
平成12年度厚生省科学研究
厚生省感覚器障害及び免疫・アレルギー等の研究事業
アレルギー疾患に係わる
胎内・胎外因子に関する研究
研 究 報 告 書

厚 生 省

目 次

1.総括研究報告書

アレルギー疾患に係わる胎内・胎外因子に関する研究

主任研究者

群馬大学医学部小児科教授

森川 昭廣 1

2.分担研究報告書

- 1) 皮膚バリア障害の検討
分担研究者
京都大学大学院医学研究科皮膚病態学教授 宮地 良樹 6
- 2) アトピー遺伝子の検討
分担研究者
岐阜大学医学部小児科教授 近藤 直実 12
- 3) サイトカインと胎外因子
分担研究者
帝京大学医学部内科教授 大田 健 17
- 4) サイトカインと胎内因子
分担研究者
山口大学医学部小児科教授 古川 漸 22
- 5) 皮膚バリア障害の検討
分担研究者
横浜市立大学医学部皮膚科教授 池澤 善郎 27
- 6) アトピー遺伝子の検討
分担研究者
筑波大学臨床医学系小児科助教授 柴崎 正修 32
- 7) 疫学調査
分担研究者
国立療養所南福岡病院小児科医長 小田嶋 博 36
- 8) サイトカインと胎内因子
分担研究者
群馬大学医学部小児科講師 徳山 研一 41
- 9) アトピー遺伝子の検討
分担研究者
群馬大学医学部小児科助手 荒川 浩一 46
- 10) 神経原性因子と胎外因子
分担研究者
獨協医科大学小児科講師 吉原 重美 51
- 11) 疫学調査
分担研究者
ささきアレルギー科クリニック院長 佐々木 聖 56
- 12) アトピー遺伝子の検討
分担研究者
群馬大学医学部小児科教授 森川 昭廣 61

研究要旨

近年、日本を含む世界各国においてアレルギー疾患患者の増加が報告され、何らかの遺伝的要因（胎内因子）と環境的要因（胎外因子）が変化してきたことが疑われる。この変化してきた胎内・胎外因子を解明することで、アレルギー疾患の増加を防ぐ早期介入への保健指導の確立が可能となる。本研究では、アレルギー疾患発症における重要な原因であるアレルギー的側面と非アレルギー的側面である臓器過敏性に着目し、それぞれに係わる胎内・胎外因子を同定することを目的とした。本年度においては以下の結果を得た。

（１）アレルギー的側面に係わる因子

アトピー候補遺伝子の検討として、カモガヤ花粉症の全ゲノム連鎖解析を行い、気管支喘息を含めた他のアレルギー疾患とは異なったカモガヤ花粉症に特異的な遺伝子領域の存在を示唆する所見を得た。IL-4、IL-13 受容体の下流にある細胞内シグナル伝達物質 Stat6 をコードする遺伝子の多型とアレルギー疾患で関連が認められた。また、IFN- γ が高いにも関わらず、IgE が高値である症例において、c-DNA 上 IFN- γ 受容体 1 の exon3 に相当する部分に欠失変異が認められた。

アレルギー発症に関するサイトカインの検討として、母体血、臍帯血、羊水中の IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、IFN- γ 、IL-12、さらには臍帯血 IL-4 産生 CD3 陽性 T リンパ球を測定したところ、アレルギー疾患発症予知の指標となる可能性が示唆された。測定を行った症例に関する調査は、現在も進行中である。一方、CC ケモカインである thymus and activation-regulated chemokine (TARC) は、アレルギー疾患において高値を示したが、今後、アレルギー疾患発症予知の指標になるかを検討する。

Th1/Th2 サイトカインバランスを規定する因子の検討として、IL-10 は IL-12 や IFN- γ の産生を抑制し、IgE の過剰産生の方向で働くが、一方で Th1 系のサイトカインである IL-12 や IFN- γ と同じように IgE の産生を抑える作用もあると考えられた。

アレルギー疾患の疫学調査の調査に基づいた検討として、家族歴、保育形態、性別、誕生月などのデータを分析し有病率との関連を検討した結果、気管支喘息とアトピー性皮膚炎では異なった特性が認められた。

（２）非アレルギー的側面に係わる因子

気道過敏性に係わる因子として、乳幼児喘息においては、気道上皮細胞由来のクレオラ小体 (CrB) 陽性例が多く、さらに CrB の出現と痰中エラスターゼや IL-8 と相関が認められたことより、乳児喘息の気道炎症・上皮障害を起こす機序に、好中球が関与していることが示唆された。

気道過敏性獲得に関与するサイトカインとして、マウスを用いた検討では GM-CSF が重要な因子であった。また、PDGF は気道リモデリングに係わる基底膜部の線維化に関与していた。一方、気道壁リモデリングの発生部位は年齢により影響されている可能性が示唆された。

アトピー性皮膚炎発症に係わる因子として、皮膚バリア機能を形成するスフィンゴミエリンおよびセラミドからの検討では、セラミド転換酵素であるスフィンゴミエリナーゼをコードする遺伝子多型とアトピー性皮膚炎との関連が示唆された。また、皮膚バリア機能は、マウスでは胎生後期に形成されるが、スフィンゴミエリンは表皮細胞の増殖、分化、バリア機能形成に関与していることが推察された。

アトピー性皮膚炎における胎外因子として、患者の乾燥病変部においても湿潤部と同様に、角層コンダクタンスや経表皮水分蒸散量は異常を示し、さらにヒアルロニダーゼ産生性の黄色ブドウ球菌が増殖していることが認められた。

荒川浩一（群馬大学医学部小児科助手）

池澤善郎（横浜市立大学医学部皮膚科教授）

大田 健（帝京大学医学部内科教授）

小田嶋博（国立療養所南福岡病院小児科）

近藤直美（岐阜大学医学部小児科教授）

佐々木聖（ささきアレルギー科クリニック）

柴崎正修（筑波大学臨床医学系助教授）

徳山研一（群馬大学医学部小児科講師）

古川 漸（山口大学医学部小児科教授）

宮地良樹（京都大学大学院医学研究科皮膚病態学教授）

吉原重美（獨協医科大学小児科講師）

（アイウエオ順）

A. 研究目的

アレルギー疾患のような多因子疾患は、二つの大きな要素である遺伝的要素（胎内因子）と環境的要素（胎外因子）が複雑に絡み合っていて発症していくと考えられている。近年、日本を含む世界各国においてアレルギー疾患患者の増加が報告され、何らかの胎内・胎外因子が変化してきたことを疑わせる。したがって、この変化してきた胎内・胎外因子を解明していくことにより、アレルギー疾患発症の予知あるいは予防に向けての保健指導の確立が可能となる。

アレルギー疾患発症には、アレルギー的側面に加え、非アレルギー的側面である臓器過敏性が重要である。しかしながら、それに係わる因子についての検討は少なく、臓器過敏性が遺伝的なものか、後天的に獲得されていくのかの結論もでない。

本研究班では、アレルギー疾患発症におけるアレルギー的側面である感作成立と非アレルギー的側面である臓器過敏性に係わる因子の同定に関し、臨床的検討を行い、また、これらの機序に関する詳細な検討や、倫理的に困難な胎児期における臓器形成の検討は、動物実験を用いて行う。

アレルギー的側面に関与する因子では、IgE 産生に関連したアトピー候補遺伝子、Th1/Th2 サイトカインバランスを規定する因子を明らかにし、その後のアレルギー疾患発症の追跡調査を行う。また、疫学的調査に基づき、胎内・胎外因子を明らかにしていく項目の決定と有用な活用法について検討する。一方、非アレルギー的側面である臓器過敏性（気道過敏性や皮膚バリア障害）の獲得に係わる胎内・胎外因子の同定に関する検討として、気管支喘息においては、サイトカインや増殖因子、神経原性因子などがどのように影響しているかを解明するとともに、胎外因子の影響を解明していく。また、これらの因子が年齢により異なるかを明らかにしていく。アトピー性皮膚炎に関しては、皮膚バリア障害の成立機構を明らかにするために、皮膚バリア機能の発生を詳細に検討すること、セラミド変換酵素であるスフィンゴミエリナーゼをコードする遺伝子多型を検討する。また、胎外因子として黄色ブドウ球菌の関与を明らかにしてい

くことである。

本研究にて、アレルギー疾患の発症に係わる因子を一つ一つ同定していくことで、それに対応する施策を講じ、アレルギー疾患の増加をくい止め、悪化防止と、健康回復への道筋をつくることで、アレルギー疾患に対する保健指導方法が確立されると考えられる。

B. 研究方法

1) アレルギー的側面の検討

遺伝学的検討：カモガヤ花粉症を発端者とする家系による全ゲノム解析を行い、小児アトピー性気管支喘息との相違を検討する。Th2 サイトカインである IL-4、IL-13 受容体の下流にある細胞内シグナル伝達系の遺伝子多型とアレルギー疾患との関連を検討する。IgE とサイトカイン産生パターンにもとづき個々の症例を分類し、想定されるサイトカインレセプターの遺伝子異常の有無について解析する。

