

201023027A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森 晶夫

平成23(2011)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 _____ 15
森 晶夫
2. 重症難治性喘息の臨床的特徴と炎症細胞からみた
基礎的要因に関する研究 _____ 22
谷本 安
3. 喘息死の剖検例の肺病変部における炎症性サイトカイン発現の検討 _____ 30
相澤久道
4. 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 _____ 35
藤澤隆夫
5. 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 _____ 40
大田 健
6. 平滑筋リモデリング機序の実験的検討 _____ 44
庄司俊輔
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 ー 47
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 _____ 51
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 _____ 56
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

相沢久道（久留米大学医学部第一内科教授） 庄司俊輔（独）国立病院機構東京病院臨床研究部長
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）
谷本 安（岡山大学医学部歯学部附属病院血液・腫瘍・呼吸器内科）

研究協力者

安部暁美（国立病院機構相模原病院臨床研究センターリサーチレジデント） 北村紀子（同センター研究員）
神山智（同センター研究員） 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）
高橋 清（独）国立病院機構南岡山医療センター前院長 宗田 良（同院長）
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）
岡田千春（国立病院機構本部人材育成キャリア支援室） 片岡幹男（岡山大学大学院保健学研究科）
能島大輔（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科血液・腫瘍・呼吸器内科学） 早稲田公一（同左）
陳 妍妍（同上）
金廣有彦（岡山大学病院呼吸器・アレルギー内科） 宮原信明（同左）
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）
細木興五（三重大学大学院病態解明医学講座成育医学分野） 平口雪子（同左）
星野友昭（久留米大学呼吸器・神経・膠原病内科准教授） 川山智隆（同内科講師）
坂崎優樹（同上大学院生） 武井仁子（同上大学院生）
澤田昌典（同上大学院生） 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（高知大学副学長）
康峪梅（高知大学農学部教授） 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） 日下幸則（福井大学医学部教授）

研究要旨

今年度の本研究班の成果によって、1) T細胞レベルのステロイド抵抗性を *in vitro* と *in vivo* の両面で同時に解析可能な、ステロイド抵抗性、感受性喘息モデルがはじめて樹立できた、2) 成人喘息患者におけるEBC中のECPとIL-8は治療により修飾を受けるが、治療の反応性あるいは病態の違いにより動態が異なること、3) ヒト好塩基球は抗原提示細胞として気管支喘息の病態に関与する可能性があること、4) 気道上皮や炎症細胞により産生されたIL-18がCD8陽性T細胞表面に高発現するIL-18受容体を介してCD8陽性T細胞を活性化していること、5) 好酸球はPAF受容体を介してブドウ球菌と反応し、ステロイド不応性の非Th2型炎症とリモデリングを誘導することから、PAF受容体阻害は難治性喘息の新たな治療手段となる可能性があること、6) 喘息の発病・増悪に関する因子として近年注目されている代謝異常症について、糖代謝異常に伴って体内で生成されるAGEが好塩基球機能に影響を与えること、7) 気道平滑筋細胞が肺線維芽細胞より産生・放出されたフィブロネクチンを認識し、結合組織から気道上皮下の基底膜方向へと遊走すること、8) アジュバントフリーのダニ抗原感作による喘息様病態形成、先行するウィルス感染による増悪にはIL-13が重要な役割を有すること、9) アルギナーゼ2の遺伝子多型および喫煙とアルギナーゼ1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、ニコチン代謝における抗酸化ストレス応答活性の低下と喘息重症化が関連すること、10) 非晶質鉄フィル

ターと活性炭フィルターを組み合わせで構成されている開発中の本フィルターは、DEP 特に PAHs によるアレルギー促進作用を抑制し、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

吸入ステロイドをファーストチョイスとする薬物療法ガイドラインの普及により、軽症ないし中等症の喘息においては著しい予後・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) study¹⁾、欧州12カ国共同研究の ENFUMOSA (European Network For Understanding Mechanisms Of Severe Asthma) study²⁾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出ししてきたので、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 (研究代表者) らは、既報の Th clone 受身移入喘息モデルを活用し (Kaminuma O. et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 16:448, 1997)、Th細胞のステロイド感受性を *in vitro*、*in vivo*で比較、検討した。5 x 10⁶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 を経気道的に抗原チャレンジした。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。1, 3 mg/kg のデキサメサゾン (DEX) を Day 1, 2 に皮下投与した。*in vitro*のステロイド感受性は、4 x 10⁴個の Th clone を抗原提示細胞、抗原、各濃度の DEX とともに 96 well culture plate にて培養し、48 時間後に上清を採取、72 時間後に細胞増殖反応を計測した。
- 2) 谷本 (岡山大学) らは、治療下の成人喘息症例を

対象に、EBC中のECPとIL-8を測定し、JGL2009に基づいた症状、治療ステップ、治療を考慮した重症度、呼吸機能との関連を検討した。また、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。

3) 相沢(久留米大学)らは、喘息死12例、肺癌切除術を施行した非喫煙の軽症喘息5名及び非喫煙者コントロール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。

4) 藤澤(三重病院)らは、末梢血よりCD16negative selection法により分離した好酸球を用い、Staphylococcus aureus(SA)標準株に対する反応性を、上清中に遊離したEDNをELISA法で、サイトカイン/ケモカインをビーズアレイシステムにて、活性酸素産生をチトクロームC還元法により定量した。CD49d発現をフローサイトメトリーにて、fibronectin接着能を蛍光プレートリーダーで計測した。

5) 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、種々の濃度のAGE(試薬としてはAGE-BSA)または対照のBSAを添加し、好塩基球の脱顆粒、CD11b発現、遊走、生存を解析するとともに、AGEの受容体(RAGE)発現とその制御を検討した。

6) 庄司(東京病院)らは、正常ヒト肺線維芽細胞(Lonza社)培養上清に対する気管支平滑筋細胞の遊走を48穴ボイデンチャンバーにより検討した。抗フィブロネクチン抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。

7) 田中(岐阜薬大)らは、二本鎖RNAのpoly ICを先行投与したアジュバントfree喘息モデルにおいて、抗IL-13抗体を感作成立後(治療的なタイミング)に投与した。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。

8) 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、アルギナーゼ1のrs2749935(A/T)とrs2781659(A/G)、アルギナーゼ2のrs12885261(C/T)、rs3742879(A/G)の遺伝子多型の遺伝子多型につき、患者対照研究(相関解析)を実施した。

9) 中村(金沢大学)らは、DEP抽出物およびその成分である芳香族炭化水素ナフタレン、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-ニトロフェノールバソについて、開発した化学物質の除去を目的とした非晶鉄および活性炭を含むフィルターの除去能を評価した。

(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

1) *in vitro*のステロイド感受性解析により、6種類のTh cloneは、DEXにより細胞増殖反応が抑制されるsteroid sensitive(SS) clone BF7, T6-2, T6-10と抑制されないsteroid resistant(SR) clone T5-1, T6-4, T6-7とに分類された。サイトカイン産生は、SR cloneのほうがIC₅₀値が高いものの、抑制された。SS cloneを移入されたマウスでは、BALF好酸球浸潤がDEX投与により有意に抑制された。一方、SR cloneを移入された喘息マウスでは、1個のSR clone T5-1移入モデルにおいてのみ、好酸球浸潤が30%抑制されたものの、残りの2 cloneでは全く抑制されなかった。T細胞移入喘息モデルにおける個体レベルのステロイド感受性は、移入されるTh cloneの*in vitro*におけるステロイド感受性によって規定されることが明らかになった。

2) 治療下における成人喘息患者のEBC中のECPとIL-8について検討したところ、EBC中のECPやIL-8は、症状・治療ステップ・治療を考慮した重症度や呼吸機能との間に有意な関連を認めなかった。また、各々血清中のECPやIL-8との間にも相関がみられなかった。一方、EBC中のECPはIL-8との間に強い負の相関を示した。治療下での成人喘息において、EBC中ECP高値・IL-8低値群とECP低値・IL-8高値群の2群に大別できた。未刺激下の末梢血好塩基球、末梢血幹細胞

