

## 10% 高張性食塩水 15 分間吸入誘発喀痰法による 喘息安定期の末梢気道炎症評価

<sup>1)</sup>JA 岐阜厚生連東濃厚生病院アレルギー呼吸器科

<sup>2)</sup>昭和大学呼吸器・アレルギー内科

大林 浩幸<sup>1)2)</sup> 足立 満<sup>2)</sup>

【背景・目的】喘息末梢気道炎症治療の重要性が認識される中、その評価法として、10% 高張性食塩水 15 分間吸入誘発喀痰法（10%15 分間誘発法）の有用性を検討した。

【方法】健常者 16 名、無症状の喘息安定期患者 29 名を対象に、5%・10% 高張性食塩水吸入時の喀痰誘発率と喀出時間を調べた。早期相と遅発相喀痰の surfactant protein D (SP-D) 値と eosinophil cationic protein (ECP) 値を測定し、肺機能測定と患者アンケートも行った。

【結果】健常者群、喘息安定期患者群の 10% 食塩水の誘発率は 5% と比べ有意に高く、各々 75.0% ( $p=0.004$ ), 75.9% ( $p=0.007$ ) であった。健常者群・喘息安定期患者群とも、遅発相喀痰の SP-D 値は早期相喀痰と比べ有意に高値であった(各  $p=0.045$ ,  $p=0.007$ )。喘息安定期患者群の遅発相喀痰 SP-D 値は ECP 値と有意に相関した( $r=0.527$ ,  $p=0.017$ )。喘息安定期患者群 18 名(62.1%) の 1 秒率は、10% 食塩水 15 分間吸入終了直後に  $2.9\pm 2.5\%$  低下していたが、その 15 分後に回復した。両群とも 7~8 割以上が 10%15 分間誘発法は負担がなく、塩辛くないと答えた。

【結語】10%15 分間誘発法で得た遅発相喀痰は、喘息安定期患者の末梢気道炎症の評価に役立つ可能性がある。

**Key words:** asthma — distal airway — eosinophil cationic protein (ECP) — sputum induction — surfactant protein D (SP-D)

### 緒 言

末梢気道とは内径 2mm 未満の気管支全体を示し、従来用いられてきた small airway が指し示す 6~7 分枝以降の範囲を含む領域である。気管支喘息における好酸球性炎症は、中枢気道のみならず、末梢気道から肺胞領域に至る広い領域に生じ、末

梢気道により強く存在する事も示唆されている<sup>1)3)</sup>。外科切除で得た喘息患者の肺標本を用いた Hamid らの検討によれば、内径 2mm 未満の気管支に存在する活性好酸球数は、2mm 以上の気管支と比較し有意に多かった<sup>2)</sup>。また、IL-5 の mRNA の発現も内径 2mm 未満の気管支で有意に高く<sup>4)</sup>、これらの報告が、内径 2mm 未満の気管支を末梢

Received: September 14, 2007, Accepted: June 6, 2008

利益相反 (conflict of interest) に関する開示：著者全員は本論文の研究内容について他者との利害関係を有しません。

**Abbreviations:** ECP “eosinophil cationic protein”, SP-D “surfactant protein D”

大林浩幸：JA 岐阜厚生連東濃厚生病院アレルギー呼吸器科〔〒509-6101 岐阜県瑞浪市土岐町 76-1〕

E-mail: ohbayasi@nn.ij4u.or.jp

Table 1 Subjects in this study

	Healthy volunteers	Asthma patients (untreated)	Asthma patients (well controlled)
N	16	13	29
mean age (yr)	38.4 ± 8.3	55.9 ± 20.8	67.8 ± 11.5
Gender (Male/Female)	16/0	3/10	15/14
Smokers/Ex-smokers/Non-Smokers	8/0/8	1/0/12	0/10/19
Type of asthma (Atopic/Non-atopic)	—	9/4	15/14
Duration from onset of Asthma (months)	—	—	64.7 ± 52.0
Duration of using inhaled corticosteroid (months)	—	—	56.6 ± 50.7

気道として、区別して扱う根拠の1つになっている。また、末梢気道領域は、気道累積容積や総断面積で見た場合、全気道の9割以上を占める広範な領域であるにもかかわらず<sup>5)</sup>、症状がでにくいサイレント領域でもある。そのため、気付かないうちに気道炎症が進展し、これが将来のリモデリングに繋がる可能性も否定できず、喘息における重要な治療ターゲットとして再認識されてきている。

日常臨床現場において、ガイドラインに沿った治療を行い、中長期間安定状態となった喘息患者に対し、治療ステップを現状維持すべきか、いつステップダウンするかを判断するための根拠と基準が、現状では明確ではない。喘息安定状態の患者に対し、喘息症状の有無や肺機能値等で判断し、治療ステップダウンした場合、最終的に症状が再燃する場合も経験される。我々は、このような無症状の安定期喘息患者の治療ステップ変更時に、従来の評価方法に限界を感じ、サイレント領域である末梢気道領域の炎症残存の関与も推察する。本邦の臨床現場では、肺機能値 $\dot{V}50$ や $\dot{V}25$ がsmall airwayを反映する指標として従来用いられてきたが、末梢気道炎症状態を直接評価することはできない。また、この肺機能指標は、特に高齢喘息患者ではたとえ最良な軽快状態であっても、若年者群と比較しすでに有意に低下しているため<sup>6)</sup>、末梢気道状態の変化を短期間でダイナミックに捉える指標になり得るか疑問がある。より明確に末梢気道領域の炎症残存状態を把握でき、治

