

原 著

誘発喀痰中好酸球数による気管支喘息の気道炎症評価とその臨床応用

富井 啓介 松村 栄久 田口 善夫
郡 義明 種田 和清 小橋陽一郎*

要旨: [目的] 誘発喀痰中好酸球数による気管支喘息患者の気道炎症評価とその臨床応用. [方法] 3% 高張食塩水による誘発喀痰を吸入ステロイドとピークフロー (PEF) 測定で管理中の中等症以上慢性喘息患者 29 例に各 2 回, 健常対照者 15 例に各 1 回施行し, 塗抹標本白血球中好酸球比率 (Eos%) と 400 倍 5 視野中好酸球総数 (TEC) を測定した. これらを喀痰採取日朝の PEF 自己最良値 80% 未満 (Y) 群, 以上 (G) 群, 健常 (C) 群間で比較した. 次に G 群相当 PEF 安定 20 例で吸入ステロイドを半減させ, 12 週後まで PEF を前向き観察した. [結果] Eos%, TEC と C 群に対し Y 群 ($p < 0.001$, $p < 0.001$), G 群 ($p < 0.001$, $= 0.03$) とも大で, 吸入ステロイド半減後 PEF の自己最良値 70% 未満悪化は Eos% $> 10\%$, TEC > 100 の例で高頻度に認めた ($p = 0.03$, 0.001). [結論] 中等症以上の慢性喘息患者では PEF 安定後も誘発喀痰中好酸球増多を認め, その多寡によりステロイド吸入減量後の悪化を予測できる.

キーワード: 気管支喘息, 誘発喀痰, 好酸球, 気道炎症, 吸入ステロイド

Persistent asthma, Induced sputum, Eosinophil, Airway inflammation, Corticosteroid

緒 言

気管支喘息の病状把握はこれまで症状と直結する肺機能, ピークフロー (PEF) など生理学的パラメーターによってきた. しかし気管支喘息の本態は好酸球浸潤を伴う気道炎症で, 抗炎症剤を治療の中心に位置づけるべきとの考えが広く認められるとともに, 直接気道炎症を評価する方法が今日注目されつつある.

気道から直接検体を得る方法として, 従来気管支洗浄, 気管支生検など施行されてきたが, 侵襲的で反復施行困難であり, 治療指標としての臨床応用は困難であった. 一方誘発喀痰法は, 健常人も含めてほとんど喀痰のない患者からでも非侵襲的かつ安全に繰り返し採取でき¹⁾⁻³⁾, これまですでに様々な形で臨床応用されてきた. 当初は病原体検索が主であったが, 1992 年 Pin ら⁴⁾により喘息患者への高張食塩水を用いた方法が報告されてより, 気管支喘息の病態把握, 治療効果判定⁵⁾の手段として用いられるようになった. とくに気管支喘息においては安全³⁾のみならず, 通常の随意喀痰と内容に差がなく⁶⁾, BAL, 気管支生検と同等⁷⁾, もしくは検体が凝縮されているため気管支洗浄より優れるとの報告⁸⁾もある.

現在最も広く行われている方法として, 10~30 分の 3

~5% 高張食塩水超音波吸入を施行し, この間喀出した喀痰の唾液成分を除いた重量を測定, それと同量の喀痰溶解剤 (0.1% dithiothreitol: DTT) の添加, 攪拌, サイトスピンによる細胞, 液性成分分離したのち, それぞれの内容を喀痰単位重量あたりとして算出する方法がある⁴⁾. この方法は喀痰中の液性成分, 細胞成分いずれの評価も可能で再現性も高く⁹⁾, また塗抹法と比べると細胞分類が明瞭かつ容易¹⁰⁾とされる. しかしその手技は煩雑で, 時間, 労力, コストの面で臨床応用には不向きである.

これらの点を考慮し, 今回我々は判別の容易な好酸球に着目した, 誘発喀痰直接塗抹法による簡便な評価方法を考案し, ステロイド吸入治療中の気管支喘息患者の残存気道炎症評価と治療指標としての臨床応用を試みた.