培養好塩基球には HLA-DR、CD80、CD86 の発現はみられなかったが、IL-3 の 24 時間刺激によって HLA-DR、CD80 の発現が誘導された。ヒト好塩基球がアレルギー性炎症において抗原提示能を有する可能性が考えられた。

3) 喘息死患者の気道では、CD4 陽性 T 細胞は軽症喘息と同等に非喫煙者より増加していた。一方 CD8 陽性 T 細胞は軽症喘息と非喫煙者に比べ著明に増加していた。炎症性サイトカイン IL-18 は喘息死患者の気道、肺上皮と炎症細胞に強く発現していた。一方、軽症喘息患者やコントロール正常肺では弱く発現していた。喘息死患者の肺病変部で増えている CD8 陽性 T 細胞は IL-18 受容体をほとんど 100% 発現していた。また、これら CD8 陽性 T 細胞は IL-18 をほとんど 100% 膜表面に発現していた。

4) SA は用量依存的に脱顆粒、活性酸素産生を誘導した。IL-5 が SA による脱顆粒を、IL-5、IFN- γ 、IL-17 が SA による活性酸素産生を強く増強した。SA は CD49d 発現を増強し、Fibronectin への好酸球接着を誘導した。SA 刺激により IL-17、TNF- α 、IP-10、FGF-basic、VEGF など多種のサイトカイン/ケモカインの産生誘導が認められた。PAF 受容体ブロックングペプチドは脱顆粒、活性酸素産生、接着、TNF- α 産生を有意に抑制した。ブドウ球菌感染と喘息難治化の関連を示唆する。PAF 受容体を介することを初めて明らかにした。5) IL-3 の存在下で好塩基球細胞表面に RAGE 発現量が増加した。AGE 自体も RAGE 発現量が増加する傾向がみられた。AGE-BSA 1 mg/ml 下で生細胞の減少、apoptosis の増加がみられた。AGE-BSA 1 mg/ml overnight 刺激により、好塩基球からの IL-6、IL-8 産生が認められた。好塩基球機能変化が、代謝異常症と喘息重症化の関連メカニズムの一つとして示唆される。

6) 肺線維芽細胞培養上清中には、気管支平滑筋細胞遊走活性が存在し、抗フィブロネクチン抗体を用いた肺線維芽細胞上清のウェスタンブロッティング法にて、200kDa 以上の分子領域に 2 本のバンドが確認された。肺線維芽細胞培養上清に含まれるフィブロネクチンが気管支平滑筋細胞遊走因子として作用する可能性が示唆される。

7) マウスに poly IC を先行投与し、少量のダニ抗原を反復気管内投与することにより、喘息様病態が形成された。抗 IL-13 抗体は、気道過敏性ならびに好酸球増多性の気道炎症を用量依存的かつ有意に抑制した。

8) アルギナーゼ 2 の遺伝子多型 rs12885261 (C/T)、rs3742879 (A/G) と喘息重症化との関連が認められた。また、喫煙者においてのみ、アルギナーゼ 1 の遺伝子多型 rs2781659 (A/G) と喘息重症化との関連が示され

た。喫煙とアルギナーゼ 1 の遺伝子との相互作用が示唆された。

9) DEP 構成成分のフルオランテン、ナフタレンは、既存のフィルターで除去が可能であったが、ベンゾ (a) アントラセンに対しては非晶質鉄フィルターが効果的であり、p-ニトロフェノールに対しては活性炭フィルターが効果的であった。非晶質鉄フィルターと活性炭フィルターを組み合わせる構成されている本フィルターはアレルギー反応を抑制できることから、喘息の重症化予防に有効であることが示された。

E. 結論

今年度の本研究班の成果によって、1) T 細胞レベルのステロイド抵抗性を *in vitro* と *in vivo* の両面で同時に解析可能な、ステロイド抵抗性、感受性喘息モデルがはじめて樹立できた、2) 成人喘息患者における EBC 中の ECP と IL-8 は治療により修飾を受けるが、治療の反応性あるいは病態の違いにより動態が異なること、3) ヒト好塩基球は抗原提示細胞として気管支喘息の病態に関与する可能性があること、4) 気道上皮や炎症細胞により産生された IL-18 が CD8 陽性 T 細胞表面に高発現する IL-18 受容体を介して CD8 陽性 T 細胞を活性化していること、5) 好酸球は PAF 受容体を介してブドウ球菌と反応し、ステロイド不応性の非 Th2 型炎症とリモデリングを誘導することから、PAF 受容体阻害は難治性喘息の新たな治療手段となる可能性があること、6) 喘息の発病・増悪に関する因子として近年注目されている代謝異常症について、糖代謝異常に伴って体内で生成される AGE が好塩基球機能に影響を与えること、7) 気道平滑筋細胞が肺線維芽細胞より産生・放出されたフィブロネクチンを認識し、結合組織から気道上皮下の基底膜方向へと遊走すること、8) アジュバントフリーのダニ抗原感作による喘息様病態形成、先行するウイルス感染による増悪には IL-13 が重要な役割を有すること、9) アルギナーゼ 2 の遺伝子多型および喫煙とアルギナーゼ 1 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、ニコチン代謝における抗酸化ストレス応答活性の低下と喘息重症化が関連すること、10) 非晶質鉄フィルターと活性炭フィルターを組み合わせる構成されている開発中の本フィルターは、DEP 特に PAHs によるアレルギー促進作用を抑制し、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. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Abe, A., Ohtomo, T., Koyama, S., Kitamura, N., Kaminuma, O., and Mori, A. 2011. Comparative analysis of steroid sensitivity of Th cells *in vitro* and *in vivo*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)
2. Kitamura, N., Mori, A., Tatsumi, H., Nemoto, S., Hiroi, T., and Kaminuma, O. 2011. Zinc finger protein, multitype 1 suppresses human Th2 development via down-regulation of IL-4. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)
3. Ohtomo, T., Kaminuma, O., Yamada, J., Kitamura, N., Suko, M., Kobayashi, N., and Mori, A. 2010. Eosinophils are required for the induction of bronchial hyperresponsiveness in a Th transfer model of Balb/c background. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 152 (Suppl 1):79-82.
4. 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.* 152 (Suppl 1):18-21.
5. Kaminuma, O., Suzuki, K., and Mori, A. 2010. Effect of sublingual immunotherapy on antigen-induced bronchial and nasal inflammation in mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 152 (Suppl. 1):75-78.
6. Katoh, S., Maeda, S., Fukuoka, H., Wada, T., Moriya, S., Mori, A., Yamaguchi, K., Senda, S., and Miyagi, T. 2010. A crucial role of sialidase Neul in hyaluronan receptor function of CD44 in T helper type 2-mediated airway inflammation of murine acute asthmatic model. *Clin. Exp. Immunol.* 161 (2):233-241.
7. 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.
8. Seki, M., Kimura, H., Mori, A., Shimada, A., Yamada, Y., Maruyama, K., Hayashi, Y., Agematsu, K., Morio, T., Yachie, A., and Kato, M. 2010. Prominent eosinophilia but less eosinophil activation in a patient with Omenn syndrome. *Pediatr. Int.* 52:e196-e199.
9. 森 晶夫:真菌アレルギー—最近の話題—自然免疫、獲得免疫と真菌、アレルギーの臨床;30 (1):30-32, 2010
10. 森 晶夫:重症喘息の機序とその対策、臨床免疫・アレルギー科;53 (2):167-173, 2010
11. 森 晶夫:国際アレルギー学会(WAO)2009報告、日本アレルギー協会関東支部だより;7:3-5, 2010
12. 森 晶夫:炎症性メディエータとアレルギー疾患、Topics in Atopy;9(2):37-43, 2010
13. 福富友馬、谷口正実、東 典孝、石井豊太、龍野清香、谷本英則、押方智也子、小野恵美子、関谷潔史、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、秋山一男:成人喘息患者における持続的気流閉塞—臨床的見地から—、第11回喘息リモデリング研究会、呼吸;29(5):535-537, 2010
14. 神沼 修、加藤茂樹、森 晶夫:T細胞の遊走と CD44、臨床免疫・アレルギー科;53(6):551-555, 2010
15. 森 晶夫、北村紀子、安部暁美、山口美也子、谷本英則、関谷潔史、押方智也子、福富友馬、大友 守、前田裕二、谷口正実、長谷川眞紀、秋山一男、大友隆之、神沼 修:わが国の重症難治性喘息の病態と治療、第50回日本呼吸器学会学術講演会ハイライト:2-4, 2010
16. 森 晶夫:非アトピー型喘息、The 17th Symposium of Asthma in Tokyo、ライフサイエンス出版、東京 p.62-68, 2010
17. 森 晶夫:コーヒーとぜんそく、コーヒーの医学(野田 光彦編)、日本評論社、東京 p.199-201, 2010
18. 森 晶夫:アレルギー性疾患関連の分子を標的とした治療、総合アレルギー学(福田 健編)、南山堂、東京 p.690-695, 2010
19. 森 晶夫:難治性喘息の今日的な定義および診断・治療の課題を検討する、~抗体治療時代の~気管支喘息治療の新たなストラテジー(大田健編)、先端医学社、東京 p.22-29, 2010
20. 森 晶夫:高IgE症候群、呼吸;30(2):151-153, 2011
21. Matsuo T, Ichimura K, Sato Y, Tanimoto Y, Kiura K, Kanazawa S, Okada T, Yoshino T. Immunoglobulin G4 (IgG4)-positive or -negative ocular adnexal benign lymphoid

