



気管支喘息管理における硫化水素測定の意味

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-01-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 康仁 メールアドレス: 所属:
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000147

福島県立医科大学大学院医学研究科

博士課程 医学専攻 呼吸器病態学

博士学位論文

(タイトル)

気管支喘息管理における硫化水素測定の意義

2015 年 10 月

(申請者氏名)

鈴木 康仁

目次	頁
1. 略語	2
2. 概要	3
3. 背景	6
4. 目的	8
5. 対象と方法	9
5-1. 対象	9
5-2. 研究デザイン	10
5-3. 喘息コントロールの評価	11
5-4. 喘息発作の定義	11
5-5. 呼吸機能検査	12
5-6. 気道過敏性検査	12
5-7. FeNO 測定	13
5-8. 血清採取とプロセス	13
5-9. 喀痰採取とプロセス	14
5-10. H ₂ S 濃度測定	14
5-11. 統計解析	15
6. 結果	17

6-1. 患者背景	17
6-2. 健常者と喘息患者の血清および喀痰 H_2S 濃度	17
6-3. 喘息コントロール状態における血清 H_2S 濃度の関係	18
6-4. 血清および喀痰 H_2S 濃度と喘息関連指標との関係	18
6-5. コントロール不良または喘息発作を予測するための血清 H_2S 濃度 cutoff値	19
7. 考察	20
8. 結語	29
9. 謝辞	30
10. 引用文献	31
11. Table, Figure legend	42
11-1. Table 1	42
11-2. Table 2	43
11-3. Table 3	44
11-4. Figure legend	45

略語

ACT: Asthma control test

ATS: American Thoracic Society

AUC: Area under the curve

CBS: Cystathionine β -synthase

CI: Confidence interval

CO: Carbon monoxide

COPD: Chronic obstructive pulmonary disease

CSE: Cystathionine γ -lyase

Dmin: Minimum dose

DTT: Dithiothreitol

ERS: European Respiratory Society

FeNO: Fractional exhaled nitric oxide

FEV₁: Forced expiratory volume in one second

FVC: Forced vital capacity

GINA: Global Initiative for Asthma.

GR: Glutathione reductase

H₂S: Hydrogen sulfide

ICS: Inhaled corticosteroid

LABA: Long-acting β -agonist

3-MST: 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase

NO: Nitric oxide

OVA: Ovalbumin

PAG: Propargylglycine

PBS: Phosphate buffered saline

PEF: Peak expiratory flow

ROC: Receiver operating characteristic curve

RSS: Reactive sulfur species

SAOB: Sulfide antioxidant buffer

SOD: Superoxide dismutase

【概要】

気管支喘息(以下, 喘息)は慢性の気道炎症を背景に生じた可逆性気流閉塞と非特異的気道過敏性で特徴付けられる慢性呼吸器疾患と定義される. これまで, 喘息における慢性気道炎症は好酸球やリンパ球, マスト細胞が主体とされてきたが, 最近では炎症細胞のプロファイルにも好酸球優位型と非好酸球優位型である好中球優位型, 顆粒球寡少型にフェノタイプが分類され, 治療反応性や予後に大きく関連していることがわかってきた. 近年, 好酸球優位型喘息のバイオマーカーとして呼気一酸化窒素やペリオスチンが注目され, 喘息の診断および管理指標としての有用性が期待されている. 一方で, 非好酸球優位型喘息のフェノタイプを検出し, 喘息の病態とも関連を示す有用なバイオマーカーは現時点で報告がない.

硫化水素(H_2S)は無色, 水溶性で腐卵臭がする揮発性ガスである. H_2S には外因性と内因性の2種類が存在し, 外因性 H_2S は火山性ガスや温泉の成分として有名である. 一方, 内因性 H_2S はヒトの生体内でも産生されており, 肺においては各種肺構成細胞から産生されと考えられている. 肺において H_2S は, 気道平滑筋の増殖抑制や気管支収縮の抑制など様々な作用を担っていることが示唆されている. 一方, 臨床的に H_2S 濃度と呼吸器疾患の関係を検討した報告は少ない. 以前我々は, 血清および喀痰 H_2S 濃度が健常者と比較して非発作期喘息患者で上昇することを報告した. しかし, H_2S が喘息の病勢(発作状態やコントロール状態)をどのように反映しているか

は明らかでない.

今回, 我々は喘息患者における非発作期および発作期の血清・喀痰 H_2S 濃度や喘息患者のコントロール状態における血清 H_2S 濃度の変化, 喘息の疾患活動性指標と血清・喀痰 H_2S 濃度との関係について検討した.

結果は, 血清 H_2S 濃度は喘息患者の非発作期では健常者と比べ有意に高値, 発作期では非発作期と比べ有意に低値で健常者と同程度であった. また喀痰 H_2S 濃度は喘息患者の発作期では健常者と比べ有意に高値で, 非発作期と比べても高い傾向にあった. 同一喘息患者における血清 H_2S 濃度の比較では, 非発作期に比べ発作期で有意に低下した. また, コントロール不良な喘息患者の血清 H_2S 濃度はコントロール良好な喘息患者の血清 H_2S 濃度と比べ有意に低値であった. 血清および喀痰 H_2S 濃度と喘息関連指標との検討では, 喀痰好中球分画が喀痰 H_2S 濃度と関連していた.

今回我々は, 発作期喘息患者およびコントロール状態に分けた非発作期喘息患者の H_2S 濃度について初めて報告し, コントロール不良喘息もしくは喘息発作を起こしやすい状態では血清 H_2S 濃度が低下し, 喀痰 H_2S 濃度が好中球性気道炎症と関連していることが示唆された. H_2S が肺や気道でどのような病態生理学的役割を担っているかについては現時点で明らかとなっていないが, これまでに報告されている *In vitro* および *in vivo* での実験結果を踏まえると, 喘息発作状態やコントロール不良状

態, 即ち気道炎症が増強した状態では, 気道中での H_2S 産生が亢進するか, もしくは血中の H_2S が気道に流入することで, H_2S が抗炎症作用や抗酸化作用を発揮している可能性が考えられた.

結論として, 血清および喀痰 H_2S 濃度測定は喘息のコントロール状態や発作の予測因子として, 更には, 喘息患者における好中球優位型喘息のフェノタイプを分類する新規バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された.

【背景】

気管支喘息(以下, 喘息)は慢性の気道炎症を背景に生じた可逆性気流閉塞と非特異的気道過敏性で特徴付けられる慢性呼吸器疾患と定義される^{1, 2)}. これまで, 喘息における慢性気道炎症は好酸球やリンパ球, マスト細胞が主体とされてきた. しかし, 最近では炎症細胞のプロファイルにも好酸球優位型と非好酸球優位型である好中球優位型, 顆粒球寡少型にフェノタイプが分類され, 治療反応性や予後に大きく関連していることがわかってきた³⁾. 例えば, 好酸球優位型の喘息はステロイドに対する反応性が良好であるが, 好中球優位型の喘息ではステロイドに対する反応が不良で重症難治化する喘息患者が多いとされる^{4, 5)}. 更にMoorらは, 米国の喘息患者コホート(severe asthma research program:SARP)の対象を用いて, 喀痰中炎症細胞のパターンによるクラスター分類を行ったところ, 好酸球が優位なタイプには軽症から中等症喘息患者が多いが, 好中球優位な喘息には呼吸機能が低く, 高用量吸入ステロイドや経口ステロイドが必要な重症患者が多いことを報告している⁶⁾. よって, 気道炎症のフェノタイプを簡便に把握することができるバイオマーカーが存在すれば, 多様性のある喘息の病態をより正確に把握することが可能になると考える.

近年, 好酸球優位型喘息の簡便かつ鋭敏で非侵襲的なバイオマーカーとして呼気一酸化窒素濃度(fractional exhaled nitric oxide: FeNO)^{7, 8, 9)}やペリオスチン¹⁰⁾が注目され, 喘息の診断指標としてだけでなく, ステロイドやOmalizumab,

Mepolizumab, Lebrikizumab等の生物学的製剤の治療効果予測指標としての有用性も期待されている^{11, 12, 13, 14, 15)}。その一方で、喘息の病態生理学的特徴を反映し、かつ非好酸球優位型喘息のフェノタイプを簡便かつ鋭敏に検出し、喘息の病態とも関連を示す有用なバイオマーカーは現時点で報告がない。

硫化水素(H₂S)は、無色、水溶性で腐卵臭がする揮発性ガスであり、一酸化窒素(nitric oxide:NO)や一酸化炭素(carbon monoxide:CO)に次ぐ第3のガス伝達物質として注目されている¹⁶⁾。H₂Sには外因性と内因性の2種類が存在し、外因性H₂Sは火山性ガスや温泉の成分、ディーゼル車から排気される粒子物質として有名である。一方、内因性H₂Sはヒトの生体内からも微量ながら産生されており、肺においてH₂Sは肺血管平滑筋、血管内皮細胞、気道平滑筋などの各種肺構成細胞から産生されると考えられている¹⁷⁾。その産生経路は、細胞内にある含硫アミノ酸のシステイン、ホモシステイン、シスタチオニンを基質として、H₂S合成酵素であるシスタチオニンβシンターゼ(cystathionine β-synthase: CBS)、シスタチオニンγリアーゼ(cystathionine γ-lyase: CSE)、3-メルカプトピルビン酸サルファートランスフェラーゼ(3-mercaptopyruvate sulfurtransferase: 3-MST)から産生される酵素誘導経路と、グルコースと硫黄元素単体(S₀)による反応($2C_6H_{12}O_6 + 6S_0 + 3H_2O \rightarrow 3C_3H_6O_3 + 6H_2S + 3CO_2$)で生じる非酵素誘導経路の2つがあると考えられている^{16, 18)}。

肺におけるH₂Sの役割については、in vitroおよびin vivoにおけるこれまでの報告

から、気道平滑筋の増殖抑制や気管支収縮の抑制、筋線維芽細胞の遊走抑制や上皮間葉移行の抑制といった作用があることがわかっている^{16, 19, 20, 21)}。一方、臨床的にH₂S濃度と呼吸器疾患の関係を検討した報告は少ない。以前に我々は、非発作期の喘息患者における血清および喀痰H₂S濃度が健常者よりも上昇し、気流閉塞の程度や喀痰好中球分画と相関することを報告した²²⁾。この結果はH₂Sが好中球性の気道炎症を反映するバイオマーカーとなる可能性を示唆している。しかし、これまでにH₂Sと喘息の病勢、すなわち喘息の発作状態やコントロール状態における血清および喀痰H₂S濃度との関係については明らかとなっていない。

【目的】

今回、我々は①喘息患者における非発作期および発作期の血清・喀痰 H₂S 濃度およびその変化、②喘息患者のコントロール状態における血清 H₂S 濃度の変化、③喘息の疾患活動性指標として用いられる自覚症状、呼吸機能、血清・喀痰炎症細胞分画と血清・喀痰 H₂S 濃度との関係について検討した。

【対象と方法】

＜対象＞

2014 年 1 月から 2015 年 9 月の間に福島県立医科大学附属病院呼吸器内科を受診した非発作期の喘息患者 55 名と発作期の喘息患者 23 名, そして学内ボランティアの健常者 15 名を対象とした.

