

は、卵白アルブミン(OA)と水酸化アルミニウムゲル(アラム)を用いて全身的に感作し、その後、抗原を反復曝露することにより喘息様病態形成が認められることを特徴としている。これらのモデルは、いわゆるTh2依存性の免疫反応の解明などに大きく寄与してきたが、近年の喘息患者数の増加およびその病態の難治化・重症化を解明する上で、臨床をより反映する動物モデルの確立が急務であると思われる。特に、感染や大気汚染などの喘息の難治化・重症化の原因を解明する上で、抗原性、抗原感作部位、アジュバントの使用などを考慮したモデル作成が重要である。

以上を鑑み、当研究室では平成17年度厚生労働科学研究を通じて、マウス気管内にダニ抗原(Der f)の抽出物を頻回投与することによりマウス喘息モデルを確立した。すなわち、アラムなどのアジュバントを使用せず、喘息の主要抗原であるダニ抗原を気道内に反復投与することにより喘息様病態形成が生ずることから、従来のモデルに比し臨床に近いモデルであると思われる。

一方、当講座では上述のOAモデルを用いた検討から、気道リモデリング形成、特に基底膜下の膠原線維の沈着には好酸球由来のTGF- β 1産生が重要であることを見出している。しかし、このOAモデルを用いた知見に普遍性があるか否かは不明である。また、ダニ抗原の気管内投与により生ずる喘息様病態形成の詳細は不明である。そこで本研究では、まず平成18年度研究として、ダニ抗原誘発喘息モデルにおける特異性を見出すため、Th2サイトカインの意義を各種遺伝子改変動物を用いて解析した。また、2年目の平成19年度はこのダニ抗原誘発マウス喘息モデルを用いて喘息様病態形成の難治化・重症化に及ぼす室外環境因子、特にディーゼル排気粒子(Diesel exhaust particle, DEP)の影響を検討した。すなわち、まず初めにDEPを抗原投与期間中に併用投与し、抗原による感作およびその後の喘息病態形成に及ぼす影響を検討した。次いで、抗原認識から感作成立までにDEPが及ぼす影響を初回抗原投与時にDEPを共存させることにより検討した。最後に、DEPがあらかじめ気道局所に存在している場合を想定し、DEPを抗原投与前および初回抗原投与時に投与し影響を検討した。さらに最終年度の平成20年度は、従前より疫学調査などで喘息の発症促進ならびに難治化因子として注目されているウィルス感染の影響を、二本鎖RNAであるpolyinosinic polycytidylic acid (poly IC)をマウス気管内に先行投与し、その後、極少量のダ

ニ抗原を投与することにより、その意義を検討した。

B. 研究方法

1) ダニ抗原気管内投与による喘息モデル

実験は、当教室のダニ抗原誘発マウス喘息モデルのプロトコールに従った(Wakahara et al, 2008)。すなわち、吸入麻酔下にてマウスの気管内に *Dermatophagoides farinae* (Der f)の抽出物を複数回投与して反応を惹起した。最終抗原投与48時間後に、アセチルコリンによる気道収縮反応を測定し、その直後に右肺は気管支肺胞洗浄(BAL)を行い、左肺は組織学的検討を行った。

2) DEP気管内投与による影響

今回用いたダニ抗原の用量は、それ自体でわずかに気道内好酸球増多が認められる程度の用量(低用量)とし、陽性対象としてダニ抗原単独投与で喘息様病態形成が確実な用量(高用量)も含めて検討した。一方、DEPの量に関しては、環境基準値の約1/2倍(30 μ g)、1.5倍(100 μ g)および5倍(300 μ g)換算量とした。DEPの投与は、以下のように行った。すなわち、抗原投与期間併用投与の検討では、抗原と同時に4回気管内投与した。抗原初回投与時併用投与の検討では、抗原と同時に初回抗原投与日および翌日のみ気管内投与した。抗原投与前および初回投与時併用投与の検討では、初回抗原投与2週間前、1週間前および初回抗原投与日の3日のみ気管内投与した。

3) ウィルス感染様刺激による影響

マウスの気管内に一本鎖RNAウィルスが増殖する際に産生する二本鎖RNAの模倣品であるpoly ICを投与した。その後、Der fの粗抽出物を複数回投与して反応を惹起した。なお、ダニ抗原の用量は、それ自体でわずかに気道内好酸球増多が認められる程度の用量とし、陽性対象としてダニ抗原単独投与で喘息様病態形成が確実な用量も含めて検討した。また、従来のダニ抗原単独による喘息様病態形成に及ぼすステロイドの影響に加え、ウィルス様刺激による喘息病態に及ぼす影響も検討した。すなわち、fluticasone propionate (FP)をダニ抗原による感作が成立し、好酸球が気道に認められる時期からダニ抗原投与の前後にFPを投与し、両モデルのステロイド反応性を比較検討した。

(倫理面への配慮)

本研究における実験動物の取り扱いならびに実験方法に関しては、本学バイオセーフティー委員会の承認を受け、その規約を遵守した。

C. 研究結果

1) ダニ抗原誘発マウス喘息モデルにおける気道炎症、気道過敏性ならびに気道リモデリング形成の発症機序 (Fig. 1 および 2)

ダニ抗原 (Der f) をマウスの気管内に頻回投与することにより、アセチルコリンに対する気道過敏性、BAL 液中好酸球増多、Th2 サイトカイン産生および TGF- β 1 産生量の増加ならびに気道上皮および基底膜下において気道リモデリング形成が観察された。これに対し、IL-4 遺伝子欠損 (KO) マウスでは、基底膜下の線維化形成以外のいずれのパラメーターも、野生型マウスに比し有意な低下が観察された。一方、IL-5 受容体 α 鎖 KO マウスでは、BAL 液中の好酸球は検出されなかったが、気道過敏性ならびに気道リモデリング形成など、いずれも野生型マウスと差は認められなかった。これに対し、IL-13 KO あるいは IL-4 受容体 α 鎖 KO マウスでは、いずれのパラメーターも有意な低下が観察された。

2) DEP 気管内投与による影響

○抗原投与期間併用投与の影響 (Fig. 3-6)

まず、抗原投与期間内に DEP を併用投与することにより、喘息様病態形成ならびに気道リモデリング形成における DEP の影響を検討した。その結果、抗原によって誘発される気道反応性の亢進、BALF 中好酸球数の増加、Th2 サイトカイン量の増加、Th1 サイトカイン量の減少、eotaxin 量の増加ならびに血清中抗原特異的 IgG1 値の上昇の用量依存的かつ有意な増強が認められた。また、ダニ抗原投与による BALF 中 TGF- β 1 量の増加、肺中の hydroxyproline 量 (コラーゲンの特異的構成アミノ酸) の増加、気道上皮の杯細胞の過増生・肥厚および基底膜下の膠原線維沈着量の増加についても、用量依存的な増強が認められた。これらの成績から、DEP はダニ抗原によって誘発される気道炎症ならびに気道リモデリング形成に対しアジュバント作用を示すことが明らかとなった。

○初回抗原投与時併用投与ならびに抗原投与前および初回投与時併用投与の影響

これまでの報告では DEP と抗原の併用投与による検討が多く、喘息病態発症以前および初期における DEP の影響については不明である。そこで、喘息病態発症初期における DEP の影響を検討する

目的で初回抗原投与時のみ併用投与した。さらに、喘息病態発症以前における DEP の影響を検討する目的で抗原投与以前に投与した。その結果、両検討とも DEP の併用によりダニ抗原によって誘発される気道炎症ならびに気道リモデリング形成の増強が認められた。さらに、回収した BALF 中には DEP が認められ、肺組織中にも DEP の沈着が観察された。

3) ウィルス感染様刺激による影響

ダニ抗原 (Der f) をマウスの気管内に頻回投与することにより、その用量に依存して気道過敏性、BAL 液中好酸球増多、Th2 サイトカイン産生および TGF- β 1 産生量の増加ならびに気道リモデリング形成が観察された。また、いずれの反応も FP の気管内投与により、有意に抑制された。一方、poly IC を先行投与し、その後、ダニ抗原を反復投与したモデルでは、ダニ抗原少量単独投与群に比し、気道過敏性、気道内好酸球増多、Th2 サイトカイン産生などがいずれも有意に増悪した。さらに、本反応は別の二本鎖 RNA である poly adenylic polyuridylic acid (poly AU) や一本鎖 RNA である polycytidylic acid (poly C) では再現できなかったことから、toll-like receptor (TLR) 3、retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) あるいは melanoma differentiation associated gene 5 (MDA-5) 等を介する二本鎖 RNA に特異的な反応であることも明らかとなった。一方、本モデルにおける表現系は、LPS の混入によって起こる喘息病態の増悪機序と類似性が高いため、TLR4 KO マウスを用いて同様の検討を行ったが、表現系には影響を及ぼさなかった。最後に、この二本鎖 RNA による喘息様病態形成の増悪モデルに対する FP の影響を検討したところ、FP は気道内好酸球増多ならびに BALF 中 IL-13 量の増加を有意に抑制したが、気道過敏性ならびに BALF 中マクロファージ、好中球およびリンパ球数の増加に対しては、ほとんど影響を及ぼさなかった。

D. 考察

1) ダニ抗原誘発マウス喘息モデルにおける気道炎症、気道過敏性ならびに気道リモデリング形成の発症機序

吸入ステロイド薬ならびに長時間作動性吸入 β 2 刺激薬の普及に伴い、気管支喘息患者の症状のコントロールにおいて、ある程度そ

これらの効果が認められているにもかかわらず、気管支喘息患者を含め、アレルギー疾患患者数は増加の一途を辿っている。この主要な原因として、遺伝的要因以上に環境要因が重要であると考えられており、特に室内環境抗原であるダニ抗原の重要性が指摘されている。