- lesions in relation to systemic involvement. *J Clin Exp Hematopathol* 50: 129-142, 2010.
22. Fukutomi Y, Nakamura H, Kobayashi F, Taniguchi M, Konno S, Nishimura M, Kawagishi Y, Watanabe J, Komase Y, Akamatsu Y, Okada C, Tanimoto Y, Takahashi K, Kimura T, Eboshida A, Hirota R, Ikei J, Odajima H, Nakagawa T, Akasawa A, Akiyama K. Nationwide cross-sectional population-based study on the prevalences of asthma and asthma symptoms among Japanese adults. *Int Arch Allergy Immunol* 153: 280-7, 2010.
 23. Iio K, Ueno-Iio T, Okui Y, Ichikawa H, Tanimoto Y, Miyahara N, Kanehiro A, Tanimoto M, Nakata Y, Kataoka M. Experimental pulmonary granuloma mimicking sarcoidosis induced by Propionobacterium acnes in mice. *Acta Med Okayama* 64: 75-83, 2010.
 24. 能島大輔, 谷本 安. 特集 アレルギーと炎症細胞 アレルギー性炎症における好塩基球の役割. 臨床免疫・アレルギー科 53: 486-90, 2010.
 25. 谷本 安. 特集 One airway, one disease One airway, one disease の治療戦略—アレルギー免疫療法—. 喘息 23: 50-5, 2010.
 26. 谷本 安, 能島大輔. アレルギー性炎症における好塩基球のあらたな役割. —好塩基球は免疫・アレルギー反応を調節する細胞である—. 医学のあゆみ 233: 61-5, 2010.
 27. Matsunaga K, Hirano T, Kawayama T, Tsuburai T, Nagase H, Aizawa H, Akiyama K, Ohta K, Ichinose M. Reference Ranges for Exhaled Nitric Oxide Fraction in Healthy Japanese Adult Population. *Allergol Int.* 2010 Aug 25;59. [Epub ahead of print].
 28. Miura S, Shibata H, Kida H, Noda K, Toyama T, Iwasaki N, Iwaki A, Ayabe M, Aizawa H, Taniwaki T, Fukumaki Y. Partial SPAST and DPY30 deletions in a Japanese spastic paraplegia type 4 family. *Neurogenetics* 2010 Sep 22. [Epub ahead of print].
 29. Kurata S, Ishibashi M, Azuma K, Kaida H, Takamori S, Fujimoto K, Kobayashi M, Hirose Y, Aizawa H, Hayabuchi N. Preliminary study of positron emission tomography/computed tomography and plasma osteopontin levels in patients with asbestos-related pleural disease. *Jpn J Radiol.* 2010;28:446-52.
 30. Miura S, Azuma K, Yamada K, Takamori S, Kawahara A, Noda K, Ayabe M, Kage M, Aizawa H, Taniwaki T. Combined treatment with prednisolone and tacrolimus for myasthenia gravis with invasive thymoma. *Acta Neurol Belg.* 2010;110:107-9.
 31. Imamura Y, Azuma K, Kurata S, Hattori S, Sasada T, Kinoshita T, Okamoto M, Kawayama T, Kaida H, Ishibashi M, Aizawa H. Prognostic value of SUVmax measurements obtained by FDG-PET in patients with non-small cell lung cancer receiving chemotherapy. *Lung Cancer* 2010 Apr 27. [Epub ahead of print].
 32. Kawahara A, Yamamoto C, Nakashima K, Azuma K, Hattori S, Kashihara M, Aizawa H, Basaki Y, Kuwano M, Kage M, Mitsudomi T, Ono M. Molecular diagnosis of activating EGFR mutations in non-small cell lung cancer using mutation-specific antibodies for immunohistochemical analysis. *Clin Cancer Res.* 2010;16:3163-70.
 33. Kawahara A, Azuma K, Hattori S, Nakashima K, Basaki Y, Akiba J, Takamori S, Aizawa H, Yanagawa T, Izumi H, Kohno K, Kono S, Kage M, Kuwano M, Ono M. The close correlation between 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and epidermal growth factor receptor activating mutation in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol.* 2010;41:951-9.
 34. 相澤久道, 中村雅之, 福島徳子: 考慮するべきさまざまな側面. 呼吸器内科 2010;18(5):437-442.
 35. 相澤久道, 松本恵太, 佐々木潤: 高齢者喘息と COPD: 実地臨床でのとらえ方. 呼吸器内科 2010;18(3):279-281.
 36. 相澤久道: 気管支喘息の外来診療. 呼吸器内科 2010;18:101-106.
 37. 相澤久道: 注目の新薬 シムビコート(ブデソニド・ホルモテロール配合剤). 診断と治療 2010;98(9):1533-1537.
 38. 相澤久道, 澤田昌典, 園部伸恵: 日常診療における COPD 患者の状態評価—COPD アセスメントテスト(CAT)日本語版の利用—. *International Review of Asthma & COPD* 2010;12:39-46.
 39. 相澤久道: COPD 急性増悪と喘息急性増悪との違い. アレルギーの臨床 2010;30:44-49.
 40. 相澤久道, 澤田昌典, 園部伸恵: COPD アセス

