

급성 천식 악화와 natural killer T 세포의 관련성 규명

전남대학교 의과대학 알레르기내과학교실

고 영 일

Background/Aims: Natural killer T (NKT) cells have been reported to play a crucial role in the pathogenesis of asthma in a mouse model of acute asthma. However, the role for NKT cells in the pathogenesis of acute exacerbation in human asthma is not defined.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells and induced sputum were obtained at baseline and 8 hrs after challenges in 20 asthmatics who underwent bronchial provocation tests with *Dermatophagoides farinae* and 6 asthmatics who underwent aspirin inhalation challenges, or during exacerbation and convalescence in 9 asthmatics with acute exacerbation associated with upper respiratory tract infection. NKT cells were stained with 6B11 or anti-TCR α 24 monoclonal antibodies and analyzed with flowcytometric assays. Sputum cells, cytokines and chemokines were measured.

Results: Blood CD4⁺ 6B11⁺ NKT cells were increased after allergen challenges compared with baseline in 8 asthmatics with positive response ($p=0.04$), but not in 12 asthmatics with negative response. Blood CD3⁺ 6B11⁺ NKT cells ($p=0.04$) and CD3⁺ V α 24⁺ NKT cells ($p=0.04$) were decreased after aspirin challenges compared with baseline in 5 asthmatics with positive challenge. Blood CD4⁺ V α 24⁺ NKT cells were decreased during exacerbation compared with during convalescence in asthmatics with infection-associated exacerbation ($p=0.02$). Blood CD4⁺ V α 24⁺ NKT cells were inversely associated with sputum eosinophils ($R_s=-0.46$, $n=20$, $p=0.03$). However, the frequencies of sputum NKT cells did not change. Various cytokines and chemokines were increased during infection-associated exacerbation.

Conclusions: Blood NKT cells were decreased following aspirin challenge or during infection-associated exacerbation in asthmatics, suggesting that blood NKT cells might be mobilized to the lungs during acute exacerbation of asthma. Thus, NKT cells may play an important role in the pathogenesis of acute exacerbation in human asthma.

Key Words: Asthma; Exacerbation; Natural killer T cells

서 론

천식은 기도의 만성 염증성 질환으로 기도과민성과 기도 폐쇄의 가역성을 특징으로 하며 호전과 악화를 반복한다¹⁾. 천식은 흡입성 스테로이드 등의 항염증약물로 비교적 잘 조절되지만, 종종 급성악화로 응급실 내원 또는 입원을 하며, 중증악화의 경우 치료에도 불구하고 사망하기도 한다. 천식은 호흡기 바이러스 감염, 알레르겐 또는 직업성 물질, 아스피린 약물, 대기오염 등에 의해 흔히 악화된다²⁾. 천식악화로 인한 비용은 천식으로 인한 의료비의 상당 부분을 차지할 뿐만 아니라, 환자와 가족들의 삶의 질을 심각하게 감소시킨다³⁻⁵⁾. 지난 50년간 천식악화의 빈도수와 중증도를 감소시키려는 노력으로 천식에 대한 신약물 개발 연구를 지속해 오고 있으나⁶⁾, 천식악화의 면역학적 병인기전이 잘 알려져 있지 않아 한계점을 가지고 있다.

최근 천식의 병인기전에서 natural killer T (NKT) 세포가 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다⁷⁾. NKT 세포는 NK 세포 수용체와 $\alpha\beta$ T 세포 수용체 ($\alpha\beta$ T cell receptor, $\alpha\beta$ TCR)를 동시에 가지고 있는 독특한 T 세포로, 활성화되면 다량의 Th1/Th2 사이토카인을 순식간(90분 이내)에 분비하여, 수지상세포(dendritic cells), 자연살해세포(natural killer cells), B 세포, CD4⁺/CD8⁺ 고식적 T 세포(conventional T cells) 등에 영향을 미쳐 강력한 면역조절 기능을 나타낸다⁸⁾. NKT 세포는 고식적 T 세포와는 달리 항원제시세포(antigen-presenting cells)의 class I 또는 II MHC에 의해 제시되는 단백질 항원에 반응하지 않고, class I-like MHC인 CD1d molecule에 의해 제시되는 당지질(glycolipid) 항원에 의해 반응하여 활성화되는 차이점이 있다. 고식적 T 세포가 다양한 TCR을 가지는데 반하여 NKT 세포는 매우 제한된 수의 TCR을 가지며, 쥐에서는 V α 14-J α 18 TCR을, 사람에서는 V α 24-J α 18 TCR을 가진다⁸⁻¹⁰⁾.

이러한 TCR을 가지는 NKT 세포를 invariant NKT (iNKT, 제 1형 NKT, classical NKT) 세포라고 부르는데, 이외에도 제2형 (non-classical), 제3형(NKT-like cell, CD1d-independent) NKT 세포와 같은 non-invariant NKT 세포들도 존재한다¹¹⁾. 이러한 NKT 세포는 천식 이외의 다른 질환들 즉, 기생충 및 바이러스 등의 감염성 질환, 원발성 담관 경화증(primary biliary cirrhosis), 제1형 당뇨병, 루프스, 동맥경화성 질환(atherosclerosis) 등의 병인기전에 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾.

동물실험을 통한 연구에서 알레르겐^{12,13)} 또는 오존 유도성 기도과민성의 병인기전에 iNKT 세포가 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었고¹⁴⁾, 마우스 기도에 iNKT 세포를 자극하는 α -Galactosyl Ceramide를 투여하면 기도과민성과 기도염증이 발생되었고¹⁵⁾, T-bet 결핍 마우스에서 발생하는 기도과민성에도 iNKT 세포가 역할을 하는 것으로 보고되었다¹⁶⁾. Non-invariant NKT 세포도 천식의 병인기전에 중요함이 보고되었다¹⁷⁾.

사람에서도 NKT 세포에 대한 연구가 진행되어 천식 환자의 기도에 NKT 세포가 증가되어 있는 것으로 보고되었다¹⁸⁻²¹⁾. 그러나 NKT세포의 증가를 관찰하지 못한 보고도 있어 더 많은 연구가 필요한 상태이다^{22,23)}. 최근 저자는 천식 환자의 말초혈액단핵구에서 NKT 세포 수를 측정하여 혈액 내 NKT 세포가 아토피를 나타내는 지표들 즉, 혈청 총 IgE와 피부단자검사로 나타낸 아토피 정도와 반비례 관련성을 나타내는 것으로 보고하였고²⁴⁾, 유도객담 NKT 세포를 측정하여 NKT 세포가 천식뿐만 아니라 호산구기관지염 환자에서도 증가하여 NKT 세포가 기도 내 호산구성 기도염증과 관련되는 것으로 보고하였다²⁵⁾. 사람에서도 천식의 병인기전에 NKT 세포가 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

그러나 지금까지 사람에서 NKT 세포 연구는 안정된 만성 천식 즉, 악화가 동반되지 않은 천식 환자를 대상으로 시행되어 왔고, 천식 급성악화와 관련하여 NKT 세포의 역할을 연구한 보고는 별로 없다. NKT 세포의 특징 즉, 활성화되면 Th1/Th2 시토카인(cytokines)을 신속하게 다량 분비하는 점을 고려하면, 천식의 급성악화의 병인기전에 NKT 세포가 관여될 가능성을 고려해 볼 만 하다.

현재 사용 중인 천식의 급성악화에 쓰이는 약물은 속효성 기관지확장제와 전신성스테로이드가 전부라고 할 수 있다. 천식의 급성악화에 관여하는 새로운 병인기전이 밝혀진다면 이와 관련된 신약개발이 가능할 것이다. 급성악화 시 치료 약물뿐만 아니라 악화가 예상되는 경우 예방하는 약물개발도 가능할 것으로 사료된다.

천식은 알레르겐 또는 아스피린 약물에 의해 악화될 수 있기 때문에, 본 연구에서는 알레르겐 또는 아스피린 기관지유발검사를 시행하여 유발 전후에 NKT 세포 수 변화를 분석하고, 또한 상기도감염 후에 흔히 악화되기 때문에 상기도감염 증상 이후 천식 악화로 입원한 환자를 대상으로 악화 시와 회복기에 NKT 세포 수 변화를 측정하여, 알레르겐, 아스피린, 상기도감염에 의한 천식악화의 병인기전에 혈액 및 기도 NKT 세포의 역할을 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 환자

총 35예의 천식환자를 대상으로 집먼지진드기 알레르겐 기관지유발검사를 시행한 환자 20예, 아스피린 기관지유발검사를 시행한 환자 6예, 감염 후 악화로 입원한 환자 9예를 대상으로 하였다. 집먼지진드기 기관지유발검사는 전형적 천식 증상이 있고, 기도가역성 또는 기도과민성이 증명되어 외래 진료를 받고 있는 천식 환자로, 집먼지진드기에 감작되어 있는 환자를 대상으로 하였다. 아스피린 기관지유발검사는 천식으로 진단되어 외래 진료를 받고 있는 환자 중 과거 아스피린 약물 관련 천식 악화 병력에서 아스피린 과민성 천식(aspirin-intolerant asthma)이 의심되는 경우를 대상으로 하였다. 급성 악화는 상기도감염 증상 이후 천식 증상의 악화와 함께 폐기능 FEV₁의 감소를 보이고²⁶⁾, 악화에 대한 약물요법으로 증상의 호전과 폐기능의 정상화를 보인 환자를 대상으로 하였다.

기도가역성은 속효성 기관지확장제 흡입 후 FEV₁이 12% 그리고 200 mL 이상 증가하는 경우로 정의하였다²⁷⁾. 기도과민성은 메타콜린 기관지유발검사를 시행하여 PC₂₀ 값이 25 mg/mL 미만인 경우 존재하는 것으로 하였다. 안정 시 만성 천식의 중증도 및 급성악화의 중증도 분류는 Global Initiative for Asthma 2002 가이드라인²⁸⁾에서 제시한 기준을 이용하였으며 즉, 천식약물 치료 전 증상 및 폐기능 정도에 따라 간헐성(intermittent), 경증 지속성(mild persistent), 중등도 지속성(moderate persistent), 중증 지속성(severe persistent)의 4 단계로 분류하였고, 만약 이미 천식약물을 사용하고 있는 경우에는 현재 천식 증상과 폐기능, 그리고 사용하고 있는 천식 약물 단계에 따라 상기 4단계로 분류하였다. 입원 당시 천식의 급성 악화 정도는 경증(mild), 중등도(moderate), 중증(severe), 호흡정지 직전(respiratory arrest imminent)으로 분류하였다.

혈청 총 IgE 및 혈액 호산구 수를 측정하였고, 가능한 경우

피부단자검사를 시행하였다. 모든 환자로부터 연구 참여에 관한 승낙서를 받았고, 본 병원 윤리위원회로부터 연구 승인을 받았다.

2. 혈액 호산구 수 및 혈청 총 IgE 측정

K3EDTA 항응고제가 들어 있는 Vacutainer 튜브(Ref. 366437, Becton Dickinson, Plymouth, UK)에 혈액을 담아 보관한 후 바로 COULTER® LH 750 analyzer (Coulter Electronics Inc., Hialeah, USA)를 이용하여 총 백혈구 수와 세포 분획을 측정하고, 총 백혈구 수에 호산구 분획을 곱하여 호산구 수를 계산하였다. 혈청 총 IgE 농도는 혈액을 채취하고 37°C에서 2 시간 동안 보관하여 혈액을 응고시킨 후, 10분 동안 1,350 g에서 원심분리하여 -20°C에 보관하여 Nephelometry (Behring Nephelometer Analyzer; Dade Behring, Marburg, Germany) 방법으로 측정하였다.

