

2009 34040 A

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

重症・難治性喘息の病因・病態の解明に関する研究

(H21-免疫-一般-004)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森 晶夫

平成22(2010)年4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 重症・難治性喘息の病因・病態の解明に関する研究 ————— 1  
森 晶夫

### II. 分担研究報告

1. 重症・難治性喘息の病因・病態の解明に関する研究 ————— 13  
森 晶夫
2. 重症難治性喘息の機序解明と臨床分類に基づく治療法の確立に関する研究 —— 22  
高橋 清
3. 喘息死患者の気道リモデリングと炎症細胞の解析に関する研究 ————— 27  
相澤久道
4. 難治性喘息におけるリモデリング形成機序の解明に関する研究 ————— 38  
庄司俊輔
5. 難治性好酸球性炎症の発症メカニズム解明による  
気管支喘息の重症化予防に関する研究 ————— 41  
藤澤隆夫
6. 好塩基球を対象とした重症・難治性喘息の病因・病態の解明に関する研究 —— 45  
大田 健
7. マウス喘息モデルを用いた難治化・重症化因子の探索  
ーダニ抗原誘発マウス喘息様病態形成に及ぼすウイルス感染様刺激の影響 —— 50  
田中宏幸
8. 気管支喘息症の重症度に関連する酸化ストレス応答遺伝子と環境との  
相互作用機能 ————— 53  
烏帽子田 彰
9. 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 ————— 57  
中村裕之

# I. 総括研究報告

## 重症・難治性喘息の病因・病態の解明に関する研究

研究代表者 森 晶夫

独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター部長

### 研究分担者

高橋 清（独）国立病院機構南岡山医療センター院長） 庄司俊輔（独）国立病院機構東京病院臨床研究部長）  
相沢久道（久留米大学医学部第一内科教授） 藤澤隆夫（独）国立病院機構三重病院臨床研究部長）  
大田 健（帝京大学医学部内科教授） 烏帽子田彰（広島大学公衆衛生学講座教授）  
中村裕之（金沢大学医学部医学科環境医学教室教授） 田中宏幸（岐阜薬科大学機能分子学大講座准教授）

### 研究協力者

秋山一男（国立病院機構相模原病院院長・臨床研究センター長） 北村紀子（同センター研究員）  
安部暁美（同センターリサーチレジデント） 山口美也子（同センター研究員）  
神沼修（東京都臨床医学総合研究所主任研究員） 大友隆之（東京薬科大学総合医療薬学助教）  
宗田 良（国立病院機構南岡山医療センター副院長） 岡田千春（同センター診療部長）  
木村五郎（同センターアレルギー科） 平野 淳（同センターアレルギー科）  
片岡幹男（岡山大学大学院保健学研究科）  
金廣有彦（岡山大学医学部歯学部附属病院血液・腫瘍・呼吸器内科） 谷本 安（同講師）  
岡元孝二（九州工業大学大学院生命体工学研究科教授） 西原麻千子（同大学院生）  
平口雪子（三重大学大学院病態解明医学講座成育医学分野） 細木興重（同左）  
星野友昭（久留米大学呼吸器・神経・膠原病内科講師） 川山智隆（同内科講師）  
木下隆（同上助教） 坂崎優樹（同左大学院生）  
武井仁子（同上大学院生） 澤田昌典（同左大学院生）  
小田華子（同上大学院生）  
山口正雄（帝京大学医学部内科学講座准教授） 稲垣直樹（岐阜薬科大学機能分子学大講座教授）  
人見嘉哲（金沢大学医学系研究科准教授）  
櫻井克年（高知大学農学部教授） 康峪梅（同准教授）  
秋丸国広（高知大学医学部助教） 弘田量二（同助教）  
菅沼成文（高知大学医学部教授） 日下幸則（福井大学医学部教授）

### 研究要旨

喘息診療ガイドラインや吸入ステロイドの普及により、軽症～中等症患者の QOL は大いに向上したものの、重症喘息患者はその恩恵に与っていない。約 1 割の重症者に対する支出が喘息全体の過半を占めることは医療経済学的課題とされる。当班研究では、難治性喘息の今日的診断基準の開発、現時点の実態、病態、治療内容の把握を行い、重症喘息には、長期間のリモデリング蓄積が関与する群（従来説）に加え、発症後短期間に重症化するステロイド抵抗性を特徴とする群が存在することを指摘した。メカニズム面の研究では、高用量ステロイド投与下でも持続する強い炎症の存在を示し、costimulatory signal とサイトカインによるステロイド抵抗性の誘導を証明した。加えて、重症喘息の大部分を占める非アトピー型喘息の機序として、IgE 非依存性、T 細胞依存性の気道閉塞メカニズムを発見した。リモデリングの観点からは、細胞外マトリクスと気道平滑筋細胞の相互作用、新たな好酸球活性化シグナルを見出してきた。これらの難治化関連分子の制御異常とリモデリング、気道過敏性の関連について詳細に分子レベルで明らかにし、治療・予防法として成果の結実をめざす。今年度の本研究班の成果によって、1) 治療抵抗性の気流閉塞は重症喘息の主要徴候であるが、そのメカニズムとして、IgE を介さない T 細胞依存性の気流閉塞の制御が重要と考えられること、2) 非アトピー機序による気道閉塞メカニズムの解明に向け、クローン化 T 細胞移入によるマウス実験喘息系が確立できたこと、3) 呼気 NO

が重症化抑制指標の一つとなりうること、4) ヒト好塩基球は抗原提示細胞として喘息病態に関与する可能性があること、5) 喘息死には、気道リモデリング、好酸球、IL-18 産生 CD8 陽性 T 細胞が関与すること、6) 好酸球は細菌に対する生物活性発現を通して、喘息重症化に関わる可能性があること、7) 低レベルの抗原刺激が好塩基球の機能増強を介して重症化病態に関与しうること、8) 62、56、42 kDa の 3 種のプロテアーゼが気管支平滑筋細胞の遊走、リモデリングに寄与すること、9) 先行するウイルス感染による喘息病態の増悪には、CD8 T 細胞およびLTB<sub>4</sub>が関与すること、10) NQO1 の遺伝子多型および喫煙と GSTM1 の遺伝子多型との相互作用が喘息重症化に関与すること、11) 非晶質鉄フィルターと活性炭フィルターを組み合わせて構成されている開発中の本フィルターは喘息重症化を予防できる可能性があること、等を明らかにした。

## A. 研究目的

喘息診療においては、近年のガイドラインの普及、吸入ステロイドを代表とする薬物療法の進歩により、比較的軽症な症例に対しては十分な予後・QOLの向上がもたらされた。一方、重症患者に対する治療効果は十分な水準に達していないことが、国内のAIRJ、海外のGOAL study等によって明らかにされた。特に、経口ステロイド薬を常時使用するステロイド依存性の重症喘息患者は、喘息死の予備軍とも位置づけられ、必ずしも近年の治療成績向上の恩恵には浴していないこと、頻回の救急受診・長期入院・社会不適応を理由とする直接・間接の医療費に占める比重の高いことが指摘されている。医療経済的には約1割の重症喘息に対する支出が喘息全体の過半を占めることが解決すべき課題である。喘息の重症化、難治化の病態・発症機序を解明し、治療・予防法を確立することができれば、年間数千人の喘息死を未然に防止するのみならず、喘息を理由に家庭や社会から疎外されている患者、患者家族のQOLを改善し、なお増大しつつある医療費の削減にもつながることが期待される。

われわれは、前年度までの厚生労働科学研究の成果として、難治性喘息の今日的診断基準を提唱し、ステロイド依存性喘息100症例の登録調査の実施によって、現在の我が国における重症喘息の実態、病態、治療内容を把握してきた。同時期の米国 NIH の大規模研究 SARP (Severe Asthma Research Program) study<sup>1)</sup>、欧州 12 カ国共同研究の ENFUMOSA (European Network For Understanding Mechanisms Of Severe Asthma) study<sup>3)</sup>が、重症喘息 250 例、163 例を登録しており、ステロイド依存性喘息はそのうちの約3割との事実を考慮すると、われわれの調査の意義は大きいものと考えられる。喘息の重症・難治化の要因について、以前は、早期介入の失敗によって長年の間に高度のリモデリングが蓄積された結果と認識されてきたが、この調査によって始めて、重症喘息の半数が喘息発症1~2年以内にステロイド依存状態に陥っており、これら相当数の重症喘息の機序は、発症時から通常の喘息と異なっていることが示唆された。メカニズムの観点からは、

高用量のステロイド使用にもかかわらず、高度の炎症反応が持続していることが明らかになった。重症・難治化の分子生物学的要因の解明は、予防、治療への突破口と期待される。T細胞レベルのステロイド抵抗性は、炎症局所での costimulatory シグナルとサイトカインにより誘導され、PI-3 kinase 依存性であることを見いだしてきたので、さらに本研究では、治療応用に向けて CTLA4-Ig (ORENCIA®、CD28 とそのリガンドである CD80、CD86 との結合を競合し阻害する薬物) による costimulatory シグナル阻害および近年合成された特異的PI-3 kinase 阻害剤のステロイド感受性回復効果を *in vitro*、*in vivo*で検証し、臨床応用への突破口としたい。難治化に関連する好酸球過剰活性化、平滑筋細胞を主体とした気道リモデリング、T細胞の細胞性免疫応答の異常についても、重症例の炎症細胞 (T細胞、好酸球、気道上皮細胞、平滑筋細胞) における、細胞表面分子、シグナル伝達分子、サイトカイン遺伝子転写機構の異常の詳細を分子レベルで特定する。*in vitro*の実験と平行して、わが国のアレルギーモデル研究で最先端に位置する研究グループの手で、*in vivo*でのステロイド低応答性、気道過敏性、リモデリングの責任分子を検証する。加えて、重症化関連遺伝子多型を複数見い出してきたので、診断法として確立し、早期発見、予知、予防への応用をめざす。喘息を特徴づける好酸球性炎症、粘膜組織リモデリングはアレルギー疾患全般に共通するプロセスであり、喘息の重症化因子が、アレルギー性鼻炎、結膜炎、花粉症など他のアレルギー疾患の慢性化、治療抵抗性因子と共通することは臨床医学的に想定され、本研究の成果はアレルギー学全般に波及するものと期待される。ステロイドの効果不全をきたす分子機構の解明は、難治性喘息および他のステロイド抵抗性の難治性炎症疾患 (リウマチ、SLE、自己免疫性血管炎等) の病因・治療ターゲットの解明に道をひらくもので医学的意義が大きい。

