点では皮膚反応試験が優れているが、最近は、より簡便な血清を用いた検査が好まれる傾向にある。問診においては、アレルギー疾患の家族歴や既往歴、生活環境として住宅環境、本人や同居者の喫煙、室内環境(空調、掃除、カーペット、建築年数、間取りや日当たりなど)、ペットの有無、職業と職場環境などが重要である。最も頻度の高い抗原は、吸入性抗原の室内塵(HD; house dust) やヒヨウヒダニ(dermatophagoides)、通称チリダニ(house dust mite)である。また職業性喘息が疑われる場合には、抗原特異性 IgE 抗体の検索を症例毎に疑わしい抗原を用いて(時には研究室で調整して)行なう必要がある。

ii) 気道炎症の存在

気道炎症を臨床的にモニターするための指標は、十分に確立されていない。

血算では、好酸球の增多(500/mm³以上)のみられることが多い。喀痰は通常漿液性で気泡に富み、好酸球の增多や剥離した気道上皮からなるクレオラ体を認める。喀痰がでない場合には、高張食塩水による誘発喀痰を採取して検査することも有用である。また、将来的に普及することが予想される呼気中一酸化窒素(NO)の測定では、NOの上昇を認める。

d) 鑑別診断疾患の除外

最初から喘息と決めつけないで、鑑別診断を行なうことが重要である(表3)。

表3 鑑別すべき疾患 (JAGL2013)

-
1. 上気道疾患：喉頭炎、喉頭蓋炎、vocal cord dysfunction(VCD)
 2. 中枢気道疾患：気管内腫瘍、気道異物、気管軟化症、気管支結核、サルコイドーシス
 3. 気管支～肺胞領域の疾患：COPD、びまん性汎細気管支炎、肺線維症、過敏性肺炎
 4. 循環器疾患：うつ血性心不全、肺血栓塞栓症
 5. アンギオテンシン変換酵素阻害薬などの薬物による咳
 6. その他の原因：自然氣胸、迷走神経刺激症状、過換気症候群、心因性咳嗽
 7. アレルギー性呼吸器疾患：アレルギー性気管支肺真菌症、好酸球性肉芽腫性多発血管炎(eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, EGPA, Churg-Strauss症候群)、好酸球性肺炎

高齢化社会を迎え、うつ血性心不全による心臓喘息といわれる状態との鑑別、またその原因として、急性心筋梗塞の有無にまで思いを巡らす必要がある。また

中年以降の喫煙者では、慢性閉塞性肺疾患（COPD）との鑑別、あるいは合併の有無を明らかにする。急性発症の呼吸困難と言う点では、緊急な対応を必要とする気胸と肺血栓塞栓症を見逃してはならない。また喘息には気道感染の併発が高率にみられることが考慮する必要である。喘息を合併するアレルギー性呼吸器疾患では、通常の喘息治療でコントロールされ難い場合が多く、副腎ステロイド薬の全身投与を必要とする難治性喘息では特に、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症（アレルギー性気管支肺真菌症）や好酸球性肉芽腫性多発血管炎（eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, EGPA, Churg-Strauss 症候群）などとの鑑別が必要である。

4. 治療

a) 概要

i) 長期管理

喘息は、発作につながる可逆性の気道閉塞と気道過敏性とともに慢性の気道炎症とその結果引き起こされる気道傷害から成り立つ疾患である。したがって、治療する場合には、発作あるいは喘息症状だけではなく、背景にある気道炎症も標的として考え治療を組み立てることが、発作を起こさないことにつながる。すなわち、JGL2012 を規範として、まず患者毎に喘息の重症度を判定し（表4、表5）、症状に対する治療と炎症を抑え症状を予防する治療（長期管理）の両面から、適切な薬物治療を実行することが基本となる（表6）。

表4 治療前の臨床所見による喘息重症度の分類(成人)

重症度 ^{*1}		軽症間欠型	軽症持続型	中等症持続型	重症持続型
喘息症状の特徴	頻度	週1回未満	週1回以上だが毎日ではない	毎日	毎日
	強度	症状は軽度で短い	月1回以上日常生活や睡眠が妨げられる	週1回以上日常生活や睡眠が妨げられる	日常生活に制限
				短時間作用性吸入β ₂ 刺激薬頓用がほとんど毎日必要	治療下でもしばしば増悪
PEF FEV ₁ ^{*2}	%FEV ₁ , %PEF	80%以上	80%以上	60%以上80%未満	60%未満
	変動	20%未満	20~30%	30%を超える	30%を超える

*1 いずれか1つが認められればその重症度と判断する。

*2 症状からの判断は重症例や長期罹患例で重症度を過小評価する場合がある。呼吸機能は気道閉塞の程度を客観的に示し、その変動は気道過敏性と関連する。 $\%FEV_1 = (FEV_1 \text{測定値}/FEV_1 \text{予測値}) \times 100$, $\%PEF = (PEF \text{測定値}/PEF \text{予測値} \text{または自己最良値}) \times 100$

表5 現在の治療を考慮した喘息重症度の分類(成人)

現在の治療における患者の症状	現在の治療ステップ			
	ステップ1	ステップ2	ステップ3	ステップ4
コントロールされた状態¹⁾ ●症状を認めない ●夜間症状を認めない	軽症間欠型	軽症持続型	中等症持続型	重症持続型
軽症間欠型相当²⁾ ●症状が週1回未満 ●症状は軽度で短い ●夜間症状は月に2回未満	軽症間欠型	軽症持続型	中等症持続型	重症持続型
軽症持続型相当³⁾ ●症状が週1回以上、しかし毎日ではない ●月1回以上日常生活や睡眠が妨げられる ●夜間症状が月2回以上	軽症持続型	中等症持続型	重症持続型	重症持続型
中等症持続型相当³⁾ ●症状が毎日ある ●短時間作用性吸入 β_2 刺激薬がほとんど毎日必要 ●週1回以上日常生活や睡眠が妨げられる ●夜間症状が週1回以上	中等症持続型	重症持続型	重症持続型	最重症持続型
重症持続型相当³⁾ ●治療下でもしばしば増悪 ●症状が毎日ある ●日常生活が制限される ●夜間症状がしばしば	重症持続型	重症持続型	重症持続型	最重症持続型

*1：同一治療継続3～6か月でステップダウンを考慮する。

*2：各治療ステップにおける治療内容を強化する。

*3：治療のアドヒアランスを確認し、必要に応じてステップアップする。

表6 喘息治療ステップ

		治療ステップ1	治療ステップ2	治療ステップ3	治療ステップ4
長期管理薬	基本治療	吸入ステロイド薬 (低用量)	吸入ステロイド薬 (低～中用量)	吸入ステロイド薬 (中～高用量)	吸入ステロイド薬 (高用量)
		上記が使用できない場合は以下のいずれかを用いる	上記で不十分な場合に以下のいずれか1剤を併用 LABA (配合剤の使用可 ⁵⁾)	上記に下記のいずれか1剤、あるいは複数を併用 LABA (配合剤の使用可 ⁵⁾)	上記に下記の複数を併用 LABA (配合剤の使用可)
		LTRA テオフィリン徐放製剤 ※症状が穢ならば必要なし	LTRA テオフィリン徐放製剤	LTRA テオフィリン徐放製剤	LTRA テオフィリン徐放製剤 上記のすべてでも管理不良の場合は下記のいずれかあるいは両方を追加 抗IgE抗体 ²⁾ 経口ステロイド薬 ³⁾
		LTRA以外の 抗アレルギー薬 ¹⁾	LTRA以外の 抗アレルギー薬 ¹⁾	LTRA以外の 抗アレルギー薬 ¹⁾	LTRA以外の 抗アレルギー薬 ¹⁾
発作治療 ⁴⁾		吸入SABA	吸入SABA ⁵⁾	吸入SABA ⁵⁾	吸入SABA

そして、あくまでも無症状の状態で健常人と変わらない生活の出来る状態をめざす（表7）。すなわち、症状の治療には即効性の気管支拡張薬、長期管理としては、吸入ステロイド薬を基本薬として継続し、必要に応じて他の薬剤を併用して無症状の状態を維持するのである。喘息の治療を担当する医師側には、JGL2012に沿った治療を喘息の病態を理解した上で実行することが望まれる。患者側には、薬剤の服用を遵守し（アドヒアラנסを堅持し）、喘息の原因への曝露を回避することが要求される。良い生活環境にはフローリング、週3回以上の掃除、寝具の衛生管理が重要とされている。

表7 コントロール状態の評価

	コントロール良好 (すべての項目が該当)	コントロール不十分 (いずれかの項目が該当)	コントロール不良
喘息症状 (日中および夜間)	なし	週1回以上	コントロール不十分 の項目が3つ以上当 てはまる
発作治療薬の使用	なし	週1回以上	
運動を含む活動制限	なし	あり	
呼吸機能 (FEV ₁ およびPEF)	予測値あるいは 自己最高値の80%以上	予測値あるいは 自己最高値の80%未満	
PEFの日(週)内変動	20%未満	20%以上	
増悪(予定外受診、 救急受診、入院)	なし	年に1回以上	月に1回以上*

*増悪が月に1回以上あれば他の項目が該当しなくともコントロール不良と評価する。

ii) 発作への対応

長期管理を実行していても、発作が出現することもあり、発作に対する適切な対応も長期管理とともに非常に重要である。とくに喘息死をゼロにするためには、長期管理による予防効果だけではなく、死亡の直接の原因である発作に対して、適切に対応することが必須である。

発作は、時と場所を選ばず出現するので、患者自身での対応を指導することが必要である。とくに医療機関を受診しなければならないと判断する基準を明らかにして指導することが重要である。JGL2012では、表8のように発作強度を分類しており、発作のために横になれない状態（中等度の発作）であれば医療機関を受診することを推奨している。とくに発作が重症化した経験のある患者、アドヒアラנסの悪い患者では、担当医がCSの経口薬（例えばプレドニン）を渡しておき、30mgを目安に家庭で内服して受診するよう指導することも推奨されている。

表8 喘息発作の強度と目安となる発作治療ステップ

発作強度 ²⁾	呼吸困難	動作	検査値 ¹⁾				選択する 発作治療ステップ
			PEF	SpO ₂	PaO ₂	PaCO ₂	
喘鳴/ 胸苦しい	急ぐと苦しい 動くと苦しい	ほぼ普通	80% 以上	96% 以上	正常	45mmHg 未満	発作治療ステップ 1
軽度 (小発作)	苦しいが 横になれる	やや困難					
中等度 (中発作)	苦しくて 横になれない	かなり困難 かろうじて 歩ける	60～ 80%	91～ 95%	60mmHg 超	45mmHg 未満	発作治療ステップ 2
高度 (大発作)	苦しくて 動けない	歩行不能 会話困難	60% 未満	90% 以下	60mmHg 以下	45mmHg 以上	発作治療ステップ 3
重篤	呼吸減弱 チアノーゼ 呼吸停止	会話不能 体動不能 錯乱 意識障害 失禁	測定 不能	90% 以下	60mmHg 以下	45mmHg 以上	発作治療ステップ 4

1) 気管支拡張薬投与後の値を参考とする。

2) 発作強度は主に呼吸困難の程度で判定する(他の項目は参考事項とする)。異なる発作強度の症状が混在する場合は発作強度の思いほうをとる。

基本的には、通常の発作に対する家庭での治療をしても発作が収まらないときは、医療機関を受診し、もっと積極的で有効性の高い治療を施行しなければならないという認識を患者に持たせるよう指導する。

「発作に対する家庭での対応は、まず発作の強さを判定することから始まります。苦しくても横になれば軽度の発作で、主治医の処方した吸入 β_2 刺激薬の吸入あるいは経口の発作止めを頓服して下さい。目安として、吸入は1時間で15～20分毎に動悸を感じない限り継続、経口薬は30分後に1回追加可能です。それでも収まらないときや明らかに悪化するときは1時間にこだわらず、受診することをお勧めします。また苦しくて横になれない中等度や話が困難な高度の発作では、ただちに気管支拡張薬を服用して受診して下さい。中等度でも気管内挿管歴や入院歴がある場合、高用量吸入ステロイド薬や経口ステロイド薬を継続投与されている場合には、家庭で経口ステロイド薬を主治医の指示に従い内服し、直ぐに受診して下さい。」という内容の話をして指導することになる。

このような内容を口頭で指導するだけでなく、記載した行動計画表（アクションプラン）を作成し手渡すことも、JGL2012の家庭での対応を実行するうえで必要である。

患者の受診後、その予後を左右する上で重要なのが医療機関での対応で、発作治療ステップとして記述している（表9）。とくに中等度よりも重症の高度（話すのが困難で動けない）や重篤・エマージェンシー（意識障害、呼吸停止）に相当する場合は、救急隊、入院設備のある病院あるいは院内での救命救急部と

の連携が必要となる。そして適切な治療の実行には、各患者の平素の治療内容、発作時に施行する治療内容や治療に当たっての注意点を記した診療カードの作成が有用であると考えられる。カードに含まれる内容としては、処方されている治療薬、推奨される発作時の対応に加えて、喘息の発症時期、治療歴、入院歴、アスピリン喘息の有無、薬剤アレルギーの有無などである。

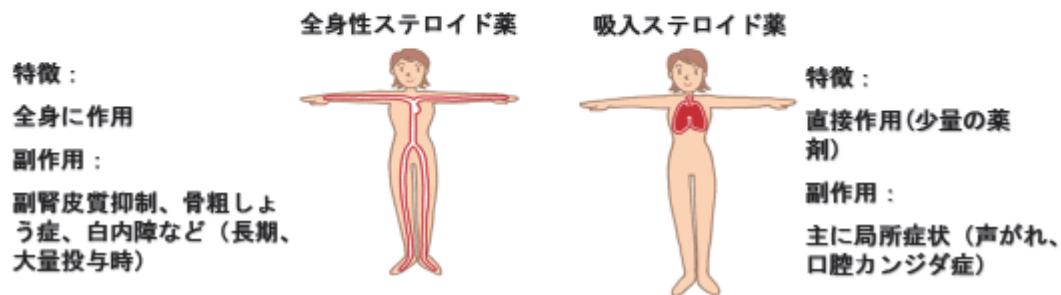
表9 喘息発作の強度に対応した管理法（成人）

	治療	自宅治療可、救急外来入院、ICU管理 ^①
発作治療ステップ1	β_2 刺激薬吸入、頓用 ^② テオフィリン薬頓用	自宅治療可
発作治療ステップ2	β_2 刺激薬ネブライザー吸入反復 ^③ アミノフィリン点滴静注 ^④ ステロイド薬点滴静注 ^⑤ 酸素吸入(鼻カニューレなどで1～2L/分) ボスマシン ^⑥ (0.1%アドレナリン)皮下注 ^⑦ 抗コリン薬吸入考慮	救急外来 ・1時間で症状が改善すれば帰宅 ・2～4時間で反応不十分 入院治療 ・1～2時間で反応なし 入院治療：高度喘息症状として発作治療ステップ3を施行
発作治療ステップ3	アミノフィリン持続点滴 ^⑧ ステロイド薬点滴静注反復 ^⑨ 酸素吸入(PaO_2 80mmHg前後を目標に) ボスマシン ^⑩ (0.1%アドレナリン)皮下注 ^⑪ β_2 刺激薬ネブライザー吸入反復 ^③	救急外来 1時間以内に反応なければ入院治療 悪化すれば重篤症状の治療へ
発作治療ステップ4	上記治療継続 症状、呼吸機能悪化で挿管 ^⑫ 酸素吸入にもかかわらず PaO_2 50mmHg以下および/または意識障害を伴う急激な PaCO_2 の上昇 人工呼吸 ^⑬ 、気管支洗浄 全身麻酔(イソフルラン・セボフルラン・エンフルランなどによる)を考慮	直ちに入院、ICU管理 ^⑭

b) 吸入ステロイド薬の安全性

わが国では、副腎皮質ステロイド薬（CS）は怖い薬として位置付けられ、吸入薬についてもこれまでの恐怖感が、医師と患者の両方に根強く残っている。すなわち、CSは、まず経口薬や注射薬が種々の疾患で使用され、いろいろな副作用が出現することから良く効く反面怖い薬という認識が定着してしまっている。喘息の治療で使用される吸入ステロイド薬（ICS）は、CSの中では最後に登場した剤形であるが、すでに20年以上にわたり喘息の治療に用いられ、その効果と安全性から喘息の治療に革命を起こしたと言っても過言ではない（図12）。喘息は、気道の炎症を特徴とする慢性疾患であり、ICSを長期に投与することが治療の基本となる疾患である。副作用についてもしっかり研究され、ICSの常用量では、CSの全身投与でみられる副腎機能の抑制、骨粗鬆症、糖尿病、消化性潰瘍、免疫不全、異常脂肪沈着などはみられず、また懸念された小児の成長障害、胎児の奇形の発生、気道上皮細胞への悪影響などもみられていない。JGL2012で推奨されている常用量である限り、咽頭のカンジダ症や嗄声が一般的な副作用で、重篤なもののはみられていない。

図12 吸入ステロイド薬について



局所抗炎症作用が強力。常用量では副腎機能の副作用はほとんど見られない。吸入薬のステロイド用量は、経口薬に比較して1/1000である。

肝臓において初回通過で90%が代謝される。

局所副作用としては、嗄声、咽頭の異常感、口腔のカンジダ症などがあるがうがいによって多くの場合が防げる。

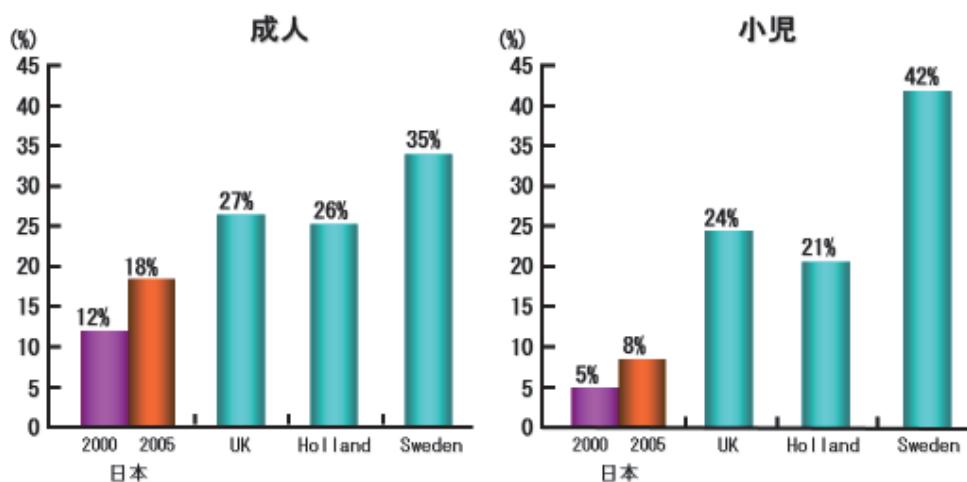
小児の発育においても、長期の追跡結果では健常な子どもの発育（身長）と差がない。

c) 課題

i) 喘息の臨床に関する実態

わが国での喘息の実態調査として、国際的に共通の質問表を用いた電話による疫学調査が、2000年（AIRJ2000）と2005年（AIRJ2005）に実施された。その結果によると、成人におけるICSの使用頻度は、2000年は12%、2005年は18%で、これは2000年の英国（27%）、オランダ（26%）、スウェーデン（35%）と比べていずれも低値であった（図13）。

図13 吸入ステロイド薬の使用頻度



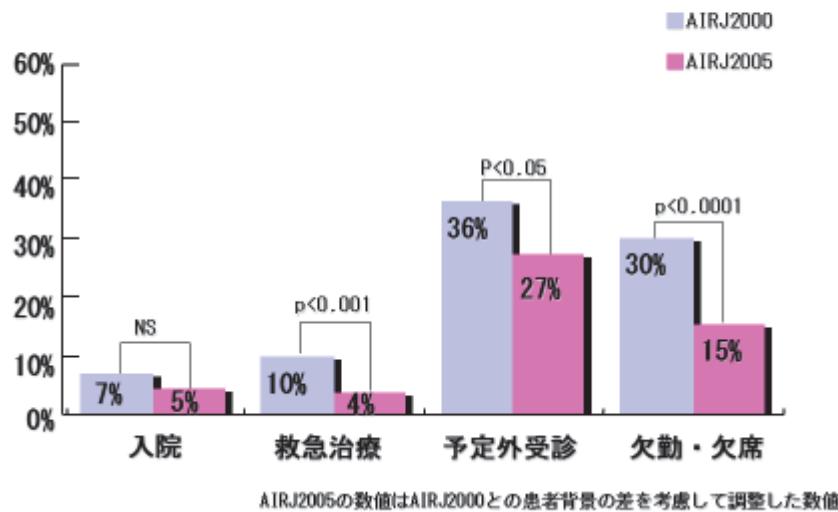
足立 满ほか：アレルギー 2002;51:411-420 （一部改変）

すなわち、ICS を第一選択薬として推奨している喘息治療のガイドラインが十分に実行されていないことを示唆する結果であった。また小児では一層低頻度であることも示された。さらに注目されることは、ICS の使用頻度が 2000 年から 2005 年にかけて 6% 増加した結果、救急治療、予定外受診、欠勤・欠席の経験率が有意に減少し（図 14）、吸入ステロイドを用いることの臨床効果を表しており、JGL2012 に沿った ICS による長期管理の有効性を強く支持している。

さらに、AIRJ2000 の結果から、患者の自己管理を評価する上で重視されているピークフローメータの使用が、理想とは程遠く、週 1 回以上使用している成人患者がわずか 6% に過ぎないことが明らかとなった（図 8）。すなわち、喘息の状態を客観的に評価するために、より簡便な方法を考えることの必要性が示された。

**図14 最近1年間の
入院、救急治療、予定外受診、欠勤・欠席の経験率**

成人



ii) 高齢者への対応

喘息死の年齢分布を見ると喘息死の 90% 近くが 65 歳以上の高齢者であることが明らかとなっている（図 2）。この事実から、JGL2012 を実行するにあたり高齢者への対応をとくに意識することが必要である。

高齢者では、喫煙者であれば COPD を合併していることが稀ではなく、喘息 COPD オーバーラップ症候群（asthma-COPD overlap syndrome, ACOS）と呼ばれている。そして ACOS では、喘息とともに COPD に対する治療も考慮する。禁煙は喘息では ICS の効果が喫煙により抑制されることを阻止するが、COPD では治療においてさらに重要であり、これまでのところ疾患の進行を抑制する唯一の方法といつても過言ではない。したがって禁煙の実行が一層重要となる。

薬物療法では、抗コリン薬を含む複数の気管支拡張薬の使用が COPD の閉塞性換気障害に有効である。発作時には表 3 の鑑別すべき診断に一層の注意を払い、また喘息に加えてこれらの疾患を併発している可能性もあることを忘れずに対応することが必要となる。さらに、薬剤の代謝も加齢や併用薬により変化するので、その点についても注意が必要である。喘息死ゼロ作戦においては、いかに高齢者の喘息への対応を適切に行なえるようにするかが重要な課題として位置付けられると考えられる。

iii) JGL2012 の普及と実行に関する方策

JGL2012 の普及を妨げることとして、ガイドラインが複雑すぎることが挙げられている。表 2～9 にまとめられた内容を完全に記憶して日常の臨床で実行するのは、非専門医に限らずたとえ専門医であっても困難であると考えられる。また、ICS を基本薬として用いる長期管理を実行するには、まず喘息の病態に長期管理を必要とする気道の慢性炎症が重要な役割を演じていることの理解を深め、炎症に対して ICS が最も有効で、しかも ICS は長年にわたる臨床的な検討の結果、安全性が極めて高いことの理解を広めることが必須であると考えられる。

したがって、ゼロ作戦の戦略には、喘息の理解を深める教材、ガイドラインの実行を可能にする簡便なプログラム、治療効果として患者の状態を客観的にかつ簡便に評価するための方法などの道具立てが必要と考えられる。

自己管理法を含む喘息死ゼロ作戦の実行に関する指針

平成27年3月31日

受託者 住所 東京都清瀬市竹丘1-1-1

独立行政法人国立病院機構

東京病院

氏名 大田 健

独立行政法人 環境再生保全機構

成人気管支喘息診療のミニマムエッセンス

成人気管支喘息診療のミニマムエッセンス作成ワーキンググループ 編

本書は、平成23年度厚生労働科学研究費補助金で成人気管支喘息診療のミニマムエッセンス作成ワーキンググループ（奥付参照）が作成したものを元に、その後発刊された喘息予防・ガイドライン2012とアレルギー総合ガイドライン2013（一般社団法人日本アレルギー学会作成）の内容を踏まえて改編したミニマムエッセンスです。

1. 診断

診断は、①発作性の呼吸困難、喘鳴、咳、胸苦しさなどの症状の反復、②可逆性の気流制限、③他の心肺疾患などの除外による。過去の救急外来受診歴や、喘息治療薬による症状の改善は診断の参考になる。喘鳴や呼吸困難を認めず、診断に苦慮する場合は、気道過敏性試験を依頼するか、吸入ステロイド薬や β_2 刺激薬による治療的診断を考慮する。

表1. 成人喘息診断の目安

	一般診療	専門診療
1. 発作性の呼吸困難、喘鳴、咳の反復	問診：夜間、早朝に出現しやすい。 聴診：喘鳴は、強制呼気時に頸部で聴取しやすい。	
2. 可逆性の気流制限	問診：無症状期をはさんで、発作が反復	気道可逆性試験
3. 症状が他の心肺疾患によらない（表3）	胸部レントゲン撮影	
4. 気道過敏性の亢進	問診：運動、気道ウイルス感染、アレルゲン曝露、気象変化、精神的ストレス、月経などで症状が惹起される。	気道過敏性試験
5. アトピー素因	血清特異的IgE抗体	即時型皮膚反応
6. 気道炎症の存在	喀痰細胞診や末梢血白血球像における好酸球增多	呼気一酸化窒素濃度測定

1、2、3が臨床診断上重要である。4、5、6は他の所見とともに喘息診断を支持する。

2. 他疾患の鑑別

中高年発症で、喫煙歴を有する場合、COPDの存在を念頭におく。COPDでは、気管支拡張薬吸入後の1秒率が70%未満、高分解能CTで低吸収域、肺拡散能低下などの所見を認める。診断に迷う場合は、専門医へ紹介する。

標準治療に対する反応が十分得られない場合は、表3の疾患を念頭に、胸部CT、心機能評価、呼吸器専門医や耳鼻咽喉科医への紹介を考慮する。

表2. COPDとの鑑別のポイント

	COPD	喘息
喫煙歴	ほぼ全例あり	ありうる
40歳未満の場合	稀	多い
呼吸困難	進行性・持続性	発作性・症例により異なる
夜間の咳込み、覚醒	少ない	多い
症状の変動	少ない	多い