胎内因子と追跡調査：羊水、母体血、臍帯血をサンプルとして IgG、IgE、特異 IgE 抗体、サイトカインなどの各種因子を酵素免疫法などにより測定し、また臍帯血 IL-4 産生 CD3 陽性 T リンパ球はフローサイトメーターにより解析する。さらに、アトピー素因を有する母親と有さない母親についての差違を検討し、その後の児のアレルギー疾患発症の追跡調査を行う。また、CC ケモカインである thymus and activation-regulated chemokine (TARC) が、アレルギー疾患の予知因子になり得るかの予備検討を行なう。

アレルギーにおけるサイトカインネットワーク：アレルギー患者および健常人の末梢血単核球分画について非刺激下あるいは刺激下のもとでのサイトカイン (INF- γ 、IL-4、IL-10、IL-12) 産生量および血清 IgE を測定する。

疫学調査による因子の解明：福岡市内の3地区5小学校における1年生全員と2年生以上は前年度にアレルギー疾患を有すると判断された者に対する疫学調査のデータを分析し、発症、予後との関連を検討する。

2) 非アレルギー的側面の検討

気道炎症と気道過敏性：乳幼児喘息における気道炎症・上皮障害の程度、気道上皮細胞の集塊（クレオラ体）を指標とし、さらにその機序として好中球や好酸球が関与しているかを明らかにするために、痰中エラスターゼや IL-8、好酸球数を測定する。

幼若、成熟、老齢モルモット抗原反復曝露モデルを用いて、気道リモデリングの進展を組織学的に検討し、年齢による差異を検討する。また、マウスの気道過敏性モデルを用いて、非特異的な気道刺激（ディーゼル排気微粒子）あるいはアレルゲン曝露群の両者において、気道過敏性獲得に関与するサイトカインや成長因子を検討する。

皮膚バリア障害：皮膚バリア機能の発生を解析するために、マウス胎仔、新生仔、成体皮膚でのスフィンゴミエリンの局在に関して特異抗体を用いた免疫蛍光抗体法で検出しバリア障害の指標である経皮水分喪失量測定する。小児アトピー性皮膚炎におけるバリア障害の有無ならびに病態生理を解明するために、経皮水分喪失量を測定し、またスフィンゴミエリナーゼをコードする遺伝子を解析する。アトピー性皮膚炎で乾燥症状が主体の患者に対して、皮膚生理パラメータの測定と皮膚好気性菌の分離培養と酵素活性を測定する。

C. 研究結果

1) アレルギー的側面の検討

遺伝学的検討：カモガヤ花粉症の全ゲノム連鎖解析では、臨床症状は染色体 1p36.2、4q13.3、9q34.3 領域と、総 IgE 値は 3P24.1、5q33.1、12q24 と連鎖し、9q34 にはカモガヤ花粉症に特異的な遺伝子が存在する可能性が示唆された。細胞内信号伝達物質である STAT6 の非翻訳領域であるエクソン 1 に GT 繰り返し配列の多型を認め、アレルギー疾患との関連を認めた。サイトカイン産生パターンで症例を検討したところ、IFN- γ 産生が高いにも関わらず、IgE が高値である症例があり、これらにおいて、IFN- γ 受容体 1 の c-DNA 上の exon 3 に相当する部分に 102bp の deletion が認められた。

胎内因子と追跡調査：アトピー素因陽性群と陰性群において、羊水、母体血、臍帯血中の各種因子の差を検討したところ、母体血では IL-4、IL-13

が高く、臍帯血では IL-13 の検出率が高かったが、羊水では差は見られなかった。また、アトピー素因のある児の臍帯血 IL-4 産生 CD3 陽性 T リンパ球が高値を示し、これらの児の追跡調査では 7 例中 4 例 (57%) において早期にアレルギー疾患の発症が見られた。アレルギー疾患患者血漿中 TARC は、健常者に比較して有意に高値を示した。

アレルギーにおけるサイトカインネットワーク：IL-10 は、in vitro にて強発現させた場合には IL-12 や IFN- γ を抑制し、IgE の過剰産生の方向で働いた。一方、無刺激の状態では IL-10 は IL-12、IFN- γ と正の相関を認め、逆に IgE と負の相関を示した。Th1 系のサイトカインである IL-12 や IFN- γ と同じように IgE の産生を抑える作用もあると考えられた。

疫学調査による因子の解明：気管支喘息の罹患率は経年的に増加傾向を示したが、アトピー性皮膚炎では頭打ちの傾向であった。有病率と関連した背景因子としては、家族歴、保育形態、性別、誕生月などがあり、血清 IgE は喫煙が関連していた。また、呼気中の NO は、アトピー性皮膚炎以外の気道アレルギーにおいては共通して高値であった。また、寛解例でも高値を示すものが観察された。

2) 非アレルギー的側面の検討

気道炎症と気道過敏性：乳幼児喘息において、気道上皮細胞の集塊（クレオラ体）陽性例が多く、クレオラ体の出現と痰中における好中球由来のエラスターゼや IL-8 と相関があり、乳児喘息の気道炎症・上皮障害を起こす機序に、好中球が関与していることが示唆された。

モルモット慢性アレルギー性炎症モデルでは、幼若、成熟群では気道壁内壁層の肥厚が主体であり、老齢群では逆に平滑筋層の肥厚が優位と、肥厚の主体となる成分は年齢により異なっていた。内壁層の肥厚には気道上皮細胞における細胞新生が関与し、平滑筋層の肥厚は平滑筋細胞の肥大が関与している可能性が示唆された。

マウスの気道過敏性モデルによる、非特異的な気道の刺激およびアレルゲン感作の両者において、気道過敏性獲得に関与するサイトカインとして GM-CSF が重要な因子であった。また、PDGF は基底膜

部の線維化に関与し、気道過敏性亢進に係わる因子であることが示された。

皮膚バリア障害：皮膚バリア機能の指標である transepidermal water loss (TEWL) は、妊娠後期の胎仔皮膚において、成体とほぼ同値にまで下がり、バリア機能が獲得したとみなされた。その時期に皮膚細胞間にもスフィンゴミエリンの存在が確認された。スフィンゴミエリンは表皮細胞の増殖、分化、バリア機能形成に関与していることが推察された。

アトピー性皮膚炎では、小児においても無湿部で経皮水分喪失量は亢進していた。このように皮膚バリア障害が小児期でも存在することが明らかになった。スフィンゴミエリナーゼ遺伝子のエクソン1に存在する6塩基繰り返し配列の多型とアトピー性皮膚炎とは関連が認められた。

成人アトピー性皮膚炎患者の乾燥病変部でも、湿润部と同様に角層コンダクタンスの低下や経表皮水分蒸散量の上昇を示し、さらにヒアルロニダーゼ産生性の黄色ぶどう球菌が増殖していることが認められた。

D. 考察

アレルギー的側面

花粉症形質と喘息形質には共通する連鎖領域がみられなかったが、唯一、5q33 領域が共通する連鎖領域であった。この領域は多くの研究者によって、喘息、気道過敏性、アレルギー関連因子との連鎖が報告されており、花粉症の発症にも影響を与える重要な遺伝子を含んでいると考えられた。これらの研究結果により得られた成果をもとにアトピー性疾患のハイリスク児に対してスクリーニングを行えば早期治療、発症予防に貢献できると考えられる。個々の患者のサイトカインの動態を分析し、各々についてその異常な部位について検討することで個々の患者の病態における遺伝子異常が明らかになる可能性が示された

母体血、臍帯血、羊水中の IgE 値、各種サイトカイン、TARC、臍帯血 IL-4 産生 CD3 陽性 T リンパ球のような指標の解析は、早期のアレルギー疾患の予知に有用である可能性が示唆された。今後、測定した症例について ATS-DLT を用いたアンケー

ト調査で、アレルギー疾患の発症の有無との関係を明らかに、精度のよい指標を確立していく必要があると思われる。

IL-10 はアレルギーの病態において Th1、Th2 のバランスを決定する上で modulator の役割をになり、アレルギー発症における重要な役割を演じているものと思われた。

アレルギー疾患でも気管支喘息とアトピー性皮膚炎のような臓器によって異なった特性が認められた。これらが胎内あるいは胎外因子によるかは今後の検討課題である。呼気中の NO によって測定される炎症の関与の意義について今後さらに検討されなければならないと考えられた。

非アレルギー的側面

小児気管支喘息においても、CrB は出現し、特に、乳児喘息に多く検出された。この結果から低年齢喘息児に気道上皮剥離が起こりやすいことが示唆された。また、CrB(+)群において、痰中 IL-8 と好中球エラスターゼが CrB(-)群と比較して有意な高値を示すことや痰中 LL-5 と ECP が両群間に有意な差異がないことから、低年齢の気道上皮傷害に、好酸球のみでなく好中球による気道炎症の関与が重要であると考えられた。

アレルギー炎症による気道リモデリングの進展とその修復機転における年齢の影響を、モルモット抗原反復曝露モデルにより検討した結果、気道壁リモデリングの発生部位は加齢により変化する可能性が示唆された。今回の検討でアレルギー特異的なモデルおよび非特異的な刺激である DEP についても同様に GM-CSF が気道過敏性獲得に重要な因子であることが明らかになった。今後この気道過敏性獲得のターゲットとなっている細胞を同定してく予定である。