研究対象, 方法

< 喀痰採取 >

まず気道攣縮予防のため被験者に fenoterol 200 μg をスプレー (ボルマチック 日本グラクソ) を用いて吸入させたのち, 10 分間の 3% 食塩水 50 ml 超音波吸入 (NE-U 12 オムロン) を最大出力で 2 回繰り返した. この間咳とともに口腔内に出たものは唾液も含めすべて容器に蓄積させた. 喘息患者では吸入終了後も再度 fenoterol 200 μg を吸入させた.

< 喀痰処理と好酸球数カウント >

容器内に浮遊する喀痰塊を竹べらで残らずスライドグ

〒632 0015 奈良県天理市三島町 200

天理よろづ相談所病院呼吸器内科

* 同 病理

(受付日平成 9 年 6 月 18 日)

Table 1 Baseline data

	n	Age	M/F	Best PEF (%predict)	Morning PEF (%best)	Weekly PEF (%best)
Subjects	29	54.5 ± 14.0	20/9	110 ± 23	78.4 ± 9.7	87.6 ± 20.4
(Y)	31*	57.3 ± 13.7	24/7	116.5 ± 22.8	71.2 ± 6.9	73.6 ± 8.9
(G)	27**	51.4 ± 13.7	16/11	103.5 ± 20.9	86.6 ± 4.7	86.5 ± 5.4
Control	15	53.9 ± 14.0	10/5			
Steroid reduction	20	54.6 ± 15.2	14/6			86.3 ± 5.7

* Number of sputum samples taken at the yellow (Y) and ** green zones (G). Mean ± SD.

ラス全体にまんべんなく塗抹し、メタノール乾燥固定後ギムザ染色（好酸球染色）を行ったのち、患者情報を伏せたまま2名の専任細胞検査士により以下のカウントを行い、両者の平均値を採用した。まず低倍率で標本全体を観察し、細胞の重なりが少なく個々の細胞の識別が容易な視野において、白血球200~400個中の好酸球を数え、その比率「誘発痰白血球中好酸球比率：Eos%」を算出した。ただし好酸球以外の白血球分類は行わず、口腔粘膜由来と考えられる扁平上皮は白血球中に含まなかった。また標本内の細胞数が著しく少なく、白血球を200個以上数えられない場合は検討から除いた。次に標本全体から好酸球のもっとも密集した400倍の異なる5視野を選び、その中の好酸球総数を算出し「誘発痰好酸球総数：TEC」とした。ただしこれの自然対数「log TEC」を用いた検討については、標本全体中に好酸球が皆無でTEC0とされた標本は除外した。

< PEF 測定 >

スタンダードレンジのアセス型ピークフローメーター（米国ヘルススキャン社）を用いて、朝夕薬剤吸入前にPEFを計3回測定し、その最良値を記録した。PEFの指標としては過去6カ月以上に渡るピークフローグラム中の自己最良値に対する比率を用い、一部参考のため月岡ら¹¹⁾による予測値に対する比率も示した。

< 誘発喀痰中好酸球数による喘息患者の残存気道炎症評価 >

まず4週間以上全身ステロイド投与を受けていない喘息治療歴平均10.0±8.9(S.D.)年、ステロイド吸入歴3.5±2.3年、BDP(beclomethasone dipropionate)吸入1105±229µgを要す非喫煙中等症以上の慢性気管支喘息29例から4週以上の間隔で計2回、性、年齢をマッチさせた健常非喫煙者15例から1回の誘発喀痰採取を行った。好酸球カウントについて2名の検者間一致率はEos%についてはSpearman順位相関、TECについては自然対数をとった後Pearson相関で検討した。患者喀痰は喀痰採取当日朝のPEFによりイエローゾーン(Y)群(自己最良値80%未満)とグリーンゾーン(G)群(自己最良値80%以上)に分け、それぞれ健常(C)群間との比較をEos%についてはMann-Whitney U検定、TEC