3. 피부단자검사 및 아토피 정의

흔한 12 흡입성 알레르겐(*Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*, cat, dog, *Alternaria tenuis*, trichophyton, cockroach, alder, birch, orchard, mugwort, ragweed)을 이용하여 표준화된 방법으로 환자의 등에 피부단자검사(Allergopharma, Reinbek, Germany)를 시행하고, 양성 또는 음성 대조액으로 각각 히스타민 또는 생리식염수를 이용하였다. 피부단자 15분 후 팽진 직경을 측정하여 장경과 그에 수직인 단경을 측정하여 이들의 산술 평균값을 구하고, 음성 대조액인 생리식염수에 대한 직경에 비해 3 mm 이상으로 증가된 경우 피부단자검사에서 양성으로 간주하였다. 최소한 한 가지라도 양성을 보이면 피부단자검사서 아토피가 있는 것으로 정의하였다. 피부반응의 정도는 히스타민 양성 대조액 팽진 직경에 대한 비율을 계산하여 25% 이상이고 50% 미만이면 1+, 50% 이상이고 100% 미만이면 2+, 100% 이상이고 200% 미만이면 3+, 200% 이상이면 4+로 정의하였다.

4. 알레르겐 기관지유발검사

집먼지진드기 알레르겐 *D. farinae* 추출액(Arthropods of Medical Importance Resource Bank, Seoul, Korea)으로 기관지유발검사를 시행하였다. 알레르겐 용액을 만들어 Lowry 방법²⁸⁾으로 단백질 농도를 측정하여 0.46 µg/mL임을 확인하였다. 기저치 FEV₁ (Spiro Analyzer ST-250, Fukuda Sangyo, Tokyo, Japan)을 측정한 다음, 생리식염수와 알레르겐 용액을 DeVillbiss 646 분무기(DeVillbiss Co., Somerset, PA, USA; output 0.13

mL/min)를 이용하여 2-min tidal breathing method로 흡입한 후 5, 10, 20분, 1시간째, 이후에는 1시간 간격으로 8시간 동안 FEV₁을 측정하였다. 집먼지진드기 용액은 10배 희석액부터 흡입하여 조기반응이 없으면, 다음에 원액(undiluted solution)을 흡입하였다. 조기반응은 알레르겐 흡입 후 처음 2시간 동안 FEV₁이 생리식염수 흡입에 비해 20% 이상 감소하는 경우에 양성으로 정의하였고, 후기반응 양성은 3시간째부터 8시간째까지 FEV₁이 20% 이상 감소되는 경우로 정의하였다²⁹⁾. 유발 전과 유발 후 8시간째 말초혈액과 유도객담을 얻었다.

5. 아스피린 기관지유발검사

Lysine-aspirin (Artalgyl®, 일양약품 또는 Aspirin Lysine®, 신풍제약) 900 mg을 생리식염수 1.4 mL에 녹여 2 M 농도로 만들고, 희석하여 1 M과 0.1 M 농도 용액을 만들었다. 기저치 FEV₁을 측정한 후 생리식염수를 흡입하고 FEV₁을 측정한다. 낮은 농도부터 고농도로 흡입 횟수를 늘려 아스피린 흡입 용량을 점차적으로 증가시켰다. 즉, 0.1 M을 1회(아스피린 용량 0.18 mg), 2회(0.36 mg), 5회(0.9 mg), 13회(2.34 mg), 1 M을 4회(7.2 mg), 9회(16.2 mg), 2 M을 11회(39.6 mg), 32회(115.2 mg)씩 증량하였다³⁰⁾. 흡입 후 30분째 FEV₁을 측정하고 20% 감소될 때까지 또는 마지막 용량까지 흡입하였다. 분무기는 압축공기원(Pulmo-Aide, DeVilbiss, Somerset, PA, USA)과 dosimeter (SM Instrument Company, Doylestown, PA, USA)에 연결된 DeVilbiss 분무기(Sunrise Medical, Somerset, PA, USA)를 이용하였다. 유발 양성은 생리식염수 흡입에 비해 20% 이상 감소되는 경우로 하였고³⁰⁾, 유발 전과 유발 후 8시간째 말초혈액과 유도객담을 얻었다.

6. 감염 후 악화 천식

급성 악화로 내원한 천식 환자에서 증상의 신속한 완화(quick-relief)를 목적으로 속효성 베타2 항진제인 salbutamol과 속효성 항콜린제인 ipratropium bromide를 흡입시키면서 말초혈액과 유도객담을 얻었다. 다른 증상 완화 약물 즉, systemic corticosteroids 및 aminophylline을 사용하고, 천식 조절 약물(controller)은 inhaled corticosteroids (ICS), long-acting beta2-agonist (LABA), leukotriene receptor antagonist (LTRA), sustained-release theophylline을 투여하였다. 증상이 소실되고 FEV₁이 정상화되면 입원 중 또는 퇴원 후 반복하여 말초혈액과 유도객담을 얻었다. 일부 환자들에서는 생리식염수와 혼합한 salbutamol과 ipratropium bromide 희석액을 흡입하면서 유도되는 객담을 얻었다.

7. 말초혈액단핵구(peripheral blood mononuclear cells) 분리

혈액을 heparinized vacutainer 튜브에 얻어, 동량의 Lymphoprep™ (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway)이 들어 있는 튜브에 조심스럽게 옆면을 따라서 흐르도록 하여 넣고, 실온에서 2,000 rpm으로 30분간 brake off한 상태로 원심분리한 후 중간에 생긴 interface 층을 따서 말초혈액단핵구를 얻었다²⁴⁾.

8. 객담 유도 및 처리

200 µg salbutamol 흡입으로 기관지를 확장시킨 다음, 초음파분무기(DeVilbiss-Sunrise Medical, Somerset, PA, USA)로 만들어진 고장액식염수 에어로졸을 흡입하도록 하여 객담을 유도하였다. 객담 무게를 재고 4배 용량의 0.1% dithiothreitol (DTT) (Sigma, St. Louis, MO) 용액을 혼합하여 객담을 녹이고 40 µm의 cell strainer에 filtration 후 상층액은 시토카인 및 케모카인(chemokines) 측정을 위해 -70°C에 보관하고 세포는 cytopins (Sakura, Tokyo, Japan)를 시행하여 슬라이드를 만들고 Diff-Quik (Sysmex Co., Kobe, Japan)으로 염색하였다. 편평세포, 대식세포, 호산구, 호중구, 림프구를 세어, 편평세포 수는 총 세포수에 대한 비율로, 대식세포, 호산구, 호중구, 림프구 수는 편평세포를 제외한 세포수에 대한 비율로 나타냈다. 슬라이드를 만드는데 필요한 세포 이외 나머지 세포는 NKT 세포를 측정하는데 이용하였다²⁵⁾. 편평세포가 총세포수의 80% 이상인 경우는 적절한 객담이 아닌 것으로 간주하여 분석에서 제외하였다³¹⁾.

9. NKT 세포 및 T 세포의 유세포측정법(flow cytometry)

말초혈액단핵구와 객담세포를 FITC-anti-CD4 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), PE-6B11 (BD Biosciences) 또는 PE-anti-TCR α 24 (Beckman Coulter, Marseille, France), PerCP-anti-CD3

(BD Biosciences)의 단클론항체와 4°C에서 30분 동안 배양하였다. 객담세포는 항체가 Fc γ 수용체에 비특이적으로 결합하는 것을 예방하기 위해 2 mg/mL polyclonal human immunoglobulin G (Sigma)로 미리 15분 동안 반응시킨 후 사용하였다. 6B11는 iNKT 세포의 V α 24-J α 18 T 세포 수용체 CDR3에 대한 단클론항체로 알려져 있다³²⁾. PE-mouse IgG₁ (BD Biosciences) 항체를 동형(isotype) 대조 항체로 사용하였고, four-color BD FACS Calibur (BD Biosciences)를 이용하여 유세포분석을 시행하였다. 일부 실험에서는 6B11+V α 24+ double positive iNKT 세포를 측정하기 위해 APC-6B11 (BD Biosciences)와 APC-mouse IgG₁ 동형 항체를 사용하였다. CD3+ T 세포를 gating 한 후에 CD3+6B11+ NKT, CD3+V α 24+ NKT, CD4+6B11+ NKT, CD4+V α 24+ NKT 세포, CD4+6B11+V α 24+ NKT 세포 수를 분석하여, CD3+ T 세포 수에 대한 비율(%)로 나타내었다(그림 1, 2). NKT 세포를 back-gating하여 이들 세포가 림프구라는 것을 확인하여, 객담세포 내 대식세포가 비특이적으로 염색되지 않았다는 것을 증명하였다. 6B11+ NKT 세포, V α 24+ NKT 세포는 forward- and side-scatter plot에서 전형적인 림프구인 것으로 확인되었다(그림 2)²⁵⁾. CD4+ T 세포는 CD3+ T 세포 중에서 6B11 또는 V α 24에 음성인 CD4+ T 세포로 정의하였고, CD3+ T 세포에 대한 비율로 나타내었다.

10. 객담 상층액 내 시토카인 및 케모카인 측정

객담 내 시토카인 및 케모카인은 Procarta cytokine assay kit (Affymetrix, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. -70°C에 동결 보관해 둔 객담 상층액을 PBS에 5배 희석하고, body fluid buffer로 점도를 낮추었다. Antibody bead에 1시간, detection antibody에 30분 동안 상온, 차광상태에서 반응시키고, streptavidin-PE와 5분 동안 반응시켜서, Luminex 200 (Mirai Bio,

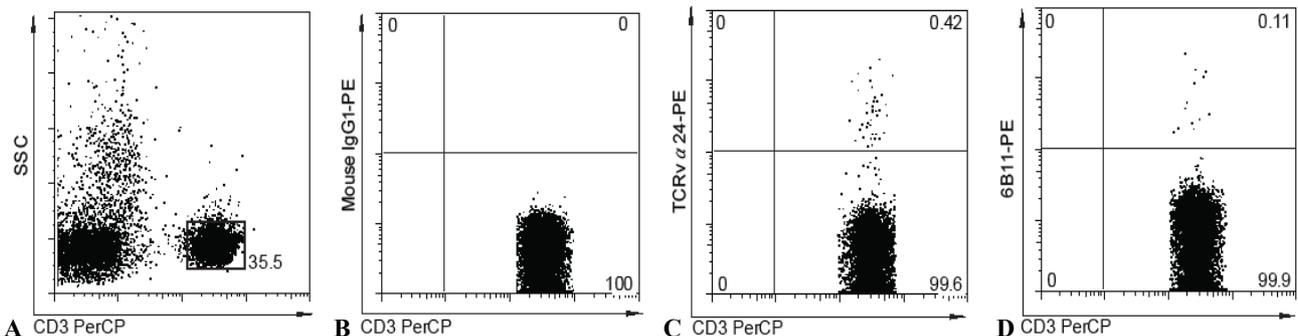


Figure 1. A representative example of flow cytometric analysis of blood NKT cells. CD3⁺V α 24⁺ NKT cells (C) and CD3⁺6B11⁺ NKT cells (D) were analyzed after gating CD3⁺ T cells (A). Mouse IgG₁-PE (B) was isotype for 6B11-PE and TCR α 24-PE. The number of NKT cells was shown as the percentage of CD3⁺ T cells.

