

平成22年5月28日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591175
 研究課題名 (和文) 呼気凝縮液を用いた気道炎症モニタリングによる難治性喘息の病態解明
 研究課題名 (英文) Exhaled breath condensate analysis in difficult asthma

研究代表者
 松永 和人 (Matsunaga Kazuto)
 和歌山県立医科大学・医学部・講師
 研究者番号：20347602

研究成果の概要 (和文)：喘息の気道炎症は閉塞性障害や気道過敏性と関連する。通常、喘息の気道炎症はステロイド薬で制御されるが、ステロイド薬に抵抗性を示す場合 (難治性喘息) もある。呼気凝縮液分析は非侵襲的な気道炎症マーカーである。本研究では、治療前の呼気凝縮液中 IL-4, RANTES 発現の増加および IP-10 発現の減少がステロイドによる閉塞性障害の改善程度と関連し、ステロイド抵抗性喘息の予測に応用できる可能性が示された。

研究成果の概要 (英文)：Airway inflammation in asthma is associated with airway obstruction and airway hyperresponsiveness. It is generally assumed that steroid therapy reduces airway inflammation. However, not all individuals respond similarly to steroid like as difficult asthma. Exhaled breath condensate (EBC) analysis is a noninvasive method for assessing inflammatory molecules in the airways. This study demonstrated that increased IL-4 and RANTES levels as well as decreased IP-10 levels at baseline were correlated with an improvement in airway obstruction. EBC measurements of IL-4, RANTES and IP-10 might be useful for predicting the steroid-resistant asthma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：内科系臨床医学 膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：気管支喘息 呼気凝縮液 気道炎症 ステロイド 炎症関連物質 難治性喘息

1. 研究開始当初の背景

(1) 難治性喘息の病態解明は社会的にも重要な研究テーマである。吸入ステロイド療法で十分に管理が可能な喘息と難治性喘息との間にどのような気道炎症の差異があるか

については十分検討されていない。さらに喘息の難治化因子とされる高度な気流制限や気道過敏性亢進などの病態において、どのメディエーターが中心的な役割を果たすかについてはいまだ不明な点が多い。

(2) 呼気凝縮液は非侵襲的で難治性喘息においても反復採取が可能な気道炎症バイオマーカーである。我々は健康者と喘息患者の呼気凝縮液中の炎症関連物質発現の差異について検討し、IL-4, IL-17, RANTES, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8, TNF- α , TGF- β の9つの炎症関連物質が喘息気道において発現が亢進しており、RANTES 発現レベルと気流制限の程度、TNF- α および TGF- β 発現レベルと気道過敏性の閾値との間に有意な相関が認められたことを報告した(Matsunaga K et al. J Allergy Clin Immunol 2006; 118: 84-90)。

2. 研究の目的

喘息患者を対象に、ステロイド治療による呼気凝縮液中の炎症関連物質発現の変化をモニタリングし、吸入ステロイド薬で十分に管理が可能な喘息と難治性喘息における炎症関連物質のステロイド反応性の違いについて明らかにし、難治性喘息の予測指標となる炎症物質を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 対象と検体採取法

対象はステロイド薬未使用で軽症および中等症持続型の安定期喘息患者とする。全ての対象者において文書による同意を得た上、吸入ステロイド投与前および投与8週後に呼気凝縮液を採取する。

(2) 呼気凝縮液中の炎症物質測定

呼気凝縮液は採取後ただちに-70°Cで保存し、Human Inflammation Antibody Array III (RayBiotech 社)を用いてサイトカイン発現を検出する。具体的には40種類のサイトカインやケモカインの一次抗体が2ヶ所ずつ標識されたメンブレンを10%血清アルブミンで処理・洗浄後に、メンブレンを1mlの呼気凝縮液にてコーティングし、試料中のサイトカインを一次抗体で捕捉する。さらにビオチン標識された抗サイトカイン二次抗体混合液、HRP 標識ストレプトアビジンにて順次コーティング、洗浄を行う。サイトカイン発現の測定は化学発光システムを用いて行い、各スポットの発光度を計測する。

(3) 炎症物質発現と肺機能

スパイロメーターを用い閉塞性障害の程度について評価する。またメサコリンの吸入負荷に対する気道反応性の閾値をアストグラフ法にて定量評価する。吸入ステロイド治療による呼気凝縮液中メディエーター発現の変化を検討し、吸入ステロイド療法に反応ないし抵抗性を示す、炎症関連物質を同定する。さらに気流制限、気道過敏性、気道炎症の変化についても評価し、呼気凝縮液中メディエーター発現との関連について検討する。

