

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590560

研究課題名（和文）

呼気凝縮液による気道炎症モニタリングシステムの開発と気管支喘息病態評価法への応用
研究課題名（英文）Monitoring of Inflammatory Markers in Exhaled Breath Condensate in patients with
Asthma and Development of Evaluating System of Asthma Severity

研究代表者

片岡 幹男 (KATAOKA MIKIO)

岡山大学・大学院保健学研究科・教授

研究成果の概要（和文）：

気管支喘息において、気道炎症の評価は診断や治療において重要である。呼気凝縮液（EBC）は誘発喀痰や気管支肺胞洗浄（BAL）などに比べより簡便で非侵襲的な気道炎症評価法として注目されている。今回、気管支喘息患者を対象に EBC を採取し喘息の気道炎症状態を反映するバイオマーカーを見出し、これらを用いて喘息の重症度や肺機能との関連を明らかにすることを研究の目的とした。採取した EBC において、気管支喘息患者 55 名では健常者 58 名に比し CRP、Eosinophil cationic protein (ECP)、 H_2O_2 、 NO_2/NO_3 が有意に上昇しており、気管支喘息患者の軽症持続型は他の重症度に比し、pH が有意に低く、CRP、 H_2O_2 、 NO_3 が有意の高値を示していた。また EBC 中 ECP、 H_2O_2 、NO は気道閉塞の指標である FEV1、PEFR と有意の負相関を示した。EBC は非侵襲的に、簡便に採取可能であり、その中に含まれるバイオマーカーを測定することにより、喘息の気道炎症状態の把握や治療効果の判定に有用であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The evaluation of airway inflammation is important for the diagnosis and treatment of asthma. The exhaled breath condensate (EBC) is a less invasive method compared with bronchoalveolar lavage or bronchial biopsy. Measurement of mediators in EBC could be a useful method for monitoring airway inflammation in asthma. The aims of this study are to establish the EBC collection method and to find measurable biomarkers reflecting asthmatic airway inflammation and the relationship between these biomarkers and asthmatic severity and lung function. Fifty-eight non-smoking healthy subjects, 7 asymptomatic smokers, 9 common cold subjects and 55 asthmatics with disease severity ranging from mild intermittent to severe persistent were enrolled. We measured the levels of pH, CRP, albumin, Eosinophil cationic protein (ECP), H_2O_2 , and nitrite/nitrate in EBC. The levels of CRP, H_2O_2 , nitrite/nitrate of the asthma group were significantly higher than in the control group. In asthmatic severity, the levels of pH, CRP, ECP, H_2O_2 and nitrate in the mild persistent group were significantly higher than the other groups with severity. In addition, the H_2O_2 level in EBC significantly correlated with that of nitrite/nitrate. FEV1 and PEFR showed a significant negative correlation with the levels of ECO, H_2O_2 and nitrite/nitrate. EBC collection is noninvasive and useful to evaluate airway inflammation by measuring inflammatory markers in the management of asthma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査学、臨床検査システム

1. 研究の背景

喘息は気道の慢性炎症病態と特徴づけられている。このような炎症は喘息症状や気道閉塞、気道過敏性などを惹起する。現在、気道炎症は、肺機能検査、誘発喀痰による好酸球検出、呼気一酸化窒素濃度 (FeNO) 検査などにより間接的に、または気管支肺胞洗浄 (BAL)、肺生検により評価されている。しかし、それぞれに欠点があり気道炎症の指標としては確立していない。炎症部位から直接情報を得て診断、治療を行っていくことができれば、気道炎症のモニタリングに非常に有用である。そこで、より簡便により非侵襲的に採取できる検体として呼気凝縮液 (EBC) に注目した。

2. 研究の目的

EBCは呼気を冷却装置に通し、急速に冷却させることにより凝縮させ、液体として採取したものである。EBCの成分は大部分が水分であるが、気道からの揮発性成分や蛋白質のような不揮発性物質もエアロゾルとして含まれている。EBCから検出された物質の中には、酸化的ストレスや炎症を反映する物質が含まれており、気管支喘息に関わるメディエーターもいくつか確認されている。今回の研究の目的は、気管支喘息患者を対象にEBC採取法の確立と喘息の気道炎症状態を反映するバイオマーカーを見出し、これらのバイオ