気道のリモデリングについては線維芽細胞増殖の competence factor である PDGF が基底膜部の肥厚に関与していることが明らかになった。これはコラーゲンの沈着という側面において肺の線維化に関与しているのと同様のサイトカインが喘息においても関与している可能性を示している。

このように、気管支喘息の病態として重要な気道炎症と気道過敏性に関しては、胎外因子としての環境因子の曝露、年齢やサイトカイン、増殖因子

などが重要な役割を果たしていると考えられた。

小児アトピー性皮膚炎患者においても、経皮的水分喪失量の上昇を認め、皮膚バリア障害が存在する可能性が示唆された。また、経皮的水分喪失量の上昇と血清 IgE や末梢血好酸球数とは相関関係が認められなかったことより、アトピー性皮膚炎における皮膚バリア障害は、アレルギー素因とは独立した因子である可能性が示唆された。スフィンゴミエリナーゼ遺伝子の解析は、アトピー性皮膚炎の発症機序を解明するための一役を担い、さらに遺伝子診断により乳児期早期の発症予知も可能である可能性が示唆された。

バリア機能を獲得したとみなされる妊娠後期の胎仔皮膚では、細胞間にもスフィンゴミエリンの存在が確認されたが、その分布には偏りがあり、角層と顆粒層の間の細胞間と有棘層上層に特に存在していた。細胞外、特に角層と顆粒層の細胞間のスフィンゴミエリンは角質細胞間脂質の材料として重要と考えられる。

アトピー性皮膚炎の乾燥病変ではバリア障害によりヒアルロニダーゼ産生性黄色ブドウ球菌が増殖し、それがアトピー性皮膚炎の増悪遷延化を促す可能性が考えられた。乾燥病変に対し単なる保湿のみでなく、本来の皮膚常在菌叢を回復させることがADの皮疹の改善に有効であると考えられた。

E. 結論

アレルギー疾患におけるアレルギー的側面と非アレルギー的側面である臓器過敏性の獲得に分け、最新の知見をもとに、疫学的調査を含め、遺伝学的、免疫学的手法、さらに分子生物学的手法を用い、それに係わる胎内・胎外因子の検討を行った。本研究のように、非アレルギー的側面から、アレルギー疾患の発症要因を検討した研究は少なく、アレルギー疾患の原因解明および治療にもつなが

る意義深いものに発展することが期待される。さらに、アレルギー発症増加因子を一つ一つ同定し、それに対応する施策を講じることで、アレルギー疾患の増加をくい止め、悪化防止と、健康回復への道筋をつくることで、アレルギー疾患に対する保健指導方法が確立されることが考えられる。

研究協力者

相原道子（横浜市立大学医学部皮膚科講師）

青木美奈子（岐阜大学医学部小児科大学院）

有坂忠雄（筑波大学基礎医学系遺伝学医学助教授）

大木康史（桐生厚生病院小児科部長）

笠原貴美子（岐阜大学医学部小児科）

金子英雄（岐阜大学医学部小児科講師）

金子富士夫（帝京大学医学部内科助手）

佐藤 哲（前橋赤十字病院小児科医員）

白川太郎（京都大学医学研究科健康増進・行動学分野教授）

鈴木幸代（群馬県立がんセンター小児科）

鈴木道子（群馬大学医学部小児科大学院）

田中洋子（岐阜大学医学部小児科大学院）

中野純一（帝京大学医学部内科講師）

藤本 昭（友誼会総合病院産婦人科部長）

松井永子（岐阜大学医学部小児科医員）

松原知代（山口大学医学部小児科講師）

山下直美（帝京大学医学部内科助教授）

良田陽子（京都大学大学院医学研究科皮膚病態学大学院生）

渡辺みづほ（岐阜大学医学部小児科大学院）

（あいうえお順）

厚生科学研究費補助金（感覚障害及び免疫・アレルギー等研究事業）

アレルギー疾患に係わる胎内・胎外因子の同定に関する研究

分担研究者 宮地良樹 京都大学大学院医学研究科皮膚病態学教授

研究要旨

アトピー性皮膚炎患者のバリア機能が損なわれた皮膚では、角質細胞間脂質中の ceramide が減少していることが知られているが、その原因については未だ十分に解明されていない。そこで ceramide の前駆物質である sphingomyelin に着目し、胎仔皮膚での sphingomyelin の発生、局在を免疫蛍光抗体法、免疫電顕法で観察すると共に経表皮水分蒸散量測定と従来からの脂質染色法である Nile red 染色を行った。その結果、ケラチノサイトが顆粒細胞や有棘層細胞に分化する直前で細胞内小器官が未熟な時期、表皮内 sphingomyelin は多くなり、細胞内に広く分布することが観察された。その後、顆粒細胞や有棘層細胞に分化すると sphingomyelin の標識は弱くなり、経表皮水分蒸散量が成体とほぼ同値にまで下がり、バリア機能を獲得したと思われる妊娠後期になるとともにその標識は角質顆粒層間と有棘細胞上層に見られるようになった。成長につれ、sphingomyelin の標識は細胞内より細胞間に多くなっていった。これらから sphingomyelin はマウス皮膚において表皮細胞の分化、バリア機能形成に関与していることが推察された。

研究協力者

良田陽子・京都大学大学院医学研究科皮膚病態学
大学院生

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎患者は、かさついた粗造な外観の乾燥性皮膚を呈する。このような皮膚はバリア機能が損なわれ、皮膚の水分が失われることにより生じる。バリア機能の低下は外界からの種々の抗原物質の侵入を容易にするので、皮膚炎の発症、増悪と深く関わっていると考えられる。

皮膚バリア機能を担う重要な要素に角質細胞間脂質がある。アトピー性皮膚炎患者のバリア機能が損なわれた乾燥性皮膚では、角質細胞間脂質中の ceramide の減少が知られ、その原因として sphingomyelin deacylase の活性が亢進し、sphingomyelin が ceramide に転換されずに sphingosylphosphorylcholine になることなどが言われているが未だ十分に解明されていない。角質細胞間脂質中の ceramide は顆粒細胞内の lamellar body から sphingomyelin が細胞外に放出され、水解されて生じるとされている。しかし sphingomyelin の表皮における微細局在、発現は明らかではない。

そこで今回、胎仔期皮膚において ceramide の前駆物質である sphingomyelin の発生、局在と皮膚バリア機能について検討した。

B. 方法

ddy マウス胎仔、新生仔、成体の背部皮膚を 1% グルタルアルデヒドを含む 2% ホルムアルデヒド液に 4℃ で 1 時間浸漬固定し、抗 sphingomyelin 抗体 (VJ-41) と Lysenin-glutathione-s-transferase (GST) 融合蛋白を用いて免疫蛍光抗体法をおこなった。VJ-41 は sphingomyelin と不飽和脂肪酸を認識する抗体である (岩森, 1996)。その蛍光抗体法の 2 次抗体としては FITC 結合抗マウス IgM 抗体を用いた。Lysenin は sphingomyelin 特異的結合蛋白である (Yamaji, 1997)。Lysenin-GST 結合部位をウサギ抗 GST 抗体と FITC 結合ヤギ抗ウサギ抗体を用いて蛍光染色し、可視化した。また徳安法 (徳安, 1978) による免疫電顕法を直径 10 nm のコロイド金ラベル抗体を用いて行った。

さらに無固定のマウス胎仔、新生仔、成体の背部皮膚を用い、Nile red 染色 (Fowler and Greenspan, 1985) を行った。

蛍光強度は、共焦点レーザー顕微鏡で同一条件のもとに撮影した像をマッキントッシュ・コンピューターの NIH イメージソフトで皮膚表面から垂直に 30 X 30 ピクセルの範囲を測定し、解析した。

経表皮水分蒸散量 (TEWL) はマウスの背部肩甲骨間の皮膚で皮膚水分蒸発量測定装置 (花王、栃木) を用いて測定した。

動物実験については動物愛護に充分配慮し、操作はジエチルエーテル麻酔下にて行った。

C. 結果

免疫蛍光抗体法による sphingomyelin の標識は、マウス成体表皮では基底層から顆粒層にかけて細胞内、細胞間、細胞膜上に広く分布していたが、顆粒層や有棘層に分化していない胎生 14.5 日の皮膚では表皮全体の細胞質に強くみられ、胎生 16.5 日から出生までは角層と顆粒層の間の細胞間と有棘層上層の 2 ケ所に分かれて観察された (図 1)。その蛍光染色の強度を測ると表皮内で 2 峰性のピークを示していた (図 2、白抜き矢印、黒矢印)。

Nile red 染色では胎生 15.5 日までは polar lipid を示す red-orange の蛍光のみが表皮全体に観察され、胎生 16.5 日 (図 3a) ではそれまでと同様の red-orange の蛍光に加え、periderm の剥離とともに neutral lipids を示すわずかな yellow-gold の蛍光が角層にみられるようになり、以降角層が厚くなるにつれ、角層細胞間に yellow-gold の蛍光が増していき、成体 (図 3b) では厚い角質の細胞間に yellow-gold の蛍光が明瞭に観察された。Nile red 染色の red-orange の蛍光強度は sphingomyelin のような 2 峰性を示さなかった (図 4)。