## B. 方法

1) 森 (主任研究者) らは、ヒト気管支平滑筋細胞

(Cambrex 社) をコンフルエント条件に培養し、コーゲンゲルに封入アプライした後、サンプルをアプライし、収縮を経時的に記録、解析した。*Candida albicans* acid protease (Secreted aspartic proteinase 2: SAP2) に反応して IgE 非依存性に遅発型喘息反応が惹起される非アトピー型喘息症例より、末梢血単核球(PBMC)を得、SAP2 と培養し、上清を回収後、濃縮、透析、保存した。

2) 既報の如く Balb/c マウスを OVA で感作し、所属リンパ節より感作リンパ球を回収、*in vitro* での抗原刺激、limiting dilution を行って、OVA 特異的 Th clone を樹立した (Kaminuma O. et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 16:448, 1997)。OVA 特異的 T 細胞受容体の transgenic である D011.10 マウスからも同様の手法で Th clone を樹立した。Irradiated spleen cell を antigen-presenting cell とし、subcloning を行い、さらに expansion し、細胞移入実験に使用した。5 x 10<sup>6</sup> 個の Th clone を無処置マウスに尾静脈より注入し (Day 0)、翌日 OVA あるいは OVA 部分ペプチド (P<sub>323-339</sub>) を経気道的に抗原チャレンジした。経時的に気道抵抗を BUXCO 社製非拘束下呼吸解析装置により測定した。さらに 48 hr 後、BUXCO にてメサコリン気道反応性を測定、気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、細胞数、分画を測定した。加えて、実験群によっては、麻酔下にレスピレータ装着し、気道抵抗解析装置にてモニターした。

3) 高橋 (南岡山医療センター) らは、呼気 NO 濃度を測定し、症状ステップ、治療ステップ、試案の難治基準 (PSL 5mg 以上/日) との関連を検討した。末梢血から比重遠心法により単核球を分離し、IL-3 の存在下、非存在下で培養し、CD203c 陽性分画 (好塩基球分画) における HLA-DR、CD80、CD86 の発現を検討した。

4) 相沢 (久留米大学) らは、喘息死 12 例、コントロール 10 例の肺病理組織を用い、CD4、CD8 陽性 T 細胞の IL-18 産生を 2 重免疫染色法で解析した。

5) 藤澤 (三重病院) らは、CD16 negative selection により分離した好酸球を用い、加熱処理細菌を各種濃度で添加し、好酸球からの活性酸素産生、EDN 遊離、サイトカイン産生、indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) を定量した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて免疫染色による形態観察も行った。

6) 大田 (帝京大学内科) らは、ヒト末梢血から好塩基球を分離し、抗原あるいは IgE や Fc ε RI を架橋する抗体試薬による刺激と炎症性サイトカイン MCP-1 などの刺激を加え、活性化状態の変化を解析した。

7) 庄司 (東京病院) らは、無血清 DMEM にて正常ヒト気管支平滑筋細胞 (Lonza 社) を培養した上清を濃縮、電気泳動した後、転写膜へ転写・ボンソー S 染色し、

62 及び 57kDa の蛋白質バンドを切り出して N 端配列解析を行った。

8) 田中 (岐阜薬大) らは、二本鎖 RNA の poly IC を先行投与し、吸入麻酔下のダニ粗抗原気管内投与により感作する、アジュバント free 喘息モデルにおいて、抗 CD8 抗体、BLT1 受容体拮抗薬を投与した。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。

9) 烏帽子田 (広島大学) らは、重症喘息として JGL98 Step 4 の 15 例、軽症として Step 1-2 の 30 例、健常者 50 例を対象に、NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) と Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) の遺伝子多型につき、患者対照研究 (相関解析) を実施した。

10) 中村 (金沢大学) らは、A549 細胞へ自動車排出物質 (Diesel exhaust particulate, DEP) 抽出物、その成分の芳香族炭化水素 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) ナフタレン、フルオレン、フェナントレン、フルオランテン、ベンゾ (a) アントラセン、ベンゾ (a) ピレン、p-ニトロフェノールベンゾを添加し、産生された Interleukin-8 (IL8) 濃度をサンドイッチ ELISA 法で測定した。喘息モデルに、これらの物質を気管内投与し、好酸球、好中球浸潤と気道過敏性を評価した。DEP を含む水を、非晶鉄、活性炭を含む除去フィルターでろ過し、PAHs を GC/MS にて測定した。

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮として、患者を対象とする調査、検査において、また、ヒト由来の細胞、組織等の試料を用いる場合には、ヘルシンキ宣言を遵守するとともに、わが国のヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)、疫学研究に関する倫理指針 (平成 19 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号)、臨床研究に関する倫理指針 (平成 20 年厚生労働省告示第 415 号) を遵守した。インフォームドコンセントを徹底するとともに、症例はコード化し、プライバシーの保護に万全を期した。実施に先立って各研究者の施設ごとに倫理委員会の承認を得たうえで、倫理規定に従って実施した。実験動物を使用する場合、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18 年 6 月 1 日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知) 及び研究者の施設における動物実験に関する倫理規定を遵守した。実験間のばらつきを考慮した上で、統計学的有意性を議論する最小例数を算出し、その使用数を決定し、動物を保定、施術お

よび致死させる場合は、最も苦痛を与えない方法を事前に検討した。

#### C. 結果およびD. 考察

1) ヒスタミン、メサコリン、ロイコトリエンを含む既知の収縮物質と異なるヒト気管支平滑筋収縮活性を産生するT細胞クローンを樹立した。クローンの培養上清を濃縮、分画し、銀染にて数バンドまで精製を進めた。

2) Th cloneの移入、抗原チャレンジによって、T細胞がエフェクター相において直接気流閉塞を惹起するモデルを初めて確立した。好酸球ノックアウトの影響がないことから、本モデルにおけるLARと好酸球性炎症とは直接関連しないことが明らかになった。

3) 呼気NOは、治療下においても健常人に比べて高値で、症状Step別では、Step4群において最も高かった。治療Step別では、差はなかった。症状Step1の症例では、治療Step4a群で高値であった。呼気NOは治療下での喘息コントロール状態を反映する。末梢血好塩基球は、IL-3との24時間培養によりCD203c、HLA-DRの発現が増強し、抗原提示能を有する可能性が示唆された。

4) 喘息死症例で、細気管支への著明な炎症細胞浸潤、平滑筋の肥大、分泌腺過形成を伴った著明な気道リモデリング、粘液栓による気道の閉塞を認めた。CD4陽性T細胞は軽症喘息と同等に健常人より増加していた。CD8陽性T細胞は軽症喘息に比べ著明に増加しており、CD4/CD8比0.4と著明な低下を認めた。CD8T細胞はIL-18産生陽性であった。

5) 好酸球は高病原性の *Clostridium difficile* に反応して、プロバイオティクス *Bifidobacterium bifidum* (BB) より高度の脱顆粒を起こした。BBに反応して、TGF- $\beta$ を産生した。IL-5、IFN- $\gamma$ 、IL-17による活性酸素産生が、*S. aureus* 存在下で増強された。アレルギー患者好酸球では *S. aureus* によりIDO産生が誘導された。

6) 抗Fc $\epsilon$ RI抗体(CRA-1)の1 ng/ml以下と脱顆粒に至らない低濃度で、好塩基球に微弱なFc $\epsilon$ RI依存性刺激を与えると、その後のIgE・Fc $\epsilon$ RI非依存性刺激(MCP-1、FMLP)による脱顆粒、LTC<sub>4</sub>産生が増強された。IL-3によるprimingとの相加効果から、両者は別個のメカニズムと考えられる。2時間後でも反応性増強状態が保たれていた。

7) 気管支平滑筋細胞培養上清の56 kDa蛋白質の候補配列(APLPIIKFPG)はMMP-2のプロペプチドドメインにあたる30-39残基の配列(APSPIIKFPG)と90%の相同性を有していた。62 kDa蛋白質のN端候補配列(APLP)は56 kDa蛋白質の候補配列中の1-4残基と

一致した。

8) Poly ICの先行投与は、ダニ抗原単独に比し、気道過敏性、好酸球増多、Th2サイトカイン産生を有意に増悪させた。抗CD8抗体投与は、気道過敏性、Th2/Th1サイトカイン産生バランスに影響しないが、BALF中総白血球数、好酸球数の増加を有意に抑制した。BLT1拮抗薬もBALF中好酸球数の増加を用量依存性的かつ有意に抑制した。

9) NQ01の遺伝子多型Pro187SerおよびSer187Serと重症化との関連が認められた。治療抵抗性との関連が推測された。喫煙者、過去の喫煙者においてのみ、GSTM1の遺伝子多型null型と喘息重症化との関連が示された。喫煙とGSTM1の遺伝子との相互作用が示唆された。抗酸化ストレス応答活性の低下と重症化の関連が示唆される。

10) DEP成分のフルオランテン、ナフタレン、ベンゾ(a)アントラセン、p-ニトロフェノールによるIL-8産生増強が認められた。フルオランテン、ナフタレンは、既存のフィルターで除去可能だが、ベンゾ(a)アントラセンには非晶質鉄フィルターが効果的で、p-ニトロフェノールには活性炭フィルターが効果的であった。

#### E. 結論

今年度の本研究班の成果によって、1) 治療抵抗性の気流閉塞は重症喘息の主要徴候であるが、そのメカニズムとして、IgEを介さないT細胞依存性の気流閉塞の制御が重要と考えられること、2) 非アトピー機序による気道閉塞メカニズムの解明に向け、クローン化T細胞移入によるマウス実験喘息系が確立できたこと、3) 呼気NOが重症化抑制指標の一つとなりうること、4) ヒト好塩基球は抗原提示細胞として喘息病態に関与する可能性があること、5) 喘息死には、気道リモデリング、好酸球、IL-18産生CD8陽性T細胞が関与すること、6) 好酸球は細菌に対する生物活性発現を通して、喘息重症化に関わる可能性があること、7) 低レベルの抗原刺激が好塩基球の機能増強を介して重症化病態に関与しうること、8) 62、56、42 kDaの3種のプロテアーゼが気管支平滑筋細胞の遊走、リモデリングに寄与すること、9) 先行するウイルス感染による喘息病態の増悪には、CD8 T細胞およびLTB<sub>4</sub>が関与すること、10) NQ01の遺伝子多型および喫煙とGSTM1の遺伝子多型との相互作用が喘息重症化に関与すること、11) 非晶質鉄フィルターと活性炭フィルターを組み合わせ構成されている開発中の本フィルターは喘息重症化を予防できる可能性があること、等を明らかにした。

