

## アスピリン喘息におけるアスピリン負荷前後の 血清中メディエーターの検討

丹羽義和・磯谷澄都・山本直樹<sup>1</sup>・相馬智英  
渡邊俊和・赤尾 謙・堀口智也・後藤祐介  
森川紗也子・峯澤智之・榊原洋介・武山知子  
山口哲平・岡村拓哉・魚津桜子・三重野ゆうき  
後藤康洋・林 正道・中西 亨・今泉和良  
(藤田保健衛生大学医学部・呼吸器内科学 I 教室)  
(<sup>1</sup>藤田保健衛生大学・共同利用研究施設・分子生物学)

### 1. 緒 言

成人気管支喘息の一部に難治例（難治性喘息）がある。その背景因子として心因性疾患、慢性気道感染、副鼻腔炎・鼻茸、アスピリン喘息（AERD：aspirin exacerbated respiratory disease）、胃食道逆流症、心不全・腎不全、内分泌疾患、睡眠時無呼吸症候群の合併などが挙げられている<sup>1</sup>。難治性喘息は慢性の経過をたどるだけでなく、時に重篤な発作を起し仕事や社会生活に影響を及ぼすことから、その克服は重要な課題である。

難治性喘息の一つである AERD は、20 歳代から 50 歳代の女性に多く、高頻度に副鼻腔炎・鼻茸を合併し、非アスピリン喘息（ATA：aspirin tolerant asthma）と比べ重症難治例が多いことが特徴であり、意識障害をきたすほどの大発作を起こす頻度が高いことでも知られている<sup>2</sup>。その病態として、非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs：non-steroidal anti-inflammatory drugs）によって cyclooxygenase（COX）が阻害されることで、アラキドン酸カスケードのバランスが崩れ、気管支収縮作用の極めて強いロイコトリエンが著明に上昇し、prostaglandin（PG）の合成が低下、特に PGE<sub>2</sub> 合成が低下することなどが関与すると考えられている。その他にも 15-LO（15-lipoxygenase）により生じ、抗炎症作用を持つリポキシンが AERD では低下している事も報告されている<sup>3</sup>。また AERD に合併する頻度の高い鼻茸の病理所見などから、病態形成に重要な細胞はマスト細胞と考えられるようになってきており、その他に好酸球や血小板の関与も報告されている<sup>4,5</sup>。しかし、これらの研究成果にも関わらず AERD の病態は未だ明確にはなっておらず、特にア

スピリン（ASA）を投与されたときの生体内でのメディエーター変動についての知見は少ない。また、これまでの報告の多くは、尿中の測定値での評価であり、血清での測定値の評価はほとんどない。血清での測定はメディエーターが全身に及ぼす影響を鋭敏に解析出来る可能性がある。そこで、我々は当科で ASA 内服負荷試験を施行した AERD 症例で、負荷試験前後での血清中のメディエーター（AERD の炎症病態に関与すると考えられる 15-epimer of lipoxin A<sub>4</sub>（15-epi-lipoxin A<sub>4</sub>）、eosinophil cationic protein（ECP）、prostaglandin E<sub>2</sub>（PGE<sub>2</sub>）、及びマスト細胞の活性化を反映する tryptase と prostaglandin D<sub>2</sub>（PGD<sub>2</sub>）を EIA（enzyme immunoassay）kit を用いて測定し検討した。

### 2. 方 法

#### 1) 患者背景と方法

解析対象患者は、2014 年 12 月から 2015 年 12 月にかけて当院を受診され、肺機能検査での 1 秒率（FEV<sub>1</sub>）が 70% 以上であり、かつ検査前 4 週間以上上気道感染および喘息発作を認めなかった患者で、NSAIDs による喘息発作症状があり、ASA 内服負荷試験を受け、AERD と確定診断された患者を対象とした。全員 NSAIDs による何らかの喘息誘発歴があり、女性 2 名、男性 7 名で平均年齢は 49.3 歳であった。重症度は軽症が 2 名、中等症が 3 名、重症が 4 名で、鼻炎、副鼻腔炎、鼻茸はそれぞれ 5 名（55.6%）、6 名（66.7%）、5 名（55.6%）で合併していた（表 1）。ASA 内服負荷試験を施行し、内服前と内服後の症状出現時（AERD と診断時）に採血を施行した。その後速やかに血清を凍結保存し後日 EIA kit にて各種メデ