対象者から現喫煙者, 慢性閉塞性肺疾患や間質性肺炎, 気道感染症, 肺腫瘍など他の呼吸器疾患を合併した患者, 妊婦喘息は除外した.

喘息の診断は GINA ガイドライン¹⁾および本邦の喘息・管理ガイドライン²⁾に基づいて行った. 具体的には, 呼吸器症状(反復する咳嗽・喘鳴・発作性の呼吸困難など)に加えて, メサコリン負荷による気道過敏性検査陽性 (minimum dose: $D_{min} \leq 12.5$), 気管支拡張薬(サルブタノール)投与前後もしくは治療前後の 1 秒量 (forced expiratory volume in one second: FEV_1) が 200ml 以上かつ 12%以上の改善, 喀痰中の好酸球分画が 3%以上²³⁾のいずれか 1 つ以上を満たした対象を喘息と診断した.

健常者は喫煙歴が 5pack-year 未満で最終喫煙から 1 年以上経過しており, 呼吸器疾患の合併や 4 週間以内の呼吸器感染症罹患がなく, 呼吸機能検査が正常な者を対象とした.

本研究は, 福島県立医科大学医学部倫理委員会の承認を得ており, 同意の得られ

た対象に対してのみ検査を施行した(倫理委員会承認番号:1719, UMIN:000010509).

<研究デザイン>

本研究は横断的観察研究(cross-sectional observational study)である. 健常者に対しては, エントリー時に呼吸機能検査, 血液検査, 誘発喀痰採取, 呼気一酸化窒素濃度(FeNO)測定を行った. 喘息患者に対しては, エントリー時に呼吸機能検査, 血液検査, 誘発喀痰採取, FeNO 測定, 喘息コントロールテスト(asthma control test:ACT)を行うとともに, ガイドラインの評価基準に従って喘息コントロール状態の評価を行った. そして, 健常者と非発作期の喘息患者および発作期の喘息患者に対して血清・喀痰 H₂S 濃度を測定した. なお 13 名の喘息患者に対しては非発作期及び発作期の二点で血液採取を行い, 血清 H₂S 濃度を測定した. また, 血清および喀痰 H₂S 濃度と喘息関連指標(自覚症状や呼吸機能, 血清・喀痰炎症細胞分画, FeNO 値)との関係について検討した. なお後述のように喘息発作期の血清および喀痰 H₂S 濃度は非発作期とは別の変化をきたすため, 血清および喀痰 H₂S 濃度と喘息関連指標との関係は非発作期の喘息患者と健常者を対象に検討した. 最後に, コントロール不良または喘息発作が生じる可能性が高い患者を予測するための血清 H₂S 濃度の cutoff 値について検討した.

<喘息コントロールの評価>

喘息コントロールの評価は GINA ガイドライン¹⁾および本邦の喘息予防管理ガイドライン²⁾に従って行った。具体的には、①日中及び夜間の喘息症状が1週間に1回以上、②運動を含む活動の制限、③短時間作用性 β_2 刺激薬などの発作治療薬の使用、④呼吸機能検査における FEV₁ あるいはピークフロー (peak expiratory flow: PEF) が予測値または自己最良値の 80%未満、⑤PEF の日内または週内変動が 20%以上の 5 項目のうち該当する項目が 2 項目以下の場合をコントロール良、3 項目以上の場合をコントロール不良とした。

<喘息発作の定義>

ATS/ERS (American Thoracic Society/European Respiratory Society)で提唱されている喘息発作の定義に従った²⁴⁾。重度喘息発作は、新規経口ステロイド投与、または維持量以上の経口ステロイド増量が少なくとも3日以上必要な場合、または喘息発作で救急外来を受診または入院し、全身性コルチコステロイド薬の投与が必要であった場合と定義した。中等度喘息発作は、①喘息症状の悪化、②PEF の低下、③レスキューのための気管支拡張薬使用のいずれか1項目以上が2日以上にわたり認められた場合と定義した。そして、本研究での喘息発作対象は中等度以上の発作

を起こした対象とした.

<呼吸機能検査>

呼吸機能測定は呼吸機能検査ガイドライン²⁵⁾に準じて, CHESTAC-8900® (CHEST 株式会社, 東京, 日本)を用いて, ノーズクリップをして立位にて, 熟練した臨床検査技師が施行した. そして努力性肺活量(forced vital capacity:FVC), 予測努力性肺活量(%FVC), 1 秒量 (forced expiratory volume in one second: FEV₁), 予測 1 秒量(%FEV₁), 1 秒率(FEV₁/FVC), ピークフロー(peak expiratory flow:PEF), 予測ピークフロー(%PEF)を用いて評価した.

<気道過敏性検査>

メサコリン吸入による気道過敏性試験は Jupiter 21®(CHEST 株式会社, 東京, 日本)を用いてアストグラフ法にて行った²⁶⁾. まず初めにコントロールの生理食塩水から吸入を開始し, 初期呼吸抵抗値を測定した. 次に気道平滑筋収縮作用を持つメサコリンを 2 倍希釈系列(49 µg/mL, 98 µg/mL, 195 µg/mL, 390 µg/mL, 781 µg/mL, 1563 µg/mL, 3125 µg/mL, 6250 µg/mL, 12500 µg/mL, 25000 µg/mL)で低濃度から 1 分間ずつ連続吸入させて, 呼吸抵抗値が上昇を開始する時点までのメサコリンの累積投与量を minimum dose:Dmin として Dmin<12.5 単位であった場合を気

道過敏性陽性とした²⁷⁾。なお、呼吸抵抗値が2倍になるまで吸入を続け、呼吸抵抗値が2倍になった時点で気管支拡張薬を吸入させ、呼吸抵抗値が初期値まで改善したことを確認して検査は終了とした。

<FeNO 測定>

FeNO 測定は、据え置き型の FeNO 測定器である NA-623N®(紀本電子工業株式会社, 大阪, 日本)を用いて, ATS/ERS のガイドラインに従い行った²⁸⁾。対象者は、座位にてノーズクリップをせずに安静換気をした後、最大吸気位から口腔内圧が 16cmH₂O, 呼出流速が 50ml/sec と一定になるように圧モニターを見ながら約 10 秒間呼出した。そして、モニター上の FeNO 濃度が一定になった所を FeNO 値として採用した。なお、測定は誤差が 10%以内になるように 3 回測定し、その平均値を測定値とした。

<血清採取とプロセス>

採取した 10ml の血液を遠心分離(3000rpm, 10 分間)し、得られた血清 1ml に酸化防止用の硫化物抗酸化緩衝液(sulfide antioxidant buffer:SAOB, Thermo Fisher Scientific 社, Beverly, USA)を 1ml 加えたのち、-80℃で冷凍保存した。残りの血清はエッペンドルフチューブに 1ml ずつ小分けにし、同様に-80℃で冷凍

保存した. なお SAOB は SAOB-B (アスコルビン酸) 1g を SAOB-A (水酸化ナトリウム; 2M とエチレンジアミン四酢酸; 0.2M) 28ml で溶解し作成した.

<喀痰採取とプロセス>

対象者に超音波ネブライザーを用いて 5% 高張食塩水を最長 30 分間吸入させ喀痰を採取した. 採取した喀痰は標準法に従って 2 時間以内に処理した²⁹⁾. まず, 喀痰の重量を測定し, その 4 倍の 0.1% DTT(dithiothreitol)および PBS(phosphate buffered saline)を加えた. 続いてナイロンガーゼを用いて細胞残屑を濾した後に遠心分離(3500rpm, 10 分間)し, 喀痰細胞成分と上清を分離した. 分離した喀痰上清は, 酸化防止のために直ちに SAOB を加えて -80°C で冷凍保存した. 細胞成分については PBS を加えて再溶解したのち, 血球計算版を用いて総細胞数をカウントした. そして, 検体 100 μl をサイトスピン(Auto Smear CF-120: サクラファインテックジャパン株式会社, 東京, 日本)を用いて遠心(700rpm, 5 分間)してスライドガラスを作成したのち, Diff Quick 染色を行い炎症細胞分画のカウントを行った. なお, 炎症細胞分画は少なくとも 400 個の細胞をカウントしてその割合を算出した.

<H₂S 濃度測定>

血清および喀痰 H₂S 濃度は硫化銀電極(Model 9616; Thermo Fisher

Scientific 社, Beverly, USA)を用いて測定マニュアルに従い測定した. 血清 H_2S 濃度測定には, $\text{NaSH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (硫化水素ナトリウム水和物; SIGMA-ALDRICH JAPAN 合同会社, 東京, 日本)と生理食塩水を用いて, 250 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM , 10 μM の濃度の溶液を作成したのち, 検体処理と同様に同量の SAOB を加えてスタンダード溶液を作成した. そして, 濃度の低いスタンダード溶液から順に硫化銀電極に浸して mV モードで測定しスタンダード曲線を作成した. 一方, 喀痰 H_2S 濃度測定の際には, DTT 溶液の H_2S 濃度に及ぼす影響を最小限にするため, 生理食塩水の代わりに 0.1%DTT 溶液を用いてスタンダード溶液を作成し, 上述の方法にてスタンダード曲線を作成した. 引き続き, 患者血清および喀痰の H_2S 濃度測定を行った. 測定は 2 回行い, その平均 mV 値を測定値として採用した. 最終的に得られた mV 値をスタンダード曲線に当てはめることで各検体の H_2S 濃度を算出した. なお, 本測定方法のバリデーション(再現性, 正確性および検体保存の影響)については既に確認し報告している²²⁾.