免疫電顕法では、胎生 14.5 日の皮膚の未熟な細胞内小器官上など細胞内に immunogold 粒子が多く見られた (図 5a, b)。胎生 16.5 日になると顆粒細胞や有棘層細胞に分化し、細胞内小器官も発達して、immunogold 粒子が lamellar body 上と細胞間にも少し見られた (図 5c)。成体皮膚では lamellar body 上 (図 5f, g) や特に細胞間に多くの immunogold 粒子が見られた (図 5d, e)。

胎生 15.5 日までの TEWL は胎生 16.5 日以降に比較すると高値で、胎生 16.5 日にはほぼ成体と同値にまで低下した (図 6、平均値 \pm SD g/m²/h)。

これらの結果をまとめて図示する (図 7)。

D. 考察

ケラチノサイトの増殖が盛んで、かつ顆粒細胞や有棘層細胞に分化する直前の時期、表皮の sphingomyelin の標識は強かった。しかしその時 sphingomyelin は細胞内に存在しており、ケラチノサイト間を埋める働きはしていない。つまり、バリア機能には寄与していないと思われる。TEWL が成体とほぼ同値にまで下がり、バリア機能を獲得したとみなされる妊娠後期の胎仔皮膚では、細胞間にも sphingomyelin の存在が確認された。興味深いことにその分布には偏りがあり、角層と顆粒層の間の細胞間と有棘層上層に特に存在していた。細胞外、特に角層と顆粒層の細胞間の sphingomyelin は角質細胞間脂質の材料として重要視されよう。

この分布の偏りは従来からの脂質染色法である Nile red 染色では観察され得なかった。Nile red 染色では polar lipid と neutral lipid を染め分けられるが、sphingomyelin だけを特異的に識別できないからだろう。今回用いた抗 sphingomyelin 抗体と lysenin-GST は sphingomyelin の局在を調べるために有用なプローブであると考えられた。

これらによる標識は免疫蛍光染色では明らかな差異が見られなかった。電顕観察上では抗 sphingomyelin 抗体による標識が lamellar body の内部に、lysenin による標識が膜寄りに線状に見られる傾向があった。lysenin のほうが二重膜内の sphingomyelin に結合しやすいのかもしれない。

今後さらに皮膚バリア機能と sphingomyelin の関係の検討をすすめていくことは、TEWL が高値を示し、バリア機能が破壊されているアトピー性皮膚炎患者皮膚の基礎的な皮膚状態の解明の一端となるだろう。

E. 結論

sphingomyelin はマウス胎生期皮膚において表皮細胞の増殖、分化、バリア機能形成に関与していることが推察された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 学会発表

日本研究皮膚科学会第 24 回年次学術大会

61st Annual Meeting of The Society for Investigative Dermatology

H. 知的財産権の出願・登録状況

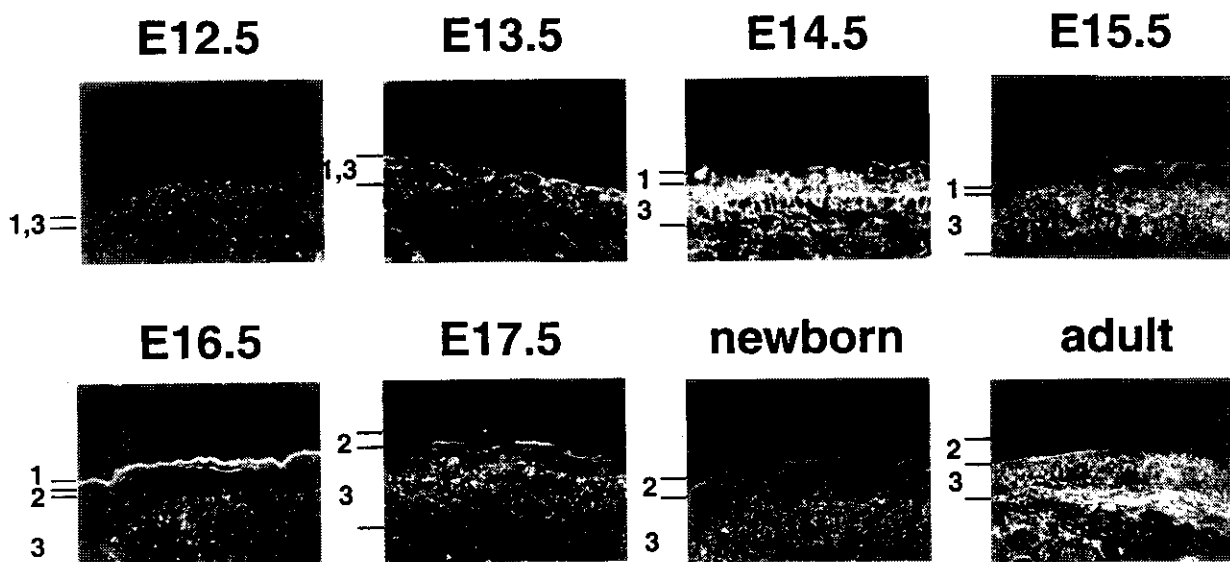


図 1

マウス背部皮膚の抗sphingomyelin抗体を用いた蛍光免疫染色像

E12.5-E17.5, 胎生12.5-17.5日: 1, periderm: 2, stratum corneum:
3, intermediate layer or stratum granulosum, stratum spinosum,
and stratum basale