ダニ抗原については、これまでに *in vitro* の実験による解析により、その抗原性ならびに各種細胞に対する作用機序の一端が明らかにされてきたが、*in vivo* での検討は世界的にも十分に行われているとは言いがたい。従来モデル動物では、OA などの外来タンパク抗原とアラムのような、いわゆる Th2 誘導性のアジュバントを用いて全身感作し、その後、抗原を局所的に曝露する方法がとられ、この方法によってアレルギー反応の根底にある免疫反応の理解が進んだと思われる。しかし、実生活における抗原を用いた、より臨床に近いモデルによる検討は十分に行われていないのが現状である。そこで、初年度はダニ抗原をマウスの気管内に反復投与した際の変化を、特に Th2 サイトカインの意義を中心に解析し、これまでの OA を用いたマウス気道リモデリングモデルとの比較を試みた。

その結果、ダニ抗原反復曝露により生ずる気道過敏性、好酸球性気道炎症ならびに気道リモデリング形成も、OA 喘息モデルと同様に Th2 依存性の反応であることが明らかとなった。一方、OA モデルでは IL-5 受容体 α 鎖 KO マウスにおいて気道過敏性は全く観察されず、また、好酸球由来の TGF- β 1 が基底膜下の線維化形成に重要であったが、ダニモデルの場合、BAL 液中 TGF- β 1 産生量は野生型と差は認められず、また、基底膜下の線維化形成の程度もほぼ同等であったことから、ダニモデルでは好酸球の基底膜下の線維化形成における意義も小さいと思われる。これに対し、IL-13 ならびにその受容体である IL-4 受容体 α 鎖 KO マウスを用いた検討から、ダニモデルにおいても気道過敏性ならびに気道リモデリング形成など、喘息の重症化と関連する病態形成には IL-13 が特に重要であることが明らかとなった。

今後、KO マウスにおけるこれらの検討に加え、IL-13 中和抗体を用いて、治療的観点から検討を加える予定である。

2) DEP 気管内投与による影響

次年度の平成 19 年度研究では、ダニ抗原誘発マウス喘息モデルを用いて喘息様病態形成の難治化・重症化に及ぼす室外環境因子、特に DEP の影響を検討した。その結果、DEP と抗原の併用投与により、BALF 中好酸球数の増加の増強が認めら

れた。また、成熟好酸球の活性化およびまた前駆細胞の局所における分化、成熟、活性化に作用する IL-5 量の増加、さらに、前駆細胞および好酸球を刺激し、気道局所に遊走させる eotaxin 量の増加も認められた。この eotaxin は気道上皮細胞、平滑筋細胞および線維芽細胞から産生され、IL-4 および IL-13 のような Th2 サイトカインによって産生が増強される。本研究においても、これら Th2 サイトカイン量の増加が認められており、その結果として eotaxin 産生を増強させていると思われる。これまでに、ダニ抗原と DEP の併用気管内投与により肺組織中にケモカインである RANTES、eotaxin および GM-CSF タンパク量の増加が観察されることが報告されている。したがって、DEP による BALF 中好酸球増多の増強は Th2 サイトカインの産生増加およびそれに伴うケモカインの産生増強によるものと推察される。

本研究では、DEP によって気道過敏性の増強が観察された。これまでに、マウス喘息モデルを用いて、気道過敏性発症機序について様々な検討がなされているが、詳細に関しては明確になっていない。しかしながら、IL-4 KO マウス、IL-5 KO (受容体欠損も含む) マウスあるいは IL-13 KO では気道過敏性が発症しないことが確認されており、Th2 サイトカインが気道過敏性発症に主要な役割を担っていることが考えられる。したがって、本研究においても DEP による気道過敏性の増強は DEP と抗原の併用投与によるこれら Th2 サイトカイン産生量の増加による Th2 反応の増強が一因であると推察される。

また、DEP 併用によって抗原投与による気道リモデリング形成の増強が認められた。これまでに、*in vitro* においてヒト気道上皮細胞にディーゼル排気 (diesel exhaust: DE) を曝露すると TGF- β 1 の mRNA 発現の増強が認められ、さらに、この DE を DEP が通過できないフィルターに通し同様に曝露させると発現増強は認められないことが示されている。すなわち、DE のうち DEP などの粒子物質がその発現増強には重要であると思われる。したがって、本研究においても DEP が気道上皮に作用し TGF- β 1 mRNA 発現量を増加させ、さらに抗原投与による Th2 反応への傾きにより相乗的に TGF- β 1 産生量が増加したと推察される。また、BALF 中 TGF- β 1 量と基底膜下の線維化形成については、基礎および臨床研究の両面において高い相関が認められており、TGF- β 1 量の増加および Th2 依存性の気道

炎症の増強により線維化の増強が引き起こされたと推察される。

DEPのアレルギー疾患発症の亢進作用に関しては、DEPの含有成分であるピレンによるIL-4 mRNAの発現増強が認められており、さらにDEP投与によりIFN- γ 産生が抑制されることが報告されている。さらに、DEPは抗原と結合可能であり、その結果として、DEPが抗原のキャリアとして働いている可能性が示唆されている。したがって、DEPは前述のようにそれ自体で炎症を誘発するばかりでなく、抗原との併用により抗原性を高め、炎症反応を相乗的に増強していると考えられる。

しかしながら、本研究においてDEPを初回抗原投与時および抗原投与以前に投与し影響を検討したところ、DEPの抗原投与期間中の併用投与での表現型と同様の表現型が得られた。DEPの初回抗原投与時併用投与ならびに抗原投与前投与の検討は、DEP投与の30日後に各種の測定を行っており、DEPの炎症誘発作用による相乗効果のみで増強されたとは考えにくい。すなわち、初めて抗原が体内に侵入する際、あるいはそれ以前にDEPが存在することがこのアジュバント作用に重要であると考えられる。一方、DEP投与によりヒトにおいて抗原提示細胞上のCD80のmRNAの発現増強が報告されている。このCD80はT細胞上のCD28と高い親和性を持っており、相互作用によりT細胞に活性化シグナルを伝達し、サイトカイン産生を誘導する。したがって、本研究では、DEPが直接抗原提示細胞に作用し、アジュバント作用を示したとも考えられる。しかしながら、抗原提示におけるDEPの影響については不明な点が多く、今後、さらなる検討が必要であると思われる。

今後、このアジュバント作用の原因およびアジュバント作用の軽減を目的とし、さらに詳細に検討する必要があると思われる。

3) ウィルス感染様刺激による影響

乳幼児期のウィルス感染、特にRSウィルスならびにライノウィルス感染、が喘息発症ならびにその後の重症化・難治化の要因になりうることは古くから報告されてきたが、その詳細なメカニズムは不明であり、基礎研究レベルにおいても十分に検討されていないのが現状である。我々のモデルでは、一本鎖RNAウィルス感染によるウィルス複製時に産生・放出される二本鎖RNAに着目し、その模倣刺激であるpoly ICをマウスの気管内に先行投与することにより、実際のウィルス感染の再現を試みた。その結果、poly ICを抗原曝露前にマウスの気管内に投与することにより、極少量のダニ抗原投与による反応が有意に亢進し、ダニ抗原単独では認められないような気道過敏性、気

道内好酸球増多、気道リモデリング形成が観察された。本反応は、他の二本鎖RNAのpoly AUや一本鎖RNAのpoly Cによって再現できないことから、おそらくtoll-like receptors (TLRs)あるいは前述のRIG-IまたはMDA-5などの受容体を介して生じている可能性が高い。近年、細胞内受容体については、二本鎖RNAのうち鎖長が長いRNAはMDA-5に、鎖長が短いもの、または5'末端にリン酸基が3つ結合した構造を有するRNAはRIG-Iに認識される可能性が指摘されていることから、おそらく本反応もTLR-3あるいはMDA-5依存的な反応であると思われる。

一方、poly ICとダニ抗原による喘息様病態形成は、高用量のダニ抗原単独投与による病態とは、発症機序の点から異なる可能性を示唆する成績を得たため、ステロイドに対する反応性を両モデル間で比較検討したところ、ダニ抗原単独による気管内投与群では、FPにより気道過敏性ならびに各種炎症性細胞の気道局所への浸潤が抑制されたが、poly ICとダニ抗原による喘息モデルではFPは気道過敏性に対して影響を及ぼさず、また、BALF中炎症性細胞数の変化についても、好酸球の増加に対しては抑制作用を示したものの、マクロファージ・好中球・リンパ球数の増加に対しては影響を及ぼさなかった。従って、ウィルス感染が先行する場合には、その後の抗原曝露によって生ずる喘息様病態形成は、一部、ステロイド抵抗性を示す可能性が示唆され、近年、臨床において報告されている成績とも関連することから興味深い。今後は、poly ICの受容体の解明を始めとして、喘息様病態形成の増悪機序の解明と、ステロイド抵抗性の原因を探索する必要がある。

E. 結論

代表的な室内抗原であるダニ抗原を用いて、気管支喘息の難治化・重症化の一因である気道過敏性ならびに気道リモデリング形成におけるTh2サイトカインの意義を遺伝子改変マウスを用いて解析した結果、ダニ抗原(Der f)の気管内投与により生ずる気道過敏性、好酸球性気道炎症ならびに気道リモデリング形成は、いずれもTh2依存性の反応であることが示唆された。一方、本モデルにおいては、IL-5は気道内好酸球増多には重要であるが、気道過敏性ならびに気道リモデリング