<統計解析>

統計解析および図の作成は SPSS for Windows (version 21, IBM 社, IL, USA) および Graph Pad Prism (version 5, GraphPad Software 社, San Diego, USA) を用いて行った. データは中央値 (25 パーセンタイル, 75 パーセンタイル) にて示した.

非正規分布のデータは対数変換を行い正規分布することを確認してから検討した. 異なる 2 群間の比較は Mann-Whitney 検定と χ^2 乗検定を, 異なる 3 群間の比較では Bonferroni 法による一元配置分散分析法 (ANOVA) を, 同一気管支喘息患者のペア検定には Wilcoxon matched-pairs signed rank 検定を用いて行った. 連続した 2 変数の相関については Pearson の相関を用いて検討した. そして, 最終的には $p < 0.05$ となった因子と H_2S 濃度に影響を与えることが予想される年齢, 性別, 身長, 体重の因子を加え, 多変量線形回帰分析を行って H_2S と独立して関連のある因子の検討を行った. 最後に, ROC (receiver operating characteristic curve) 曲線を用いてコントロール不良喘息患者および喘息発作を起こしている患者を予測するための血清 H_2S の cutoff 値を求め, AUC (area under the curve) と感度, 特異度を用いて示した. なお, 両側 p 値 < 0.05 を統計学的に有意とした.

【結果】

<患者背景>

非発作期喘息患者 55 名, 発作期喘息患者 23 名, 健常者 15 名の背景を Table 1 に示す. 非発作期喘息患者は健常者と比べて高齢, 低身長, 喀痰中マクロファージ比率の低下, 喀痰中好中球比率の増加, FeNO 値の上昇および FEV₁/FVC の有意な低下を認めた ($p<0.05$). 発作期喘息患者では健常者と比べて女性比率が高く, 高齢, 低身長, 喀痰中マクロファージ比率の低下, 喀痰中好中球および好酸球比率の増加, FeNO 値の上昇, %FVC, %FEV₁ および FEV₁/FVC の有意な低下を認めた ($p<0.05$). なお, 発作期と非発作期の間に有意な差は認められなかった.

<健常者と喘息患者の血清および喀痰 H₂S 濃度>

非発作期喘息患者の血清 H₂S 濃度 (105(66.8,175) μ M) は健常者 (55.4(52.3,68.8) μ M) と比べ有意に高値であった ($p=0.003$). 一方, 発作期喘息患者の血清 H₂S 濃度 (60.6(48.3,102) μ M) は非発作期喘息患者と比べて有意に低値を示した ($p=0.009$) (Figure 1).

同時に採取した喀痰の H₂S 濃度も同様に検討したところ, 発作期喘息患者の喀痰 H₂S 濃度 (26.4(22.0,41.4) μ M) は, 健常者 (13.0(9.9,15.6) μ M) と比べて有意に高く ($p=0.017$), 非発作期喘息患者 (15.2(10.1,22.1) μ M) と比べても高い傾向にあった

($p=0.084$) (Figure 2).

同一喘息患者 13 人における非発作期と発作期の血清 H_2S 濃度の比較では, 非発作期に比べて発作期の血清 H_2S 濃度が有意に低下した($p=0.035$) (Figure 3).

<喘息コントロール状態における血清 H_2S 濃度の関係>

非発作期喘息患者 55 人のうちコントロール良な喘息患者は 43 名, コントロール不良な喘息患者は 12 名であった. コントロール不良喘息患者の血清 H_2S 濃度 ($66.0(44.5,99.7)\mu M$) はコントロール良な喘息患者の血清 H_2S 濃度 ($121(87.0,186)\mu M$) と比べ有意に低値であった($p=0.009$) (Figure 4).

<血清および喀痰 H_2S 濃度と喘息関連指標との関係>

血清 H_2S 濃度は年齢と有意な正の相関を($r=0.275$, $p=0.024$), 身長とは有意な負の相関を($r=-0.286$, $p=0.020$), FEV_1/FVC とも有意な負の相関を認めた($r=-0.293$, $p=0.024$). その他, 血中および喀痰中の炎症細胞分画, FeNO, ACT スコアとの間に有意な相関関係は認めなかった (Table 2).

一方, 喀痰 H_2S 濃度は喀痰好中球分画とのみ有意な正の相関を認めた($r=0.430$, $p=0.028$). その他の指標(血中および喀痰中の炎症細胞分画, FeNO, ACT スコア)との間には有意な相関関係は認めなかった (Table 2).

多変量線形回帰分析を用いて血清および喀痰 H_2S 濃度と独立して関連のある因子を検討したところ、唯一、喀痰好中球分画だけが喀痰 H_2S 濃度と関連していることがわかった ($\beta=0.247$, $p=0.029$) (Table 3).

＜コントロール不良または喘息発作が生じる可能性が高い患者を予測するための血清 H_2S 濃度 cutoff 値＞

コントロール不良喘息を予測するための血清 H_2S 値の cutoff 値は $82.5 \mu\text{M}$ であり、その感度は 80.0%、特異度は 75.0%であった (AUC:0.78, $p=0.004$) (Figure 5). 一方、喘息発作が生じる可能性が高い患者を予測するための血清 H_2S の cutoff 値は $63.2 \mu\text{M}$ であり、その感度は 80.8%、特異度は 60.9%であった (AUC: 0.71, $p=0.004$) (Figure 6).

【考察】

喘息患者において、血清 H_2S 濃度は非発作期に上昇していたが、発作期には低下し、健常者と同程度であった。同一患者における血清 H_2S 濃度の変化も観察したところ、発作期では非発作期に比べて有意に血清 H_2S 濃度が低下した。更に、非発作期喘息患者をコントロール状態に分けて検討してみると、コントロール不良な喘息患者の血清 H_2S 濃度はコントロール良な患者よりも有意に低値であった。一方、喀痰 H_2S 濃度は、健常者と比べて発作期喘息患者でのみ有意に上昇していた。最後に、血清および喀痰 H_2S 濃度と従来の喘息関連指標との関係を検討したところ、喀痰 H_2S 濃度が喀痰好中球分画と有意な正の相関を示した。

本研究は、 H_2S 濃度を発作期喘息患者およびコントロール状態に分けた非発作期喘息患者にて検討した初めての報告である。これまでの報告では、非発作期喘息患者の血清 H_2S 濃度は健常者と比べて有意に高値であり、喘息重症度とは関連がなかった²²⁾。我々の検討でも非発作期喘息患者の血清 H_2S 濃度は健常者に比べて有意に高値であり既報告と一致している。そこで、我々は非発作期喘息患者を重症度ではなく、GINA ガイドライン¹⁾および本邦の喘息予防管理ガイドライン²⁾に基づいて喘息コントロール状態を 2 群に分けて検討したところ、コントロール不良な喘息患者の血清 H_2S 濃度はコントロール良な喘息患者よりも有意に低下していた。コントロール不良喘

息患者はコントロール良好な喘息患者よりも喘息発作を起こすリスクが高く³⁰⁾, 治療強化が必要な対象でもある. 今回の検討で, コントロール不良喘息患者を予測する血清 H_2S 値の cutoff 値は $82.5 \mu\text{M}$ であった(感度:80.0%, 特異度:75.0%). 今後, この cutoff 値を用いた前向きな検討が必要であるが, コントロール不良喘息患者を血清 H_2S 濃度測定を用いてより早期に予測できれば非常に有用であると考える.

今回の研究で更に興味深い点として, 喘息発作期の血清 H_2S 濃度は非発作期に比べて有意に低下していたことである. これは同一患者における血清 H_2S 濃度の変化を検討した結果においても同様であった. すなわち, 喘息コントロールが不良もしくは喘息発作を起こしやすい状態では血清 H_2S 濃度が低下してくることが予想される. これまで喘息での報告はないが, COPD (chronic obstructive pulmonary disease) 患者においては同様の結果が報告されている. Chen らの検討では, 血清 H_2S 濃度は健常者と比べて COPD 安定期において有意に上昇し, COPD 急性増悪期で低下していると報告している³¹⁾. 我々の検討でも COPD 安定期の血清 H_2S 濃度は健常者と比べて有意に高値であり, COPD 急性増悪期で低下していた³²⁾. また同一 COPD 患者においても, 急性増悪期の血清 H_2S 濃度は安定期よりも有意に低下していたことを報告している²⁹⁾.

喀痰 H₂S 濃度に関しては、発作期喘息患者での喀痰 H₂S 濃度は健常者と比べて有意に上昇していた。これは我々が過去に報告した COPD 急性増悪期での上昇と類似している³²⁾。恐らく何らかの増悪因子が引き金となってより強力な気道炎症が起こり、気道局所での H₂S 産生が亢進することで発作期の喀痰 H₂S 濃度が上昇した可能性が示唆される。他にも、COPD 増悪と同様に喘息発作の誘因としては細菌感染やウイルス感染症も多く³³⁾、何らかの細菌感染が起こり、細菌自体による H₂S の産生が喀痰 H₂S 濃度の上昇に関与していた可能性も考えられた³⁴⁾。一方、今回の検討では非発作期での喀痰 H₂S 濃度の上昇は認められなかった。これまでの報告をみると、非発作期でも喘息患者では健常者と比べて喀痰 H₂S 濃度が上昇していた²²⁾。今回、非発作期で喀痰 H₂S 濃度が上昇しなかった理由として、非発作期喘息患者の中にも H₂S の上昇するフェノタイプが存在する可能性が示唆された。即ち、非発作期喘息患者の喀痰 H₂S 濃度をみると、喀痰 H₂S 濃度が 20 μ M 以上と比較的高値の症例が少なからず存在していた。そこで、非発作期喘息患者の背景を検討してみると、喀痰 H₂S 濃度が 20 μ M 以上の非発作期喘息患者は喀痰 H₂S 濃度が 20 μ M 未満と低い対象と比べて、好中球性気道炎症が強い傾向にあった(喀痰好中球分画 83.5(73.1,89.6)% vs 73.6(60.1,80.6)%, $p=0.1$)。これらの観点および発作期喘息患者において喀痰 H₂S 濃度が上昇することから考えると、気道炎症(特に好中球性気道炎症)の強さの程度が今回の結果に影響を及ぼした可能性が考えられた。

