



Clinical Significance of the Increased Peak Levels of Exhaled Nitric Oxide in Patients with Bronchial Asthma

里内, 美弥子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-03-06

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2211

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002211>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍） さと うち みやこ 里 内 美弥子 （兵庫県）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学位記番号 博ろ第1626号

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の日付 平成10年3月6日

学位論文題目 Clinical Significance of the Increased Peak Levels of Exhaled Nitric Oxide in Patients with Bronchial Asthma
（気管支喘息患者における呼気中一酸化窒素（NO）濃度の臨床的意義）

審査委員 主査 教授 梶 山 光 宏
教授 尾 原 秀 史 教授 石 井 昇

論文内容の要旨

【緒 言】

一酸化窒素（NO）は、血管トーンスの制御や、神経伝達、免疫・炎症への関与など、肺を含めた生体内で多彩な機能を示すメディエーターとして知られている。1991年、実験動物やヒトで呼気中NOが測定可能であることが報告され、以後種々の疾患で検討され、気管支喘息、上気道感染症、気管支拡張症等の炎症性肺疾患患者において、呼気NO濃度が増加することが示されてきた。

気管支喘息は気道の炎症性疾患であり、好酸球等の炎症細胞浸潤と、種々のサイトカインの産生を認める。これらのサイトカインは、NO合成酵素（NOSynthase, NOS）のなかで、inducible NOS（iNOS）を活性化し、多量のNOを産生する。肺において、iNOSはマクロファージや気道上皮で認められており、また気管支喘息患者の気道上皮で、正常人では殆ど認めないiNOSが発現していることが、免疫組織学的に証明されている。喘息患者での増加した呼気中NOは下気道における炎症性変化に伴ってサイトカインによって誘導されたNOを反映していると考えられる。

本研究ではまず気管支喘息患者で繰り返し測定可能で信頼性のある呼気中NO濃度測定法を確立し、さらに気管支喘息患者の呼気中の増加したNOが、気道のアレルギー性炎症を反映しているか否かを評価することを目的とした。

【方 法】

1. 対 象

正常対照（男性8名、女性2名、平均年齢30.0才）は、喫煙歴のない健常人10名とした（Control群）。症状の安定した気管支喘息患者（Stable BA群）（男性10名、女性3名、平均年齢44.5才）と症状の不安定な気管支喘息患者（Unstable BA群）（男性5名、女性7名、平均年齢47.7才）は全てアトピー性で喫煙歴のない患者であった。症状安定とは、最近1カ月間で全く症状のないものと定義した。気管支喘息患者の21例は吸入ステロイドを、17例は β_2 刺激薬を、また12例は経口テオフィリンの投与を受けていた。

2. 方 法

呼気NO濃度は0.21/minの定常流でsamplingしchemiluminescenceanalyzerを用いて測定した。呼気NOは安静呼吸時（multiple-breath-method）と、吸気位からの一回呼出時（single-breath-method）に測定された。

まず、対象者は20cmH₂Oの気道抵抗下にone-way-valveを通して安静呼吸を5分間行った。呼気は6mm径のTeflon tubeで接続したanalyzerに運ばれ、呼気中NO濃度が持続的に測定された。その後、対象者は吸気位で0, 15, 30, 40秒の息こらえをした後ゆっくりと30, 40, 50, 60秒かけて呼出を行い同様に呼気中NO濃度を測定した。又、測定日のピークフロー（PEFR）値を喘息日誌より調査し記録した。

呼気NO濃度測定から1週間以内に対象者は再度来院し、肺機能検査、気道過敏性試験（メサコリン誘発試験）、誘発喀痰採取を行った。

メサコリン誘発試験はアストグラフ法を用いて行い、次にあげる3種の指標を呼吸抵抗（Rrs）のresponce-curveより求めて気道過敏性の指標とした：1）Rrs-cont:生食吸入時の呼吸抵抗の平均値、2）Dmin：呼吸抵抗が上昇し始めた時点のメサコリン累積量、3）PD₃₅Grs：呼吸コンダクタンスが35%減少するまでのメサコリン累積量。

誘発喀痰は3%の高張食塩水の吸入を20分間または、充分量の喀痰が得られるまで行い採取した。得られた喀痰は同量のN-acetylcysteinを加えて混和しスライドグラスに載せて風乾後Diff-Quikで染色し、炎症細胞の比率を評価した。

【結 果】

single-breath-methodでは、呼気中NO濃度は早期にpeakに達しその後徐々に減少した。multiple-breath-methodでは、呼気中NO濃度は徐々に上昇し peak値を維持した。single-breath-methodのpeak値はmultiple-breath-methodの約3倍であった。両者ともに再現性を認め、双方のpeak値に相関性を認めた（ $r=0.708$ ）。

single-breath-methodでは、BA群、Control群共に呼気時間を長くすればするほど、呼気中NO濃度は高くなった。同一の呼気時間では呼気中NO濃度は常にBA群がControl群に比し、有意に高かった。息こらえをすると、呼気中NO濃度は上昇し、息こらえが長いほど高くなった。以後のデータにはsingle-breath-methodで呼気時間30秒、もしくは息こらえ15秒＋呼気時間30秒の呼気中NOのpeak値を用いた。