CA, USA)를 이용해 IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-17, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , G-CSF, MIP-1 β , MCP-1, eotaxin, FGF basic, VEGF를 측정하였다.

11. 통계분석

결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 서로 다른 군은 Mann-

Whitney U 검정 및 교차분석으로 비교하였고, 동일군 내 전 후 비교는 Wilcoxon 검정으로 하였다. 변수들 간 상관성은 Spearman's correlation coefficient로 검정하였다. 윈도우용 SPSS 18.0 통계프로그램(SPSS Inc., Chicago, IL)을 사용하였고, $p < 0.05$ 인 경우 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. 환자특성

1) 알레르겐 기관지유발검사 대상 환자

표 1에 각 환자들의 특성을 정리하였다. 집먼지진드기 알레르겐을 흡입하여 기관지유발검사를 시행받은 20예 중 8예(40%)에서 조기 또는 후기 천식반응 양성을 보였고, 12예(60%)에서 음성을 보였다. 유발 양성군에서 조기반응 FEV₁은 31.1 \pm 3.0% 감소되었고 후기반응은 11.7 \pm 3.2% 감소되었고, 음성군에서는 조기 및 후기반응 FEV₁은 각각 6.4 \pm 1.6%, 2.1 \pm 3.7% 감소되었다. 양성군 모두 *D. farinae*에 감작되어 있었으며 8예 중 7예는 피부단자검사에 3+ 이상을 보였고, 1예는 피부단자검사를 시행하지 않았으나 multiple allergen simultaneous test 검사를 시행하였으며 *D. farinae*-특이 IgE 양성으로 확인되었다. 음성군에서는 2예는 피부단자검사에 음성, 1예는 피부단자검사 또는 혈청 특이 IgE 측정을 시행하지 않았으며, 나머지는 피부단자검사에 2+ 이상 양성을 보였다.

양성군과 음성군 간에 연령, 성별, 흡연(37.5% vs. 33.3%), 아토피(100.0% vs. 91.7%), 천식 유병 기간(15.1 \pm 4.1년 vs. 6.0 \pm 1.5년), 비염 동반(87.5% vs. 75.0%), 부비동염 동반(75.0% vs. 33.3%, $p=0.07$), 메타콜린 PC₂₀ (5.7 \pm 4.2 mg/mL, n=5 vs. 8.7 \pm 2.7 mg/mL, n=9), 혈청 총 IgE (890.3 \pm 326.0 IU/mL vs. 851.9 \pm 294.1 IU/mL), 혈액 호산구 수 (333.4 \pm 108.4 / μ L vs. 449.4 \pm 106.1 / μ L) 등의 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$). 기저치 FEV₁은 양성군에서 음성군에 비해 유의하게 낮았다($p=0.008$). ICS, LABA, LTRA, theophylline 사용 빈도 수의 차이는 없었으나, 양성군 중 3예(37.5%)에서는 고용량 ICS를 사용하고 있었다. 천식약물 사용을 고려하여 천식 중증도를 분류하였을 때 중증 천식을 가진 환자 비율은 양성군에서 음성군에 비해 유의하게 높았다(37.5% vs. 0%, $p=0.02$).

2) 아스피린 기관지유발검사 대상 환자

표 2에 각 환자들의 특성을 정리하였다. 아스피린 흡입 유발검사서에서 6예 중 5예(83.3%)에서 양성을 보였으며 1예는 음성을 보였다. 양성을 보인 환자들의 흡입된 아스피린 용량

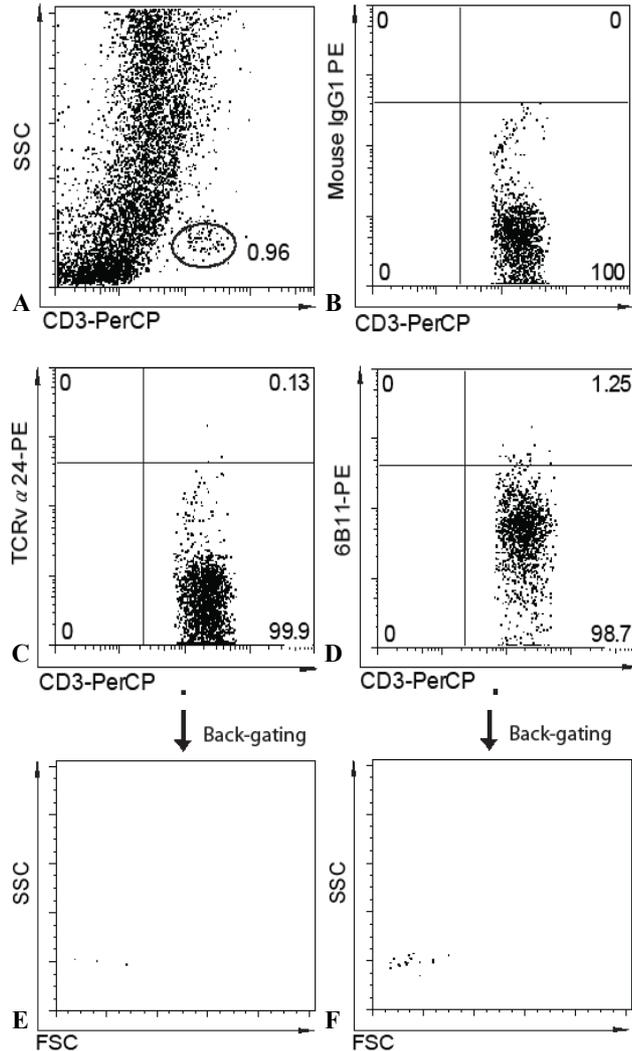


Figure 2. A representative example of flow cytometric analysis of sputum NKT cells. CD3+V α 24+ NKT cells (C) and CD3+6B11+ NKT cells (D) were analyzed after gating low side-scatter CD3+ T cells (A). Mouse IgG₁-PE (B) was isotype for 6B11-PE and TCRv α 24-PE. The number of NKT cells was shown as the percentage of CD3+ T cells. Back-gating of the CD3+V α 24+ NKT cells (C) and CD3+6B11+ NKT cells (D) showed that the V α 24+ NKT cells (E) and the 6B11+ NKT cells (F) were limited to the typical lymphocyte cluster in the forward- and side-scatter plot, respectively.

Table 1. Characteristics of asthmatics who underwent allergen bronchial provocation test

No.	Age (yr)	Sex (M/F)	FEV ₁ (% pred.)	Control medications	Asthma severity	Skin reactivity to <i>D. farinosa</i>	Maximum fall % in FEV ₁ after challenge	
							EAR	LAR
Positive								
1	49	M	72.7	ICS	Moderate	4+	28.2	-2.3
2	19	M	80.7	None	Intermittent	4+	46.2	24.3
3	46	F	77.7	ICS, LABA, LTRA, Theo	Severe	4+	37.3	23.0
4	50	F	59.2	ICS, LTRA	Moderate	3+	33.1	8.5
5	49	F	48.7	ICS, LABA, LTRA	Moderate	4.2*	23.6	18.4
6	49	M	76.7	ICS, LABA, LTRA, Theo	Severe	3+	23.2	6.4
7	29	M	68.9	ICS, LABA	Severe	4+	36.4	8.9
8	55	F	93.7	ICS, LABA	Moderate	4+	20.5	6.8
Mean±SEM	43.2±4.3		72.3±4.8				31.1±3.0	11.7±3.2
Negative								
9	28	M	82.4	ICS, LABA	Mild	4+	3.1	0.5
10	20	M	80.7	ICS, LABA	Moderate	4+	2.3	4.4
11	65	F	96.9	ICS, LABA, LTRA	Mild	2+	16.5	-0.4
12	46	F	95.4	ICS, LTRA	Mild	4+	8.3	19.1
13	69	M	104.8	ICS, LABA	Moderate	2+	1.6	0.3
14	24	M	89.6	None	Intermittent	ND	6.7	7.5
15	28	M	79.9	None	Moderate	0	4.8	2.5
16	33	M	92.6	ICS, LABA, LTRA	Moderate	2+	-0.7	-1.7
17	20	M	65.0	ICS, LABA	Moderate	0	0	-32.3
18	29	M	115.0	None	Intermittent	3+	12.0	5.3
19	26	M	89.0	None	Mild	3+	14.7	18.9
20	39	F	90.5	ICS, LABA	Moderate	4+	8.2	1.4
Mean±SEM	35.4±4.7		90.1±3.6				6.4±1.6	2.1±3.7

LAR was defined as a ≥20% fall in FEV₁ between 3 and 8 hours after allergen challenge.

M, male; F, female; FEV₁, forced expiratory volume in one second; D, Dermatophagoides; EAR, early asthmatic response; LAR, late asthmatic response; ICS, inhaled corticosteroid; LABA, long-acting beta2-agonist; LTRA, leukotriene receptor antagonist; Theo, sustained-release theophylline; ND, not determined. EAR was defined as a ≥20% fall in FEV₁ between 0 and 2 hours after allergen challenge.

* Denotes class determined by multiple allergen simultaneous test.

Table 2. Characteristics of asthmatics who underwent aspirin bronchial provocation test

No.	Age (yr)	Sex (M/F)	FEV ₁ (% of pred.)	Control medications	Asthma severity	Inhaled dose of aspirin (mg)	Maximum fall % in FEV ₁ after challenge
Positive							
1	52	M	90.1	ICS, LABA, LTRA	Moderate	7.2	45.6
2	70	M	62.5	ICS, LABA, LTRA	Moderate	16.2	47.2
3	50	F	62.7	ICS, LABA, LTRA, Theo	Moderate	16.2	34.1
4	48	F	60.5	ICS, LABA, LTRA, Theo	Moderate	2.3	20.3
5	53	M	69.2	ICS, LABA, LTRA, Theo	Moderate	16.2	23.9
Mean±SEM	54.6±3.9		69.0±5.4			11.6±2.9	34.2±5.4
Negative							
6	58	F	120.1	ICS, LABA	Moderate	115.2	15.0

M, male; F, female; FEV₁, forced expiratory volume in one second; ICS, inhaled corticosteroid; LABA, long-acting beta₂-agonist; LTRA, leukotriene receptor antagonist; Theo, sustained-release theophylline.

Table 3. Characteristics of patients with acute exacerbation of asthma following upper respiratory tract infection

No.	Age (yr)	Sex (M/F)	On admission		Exacerbation period (day)*	Medications		Best FEV ₁ after treatment (%)	
			FEV ₁ (% of pred.)	PaCO ₂ (mmHg)		Severity	Quick-relief		Long-term control†
1	51	F	59.8	36.6	0.5	Severe	BD, SS, AMP	+	101.5
2	18	M	22.6	39.2	7	Severe	BD, SS, AMP	+	110.1
3	33	M	50.5	43.0	15	Severe	BD, SS, AMP	+	100.7
4	48	M	29.8	42.0	5	Severe	BD, SS, AMP	+	73.7
5	21	F	35.4	34.0	4	Severe	BD, SS, AMP	+	82.3
6	56	F	59.5	39.0	7	Severe	BD, AMP	+	90.4
7	56	F	46.6	36.2	4	Severe	BD, SS, AMP	+	102.4
8	47	F	10.4	33.7	15	Severe	BD, SS, AMP	+	101.6
9	40	M	45.5	37.6	10	Severe	BD, SS, AMP	+	100.0
Mean±SEM	41.1±4.7		40.0±5.6	37.9±1.0	7.5±1.6				95.8±3.8

M, male; F, female; FEV₁, forced expiratory volume in one second; PaCO₂, partial pressure of carbon dioxide in the arterial blood; ND, not determined; BD, nebulized bronchodilators such as salbutamol and ipratropium bromide; SS, systemic steroids; AMP, aminophylline.