H₂Sの肺での役割については諸説が考えられている。まず肺各種構成細胞で産生されたH₂Sは脂溶性で、その多くは $\text{H}_2\text{S} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HS}^- \rightleftharpoons 2\text{H}^+ + \text{S}^{2-}$ として解離しているが、恒常性を維持するための生体内pH 7.40の状態では約1/3が解離せずH₂Sの形で存在し、その溶解度は水の約5倍であるため、K_{ATP}チャネルを通じて容易に細胞膜を通過し、シグナル伝達に関与しているとされる¹⁸⁾。最近ではH₂S自身がシグナル伝達物質として働くのではなく、L-システイン(Cys)のチオール基(SH)に過剰にイオン分子が付着したシステインパースルフィド(Cys-S-SH)などの活性イオウ分子種(reactive sulfur species:RSS)が生理活性を担っている可能性も指摘されている³⁵⁾。このような形で存在するH₂Sが肺や気道でどのような病態生理学的役割を担っているかについては現時点で明らかではないが、これまでのIn vitroの実験から、外因性H₂Sの投与は気道平滑筋の増殖やIL-8の産生を抑制し³⁶⁾、血管平滑筋を弛緩させる作用があることがわかっている³⁷⁾。また、OVA(Ovalbumin)感作による喘息モデルマウスを用いた実験において、H₂S合成酵素であるCSEが欠損したマウスでは、OVA感作によって気道炎症の増強や気道過敏性の亢進を認めるが、外因性H₂S投与によって、気道炎症が抑制され、気道過敏性も軽減することが指摘されている³⁸⁾。更に、OVA感作による喘息モデルマウスにおいて、外因性H₂S投与によって、肺における抗酸化作用を持つ酵素(superoxide dismutase:SODやglutathione reductase:GR)の増加およ

び脂質過酸化物質の減少を認めることが指摘されている³⁹⁾。

これらの報告をもとに、本研究結果から予想されるH₂Sの動態・作用について考察すると、喘息発作状態やコントロール不良状態、即ち気道炎症が増強した状態では、気道中のH₂S産生が亢進し、産生されたH₂Sが気道局所に作用して、喘息モデルマウスにおける報告と同様に、抗炎症作用や抗酸化作用を発揮している可能性が考えられた。そして、気道でのH₂S産生が亢進することでネガティブフィードバックがかかり、全身でのH₂S産生能が下がり血清H₂S濃度が低下した可能性が考えられた(Figure 7A)。また別の推察される機序として、気道炎症が増強すると気道局所での抗炎症作用や抗酸化作用を惹起するために血中H₂Sが気道局所に流入することで気道のH₂S濃度が上昇する。その結果として消費性に血清のH₂S濃度が低下した可能性が考えられた(Figure. 7B)。

しかし、その一方で、LPS(lipopolysaccharide)投与による敗血症モデルラットを用いた検討では、肝臓でのH₂S産生は亢進するが、CSE阻害薬であるPAG(propargylglycine)を添加してH₂Sの産生を抑制すると、敗血症による臓器障害が軽減するという報告⁴⁰⁾や急性膵炎モデルマウスにおいて、血漿H₂S濃度の増加を認めるが、PAG添加によってH₂S産生を抑制すると膵炎の軽減を認めたという報告⁴¹⁾もある。同様に熱傷モデルマウスにおいて、血漿H₂S濃度の増加を認め、外因性にH₂Sを投与することで更に全身性の炎症が増悪したという報告⁴²⁾もある。これらの結果は

H₂Sが炎症を促進する働きも併せ持っている可能性を示唆する。即ち、生体内のH₂S濃度産生低下は臓器障害の阻止に寄与している可能性が考えられる。本研究で増悪時に血清H₂S濃度が低下したのは、全身におけるH₂Sの産生が増悪によりダウンレギュレーションした可能性も考えられた。今後更なる病態解明のために、経時的な喀痰および血清H₂S濃度の測定を行い、その変化を追跡していくことでその機序が明らかになると考える。

血清および喀痰H₂S濃度と従来用いられてきた喘息関連指標の関係を検討した結果、単変量解析では血清H₂S濃度の上昇は気流閉塞の程度と、喀痰H₂S濃度の上昇は好中球性気道炎症の程度と関連していた。最終的に、H₂S濃度に影響を及ぼしうる年齢、性別、身長、体重で調整して検討した結果、喀痰好中球分画は喀痰H₂S濃度と独立して関連していることがわかった。この結果は、以前、我々が行った非発作期喘息患者および安定期COPD患者を対象とした喀痰・血清H₂S濃度の検討結果と一致している^{22, 33)}。即ち、喘息患者において喀痰好中球分画は喀痰H₂S濃度とのみ関連していた²²⁾が、COPD患者では喀痰・血清H₂S濃度とも有意な相関を認めた³³⁾。恐らくこれは、COPDが全身性炎症性疾患として捉えられているのに対し⁴³⁾、喘息は気道局所の炎症性疾患として考えられているため⁴⁴⁾、本研究では喀痰H₂S濃度でのみ喀痰好中球分画と有意な相関を示したのではないかと推察された。

一方、単変量解析にて血清 H_2S 濃度と相関のあった FEV_1/FVC が、多変量解析では血清 H_2S 濃度の独立した関連因子ではなくなった。その理由として、本研究対象の年齢と FEV_1/FVC の間には強い相関関係があり、年齢が交絡因子となったためと考えた。これまで COPD 患者の血清 H_2S 濃度は FEV_1/FVC と有意な負の相関を示すが、喘息患者では有意な相関がないことが報告されている³²⁾。前述のように COPD は全身性炎症性疾患⁴³⁾である一方で、喘息は局所気道炎症疾患と考えられるため⁴⁴⁾、本研究において全身性炎症を反映する血清 H_2S 濃度が呼吸機能とは関連しなかった可能性が一つ考えられる。更に H_2S は炎症性バイオマーカーであるのに対し、呼吸機能は間接的に気道炎症と関連する指標である。よって、本研究対象者の気流閉塞の程度が軽かった (FEV_1/FVC : 中央値 74.3%) ことも結果に影響を及ぼした可能性があると考えた。

今後、 H_2S の産生部位、作用機序の解明など明らかにしなければならないことは多いが、これまでの報告や上述の結果を基に考えると、血清および喀痰 H_2S 濃度測定は喘息の病勢 (特にコントロール状態および増悪予測) や好中球性気道炎症を反映する新規バイオマーカーとして有用な可能性が示唆された。

本研究においては幾つかの Limitation がある。

一つ目として、喀痰採取は全体の 4 割しか出来なかった。よって、喀痰 H_2S 濃度の検討に関してはパワー不足の可能性がある、今後症例数を増やしていく予定である。しかし、確かに喀痰採取は気道局所の状態を把握する上ではとても有用であるが、常に良質検体を採取することは難しく、誘発喀痰採取時の刺激により喘息発作を誘発してしまうこともある。従って、喀痰に代わる気道炎症を直接反映する検査法である呼気 H_2S 濃度の測定も今後併せて検討していきたいと考えている⁴⁵⁾。

二つ目として、喘息患者は健常者と比べて年齢が有意に高齢であったことから、年齢により H_2S 濃度が影響を受けている可能性もある。しかし、以前に我々が血清および喀痰 H_2S 濃度を健常者、軽症～中等症喘息患者および重症喘息患者の 3 群で検討した報告²²⁾では、健常者と非重症喘息患者との間には年齢に差はなかったものの、血清および喀痰 H_2S 濃度は健常者と比べ軽症～中等症喘息患者で有意に高値であった。また、重症喘息患者は軽症～中等症喘息患者と比べ有意に高齢であったが、両者の間で血清および喀痰 H_2S 濃度に差は認めなかった。更に、多変量線型回帰分析を用いて検討した結果でも年齢は H_2S 濃度の独立した関連因子ではなかったことから、その影響はほとんどないとする。

三つ目として、血清 H_2S 濃度は全身の様々な臓器より産生されていると考えられており、呼吸器疾患以外の全身合併症(高血圧・糖尿病など)の影響を受けている可能性もある。しかし、追加解析にて高血圧・糖尿病・脂質異常症・高尿酸血症の有無で

血清 H_2S 濃度に有意差はなく (data not shown), その影響はほとんど無視してよいと考える.

四つ目として, 喘息治療薬が H_2S 濃度に影響を及ぼした可能性がある. しかし, 本研究において ICS(inhaled corticosteroid)投与量と血清および喀痰 H_2S 濃度との間に相関関係は認めなかった (data not shown). また, COPD 患者においては ICS およびテオフィリン薬は H_2S 濃度に影響を及ぼさなかったという報告もあり⁴⁶⁾, 喘息治療薬の影響はあっても小さいと考える.

五つ目として口腔内における細菌が H_2S を産生し喀痰 H_2S 濃度に影響を及ぼした可能性が考えられた. しかし, 唾液の H_2S 濃度は喘息患者と健常者の間で差がない²²⁾というこれまでの報告から, その影響はほとんど考えなくてよいと思われる.

【結語】

今後、症例をさらに増やして検討する必要があるが、血清および喀痰 H_2S 濃度は喘息の病勢(コントロール状態)や発作予測因子として有用である可能性や、喘息のフェノタイプの一つである好中球優位型喘息を分類する新規バイオマーカーとなる可能性が示唆された。将来的には、 H_2S に FeNO やペリオスチンなどの異なる病態を反映するバイオマーカーを組み合わせることで、より正確な喘息病態の評価や個別化医療が可能になることが期待される。

【謝辞】

本研究において患者のリクルートにご協力いただいた当院呼吸器内科:棟方充先生, 谷野功典先生, 斉藤純平先生, 佐藤俊先生, 福原敦朗先生, 福原奈緒子先生, 二階堂雄文先生, 美佐健一先生, 植松学先生, 佐藤佑樹先生, 東川隆一先生, そして本論文作成の上で研究デザインと考察内容につきご指導をいただきました当院呼吸器内科:斉藤純平先生, 棟方充先生に深謝いたします.