マーカーを用いて喘息の重症度や肺機能との関連を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 対象

対照群として58名の非喫煙健常者(男性11名、女性47名、平均年齢22歳)と7名の喫煙者(男性6名、女性1名、平均年齢37歳)、9名の感冒罹患者(女性9名、平均年齢21歳)であり、気管支喘息患者グループとして55名(男性24名、女性31名、平均年齢56歳)の気管支喘息患者の検討を行った。喘息患者はJGL2006の定義を満たしており、44名は吸入ステロイドを使用していた。さらに気管支喘息患者はJGL2006分類に基づき軽症間欠型(18名)、軽症持続型(7名)、中等症持続型(9名)、重度持続型(21名)の4グループに分類した。検体の採取は患者、健常者とも書面にて同意を得た上で採取した。検体、データは匿名化して保存した。

(2) EBC採取

EBCの採取は市販のEBC採取装置(Ecoscreen; Jeager, Hoechberg, Germany)とピペットを用いた自作の簡易式EBC採取装置(Pipet法)を作製し、Pipet法の有効性について検討した。どちらの方法においても、被検者はノーズクリップを着用し、マウスピースを通して10分間の安静呼吸を行った。

採取したサンプルは液量を測定した後、
-80°Cで貯蔵した。

(3) EBC 中バイオマーカーの測定

① pH 測定

微小電極 pH メーターを用いて未処理 EBC の pH を測定した。続いてアルゴンガスをサンプルへ 2 L/min の流量で 10 分間通気することにより deaeration を行った後、再度 pH を測定した。

② CRP、Albumin (Alb)、ECP 測定

2 種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA により行った。

③ 過酸化水素測定

Zho らの方法に従って、サンプルへ Amplex Red と Horseradish Peroxidase を加え、蛍光を測定した。

④ NO (nitrate/nitrite) 測定

NO は Misko らの方法に従って、サンプルへ DAN (2,3 diamionaphthalene) と NaOH を加えた後、蛍光を測定した。総 NO は NO₂ (nitrite) と NO₃ (nitrate) の合計として、最初に NO₂ を測定し、次に NO₃ を Nitrate Reductase により NO₂ に転換したのち total NO を測定し、最後に NO₃ を算出した。

⑤ 肺機能検査

肺機能は VC、%VC、FVC、FEV1、FEV1% (G)、V75、V50、V25、ピークフロー (PEFR) について標準法で測定した。

⑥ 統計解析

データは平均値±標準誤差で示している。各測定項目の値のグループ間の比較は Fisher の PLSD 検定を用い、EBC 中の各測定項目と肺機能間の相関は Spearman correlation coefficient によって評価した。結果は p < 0.05 なら有意差有りとした。グラフ中 * ; p < 0.05、** ; p < 0.01、*** ; p < 0.001 を示す。

4. 研究成果

(1) EBC の採取

ピペットを用いた簡易呼気凝縮液採取装置を作製した(図 1)。まず Ecoscreen と Pipet 法で採取された EBC の採取量を比較したところ、Ecoscreen のほうが Pipet 法よりも約二倍多く採取されていた。EBC 中のバイオマ-

ーカーとして、pH、CRP、アルブミン (Alb)、好酸球カチオン蛋白 (ECP)、H₂O₂、NO の測定が可能であった。両法とも今回の測定を行うのに十分な量を採取でき、測定値も両採取法間に有意の差は認められなかった (図 2)。

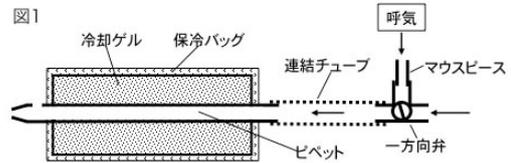
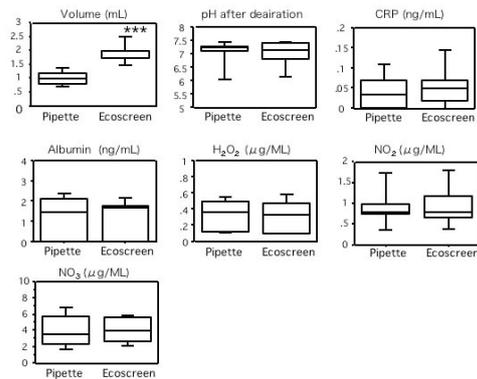


図 2



(2) EBC 中のバイオマーカー

① EBC の pH

pH 測定において、アルゴンガスによる deaeration を行うと全てのサンプルで pH の上昇が見られた。気管支喘息患者の処理前 pH (白色カラム) は健常者に比し有意に高かった。しかし、処理後 pH (斜線カラム) は気管支喘息患者と健常者間に有意差は見られなかった。一方、処理前後ともに感冒罹患者の pH は健常者に比し有意の低下が見られた (図 3a)。