療効果判定にも応用できる方法が望まれ、その条件として、実際に多くの喘息患者の診療にあたる一般病院や診療所にて可能な、簡便で、侵襲性が低く安全で、かつ安価で繰り返し実施できる検査方法の必要性を実感する。

以前より、欧米を中心に、主に喘息患者を対象にした3~5%の高張性食塩水吸入による誘発喀痰法が盛んに行われてきた<sup>7,8)</sup>。しかし、無症状の安定期喘息患者の末梢気道炎症の評価目的で、著者が同じ食塩濃度で同様の誘発方法を行ったところ、喀痰自体が全く誘発されない症例や、誘発喀痰を得た場合であっても、検討可能な十分量が得られない症例を数多く経験した。さらに、喀痰を得るまで時間に大きな個人差があり、喀出された痰は、はたして中枢気道か末梢気道のいずれに近い領域から得たものか判断できない喀痰であった。

今回、我々は安定期喘息患者を対象に、一般病院等の臨床現場においても、容易に実施可能な誘発喀痰法の確立を目指し、現在当院で日常的に施行している、10%高張性食塩水15分間吸入誘発喀痰法(10%15分間誘発法)の有用性を、5%食塩水吸入の場合と比較検討した。

## 方法

### 2.1. 被検者

喘息等の慢性疾患の既往歴がない健常者16名、未治療の喘息初診患者13名および、吸入ステロイド剤を安定使用し、現在無症状の気管支喘息患者29名(以

下、喘息安定期患者群)を対象とした。初診患者と喘息安定期患者の治療前の重症度分類は、軽症～中程度持続型(STEP2-3)(日本アレルギー学会喘息重症度分類(JGL2006))である。患者背景をTable 1に示す。6カ月以上の中長期間吸入ステロイド剤を使用し、試験開始3カ月以上前より無症状で安定しているwell control状態<sup>9)</sup>の患者である。また、患者選別にあたり、下記の除外基準に該当する患者は除外した。1)経口ステロイド薬投与を受けている患者、2)減感作療法または非特異的療法を試験開始前6カ月以内に実施した患者、3)重篤な肝障害、腎障害、心疾患、血液疾患または他の重篤な合併症を有する患者、4)妊娠している患者及び、妊娠の可能性のある患者、5)有効な抗菌剤の存在しない感染症、全身の真菌症の患者、結核性疾患の患者、6)服薬遵守状況が低い患者。

本試験を実施するにあたり、外部有識者を含む院内倫理委員会で本試験の有用性と安全性を十分に審議し、その許可を得た。本研究は、ヘルシンキ協定(1999年エジンバラ改訂)に基づく当院倫理規定を遵守し、人権や個人情報保護を十分配慮して行われた。被検者に対し、事前に1)試験の目的、臨床的意義および方法、2)予期される副作用、3)被験者が試験参加に同意しない場合であっても不利益を受けないこと、4)試験途中でも参加同意を随時撤回できること、5)被験者の人権保護・個人情報保護を遵守することなどを十分に説明し、患者自らがサインした同意書を得た場合のみ施行した。被検者に、検査施行前1週間以内に感冒症状が無いことを確認した。また、今回の検討は、スギ花粉によるアレルギー性鼻炎の増加時期および、感冒やインフルエンザ流行期を避けて行われた。

## 2.2. 誘発喀痰法

各被検者は、誘発開始直前にうがいし、口腔内に残存する食物残渣や粘液を除去した。その後、医師・トレーニングされた看護師の立会いのもと、5%あるいは10%高張性食塩水のネブライザー吸入を15分間行った。15分間の吸入時間とその後15分間の観察時間を合わせた30分間に誘発され喀痰は、深い咳嗽と共に喀出され、全て別々の滅菌シャーレに順に採取された。なお、同一被検者に対し、同一日に5%と10%高張性食塩水吸入試験は行わず、原則として1日以上の日数を空けて行った。一方、本試験に先立つ予備検

討段階にて、3%食塩水吸入を実施したが、喀痰が誘発される者が非常に少なく、採取された場合でもその喀痰量はごく少量であったため、今回の検討から除外した。

喀出された誘発喀痰は、ピンセットで粘性の強い喀痰部分と唾液成分とに分離した。直ちに塗抹標本作製し、好酸球が確認し易いライトギムザ染色を施した。プレパラート上で5視野以上(顕微鏡倍率400倍)を無作為に選び、総細胞数が500個以上になるまでカウントし、その内好酸球が何個あるかで、その比率の算出が可能である。しかし今回は、一般臨床現場で、ごく短時間で多くの患者に対し、簡便に好酸球の有無を判定する方法として、細胞の集まっている適切な5視野(顕微鏡倍率400倍)を無作為に選び、5視野中の好酸球数を数え、その平均値を出す方法を採用した。平均好酸球数値が、1個未満を「喀痰中に好酸球認めず」の(-)判定とし、1個以上10個未満を「喀痰中に好酸球あり」の(+)判定、10個以上20個未満を(2+)判定、21個以上を(3+)との判定基準にて評価した。

採取された喀痰は重量を測定し、終濃度で5倍希釈となるように4倍量の生理食塩水を加えた。Physcotorn Handy Micro Homogenizer((株)マイクロテック・ニチオン、千葉、日本)を用い、冷却操作を行いながら、15~30秒間のホモジナイズを行い、その後4℃、2000×Gにて10分間の遠心分離操作を行った。その上清を得て、ECP及びSPD測定まで-20℃以下で凍結保存した。喀痰の前処理および保存には、吸着防止のためポリプロピレンチューブを用いた。

