

気管支喘息患者気管支肺胞洗浄液中の所見に及ぼす Beclomethasone dipropionate の影響

西沢クリニック

滋賀医科大学・麻酔学教室

西澤芳男

The Effect of Beclomethasone Dipropionate Inhala on Cellulal
and Chemical Compornents in Broncho-Alveolar Lavage Fluid
in Patients with Bronchial Asthma

Yoshio Nishizawa

Nishizawa Clinic

The Department of Anesthesiology, Shiga University of
Medical Sience

Cellulal and chemical compornents in Broncho-Alveolar Lavage Fluid (BALF) obtained from patients with bronchial asthma induced with *Dermatophagoides farinae* was studied before and after Beclomethasone dipropionate inhala (BDI) (400 μ g/day, for 8 weeks).

As compared with healthy subjects, in bronchial asthma cases macrophages decreased and lymphocytes, neutrophils, eosinophils and basophiles increased in BALF. In non intractable asthmatic cases, neutrophils decreased and eosinophils increased as compared with intractable asthmatic cases. In peripheral respiratory tract obstructive cases, (\dot{V}_{25} was lower cases.) macrophages, neutrophils and lymphocytes decreased and eosinophils increased. In immediate asthmatic attack after allergen inhalation, neutrophils decreased and eosinophils and basophiles increased. On the other hand late asthmatic attack, these cells increased. Leucotrien (LT) B₄ had good collation with neutrophils chemotaxis in late asthmatic response. LTB₄, LTC₄, LTD₄ and TXB₂ incresed in BALF from asthmatic patients. Concentration of fucose decreased and concentration of albumin increased in BALF from asthmatic patients.

These cellulal and chemical abnormality in BALF was improved by BDI treatment.

Analysis of cellulal and biochemical changes at local asthmatic lesion by BALF is good useful tool for the investigation of asthmatic states. These studies is now underway.

緒言

気管支喘息を研究、治療していく上に於て末梢気道肺胞領域に出現する気道分泌物を検討することは重要な課題の一つである。近年の気管支喘息の研究より組織肥満細胞、好塩基球のみ

ならず好酸球¹⁾、好中球²⁻⁴⁾、単球⁵⁾等の関与も示唆されている。さらにその反応部位に関しても区域気管支の攣縮や浮腫以外に末梢気道の障害を示唆する所見もありchemical mediator(s)の生体局所での関与⁶⁾の検討が今後の重要な課

題の一つである。このことは気道レベルより末梢気道肺泡領域における分泌物の成分解明が重要であることを示唆している。

今回、以上の点を解明していく上で Reynold ら^{7, 8)}の変法として気管支肺胞洗浄法 (Broncho-Alveolar Lavage: 以下 BAL と略す) を健康対症者, 気管支喘息患者に施行し気管支肺胞洗浄液 (Broncho-Alveolar Lavage Fluid: 以下 BALF と略す) 中に含まれる細胞分画, chemical mediator (s) に関して比較分析し, beclomethasone dipropionate inhala (以下 BDI と略す) 使用による細胞成分, chemical mediator(s) の変化についてもあわせ検討したのでこれを報告する。

対象と方法

1) 対象患者

allergen (*Dermatophagoides farinae*) の判明している気管支喘息患者20名 (17~35歳, 平均年齢26.3歳, 男:女=18:2) を対象とし, 正常健康対照者とし同性同年齢のボランティア20名をそれぞれ患者, ボランティア了解の下に本研究に参加してもらった。

2) BALF 採取法

気管支ファイバースコープを挿入, 右中葉 B₄ あるいは B₅ の区域気管支あるいは亜区域気管支にウェッジし, 滅菌した等張生理食塩水を1回に50ml 注入, 吸引操作を行い, この操作を4回反覆, 即ち, 合計200ml の生食で洗浄を行い, BALF を採取した。

3) 細胞分画の検討

遠心分離により液性成分と細胞分画に分類し, メイ・ギムザ染色で細胞種を検討した。

4) BALF 中 leukotrien の測定

BALF 中の leukotriens (以下 LT と略す) 中 LTB₄, LTC₄, LTD₄ は高速液体クロマトグラフィーにより分離した後溶出し radioimmunoassay で測定した。

