

健康な非喫煙者および慢性気管支炎患者の喀痰誘発に用いる 新型音響デバイス Lung Flute™ の効果および安全性

Sanjay Sethi, Jane Maloney, Lori Grove, and Catherine Wrona
VA WNY Healthcare system, Buffalo, NY and University at Buffalo, SUNY, Buffalo,
NY and Medical Acoustics, Buffalo NY.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 誌へ投稿

要約

喀痰誘発は、下気道分泌物を非侵襲的に採取する方法であり、様々な呼吸器疾患の研究、診断および管理への利用が拡大しつつある。口で発生した低周波数の音波は逆行して下気道に達し、粘膜毛様体クリアランスの促進効果を有する。Lung Flute™ は、勢いよく息を吹き込むことにより、このような音波を発生させる小型の音響デバイスである。我々は、Lung Flute™ を用いて誘発・採取された喀出サンプルが下気道分泌物の特徴を備え、高張食塩水を用いた誘発で得られた喀痰サンプルと同等であるとの仮説を立てた。Lung Flute™ を用い、健康な非喫煙者 10 名および慢性気管支炎の被験者 20 名の喀痰を誘発した。細胞内容物、およびインターロイキン-8、フィブリノゲンおよびエラスターゼの濃度を、両被験者群の Lung Flute™ 採取サンプルと唾液との間で、また慢性気管支炎の被験者等において 3%食塩水を用いて誘発・採取されたサンプルとの間で比較した。誘発の副作用については、誘発直後と 24 時間後に評価した。健康な非喫煙者等から Lung Flute™ で採取したサンプルを唾液と比較したところ、IL-8 (4.86 vs 1.88ng/ml, p=0.02) およびフィブリノゲン (6127.77 vs 2133.74 ng/ml, p=0.04) が有意に高く、エラスターゼ (6.05 vs 20.25nM, p=0.005) が有意に低かった。また、慢性気管支炎の被験者等から Lung Flute™ で採取したサンプルを唾液と比較したところ、膿をより多く含み粘度が高く、IL-8 (27.43 vs 0.55ng/ml, p<0.001) およびフィブリノゲン (3642.76 vs 436.92 ng/ml, p<0.001) が有意に高かった。健康な非喫煙者の 70%、および慢性気管支炎の被験者全員において、Lung Flute™ で採取したサンプルに下気道分泌物が含まれていた。Lung Flute™ で採取したサンプルと高張食塩水で採取したサンプルとは、前者の方が扁平細胞を多く含む(扁平細胞スコア 1.9 vs 1.1, p=0.02) 以外は同様であった。過渡的な軽度の喉刺激は、Lung Flute™ によるごく普通の副作用である。Lung Flute™ は安全、効果的、簡便かつ迅速な喀痰誘発の方法である。その利用法や、診断・治療用途について更に検討する価値は大きい。

下気道分泌物、すなわち喀痰のサンプルの分析は、数種の肺疾患の臨床管理ならびに研究において極めて有用である。喀痰分析が最も広く用いられている臨床用途は、肺炎、ニューモシシス、結核等の呼吸器感染症の病因学的診断のための微生物学的分析である¹⁻³。近年、喀痰サンプルの生化学的、免疫学的分析が、喘息、COPD および嚢胞性線維症をはじめとする幾つかの気道疾患において重要な研究ツールとなりつつある^{4;5}。これにより、これらの疾患における診断および治療応答の評価において、喀痰分析の臨床応用の道が開かれた⁶⁻⁹。しかしながら、多くの場合、呼吸器感染症や気道疾患を持つ患者等は、自発喀出により適切な喀痰サンプルを産出することができない。このような場合、および方法論の均一性を確保し得る研究体制を整える場合に、喀痰誘発は下気道分泌物の適切なサンプルの採取法として広く利用されている^{2;3;7;10}。

喀痰誘発には信頼性が高く、効率的で簡便で安全な方法が求められているにもかかわらず、現状の方法論は少なく、限定されている。霧状にした高張食塩水の吸入が効果的であることがこれまでに数多くの文献で示されており、これが標準的な方法となっている^{10;11}。高張食塩水を用いる誘発は、研究ツールとして多用されているものの、幾つかの制限により臨床応用への拡張が阻まれている¹²。これらの制限とは、気管支収縮の発生率が高いこと、専用の機器や訓練が必要なこと、処置時間が長いこと、気道に対して強い炎症促進効果があること、等である¹²⁻¹⁵。