## 2.3. 検討項目

### 喀痰誘発率と喀出時間

Table 1に示した健常者群、喘息未治療群、喘息安定期患者群の各々に対し、5%あるいは10%高張性食塩水吸入施行時の、喀痰誘発率を算出した。15分間の吸入時間とその後15分間の観察時間の合計30分の間に、誘発喀痰が1個以上得られた場合、誘発されたと認め、各群での喀痰誘発率を算出した。また、各誘発痰の喀出時間を全て記録した。

Table 2 Rate of sputum induction and time to obtain induced sputum

(A) Rate of sputum induction				
	N	Rate of sputum induction (%)		p value
		5% hypertonic saline	10% hypertonic saline	
Healthy volunteers	16	18.8	75.0	0.004
Asthma patients (untreated)	13	92.3	—	—
Asthma patients (well controlled)	29	37.9	75.9	0.007

(B) Mean induction time to obtain induced sputum (min)		
	Mean induction time (min)	
	First induced sputum	Last induced sputum
5% hypertonic saline		
Healthy volunteers	21.3 ± 5.06	None
Asthma patients (untreated)	8.7 ± 5.3	16.4 ± 10.8
Asthma patients (well controlled)	12.7 ± 3.7	18.7 ± 1.3
10% hypertonic saline		
Healthy volunteers	16.3 ± 3.1	23.7 ± 2.6
Asthma patients (well controlled)	6.6 ± 4.2	17.2 ± 2.5

### 誘発喀痰中 Surfactant protein D (SP-D) 値, Eosinophil Cationic Protein (ECP) 値, およびアルブミン値の測定

今回, 15 分間の吸入時間の最初に喀出された喀痰を早期相喀痰, その後 15 分間の観察時間を含め最後に喀出された喀痰を遅発相喀痰とし, それぞれの喀痰 surfactant protein D (SP-D) 値 と eosinophil cationic protein (ECP) 値を測定した. さらに, 高張性食塩水刺激により, 末梢領域で血管透過性亢進が生じ, その影響が誘発喀痰に及んでいないか検討するため, 喘息安定期患者群では, 喀痰中および血清アルブミン値を測定した. 喀痰 SP-D 測定は 2 種類のモノクローナル抗ヒト SP-D 抗体 (7C6, 6B2) を用いたサンドイッチ ELISA 測定キット「ヤマサ」(ヤマサ醤油(株), 千葉, 日本)を用いて行い<sup>10)</sup>, 喀痰 ECP 値測定は ECP FEIA キット(Pharmacia & Upjohn Diagnostics AS, Uppsala, Sweden)を用い, 喀痰中アルブミン値は, 測定試薬スペリオルマイクロアルブミン((株) 苫小牧臨床検査センター)を用いた TIA 法で測定した.

### 肺機能測定

喘息安定期患者群全員に対し, 吸入試験開始前および, 15 分間の吸入時間終了直後, 15 分間の観察期間終了時(吸入試験開始 30 分間後)に各々肺機能検査を行い, 10%15 分間誘発法による肺機能各測定値への影響を検討した.

### 患者アンケート内容

今回の被検者全員に対し, 10%15 分間誘発法に対する, 下記 4 項目の質問内容の無記名式アンケートを行った.

問 1) 10% 食塩水の吸入検査の塩からさは, どの程度感じますか?

問 2) 10% 食塩水を 15 分間吸入する誘発検査は, つらいですか?

問 3) この食塩水吸入検査を行った際に, 何か副作用ありましたか?

問 4) この食塩水吸入検査を, 必要な際には今度も行って良いですか?

**Table 3** Changes in major indexes of pulmonary functions before, and soon after and 15 minutes after 10% hypertonic saline inhalation in patients with well controlled asthma (N = 29).

	Before	Soon after finishing inhalation	<i>p</i> value	15 minutes after finishing inhalation	<i>p</i> value
%VC	108.1 ± 14.0	103.6 ± 16.3	0.002	105.8 ± 11.4	NS
FEV1.0%	76.1 ± 9.9	75.2 ± 10.6	NS	77.1 ± 7.6	NS
pred %FEV1.0	96.7 ± 13.8	92.8 ± 15.9	0.002	93.9 ± 15.1	NS
V50 (FEF50)	2.59 ± 1.57	2.47 ± 1.60	0.007	2.74 ± 1.11	NS
V25 (FEF75)	0.98 ± 0.66	0.95 ± 0.64	NS	0.97 ± 0.45	NS
V25/H	0.60 ± 0.38	0.58 ± 0.37	NS	0.60 ± 0.26	NS

Abbreviations FEF: Forced Expiratory Flow, N.S: no statistical significance.

## 2.4. 統計解析

統計値は、平均値 ± 標準偏差で表し、5% を有意水準とした。Table 2 (A) の誘発率の比較は Fisher の正確検定を行った。Table 3 の肺機能各測定値の吸入開始前値との比較、Fig. 2 の早期相と遅発相喀痰 SP-D 値の比較、および Fig. 4 の早期相と遅発相喀痰アルブミン値の比較は、各々 paired Student *t* 検定を用いた。なお、Fig. 2 の喀痰 SP-D 値のみは平均値 ± 標準誤差で表記した。Fig. 3 の早期相と遅発相における、喀痰 SP-D 値と喀痰 ECP 値の各相関は、Pearson 相関係数を用いた。これらの統計解析には、統計解析ソフト SPSS 14.0J (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を使用した。