- メントテスト (CAT) 日本語版. 吸入療法 2010;2:18-23.
41. 相澤久道, 澤田昌典, 園部伸恵: COPD の重症度と新しくなった薬物療法. 治療 2010;92:1811-1816.
 42. 相澤久道, 園部伸恵: 喫煙と肺年齢. 呼吸器内科 2010;17:482-486.
 43. 相澤久道, 伊藤光佑: 10. COPD の管理と治療. ①管理の目標. 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) のマネジメント改訂版 72-78, 2010.
 44. 相澤久道, 伊藤光佑: 1. COPD とは. 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) のマネジメント改訂版 10-15, 2010.
 45. 相澤久道: 5 呼吸器疾患. 呼吸器疾患 最近の動向. 今日の治療指針 私はこう治療している 226-230, 2010.
 46. Kim, C. K., J. Choi, H. B. Kim, Z. Callaway, B. M. Shin, J. T. Kim, T. Fujisawa, and Y. Y. Koh. 2010. A randomized intervention of montelukast for post-bronchiolitis: effect on eosinophil degranulation. *J. Pediatr.* 156:749-754. (May)
 47. Choi, J., Z. Callaway, H. B. Kim, T. Fujisawa, and C. K. Kim. 2010. The role of TNF-alpha in eosinophilic inflammation associated with RSV bronchiolitis. *Pediatr Allergy Immunol.*
 48. Hosoki K, Nakamura A, Nagao M, Hiraguchi Y, Tokuda R, Wada H, Wada, H. Nobori, T. Fujisawa, T. Differential activation of eosinophils by 'probiotic' *Bifidobacterium bifidum* and 'pathogenic' *Clostridium difficile*. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; 152:83-9.
 49. 藤澤隆夫 好酸球の細胞生物学 総合アレルギー学(福田健 編)改訂2版 2010年 南山堂 東京
 50. 藤澤隆夫 アレルギーを理解するための基礎知識:好酸球 アレルギー疾患イラストレイテッド メディカルレビュー社 東京 2010
 51. 藤澤隆夫 最新の喘息ガイドラインのポイント:小児喘息のガイドライン 医学のあゆみ 233(1):19-24, 2010
 52. 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* 30(3):181-185, 2010.
 53. Toda T, Yamaguchi M, Nakase Y, Sugimoto N, Suzukawa M, Nagase H, Ohta K. A case of anaphylactic reaction following Matsutake mushroom ingestion: Demonstration of histamine release reaction of basophils. *Allergol Int* 59(4): 417-419, 2010.
 54. Han K, Suzukawa M, Yamaguchi M, Sugimoto N, Nakase Y, Toda T, Nagase H, Ohta K. The in vitro effects of advanced glycation endproducts (AGEs) on basophil functions. *Int Arch Allergy Immunol*, in press.
 55. 大田健:最新の喘息ガイドラインのポイント 成人喘息のガイドライン. 医学のあゆみ 233(1):15-18, 2010.
 56. 大田健:重症喘息と喘息死の現況と対策 わが国の喘息死の現況. *Mebio* 27(9): 27-33, 2010.
 57. 大田健. 最新の喘息予防・管理ガイドライン JGL2009 . 東京都医師会雑誌 63(5):596-600, 2010.
 58. 大田健:最新の喘息予防・治療ガイドライン 2009(JGL2009)に沿った成人喘息の治療. 日本薬剤師会雑誌 62(10):1305-1308, 2010.
 59. 大田健:臨床最前線 最新の喘息予防・管理ガイドライン JGL2009 . *Allergia Trends* 12(2):21, 2010.
 60. 大田健:喘息予防・管理ガイドライン 2009 JGL2009 のポイント. 日本病院薬剤師会雑誌 46(9): 1237-1239, 2010.
 61. Machiko Nishihara-Fujihara, Shunsuke Shoji, Iori Maeda, Terufumi Shimoda, Sankei Nishina, Koji Okamoto. Involvement of fibronectin and matrix metalloproteinases in airway smooth muscle cell migration for the process of airway remodeling. *Allergology International* 59(3): 267-275, 2010.
 62. Fukutomi Y, Nakamura H, Kobayashi F, Taniguchi M, Konno S, Nishimura M, Kawagishi Y, Watanabe J, Komase Y, Akamatsu Y, Okada C, Tanimoto Y, Takahashi K, Kimura T, Eboshida A, Hirota R, Ikei J, Odajima H, Nakagawa T, Akasawa A, Akiyama K. Nationwide cross-sectional population-based study on the prevalences of asthma and asthma symptoms among Japanese adults. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010;153(3):280-7.
 63. Usui C, Hatta K, Doi N, Nakanishi A, Nakamura H, Nishioka K, Arai H: Brain perfusion in

- fibromyalgia patients and its differences between responders and poor responders to gabapentin. *Arthritis Res Ther.* 12(2):R64(2010)
64. Hatta K, Usui C, Nakamura H, Kurosawa H, Arai H: Open wards versus locked wards of general hospitals in the treatment of psychiatric patients with medical comorbidities: a cross-sectional study in Tokyo. *Psychiatry Clin Neurosci.* 64(1):52-6(2010)
65. Hirota R, Roger NN, Nakamura H, Song HS, Sawamura M, Suganuma N: Anti-inflammatory effects of limonene from yuzu (Citrus junos Tanaka) essential oil on eosinophils. *J Food Sci.* 75(3):H87-92(2010)
66. 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 multicentre study of intravenous medications in behavioural emergencies: haloperidol versus flunitrazepam. *Psychiatry Res.* 178(1):182-185(2010)
67. Higuchi M, Hatta K, Honma T, Hitomi YH, Kambayashi Y, Hibino Y, Matsuzaki I, Sasahara S, Nakamura H: Association between altered systemic inflammatory interleukin-1 β and natural killer cell activity and subsequently agitation in patients with alzheimer disease. *Int J Geriatr Psychiatry.* 25(6):604-11(2010)
68. Konoshita T, Makino Y, Kimura T, Fujii M, Wakahara S, Arakawa K, Inoki I, Nakamura H, Miyamori I, Genomic Disease Outcome Consortium Study Investigators: A new-generation N/L-type calcium channel blocker leads to less activation of the renin-angiotensin system compared with conventional L type calcium channel blocker. *J Hypertens.* 28(10):2156-60(2010)
69. Umeda T, Sasahara S, Tomotsune Y, Yoshino S, Usami K, Haoka T, Ohi Y, Nakamura H, Matsuzaki I: Relationship Between Sense of Coherence and Depression among Workers: A Large-scale Epidemiologic Survey in Tsukuba Science City. *J Phys Fit Nutri Immunol.* 20(1):3-10(2010)
70. Sauriasari R, Sakano N, Wang DH, Takaki J, Takemoto K, Wang B, Sugiyama H, Sato Y, Takigawa T, Takahashi N, Kanbara S, Hitomi Y, Nakamura H, Ogino K: C-reactive protein is associated with cigarette smoking-induced hyperfiltration and proteinuria in an apparently healthy population. *Hypertens Res* 33:1129- 1136(2010)
71. Fukutomi Y, Itagaki Y, Taniguchi M, Saito A, Yasueda H, Nakazawa T, Hasegawa M, Nakamura H, Akiyama K. Rhinoconjunctival sensitization to hydrolyzed wheat protein in facial soap can induce wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 127(2):531-533(2011)
72. 中村裕之、人見嘉哲、神林康弘、日比野由利、柴田亜樹、弘田量二、福富友馬、松崎一葉、烏帽子田彰 環境衛生の面より考える思春期のアレルギー *思春期学*. 29(1), 2011(in press)
73. 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.* 110; 192-202: 2010.
74. Komai M, Tanaka H, Nagao K, Ishizaki M, Kajiwarra D, Miura T, Ohashi H, 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.* 112; 203-213: 2010.
75. Tsuji F, Murai M, Oki K, Inoue H, Sasano M, Tanaka H, Inagaki N, Aono H: Effects of SA13353, a transient receptor potential vanilloid 1 agonist, on leukocyte infiltration in lipopolysaccharide-induced acute lung injury and ovalbumin-induced allergic airway inflammation. *J. Pharmacol. Sci.* 112; 487-490: 2010.
2. 学会発表
1. Kaminuma, O., Kitamura, N., Mori, A., Nemoto, S., Tatsumi, H., Miyoshi, H., Miyatake, S., Kitamura, F., Yamaoka, K., and Hiroi, T. Human Th2 cells produce IFN- γ due to hyper-expression of T-bet. 2010 American