* Denotes the elapsed days since the onset of asthma exacerbation. † includes inhaled corticosteroid, long-acting beta2-agonist, leukotriene receptor antagonist and sustained-release theophylline.

은 11.6±2.9 mg이었고 유발검사 후 FEV₁은 34.2±5.4% 감소되었다. 양성을 보인 환자의 연령은 54.6±3.9년, 여성의 비율은 40%, 현재 흡연자는 없었으며, 피부단자검사는 4예에서 시행하였으며 모두 음성이었고, 비염 및 부비동염은 80%에서 동반되었고, 천식 유병 기간은 9.0±4.2년, 메타콜린 PC₂₀는 7.1±5.4 mg/mL, 혈청 총 IgE는 625.7±219.3 IU/mL, 혈액 호산구 수는 189.8±83.7/μL이었다. 기저치 FEV₁은 69.0±5.4%이었고, 모두 ICS, LABA, LTRA 등의 천식약물을 사용하고 있었다. 약물 사용을 고려한 천식 중증도의 분류는 모두 중등도 천식이었다.

3) 감염 후 악화 천식 환자

표 3에 각 환자들의 특성을 정리하였다. 모두 상기도감염 후 천식의 악화가 발생하였고, 감염 증상 발생 후 7.5±1.6일 지나서 내원하였다. 연령은 41.1±4.7년, 여성 5예(55.6%), 흡연가 1예(11.1%)이었고, 천식 유병 기간은 11.3±5.2년이고, 비염은 9예(100%) 모두에서 동반되고, 부비동염은 6예(66.7%)에서 동반되었고, 혈청 총 IgE 685.1±329.1 IU/mL, 혈액 호산구 수 799.2±164.7/μL이었다. 9예 중 2예(22.2%)에서는 ICS를 포함한 천식약물을 사용 중이었고, 나머지는 천식약물을 사용하지 않고 있었다. 내원 시 FEV₁은 40.0±5.6%, PaCO₂는 37.9±1.0 mmHg, 급성악화 중증도를 분류하였을 때 모두 중증으로 판단되었다. 모든 환자에서 폐렴은 없었다. 내원 이후 모두 salbutamol과 ipratropium을 사용하였고, 전신성 스테로이드는 8예(88.9%)에서 사용하였고, aminophylline은 모두에서 사용하였다. 이후 ICS, LABA, LTRA, theophylline 등의 천식 조절약물은 모두에서 사용되었다. 천식 약물 요법 후 최고 FEV₁은 95.8±3.8%로 내원 시에 비해 221.9±87.5% 증가되었다.

2. 유도객담 내 염증세포 변화

알레르겐 유발검사서 유발 음성군에서 총 세포수 및 대

식세포, 림프구, 호중구, 호산구 분획은 유발 전후 유의한 차이가 없었고, 호산구 분획의 경우 유발 후와 전의 차이는 2.9±4.2%이었다. 양성군에서는 총 세포수 및 대식세포, 림프구 분획의 차이가 없었고, 호중구 분획은 유의하게 감소하였으며, 호산구 분획은 4.3±4.1% 차이로 유발 전후에 유의한 변화가 없었다(표 4).

아스피린 유발검사서 유발 양성군 환자에서 총 세포수 및 림프구 분획은 유발 전후에 유의한 차이가 없었으나, 대식세포와 호중구 분획은 유발 후 유의하게 감소하였고($p < 0.05$), 호산구 분획은 유발 전에 비해 유발 후 15.0±4.0% 차이 만큼 증가하였다($p=0.07$) (표 5).

감염 후 악화된 천식 환자에서 회복기에 비교하여 악화 시에 총 세포수 및 대식세포, 림프구, 호중구 분획의 유의한 차이는 보이지 않았고, 호산구 분획이 회복기에 비해 19.6±12.1% 차이만큼 증가하였다(표 5).

3. 유도객담 내 시토카인과 케모카인 변화

알레르겐 유발 후 음성군에서는 IL-4, IL-7, IL-17, IFN- γ , G-CSF 시토카인은 유발 전에 비해 감소하였고, 양성군에서는 모든 시토카인과 케모카인의 유의한 증가는 없었다(표 6). 아스피린 유발 양성군에서 유발 전에 비해 유발 후 모든 시토카인과 케모카인의 변화는 관찰되지 않았다(표 7). 감염 후 악화 천식환자에서는 회복기에 비해 악화시에 IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-17, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , G-CSF, MIP-1 β , MCP-1, eotaxin, VEGF 등의 유의한 증가를 보였다(표 7).

4. NKT 세포와 T 세포 수 변화 분석

1) 알레르겐 기관지유발 후 변화

집먼지진드기 기관지유발검사 음성 또는 양성을 보인 환자에서 말초혈액단핵구 내 CD3+6B11+ NKT 또는 CD3+V

Table 4. Sputum cells after allergen bronchial provocation test

	Positive response (n=8)		Negative response (n=11)	
	Baseline	After challenge	Baseline	After challenge
Total cells ($\times 10^5/g$)	11.2±4.4	11.1±4.3	7.8±2.0	10.9±3.2
Squamous cells (%)	38.4±4.8	26.0±2.6*	25.8±4.1	30.8±5.8
Macrophages (%)	34.5±4.6	39.1±4.8	34.5±4.8	40.7±5.7
Lymphocytes (%)	5.0±1.3	6.9±2.0	6.8±2.1	4.5±1.2
Neutrophils (%)	50.5±3.3	39.7±2.4*	51.8±5.2	45.0±5.7
Eosinophils (%)	9.8±5.8	14.2±5.2	6.6±3.2	9.6±4.6

* $p < 0.05$ vs. baseline.

Table 5. Sputum cells after aspirin bronchial provocation test or during asthma exacerbation following upper respiratory tract infection

	Positive aspirin challenge (n=5)		Asthma exacerbation (n=8)	
	Baseline	After challenge	Exacerbation	Convalescence
Total cells ($\times 10^5/g$)	23.2 \pm 11.3	12.0 \pm 1.5	34.3 \pm 13.0	23.4 \pm 8.2
Squamous cells (%)	28.4 \pm 4.6	27.3 \pm 2.8	24.7 \pm 7.3	39.0 \pm 7.5
Macrophages (%)	18.2 \pm 2.8	25.8 \pm 5.2*	28.2 \pm 6.9	43.8 \pm 8.4
Lymphocytes (%)	3.4 \pm 0.6	2.7 \pm 1.0	3.5 \pm 0.5	2.6 \pm 1.4
Neutrophils (%)	66.2 \pm 5.8	44.3 \pm 10.1*	42.9 \pm 9.9	47.9 \pm 8.4
Eosinophils (%)	12.0 \pm 5.1	27.0 \pm 7.9	25.2 \pm 10.6	5.6 \pm 3.2

* $p < 0.05$ vs. baseline.

Table 6. Sputum cytokines and chemokines after allergen bronchial provocation test

	Positive response (n=8)		Negative response (n=11)	
	Baseline	After challenge	Baseline	After challenge
IL-1 (pg/mL)	80.3 \pm 27.5	57.9 \pm 20.5	50.2 \pm 12.1	52.1 \pm 23.1
IL-2 (pg/mL)	5.8 \pm 0.4	7.7 \pm 2.4	6.1 \pm 0.6	4.6 \pm 0.3
IL-4 (pg/mL)	6.1 \pm 0.6	8.7 \pm 2.9	7.7 \pm 1.2	5.4 \pm 0.3*
IL-5 (pg/mL)	3.7 \pm 0.4	6.3 \pm 3.1	4.6 \pm 0.8	3.5 \pm 0.3
IL-6 (pg/mL)	24.3 \pm 9.2	24.9 \pm 5.5	21.4 \pm 4.8	22.6 \pm 5.1
IL-7 (pg/mL)	4.2 \pm 0.3	7.7 \pm 2.3	5.8 \pm 1.2	3.6 \pm 0.2*
IL-8 (pg/mL)	299.0 \pm 105.9	356.7 \pm 135.0	322.1 \pm 110.5	246.7 \pm 75.5
IL-10 (pg/mL)	9.7 \pm 1.0	13.3 \pm 3.0	9.6 \pm 0.9	7.0 \pm 0.7*
IL-12 (pg/mL)	4.6 \pm 0.3	7.2 \pm 2.5	6.2 \pm 1.8	3.3 \pm 0.3
IL-13 (pg/mL)	4.4 \pm 0.2	7.5 \pm 2.0	4.4 \pm 0.2	3.5 \pm 0.2
IL-17 (pg/mL)	10.6 \pm 1.3	14.1 \pm 3.3	14.3 \pm 1.6	11.5 \pm 1.2*
IFN- γ (pg/mL)	4.8 \pm 0.3	6.0 \pm 1.7	5.3 \pm 0.7	3.8 \pm 0.2*
GM-CSF (pg/mL)	3.3 \pm 0.3	5.6 \pm 1.8	5.0 \pm 1.9	2.5 \pm 0.2
TNF- α (pg/mL)	4.6 \pm 0.5	7.3 \pm 2.2	4.7 \pm 0.4	4.0 \pm 0.3
G-CSF (pg/mL)	5.8 \pm 0.6	14.0 \pm 4.2	8.0 \pm 1.1	5.1 \pm 0.4*
MIP-1 β (pg/mL)	100.0 \pm 57.9	99.5 \pm 52.5	120.0 \pm 61.3	120.5 \pm 87.9
MCP-1 (pg/mL)	5.3 \pm 0.6	21.6 \pm 11.2	9.8 \pm 2.2	5.4 \pm 0.7
Eotaxin (pg/mL)	6.4 \pm 0.4	9.5 \pm 2.2	7.6 \pm 1.3	5.3 \pm 0.2
FGF basic (pg/mL)	33.4 \pm 5.1	34.5 \pm 7.0	29.5 \pm 7.6	17.9 \pm 2.1
VEGF (pg/mL)	11.3 \pm 0.9	33.8 \pm 13.0	41.3 \pm 12.8	25.1 \pm 6.2

IL, interleukin; IFN, interferon; GM-CSF, granulocyte macrophage colony-stimulating factor; TNF, tumor necrosis factor; MIP, macrophage inflammatory protein; MCP, monocyte chemotactic protein; FGF, fibroblast growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor.

* $p < 0.05$ vs. baseline.