表3. 喘息と鑑別すべき疾患

1. 上気道疾患：喉頭炎、喉頭蓋炎、vocal cord dysfunction (VCD)
2. 中枢気道疾患：気管内腫瘍、気道異物、気管軟化症、気管支結核、サルコイドーシス
3. 気管支～肺胞領域の疾患：COPD、びまん性汎細気管支炎、肺線維症、過敏性肺炎
4. 循環器疾患：うっ血性心不全、肺血栓塞栓症
5. アンジオテンシン変換酵素阻害薬などの薬物による咳
6. その他：自然気胸、迷走神経刺激症状、過換気症候群、心因性咳嗽
7. アレルギー性呼吸器疾患：アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (Churg-Strauss症候群)、好酸球性肺炎

3. 長期管理における薬物療法プラン

可能な限り呼吸機能を正常化し、QOLを改善し、健常人と変わらない日常生活を送ることが治療の目標である。長期に罹患し、気道リモデリングがある患者では、呼吸機能は正常値まで改善し得ないので、自己最良値に基づいて判定する。コントロール状態は表4に基づいて判断するが、短時間作用性 β_2 刺激薬(SABA)の使用頻度の問診が簡便である。

薬物治療を、表5の4つの治療ステップに分ける。未治療患者(表6)は、症状が週1回あるかどうかで治療ステップ1と2に分け、連日症状があれば治療ステップ3、さらに治療下でも増悪していれば治療ステップ4とする。治療中の患者は表4を参考にコントロール良好を目指し、コントロール不十分であれば、表5を参考に治療のステップアップを行う。

表4. コントロール状態の評価

		コントロール良好 (すべての項目が該当)	コントロール不十分 (いずれかの項目が該当)	コントロール不良
喘息症状(日中および夜間) 発作治療薬の使用 運動を含む活動制限 呼吸機能(FEV ₁ およびPEF) PEFの日(週)内変動 増悪	なし	週1回以上	コントロール不十分の 項目が3つ以上当てはまる	
	なし	週1回以上		
	なし	あり		
	正常範囲内	予測値あるいは 自己最高値の80%未満		
	20%未満	20%以上		
	なし	年に1回以上		月に1回以上*

*増悪が月に1回以上あれば他の項目が該当しなくてもコントロール不良と評価する。

表5. 喘息治療ステップ

		治療ステップ1	治療ステップ2	治療ステップ3	治療ステップ4
長期管理薬 基本治療	吸入ステロイド薬 (低用量) 上記が使用できない場合 以下のいずれかを用いる LTRA テオフィリン徐放製剤 (症状が稀であれば必要なし)	吸入ステロイド薬 (低～中用量) 上記で不十分な場合に以下 のいずれか1剤を併用 LABA (配合剤の使用可) LTRA テオフィリン徐放製剤	吸入ステロイド薬 (中～高用量) 上記に下記のいずれかを 1剤、あるいは複数を併用 LABA (配合剤の使用可) LTRA テオフィリン徐放製剤	吸入ステロイド薬 (高用量) 上記に下記の複数を併用 LABA (配合剤の使用可) LTRA テオフィリン徐放製剤 上記のすべてでも管理不良の 場合は下記のいずれかあるいは 両方を追加 抗IgE抗体 経口ステロイド薬	吸入ステロイド薬 (高用量) 上記に下記の複数を併用 LABA (配合剤の使用可) LTRA テオフィリン徐放製剤 上記のすべてでも管理不良の 場合は下記のいずれかあるいは 両方を追加 抗IgE抗体 経口ステロイド薬
追加治療	LTRA以外の 抗アレルギー薬	LTRA以外の 抗アレルギー薬	LTRA以外の 抗アレルギー薬	LTRA以外の 抗アレルギー薬	LTRA以外の 抗アレルギー薬
発作治療	吸入SABA	吸入SABA	吸入SABA	吸入SABA	吸入SABA

LTRA：ロイコトリエン受容体拮抗薬、LABA：長時間作用性 β_2 刺激薬、SABA：短時間作用性 β_2 刺激薬

表6. 未治療患者の症状と目安となる治療ステップ

		治療ステップ1 (軽症間欠型相当)	治療ステップ2 (軽症持続型相当)	治療ステップ3 (中等症持続型相当)	治療ステップ4 (重症持続型相当)
喘息症状		週1回未満 軽度で短い	週1回以上だが 毎日ではない	毎日	毎日 治療下でも しばしば増悪
夜間症状		月2回未満	月2回以上	週1回以上	しばしば
日常生活の妨げ		なし	月1回以上	週1回以上	持続的

表7. 吸入ステロイド薬、吸入ステロイド薬/長時間作用性 β_2 刺激薬配合剤の治療ステップ別推奨量

商品名	治療ステップ1～2 低用量	治療ステップ3 中用量	治療ステップ4 高用量
キュバール®、フルタйте®エアゾール、オルベスコ®、フルタйте®ロタディスク®、フルタйте®ディスカス®、アズマネックス®ツイストヘラー®	100～200μg/日	200～400μg/日	400～800μg/日
パルミコート®タービュヘイラー®	200～400μg/日	400～800μg/日	800～1600μg/日
パルミコート®吸入液	0.5mg/日	1.0mg/日	2.0mg/日
アドエア®ディスカス®(1吸入2回/日)	100ディスカス	250ディスカス	500ディスカス
シムビコート®タービュヘイラー®	1吸入2回/日	2吸入2回/日	4吸入2回/日
アドエア®エアゾール(2吸入2回/日)	50エアゾール	125エアゾール	250エアゾール
フルティフォーム®	50エアゾール 2吸入2回/日	125エアゾール 2吸入2回/日	125エアゾール 4吸入2回/日
レルベア®エリプタ®(1吸入1回/日)	100エリプタ	100エリプタ または200エリプタ	200エリプタ

●長期管理薬(コントローラー)の使用に関する注意点

- ①**吸入ステロイド薬(ICS)**：最も効果的な抗炎症薬である。副作用は、口腔・咽頭カンジダ症、嘔吐などで全身性の副作用は少ない。妊娠自体に影響しない。喘息患者の呼吸器感染症の頻度を上げる証拠はない。最大呼気位(最大限呼出したところ)から最大吸気位(最大限吸入したところ)まで吸入し、約10秒間息こらえをしてゆっくり吐き出す。デバイス毎に吸入の強さが適切となるように指導する(はやく深く：フルタйте®ロタディスク®・ディスカス®、アドエア®ディスカス®／深く力強く：パルミコート®、シムビコート®、アズマネックス®、レルベア®エリプタ®／ゆっくり深く：キュバール®、オルベスコ®、フルタйте®エアゾール、アドエア®エアゾール、フルティフォーム®)。
- ②**長時間作用性 β_2 刺激薬(LABA)**：吸入薬、貼付薬、経口薬があり、必ずICSと併用する(単独使用は禁忌)。ICSにLABAを併用すると相乗効果が得られる。
- ③**吸入ステロイド薬/長時間作用性吸入 β_2 刺激薬配合剤**：ICSとLABAを個別に吸入するよりも有効性が高い。アドヒアランスを向上させてLABAの単独使用を防ぐ。
- ④**ロイコトリエン受容体拮抗薬(LTRA)**：気管支拡張作用と抗炎症作用を有し、ICSに併用すると有効性が高い。アレルギー性鼻炎合併喘息、運動誘発喘息、アスピリン喘息患者の管理において有用である。
- ⑤**テオフィリン徐放製剤**：気管支拡張作用を有する。ICSとの併用で相乗効果が得られる。副作用や過剰投与(中毒)を回避するには100mg錠を2～3回/日で開始し、効果が不十分なら保険診療上の常用量である200mgを2回/日まで增量する。重症例では、専門医と相談の上さらに500～600mg/日へと100mg単位(分2～3)で增量できる(レセプト上の詳記を必要とする場合がある)。血中濃度は5～15μg/mLが目標であるが、患者によっては適正な血中濃度でも、それ以下でも中毒症状が生じることがあるので400mg/日の時点で血中濃度のモニタリングをする。
- ⑥**抗IgE抗体(オマリズマブ)**：高用量ICSと複数の気管支拡張薬の併用下でもコントロール不十分で総血清IgE値が30～1,500 IU/mL、通年性吸入抗原が証明されている場合に投与する。約60%で奏効するとされる。4か月間投与後に効果判定を行う。

4. 急性増悪(発作)時の対応(成人)

発作強度を呼吸困難症状から判定して遅滞なく治療を開始する。前夜横になれば小発作、苦しくて横になれないが歩行可能なら中発作、歩行や会話が困難なら大発作、チアノーゼ、意識障害、呼吸停止を認める場合は重篤症状とする。

中等度以上の発作や、吸入 β_2 刺激薬による初期治療に反応が乏しい場合、十分量のICSや、経口ステロイド薬を常用している症例、挿管の既往例、過去1年間に入院、救急受診があった症例では、直ちに全身性ステロイド薬を投与する。入院や集中治療を要すると判断した場合は、遅滞なく専門施設への搬送を手配する。

表8. 喘息発作の強度に対応した管理のポイント

発作強度	呼吸困難	動作	SpO ₂	治療	自宅治療可、入院、ICU管理
喘鳴/ 胸苦しい	急ぐと苦しい 動くと苦しい	ほぼ普通	96% 以上	β ₂ 刺激薬吸入、頓用 ¹⁾ テオフィリン薬頓用	自宅治療可
軽度 (小発作)	苦しいが 横になれる	やや困難		β ₂ 刺激薬吸入、頓用 ¹⁾ テオフィリン薬頓用	自宅治療可
中等度 (中発作)	苦しくて 横になれない	かなり困難 かろうじて 歩ける	91 ～ 95%	β ₂ 刺激薬ネプライザー吸入反復 ²⁾ 0.1%アドレナリン(ボスマシン [®])皮下注 ³⁾ アミノフィリン点滴静注 ⁴⁾ ステロイド薬点滴静注 ⁵⁾ 酸素投与	救急外来 ・1時間で症状が改善すれば帰宅 ・2～4時間で反応不十分 ・1～2時間で反応無し 入院治療→高度喘息症状治療へ
高度 (大発作)	苦しくて 動けない	歩行不能 会話困難	90% 以下	0.1%アドレナリン(ボスマシン [®])皮下注 ³⁾ アミノフィリン持続点滴 ⁶⁾ ステロイド薬点滴静注反復 ⁵⁾ 酸素投与 β ₂ 刺激薬ネプライザー吸入反復 ²⁾	救急外来 1時間以内に反応なければ入院治療 悪化すれば重篤症状の治療へ
重篤	呼吸減弱 チアノーゼ 呼吸停止	会話不能 体動不能 錯乱、失禁 意識障害	90% 以下	上記治療継続 症状、呼吸機能悪化で挿管 ⁷⁾ 人工呼吸 ⁷⁾ 気管支洗浄 全身麻酔を考慮	直ちに入院、ICU管理

1) β₂刺激薬pMDI 1～2バフ、20分おき2回反復可。

2) β₂刺激薬ネプライザー吸入：20～30分おきに反復する。脈拍を130/分以下に保つようにモニターする。

3) 0.1%アドレナリン(ボスマシン[®])：0.1～0.3mL皮下注射20～30分間隔で反復可。脈拍は130/分以下にとどめる。虚血性心疾患、緑内障〔開放隅角(単性)緑内障は可〕、甲状腺機能亢進症では禁忌、高血圧の存在下では血圧、心電図モニターが必要。

4) アミノフィリン6mg/kgと等張補液葉200～250mLを点滴静注、1/2量を15分間程度、残量を45分間程度で投与し、中毒症状(頭痛、吐き気、動悸、期外収縮など)の出現で中止。発作前にテオフィリン薬が十分に投与されている場合は、アミノフィリンを半量もしくはそれ以下に減量する。通常テオフィリン服用患者では可能な限り血中濃度を測定。

5) ステロイド薬静注：ヒドロコルチゾン200～500mg、メチルプレドニゾロン40～125mg、デキサメタゾン、あるいはベタメタゾン4～8mgを点滴静注。以後必要に応じて、ヒドロコルチゾン100～200mgまたはメチルプレドニゾン40～80mgを4～6時間ごとに、あるいはデキサメタゾンあるいはベタメタゾン4～8mgを6時間ごとに点滴静注、またはブレドニゾロン0.5mg/kg/日、経口。

6) アミノフィリン持続点滴：第1回の点滴に続く持続点滴はアミノフィリン250mg(1筒)を5～7時間(およそ0.6～0.8mg/kg/時)で点滴し、血中テオフィリン濃度が10～20μg/mL(ただし最大限の薬効を得るには15～20μg/mL)になるように血中濃度をモニターし中毒症状の出現で中止。

7) 挿管、人工呼吸装置の装着は時に危険なので、緊急処置としてやむを得ない場合以外は専門施設で行われることが望ましい。

アスピリン喘息の場合、40～60%相当の症例でコハク酸エステル型(サクシゾン[®]、ソル・コーテフ[®]、ソル・メドロール[®]、水溶性プレドニン[®]など)で発作誘発の危険があるため、リン酸エステル型(ハイドロコートン[®]、リンドロン[®]、デカドロン[®]など)を使用する。リン酸エステル型であっても、急速静注では添加物による発作誘発の可能性がある。初回投与時や、アスピリン喘息の有無が不明の場合は1時間程度かけて点滴投与する。

5. 専門医への紹介を考慮する条件

1. 治療ステップ3で良好な管理ができず、治療ステップ4に変更する場合。
2. 経口ステロイド薬や高用量の吸入ステロイド薬の長期投与が必要な場合。
3. 経口ステロイド薬高用量短期投与を年に2回以上必要とする場合。
4. 症状が典型的でなく、診断や鑑別が困難で、気道過敏性試験、胸部CTなどが必要な場合。
5. 困難な合併症(例：副鼻腔炎、鼻ポリープ、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、COPD合併、心身医学的問題など)や、特殊な原因(職業喘息、アスピリン喘息、食事アレルギーなど)を有する場合。

平成26年度厚生労働科学研究費補助金 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

アレルギー疾患の予後改善を目指した自己管理および生活環境改善に資する治療戦略の確立に関する研究

研究代表者 大田 健(国立病院機構東京病院院長)

成人気管支喘息診療のミニマムエッセンス作成ワーキンググループ(順不同・敬称略)

監修：大田 健 長瀬 洋之(帝京大学医学部呼吸器・アレルギー内科准教授)

日本医師会 今村 聰(日本医師会副会長) 大森 千春(大森メディカルクリニック院長)

鈴木 育夫(鈴木医院院長) 平山 貴度(平山医院院長)

萩原 照久(萩原医院院長)

ダニアレルゲン対策

- ✓ 普通に生活していてもアレルギーの主たる原因となりうるダニは日本の温暖・湿潤な気候で増殖しやすく、多くの家がダニアレルゲンで汚染されています
- ✓ 「効果的な掃除」等の環境整備によりダニアレルゲン量を減らすことができます
- ✓ 特に「寝室」と「寝具」に対する対策が重要です
- ✓ 「除湿」は「カビ対策と共に」しており、カビをエサにするダニの増殖を抑えることができます
- ✓ 掃除の際は「窓を開けて換気」し、「マスクやタオルで口を覆い」ながら行ってください



→「アレルゲン」に関する参考書籍：<http://www.jrrm.or.jp/jalibary/tanrei/tanrei.html>

《寝具のダニアレルゲンを減らす方法》

- 週に1回以上、家族全員の寝具カバーをはすして寝具そのものに直接掃除機をかける
- 高密度綿維でできた布団・枕カバーを使用する
- ベッドメイキング時に窓を開放する
- 布製のソファを寝室に置かない
- 開放型暖房機器を寝室に置かない
- 1日に数回窓を開けて換気する
- 掃除機をかける前に床を拭きする
- 寝室のカーテンを年2回以上丸洗いする



《寝室のダニアレルゲンを減らす方法》

- 室内に植物や水槽、洗濯物、加湿器を置かない
- 週に1回以上寝室を含むすべての部屋に掃除機をかける
- 掃除機をかける前に床の拭き掃除をする
- 床はフローリングである
- 床を化学雑巾やモップで乾拭きする



厚労科研費補助金難治性疾患等克服研究事業 「気管支喘息に対する喘息死の予防や自己管理手法の普及に関する研究」
主任研究者：大田 健 分担研究者：＊ 国立病院機構相模原病院 釣木澤尚実 提供資料

「一般住民に対するダニアレルゲン回避のためのパンフレット

作成：研究分担者 釣木澤尚実

Association of Asthma Education with Asthma Control Evaluated by Asthma Control Test, FEV₁, and Fractional Exhaled Nitric Oxide

JUNPEI SAITO, M.D., PH.D., * SUGURU SATO, M.D., PH.D., ATSURO FUKUHARA, M.D., YASUKO SATO, M.T., TAKEFUMI NIKAIDO, M.D., YAYOI INOKOSHI, M.D., NAOKO FUKUHARA, M.D., KAZUE SAITO, M.D., TAEKO ISHII, M.D., YOSHINORI TANINO, M.D., PH.D., TAKASHI ISHIDA, M.D., PH.D., AND MITSURU MUNAKATA, M.D., PH.D.

Department of Pulmonary Medicine, School of Medicine, Fukushima Medical University, Fukushima, Japan.

Background. Asthma education is an important adjunct for asthma control although the way asthma education affects asthma outcomes is poorly understood. The asthma control test (ACT), forced expiratory volume in 1 s (FEV₁), and fractional exhaled nitric oxide (FeNO) have all been used as markers of asthma control. However, the use of FeNO as a surrogate marker remains controversial. **Objectives.** (i) To examine whether asthma education is associated with asthma control; (ii) to compare absolute levels and changes of ACT, FEV₁, and FeNO over a year; and (iii) to evaluate whether FeNO can be used as an additional marker of asthma control. **Methods.** Fifty asthmatics with poor adherence (12 mild, 21 moderate, and 17 severe) received asthma education at study entry. Medications were unchanged for the first 3 months, and ACT, FEV₁, and FeNO measurements were recorded at entry, 3, 6, and 12 months. Asthma control was assessed at each visit and patients were categorized as either “stable” or “unstable” asthmatics according to the global initiative for asthma (GINA) guidelines. **Results.** A significant decrease in FeNO and increase in ACT score were noted in the stable asthmatic group at 3 months ($p < .001$), and this persisted over 12 months. Significant correlations were seen between changes (Δ) in FeNO, ACT, and FEV₁ over time. However, significant correlations between the absolute levels were not maintained over 12 months. A decrease of $\geq 18.6\%$ in FeNO and a ≥ 3 -point increase in ACT score (sensitivity: 80% and 73.3% and specificity: 83.3% and 87.5%, respectively) were associated with stable asthma control although the absolute levels were not. **Conclusions.** Asthma education may be useful to achieve stable control. In addition, changes rather than absolute levels of FeNO and ACT may be better markers of asthma control.

Keywords asthma control, asthma control test questionnaire, asthma education, fractional exhaled nitric oxide

INTRODUCTION

Interventions that aim to enhance medication adherence have recently been developed (1), although studies of adults and children with asthma show that approximately 30%–50% of those on asthma therapy are nonadherent to therapy at least for part of the time (2–4). Therefore, educating patients on how to manage their asthma more effectively should be used to improve patients’ knowledge and influence their decision-making process regarding disease management, resulting in greater treatment adherence. However, the way asthma education affects asthma control remains poorly understood.

Asthma symptom questionnaires, spirometry, sputum eosinophil cell counts, and airway hyperresponsiveness (AHR) are potential ways of monitoring asthma control. Of these, the global initiative for asthma (GINA) guidelines recommend asthma symptom questionnaires and spirometry as conventional approaches for managing asthma. These are easy to perform and are considered to be an indirect marker of underlying airway inflammation (5). However, directly monitoring airway inflammation may be a better and more reliable method. Fractional exhaled nitric oxide (FeNO) is an easy, sensitive, reproducible, and noninvasive marker for directly detecting allergic airway inflammation

(6–9). However, the use of FeNO as a surrogate marker of asthma control remains controversial (6, 10).

The aims of this study were to examine whether an intensive asthma educational program is associated with asthma control, to compare changes of predictive markers for asthma control [asthma control test questionnaire (ACT), forced expiratory volume in 1 s (FEV₁), and FeNO] over a 12-month period following asthma education and finally to evaluate whether FeNO measurements could be used as an additional marker of asthma control compared with ACT and FEV₁.

METHODS

Subjects

Asthmatic patients with persistent disease and poor adherence were recruited. All subjects had attended the outpatient clinic at the Department of Pulmonary Medicine, Fukushima Medical University Hospital for more than 6 months. Asthma was diagnosed according to a clinical history of characteristic symptoms (i.e., dry cough, wheezing, chest tightness, and breathlessness) and the presence of either bronchial hyperresponsiveness to methacholine or bronchodilator reversibility $\geq 12\%$ (5). Subjects were excluded if they were current smokers, had other respiratory diseases, or had a respiratory tract infection within 6 weeks of study entry. Poor adherence was defined as the

*Corresponding author: Junpei Saito, M.D., Ph.D., Department of Pulmonary Medicine, School of Medicine, Fukushima Medical University, Hikarigaoka-1, Fukushima 960-1295, Japan; Tel: +81-24-547-1360; Fax: +81-24-548-9366; E-mail: junpei@fmu.ac.jp

presence of at least one of the following in the previous 6 months: (i) failure to follow treatment by missing any prescribed asthma medications more than 1–2 times per week; (ii) a missed follow-up appointment for more than 4 weeks without taking appropriate medications; (iii) difficulty in using prescribed inhalers evaluated by observing and assessing the patient's demonstration of a sample inhaler device, and (iv) the requirement of high-dose inhaled corticosteroid (ICS) due to uncontrolled symptoms. Adherence to therapy and current medications was assessed by respiratory consultants in our department following a patient interview, review of medical records, and asthma diaries. Asthmatic patients attending our hospital's outpatient clinic are seen every 4–8 weeks and medications can only be prescribed at these appointments.

All subjects provided written informed consent, and the Ethics Committee of Fukushima Medical University approved the study.

Study Design

This was a prospective, single-center, observational study. Subjects were reviewed at entry and at intervals of 3, 6, and 12 months (four visits). At study entry, all subjects received an intensive educational program using an illustrated guide. ACT, FeNO measurements, and spirometry [FEV₁ and forced vital capacity (FVC)] were performed, and asthma control, based on the GINA guidelines, was assessed at each subsequent visit in order to evaluate the most appropriate treatment (5). Treatment remained unchanged during the first 3 months to evaluate the association of the intensive asthma educational program with asthma control. Following this 3-month period, the treatment could be changed if the subjects needed to step-up or step-down their treatment in line with the GINA guidelines (5). During the follow-up period, subjects were divided into two groups: (i) stable control group: asthmatic subjects whose treatments had not been changed or had been decreased over the study period and (ii) unstable control group: asthmatic subjects who had to increase their ICS dose or add other antiasthmatic drugs during the study period. These groups categorized as "stable" and "unstable" were used to assess ACT, FeNO, and FEV₁ as outcome predictors in this study.

Intensive Asthma Educational Program

The Ministry of Health and Welfare of Japan has developed a specific educational intervention program for asthma management according to the GINA guidelines. It provides information about asthma pathogenesis, diagnosis, severity, medications (including side effects), differences between reliever and controller agents, importance of asthma treatment, inhaler device instructions, exacerbation management, peak expiratory flow (PEF) monitoring, and a self-management plan. All subjects received a 30-min educational intervention program from a respiratory physician. The program included a detailed explanation and a demonstration of inhaler technique.

The Online FeNO Measurement Methods

FeNO measurements were made prior to spirometry at a constant flow of 50 mL/s according to the American Thoracic Society (ATS)/ European Respiratory Society (ERS) guidelines (11) using a chemiluminescence analyzer (Kimoto, Osaka, Japan). Three measurements were performed and the mean value was documented (coefficient of variation $\leq 10\%$).

Lung Function Tests

Spirometry was performed using rolling seal spirometers (CHESTAC-11; Chest M.I., Inc., Tokyo, Japan) according to the ATS guidelines (12). Three tests were performed and the highest FEV₁ was recorded. Results of FVC and FEV₁ were presented as percentages of the predicted level for statistical analysis.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS for Windows (version 17.0; SPSS, Chicago, IL, USA). Data are shown as means and 95% confidence interval (95% CI). Changes in FeNO, ACT, and FEV₁ are shown as Δ FeNO, Δ ACT, and Δ FEV₁, respectively.

The association between intensive asthma education and asthma control was evaluated using a comparison of ACT scores, FeNO levels, and FEV₁ %predicted at study entry and at the 3-month visit using a paired *t* test. The one-way analysis of variance was used to compare changes in FeNO levels, ACT scores, and FEV₁ %predicted over 12 months in the stable and unstable asthmatic groups. Correlations of changes (Δ) and absolute levels between FeNO, ACT, and FEV₁ were evaluated using the Spearman rank correlation coefficient analysis. A receiver operating characteristic (ROC) curve was constructed and the area under the curve (AUC) for each parameter was compared with 0.5 to estimate the optimal cutoff levels for detecting stable control of asthma. Sensitivity, specificity, positive predicted value (PPV), negative predicted value (NPV), positive likelihood ratio (LR(+)), and negative likelihood ratio (LR(-)) were calculated. A two-tailed *p*-value of $<.05$ was considered significant.

RESULTS

Characteristic of Subjects

The study population consisted of 50 asthmatic patients with poor adherence (18 males and 32 females) (Table 1). The mean age was 55.4 years (range: 16–79 years) and the patients were nonsmokers or ex smokers with a <5 pack-year history. Thirty-three patients (66%) were atopic and the cohort consisted of 12 mild, 21 moderate, and 17 severe persistent asthmatic subjects based on symptoms and treatment intensity (13). All the subjects were treated with regular ICS.

TABLE 1.—Subject characteristics.

Characteristics	Data
Patients	50
Sex (male/female)	18/32
Mean age (y.o.)	55.4 (50.4–60.5)
Height (cm)	157.6 (154.8–160.4)
Weight (kg)	61.1 (56.8–65.4)
Atopic status	33 (66%)
Severity of asthma	Mild persistent: 12 Moderate persistent: 21 Severe persistent: 17
FEV ₁ %predicted (%)	87.8 (81.8–93.9)
FEV ₁ /FVC (%)	72.4 (69.3–75.5)
FeNO level (ppb)	84.9 (69.6–100.1)
ACT score (point)	19.0 (18–20.1)
ICS dose (μ g) BDP equivalent	1106 (957–1255)

Note: Data was expressed as mean (95% CI) or number of patients.
BDP; Beclomethasone dipropionate.

The Effect of Intensive Asthma Educational Program

Asthma treatment remained unchanged during the first 3 months. Following the educational program, a significant decrease in FeNO levels and increase in ACT scores were seen in the stable asthma group ($n = 42$) compared with the unstable asthma group ($n = 8$; $p < .001$; Figure 1A and B). There was no significant difference in FEV₁ %predicted (Figure 1C).

The Changes of FeNO Levels, ACT Scores, and FEV₁ %predicted over 12 Months

In 8 of 50 asthmatic subjects (16%), the ICS dose was increased or other antiasthmatic drugs were added due to poor asthma control. Asthma medications were decreased in 14 of 42 patients (33%) reflecting improved asthma control. Significant decreases in FeNO levels and increases in ACT score following asthma educational program remained consistent in the stable asthmatic group over the course of 12 months (Figure 1A and B).