5) BALF 中 fucose, albumin 濃度の測定

一般検査法によった。

6) 抗原誘発テスト

Dermatophagoides farinae をあらかじめ決

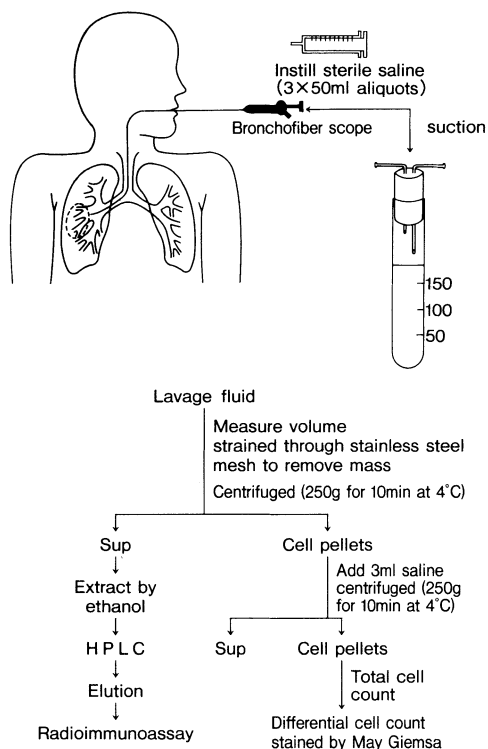


Fig 1 Method of Broncho-Alveolar Lavage and procedure of the method in this experiments

定した閉値濃度 De Vilbiss nebulizer で吸入させ FVC, FEV_{1.0} PFR および喘鳴, 呼吸困難, 胸部聴診でのラ音等を検討した。Dermatophagoides farinae の抗原抽出は Miyamoto らの方法によった。

7) BDI 吸入

BDI 100 μg × 4 回/日を 8 週間吸入したのち, 上記各種検査を施行した。

結果

1) BALF 中出現細胞の分類

正常健康対照群では BALF 中出現細胞は macrophage 90.3 ± 7.8, lymphocyte 9.8 ± 6.2%, neutrophil 1.4 ± 1.0%, eosinophil 1.2 ± 0.7% であった。気管支喘息患者においては macrophage 66.2 ± 21.4%, lymphocyte 14.3 ± 9.8%, neutrophil 5.4 ± 3.2%, eosinophil 19.6 ± 16.8

%であった。気管支喘息患者 BDI 吸入により macrophage $81.6 \pm 10.3\%$, lymphocyte $10.5 \pm 4.2\%$, neutrophil $2.3 \pm 1.4\%$, eosinophil $7.2 \pm 6.6\%$ と特に気管支喘息で健常人に比較し macrophage の減少, neutrophil, eosinophil の増加が認められたが BDI 吸入でこれらの BALF 中出現頻度は減少を認めた (Fig. 2)。また, 難治性, 非難治性気管支喘息に分類すると (各々12名と13名) macrophage, lymphocyte に関して両者間に差はないが neutrophil では難治性群 $9.7 \pm 6.6\%$ に対し, 非難治性群 $4.5 \pm 3.2\%$ と $P < 0.05$ 以下の危険率で有意に高値をしめし, 逆に eosinophil ではそれぞれ $9.8 \pm 6.7\%$, $18.4 \pm 10.3\%$ と ($P < 0.01$) の危険率で非難治群で有意に高かったが, BDI 8 週間 $400 \mu\text{g} / \text{日分} 4$ 吸入を難治群, 非難治群に吸入させるとそれぞれ neutrophil, eosinophil で $4.9 \pm 3.5\%$, $6.7 \pm 2.1\%$, 及び $2.2 \pm 1.3\%$, $3.6 \pm 1.4\%$ と有意 ($P < 0.01\%$) の低下を認めた (Fig. 3)。末梢気道閉塞の指標である \dot{V}_{25} で気管支喘息患者末梢