Lung Flute™ は、小型の自己給電式音響デバイスであり、圧力 2.5cmH₂O で 18~22Hz、出力 110~115dB の音波を発生する。この音波は、口から勢いよく息を吹き込むことで発生し、理論的には気管気管支ツリー内を下降し、気管気管支分泌物を振動させる。この振動は下気道の粘膜炎様体クリアランスを大幅に促進することができ、その結果、痰が誘発される。

本報は、ヒト被験者への Lung Flute™ の適用を初めて体系的に評価した論文である。健康な対照被験者等と慢性気管支炎の患者群について、Lung Flute™ の有効性と安全性を検討した。下気道分泌物の細胞学的・生化学的特徴を調べるため、Lung Flute™ で誘発・産出したサンプルを唾液サンプルと比較した。また、慢性気管支炎の被験者等において、Lung Flute™ で採取したサンプルを、霧状の高張食塩水を用いて採取したサンプルと比較した。

方法

被験者

本研究は、VA WNY Healthcare System の対人研究小委員会 (Human Studies Subcommittee) の承認を得ている。健康な被験者 10 名と慢性気管支炎の被験者 20 名を 1ヶ所の施設 (Buffalo VA Medical Center) に招集した。健康な対照群の選定基準は、a) 18 歳以上であること、b) 自発的な痰産生が無いこと、c) 慢性呼吸器疾患に罹患していないこと、d) 招集前 4 週間以内に急性呼吸器感染症に罹患していないこと、e) 喫煙経験が無いか、または元喫煙者で年間の喫煙本数が 5 箱未満であること、とした。

一方、慢性気管支炎の被験者の選定基準は、a) 30 歳以上であること、b) 慢性気管支炎の病歴として、過去 2 年間にわたり、少なくとも 1 年のうち少なくとも 3 ヶ月間はほぼ毎日咳および痰が出ること、c) 現在も喫煙中であるか、または少なくとも年間 15 箱の元喫煙者であったこと、d) 招集前 4 週間以内に急性呼吸器感染症に罹患していないこと、e) 医師の診断により喘息および気管支拡張症を有しないこと、とした。

手順

健康な被験者等については、1回で調査を終えた。簡単な問診と、喉および呼吸のベースライン検査を行い、唾液を採取した。続いて被験者等は、深く息を吸い込んだ後に Lung Flute™ に勢いよく息を吹き込むことを最大 20 回行ってもらった。被験者等には、Lung Flute™ のリードが呼吸ではためくように息を吹き込むよう指導した。息の吹き込みを終えて 5 分後に、被験者等に咳をしてもらい、以後 10 分間にわたり喀出物を採取した。誘発から 15 分後に喉および肺の検査を行い、被験者等に副作用の有無を質問した。被験者等にはまた、24 時間後に電話で連絡をとり、誘発による副作用が新たに生じたか、または継続しているかを質問した。

一方、慢性気管支炎の被験者等については、1 週間間隔で 2 回に分けて調査を行った。この被験者らの初回訪問は健康な対照群と同日とし、ベースライン検査として肺活量測定を追加した。初回訪問から 1 週間後、ベースライン症状、および喉と肺の検査を再び行い、高張食塩水を用いた誘発を行った。3%食塩水 30ml を Devilbiss 099HD 超音波噴霧器で霧状にし、最長 15 分間投与した。誘発中、被験者等には 5 分おきに投与を中断し、口内の唾液をすすぎ、勢いよく咳をもらい、喀出物を採取した。誘発後の評価は、Lung Flute™ による誘発後と同様に行った。