#### F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohtomo, T., Kaminuma, O., Yamada, J., Kitamura, N., Suko, M., Kobayashi, N., and Mori, A. 2010. Induction of bronchial hyperresponsiveness is dependent on eosinophils in Th-transfer model of Balb/c background. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)
2. Kitamura, F., Kitamura, N., Mori, A., Tatsumi, H., Nemoto, S., Miyoshi, H., Miyatake, S., Hiroi, T., and Kaminuma, O. 2010. Selective down-regulation of Th2 cytokines by C-terminal binding protein 2 in human T cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)
3. Kaminuma, O., Suzuki, K., and Mori, A. 2010. The effect of sublingual immunotherapy on antigen-induced bronchial and nasal inflammation in mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)
4. Katoh, S., maeda, S., Fukuoka, H., Wada, T., Moriya, S., Mori, A., Yamaguchi, K., and Miyagi, T. 2010. An essential role of sialidase Neul in CD44 hyaluronan receptor function on activated CD4<sup>+</sup> T cells in a murine asthma. *Clin. Exp. Allergy*. (in press)
5. Yoshioka, M., Sagara, H., Takahashi, F., Harada, N., Nishio, K., Mori, A., Ushio, H., Shimizu, K., Okada, T., Ota, M., Ito, Y., Nagashima, O., Atsuta, R., Suzuki, T., Fukuda, T., Fukuchi, Y., Takahashi, K. 2009. Role of multidrug resistance-associated protein 1 in the pathogenesis of allergic airway inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 296:L30-L36.
6. Kitamura, N., Motoi, Y., Mori, A., Tatsumi, H., Nemoto, S., Miyoshi, H., Kitamura, F., Miyatake, S., and Kaminuma, O. 2009. Suppressive role of C-terminal binding protein 1 in IL-4 synthesis in human T cells. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 382:326-330.
7. Kaminuma, O., Kitamura, F., Miyatake, S., Yamaoka, K., Miyoshi, H., Inokuma, S., Tatsumi, H., Nemoto, S., Kitamura, N., Mori, A., and Hiroi, H. 2009. T-bet is responsible for distorted Th2 differentiation in human peripheral CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123:813-820.
8. Suzuki, K., Kaminuma, O., Yang, L., Motoi, Y., Takai, T., Ichikawa, S., Okumura, K., Ogawa, H., Mori, A., Takaiwa, F., and Hiroi, T. 2009. Development of transgenic rice expressing mite allergen for a new concept of immunotherapy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 149 (Suppl 1):21-24.
9. Yamaoka, K., Okayama, Y., Kaminuma, O., Katayama, K., Mori, A., Tatsumi, H., Nemoto, S., and Hiroi, T. 2009. Proteomic approach to Fc $\cdot$ RI aggregation-initiated signal transduction cascade in human mast cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 149 (Suppl 1):73-76.
10. Kitamura, N., Kaminuma, O., Ohtomo, T., Kiyokawa, N., Kobayashi, N., Suko, M., and Mori, A. 2009. Evaluation of cysteinyl leukotriene-induced contraction of human cultured bronchial smooth muscle cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 149 (Suppl 1):83-86.
11. Ohtomo, T., Kaminuma, O., Kitamura, N., Suko, M., Kobayashi, N., and Mori, A. 2009. Murine Th clones confer late asthmatic response upon antigen challenge. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 149 (Suppl 1):2-6.
12. Kitamura, N., Katagiri, Y., Itagaki, M., Miyagawa, Y., Onda, K., Okita, H., Mori, A., Fujimoto, J., and Kiyokawa, N. 2009. The expression of grenulysin in systemic anaplastic large cell lymphoma in childhood. *Leuk. Res.* 33:908-912.
13. Ebisawa, T., Numazawa, K., Shimada, H., Izutsu, H., Sasaki, T., Kato, N., Tokunaga, K., Mori, A., Honma, K., Honma, S., and Shibata, S. 2010. Self-sustained circadian rhythm in cultured human mononuclear cells isolated from peripheral blood. *Neurosci. Res.* 66:223-227.
14. 高橋 清. 成人気管支喘息とその自然経過. *アレルギー・免疫* 16:478-488, 2009.
15. 高橋 清. 高齢者喘息調査における課題. *アレルギーの臨床* 29:599-604, 2009.
16. 高橋 清, 山中隆夫. 重症喘息とは 定義と実態. *アレルギー・免疫* 16:1503-1513, 2009.
17. 高橋 清. 成人気管支喘息の自然経過. *臨床免疫・アレルギー科* 52:292-299, 2009.
18. 宗田 良, 高橋 清. 高齢者喘息の特徴. *アレルギーの臨床* 29:502-506, 2009.
19. 岡田千春, 高橋 清. 重症喘息, 成人および高齢



- 者重症喘息の管理の現状. *Progress in Medicine* 29;19-23, 2009.
20. 谷本 安, 高橋 清. 特集 気管支喘息: 診断と治療の進歩. V. 喘息の亜型・特殊型 4. 重症難治性喘息. 日内会誌 98: 3103-13, 2009.
  21. 谷本 安, 高橋 清. 14 急性増悪 (発作) への対応 C. 急性増悪時の家庭での対応 福田 健編: よくわかる気管支喘息—その診療を極める—永井書店, 大阪, 233-35, 2009.
  22. 平野 淳, 高橋 清. 喘息コントロール問題点と対策 長期管理薬の使い方 成人. *医薬ジャーナル* 45;1369-1371, 2009.
  23. Hoshino T, Okamoto M, Takei S, Sakazaki Y, Iwanaga T, Aizawa H. Redox-Regulated Mechanisms in Asthma. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*. 2008;10(4): 769-783
  24. Imaoka H, Hoshino T, Takei S, Kinoshita T, Okamoto M, Kawayama T, Kato S, Iwasaki H, Watanabe K, Aizawa H. Interleukin-18 production and pulmonary function in COPD. *Eur Respir J* 2008;31(2):287-297.
  25. Inoue H, Hiraoka K, Hoshino T, Okamoto M, Iwanaga T, Zenmyo M, Shoda T, Aizawa H, Nagata K. High levels of serum IL-18 promote cartilage loss through suppression of aggrecan synthesis. *Bone* 2008;42(6): 1102-1110.
  26. Adachi M, Aizawa H, Ishihara K, Ohta K, Sano Y, Taniguchi H, Nakashima M. Comparison of salmeterol/fluticasone propionate (FP) combination with FP + sustained release theophylline in moderate asthma patients. *Respiratory Medicine* 2008;102(7): 1055-1064.
  27. Furumoto A, Ohkusa Y, Chen M, Kawakami K, Masaki H, Sueyasu Y, Iwanaga T, Aizawa H, Nagatake T, Oishi K. Additive effect of pneumococcal vaccine and influenza vaccine on acute exacerbation in patients with chronic lung disease. *Vaccine*. 2008;26: 4284-4289.
  28. Kawayama T, Hoshino T, Ichiki M, Tsuda T, Kinoshita M, Takata S, Koga T, Iwanaga T, Aizawa H, Kurume COPD Study Group. Effect of add-on therapy of tiotropium in COPD treated with theophylline. *INTERNATIONAL JOURNAL OF COPD*. 2008;3(1):137-147.
  29. Kawayama T, Minakata Y, Matsunaga K, Yamagata T, Tsuda T, Kinoshita M, Iwanaga T, Ichinose M, Aizawa H. Validation of symptom-based COPD questionnaires in Japanese subjects. *Respirology*. 2008;13(3):420-426.
  30. Minakata Y, Iijima H, Takahashi T, Miura M, Ogawa H, Kimura K, Koga T, Kinoshita M, Tsuda T, Aizawa H, Ichinose M. Efficacy and Safety of Formoterol in Japanese Patients with COPD. *Intern Med*. 2008;47(4):217-223.
  31. Minami S, Kawayama T, Ichiki M, Nishimura M, Sueyasu Y, Gohara R, Kinoshita M, Koga H, Iwanaga T, Aizawa H. Clinical efficacy of the transdermal tulobuterol patch in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a comparison with slow-release theophylline. *Intern Med*. 2008;47(6):503-509.
  32. Takeoka H, Koga T, Yano H, Ikeda J, Nishimura M, Kamimura T, Aizawa H. A Hybrid Lesion of Lung Cancer and Aspergillosis. *Clinical Medicine:Oncology*. 2008;2:115-118.
  33. Nakao I, Kanaji S, Ohta S, Matsushita 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, Shiraki A, Inoue M, Suzuki K, Aizawa H, Okinami S, Nagai H, Hasegawa M, Fukuda T, Eric D. Green, and Izuhara K. Identification of Pendrin as a Common Mediator for Mucus Production in Bronchial Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Immunol*. 2008;180: 6262-6269.
  34. Takata S, Washio M, Moriwaki A, Tsuda T, Nakayama H, Iwanaga T, Aizawa H, Arai Y, Nakanishi Y, Inoue H. Burden among Caregivers of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease with Long-Term Oxygen Therapy. *International Medical Journal*. 2008;15(1):53-57.
  35. Tokuda R, Nagao M, Hiraguchi Y, Hosoki K, Matsuda T, Kouno K, et al. Antigen-Induced expression of CD203c on basophils predicts IgE-mediated wheat allergy. *Allergol Int* 2009; 58:193-9.
  36. Fujisawa T, Nagao M, Hiraguchi Y, Hosoki K, Tokuda R, Usui S, et al. Biomarkers for allergen immunotherapy in cedar pollinosis. *Allergol Int* 2009; 58:163-70.
  37. Fujisawa T, Nagao M, Hiraguchi Y, Katsumata