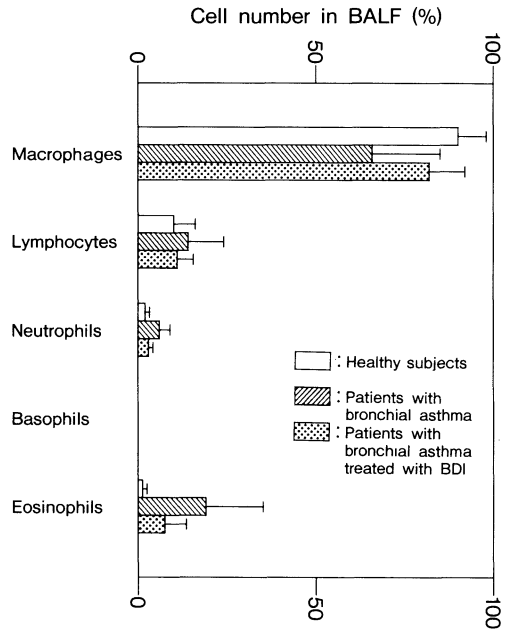


Fig 2 The differential cell count of BALF from patients with bronchial asthma and healthy subjects

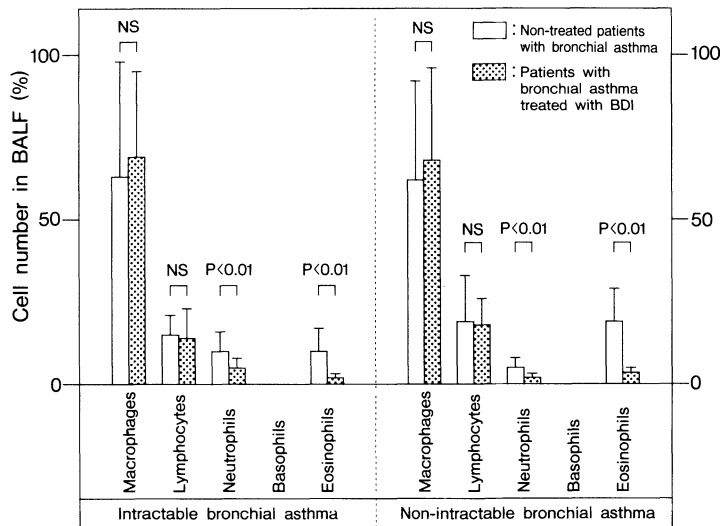


Fig 3 The differential cell count of BALF from patients with bronchial asthma in relation to intractable or non-intractable asthma

気道閉塞程度と BALF 中出現細胞を比較検討した。 \dot{V}_{25} 低値 (15%以下) になる程 macrophage, neutrophil, lymphocyte の比率が増え,

\dot{V}_{25} 高値 (25%以上) となるとこれらの細胞は減少するが eosinophil の有意の増加が認められた。これらの BALF 中細胞分画の比率は BDI

8週 400 μg /日 4 吸入で健常人に近づく改善を見た (Fig. 4)。

2) allergen 吸入時の BALF 中細胞分画

閾値濃度の allergen 吸入試験で immediate asthmatic response (以下 IAR と略す), late asthmatic response (以下 LAR と略す) に分け BALF 中の neutrophil, eosinophil, basophil の出現頻度を検討すると neutrophil, eosinophil, basophil は誘発前それぞれ $2.9 \pm 1.8\%$, $4.6 \pm 3.3\%$, $0.02 \pm 0.01\%$ であったが IAR ではそれぞれ $1.4 \pm 0.9\%$, $5.3 \pm 1.2\%$, $0.32 \pm 0.11\%$ となり, LAR ではそれぞれ $5.9 \pm 5.1\%$, $11.6 \pm 4.4\%$, $0.52 \pm 0.31\%$ と IAR で neutrophil の減少, eosinophil の変化ないこと, basophil の増加が認められ LAR では三者ともすべて有意に増加した。しかし, BDI 400 μg /日, 1日 4 吸入, 8 週間でこれらの変化は総て有意の改善を認めた (Fig. 5)。