## 結果

### 3.1. 喀痰誘発率と喀出時間

Table 1 に示した健常者、喘息未治療、喘息安定期患者の各群の患者に対し、5% と 10% 高張性食塩水吸入を各々施行し、喀痰誘発率を算出した。Table 2 (A) に示すように、健常者群では 5% 高張性食塩水吸入での誘発率は 2 割未満であったが、10% 高張性食塩水吸入では 75.0% が誘発され、誘発率は有意に高かった ( $p=0.004$ )。喘息安定期患者群においても、5% 高張性食塩水吸入で 4 割未満であったが、10% 高張性食塩水吸入にて 75.9% が誘発され、喀痰誘発率は有意に高かった ( $p=0.007$ )。さらに、各群において、最初と最後に喀出された誘発喀痰が出た時間を計測した結果を Table 2 (B) に示す。なお、未治療の喘息患者群では、5% 高張性食塩水吸入で 9 割以上が誘発さ

れたため、10% 高張性食塩水吸入試験を行わなかった。

喘息安定期の各患者が、5% と 10% 高張性食塩水吸入で、実際にどのような時間で喀痰を喀出したかを、各々プロットし、Fig. 1 に示す。5% 高張性食塩水吸入法では得られる喀痰数自体が少なく、同じ試験時間内に誘発喀痰を 2 個以上得た者は 29 名中 7 名であった。また、症例 N の最初に喀出された誘発時間と、他の被検者の最後に喀出された誘発時間が重なっている。一方、10% 高張性食塩水吸入法では、Fig. 1 に示すように、吸入時間 15 分以内に最初の 1 個目の喀痰が得られ、最後の喀痰 (●で示す) が 15 分間の吸入時間終了前後以降に得られている症例が多いことが分かる。今回、Fig. 1 の結果により、吸入時間 15 分以内で最初に得た誘発喀痰を早期相誘発喀痰、30 分間の検討時間内の最後に得られた喀痰を遅発相誘発喀痰とした。

### 3.2. 誘発喀痰中好酸球数、SP-D 値、ECP 値、およびアルブミン値測定結果

10%15 分間誘発法で得た、早期相と遅発相誘発喀痰の各々 22.7%、45.5% に好酸球判定 (+) 以上の好酸球を認めた。また、早期相と遅発相誘発喀痰の各 SP-D 測定値を Fig. 2 に示す。遅発相誘発喀痰 SP-D 値は早期相誘発喀痰と比較し、健常者群・喘息安定期患者群とも有意に高かった (各々  $p=0.045$ ,  $p=0.007$ )。また、喘息安定期患者群において、遅発相誘発喀痰 SP-D 値と ECP 値には、有意な相関関係 ( $r=0.527$ ,  $p=0.017$ ) を認めたが、

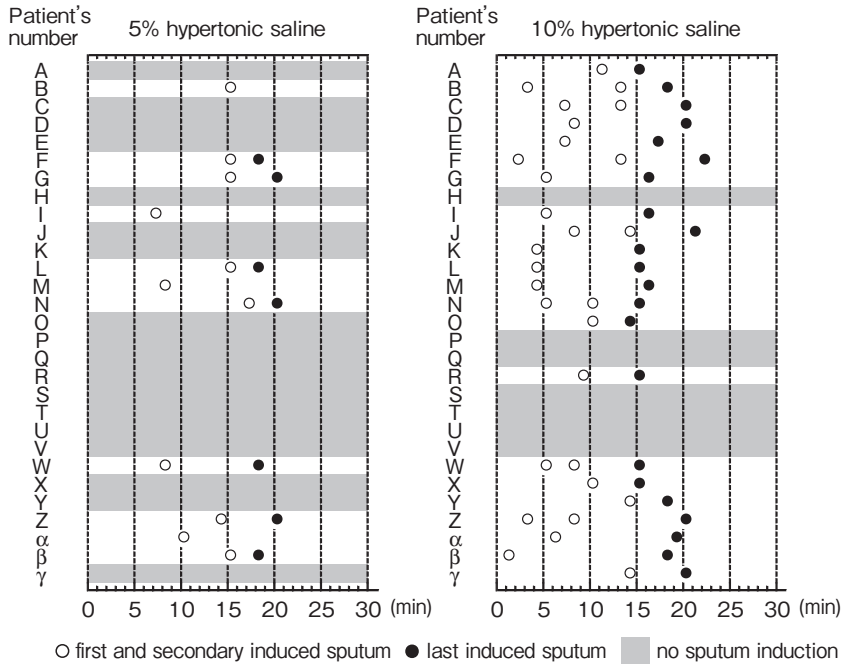


Fig. 1. Comparison of sputum induction between 5% and 10% hypertonic saline inhalation in patients with treated asthma.

早期相誘発喀痰の SP-D 値と ECP 値では認められなかった (Fig. 3)。さらに、喘息安定期患者群における、早期相と遅発相誘発喀痰中アルブニン値を血清アルブニン値と比較したものを Fig. 4 に示す。両者の測定値には、3 桁以上の測定値のレベル差を認めた。

### 3.3. 10%15 分間誘発法実施前後の肺機能測定値の変化

喘息安定期患者群における、試験開始前、15 分間の吸入時間終了直後、15 分間の観察期間終了時 (吸入開始 30 分間後) の主な肺機能測定値の平均値を Table 3 に示す。15 分間の吸入時間終了直後に測定した pred%FEV1.0 と  $\dot{V}50$  値が有意な低下を認めたが (各々  $p=0.002$ ,  $p=0.007$ )、それ以外の肺機能測定値では、試験前後を通じて有意な変化を認めなかった。また、15 分間の吸入時間終了直後に、1 秒率 (FEV1.0%) が低下していた患者は 18 名 (62.1%) であり、その平均低下率は  $2.9 \pm 2.5\%$  (最大 8.3%) であったが、吸入開始 30 分間後にほぼ回復した。