【引用文献】

- 1) Global strategy for asthma management and prevention, Global Initiative for Asthma (GINA). Available from: www.ginasthma.org Date last updated: April 2015. Date last accessed: August 12, 2015.
- 2) 一般社団法人日本アレルギー学会. 喘息予防・管理ガイドライン 2015. 東京:協和企画;2015.
- 3) Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. Lancet 2006; 368: 804-813.
- 4) Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Brightling CE, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. Am J Respir Crit Care Med 2008; 178: 218-224.
- 5) Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. Am J Respir Crit Care Med 1999; 160: 1532-1539.

- 6) Moore WC, Hastie AT, Li X, Li H, Busse WW, Jarjour NN, et al. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2014; 133: 1557-1563 e5.
- 7) Saito J, Inoue K, Sugawara A, Yoshikawa M, Watanabe K, Ishida T, et al. Exhaled nitric as a marker of airway inflammation for an epidemiologic study in schoolchildren. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 512-516.
- 8) Saito J, Sato S, Fukuhara A, Sato Y, Nikaido T, Inokoshi Y, et al. Association of asthma education with asthma control evaluated by asthma control test, FEV1, and fractional exhaled nitric oxide. *J Asthma* 2013; 50: 97-102.
- 9) Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, Irvin CG, Leigh MW, Lundberg JO, et al. An official ATS clinical practice guideline: international of exhaled nitric oxide levels (FeNO) for clinical applications. *Am J Respir Crit Care*

Med 2011; 184: 602-615.

10)Izuhara K, Arima K, Ohta S, Suzuki S, Inamitsu M, Yamamoto K., et al.

Periostin in allergic inflammation. Allergol Int 2014; 63: 143-151.

11)Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, Filsell S, McLachlan C,

Monti-Sheehan G, et al. Exhaled nitric oxide: a predictor of steroid response. Am J Respir Crit Care Med 2005; 172: 453-459.

12)Hanania NA, Wenzel S, Rosén K, Hsieh HJ, Mosesova S, Choy DF, et al.

Exploring the effects of omalizumab in allergic asthma: an analysis of biomarkers in the EXTRA study. Am J Respir Crit Care Med 2013; 187: 804–811.

13)Pavord ID, Korn S, Howarth P, Bleecker ER, Buhl R, Keene ON, et al.

Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet 2012; 380: 651-659.

- 14)Ortega HG, Liu MC, Pavord ID, Brusselle GG, FitzGerald JM, Chetta A, et al. Mepolizumab treatment in patients with severe eosinophilic asthma. N Engl J Med 2014; 371: 1198-1207.
- 15)Corren J, Lemanske RF, Hanania NA, Korenblat PE, Parsey MV, Arron JR, et al. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. N Engl J Med 2011; 365: 1088-1098.
- 16)Chen Y, Wang R. The message in the air: Hydrogen sulfide metabolism in chronic respiratory diseases. Respir Physiol Neurobiol 2012; 184: 130-138.
- 17)Wang P, Zhang G, Wondimu T, Ross B, Wang R. Hydrogen sulfide and asthma. Exp Physiol 2011; 96: 847-852.
- 18)Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? FASEB J 2002; 16: 1792-1798.

- 19)Chen Y, Wang P, Wang X, He Y, Yao W, Qi Y. Tang C. Involvement of endogenous hydrogen sulfide in cigarette smoke-induced changes in airway responsiveness and inflammation of rat lung. *Cytokine* 2011; 53: 334-341.
- 20)Fang L, Lin Q, Tang C, Liu X. Hydrogen sulfide suppresses migration, proliferation and myofibroblast transdifferentiation of human lung fibroblasts. *Pulm Pharmacol Ther* 2009; 22: 554-561.
- 21)Fang L, Lin Q, Tang C, Liu X. Hydrogen sulfide attenuates epithelial–mesenchymal transition of human alveolar epithelial cells. *Pharmacol Res* 2010; 61: 298-305.
- 22)Saito J, Zhang Q, Hui C, Macedo P, Gibeon D, Menzies-Gow A, et al. Sputum hydrogen sulfide as a novel biomarker of obstructive neutrophilic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131: 232-234. e3.
- 23)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: 25-29.

24)Reddel HK, Taylor DR, Bateman ED, Boulet LP, Boushey HA, Busse WW, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: asthma control and exacerbations: standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180: 59-99.

25)一般社団法人日本呼吸器学会. 呼吸機能検査ガイドライン-スパイロメトリー, フローボリューム曲線, 肺拡散能力-, 東京:メディカルレビュー社.

26)Takishima T, Hida W, Sasaki H, Suzuki S, Sasaki T. Direct-writing recorder of the dose-response curves of the airway to methacholine. *Chest* 1981; 80: 600-606.

27)K. Fujimori, Suzuki E, Arakawa M, Gejyo F. The diagnostic role of the methacholine inhalation challenge in adult patients with chronic

persistent cough. *Aerugi* 1999; 48: 713-718.

28) Anonymous. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 912-930.

29) Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 54: 308-317.

30) Haselkorn T, Fish JE, Zeiger RS, Szeffler SJ, Miller DP, Chipps BE, et al. Consistently very poorly controlled asthma, as defined by the impairment domain of the Expert Panel Report 3 guidelines, increases risk for future severe asthma exacerbations in The Epidemiology and National History of Asthma: Outcomes and Treatment Regimens (TENOR) study. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 895-902.

- 31)Chen YH, Yao WZ, Geng B, Ding YL, Lu M, Zhao MW, et al. Endogenous hydrogen sulfide in patients with COPD. *Chest* 2005; 128: 3205-3211.
- 32)Saito J, Mackay AJ, Rossios C, Gibeon D, Macedo P, Sinharay R, et al. Sputum-to-serum hydrogen sulfide ratio in COPD. *Thorax* 2014; 69: 903-909.
- 33)Jackson DJ, Sykes A, Mallia P, Johnston SL. Asthma exacerbations: origin, effect, and prevention. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128: 1165-1174.
- 34)Shatalin K, Shatalina E, Mironov A, Nudler E. H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science* 2011; 334: 986-990.
- 35)Ida T, Sawa T, Ihara H, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Kumagai Y, et al. Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative

stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: 7606-7611.

36) Perry MM, Hui CK, Whiteman M, Wood ME, Adcock I, Kirkham P, et al. Hydrogen sulfide inhibits proliferation and release of IL-8 from human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 45: 746-752.

37) Wang R. Signaling pathways for the vascular effects of hydrogen sulfide. *Curr Opin Nephro hypertens* 2011; 20: 107-112.

38) Zhang G, Wang P, Yang G, Cao Q, Wang R. The inhibitory role of hydrogen sulfide in airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of asthma. *Am J Pathol* 2013; 182: 1188-1195.

39) Benetti LR, Campos D, Gurgueira SA, Vercesi AE, Guedes CE, Santos KL, et al. Hydrogen sulfide inhibits oxidative stress in lungs from allergic mice in vivo. *Eur J Pharmacol* 2013; 698: 463-469.

40)Collin M, Anuar FB, Murch O, Bhatia M, Moore PK, Thiernemann C.

Inhibition of endogenous hydrogen sulfide formation reduces the organ injury caused by endotoxemia. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 498-505.

41)Bhatia M, Wong FL, Fu D, Lau HY, Mochhala SM, Moore PK. Role of

hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury. *FASEB J* 2005; 19: 623-625.

42)Zhang J, Sio SW, Mochhala S, Bhatia M. Role of hydrogen sulfide in

severe burn injury-induced inflammation in mice. *Mol Med* 2010; 16: 417-424.

43)Choudhury G, Rabinovich R, MacNee W. Comorbidities and systemic

effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med.* 2014; 35: 101-130.

44)Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma.

From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am.*

J. Respir. Crit. Care Med.2000; 161: 1720-1745

45)Zhang J, Wang X, Chen Y, Yao W. Correlation between levels of exhaled hydrogen sulfide and airway inflammatory phenotype in patients with chronic persistent asthma. *Respirology* 2014; 19: 1165-1169.

46)Kirkham PA, Whiteman M, Winyard PG, Caramori G, Gordon F, Ford PA, et al. Impact of theophylline/corticosteroid combination therapy on sputum hydrogen sulfide levels in patients with COPD. *Eur Respir J* 2014; 43: 1504-1506.

Table 1: 対象患者背景

	健常者 (n=15)	喘息非発作期 (n=55)	喘息発作期 (n=23)
年齢 (歳)	36.0(31.0,46.0)	65.0(51.0,72.0)***	63.0(48.0,68.0)**
性別 (男性 / 女性)	12/3	28/27	9/14*
身長 (cm)	170(163,174)	159 (150,168)**	159 (150,164)**
体重 (kg)	68.0(56.0,72.0)	60.0(52.8,68.0)	62.0(53.6,68.8)
喫煙歴(never/ former/ current)	14/ 1 /0	35/ 20/ 0	18 /5 /0
喫煙指数 (pack-year)	0.0(0.0,0.0)	0.0(0.0,17.0)	0.0(0.0,0.0)
喀痰マクロファージ分画 (%)	82.6(70.8,85.9)	15.3(5.4,24.9)***	11.1(6.5,32.1)***
喀痰好中球分画 (%)	9.5(6.8,21.3)	76.2(61.1,82.1)***	54.5(12.0,69.6)*
喀痰好酸球分画 (%)	2.0(0.3,2.4)	3.9(1.9,20.3)	17.0(1.2,66.9)*
喀痰リンパ球分画 (%)	5.5(3.5,6.5)	2.0(1.2,4.0)	3.0(2.1,3.9)
%FVC (%)	105(97.2,113)	96.5(87.1,107)	85.4(70.2,98.9)**
%FEV ₁ (%)	97.1(90.5,105)	84.5(74.2,101)	74.4(45.0,92.8)**
FEV ₁ /FVC (%)	83.7(80.1,89.3)	74.3(65.2,80.0)**	68.6(51.8,83.2)**
FeNO 値 (ppb)	17.5(13.7,22.4)	44.6(29.4,92.3)**	98.2(36.2,116)**
ACT スコア (pts)	N/A	20.5(15.0,23.0)	N/A

ICS (+/-)	N/A	44/11	19/4
ICS 量 (μg/day)	N/A	500 (160,1000)	500 (320,1000)
LABA (+/-)	N/A	33/22	16/7

各値は中央値 (25 パーセンタイル, 75 パーセンタイル) で示す.