- H, Nishimori H, Iguchi K, et al. Serum measurement of thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 in children with atopic dermatitis: elevated normal levels in infancy and age-specific analysis in atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 2009; 20:633-41.
38. 細木興亜, 長尾みづほ, 平口雪子, 徳田玲子, 藤澤隆夫. RS ウイルス感染症入院例における退院後の喘鳴についての検討. *アレルギー* 58:1521-1529. 2009.
39. 藤澤隆夫. 小児気管支喘息の病態生理. *小児科臨床* 62(3), 383-388, 2009
40. Ohta K, Miyamoto T, Amagasaki T, Yamamoto M: 1304 Study Group. Efficacy and safety of omalizumab in an Asian population with moderate-to-severe persistent asthma. *Respirology*. 2009; 14(8): 1156-1165.
41. Yamamura K, Adachi T, Masuda T, Kojima Y, Hara A, Toda T, Nagase H, Ohta K: Intracellular protein phosphorylation in eosinophils and the functional relevance in cytokine production. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009; 149 Suppl1: 45-50.
42. Suzukawa M, Yamaguchi M, Iikura M, Koketsu R, Komiya A, Nagase H, Nakae S, Matsumoto K, Saito H, Matsushima K, Yamamoto K, Ohta K: IL-33-induced activation of human basophils and eosinophils via ST2. *Inflammation and Regeneration*, in press.
43. 社団法人日本アレルギー学会喘息ガイドライン専門部会: 大田健, 秋山一男, 西間三馨 (監修) 『喘息予防・管理ガイドライン2009』作成委員 (作成). 喘息予防・管理ガイドライン2009. 協和企画
44. 杉山公美弥, 相良博典, 足立満, 美濃口健治, 田中明彦, 井上洋西, 山内広平, 小林仁, 秋山一男, 釣木澤尚実, 谷口正実, 棟方充, 斉藤純平, 佐藤俊, 三嶋理晃, 新実彰男, 松本久子, 大田健, 足立哲也, 長瀬洋之, 中島裕史, 加々美新一郎, 岩本逸夫, 福田健: 気管支喘息の早期診断基準の提言. *アレルギー*. 2009; 57(12): 1275-1283.
45. 大田健: 喘息死ゼロを目指して. *日本内科学会雑誌*. 2009; 98 Suppl 1: 90-91.
46. 宮本昭正, 秋山一男, 足立満, 井上洋西, 大田健: 成人気管支喘息に対するモメタゾンフランカルボン酸エステル吸入用散剤とフルチカゾンプロピオン酸エステル吸入用散剤との非盲検、非劣性比較試験. *アレルギー・免疫*. 2009; 16(5): 716-731.
47. 宮本昭正, 秋山一男, 足立満, 井上洋西, 大田健: 成人気管支喘息に対するモメタゾンフランカルボン酸エステル吸入用散剤長期投与時の安全性および有効性の検討. 他剤吸入ステロイド薬を使用した中等症患者を対象とした 52 週間長期投与試験. *アレルギー・免疫*. 2009; 16(5): 732-745.
48. 大田健: 世界のガイドラインにおける治療戦略 (GINA, JGL) 成人. *医薬ジャーナル*. 2009; 45(5): 1349-1357.
49. 大田健: 喘息予防・管理ガイドライン2006 (JGL2006). *成人病と生活習慣病*. 2009; 39(6): 671-675.
50. 大田健: 美濃口健治: 喘息コントロールの理想と現実. 医師と患者を対象にしたインターネットによる検討. ACTUAL-I: A Clinical survey To Understand real Asthma Life for Patients-I. *アレルギー・免疫*. 2009; 16(9): 1430-1440.
51. 長瀬洋之, 山下直美, 大田健: 喫煙曝露がアレルギー性気道炎症と気道過敏性に及ぼす影響. 喘息モデルマウスにおける検討. *Topics in Atopy*. 2009; 8(1): 46-52.
52. 大田健: アレルギー疾患の現況と今後の展望. 特に喘息を中心に. *日本臨床*. 2009; 67(11): 2033-2038.
53. 大田健: 気管支喘息ガイドライン 2009. *呼吸*. 2009; 28(10): 974-980.
54. 大田健: 喘息の克服を目指して. *アレルギー*. 2009; 58(11): 1497-1501.
55. 山口正雄, 大田健: 7) 吸入ステロイド薬の併用薬の選択順位とその効果のエビデンスは?. p33-36. *EBM アレルギー疾患の治療*. 中外医学社. 2009.
56. Kimura, T., Yokoyama, A., Kohno, N., Nakamura, N., Eboshida, A. Self-administered assessments of perceived stress and quality of life and their associations in community-based and hospital-based surveys.
57. Kimura, T., Nakamura, H., Eboshida, A. Perceived stress, severity of asthma, and quality of life in young adults with asthma. *Allergology International* 2008
58. Awaya, T., Yokosaki, Y., Yamane, K., Usui, H., Kohno, N., Eboshida A. Gene-environment Association of an ITGB2 Sequence Variant with

- obesity in ethnic Japanese. *OBESITY* vol.16 no.6 1463-1466 June 2008.
59. Uebaba, K., Feng-Hao Xu, Origasa, H., Yamaguchi, N., Delixiati Yimiti, Izumi, H., Eboshida, A. Relationship between Lifestyle and psychosomatic health- Study on Japanese residents of 60 years old - .
  60. Awaya, T., Yokosaki, Y., Yamane, K., Higashikawa, F., Kohno, K., Eboshida, A. Polymorphisms in the integrin super gene family associated with obesity and type 2 diabetes in Japanese American and Japanese population.
  61. 信國好俊, 高橋佳代, 守田貴子, 沼本通孝, 烏帽子田彰. 細胞内コレステロール代謝輸送の解明と予防医学への応用. 日衛誌(Jpn. J. Hyg.)第63巻 第2号 346 2008年3月
  62. Fukuyama S, Nakao T, Matsumoto T, Oliver BGG, Burgess JK, Moriwaki A, Tanaka K, Kubo M, Hoshino T, Tanaka H, McKenzie ANJ, Matsumoto K, Aizawa H, Nakanishi Y, Yoshimura A, Black A, Inoue H. Pulmonary suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 induced by IL-13 regulates allergic asthmatic phenotype. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2009; 179: 992-998.
  63. Suda M, Okuda T, Ishimura M, Kurokawa S, Tokuoka S, Nakamura T, Takahashi Y, Tanaka H, Nagai H. The effects of inhaled KP-496, a novel dual antagonist for cysteinyl leukotriene receptor and thromboxane A<sub>2</sub> receptor, on allergic asthmatic responses in guinea pigs. *Pharmacology* 2009; 84: 249-56.
  64. Takahashi G, Tanaka H, Wakahara K, Nasu R, Hashimoto M, Miyoshi K, Takano H, Yamashita H, Inagaki N, Nagai H. Effect of diesel exhaust particles on house dust mite-induced airway eosinophilic inflammation and remodeling in mice. *J. Pharmacol. Sci.* (in press)
  65. Komai M, Tanaka H, Nagao K, Ishizaki M, Kajiwara D, Miura T, Ohashi H, Haba T, Kawakami K, Sawa E, Yoshie O, Inagaki N, Nagai H. A novel CC-chemokine receptor 3 antagonist, Ki19003, inhibits airway eosinophilia and subepithelial/Peribronchial fibrosis induced by repeated antigen challenge in mice. *J. Pharmacol. Sci.* (in press)
  66. Kimura T, Yokoyama A, Kohno N, Nakamura H, Eboshida A. Perceived stress, severity of asthma, and quality of life in young adults with asthma. *Allergol Int.* 2009 Mar;58(1):71-9.
  67. Hatta K, Nakamura H, Usui C, Kobayashi T, Kamiyo Y, Hirata T, Awata S, Kishi Y, Arai H, Kurosawa H: Medical and psychiatric comorbidity in psychiatric beds in general hospitals: a cross-sectional study in Tokyo. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2009 Jun;63(3):329-35.
  68. Hatta K, Sato K, Hamakawa H, Takebayashi H, Kimura N, Ochi S, Sudo Y, Asukai N, Nakamura H, Usui C, Kawabata T, Hirata T, Sawa Y: Effectiveness of second-generation antipsychotics with acute-phase schizophrenia. *Schizophr Res.* 2009 Aug;113, 49-55.
  69. Hibino Y, Takaki J, Kambayashi Y, Hitomi Y, Sakai A, Sekizuka N, Ogino K, Nakamura H: Relationship between the Noto-Peninsula earthquake and maternal postnatal depression and child-rearing. *Environ Health Prev Med.* 2009 Sep; 14, 255-260.
  70. Higuchi M, Hatta K, Honma T, Hitomi YH, Kambayashi Y, Hibino Y, Matsuzaki I, Sasahara S, Nakamura H: Association between altered systemic inflammatory interleukin-1beta and natural killer cell activity and subsequently agitation in patients with alzheimer disease. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2009 Sep
  71. Sagara T, Hitomi Y, Kambayashi Y, Hibino Y, Matsuzaki I, Sasahara S, Ogino K, Hatta K, Nakamura H: Common risk factors for changes in body weight and psychological well-being in Japanese male middle-aged workers. *Environ Health Prev Med.* 2009 Nov 14, 319-327.
  72. Hatta K, Nakamura M, Yoshida K, Hamakawa H, Wakejima T, Nishimura T, Furuta K, Kawabata T, Hirata T, Usui C, Nakamura H, Sawa Y: A prospective naturalistic multicenter study of intravenous medications in behavioral emergencies: haloperidol versus flunitrazepam. *Psychiatry Research* ,(in press)