### 3.4. 患者アンケート結果

Table 4 に示したように、健常者群と喘息安定期患者群とも、6~7 割以上が 10% 高張性食塩水吸入に塩辛さは感じないと答え、残りの者は少し塩辛いと答えた。今回、塩辛いと答えた者は 1 人も居なかった。また、10%15 分間誘発法の施行に、特に負担は無く何でもないと答えた者は両群とも 7~8 割以上あった。逆に、つらいと答えた 7 人中 6 人は、15 分間の吸入時間の長さを理由に挙げた。10%15 分間誘発法の施行後に異常を訴えた者は今回の検討群では 1 人もいなく、両群とも 8 割近くが再度本法を実施しても良いと答えた。また、予備段階で健常者群内の本人同意を得た 6 名に対し、別に 15% 高張性食塩水吸入による検討を行ったが、全員が吸入終了後 30 分経過しても、咽喉頭部分に塩辛さや違和感が残り、10% 高張性食塩水吸入の塩辛さや刺激性とは明らかに異なっていた (実 data 示さず)。



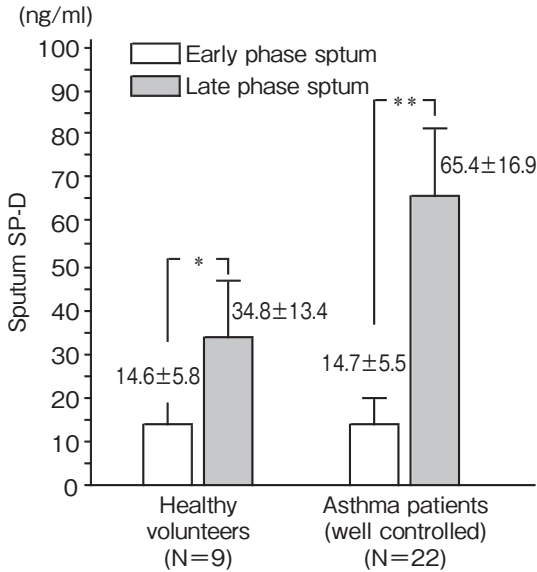


Fig. 2. 10% hypertonic saline-induced sputum SP-D values.

## 考 察

今回、我々は、安定期喘息患者の末梢気道に残存する炎症を評価するため、より末梢気道に近い領域から喀痰を得る方法として、10%15分間誘発法の有用性を検討した。前述のように、今回10%15分間誘発法を行った経緯の1つに、5%高張性食塩水吸入の際の誘発率の悪さがあった。1992年Pinらは、17名の喘息患者に対し、3%から順次4%、5%と濃度を上昇させる誘発喀痰法を最初に行い、13名(76%)の患者から誘発痰を得ている<sup>11)</sup>。他の欧米の報告と比較しても、我々の5%高張性食塩水吸入時の誘発率は実際に低いが、その明確な理由は今回得られていない。その一因として、以前の欧米を中心とする報告では対象喘息患者は平均30~40歳代が中心であるのに対し、本検討の安定期喘息患者は65歳以上の高齢者が中心という年齢層の違いもあり得る。喘息死の8割以上が高齢者であることから、この年齢層の患者に対し、積極的治療アプローチは重要である。しかし、本法の最も目的とするところは、単に誘発率を上げ評価できる複数の誘発喀痰を得ることの

みでなく、本法で得た遅発相喀痰はより肺胞領域に近い末梢気道から採取されたものであり、末梢気道炎症の評価に役立つ有用な喀痰が得られることである。

本論文では、一般病院や診療所外来で短時間に判定できるように、好酸球数の評価法を5視野中の平均好酸球数を出す判定基準で定性的に評価した。好酸球数の定量的方法として、少し時間を要するが、顕微鏡倍率400倍下で総細胞数が500個以上になるまでカウントし、その内何個好酸球があるかを数え比率を算出することも可能である。この場合、好酸球比率何%以上をカットオフ値として、積極的な治療対象にするかは今後の課題である。我々はさらに、10%15分間誘発法によって得た誘発喀痰が、高張性食塩水刺激による血管透過性亢進を介する血漿浸透によるものでないことを示す目的で、誘発喀痰中および血清中アルブミン値を測定し比較した。Fig. 4に示したように、血清中アルブミン値は誘発喀痰中アルブミン値の数百倍の値を示し、15分間の誘発時間内に、血管透過性の著しい亢進が生じ、これが誘発喀痰に影響を及ぼしているのではないことが示された。また、10%という高い浸透圧を有する食塩水吸入で誘発した際に、採取された好酸球などの細胞成分に対する浸透圧の影響も予想される。しかし、ネブライザーによりミスト状となった10%高張性食塩水の吸入は誘発刺激となるのみであり、喀痰を10%高張性食塩水に浸すわけではない。実際に、プレパレートで観察できる好酸球などの細胞成分は喀痰粘液内に包まれて喀出されるため、浸透圧でつぶされていることはなく、気道内とほぼ近い状態で喀出される。

今回、肺胞サーファクタントの中で、誘発喀痰中のSP-D値を測定した理由は、下記の2つが挙げられる。第1に、SP-DはII型肺胞上皮細胞や末梢気道上皮細胞内の粗面小胞体で産生される親水性の糖蛋白質であり、恒常的に肺胞被覆液内に分泌されているため、その喀痰中の測定値が高いほど、より末梢の肺胞領域に近い部分から喀出された喀痰である<sup>12)</sup>。さらに、このSP-Dは喫煙の影響で減少するが、他のサーファクタントであるSP-