喀痰および唾液の処理

サンプルはすべて、採取から 2 時間以内に同様に処理した。目視による膿性 [1 = 水性または粘液性、2 = 粘膿性 (黄色または緑色の小片)、3 = 膿性 (不均一な黄色または緑色)]、および粘度 (1 = 低、2 = 高) の等級付けを行った。続いてサンプルを秤量し、0.1% ジチオスレイトール (4 倍重量) を用いて室温で 20 分間インキュベートすることにより均一化した。インキュベーション終了時に、サンプルをさらに等容の PBS で希釈し (最終希釈率 1:10)、均一化サンプルの塗抹標本を作成した。慢性気管支炎患者等から採取した喀痰サンプルの一部を規定濃度の食塩水で希釈し、希釈液で細菌培養を行った。サンプルはすべて 800G にて 4°C で 10 分間遠心し、上清を -70°C で保存した。培養で得られた細菌性病原菌は、標準的な方法で同定し、-70°C で凍結保存した。

顕微鏡観察による評価

喀痰と唾液の塗抹標本をグラム染色し、既報^{16,17}にしたがい単盲検の観察者がコード化と観察を行った。独立した弱拡大視野 (LPF) 5 ヶ所を観察した。各視野について、扁平上皮 (口咽頭) 細胞の数と、非扁平上皮細胞 (多形核細胞、マクロファージ、柱状上皮細胞、リンパ球) の数を数え上げ、スコアを付けた。スコア 1 は 10 個未満/LPF、スコア 2 は 10 個以上 25 個未満/LPF、スコア 3 は 25 個以上/LPF とした。各サンプルについて平均スコアを算出した。

生化学分析

喀痰および唾液の上清中のインターロイキン-8 (IL-8) 濃度を、既報¹⁷にしたがいサンドイッチ ELISA 法で測定した。本法による IL-8 の検出限界は 0.005ng/ml、直線範囲は 0.02ng/ml ~ 12.5 ng/ml であった。上清中の遊離エラストラーゼ活性を、既報¹⁷にしたがい、N-メトキシスクシニル-Ala-Ala-Pro-Val p-ニトロアニリドを合成基質とする比色酵素アッセイにより決定した。標準

品のエラスターゼとしては、白血球由来の力価測定済み精製酵素 (Sigma) を用いた。エラスターゼ活性の検出限界は 0.2nM、直線範囲は 0.4nM~2.5nM であった。

上清中のフィブリノゲン濃度は、サンドイッチ ELISA 法を用いて下記のように測定した。ウサギ抗ヒト・フィブリノゲン抗体 (Dako) でコーティングした 96 穴プレートのウェルに、0.5% Tween-20 (PWB) を含む 1% blotto-PBS で希釈した喀痰の上清 100 μ l を注入した。別のウェルに対照用のフィブリノゲン標準品 (Sigma) の希釈列を入れ、同時にインキュベートし、検量線を作成した。37°C で 2 時間インキュベートした後、各ウェルを PWB で洗浄し、3% ヤギ血清を含む PWB で 1 万倍に希釈した HRP 標識化ウサギ抗ヒト・フィブリノゲン抗体 (Dako) 100 μ l を各ウェルに加え、室温で 1 時間インキュベートした。PWB で洗浄後、10mg/ml の 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) を含むジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液を 0.02% の過酸化水素を含む 0.1 M 酢酸ナトリウム溶液 pH 4.5 で 100 倍に希釈した溶液を加え、室温に 15 分間放置した。1M 硫酸で溶液を酸性にすることで呈色反応を停止させ、450nm における吸光度 OD₄₅₀ を測定した。フィブリノゲンの検出限界は 0.2ng/ml、直線範囲は 0.78ng/ml~50ng/ml であった。

データ解析

データはすべて、Statview 5.0 ソフトウェアを使用し、非パラメトリック統計法により解析した。一対比較には、Wilcoxon 符号順位検定法を適用した。p<0.05 の場合を有意と解釈した。

結果

被験者の個体群統計

招集された被験者全員について検討を終了した。慢性気管支炎の被験者 1 名については気管支痙攣がみられたため、高張食塩水による誘発を 3 分間で中止したが、喀痰サンプルは採取した。これら健康な被験者 10 名と慢性気管支炎の被験者 20 名の個体群統計的特徴を、表 1 にまとめる。慢性気管支炎の被験者 4 名は 70% より大きい FEV₁/FVC 比を示し (GOLD ステージ 0)、2 名は軽度の閉塞を示し (FEV₁ >80%、GOLD ステージ 1)、5 名は中等度の閉塞を示し (FEV₁ 50~79%、GOLD ステージ 2a)、7 名はやや重度の閉塞を示し (FEV₁ 30~49%、GOLD ステージ 2b)、2 名は重度の気道閉塞を示した (FEV₁ <30%、GOLD ステージ 3)¹⁸。