4. 研究成果

(1) ステロイドによる肺機能の改善

ステロイド未治療の喘息患者に対する吸入ステロイドの導入により、閉塞性障害の指標である1秒量と気道過敏性の閾値は有意な改善が認められた。

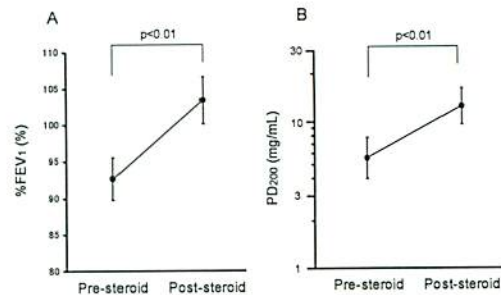


図1. ステロイド薬導入前後における閉塞性障害(A)と気道過敏性(B)の変化

(2) ステロイドによる呼気凝縮液中の炎症物質発現の変化

ステロイドにより喘息患者から得られた呼気凝縮液中のIL-4, RANTES, IL-8, IL-17, MIP-1 α , MIP-1 β 発現は有意に抑制された。一方、TNF- α , TGF- β , IP-10 発現はステロイドに対する反応が不良な分子であった。

(3) ステロイド治療前の呼気凝縮液中炎症物質発現レベルと閉塞性障害・気道過敏性の改善程度との関連

ベースラインの呼気凝縮液中のIL-4およびRANTES発現レベルは、ステロイドによる閉塞性障害の改善程度と正の相関を示した。逆に、ベースラインのIP-10発現レベルは閉塞性障害の改善程度と負の相関を示した。

一方、今回検討した炎症関連物質の中で、ステロイドによる気道過敏性の改善程度と関連した分子は同定されなかった。

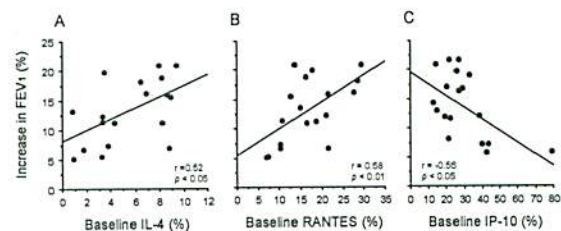


図2. ステロイド治療前のIL-4(A), RANTES(B), IP-10(C)発現レベルとステロイド投与による閉塞性障害の改善との関連

(4) ステロイド治療によるIL-4, RANTES発現の変化と閉塞性障害の改善との関連

ステロイドによる閉塞性障害の改善程度はIL-4とRANTESの発現レベルの変化と有意な相関を認めた。

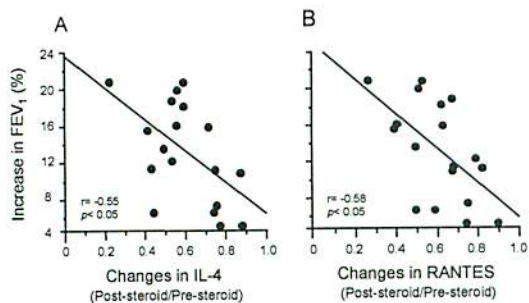


図3. ステロイドによるIL-4(A)、RANTES(B)発現の変化と閉塞性障害の改善程度の間関連

本研究の成果として、(1) 気管支喘息の病態に関与する炎症関連物質の中で、ステロイド治療に反応する分子と抵抗性を示す分子の弁別が呼気凝縮液分析により可能であること、(2) 治療前の呼気凝縮液中のIL-4, RANTES, IP-10 発現レベルは、ステロイドによる閉塞性障害の改善程度を予測する指標として有用であること、(3) 呼気凝縮液中のIL-4, RANTES 発現レベルは、ステロイドによる閉塞性障害の改善程度を反映する指標となり得ること、が明らかにされた。呼気凝縮液検査により、ステロイド反応性・抵抗性が識別できる可能性が示された。呼気凝縮液分析がステロイド反応性の予測やステロイド抵抗性(難治性喘息)の検知に応用可能であることを明らかにした初めての研究であり、成果は *Respiration* 誌に報告した。

(5) その他の研究

呼気凝縮液検査は新しい気道炎症評価法であるため、妥当性検証のため呼気凝縮液分析における唾液混入の影響について検討した。呼気凝縮液および唾液に含まれる炎症物質の発現プロファイルは全く異なっており、蛋白濃度による補正後では、全ての炎症物質発現が唾液と比べ呼気凝縮液中で増加していた。唾液由来成分が呼気凝縮液分析に及ぼす影響は些少であり、成果は *Analytical chemistry insights* 誌に報告した。