形成にはその関与は少ないものと思われた。これに対し、ダニモデルにおいても、従来の OA モデルと同様に、気道過敏性ならびに気道リモデリング形成など、喘息の重症化と関連する病態形成には IL-13 が特に重要であることが明らかとなった。

代表的な室内抗原であるダニ抗原を用いて、気管支喘息の難治化・重症化の一因である気道過敏性ならびに気道リモデリング形成における室外環境因子である DEP の影響を検討した。その結果、ダニ抗原 (*Der f*) の気管内投与により生ずる気道過敏性、好酸球性気道炎症ならびに気道リモデリング形成は、抗原投与期間中、初回投与時ならびに抗原投与前に DEP を併用投与することにより、気道炎症および気道リモデリング形成の増強が認められた。すなわち、DEP が主要な室内抗原であるダニ抗原によって生ずる喘息様病態形成の増悪因子であり、気管支喘息の難治化・重症化の要因であることが示唆された。

喘息発症ならびに難治化の危険因子であるウイルス感染による影響を検討するため、二本鎖 RNA を用いて先行感染による喘息難治化への影響を検討したところ、ウイルス感染様刺激の先行投与により、通常、ダニ抗原単独では病態形成が認められない極少量のダニ抗原投与によっても、気道過敏性・気道リモデリング形成が観察された。また、この病態は、一部、ステロイド抵抗性を示すことから、ウイルス感染様刺激もダニ抗原によって生ずる喘息様病態形成の増悪因子であり、気管支喘息の難治化・重症化の要因であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文

- 1) Kawakami Y, Inagaki N, Salek-Ardakani S, Kitaura J, Tanaka H, Nagao K, Kawakami Y, Xiao W, Nagai H, Croft M, Kawakami T: Regulation of dendritic cell maturation and function by Bruton's tyrosine kinase via IL-10 and Stat3. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 153-158
- 2) Takayama G, Arima K, Kanaji T, Toda S, Tanaka H, Shoji S, McKenzie AN, Nagai H, Hotokebuchi T, Izuhara K: Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 98-104
- 3) Okamoto N, Murata T, Tamai H, Tanaka H, Nagai H: Effects of alpha tocopherol and probucol supplements on allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in a mouse model of allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 141: 172-180
- 4) Kimata M, Ishizaki M, Tanaka H, Nagai H, Inagaki N: Production of matrix metalloproteinases in human cultured mast cells: involvement of protein kinase C-mitogen activated protein kinase kinase-extracellular signal-regulated kinase pathway. *Allergol Int* 2006; 55: 67-76
- 5) Akabane H, Murata M, Kubota M, Takashima E, Tanaka H, Inagaki N, Horiba M, Nagai H. Effects of salmeterol xinafoate and fluticasone propionate on immunological activation of human cultured mast cells. *Allergol Int* 2006; 55: 387-393
- 6) Wakahara K, Tanaka H, Takahashi G, Tamari M, Nasu R, Toyohara T, Takano H, Saito S, Inagaki N, Shimokata K, Nagai H. Repeated instillations of *Dermatophagoides farinae* into the airways can induce Th2-dependent airway hyperresponsiveness, eosinophilia and remodeling in mice. *Eur J Pharmacol* 2008; 578: 87-96
- 7) Wirotasangthong M, Inagaki N, Tanaka H, Thanakijcharoenpath W, Nagai H. Inhibitory effects of *Piper betle* on production of allergic mediators by bone marrow-derived mast cells and lung epithelial cells. *Int Immunopharmacol* 2008; 8: 453-457
- 8) Hirose I, Tanaka H, Takahashi G, Wakahara K, Tamari M, Sakamoto T, Kojima S, Inagaki N, Nagai. Immunomodulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides on house dust mite-induced airway inflammation in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 147: 6-16
- 9) Nakao I, Kanaji S, Ohta S, Matsushima H, Arima K, Yuyama N, Yamaya M, Nakayama K, Kubo H, Watanabe M, Sagara H, Sugiyama K, Tanaka H, Toda S, Hayashi H, Inoue H, Hoshino T, Nakajima A, Inoue M, Suzuki K, Aizawa H, Okinami S, Nagai H,

Hasegawa M, Fukuda T, Green ED, Izuhara K. Identification of pendrin as a common mediator for mucus production in bronchial asthma and chronic obstruction pulmonary disease. *J Immunol* 2008; 80: 6262-6269

- 10) Ishizaki M, Tanaka H, Kajiwara D, Toyohara T, Wakahara K, Inagaki N, Nagai H. Nafamostat mesilate, a potent serine protease inhibitor, inhibits airway eosinophilic inflammation and airway epithelial remodeling in a murine model of allergic asthma. *J Pharmacol Sci* 2008; 108: 355-363

2. 総説

- 1) 田中宏幸, 稲垣直樹, 永井博式: 気道リモデリングと好酸球-マウスモデルを用いた検討一. 炎症と免疫 14; 31-37: 2006.
- 2) 田中宏幸, 稲垣直樹, 永井博式: マウス喘息モデルによる気道リモデリングの解析. アレルギー科 21; 542-548: 2006.
- 3) 田中宏幸, 稲垣直樹, 永井博式: 喘息とトロンボキサン_{A₂}. 喘息 19; 35-40: 2006.
- 4) 田中宏幸, 稲垣直樹, 永井博式: 脂質メディエーターと気管支喘息. 呼吸 25; 944-949: 2006.
- 5) 田中宏幸, 永井博式. 気道過敏性. 喘息, 2007; 20: 21-26.
- 6) 田中宏幸, 稲垣直樹, 永井博式. マウス喘息モデルの有用性とその限界. 喘息, 2007; 20: 32-37.
- 7) 坂田 孝, 宮本樹美代, 田中宏幸, 稲垣直樹, 永井博式. ダニ抗原誘発気道炎症モデルへのフローサイトメトリー法の適用検討. アレルギーの臨床, 2007; 27: 61-65.
- 8) Nagai H, Tanaka H, Inagaki N, Teramachi H, Tsuchiya T: Possible role of prostaglandins in allergic inflammation. *Clin. Exp. Allergy Rev.* 2007; 7: 32-35.

3. 学会発表

- 1) 田中宏幸, 稲垣直樹, 永井博式: マウス喘息モデルを用いた気道リモデリング発症機序の解析. 第56回日本アレルギー学会総会 イブニングシンポジウム 8 (2006年11月, 東京)
- 2) Tanaka H: House dust mite-induced airway inflammation, hyperresponsiveness and remodeling in mice. 第56回日本アレルギー学会総会 Young Seminar 4 (2006年11月, 東京)

3) 橋本末樹子, 田中宏幸, 高橋 剛, 若原恵子, 那須礼史, 広瀬 泉, 高津聖志, 稲垣直樹, 永井博式: ダニ抗原誘発マウス気道炎症における Th2 サイトカインの意義 (1). 第56回日本アレルギー学会総会 一般演題 385 (2006年11月, 東京)

4) 三好康介, 田中宏幸, 高橋 剛, 若原恵子, 那須礼史, 広瀬 泉, 出原賢治, McKenzie ANJ, 稲垣直樹, 永井博式: ダニ抗原誘発マウス気道炎症における Th2 サイトカインの意義 (2). 第56回日本アレルギー学会総会 一般演題 386 (2006年11月, 東京)

5) 柳楽庸史, 田中宏幸, 三好康介, 橋本末樹子, 江崎友哉, 松本次郎, 稲垣直樹, 永井博式: アレルギー性気道炎症における protease-activated receptor (PAR)2 の意義. 第57回日本アレルギー学会総会 ミニシンポジウム MS10-7 (2007年11月, 横浜)

6) 橋本末樹子, 高橋 剛, 田中宏幸, 三好康介, 永平和広, 寺川真紀, 稲垣直樹, 永井博式: SCP200401 のアレルギー性気道炎症に及ぼす影響. 第57回日本アレルギー学会総会 一般演題 173 (2007年11月, 横浜)

7) 三好康介, 田中宏幸, 橋本末樹子, 江崎友哉, 柳楽庸史, 平井博之, 永田欽也, 中村正孝, 稲垣直樹, 永井博式: ダニ抗原誘発マウス気道炎症における CRTH2 の意義. 第57回日本アレルギー学会総会 一般演題 177 (2007年11月, 横浜)

8) 江崎友哉, 田中宏幸, 三好康介, 橋本末樹子, 柳楽庸史, 平井博之, 永田欽也, 中村正孝, 稲垣直樹, 永井博式: ダニ抗原誘発マウス気道炎症における CRTH2 の意義. 第57回日本アレルギー学会総会 一般演題 178 (2007年11月, 横浜)

9) 田中宏幸, 稲垣直樹, 永井博式: アレルギー性炎症におけるリモデリングのメカニズム. 第58回日本アレルギー学会総会 特別シンポジウム 3 (2008年11月, 東京)

10) 田中宏幸, 稲垣直樹, 永井博式: 実験喘息の立場から. 第58回日本アレルギー学会総会 シンポジウム 1 (2008年11月, 東京)

11) 柳楽庸史, 田中宏幸, 江崎友哉, 三好康介, 稲垣直樹, 永井博式: ダニ抗原誘発マウス気道炎症の解析 (1) 第58回日本アレルギー学会総会 ミニシンポジウム 6-5 (2008年11月, 東京)

12) 梶原 悠、田中宏幸、江崎友哉、柳楽庸史、村田健司、三好康介、稲垣直樹、永井博弐：ダニ本アレルギー学会総会 一般演題 43 (2008年11月、東京)

13) 江崎友哉、田中宏幸、柳楽庸史、三好康介、稲垣直樹、永井博弐：ダニ抗原誘発マウス気道炎症の解析 (3) 第 58 回日本アレルギー学会総会 一般演題 178 (2008年11月、東京)