健康な対照群における喀痰サンプルと唾液サンプルとの比較

Lung Flute™ を用いた誘発で得られたサンプルを、同じ被験者等から得られた唾液サンプルと比較した (表 2)。Lung Flute™ で得られたサンプルは、唾液サンプルに比べ、IL-8 とフィブリノゲンが有意に高く、エラスターゼ活性が有意に低かった。

Lung Flute™ で採取した 10 サンプル中、3 サンプルは、グラム染色で観察した非扁平細胞数/LPF が 10 個未満 (平均スコア 1) であった。これらのサンプル中の IL-8、フィブリノゲンおよびエラスターゼ濃度は、対応する唾液サンプル中の各濃度とほぼ同様であった。残り 7 サンプルは、非扁平細胞数/LPF が平均 10 個以上であり (平均スコア >1)、いずれのサンプルも、対応する唾液サンプルと実質的に異なる生化学的測定値を 1 つまたは複数示した。したがって、健康な非喫煙者等における Lung Flute™ による喀痰誘発の総合的な成功率は 70% であった。

慢性気管支炎の被験者における喀痰サンプルと唾液サンプルとの比較

Lung Flute™ を用いた誘発で得られたサンプルを、同じ被験者等から得られた唾液サンプル、および高張食塩水を用いた誘発で得られた喀痰サンプルと比較した (表 3)。Lung Flute™ で採取したサンプルは、唾液サンプルに比べて IL-8 とフィブリノゲンが有意に高かった。さらに、Lung Flute™ で得られたサンプルは、唾液サンプルに比べ、非扁平細胞および顕微鏡観察による膿が有意に多かった。

Lung Flute™ で採取した 20 サンプル中、2 サンプルは、グラム染色で観察した非扁平細胞数/LPF が 10 個未満であった (平均スコア 1)。これらのサンプル中の IL-8 およびフィブリノゲン濃度は、対応する唾液サンプルよりも有意に高かった。残り 18 サンプルは、非扁平細胞数/LPF が平均 10 個以上であり (平均スコア >1)、対応する唾液サンプルと実質的に異なる生化学的測定値を 1 つまたは複数示した。したがって、慢性気管支炎の被験者等における Lung Flute™ による喀痰誘発の総合的な成功率は 100%であった。

異なる誘発法で採取された喀痰サンプル間の比較

Lung Flute™ で採取したサンプルと、高張食塩水を用いて得られたサンプルとは、後者において扁平細胞数が少ないこと以外は、細胞学的・生化学的特徴に有意な差がみられなかった。Lung Flute™ を用いて得られた 20 サンプル中、12 サンプル (60%)、および食塩水を用いて得られた 20 サンプル中、10 サンプル (50%) には、培養により強い呼吸器病原体が出現した。培養実験の結果は被験者 9 名において完全に一致し (両サンプル共に病原体がみられないか、または同じ病原体プロファイルがみられる)、被験者 7 名において部分的に一致し (両サンプル共に病原体が単離されるが、プロファイルが異なる)、被験者 4 名では一致しなかった (一方のサンプルには病原体がみられず、他方のサンプルには病原体がみられる)。

喀痰誘発の副作用

健康な被験者等においては、Lung Flute™ による痰誘発後、過渡的な喉刺激が 10 名全員にみられた。刺激は軽度で、継続期間は 24 時間未満であり、会話や嚥下への支障はなかった。慢性気管支炎の被験者等においては、20 名中、13 名 (65%) に同様の副作用がみられ、1 名 (5%) においては 24 時間以上継続した。慢性気管支炎の被験者 20 名中、1 名 (5%) は Lung Flute™ による誘発後に気管支収縮を起こしたが、アルブテロールの吸入により回復した。慢性気管支炎の被験者等において Lung Flute™ に関連して報告された 24 時間後の他の副作用としては、咳の増加が 3 名、しゃっくりが 1 名にみられた。