アレルギー性鼻炎は気管支喘息と高率に合併し、喘息の難治化因子である。鼻炎合併喘息においてロイコトリエン拮抗薬(LTRA)が有効であることは知られていたが、その作用機序は不明であった。鼻炎合併喘息ではLTRA投与により呼気凝縮液中のRANTES発現が抑制され、RANTES発現の抑制程度と閉塞性障害、ピークフロー変動率の改善との間には関連が認められることを見出した。鼻炎合併喘息に対するLTRAの作用機序の一端を解明した初めての研究であり、成果は *Allergology International* 誌に報告した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Matsunaga K, Yanagisawa S, Ichikawa T, Akamatsu K, Koarai A, Hirano T, Sugiura H, Minakata Y, Ichinose M. Molecular Mechanism of the Additive Effects of Leukotriene Modifier in Asthmatic Patients Receiving Steroid Therapy. *Allergol Int.*2009; 58: 89-96 査読有
2. Matsunaga K, Ichikawa T, Yanagisawa S, Akamatsu K, Koarai A, Hirano T, Sugiura H, Minakata Y, Ichinose M. Clinical Application of Exhaled Breath Condensate Analysis in Asthma: Prediction of FEV₁ Improvement by Steroid Therapy. *Respiration* 2009; 78: 393-398 査読有
3. Matsunaga K, Ichinose M. Issues and cautions of asthma management in elderly patients. *International Review of Asthma*.11: 34-41, 2009 査読有
4. 松永和人、一ノ瀬正和. 気道アレルギー疾患における抗炎症治療のトピックス. *アレルギーの臨床* 29: 30-36, 2009 査読無
5. K. Matsunaga, M. Kanda, A. Hayata, S. Yanagisawa, T. Ichikawa, K. Akamatsu, A. Koarai, T. Hirano, H. Sugiura, Y. Minakata, M. Ichinose. Peak expiratory flow variability adjusted by forced expiratory volume in one second is a good index for airway responsiveness in asthmatics. *Intern Med* 47: 1107-12, 2008 査読有
6. 松永和人、市川朋宏、一ノ瀬正和: 気道炎症を評価する～呼気凝縮液を用いた検討～. *THE LUNG perspectives*. 16: 80-85, 2008 査読無
7. 松永和人、一ノ瀬正和: 呼気NO濃度測定的基础と臨床. *検査と技術*. 36: 1073-1079, 2008 査読無
8. T. Ichikawa, K. Matsunaga, Minakata Y, S. Yanagisawa, K. Ueshima, K. Akamatsu, T. Hirano, M. Nakanishi, H. Sugiura, M. Ichinose. Possible impact of salivary contamination on cytokine analysis in exhaled breath condensate. *Analytical Chemistry Insights* 2007; 2: 85-92. 査読有
9. Ueshima K, Minakata Y, Sugiura H, Yanagisawa S, Ichikawa T, Akamatsu K, Hirano T, Nakanishi M, Matsunaga K, Yamagata T, Ichinose M. The influence of free 3-Nitrotyrosine and saliva on the quantitative analysis of protein-bound 3-Nitrotyrosine

in sputum. Analytical chemistry insights 1: 1-7, 2007 査読有.

10. 松永和人, 柳澤 悟, 市川朋宏, 上嶋千史, 赤松啓一郎, 平野綱彦, 中西正典, 山縣俊之, 南方良章, 一ノ瀬正和. 気管支喘息における呼気凝縮液中の炎症関連物質発現と呼吸生理パラメーターとの関連. 呼吸 26: 2-4, 2007 査読有
11. 松永和人. 気管支喘息管理における呼気凝縮液検査の有用性. 臨床病理. 55: 375-380, 2007 査読有
12. 松永和人, 一ノ瀬正和. 気管支喘息とコリン作動性神経. アレルギー・免疫. 14: 30-34, 2007 査読無

[学会発表] (計 18 件)