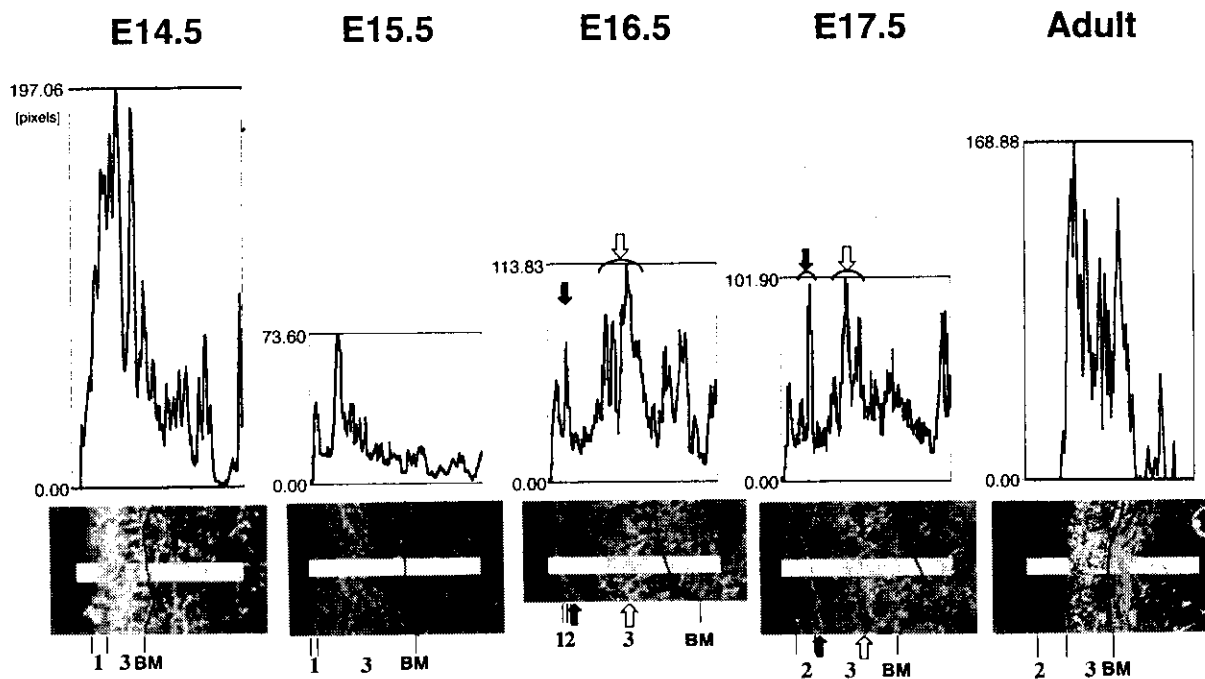


図 2

マウス皮膚における抗sphingomyelin染色の蛍光強度

BM, basement membrane zone

50µm

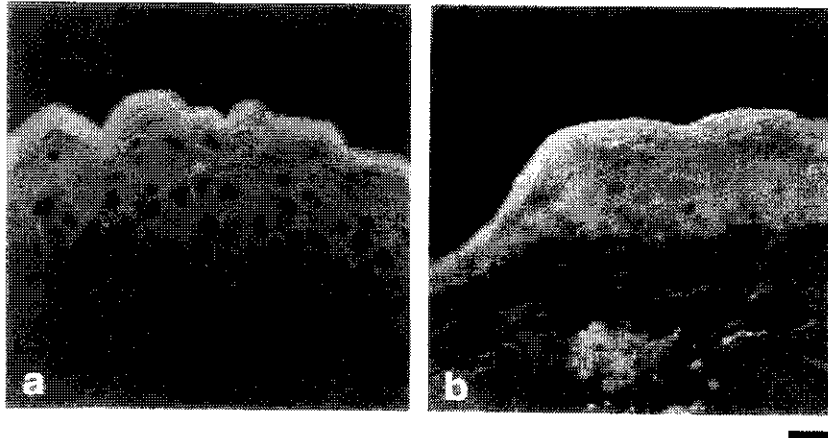


図 3
胎生16.5日 (a) と成体 (b) の皮膚のNile red 染色
Scale bar: 50 μ m

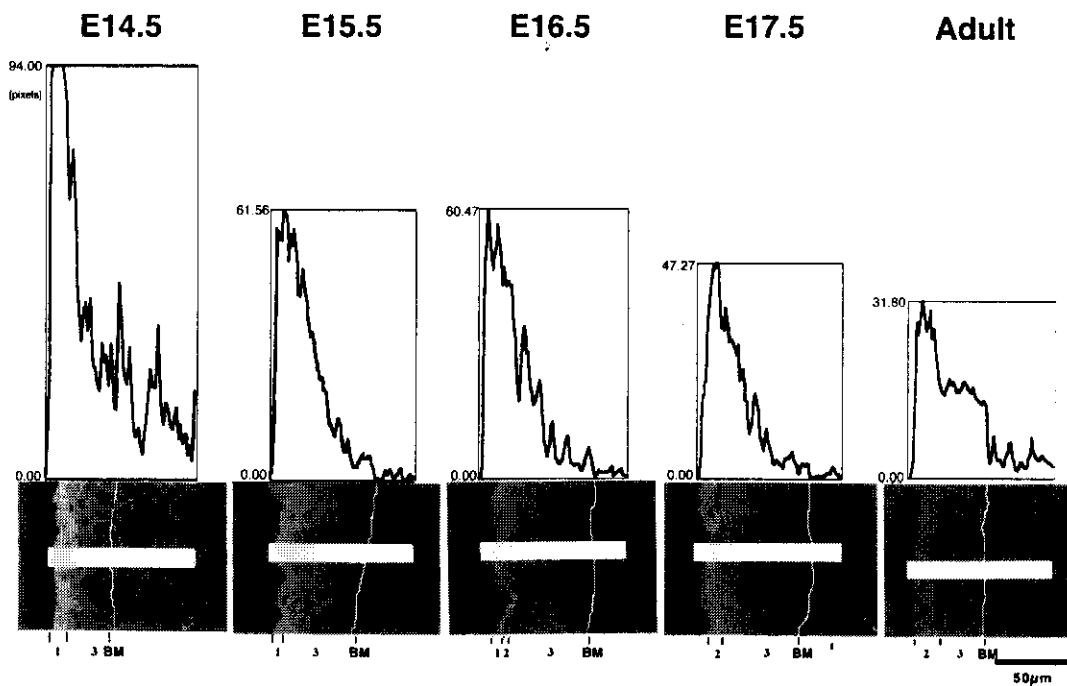


図 4
Nile red 染色におけるred-yellowの蛍光強度
BM, basement membrane zone

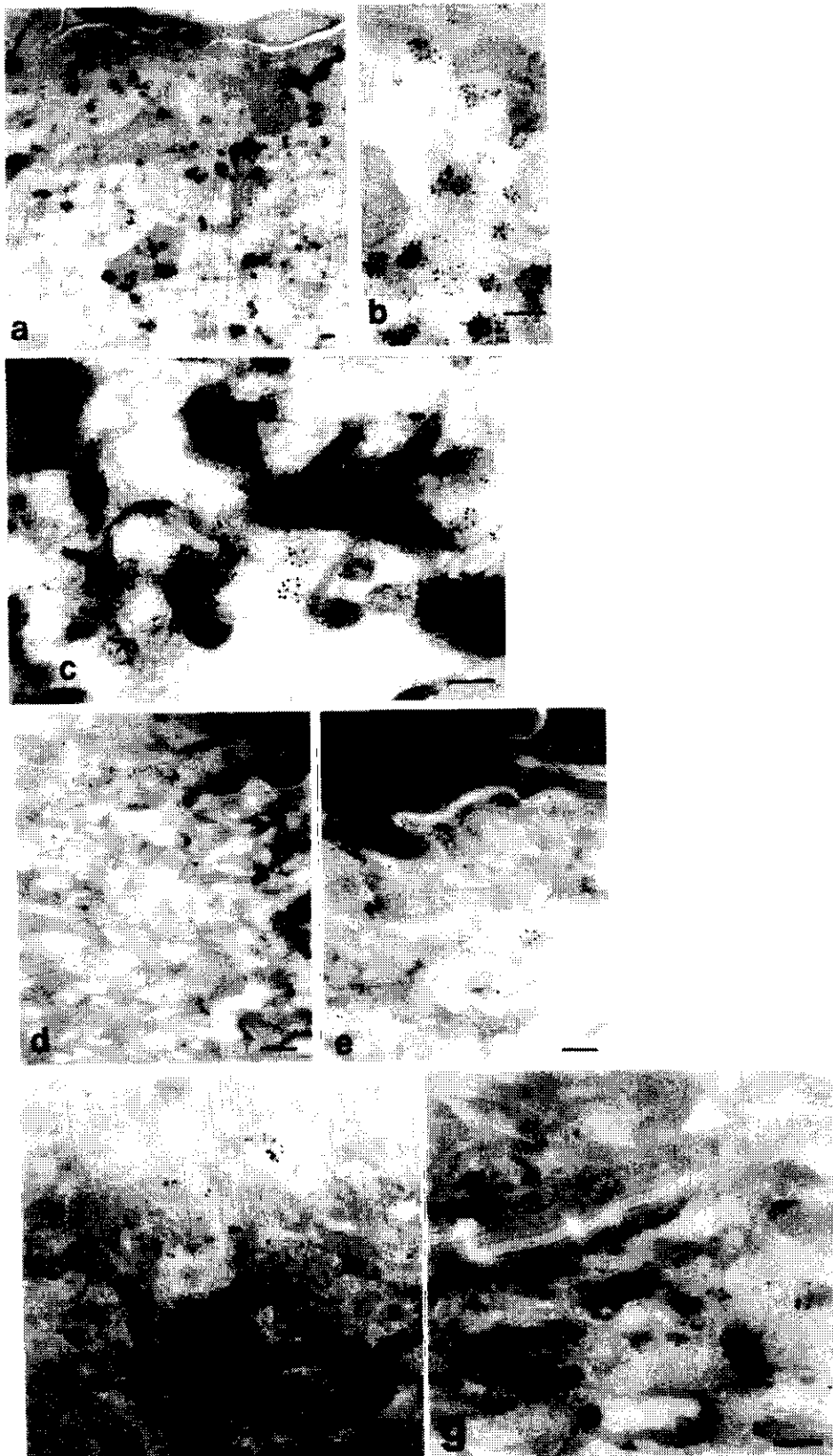


図 5
 Sphingomyelin specific binding proteinを用いた免疫電顕像
 (a, b; 胎生14.5日、c; 胎生16.5日、d, f; 成体)
 と抗sphingomyelin抗体を用いた免疫電顕像 (e, g; 成体)
 Scale bar: 200 nm