## 2. 学会発表

1. Mori, A., Kitamura, N., Otomo, M., Akiyama, K. and Kaminuma, O. 2009. T cell response to *Candida albicans* acid protease is associated with the isolated late asthmatic response. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology. Symposium CL-01 Allergic fungal infections. Abstract book p. 209. (Tokyo) 2009/5/25-29
2. Mori A, Otomo T, Kitamura N, Kaminuma O. 2009. Cloned Th cells confer airway obstruction upon antigen challenge in the absence of IgE antibody - a model for nonatopic bronchoconstriction. European Respiratory Society 2009. Final program p.375 (Vienna) 2009/09/12-16
3. Mori A, Kitamura N, Otomo T, Kaminuma O. 2009. Detection of T cell-dependent bronchoconstriction using human cultured bronchial smooth muscle cells. XXI World Allergy Congress. Final program p.124 (Buenos Aires) 2009/12/6-10
4. Kaminuma, O., Kitamura, N., Mori, A., nemoto, S., Tatsumi, H., Miyoshi, H., Miyatake, S., Kitamura, F., Yamaoka, K., and Hiroi, T. 2010. Human Th2 cells produce IFN-gamma due to hyper-expression of T-bet. 2010 American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology Annual Meeting. *J. Allergy Clin. Immunol.* :S (New Orleans) 2010/2/26-3/2
5. Kaminuma O, Yang L, Takagi S, Ichikawa S, Hirose S, Mori A, Umez-Goto M, Ohtomo T, Ohmachi Y, Noda Y, Okumura K, Ogawa H, Kitamura F, Hiroi T. 2010. Successful recovery from allergic airway inflammation by oral immunotherapy with allergen-expressing transgenic rice seed. American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology Annual meeting. (New Orleans) 2010/2/26-3/2
6. 森 晶夫, 山口美也子, 北村紀子, 大友隆之, 大村武雄, 須甲松信: 成人喘息のQOL-厚生労働科学研究須甲班調査から, 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム3「アレルギー患者のQOLの評価と活用と展望」, アレルギー 58:301, 2009.6.4 (岐阜)
7. 森 晶夫, 北村紀子, 大友隆之, 前田裕二, 谷口正実, 大友 守, 福富友馬, 長谷川眞紀, 秋山一男, 神沼 修: 重症喘息の機序とその対策, 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム8「重症喘息の病態と患者に優しい治療とその開発」, アレルギー 58:313, 2009.6.5 (岐阜)
8. 小野恵美子, 谷口正実, 東 憲考, 三田晴久, 梶原景一, 山口裕礼, 龍野清香, 谷本英則, 福富友馬, 関谷潔史, 押方智也子, 粒来崇博, 釣木澤尚美, 大友 守, 前田裕二, 森 晶夫, 長谷川眞紀, 秋山一男: 喘息病態における好塩基球活性化マーカーCD203cの発現変化, 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会, アレルギー 58:371, 2009.6.5 (岐阜)
9. 小野恵美子, 谷口正実, 東 憲考, 三田晴久, 山口裕礼, 東 愛, 梶原景一, 伊藤伊津子, 龍野清香, 谷本英則, 福富友馬, 押方智也子, 関谷潔史, 粒来崇博, 釣木澤尚美, 大友 守, 前田裕二, 森 晶夫, 長谷川眞紀, 秋山一男: 炎症性メディエーターと各種アレルギー・炎症疾患, 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会, アレルギー 58:386, 2009.6.5 (岐阜)
10. 押方智也子, 釣木澤尚美, 齋藤明美, 三富弘之, 齋藤博士, 粒来崇博, 龍野清香, 谷本英則, 福富友馬, 小野恵美子, 関谷潔史, 谷口正実, 大友 守, 前田裕二, 森 晶夫, 長谷川眞紀, 中澤卓也, 安枝 浩, 秋山一男: 約12年の気管支喘息の経過で発症した *Aspergillus niger* によるアレルギー性気管支肺アスペルギルス症の一例, 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会, アレルギー 58:393, 2009.6.4 (岐阜)
11. 関谷潔史, 谷口正実, 福富友馬, 龍野清香, 谷本英則, 押方智也子, 小野恵美子, 粒来崇博, 東 憲考, 中澤卓也, 釣木澤尚美, 大友 守, 前田裕二, 森 晶夫, 長谷川眞紀, 秋山一男: 若年成人の間欠型喘息における肺機能からみた重症度評価の検討, 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会, アレルギー 58:398, 2009.6.4 (岐阜)
12. 谷本英則, 谷口正実, 関谷潔史, 龍野清香, 福富友馬, 小野恵美子, 押方智也子, 粒来崇博, 釣木澤尚美, 大友 守, 前田裕二, 森 晶夫, 長谷川眞紀, 秋山一男: 高用量ICSや $\beta$ 刺激薬でも低肺機能が持続する重症喘息-臨床的に真のリモデリングと言えるのか, 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会, アレルギー 58:417, 2009.6.5 (岐阜)
13. 龍野清香, 谷口正実, 福富友馬, 谷本英則, 小野恵美子, 押方智也子, 関谷潔史, 粒来崇博, 釣木澤尚美, 大友 守, 前田裕二, 森 晶夫, 長谷川眞紀, 中澤卓也, 安枝 浩, 石井豊太, 秋山一男: イネ科花粉アレルギーの臨床症状-カモガヤ特

- 異的 IgE 単独陽性例の検討、第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会、アレルギー 58 : 423, 2009. 6. 5 (岐阜)
14. 谷本英則、谷口正実、竹内保雄、齋藤明美、龍野清香、福富友馬、小野恵美子、関谷潔史、押方智也子、粒来崇博、釣木澤尚美、中澤卓也、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、安枝 浩、秋山一男：アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 (ABPA) 30 例の臨床的検討、第 49 回日本呼吸器学会学術講演会、日本呼吸器学会雑誌 47 : 246, 2009. 6. 13 (東京)
  15. 押方智也子、釣木澤尚美、三富弘之、齋藤博士、粒来崇博、龍野清香、谷本英則、福富友馬、小野恵美子、関谷潔史、谷口正実、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：アレルギー性気管支肺真菌症における気道過敏性、気道リモデリングの検討、第 49 回日本呼吸器学会学術講演会、日本呼吸器学会雑誌 47 : 246, 2009. 6. 13 (東京)
  16. 関谷潔史、谷口正実、福富友馬、龍野清香、谷本英則、小野恵美子、押方智也子、粒来崇博、東 憲考、中澤卓也、釣木澤尚美、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：若年成人の自覚症状が軽症間欠型である喘息における肺機能・気道過敏性・気道炎症からみた重症度評価と持続的気流閉塞の検討、第 49 回日本呼吸器学会学術講演会、日本呼吸器学会雑誌 47 : 277, 2009. 6. 14 (東京)
  17. 福富友馬、谷口正実、関谷潔史、龍野清香、谷本英則、小野恵美子、押方智也子、粒来崇博、釣木澤尚美、東 憲考、中澤卓也、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：若年成人喘息患者における気流閉塞—短期間喫煙でも持続的気流閉塞を生じるか、第 49 回日本呼吸器学会学術講演会、日本呼吸器学会雑誌 47 : 314, 2009. 6. 14 (東京)
  18. 大友隆之、神沼 修、北村紀子、森 晶夫：T 細胞依存的な気道過敏性亢進における好酸球の影響、アレルギー・好酸球研究会 2009、抄録集 p. 6, 2009. 6. 20 (東京)
  19. 神沼 修、北村紀子、本井祐二、北村ふじ子、宮武昌一郎、三好浩之、巽英樹、根本荘一、森 晶夫、廣井隆親：ヒト T 細胞の IL-4 に対する C-terminal binding protein の役割、アレルギー・好酸球研究会 2009、抄録集 p. 12, 2009. 6. 20 (東京)
  20. 鈴木一矢、神沼 修、森 晶夫、廣井隆親：マウスを用いた舌下免疫療法のモデル実験系の開発、アレルギー・好酸球研究会 2009、抄録集 p. 17, 2009. 6. 20 (東京)
  21. 龍野清香、粒来崇博、谷口正実、福富友馬、谷本英則、小野恵美子、押方智也子、関谷潔史、釣木澤尚美、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：副鼻腔炎の合併は気流制限なく臨床的にコントロールされている喘息患者における呼気 NO 高値の危険因子である、第 19 回国際喘息学会日本北アジア部会、プログラム・抄録集 p. 67, 2009. 7. 10 (東京)
  22. 関谷潔史、谷口正実、福富友馬、龍野清香、谷本英則、押方智也子、粒来崇博、釣木澤尚美、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：自覚症状が軽症間欠型の若年成人喘息における臨床的検討、第 19 回国際喘息学会日本北アジア部会、プログラム・抄録集 p. 76, 2009. 7. 11 (東京)
  23. 谷本英則、竹内保雄、谷口正実、龍野清香、福富友馬、関谷潔史、森 晶夫、長谷川眞紀、齋藤明美、安枝 浩、秋山一男：自覚症状が軽症間欠型の若年成人喘息における臨床的検討、第 19 回国際喘息学会日本北アジア部会、プログラム・抄録集 p. 79, 2009. 7. 11 (東京)
  24. 押方智也子、釣木澤尚美、齋藤博士、齋藤明美、粒来崇博、龍野清香、谷本英則、福富友馬、関谷潔史、中澤卓也、谷口正実、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、安枝 浩、秋山一男：アレルギー性気管支肺真菌症と真菌症と真菌感作喘息の病態における制御性 T 細胞に関する検討、第 59 回日本アレルギー学会秋期学術大会、アレルギー 58 (8・9) : 1204, 2009. 10. 29 (秋田)
  25. 神沼 修、大友隆之、森 晶夫、長久保大輔、稗島州雄、義江 修、鈴木一矢、廣井隆親：T 細胞依存性の好酸球気道炎症に対する CCR4 拮抗薬の作用、第 59 回日本アレルギー学会秋期学術大会、アレルギー 58 (8・9) : 1206, 2009. 10. 29 (秋田)
  26. 谷本英則、谷口正実、竹内保雄、齋藤明美、龍野清香、福富友馬、関谷潔史、押方智也子、粒来崇博、釣木澤尚美、中澤卓也、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、安枝 浩、秋山一男：アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 (ABPA) 40 例の臨床的検討、第 59 回日本アレルギー学会秋期学術大会、アレルギー 58 (8・9) : 1213, 2009. 10. 29 (秋田)
  27. 関谷潔史、谷口正実、谷本英則、龍野清香、福富友馬、押方智也子、粒来崇博、釣木澤尚美、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：