3) BALF 中の好中球の割合と LTB_4 の関係

Fig.5 の結果より LAR と neutrophil には何

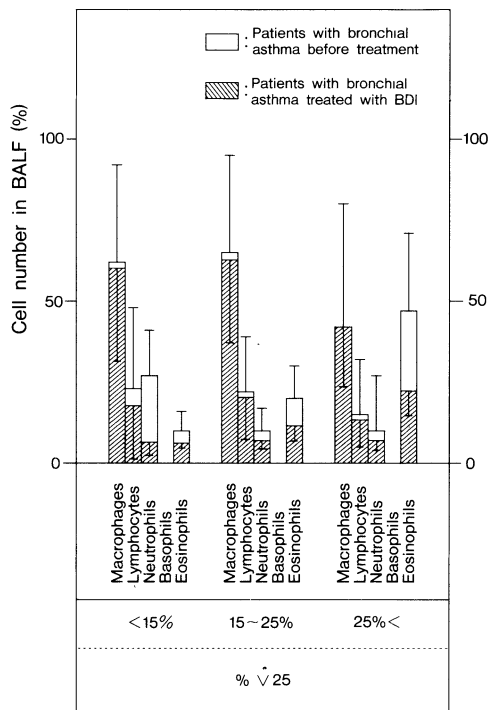


Fig 4 The differential cell count of BALF from patients in bronchial asthma in relation to $\% \dot{V}_{25}$

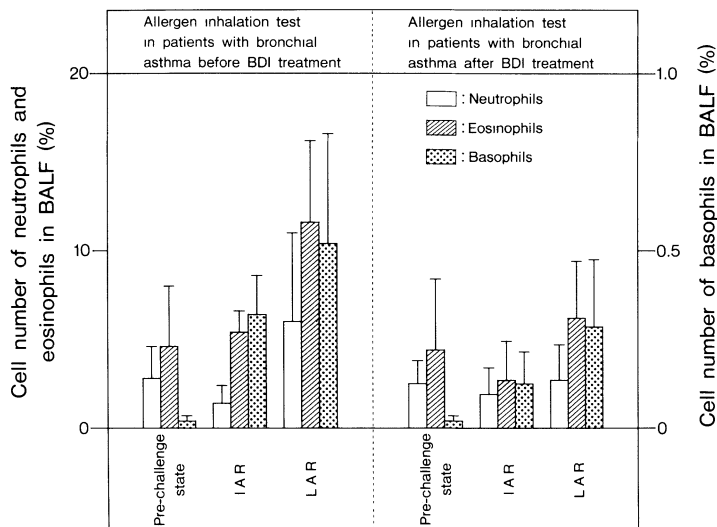


Fig 5 The differential cell count in BALF from patients with bronchial asthma in relation to allergen inhalation test Allergen extracted from *D. farinae* and threshold concentration of allergen to each patient with bronchial asthma used for the inhalation test to the patient.

らかの相関があると考えられたので allergen吸入後の好中球数と LTB_4 の関係を検討すると LTB_4 は IAR から LAR にかけて著しい増加をし

めた。一方、好中球は IAR で減少し LAR で増加した。これらは同様の BDI 吸入で抑制をうけた (Fig. 6)。

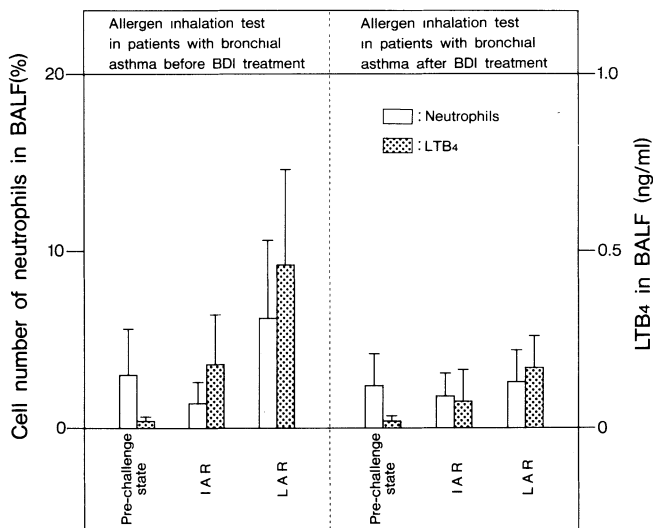


Fig 6 The relationship LTB_4 and cell number of neutrophils in BALF from patients with bronchial asthma after the allergen inhalation test. The allergen inhalation test was done as the exactly same method that was described in Fig 5.