抗原誘発マウス気道炎症の解析 (2) 第 58 回日

14) 村田健司、田中宏幸、東 明香、稲垣直樹、永井博弐：マウス骨髄由来肥満細胞 (BMMC) からの IgE 依存性ヒスタミン遊離に及ぼす prostaglandin D₂ (PGD₂) の影響. 第 58 回日本アレルギー学会総会 一般演題 52 (2008年11月、東京)

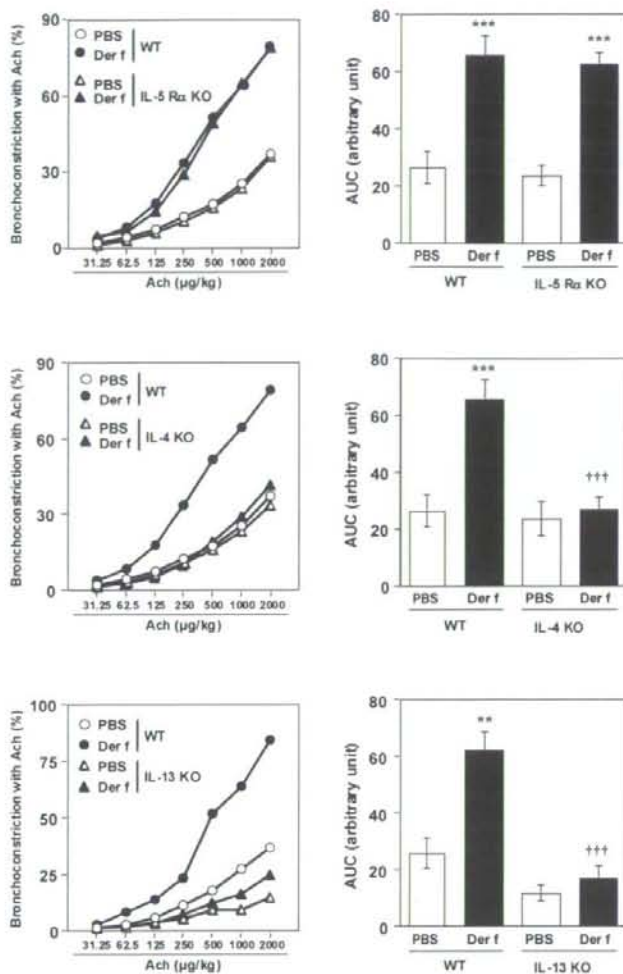


Fig. 1 Effect of IL-5 receptor α ($R\alpha$) chain, IL-4 and IL-13 deficiency on the allergen-induced airway hyperresponsiveness to acetylcholine (Ach) in BALB/c mice. Forty-eight h after the final allergen instillation, the airway responsiveness to Ach was measured. Values are represented as the means or means \pm S.E.M. of 4-9 mice in each group. AUC, area under the curve (range: 31.25-2000 μ g/kg); Der f, *Dermatophagoides farinae* instilled; KO, knockout; PBS, phosphate-buffered saline-instilled; WT, wild-type.

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (vs PBS, Student's t -test or Mann-Whitney's U -test);

††† $p < 0.001$ (vs WT, Student's t -test or Mann-Whitney's U -test).

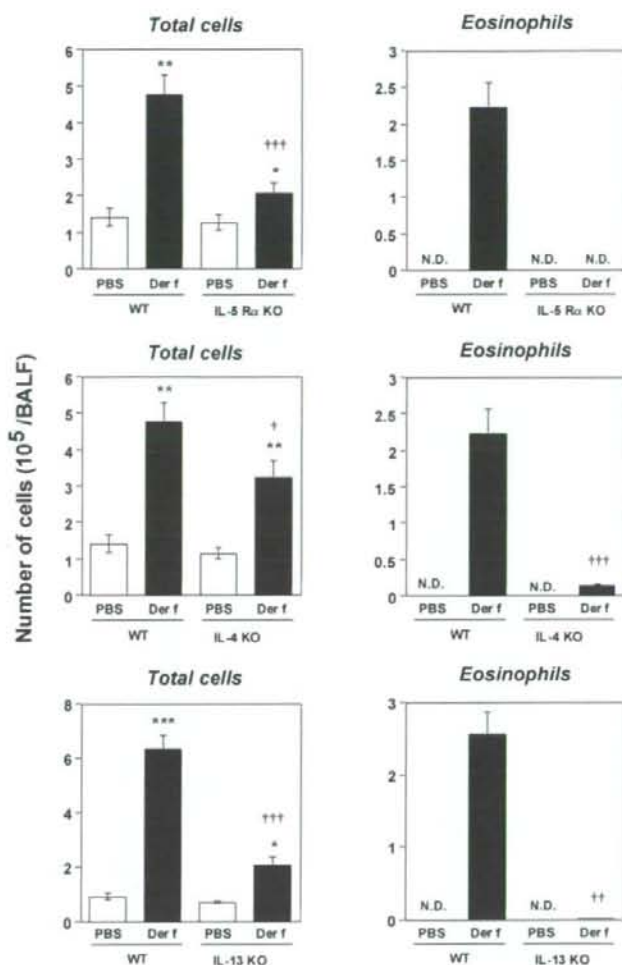


Fig. 2 Effect of IL-5 receptor α ($R\alpha$) chain, IL-4 and IL-13 deficiency on the allergen-induced increases in the numbers of total leukocytes and eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in BALB/c mice.

Forty-eight h after the final allergen instillation, bronchoalveolar lavage was carried out. Values are represented as the means \pm S.E.M. of 4-9 mice in each group. Der f, *Dermatophagoides farinae* instilled; KO, knockout; N.D., not detected; PBS, phosphate-buffered saline instilled; WT, wild-type.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (vs PBS, Student's t -test or Mann-Whitney's U -test);

† $p < 0.05$, ††† $p < 0.001$ (vs WT, Student's t -test or Mann-Whitney's U -test).

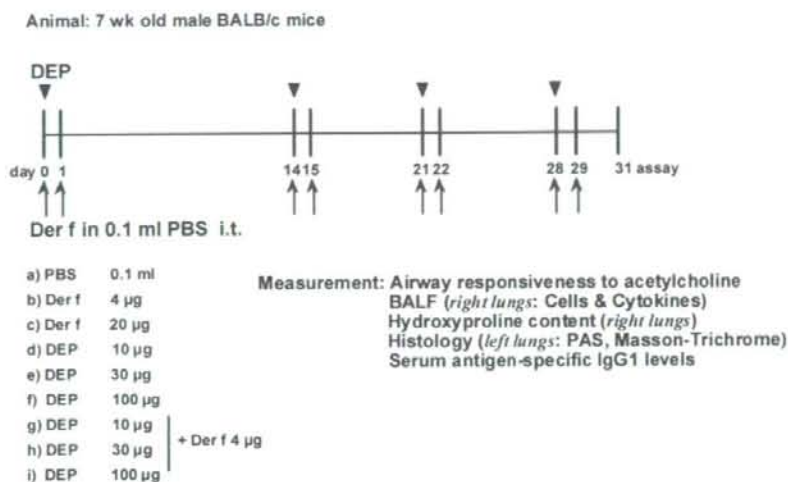


Fig. 3 Experimental protocol for antigen-induced airway inflammation and airway remodeling in BALB/c mice.

BALF, bronchoalveolar lavage fluid; DEP, diesel exhaust particles; Der f, *Dermatophagoides farinae*; i.t., intratracheal injection; PAS, periodic acid-Schiff; PBS, phosphate-buffered saline

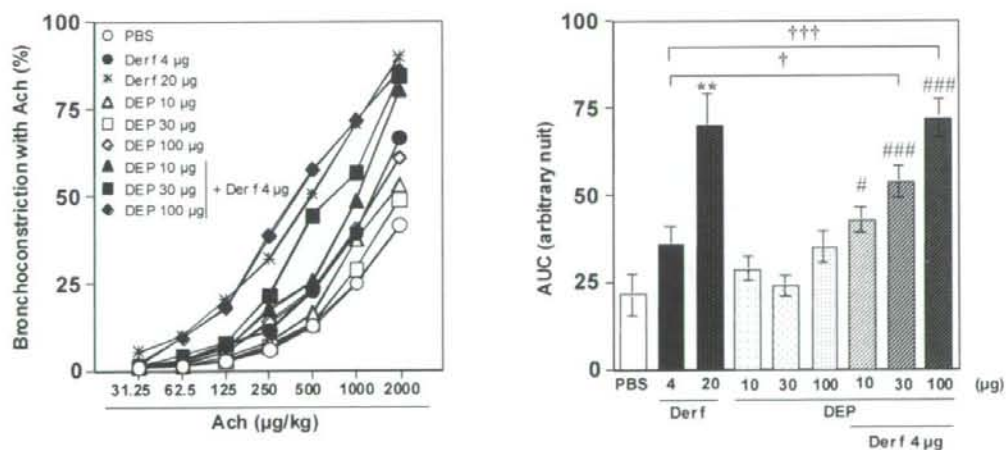


Fig. 4 Effect of DEP on airway hyperresponsiveness to acetylcholine (Ach) after repeated antigen challenge in BALB/c mice. Bronchoconstriction was measured by the modified method of Konzett & Rössler. Results were represented as the means or means \pm S.E.M. of 8-9 mice.