BA群の呼気中NO濃度は 250.4 ± 30.4 ppbでControl群（ 59.9 ± 9.6 ppb）に比し有意に高かった（ $p < 0.01$ ）。Stable BA群の呼気中NO濃度はUnstable BA群に比し有意に低かった（ 143.6 ± 18.8 ppb vs 384.2 ± 32.5 ppb）が、Control群より有意に高かった（ $F = 51.0$, $p < 0.01$ ）。15秒間の息こらえの効果を見ると、息こらえ15秒による呼気NO濃度上昇は、BA群で 150.4 ± 40.1 ppbでControl群（ 54.8 ± 12.6 ppb）より有意に高く（ $p < 0.01$ ）、またUnstable BA群（ 243.3 ± 37.1 ppb, $n=9$ ）はStable BA群（ 104.3 ± 11.6 ppb, $n=12$ ）より有意にNO濃度上昇が高かった（ $p < 0.01$ ）。

25例の気管支喘息患者中充分量の評価可能な喀痰採取ができたのは7例であった。喀痰中の好酸球比率と呼気中NO濃度には有意の正相関を認めた（ $r=0.772$, $p < 0.05$, $n=7$ ）。気道過敏性の各指標（Dmin, PD₃₅Grs）と呼気中NO濃度には相関を認めなかった。

ピークフロー値の予測値に対する比率（%PEFR）と呼気中NO濃度には有意の負の相関を認めた（ $r=0.671$, $p < 0.01$, $n=15$ ）。

《考察》

本研究において全対象者で呼気中NO濃度が測定可能であり、1) 呼気中NO濃度が気管支喘息患者、特に有症者で高濃度であること、2) single-breath-methodでの呼気中NO濃度のpeak値はmultiple-breath-methodのpeak値と相関し、喘息の評価においてより鋭敏な指標となること、3) 呼気中NO濃度は喀痰中好酸球比率と正相関を示し、ピークフロー値と負相関を示すが、気道過敏性の指標とは相関しないことが示された。

NOの肺における産生部位が特定されておらず、健常者の呼気中NOは、上気道由来のものを含んでいることも示されている。しかし、本研究において呼気時間の延長により呼気中NO濃度が上昇したことは、より末梢領域でのNO産生を反映したためと考えられる。また、気管支喘息患者での高濃度のNOは、定常的な上気道でのNO産生に加えて、下気道で産生の増大したNOを反映していると考えられる。健常対照者のmultiple-breath-methodのpeak値は大気中のNO濃度とほぼ同様である場合もあり、本研究では気管支喘息患者戸健常人との比較にsingle-breath-methodのみを用いた。

内因性NOはL-arginineからNOSにより合成され、肺内ではcNOSとiNOSの二種類のisotypeのNOSが認められる。cNOSは肺内では血管内皮細胞や神経細胞で、iNOSはマクロファージや好中球等の炎症細胞や気道上皮細胞で認められる。iNOSはTNF- α , interferon- γ , interleukin-1 β 等のサイトカインにより活性化されるが、気管支喘息患者の気道の多くのサイトカインが活性化されており、気道上皮において正常人では殆ど認められないiNOSの発現が認められる。本研究で喘息患者の呼気中NO濃度が高いことが示されたが、これはAlvingやKharitonovの報告と一致する。最近、ほかの炎症性肺疾患でも呼気中NO濃度が高くなることが報告されている。

さらに本研究では症状の安定した気管支喘息患者では、不安定な患者に比し有意に呼気中NO濃度が低いことも示された。ステロイド剤は気管支喘息患者の呼気中NO濃度を低下させることが報告されているが、本研究ではUnstable B A群、Stable B A群とも同様に吸入ステロイド剤を使用しており、両群における呼気中NO濃度の差はステロイドの直接作用とは考えられず、気道における炎症の状態を反映しているものと考えられ、呼気中NO濃度の測定が気道炎症を評価する鋭敏な指標となると考えられた。

気管支喘息患者の気道炎症を評価することは喘息の重症度や、コントロール状態や重症度を把握するためにPEFRの測定や、気道過敏性検査が広く行われ、PEFRの低下は喘息状態の悪化を示すとされる。本研究でPEFRと呼気中NO濃度が高い相関関係を認めたことにより、呼気中NO濃度は喘息の重症度の指標になりうると考えられる。

高張食塩水吸入による誘発喀痰は気道炎症を評価する再現性のある有用な方法とされており、誘発喀痰中の好酸球数は気管支洗浄液中の好酸球と高い相関関係を示すことが報告されている。我々は気道炎症の指標として誘発喀痰中の好酸球数を用い、呼気中NO濃度との相関を調べ、その高い相関関係を示した。高張食塩水吸入は気道炎症を悪化させる可能性が指摘されており、呼気中NO濃度測定が、より簡単で安全性の高い気道炎症の指標となりうると考えられた。