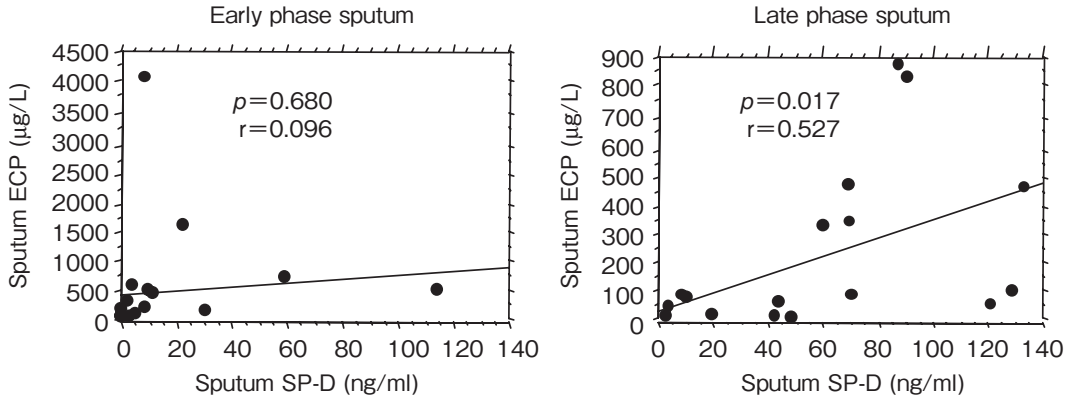


Fig. 3. Correlation between sputum SP-D and ECP in the well controlled asthma group.

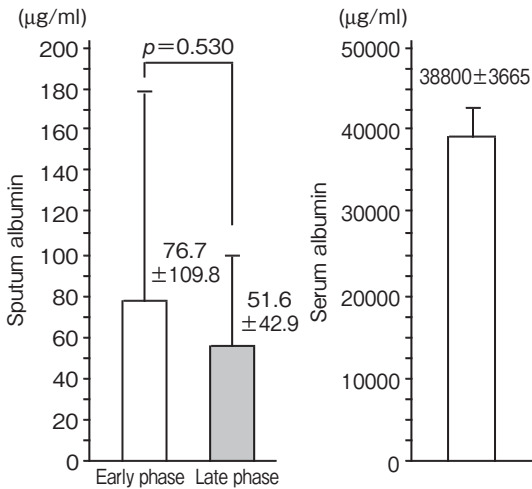


Fig. 4. Comparison between sputum and serum albumin levels in the well controlled asthma group.

A と異なり、加齢や COPD 合併進行による影響は受けにくいいため、COPD が合併しやすい高齢者喘息であっても良い指標となり得る<sup>13)14)</sup>。第 2 の理由として、SP-D は早期のアレルギー反応において、肺内で抗炎症作用を示し、生体内で喘息の好酸球性炎症を抑制する働きをする点が挙げられる。卵白アルブミン誘発喘息動物モデルにおいて、クララ細胞や過形成杯細胞において、抗原誘発により SP-D の盛んな産生がみられる<sup>15)</sup>。SP-D は、特異的 IgE が好塩基球へ結合するのを阻止し<sup>16)</sup>、

好塩基球からのヒスタミン遊離を抑制する作用を有する<sup>16)</sup>。ABPA 動物モデルにおいて、SP-D や SP-A を外部から投与すると、アスペルギルス抗原曝露による気道過敏性亢進などのアレルギー反応の抑制が認められるが、SP-D は SP-A と比較し、より長期に抑制効果の持続が認められた<sup>17)</sup>。一方で、ステロイド剤は SP-D 産生に影響を与えないため<sup>15)</sup>、吸入ステロイド剤が十分に到達せず、末梢気道に好酸球性炎症が残存する場合、アレルギー性炎症を制御しようと SP-D が増加し、SP-D と ECP が同時に高い状況が起こり得る。今回、遅発相の SP-D 値と ECP 値は有意な相関を認め (Fig. 3)、遅発相 SP-D 値が高い群では同時に ECP 値が高い結果は、吸入ステロイド剤が十分に末梢気道に到達せず、好酸球性炎症を抑制できていないことを意味する。一方、より太い中枢気道では吸入ステロイド剤がほぼ十分に送達され、好酸球性炎症が抑制されているため喀痰 ECP 値は高くなく、また SP-D は主に末梢気道～肺動脈領域で産生されるため、SP-D 値と相関しない事は当然の結果である (Fig. 3)。

今回の検討により、10%15 分間誘発法によって採取された遅発相喀痰は、末梢領域近傍から採取されたものであり、末梢気道領域に残存する好酸球性炎症状態をより色濃く反映する喀痰であることが示された。しかし、本法をより有効にかつ安全に行うために、いくつかの重要な留意点がある。



Table 4 Results of patient questionnaire

	Answer	Healthy volunteers (n = 16)	Asthmatic patients (well controlled) (n = 29)
Q1	Salty	0	1 ( 3.5%)
	Slightly salty	6 ( 37.5%)	7 ( 24.1%)
	No taste	10 ( 62.5%)	21 ( 72.4%)
Q2	Feeling better	1 ( 6.3%)	0
	Nothing	12 ( 75.0%)	25 ( 86.2%)
	Severe feeling †	3 ( 18.7%)	4 ( 13.8%)
	Very severe feeling	0	0
Q3	Yes	0	0
	Nothing	16 (100.0%)	29 (100.0%)
Q4	Yes	12 ( 75.0%)	23 ( 79.3%)
	Any	4 ( 25.0%)	6 ( 20.6%)
	No	0	0

Q1. Did it taste salty when you inhaled the 10% hypertonic saline?