- Academy of Allergy, Asthma, and Immunology Annual Meeting. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125(2) Suppl. 1:AB144 (New Orleans) 2010/2/26-3/2
2. Mori A, Kitamura N, Ohtomo T, Abe, A., and Kaminuma O. 2010. Analysis of T cell-dependent bronchoconstriction using human cultured bronchial smooth muscle cells. Collegium International Allergologicum 27th SYMPOSIUM. Final program p.67 (Ischia) 2010/4/25-30
 3. Mori A, Kitamura N, Ohtomo T, Abe, A., and Kaminuma O. 2010. T cell-dependent bronchoconstriction *in vivo* and *in vitro*. European Association of Allergy and Clinical Immunology 2010. Allergy 65 (Suppl. 92):69 (London) 2010/6/5-9
 4. Tanimoto, H., Taniguchi, M., Sekiya, A., Mori, A., and Akiyama K. 2010. Efficacy of systemic corticosteroids in refractory asthmatics showing no bronchial reversibility with high-dose inhaled corticosteroids or β agonist inhalation. European Respiratory Society 2010. P4662 (Barcelona) 2010/09/18-22
 5. Mori A, Kitamura N, Abe, A., Ohtomo T, and Kaminuma O. 2010. Role of T cells in late phase asthmatic response. The 8th Asia Pacific Congress of Allergy, Asthma, and Clinical Immunology 2010. Programme & Abstracts Handbook p.87 (Singapore) 2010/11/6-9
 6. Mitsui C., Taniguchi M., Higashi N., Ono E., Kajiwara K., Hukutomi Y., Tsuburai T., Sekiya K., Tanimoto H., Ishii T., Mori A., Mita H., Hasegawa M. and Akiyama K. Cysteinyl-Leukotriens overproduction and the asthma severity in patients with aspirin-induced asthma. World Allergy Organization International Scientific Conference. Final program p.100 (Dubai) 2010/12/5-8
 7. 押方智也子、釣木澤尚美、齋藤明美、中澤卓也、齋藤博士、粒来崇博、龍野清香、谷本英則、福富友馬、関谷潔史、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：アトピー型成人喘息患者における環境中ダニアレルゲン量モニタリングの有用性の検討、第50回日本呼吸器学会学術講演会、日本呼吸器学会雑誌 48：175, 2010. 4. 23 (京都)
 8. 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、森 晶夫、前田裕二、長谷川眞紀、秋山一男：若年成人喘息大発作入院症例における臨床的背景の検討、第50回日本呼吸器学会学術講演会、日本呼吸器学会雑誌 48：335, 2010. 4. 25 (京都)
 9. 福富友馬、谷口正実、粒来崇博、龍野清香、谷本英則、押方智也子、小野恵美子、関谷潔史、釣木澤尚美、東 憲孝、中澤卓也、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：成人喘息難治化因子の臨床的検討～特に性差に注目して～、第50回日本呼吸器学会学術講演会、日本呼吸器学会雑誌 48：336, 2010. 4. 25 (京都)
 10. 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、中澤卓也、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安定している喘息患者における呼気NO高値の予測因子である、第50回日本呼吸器学会学術講演会、日本呼吸器学会雑誌 48：363, 2010. 4. 25 (京都)
 11. 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、東 憲孝、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：若年成人の喘息大発作はここ10年でどう変化したのか、第22回日本アレルギー学会春期臨床大会、アレルギー 59：376, 2010. 5. 8 (京都)
 12. 谷本英則、谷口正実、竹内保雄、齋藤明美、武市清香、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：ABPA-Seropositiveの臨床的検討、第22回日本アレルギー学会春期臨床大会、アレルギー 59：378, 2010. 5. 8 (京都)
 13. 押方智也子、釣木澤尚美、齋藤明美、中澤卓也、齋藤博士、粒来崇博、武市清香、谷本英則、関谷潔史、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：成人喘息患者における超極細線維フトンカバーによる環境調整の有用性に関する検討、第22回日本アレルギー学会春期臨床大会、アレルギー 59：385, 2010. 5. 8 (京都)
 14. 齋藤明美、押方智也子、釣木澤尚美、粒来崇博、龍野清香、谷本英則、福富友馬、関谷潔史、谷口正実、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、田中 昭、池田玲子、中澤卓也、安枝 浩、秋山一男：過敏性肺炎における沈降抗体反応とイムノキャップTaの有用性、第22回日本アレルギー学会春期臨床大会、アレルギー 59：385, 2010. 5. 8 (京都)

- 一学会春期臨床大会、アレルギー 59 : 414, 2010. 5. 8 (京都)
15. 武市清香、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、中澤卓也、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安定している喘息患者における呼気NO高値の予測因子である、第20回国際喘息学会日本・北アジア部会 プログラム・抄録集 p. 59, 2010. 7. 2-3 (東京)
 16. 関谷潔史、谷口正実、福富友馬、武市清香、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：若年成人喘息大発作入院症例における臨床背景の変化、第20回国際喘息学会日本・北アジア部会 プログラム・抄録集 p. 61, 2010. 7. 2-3 (東京)
 17. 谷本英則、谷口正実、竹内保雄、齋藤明美、武市清香、福富友馬、関谷潔史、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43例の臨床的検討、第20回国際喘息学会日本・北アジア部会 プログラム・抄録集 p. 62, 2010. 7. 2-3 (東京)
 18. 押方智也子、釣木澤尚美、齋藤明美、齋藤博士、粒来崇博、谷本英則、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：アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 (ABPA) とアスペルギルスに感作された成人喘息 (FSBA) のアレルギー特異的 IgE 抗体に関する比較検討、第20回国際喘息学会日本・北アジア部会 プログラム・抄録集 p. 69, 2010. 7. 2-3 (東京)
 19. 神沼 修、北村紀子、北村ふじ子、巽 英樹、根本莊一、宮武昌一郎、三好浩之、森 晶夫、廣井隆親：ヒトTh1/Th2分化に対するZFPM1の役割、アレルギー・好酸球研究会 2010、抄録集 p. 21, 2010. 6. 19 (東京)
 20. 安部暁美、大友隆之、神山 智、北村紀子、神沼修、森 晶夫：T細胞クローン移入喘息モデルによるステロイド感受性解析、アレルギー・好酸球研究会 2010、抄録集 p. 36, 2010. 6. 19 (東京)
 21. 森 晶夫、北村紀子、安部暁美、荒川真理子、山口美也子、神山 智、福富友馬、谷本英則、押方智也子、関谷潔史、大友 守、谷口正実、前田裕二、長谷川眞紀、秋山一男、大友隆之、神沼 修：ワークショップ7「難治性アレルギー疾患における真菌の役割」わが国の重症喘息の病態と真菌抗原による非IgE依存性喘息反応、第60回日本アレルギー学術秋季学術大会、アレルギー 59 (9) : 1283, 2010. 11. 27 (東京)
 22. 神沼 修、北村紀子、森 晶夫、巽 英樹、根本莊一、廣井隆親：ZFPM1/CtBP1コンプレックスはGATA-3によるTh2分化を抑制する、第60回日本アレルギー学術秋季学術大会、アレルギー 59 (9) : 1399, 2010. 11. 26 (東京)
 23. 押方智也子、釣木澤尚美、齋藤明美、齋藤博士、粒来崇博、三井千尋、谷本英則、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：アレルギー性気管支肺アスペルギルス症とアスペルギルス感作成人喘息の臨床像とIgE抗体産生に関する検討、第60回日本アレルギー学術秋季学術大会、アレルギー 59 (9) : 1400, 2010. 11. 27 (東京)
 24. 押方智也子、釣木澤尚美、齋藤明美、中澤卓也、粒来崇博、三井千尋、谷本英則、関谷潔史、谷口正実、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川眞紀、西岡謙二、安枝 浩、秋山一男：環境中ダニアレルゲン量は成人喘息患者の臨床症状を反映する—2 臨床—、第60回日本アレルギー学術秋季学術大会、アレルギー 59 (9) : 1424, 2010. 11. 27 (東京)
 25. 三井千尋、谷口正実、東 憲孝、小野恵美子、梶原景一、福富友馬、粒来崇博、関谷潔史、谷本英則、石井豊太、森 晶夫、三田晴久、長谷川眞紀、秋山一男：NSAIDs過敏喘息の難治化とCysLTs過剰産生、第60回日本アレルギー学術秋季学術大会、アレルギー 59 (9) : 1446, 2010. 11. 26 (東京)
 26. 武市清香、粒来崇博、谷口正実、福富友馬、三井千尋、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、中澤卓也、森 晶夫、長谷川眞紀、秋山一男：喘息が臨床的に安定しているにもかかわらず呼気NO高値の症例の経過、第60回日本アレルギー学術秋季学術大会、アレルギー 59 (9) : 1467, 2010. 11. 27 (東京)
 27. 関谷潔史、谷口正実、福富友馬、三井千尋、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：喘息大発作症例の臨床的検討、第60回日本アレルギー学術秋季学術大会、アレルギー 59 (9) : 1477, 2010. 11. 27 (東京)
 28. 谷本 安、高橋 清、能島大輔、早稲田公一、平野淳、木村五郎、岡田千春、宗田 良、片岡幹男、谷本光音. シンポジウム4 重症および治療困難な成人喘息の原因の多様性と対策 S4-4 非アト