*p<0.05 vs 健常者. **p<0.01 vs 健常者. ***p<0.001 vs 健常者.

FVC, forced vital capacity; FEV₁, forced expiratory volume in one second;

FeNO, fractional exhaled nitric oxide; ACT, asthma control test; ICS, inhaled

corticosteroid; LABA, long-acting β -agonist. ICS 量はフルチカゾン換算で示

す.

Table 2: 血清および喀痰 H₂S 濃度と喘息関連指標との関係

	血清 H ₂ S 濃度		喀痰 H ₂ S 濃度	
	R	p value	r	p value
年齢 (歳)	0.275	0.024*	0.186	0.342
身長 (cm)	-0.286	0.020*	0.184	0.349
体重 (kg)	-0.096	0.444	0.271	0.163
喫煙指数(pack-year)	0.077	0.537	0.370	0.052
血中好中球分画(%)	-0.030	0.855	0.147	0.615
血中好酸球分画(%)	0.036	0.823	0.018	0.950
喀痰マクロファージ分画 (%)	-0.189	0.346	-0.381	0.055
喀痰好中球分画 (%)	0.033	0.870	0.430	0.028*
喀痰好酸球分画 (%)	0.378	0.052	-0.100	0.626
喀痰リンパ球分画 (%)	-0.164	0.413	-0.073	0.722
%FVC (%)	-0.089	0.501	-0.075	0.712
%FEV ₁ (%)	-0.201	0.127	-0.079	0.696
FEV ₁ /FVC (%)	-0.293	0.024*	-0.056	0.780
FeNO 値 (ppb)	0.220	0.094	0.159	0.437
ACT スコア (pts)	0.330	0.181	0.056	0.906

*p<0.05

H₂S, hydrogen sulfide; FVC, forced vital capacity; FEV₁, forced expiratory volume in one second; FeNO, fractional exhaled nitric oxide; ACT, asthma control test.

Table 3: 多変量線形回帰分析による血清および喀痰 H₂S 濃度と独立して関連のある因子

	β value	95% CI	p value	R ²
血清 H ₂ S 濃度				
FEV ₁ /FVC	-1.680	-3.838 to 0.479	0.125	0.153
喀痰 H ₂ S 濃度				
喀痰好中球分画	0.247	0.028 to 0.467	0.029*	0.311

年齢, 性別, 身長, 体重で調整. *p<0.05

CI, confidence interval; H₂S, hydrogen sulfide; FVC, forced vital capacity;

FEV₁, forced expiratory volume in one second.

【Figure legend】

Figure 1: 健常者(●)と非発作期喘息患者(■), 発作期喘息患者(▲)の血清 H_2S 濃度. 水平の実線は中央値を示す.

Figure 2: 健常者(●)と非発作期喘息患者(■), 発作期喘息患者(▲)の喀痰 H_2S 濃度. 水平の実線は中央値を示す.

Figure 3: 同一喘息患者における非発作期と発作期の血清 H_2S 濃度の変化.

Figure 4: 非発作期喘息患者のコントロール状態と血清 H_2S 濃度の関係. コントロール良好喘息患者(●), コントロール不良喘息患者(■). 水平の実線は中央値を示す.

Figure 5: コントロール不良喘息患者を予測するための血清 H_2S 濃度の ROC 曲線.

Figure 6: 喘息発作が生じる可能性が高い患者を予測するための血清 H_2S 濃度の ROC 曲線.

Figure 7A: 本研究の結果から予想される H_2S の動態・作用に関する仮説その 1. 喘息発作状態やコントロール不良状態では、気道中の H_2S 産生が亢進し、産生された H_2S が気道局所に作用し、抗炎症作用や抗酸化作用を発揮している可能性が考えられる. 一方、気道での H_2S 産生が亢進することで、ネガティブフィードバックがかかり全身での H_2S の産生が低下したため血清 H_2S 濃度が低下した可能性が考えられる.

GR: Glutathione reductase, SOD: Superoxide dismutase.

Figure 7B: 本研究の結果から予想される H_2S の動態・作用に関する仮説その 2. 喘息発作状態やコントロール不良状態では、気道局所での抗炎症作用や抗酸化作用をより発揮するために血中の H_2S が気道局所に流入することで、血清中の H_2S 濃度が低下し、気道中の H_2S 濃度が上昇した可能性が考えられる.

GR: Glutathione reductase, SOD: Superoxide dismutase.