- 若年老人における喘息大発作入院症例の臨床背景の検討、第59回日本アレルギー学会秋期学術大会、アレルギー 58 (8・9) : 1213, 2009. 10. 29 (秋田)
28. Kaminuma, O., Kitamura, F., Miyatake, S., Yamaoka, K., Kitamura, N., Mori, A., and Hiroi, T. T-bet の高発現がヒト Th2 分化における不完全性の要因である/Hyperexpression of T-bet is responsible for incomplete human Th2 differentiation. 日本免疫学会総会 2009 proceedings of the Japanese Society for Immunology 39:150, 2009. 1. 2-4 (大阪)
  29. 福富友馬, 小林章雄, 中村裕之, 西村正治, 河岸由起男, 谷口正実, 高橋 清, 烏帽子田彰, 小田嶋博, 中川武正, 秋山一男, 赤澤 晃. 気管支喘息 診断と管理 疫学と実態調査 日本語版 ECRHS 調査票を用いた全国成人喘息有病率調査. 第59回日本アレルギー学会総会, 秋田, 2009.
  30. Okada C, Hirano A, Kimura G, Tanimoto Y, Kanehiro A, Soda R, Takahashi K. The interaction of PBMC from asthmatics and cultured bronchial epithelial cells showed enhanced MMP-9 and TGF- $\beta$  1 production in difficult asthma. ATS, San Diego, 2009.
  31. Okada C, Hirano A, Tanimoto Y, Kimura G, Miyahara N, Kanehiro A, Soda R, Takahashi K. The PBMC of severe asthmatics showed enhanced candida antigen induced IL-5, IL-13 and TARC production and this enhancement was inhibited by dendritic cell depletion. ERS, Wien, 2009.
  32. 岡田千春, 谷本 安, 保澤総一郎, 尾長谷靖, 金廣有彦, 佐藤利雄, 竹山博泰, 小崎晋司, 沖本二郎, 塩田雄太郎, 多田慎也, 高橋 清. 吸入ステロイド薬 HFA-CIC の服薬遵守状況と諸因子の検討. 第21回日本アレルギー学会春期臨床大会, 岐阜, 2009.
  33. 岡田千春, 平野 淳, 高橋 清. 高齢者喘息とデバイスを考える 高齢者喘息の現状と課題. 第59回日本アレルギー学会総会, 秋田, 2009.
  34. 岡田千春, 平野 淳, 木村五郎, 谷本 安, 高橋 清. One airway, one disease の病態と治療 成人喘息と鼻炎. 第59回日本アレルギー学会総会, 秋田, 2009.
  35. 谷本 安, 佐久川亮, 井上由佳理, 斎藤博久, 高橋 清, 谷本光音. シンポジウム 12 アレルギーと炎症細胞(メディエーターも含む) S12-2. 好塩基球 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会, 岐阜, 2009.
  36. Nishihara M, Shoji S, Maeda I, Shimoda T, Nishima S, Okamoto K: Autocrine and paracrine migration of smooth muscle cell in response to fibronectin in airway remodeling ATS 2008 (2008年5月)
  37. 西原麻千子, 庄司俊輔, 前田衣織, 下田照文, 西間三馨, 岡元孝二: 気管支喘息でのリモデリング形成における平滑筋細胞遊走とインテグリンの関与 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2008年11月)
  38. 大田健: 成人喘息に対する生物学的製剤の有用性. 第21回日本アレルギー学会春期臨床大会. 2009: 岐阜.
  39. 大田健: 日本人成人気管支喘息に対するブデソニド/ホルモデロール配合剤の第三相無作為化二重盲検比較試験結果. 第21回日本アレルギー学会春期臨床大会. 2009: 岐阜.
  40. 大田健, 足立満, 秋山一男, 井上洋西, 宮本昭正: 成人気管支喘息に対する Mometasone Furoate (MF)-DPI の長期投与時における安全性および有効性の検討. 第21回日本アレルギー学会春期臨床大会. 2009: 岐阜.
  41. 鈴木真穂, 川上綾子, 小宮明子, 木村美和子, 二藤隆春, 山口正雄, 山本一彦, 大田健: 喉頭ファイバー施行直後にアナフィラキシーを発症した3症例の検討. 第21回日本アレルギー学会春期臨床大会. 2009: 岐阜.
  42. 大田健: 喘息治療における抗体治療の位置づけ. 第49回日本呼吸器学会学術講演会. 2009: 東京
  43. Maho Suzukawa, M Iikura, M Yamaguchi, R Koketsu, A Komiya, H Nagase, S Nagae, K Matsumoto, H Saito, K Matsushima, K Yamamoto, K Ohta: IL-33 induces human bsohil and eosinophil activation via ST2. The 9th World Congress on Inflammation. 2009: Tokyo.
  44. 大田健: 各種喘息治療薬のガイドラインでの位置づけ. 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2009: 秋田.
  45. 大田健: アレルギー性鼻炎合併喘息全国実態調査 (第一報). 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2009: 秋田.
  46. 大田健: 気管支喘息ガイドライン. 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2009: 秋田.
  47. 長瀬洋之, 平井浩一, 山口正雄, 大田健: Expression and Function of Toll-like Receptors (TLRs) in Allergic Inflammatory Cells. 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2009: 秋田.

48. 瀨瀬力也、山口正雄、川上綾子、鈴木真穂、小宮明子、関谷 剛、飯倉元保、長瀬洋之、山田浩和、松本健治、斎藤博久、羅 智晴、山本一彦、大田健：低濃度抗  $Fc\epsilon R1\alpha$  抗体によるヒト好塩基球・マスト細胞の活性化制御。第19回国際喘息学会日本北アジア部会。2009：東京。
49. 山口正雄、長瀬洋之、川畑仁人、神田浩子、瀨瀬力也、小宮明子、山本一彦、大田 健：自己免疫疾患に伴う著明な閉塞性呼吸機能障害：抗コリン薬吸入の持続的効果。第46回日本臨床生理学会総会。2009：盛岡。
50. 大田 健、山口正雄：シンポジウム IgE を介した即時型反応の意義 再考。抗 IgE 抗体療法により解明されたこと—小児への可能性も含めて—。第46回日本小児アレルギー学会。2009：福岡。
51. 山口正雄、鈴木真穂、瀨瀬力也、長瀬洋之、大田健：臨床・研究のための技術・技能プラクティカルセミナー3 ヒト好塩基球の分離と機能評価の実際。第59回日本アレルギー学会秋季学術大会。2009：秋田。
52. 原 麻恵、長瀬洋之、小島康弘、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、山口正雄、鈴木直仁、工藤宏一郎、小林信之、大田 健：喘息治療ステップダウン成功予測因子としての呼気凝縮液/FeNO の検討。第59回日本アレルギー学会秋季学術大会。2009：秋田。
53. 山口正雄、瀨瀬力也、鈴木真穂、川上綾子、小宮明子、山田浩和、長瀬洋之、山本一彦、大田 健：病院スタッフを対象としたアナフィラキシー講習会：参加者アンケートの結果。第59回日本
54. 戸田貴子、長瀬洋之、鈴木真穂、原 麻恵、小島康弘、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、山口正雄、大田 健：Th17 系サイトカインが好酸球からのサイトカイン放出に及ぼす影響。第59回日本アレルギー学会秋季学術大会。2009：秋田。
55. 杉本直也、原 麻恵、中瀬裕子、戸田貴子、小島康弘、竹澤智湖、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、長瀬洋之、山口正雄、鈴木直仁、大田 健：トロポニン I 値が心病変評価に有用であった Churg-Strauss 症候群 (CSS) の 1 例。第188回日本呼吸器学会関東地方会。2010：東京。気管支喘息症の重症度に関連する酸化ストレス遺伝子と環境との相互作用機能 (鳥帽子田彰, 中村裕之) 平成20年度 厚生労働科学研究費補助金 免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業 研究報告会抄録集 p11, 2009.1 東京
56. 小林敏生, 荒木善光, 鳥帽子田彰, 上野直美, 桐山美紀子, 岡野吉晴, 新開洋一: 地域・職域保健の連携における保健所の取り組み—事業所の健康調査と連携活動の実践— (第68回日本公衆衛生学会総会 (奈良))
57. 鳥帽子田彰: アレルギーと都市環境 2009. 6. 5 広島ロータリークラブ
58. 田中宏幸、高橋 剛、若原恵子、橋本末樹子、三好康介、山下弘高、稲垣直樹、永井博弐: 気道リモデリング形成における環境因子の役割。第29回気道分泌研究会 (2009年4月、東京)
59. 田中宏幸: アレルギー反応とプロスタグランジン  $D_2$ 。第9回愛知成人喘息研究会 特別講演 (2009年9月、名古屋)
60. 田中宏幸: 環境因子による喘息様病態形成への影響—マウスモデルを用いた検討から—。第59回アレルギー学会秋季学術大会 シンポジウム (2009年11月、秋田)
61. 土性千恵、田中宏幸、梶原 悠、村田健司、樋口純一、江崎友哉、柳楽庸史、稲垣直樹、永井博弐: ダニ抗原誘発マウス気道炎症における Protease-activated receptor (PAR)2 の意義。第59回アレルギー学会秋季学術大会 一般演題 (2009年11月、秋田)
62. 福富友馬、小林章雄、中村裕之、西村正治、河岸由紀男、谷口正実、高橋清、鳥帽子田彰、小田嶋博、中川武正、秋山一男、赤澤晃: 日本語版 ECRHS 調査票を用いた全国成人喘息有病率調査。第59回日本アレルギー学会秋季学術大会、2009年10月、秋田
63. 辻本藤太郎、人見嘉哲、神林康弘、日比野由利、柴田亜樹、中村裕之: Lipopolysaccharide (LPS) 投与マウス敗血症モデルにおける血漿中抗酸化物質濃度と総抗酸化能の変化。第7回日本予防医学学会学術総会、2009年12月、千葉
64. 人見嘉哲、辻本藤太郎、石神昭人、近藤嘉高、神林康弘、弘田量二、日比野由利、柴田亜樹、中村裕之: ストレスによるマウス血漿総抗酸化能、抗酸化物質濃度の変化。第9回分子予防環境医学研究会、2010年1月、東京
- H. 知的所有権の取得状況  
特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## II. 分担研究報告