- ピー型喘息 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会(東京), 2010.
29. 谷本 安, 平野 淳, 尾長谷 靖, 有田真知子, 佐藤利雄, 高橋 清, 谷本光音. 喘息治療におけるフルチカゾン・サルメテロール配合剤の服薬アドヒアランスに関する検討 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会(京都), 2010.
 30. 今野 哲, 福富友馬, 谷口正実, 中村裕之, 小林章雄, 河岸由紀夫, 岡田千春, 谷本 安, 高橋 清, 烏帽子田彰, 小田嶋博, 中川武正, 秋山一男, 西村正治, 赤澤 晃. 本邦のアレルギー性鼻炎有病率とその危険因子 日本語版 ECRHS 調査票による疫学調査. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会(東京), 2010.
 31. 能島大輔, 谷本 安, 栗本悦子, 早稲田公一, 宮原信明, 金廣有彦, 岸本卓巳, 片岡幹男, 高橋清, 谷本光音. ヒト好塩基球の抗原提示能に関する検討 -IL-3 で活性化された好塩基球は HLA-DR を発現する-. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会(東京), 2010.
 32. 宮原信明, 武田勝行, 宮原聡子, 早稲田公一, 栗本悦子, 池田元洋, 古賀 光, 谷口暁彦, 能島大輔, 沢本康子, 谷本 安, 金廣有彦, 片岡幹男, Gelfand E, 谷本光音. 動物モデルを用いた喘息病態と治療法開発 アレルギー性気道反応における経口免疫寛容の効果. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会(東京), 2010.
 33. 福富友馬, 谷口正実, 中村裕之, 小林章雄, 今野哲, 西村正治, 河岸由紀夫, 岡田千春, 谷本 安, 高橋 清, 烏帽子田彰, 小田嶋博, 中川武正, 赤澤 晃, 秋山一男. 本邦の成人喘息有病率とその危険因子 日本語版 ECRHS 調査票による Nationwide cross-sectional population-based study. 第50回日本呼吸器学会学術講演会(京都), 2010.
 34. Y. Sakazaki, T. Hoshino, T. Kawayama, H. Imaoka, T. Kinoshita, M. Sawada, H. Oda, Y. Kitasato, T. Iwanaga, H. Aizawa. Severe airway remodeling and increased CD8⁺T cells and eosinophils in airways of asthma death. American Thoracic Society international conference 2010, New Orleans, USA, May 16, 2010.
 35. T. Kinoshita, T. Hoshino, Y. Sakazaki, M. Sawada, H. Oda, T. Kawayama, H. Aizawa. Elastase-induced emphysematous change and pulmonary inflammation are attenuated in caspase-1 deficient mice. American Thoracic Society international conference 2010, New Orleans, USA, May 14-19, 2010.
 36. M. Sawada, T. Hoshino, Y. Sakazaki, H. Oda, T. Kawayama, H. Aizawa. Overproduction of IL-18 in the lungs, and results in airway hyperresponsiveness and pulmonary inflammation. American Thoracic Society international conference 2010, New Orleans, USA, May 14-19, 2010.
 37. T. Sekizuka, T. Kawayama, H. Ishii, K. Ito, K. Matsunaga, T. Hoshino, H. Aizawa. Impairment of glucose tolerance in subjects with COPD in Japan. American Thoracic Society international conference 2010, New Orleans, USA, May 19, 2010.
 38. K. Matsunaga, R. Toda, T. Kawayama, M. Tajiri, T. Hoshino, H. Aizawa. High prevalence of gastroesophageal reflux in patients with asthma. American Thoracic Society international conference 2010, New Orleans, USA, May 19, 2010.
 39. T. Kawayama, K. Matsunaga, R. Toda, T. Hoshino, H. Aizawa. Heterogeneity of plasma brain natriuretic peptide levels and systemic inflammation in COPD with normal cardiac function. American Thoracic Society international conference 2010, New Orleans, USA, May 19, 2010.
 40. H. Aizawa. Various Effects of Nitric Oxide (NO) on Airway Functions. 国際NO学会学術集会, Kyoto, Japan, June 14-18, 2010.
 41. K. Matsunaga, T. Kawayama, K. Yamaguchi, T. Hoshino, H. Aizawa. Different profiles of lung and systemic regulatory T cells in mild asthmatics. European Respiratory Society annual congress, Barcelona, Spain, September 18, 2010.
 42. Y. Sakazaki, T. Hoshino, T. Kawayama, H. Imaoka, T. Kinoshita, M. Sawada, H. Oda, S. Takenaka, Y. Kitasato, T. Iwanaga, H. Aizawa. Enhanced expression of IL-18 and increased CD8⁺T cells and eosinophils in the airways of asthma death. European Respiratory Society annual congress, Barcelona, Spain, September 18, 2010.
 43. H. Oda, T. Hoshino, S. Takenaka, M. Sawada, Y. Sakazaki, T. Kinoshita, H. Aizawa. Emphysematous change, weight loss, atrophy of