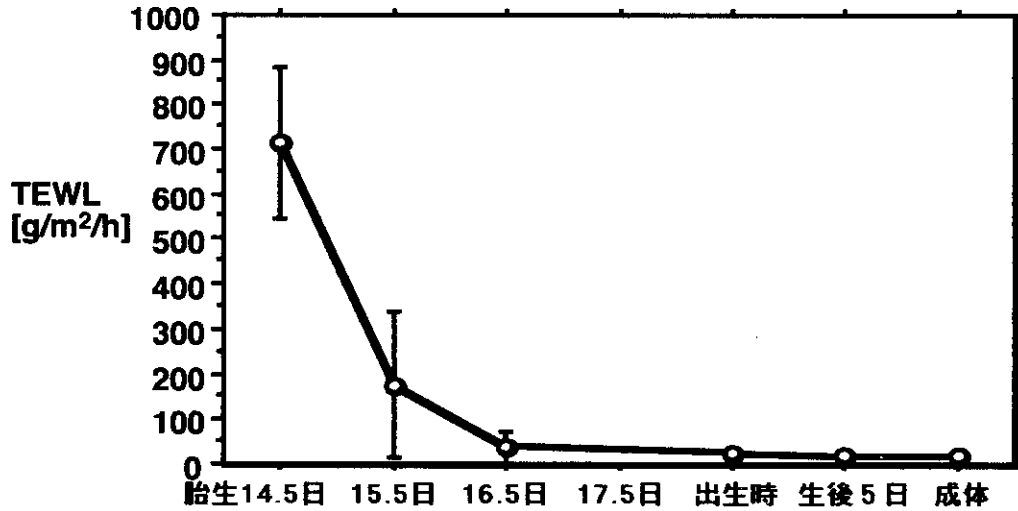


図 6
胎仔期から成体までの経表皮水分蒸散量 (TEWL) の変化

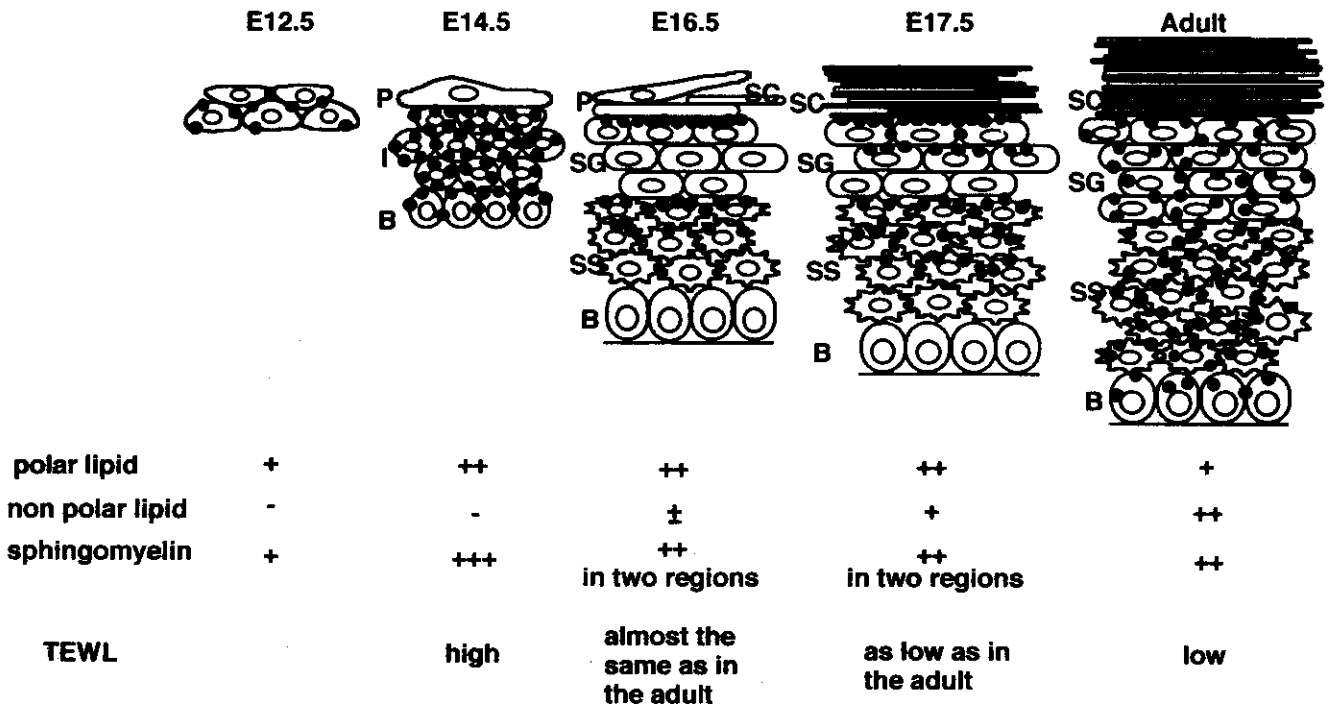


図 7
皮膚の発生における sphingomyelin の分布とバリア機能の発達のみとめ

P, periderm: I, intermediate layer: SC, stratum corneum: SG, stratum granulosum: SP, stratum spinosum: B, basal cells
closed circles, sphingomyelin

研究課題名：アレルギー疾患に係わる胎内、胎外因子同定に関する研究

分担課題名：アトピー遺伝子の検討

氏名 分担研究者 近藤直実

所属機関 岐阜大学医学部小児科・教授

研究要旨 アレルギーの発症機序ならびにその病態解明、および病因遺伝子を解明する一貫として、IL-10に着目し、そのTh1及びTh2系のサイトカイン並びにIgE産生に及ぼす影響、アレルギー患者における動態を検討した。IL-10はAPCやTcellより産生され、*in vitro*にて強発現させた場合にはIL-12やIFN- γ を抑制し、IgEの過剰産生の方向で働くが、一方でもう一つの作用として、Th1系のサイトカインであるIL-12やIFN- γ と同じようにIgEの産生を抑える作用もあると考えられた。すなわち現時点ではIL-10はアレルギー反応に関してはModulatorとしての働きがあると考えられた。個々の症例についておのおののサイトカインについて検討し、特異例を選択し、そのIFN- γ receptor、IL-10 receptorなどについて検討したところIFN- γ が高いにも関わらず、IgEが高値である症例にてc-DNA上にIFN- γ receptor1のexon 3に相当する部分に102bpのdeletionが認められる症例が存在した。

青木美奈子 岐阜大学医学部小児科大学院
松井永子 岐阜大学医学部小児科医員
金子英雄 岐阜大学小児科講師
渡辺みづほ 岐阜大学医学部小児科大学院
田中洋子 岐阜大学医学部小児科大学院
笠原貴美子 岐阜大学医学部小児科

A.研究目的

IL-10は1989年にMosmannらによりTh1細胞からのサイトカイン産生を抑制する因子として同定された。その後の研究により1) Th0/Th2細胞 2) 単球/マクロファージ 3) 活性化T細胞 4) 活性化B細胞などより産生されA) Th1細胞からのサイトカイン産生抑制 B) IL-3と協同して肥満細胞の増殖促進 C) 単球・マクロファージに対する抑制などの作用が明らかになった。しかし、アレルギーにおけるサイトカインネットワークに関する作用は十分には解明されていない。そこでIL-10のアレルギーに対する作用を通してアレルギーにおけるサイトカインネットワークを分析する中でアトピー遺伝子を検索した。

B.研究方法

アレルギー患者、および健常人の末梢血より末梢血単核球分画(以下PBMCs)を分離し1)無刺激、Derf-1、LPS、PHAにて刺激し、24時間培養後、培養上清中のIL-4、IL-10、IL-12、IFN- γ をそれぞれELISA法で測定し各々の関係を検討した。2)アレルギー患者においてPHAおよび種々の濃度の

IL-10を加えて24時間培養し、IL-12、IFN- γ をELISA法で測定した。またCD4陽性細胞のみを分離し同様の実験を行った。3)アレルギー患者においてPHAおよび種々の濃度のIL-12を加えて24時間培養し、IL-10、IL-4をELISA法で測定した。4)コントロール群の平均値 \pm 1SDを基準値と定め、個々の症例のサイトカインの動態について解析した。5)解析にもとづき個々の症例を分類し、考えられるサイトカインレセプターの遺伝子異常の有無について検討した。

(倫理面への配慮)

研究対象者には本研究の内容、方法および予想される結果を十分に説明し充分な理解(インフォームドコンセント)を得た上で採血が行われた。また倫理面でも、結果による不利益は全く生じないか、または配慮が充分になされることから問題がないと判断された。

C.研究結果

IL-10はPBMCsを用いてIL-12やIFN- γ などTh1系のサイトカインを*in vitro*において強発現させた場合には濃度依存的にこれらのサイトカインの産生を抑制した(図1)。さらにCD4陽性細胞を用いてIFN- γ を強発現させた時もその産生を濃度依存的に抑制した(図1)。一方、Th2系のサイトカインであるIL-4を強発現させた時、IL-10はほとんどその産生に影響を及ぼさなかった(図1)。次にIL-12がIL-10及びIL-4に及ぼす影響についても検討したが、IL-12はどちらのサイトカインの産生にも影

響を及ぼさなかった。以上のように IL-10 は *in vitro* において強発現させた Th1 系サイトカインである IL-12、IFN- γ に対して抑制効果を示すことがあきらかとなった。

次に、コントロール群とアレルギー群さらにはアトピー性皮膚炎群と気管支喘息群について各サイトカインの産生の状況をしらべたところ(表1)、IL-4 だけがコントロール群に比べてアレルギー群で高値を示し、それ以外の IL-10、IL-12、IFN- γ はいずれもコントロール群よりアレルギー群で低い傾向が認められた。生体にできるだけ近いという意味で、無刺激の状態でも検討したが、同様の結果を得た。また Derf-1 刺激、LPS 刺激、PHA 刺激の場合も同様の結果であった。さらにアトピー性皮膚炎群と気管支喘息群とを比較すると、気管支喘息の方が特に顕著な傾向にあった。

そこで血清 IgE とこれらのサイトカインの産生との関連を検討した(表2)。IFN- γ は無刺激でも種々の刺激をしても血清 IgE とは優位な負の相関を示した。この結果は私たちが以前より示している結果とまた一般的にいわれているものとも一致している。ところが IL-10 は、無刺激の状態では IgE と負の相関すなわち IFN- γ (Th1 系)と同様の動きを示すが、*in vitro* にて刺激したときの IL-10 の産生はこのような傾向は示さなかった。

そこでさらに各サイトカイン同士の産生の相関を検討した(表3)。いづれの条件でも IL-12 と IFN- γ とは明らかに優位な正の相関を認めた。ところが IL-10 は無刺激の時には IL-12、IFN- γ と正の相関を認めたが、*in vitro* で刺激した場合には IL-10 は IL-12、IFN- γ とともに関連を認めなかった。

次に種々のサイトカイン産生のパターンに分けて、個々の症例を検討した。現時点では通常の見解では理解できない症例をピックアップして、特にそのレセプターを中心に遺伝子学的な異常の有無につき検討をすすめた。IFN- γ が高いにも関わらず、IgE が高値である症例において IFN- γ receptor 異常の有無について検討したところ、c-DNA 上に IFN- γ receptor1 の exon 3 に相当する部分に 102bp の delation が認められた症例が存在した。