Correlations between Absolute Levels of FeNO, ACT Scores, and FEV₁ %predicted at Each Visit

There were significant negative correlations between absolute levels of FeNO and ACT scores at the beginning of the study and at 3 months following asthma educational program ($r = -0.47$, $p = .001$; $r = -0.49$, $p = .002$, respectively) (Table 2). Negative weak correlations were found between absolute levels of FeNO and FEV₁ %predicted over the same period ($r = -0.26$, $p = .07$; $r = -0.39$, $p = .02$, respectively). However, these correlations were not present at 6 months (Table 2).

Correlations between Changes (Δ) in FeNO, ACT, and FEV₁ at Each Visit

Highly significant correlations were observed between the Δ FeNO, Δ ACT, and Δ FEV₁ which were maintained over the course of 12 months ($p < .05$; Table 3).

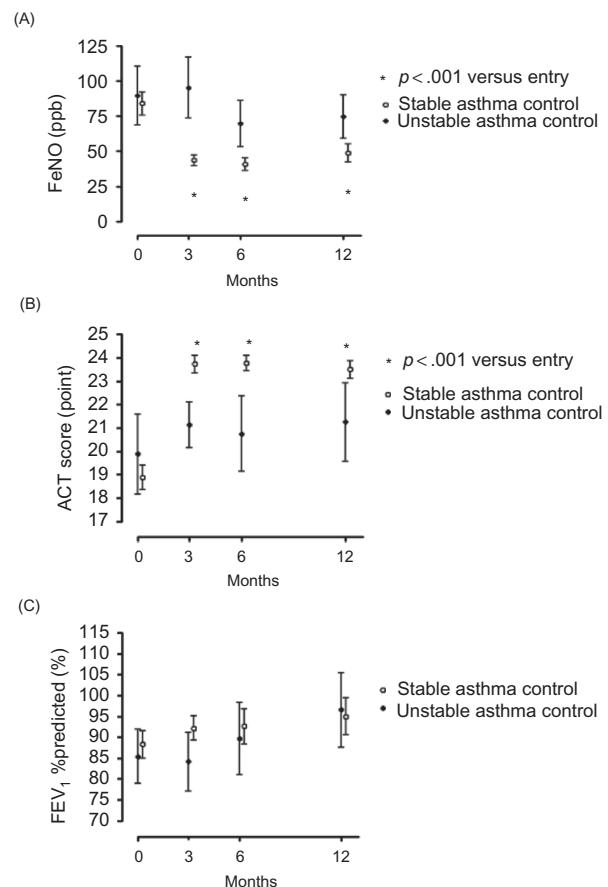


FIGURE 1.—Levels at time points indicated for FeNO levels (A), ACT score (B), and FEV₁ %predicted (C) between the subjects with or without achieving asthma control after the intensive educational interventions. Forty-two asthmatic subjects achieved good control whereas eight asthmatic subjects still had poor control.

Predictive Value of Each Parameter as a Marker to Achieve Stable Asthma Control

ROC curves were constructed to determine the cutoff levels for obtaining stable asthma control using absolute levels or changes in FeNO, ACT, and FEV₁. There were no useful parameters to discriminate subjects with stable asthma from those with unstable asthma using absolute levels (Figure 2A). However, an 18.6% decrease in Δ FeNO [AUC = 0.85, sensitivity of 80.0%, specificity of 83.3%, LR(+) of 4.8, LR(-) of 4.17, PPV of 92.3%, and NPV of 40%; $p = .007$] and a 3-point increase in Δ ACT (AUC = 0.794, sensitivity of 73.3%, specificity of 87.5%, LR(+) of 5.86, LR(-) of 3.28, PPV of 95.7%, and NPV of 46.7%; $p = .012$) were noted.

DISCUSSION

This is a prospective, observational study to estimate the association of asthma educational program with asthma control. We have compared the absolute levels and changes in FeNO, ACT, and FEV₁ with asthma control. Our results indicate that intensive asthma educational program may be associated with improved asthma control.

TABLE 2.—Correlations between absolute levels of FeNO, ACT scores, and FEV₁ %predicted.

FeNO	Entry	<i>p</i>	3 months	<i>p</i>	6 months	<i>p</i>	12 months	<i>p</i>
ACT	-0.47*	.001	-0.49*	.002	-0.20	.249	-0.06	.742
FEV ₁ % predicted	-0.26	.07	-0.39*	.019	-0.28	.110	-0.08	.649

Note: Spearman rank correlation coefficients were calculated and the data were expressed as *r* values.
**p* < .05.

TABLE 3.—Correlations between changes of FeNO levels, ACT scores, and FEV₁.

ΔFeNO	3-entry	<i>p</i>	6-entry	<i>p</i>	12-entry	<i>p</i>
ΔACT	-0.76*	<.001	-0.61*	<.001	-0.53*	.005
ΔFEV ₁	-0.53*	.001	-0.54*	.003	-0.42*	.03

Note: Spearman rank correlation coefficients were calculated and the data were expressed as *r* values.

**p* < .05.

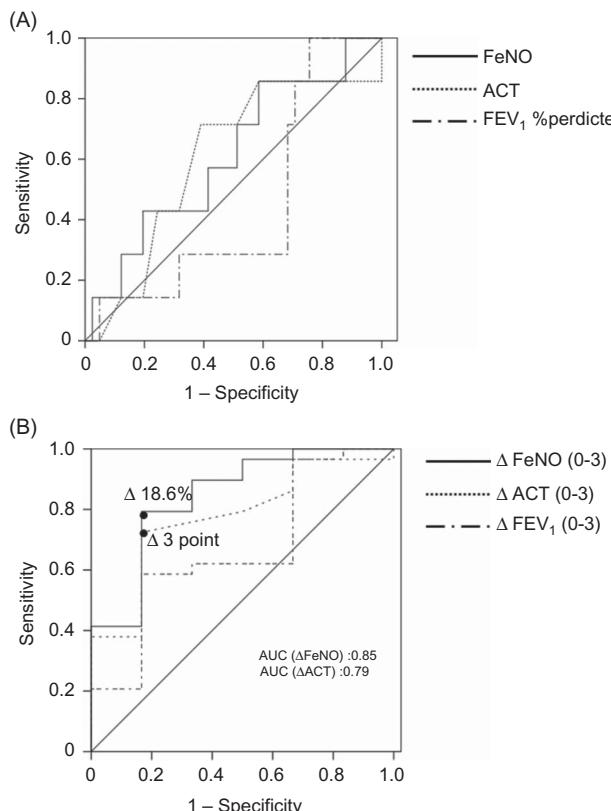


FIGURE 2.—ROC curves of absolute levels (A) and changes (B) of three parameters to determine good asthma control.

FeNO levels and ACT scores, but not FEV₁ %predicted, in the stable asthmatic group indicate improved asthma control over the course of 12 months. Changes (Δ) in FeNO levels, ACT scores, and FEV₁ had a stronger correlation, suggesting that multiple measurements and monitoring these changes may be a better way of predicting future asthma control.

Asthmatic subjects without self-management plans are often less adherent to prescribed medications and are more

likely to be poorly controlled (4, 14). Many asthmatic patients do not use their inhaler devices correctly and asthmatic patients who are more adherent to therapy are less likely to suffer exacerbations (15, 16). Therefore, asthma education plays a vital role in improving and obtaining asthma control. The GINA guidelines emphasize the importance of asthma education, highlighting that educational intervention should be an integral part of interactions between patients and physicians (5). This interaction plays an important role by increasing motivation, skills, and confidence with subsequent benefits in asthma control. This results in improved asthma symptoms and lung function, and a decreased economic burden in terms of medical expenses (17).

This study found a significant increase in ACT scores and decrease in FeNO levels at 3 months following asthma educational program in the stable asthmatic group. No significant difference was seen in the unstable asthmatic group. Several previous studies have noted similar findings, reporting that asthma education is associated with improvements in symptoms (4, 18–21), lung function (18–21), and quality of life (QOL) (19, 21). However, while some of these studies noted an association between all three factors (19, 21), others found that only symptoms correlated with an educational program (4, 18, 20). This difference may be explained by the content of educational program, study designs, and characteristics of the subjects. In our study, a significant reduction in FeNO levels could be seen in the stable asthma group. There is a paucity of information regarding the relationship between asthma education and FeNO. Dressel et al. noted a significant decrease in FeNO levels and improved asthma symptoms following an educational program in occupational asthmatic patients. In addition, they found that these improvements were not correlated with lung function (22). These findings and results from our study support the view that an intensive asthma educational program may be a valuable adjunct to achieve stable asthma control.

In this study, significant decreases in FeNO levels and increases in ACT scores remained consistent over the course of 12 months in stable asthmatic subjects. Symptom questionnaires and lung function tests are recommended in the GINA guidelines as markers of asthma control (5). Although they are easy to perform on almost all subjects, they are sometimes discordant with airway inflammation (23). Furthermore, symptoms are subjective and results may be influenced by patient's perception (24). Other markers such as sputum eosinophils and AHR have shown good correlations with asthma control (25, 26). However, these tests are time consuming,

invasive, require technical skill to process, and are, therefore, difficult to incorporate into standard clinical practice. Our results suggest that a combination of ACT and FeNO may be a quick and easy way to differentiate between stable and unstable asthmatic subjects.

In this study, we found a significant relationship between Δ FeNO, Δ ACT, and Δ FEV₁ over the course of 12 months, whereas significant correlations between absolute levels were only observed at 3 months. FeNO reflects airway inflammation directly and correlates with conventional markers such as FEV₁, AHR, and sputum eosinophil counts (6–9). Several randomized control trials comparing the single or add-on effects of FeNO, with established parameters of asthma control, have only noted a limited benefit (27–30). These findings may reflect differences in study designs, the small number of subjects enrolled, variation in significance levels, and differences in asthma severity. Furthermore, individual patients may have their own personal best and range of FeNO levels, as seen with PEF measurements (31). FeNO levels in some asthmatic patients remain predominantly high regardless of an improvement in lung function and symptoms (29). Therefore, an individual cutoff level or proportional change, from baseline rather than an absolute cutoff level may be more useful.

The results of this study indicate that a 20% Δ FeNO decrease and a 3-point Δ ACT increase may predict stable asthma control. To date, few studies have examined the relationship between Δ FeNO and other conventional parameters of asthma control. Jones et al. reported that change in FeNO level from baseline had a higher PPV compared with an absolute cutoff level in terms of asthma control (32). Michils et al. suggested that a single measurement of FeNO was not a good reflection of asthma control, particularly in patients on medium-to-high doses of ICS (33). A study looking at Δ ACT found that a minimally important difference (MID) of three points is a significant predictor of asthma control (34). These studies support our observations that using changes in the levels of parameters may be better than using absolute levels for the evaluation of asthma control. We suggest that monitoring changes in FeNO levels and ACT scores in individual patients over time could be used as markers for achieving stable asthma control.

There are several limitations to this study. This is a prospective, observational study with a relatively small number of subjects tested. In addition, the educational intervention may be confounded by the Hawthorne effect, whereby subjects can subconsciously alter their behavior in a specific manner simply because of awareness of being educated and observed. Finally, subjects in this study may not represent the general asthmatic population. Only asthmatic subjects with poor adherence were recruited, and this may generate a positive selection bias. However, this is a group that we believe requires greater asthma education than their well-controlled counterparts.

In conclusion, this study suggests that comprehensive asthma educational program should be viewed as an

important treatment option and considered prior to instituting changes in treatment. In addition, the changes (Δ) in FeNO and ACT levels could become useful surrogate markers for long-term asthma management. Further, large randomized studies are warranted to determine the influence of asthma education on disease control and the utility of changes (Δ) of FeNO and ACT.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. Pankaj Bhavsar and Dr. David Gibeon, Airway Disease Section in the National Health and Lung Institute, Imperial College London for their insightful suggestions and linguistic corrections.

DECLARATION OF INTEREST

Prof. Mitsuru Munakata was supported by a grant from the Environmental Restoration and Conservation Agency, Japan. The rest of authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the article.

REFERENCES

1. Haynes RB, Ackloo E, Sahota N, McDonald HP, Yao X. Interventions for enhancing medication adherence. Cochrane Database Syst Rev 2008; 16:CD000011.
2. Coutts JA, Gibson NA, Paton JY. Measuring compliance with inhaled medication in asthma. Arch Dis Child 1992; 67:332–333.
3. Clerisme-Beaty EM, Bartlett SJ, Teague WG, Lima J, Irvin CG, Cohen R, Castro M, Wise RA, Rand CS. The Madison avenue effect: how drug presentation style influences adherence and outcome in patients with asthma. J Allergy Clin Immunol 2011; 127:406–411.
4. Janson SL, McGrath KW, Covington JK, Cheng SC, Boushey HA. Individualized asthma self-management improves medication adherence and markers of asthma control. J Allergy Clin Immunol 2009; 123:840–846.
5. Global Initiative for asthma. Global strategy for asthma management and prevention. Revised 2010. Available at: www.ginasthma.org. Accessed March 16, 2012.
6. Barnes PJ, Dweik RA, Gelb AF, Gibson PG, George SC, Grasemann H, Pavord ID, Ratjen F, Silkoff PE, Taylor DR, Zamel N. Exhaled nitric oxide in pulmonary diseases: a comprehensive review. Chest 2010; 138:682–692.
7. Saito J, Inoue K, Sugawara A, Yoshikawa M, Watanabe K, Ishida T, Ohtsuka Y, Munakata M. Exhaled nitric oxide as a marker of airway inflammation for an epidemiologic study in schoolchildren. J Allergy Clin Immunol 2004; 114:512–516.
8. Saito J, Sato S, Hasunuma H, Ishimaru Y, Kanegae H, Kudo S, Munakata M. Off-line fractional exhaled nitric oxide measurement is useful to screen allergic airway inflammation in an adult population. J Asthma 2007; 44:805–810.
9. Sato S, Saito J, Sato Y, Ishii T, Xintao W, Tanino Y, Ishida T, Munakata M. Clinical usefulness of fractional exhaled nitric oxide for diagnosing prolonged cough. Respir Med 2008; 102:1452–1459.
10. Pinsky HL, Cates CJ, Lasserson TJ, Li AM, Turner C, Kynaston JA, Chang AB. A systematic review and meta-analysis: tailoring asthma treatment on eosinophilic markers (exhaled nitric oxide or sputum eosinophils). Thorax 2012; 67:199–208.
11. Anonymous. 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; 171:912–930.

12. Standardization of spirometry. 1994 update. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:1107–1136.
13. GINA Report. global strategy for asthma management and prevention. Revised 2005. Available at: www.ginasthma.org. Accessed March 16, 2012.
14. Horne R. Compliance, adherence, and concordance: implications for asthma treatment. *Chest* 2006; 130(Suppl. 1):65S–72S.
15. Stern L, Berman J, Lumry W, Katz L, Wang L, Rosenblatt L, Doyle JJ. Medication compliance and disease exacerbation in patients with asthma: a retrospective study of managed care data. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 97:402–408.
16. Crompton GK, Barnes PJ, Broeders M, Corrigan C, Corbett A, Dekhuijzen R, Dubus JC, Magnan A, Massone F, Sanchis J, Viejo JL, Voshaar T; Aerosol Drug Management Improvement Team. The need to improve inhalation technique in Europe: a report from the aerosol drug management improvement team. *Respir Med* 2006; 100:1479–1494.
17. Gibson PG, Powell H, Coughlan J, Wilson AJ, Abramson M, Haywood P, Bauman A, Hensley MJ, Walters EH. Self-management education and regular practitioner review for adults with asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; 1:CD001117.
18. Choi JY, Cho Chung HI. Effect of an individualised education programme on asthma control, inhaler use skill, asthma knowledge and health-related quality of life among poorly compliant Korean adult patients with asthma. *J Clin Nurs* 2011; 20:119–126.
19. van der Meer V, Bakker MJ, van den Hout WB, Rabe KF, Sterk PJ, Kievit J, Assendelft WJ, Sont JK; SMASHING (Self-Management in Asthma Supported by Hospitals, ICT, Nurses and General Practitioners) Study Group. Internet-based self-management plus education compared with usual care in asthma: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2009; 151:110–120.
20. Kauppinen R, Vilkka V, Sintonen H, Klaukka T, Tukiainen H. Long-term economic evaluation of intensive patient education during the first treatment year in newly diagnosed adult asthma. *Respir Med* 2001; 95:56–63.
21. Armour C, Bosnic-Anticevich S, Brillant M, Burton D, Emmerton L, Krass I, Saini B, Smith L, Stewart K. Pharmacy Asthma Care Program (PACP) improves outcomes for patients in the community. *Thorax* 2007; 62:496–502.
22. Dressel H, Gross C, de la Motte D, Sülz J, Jörres RA, Nowak D. Educational intervention decreases exhaled nitric oxide in farmers with occupational asthma. *Eur Respir J* 2007; 30:545–548.
23. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Brightling CE, Wardlaw AJ, Green RH. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178:218–224.
24. Lurie A, Marsala C, Hartley S, Bouchon-Meunier B, Dusser D. Patients' perception of asthma severity. *Respir Med* 2007; 101: 2145–2152.
25. Quaedvlieg V, Sele J, Henket M, Louis R. Association between asthma control and bronchial hyperresponsiveness and airways inflammation: a cross-sectional study in daily practice. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 1822–1829.
26. Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360:1715–1721.
27. de Jongste JC, Carraro S, Hop WC, Baraldi E; CHARISM Study Group. Daily telemonitoring of exhaled nitric oxide and symptoms in the treatment of childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179:93–97.
28. Szeffler SJ, Mitchell H, Sorkness CA, Gergen PJ, O'Connor GT, Morgan WJ, Kattan M, Pongracic JA, Teach SJ, Bloomberg GR, Eggleston PA, Gruchalla RS, Kercsmar CM, Liu AH, Wildfire JJ, Curry MD, Busse WW. Management of asthma based on exhaled nitric oxide in addition to guideline-based treatment for inner-city adolescents and young adults: a randomised controlled trial. *Lancet* 2008; 372:1065–1072.
29. Pijnenburg MW, Bakker EM, Hop WC, De Jongste JC. Titrating steroids on exhaled nitric oxide in children with asthma: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:831–836.
30. Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, Herbison GP, Taylor DR. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N Engl J Med* 2005; 352:2163–2173.
31. Smith AD, Cowan JO, Taylor DR. Exhaled nitric oxide levels in asthma: personal best versus reference values. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124:714–718.
32. Jones SL, Kittelson J, Cowan JO, Flannery EM, Hancox RJ, McLachlan CR, Taylor DR. The predictive value of exhaled nitric oxide measurements in assessing changes in asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:738–743.
33. Michils A, Baldassarre S, Van Muylem A. Exhaled nitric oxide and asthma control: a longitudinal study in unselected patients. *Eur Respir J* 2008; 31:539–546.
34. Schatz M, Kosinski M, Yarlas AS, Hanlon J, Watson ME, Jhingran P. The minimally important difference of the asthma control test. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124:719–723.

Review Series: Non-Invasive Monitoring of Airway Inflammation in Asthma

Exhaled Nitric Oxide (FeNO) as a Non-Invasive Marker of Airway Inflammation

Mitsuru Munakata^{1,2}

ABSTRACT

Nitric oxide (NO), previously very famous for being an environmental pollutant in the field of pulmonary medicine, is now known as the smallest, lightest, and most famed molecule to act as a biological messenger. Furthermore, recent basic researches have revealed the production mechanisms and physiological functions of nitric oxide in the lung, and clinical researches have been clarifying its tight relation to airway inflammation in asthma. On the bases of this knowledge, fractional nitric oxide (FeNO) has now been introduced as one of the most practical tools for the diagnosis and management of bronchial asthma.

KEY WORDS

asthma, cut-off, diagnosis, monitor, non-invasive

INTRODUCTION

Previously known as a toxic molecule listed as an environmental pollutant, nitric oxide (NO) is now known to be the smallest, lightest, and most famed molecule to act as a biological messenger in mammals. NO was first recognized as a physiologically important molecule in the manuscript written by Furchtgott and Zawadzki, entitled "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine", published in Nature in 1980.¹ Initially, the factor released from vascular endothelial cells was named as endothelium derived relaxing factor (EDRF), and large number of scientists had been pursued the true feature of EDRF. In 1987, two groups led by Ignaro and by Moncada, independently discovered and reported that EDRF is a simple gaseous molecule called NO.^{2,3} After the discovery, a large amount of studies in field of medicine revealed its many roles in a wide range of pathophysiological status including cardiovascular, immune, metabolic, and neurological diseases. For an ordinary person, it became a very famous physiological mediator of penile erection and opened the door for the treatment

of impotence.⁴ In 1992, NO was selected as Molecule of the Year for a startlingly simple molecule unites neuroscience, physiology and immunobiology and revised scientists' understanding of how cells communicate and defend themselves.⁵ In 1998, the Nobel prize for Physiology or Medicine was awarded to Doctors, Furchtgott R, Ignarro L, and Murad F.⁶

In the field of pulmonary medicine, physiological and pathological roles of NO in lung disease have also been investigated. Epithelium dependent inhibition of airway smooth muscle contraction and epithelium dependent relaxation of airway smooth muscle, similar effect of vascular endothelium to vascular smooth muscle, have been reported.^{7,8} These phenomena also suggested the existence of epithelium derived relaxing factor (EpDRF).⁹ Since NO is also confirmed to be a potent smooth muscle relaxing agent (Fig. 1),¹⁰ several pharmacological studies verifying whether EpDRF is also NO were carried out and confirmed production of NO from airway epithelium.¹¹ In these processes, measurement systems for NO in exhaled air have been developed.¹² By applying such systems, exhaled NO have been measured in many pulmonary diseases and significant increase

¹Fukushima Medical University Hospital and ²Fukushima Medical University, Fukushima, Japan.

Conflict of interest: No potential conflict of interest was disclosed.

Correspondence: Mitsuru Munakata, MD, PhD, President, Fukushima Medical University Hospital, Director, Fukushima Medi-

cal University, Fukushima 960-1295, Japan.

Email: munakata@fmu.ac.jp

Received 2 May 2012.

©2012 Japanese Society of Allergology

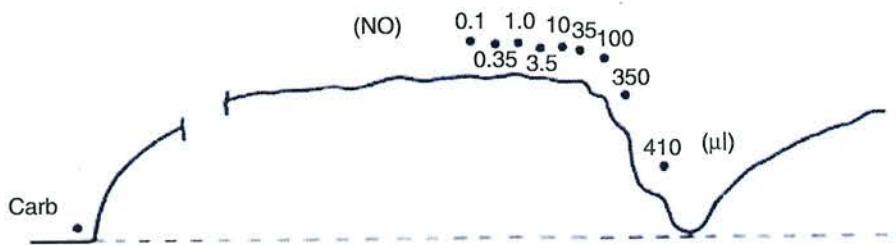


Fig. 1 Airway smooth muscle relaxation induced by nitric oxide (NO). Guinea pig tracheal strip was contracted by stimulated by Carbachol (Carb), then 0.1 to 410 μ l of saturated solution of NO (estimated concentration 2 mM) was prepared, and was added to the tissue bath. Clear concentration-dependent relaxation was observed (Adapted from reference 10).

in exhaled NO of the patients with asthma became apparent.^{13,14} Since the measurement is noninvasive and effort independent, exhaled NO has been much expected as a new tool for the diagnosis and management of asthma, and large efforts have been devoted on the clinical research.

PRODUCTION AND FUNCTION OF NO IN THE AIRWAYS

In the respiratory tract, NO is produced by a wide variety of cell types and is generated through conversion of L-arginine to L-citrulline by the action of nitric oxide synthase (NOS). Three isoforms of NOS are known: neuronal NOS (NOS I or nNOS), inducible NOS (NOS II or iNOS), and endothelial NOS (NOS III or eNOS).¹⁵ Two isoforms, nNOS and eNOS, are expressed constitutively, but iNOS is not normally expressed in most tissues but is induced in several types of cells by pro-inflammatory cytokines.¹⁶⁻¹⁸ All three types of NOS isoforms are known to be expressed in the lung. Endothelial NOS (eNOS) immunoreactivity is found in endothelial cells of pulmonary vessels. In addition, it is constitutively expressed in human bronchial epithelium and in type II pneumocytes.^{19,20} NO produced by eNOS and released from endothelial cells in the pulmonary circulation is speculated to regulate vascular basal tone and counteract hypoxic vasoconstriction.²¹ Neuronal NOS (nNOS) is expressed in human airway nerves, including those present in the airway smooth muscle,^{22,23} and is estimated to be a major mediator of the inhibitory non-adrenergic non-cholinergic nervous (iNANC) system.²⁴ Co-localization with vasoactive intestinal polypeptide (VIP) is also observed.²⁵ Nerves distributed to submucosal glands also contain nNOS and NO regulates secretory function of the glands.^{22,26} In the lung, iNOS (or NOS II) is known to be expressed in macrophages,²⁷ epithelial cells,²⁸⁻³⁰ type II pneumocytes,^{31,32} endothelial cells,³³ airway and vascular smooth muscle,³⁴ mast cells,³⁵ neutrophils,³⁶ chondrocytes,²³ and fibroblast.³⁷ Usually, iNOS in these cells is expressed when stimulated by endogenous mediators such as chemokines and cy-

tokines, and by exogenous stimulant such as bacterial toxins, viruses, allergens, etc. Constitutive expression of iNOS in airway epithelial cells and rapid loss of its expression after removal of the epithelial cells from the in vivo airway environment were reported only in humans and suggest that the expression is dependent upon conditions and/or factors present in the airway.³⁸ iNOS derived NO is also speculated to regulate both airway smooth muscle tone and inflammatory responses.

MEASUREMENT OF EXHALED NO

The presence of NO in the exhaled air of humans was demonstrated by chemiluminescence, diazotization and mass spectrometry in 1991.¹² Thereafter, several measurement systems have been developed. The most commonly used system is chemiluminescence, and in Japan, two types are available; NOA280i (Severs, GE Analytical Instruments, Boulder, USA) and NA623N (Chest MI, Tokyo, Japan). These can be applied for both online and offline measurement of fractional exhaled NO (FeNO) in ppb. With these two types, we can get almost the same FeNO values.³⁹⁻⁴² It is known that FeNO is strongly affected by expiratory flow rate, FeNO levels in dead space air are high, and those in nasal cavities are very high. Therefore, several cautions should be kept in mind to get reasonable FeNO values. These cautions are included in American Thoracic Society (ATS) and European Respiratory Society (ERS) recommendations for the measurement of FeNO,^{43,44} and following these recommendations is very important when FeNO is measured with these analyzers.

Another NO measurement system is the electrochemical method. The merits of the system are its compact size and portability. In Japan, two types of analyzers, NIOX MINO (Aerocrine, Stockholm, Sweden) and NObreath (Bedfont Scientific, Kent, UK), are available. There are some differences in FeNO levels measured by these analyzers when compared to a chemiluminescence analyzer. Differences of FeNO levels measured by different analyzers have been examined and conversion equations are also

available.³⁹⁻⁴² Several attempts to separate alveolar NO from airway NO have been performed by measuring FeNO at multiple exhalation flow rates,⁴⁵⁻⁴⁸ however, it seems very difficult to apply such methods to clinical medicine and they might be useful as research tools.