- the gastrocnemius and cor pulmonale in aging IL-18 transgenic mice: roles of IL-13 in mouse COPD model. European Respiratory Society annual congress, Barcelona, Spain, September 18, 2010.
44. Masanori Sawada, Tomoaki Hoshino, Yuki Sakazaki, H. Oda, S. Takenaka, T. Kawayama, H. Aizawa. Overproduction of IL-18 induces IL-13 producing CD4+ T cells in the lungs, and results in airway hyperresponsiveness and pulmonary inflammation in Balb/c mice. European Respiratory Society annual congress, Barcelona, Spain, September 18, 2010.
 45. 相澤久道: 日本語版 CAT プロジェクトの取り組みについて. 日本喘息・COPD フォーラム第7回総会, 東京, 2010. 3. 6
 46. 坂崎優樹、星野友昭、川山智隆、木下隆、武井仁子、澤田昌典、小田華子、北里裕彦、岩永知秋、相澤久道: 非喫煙喘息死患者の気道リモデリングと炎症細胞の解析. 日本内科学会, 東京, 2010. 4. 10
 47. 相澤久道: COPD と喘息. 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 京都, 2010. 4. 23-25
 48. 相澤久道: COPD Assessment Test (CAT) 日本語版の作成. 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 京都, 2010. 4. 23-25
 49. Y. Sakazaki, T. Hoshino, M. Sawada, H. Oda, S. Takei, Y. Kitasato, M. Yoshida, T. Iwanaga, T. Kawayama, H. Aizawa. Characteristics of fatal asthma: CD8+ T cells and eosinophils were recruited into airways in fatal asthma. 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 京都, 2010. 4. 24
 50. 木下隆、星野友昭、坂崎優樹、澤田昌典、小田華子、川山智隆、相澤久道: Elastase 誘導性気腫における Caspase-1 の役割. 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 京都, 2010. 4. 23-25
 51. 田尻守祐、岡元昌樹、川山智隆、星野友昭、相澤久道: 当院における皮膚筋炎合併間質性肺疾患、特発性肺線維症の急性増悪の臨床的検討. 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 京都, 2010. 4. 23-25
 52. M. Sawada, R. Toda, Y. Sakazaki, T. Kawayama, T. Hoshino, H. Aizawa. Detection and Evaluation of Severity of COPD using IPAG Questionnaires: Evaluation of IPAG Questionnaires for COPD in Japan. 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 京都, 2010. 4. 23-25
 53. 相澤久道: 高齢者喘息: 病態の特徴と診断. 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会, 京都, 2010. 5. 8-9
 54. 相澤久道: COPD 共同研究について. 第3回 KASCOM 総会, 福岡, 2010. 5. 22
 55. 大田健: 喘息治療の現状と将来展望 Best Strategy を考える; 喘息治療の現状 Best Strategy を考える. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会. アレルギー59(9-10):1290, 2010.
 56. 大田健: アレルギー疾患診断・治療ガイドライン 今後の方向性と展望 喘息予防・管理ガイドライン 今後の方向性と展望. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会. アレルギー59(9-10):1228, 2010.
 57. 大田健: アレルギー性呼吸器疾患の過去・現在・未来. 日本呼吸器学会雑誌 48(特別号):75, 2010.
 58. 長瀬洋之、戸田貴子、杉本直也、中瀬裕子、神山麻恵、吉原久直、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、山口正雄、鈴木直仁、大田健: ミニワークショップ JGL2009、GINA、EPR3 喘息コントロールテスト (ACT) における喘息コントロール評価の比較. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会. 平成22年11月25-27日. アレルギー、59(9, 10):1366, 2010.
 59. 鈴木真穂、Han Kaiyu、山口正雄、杉本直也、中瀬裕子、戸田貴子、原麻恵、小島康弘、吉原久直、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、長瀬洋之、鈴木直仁、大田健: ミニワークショップ Advanced glycation endproducts (AGEs) がヒト好塩基球に及ぼす作用の解析. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会. 平成22年11月25-27日 アレルギー、59(9, 10):1363, 2010.
 60. 烏帽子田彰: 「アレルギーと健康」 服部流料理研究会 2010/03/11 東京
 61. 烏帽子田彰, 鹿島小織里, 小泉武夫, 服部幸雄: 「環境と健康」 広島食育フォーラム/広島大学公開講座 2010/07/21 広島県廿日市市
 62. 日比野由利、高木二郎、水野真希、神林康弘、中村裕之: マルチレベル分析によるソーシャル・キャピタルと主観的健康感 第38回北陸公衆衛生学会、2010年10月、富山
 63. 日比野由利、神林康弘、中村裕之: インドの商業的代理出産と代理女性・子供の権利 第83回日本社会学会大会、2010年11月、名古屋
 64. 今野哲、福富友馬、谷口正実、中村裕之、小林章雄、河岸由紀夫、岡田千春、谷本安、高橋清、烏帽子田彰、小田嶋博、中川武正、秋山一男、西村正治、赤澤晃: 本邦のアレルギー性鼻炎有病率と

その危険因子:日本語版 ECRHS 調査票による疫学調査 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2010 年 11 月、東京

65. 相良多喜子、神林康弘、人見嘉哲、日比野由利、柴田亜樹、大滝直人、林宏一、中村裕之:能登半島地震で被災した仮設住宅入居高齢者の精神的ストレスと食行動 第 8 回日本予防医学会学術総会、2010 年 12 月、金沢
66. 柴田亜樹、人見嘉哲、林 宏一、大滝直人、田野翔、神林康弘、日比野由利、中村裕之:幼児期の食生活・生活習慣が子どもの心身に与える影響についてー保育園・幼稚園の食育調査からー第 8 回日本予防医学会学術総会、2010 年 12 月、金沢
67. 弘田量二、康峪梅、中村裕之、菅沼成文、櫻井克年:アレルギーで刺激されたマウスにおける多環式芳香族炭化水素類の気道過敏症増強作用と病理組織変化 第 8 回日本予防医学会学術総会、2010 年 12 月、金沢
68. 田中宏幸:シンポジウム アレルギー疾患のオーダーメイド治療 薬学者からの発信. 第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会(2010 年 5 月、京都)
69. 田中宏幸:シンポジウム アレルギー疾患の薬物治療に役立つ基礎薬理学 アレルギー治療薬ー免疫療法薬ーの基礎. 第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2010 年 5 月、京都)
70. 田中宏幸:ワークショップ 動物モデルによる病態解明の進歩 ウイルス感染による喘息発症の促進機構ーマウスモデルを用いた検討ー. 第 60 回アレルギー学会秋季学術大会 シンポジウム (2010 年 11 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

われわれが実施した重症喘息登録調査の結果からは、わが国の重症喘息は成人発症、非アトピー型、ステロイド抵抗性の病態が特徴的である。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、特に重要な要因と考えられる。ステロイド抵抗性喘息は患者レベルでの現象として定義され、細胞レベルで指摘されている転写因子、シグナル伝達異常とのギャップが大きかった。個体レベルと細胞レベルの研究を結びつける喘息研究モデルを世界に先駆けて構築する目的に、マウス Th クローン移入喘息モデルを応用し、*in vitro*における Th クローンのステロイド感受性と、*in vivo*における喘息モデル（好酸球浸潤）のステロイド感受性を計測し、関連を調べた。その結果、ステロイド抵抗性クローンの移入により、ステロイド抵抗性喘息モデルが、ステロイド感受性クローンの移入によりステロイド感受性喘息モデルが成立することがわかった。本喘息モデルは、ヒト以外ではじめてステロイド抵抗性喘息病態を表現できる実験系であり、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、病態解析、治療薬効果解析の両面で大いに役立つものと期待される。

A. 研究目的

吸入ステロイドの普及により軽症～中等症喘息の予後は著しく改善したものの、重症喘息患者に対する治療効果としては、現在の薬物療法は未だ満足な水準に達していないことが、近年実施された国内の AIRJ、海外の GOAL study 等の大規模調査によって明らかにされた。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し、患者、患者家族の QOL を改善し、1 割の重症喘息が喘息医療支出の過半を占める医療費の削減にもつながる。

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 ヶ国共同研究の 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。ステロイド抵抗性の要因としては、米英の一流研究者は、T細胞に intrinsic な異常を提唱しているが、彼らの論文では、ステロイド薬投与効果がみられないだけの軽症例を多く解析しており、真に重症喘息のメカニズムとは言えない。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、ステロイド抵抗性喘息の病態解析モデルの構築を世界に先駆けて実現した。

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、吸入アレルゲン 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。

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、 2×10^6 /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 μ 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 μ g/ml) で coat し、固相化抗 CD3 抗体刺激に用いた。抗 CD28 抗体は、1 μ g/ml で培養中に添加した。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- γ をそれぞれ特異的サンドイッチ ELISA 法にて測定した。

OVA 特異的マウス Th クローン樹立と *in vitro* ステロイド感受性の解析

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)。Irradiated spleen cell を antigen-presenting cell (APC) とし、subcloning、さらに expansion し、実験に使用した。また、T cell receptor transgenic mouse (DO11.10) の脾細胞から CD4⁺ T 細胞を精製し、同様に抗原刺激、limiting dilution を行って、OVA₃₂₃₋₃₃₉ 特異的 Th clone を樹立した。

Th clone (10^5 /well) を APC (4×10^5 /well)、OVA (100 μ g/ml) とともに 96 well culture plate にて 72 時間培養し、細胞増殖応答を最後の 18 時間 ³H-thymidine パルスにて評価した。サイトカイン産生は 48 時間後の培養上清を特異的サンドイッチ ELISA にて測定した。培養中に dexamethasone (DEX) 最終濃度 1~1000 nM を加え、IC₅₀ 値を評価した。

Th 細胞移入喘息モデルと *in vivo* ステロイド感受性の解析

5×10^6 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 を経気道的に抗原チャレンジした。さらに 48 hr 後、BUXCO にて気道抵抗を測定、気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、細胞数、分画を測定した。Day 1、2 に DEX 1、3 mg/kg、および vehicle

を皮下投与した。

(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 4 1 5 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

これまでの研究から、重症喘息においては、高用量吸入ステロイド+経口ステロイドの投与にも拘わらず、末梢血 Th 細胞 IL-5 産生が亢進していることがアキラカである (表 1)。

表 1. 高用量吸入ステロイド+経口ステロイド使用中の重症喘息と軽症喘息 (吸入ステロイド使用前後) の末梢血 T 細胞 IL-5 産生の比較

	Severe	Mild	
		Before ICS	After ICS
N	11	10	
Age	58.4 \pm 6.4	45.9 \pm 6.0	
M/F	6/5	6/4	
Atopic/Nonatopic	2/9	7/3	
%FEV ₁	52.7 \pm 8.4	74.7 \pm 4.4	84.7 \pm 4.4
Eosinophil (/ml)	189.7 \pm 39.4	548.0 \pm 162.3	492.7 \pm 135.7
Ach PC ₅₀ (μ g/ml)	567 \pm 264.4	9332 \pm 3205	
Cytokine production* (pg/ml)			
IL-5	46.5 \pm 16.4	46.1 \pm 11.8	4.4 \pm 2.0
IL-2	2029 \pm 489	4954 \pm 522	3132 \pm 824
IL-4	196.9 \pm 41.9	403.8 \pm 117.7	227.4 \pm 53.4

*Peripheral blood mononuclear cells (2×10^6 /well) were stimulated with PMA (20 nM) plus ionomycin (1 μ M) for 24 hrs. Cytokine concentration in the supernatants was determined by specific ELISAs.