については自然対数に変換した後、対応あるt検定を用いて行った。

< 治療指標としての臨床応用 >

つぎに週平均PEFが自己最良値80%以上で過去3カ月内に70%以下の低下のないBDP吸入960±359µgの安定20例を対象とし、誘発喀痰採取後informed consentを得た上で吸入ステロイドを50%減量させ、前、4、8、12週後のPEFを前向きに観察した。ステロイド減量後PEFが自己最良値70%未満に低下した時点で脱落とし、脱落例と非脱落例について減量前のEos%、TECの多寡による判別をFisherの直接法で行った。非脱落例については週平均PEFの変化を減量前値に対して対応あるt検定で比較した。いずれもp<0.05で有意とした。

成 績

誘発喀痰標本中白血球数が200個未満で喀痰採取不成功と判定された標本は喘息患者標本58個中5個(8.6%)、健常者19個中3個(15.8%)で2名の検者間で完全に一致した。Eos%、log TECの検者間一致率(Fig. 1)はきわめて高かったが、log TECについては少なくとも1名の検者がTEC0とした標本(患者14個、健常者13個)は除外された。

Eos%はY群20.1±21.4(SD)%、G群13.0±16.5%、C群0.8±1.4%でY-C間、G-C間で有意差を認め、log TECについてもY群1.91±0.75、G群1.45±0.81、C群0.63±0.56と同様にY-C間、G-C間で有意差を認めた(Fig. 2)。ただし2名の検者ともTEC0としたため平均値も0となり、log TECの群間比較から除外されたものは患者標本58個中11個、健常者19個中12個あった。

BDP50%減量12週内の脱落(Fig. 3)は減量前誘発喀痰中好酸球数の多い例で高頻度で、また非脱落例でもEos%もしくはTEC高値群でBDP減量後有意な週平均PEFの低下を認めた。(Fig. 4)

考 察

今回の我々の結果は気道炎症沈静化を目的とする吸入ステロイド投与によりPEF正常化に至った慢性気管支

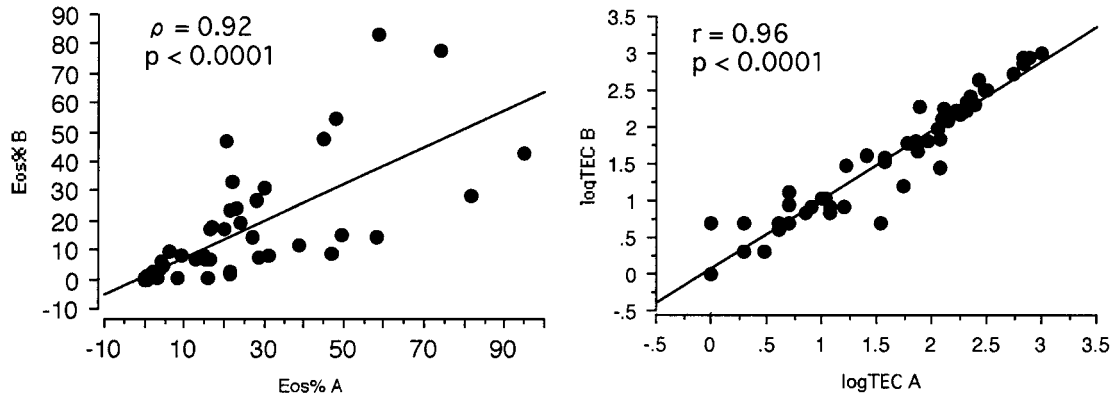


Fig . 1 Interobserver correlation of Eos% and TEC. ρ : Spearman's rank correlation coefficient, r : Pearson's correlation coefficient. Two cytotechnologists (A and B) counted every sample blindly, and their Eos% and TECs closely correlated.