② EBC の CRP 値

CRP 値は喘息患者で健常者に比し有意の高値を示していた。喫煙者、感冒罹患者は健常者と差は認められなかった (図 3b)。

③ EBC の Alb 値

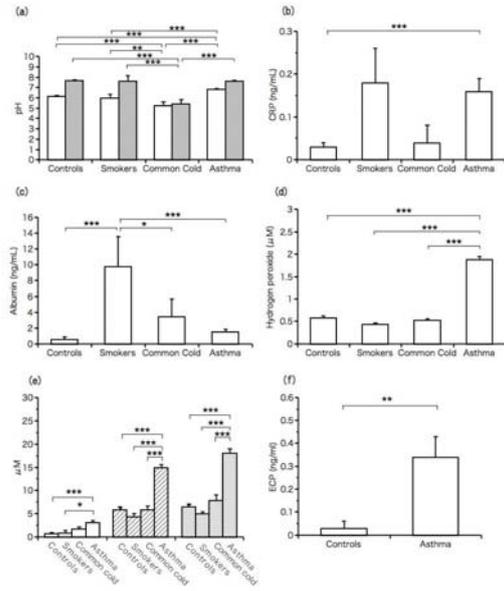
EBC 中の Alb 値はでは健常喫煙者群で健常者群に比し有意の上昇が認められた。しかし健常者と喘息患者の間には差は認められなかった (図 3c)。

④ EBC の H₂O₂ 値

喘息患者の EBC 中の H₂O₂ 値は健常者に比し有意の上昇がみられた。喫煙者、感冒罹患

は健常人と差は認められなかった (図 3d)。

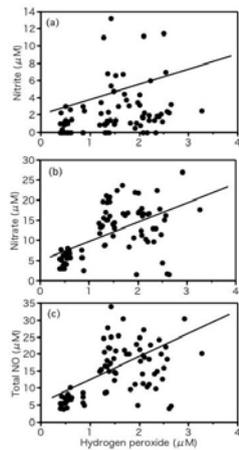
図 3



⑤ EBC の NO 値

喘息患者の EBC 中 Nitrite 値 (図 3e、白色カラム) は健常者に比し有意の高値を示していた。また Nitrate (図 3e、斜線カラム) 値も喘息患者では有意に高値であった。総 NO (Nitrite+Nitrate、点カラム) も同様に喘息患者において有意の高値を示していた。また Nitrite、Nitrate、総 NO とも H_2O_2 と有意の相関が認められた (図 4a、4b、4c)。

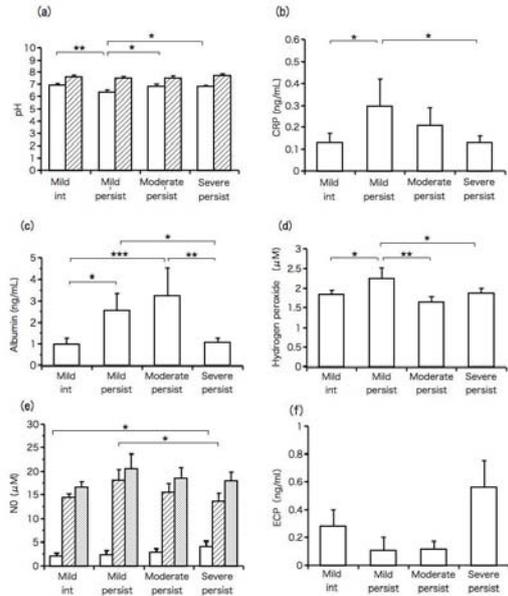
図 4



⑥ EBC の ECP 値

喘息患者の EBC 中の ECP 値は健常者に比し有意の上昇が認められた (図 3f)。更に EBC 中 ECP 値は末梢血好酸球数と有意の正の相関を示し、FEV1、PEFR と有意の負の相関を示していた。