高張食塩水による誘発では、20 名中、10 名 (50%) の被験者に気管支収縮がみられたが、アルブテロールの吸入により回復した。我々は、将来を見越して気管支収縮を下記の 1 つまたは複数の症状と定義した。すなわち、FEV₁ の 20%以上の低下、呼吸困難または胸苦しきの発現、および胸部聴診で判明する喘鳴の増大である。10 名中、3 名の被験者において、気管支収縮の唯一の症状として喘鳴の増大が聴診で判明した。

考察

本研究は、ヒト被験者への Lung Flute™ 適用に関する初めての体系的な研究である。したがって、本研究の主たる目的は Lung Flute™ が妥当なレベルで安全かつ効率的であることを実証することであった。Lung Flute™ は、健康な非喫煙者の 70%、および慢性気管支炎の被験者（多くは気道閉塞、すなわち COPD）の 100%に喀痰を誘発することができた。その成功率は、高張食塩水による誘発における成功率^{5,19}に匹敵する。また、Lung Flute™ は安全であるが、主な副作用として過渡的な喉刺激を生ずる。この副作用が Lung Flute™ の反復使用の障害となるか否かについては、検討が必要である。Lung Flute™ による誘発は迅速、簡便であり、被験者等への使い方の指導もごく僅かで済んだ。

あらゆる新しい方法は、標準的な方法と比較する必要がある。Lung Flute™ に関しては、慢性気管支炎の被験者等において、高張食塩水との比較を行った。Lung Flute™ で得られたサンプルは、おそらく唾液の混入が多いことに起因してサンプル中の扁平細胞数が多かったこと以外は、高張食塩水を用いて得られたサンプルと同等であった。Lung Flute™ の大きな利点は、気管支痙攣の発生率が高張食塩水に比べて遙かに低い(5% vs 50%)ことであった。本研究において、高張食塩水による気管支痙攣の発生率は、過去の報告値¹²よりも高かった。これは恐らく、気管支痙攣の定義が広いこと、 $\beta 2$ 作用薬の吸入による前投薬量が少ないこと、高出力の噴霧器を使用していることに関連していると考えられる¹²。

本研究において、誘発痰中に唾液よりも高濃度の IL-8 およびフィブリノゲンがみられたことは、以前の知見を追認し発展させるものである^{5,20}。さらに、以前にも示されているように、慢性気管支炎患者では健康な非喫煙者よりも高濃度の IL-8 およびフィブリノゲンがみられた^{20,21}。健康な対照群では誘発痰中のエラスターゼ活性が唾液中よりも有意に低く、慢性気管支炎患者等では喀痰サンプル中と唾液中のエラスターゼ濃度は同等であることは、驚くべき知見である。しかし、歯科関係の文献では、唾液には遊離エラスターゼが含まれており、その量は歯周病患者において増大することが示されている^{22,23}。さらに、唾液エラスターゼは頻繁な喫煙により減少する²³。我々は、今回の被験者等について歯の健康に関する調査は行わなかった。しかし、今回の健康な非喫煙者の数名に高濃度の唾液エラスターゼが観測されたことから、歯周病に関連があった可能性がある。さらに、今回の慢性気管支炎患者の多くが現在も喫煙者であったことから、我々は、唾液エラスターゼの濃度がその被験者群において低かったと考えている。我々は、健康な被験者等の誘発痰中のエラスターゼが有意に低かったことは、誘発により得られた下気道分泌物中の分泌型白血球プロテアーゼ阻害剤(SLPI)および α -1 アンチトリプシンのアンチプロテアーゼ活性²⁴に関連があると推測している。また我々は、慢性気管支炎患者から採取される唾液サンプルと喀痰サンプルとの間にエラスターゼ活性の差が無いことは、プロテアーゼとアンチプロテアーゼとのバランスが慢性気管支炎の被験者等におけるタンパク分解活性にとって有利に変化することで説明できると考えている。