表1 患者背景 (n=9)

喫煙(有/無)	3/6
性別(M/F)	2/7
年齢	49.3歳(24-73歳)
WBC(/ $\mu$ L)	7500 $\pm$ 250
Eo(%)	6.3 $\pm$ 1.1
重症度(mild/moderate/severe)	2/3/4
IgE(IU/mL)	253 $\pm$ 83
FVC(m $\ell$ )	3250 $\pm$ 290
FEV1(m $\ell$ )	2250 $\pm$ 280
鼻炎(有/無)	5/4
副鼻腔炎(有/無)	6/3
鼻茸(有/無)	5/4

( $\pm$ S. E.)

イエーターを測定した。

ASA 内服負荷試験前に対象患者にインフォームドコンセントを実施し、書面にて同意を得た。また、この研究は藤田保健衛生大学倫理委員会の承認を得て(受付番号 12-252)、実施された。

2) ASA 内服負荷試験によるアスピリン喘息診断基準

- ① 1 秒量が基準値(内服前値)の 20% 以上低下した場合
  - ② 1 秒量が基準値の 15% 以上低下し、かつ気管支外症状(鼻閉、鼻汁、顔面紅潮、結膜充血など)を認めた場合
  - ③ 1 秒量は低下しないものの、他の症状(鼻、消化器、皮膚症状、胸痛、咳など)が明らかに出現し、負荷量の増量とともに、その症状の悪化を認めた場合
- ①②③のいずれかを満たした場合、陽性と判断し検査を中止した。ASA 内服負荷試験の結果が陽性で、他の臨床症状(喘息発作などの症状)が矛盾しないものを AERD と最終的に診断した。

3) メディエーター測定方法

凍結保存した血清は 37 $^{\circ}$ C にて解凍後、EIA キットを用いて PGD<sub>2</sub>, tryptase, ECP(Flarebio Biotech LLC, College Park, MD), PGE<sub>2</sub> (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) および 15-epi-Lipoxin A<sub>4</sub> (NEOGEN Corp., Lexington, KY) の濃度を測定した。具体的には、測定対象物質(PGD<sub>2</sub>, tryptase, ECP, PGE<sub>2</sub> および 15-epi-lipoxin A<sub>4</sub>) の標準液を各キットの EIA buffer にて希釈して希釈標準液を作成した後、96 ウェルプレートを用いて検体または希釈標準液に、測定対象物質の HRP (horseradish peroxidase) 酵素標識化抗原を加え、37 $^{\circ}$ C (PGD<sub>2</sub>, tryptase, ECP) または室温(PGE<sub>2</sub>, 15-epi-lipoxin A<sub>4</sub>) で放置して、測定対象物質に対する抗体と反応させた。96 ウェルプレートを洗浄後、HRP に対する色素原性基質(TMB: tetramethylbenzidine) を加え、15 から 30 分反応させた後 450nm にて吸光度を測定した。各々の希釈標準液の吸光度から検量線を作成し、各検体の濃度を求めた。

4) 統計解析

ASA 内服試験における各メディエーターの前後で

の測定値は Wilcoxon 検定を行い、P<0.05 のとき有意差ありと判定した。結果は、すべて平均 $\pm$ 標準偏差値(SD)で示した。

3. 結 果

ASA 内服負荷試験前後の血清中メディエーター 15-epi-lipoxin A<sub>4</sub>, ECP [図 1]