$\alpha 24+$ NKT 세포 비율은 유발검사 전에 비해 유발 후 유의한 변화를 보이지 않았다. 그러나 $CD4+6B11+$ NKT 세포의 비율은 음성군에서는 유발 전후 변화가 없었지만, 양성군에서는 유발 전에 비해 유발 후 유의한 증가를 보였다($p=0.04$). $CD4+V\alpha 24+$ NKT 세포는 음성군 또는 양성군에서 유발 전 후에 유의한 차이를 보이지 않았다(그림 3A, 3B). 소수 환자들

을 대상으로 $CD4+6B11+V\alpha 24+$ NKT 세포 비율을 측정된 결과, 유발 전에 비해 유발 후에 음성군($0.011\pm 0.001\%$ vs. $0.008\pm 0.001\%$, $n=3$, $p=0.25$)에서는 약간 감소하는 반면, 양성군($0.007\pm 0.005\%$ vs. $0.015\pm 0.002\%$, $n=2$, $p=0.18$)에서는 약간 증가함을 보였다. $CD4+$ T 세포 비율은 음성군($58.0\pm 3.2\%$ vs. $59.2\pm 2.7\%$, $p > 0.05$) 또는 양성군($61.0\pm 4.5\%$ vs. $64.4\pm 4.3\%$, $p >$

Table 7. Sputum cytokines and chemokines after aspirin bronchial provocation test or during asthma exacerbation following upper respiratory tract infection

	Positive aspirin challenge (n=5)		Asthma exacerbation (n=8)	
	Baseline	After challenge	Exacerbation	Convalescence
IL-1 (pg/mL)	330.9±259.5	31.9±4.1	524.6±341.9*	31.3±11.6
IL-2 (pg/mL)	6.4±0.4	6.4±0.8	21.3±9.0*	5.3±0.4
IL-4 (pg/mL)	7.8±0.4	7.1±0.9	21.1±9.2*	5.8±0.3
IL-5 (pg/mL)	4.9±0.6	5.7±0.9	47.1±14.5*	3.8±0.2
IL-6 (pg/mL)	56.2±25.1	42.4±7.6	232.7±146.7*	21.9±8.4
IL-7 (pg/mL)	4.6±0.5	5.2±0.7	16.5±6.7*	4.1±0.3
IL-8 (pg/mL)	1,128.3±780.4	209.0±62.6	1,508.0±663.1	598.5±353.8
IL-10 (pg/mL)	8.0±0.4	8.8±0.6	22.8±7.0	8.8±2.3
IL-12 (pg/mL)	4.6±0.4	5.0±0.5	19.1±8.2*	4.0±0.6
IL-13 (pg/mL)	5.4±0.4	5.8±0.2	16.8±6.5*	4.5±0.5
IL-17 (pg/mL)	14.2±0.7	12.9±1.8	29.1±10.8	12.2±2.1
IFN- γ (pg/mL)	5.4±0.2	5.6±0.6	16.9±6.9*	4.3±0.3
GM-CSF (pg/mL)	3.4±0.4	4.1±0.5	15.6±7.2*	2.9±0.3
TNF- α (pg/mL)	5.2±0.2	5.2±0.4	17.6±7.2*	4.4±0.3
G-CSF (pg/mL)	8.1±1.0	7.3±1.0	20.9±6.7*	6.0±0.9
MIP-1 β (pg/mL)	931.1±866.1	77.0±30.2	1,823.0±482.8*	320.7±178.7
MCP-1 (pg/mL)	12.6±3.2	11.5±4.2	486.1±452.4	17.6±5.7
Eotaxin (pg/mL)	7.2±0.3	7.2±0.3	18.0±7.0*	8.0±0.9
FGF basic (pg/mL)	17.4±3.4	16.4±0.8	40.2±7.2	25.5±9.7
VEGF (pg/mL)	30.8±6.9	30.0±14.4	46.0±9.9*	31.3±8.3

IL, interleukin; IFN, interferon; GM-CSF, granulocyte macrophage colony-stimulating factor; TNF, tumor necrosis factor; MIP, macrophage inflammatory protein; MCP, monocyte chemotactic protein; FGF, fibroblast growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor.

* $p < 0.05$ vs. convalescence.

0.05)에서 각각 유발 전과 후에 유의한 차이가 없었다.

객담 내 CD3+6B11+ NKT, CD3+V α 24+ NKT, CD4+6B11+ NKT, CD4+V α 24+ NKT 세포 비율은 음성군 또는 양성군 각각에서 유발 전에 비해 유발 후에 감소되는 경향을 보였지만, 유의한 차이는 없었다(그림 3C, 3D). 객담 내 CD4+ T 세포 비율은 음성군(31.5±5.0% vs. 40.3±6.5%, n=11, $p > 0.05$) 또는 양성군(33.4±6.6% vs. 43.8±10.9%, n=8, $p > 0.05$)에서 각각 유발 전과 후에 유의한 차이가 없었다.

2) 아스피린 기관지유발 후 변화

아스피린 유발검사에 양성반응을 보인 5예 환자들을 대상으로 유발 전 후 NKT와 T 세포 수의 변화를 분석하였다. 말초혈액 내 CD3+6B11+ NKT ($p=0.04$)와 CD3+V α 24+ NKT 세포($p=0.04$) 비율은 아스피린 유발 전에 비해 유발 후에 유의

하게 감소되었다. CD4+6B11+ NKT 및 CD4+V α 24+ NKT 세포($p=0.08$) 비율은 유발 전에 비해 유발 후에 감소되었다(그림 4A). 혈액 내 CD4+ T 세포 비율은 유발 전에 비해 유발 후에 유의한 차이가 없었다 (67.1±5.1% vs. 68.7±5.7%, $p > 0.05$).

객담 내 CD3+6B11+ NKT, CD3+V α 24+ NKT, CD4+6B11+ NKT, CD4+V α 24+ NKT 세포 비율은 양성군에서 유발 전에 비해 유발 후에 감소되는 경향을 보였지만, 유의한 차이는 없었다(그림 4B). 객담 내 CD4+ T 세포 비율은 유발 전에 비해 유발 후에 차이가 없었다(48.8±16.2% vs. 34.4±13.7%, n=4, $p > 0.05$).

3) 감염 후 천식 악화 시 변화

혈액 내 CD3+6B11+ NKT 와 CD3+V α 24+ NKT ($p=0.07$) 세

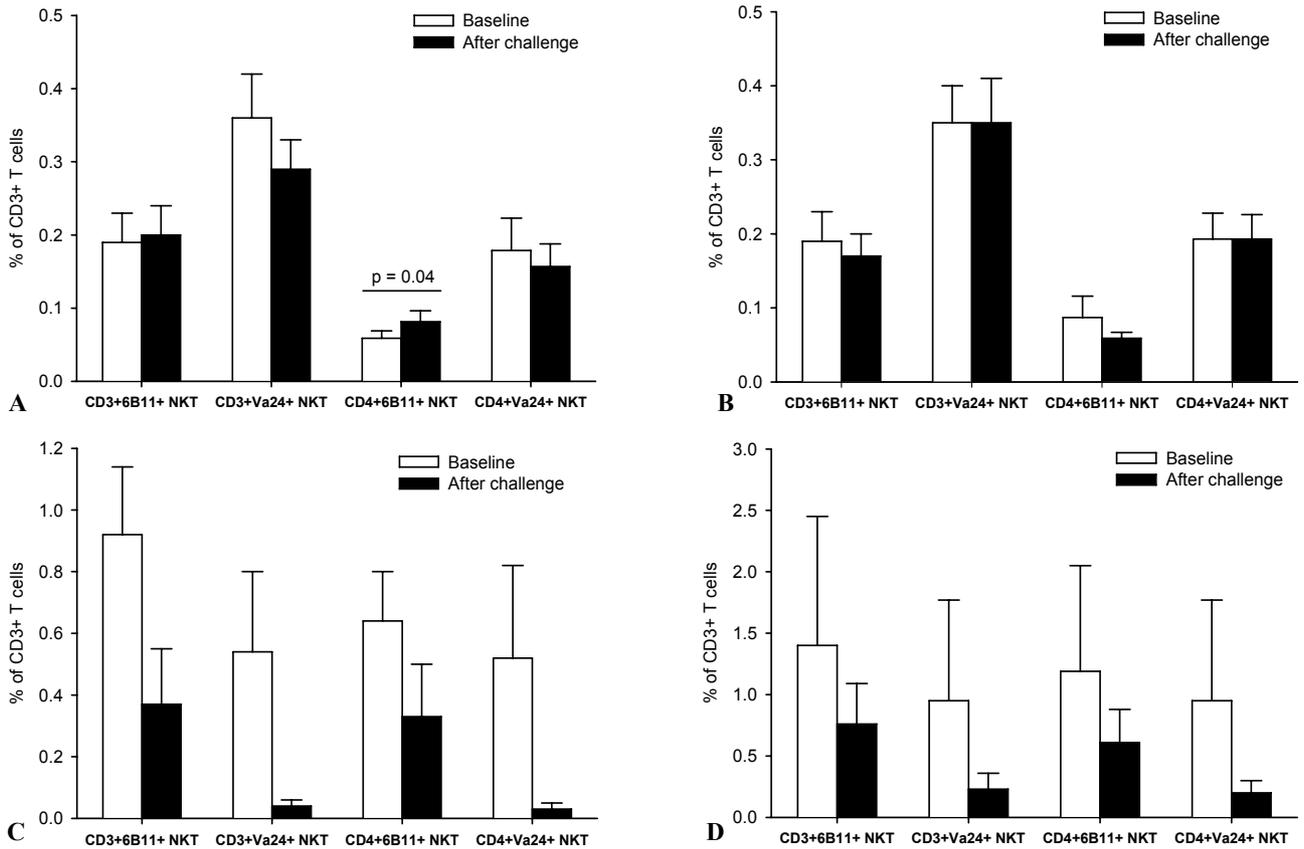


Figure 3. The frequency of NKT cells in peripheral blood mononuclear cells and the induced sputum at baseline and after challenges in asthmatics with positive allergen challenges (A for blood, n=8 and C for sputum, n=6) and in those with negative challenges (B for blood, n=12 and D for sputum, n=8). Data are expressed as the percentage of CD3⁺ T cells.

포 비율은 회복기에 비해 악화시에 유의하지는 않지만 감소되었다. CD4+6B11+ NKT 세포 비율도 회복기에 비해 악화시에 감소되었고($p=0.09$), CD4+Va24+ NKT 세포 비율은 유의하게 감소되었다($p=0.02$) (그림 5A). 혈액 내 CD4+ T 세포 비율은 회복기에 비해 악화 시에 유의한 차이는 없었다 ($65.5\pm 3.4\%$ vs. $67.1\pm 2.8\%$, $p > 0.05$).

객담 내 CD3+6B11+ NKT, CD3+Va24+ NKT, CD4+6B11+ NKT, CD4+Va24+ NKT 세포 비율은 회복기에 비해 악화 시 감소되는 경향을 보였지만, 유의한 차이는 없었다(그림 5B). 객담 내 CD4+ T 세포 비율은 회복기에 비해 악화 시 유의한 차이가 없었다($33.6\pm 7.8\%$ vs. $31.3\pm 7.6\%$, $n=7$, $p > 0.05$).

5. 말초혈액 내 NKT 세포와 객담 내 호산구와의 관련성

알레르겐 기관지유발 양성군에서 유발 전후 객담 호산구 분획의 차이는 혈액 NKT 세포 분획의 차이와 유의한 상관관계가 없었다. 그러나 유발 후 8시간째 측정된 객담 호산구

분획과 혈액 CD4+Va24+ NKT 세포 분획 간에는 유의 상관관계를 보였다($R_s=0.68$, $n=8$, $p=0.06$). 음성군에서는 이러한 상관관계가 관찰되지 않았다. 아스피린 유발 양성군에서 유발 전후 객담 호산구 분획의 차이와 혈액 NKT 세포 분획 차이의 상관관계 또는 유발 후 8시간째 측정된 객담 호산구 분획과 혈액 CD4+Va24+ NKT 세포 분획 간 상관관계는 없었다. 감염후 천식 악화를 보인 환자에서 회복기와 악화 시 객담 호산구 분획의 차이는 혈액 CD3+6B11+ NKT 세포 분획 ($R_s=0.64$, $n=8$, $p=0.09$) 또는 CD4+6B11+ NKT 세포 분획의 차이($R_s=0.76$, $n=8$, $p=0.03$)와 유의 상관관계를 보였다. 악화 시 측정된 객담 호산구 분획과 혈액 CD4+Va24+ NKT 세포 분획 간에는 유의 상관관계의 경향이 있었다($R_s=0.49$, $n=9$, $p=0.18$).