本研究の限界としては、喀痰サンプルおよび唾液サンプルのサイトスピン標本で実施される総細胞数および百分率細胞数のカウントを行っていないことが挙げられる²⁵。我々は、その代わりとして、グラム染色塗抹標本を用いて細胞性を評価し、そのサンプルが上気道、下気道のいずれに由来するかを適切に判断することができた。我々はまた、健康な非喫煙者等における Lung Flute™ の有効性と、高張食塩水による誘発も比較していない。本研究はまた、Lung Flute™ が喀痰を誘発

するメカニズムについても何ら洞察を行っていない。これらは、Lung Flute™に関する今後の研究課題となろう。

高張食塩水やマニトール等の高浸透圧剤は、粘膜毛様体クリアランスを増大させることによって喀痰を誘発する²⁶。かかる粘膜毛様体クリアランスの増大は、恐らく毛様体の活動量の増大ならびに粘液の輸送性の増大に関連している²⁷。Lung Flute™が喀痰を誘発する正確なメカニズムは不明である。仮説的なメカニズムとしては、気管気管支の粘膜毛様体ブランケットの音波による振動が考えられる。この振動により、分泌物の粘度が低下するか、毛様体の拍動周波数が増大するか、あるいはその両方が生ずる可能性がある。さらに付加的な、あるいはこれに代わるメカニズムとしては、上下気道における求心的な神経終末の音波刺激による咳反射の増強、および粘膜毛様体の分泌の増強が挙げられる。Lung Flute™が喀痰を誘発する正確なメカニズムを解明するには、粘膜毛様体クリアランスの直接測定と、単離した気道を用いる *in vitro* 実験が必要である^{26;27}。

下気道分泌物を非侵襲的に採取できる安全、有効かつ簡便な新方法は、感染性、気道、実質および腫瘍性の諸疾患等、広範な呼吸器系疾患の研究・診断への応用が期待される¹⁵。かかる方法はまた、気道の炎症を繰り返し測定することにより、治療応答の監視強化にも役立つ可能性がある^{9;28}。さらに、下気道分泌物のクリアランスを増強し、家庭での実施にも適する方法があれば、嚢胞性線維症、気管支拡張症、慢性気管支炎、無気肺、長期にわたる人工呼吸等^{29;30}、回収分泌物によって特徴付けられる呼吸器系疾患の治療に極めて有用であろう。Lung Flute™は、その有効性、簡便性および安全性ゆえに、これらの診断・治療用途の幾つかにおいて大きな利用可能性を秘めている。

参考文献

1. Zar, H. J., E. Tannenbaum, D. Hanslo, and G. Hussey. 2003. Sputum induction as a diagnostic tool for community-acquired pneumonia in infants and young children from a high HIV prevalence area. *Pediatr Pulmonol* 36:58-62.
2. Cruciani, M., P. Marcati, M. Malena, O. Bosco, G. Serpelloni, and C. Mengoli. 2002. Meta-analysis of diagnostic procedures for *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-1-infected patients. *Eur Respir J* 20:982-9.
3. Conde, M. B., A. C. Loivos, V. M. Rezende, S. L. Soares, F. C. Mello, A. L. Reingold, C. L. Daley, and A. L. Kritski. 2003. Yield of sputum induction in the diagnosis of pleural tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 167:723-5.
4. Pin, I., P. G. Gibson, R. Kolendowicz, A. Girgis-Gabardo, J. A. Denburg, F. E. Hargreave, and J. Dolovich. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992;47:25-29.
5. Fahy, J. V., J. Liu, H. Wong, and H. A. Boushey. 1993. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 147:1126-31.
6. Keatings, V. M., A. Jatakanon, Y. M. Worsdell, and P. J. Barnes. 1997. Effects of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD.

Am J Respir Crit Care Med 155:542-8.

7. Crapo, R. O., R. L. Jensen, and F. E. Hargreave. Airway inflammation in COPD: physiological

outcome measures and induced sputum. *Eur Respir J* 2003;21:19s-28s.

8. Ayik, S. O., O. K. Basoglu, M. Erdinc, A. Veral, and C. Bilgen. Eosinophilic bronchitis as a cause of chronic cough. *Respir Med* 2003;97:695-701.