1. 松永和人, 神田匡兄, 田中里江, 柳澤悟, 市川朋宏, 赤松啓一郎, 小荒井晃, 平野綱彦, 杉浦久敏, 南方良章, 一ノ瀬正和: 喫煙喘息患者における気道炎症と肺機能. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田, 2009. 10. 31
2. 松永和人. 呼気分析による気道炎症評価. 第 46 回日本臨床生理学会, 盛岡, 2009. 10. 23
3. Matsunaga K, Ichikawa T, Yanagisawa S, Minakata Y, Ichinose M. Clinical Application of Exhaled Breath Condensate Analysis in Bronchial Asthma: A Predictor of Steroid Response. 49th Japan Respiratory Society Annual Meeting, Tokyo, 2009.6.13
4. 松永和人. One airway, one disease. 第 49 回日本呼吸器学会, 東京, 2009. 6. 12
5. 松永和人, 神田匡兄, 田中里江, 柳澤悟, 市川朋宏, 赤松啓一郎, 小荒井晃, 平野綱彦, 杉浦久敏, 南方良章, 一ノ瀬正和. 薬剤抵抗性の副鼻腔炎に対する外科療法が有効であった重症喘息症例. 第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 岐阜, 2009. 6. 5
6. K. Matsunaga, S. Yanagisawa, T. Ichikawa, H. Sugiura, Y. Minakata, M. Ichinose. Exhaled breath condensate analysis: a predictor of steroid response in asthma. 2009 ATS International Conference in San Diego, 2009.5.15
7. 松永和人, 神田匡兄, 田中里江, 柳澤悟, 市川朋宏, 赤松啓一郎, 小荒井晃, 平野綱彦, 杉浦久敏, 南方良章, 一ノ瀬正和: 呼気凝縮液分析による喘息患者のステロイド反応性の予測. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2008. 11. 29
8. 松永和人, 柳澤悟, 市川朋宏, 赤松啓一郎, 小荒井晃, 平野綱彦, 杉浦久敏, 南方良章, 一ノ瀬正和. 呼気 NO を指標にした喘息治療ステップアップによる気道炎症と肺機能の変化. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2008. 11. 28
9. 松永和人, 神田匡兄, 田中里江, 柳澤悟, 市川朋宏, 赤松啓一郎, 小荒井晃, 平野綱彦, 杉浦久敏, 南方良章, 一ノ瀬正和: ステロイド療法中の喘息患者における LTRA 追加療法の有効性とその分子学的機序. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2008. 11. 28
10. 松永和人. 高齢者喘息における気道炎症と吸入ステロイド療法. 第 48 回日本呼吸器学会, 神戸, 2008. 6. 15
11. 松永和人. 喘息死ゼロ作戦の現状、高齢者喘息死の減少に向けて. 第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 東京, 2008. 6. 14
12. 松永和人. 喘息の気道炎症を評価する指標、呼気分析による気道炎症評価. 第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 東京, 2008. 6. 13
13. Matsunaga K, Ichinose M. Airway cytokine expression in exhaled breath condensate. The 6th Asthma Forum Expert Meeting in Osaka, Osaka, 2007.6.24
14. 松永和人, 柳澤悟, 市川朋宏, 赤松啓一郎, 小荒井晃, 平野綱彦, 杉浦久敏, 山縣俊之, 南方良章, 一ノ瀬正和: 呼気凝縮液中の炎症関連物質のステロイド反応性. 第 19 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 横浜, 2007. 6. 10
15. K. Matsunaga, S. Yanagisawa, T. Ichikawa, K. Ueshima, K. Akamatsu, T. Hirano, M. Nakanishi, Y. Minakata, M. Ichinose: Steroid responsiveness of inflammatory molecules in exhaled breath condensate: Correlation with physiological properties in asthmatic patients. American Thoracic Society 2007 International Conference, San Diego, 2007.5.20
16. K. Matsunaga, S. Yanagisawa, T. Ichikawa, K. Ueshima, K. Akamatsu, T. Hirano, M. Nakanishi, Y. Minakata, M. Ichinose: Steroid responsiveness of inflammatory molecules in exhaled breath condensate. The 47th of Annual Meeting of the Japanese Respiratory Society, Tokyo, 2007.5.10
17. 松永和人, 一ノ瀬正和. 呼気凝縮液による気道炎症モニタリング. 第 47 回日本呼吸器学会, 東京, 2007. 5. 10
18. K. Matsunaga, M. Ichinose. Airway cytokine expression in exhaled breath condensate. Emerging Leader Meeting

in Respiratory Medicine, Lund,
Sweden, 2007.4.23

[図書] (計 4 件)

1. 松永和人、一ノ瀬正和: 喘息治療管理のモニタリング法の今後の見通しは? EBM アレルギー疾患の治療 2010-2011. 中外医学社, p69-73, 2009
2. 松永和人, 一ノ瀬正和: 喘息治療の考え方 どの薬物で治療するか? 2. 発作治療薬(リリーバー). 気管支喘息のすべて. 文光堂, p268-273, 2007
3. 松永和人, 一ノ瀬正和: 喘息治療の考え方 発作時(急性増悪時)の治療指針 1. 発作強度と薬物療法の実例 成人の場合. 気管支喘息のすべて. 文光堂, p287-291, 2007
4. 松永和人, 一ノ瀬正和: 高齢者における気管支喘息とCOPDの臨床上的問題点・留意点 4. 管理. 気管支喘息とCOPDの類似点・相違点—中高齢患者における特徴と治療・管理の戦略—. メディカルレビュー社, p98-109, 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永 和人 (Matsunaga Kazuto)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号: 20347602