NO AND AIRWAY INFLAMMATION IN ASTHMA

Asthma is a syndrome characterized by the presence of two physiological characteristics, reversible airflow limitation and airway hyperresponsiveness with respiratory symptoms. However, a recent advance in asthma research revealed the importance of airway inflammation existing behind these physiological characteristics. According to such progress in the concept of asthma, diagnosis and treatment strategies have been changing dramatically. One of the most prominent examples is the introduction of anti-inflammatory therapy with ICS, resulting in the pronounced improvement in control and quality of life of the patients, and a dramatic reduction in the number of emergency room visit and deaths of the patients in Japan.

The recognition of the important roles of airway inflammation in asthma also promoted the development of new technology to evaluate airway inflammation in asthma. In these processes, a FeNO measurement was recognized as the most anticipated candidate. In early 1990s, significant increase in FeNO of ICS naïve patients with asthma, and decreased FeNO after ICS treatment was revealed,^{13,14} suggesting the relationship between airway inflammation and elevation of FeNO. Hamid *et al.* applied immune-histochemical methods for bronchial biopsy specimen to investigate the presence of NOS in asthma. Immunoreactivity to iNOS was observed in the epithelium and some inflammatory cells in 22 of 23 biopsies from asthmatics, but in only 2 of 20 controls.⁴⁹ Guo *et al.* also examined iNOS expression by mRNA and protein assay and revealed that human airway epithelium has abundant expression of iNOS due to continuous transcriptional activation of the gene *in vivo*, and that individuals with asthma have higher than normal NO concentrations and increased iNOS mRNA and protein due to transcriptional regulation through activation of STAT1.⁵⁰ In addition, they revealed decreased expression of iNOS mRNA in asthmatics receiving ICS.⁵⁰ Redington *et al.* also examined iNOS expression in the airway epithelium and revealed enhanced expression in asthmatic subjects and regulation by corticosteroid treatment.⁵¹

The regulation mechanisms of iNOS expression are far from full elucidation. Although abundant expression of iNOS is observed in human airway epithelium, it will instantly disappear when these cells are cultured *ex vivo*,³⁸ suggesting the existence of *in vivo* factors or stimuli in the airway. In other types of cells,

iNOS expression is only observed after stimulation with cytokines such as IFN- γ , IL-1 β , and/or TNF- α .⁵² Guo *et al.* revealed that a combination of IFN- γ /IL-4, which occurs naturally in lung epithelial lining fluid, leads to maintenance of iNOS expression in human airway epithelium through production of soluble mediators and stabilization of mRNA.⁵³ Alving and Malinovschi suggested a possible model of iNOS regulation of human airway from the results of recent studies⁵⁴ (Fig. 2). In healthy subjects (Fig. 2a), continuous expression of iNOS is maintained by IFN- γ , which normally exists in the respiratory tract. In this process, induction of unidentified soluble mediators by IFN- γ and the subsequent activation of the JAK/STAT pathway are considered to be important.⁵⁵ In asthmatic airways (Fig. 2b), different regulation mechanisms are estimated (Fig. 2b). Initially, Th2 cytokines such as IL-4 and IL-13 were recognized to down-regulate iNOS expression.⁵⁶ However, several recent studies revealed that IL-4 and IL-13 actually induce iNOS expression in human airway epithelial cells in reasonable medium conditions through the STAT-6 pathway.^{50,53,57,58}

There are several epidemiological evidences suggesting the relation between allergic airway inflammation and increased FeNO. Saito *et al.* examined FeNO levels, pulmonary function, and serum total and antigen specific IgE levels in 278 normal school children aged 10 to 12.⁵⁹ There are statistically significant positive correlations between FeNO and total IgE or mite specific IgE, and significant negative correlations between FeNO and FEV1/FVC. In addition, FeNO was determined by means of multiple logistic regression analysis to be the best predictor for recurrent wheeze, suggesting the relationship between allergic airway inflammation and FeNO levels. They also obtained the same results when they examined 280 normal adults aged 18 to 82 who received annual health check.⁶⁰ Moody *et al.* revealed that the increase in FeNO is associated with house dust mite sensitivity in asymptomatic subjects.⁶¹ Additionally, some atopic subjects without symptoms and airway hyperresponsiveness have airway eosinophilic inflammation.⁶² These findings support the tight relationship between increase of FeNO levels and allergic airway inflammation.

NO AS A DIAGNOSTIC TOOL OF ASTHMA

Traditionally, asthma has been characterized by respiratory symptoms such as cough, wheeze, and dyspnea, reversible airflow limitation, and non-specific airway hyperresponsiveness.^{63,64} These are evaluated by pulmonary function tests before and after inhalation of bronchodilators such as β -adrenergic receptor agonists, and bronchial challenge test with bronchoconstrictors such as histamine and acetylcholine.⁶⁴ For the airway inflammation, trans-bronchial biopsy (TBB) and brochoalveolar lavage (BAL) under the fi-

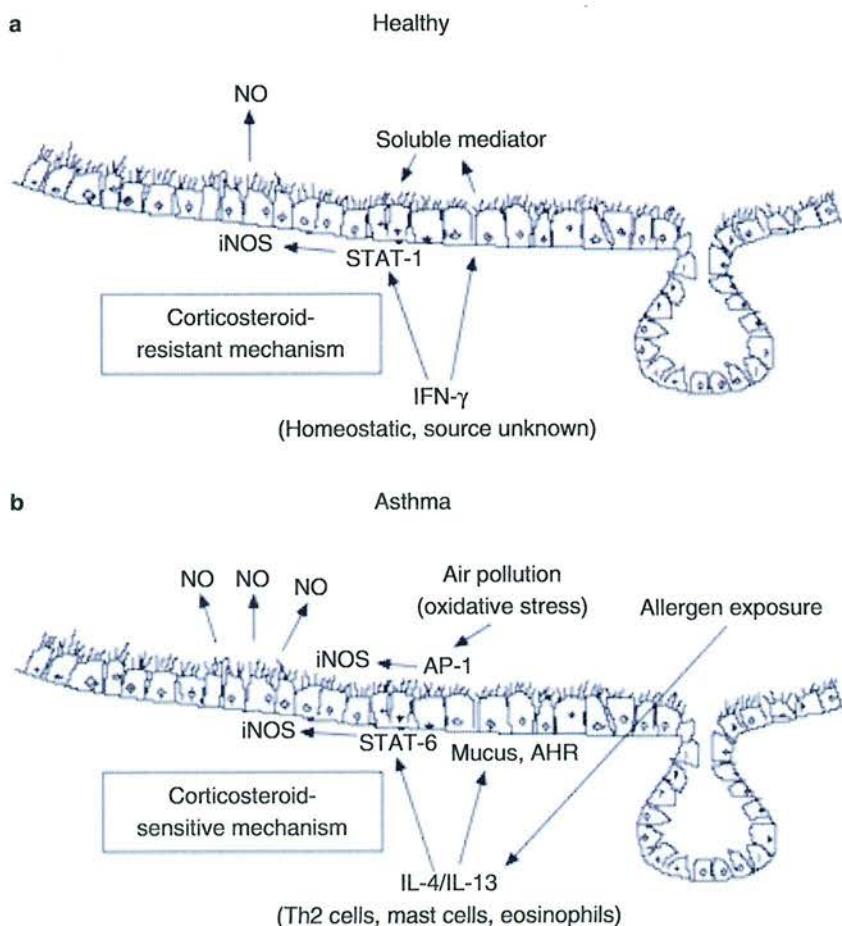


Fig. 2 A possible model of iNOS regulation of human airway. **a)** normal healthy airway, **b)** asthmatic airway (Adapted from reference 54).

beroptic bronchoscopic examination are applied. Recently, cell sorting of sputum induced by the inhalation of hypertonic saline has also been utilized. However, these methods are relatively invasive and sometimes induce asthma attacks. It is therefore difficult to apply widely in general clinical practice.

Because of the tight relation between FeNO and allergic airway inflammation and its non-invasiveness, attempts to use FeNO as a non-invasive tool for asthma diagnosis have been carried out in various clinical settings. Sato *et al.* examined 71 consecutive patients who visited out-patient clinics by complaining chronic cough continuing more than 3 weeks.⁶⁵ They examined FeNO, pulmonary function, serum IgE, methacholine airway responsiveness and induced sputum. FeNO is significantly higher in patients with asthma and cough variant asthma compared to other diseases including COPD and eosinophilic pneumonia without asthma, suggesting the usefulness of FeNO measurement in the diagnosis of asthma in patients with chronic cough. Cut-off value for FeNO for the diagnosis of asthma was 38.8 ppb with sensitivity of 79.2% and specificity of 91.3%. Simi-

lar results were also reported in patients with chronic cough by Chatkin *et al.*, Fujimura *et al.*, and Kowal *et al.*⁶⁶⁻⁶⁸

For the patients with non-specific respiratory symptoms and suspected to having asthma, Smith *et al.* examined FeNO and sputum eosinophils in addition to conventional peak expiratory flow and spirometric parameters before and after bronchodilator treatment.⁶⁹ They observed the overall superiority of FeNO measurements and induced sputum analysis in the diagnosis of asthma compared with conventional tests. DuPont *et al.* also reported the usefulness of FeNO in 160 asthmatic patients diagnosed by the presence of reversible airflow obstruction (Δ FEV1 > 12%) and histamine airway hyperresponsiveness ($PC_{20} < 8.0$ mg/ml).⁷⁰ Their cut-off level of FeNO at expiratory flow rate of 200 ml/s (FeNO200) was 16.0 ppb with the sensitivity of 69.4% and specificity of 90.0%. Fortuna *et al.* also reported that the diagnostic accuracy of FeNO measurement was superior to that of the standard diagnostic spirometry in patients with symptoms suggestive of asthma.⁷¹ Fukuhara *et al.* recently reported the results of their prospective validation

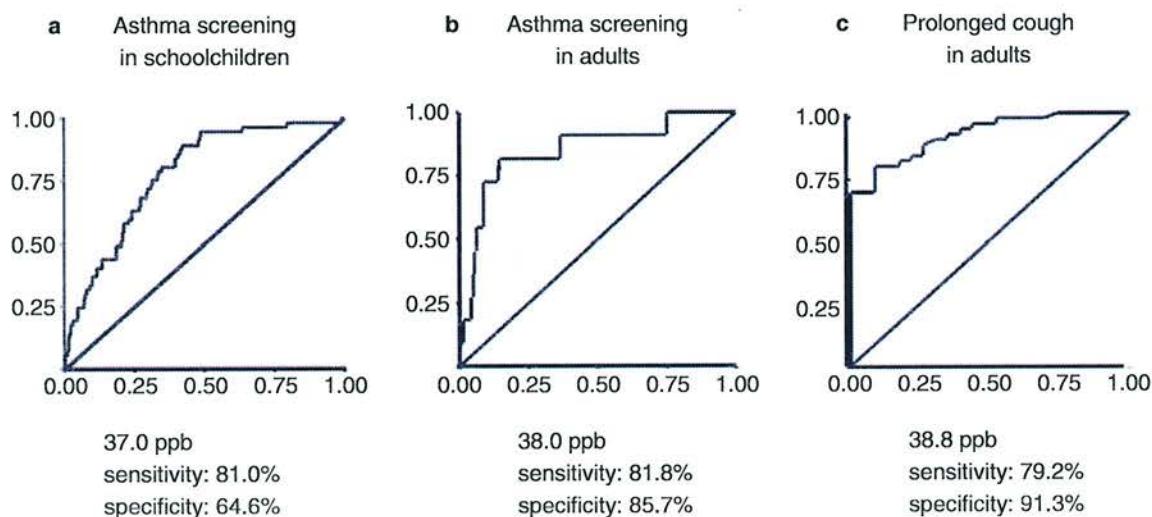


Fig. 3 The cut-off levels of fractional exhaled nitric oxide (FeNO) for diagnosing asthma obtained from 3 independent studies. **a)** for 277 school children, **b)** for 280 adult volunteers, **c)** for 71 patients with chronic cough (Adapted from reference 42).

study of asthma screening criteria based on subjective symptoms and FeNO at expiratory flow rate of 50 ml/sec (FeNO₅₀); i) recurrent cough, wheezing, or dyspnea; ii) FeNO₅₀ > 40 ppb, iii) exclusion of other lung diseases.⁴² A cut-off value of 40 ppb was determined by the results of their 3 previous independent studies on school children, normal adults, and patients with prolonged cough (Fig. 3).^{59,60,65} When compared to conventional asthma diagnostic criteria based on GINA and JGL guidelines,^{63,64} FeNO based criteria showed good sensitivity, specificity, and a concordance rate (k) (78.6%, 89.5%, and 0.62, respectively). However, 9 of 42 patients were misdiagnosed as not having asthma by FeNO based criteria, and 7 of these 9 patients were non-atopic according to their IgE levels. From these results, they suggested that FeNO could be used as a tool for the non-invasive accurate diagnosis of asthma, particularly in atopic patients in daily clinical practice.

NO AS A CONTROL TOOL OF ASTHMA

Understanding that the most basic event in asthma is airway inflammation and the tight correlation between FeNO and airway inflammation has motivated the application of FeNO as a monitoring tool for asthma control. In 2005, Smith *et al.* did a single-blind, placebo-controlled trial of adult asthmatics to examine the usefulness of FeNO measurements for the adjustment of ICS doses. With the FeNO based strategy, the maintenance doses of ICS were significantly reduced without compromising asthma control compared to those with an algorithm based on conventional guidelines.⁷² In the same year, Pijnenburg *et al.* did a randomized controlled trial to examine the usefulness of FeNO for the titration of ICS in atopic children with asthma. They also found that FeNO im-

proved airway hyperresponsiveness and inflammation without elevating the ICS doses.⁷³ Following these studies, several consecutive studies were conducted and controversial results were reported. For the adult asthmatics, Shaw *et al.* reported that a treatment strategy based on FeNO measurement did not result in a large reduction in asthma exacerbation or in the total amount of ICS therapy used over 12 months, compared with the current asthma guideline.⁷⁴ But when the results were pored over precisely, in the initial several months, the required dose of ICS was higher in the FeNO based group compared to the control group, the dose gradually declined and the final daily dose of ICS was significantly lower in the FeNO based group compared to the control group (average; 557 ug/day and 895 ug/day, respectively, $p < 0.028$). More recently, Powel *et al.* carried out a double-blinded, randomized controlled trial to examined the usefulness of asthma management in pregnancy guided by FeNO. They revealed that asthma exacerbations during pregnancy can be significantly reduce with a validated FeNO-based treatment algorithm.⁷⁵ For adolescents and young adults, Szefler *et al.* did the largest randomized controlled trial to date with 780 patients with asthma to examine the usefulness of FeNO-based asthma management in addition to guideline-based treatment. They concluded that the addition of FeNO as an indicator of asthma control resulted in higher doses of ICS, without clinically important improvements in symptomatic asthma control.⁷⁶ But the subgroup analyses of the patients with a higher number of positive skin tests or those with serum nonspecific IgE higher than 460 kU/L revealed that the FeNO monitoring group had significantly fewer maximum days with symptoms in 2 weeks than that of the control group (0.84 and 0.51, p

< 0.024 and $p < 0.007$, respectively). As shown in the previous section, FeNO is suggested to be a very useful tool to monitor airway inflammation in atopic subjects. From these facts, it is suggested that application of FeNO as a tool for asthma control might be limited to the patients with atopic asthma.

Another point that should be borne in mind is the fact that the period of previously introduced studies were only up to 12 months. Sont *et al.* compared the difference in histopathologic outcome of asthma when using airway hyperresponsiveness as an additional guide to long-term treatment. They demonstrated that the examined strategy group showed a greater reduction in thickness of the subepithelial reticular layer compared to the reference strategy group, suggesting a role for the monitoring of airway hyperresponsiveness or other surrogate makers of inflammation in preventing airway remodeling.⁷⁷ Long-term usefulness of FeNO as a monitoring tool for asthma control, whether it could be helpful in prevention of airway remodeling or in decreasing annual decline in FEV₁, needs to be examined.

FUTURE DIRECTIONS

As noted above, FeNO is a very useful diagnostic tool and control monitoring maker of asthma. Usefulness of FeNO in asthma management is probably better than spirogram, induced sputum, and AHR test, because of its non-invasiveness, effort independency, measurement simplicity, and reproducibility. Although the FeNO analyzer has not been approved as a medical device, it will be widely used as a convenient clinical tool for asthma management in the near future in Japan.

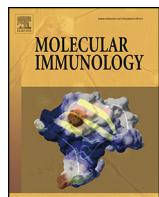
The FeNO analyzer has been used as a clinical research tools and wide application of FeNO in the clinical setting revealed the issues that should be solved before its clinical application. Now, many researchers recognize that there is a minor population of subjects with very high levels of FeNO without respiratory symptoms, and that there are asthmatics with all asthmatic symptoms but with normal FeNO levels. The mechanisms behind these phenomena are unclear, meaning that the production mechanisms of NO in the airway and lung parenchyma have not been thoroughly clarified. Additional point is that, although the ATS/ERS guideline was established to standardize the FeNO measurements,⁴³ there are variations in FeNO values measured by different analyzers.^{41,42} It also affects the determination FeNO cutoff levels for the diagnosis and control of asthma. In addition, to be used widely in the clinical practice, the development of handier, more accurate, less expensive measurement systems is required. Furthermore, not only more practical studies but also more basic studies will be warranted.

REFERENCES

1. Furchtgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-6.
2. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:9265-9.
3. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-6.
4. Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science* 1992;257:401-3.
5. Anonymous. No news is good news. *Science* 1992;258:1862-3.
6. Howlett R. Nobel award stirs up debate on nitric oxide breakthrough. *Nature* 1998;395:625-6.
7. Flavahan NA, Aarhus LL, Rimele TJ, Vanhoutte PM. Respiratory epithelium inhibits bronchial smooth muscle tone. *J Appl Physiol* 1985;58:834-8.
8. Munakata M, Mitzner W, Menkes H. Osmotic stimuli induce epithelial-dependent relaxation in the guinea pig trachea. *J Appl Physiol* 1988;64:466-71.
9. Farmer S, Hay D. Airway epithelial modulation of smooth-muscle function: the evidence for epithelium-derived inhibitory factor. In: Farmer S, Hay D (eds). *The Airway Epithelium: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology (Lung Biology in Health and Disease)*. New York: Marcel Dekker, 1991;437-836.
10. Munakata M, Masaki Y, Sakuma I *et al*. Pharmacological differentiation of epithelium-derived relaxing factor from nitric oxide. *J Appl Physiol* 1990;69:665-70.
11. Figini M, Ricciardolo FL, Javdan P *et al*. Evidence that epithelium-derived relaxing factor released by bradykinin in the guinea pig trachea is nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:918-23.
12. Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:852-7.
13. Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J* 1993;6:1368-70.
14. Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994;343:133-5.
15. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004;84:731-65.
16. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988;141:2407-12.
17. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:7773-7.
18. Morris SM Jr, Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 1994;266 (Pt 1):E829-39.
19. Shaul PW, North AJ, Wu LC *et al*. Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epi-

- thelium. *J Clin Invest* 1994;94:2231-6.
20. Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol* 2002;64:749-74.
 21. Persson MG, Gustafsson LE, Wiklund NP, Moncada S, Hedqvist P. Endogenous nitric oxide as a probable modulator of pulmonary circulation and hypoxic pressor response in vivo. *Acta Physiol Scand* 1990;140:449-57.
 22. Fischer A, Hoffmann B. Nitric oxide synthase in neurons and nerve fibers of lower airways and in vagal sensory ganglia of man. Correlation with neuropeptides. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:209-16.
 23. Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ *et al.* Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;9:371-7.
 24. Widdicombe JG. Autonomic regulation. i-NANC/e-NANC. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158(Pt 3):S171-5.
 25. Kummer W, Fischer A, Mundel P *et al.* Nitric oxide synthase in VIP-containing vasodilator nerve fibres in the guinea-pig. *Neuroreport* 1992;3:653-5.
 26. Tamada T, Nara M, Kanatsuka H *et al.* A potentiating effect of endogenous NO in the physiologic secretion from airway submucosal glands. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;37:357-65.
 27. Pechkovsky D, Zissel VG, Stamm C *et al.* Human alveolar epithelial cells induce nitric oxide synthase-2 expression in alveolar macrophages. *Eur Respir J* 2002;19:672-83.
 28. Asano K, Chee CB, Gaston B *et al.* Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:10089-93.
 29. Watkins DN, Peroni DJ, Basclain KA, Garlepp MJ, Thompson PJ. Expression and activity of nitric oxide synthases in human airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;16:629-39.
 30. Pechkovsky DV, Zissel G, Goldmann T *et al.* Pattern of NOS2 and NOS3 mRNA expression in human A549 cells and primary cultured AEC II. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L684-92.
 31. Adcock IM, Brown CR, Kwon O, Barnes PJ. Oxidative stress induces NF kappa B DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;199:1518-24.
 32. Warner RL, Paine R, Christensen PJ 3rd *et al.* Lung sources and cytokine requirements for in vivo expression of inducible nitric oxide synthase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:649-61.
 33. Ermert M, Ruppert C, Gunther A, Duncker HR, Seeger W, Ermert L. Cell-specific nitric oxide synthase-isoenzyme expression and regulation in response to endotoxin in intact rat lungs. *Lab Invest* 2002;82:425-41.
 34. Xue C, Rengasamy A, Le Cras TD, Koberna PA, Dailey GC, Johns RA. Distribution of NOS in normoxic vs. hypoxic rat lung: upregulation of NOS by chronic hypoxia. *Am J Physiol* 1994;267(Pt 1):L667-78.
 35. Gilchrist M, Savoie M, Nohara O, Wills FL, Wallace JL, Befus AD. Nitric oxide synthase and nitric oxide production in in vivo-derived mast cells. *J Leukoc Biol* 2002;71:618-24.
 36. Blackford JA, Antonini JM Jr, Castranova V, Dey RD. Intratracheal instillation of silica up-regulates inducible nitric oxide synthase gene expression and increases nitric oxide production in alveolar macrophages and neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;11:426-31.
 37. Romanska HM, Polak JM, Coleman RA *et al.* iNOS gene upregulation is associated with the early proliferative response of human lung fibroblasts to cytokine stimulation. *J Pathol* 2002;197:372-9.
 38. Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FB, Erzurum SC. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7809-13.
 39. Muller KC, Jorres RA, Magnussen H, Holz O. Comparison of exhaled nitric oxide analysers. *Respir Med* 2005;99:631-7.
 40. Borrell Z, Clough D, Truman N, Morris J, Langley S, Singh D. A comparison of exhaled nitric oxide measurements performed using three different analysers. *Respir Med* 2006;100:1392-6.
 41. Saito J, Fukuhara A, Sato Y *et al.* [Differences of fractional exhaled nitric oxide (FeNO) levels performed using two different analyzers]. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 2010;48:17-22.
 42. Fukuhara A, Saito J, Sato S *et al.* Validation study of asthma screening criteria based on subjective symptoms and fractional exhaled nitric oxide. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011;107:480-6.
 43. 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.
 44. Kharitonov S, Alving K, Barnes PJ. Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendations. The European Respiratory Society Task Force. *Eur Respir J* 1997;10:1683-93.
 45. Tsoukias NM, George SC. A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. *J Appl Physiol* 1998;85:653-66.
 46. Tsoukias NM, Tannous Z, Wilson AF, George SC. Single-exhalation profiles of NO and CO₂ in humans: effect of dynamically changing flow rate. *J Appl Physiol* 1998;85:642-52.
 47. Condorelli PH, Shin W, Aledia AS, Silkoff PE, George SC. A simple technique to characterize proximal and peripheral nitric oxide exchange using constant flow exhalations and an axial diffusion model. *J Appl Physiol* 2007;102:417-25.
 48. Kerckx Y, Michils A, Van Muylem A. Airway contribution to alveolar nitric oxide in healthy subjects and stable asthma patients. *J Appl Physiol* 2008;104:918-24.
 49. Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V *et al.* Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* 1993;342:1510-3.
 50. Guo FH, Comhair SA, Zheng S *et al.* Molecular mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis. *J Immunol* 2000;164:5970-80.
 51. Redington AE, Meng QH, Springall DR *et al.* Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in the airway epithelium of asthmatic subjects and regulation by corticosteroid treatment. *Thorax* 2001;56:351-7.
 52. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994;78:915-8.
 53. Guo FH, Uetani K, Haque SJ *et al.* Interferon gamma and interleukin 4 stimulate prolonged expression of inducible nitric oxide synthase in human airway epithelium through synthesis of soluble mediators. *J Clin Invest* 1997;100:

- 829-38.
54. Alving K, Malinovschi A. Basic aspects of exhaled nitric oxide. In: Horvath I, de Jongste JC (eds). *Exhaled Biomarkers, European Respiratory Society Monograph*. Lausanne: European Respiratory Society, 2010;1-31.
 55. Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 2004;500:255-66.
 56. Berkman N, Robichaud A, Robbins RA et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by interleukin-4 and interleukin-13 in human lung epithelial cells. *Immunology* 1996;89:363-7.
 57. Suresh V, Mih JD, George SC. Measurement of IL-13-induced iNOS-derived gas phase nitric oxide in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37:97-104.
 58. Chibana K, Trudeau JB, Mustovich AT et al. IL-13 induced increases in nitrite levels are primarily driven by increases in inducible nitric oxide synthase as compared with effects on arginases in human primary bronchial epithelial cells. *Clin Exp Allergy* 2008;38:936-46.
 59. Saito J, Inoue K, Sugawara A et al. Exhaled nitric oxide as a marker of airway inflammation for an epidemiologic study in schoolchildren. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:512-6.
 60. Saito J, Sato S, Hasunuma H et al. Off-line fractional exhaled nitric oxide measurement is useful to screen allergic airway inflammation in an adult population. *J Asthma* 2007;44:805-10.
 61. Henriksen AH, Holmen TL, Bjermer L. Sensitization and exposure to pet allergens in asthmatics versus non-asthmatics with allergic rhinitis. *Respir Med* 2001;95:122-9.
 62. Djukanovic R, Lai CK, Wilson JW et al. Bronchial mucosal manifestations of atopy: a comparison of markers of inflammation between atopic asthmatics, atopic nonasthmatics and healthy controls. *Eur Respir J* 1992;5:538-44.
 63. Global Initiative for Asthma Management and Prevention: NHLBI/WHO Workshop Reprots. Bethesda, MD: National Institute Heart, Lung, and Blood Institute, 2010.
 64. Ohta K, Yamaguchi M, Akiyama K et al. Japanese guideline for adult asthma. *Allergol Int* 2011;60:115-45.
 65. Sato S, Saito J, Sato Y et al. Clinical usefulness of fractional exhaled nitric oxide for diagnosing prolonged cough. *Respir Med* 2008;102:1452-9.
 66. Chatkin JM, Ansarin K, Silkoff PE et al. Exhaled nitric oxide as a noninvasive assessment of chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1810-3.
 67. Fujimura M, Ohkura N, Abo M et al. Exhaled nitric oxide levels in patients with atopic cough and cough variant asthma. *Respirology* 2008;13:359-64.
 68. Kowal K, Bodzenta-Lukaszyk A, Zukowski S. Exhaled nitric oxide in evaluation of young adults with chronic cough. *J Asthma* 2009;46:692-8.
 69. Smith AD, Cowan JO, Filsell S et al. Diagnosing asthma: comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:473-8.
 70. Dupont IJ, Demedts MG, Verleden GM. Prospective evaluation of the validity of exhaled nitric oxide for the diagnosis of asthma. *Chest* 2003;123:751-6.
 71. Fortuna AM, Feixas T, Gonzalez M, Casan P. Diagnostic utility of inflammatory biomarkers in asthma: exhaled nitric oxide and induced sputum eosinophil count. *Respir Med* 2007;101:2416-21.
 72. Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, Herbison GP, Taylor DR. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N Engl J Med* 2005;352: 2163-73.
 73. Pijnenburg MW, Bakker EM, Hop WC, De Jongste JC. Titrating steroids on exhaled nitric oxide in children with asthma: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:831-6.
 74. Shaw DE, Berry MA, Thomas M 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.
 75. Powell H, Murphy VE, Taylor DR et al. Management of asthma in pregnancy guided by measurement of fraction of exhaled nitric oxide: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2011;378:983-90.
 76. Szefler SJ, Mitchell H, Sorkness CA et al. Management of asthma based on exhaled nitric oxide in addition to guideline-based treatment for inner-city adolescents and young adults: a randomised controlled trial. *Lancet* 2008; 372:1065-72.
 77. Sont JK, Willems LN, Bel EH, van Krieken JH, Vandebroucke JP, Sterk PJ. Clinical control and histopathologic outcome of asthma when using airway hyperresponsiveness as an additional guide to long-term treatment. The AMPUL Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159(Pt 1):1043-51.