Q2. Was the feeling severe when you performed the 10% hypertonic saline inhalation-induced sputum method?

Q3. Did you feel anything abnormal after finishing the inhaled method?

Q4. Will you allow us to perform the inhaled method again?

†: The most reasons were the length of the inhalation time.

まず、第一に、本法で得られる喀痰は、喀出時に必ず一度は中枢気道を通り喀出されるため、中枢気道状態の影響を皆無することは避け難いことである。第2に、採取時に出来るだけ鼻汁の混在を避けるため、花粉症やインフルエンザ流行期、感冒罹患時など、上気道の炎症が著しい時の実施を避けるべきである。そして、最も留意すべき点は、喘息発作の誘発である。今回の我々の検討は、健常者を含め60名に満たない小規模な検討であるが、我々はすでに2004年より、本法を用いた検討を日常臨床に取り入れ、これまで約1000件近く実施しており、現在まで明らかな喘息発作の誘発は1例も経験していない。また、Table 4の患者アンケート結果に示したように、本法は患者の認容性が高く、日常診療内で繰り返し施行可能なものである。しかし、我々の経験がそのまま安全性を保障するものではないことは言うまでもない。重症喘息患者に蒸留水吸入を行い、死亡した例は良く知られているが<sup>18)</sup>、欧州呼吸器学会(ERS)ワーキンググループの、これまで行われた

3~5% 高張性食塩水吸入による喀痰誘発法の様々な報告をまとめた検討によれば、これまで入院や死亡例の報告は1例も無い<sup>8)</sup>。また、同報告では誘発直前に短時間型β刺激剤吸入を行う場合と行っていない場合の両方の研究報告がまとめられているが、短時間型β刺激剤前投与で予め気管支拡張を行った場合、高張性食塩水吸入後に平均5~6%の1秒率の低下が認められている。さらに、様々な報告を平均すると、約11.1% (5.8~32%)の患者に20%以上の1秒率の低下を認め、多くの場合は開始数分以内に低下が起きている<sup>8)</sup>。そのため、同ワーキンググループは、軽~中等度喘息患者の誘発の際、誘発開始1分後、4分後その後5分毎に、1秒率を頻回測定し、20%以上低下した際に中止することを推奨している。Table 3に示したように、吸入終了15分後にはほぼ回復しているが、10%15分間誘発法の施行直後のpredFEV1.0とV50は有意に低下し、1秒量が低下した患者では平均2~3%の低下を認めた。今回吸入は15分間連続して行ったが、今後さらなる安

全性の向上のため、吸入開始後5分毎に1秒率測定を行う必要性を感じている。また、10%15分間誘発法を行う際には、医師や十分にトレーニングされた看護師の立会いのもと、常に患者状態の観察を行い、かつ救急対応できる医療環境下で施行すべき事は言うまでもない。さらに、今回、末梢気道領域近傍から喀痰を得る際に、直前の短時間型 $\beta$ 刺激剤吸入はその影響の可能性を排除する目的で行わなかったが、安全性を考慮し、誘発直前にサルブタノール等の短時間型 $\beta$ 刺激剤吸入が推奨される。

喘息リモデリング進行を防ぎ、将来の喘息死の減少を主目的とし、治療のGolden Standardとして、吸入ステロイド剤の早期導入が提唱される中<sup>19)</sup>、その吸入ステロイド剤の使用期間中、ステロイドが末梢気道炎症を有効に制御できているかをモニターすることは非常に重要である。実際に日常診療において、多くの喘息患者治療にあたる一般病院や診療所の現場臨床医にとって、現在使用する吸入ステロイド剤が喘息患者の末梢気道領域に十分量到達し、末梢気道炎症を有効にコントロールできているかは、非常に興味がある。その際に、診療現場で、高価な特殊機器や試薬を必要せず、安全、簡便、かつ安価で繰り返し施行できる方法が理想的である。その方法の1つとして、この10%15分間誘発法の持つ臨床的意義は大きいと考える。我々は以前に、ドライパウダー型吸入ステロイド剤を中長期間使用する安定期喘息患者の3~4割の末梢気道に好酸球性炎症が残存していることを示し、この残存する炎症が末梢気道送達性に優れたHFA-BDP剤<sup>20)</sup>や血行を介したロイコトリエン受容体拮抗剤の抗炎症作用により<sup>21)</sup>、より有効に制御できる可能性を報告した。これらの報告は、いずれも一般病院レベルで可能な実例である。

さいごに、日常診療において無症状の安定期喘息患者に対し、治療ステップを変更する際に、従来の評価法に加え、この10%15分間誘発法を用いることで、サイレント領域である末梢気道領域に残存する炎症を評価でき、より積極的に治療アプローチできる可能性が広がると考える。