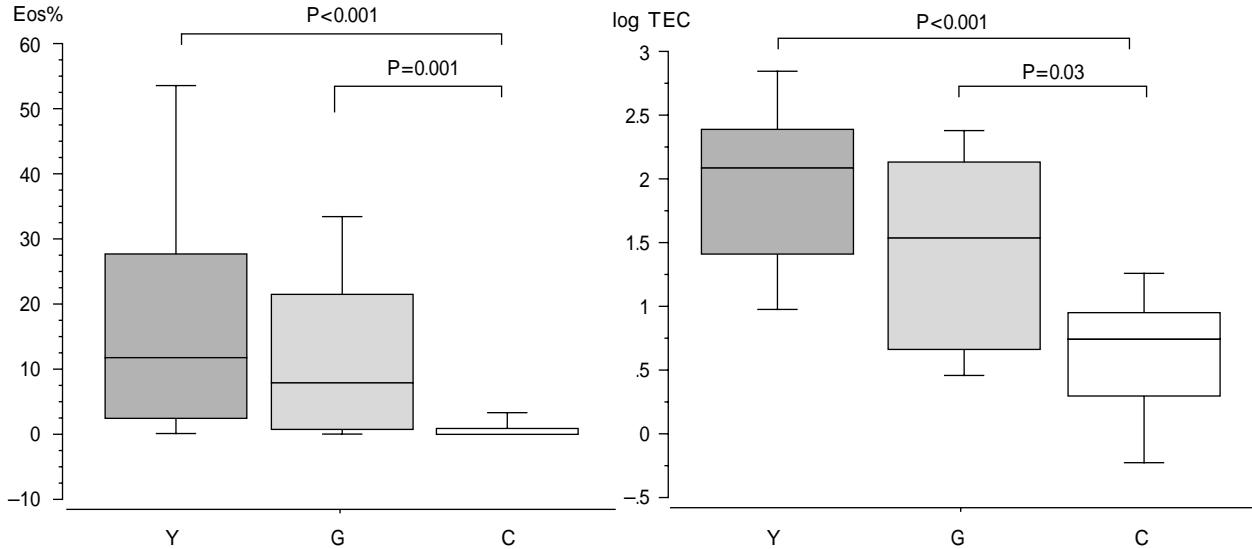


Fig . 2 Comparison of Eos% and TEC among two groups of asthmatic subjects and normal controls. Y : Induced sputum samples taken from asthmatic subjects at the yellow-zone (morning PEF < 80% of their best PEF). G : Samples from subjects at the green-zone (morning PEF > 80% of their best PEF). C : Samples from normal age-and sex-matched controls. Bars and boxes indicate the 10 th, 25 th, 50 th, 75 th and 90 th percentiles.

喘息症例 (G 群) においても、誘発喀痰中には健常人と比較してなお有意な好酸球増多が持続することを示した。また PEF 正常化例で吸入ステロイド減量を試みた際、誘発喀痰中好酸球数高値例は低値例と比べて減量後 PEF の有意な悪化傾向を認めた。このことは PEF が正常化しても誘発喀痰中好酸球数低下によって示唆される気管支粘膜内の好酸球数低下、ひいては気道炎症の緩解¹²⁾¹³⁾が得られなければ、吸入ステロイド減量は再増悪を招く可能性を示している。

気管支喘息においては好酸球浸潤を主体とする気道炎症の結果として気道過敏性亢進、気流制限を来すとされるが、その前段階、もしくは類縁疾患として、cough variant asthma¹⁴⁾¹⁵⁾、すなわち気管支粘膜や喀痰中に好酸球増多を来すものの気流制限を生じない病態も存在する。また逆に今回示したように、気流制限の改善が達成されても気道炎症の残存する症例も存在する。Boothらの報告¹⁶⁾でも大量の吸入ステロイドを3カ月投与すると、症状、肺機能、気道過敏性の改善をみるが、BAL中の好