9. Wark, P. A., M. J. Hensley, N. Saltos, M. J. Boyle, R. C. Toneguzzi, G. D. Epid, J. L. Simpson, P. McElduff, and P. G. Gibson. 2003. Anti-inflammatory effect of itraconazole in stable allergic bronchopulmonary aspergillosis: a randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 111:952-7.

10. Paggiaro, P. L., P. Chanez, O. Holz, P. W. Ind, R. Djukanovic, P. Maestrelli, and P. J. Sterk. 2002. Sputum induction. *Eur Respir J Suppl* 37:3s-8s.

11. Djukanovic, R., P. J. Sterk, J. V. Fahy, and F. E. Hargreave. 2002. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J Suppl* 37:1s-2s.

12. Pizzichini, E., M. M. Pizzichini, R. Leigh, R. Djukanovic, and P. J. Sterk. 2002. Safety of sputum induction. *Eur Respir J Suppl* 37:9s-18s.

13. Holz, O., K. Richter, R. A. Jorres, P. Speckin, M. Mucke, and H. Magnussen. 1998. Changes in sputum composition between two inductions performed on consecutive days. *Thorax* 53:83-6.

14. Nightingale, J. A., D. F. Rogers, and P. J. Barnes. 1998. Effect of repeated sputum induction on cell counts in normal volunteers. *Thorax* 53:87-90.

15. Vignola, A. M., S. I. Rennard, F. E. Hargreave, J. V. Fahy, M. R. Bonsignore, R. Djukanovic, and P. J. Sterk. Future directions. *Eur Respir J* 2002;20:51s-55s.

16. Geckler, R. W., D. H. Gremillion, C. K. McAllister, and C. Ellenbogen. 1977. Microscopic and bacteriological comparison of paired sputa and transtracheal aspirates. *J Clin Microbiol* 6:396-9.

17. Sethi, S., K. Muscarella, N. Evans, K. L. Klingman, B. J. B. Grant, and T. F. Murphy. Airway inflammation and etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Chest* 2000;118:1557-1565.

18. Pauwels, R., A. S. Buist, P. M. A. Calverley, C. R. Jenkins, S. S. Hurd, and on behalf of the GOLD Scientific Committee. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:1256-1276.

19. Popov, T. A., M. M. Pizzichini, E. Pizzichini, R. Kolendowicz, Z. Punthakee, J. Dolovich, and F. E. Hargreave. 1995. Some technical factors influencing

- the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J* 8:559-65.
20. Pizzichini, E., M. M. Pizzichini, A. Efthimiadis, S. Evans, M. M. Morris, D. Squillace, G. J. Gleich, J. Dolovich, and F. E. Hargreave. 1996. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 154:308-17.
21. Keatings, V. M., P. D. Collins, D. M. Scott, and P. J. Barnes. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am.J.Respir.Crit.Care Med*. 1996;153:530-534.
22. Uitto, V. J., A. Nieminen, J. Coil, H. Hurttia, and H. Larjava. 1996. Oral fluid elastase as an indicator of periodontal health. *J Clin Periodontol* 23:30-7.
23. Pauletto, N. C., K. Liede, A. Nieminen, H. Larjava, and V. J. Uitto. 2000. Effect of cigarette smoking on oral elastase activity in adult periodontitis patients. *J Periodontol* 71:58-62.
24. Culpitt, S. V., W. Maziak, S. Loukidis, J. A. Nightingale, J. L. Matthews, and P. J. Barnes. 1999. Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines, and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1635-9.
25. Efthimiadis, A., A. Spanevello, Q. Hamid, M. M. Kelly, M. Linden, R. Louis, M. M. Pizzichini, E. Pizzichini, C. Ronchi, F. Van Overvel, and R. Djukanovic. 2002. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation. *Eur Respir J Suppl* 37:19s-23s.
26. Daviskas, E., S. D. Anderson, I. Gonda, S. Eberl, S. Meikle, J. P. Seale, and G. Bautovich. 1996. Inhalation of hypertonic saline aerosol enhances mucociliary clearance in asthmatic and healthy subjects. *Eur Respir J* 9:725-32.
27. Daviskas, E., S. D. Anderson, S. Eberl, H. K. Chan, I. H. Young, and J. P. Seale. 2002. Effects of terbutaline in combination with mannitol on mucociliary clearance. *Eur Respir J* 20:1423-9.
28. Pavord, I. D., P. J. Sterk, F. E. Hargreave, J. C. Kips, M. D. Inman, R. Louis, M. M. Pizzichini, E. H. Bel, I. Pin, D. C. Grootendorst, K. Parameswaran, and R. Djukanovic. 2002. Clinical applications of assessment of airway inflammation using induced sputum. *Eur Respir J Suppl* 37:40s-43s.
29. Hess, D. R. 2001. The evidence for secretion clearance techniques. *Respir Care* 46:1276-93.
30. Pryor, J. A. 1999. Physiotherapy for airway clearance in adults. *Eur Respir J* 14:1418-24.