## 文 献

- 1) Kraft M, Djukanovic R, Wilson S, Holgate ST, Martin RJ. Alveolar tissue inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1505-10.
- 2) Hamid Q, Song Y, Kotsimbos TC, Minshall E, Bai TR, Hegele RG, et al. Inflammation of small airways in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 44-51.
- 3) Sutherland ER, Martin RJ. Distal lung inflammation in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 89: 119-24.
- 4) Minshall EM, Hogg JC, Hamid QA. Cytokine mRNA expression in asthma is not restricted to the large airways. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 386-90.
- 5) 永井厚志. 末梢気道の形態的特性. アレルギーの臨床 2005 ; 9 : 681-5.
- 6) 富岡眞一, 本間誠一, 根本俊和, 中沢次夫, 笛木隆三, 小林節雄. 最良の軽快状態における老年者気管支喘息患者の換気機能の検討. 日胸疾会誌 1981 ; 19 : 92-100.
- 7) Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, Ind PW, Djukanović R, Maestrelli P, et al. Sputum induction. *Eur Respir J* 2002; 37: 3s-8s.
- 8) Pizzichini E, Pizzichini MM, Leigh R, Djukanović R, Sterk PJ. Safety of sputum induction. *Eur Respir J* 2002; 37: 9s-18s.
- 9) Bateman ED, Boushey HA, Bousquet J, Busse WW, Clark TJ, Pauwels RA, et al. Can guideline-defined asthma control be achieved? The Gaining Optimal Asthma Control study. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 836-44.
- 10) Inoue T, Matsuura E, Nagata A, Ogasawara Y, Hattori A, Kuroki Y, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for human pulmonary surfactant protein D. *J Immunol Method* 1994; 173: 157-64.
- 11) Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992; 47: 25-9.
- 12) Persson A, Chang D, Crouch E. Surfactant protein D is a divalent cation-dependent

- carbohydrate-binding protein. *Biol Chem* 1990; 265: 5755-60.
- 13) Honda Y, Takahashi H, Kuroki Y, Akino T, Abe S. Decreased contents of surfactant proteins A and D in BAL fluids of healthy smokers. *Chest* 1996; 109: 1006-9.
  - 14) Betsuyaku T, Kuroki Y, Nagai K, Nasuhara Y, Nishimura M. Effects of ageing and smoking on SP-A and SP-D levels in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur Respir J* 2004; 24: 964-70.
  - 15) Kasper M, Sims G, Koslowski R, Kuss H, Thuemmler M, Fehrenbach H, et al. Increased surfactant protein D in rat airway goblet and Clara cells during ovalbumin-induced allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1251-8.
  - 16) Madan T, Kishore U, Shah A, Eggleton P, Strong P, Wang JY, et al. Lung surfactant proteins A and D can inhibit specific IgE binding to the allergens of *Aspergillus fumigatus* and block allergen-induced histamine release from human basophils. *Clin Exp Immunol* 1997; 110: 241-9.
  - 17) Madan T, Kishore U, Singh M, Strong P, Clark H, Hussain EM, et al. Surfactant proteins A and D protect mice against pulmonary hypersensitivity induced by *Aspergillus fumigatus* antigens and allergens. *J Clin Invest* 2001; 107: 467-75.
  - 18) Saetta M, Di Stefano A, Turato G, De Caro R, Bordignon D, Holgate ST, et al. Fatal asthma attack during an inhalation challenge with ultrasonically nebulized distilled water. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 1285-7.
  - 19) 大田 健. 喘息と early intervention. *アレルギー科* 2003; 16: 60-6.
  - 20) 大林浩幸. ドライパウダー型吸入ステロイド剤を中長期使用する喘息患者の, 誘発喀痰による末梢気道炎症の評価と HFA-BDP 吸入剤 (キュバール<sup>TM</sup>) の効果. *アレルギー* 2005; 54: 24-35.
  - 21) 大林浩幸. 吸入ステロイド使用高齢喘息患者における, プランルカスト (オノン<sup>®</sup>) 投与による末梢気道好酸球性炎症改善効果. *新薬と臨床* 2005; 54: 72-9.

THE EVALUATION OF THE DISTAL AIRWAY INFLAMMATION OF WELL CONTROLLED  
ASTHMATIC PATIENTS USING SPUTUM INDUCTION BY INHALATION OF 10%  
HYPERTONIC SALINE FOR 15 MINUTES

Hiroyuki Ohbayashi<sup>1)2)</sup> and Mitsuru Adachi<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>*Department of Allergy and Respiratory Medicine, Tohno-Kousei Hospital*

<sup>2)</sup>*Department of Respiratory and Allergy Medicine, Showa University*

**Background:** As the clinical importance of treatment to asthmatic distal airway has been recognized, this study aimed to evaluate the efficacy of the 10% hypertonic saline-induced 15 minutes long-inhaled method to assess the inflammatory situation in the distal airways.

**Methods:** The subjects were 16 healthy volunteers and 29 patients with well controlled asthma. They inhaled 5% or 10% hypertonic saline for 15 minutes and the sputum induction rates and induced times were measured. We also investigated the values of surfactant protein D (SP-D) and eosinophil cationic protein (ECP) both in early- and late-phase induced sputum, together with pulmonary function indexes, and the patients' impressions of the method.

**Results:** The sputum induction rates with 10% hypertonic saline inhalation in both healthy volunteer group and well controlled asthmatic patients group were significantly high compared with those with 5% hypertonic saline inhalation; 75.0% ( $p = 0.004$ ) and 75.9% ( $p = 0.007$ ), respectively. The SP-D levels in late-phase sputum in both healthy volunteer group and well controlled asthmatic patients group significantly elevated compared with those in the early-phase:  $p = 0.045$  and  $p = 0.007$ , respectively. The SP-D levels in late-phase sputum significantly correlated to those of ECP in the well controlled asthmatic patients group ( $r = 0.527$ ,  $p = 0.017$ ). The pulmonary function index FEV1.0% of 18 well controlled asthmatic patients (62.1%) attenuated  $2.9 \pm 2.5\%$  soon after finishing the 10% hypertonic saline inhalation, and recovered after an additional 15 minutes rest. 70~80% of the subjects in both groups answered that they felt no strain in using the inhaled method.

**Conclusion:** The late-phase sputum obtained by the 10% hypertonic saline-induced 15 minutes long-inhaled method may be useful in evaluating the inflammatory situation in the distal airways.