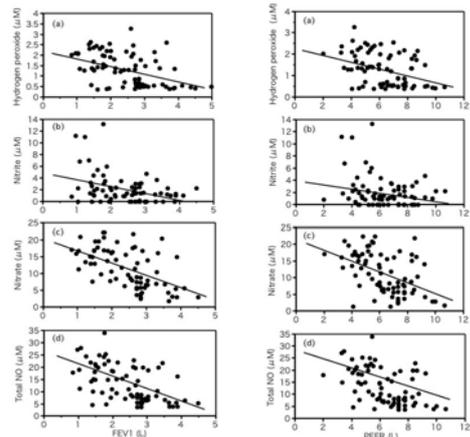
図 5



⑦ EBC 中バイオマーカーと喘息重症度

図 6

図 7



気管支喘息患者重症度においては、軽症持続型の処理前 pH は軽症間欠型、中等症持続型、重症持続型に比し有意に低値を示していた。処理後 pH は 4 群に差は認められなかった (図 5a)。又 ECP も軽症持続型、中等症持続型が他の重症度に比し低値を示していた (図 5f)。CRP、 H_2O_2 、総 NO、Nitrite は軽症持続型が他の重症度に比し、最も高値を示していた (図 5b、5d、5e)。Alb は軽症持続型と中等症持続型で他の分類に比べて有意に増加していた。 H_2O_2 と Nitrite、Nitrate、Total NO は気道閉塞の指標である FEV1 (図 6a、6b、6c、6d) と PEFR (図 7a、7b、7c、7d) と有意の負相関を示した。

(3) 考察

気管支喘息は気道炎症を主徴とし、炎症性細胞が放出する各種メディエーターが気道の損傷やリモデリングを引き起こすと考えられている。気道炎症のモニタリングは喘息の病態の把握や治療を行う上で、重要なことと考えられる。呼気凝縮液は気管支肺胞洗浄などに比し、非侵襲的であり、誘発喀痰に比べても、更に侵襲が少ない。気管支喘息の気道炎症状態を把握するにはどのようなバイオマーカーが最適かは確定したものは未だない。そこで我々は、健常非喫煙者、健常喫煙者、感冒罹患者を対照に、気管支喘息患者よりEBCを採取した。EBC中の測定可能な気道炎症状態を反映するバイオマーカーを見出すため、pH、CRP、Albumin、 H_2O_2 、nitrite/nitrate、ECPの測定を行うとともに、気管支喘息患者重症度による各メディエーター量の比較や生理学的所見との関連性について検討した。

気管支喘息は気道炎症を原因とし、気道過敏性の亢進や気道閉塞を特徴とする慢性病変である。喘息において気道炎症の評価を行うことは診断、治療効果の判定において有用性が高い。しかし、従来の評価に用いられた方法は侵襲的であり、反復検査が困難であることなどから気道炎症の指標としてモニタリングに用いられるまでには至っていない。今回用いたEBCは採取が簡便であり、非侵襲的に繰り返しの採取が可能である。さらにEBC採取装置として作製したプラスチックピペットを用いた装置は市販装置に比しサンプル量が約半分であったが、1ml以上の採取が可能であり、バイオマーカーの測定値は両者で差は認められなかった。また採取したサンプルはアミラーゼの測定を行った結果、唾液の混入は認められなかった。これらのことより今後、EBC採取は簡易装置を用いることにより病院、診療所、自宅など様々な場所で実施できる可能性を示している。

EBCのpHはpH電極を用いて容易に測定可能であるが、健常者ではEBCのpHは不安定である。安定性を高めるためにアルゴンガスを用いてdeaerationを行い、 CO_2 の遊離を行った。未処理pHは、健常者に比し上気道炎患者で有意の低下を示した。喘息重症度別に

処理前pHをみると軽症持続型患者で最も低値であった。一方、deaerationを行うと全てのサンプルでpHの上昇が見られた。

deaeration後の健常者のpH値はこれまでの報告とほぼ一致していた。健常者と気管支喘息患者や重症度における差は認められなかった。これは喘息重症度が増すとpHは低下するとの報告と一致しない。また急性期の気管支喘息患者では呼気凝縮液のpHが健常者に比し有意に低く、この酸性化はステロイド治療により改善されるとも報告されている。今回、有意のpH変化が認められなかった原因として、気管支喘息患者が多くが慢性期患者で、ほとんどがステロイド吸入治療を受けていたためと思われる。安定したpH測定を行うには、測定までの時間や温度などの厳密な管理が必要であるが、気道炎症マーカーとしてモニタリングに用いられる可能であると思われる。

次に炎症性蛋白であるCRPと気管支肺胞洗浄液では炎症性疾患で増加が認められているアルブミンについて測定した。アルブミンについては気管支喘息患者と健常者間に有意差は見られなかった。健常者では大半が検出限界以下であったのに対し気管支喘息群は測定可能例が多かったが、その平均は低値であり、有意差は認められなかった。EBCは大部分が水蒸気でありエアロゾル中蛋白はかなり希釈されており、さらに感度良い測定法の開発が必要である。