表 1 被験者の個体群統計

特徴	健康な被験者等	慢性気管支炎の被験者
平均年齢 (範囲)	37.3 (19 - 65)	48.5 (38- 81)
性別: n (%)	男性: 4 (40%) 女性: 6 (60%)	男性: 16 (80%) 女性: 4 (20%)
人種: n (%)	白人: 5 (50%) アフリカ系米国人: 3 (30%) アジア系米国人: 2 (20%)	白人: 18 (90%) アフリカ系米国人: 2 (10%)
喫煙状況: n (%)	非喫煙者: 10 (100%)	現在喫煙者: 17 (85%) 元喫煙者: 3 (15%)
平均年間喫煙箱数 (範囲)		37 (25-120)
FEV ₁ 平均 ± 1SD		1.90 ± 0.77L
FEV ₁ % 予測 平均 ± 1SD		58.9 ± 22.7

FEV₁ = 1 秒間の強制呼吸量

表 2 Lung Flute™ で採取したサンプルと唾液との、細胞学的、生化学的特徴の比較。データは健康な被験者 10 名より取得。p 値は Wilcoxon 符号順位検定方により決定。

パラメータ メジアン (四分位範囲)	唾液	Lung Flute™ で 採取した痰	p 値 唾液 vs 喀痰
重量 (gm)	1.23 (0.24)	10.67 (5.57)	ND
膿 スコア	1 (0)	1 (1)	0.08
粘度 スコア	1 (0)	1 (0)	0.99
扁平細胞 スコア	2.8 (1.4)	1.8 (1.2)	0.12
非扁平細胞 スコア	1.0 (0.4)	2.0 (1.8)	0.11
IL-8 ng/ml	1.88 (4.48)	4.86 (7.06)	0.02
フィブリノゲン ng/ml	2133.74 (4025.29)	6127.77 (7410.74)	0.04
エラスターゼ nM	20.25 (26.7)	6.05 (3.05)	0.005

ND = 測定せず。

表 3 Lung Flute™ で採取したサンプルと、唾液および高張食塩水による誘発で得られたサンプルとの細胞学的、生化学的特徴の比較。データは慢性気管支炎の被験者等 20 名より取得。p 値は Wilcoxon 符号順位検定方により決定。

パラメータ メジアン (四分位範囲)	唾液 (SA)	Lung Flute™ で 採取した痰 (SPF)	高張食塩水 で採取した 痰 (SPS)	p 値 SPF vs SA	p 値 SPF vs SPS
重量 (gm)	1 (0.36)	7.43 (5.97)	6.51 (6.18)	ND	0.53
膿	1 (0)	2 (1)	2 (1)	<0.001	0.32
粘度	1 (0)	2 (0)	2 (0)	<0.001	0.99
上皮細胞 スコア	2.5 (1.5)	1.9 (1.5)	1.1 (0.8)	0.11	0.02
PMN スコア	1 (0.6)	2.5 (1.2)	2.8 (0.7)	0.001	0.09
IL-8 ng/ml	0.55 (1.61)	27.43 (142.57)	43.64 (368.77)	<0.001	0.68
フィブリノゲン ng/ml	436.92 (1339.89)	3642.76 (7614.73)	3866.15 (5313.38)	<0.001	0.12
エラスターゼ nM	4.20 (7.45)	5.45 (8.44)	5.5 (10.15)	0.90	0.53
強い病原体	ND	60%	50%	ND	ND

ND = 測定せず。