## 重症・難治性喘息の病因・病態の解明に関する研究

研究代表者 森 晶夫（独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター先端技術開発研究部長）

### 研究協力者

秋山一男（国立病院機構相模原病院院長・臨床研究センター長） 北村紀子（同センター研究員）  
安部暁美（同センターリサーチレジデント） 山口美也子（同センター研究員）  
神沼修（東京都臨床医学総合研究所主任研究員） 大友隆之（東京薬科大学総合医療薬学助教）

### 研究要旨

重症・難治性喘息の大部分は非アトピー型喘息であり、高用量吸入ステロイドに加えて経口ステロイド、テオフィリン、抗ロイコトリエン薬、長時間作用型β刺激薬等多種類の治療薬を併用してもなお満足な治療効果が得られていない。その特徴は、成人発症、非アトピー型で、メカニズム面においては、発病初期から、軽症ないし中等症の喘息とは異質な、ステロイド抵抗性の病態が存在する。リモデリングに加えて、1) T細胞レベルのステロイド抵抗性と、2) 非アトピー型の喘息反応、慢性炎症、の2つの病態は、特に重要な因子と考えられる。重症喘息の大部分を占める非アトピー型喘息の気流閉塞メカニズムを明らかにする目的に、*in vitro* のヒト気管支平滑筋収縮モデルを確立し、T細胞由来の気管支平滑筋収縮活性のcharacterizationを行った。また、活性化依存性に気管支平滑筋収縮活性を産生するヒトT細胞クローンを樹立した。加えて、*in vivo* で、T細胞依存性、IgE非依存性の喘息反応（気道抵抗上昇）を解析できるモデルを構築した。T細胞が炎症、過敏性、リモデリングに加えて、気流閉塞にも関与することを、はじめて証明した。非アトピー機序による気流閉塞メカニズムの解明は、既存の治療薬の効果に限界のある重症・難治症例の治療法開発に向けて、大いに役立つものと期待される。

### A. 研究目的

近年のガイドラインの普及、吸入ステロイドを代表とする薬物療法の進歩により、比較的軽症な症例に対しては十分な予後・QOLの向上がもたらされた。一方、重症患者に対する治療効果は満足な水準に達していないことが、国内のAIRJ、海外のGOAL study等によって明らかになっている。特に、経口ステロイド薬を常時使用するステロイド依存性の重症喘息患者は、喘息死の予備軍とも位置づけられ、必ずしも近年の治療成績向上の恩恵には浴していないこと、頻回の救急受診・長期入院・社会不適応を理由とする直接・間接の医療費に占める比重の高いことが指摘されている。医療経済的には約1割の重症喘息に対する支出が喘息全体の過半を占めることが解決すべき課題である。喘息の重症化、難治化の病態・発症機序を解明し、治療・予防法を確立することができれば、年間数千人の喘息死を未然に防止するのみならず、喘息を理由に家庭や社会から疎外されている患者、患者家族のQOLを改善し、なお増大しつつある医療費の削減にもつながることが期待される。

われわれは、難治性喘息の今日的診断基準を提唱し、ステロイド依存性喘息、100症例の登録調査の実施によって、現在の我が国における重症喘息の実態、病態、

治療内容を把握してきた。同時期の米国NIHの大規模研究SARP (Severe Asthma Research Program) study、欧州12カ国共同研究のENFUMOSA (European Network For Understanding Mechanisms Of Severe Asthma) studyが、重症喘息250例、163例を登録しており、ステロイド依存性喘息はそのうちの約3割と的事实を考慮すると、われわれの調査の意義は大きいものと考えられる。喘息の重症・難治化の要因について、以前は、早期介入の失敗によって長年の間に高度のリモデリングが蓄積された結果と認識されてきたが、この調査によってはじめて、重症喘息の半数が喘息発症1～2年以内にステロイド依存状態に陥っており、これら相当数の重症喘息の機序は、発症時から通常の喘息と異なっていることが示唆された。難治性喘息の8割以上を非アトピー型喘息が占めること、メカニズムの観点からは、高用量のステロイド使用にもかかわらず、高度の炎症反応が持続していること（T細胞レベルでのステロイド感受性低下）が明らかになっている。現行の治療法では限界のある重症・難治性喘息患者を対象とする新たな治療法の実現に向けて、IgE非依存性の気流閉塞がいかなる機序によって生ずるかを解明することは大きな意義を有する。前年度までの研究でヒト培養気管支平滑筋細胞のゲル内収縮アッセイ系

を樹立したので、T細胞依存性の気道平滑筋収縮活性の characterization を進めた。また、多数のマウス Th クローンを樹立、スクリーニングし、Th クローンの受身移入によって、IgE 非依存性、T細胞依存性に、抗原チャレンジ後、遅発型気流閉塞が惹起される喘息モデルを確立した。

## B. 方法

### 対象症例、臨床検査

国立病院機構相模原病院アレルギー科外来に通院中の成人喘息症例より、インフォームドコンセントを得たうえで対象とした。アセチルコリン、ヒスタミンに対する気道過敏性の測定、および抗原吸入負荷試験は、日本アレルギー学会の標準法によって行った。β刺激剤、テオフィリン剤、インタール、抗コリン剤、ベクロメサゾン吸入は、12時間以上、抗ヒスタミン剤、ステロイド剤は24時間以上中止した。アトピー型は、吸入アレルギー20種を含む皮膚テストにおいて、一つ以上の陽性を示すものと定義した。非アトピー型は皮膚テスト陰性のものとした。

### アレルギー

粗抗原として用いたダニ、スギ、イヌ、ネコ、カンジダ、アルテルナリア、アスペルギルスなど各種アレルギー診断用エキスの原末は鳥居薬品より供与された。精製ダニアレルギー Der f 1、Der f 2 はアサヒビール薬品（株）より、精製カンジダアレルギー Secretory aspartic prorease 2 (SAP2)、Superoxide dismutase (SOD)、cyclophilin、enolase、mannan A は宝酒造（株）より購入した。Stock solution として、Hank's buffered saline solution (HBSS) に 2 mg/ml の濃度で溶解し、使用時まで $-20^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存した。

### 細胞培養およびアッセイ

ヘパリン採血の後、Ficoll-paque 比重遠心法にて末梢血単核細胞 (Peripheral blood mononuclear cells: PBMC) を得、 $2 \times 10^6/\text{ml}$  の濃度にて、AIM-V 培地に懸濁した。20 nM の Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) と  $1 \mu\text{M}$  の ionomycin (IOM) で 24 時間刺激した後、上清をハーベストした。一部の well は、抗 CD3 抗体 (OKT3,  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) で coat し、固相化抗 CD3 抗体刺激に用いた。抗 CD28 抗体は、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  で培養中に添加した。Crude アレルギーとしてダニアレルギー、*Candida albicans* 抗原などによる T 細胞からのサイトカイン産生を調べるため *Dermatophagoides farinae* (Der f) extract、*Candida albicans* extract、その他のアレルギー粗抗原エキス（鳥居薬品）の最終濃度 0.1、1、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$

を加えて6日間培養し、上清をハーベストした。サイトカイン産生の評価には、上清中の IL-2、IL-4、IL-5、IL-9、IL-13、IFN- $\gamma$  をそれぞれ特異的サンドイッチ ELISA 法にて測定した。リンパ球の増殖反応は  $10^5$  個の細胞を刺激後 6 日間培養した後、16 時間  $^3\text{H}$ -Thymidine パルスにて測定した。実験によっては、negative selection 法により CD4 細胞を enrich した。アトピー型喘息症例の PBMC を Der f 2 と培養し、得られたリンパ芽球を限界希釈法によりクローニングし、ダニアレルギー Der f 2 特異的ヘルパー T (Th) 細胞クローンを樹立した。さらに、autologous の PBMC を抗原提示細胞とし、抗原を加えて共培養することで subcloning、増殖せしめ、種々の活性化刺激に応答したサイトカイン産生、遺伝子発現、細胞増殖反応につき測定した。

### 培養平滑筋細胞アッセイ

ヒト気管支平滑筋細胞 (Cambrex 社) をコンフルエント条件に培養し、コラーゲンゲルに封入アプライした後、サンプルをアプライし、収縮を経時的に記録、解析した。*Candida albicans* acid protease (Secreted aspartic proteinase 2: SAP2) に反応して IgE 非依存性に遅発型喘息反応が惹起される非アトピー型喘息症例より、末梢血単核球 (PBMC) を得、SAP2 と培養し、上清を回収後、濃縮、透析、保存した。

### T細胞依存性気流閉塞メカニズムの解析 (in vivo)

既報の如く Balb/c マウスを OVA で感作し、所属リンパ節より感作リンパ球を回収、*in vitro* での抗原刺激、limiting dilution を行って、OVA 特異的 Th clone を樹立した (Kaminuma O. et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 16:448, 1997)。OVA 特異的 T 細胞受容体の transgenic である DO11.10 マウスからも同様の手法で Th clone を樹立した。Irradiated spleen cell を antigen-presenting cell とし、subcloning を行い、さらに expansion し、細胞移入実験に使用した。 $5 \times 10^6$  個の Th clone を無処置マウスに尾静脈より注入し (Day 0)、翌日 OVA あるいは OVA 部分ペプチド ( $P_{323-339}$ ) を経気道的に抗原チャレンジした。経時的に気道抵抗を BUXCO 社製非拘束下呼吸解析装置により測定した。さらに 48 hr 後、BUXCO にてメサコリン気道反応性を測定、気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、細胞数、分画を測定した。実験群によっては、麻酔下にレスピレータ装着し、気道抵抗解析装置にてモニターした。

### (倫理面への配慮)

倫理面の配慮として、患者を対象とする調査、検査において、また、ヒト由来の細胞、組織等の試料を用

いる場合には、ヘルシンキ宣言を遵守するとともに、わが国のヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）、疫学研究に関する倫理指針（平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号）、臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）を遵守した。インフォームドコンセントを徹底するとともに、症例はコード化し、プライバシーの保護に万全を期した。実施に先立って研究者の施設における倫理委員会の承認を得たうえで、倫理規定に従って実施した。実験動物を使用する場合、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）及び研究者の施設における動物実験に関する倫理規定を遵守した。実験間のばらつきを考慮した上で、統計学的有意性を議論しうる最小例数を算出し、その使用数を決定し、動物を保定、施術および致死させる場合は、最も苦痛を与えない方法を事前に検討した。