AUC, area under the curve (range: 31.25-2000 mg/kg); DEP, diesel exhaust particles; Der f, *Dermatophagoides farinae*; PBS, phosphate-buffered saline

** p < 0.01 (vs PBS: Dunnett's multiple comparison test)

†, ††† p < 0.05, 0.001 (vs Der f 4 mg: Dunnett's multiple comparison test)

#, ### p < 0.05, 0.001 (vs DEP: Student's t test)

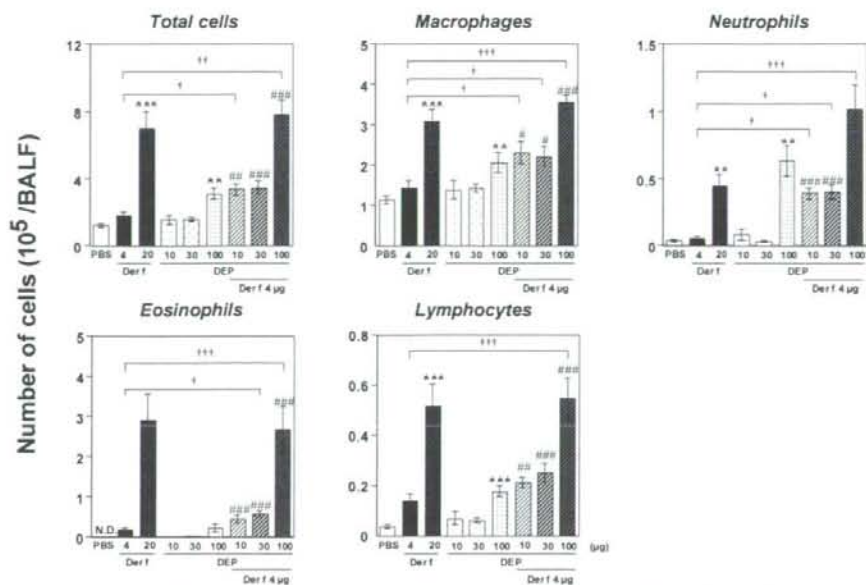


Fig. 5 Effect of DEP on leukocytes accumulation in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) after repeated antigen challenge in BALB/c mice. Results were represented as the means \pm S.E.M. of 8-9 mice. DEP, diesel exhaust particles; Der f, *Dermatophagoides farinae*; N.D., not detected; PBS, phosphate-buffered saline

** , ***: $p < 0.01, 0.001$ (vs PBS: Dunnett's multiple comparison test)

†, ††, †††: $p < 0.05, 0.01, 0.001$ (vs Der f 4 mg: Dunnett's multiple comparison test)

#, ##, ###: $p < 0.05, 0.01, 0.001$ (vs DEP : Student's t -test or Mann-Whitney U -test)

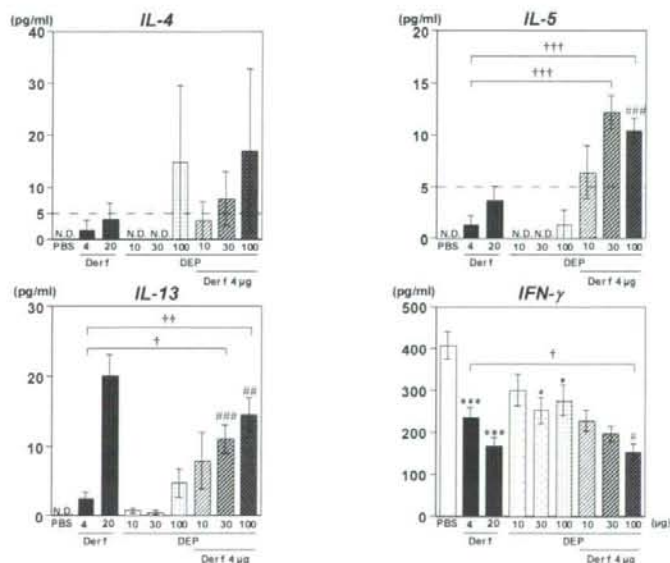


Fig. 6 Effect of DEP on cytokine production in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) after repeated antigen challenge in BALB/c mice. Results were represented as the means \pm S.E.M. of 8-9 mice. Dotted line meant the minimum detectable dose.

DEP, diesel exhaust particles; Der f, *Dermatophagoides farinae*; N.D., not detected; PBS, phosphate-buffered saline

* , ***: $p < 0.01, 0.001$ (vs PBS: Dunnett's multiple comparison test)

†, ††, †††: $p < 0.05, 0.01, 0.001$ (vs Der f 4 mg: Dunnett's multiple comparison test)

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
（総合）研究報告書

環境中化学物質の気管支喘息の重症化への影響と抗アレルギーフィルターの開発

研究分担者 中村 裕之 金沢大学医薬保健研究域医学系環境生態医学・公衆衛生学教授

研究要旨 近年の文明国におけるアレルギー性疾患の増加の背景には、大気汚染をはじめとする環境中の化学物質に対する暴露機会の増加が指摘されている。さらには気管支喘息症の増悪因子としても化学物質が関与することが考えられる。本研究では水道水および環境中の自動車排出物質（Diesel exhaust particulate, DEP）のアレルギーへの影響をin vitroにおいて系統的に評価し、さらにその影響を予防するための化学物質除去を目的とした非晶鉄および活性炭を含む除去フィルターを新たに開発し、その予防効果を検証した。水道水抽出物は、有意にIL-1誘導MCP-1産生を抑制した。一方、水道水を活性炭処理すると、MCF-7細胞におけるIL-1誘導MCP-1産生が有意に回復した。また、このフィルターでDEPを含む水をろ過し、アレルギーモデルマウスに投与し、気管支喘息の予防効果および軽減効果を検証した。DEPによって著しい杯細胞の過増生・浮腫部位への好酸球浸潤が観察されるが、フィルター処理によって杯細胞の過増生・好酸球浸潤、好中球浸潤が抑制され、肺の炎症が抑制されていることがわかった。またDEPはp38MAPK経路の活性化を通じて、好酸球細胞の遊走能の増加を、またNF κ Bの活性化を通じて、好酸球のMCP-1の産生、IL-8産生を増加させた。したがってDEPは好中球、マクロファージ、好酸球の浸潤を過剰に促進させることにより、炎症の拡大を引き起こしていることが推測された。またBiwaエキスは、DEPによるアレルギー反応の増強を抑制することがin vivoの実験で示された。以上から、水道水および大気中にはアレルギー反応を促進する化学物質が含まれていることが示された。それが新たに開発されたフィルターおよびBiwaエキスによって除去できたことから、喘息の重症化の予防に本フィルターおよびBiwaエキスが有効であることが示唆された。

研究協力者 人見嘉哲（金沢大学医薬保健研究域医学系准教授）、櫻井克年（高知大学農学部教授）、
康峪梅（高知大学農学部准教授）、秋丸国広、弘田量二（高知大学医学部助教）、
菅沼成文（高知大学医学部教授）、田中宏幸（岐阜薬科大学准教授）、
日下幸則（福井大学医学部教授）、烏帽子田 彰（広島大学医歯薬総合研究科教授）

A. 研究目的

近年の文明国におけるアレルギー性疾患の増加の背景には、大気汚染をはじめとする環境中の化学物質に対する暴露機会の増加が指摘されている。さらには、気管支喘息症の増悪因子としても化学物質が関与することが考えられることから、化学物質における免疫毒性やアレルギー発症への影響を調べることは急務である。本研究では環境中の化学物質のアレルギーへの影響をin vitroおよびin vivoにおいて系統的に評価し、さらにその影響を予防するためのフィルターを開発し、その予防効果を検証した。またBiwaエキスの予防効果を検証した。

B. 研究方法

1. 水道水およびフィルター実験

1) In vitro研究

内在性エストロゲン除去処理をしたMCF-7細胞に試験試料添加、IL-1で刺激後3日間培養し、培地中産生されたchemoattractant protein -1 (MCP-1, CCL2)濃度をサンドイッチELISA法で測定した。自動車排出物質（Diesel exhaust particulate, DEP）抽出物存在下、2日間培養後の上清のサイトカインをRayBio Human Cytokine Array III kitで測定した。DEP抽出物の好酸球遊走能への影響について調べた。同時に化学物質

除去を目的として非晶鉄および活性炭を含む除去フィルターを新たに開発した。このフィルターでDEPを含む水をろ過し、サイトカインおよび好酸球遊走能を調べた。

2) In vivo研究

化学物質除去を目的として非晶鉄および活性炭を含む除去フィルターを新たに開発した。このフィルターでDEPを含む水をろ過し、アレルギーモデルマウスに投与し、気管支喘息の予防効果および軽減効果を検証した。マウス1グループ6匹に対して、DEPに関して(-)、(+)、フィルターに関して(-)、(+)の4群作成し、週2回合計10回、カニューレによる経気道的に投与(1回投与量;ダニ抗原4 μ g、DEP62.5 μ g、総液量0.1ml)した。DEPフィルター溶液については、1250 μ g/mlのDEP 15mlを本フィルター45cm²でろ過した(図1)。

2. DEP実験

0.03%のDEP存在下、10ng/mL IL-1存在下、もしくは両方を含まない(定常状態)の3実験区を作製し、RPMI1640培養液中で好酸球様HL-60#clone15細胞株を37 $^{\circ}$ C、1.5%CO₂下で72時間培養した。

0.1mg/mLDEP存在下、非存在下において4時間培養した好酸球様HL-60#clone15細胞から核内タンパク質を精製し、NF- κ Bの測定を行った。

好酸球様HL-60#clone15細胞を5nM MG132存在下もしくは非存在下において37 $^{\circ}$ C60分ブレインキューベ

ーション後、0.1mg/mLDEP存在下もしくは非存在下において37 $^{\circ}$ C24時間培養した。遠心して培養上清を得、MCP-1をELISA法で測定した。