D. 考察

IL-10 は APC や T cell より産生され、*in vitro* にて強発現させた場合には図2の[1]や[2]のように IL-12 や IFN- γ を抑制し、ひいては IgE の過剰産生の方向で働くが、一方でもう一つの作用として、Th1 系のサイトカインである IL-12 や IFN- γ と同じように IgE の産生を抑える作用もあると考えられた(図2の[3])。従って、現時点では IL-10 は、アレルギー反応に関しては Modulator としての働きがあると考えられる。個々の症例についておのおのサイトカインについて検討し、特異例を選択し、検討したところ IFN- γ が高いにも関わらず、IgE が高値である症例にて c-DNA 上に IFN- γ receptor1 の exon 3 に相当する部分に遺伝子異常が認められた症例が存在した。

E. 結論

IL-10 はアレルギーの病態において Th1、Th2 のバランスを決定する上で modulator の役割をにない、アレルギー発症における重要な役割を演じているものと思われた。また、個々の患者のサイトカインの動態を分析し、各々についてその異常な部位について検討することで個々の患者の病態における遺伝子異常が明らかになる可能性が示された。

F. 研究発表

学会発表

- (1) 青木美奈子、松井永子、渡辺みづほ、金子英雄、寺本貴英、加藤善一郎、伊上良輔、坂口平馬、笠原貴美子、近藤直実：アレルギー患者における IL-12 刺激伝達系におよぼす IL-10、IL-4 の影響。日本小児アレルギー学会(第37回)(2000年11月3日～11月4日、群馬)
- (2) 青木美奈子、松井永子、渡辺みづほ、金子英雄、寺本貴英、加藤善一郎、伊上良輔、坂口平馬、笠原貴美子、近藤直実：アレルギー患者における IL-12 刺激伝達系におよぼす IL-10 の影響。日本アレルギー学会総会(第50回)(2000年11月30日～12月2日、横浜)