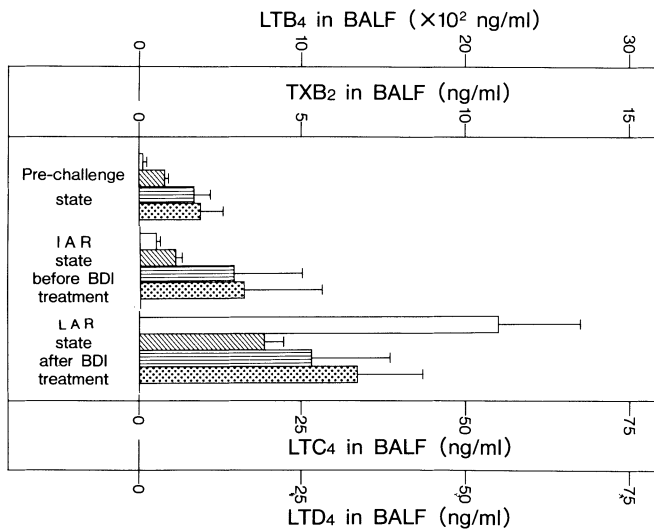


Fig 7 The concentration of LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 and TXB_2 in BALF from patients with bronchial asthma after the allergen inhalation test. The method was as the exactly same that was described in Fig 5.

4) BALF 中の LTB₄, LTC₄, LTD₄, TXB₂ 値
 誘発発作前 BALF 中 LTB₄, LTC₄, LTD₄,
 TXB₂ 値は LTB₄ 0.0013 ± 0.0004 ng/ml, LTC₄
 は 8.7 ± 2.3 ng/ml, LTD₄ は 9.6 ± 3.4 ng/ml,
 TXB₂ は 0.792 ± 0.028 ng/ml であったが, aller-
 gen 誘発後 LTB₄ は 0.22 ± 0.09 ng/ml, LTC₄
 は 26.7 ± 7.6 ng/ml, LTD₄ は 33.6 ± 10.2 ng/

ml, TXB₂ は 3.84 ± 0.62 ng/ml とすべて有意の増
 加をしめた。一方, BDI を同様吸入させてお
 くとそれぞれの値は 0.098 ± 0.022 ng/ml, 14.7
 ± 5.6 ng/ml, 16.3 ± 6.2 ng/ml, 1.08 ± 0.23
 ng/ml と有意の低下をしめた (Fig. 7)。一方,
 気管支喘息発作時5例のこれらの値を測定すると
 Table 1 に認められるように LTB₄, LTC₄, LT

Table 1 The concentration of LTB₄, LTC₄, LTD₄ and TXB₂ in BALF from patients with bronchial asthma

| | | LTB ₄ (×10 ² ng/ml) | TXB ₂ (ng/ml) | LTC ₄ (ng/ml) | LTD ₄ (ng/ml) |
|--------------------------------------|--|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Attack (-) | | 0.154 ± 0.022 | 0.764 ± 0.036 | 8.725 ± 2.619 | 0.9625 ± 0.2943 |
| Attack (+) | | 26.132 ± 4.653 | 3.916 ± 0.687 | 27.163 ± 6.984 | 3.9176 ± 1.1342 |
| Attack (+) after BDI treatment | | 10.983 ± 2.366 | 1.325 ± 0.263 | 10.925 ± 5.718 | 1.4362 ± 0.9147 |

| | Time (hr) | Materials (ml) | LTB ₄ (×10 ² ng/ml) | TXB ₂ (ng/ml) | LTC ₄ (ng/ml) | LTD ₄ (ng/ml) |
|-------------------------|--------------|-------------------|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Before BDI treatment | 0 | 48.7 | 9.325 | 1.96 | 15.13 | 2.166 |
| | 6 | 126.4 | 28.51 | 4.18 | 29.47 | 4.163 |
| | 12 | 1.5 | 0.162 | 0.79 | 8.34 | 0.926 |
| | 18 | 10.3 | 0.826 | 1.22 | 12.11 | 1.347 |
| After BDI treatment | 0 | 21.5 | 0.771 | 1.08 | 10.96 | 1.209 |
| | 6 | 59.7 | 9.715 | 2.26 | 16.23 | 2.254 |
| | 12 | 1.2 | 0.135 | 0.72 | 8.16 | 0.884 |
| | 18 | 7.2 | 0.745 | 0.98 | 10.38 | 1.146 |