알레르겐 유발검사 양성군에서 유발 후 객담 또는 혈액 NKT 세포 수, 아스피린 유발검사 양성군에서 유발 객담 또는 혈액 NKT 세포 수, 감염후 천식 악화 시 객담 또는 혈액 NKT 세포 수 결과를 종합하여 분석하였을 때, 객담 호산구

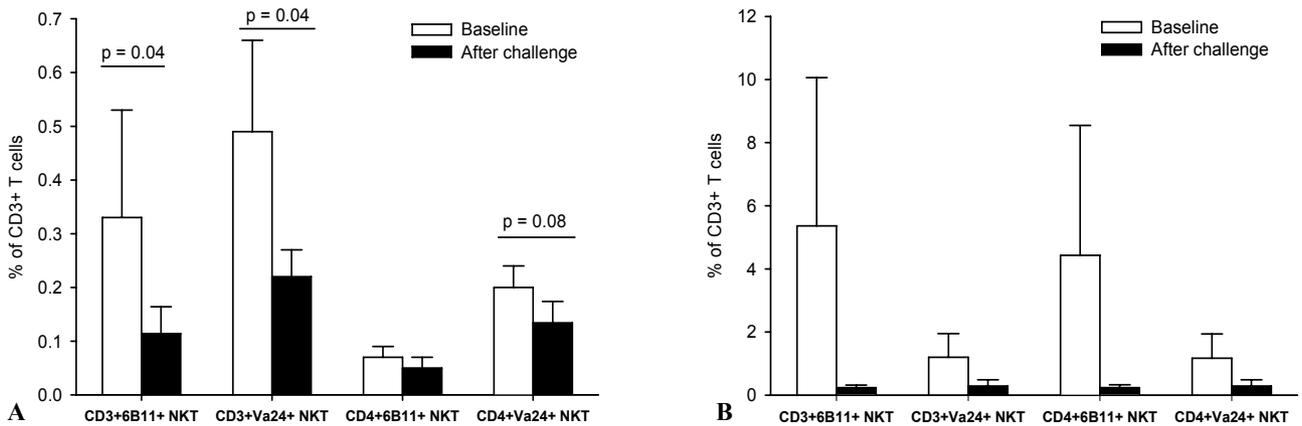


Figure 4. The frequency of NKT cells in peripheral blood mononuclear cells (A, n=5) and the induced sputum (B, n=4) at baseline and after challenges in asthmatics with positive aspirin challenges. Data are expressed as the percentage of CD3⁺ T cells.

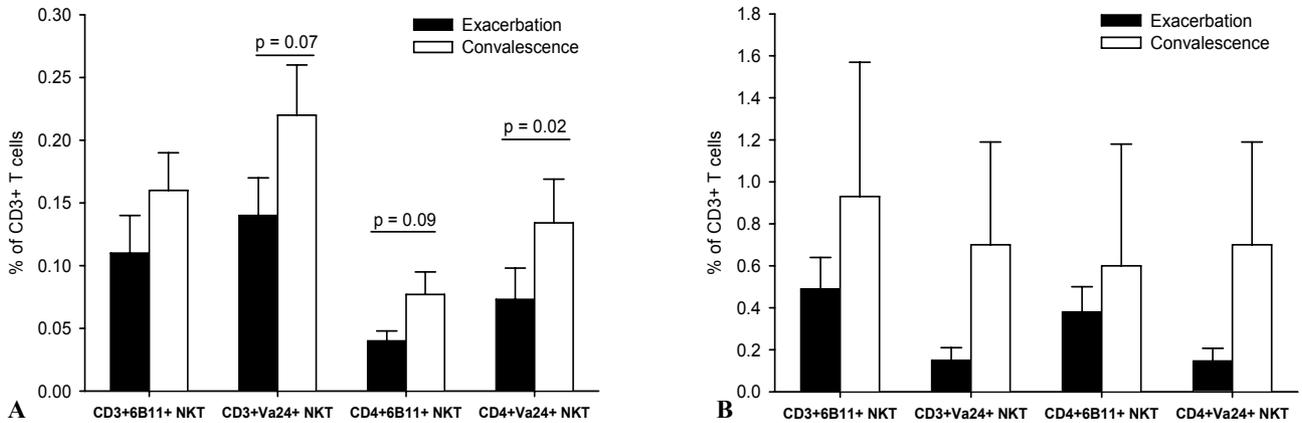


Figure 5. The frequency of NKT cells in peripheral blood mononuclear cells (A, n=9) and the induced sputum (B, n=7) during exacerbation and convalescence in asthmatics with infection-associated exacerbation. Data are expressed as the percentage of CD3⁺ T cells.

분획은 혈액 CD4+Va24+ NKT 세포 분획과 유의한 음의 상관관계를 보였다(그림 6).

고찰

본 연구에서 객담 NKT 세포 수의 변화는 관찰되지 않았지만, 혈액 NKT 세포 수는 아스피린 유발 또는 감염후 악화되는 천식에서 유의하게 감소되었고, 알레르겐 유발 후 악화되는 천식에서는 약간 증가되었다. 천식 악화 시 관찰되는 혈액 NKT 세포 수의 변화는 사람에서 NKT 세포가 천식악화의 병인 기전에서 중요한 역할을 하는 것을 의미한다고 볼 수 있다.

천식 악화 시 혈액 NKT 세포 수의 감소는 기도염증 악화와 관련될 수 있다. 천식 악화에 의한 기도염증의 악화로 혈액 NKT 세포가 기도로 mobilization되었을 가능성을 추정해

볼 수 있다. 본 연구에서 아스피린 유발 또는 감염 후 악화 천식의 객담에서 호산구성 염증이 관찰되고, 동시에 혈액 NKT 세포 수가 감소되었는데, 이는 혈액 NKT 세포가 악화 시 기도로 mobilization됨을 나타낸다. 본 연구에서 알레르겐 또는 아스피린 유발 후 또는 감염 후 악화 시에 혈액 NKT 세포수는 객담 호산구 수와 반비례 관계를 보였다. 최근 저자는 안정된 만성천식 및 호산구기관지염(eosinophilic bronchitis) 환자를 대상으로 객담 내 NKT 세포를 분석하여 기도 내 호산구성 기도염증의 병인기전에 기도 NKT 세포가 중요한 역할을 할 수 있는 것으로 보고하였다²⁵⁾. 따라서 급성 천식 악화와 동반된 호산구성 기도염증과 NKT 세포가 상호 관련될 가능성이 있다. 그러나 호산구성 기도염증의 악화가 NKT 세포 mobilization의 원인인지 결과인지 또는 부수적 현상인지에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다. 천식 악화 시 폐

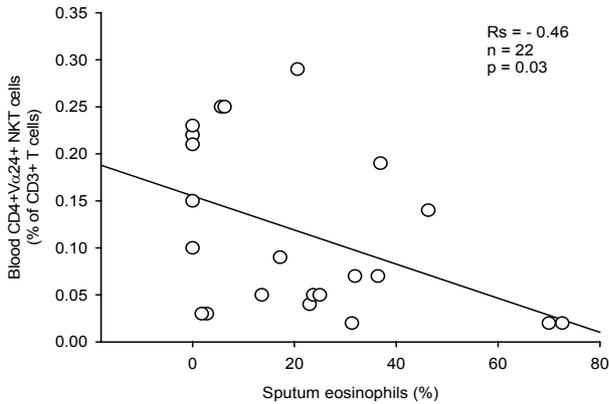


Figure 6. Correlation between the proportion of eosinophils in the induced sputum and the frequency of CD4⁺Vα24⁺ NKT cells in peripheral blood mononuclear cells in 22 samples obtained at 8 hours after positive allergen and aspirin challenges and during infection-associated asthma exacerbation.

또는 기도에서 생성되는 케모카인에 의해 NKT 세포가 혈액에서 폐로 이동할 수 있다. 본 연구에서 감염 후 악화된 천식 환자들의 객담 내에 MIP-1β가 증가되어 있었는데, MIP-1β가 CCR5 리간드(ligand)이고 CCR5가 사람 혈액 NKT 세포에 높게 발현되어 있는 것으로 보고되어 있는 점을³³⁾ 고려하면, MIP-1β에 의해 혈액 내 NKT 세포가 폐 또는 기도로 이동하였을 가능성이 있다.

본 연구에서 아스피린 유발검사 후 8시간째 얻은 객담에서 호산구 증가가 관찰되었다. 아스피린 과민성 천식 환자에게 아스피린을 흡입시키면 기도 내 류코트리엔 생성이 증가되고³⁴⁾, 기도 내 호산구성 염증이 발생 또는 악화될 수 있다.^{35,36)} Rolla 등³⁶⁾도 아스피린 과민성 천식환자에게 아스피린을 흡입시키고 6시간째 객담을 분석하였을 때, 호산구가 증가되어 있음을 관찰할 수 있었다.

본 연구의 감염후 악화된 천식 환자의 객담에서도 호중구 보다는 호산구성 염증이 주로 관찰되었다. 감기 바이러스에 노출은 기도 내 호산구성 염증을 유도할 수도 있다^{37,38)}. 바이러스 감염 후 호산구성 기도염증은 비아토피보다는 아토피 천식에서 더 잘 발생한다³⁹⁾. 본 연구에서 감염 후 악화 천식 환자들의 혈청 총 IgE의 평균은 685.1 IU/mL로 높게 측정되어, 대상 환자들이 아토피 천식을 가지고 있을 가능성이 높고, 이러한 아토피에 의해 호산구성 기도염증이 주로 관찰되었을 가능성이 있다. 비염에서도 감기 후에 비액 내 염증세포를 관찰하였을 때, 호산구성 염증이 주로 발생된 보고가 있다⁴⁰⁾. 감기 후 상당한 시간이 경과하여도 기도 또는 비액 내 호산구성 염증이 장기간 지속되었다^{37,40)}. 감기 바이러스에

의한 호산구성 염증이 발생에 IL-5 시토카인⁴¹⁾ 또는 RANTES, eotaxin 등 케모카인⁴⁰⁾이 관여할 수 있다. 본 연구에서 감염 후 악화된 환자들의 객담 내 IL-5과 eotaxin이 증가되어 악화 시 호산구 수 증가를 설명할 수 있을 것으로 보인다.

최근 동물실험에서 바이러스에 의해 NKT-대식세포 면역축(NKT-macrophage innate immune axis)이 활성화되고, 이들이 천식 또는 만성 폐쇄성 폐 질환에서 보이는 기도염증에 중요한 것으로 보고되었다⁴²⁾. 바이러스 감염에 의한 천식악화의 경우에도 이러한 기전을 통해 NKT 세포가 천식 악화의 병인기전에 관여할 가능성도 고려해 볼 수 있다.