Figure 1

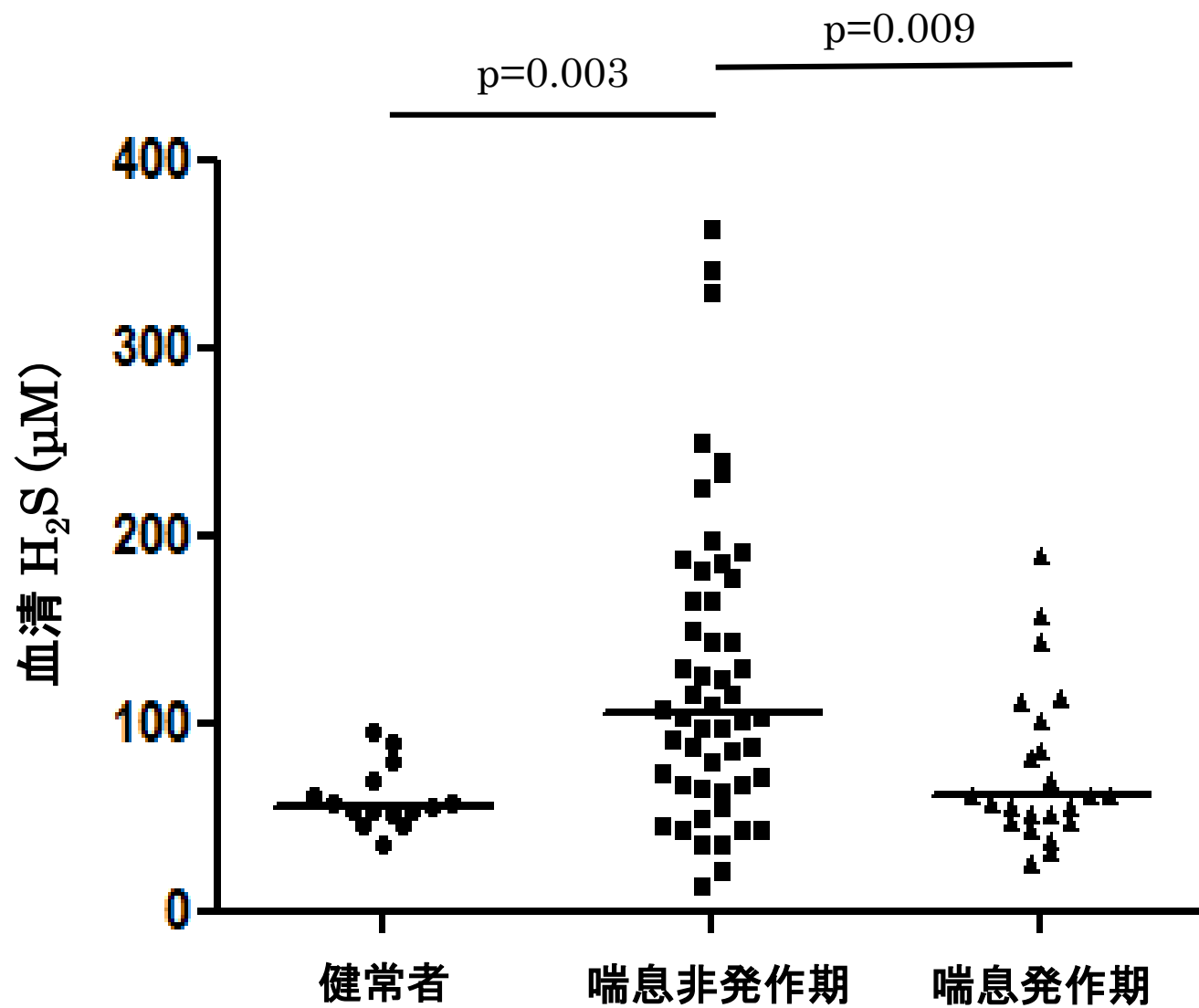


Figure 2

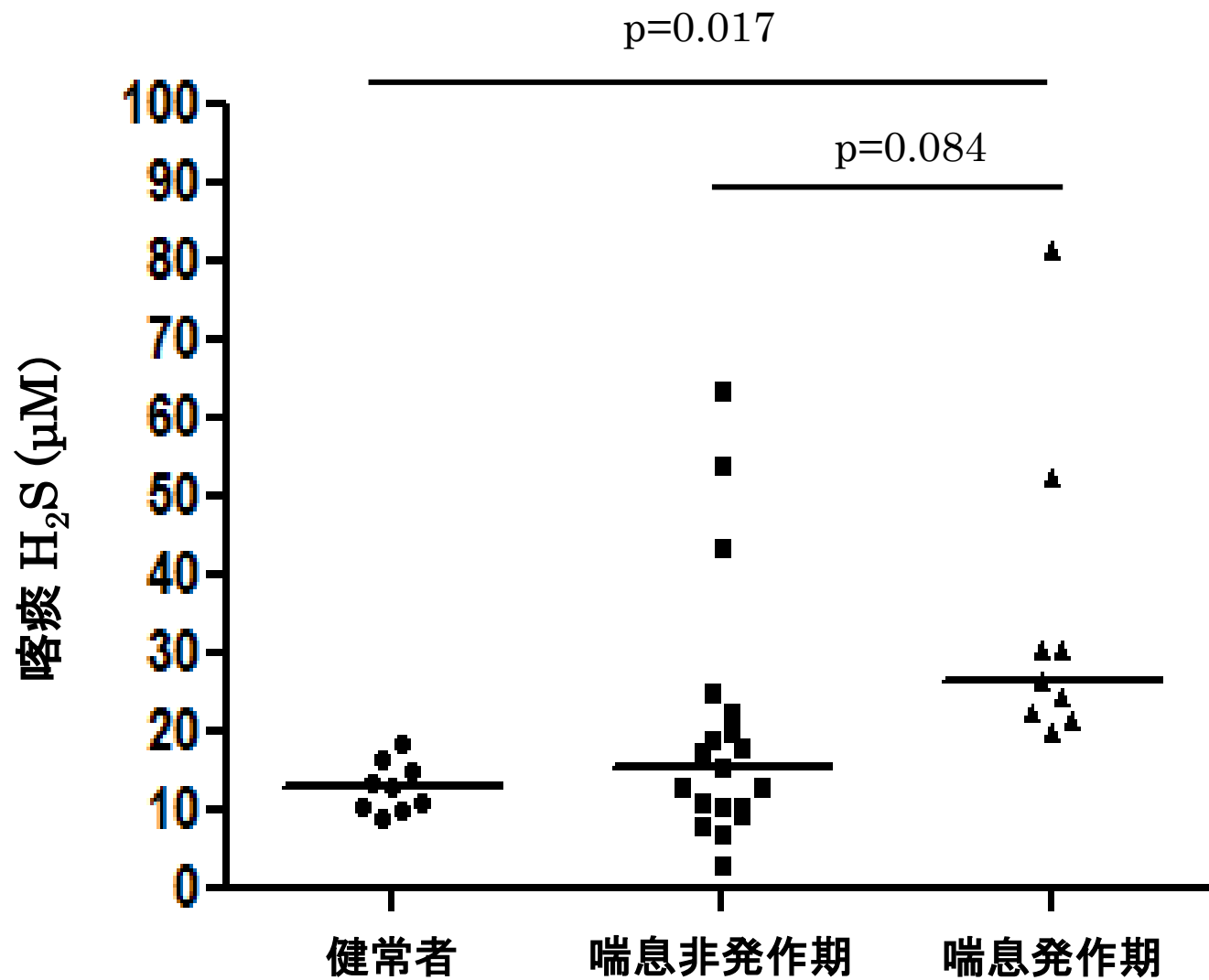


Figure 3

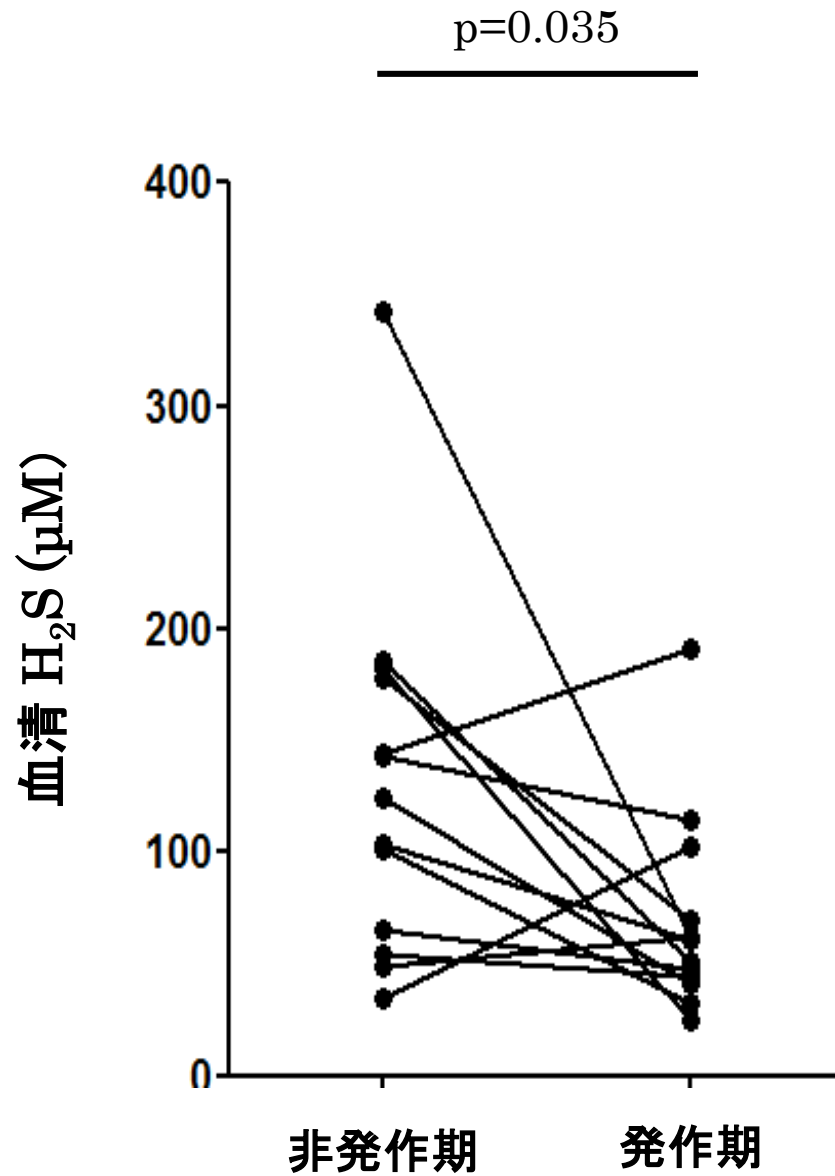


Figure 4

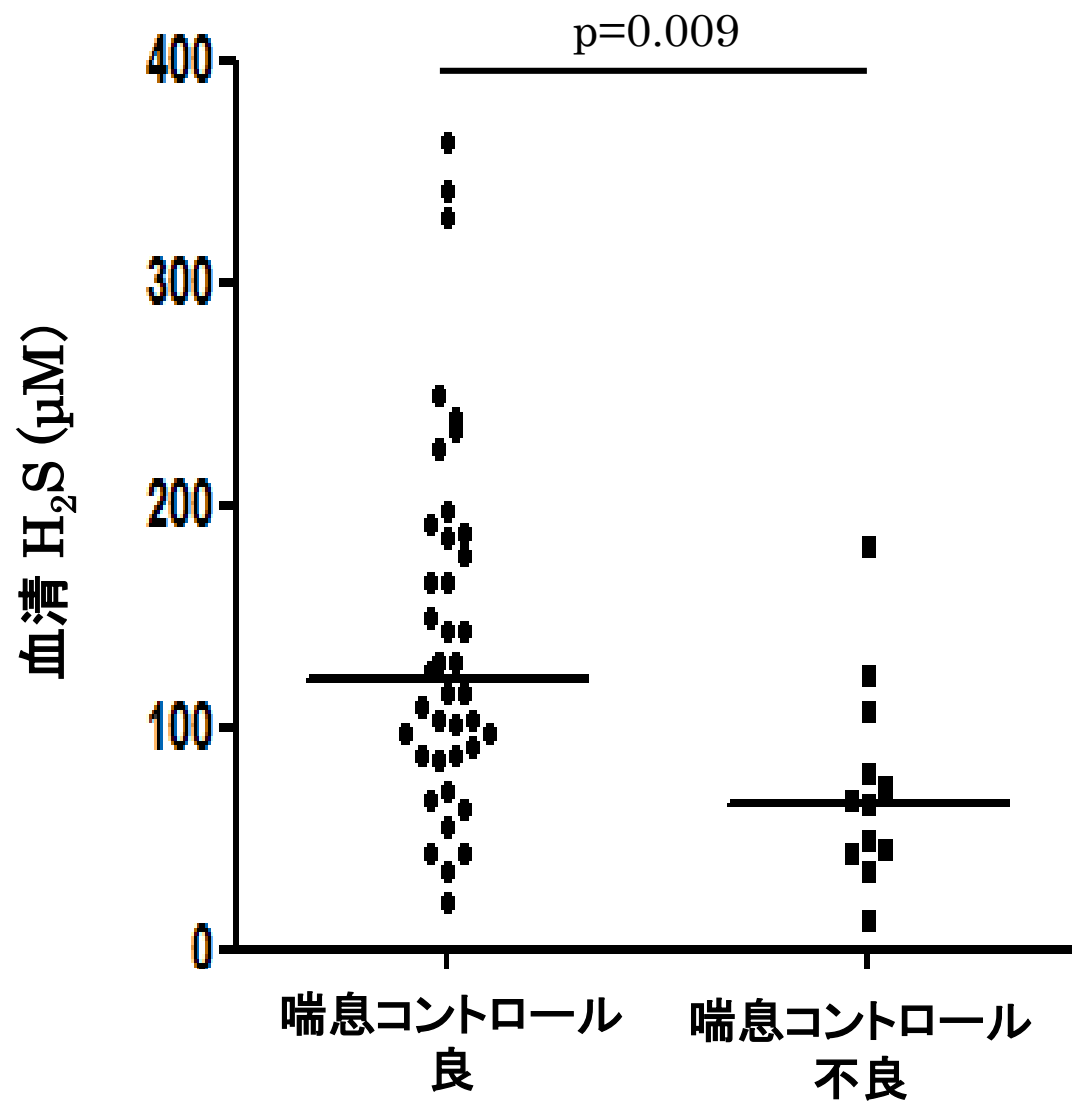