Functional assessment of the mutational effects of human IRAK4 and MyD88 genes



Takahiro Yamamoto^{a,1}, Naotaka Tsutsumi^{b,1}, Hidehito Tochio^{b,**}, Hidenori Ohnishi^{a,*}, Kazuo Kubota^a, Zenichiro Kato^a, Masahiro Shirakawa^{b,c}, Naomi Kondo^{a,d}

^a Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1194, Japan

^b Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Katsura, Nishikyo-ku, Kyoto 615-8510, Japan

^c Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Corporation, 4-1-8 Hon-cho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan

^d Heisei College of Health Sciences, 180 Kurono, Gifu 501-1131, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 October 2013

Received in revised form 8 November 2013

Accepted 9 November 2013

Available online 5 December 2013

Keywords:

IRAK4
MyD88
Myddosome
TIR domain
Death domain
Immune-deficiency

ABSTRACT

Human interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4) deficiency and myeloid differentiating factor 88 (MyD88) deficiency syndromes are two primary immune-deficiency disorders with innate immune defects. Although new genetic variations of IRAK4 and MyD88 have recently been deposited in the single nucleotide polymorphism (SNP) database, the clinical significance of these variants has not yet been established. Therefore, it is important to establish methods for assessing the association of each gene variation with human diseases. Because cell-based assays, western blotting and an NF-κB reporter gene assay, showed no difference in protein expression and NF-κB activity between R12C and wild-type IRAK4, we examined protein-protein interactions of purified recombinant IRAK4 and MyD88 proteins by analytical gel filtration and NMR titration. We found that the variant of IRAK4, R12C, as well as R20W, located in the death domain of IRAK4 and regarded as a SNP, caused a loss of interaction with MyD88. Our studies suggest that not only the loss of protein expression but also the defect of Myddosome formation could cause IRAK4 and MyD88 deficiency syndromes. Moreover a combination of *in vitro* functional assays is effective for confirming the pathogenicity of mutants found in IRAK4 and MyD88-deficiency patients.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) 4 is the one of the essential molecules of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway (Suzuki et al., 2002). In this pathway, ligand-induced hetero- or homodimerization of receptors recruits the Toll/interleukin-1 receptor homology domain (TIR domain) containing adaptor oligomers. One of these adaptors, MyD88, then binds IRAK4 (Burns et al., 2003). Recently, defects in the innate

immune system have been shown to cause newly categorized human primary immune-deficiency syndromes (Al-Herz et al., 2011) such as human IRAK4 deficiency (Picard et al., 2003).

In affected IRAK4 deficient patients, invasive infections such as bacterial meningitis, sepsis, arthritis, or osteomyelitis are caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* (Picard et al., 2010). Human MyD88 deficiency (von Bernuth et al., 2008) has remarkably similar clinical features to human IRAK4 deficiency. Interestingly, the life-threatening infections in IRAK4 or MyD88 deficient patients first occur during early infancy, but their frequency and severity reduce after the teenage years (Picard et al., 2011). Therefore, it is necessary for them to be diagnosed quickly.

IRAK4 and MyD88 proteins both consist of two major functional domains. In IRAK4, the death domain (DD) interacts with MyD88, while the kinase domain phosphorylates downstream signaling factors such as IRAK1, IRAK2, and subsequently causes activation of TNF Receptor Associated Factor 6 (TRAF6). In MyD88, both the DD and TIR domains interact in homotypic binding to similar domain structures. The domain-domain interactions are critical for these signaling pathways. IRAK4 and MyD88 form a hetero-oligomeric signaling complex via a shared DD, so-called Myddosome (Motshwene et al., 2009). Appropriate Myddosome

Abbreviations: DD, death domain; HEK, human embryonic kidney; ID, internal domain; IRAK, Interleukin-1 receptor-associated kinase; MyD88, myeloid differentiating factor 88; Mal, MyD88 adaptor-like; NMR, nuclear magnetic resonance; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; TIR domain, Toll/interleukin-1 receptor homology domain; WT, wild type; SNP, single nucleotide polymorphism; IRAK4-DD, death domain of IRAK4; IRAK4-DD + ID, death domain and internal domain of IRAK4; MyD88-DD, death domain of MyD88; MyD88-DD + ID, death domain and internal domain of MyD88; MyD88-TIR, TIR domain of MyD88; Mal-TIR, TIR domain of Mal; TRAF, TNF receptor associated factor.

* Corresponding author. Tel.: +81 58 230 6386; fax: +81 58 230 6387.

** Corresponding author. Tel.: +81 75 383 2536; fax: +81 75 383 2541.

E-mail addresses: tochio@moleng.kyoto-u.ac.jp (H. Tochio), ohnishi@gifu-u.ac.jp (H. Ohnishi).

¹ Contributed equally as first authors.

formation can induce activation of the downstream signaling pathway, which eventually leads to the activation of NF- κ B and activator protein 1 (AP-1).

Most previously identified causative mutations of human IRAK4 deficiency are nonsense or frame shift mutations that create early stop codons (Cardenes et al., 2006; Davidson et al., 2006; Enders et al., 2004; Krause et al., 2009; Ku et al., 2007; Medvedev et al., 2003; Picard et al., 2010; Takada et al., 2006; Yoshikawa et al., 2010), however, three missense mutations (M1V, R12C, and G298D) have been reported (Bouma et al., 2009; de Beaucoudrey et al., 2008; Hoarau et al., 2007). In human MyD88 deficiency, one nonsense mutation (E53X) and three missense mutations (E52del, L93P, and R196C) were reported as causative mutations (Conway et al., 2010; von Bernuth et al., 2008). Recently, new gene variations of *IRAK4* and *MyD88* have been deposited in the single nucleotide polymorphism (SNP) database following next-generation DNA sequencing, but the significance of these variants has not been evaluated. It is therefore important to establish methods to determine the association of gene variations with human diseases. For example, about MyD88, previous attempts have used western blotting, reporter gene assays, immunoprecipitation, and size exclusion chromatography of recombinant proteins to show that the SNPs MyD88 S34Y and R98C were loss-of-function variants (George et al., 2011), while another study used immunofluorescence to determine that S34Y fails to interact with IRAK4 (Nagpal et al., 2011).

Methods to detect the impaired responses to the Toll/interleukin-1 receptor agonists, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and flow-cytometry, are useful for rapid screening of innate immune deficiency syndromes (Davidson et al., 2006; Ohnishi et al., 2012a; Takada et al., 2006; von Bernuth et al., 2006). However, no *in vitro* method to assess the pathogenicity of novel variants of human *IRAK4*, *MyD88* and the other possible signaling components has been established. Therefore, when novel gene variants are found in that possible cases of IRAK4 or MyD88 deficiency syndromes, it is difficult to analyze the pathogenetic significance of these variants. In this study, we used a cell-based assay as well as *in vitro* protein-interaction analyses to show that IRAK4 R12C and R20W caused a loss of interaction with MyD88. This suggested that not only the loss of full-length IRAK4 and MyD88 protein expression but also the loss of Myddosome formation could cause IRAK4 and MyD88 deficiency syndromes.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

Human embryonic kidney (HEK) 293T cells were cultured in high glucose-containing DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 μ g/ml). Cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

2.2. Vector preparations

cDNA encoding full-length IRAK4 (amino acid residues 1–460) or the DD and the internal domain (ID) of IRAK4 (IRAK4-DD+ID, amino acid residues 1–150) were tagged at the N terminus with a FLAG-epitope and cloned into the plasmid vector pcDNA3.1+ (Invitrogen). M1V was tagged at the C terminus because of a substitution of the start codon, and wild type (WT) tagged at the C terminus was prepared as a reference. Similarly, cDNA encoding full-length MyD88 (amino acid residues 1–296) or the TIR domain of MyD88

(MyD88-TIR, amino acid residues 148–296) tagged at the N terminus with a myc-epitope were cloned into the plasmid vector pcDNA3.1+ (Nada et al., 2012; Ohnishi et al., 2009). IRAK4 mutants and SNPs taken from dbSNP135 of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) were generated using the GeneEditor *in vitro* Site-Directed Mutagenesis System (Promega, Fitchburg, WI). The pUNO-hIL1R1(mb) vector (InvivoGen, San Diego, CA) was purchased and cDNA encoding IL-1RAcP and IL-18RAcPL were cloned into the plasmid vector pcDNA3.1+. The pGL4.32[luc2P/NF- κ B-RE/Hygro] vector, used as an NF- κ B luciferase reporter vector, and the pGL4.70[hRLuc] vector, used as an internal control Renilla luciferase reporter vector, were purchased from Promega.

2.3. Western blot analysis

To detect protein expression, HEK293T cells were seeded on six-well plates at a density of 2×10^5 /ml and transfected with 1 μ g of expression plasmids of FLAG-tagged IRAK4 full length, FLAG-tagged IRAK4-DD, and myc-tagged MyD88 full length using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After 48 h incubation, cells were harvested, washed with PBS, and lysed using CytoBuster Protein Extraction Reagent (Novagen, Darmstadt, Germany) containing a protease inhibitor mix (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). All extracts were adjusted to contain equal amounts of total cellular proteins, as determined using the Bradford method. Supernatants and whole cell lysates were separated by electrophoresis on SDS polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes using an iBlot Gel Transfer Device (Invitrogen). Membranes were blocked for 1 h in 5% BSA in TBST (pH 8.0, 10 mM Tris buffer containing 0.15 M NaCl and 0.1% Tween 20), then incubated at room temperature for 2 h with an anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma-Aldrich), anti-myc antibody (Invitrogen), or anti- β -actin antibody (Sigma-Aldrich) followed by incubation with anti-mouse IgG HRP conjugate (Promega) at room temperature for 30 min. Detection was performed using the ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Invitrogen) and LightCapture system AE6970CP (ATTO, Tokyo, Japan).

2.4. NF- κ B reporter gene activity

For the functional assessment of IRAK4, HEK293T cells, HEK293-hTLR1/2 cells (InvivoGen), HEK293-hTLR4-MD2-CD14 cells (InvivoGen) and HEK293-hTLR5 cells (InvivoGen) were transfected with NF- κ B luciferase reporter vector, Renilla luciferase reporter vector, pcDNA3.1+ empty vector or pcDNA3.1+ FLAG-IRAK4 WT using Lipofectamine 2000. After transfection, cells were incubated for 24 h then stimulated with recombinant IL-1 β (10 ng/ml) prepared as previously described (Wang et al., 2010), Pam3CSK4 (10 ng/ml, InvivoGen), LPS (10 ng/ml, Sigma-Aldrich), and recFLA-ST (10 ng/ml, InvivoGen) for 6 h. In a similar way, HEK293T cells were transfected as described above and with IL-18RAcPL, and stimulated with recombinant IL-18 (50 ng/ml) prepared as previously described (Kato et al., 2003; Li et al., 2003) for 6 h. Luciferase reporter gene activities were analyzed using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Similarly, HEK293T cells were transfected with pUNO-hIL1R1 vector, pcDNA3.1+ IL-1RAcP vector, NF- κ B luciferase reporter vector, Renilla luciferase reporter vector, pcDNA3.1+ empty vector or pcDNA3.1+ FLAG-IRAK4 WT or variants, as described above. After transfection, cells were incubated for 24 h and luciferase reporter gene activities were analyzed.

For the functional assessment of MyD88, HEK293T cells were transfected with NF- κ B luciferase reporter vector, Renilla luciferase reporter vector, and different amounts of pcDNA3.1+ myc-MyD88

WT or variants (5, 15 or 50 ng). The amounts of transfected plasmid were adjusted to an equal amount with pcDNA3.1+ empty vector. After transfection, cells were incubated for 24 h. To compare the dominant negative effect of MyD88, pcDNA3.1+ myc-MyD88-TIR WT or variants (5, 15 or 50 ng), pcDNA3.1+ IL-18R α CPL, NF- κ B luciferase reporter vector, and Renilla luciferase reporter vector were co-transfected, and then, cells were incubated for 24 h and stimulated with/without IL-18 (10 ng/ml) for 6 h. Luciferase reporter gene activities were analyzed as described above.

The NF- κ B activation of each condition was assessed in at least three independent experiments. The statistical significance of the differences in luciferase activities was determined using one-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc test. The statistical significance was defined as $P < 0.05$.

2.5. Protein preparation

The portion of the human *IRAK4* gene encoding the DD+ID (amino acid residues 1–150) and the human *MyD88* gene encoding the DD and the ID (MyD88-DD+ID, amino acid residues 1–152) were cloned into vector pGEX-6P-1 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). These vectors were transformed into *Escherichia coli* BL-21 (DE3) (Novagen). IRAK4-DD+ID variants and MyD88-DD+ID, which were expressed as GST fusion proteins, were first purified by glutathione Sepharose 4B FF (GE Healthcare) affinity chromatography, and the GST-tag was removed by digestion with PreScission protease (GE Healthcare). Subsequently, the DD+IDs were purified by anion exchange chromatography (Q-Sepharose column; GE Healthcare) and gel filtration (Superdex 75 HR 26/60 column; GE Healthcare). Using a similar purification protocol, ^1H - ^{15}N -labeled MyD88-DD+ID was prepared. All nuclear magnetic resonance (NMR) samples were uniformly ^{15}N -labeled and prepared in 210 μl solutions of $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (95%/5%) containing 20 mM potassium phosphate buffer at pH 6.0 with 10 mM DTT. The portions of the human TIR domains of MyD88 WT and its mutants (M178I, R196C) and MyD88 adaptor-like (Mal) (Mal-TIR, amino acid residues 75–235) were cloned into pGEX-5X-1 and pGEX5X-3 vectors (GE Healthcare), respectively. The proteins were purified as previously described (Ohnishi et al., 2009).

2.6. Analytical gel filtration

Molecular masses of the purified recombinant proteins IRAK4-DD+ID and MyD88-DD+ID were evaluated by size exclusion chromatography. Gel filtration analysis was performed using a Superdex-200 10/300 GL column (GE Healthcare) attached to an AKTA purifier (GE Healthcare) at 10 °C. The column was equilibrated with 20 mM HEPES buffer (pH 7.0), 100 mM KCl, 10 mM DTT and 1 mM EDTA. The column was calibrated using a gel filtration standard kit (Bio-Rad, Hercules, CA). A total of 100 μl of 100 μM IRAK4-DD+ID and 100 μM MyD88-DD+ID proteins was applied to the gel filtration column. Protein elution was monitored by UV absorption at 280 nm. The molecular masses of these proteins were estimated using a calibration curve.

2.7. GST pull-down assays

GST-fusion proteins of MyD88-TIR and purified proteins of the TIR domain of Mal were incubated with Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) in binding buffers (20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0), 0.1 mM EDTA, 10 mM DTT, and 0.2% Triton X-100) for 16 h. After four wash steps using 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 10 mM DTT, and 0.2% Triton X-100, the resin was analyzed by SDS-PAGE and Coomassie Brilliant Blue staining.

2.8. NMR titration

An aliquot of 0.25 equivalent amounts of non-labeled IRAK4 WT or its variants was added to 210 μl of 50 μM ^{15}N -labeled MyD88-DD+ID, with the exception for R20W, up to its 2.0 equivalent amounts. For the titration with R20W IRAK4-DD+ID, 25 μM MyD88-DD+ID was used. The samples were in 20 mM potassium phosphate (pH 6.0) and 10 mM DTT in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (95%/5%). At each titration point, 2D ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC spectra were recorded at 298 K on Bruker Avance II 700 MHz spectrometer equipped with cryogenic probes. The 2D spectra were processed using NMRPipe (Delaglio et al., 1995) and analyzed using the Sparky (Goddard and Kneller, 1999) analysis software, whereas 1D projections were generated using Bruker TopSpin 3.1. A well-resolved NMR signal derived from a Trp sidechain aromatic ^1H - ^{15}N pair in the projection was selected (supplementary Fig. S1B) at each titration point, and then intensities were normalized with the intensity of the corresponding NMR signal of ^{15}N MyD88-DD+ID recorded in the absence of IRAK4-DD+ID (Ohnishi et al., 2009). The normalized intensities were plotted as a function of the equivalent molar amounts of the titrant.

2.9. Protein stability assay

HEK293T cells were seeded on six-well plates at a density of $2 \times 10^5/\text{ml}$ and transfected with 1 μg of expression plasmids Flag-tagged IRAK4-DD using Lipofectamine 2000. After 48 h, cells were treated with 25 μM cycloheximide for 0, 24, 48, and 72 h (Fukao et al., 1999). Cellular extracts were prepared in CytoBuster Protein Extraction Reagent containing complete protease inhibitor mix. All extracts were adjusted to contain equal amounts of total cellular proteins, as determined using the Bradford method. Western blot analysis with anti-FLAG antibody was carried out using standard protocols as described above.

3. Results

3.1. Cell-based assays of *IRAK4* variants

3.1.1. Protein expression of *IRAK4*

To functionally characterize the genetic variants of *IRAK4*, FLAG-tagged full-length expression constructs corresponding to the loss-of-function mutations that were previously reported as pathogenic mutations ('*IRAK4* mutants') and nonsynonymous SNPs ('*IRAK4* SNPs') were generated. In this study, we selected the six *IRAK4* mutants (M1V, a missense mutation of start codon reported in Slovenia (de Beaucoudrey et al., 2008); R12C, a missense mutation reported in France and located in the DD (Hoarau et al., 2007); c.118insA and R183X, mutations reported in Japan that include a frame shift mutation (Picard et al., 2010; Takada et al., 2006); Q293X, the most common mutation in Europe (Picard et al., 2010); G298D, a missense mutation reported in UK and located in the kinase domain (Bouma et al., 2009)) and five SNPs in the DD (Fig. 1A). Our five SNPs were all within the DD as we focused on the interaction between *IRAK4* and MyD88.

No protein expression could be detected of the three *IRAK4* mutations M1V, Q293X, and c.118insA. R183X expressed a smaller protein than WT, while G298D protein expression levels were decreased (Fig. 1B). The expression of R12C was comparable with WT as were expression levels of all SNPs (Fig. 1C).

3.1.2. Inhibition of NF- κ B activation of *IRAK4*

Next, *IRAK4* variants were tested for NF- κ B reporter gene activity using a dual luciferase assay system. As Medvedev et al.

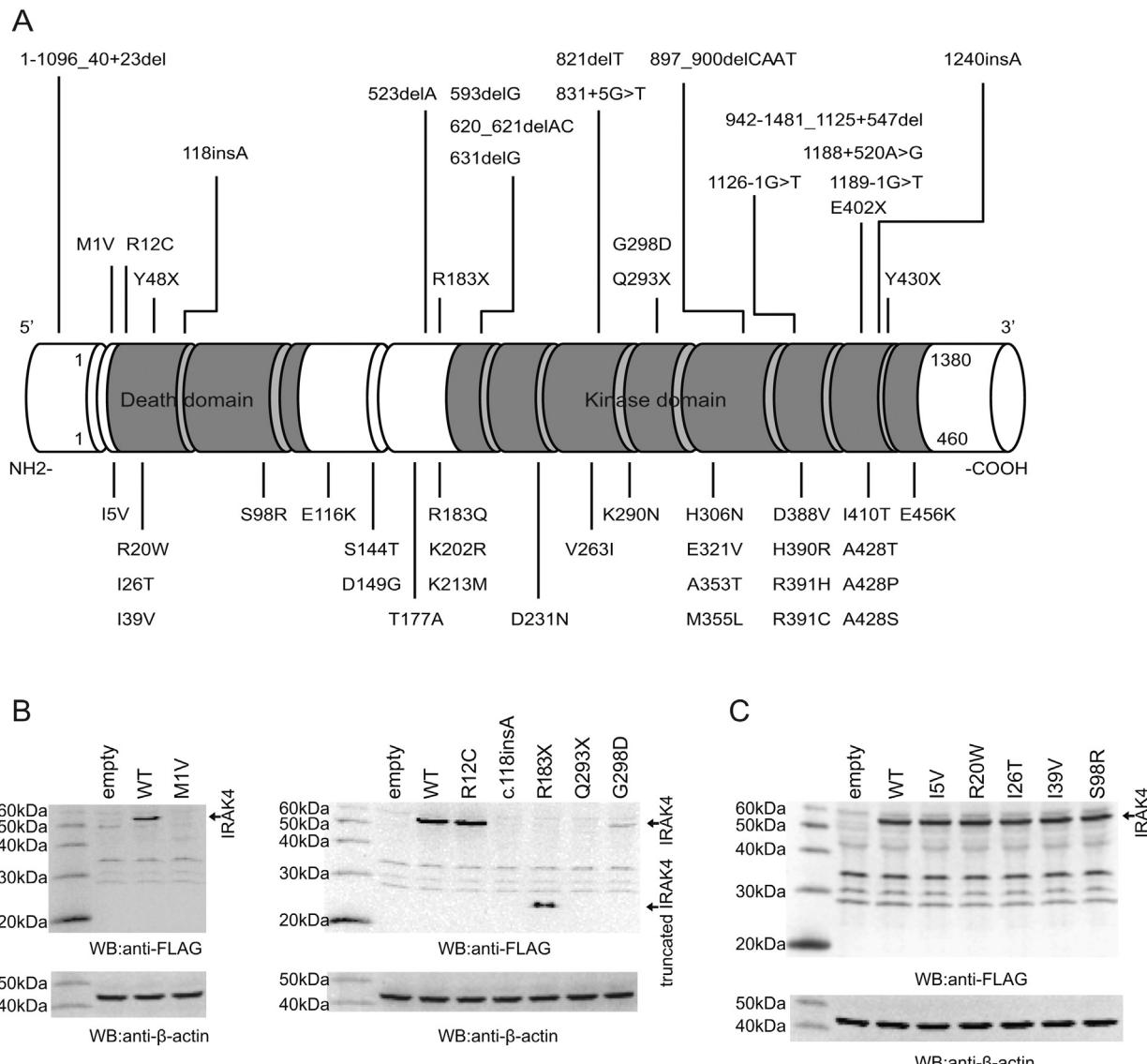


Fig. 1. Protein expression of *IRAK4* variants. (A) Schematic representation of *IRAK4* showing all identified mutations and nonsynonymous SNPs. *IRAK4* consists of 12 exons and the protein is composed of an N-terminal death domain and C-terminal kinase domain. Mutations are annotated at the upper side of this schema, and SNPs at the lower. (B) Expression levels of *IRAK4* mutants in HEK293T cells. Protein expression of M1V, Q293X, and c.118insA could not be detected. R183X expressed a truncated protein and the expression level of G298D was low. (C) Expression levels of *IRAK4* SNPs in HEK293T cells. All SNPs examined in this study expressed protein at the same level as WT.

(2003) previously reported that IL-1 β -induced NF- κ B activation was inhibited by overexpressed IRAK4 in HEK293T cells, we repeated their method with five different HEK293 cell lines and their appropriate ligands to compare the inhibition of NF- κ B activation (Fig. 2). IL-1 β , IL-18 and the ligands of TLR1/2, TLR4, and TLR5-induced NF- κ B activations were not significantly inhibited by overexpressed IRAK4 (Fig. 2A-E), but the NF- κ B activity enhanced by both transiently transfected IL-1R1 and IL-1R α Cp could be significantly inhibited by overexpressed IRAK4 (Fig. 2F).

This system was used to compare *IRAK4* variants. Fig. 2G shows that NF- κ B activation of the mutants c.118insA, R183X, Q293X, and G298D was less inhibited than WT. However, R12C showed a similar activity level to WT, although this mutation was previously reported to be a loss-of-function mutant in a human *IRAK4* deficiency patient (Hoarau et al., 2007). Fig. 2H shows that all *IRAK4* SNPs significantly inhibited NF- κ B activity to the same extent as WT. Only R20W showed a stronger inhibitory effect.

3.2. Cell-based assays of MyD88 variants

3.2.1. Protein expression of MyD88

We analyzed four previously reported loss-of-function mutations of MyD88: E52del, E53X, and L93P located in the DD, and R196C located in the TIR domain, as well as three SNPs: S34Y and R98C (loss-of-function variants (George et al., 2011; Nagpal et al., 2011) located in the DD, and M178I in the TIR domain (Fig. 3A). To functionally characterize the *MyD88* genetic variants, myc-tagged full-length expression constructs corresponding to the loss-of-function mutations ('*MyD88* mutants') and nonsynonymous SNPs ('*MyD88* SNPs') were generated. No protein expression was detected of S34Y and E53X, while expression of E52del and L93P was very low. On the other hand, expression levels of R98C, M178I, and R196C were similar to WT (Fig. 3B).