본 연구에서 알레르겐 유발 후에는 혈액 NKT 세포수가 약간 증가하고, 객담 호산구 또는 호중구성 염증이 관찰되지 않았다. 일반적으로 천식 환자에서 알레르겐 기관지유발은 기도에 호산구 또는 호중구성 기도염증을 일으키고⁴³⁻⁴⁷⁾, 특히 유발 후 24시간째 측정하였을 때 이러한 소견이 잘 관찰된다⁴⁵⁻⁴⁷⁾. Lommatzsch 등⁴³⁾은 알레르겐 유발 후 기도 내 염증세포 침윤을 측정하였을 때, 18시간째 호중구, 42시간째 호산구가 가장 높게 증가됨을 보여주었다. 그러나 유발 후 이른 시간에 측정하였을 때도 호산구성 염증이 관찰되었는데, Boulay 등⁴⁵⁾은 유발 후 6시간째 객담에서 호산구성 염증을 관찰하였고, Teran 등⁴⁶⁾은 유발 후 4시간째 호산구성 염증 발생을 관찰하였다. 그러나 Nocker 등⁴⁴⁾은 유발 후 4시간째 호산구성 염증이 전혀 발생하지 않은 것으로도 보고하였다. 알레르겐 기관지유발검사 후 초기에 즉, 6~7시간째 호산구성 염증을 나타낸 경우는 후기 천식반응이 나타나는 경우에 잘 관찰된다^{48,49)}. 그러나 후기 천식반응의 발생 유무는 알레르겐의 용량과 관련되는 것으로 알려져 있어⁵⁰⁾, 유발검사 방법에 따라 천식 반응 및 호산구성 기도염증의 유무 및 정도가 다를 가능성이 있다. 본 연구에서 유발검사 양성 환자들은 모두 초기반응은 보였지만, 후기반응은 2예에서만 관찰되어, 호산구성 기도염증이 관찰되지 않았을 가능성이 있다. 본 연구에서 알레르겐 유발 후 8시간째 호산구성 기도염증이 보이지 않은 점은 혈액 NKT 세포가 감소되지 않은 점을 설명할 수 있으나, 오히려 NKT 세포가 약간 증가된 점은 더 많은 연구가 필요하다. 알레르겐 유발 후 8시간째는 호산구성 기도염증이 발생하기 전으로, 혈액 NKT가 아직 폐로 이동하지 않은 시점에서 혈액 내 NKT 세포가 일시적으로 증가되었을 수도 있겠다.

알레르겐 유발 후 24시간째 또는 그 이후에 객담 검사를 시행한다면 유의한 호산구성 염증을 볼 수 있고, 아스피린 유발 또는 감염후 악화 천식에서처럼 혈액 NKT 세포의 감

소를 볼 수 있을지도 모른다. 알레르겐 유발 후 호산구성 기도염증이 발생하고, 혈액 NKT 세포가 기도로 mobilization될 가능성이 있다. Reynolds 등⁵¹⁾이 유발 후 24시간째 기관지내시경 조직검사를 통해 폐조직에 NKT 세포의 증가를 관찰하였다. Rock 등⁵²⁾은 알레르겐 기관지유발 후 7-8시간 동안은 혈액 내 NKT 세포의 유의한 변화를 관찰하지 못하였다. 만약 유발 후 24시간째 혈액 내 NKT 세포를 측정하였다면 혈액 내 NKT 세포 수 감소를 관찰할 수도 있었을 것이다. 그러나 Thomas 등⁵³⁾이 알레르겐 기관지유발 후 24시간째 혈액 내 NKT 세포 수를 측정하였으나, NKT 세포 수의 유의한 감소는 관찰하지 못하였다.

천식에서 아스피린 유발 후 또는 감염후 악화 시 혈액 NKT 세포 감소의 기전으로 혈액 NKT 세포의 기도로의 mobilization 이외 다른 기전도 고려해 볼 수 있다. 저자는 최근 안정된 만성천식 환자의 혈액 NKT 세포수가 아토피 지표들 즉, 총 IgE 수치 또는 피부단자검사에서 아토피 점수와 반비례의 관련성이 보이는 것으로 보고한 바 있다²⁴⁾. 혈액 내 NKT 세포는 기도 내 NKT 세포와는 달리 Th1-like NKT 세포일 가능성도 있음을 암시한다. 따라서 천식 악화 시 폐 또는 기도 내에는 Th2-like NKT 세포가 증가되고, 혈액 내에는 Th1-like NKT 세포가 감소되는 가설도 고려해 볼 수 있겠다.

본 연구에서는 객담 내 NKT 세포 수의 유의한 변화를 관찰하지 못하였다. Rock 등⁵²⁾ 또는 Thomas 등⁵³⁾도 알레르겐 유발 후 24시간째 기관지폐포세척액 내 NKT 세포 수 변화를 관찰하지 못하였다. 그러나 Reynolds 등⁵¹⁾은 폐조직검사를 통해 알레르겐 유발 후 NKT 세포가 증가된다고 하였다. 객담 내 또는 기관지폐포세척액 내에서 NKT 세포 수의 변화를 관찰하지 못했다 하더라도, 폐조직검사를 시행한다면 아스피린 유발 후 또는 감염으로 인한 천식 악화 시 기도 또는 폐조직에 NKT 세포가 증가되는 것을 증명할 수 있을 것으로 예상된다.

객담 또는 혈액 NKT 세포수에 대한 결과가 천식 약물, 특히 ICS 또는 전신성 스테로이드 등에 의해 영향을 받았을 가능성도 배제할 수 없다. 그러나 저자^{24,25)} 또는 다른 연구¹⁸⁾에 의해 판단해 볼 때, 천식약물에 의한 NKT 세포 수의 변화 또는 영향은 없을 것으로 생각된다. 알레르겐 또는 아스피린 유발검사에서는 유발 전과 유발 후 8시간째 NKT 세포 수를 비교하기 때문에 약물에 의한 영향은 배제할 수 있다. 그러나 감염 후 악화 천식에서는 악화 시에 얻은 검체는 스테로이드 약물을 사용하기 전이고 회복기에는 모두 ICS 또는 전신성 스테로이드 약물 사용 이후이기 때문에, 객담 호산구

수가 스테로이드 약물에 의해 감소되어 악화 시 호산구 수가 상대적으로 증가되는 것으로 측정되었을 수 있다. 그러나 악화시 객담 호산구 분획이 평균 25.2%로 악화와 동반되어 호산구가 증가되었음을 알 수 있다.

알레르겐 또는 아스피린 유발 후 또는 감염에 의한 천식 악화 이후에 측정하는 시점에 따라 NKT 세포의 빈도 수 또는 기능이 다를 수 있어, 향후 유발 후 시점을 달리하여 검체를 얻어 NKT 세포 수를 측정해 볼 필요가 있다. 또한 객담 또는 기관지폐포세척액 내 NKT 세포 수 측정은 실제 폐 또는 기도 조직 NKT 세포의 존재 및 증가를 반영하지 못할 수 있다. 폐조직검사를 시행하여 NKT 세포 존재 및 증가를 증명한다면 천식의 병인기전에서 NKT 세포의 역할을 좀 더 정확히 알 수 있을 것이다. 그리고 본 연구에서처럼 감염으로 악화되어 내원한 천식 환자를 대상으로 감염후 악화의 병인기전을 연구하는 방법은 적절하지 않을 수 있다. 향후 호흡기 바이러스에 노출시키고 일정한 시점에서 검체를 얻어 NKT를 측정한다면 좋을 것으로 보인다. 아울러 혈액 Th1-like 또는 Th2-like NKT 세포의 존재 및 증가를 규명하기 위해서 세포내 사이토카인 측정을 시행하는 것이 필요하다.

본 연구방법에서는 유발 후 또는 감염 후 악화 시 객담 또는 혈액 CD4+ T 세포 수의 유의한 변화는 관찰할 수 없었다. 이는 CD4+ T 세포에 비해 NKT 세포가 천식 악화에 더 중요한 역할을 할 수 있음을 암시한다. CD4+ T 세포는 알레르겐 유발 후 18시간째 기관지폐포세척액 내에 증가되는 것으로 보고되어 있어⁴³⁾, 본 연구에서는 8시간째 검체를 얻었기 때문에 CD4+ T 세포의 변화를 관찰하지 못했을 가능성도 있다. 한편, 바이러스 감염 악화에 의한 경우에는 바이러스 접종 4일째 기도에 CD4+ T 세포 증가와 혈액 내 림프구 감소가 보고 되어 있어³⁷⁾, 본 연구에서는 감염 증상 후 평균 7.5일째 내원하여 늦은 시점에 측정이 되어 CD4+ T 세포수의 변화가 관찰이 되지 않았을 수도 있다.

최근 저자는 만성 알레르기성 천식 마우스모델을 통하여 급성 천식에서는 NKT 세포가 중요한 역할을 하지만, 만성 천식 마우스모델에서는 NKT 세포가 중요한 역할을 하지 못하는 것으로 보고한 바 있다⁵⁴⁾. 사람에서 만성천식에서는 NKT 세포의 역할과 기능을 더 규명해야 할 필요가 있지만, 만성천식의 급성 악화 시의 병인기전에 NKT 세포가 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 본 연구를 통하여 천식에서 NKT 세포는 호산구성 기도염증과 관련성이 있고, NKT 세포의 기도 내 증가는 기도와민성 발생 또는 악화의 병인기전에 중요한 역할을 할지 모른다.

알레르겐 기관지유발 후 NKT 세포수 변화를 분석한 연구는 보고되어 왔지만, 아스피린 유발 후 또는 감염 후 악화 시 NKT 세포 수 변화에 대한 보고는 아직 없다. 본 연구에서는 아스피린 유발 후 또는 감염에 의한 악화 시 혈액 NKT 세포가 감소됨을 증명하였고, 이는 기도의 호산구성 염증 발생과 관련되는 것으로 보인다. NKT 세포가 천식 악화의 병인기전에 중요한 역할을 할 수 있는 것으로 생각된다. 향후 NKT 세포수 또는 기능을 억제 또는 조절할 수 있는 새로운 약물이 개발된다면 중증 악화 천식을 효과적으로 치료하고 결국 사망을 예방할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 연구는 2009년 대한내과학회연구비 지원을 받아 수행됨.