成人重症喘息でみられる T 細胞レベルのステロイド抵抗性のメカニズムを解析する目的に、*in vitro*、*in vivo*の両面で比較、検討できるマウス喘息モデルの樹立を目指した。OVA で感作した BALB/c マウスや DO11.10 マウスから脾細胞を採取し、ナイロンファイバーを用いて T 細胞を選択的に単離した。抗原提示細胞、OVA とともに共培養し、1 週間後に限界希釈を行い、T 細胞をクローニングした (図 1)。

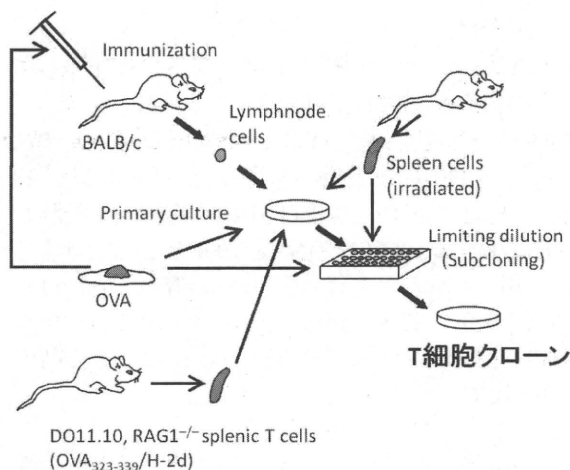


図 1. マウス Th クローンの樹立

次いで、96 ウェルマイクロプレートに APC、OVA とともに T 細胞クローンを培養し、各濃度の DEX を添加した。培養 48 時間後に培養上清を回収し、サンドイッチ ELISA 法によりサイトカインの濃度を測定した。96 ウェルマイクロプレートにトリチウム標識チミジンを添加し、24 時間後にパルス測定をして細胞増殖を評価した (*in vitro* ステロイド感受性、図 2)。*in vivo*におけるステロイド感受性解析は、T 細胞クローンを無処置 BALB/c マウスに移入し、OVA チャレンジ、DEX の皮下投与を行った。チャレンジ 48 時間後に BALF を回収し、BALF 中の炎症細胞を計測した。

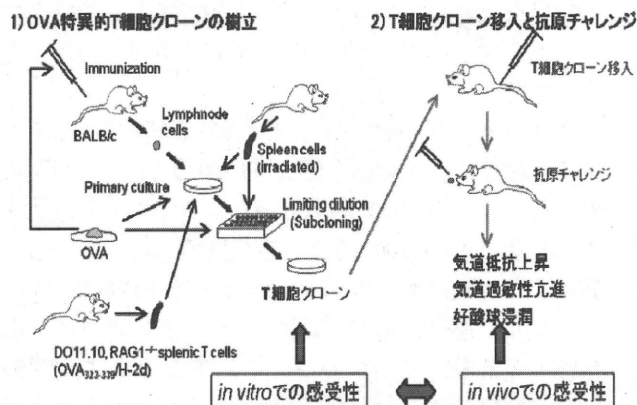


図 2. ステロイド抵抗性喘息モデル—*in vitro*と *in vivo*の T 細胞ステロイド感受性比較

T 細胞クローンの増殖応答に *in vitro* で DEX が及

ぼす影響について調べたところ、Th クローン BF7、T6-2、T6-10 の増殖は DEX の用量依存的に抑制され(図 3a)、 IC_{50} はそれぞれ 27.2、34.3、2.4 nM となった(表 2)。これに対して、Th クローン T6-4、T6-7 の増殖は実験で用いた濃度の DEX では抑制されず、 IC_{50} は 1000 nM 以上となった。 I_{max} (DEX 0 nM の時の増殖を 100%とした時の、増殖の最大抑制率)はそれぞれ 48%、31%となった。T5-1 の増殖は DEX によりやや抑制され、 IC_{50} は 664.5 nM、 I_{max} は 67%となった。

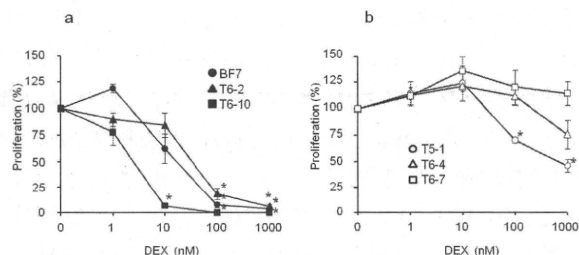


図 3 *in vitro*における T 細胞クローンの増殖
* $p < 0.05$

表 2. T 細胞クローンの細胞増殖とサイトカイン産生に対する DEX の効果

		BF7	T6-2	T6-10	T5-1	T6-4	T6-7
Proliferative responses	IC_{50} (nM) ¹	27.2	32.3	2.4	664.5	>1000	>1000
	I_{max} (%) ²	92	93	100	67	48	31
IL-4 ³	$\times 10^3$ pg/ml	12.2	ND	ND	ND	ND	ND
	IC_{50} (nM)	31.9	-	-	-	-	-
	I_{max} (%)	90	-	-	-	-	-
IL-5 ³	$\times 10^3$ pg/ml	17.3	ND	23.2	ND	ND	ND
	IC_{50} (nM)	28.9	-	5.7	-	-	-
	I_{max} (%)	91	-	96	-	-	-
IL-13 ³	$\times 10^3$ pg/ml	48.5	3.3	7.2	0.4	0.7	ND
	IC_{50} (nM)	6.3	6.3	3.8	27.3	24.5	-
	I_{max} (%)	98	98	89	79	90	-
IFN- γ ³	$\times 10^3$ pg/ml	ND	86.2	ND	103.2	178.0	137.2
	IC_{50} (nM)	-	13.1	-	20.9	114.6	43.3
	I_{max} (%)	-	98	-	92	73	80

¹T 細胞クローンを 96 ウェルマイクロプレートに APC、OVA とともに培養し、各濃度の DEX を添加した。培養 48 時間後にトリチウム標識チミジンを添加し、24 時間後にパルス測定をして細胞増殖能を評価した。 IC_{50} は、DEX 0 nM の時の細胞増殖を 100%とした時の、細胞増殖が 50%となる DEX 濃度とした。

² I_{max} は、DEX 0 nM の時の細胞増殖を 100%とした時の、細胞増殖の最大抑制率とした。

³細胞培養開始 48 時間後の IL-4、IL-5、IL-13、IFN- γ の濃度をサンドイッチ ELISA 法により測定した。検出限界は、IL-4 : 15.6 pg/ml、IL-5 : 31.1 pg/ml、IL-13 : 39.0 pg/ml、IFN- γ : 31.1 pg/ml である。ND ; not detectable

以上の結果より、実験に用いた 6 種類の T 細胞クローンのうち、BF7、T6-2、T6-10 は DEX により増殖が抑制されるステロイド感受性の Th クローン、一方、