3.2.2. NF- κ B activity of MyD88

Next, we assessed the abilities of *MyD88* variants to activate the NF- κ B signaling pathway using a dual luciferase assay system in

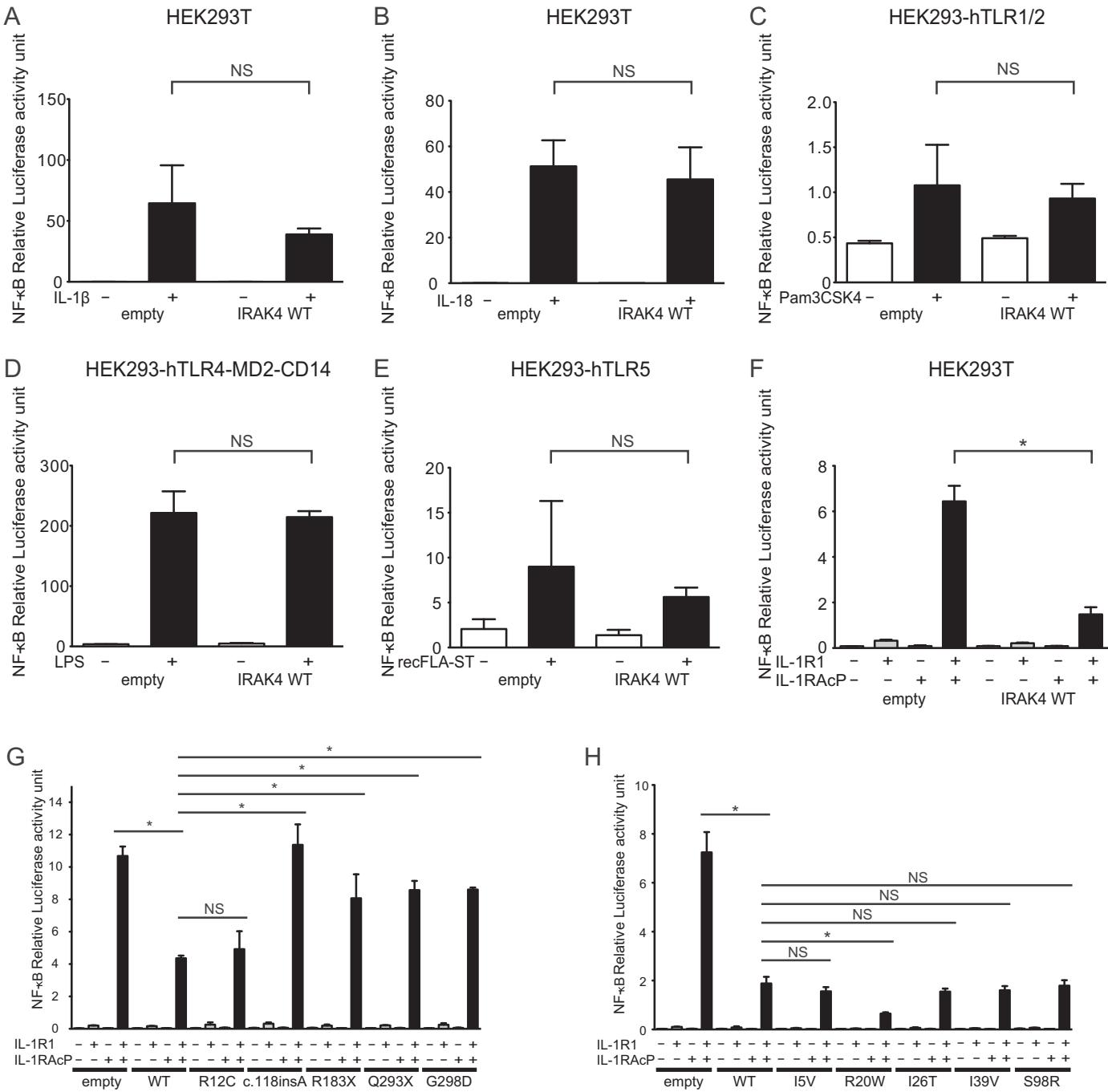


Fig. 2. Cell-based NF-κB activity assays of IRAK4 variants. (A-F) The inhibition of NF-κB activation in five different cell lines by IRAK4. IL-1 β - (10 ng/ml), IL-18- (50 ng/ml), Pam3CSK4- (10 ng/ml), LPS- (10 ng/ml) and recFLA-ST- (10 ng/ml) induced NF-κB activation was not significantly inhibited by overexpressed IRAK4 WT in HEK293T cells (A, B, F), HEK293-hTLR1/2 cells (C), HEK293-hTLR4-MD2-CD14 cells (D), and HEK293-hTLR5 cells (E). Transient transfection of both IL-1R1 and IL-1RAcP significantly enhanced NF-κB activity in HEK293T cells, which could be significantly inhibited by overexpressed IRAK4. (G and H) The inhibition of NF-κB activation induced by co-transfection both IL-1R1 and IL-1RAcP was significantly less than in WT. R12C showed a similar inhibition level to WT. All IRAK4 SNPs significantly inhibited NF-κB activity as well as WT. Only R20W showed a stronger inhibition of NF-κB activity than WT. Data represent the mean \pm SD of a representative experiment ($n=3$). Asterisk indicates a statistically significant difference between WT and the others. NS means “not-significant”.

HEK293T cells. Fig. 3C shows that overexpression of S34Y, E52del, E53X, L93P, R98C, and R196C resulted in lower NF-κB activation than that of WT. We previously reported that the truncated MyD88 lacking a DD (MyD88-TIR) inhibited IL-18-stimulated NF-κB activation by means of a dominant negative effect (Ohnishi et al., 2012b). Therefore, in the present study, we examined NF-κB activation inhibition from a dominant-negative effect in HEK293T cells transiently co-transfected with IL-1RAcP and MyD88-TIR

WT, or M178I and R196C (Fig. 3D). MyD88-TIR M178I inhibited NF-κB activation to a similar level as WT, but MyD88-TIR R196C was compromised in its effect to inhibit NF-κB activation.

3.3. GST pull-down assay of MyD88-TIR to Mal-TIR

MyD88 interacts with Mal via a shared TIR domain and activates a downstream signaling pathway. To analyze the mutations

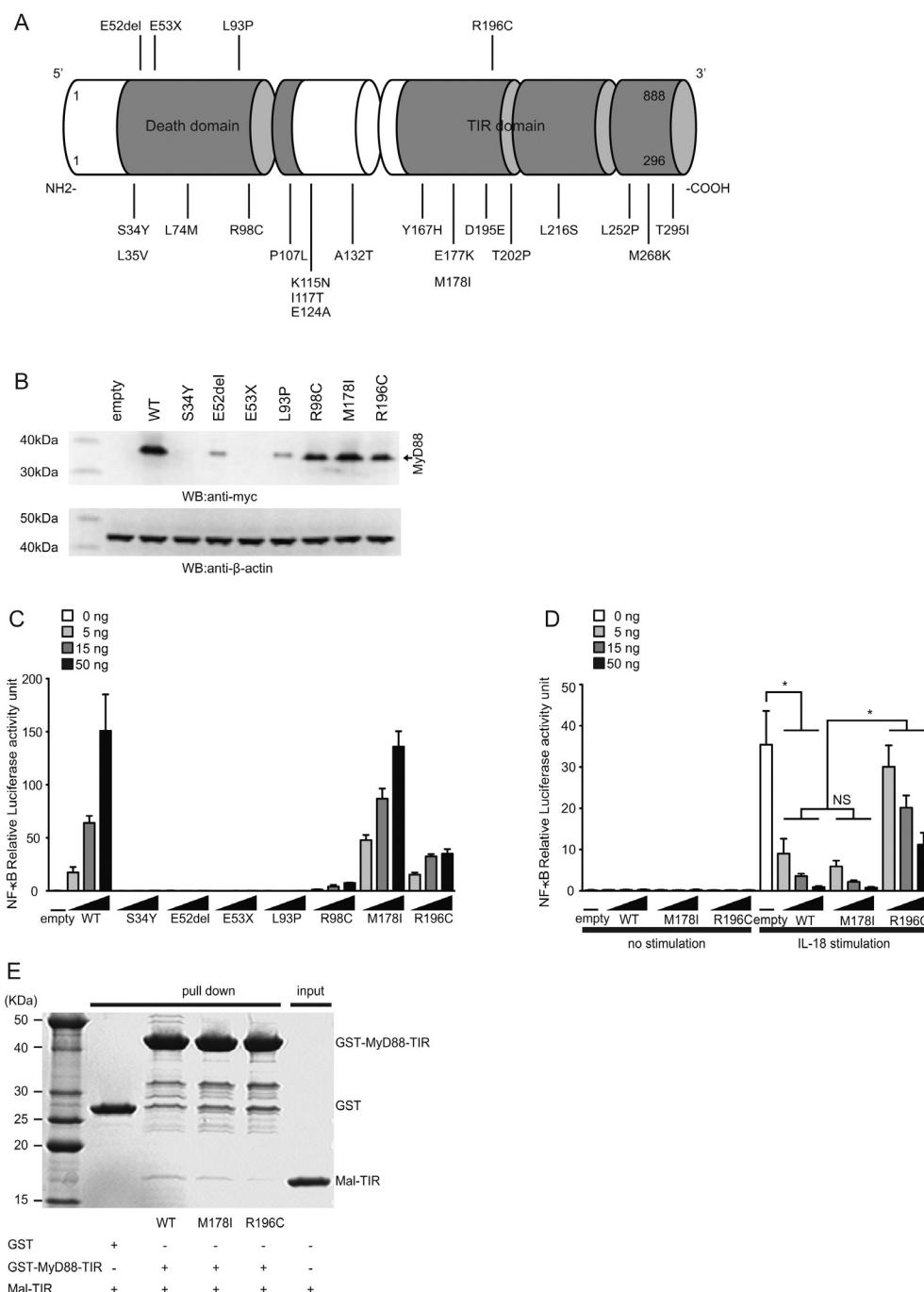


Fig. 3. Cell-based assays of *MyD88* variants. (A) Schematic representation of *MyD88* with all identified mutations and nonsynonymous SNPs. *MyD88* consists of five exons and the protein is composed of an N terminal death domain and C-terminal TIR domain. Mutations are annotated at the upper side of this schema, and SNPs at the lower. (B) Expression levels of *MyD88* variants in HEK293T cells. The protein expression of S34Y and E53X could not be detected, and that of E52del and L93P was very low. The expression levels of R98C, M178I, and R196C were similar to that of WT. (C) NF-κB reporter gene activities of *MyD88* variants in HEK293T cells. S34Y, E52del, E53X, L93P, R98C, and R196C were compromised in the ability to enhance NF-κB activation, with the exception of M178I. (D) Dominant negative inhibitory effects of *MyD88*-TIR variants in HEK293T cells. *MyD88*-TIR R196C failed to inhibit NF-κB activation. Data represent the mean ± SD of a representative experiment ($n=3$). All data were compared at each transfection dose. Asterisk indicates statistically significant difference between WT and the others. NS means "not-significant". (E) Binding assays for WT or mutant *MyD88*-TIRs with Mal-TIR using GST pull-down assays. M178I interacted with Mal-TIR as well as WT. R196C showed a reduced interaction with Mal-TIR.

located in the TIR domain of *MyD88*, we carried out a GST pull-down assay of *MyD88*-TIR and Mal-TIR (Fig. 3E). As we reported previously (Nada et al., 2012; Ohnishi et al., 2009), *MyD88*-TIR R196C showed a significant decrease in its ability to directly bind to Mal-TIR, while *MyD88*-TIR M178I interacted with Mal-TIR as well as WT.

3.4. Analytical gel filtration of IRAK4 and *MyD88*

To compare the interaction between *MyD88* and IRAK4, analytical gel filtration was carried out. We purified *MyD88*-DD + IDs and IRAK4-DD + IDs recombinant proteins, and analyzed the elution profiles of mixtures of *MyD88* WT or mutants in the presence

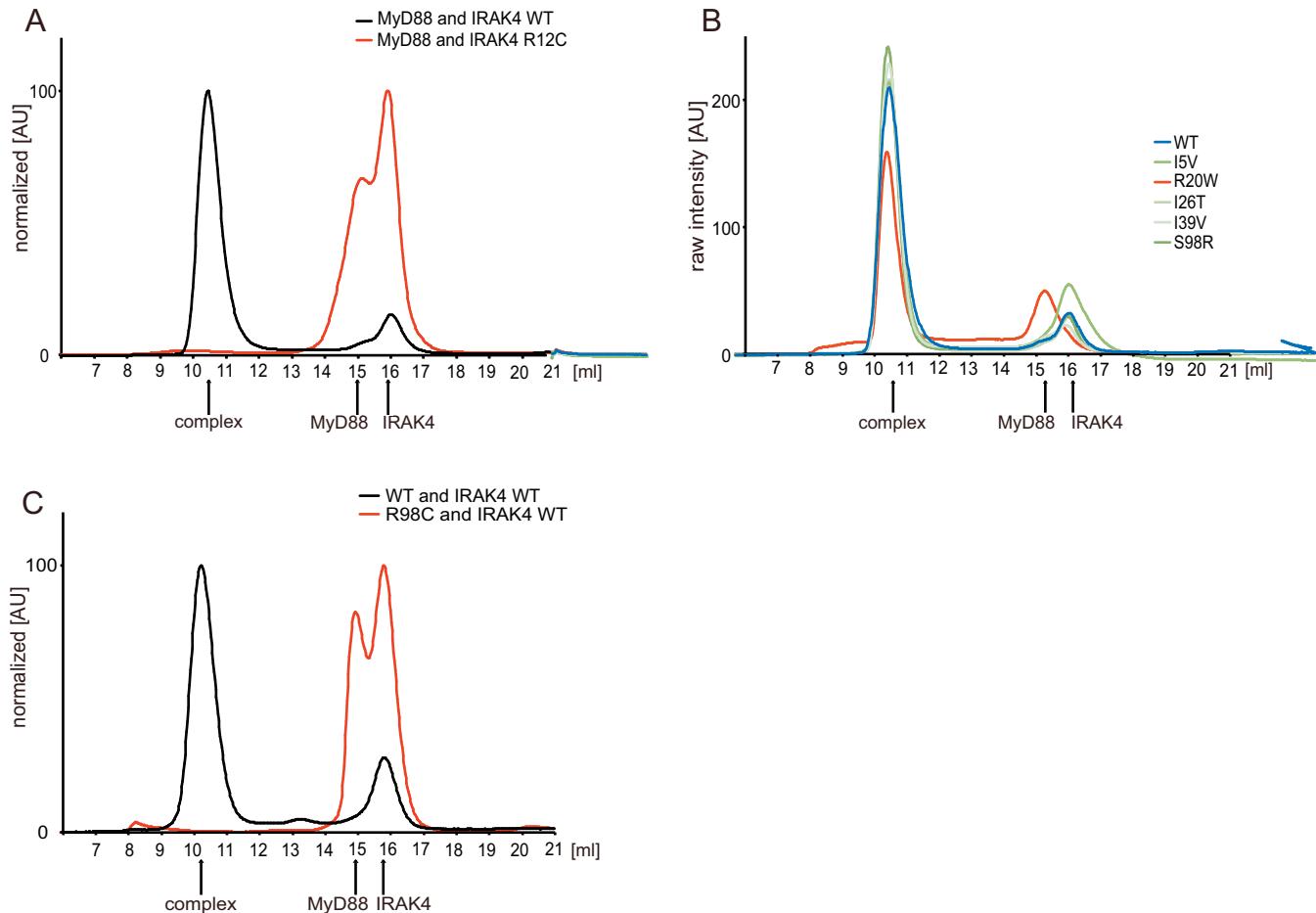


Fig. 4. Analytical gel filtration of IRAK4 and MyD88. (A) IRAK4-R12C failed to interact with MyD88. R12C was unable to assemble into a Myddosome as shown by size exclusion chromatography of mixtures of bacterially purified MyD88-DD + IDs and IRAK4-DD + IDs (added in excess). MyD88-DD + ID WT + IRAK4-DD + ID WT mixture eluted in a discrete complex peak that was absent from R12C mixtures. (B) IRAK4 SNPs interacted with MyD88 WT. Only IRAK4 R20W showed a decreased peak intensity of complete complex and residual peak of MyD88-DD + ID despite mixing an excess of IRAK4. (C) MyD88-R98C failed to interact with IRAK4. Individual peak fractions from gel filtration, purified MyD88-DD + ID or IRAK4-DD + ID alone (for size comparison) were analyzed by reducing SDS-PAGE (data not shown).

of a molar excess of IRAK4-DD + ID WT or mutants. Individual fractions or purified reference proteins were analyzed by SDS-PAGE (data not shown). The estimated molecular weights were calculated using a calibration curve, and were 30.6 kDa, 48.3 kDa, and 423 kDa for IRAK4-DD + ID, MyD88-DD + ID, and their complex, respectively. Although IRAK4-DD was eluted as a 1mer (George et al., 2011; Lin et al., 2010; Motshwene et al., 2009), IRAK4-DD + ID was mainly eluted as a 2mer. While MyD88 was mainly eluted as a 3mer. IRAK4 WT formed a characteristic oligomer by mixing with MyD88 WT, but not R98C, as previously reported (Fig. 4C) (Nagpal et al., 2011). Moreover, IRAK4 R12C also failed to form a complex (Fig. 4A). By contrast, IRAK4 SNPs interacted with MyD88 WT (Fig. 4B), but only IRAK4 R20W showed a decreased intensity of the complex and residual peak of MyD88-DD + ID, despite an excess amount of IRAK4.

3.5. NMR titration

The IRAK4–MyD88 interaction was also examined using NMR spectroscopy for which 2D ^1H – ^{15}N correlation NMR spectra of ^{15}N -labeled MyD88-DD + ID were recorded in the presence or absence of various concentrations of IRAK4-DD + ID or its derivatives. Changes of NMR signal intensities of a Trp residue in ^{15}N -labeled MyD88-DD + ID following titration were used to monitor the interaction (Fig. 5). The normalized NMR signal intensity steeply decreased upon IRAK4 titration. Attenuation of the NMR signal could be

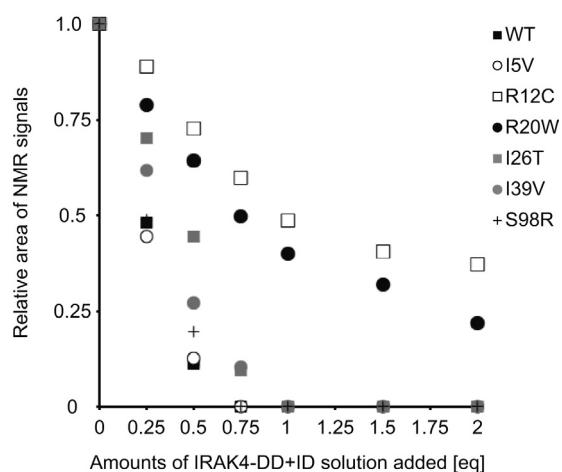


Fig. 5. NMR titration study of ^1H – ^{15}N -MyD88-DD + ID and IRAK4-DD + ID. Normalized intensities of NMR signals, obtained from the NMR titration experiment (Supplemental Fig. S1), were plotted in a function of equivalent moles (eq) of IRAK4-DD + ID added to ^{15}N -MyD88-DD + ID. The attenuation of signal intensities was presumably caused by formation of complexes between MyD88-DD + ID and IRAK4-DD + ID. NMR signal attenuation of R12C and R20W was significantly suppressed relative to WT, indicating a weak affinity for MyD88-DD + ID. Black box, white circle, black circle, gray box, gray circle, and black cross indicate the normalized intensities of WT, I5V, R12C, R20W, I26T, I39V, and S98R, respectively.

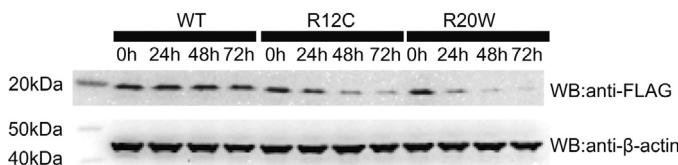


Fig. 6. Stability of IRAK4-DD variants in HEK293T cells. Cells were incubated in cycloheximide (25 μM) for the indicated times before preparation of cell extracts for SDS-PAGE separation and immunoblotting with an anti-FLAG antibody. IRAK4-DD WT maintained a steady state of protein structure, but R20W began to collapse after 24 h.

interpreted as a result of the formation of large protein complexes involving ¹⁵N-labeled MyD88-DD + ID, indicating an interaction of the titrated IRAK4-DD + ID with ¹⁵N-MyD88-DD + ID. Four IRAK4 derivatives, I5V, I26T, I39V, and S98R, showed a similar attenuation pattern to that of WT. By contrast, attenuation of NMR signal intensities was significantly suppressed when one of two derivatives, R12C or R20W, was used as a titrant. These observations suggest that the affinity of R12C and R20W towards MyD88-DD + ID was weaker than that of WT.

3.6. Instability of IRAK4 R12C and R20W

In the analytical gel filtration and NMR titration assays, IRAK4 R12C failed to interact with MyD88. On the other hand, IRAK4 R20W could interact with MyD88, but the amount of complete complex was lower than WT and other SNPs. Additionally, R12C and R20W were predicted to be “probably damaging” with scores of 1.000 and 0.998, respectively, by the PolyPhen-2 algorithm (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) (Adzhubei et al., 2010). Therefore, we next evaluated the protein stability of IRAK4-DD + ID R12C and R20W compared with WT following treatment with cycloheximide (Fig. 6). IRAK4-DD + ID WT protein levels did not change during 72 h of cycloheximide treatment, but R12C protein levels slightly decreased after 48 h of treatment, and R20W protein levels decreased after 24 h of treatment.

4. Discussion

4.1. In vitro assays for assessments of the mutational effects of human IRAK4 gene

Several cell-based functional assays of IRAK4 mutants have previously been described, but the mutational effects of novel mutations have not been confirmed. For example, Lye et al. examined the NF-κB activation of IRAK4 mutants using IRAK4-knocked out murine fibroblasts (Lye et al., 2004), while Qin et al. (2004) used human fibroblasts derived from an IRAK4 deficiency patient. Medvedev et al. (2005) examined the IL-1 signaling complex formation of an IRAK4 mutant using immunoprecipitation. In the present study, we examined selected IRAK4 mutations, including three previously reported missense mutations (Fig. 1A). Protein expression levels of WT and R12C were similar (Fig. 1B), so we then assessed the signaling function using HEK293T cells (Medvedev et al., 2003) as it is difficult to obtain an IRAK4-deficient human cell line. IRAK4 Q293X protein expression was undetectable and it did not appear to inhibit NF-κB activity (Figs. 1B and 2G), which agrees with the results of Medvedev et al. (2003).

The other IRAK4 mutants, with the exception of R12C which expressed undetectable or low level IRAK4 protein, also did not inhibit NF-κB activity. On the other hand, R12C inhibited NF-κB activity to almost the same extent as WT. This suggests that overexpressed IRAK4 protein only inhibits NF-κB activity when full-length

IRAK4 is expressed at levels above a certain threshold. All SNPs analyzed expressed similar protein levels and inhibited NF-κB activity to the same level as WT (Fig. 1C and E). Interestingly, R20W showed a significantly stronger inhibition of NF-κB activity than WT and other SNPs, while the PolyPhen-2 algorithm “probably damaging” prediction for R12C and R20W meant that the behavior of both was uncertain.

To clarify this, we focused on these two variants. From information about the Myddosome protein structure (PDB code: 3MOP) (Lin et al., 2010), residues R12 and R20 appeared to be located on the surface of IRAK4-DD, in the interface between IRAK4 and MyD88, and to directly interact with MyD88-DD E102 and D46, respectively (Fig. 7B). A protein–protein interaction study was used to assess the mutational effect of these residues. MyD88-DD R98 was located in the interface to IRAK4-DD (George et al., 2011), while MyD88-TIR R196 was located in the interface to Mal-TIR (Ohnishi et al., 2009). These arginine to cysteine substitutions caused a change in protein–protein interaction abilities. The recombinant proteins of IRAK4-DD + ID WT and MyD88-DD + ID WT formed a higher order oligomeric complex, but IRAK4 R12C failed to interact with MyD88.

While we were preparing this manuscript, T77del, a novel mutation of human IRAK4 deficiency, was reported as a loss-of-expression variant following a western blot of a patient's fibroblasts (Andres et al., 2013). Lin et al. (2010) used immunoprecipitation to show that both T76 and N78 are critical residues for the interaction with MyD88. Therefore T77 might be critical not only for protein expression but also the interaction with MyD88. It should be noted that although IRAK4 S98 is located on the surface of IRAK4-DD (Fig. 7A), it is distant from the interface with MyD88-DD. From the complex structural information, S98 might be located in the interface between IRAK4 and IRAK2. Future work should carry out a protein interaction study between IRAK4 S98R and IRAK2 or IRAK1 to evaluate the pathogenicity of IRAK4 S98R.

All IRAK4 SNPs examined in the present study formed a complex in analytical gel filtration. Interestingly, R20W also formed a complex, albeit less than WT and the other SNPs. In addition, an incomplete complex of IRAK4 R20W and MyD88 was observed between the peak of unbound proteins and complete complex (Fig. 4B). Moreover, the NMR signal attenuation titrated with IRAK4 R12C and R20W was reduced compared with WT (Fig. 5), suggesting that the interaction was weakened by amino acid substitutions. From these results, we speculated that not only the mild loss of protein–protein interaction, but also the loss of IRAK4-DD R20W protein stability inhibits the formation of a complete complex of IRAK4 and MyD88. Therefore, we examined protein stability using cycloheximide. The stability of IRAK4-DD R12C was slightly lower, but that of R20W was much lower than WT and R12C (Fig. 6). Thus it is conceivable that the hydrophilic Arg20 substitution to hydrophobic tryptophan reduces the stability of the protein structure. Finally, we propose the possibility that not only IRAK4 R12C but also R20W has an impact on human IRAK4 deficiency (Table 1).