D₄, TXB₂ の増加が発作時に認められたが, こ
 れも BDI 投与で有意に抑制され発作は減少した。

5) BALF 中の fucose, albumin 濃度

健常者での BALF 中 fucose, albumin 濃度は
 0.679 ± 0.310 mg/ml 及び 0.74 ± 0.44 mg/ml であ
 った。気管支喘息患者ではそれぞれ 0.203 ± 0.
 176 mg/ml, 6.482 ± 3.926 mg/ml と気管支喘息
 患者では fucose は健常者に比較して有意に低値
 をしめし albumin は有意の高値をしめた。し
 かし, これらの異常値もまた BDI 400 µg/日, 1
 日4吸入, 8週使用で改善をしめた (Fig. 8, 9)。

考 察

本論文においては気管支喘息患者に BAL を

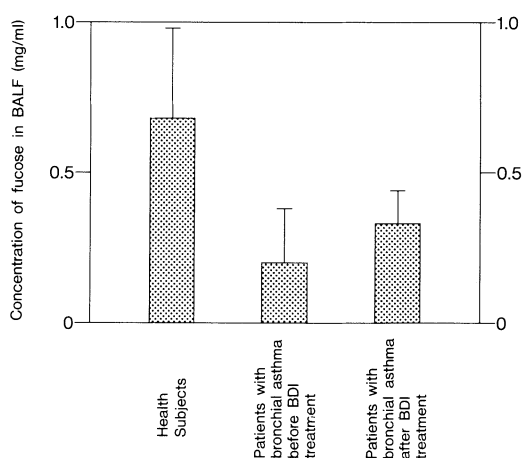


Fig 8 The concentration of fucose in BALF from patients with bronchial asthma

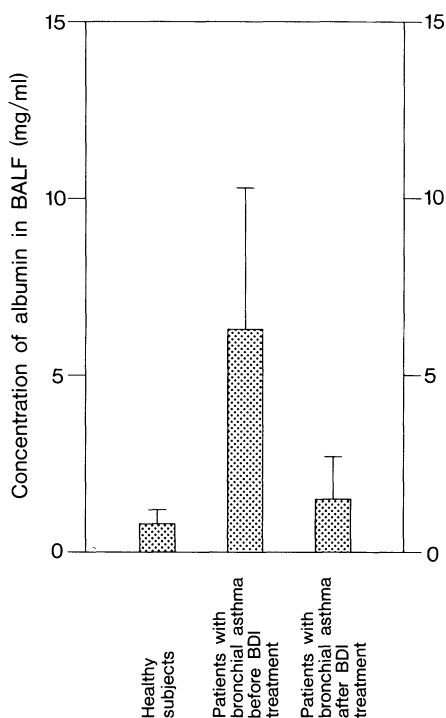


Fig 9 The concentration of albumin in BALF from patients with bronchial asthma

行い BALF 中の細胞分画, leukotrien 及び BALF 性状に関し検討し BDI のこれらに対する改善効果を検討した。

従来気道アレルギー反応局所を反映する現象を検討するため生体よりえられた材料は喀痰⁹⁻¹²⁾, カフ付メトラのカテーテル¹³⁾あるいは気管支ファイバースコープ¹⁴⁾を用いた気管支洗浄液等がもちいられてきた。しかし, これらの方法でえられる細胞成分や液性成分の絶体量は極めて少く気道アレルギー反応局所を反映する現象をとらえるのには困難さがあつた。また, これらの方法では気道成分しか検討できず, 実際気管支喘息反応の局所となる肺胞レベルでの成分分析には不向きであつた。

Raynolds ら^{7,8)}により開発された BAL はこれらの欠点を補い肺胞レベルでの気管支喘息発作の局所状態を分析するに必要な BALF がえられる。即ち従来の喀痰の検索^{9,10)} 気管支肺洗浄法^{13,14)}では良好な結果がえられなかつた。