15-epi-lipoxin A<sub>4</sub>; 負荷前 0.458 $\pm$ 0.083 (SD), 負荷後 0.531 $\pm$ 0.188 (SD) (ng/ml), ECP; 負荷前 2.843 $\pm$ 2.312 (SD), 負荷後 3.316 $\pm$ 2.095 (SD) (ng/ml) であり 15-epi-lipoxin A<sub>4</sub> は 9 例中 5 例で、ECP は 9 例中 6 例で、ASA 負荷後の増加がみられたが、共に統計学的な有意差はなかった。

PGE<sub>2</sub> [図 2]

負荷前 523.603 $\pm$ 273.642(SD), 負荷後 378.852 $\pm$ 230.358 (SD) (pg/ml) であり、9 例中 6 例で明らかな低下を認め、統計学的には有意ではないものの p=0.066 と低下傾向が認められた。

PGD<sub>2</sub>, tryptase [図 3]

PGD<sub>2</sub>: 負荷前 26.243 $\pm$ 28.550 (SD), 負荷後 13.121 $\pm$ 11.631 (SD) (pg/ml), tryptase: 負荷前 3.177 $\pm$ 2.360

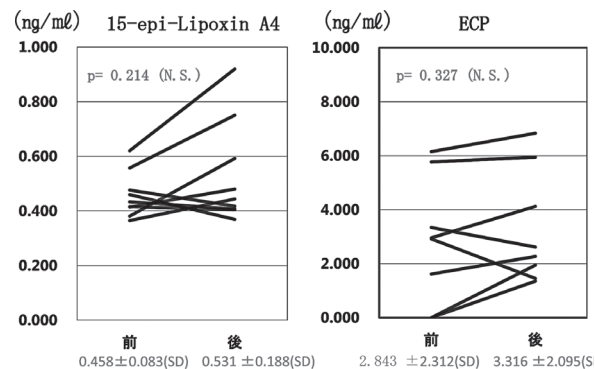


図 1 ASA 内服負荷試験前後の 15-epi-lipoxin A<sub>4</sub>, ECP の変化  
15-epi-LipoxinA<sub>4</sub>, ECP 共に統計学的有意差は認めなかったが一部の症例で ASA 内服後増加がみられた。

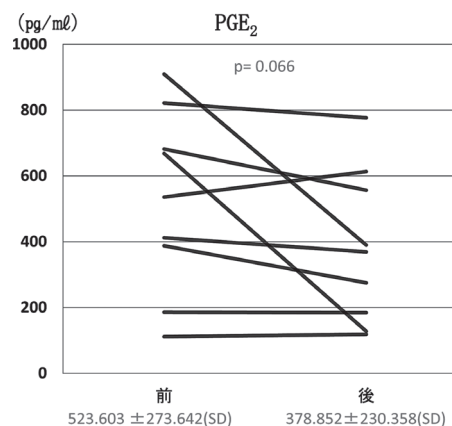


図 2 ASA 内服負荷試験前後の PGE<sub>2</sub> の変化  
PGE<sub>2</sub> も統計学的には ASA 内服前後で有意差は認めなかったが、p=0.066 と軽度の低下傾向を認めた。

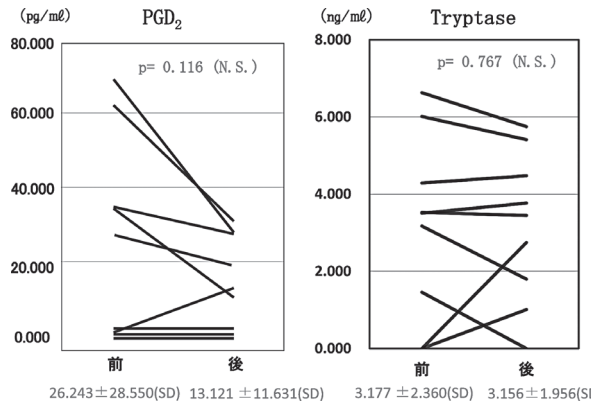


図3 ASA内服負荷試験前後のPGD<sub>2</sub>, tryptaseの推移  
PGD<sub>2</sub>, tryptaseともにASA内服前後で有意差は認めなかった。