4.2. In vitro assays for assessments of the mutational effects of human MyD88 gene

Recently, the loss-of-function variants S34Y and R98C were found in naturally occurring MyD88 SNPs (George et al., 2011; Nagpal et al., 2011). The functions of these variants were also shown by a luciferase reporter gene assay in HEK293 I3A cells, and interaction analysis with recombinant proteins. On the other hand, Nagpal et al. carried out an initial functional assay of MyD88 variants using a luciferase reporter gene assay in HEK293T cells, which are not MyD88-deficient. In addition, Loiarro et al. (2009) used immunoprecipitation in HEK293T cells to indicate that E52 and Y58 were key residues that interact with both IRAK1 and IRAK4, and that K95 was an important residue to interact with IRAK4. In this

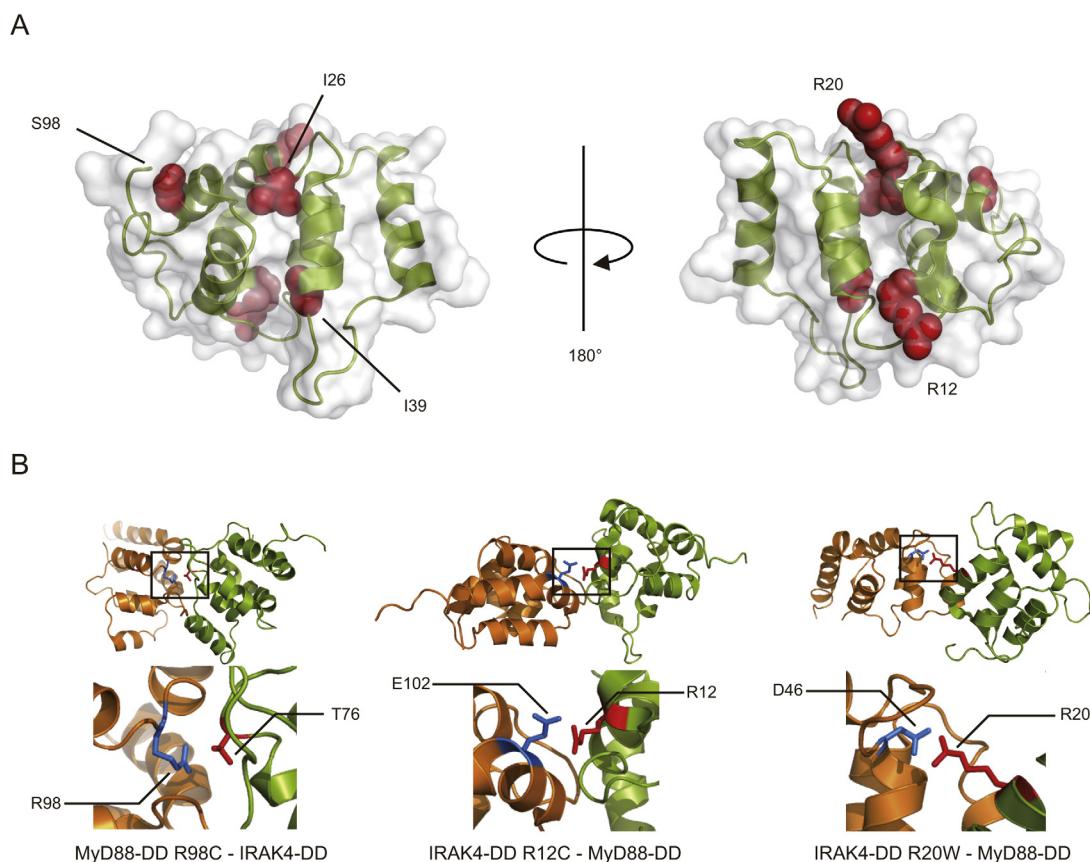


Fig. 7. Protein structure of IRAK4-DD. (A) Schematic representation of IRAK4-DD (Protein Data Bank accession code 2A9I) generated with PyMOL (DeLano Scientific, www.pymol.org). Mutants and variants are shown as red full-surface amino acid residues. R12, R20, and S98 are located on the surface of IRAK4-DD. (B) 3D interaction models of IRAK4-DD (green) with MyD88-DD (orange). MyD88-DD R98 (side chain shown as a blue stick) interacts with IRAK4-DD T76. IRAK4-DD R12 and R20 (side chains shown as red sticks) interact with MyD88-DD E102 and D46, respectively.

study, we revealed decreased protein expression levels of *MyD88* variants (S34Y, E52del, and L93P) with HEK293T cells, indicating that they have unstable protein structures (Fig. 3B). Moreover, R98C as well as the loss-of-expression variants had lower NF- κ B activity than *MyD88* WT (Fig. 3C), while *MyD88*-DD R98C had an impaired direct interaction with IRAK4-DD WT (Fig. 4C). Consequently, *MyD88* R98C can be a risk-allele for *MyD88* deficiency, because it showed similar to IRAK4 R12C about the results of interaction assay between *MyD88*-DD and IRAK4-DD. Thus, the results of *MyD88*-DD gene variation from a cell-based assay using a *MyD88*-non-deficient cell line are consistent with the protein interaction study, unlike the *IRAK4* variants.

MyD88 interacts with Mal via a shared TIR domain. We previously found that *MyD88*-TIR R196C had stable protein folding but a significant decrease in its ability to directly bind Mal-TIR

(Nada et al., 2012; Ohnishi et al., 2009). TIR domains have an important functional region, the BB loop, which interacts with other TIR domain-containing proteins. As the R196C mutation and M178I SNP are located in or near the BB loop of the *MyD88* TIR domain, we tested *MyD88* full-length-induced NF- κ B activation and the inhibition of ligand-induced NF- κ B activity caused by a dominant-negative effect to assess the functional effect of M178I. *MyD88* full-length M178I significantly enhanced NF- κ B activity, as seen in WT (Fig. 3C). *MyD88*-TIR M178I inhibited NF- κ B activation to the same extent as WT, but R196C did not (Fig. 3D). Furthermore, a GST pull-down assay using recombinant purified proteins found that *MyD88*-TIR M178I interacted with Mal-TIR as well as WT (Fig. 3E), which was consistent with the cell-based assays. Therefore we determined M178I to be a variant, although the mutation of a neighboring residue, I179N also called the Poc

Table 1
Summary of the expression and functional analysis of *IRAK4* variants.

Gene	Variant	Protein expression	NF- κ B activity	Interaction	Protein stability	Pathogenicity
<i>IRAK4</i>	M1V	Absent	–	–	–	Reported
	I5V	Normal	Inhibited	Normal	–	Polymorphism
	R12C	Normal	Inhibited	Reduced	Mild reduced	Reported
	R20W	Normal	Inhibited	Mild reduced	Reduced	Probable
	I26T	Normal	Inhibited	Normal	–	Polymorphism
	I39V	Normal	Inhibited	Normal	–	Polymorphism
	c.118insA	Severely reduced	Not inhibited	–	–	Reported
	S98R	Normal	Inhibited	Normal	–	Polymorphism
	R183X	Truncated	Not inhibited	–	–	Reported
	Q293X	Severely reduced	Not inhibited	–	–	Reported
	G298D	Reduced	Not inhibited	–	–	Reported

Table 2Summary of the expression and functional analysis of *MyD88* variants.

Gene	Variant	Protein expression	NF-κB activity	Interaction	Pathogenicity
<i>MyD88</i>	S34Y	Severely reduced	Not enhanced	–	Probable
	E52del	Reduced	Not enhanced	–	Reported
	E53X	Severely reduced	Not enhanced	–	Reported
	L93P	Reduced	Not enhanced	–	Reported
	R98C	Normal	Not enhanced	Reduced	Probable
	M178I	Normal	Enhanced	Normal	Polymorphism
	R196C	Normal	Not enhanced	Reduced	Reported

mutation, is associated with a loss-of-function of *MyD88* (Jiang et al., 2006).

In Table 2, we summarize the functional phenotypes of *MyD88* mutations and SNPs described in this study. Our results suggest that the mutational effects of *MyD88* variants, at least those located in DD and TIR domains, can only be assessed by cell-based reporter gene assays using widely available cell lines such as HEK293 cells, unlike *IRAK4* variants.

4.3. The additional discussion about another components of Myddosome, Mal

Recently, several functional assays of variants of Mal, located in the TIR domain have been reported. Nagpal et al. (2009) found that Mal D96N was unable to interact with *MyD88* using a reporter gene assay and immunoprecipitation, while George et al. (2010) confirmed this by immunofluorescence. We used a reporter gene assay to show that E132K, R143Q, and E190D are loss of functional variants (An et al., 2011). E132K is of particular importance as it is located in the BB loop of the Mal TIR domain, so we speculate that it might be a pathogenic mutation of Mal deficiency. More recently, Weller et al. (2012) reported that Mal R121W, which is also located in the Mal BB loop at a similar site to R196C of *MyD88*, causes human Mal deficiency. Therefore, future work should examine the functions of the gene variants of not only *IRAK4* and *MyD88* but also Mal deposited in the SNP database.

5. Conclusion

Not only previously reported loss-of-function mutations but also several SNPs are considered likely to be pathogenic for human diseases, because of their loss of functions proved by *in vitro* methods. Loss of protein stability and defect of interaction between the components of Myddosome may cause *IRAK4* and *MyD88* deficiencies as a result of a failure to form a precise Myddosome structure. Our findings indicate that the analysis of Myddosome formation with recombinant proteins is useful to distinguish whether missense mutations, especially those located in the DD of *IRAK4*, are causative. Thus, the combination of *in vitro* functional assays is effective to confirm pathogenicity of mutants found in *IRAK4* and *MyD88* deficiency patients.

Acknowledgments

We thank Kasahara, K., Yamamoto, M., Tsuji, K. and Sakaguchi, N. for technical assistance. We thank the members of the research group of human *IRAK4* deficiency in Japan for their collaboration. This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and by Health and Labour Science Research Grants for Research on Intractable Diseases from the Ministry of Health, Labour and Welfare.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2013.11.008>.

References

- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., Sunyaev, S.R., 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods* 7, 248–249.
- Al-Herz, W., Bousfiha, A., Casanova, J.-L., Chapel, H., Conley, M.E., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Fischer, A., Franco, J.L., Geha, R.S., Hammarstrom, L., Nonoyama, S., Notarangelo, L.D., Ochs, H.D., Puck, J.M., Roifman, C.M., Seger, R., Tang, M.L.K., 2011. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Frontiers in Immunology* 2, 54.
- An, Y., Ohnishi, H., Matsui, E., Funato, M., Kato, Z., Teramoto, T., Kaneko, H., Kimura, T., Kubota, K., Kasahara, K., Kondo, N., 2011. Genetic variations in *MyD88* adaptor-like are associated with atopic dermatitis. *International Journal of Molecular Medicine* 27, 795–801.
- Andres, O., Strehl, K., Kölsch, U., Kunzmann, S., Lebrun, A.H., Stroh, T., Schwarz, K., Morbach, H., Bernuth, H.V., Liese, J., 2013. Even in pneumococcal sepsis CD62L shedding on granulocytes proves to be a reliable functional test for the diagnosis of interleukin-1 receptor associated kinase 4 deficiency. *Pediatric Infectious Disease Journal* 32, 1017–1019.
- Bouma, G., Doffinger, R., Patel, S.Y., Peskett, E., Sinclair, J.C., Barcenas-Morales, G., Cerron-Gutierrez, L., Kumararatne, D.S., Davies, E.G., Thrasher, A.J., Burns, S.O., 2009. Impaired neutrophil migration and phagocytosis in *IRAK4* deficiency. *British Journal of Haematology* 147, 153–156.
- Burns, K., Janssens, S., Brissoni, B., Olivos, N., Beyaert, R., Tschoopp, J., 2003. Inhibition of interleukin 1 receptor/toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of *MyD88* is due to its failure to recruit *IRAK-4*. *Journal of Experimental Medicine* 197, 263–268.
- Cardenes, M., von Bernuth, H., Garcia-Saavedra, A., Santiago, E., Puel, A., Ku, C.L., Emile, J.F., Picard, C., Casanova, J.L., Colino, E., Bordes, A., Garfia, A., Rodriguez-Gallego, C., 2006. Autosomal recessive interleukin-1 receptor-associated kinase 4 deficiency in fourth-degree relatives. *Journal of Pediatrics* 148, 549–551.
- Conway, D.H., Dara, J., Bagashev, A., Sullivan, K.E., 2010. Myeloid differentiation primary response gene 88 (*MyD88*) deficiency in a large kindred. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 126, 172–175.
- Davidson, D.J., Currie, A.J., Bowdish, D.M.E., Brown, K.L., Rosenberger, C.M., Ma, R.C., Bylund, J., Campsall, P.A., Puel, A., Picard, C., Casanova, J.L., Turvey, S.E., Hancock, R.E.W., Devon, R.S., Speert, D.P., 2006. *IRAK-4* mutation (Q293X): rapid detection and characterization of defective post-transcriptional TLR/IL-1R responses in human myeloid and non-myeloid cells. *Journal of Immunology* 177, 8202–8211.
- de Beaucoudrey, L., Puel, A., Filipe-Santos, O., Cobat, A., Ghandil, P., Chrabieh, M., Feinberg, J., von Bernuth, H., Samarina, A., Janniere, L., Fieschi, C., Stephan, J.-L., Boileau, C., Lyonnet, S., Jondeau, G., Cormier-Daire, V., Le Merrer, M., Hoarau, C., Lebranchu, Y., Lortholary, O., Chandresris, M.-O., Tron, F., Gambineri, E., Bianchi, L., Rodriguez-Gallego, C., Zitnik, S.E., Vasconcelos, J., Guedes, M., Vitor, A.B., Marodi, L., Chapel, H., Reid, B., Roifman, C., Nadal, D., Reichenbach, J., Caragol, I., Garty, B.-Z., Dogu, F., Camcioglu, Y., Gulie, S., Sanal, O., Fischer, A., Abel, L., Stockinger, B., Picard, C., Casanova, J.-L., 2008. Mutations in *STAT3* and *IL12RB1* impair the development of human IL-17-producing T cells. *Journal of Experimental Medicine* 205, 1543–1550.
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G., Zhu, G., Pfeifer, J., Bax, A., 1995. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *Journal of Biomolecular NMR* 6, 277–293.
- Enders, A., Pannicke, U., Berner, R., Henneke, P., Radlinger, K., Schwarz, K., Ehl, S., 2004. Two siblings with lethal pneumococcal meningitis in a family with a mutation in interleukin-1 receptor-associated kinase 4. *Journal of Pediatrics* 145, 698–700.
- Fukao, T., Kaneko, H., Birrell, G., Gatei, M., Tashita, H., Yoshida, T., Cross, S., Kedar, P., Watters, D., Khana, K.K., Misko, I., Kondo, N., Lavin, M.F., 1999. ATM is

- upregulated during the mitogenic response in peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 94, 1998–2006.
- George, J., Kubarenko, A.V., Rautanen, A., Mills, T.C., Colak, E., Kempf, T., Hill, A.V.S., Nieters, A., Weber, A.N.R., 2010. MyD88 adaptor-like D96N is a naturally occurring loss-of-function variant of TIRAP. *Journal of Immunology* 184, 3025–3032.
- George, J., Motshwene, P.G., Wang, H., Kubarenko, A.V., Rautanen, A., Mills, T.C., Hill, A.V.S., Gay, N.J., Weber, A.N.R., 2011. Two human MyD88 variants, S34Y and R98C, interfere with MyD88-IRAK4-Myddosome assembly. *Journal of Biological Chemistry* 286, 1341–1353.
- Goddard, T.D., Kneller, D.G., 1999. SPARKY 3. University of California, San Francisco.
- Hoarau, C., Gerard, B., Lescanne, E., Henry, D., Francois, S., Lacapere, J.J., El Benna, J., Dang, P.M.C., Grandchamp, B., Lebranchu, Y., Gougerot-Pocidalo, M.A., Elbim, C., 2007. TLR9 activation induces normal neutrophil responses in a child with IRAK-4 deficiency: involvement of the direct PI3K pathway. *Journal of Immunology* 179, 4754–4765.
- Jiang, Z., Georgel, P., Li, C., Choe, J., Crozat, K., Rutschmann, S., Du, X., Bigby, T., Mudd, S., Sovath, S., Wilson, I.A., Olson, A., Beutler, B., 2006. Details of Toll-like receptor: adapter interaction revealed by germ-line mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 10961–10966.
- Kato, Z., Jee, J., Shikano, H., Mishima, M., Ohki, I., Ohnishi, H., Li, A.L., Hashimoto, K., Matsukuma, E., Omoya, K., Yamamoto, Y., Yoneda, T., Hara, T., Kondo, N., Shirakawa, M., 2003. The structure and binding mode of interleukin-18. *Nature Structural Biology* 10, 966–971.
- Krause, J.C., Ghadil, P., Chrabieh, M., Casanova, J.L., Picard, C., Puel, A., Creech, C.B., 2009. Very late-onset group B Streptococcus meningitis, sepsis, and systemic shigellosis due to interleukin-1 receptor-associated kinase-4 deficiency. *Clinical Infectious Diseases* 49, 1393–1396.
- Ku, C.L., von Bernuth, H., Picard, C., Zhang, S.Y., Chang, H.H., Yang, K., Chrabieh, M., Issekutz, A.C., Cunningham, C.K., Gallin, J., Holland, S.M., Roifman, C., Ehl, S., Smart, J., Tang, M., Barrat, F.J., Levy, O., McDonald, D., Day-Good, N.K., Miller, R., Takada, H., Hara, T., Al-Hajjar, S., Al-Ghonaium, A., Speert, D., Sanlaville, D., Li, X.X., Geissmann, F., Vivier, E., Marodi, L., Garty, B.Z., Chapel, H., Rodriguez-Gallego, C., Bossuyt, X., Abel, L., Puel, A., Casanova, J.L., 2007. Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *Journal of Experimental Medicine* 204, 2407–2422.
- Li, A.L., Kato, Z., Ohnishi, H., Hashimoto, K., Matsukuma, E., Omoya, K., Yamamoto, Y., Kondo, N., 2003. Optimized gene synthesis and high expression of human interleukin-18. *Protein Expression and Purification* 32, 110–118.
- Lin, S.C., Lo, Y.C., Wu, H., 2010. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 465, 885–890.
- Loiarro, M., Gallo, G., Fanto, N., De Santis, R., Carminati, P., Ruggiero, V., Sette, C., 2009. Identification of critical residues of the MyD88 death domain involved in the recruitment of downstream kinases. *Journal of Biological Chemistry* 284, 28093–28103.
- Lye, E., Mirtsos, C., Suzuki, N., Suzuki, S., Yeh, W.C., 2004. The role of interleukin 1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4) kinase activity in IRAK-4-mediated signaling. *Journal of Biological Chemistry* 279, 40653–40658.
- Medvedev, A.E., Lentschat, A., Kuhns, D.B., Blanco, J.C.G., Salkowski, C., Zhang, S.L., Ardit, M.H., Gallin, J.I., Vogel, S.N., 2003. Distinct mutations in IRAK-4 confer hyporesponsiveness to lipopolysaccharide and interleukin-1 in a patient with recurrent bacterial infections. *Journal of Experimental Medicine* 198, 521–531.
- Medvedev, A.E., Thomas, K., Awomoyi, A., Kuhns, D.B., Gallin, J.I., Li, X.X., Vogel, S.N., 2005. Cutting edge: expression of IL-1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4) proteins with mutations identified in a patient with recurrent bacterial infections alters normal IRAK-4 interaction with components of the IL-1 receptor complex. *Journal of Immunology* 174, 6587–6591.
- Motschwe, P.G., Moncrieffe, M.C., Grossmann, J.G., Kao, C., Ayaluru, M., Sandercock, A.M., Robinson, C.V., Latz, E., Gay, N.J., 2009. An oligomeric signaling platform formed by the Toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4. *Journal of Biological Chemistry* 284, 25404–25411.
- Nada, M., Ohnishi, H., Tochio, H., Kato, Z., Kimura, T., Kubota, K., Yamamoto, T., Kamatari, Y.O., Tsutsumi, N., Shirakawa, M., Kondo, N., 2012. Molecular analysis of the binding mode of Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain proteins during TLR2 signaling. *Molecular Immunology* 52, 108–116.
- Nagpal, K., Plantinga, T.S., Sirois, C.M., Monks, B.G., Latz, E., Netea, M.G., Golenbock, D.T., 2011. Natural loss-of-function mutation of myeloid differentiation protein 88 disrupts its ability to form Myddosomes. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 11875–11882.
- Nagpal, K., Plantinga, T.S., Wong, J., Monks, B.G., Gay, N.J., Netea, M.G., Fitzgerald, K.A., Golenbock, D.T., 2009. A TIR domain variant of MyD88 adapter-like (Mal)/TIRAP results in loss of MyD88 binding and reduced TLR2/TLR4 signaling. *Journal of Biological Chemistry* 284, 25742–25748.
- Ohnishi, H., Miyata, R., Suzuki, T., Nose, T., Kubota, K., Kato, Z., Kaneko, H., Kondo, N., 2012a. A rapid screening method to detect autosomal-dominant ectodermal dysplasia with immune deficiency syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129, 578–580.
- Ohnishi, H., Tochio, H., Kato, Z., Kawamoto, N., Kimura, T., Kubota, K., Yamamoto, T., Funasaka, T., Nakano, H., Wong, R.W., Shirakawa, M., Kondo, N., 2012b. TRAM is involved in IL-18 signaling and functions as a sorting adaptor for MyD88. *PLoS ONE* 7, e38423.
- Ohnishi, H., Tochio, H., Kato, Z., Orii, K.E., Li, A., Kimura, T., Hiroaki, H., Kondo, N., Shirakawa, M., 2009. Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 10260–10265.
- Picard, C., Casanova, J.L., Puel, A., 2011. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or 1 kappa B alpha deficiency. *Clinical Microbiology Reviews* 24, 490–497.
- Picard, C., Puel, A., Bonnet, M., Ku, C.L., Bustamante, J., Yang, K., Soudais, C., Dupuis, S., Feinberg, J., Fieschi, C., Elbim, C., Hitchcock, R., Lammas, D., Davies, G., Al-Ghonaium, A., Al-Rayes, H., Al-Jumaah, S., Al-Hajjar, S., Al-Mohsen, I.Z., Frayha, H.H., Rucker, R., Hawn, T.R., Aderem, A., Tufenkeji, H., Haraguchi, S., Day, N.K., Good, R.A., Gougerot-Pocidalo, M.A., Ozinsky, A., Casanova, J.L., 2003. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 299, 2076–2079.
- Picard, C., von Bernuth, H., Ghadil, P., Chrabieh, M., Levy, O., Arkwright, P.D., McDonald, D., Geha, R.S., Takada, H., Krause, J.C., Creech, C.B., Ku, C.L., Ehl, S., Marodi, L., Al-Muhsen, S., Al-Hajjar, S., Al-Ghonaium, A., Day-Good, N.K., Holland, S.M., Gallin, J.I., Chapel, H., Speert, D.P., Rodriguez-Gallego, C., Colino, E., Garty, B.Z., Roifman, C., Hara, T., Yoshikawa, H., Nonoyama, S., Domachowske, J., Issekutz, A.C., Tang, M., Smart, J., Zitnik, S.E., Hoarau, C., Kumararatne, D.S., Thrasher, A.J., Davies, E.G., Bethune, C., Sirvent, N., de Ricaud, D., Camcioglu, Y., Vasconcelos, J., Guedes, M., Vitor, A.B., Rodrigo, C., Almazan, F., Mendez, M., Arostegui, J.I., Alsina, L., Fortuny, C., Reichenbach, J., Verbsky, J.W., Bossuyt, X., Doffinger, R., Abel, L., Puel, A., Casanova, J.L., 2010. Clinical features and outcome of patients with IRAK-4 and MyD88 deficiency. *Medicine* 89, 403–425.
- Qin, J.Z., Jiang, Z.F., Qian, Y.C., Casanova, J.L., Li, X.X., 2004. IRAK4 kinase activity is redundant for interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase phosphorylation and IL-1 responsiveness. *Journal of Biological Chemistry* 279, 26748–26753.
- Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G.S., Millar, D.G., Wada, T., Mirtsos, C., Takada, H., Wakeham, A., Itie, A., Li, S.Y., Penninger, J.M., Wesche, H., Ohashi, P.S., Mak, T.W., Yeh, W.C., 2002. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 416, 750–754.
- Takada, H., Yoshikawa, H., Imaizumi, M., Kitamura, T., Takeyama, J., Kumaki, S., Nomura, A., Hara, T., 2006. Delayed separation of the umbilical cord in two siblings with interleukin-1 receptor-associated kinase 4 deficiency: rapid screening by flow cytometer. *Journal of Pediatrics* 148, 546–548.
- von Bernuth, H., Ku, C.-L., Rodriguez-Gallego, C., Zhang, S., Garty, B.-Z., Marodi, L., Chapel, H., Chrabieh, M., Miller, R.L., Picard, C., Puel, A., Casanova, J.-L., 2006. A fast procedure for the detection of defects in toll-like receptor signaling. *Pediatrics* 118, 2498–2503.
- von Bernuth, H., Picard, C., Jin, Z., Pankla, R., Xiao, H., Ku, C.-L., Chrabieh, M., Ben Mustapha, I., Ghadil, P., Camcioglu, Y., Vasconcelos, J., Sirvent, N., Guedes, M., Vitor, A.B., Herrero-Mata, M.J., Arostegui, J.I., Rodrigo, C., Alsina, L., Ruiz-Ortiz, E., Juan, M., Fortuny, C., Yague, J., Anton, J., Pascal, M., Chang, H.-H., Janniere, L., Rose, Y., Garty, B.-Z., Chapel, H., Issekutz, A., Marodi, L., Rodriguez-Gallego, C., Banchereau, J., Abel, L., Li, X., Chaussabel, D., Puel, A., Casanova, J.-L., 2008. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* 321, 691–696.
- Wang, D., Zhang, S., Li, L., Liu, X., Mei, K., Wang, X., 2010. Structural insights into the assembly and activation of IL-1 beta with its receptors. *Nature Immunology* 11, 905–911.
- Weller, S., Bonnet, M., Delagreverie, H., Israel, L., Chrabieh, M., Marodi, L., Rodriguez-Gallego, C., Garty, B.Z., Roifman, C., Issekutz, A.C., Zitnik, S.E., Hoarau, C., Camcioglu, Y., Vasconcelos, J., Arkwright, P.D., Cerutti, A., Mefire, E., Zhang, S.Y., Alcais, A., Puel, A., Casanova, J.L., Picard, C., Weill, J.C., Reynaud, C.A., 2012. IgM+IgD+CD27+ B cells are markedly reduced in IRAK-4-, MyD88- and TIRAP- but not UNC-93B-deficient patients. *Blood* 120, 4992–5001.
- Yoshikawa, H., Watanabe, S., Imaizumi, M., 2010. Successful prevention of severe infection in Japanese siblings with interleukin-1 receptor-associated kinase 4 deficiency. *Journal of Pediatrics* 156, 168.



Epidemiology of virus-induced wheezing/asthma in children

Yuzaburo Inoue* and **Naoki Shimojo**

Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan

Edited by:

Hirokazu Kimura, National Institute of Infectious Diseases, Japan

Reviewed by:

Linfa Wang, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation Livestock Industries, Australia
Takeshi Saraya, Kyorin University School of Medicine, Japan

***Correspondence:**

Yuzaburo Inoue, Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuou-ku, Chiba, Chiba 260-8670, Japan
e-mail: yuzaburo@chiba-u.jp

Wheezing is a lower respiratory tract symptom induced by various viral respiratory infections. Epidemiological studies have revealed the phenotypes of wheezing in early childhood which have different risk factors for the development of asthma among school age children. The major viral species causing wheezing in children include respiratory syncytial virus, rhinovirus, human metapneumovirus and influenza viruses. It has been shown that the impact on the development of asthma is different between those virus species. Moreover, recent studies have also focused on the interaction between virus infection and other risk factors in the development of asthma, such as genetic factors or allergic sensitization. In this review, we summarize the previous findings and discuss how clinicians can effectively intervene in these viral infections to prevent the development of asthma.

Keywords: **wheezing, viral respiratory infection, cohort study, interferon, respiratory syncytial virus, rhinovirus**

INTRODUCTION

Wheezing is a lower respiratory tract symptom induced by various viral respiratory infections. It is common in children, with approximately one-third of the children having at least one wheezing episode by age nine. However, about 1 to 2% of affected infants need to be hospitalized due to respiratory distress. Moreover, although the condition is transient in the majority of cases, some children develop recurrent wheezing and are diagnosed to have asthma when they reach school age. In those children, the virus-induced wheezing in early childhood may be associated with the subsequent development of recurrent wheezing and/or asthma in connection to the pathology of asthma, including chronic airway inflammation, thus leading to airway hyperresponsiveness and airway remodeling.

Epidemiological studies are therefore considered to be important for clarifying which populations are at risk for developing virus-induced wheezing accompanied with other severe symptoms, recurrent wheezing and especially asthma. Moreover, recent studies have also focused on the interaction between virus infection and other risk factors for the development of asthma, such as genetic factors or allergic sensitization.