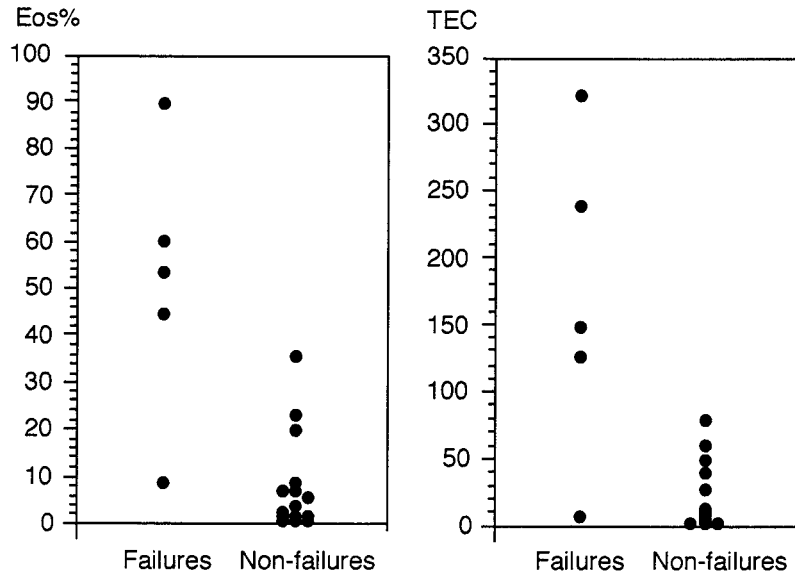


Fig . 3 Comparison of initial Eos% and TEC of inhaled corticosteroid reduction failures and non-failures. A cut-off value of 10% for Eos% and 100 for TEC separated failures and non-failures . (p=0.03, 0.001, respectively .)

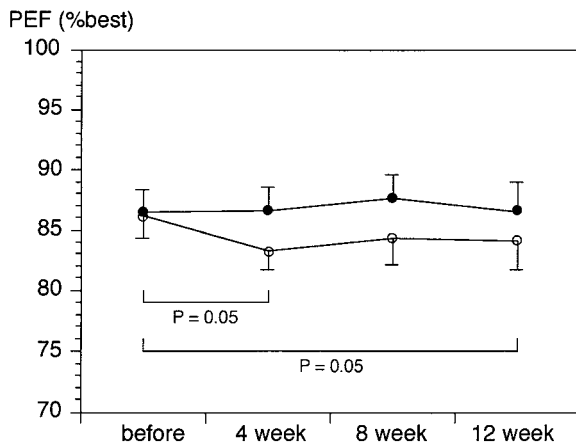


Fig . 4 Changes in weekly PEF of non-failures after inhaled corticosteroid reduction . denote patients with initial sputum eosinophilia (Eos% > 10% or TEC > 10) and the rest.

酸球は減少せず治療抵抗性であったとしており、気流制限や症状の変化と気道炎症の推移は必ずしも一致しない。

一方気道炎症評価はそれが臨床応用できればステロイド吸入を主体とする現在の気管支喘息治療戦略における重要な指標となりうる。例えばGIAガイドライン¹⁷⁾に従えばグリーンゾーン(自己最良値の80%以上)が3カ月以上続けば減量を考慮するとされるが、気道炎症残存例では減量後悪化を来す可能性があり、事前にその評価を行うことができれば危険を回避することができよう。

気管支喘息における吸入ステロイドの投与は通常ステップアップ、つまり漸増法をとることとされるが、1997年改訂 NIH ガイドライン¹⁸⁾ではステップダウン法も並記されており、十分な裏付けデータはないもののむしろこちらの方が推奨されている。これは早期に寛解状態を得るため最初から短期全身もしくは大量吸入ステロイド投与を行い、その後漸減していく方法である。我々の結果から誘発喀痰による気道炎症評価はとくにこのステップダウン法で減量を進めていく際に有用と考えられる。