5mMのNAC存在下もしくは非存在下で37 $^{\circ}$ C60分ブレインキューベート後、0.1mg/mLDEP存在下、非存在下の組み合わせで37 $^{\circ}$ C60分インキュベートした好酸球様HL-60#clone15細胞(1x10⁷cells/mL)に、100ng/mLとなるように Eotxinを添加し、ケモタキシスチャンバーで遊走能測定を行った。またp38 MAP kinase活性をATF-2タンパクのリン酸化能で測定した。

Biwaエキスの気管支喘息の予防効果を調べるために、DEPPを含む水およびBiwaエキスをアレルギーモデルマウスに投与した。すなわちマウス1グループ6匹に対して、DEPに関して(-)、(+)、Biwaエキスに関して(-)、(+)の4群を作成し、週2回合計10回、カニューレによる経気道的に投与(1回投与量;ダニ抗原4 μ g、DEP62.5 μ g、総液量0.1ml)した。DEPフィルター溶液については、1250 μ g/mlのDEP 15mlを本フィルター45cm²でろ過した(図1)。全血の特異的IgG1抗体価、培養した脾細胞におけるIL-13値、TGF- β 1値、気管支洗浄液中の好酸球を評価した。



図1 DEPによるアレルギー反応と化学物質除去フィルターによる抑制作用を検証するダニ抗原誘発マウスモデルの実験デザイン

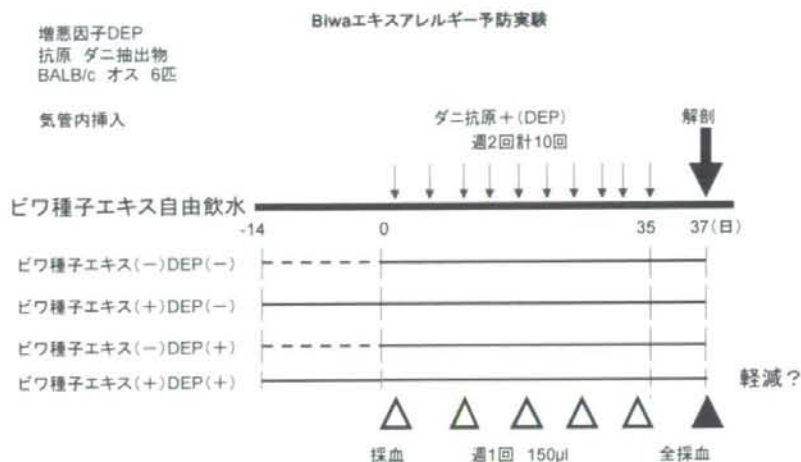


図2 DEPによるアレルギー反応とBiwaエキスによる抑制作用を検証するダニ抗原誘発マウスモデルの実験デザイン

本動物実験は、「高知大学医学部動物実験委員会」の承認を得て、「高知大学医学部動物実験指針」に従って行った。

C. 研究結果

1. 水道水およびフィルター実験

水道水抽出物は、有意にIL-1誘導MCP-1産生を抑制した。一方、水道水を活性炭処理すると、MCF-7細胞におけるIL-1誘導MCP-1産生が有意に回復した(図3)。

In vivo では、DEP投与によって杯細胞の過増生・浮腫部位への好酸球浸潤が著しく観察されるが、フィルター処理によって杯細胞の過増生の抑制、好酸球浸潤、好中球浸潤も抑制され、肺の炎症が抑制されていることがわかった。ダニ抗原特異的IgG1抗体価も有意に下がった(図4)。これらの結果、DEPによって生じるダニ抽出物誘導の感作・肺胞への好酸球浸潤・脾臓細胞からの抗原誘導Th2サイトカイン産生の増加が、有意に抑制され、本フィルターの抗アレルギー効果が実証された。

2. DEP実験

1) DEPによる好酸球様HL-60#clone15細胞株の

MCP-1、IL-8産生増強効果

DEP・IL-1非存在下(図5a、左)、DEP存在下(図5a、中)、IL-1存在下(図5a、右)いずれにおいてもIL-8、MCP-1の産生が認められた。DEP存在下で

は、MCP-1産生量は、定常状態と比べて1.9倍、IL-8産生量は、1.1倍、IL-1存在下では、それぞれ2.2倍、1.5倍であった(図5、B)。

2) DEP濃度依存的MCP-1産生の増加

MCP-1産生に与えるDEPの影響を0、0.03~1mg/mLまで5濃度検討したところ、0.1mg/mLまでは、濃度依存的にMCP-1産生量は増加し、それ以上の濃度では、細胞毒性が表れMCP-1産生量が減少した。MCP-1産生はControlと比較して最高で6.5倍増加した。

3) DEPによるNF-κBの活性化

核内タンパク質1μgあたりのNFκB活性を図6に示した。P65 NFκBに対する特異性は、consensus配列に対するDNA(Wild)との競合反応によって確認した。その結果、DEP存在下では、非存在下に比べて活性型NFκBが1.4倍に増加していた。

4) MG132により阻害されたMCP-1産生

DEP存在下ではMCP-1産生が増加したが、MG132添加によりMCP-1産生の有意な低下が認められた(図7)。

5) DEPによりup regulateされた好酸球様

HL-60#clone15細胞の遊走能

DEP添加では、controlと比べて有意な遊走能の上昇が認められた(p<0.05)。また、NACの添加により遊走能は有意(p<0.05)に低下した(図8)。

6) DEPにより活性化されたp38 MAP kinase

(Thr180/Thr182)活性

Control と比べてDEP添加細胞では、明らかなバンドの増強が認められた。また、NAC添加した細胞では、バンドの明らかな減弱が認められた。NACおよびDEP添加細胞においても明らかなバンドの減弱が認められた (図9)。

ピワエキス投与マウスでは、DEPによって増加した全血の特異的IgG1抗体価、培養した脾細胞におけるIL-13値、TGF- β 1値の有意な減少が認められた (図7)。

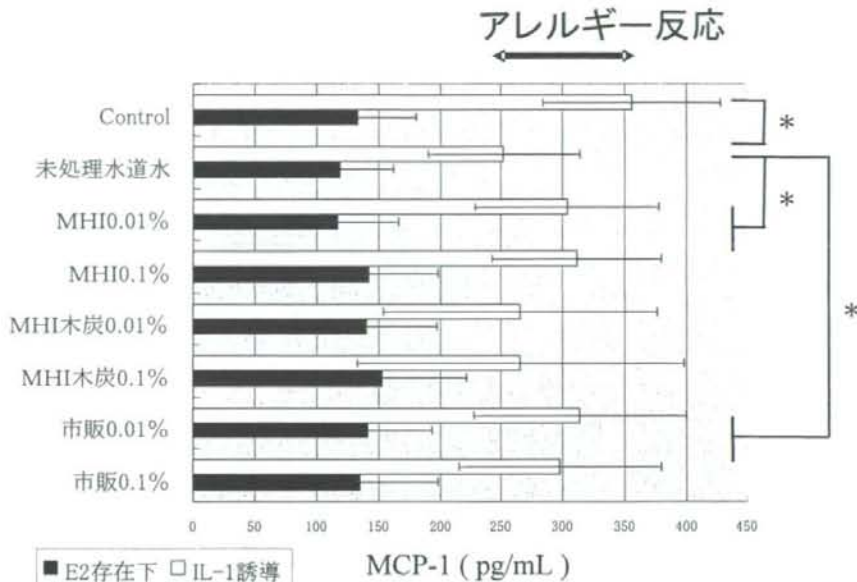


図3 超純粋(control)に比較したときの水道水によるIL-1誘導MCP-1産生の抑制と活性炭(MHI)による reversal効果

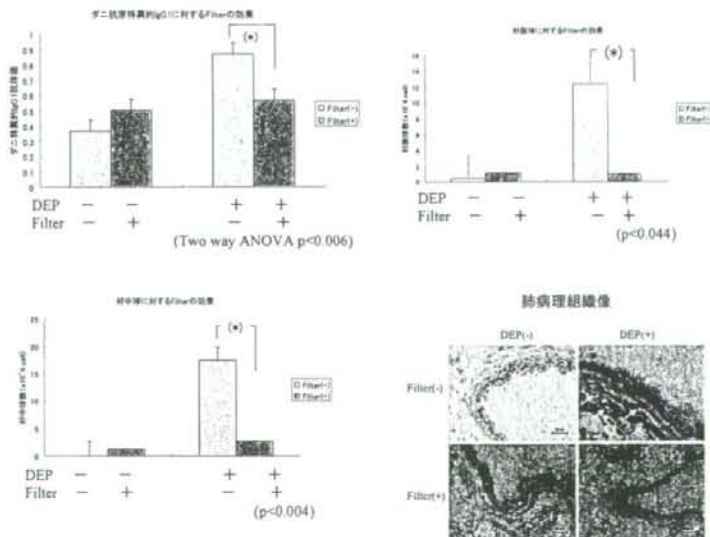
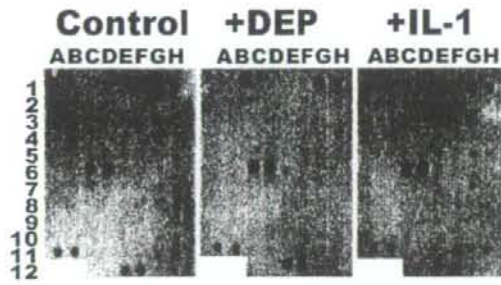


図4 ダニ抗原およびDEPによるダニ抗原特異的IgG1抗体価と、肺組織における好酸球浸潤(b)、好中球浸潤、肺病理への影響

(A)



(B)