【結 論】

本研究で、single-breath-methodで測定された呼気中NO濃度が、気道の炎症状態を反映することが示され、本方法による呼気中NO濃度測定が気管支喘息患者の気道炎症の状態や、治療状況を示す有用で再現性のある非侵襲的な方法となることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

一酸化窒素 (NO) は L-arginine から NO 合成酵素 (NOS) により産生される。肺内では構成型 NOS と誘導型 NOS の二種類 isotype が認められ、前者は血管内皮細胞と神経細胞で、後者はマクロファージや好中球等の炎症細胞や気道上皮細胞で認められる。気管支喘息は気道の炎症性疾患であり、喘息患者の気道では多くのサイトカインが活性化されており、気道上皮において正常人では殆ど認められない誘導型 NOS の発現が認められる。1991年、実験動物やヒトで呼気中 NO 濃度の測定が可能であることが報告された。本研究はまず気管支喘息患者で繰り返し測定可能で信頼性のある呼気中 NO 濃度測定法を確立し、さらに気管支喘息患者の呼気中の増加した NO が、気道のアレルギー性炎症を反映しているか否かを評価することを目的とした。

喫煙歴のない健康人10名(平均年齢30.0才, 男性8名, 女性2名)(Control群)とアトピー性で、喫煙歴のない症状の安定した気管支喘息患者13名(StableBA群)(平均年齢44.5才, 男性10名, 女性3名)および症状の不安定な気管支喘息患者12名(UnstableBA群)(平均年齢47.7才, 男性5名, 女性7名)を対象とした。症状安定とは、最近1ヶ月間で全く症状のないものと定義した。気管支喘息患者の21例は吸入ステロイドを、17例は β_2 刺激薬を、また12例は経口テオフィリンの投与を受けていた。呼気中 NO 濃度は chemiluminescence analyzer を用いて測定した。呼気中 NO は安静呼吸時(multiple-method)と、吸気位からの一回呼出時(single-breath-method)に測定された。その後、対象者は吸気位で0, 15, 30, 40秒の息こらえをした後ゆっくりと30, 40, 50, 60秒かけて呼出を行い呼気中 NO 濃度を測定した。また、ピークフロー値は喘息日誌より呼気 NO 測定日の数値を用いた。呼気 NO 濃度測定から1週間以内に対象者は肺機能検査、気道過敏性試験(メサコリン誘発試験)、誘発喀痰採取を行った。メサコリン誘発試験はアストグラフ法を用いて行い、呼吸抵抗のresponce-curveより気道過敏性を評価した。以下の結果を得た。

1) single-breath-methodでは、呼気中 NO 濃度は早期にpeakに達しその後徐々に減少した。multiple-breath-methodでは、呼気中 NO 濃度は徐々に上昇しpeakに達しpeak値を維持した両者ともに再現性を認め、双方のpeak値に相関性を認めた。single-breath-methodでは、呼気時間を長くすればするほど、呼気中 NO 濃度は高くなったが、これは気道末梢領域の NO 産生を反映しているためと考えられた。以後のデータにはsingle-breath-methodで呼気時間30秒、もしくは息こらえ15秒+呼気時間30秒の呼気中のpeak値を用いた。2) BA群の呼気中 NO 濃度はControl群に比し有意に高かった。StableBA群の呼気中 NO 濃度はUnstableBA群に比し有意に低かったが、Control群より有意に高かった。息こらえ15秒による呼気 NO 濃度上昇は、BA群がControl群より有意に高く、またUnstableBA群はStableBA群より有意に高かった。ステロイド剤は気管支喘息患者の呼気 NO 濃度を低下させることが報告されているが、本研究ではUnstableBA群、StableBA群とも同様に吸入ステロイド剤を使用しており、両群における呼気中 NO 濃度の差は気道の炎症の状態を反映しているものと考えられ、呼気中 NO 濃度の測定が気道炎症を評価する鋭敏な指標となると考えられた。3) 喀痰中の好酸球比率と呼気中 NO 濃度には有意の正相関を認めた。気道過敏性の各指標と呼気中 NO 濃度には相関を認めなかった。高張食塩水吸入による誘発喀痰は気道炎症を評価する再現性のある有用な方法とされているが、患者の苦痛と気道炎症の悪化を生じる可能性が指摘されており、呼気中の NO 濃度測定が、より簡便で安全性の高い気道炎症の指標となりうると考えられた。4) ピークフロー値の予測値に対する比率と呼気中 NO 濃度には有意の負の相関を認めた。現在気管支喘息のコントロール状態や重症度を把握するためにピークフロー値の測定が広く行われているが、呼気中

NO濃度は喘息の重症度の指標になりうると考えられる。

本研究は呼気中NO濃度測定法の確立と気管支喘息での測定の意義について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった呼気中NO濃度測定が気管支喘息の気道の炎症と重症度および治療状況を示す有用で再現性のある非侵襲的な方法となるという重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。