In this review, we summarize the previous findings and discuss how clinicians can effectively intervene in these viral infections to prevent the development of asthma.

PHENOTYPES OF VIRUS-INDUCED WHEEZING

Birth cohort studies have been conducted to clarify the natural history of wheezing in early childhood and to assess the risk factors for the development of wheezing and subsequent asthma. The first large prospective study focusing on the wheezing history was performed by the Tucson Children's Respiratory Study group (Halonen et al., 1999; Sherrill et al., 1999; Stein et al., 1999; Taussig et al., 2003; Morgan et al., 2005). They followed 828 infants until the age of 6 years and identified four different patterns of wheezing in early childhood (never wheeze, transient early wheeze,

late-onset wheeze, and persistent wheeze) on the basis of clinical observations. The "never wheeze" phenotype (51.5% of the cohort) was defined as children with no episodes of wheezing during the first 6 years of life. The "transient early wheeze" phenotype (19.9% of the cohort) was defined as children having at least one lower respiratory tract illness with wheezing during the first 3 years of life, but no wheezing at 6 years of age. The children with this phenotype had a diminished airway function both before the age of 1 year and at the age of 6 years, were more likely than the other children to have mothers who smoked but not mothers with asthma, and did not have elevated serum IgE levels or skin-test reactivity. The "late-onset wheeze" phenotype (15.0% of the cohort) was defined as children having no wheezing before the age of 3 years, but having wheezing at 6 years of age. The "persistent wheeze" phenotype (13.7% of the cohort) was defined as children having wheezing both before 3 years of age and at 6 years of age. The children of this phenotype were more likely than the "never wheeze" children to have mothers with a history of asthma, to have elevated serum IgE levels and normal lung function in the first year of life, and to have elevated serum IgE levels and diminished airway function at 6 years of age. Interestingly, these phenotypes have been shown to be associated with different risk factors for the number of encountered viral infections in early childhood (Kusel et al., 2007) and the development of asthma (Taussig et al., 2003; Stein and Martinez, 2004).

Birth cohort studies from Europe using latent class analysis identified more complicated wheezing phenotypes, including an intermediate-onset wheezing phenotype. A population-based birth cohort study of 6265 children in the United Kingdom (the ALSPAC study) identified six wheezing phenotypes in childhood, from birth to age 7 years, and demonstrated that these phenotypes differed in the atopy prevalence and lung function levels at 7–8 years of age (Henderson et al., 2008). Another multicenter birth cohort study of 2810 children in the Netherlands (the PIAMA

study) also identified five wheezing phenotypes in childhood from birth to age 8 years. Interestingly, the wheezing phenotypes identified by the two birth cohort studies were comparable (Savenije et al., 2011).

VIRAL SPECIES CAUSING WHEEZING

The major viral species causing wheezing in children include respiratory syncytial virus (RSV), rhinovirus (HRV), human metapneumovirus (hMPV) and influenza viruses.

RSV

Respiratory syncytial virus is a medium-sized negative-stranded RNA virus of the family *Paramyxoviridae*, which causes respiratory infections mainly in children. Interestingly, the clinical symptoms of RSV infection in infancy and early childhood are extremely variable. Most infants experience an RSV infection before 3 years of age (Ruuskanen and Ogra, 1993), normally escaping with only upper respiratory diseases, whereas approximately 1–2% of them require hospitalization because of severe RSV bronchiolitis (Green et al., 1989; Stretton et al., 1992). This is particularly common in those who are premature or who have chronic lung disease or congenital heart disease. Recently, a humanized monoclonal antibody designed to provide passive immunity against an epitope in the A antigenic site of the F protein of RSV has been widely used for the prophylaxis of severe RSV lower respiratory infection in those children.

HRV

Rhinovirus is a small-sized positive-strand RNA virus of the family *Picornaviridae*, which is well known as the predominant cause of the common cold. Because of the development of PCR techniques, it has been recognized that HRVs cause not only upper respiratory infections, but also lower respiratory infections or asthma exacerbation. HRVs consist of over 100 types classified into one of three species (A, B, and C) according to the phylogenetic sequence criteria. HRV C (HRV-C) is a recently classified group and has been shown to be associated with severe asthma attacks more frequently than other groups of HRV. The prevalence of HRV-associated wheezing increases by age, and it is significantly more common in children with recurrent wheezing episodes than in first-time wheezers in age categories of <24 and <36 months (Jartti et al., 2009).

hMPV

The hMPV is a medium-sized negative-stranded RNA virus of the family *Paramyxoviridae*, which was recently discovered (van den Hoogen et al., 2001), the clinical course of which resembles RSV infection. Similar to RSV, it has been reported that hMPV infection was associated with wheezing among children younger than 3 years, especially during the winter, while hMPV was not significantly associated with wheezing requiring hospitalization among children 3 years of age and older (Williams et al., 2005).

INFLUENZA VIRUSES

Influenza viruses are a medium-sized negative-stranded RNA virus of the family of *Orthomyxoviridae*. Influenza viruses cause severe lower respiratory tract complications, such as bronchitis or pneumonia. In addition, influenza is significantly associated with

wheezing during the winter among children younger than 3 years of age although the detection percentage of the influenza virus is lower than that of RSV (Heymann et al., 2004).

RISK FACTORS FOR THE DEVELOPMENT OF VIRUS-INDUCED WHEEZING

BEHAVIORAL OR ENVIRONMENTAL FACTORS

In the Tucson study, it was reported that breast-feeding at early infancy for at least 1 month was associated with lower rates of virus-induced wheezing during the first 4 months of the life (Wright et al., 1989). However, the results of the subsequent studies have been conflicting. A meta-analysis study finally showed that there was no association between any or exclusive breast feeding and wheezing illness (Brew et al., 2011).

Infants exposed to more children at home or day care experienced more frequent wheezing when they were 2 years old, but less frequent wheezing from years eight through year thirteen. Therefore, although exposure to children at home or in day care during infancy increased wheezing in early life, it appears to be protective against the development of frequent wheezing in school age children (Ball et al., 2000).

HOST IMMUNOLOGICAL FEATURES

Interferon (IFN) secretion is important in the clearance of viral pathogens. Therefore, IFN deficiency has been supposed to lead to lower respiratory viral infections. There are three types of interferons: Type I (IFN- α/β), Type II (IFN- γ) and Type III (IFN- λ). It was shown that low IFN- γ production in cord bloods (Copenhaver et al., 2004) or PBMCs in the first year of life (Stern et al., 2007) was a risk factor for wheezing during childhood, in addition to a risk factor for the development of asthma and allergies (Tang et al., 1994). It has recently been clarified that the deficiency of IFN production is related to atopy. It was reported that allergic asthmatic children had an impaired HRV-induced IFN- α and IFN- λ 1 production that correlated with an increased Fc ϵ RI expression on plasmacytoid dendritic cells in PBMCs, which were reduced by Fc ϵ RI cross-linking (Durrani et al., 2012). In addition, it was reported that bronchial epithelial cells from asthmatic individuals produced less IFN- β in response to HRV, leading to impaired apoptosis and increased HRV replication (Wark et al., 2005). Interestingly, it was revealed that allergic sensitization precedes HRV-induced wheezing, but the converse is not true (Jackson et al., 2012). The results of that study suggested that allergic sensitization can lead to more severe HRV-induced lower respiratory illnesses, which is considered to be a risk factor for the subsequent development of asthma.

GENETIC FACTORS

There have been many genetic risk factors reported to be associated with the development of RSV bronchiolitis. Two large scale genetic association studies were performed using a candidate gene approach (Janssen et al., 2007; Siezen et al., 2009). They analyzed 384 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in 220 candidate genes involved in the airway mucosal responses, innate immunity, chemotaxis, adaptive immunity, and allergic asthma. They found that SNPs in genes of the innate immune responses (the transcriptional regulator Jun, alpha interferon, IFN- α , nitric oxide synthase

and the vitamin D receptor) are important for determining the susceptibility to RSV bronchiolitis in term children. As RSV is recognized by Toll-like receptor (TLR) 4, SNPs in the genes of molecules related to TLR4 signaling have also been studied (Tal et al., 2004; Inoue et al., 2007).

In contrast, the genetic factors related to the development of HRV-induced wheezing are less well known (Helminen et al., 2008; Caliskan et al., 2013). However, the 17q21 variants, which were found to be related to childhood-onset asthma in a genomewide association study (Moffatt et al., 2007), were associated with HRV wheezing illnesses in early life, but not with RSV wheezing illnesses (Caliskan et al., 2013).

ASSOCIATION BETWEEN VIRUS-INDUCED WHEEZING AND THE DEVELOPMENT OF ASTHMA, AND EFFECTIVE TYPES OF INTERVENTION TO PREVENT THE SUBSEQUENT DEVELOPMENT OF ASTHMA

It is still unclear whether lower respiratory viral infections are causal factors, or instead serve as indicators, of a predisposition to asthma. Moreover, recent studies have indicated that the impact on the development of subsequent recurrent wheezing or asthma is different between virus species.

It was reported that infant birth approximately 4 months before the winter virus peak, which is the peak of bronchiolitis hospitalizations for that winter season, carried the highest risk for the development of asthma, thus suggesting that a lower respiratory infection with winter viruses, including RSV, in early childhood may be an important factor in the development of asthma (Wu et al., 2008). In a birth cohort study, Sigurs et al. (2010) followed 47 children aged <1 year hospitalized with RSV lower respiratory infection (RSV group) and 93 age- and gender-matched controls (Control group) for 18 years. They found that the RSV group had an increased prevalence of asthma/recurrent wheezing, clinical allergy and sensitization to perennial allergens, compared to the Control group (Sigurs et al., 2010). Meanwhile, it was shown that RSV prophylaxis using Palivizumab, a humanized monoclonal antibody against the RSV fusion protein that prevents severe RSV lower respiratory infection, in non-atopic children decreased the relative risk of recurrent wheezing by 80%, but did not have any effect in infants with an atopic family history (Simoes et al., 2010). These results suggest that RSV predisposes to recurrent wheezing via an atopy-independent mechanism.

Rhinovirus has been implicated as an important pathogen in asthma pathogenesis due to the improvement of PCR for HRV detection. In the Childhood Origins of ASThma (COAST) cohort, HRV in nasal lavage samples were evaluated by PCR. They found that, by age 3 years, wheezing in those with HRV-positive samples (OR, 25.6) was more strongly associated with asthma at age 6 years than aeroallergen sensitization (OR, 3.4; Jackson et al., 2008). As IFN deficiency is related to both atopy and the susceptibility to HRV infection, the inhalation of IFN by HRV-infected children with risk factors for asthma might thus help to prevent the development of asthma.

Recently, pandemic H1N1 influenza virus has been reported to increase the risk of lower respiratory tract complications including asthma attack, pneumonia, and atelectasis even in atopic

children without any history of either an asthma attack or asthma treatment, compared to the seasonal influenza virus (Hasegawa et al., 2011). This observation suggests that the pandemic H1N1 influenza virus may be a strong risk factor contributing to the development or exacerbation of asthma.

LIMITATIONS OF EPIDEMIOLOGY STUDIES

The correct diagnosis of individual viral infections is necessary for assessing which virus infection is important for the development of wheezing or the subsequent development of asthma. The principal diagnostic methods for respiratory viruses are virus culture, serology, immunofluorescence/antigen detection, and nucleic acid/PCR-based tests (Tregoning and Schwarze, 2010).

Although virus culture proves that the virus detected in clinically obtained samples is able to infect human cells, viral culture is time-consuming and is not appropriate for analyzing many samples in epidemiological studies. Viral serologic testing is also time-consuming, and generally requires at least two rounds of blood sampling, because viral serological testing can diagnose infections by an increase of a virus-specific antibody in the blood, which usually takes 2 weeks to develop. Most previous epidemiological studies thus evaluated viral infections by immunofluorescence/antigen detection or nucleic acid/PCR-based tests. Antigen detection is based on the use of virus-specific monoclonal antibodies. There are a variety of diagnostic test kits that use nasopharyngeal aspirate, nasopharyngeal wash or nasal swab specimens as the test material, and detect viral antigen by using either a conjugated enzyme or fluorescence. Immunofluorescence/antigen detection is appropriate for epidemiological studies because it is convenient, cheap and possible to use when handling for many samples. However, there is a limitation to the species of target viruses. Nucleic acid tests are significantly more sensitive than the other methods, and are now being multiplexed, allowing for the rapid detection of many viruses concurrently. The PCR method has greatly increased the recovery rates of viruses (Johnston et al., 1995; Rakes et al., 1999). However, the PCR-based diagnosis of viruses, especially HRV, may not necessarily indicate that the virus is causing the observed disease, because virus RNAs can be detected by PCR for several weeks after the onset of clinical symptoms (van Benten et al., 2003; Jartti et al., 2004; Wright et al., 2007).

Another limitation in epidemiological studies assessing wheezing/wheezes in early childhood is the difficulty of diagnosing these conditions in young children based on the clinical assessment of symptoms by both guardians and clinicians. It was reported that the parents of children aged 4 months to 15 years and clinicians agreed on only 45% of occasions that the patient was wheezy or had asthma (Cane et al., 2000), thus suggesting that epidemiological studies using symptom records kept by guardians may sometimes lead to a wrong conclusion. Moreover, it has been shown that even specialists might not always correctly recognize wheezing (Bisgaard and Bonnelykke, 2010).

FUTURE PROSPECTIVE

To our knowledge, previous epidemiological studies regarding the association between viral infections and wheezing/asthma did not evaluate all other risk factors for the development

of wheezing/asthma in childhood, including behavioral factors, environmental factors, host immunological features and genetic factors. Large birth cohort studies evaluating viral infections and these factors in childhood could thus better elucidate the impact of viral infections on the development of wheezing/asthma. However, epidemiological studies only reveal an association, but not a causal relationship between some viral infections and the development of wheezing or asthma. Therefore, in the future, intervention trials with preventative intervention or therapies on a specific virus would be needed to clearly identify when and how clinicians should intervene in such viral infections to thereby prevent the development of wheezing or asthma.

CONCLUSION

Virus-induced wheezing is not only a burden in early childhood, but also may be one of causes or signs of childhood asthma. Therefore, clarifying the risk factors for virus-induced wheezing in epidemiological studies can and have provided clues about the pathogenesis of asthma. Further studies are needed to clarify which virus(es) in which population should be the major target of early intervention for preventing the subsequent development of asthma.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Dr. Brian Quinn for reviewing the manuscript.

REFERENCES

- Ball, T. M., Castro-Rodriguez, J. A., Griffith, K. A., Holberg, C. J., Martinez, F. D., and Wright, A. L. (2000). Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N. Engl. J. Med.* 343, 538–543. doi: 10.1056/NEJM200008243430803
- Bisgaard, H., and Bonnelykke, K. (2010). Long-term studies of the natural history of asthma in childhood. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126, 187–197. doi: 10.1016/j.jaci.2010.07.011
- Brew, B. K., Allen, C. W., Toelle, B. G., and Marks, G. B. (2011). Systematic review and meta-analysis investigating breast feeding and childhood wheezing illness. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 25, 507–518. doi: 10.1111/j.1365-3016.2011.01233.x
- Caliskan, M., Bochkov, Y. A., Kreiner-Moller, E., Bonnelykke, K., Stein, M. M., Du, G., et al. (2013). Rhinovirus wheezing illness and genetic risk of childhood-onset asthma. *N. Engl. J. Med.* 368, 1398–1407. doi: 10.1056/NEJMoa1211592
- Cane, R. S., Ranganathan, S. C., and Mckenzie, S. A. (2000). What do parents of wheezy children understand by “wheeze”? *Arch. Dis. Child.* 82, 327–332. doi: 10.1136/adc.82.4.327
- Copenhafer, C. C., Gern, J. E., Li, Z., Shultz, P. A., Rosenthal, L. A., Mikus, L. D., et al. (2004). Cytokine response patterns, exposure to viruses, and respiratory infections in the first year of life. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170, 175–180. doi: 10.1164/rccm.200312-1647OC
- Durrani, S. R., Montville, D. J., Pratt, A. S., Sahu, S., Devries, M. K., Rajamanickam, V., et al. (2012). Innate immune responses to rhinovirus are reduced by the high-affinity IgE receptor in allergic asthmatic children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130, 489–495. doi: 10.1016/j.jaci.2012.05.023
- Green, M., Brayer, A. E., Schenkman, K. A., and Wald, E. R. (1989). Duration of hospitalization in previously well infants with respiratory syncytial virus infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 8, 601–605. doi: 10.1097/00006454-198909000-00007
- Halonen, M., Stern, D. A., Lohman, C., Wright, A. L., Brown, M. A., and Martinez, F. D. (1999). Two subphenotypes of childhood asthma that differ in maternal and paternal influences on asthma risk. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 564–570. doi: 10.1164/ajrccm.160.2.9809038
- Hasegawa, S., Hirano, R., Hashimoto, K., Haneda, Y., Shirabe, K., and Ichiyama, T. (2011). Characteristics of atopic children with pandemic H1N1 influenza viral infection: pandemic H1N1 influenza reveals ‘occult’ asthma of childhood. *Pediatr. Allergy Immunol.* 22, e119–e123. doi: 10.1111/j.1399-3038.2010.01090.x
- Helminen, M., Nuolivirta, K., Virta, M., Halkosalo, A., Korppi, M., Vesikari, T., et al. (2008). IL-10 gene polymorphism at -1082 A/G is associated with severe rhinovirus bronchiolitis in infants. *Pediatr. Pulmonol.* 43, 391–395. doi: 10.1002/ppul.20793
- Henderson, J., Granell, R., Heron, J., Sherriff, A., Simpson, A., Woodcock, A., et al. (2008). Associations of wheezing phenotypes in the first 6 years of life with atopy, lung function and airway responsiveness in mid-childhood. *Thorax* 63, 974–980. doi: 10.1136/thx.2007.093187
- Heymann, P. W., Carper, H. T., Murphy, D. D., Platts-Mills, T. A., Patrie, J., McLaughlin, A. P., et al. (2004). Viral infections in relation to age, atopy, and season of admission among children hospitalized for wheezing. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 239–247. doi: 10.1016/j.jaci.2004.04.006
- Inoue, Y., Shimojo, N., Suzuki, Y., Campos Alberto, E. J., Yamaide, A., Suzuki, S., et al. (2007). CD14 -550 C/T, which is related to the serum level of soluble CD14, is associated with the development of respiratory syncytial virus bronchiolitis in the Japanese population. *J. Infect. Dis.* 195, 1618–1624. doi: 10.1086/516790
- Jackson, D. J., Evans, M. D., Gangnon, R. E., Tisler, C. J., Pappas, T. E., Lee, W. M., et al. (2012). Evidence for a causal relationship between allergic sensitization and rhinovirus wheezing in early life. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185, 281–285. doi: 10.1164/rccm.201104-0660OC
- Jackson, D. J., Gangnon, R. E., Evans, M. D., Roberg, K. A., Anderson, E. L., Pappas, T. E., et al. (2008). Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 667–672. doi: 10.1164/rccm.200802-309OC
- Janssen, R., Bont, L., Siezen, C. L., Hodemaekers, H. M., Ermers, M. J., Doornbos, G., et al. (2007). Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus bronchiolitis is predominantly associated with innate immune genes. *J. Infect. Dis.* 196, 826–834. doi: 10.1086/520886
- Jartti, T., Lehtinen, P., Vuorinen, T., Koskenvuo, M., and Ruuskanen, O. (2004). Persistence of rhinovirus and enterovirus RNA after acute respiratory illness in children. *J. Med. Virol.* 72, 695–699. doi: 10.1002/jmv.20027
- Jartti, T., Lehtinen, P., Vuorinen, T., and Ruuskanen, O. (2009). Bronchiolitis: age and previous wheezing episodes are linked to viral etiology and atopic characteristics. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28, 311–317. doi: 10.1097/INF.0b013e3181ee0c1
- Johnston, S. L., Pattemore, P. K., Sanderson, G., Smith, S., Lampe, F., Josephs, L., et al. (1995). Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9–11 year old children. *BMJ* 310, 1225–1229. doi: 10.1136/bmj.310.6989.1225
- Kusel, M. M., De Clerk, N. H., Kebadze, T., Vohma, V., Holt, P. G., Johnston, S. L., et al. (2007). Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 1105–1110. doi: 10.1016/j.jaci.2006.12.669
- Moffatt, M. F., Kabesch, M., Liang, L., Dixon, A. L., Strachan, D., Heath, S., et al. (2007). Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature* 448, 470–473. doi: 10.1038/nature06014
- Morgan, W. J., Stern, D. A., Sherrill, D. L., Guerra, S., Holberg, C. J., Guilbert, T. W., et al. (2005). Outcome of asthma and wheezing in the first 6 years of life: follow-up through adolescence. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172, 1253–1258. doi: 10.1164/rccm.200504-525OC
- Rakes, G. P., Arruda, E., Ingram, J. M., Hoover, G. E., Zambrano, J. C., Hayden, F. G., et al. (1999). Rhinovirus and respiratory syncytial virus in wheezing children requiring emergency care. IgE and eosinophil analyses. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 785–790. doi: 10.1164/ajrccm.159.3.9801052
- Ruuskanen, O., and Ogra, P. L. (1993). Respiratory syncytial virus. *Curr. Probl. Pediatr.* 23, 50–79. doi: 10.1016/0045-9380(93)90003-U
- Savenije, O. E., Granell, R., Caudri, D., Koppelman, G. H., Smit, H. A., Wijga, A., et al. (2011). Comparison of childhood wheezing phenotypes in 2 birth cohorts: ALSPAC and PIAMA. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 1505–1512, e1514. doi: 10.1016/j.jaci.2011.02.002
- Sherrill, D., Stein, R., Kurzius-Spencer, M., and Martinez, F. (1999). On early sensitization to allergens and development of respiratory symptoms. *Clin. Exp. Allergy* 29, 905–911. doi: 10.1046/j.1365-2222.1999.00631.x
- Siezen, C. L., Bont, L., Hodemaekers, H. M., Ermers, M. J., Doornbos, G., Van’t Slot, R., et al. (2009). Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus bronchiolitis in preterm children is associated with airway remodeling genes and innate immune genes. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28, 333–335. doi: 10.1097/INF.0b013e31818e2aa9
- Sigurs, N., Aljassim, F., Kjellman, B., Robinson, P. D., Sigurbergsson, F., Bjarnason, R., et al. (2010). Asthma and allergy patterns over 18 years after

- severe RSV bronchiolitis in the first year of life. *Thorax* 65, 1045–1052. doi: 10.1136/thx.2009.121582
- Simoes, E. A., Carbonell-Estrany, X., Rieger, C. H., Mitchell, I., Fredrick, L., and Grootenhuis, J. R. (2010). The effect of respiratory syncytial virus on subsequent recurrent wheezing in atopic and nonatopic children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126, 256–262. doi: 10.1016/j.jaci.2010.05.026
- Stein, R. T., and Martinez, F. D. (2004). Asthma phenotypes in childhood: lessons from an epidemiological approach. *Paediatr. Respir. Rev.* 5, 155–161. doi: 10.1016/j.prrv.2004.01.007
- Stein, R. T., Sherrill, D., Morgan, W. J., Holberg, C. J., Halonen, M., Taussig, L. M., et al. (1999). Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 354, 541–545. doi: 10.1016/S0140-6736(98)10321-5
- Stern, D. A., Guerra, S., Halonen, M., Wright, A. L., and Martinez, F. D. (2007). Low IFN-gamma production in the first year of life as a predictor of wheeze during childhood. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 835–841. doi: 10.1016/j.jaci.2007.05.050
- Stretton, M., Ajizian, S. J., Mitchell, I., and Newth, C. J. (1992). Intensive care course and outcome of patients infected with respiratory syncytial virus. *Pediatr. Pulmonol.* 13, 143–150. doi: 10.1002/ppul.1950130304
- Tal, G., Mandelberg, A., Dalal, I., Cesar, K., Somekh, E., Tal, A., et al. (2004). Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. *J. Infect. Dis.* 189, 2057–2063. doi: 10.1086/420830
- Tang, M. L., Kemp, A. S., Thorburn, J., and Hill, D. J. (1994). Reduced interferon-gamma secretion in neonates and subsequent atopy. *Lancet* 344, 983–985. doi: 10.1016/S0140-6736(94)91641-1
- Taussig, L. M., Wright, A. L., Holberg, C. J., Halonen, M., Morgan, W. J., and Martinez, F. D. (2003). Tucson Children's Respiratory Study: 1980 to present. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, 661–675; quiz 676. doi: 10.1067/mai.2003.162
- Tregoning, J. S., and Schwarze, J. (2010). Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 74–98. doi: 10.1128/CMR.00032-09
- van Benten, I., Koopman, L., Niesters, B., Hop, W., Van Middelkoop, B., De Waal, L., et al. (2003). Predominance of rhinovirus in the nose of symptomatic and asymptomatic infants. *Pediatr. Allergy Immunol.* 14, 363–370. doi: 10.1034/j.1399-3038.2003.00064.x
- van den Hoogen, B. G., De Jong, J. C., Groen, J., Kuiken, T., De Groot, R., Fouchier, R. A., et al. (2001). A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat. Med.* 7, 719–724. doi: 10.1038/89098
- Wark, P. A., Johnston, S. L., Buccieri, F., Powell, R., Puddicombe, S., Lazan-Stanca, V., et al. (2005). Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J. Exp. Med.* 201, 937–947. doi: 10.1084/jem.20041901
- Williams, J. V., Tollefson, S. J., Heymann, P. W., Carper, H. T., Patrie, J., and Crowe, J. E. (2005). Human metapneumovirus infection in children hospitalized for wheezing. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115, 1311–1312. doi: 10.1016/j.jaci.2005.02.001
- Wright, A. L., Holberg, C. J., Martinez, F. D., Morgan, W. J., and Taussig, L. M. (1989). Breast feeding and lower respiratory tract illness in the first year of life. Group Health Medical Associates. *BMJ* 299, 946–949. doi: 10.1136/bmj.299.6705.946
- Wright, P. F., Deatly, A. M., Karron, R. A., Belshe, R. B., Shi, J. R., Gruber, W. C., et al. (2007). Comparison of results of detection of rhinovirus by PCR and viral culture in human nasal wash specimens from subjects with and without clinical symptoms of respiratory illness. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2126–2129. doi: 10.1128/JCM.02553-06
- Wu, P., Dupont, W. D., Griffin, M. R., Carroll, K. N., Mitchel, E. F., Gebretsadik, T., et al. (2008). Evidence of a causal role of winter virus infection during infancy in early childhood asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 1123–1129. doi: 10.1164/rccm.200804-579OC

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 30 July 2013; **accepted:** 02 December 2013; **published online:** 16 December 2013.

Citation: Inoue Y and Shimojo N (2013) Epidemiology of virus-induced wheezing/asthma in children. *Front. Microbiol.* 4:391. doi: 10.3389/fmicb.2013.00391

This article was submitted to Virology, a section of the journal *Frontiers in Microbiology*. Copyright © 2013 Inoue and Shimojo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.