また, 注入洗浄液が増えると洗浄液回収率, 細胞総数は増加するといわれているがその細胞分画, 成分はほとんど変わらないといわれている¹⁵⁾。

Fig. 2 にしめすごとく洗浄液中 macrophage が出現細胞の大部分をしめたことは本法が肺胞末梢気道領域への出現細胞及び病態をよく反映していることを示唆する¹⁶⁾。

Fig. 3, 4 にみられるごとく末梢気道抵抗の大きい場合や非難治性群では eosinophil が BALF 中に多く認められることは近年唱えられている eosinophil の気管支喘息発作との関連を示唆するもので興味深い¹⁷⁾。

一方, Fig. 5 に認められる allergen 吸入テスト時に eosinophil や basophil の出現は当然と考えられるが IAR や LAR で basophil が増加することは木村ら¹⁸⁾の喀痰を用いた解析や Patterson ら^{19,20)}の赤毛ザルの BAL 所見, ヒト BAL 所見からもいわれているが, basophil が IAR や LAR で asthma attack の主役を果すにしてはその細胞数が少いと考えられる。これは eosinophil が吸引等の機械的操作やその他理由で破壊されやすいこと等が理由として考えられ, 今後 disodium cromoglycate やその他の脱顆粒抑制剤使用下での BALF 採取を考慮する必要がある。また, LAR で eosinophil や neutrophil が多く BALF 中に認められることは今後の LAR の研究上重要な課題となると思われる。

Fig. 5 に認められる LAR における LTB₄, LTC₄, LTD₄ の BALF 中の増加と neutrophil, eosinophil の増加は今後の検討をまつべきであるが上述の LAR の発症と関連し興味ある問題であり今後検討したい。

Fig 6 にしめした気管支喘息発作時の BALF 中 LTB₄, LTC₄, LTD₄, TXB₂ の増加は今後肺胞—末梢気管支での気管支喘息誘発を考えていく上で興味ある結果である。即ち, ヒト気管支組織の粘液糖蛋白分泌の亢進 (Fig. 8, 9) はヒトやイヌ遊離気管支に LTD₄, LTC₄ を in vitro や in vivo で与えることでよく知られており Fig. 6, 7 の結果や Fig. 8, 9 の結果はこれら in vitro, in vivo での LTD₄, LTC₄ の気管支喘息発症機序の作用をよく反映しているといえよう。

今後、BAL による BALF を使用しヒト in vivo での気管支喘息発症機序を検討したい。

また、BDI がこれら気管支喘息状態のすべての点を改善したことは国分らの BDI による気道過敏性へ及ぼす影響をよく反映しており BDI の有用性を裏付けるものといえよう²³⁾。この点に関しても BALF 中の気道分泌物の点から解析をすすめている²⁴⁾。