Figure 5

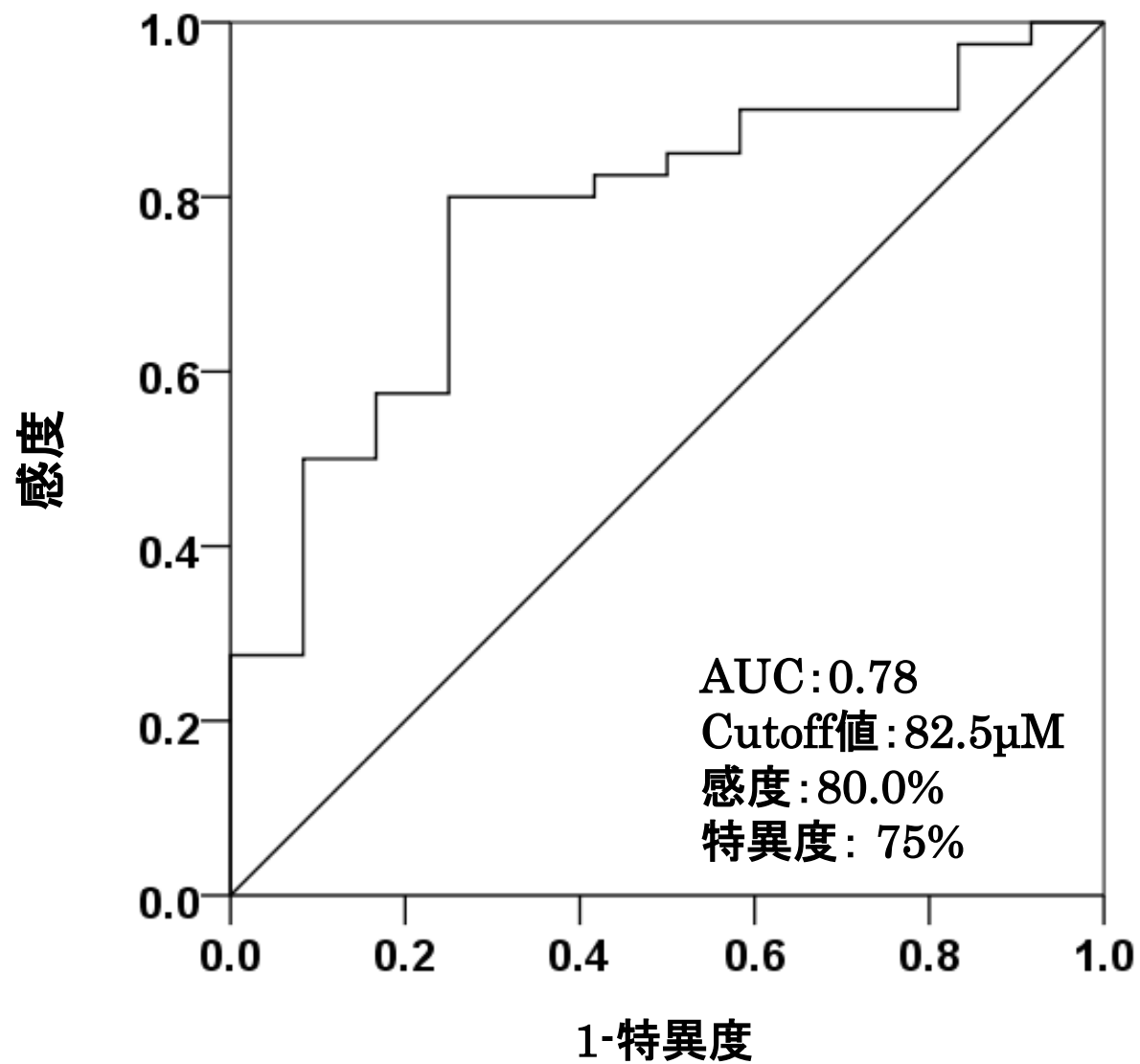


Figure 6

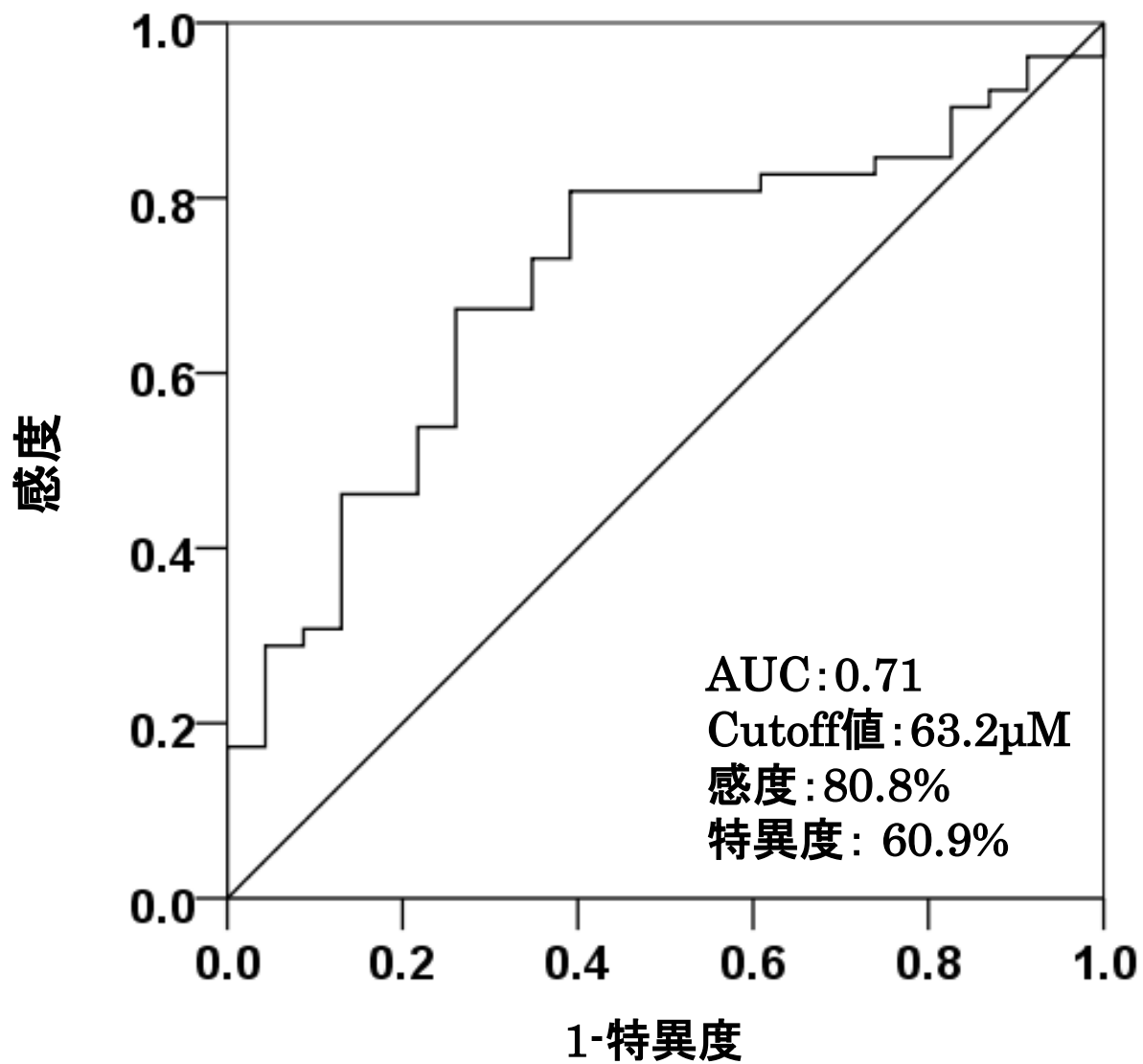


Figure 7A

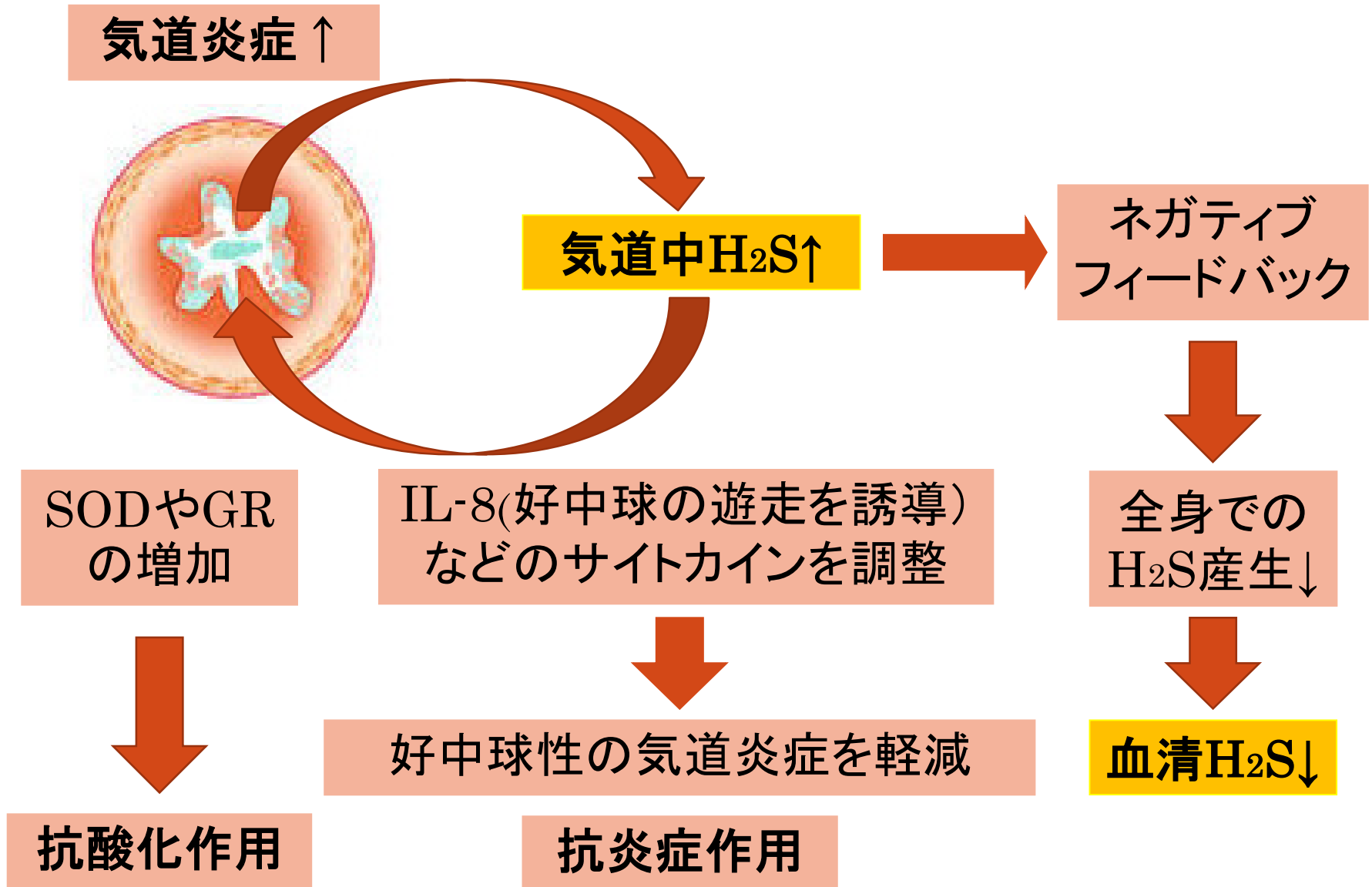


Figure 7B