REFERENCES

- 1) National Asthma Education and Prevention Program NHLA/BI. *Expert Panel Report 3: Guidelines for the diagnosis and management of asthma, full report 2007*. 2007.
- 2) Wark PA, Gibson PG. *Asthma exacerbations. 3: Pathogenesis. Thorax 61:909-915, 2006*
- 3) Lane S, Molina J, Plusa T. *An international observational prospective study to determine the cost of asthma exacerbations (COAX). Respir Med 100:434-450, 2006*
- 4) Skrepnek GH, Skrepnek SV. *Epidemiology, clinical and economic burden, and natural history of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. Am J Manag Care 10:S129-S138, 2004*
- 5) Andersson F, Borg S, Stahl E. *The impact of exacerbations on the asthmatic patient's preference scores. J Asthma 40:615-623, 2003*
- 6) Pauwels RA, Lofdahl CG, Postma DS, Tattersfield AE, O'Byrne P, Barnes PJ, Ullman A. *Effect of inhaled formoterol and budesonide on exacerbations of asthma. Formoterol and Corticosteroids Establishing Therapy (FACET) International Study Group. N Engl J Med 337:1405-1411, 1997*
- 7) Umetsu DT, DeKruyff RH. *A role for natural killer T cells in asthma. Nat Rev Immunol 6:953-958, 2006*
- 8) Kronenberg M, Gapin L. *The unconventional lifestyle of NKT cells. Nat Rev Immunol 2:557-568, 2002*
- 9) Taniguchi M, Harada M, Kojo S, Nakayama T, Wakao H. *The regulatory role of Valpha14 NKT cells in innate and acquired immune response. Annu Rev Immunol 21:483-513, 2003*
- 10) Bendelac A, Savage PB, Teyton L. *The biology of NKT cells. Annu Rev Immunol 25:297-336, 2007*
- 11) Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. *NKT cells: what's in a name? Nat Rev Immunol 4:231-237, 2004*
- 12) Akbari O, Stock P, Meyer E, Kronenberg M, Sidobre S, Nakayama T, Taniguchi M, Grusby MJ, DeKruyff RH, Umetsu DT. *Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. Nat Med 9:582-588, 2003*
- 13) Lisbonne M, Diem S, de Castro Keller A, Lefort J, Araujo LM, Hachem P, Fourneau JM, Sidobre S, Kronenberg M, Taniguchi M, Van Ender P, Dy M, Askenase P, Russo M, Vargaftig BB, Herbelin A, Leite-de-Moraes MC. *Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. J Immunol 171:1637-1641, 2003*
- 14) Pichavant M, Goya S, Meyer EH, Johnston RA, Kim HY, Matangkasombut P, Zhu M, Iwakura Y, Savage PB, DeKruyff RH, Shore SA, Umetsu DT. *Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. J Exp Med 205:385-393, 2008*
- 15) Meyer EH, Goya S, Akbari O, Berry GJ, Savage PB, Kronenberg M, Nakayama T, DeKruyff RH, Umetsu DT. *Glycolipid activation of invariant T cell receptor+ NK T cells is sufficient to induce airway hyperreactivity independent of conventional CD4+ T cells. Proc Natl Acad Sci USA 103:2782-2787, 2006*
- 16) Kim HY, Pichavant M, Matangkasombut P, Koh YI, Savage PB, DeKruyff RH, Umetsu DT. *The development of airway hyperreactivity in T-bet-deficient mice requires CD1d-restricted NKT cells. J Immunol 182:3252-3261, 2009*
- 17) Koh YI, Kim HY, Meyer EH, Pichavant M, Akbari O, Yasumi T, Savage PB, DeKruyff RH, Umetsu DT. *Activation of nonclassical CD1d-restricted NK T cells induces airway hyperreactivity in beta 2-microglobulin-deficient mice. J Immunol 181:4560-4569, 2008*
- 18) Akbari O, Faul JL, Hoyte EG, Berry GJ, Wahlstrom J, Kronenberg M, DeKruyff RH, Umetsu DT. *CD4+ invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma. N Engl J Med 354:1117-1129, 2006*
- 19) Pham-Thi N, de Blic J, Le Bourgeois M, Dy M, Scheinmann P, Leite-de-Moraes MC. *Enhanced frequency of immunoregulatory invariant natural killer T cells in the airways of children with asthma. J Allergy Clin Immunol 117:217-218, 2006*
- 20) Thomas SY, Lilly CM, Luster AD. *Invariant natural killer T cells in bronchial asthma. N Engl J Med 354:2613-2616, 2006*
- 21) Hamzaoui A, Rouhou SC, Grairi H, Abid H, Ammar J, Chelbi H, Hamzaoui K. *NKT cells in the induced sputum of severe asthmatics. Mediators Inflamm 2006:71214, 2006*
- 22) Vijayanand P, Seumois G, Pickard C, Powell RM, Angco G, Sammut D, Gadola SD, Friedmann PS, Djukanovic R. *Invariant natural killer T cells in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. N Engl J Med 356:1410-1422, 2007*
- 23) Mutalithas K, Croudace J, Guillen C, Siddiqui S, Thickett D, Wardlaw A, Lammas D, Brightling C. *Bronchoalveolar lavage*

- invariant natural killer T cells are not increased in asthma. J Allergy Clin Immunol 119:1274-1276, 2007*
- 24) Koh YI, Shim JU, Wi JO, Han ER, Jin NC, Oh SH, Park CK, Park DJ. *Inverse association of peripheral blood CD4(+) invariant natural killer T cells with atopy in human asthma. Hum Immunol 71:186-191, 2010*
- 25) Koh YI, Shim JU. *Association between Sputum Natural Killer T Cells and Eosinophilic Airway Inflammation in Human Asthma. Int Arch Allergy Immunol 153:239-248, 2010*
- 26) Global Initiative For Asthma. *Global strategy for asthma management and prevention. 2002 National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD: NIH Publication No. 02-3659.*
- 27) Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R, Coates A, van der Grinten CP, Gustafsson P, Hankinson J, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Miller MR, Navajas D, Pedersen OF, Wanger J. *Interpretative strategies for lung function tests. Eur Respir J 26:948-968, 2005*
- 28) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275, 1951*
- 29) Melillo G, Aas K, Cartier A, Davies RJ, Debelic M, Dreborg S, Kerrebijn KF, Lassen A, Pinto Mendes J, Rizzo A, et al. *Guidelines for the standardization of bronchial provocation tests with allergens. An update by an international committee. Allergy 46:321-329, 1991*
- 30) Nizankowska-Mogilnicka E, Bochenek G, Mastalerz L, Swierczynska M, Picado C, Scadding G, Kowalski ML, Setkowicz M, Ring J, Brockow K, Bachert C, Wohrl S, Dahlen B, Szczeklik A. *EAACI/GA2LEN guideline: aspirin provocation tests for diagnosis of aspirin hypersensitivity. Allergy 62:1111-1118, 2007*
- 31) in't Veen JC, Smits HH, Hiemstra PS, Zwinderman AE, Sterk PJ, Bel EH. *Lung function and sputum characteristics of patients with severe asthma during an induced exacerbation by double-blind steroid withdrawal. Am J Respir Crit Care Med 160:93-99, 1999*
- 32) Boyson JE, Rybalov B, Koopman LA, Exley M, Balk SP, Racke FK, Schatz F, Masch R, Wilson SB, Strominger JL. *CD1d and invariant NKT cells at the human maternal-fetal interface. Proc Natl Acad Sci U S A 99:13741-13746, 2002*
- 33) Thomas SY, Hou R, Boyson JE, Means TK, Hess C, Olson DP, Strominger JL, Brenner MB, Gumperz JE, Wilson SB, Luster AD. *CD1d-restricted NKT cells express a chemokine receptor profile indicative of Th1-type inflammatory homing cells. J Immunol 171:2571-2580, 2003*
- 34) Szczeklik A, Stevenson DD. *Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis and management. J Allergy Clin Immunol 104:5-13, 1999*
- 35) Szczeklik A, Sladek K, Dworski R, Nizankowska E, Soja J, Sheller J, Oates J. *Bronchial aspirin challenge causes specific eicosanoid response in aspirin-sensitive asthmatics. Am J Respir Crit Care Med 154:1608-1614, 1996*
- 36) Rolla G, Di Emanuele A, Dutto L, Marsico P, Nebiolo F, Corradi F, Brussino L, Bucca C. *Effect of inhalation aspirin challenge on exhaled nitric oxide in patients with aspirin-inducible asthma. Allergy 59:827-832, 2004*
- 37) Fraenkel DJ, Bardin PG, Sanderson G, Lampe F, Johnston SL, Holgate ST. *Lower airways inflammation during rhinovirus colds in normal and in asthmatic subjects. Am J Respir Crit Care Med 151:879-886, 1995*
- 38) Grunberg K, Smits HH, Timmers MC, de Klerk EP, Dolhain RJ, Dick EC, Hiemstra PS, Sterk PJ. *Experimental rhinovirus 16 infection. Effects on cell differentials and soluble markers in sputum in asthmatic subjects. Am J Respir Crit Care Med 156:609-616, 1997*
- 39) Trigg CJ, Nicholson KG, Wang JH, Ireland DC, Jordan S, Duddle JM, Hamilton S, Davies RJ. *Bronchial inflammation and the common cold: a comparison of atopic and non-atopic individuals. Clin Exp Allergy 26:665-676, 1996*
- 40) van Benten IJ, KleinJan A, Neijens HJ, Osterhaus AD, Fokkens WJ. *Prolonged nasal eosinophilia in allergic patients after common cold. Allergy 56:949-956, 2001*
- 41) Schwarze J, Cieslewicz G, Hamelmann E, Joetham A, Shultz LD, Lamers MC, Gelfand EW. *IL-5 and eosinophils are essential for the development of airway hyperresponsiveness following acute respiratory syncytial virus infection. J Immunol 162:2997-3004, 1999*
- 42) Kim EY, Battaile JT, Patel AC, You Y, Agapov E, Grayson MH, Benoit LA, Byers DE, Alevy Y, Tucker J, Swanson S, Tidwell R, Tyner JW, Morton JD, Castro M, Polineni D, Patterson GA, Schwendener RA, Allard JD, Peltz G, Holtzman MJ. *Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. Nat Med 14:633-640, 2008*
- 43) Lommatzsch M, Julius P, Kuepper M, Garn H, Bratke K, Irmischer S, Luttmann W, Renz H, Braun A, Virchow JC. *The course of allergen-induced leukocyte infiltration in human and experimental asthma. J Allergy Clin Immunol 118:91-97, 2006*
- 44) Nocker RE, Out TA, Weller FR, Mul EP, Jansen HM, van der Zee JS. *Influx of neutrophils into the airway lumen at 4 h after segmental allergen challenge in asthma. Int Arch Allergy Immunol 119:45-53, 1999*
- 45) Boulay ME, Prince P, Deschesnes F, Chakir J, Boulet LP. *Metalloproteinase-9 in induced sputum correlates with the severity of the late allergen-induced asthmatic response. Respiration 71:216-224, 2004*
- 46) Teran LM, Carroll MP, Frew AJ, Redington AE, Davies DE, Lindley I, Howarth PH, Church MK, Holgate ST. *Leukocyte*

- recruitment after local endobronchial allergen challenge in asthma. Relationship to procedure and to airway interleukin-8 release. Am J Respir Crit Care Med* 154:469-476, 1996
- 47) Versluis M, van den Berge M, Timens W, Luijk B, Rutgers B, Lammers JW, Postma DS, Hylkema MN. *Allergen inhalation decreases adenosine receptor expression in sputum and blood of asthma patients. Allergy* 63:1186-1194, 2008
- 48) De Monchy JG, Kauffman HF, Venge P, Koeter GH, Jansen HM, Sluiter HJ, De Vries K. *Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. Am Rev Respir Dis* 131:373-376, 1985
- 49) Silvestri M, Oddera S, Sacco O, Balbo A, Crimi E, Rossi GA. *Bronchial and bronchoalveolar inflammation in single early and dual responders after allergen inhalation challenge. Lung* 175:277-285, 1997
- 50) Machado L, Stalenheim G. *Factors influencing the occurrence of late bronchial reactions after allergen challenge. Allergy* 45:268-274, 1990
- 51) Reynolds C, Barkans J, Clark P, Kariyawasam H, Altmann D, Kay B, Boyton R. *Natural killer T cells in bronchial biopsies from human allergen challenge model of allergic asthma. J Allergy Clin Immunol* 124:860-862, 2009
- 52) Rock M, Yoder S, Hoskins A, Ajayi WU, Sheller JR, Dworski R. *Effect of allergen challenge on the percentage of natural killer T cells in patients with atopic asthma. Ann Allergy Asthma Immunol* 102:432-437, 2009
- 53) Thomas SY, Banerji A, Medoff BD, Lilly CM, Luster AD. *Multiple chemokine receptors, including CCR6 and CXCR3, regulate antigen-induced T cell homing to the human asthmatic airway. J Immunol* 179:1901-1912, 2007
- 54) Koh YI, Shim JU, Lee JH, Chung IJ, Min JJ, Rhee JH, Lee HC, Chung DH, Wi JO. *Natural killer T cells are dispensable in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation and remodelling in a mouse model of chronic asthma. Clin Exp Immunol* 161:159-170, 2010