図 1

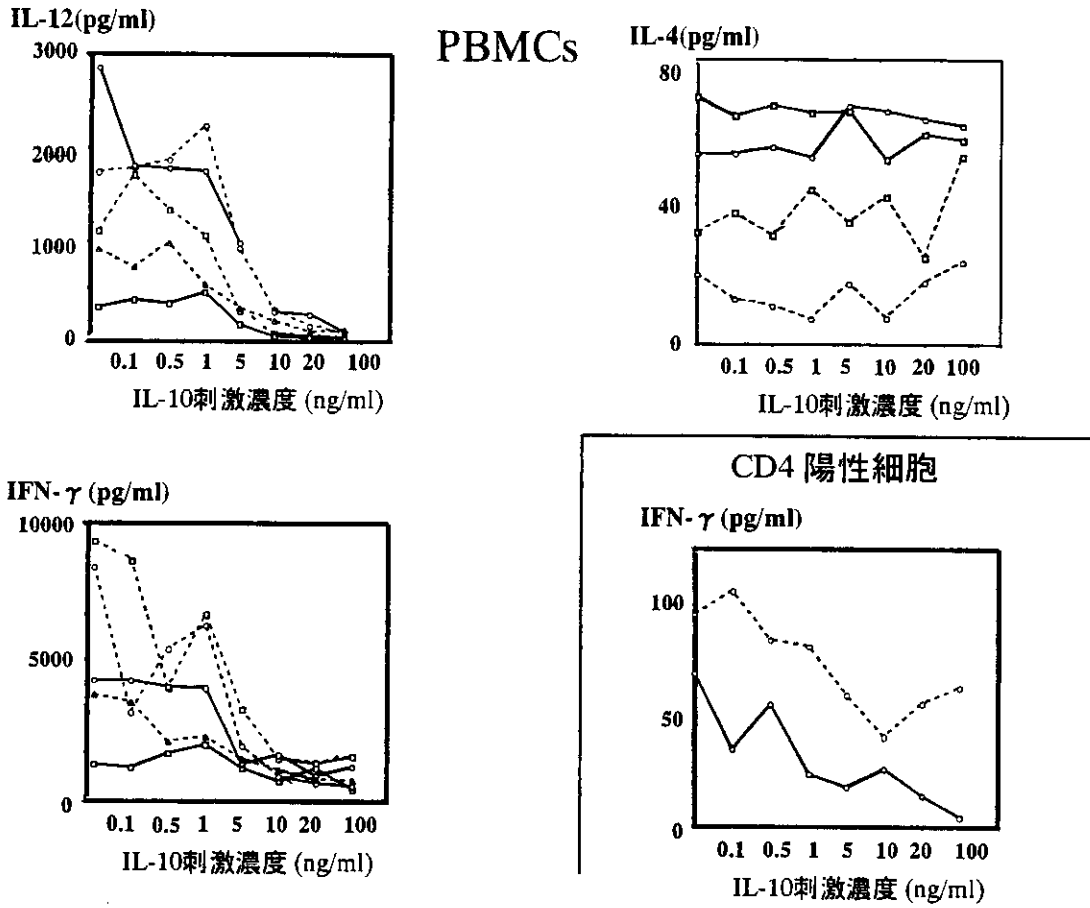


図 2

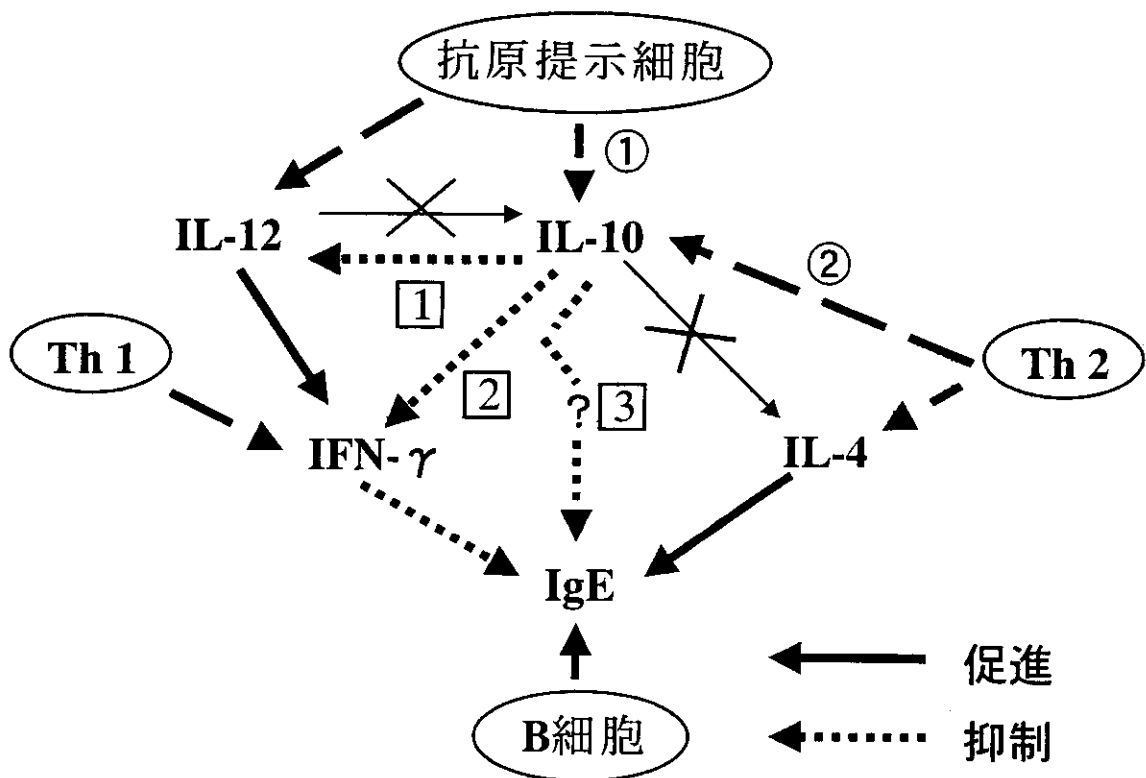


表1 各サイトカインの産生量の比較

	Control<n=18>	Allergy<n=32>	(AD<n=18> BA<n=13>)		P value			
					control/allergy	control/AD	control/BA	AD/BA
PHA stimulated IL-4	31.6 (18.1-54.9)	37.1 (16.2-74.1)	38 (19.1-75.8)	30.9 (15.5-61.7)	P=0.333	P=0.391	P=0.911	P=0.554
non stimulated IL-10	51.3 (17.4-151.4)	20.4 (10.9-38.0)	30.2 (10.7-85.1)	18.2 (11.5-30.2)	P=0.0008**	P=0.146	P=0.0004**	P=0.102
Derf-1 stimulated IL-10	123 (33.1-457.1)	48.9 (16.2-147.9)	67.6 (19.5-234.4)	35.5 (12.9-97.7)	P=0.008**	P=0.166	P=0.003**	P=0.165
LPS stimulated IL-10	575.4 (302.0-1096.5)	398.1 (162.2-977.2)	630.9 (398.1-1000.0)	199.5 (72.4-549.4)	P=0.068	P=0.614	P=0.001**	P=0.0006**
PHA stimulated IL-10	398.1 (162.1-977.2)	263.1 (102.3-676.1)	389.1 (194.9-776.2)	204.2 (75.8-549.5)	P=0.099	P=0.900	P=0.057	P=0.091
non stimulated IL-12	162.2 (32.4-812.8)	30.9 (6.7-158.9)	53.7 (8.1-354.8)	18.6 (6.5-53.7)	P=0.0003**	P=0.074	P=0.000**	P=0.005**
Derf-1 stimulated IL-12	512.8 (138.1-1905.5)	257.1 (85.1-776.2)	323.8 (91.2-1148.2)	151.4 (66.1-346.7)	P=0.046*	P=0.284	P=0.001**	P=0.003**
LPS stimulated IL-12	1202.3 (707.9-2041.7)	1148.1 (724.4-1819.7)	1380.4 (870.9-2187.8)	776.2 (512.8-1174.9)	P=0.744	P=0.352	P=0.013*	P=0.942
PHA stimulated IL-12	537.1 (245.5-1174.9)	281.8 (102.3-776.2)	323.6 (112.2-933.3)	218.8 (104.7-457.1)	P=0.0063**	P=0.110	P=0.001**	P=0.046*
non stimulated IFN- γ	32.4 (8.3-125.9)	17.8 (10.2-30.9)	19.9 (9.5-41.7)	15.6 (5.4-33.9)	P=0.075	P=0.185	P=0.000**	P=0.000*
Derf-1 stimulated IFN- γ	57.4 (10.9-301.9)	21.8 (7.6-52.5)	33.9 (9.8-117.5)	12.9 (8.1-20.4)	P=0.0209*	P=0.279	P=0.0003**	P=0.0025**
LPS stimulated IFN- γ	239.9 (34.7-1659.6)	72.4 (13.5-289.1)	158.5 (32.4-776.2)	28.8 (5.7-144.5)	P=0.0205*	P=0.472	P=0.0009**	P=0.0036**
PHA stimulated IFN- γ	1905.5 (1122.0-3235.9)	1258.9 (602.5-2630.3)	1174.9 (501.2-2754.2)	1202.3 (616.6-2344.2)	P=0.0143*	P=0.045*	P=0.037*	P=0.0.977

* : p<0.05, ** : p<0.01

表2 血清IgEと各サイトカイン産生量との関係

	IL-4	IL-10	IL-12	IFN- γ
No stimulated PBMCs	r= - 0.112	r= - 0.248*	r= - 0.283*	r= - 0.405**
Derf-1 stimulated PBMCs		r= - 0.065	r= - 0.184	r= - 0.278*
LPS stimulated PBMCs		r= 0.003	r= - 0.059	r= - 0.255*
PHA stimulated PBMCs	r= 0.182	r= 0.024	r= - 0.342**	r= - 0.401**

* : p<0.05, ** : p<0.01

表3 各サイトカイン産生量の相互関係

	IL-4	IL-10	IL-12
no-stimulation			
IL-4			
IL-10	r=-0.125		
IL-12	r=-0.353**	r=0.698**	
IFN- γ	r=-0.097	r=0.556**	r=0.502**
stimulated Derf-1			
IL-10			
IL-12		r=0.232	
IFN- γ		r=0.208	r=0.246*
stimulated LPS			
IL-10			
IL-12		r=0.210	
IFN- γ		r=0.278	r=0.302*
stimulated PHA			
IL-4			
IL-10	r=0.0437		
IL-12	r=-0.401**	r=-0.0926	
IFN- γ	r=-0.012	r=0.177	r=0.537**

* : p<0.05, ** : p<0.01

アレルギー性疾患に係わる胎内・胎外因子の同定に関する研究 —サイトカインと胎外因子—

分担研究者：大田 健 （帝京大学医学部内科教授）

アレルギー性疾患に係わるサイトカインとしてGM-CSFおよびPDGFについて検討した。マウスの気道過敏性をアセチルコリン吸入前後の気道抵抗の上昇を指標に評価した。刺激因子としてディーゼル排気微粒子およびOA+アラムで免疫しOA吸入を行ない検討した。GM-CSFはDEP曝露および特異感作抗原吸入の両者の系で気道過敏性惹起に関与することがGM-CSFに対する中和抗体を用いた検討により明らかになった。さらに、DEP曝露のモデルでは気道のリモデリングにPDGFが重要な役割を果たしていることが明らかになった。

研究協力者：山下直美（帝京大学医学部内科助教授）、中野純一（帝京大学医学部内科講師）、金子富志人（帝京大学医学部助手）

A. 目的 近年、喘息を初めとするアレルギー性疾患は増加傾向を示している。その増加に関与している胎内・胎外因子を明らかにし、アレルギー性疾患の予知予防に役立てることが、当該研究班の主題であるが、その中で、我々は喘息の発症に関連する非アレルギー的側面である臓器過敏性—気道過敏性に焦点を絞って研究を進めてきた。気道過敏性は気管支喘息の病態形成の重要な因子であり、その獲得には遺伝的因子と後天的因子として胎内、胎外因子、サイトカイン、増殖因子が関与している。本研究では、各種因子の関与をマウスのモデルを用いて明らかにすることを目的とした。本年度は増殖因子として線維芽細胞の増殖に関与するPDGFおよび好酸球の活性化および抗原

提示細胞の機能に関与するGM-CSFについて検討した。

B. 方法 遺伝的に気道過敏性を有するA/Jマウスおよび過敏性のないC57B1/6マウスを用いて検討した。刺激因子として、大気汚染物質のひとつとして注目されているディーゼル排気微粒子（DEP）およびアレルギーとして卵白アルブミン（OA）を用いた。OA曝露群は予めOA+alumで免疫し、OA特異的IgE抗体を誘導した。PDGFおよびGM-CSFの関与を検討する目的で中和抗体を投与し検討した。気道過敏性はアセチルコリン吸入前後の気道抵抗をプレシスモボディボックス法で検討し評価した。

C. 結果 A/Jマウスは非感作の状態でアセチルコリン吸入後気道抵抗の上昇を示した。一方、C57b1/6マウスは20mg/mlのアセチルコリン吸入まで全く気道抵抗の上昇を示さなかった。ただし、DEP曝露により、A/JマウスおよびC57B1/6マウスともに気道過敏性が有意に上昇した（図1）。次にA/J

マウスについてDEP曝露による気道過敏性の亢進にどのようなサイトカインが関与しているかを検討した。サイトカインの中和実験から、この気道過敏性の亢進には、IL-4は関与せず、GM-CSFが重要であることが示された(図2)。さらにこのモデルでは基底膜部の肥厚として気道のリモデリングも評価できPDGFがその形成に重要な因子であることが明らかになった(図3)。基底膜部の肥厚を定量化する目的でairway wall thickening index (AWTI) 気道外周径(Po) - 気道内周径(Pi) / Piを計算した。図4に示すように有意にPDGF中和抗体投与群で気道肥厚が軽減された。DEP刺激により肺全体から採取したmRNAでPDGFmRNAの誘導が認められ(図5)、組織染色より、気道上皮および肺胞マクロファージに産生されていることが明らかになった。コラーゲン沈着の指標としてヒドロキシプロリン量を測定するとDEP刺激でヒドロキシプロリン量が増加し、aPDGF投与群で抑制された。

アレルギー感作モデルでは、OA+alumで免疫しOA特異的IgE抗体を誘導した時点では気道過敏性はコントロールと差異を認めないが、2週間隔日吸入曝露すると、気道過敏性が亢進した。この気道過敏性の亢進もGM-CSFを中和することによって抑制された(図6)。

D. 考察

Th2型サイトカインであるIL-4、IL-5の分泌の亢進が報告され、これらサイトカインがアレルギー性炎症の形成に必須であることが動物モデルで証明されている。我々は、好酸球の活性化にIL-5やIL-3と共に重要なサイトカインであるGM-CSFに注目してきた。GM-CSFは、好酸球の分化成熟に関与するだけではなく、成熟した好酸球

に働き、細胞の活性化を誘導し、化学伝達物質の産生と遊離の増強、寿命の延長効果や遊走活性などを発現することが知られている。また樹状細胞を初めとする抗原提示細胞の成熟にも関与している。さらに、実際に気管支喘息患者気道局所でも、GM-CSF産生が亢進していることが報告されている。今回の検討でアレルギー特異的なモデルおよび非特異的な刺激であるDEPについても同様にGM-CSFが気道過敏性獲得に重要な因子であることが明らかになった。今後この気道過敏性獲得のターゲットとなっている細胞を同定してく予定である。

気道のリモデリングについては線維芽細胞増殖のcompetence factorであるPDGFが基底膜部の肥厚に関与していることが明らかになった。これはコラーゲンの沈着という側面において肺の線維化に関与しているのと同様のサイトカインが喘息においても関与している可能性を示している。

E. 結論

非特異的な気道の刺激およびアレルギー感作の両者において、気道過敏性獲得に関与するサイトカインとしてGM-CSFが重要な因子であった。GM-CSFは好酸球の寿命延長作用を有しまた、PDGFは基底膜部の線維化に関与し、気道過敏性亢進にも係わる因子であることが示された。

G. 業績

Yamashita N, Sekine K, Miyasaka T, Kawashima R, Nakajima Y, Nakano J, Yamamoto T, Horiuchi T, Hirai K, Ohta K: Platelet-derived growth factor is involved in the augmentation of airway responsiveness through remodeling of airways in diesel exhaust particulate-treated mice. *J Allergy Clin Immunol* 107:135-141, 2001