今回の結果では Fig. 3 のように Eos% で 10%、TEC で 100 にカットオフ値を設定すると p = 0.03, 0.001 の危険率で減量後の脱落例と非脱落例を判別できた。従ってこれらの数値を基準にすれば直ちに減量を行うか、PEF 安定後も現状のステロイド吸入を継続させるかを決定できる。ただし Fig. 4 の如く非脱落例と考えられた例でも PEF は平均して低下傾向にあり、ステロイド吸入減量後さらに長時間経過した時点で悪化する可能性は残されている。今回の検討では減量後の変化が明瞭となるべく任意に 50% 減量を設定したが、例えば改訂 NIH ガイドライン¹⁸⁾が示すような 25% の減量であれば PEF 低下傾向は軽度でカットオフ値の設定も異なったかもしれない。現時点ではこのステップダウン時の減量量について一定の見解はなく今後の課題である。

次に我々の考案した誘発喀痰中好酸球評価法の再現性について触れたい。冒頭で述べた喀痰採取後、喀痰溶解剤とサイトスピンを用いて評価する方法についてはすでに再現性が確立されており⁹⁾¹⁰⁾、特に好酸球については最低 2 日以上あけて採取した場合でも相関係数 0.85 の

再現性が得られている¹⁹⁾。これに対して直接塗抹による細胞数カウントでは、喀痰採取法は同一でも塗抹に伴う標本上の細胞の重なりが問題となる。つまり個々の細胞分類が容易でなく、カウントに際してばらつきが大きい点である。我々はそれを軽減すべく白血球が適度に散らばった視野において、個々の判別は行わず白血球に対する好酸球比率のみを算出することとし、また総数についても判別容易な好酸球のみをできるだけ密集した高倍率5視野を選択してカウントした。その結果これらについて同一標本に対する異なる2検者間の一致率は高く、少なくとも喀痰中好酸球の多寡の判断は十分可能なレベルとなった。

気管支喘息のいかなる患者においても気道炎症を積極的に抑え、かつ健常な気道を維持する必要があるかについては結論が得られていないが、少なくとも長期に炎症が及べば remodeling を生じ不可逆性の変化をもたらされる可能性^{20) 21)}は考慮しておく必要がある。気管支喘息の治療戦略において、病因論からも合理的と考えられる気道炎症パラメーターは今後 PEF など生理学的パラメーターに取って替わる可能性があるが、その中でもとくに誘発喀痰法は今回のように一般病院でも適用でき、また比較的短時間で結果が得られる点で優れている。ピークフローメーターの導入によって気管支喘息の治療戦略が一変したように、簡便かつ繰り返し気道炎症を評価できるこの方法が確立されれば、喘息治療の新たな転換が得られるかも知れない。

謝辞：この稿を終えるにあたって、好酸球カウントを行った細胞検査士である鴻池啓資氏と大橋功氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Pin I, Freitag AP, O'Byrne PM, et al: Changes in the cellular profile of induced sputum after allergen-induced asthmatic responses. *Am J Respir Crit Care Med* 1992; 145: 1265-1269.
- 2) Fahy JV, Liu J, Wong H, et al: Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1126-1131.
- 3) 松浦崇行, 五野上良材, 黒川真嗣, 他: 高張食塩水および蒸留水吸入による喀痰誘発法, 喀痰塗抹標本細胞分画測定法の基礎的検討. *アレルギー* 1993; 42: 1657-1669.
- 4) Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, et al: Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992; 47: 25-29.
- 5) Claman DM, Boushey HA, Liu J, et al: Analysis of induced sputum to examine the effects of predni-

sone on airway inflammation in asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 861-869.