(SD), 負荷後 3.156 ± 1.956 (SD) (ng/mL)。共に負荷前後で有意差を認めなかったが PGD<sub>2</sub> では 9 例中 5 例で負荷後に低下がみられた。

#### 4. 考 察

AERD の病態を解明するためのメディエーター動態解析の多くは尿, 喀痰, 鼻汁などの測定値をもとに報告されており, 特に尿での測定が多く血清での報告は少ない。

lipoxin は, 近年抗炎症性メディエーターとして着目されてきており, AERD では ATA に比し低値であるといわれている。今回測定した 15-epi-lipoxin A<sub>4</sub> は強い抗炎症作用をもち近年 lipoxin A<sub>4</sub> と分けて測定することが可能となり注目されている<sup>3</sup>。今回, ASA 負荷によって血清での有意変化は認めなかったが負荷後明らかに上昇した症例もあった。AERD 症例では lysine-aspirin の鼻腔投与で lipoxin A<sub>4</sub> が低下するという報告がある<sup>8</sup>。本研究結果との乖離が症例数によるものか, 15-epi-lipoxinA<sub>4</sub> が血清中で異なる動態を示すのか今後の課題である。

好酸球活性化を表す ECP は ASA 全身負荷による報告では尿中で変化なく, 鼻腔投与では AERD では ATA に比し上昇する報告がある。今回の結果では統計学的有意差は認めなかったが, 血清 ECP は ASA 負荷後 9 例中 6 例で上昇していた。我々は ASA 負荷によって AERD 症例の好酸球 CD11b 発現が上昇する結果も報告しており<sup>10</sup>, AERD において ASA による好酸球活性化機序が存在すると想定している。

PGE<sub>2</sub> は AERD における防御因子的作用を有するといわれている。安定期から尿中・組織中とも AERD では低く<sup>5,11</sup>, この事も AERD が重症である理由の一つであると思われる。今回の検討では明らかな有意差は認めなかったが, p=0.066 で ASA 負荷により PGE<sub>2</sub> は低下傾向を認め, AERD では従来いわれている PGE<sub>2</sub> の低下が ASA 負荷によりさらに増強されている可能

性がある。

マスト細胞の活性化を示す PGD<sub>2</sub> 代謝物, tryptase の AERD での動態については複数の報告があり, 尿中, 血清, 鼻汁ともに AERD では ASA 負荷によりともに上昇するといわれている<sup>5,12</sup>。しかし, 今回の結果では PGD<sub>2</sub>, tryptase 共に有意な変化は認めず, PGD<sub>2</sub> においては半数以上でむしろ低下した。マスト細胞は AERD の病態の中心的役割をしている細胞と考えられており, 我々の当初の予想としては AERD 患者では PGD<sub>2</sub>, tryptase は ASA 負荷後上昇すると考えたが, 結果は予想に反したものであった。

症例数が少ないことによるバイアスや, prostaglandin の半減期が短い事から採血を施行するタイミングによってダイナミックな変化をしてしまう可能性があり, 今後, 症例の蓄積の必要性や採血のタイミングや回数に検討を要すると考えられた。

#### 総 括

AERD 症例において, ASA 負荷の前後での血清メディエーターの変化は炎症抑制性の PGE<sub>2</sub> でやや負荷後低下傾向を認めるも lipoxin では有意な変化は認められず, 好酸球活性化を示す ECP, マスト細胞活性化を示す PGD<sub>2</sub> および tryptase でも有意な変化を認めなかった。これらの結果は従来の報告と一致しなかった。