EBC中CRPは気管支喘息患者で健常者に比較して上昇していた。気管支喘息で血清中高感度CRPの上昇が報告されている。しかしEBC中におけるCRP測定についての報告は少なく、以前の研究においては検出できなかったと報告されているが、今回我々は2種類のモノクローナル抗体を用いてより感度のよいCRP測定法を作製した結果、十分検出可能な値を示した。

気管支喘息の気道炎症は好酸球浸潤が特徴的な所見であるとされており、喀痰にも多くの好酸球の遊出が認められる。ECPは好酸球より放出されて、気管支粘膜上皮細胞を障害すると言われている。EBC中ECPは健常者に比し有意の高値を示していた。また重症持続型で最も高値を示し、末梢血好酸球数と有

意の正の相関を、FEV1、PEFR と有意の負の相関を示していたことは、ECP が気道炎症状態を反映していたものと考えた。

今回の測定したバイオマーカーの中で、 H_2O_2 と NO (nitrite/nitrate) は健常者群に比し喘息患者群で有意の上昇が認められた。どちらの分子も酸化ストレスへの関連が知られている。酸化ストレスとは酸化体の産生増加と抗酸化作用の低下といった調節の不均衡と定義され、呼吸器疾患においても気道炎症、気道傷害に関与していると考えられる。この気道の酸化ストレスのマーカーとして、 H_2O_2 と NO の測定を行った。NO 分析においては、EBC 同様非侵襲的で反復測定可能な分析方法として呼気一酸化窒素 (fractional exhaled nitric oxide; FeNO) 測定がある。気管支喘息患者の FeNO が健常者に比べて増加しており、一秒率などの気流制限、気道過敏性検査、喀痰中の好酸球や症状の重症度と相関を示すと報告されている。またステロイド高濃度吸入治療において健常者に比し重症持続型喘息患者の EBC 中 H_2O_2 は上昇していたが FeNO は正常だったとの報告があり、EBC 中 H_2O_2 は FeNO より喘息炎症のコントロールをモニタリングするのに有用であるといえる。一方、水溶液中において NO はその反応性の高さから変化しやすく、気道中 NO 濃度は生体内の NO 最終代謝産物である Nitrate (NO_3) と Nitrite (NO_2) 測定によって評価することができる。EBC 中の NO_2 、 NO_3 、total NO、全ての成分が検出可能であった。EBC 中 H_2O_2 、Nitrite、Nitrate、Total NO 濃度は健常者に比べて気管支喘息で有意の上昇がみられ、 H_2O_2 と Nitrite、Nitrate、Total NO は有意の相関が認められたことより、両者とも気道炎症を良く反映していると考えられた。EBC 中 H_2O_2 と NO (Nitrite、Nitrate、Total NO) は気道閉塞の指標である FEV1 と PEFR に有意の負相関を示しており、気道炎症状態や治療効果の判定に有用であり、厳密な気管支喘息管理が可能となると考えられた。

EBC は非侵襲的に、簡便に採取可能であり、その中に含まれるバイオマーカーを測定することにより、喘息の気道炎症状態の把握や治療効果の判定に有用であると考えられた。

5. 発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Wataru Ito, Mitsune Tanimoto, Mikio Kataoka 他. Growth Factors Temporally Associate with Airway Responsiveness and Inflammation in Allergen-Exposed Mice. Int Arch Allergy Immunol、査読有、Vol. 145、2008、pp. 324-339.
- ② Ichikawa H, Kataoka M, Hiramatsu J 他. Quantitative Analysis of Propionibacterial DNA in Bronchoalveolar Lavage Cells from Patients with Sarcoidosis. SARCOIDOSIS VASCULITIS AND DIFFUSE LUNG DISEASES、査読有、Vol. 25、2008、pp. 15-20.
- ③ Tomoe Ueno, Mikio Kataoka, Atsushi Hirano 他. Inflammatory markers in exhaled breath condensate from patients with asthma. Respirology、査読有、Vol. 13、2008、pp. 654-663.

[学会発表] (計 1 件)

- ① 谷本 安、高橋 清、片岡幹男 他. シンポジウム 気管支喘息の難治か機構とその対策 「成人喘息の立場から - 臨床マーカー -」. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008 年 11 月、東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 幹男 (KATAOKA MIKIO)

岡山大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：50177391

(2) 研究分担者

岡 久雄 (OKA HISAO)

岡山大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：80116441

石川 哲也 (ISHIKAWA TETSUYA)

岡山大学・大学院保健学研究科・准教授
研究者番号：90221754