附記

なお本研究での BDI はベコタイト[®]を使用した。

文 献

- 1) 鳥居敏明, 末石 真, 金井英夫, 富岡玖夫, 熊谷 朗: ラット好酸球よりの Arylsulfatase 遊離の機序: アレルギー, 32: 87~94, 1983
- 2) Orange, R. P., Murphy, R. C., Karnovsk, M. L. and Austen, K. F.: The physicochemical characteristics and purification of slow reactive substance of anaphylaxis. *J. Immunol.* 110, 760~770, 1973
- 3) Conroy, M. C., Orange, R. P. and Lichtenstein, L. M.: Release of slow reacting substance of anaphylaxis from human leukocytes by calcium ionophore A 23187. *J. Immunol.* 116: 1677~1681, 1976
- 4) 吉田象二, 富岡玖夫, 熊谷 朗: ヒト白血球由来の Slow Reactive Substance (SRS) に関する研究. 第 I 報; ヒト多核白血球よりの Slow reactive substance の遊離, アレルギー, 29: 179~186, 1980
- 5) 赤木克己, 谷崎勝朗, 齊藤勝剛, 高橋 清, 上田鴨男, 佐藤周一: 気管支喘息の喀痰中における好塩基球の出現について—重症難治性喘息を中心に, アレルギー, 25: 20~25, 1976
- 6) 富岡玖夫: アレルギー性メディエーター遊離におけるフィドバック機構, 代謝, 17: 2041~2055, 1980
- 7) Raynolds, H. Y. and Newball, H. H.: Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. *J. Lab. Clin. Med.* 84: 559~573, 1974
- 8) Raynolds, H. Y.: Analysis of cellular and protein content of bronchoalveolar lavage fluid from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and chronic hypersensitivity pneumonitis. *J. Clin. Invest.* 59: 165~175, 1977
- 9) Chodosh, S.: Examinations of sputum cells. *N. Engl. J. Med.* 282: 854~857, 1970
- 10) 木村郁郎, 谷崎勝朗, 齊藤勝剛, 高橋 清, 上田鴨男, 佐藤周一: 気管支喘息の喀痰中における好塩基球の出現について—重症難治性喘息を中心に—, アレルギー, 25: 20~25, 1976
- 11) Thomas, H. V. and Simmons, E.: Histamine content in sputum from allergic and non allergic individuals. *J. Appl. Physiol.* 26: 793~797, 1969
- 12) Ishizaka, K. and Newcomb, R. W.: Presence of rE in nasal washings and sputum from asthmatic patients. *J. Allergy* 46: 197~204, 1970
- 13) Finley, T. N., Swenson, E. W., Curran, W. S., Huber, G. L. and Landman A. J.: Bronchopulmonary lavage in normal subjects and obstructive lung disease. *Ann. Internal. Med.* 66: 651~658, 1967
- 14) Petterson, R., McKenna, J. M., Suzako, I. M., Solliday, N. H., Pruzansky, J. J., Roberts, M. and Koehoe, T. J.: Living histamine-containing cells from the bronchial lumens of humans—description and comparison of histamin content with cells of rhesus monkeys. *J. Clin. Invest.* 59: 217~225, 1977
- 15) Davis, G. S., Low R. B. and Visco, G.: Comparative analysis of sequential samples in human pulmonary lavage.

- Am. Rev. Resp. Dis. 17 : 327~337, 1978
- 16) 木村郁郎：気管支肺胞洗浄法：免疫と疾患，
4 : 329~336, 1982
- 17) 木村郁郎：遅発アレルギーの発症機序：細胞反応を中心に，第3回免疫薬理シンポジウム議事録 pp 23~40, 医薬ジャーナル社 1985
- 18) 木村郁郎，谷崎勝郎，高橋 清，上田鴨男，齊藤勝剛，佐藤周一：気管支喘息における抗免疫グロブリンに対する好塩基球の反応性について—抗ヒト IgG に対する反応性よりみた喘息分類の可能性—，アレルギー，25 : 70~75, 1976
- 19) Patterson, R., Tomita, Y. Oh, S.H., Suzako, I.M. and Pruzansky J. J. : Respiratory mast cells and basophiloid cells I. Evidence that they are secreted into bronchial lumen, morphology, degranulation and histamin release. Clin. Exp. Immunol. 16 : 223~233, 1974
- 20) Tomita, Y., Patterson, R. and Suzako, I. M. : Respiratory mast cells and basophiloid cells II. Effect of pharmacologic agents on 3,5²-adenosine monophosphate content and on antigen-induced histamine release. Int. Arch Allergy. 47 : 261~272, 1974
- 21) Marom, Z., Shelhamer J. H., Bach. M. K., Morton, D. R. and Kaliner. M. : Slow reacting substances, Leukotriens C₄ and D₄ increased the release of mucus from human airway in vitro. : Am. Rev. Respir. Dis. 128 : 449~459, 1982
- 22) Coles S. J., Neill. K. H., Reid. L. M., Auten, K. F., Nil, Y., Corery, E. J. and Lawls. R.A. : Effect of leukotriene C₄ and D₄ on glycoprotein and lysozyme secretion by human bronchial mucosa. Prostaglandins 25 : 155~170, 1983
- 23) 国分二三男，足立 満，飯島正之，高橋正三：ステロイド薬の気道過敏症におよぼす影響；Beclomethasone Dipropionateの吸入療法を中心として，アレルギー，33 : 403~410, 1984
- 24) Nishizawa, Y. : Analysis of cellular and protein content of broncho-alveolar lava ge fluid from patient with asthma bronchiale. Effect of Beclomethasone Dipropionate on these condition (Manuscript in preparation)