- 6) Pizzichini MM, Popov TA, Efthimiadis A, et al: Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 866-869.
- 7) Maestrelli P, Saetta M, Di Stefano A, et al: Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies, and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1926-1931.
- 8) Fahy JV, Wong H, Liu J, et al: Comparison of samples collected by sputum induction and bronchoscopy from asthmatic and healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 53-58.
- 9) Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, et al: Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J* 1996; 9: 1174-1180.
- 10) Popov T, Gottschalk R, Kolendowicz R, et al: The evaluation of a cell dispersion method of sputum examination. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 778-783.
- 11) 月岡一治: 日本人のピークフロー値. *協和企画通信*, 東京, 1995; 81-92.
- 12) Bentley AM, Hamid Q, Robinson DS, et al: Prednisolone treatment in asthma. Reduction in the numbers of eosinophils, T cells, tryptase-only positive mast cells, and modulation of IL-4, IL-5, and interferon-gamma cytokine gene expression within the bronchial mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 551-556.
- 13) Djukanovic R, Homeyard S, Gratziau C, et al: The effect of treatment with oral corticosteroids on asthma symptoms and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 826-832.
- 14) McFadden ER.: Exertional dyspnea and cough as precludes to acute attacks of bronchial asthma. *N Engl J Med* 1975; 292: 555-559.
- 15) Corrao WM, Braman SS, Irwin RS: Chronic cough as the sole presenting manifestation of bronchial asthma. *N Engl J Med* 1979; 300: 633-637.
- 16) Booth H, Richmond I, Ward C, et al: Effect of high dose inhaled fluticasone propionate on airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 45-52.
- 17) National Institutes of Health.: A six-part asthma management program. In: *Global initiative for asthma*, 1995
- 18) National asthma education and prevention program, expert panel report 2: Guidelines for the diagnosis

- and management of asthma, 1997
- 19) in 't Veen JC, de Gouw HW, Smits, HH, et al : Repeatability of cellular and soluble markers of inflammation in induced sputum from patients with asthma. *Eur Respir J* 1996 ; 9 : 2441 - 2447.
- 20) Hudon C, Turcotte H, Laviolette M, et al : Characteristics of bronchial asthma with incomplete reversibility of airflow obstruction. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997 ; 78 : 195 - 202.
- 21) Beasley R, Burgess C, Crane J, et al : Pathology of asthma and its clinical implications. *J Allergy Clin Immunol* 1993 ; 93 : 148 - 154.

Abstract

Eosinophil Count in Induced Sputum Samples as a Marker of Airway Inflammation and Adequacy of Corticosteroid Inhalation Treatment in Asthmatic Patients

Keisuke Tomii, Yoshihisa Matsumura, Yoshio Taguchi,
Kazukiyo Oida and Yoichiro Kobash*

Departments of Respiratory Medicine and Pathology* , Tenri Hospital, Nara, Japan

We tried to use eosinophil counts in induced sputum samples as a marker of airway inflammation, and as a guide for reducing inhaled corticosteroids in patients with well-controlled persistent asthma.

The eosinophil count in induced sputum smears was defined as follows : Eos% ; eosinophil percentage of 200 - 400 leukocytes in properly cell-separated fields, TEC ; total eosinophil counts in the 5 most eosinophil-dense high power view fields ($\times 400$). First, the eosinophil count in induced sputum samples was compared between 29 asthmatic subjects treated with inhaled corticosteroid and 15 age- and sex-matched healthy controls. Second, inhaled corticosteroid was reduced by 50% in 20 patients with green-zone asthma (morning PEF $>$ 80% of patient's best PEF). PEF measurements were followed prospectively for 12 weeks thereafter. Once PEF decreased below 70% of their best PEF, subjects were considered as treatment " failures ".

Both Eos% and TEC were significantly higher than in the controls, even in well-controlled (morning PEF $>$ 80% of their best) asthmatic patients ($p=0.001, 0.03$). The chance of treatment " failure " was significantly higher in those having more eosinophils (Eos $>$ 10%, TEC $>$ 100) in their initial induced sputum sample ($p=0.03, 0.001$).

Airway inflammation still persists in many well-controlled chronic asthmatic patients, and induced sputum eosinophilia predicts an early decrease of PEF after reduction of inhaled corticosteroids.