#### 謝 辞

本研究をすすめるにあたり, 多大なご協力をいただいた藤田保健衛生大学医学部呼吸器内科学 I 研究補助員日比谷睦子先生, 平松範子先生にこの場を借りて厚くお礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) ten Brinke A, Sterk PJ, Masclee AA, Spinhoven P, Schmidt JT, Zwinderman AH, Rabe KF, and Bel EH : Risk factors of frequent exacerbations in difficult-to-treat asthma. *Eur. Respir. J.* 2005 ; 26 (5) : 812-818.
- 2) Szczeklik A and Stevenson DD : Aspirin-induced asthma : advances in pathogenesis, diagnosis, and management. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003 ; 111 (5) : 913-921.
- 3) Yamaguchi H, Higashi N, Mita H, Ono E, Komase Y, Nakagawa T, Miyazawa T, Akiyama K, and Taniguchi M : Urinary concentrations of 15-epimer of lipoxin A(4) are lower in patients with aspirin-intolerant compared with aspirin-

- tolerant asthma. *Clin. Exp. Allergy*. 2011 ; 41 (12) : 1711 – 1718.
- 4) Higashi N, Mita H, Yamaguchi H, Fukutomi Y, Akiyama K, and Taniguchi M : Urinary tetranor-PGDM concentrations in aspirin-intolerant asthma and anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012 ; 129(2) : 557 – 559.
- 5) Higashi N, Mita H, Ono E, Fukutomi Y, Yamaguchi H, Kajiwara K, Tanimoto H, Sekiya K, Akiyama K, and Taniguchi M : Profile of eicosanoid generation in aspirin-intolerant asthma and anaphylaxis assessed by new biomarkers. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010 ; 125(5) : 1084 – 1091.
- 6) Mitsui C, Kajiwara K, Hayashi H, Ito J, Mita H, Ono E, Higashi N, Fukutomi Y, Sekiya K, Tsuburai T, Akiyama K, Yamamoto K, and Taniguchi M : Platelet activation markers overexpressed specifically in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016 ; 137(2) : 400 – 411.
- 7) Steinke JW, Negri J, Liu L, Payne SC, and Borish L : Aspirin activation of eosinophils and mast cells : implications in the pathogenesis of aspirin-exacerbated respiratory disease. *J. Immunol.* 2014 ; 193(1) : 41 – 47.
- 8) Kupczyk M, Antczak A, Kuprys-Lipinska I, and Kuna P : Lipoxin A4 generation is decreased in aspirin-sensitive patients in lysine-aspirin nasal challenge in vivo model. *Allergy*. 2009 ; 64(12) : 1746 – 1752.
- 9) Andrew R. Fischer, Mitchell A. Rosenberg, Craig M. Lilly, Joan C. Callery, Paul Rubin, Judith Cohn, Martha V. White, Yasushi Igarashi, Michael A. Kaliner, Jeffrey M. Drazen, and Elliot Israel : Direct evidence for a role of the mast cell in the nasal response to aspirin in aspirin-sensitive asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1994 ; 94 : 1046 – 1056.
- 10) Isogai S, Hayashi M, Yamamoto N, Morishita M, Minezawa T, Okamura T, Hoshino T, Okazawa M, and Imaizumi K : Upregulation of CD11b on eosinophils in aspirin induced asthma. *Allergol. Int.* 2013 ; 62(3) : 367 – 373.
- 11) Yoshimura T, Yoshikawa M, Otori N, Haruna S, and Moriyama H : Correlation between the prostaglandin D(2)/E(2) ratio in nasal polyps and the recalcitrant pathophysiology of chronic rhinosinusitis associated with bronchial asthma. *Allergol. Int.* 2008 ; 57 : 429 – 436.
- 12) Bochenek G, Nagraba K, Nizankowska E, and Szczeklik A : A controlled study of 9alpha, 11beta-PGF2 (a prostaglandin D2 metabolite) in plasma and urine of patients with bronchial asthma and healthy controls after aspirin challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003 ; 111 : 743 – 749.

(平成 28 年 9 月 16 日受理)