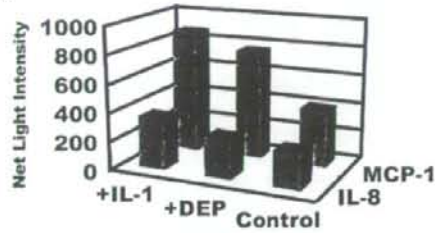


図5 DEPによる好酸球様HL-60#clone15細胞株のMCP-1、IL-8産生増強効果

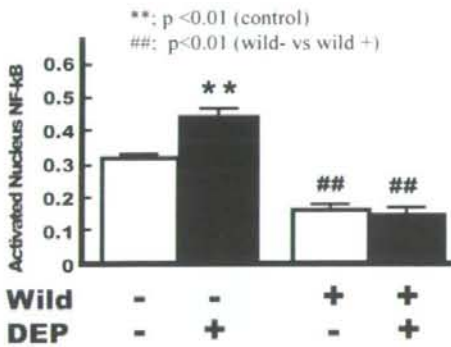


図6 DEPによるNF-κBの活性化

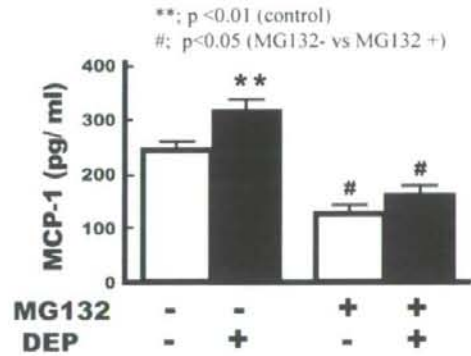


図7 MG132により阻害されたMCP-1産生

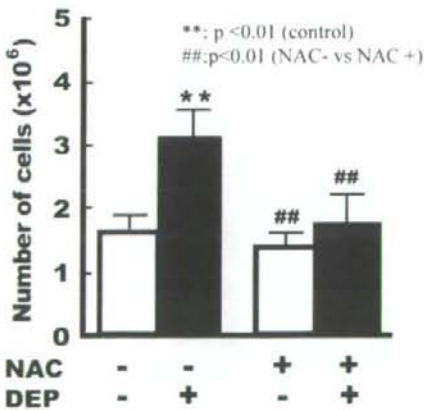


図8 DEPにより up regulateされた好酸球様HL-60#clone15細胞の遊走能

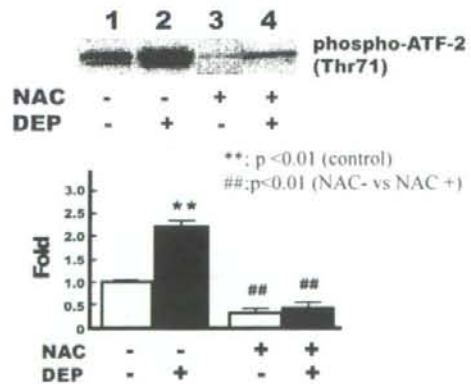


図9 DEPにより活性化された p 38 MAP kinase (Thr180/Thr182)活性

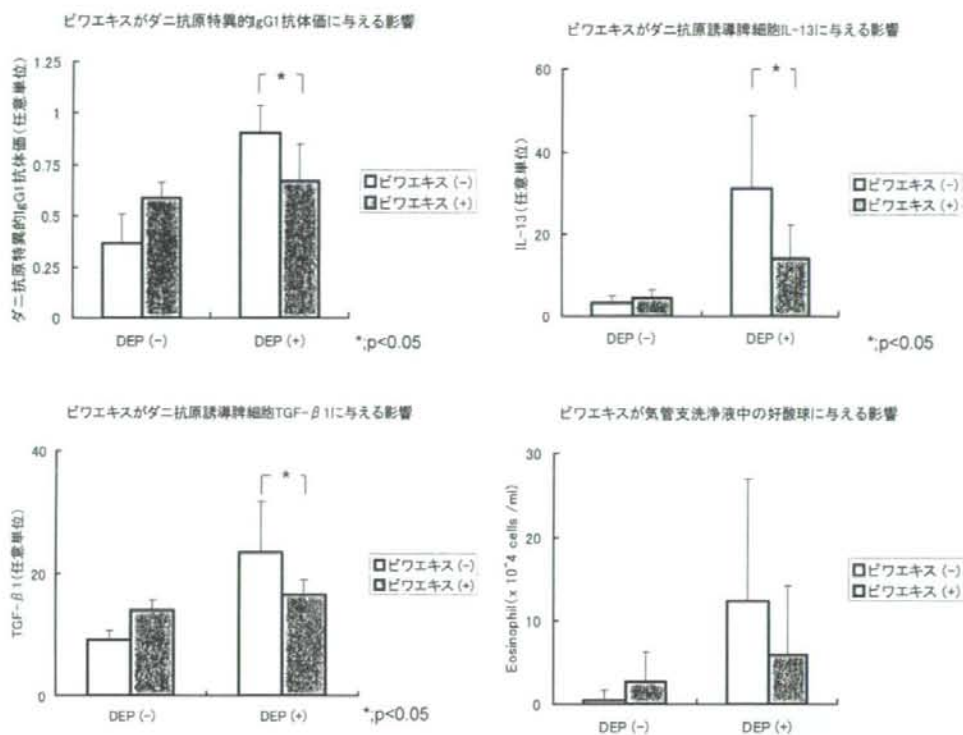


図10 ダニ抗原誘発マウスモデルにおけるDEPによるアレルギー反応（特異的IgG1抗体価、IL-13値、TGF- β 1値、気管支洗浄液中の好酸球）とBiwaエキスによる抑制作用

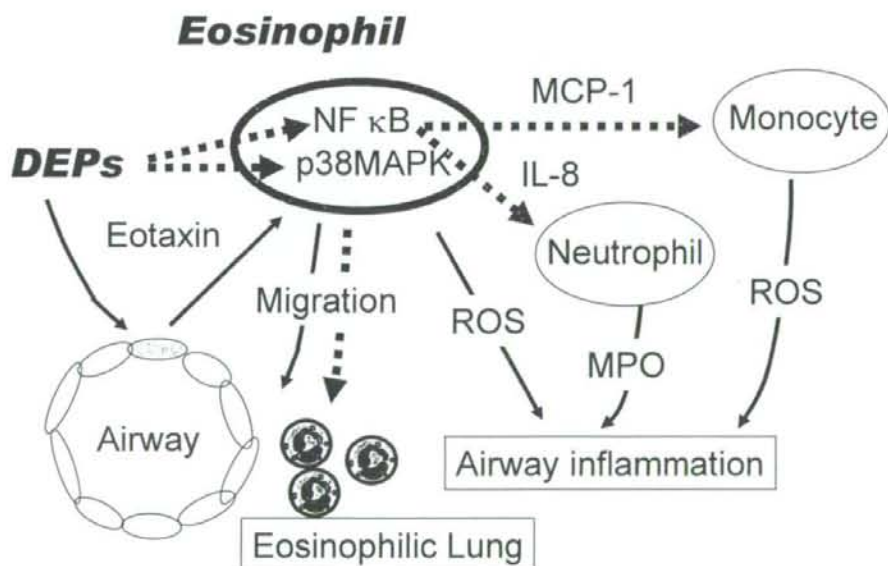


図11 DEPによる気管支喘息の増悪における機序

D. 考察

水道水のIn vitroの実験で指標として用いられたMCP-1は、炎症に伴い単球・マクロファージの炎症部位への動員に関与するケモカインであり、Th2細胞への分化を抑制する作用がある。その産生量が水道水中物質によって低下したことは、水道水中にはアレルギー疾患発症に関係する化合物が含まれていることを示唆している。

水道水のIn vivoの結果、DEPによって生じるダニ抽出物誘導の感作・肺胞への好酸球浸潤・脾臓細胞からの抗原誘導Th2サイトカイン産生の増加が、有意に抑制され、本フィルターの抗アレルギー効果が実証された。

DEPがなぜ気管支喘息を起こすのかという明確な答えはいまだ得られておらず、気管支喘息の特徴である好酸球の気管支上皮での増多の機序についてもいまだ解明されていない。今回の検討では、DEPがIL-1存在下において好酸球様細胞株HL-60 clone#15のIL-8およびMCP-1の産生を増強し、NF- κ Bの活性化を促してMCP-1産生を増強していることがわかった。MCP-1は、CCケモカインに属するケモカインであり、単球・マクロファージの遊走・浸潤に必須であり(Cavaillon 1994)、IL-8は好中球の遊走に必要である。また、DEPは、P38 MAP kinaseを活性化することで、好酸球の走化性を向上させていることも明らかになった。

このことは、DEPによる気管支の炎症の後期において、好酸球が好中球やマクロファージの動員に関わり、集積したこれらの細胞が分泌したエオタキシンによりさらに好酸球を動員して、さらに炎症を拡大している機序が示されたものと考えられた。これはヒト末梢血リンパ球にDEPを暴露するとIL-8、MCP-1、RANTESのmRNA発現が上昇することや(Fahy, Hammad et al. 2000)、気管支上皮細胞のEotaxin mRNAレベルの上昇(Takizawa, Abe et al. 2003)やICAM-1産生が増強されること(Takizawa, Abe et al. 2000)、鼻粘膜細胞のヒスタミンmRNAの上昇を引き起こすこと(Terada, Hamano et al. 1999)などから、DEPによって好中球や好酸球、マクロファージ等が炎症部位へ集積すると同時に、炎症を起こした細胞からも炎症性サイトカインやケミカルメディエーターが放出されることで炎症が拡大していくものと考