### C. 結果およびD. 考察

当研究班が実施した難治性喘息症例登録調査において、わが国のステロイド依存性喘息は、90%以上が成人発症で、70%が IgE 抗体の認められない非アトピー型喘息が占めていた。

表1. 重症喘息に関する疫学研究プログラム

	ENFUMOSA <sup>1</sup>	SARP <sup>2</sup>	難治性喘息研究班 <sup>3</sup>
症例数	163	204	93
年齢(歳)	42	41	62
性別(女性の%)	81	64	38
発症年齢(平均, 歳)	-	25	38
成人発症(%)	-	51	94
アトピー(%)	58	71	30
%FEV <sub>1</sub>	72	62	63
経口ステロイド常用者(%)	33	32	100

<sup>1</sup> ENFUMOSA study group. Eur Respir J 22:470, 2003

<sup>2</sup> Moore et al. J Allergy Clin Immunol 119:405, 2007

<sup>3</sup> 森晶夫ら 厚生科学研究(平成12-14年)「気管支喘息の難治化の病態・機序の解明と難治化の予防・治療法の開発に関する研究」

われわれは、非アトピー型喘息症例においても、T細胞レベルの IL-5 産生亢進が特徴的に認められ、IL-5産生誘導抗原に対して、IARを欠くLAR (isolated

LAR)が認められることを報告している。IgE抗体という液性免疫でなく、感作T細胞(細胞性免疫)の応答によって喘息反応が惹起されるとのコンセプトは新しい仮説である。そこで、本仮説を動物モデルで検証することを考えた。

T細胞依存性気流閉塞機序の解明と治療法研究に向けて、T細胞移入モデルを解析した。既に、T細胞クローンを無処理マウスに移入、抗原チャレンジを行うことにより、気道過敏性、肺好酸球浸潤を惹起するT細胞依存性喘息モデルを報告してきた(Kaminuma O., et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 16:448, 1997, Nakata A., et al. Int Immunol. 13:329, 2001, Kaminuma O., et al. Eur J Immunol. 31:2669, 2001)。今回は、T細胞クローン  $1 \times 10^7$  cells/head を無処理BALB/cマウスに経静脈的に移入し、24時間後にOVA経鼻あるいは吸入(噴霧)チャレンジを行い、経時的に気道抵抗を測定した。無拘束呼吸機能解析装置(BUXCO)を用いてPenh (enhanced pause) 値で表示した。また、麻酔下レスピレータ装着下に呼吸機能測定装置(BUXCO社)を用いて、直接呼吸抵抗を測定した。BALF好酸球の解析は、チャレンジ48時間後にBALを施行、総細胞数をカウントし、サイトスピンを用いてスライドガラスに接着させ、ギムザ染色を行い、好酸球数をカウントした。

図1に実験方法の概略を示す。DO11.10 transgenic mouse からOVA特異的Thクローンを樹立した。図2に実験プロトコールおよび結果を示す。Thクローン移入の24hr後にOVAまたは抗原エピソードのp323-339を経鼻的にチャレンジし、40hr後までPenh値を測定した(図2a)。計20個のクローンを解析し、T6-2、T6-4、T6-7の3個のクローンで、Penh上昇を認めた。p323-339の場合には、1hr後から、OVAの場合には2hr後から、Penh値が上昇し、40hr後まで持続した(図2c)。

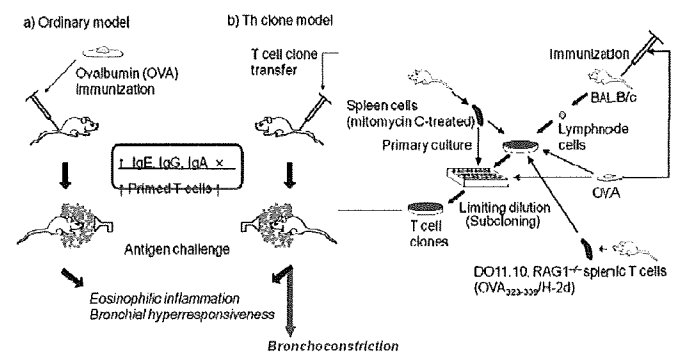
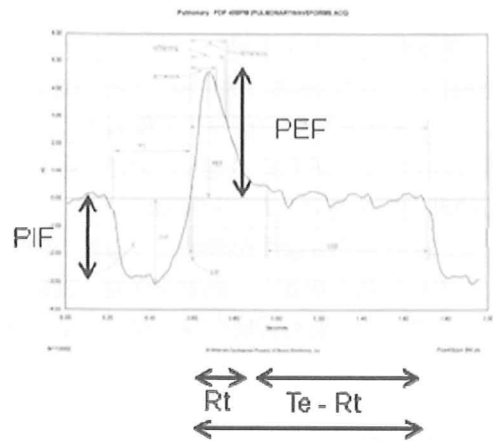
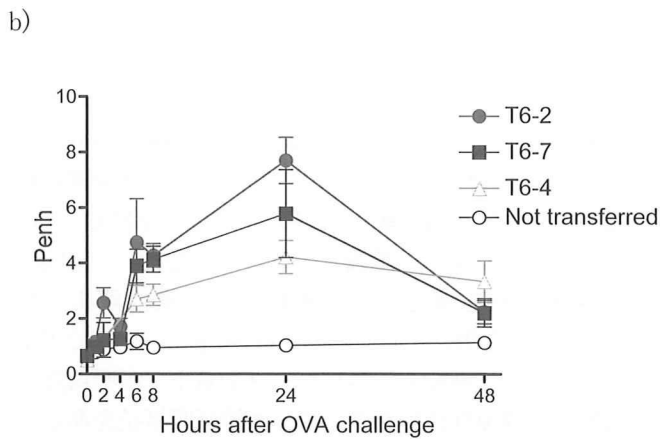
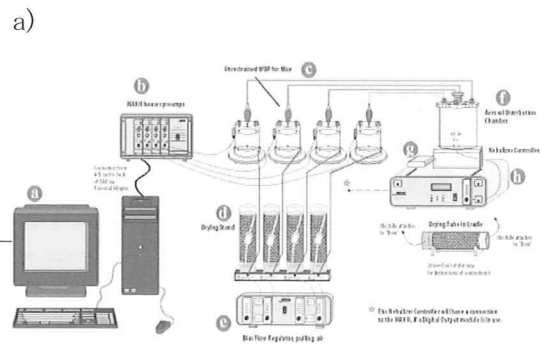
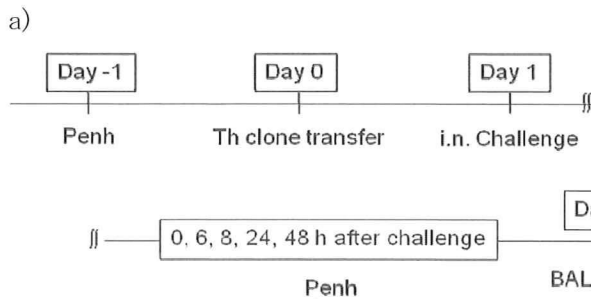
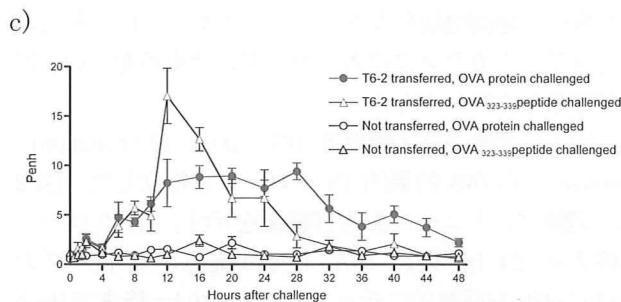


図1. Thクローン移入喘息モデル



$$\text{Penh} = \frac{\text{PEF}}{\text{PIF}} \times \left( \frac{\text{Te}}{\text{Rt}} - 1 \right)$$

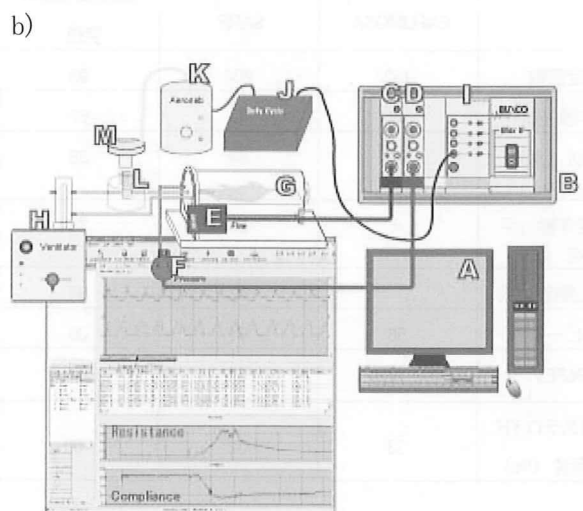
PEF: peak expiratory flow  
 PIF: peak inspiratory flow  
 Te: expiratory time  
 Rt: time to expire 65% of the "volume"  
 Penh: Enhanced Pause, PEF/PIF x Pause



\*, #, p<0.05 vs not transferred mice

図2、Th クローン移入後の Penh の推移  
 D011.10 transgenic mouse から OVA 特異的 Th クローンを樹立した。a) 実験スケジュール Th クローン移入の 24 hr 後に OVA または抗原エпитオプの p323-339 を経鼻的にチャレンジし、40 hr 後まで Penh 値を測定した。b) 計 20 個のクローンを解析し、T6-2、T6-4、T6-7 の 3 個のクローンで、Penh 上昇を認めた。c) p323-339 の場合は、1 hr 後から、OVA の場合には 2 hr 後から、Penh 値が上昇し、40 hr 後まで持続した。

さらに、麻酔下にレスピレータを装着、拘束下にダイレクトに気道抵抗値を計測した。この場合も、約 6 時間後から気道抵抗値 ( $R_L$ ) の上昇を認めた (図 3b)。



Raw: airway resistance  
 $R_L$ : lung resistance covariance,  
 lung resistance isovolumetric  
 $C_{dyn}$ : dynamic compliance covariance,  
 dynamic compliance isovolumetric

図3、2通りの気流閉塞測定方法  
 a) Unrestrained whole body plethysmography (BUXCO) for conscious animals、b) Resistance/compliance analyser (BUXCO) for anesthetized animals