えられている。

このIL-8やMCP-1産生の増加はMitogen-activated protein (MAP) kinaseのantagonistにより阻害されること(Fahy, Hammad et al. 2000)から、DEPはMAP kinase経路の活性化を通して炎症を拡大するものと考えられている。一方、DEPは、気管支上皮細胞のNF- κ Bの活性化を活性化し、IL-8産生を増強し好中球遊走を促すと同時に、抗菌性ペプチドであるbeta-defensin2の産生も誘導しており(Nam, Ahn et al. 2006)、生体内に取り込まれたDEPを細菌感染の防御系で修復・排除を試みていると思われる。さらに、未酸化のDEPが、ネズミ骨髄由来dendritic cellsの抗原特異的T細胞のIFN- γ の減少やIL-10の増加を引き起こし、nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2)-related factor 2-mediated signaling pathwayを活性化し、IL-12産生を阻害するので(Chan, Wang et al. 2006)、DEPはTh1分化を抑制しTh2分化への移行に関わっていると考えられている。

このようにDEPは、他のアレルギーの増悪因子として働き(Davies, Rusznak et al. 1998) (Salvi, Frew et al. 1999)、(Fahy, Hammad et al. 2000)、(van Zijverden and Granum 2000)この微粒子を含む汚染された大気に長期間暴露されたのちに花粉やハウスダストのような免疫源に暴露されると、細胞性免疫はIgE産生にむかう(Kanoh, Suzuki et al. 1996)と推測されている。

以上により、図11の如く、DEPが気管支喘息を増悪する機序が考えられる。DEPが、好酸球遊走因子であるエオタキシンで活性化されたヒト好酸球培養細胞のp38 MAPK経路の活性化を通じてさらに好酸球遊走を活発にすること、DEPがNuclear Factor kappa B(NF- κ B)経路を活性化することで、マクロファージ遊走因子(MCP-1)やインターロイキン-8(IL-8)の発現を強くすることによって気管支喘息の重症化がもたらされるということが想定された。このようにアレルギー促進物質としてのDEPが肺への好酸球浸潤やマクロファージ・好中球浸潤に中心的役割を果たしている可能性が示唆された。

またBiwaエキスをマウスへ投与を行ったところ、DEPによって促進されたアレルギー反応が有意に抑制された。このように、ピワ種子エキス投与マウスでは、気管支喘息の重症化の予防効果が期待される。今後の研究においては、ピワ種子エキスの有効成分

について明らかにされなければならない。

E. 結論

DEPはp38MAPK経路の活性化を通じて、好酸球細胞の遊走能の増加を、またNF- κ Bの活性化を通じて、好酸球のMCP-1の産生、IL-8産生を増加させた。したがってDEPは好中球、マクロファージ、好酸球の浸潤を過剰に促進させることにより、炎症の拡大を引き起こしていると推測された。またBiwaエキスは、DEPによるアレルギー反応の増強を抑制することがin vivoの実験で示された。したがって、気管支喘息の重症化を抑制できることが示唆された。

水道水および大気中にはアレルギー反応を促進する化学物質が含まれていることが示された。それが新たに開発されたフィルターおよびBiwaエキスによって抑制できることが示されたことから、喘息の重症化の予防に本フィルターおよびBiwaエキスが有効であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

(原著)

(1) Nakamura H, Higashikawa F, Nobukuni Y, Miyagawa K, Endo T, Imai T, Hatta K, Ozasa K, Motohashi Y, Matsuzaki I, Sasahara S, Ogino K, Akimaru K, Eboshida A
Genotypes and haplotypes of CCR2 and CCR3 genes in Japanese cedar pollinosis.
Int Arch Allergy Immunol. 2007;142(4):329-334

(2) Matsuzaki I, Sagara T, Ohshita Y, Nagase H, Ogino K, Eboshida A, Sasahara S, Nakamura H
Psychological factors including sense of coherence and some lifestyles are related to General Health Questionnaire-12 (GHQ-12) in elderly workers in Japan
Environ Health Prev Med. 2007; 12(2): 71-77.

(3) Yoshino S, Sasahara S, Maeno T, Kitaoka-Higashiguchi K, Tomotsune Y, Taniguchi K, Tomita E, Usami K, Haoka T, Nakamura H, Matsuzaki I
Relationship between mental health of Japanese residents and the quality of medical service.
J Phys Fit Nutri Immunol. 2007; 7 (1): 3-11.

(4) Hatta K, Miyakawa K, Ota T, Usui C, Nakamura H, Arai H.

Maximal response to electroconvulsive therapy for the treatment of catatonic symptoms.
J ECT. 2007 Dec;23(4):233-235.

(5) Hatta K, Shibata N, Ota T, Usui C, Ito M, Nakamura H, Arai H

Association between Physical Restraint and Drug-Induced Liver Injury.

Neuropsychobiology. 2008 Mar 7;56(4):180-184.

(6) Hirota R, Akimaru K, Nakamura H

In vitro toxicity evaluation of diesel exhaust particles on human eosinophilic cell.

Toxicology in Vitro 2008 Jun;22(4):988-994.

(7) Hatta K, Nakamura H, Usui C, Kobayashi T, Kamijo K, Hirata T, Awata S, Kishi Y, Arai H, Kurosawa H

Medical and psychiatric comorbidity at psychiatric beds in general hospitals: a cross-sectional study in Tokyo.

Psychiat Clin Neurosciences(in press)

(8) Kimura T, Yokoyama A, Kohno N, Nakamura H, Eboshida A

Perceived stress, severity of asthma, and quality of life in young adults with asthma

Allergology Int (in press)

2. 学会発表

(シンポジウム)

(1) 中村裕之、弘田量二、秋丸国広、菅沼成文、康峪梅、櫻井克年

環境化学物質によるアレルギー発症を予防する
第6回グリーンサイエンス特別研究プロジェクト公開シンポジウム、2008年3月、高知

(2) 神林康弘、中村裕之、柴田亜樹、林宏一
能登半島地震被災後に仮設住宅で暮らす高齢者の実状と健康問題に対する対策

第77回日本衛生学会総会、2008年3月、熊本

(3) 日比野由利、関塚真美
能登半島地震からみた妊産婦への支援体制

第77回日本衛生学会総会、2008年3月、熊本

(4) 中村裕之、弘田量二、鳥帽子田彰
環境とアレルギーー環境中化学物質によるアレルギー

一発症機序の解明と予防一

第58回日本アレルギー学会秋季学術大会、2008年11月、東京

(5) 中村裕之、弘田量二、菅沼成文、康嶋梅、櫻井克年

アレルギー発症予防用環境中化学物質除去フィルターの開発

第1回高知大学東京シンポジウム「グリーンサイエンスからの発言」、2009年1月、東京

(6) 中村裕之

アレルギーを予防する

第1回金沢大学未来開拓研究公開シンポジウム「病気を予防するための食と運動と環境」、2009年1月、金沢

(一般発表)

(1) 神林康弘、Nguyen Thanh Binh、人見嘉哲、日比野由利、中村裕之、荻野景規

簡便な血漿総抗酸化能測定法の開発

第29回日本フリーラジカル学会学術集会、日本過酸化脂質・フリーラジカル学会第31回大会合同学会、2007年6月、名古屋

(2) 神林康弘、人見嘉哲、日比野由利、中村裕之、荻野景規

好酸球活性化マーカーであるプロモチロシンに対する抗体の作成

第17回体力・栄養・免疫学会、2007年8月、東京

(3) 日比野由利、神林康弘、人見嘉哲、中村裕之、弘田量二、秋丸国広、永野靖典、石田健司、谷俊一
三世代ふれあい健診による小・中学生の共感性の変化と健康観・向社会的活動

第26回日本思春期学会総会、2007年8月、東京

(4) 日比野由利、秋丸国広、弘田量二、人見嘉哲、神林康弘、中村裕之

児童の共感性の発達および生活態度・身体計測値と関連性 - 三世代健診データから

第66回日本公衆衛生学会総会、2007年10月、松山

(5) 神林康弘、Nguyen Thanh Binh、人見嘉哲、日比野由利、中村裕之、荻野景規

マイクロプレートを用いた血漿総抗酸化能測定系 (TEAC) の開発

第7回分子予防環境医学研究会、2007年10月、北九州

(6) Kimura T, Yokoyama A, Nakamura H, Kohno N, Eboshida A.

Perceived Stress and Quality of Life among Japanese Adults with Asthma. (Poster)

ISOQOL 14th Annual Conference, Oct/2007 (Toronto)

(7) 神林康弘、人見嘉哲、日比野由利、中村裕之、荻野景規

好酸球活性化マーカーである (ジ) プロモチロシンを認識する抗体の作成

第5回日本予防医学会学術総会、2007年11月、指宿

(8) 人見嘉哲、木崎節子、櫻井拓也、小笠原準悦、武政徹、神林康弘、日比野由利、中村裕之、白土健、今泉和彦、芳賀脩光、大野秀樹

カルシニューリン制御タンパク Rcn1 による骨格筋活動のモニター

文部科学省学術フロンティア研究プロジェクト「ライフステージに応じた健康増進と多様性保持」第2回研究会、2007年12月、所沢

(9) 神林康弘、中村裕之

能登半島地震による仮設住宅に住む高齢者の長期的な健康被害を予防する調査研究

金沢大学能登半島地震学術調査部会第2回報告会、2008年3月、金沢

(10) 日比野由利、中村裕之

妊産婦への健康影響と支援体制

金沢大学能登半島地震学術調査部会第2回報告会、2008年3月、金沢

G. 知的所有権の取得状況

1) 特許取得

(1) 特許出願「アレルギー発症源の除去方法」

中村裕之、秋丸国広、特願 2006-084133

(2) 特許出願「アレルギー発症予防用フィルター」

中村裕之 他、特願 2008-60431

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし