

# 総合研究報告

## 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（独）国立病院機構相模原病院長）	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）	神山智（同センター研究員）
榎美香（同センター研究員）	飯島葉（同センター研究員）
北村紀子（東京都臨床医学総合研究所研究員）	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・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。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。

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有用である。

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、まず *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次いで *in vitro* の気管支平滑筋収縮活性測定系を確立し、T細胞由来の気管支平滑筋収縮活性の characterization を行った。活性化依存性に気管支平滑筋収縮活性を産生するマウス T細胞クローンを多数樹立し、プロテオーム、ゲノム解析の基盤を構築した。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つながることを期待される。

### 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・社会不適應を理由とする直接・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。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) を明らかにした。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。

難治性喘息の 8 割以上を非アトピー型喘息が占める。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。われわれは、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 クローンを受身移入によって、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、メカニズム解析に用いた。

## 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、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°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、 $2 \times 10^6$ /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 μM 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 μg/ml) で coat し、固相化抗 CD3 抗体刺激に用いた。抗 CD28 抗体は、1 μg/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 μg/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-γ 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ตอบสนอง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。IgE 抗体を介する反応を否定する目的に、白血球分画を分離して、抗原と 5～30 分間インキュベートし、ヒスタミン遊離反応を測定した。

## 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 (D011.10) の脾細胞から CD4<sup>+</sup> T 細胞を精製し、同様に抗原刺激、limiting dilution を行って、OVA<sub>323-339</sub> 特異的 Th clone を樹立した。

Th clone (10<sup>5</sup>/well) を APC (4x10<sup>5</sup>/well)、OVA (100・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 <sup>3</sup>H-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、IC<sub>50</sub> 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 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 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。

## T 細胞依存性気流閉塞メカニズムの解析 (*in vitro*)

*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。OVA 特異的マウス T 細胞クローンを固相化抗 CD3 抗体で刺激し、24 時間後に上清を回収、透析し、収縮アッセイのサンプルとした。

3-4 週齢の Balb/c マウスより気管支を採取し、37°C、3 時間半コラゲナーゼ (1 mg/ml) 処理を行った。処理後、気管支を軽く洗い、培地 (DMEM/F-12, 10% FBS) に懸濁して 24 ウェルプレートに分注することにより、マウス気管支平滑筋細胞の初代培養を行った。4 日後に継代し、さらにその 3 日後に、24 ウェルプレートにマウス気管支平滑筋細胞包埋コラーゲンの作成を行った。コラーゲンは Cellmatrix type1-A (新田ゼラチン) を用い、コラーゲンゲル 1

ウェルあたり 3 x 10<sup>5</sup> cells のマウス気管支平滑筋細胞を封入した。培地交換は毎日行い、測定 2 日前より FBS を加えない培地を用いた。

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。コラーゲンゲル収縮アッセイはゲル作成より 6 日後に行った。透析済み T 細胞クローン固相化抗 CD3 抗体刺激細胞上清サンプルをコラーゲンゲルに作用させ、15 分、30 分、60 分、90 分後にデジタルカメラでコラーゲンゲルの収縮を撮影した。画像解析ソフトウェア ImageJ (NIH) を用いてコラーゲンゲルの表面積を測定し、収縮率を解析した。

## 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 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。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) ステロイド抵抗性喘息モデルの樹立

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明らかである(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±6.4	45.9±6.0	
M/F	6/5	6/4	
Atopic/Nonatopic	2/9	7/3	
%FEV <sub>1</sub>	52.7±8.4	74.7±4.4	84.7±4.4
Eosinophil (/ml)	189.7±39.4	548.0±162.3	492.7±135.7
Ach PC <sub>20</sub> (μg/ml)	567±264.4	9332±3205	
Cytokine production* (pg/ml)			
IL-5	46.5±16.4	46.1±11.8	4.4±2.0
IL-2	2029±489	4954±522	3132±824
IL-4	196.9±41.9	403.8±117.7	227.4±53.4

\* Peripheral blood mononuclear cells (2 x 10<sup>6</sup>/well) were stimulated with PMA (20 nM) plus ionomycin (1 μM) 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)。

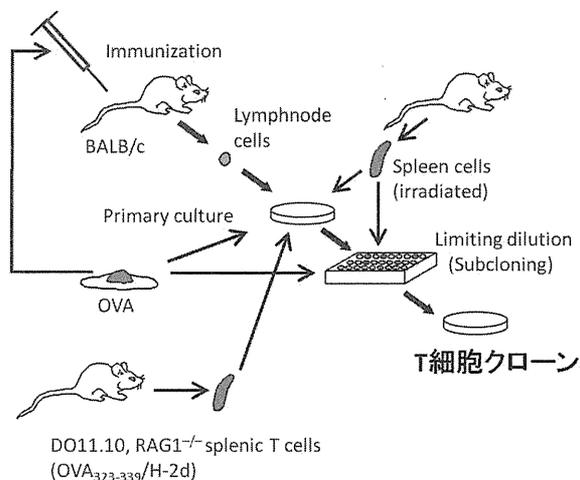


図1. マウス Th クローンの樹立

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追加し、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。

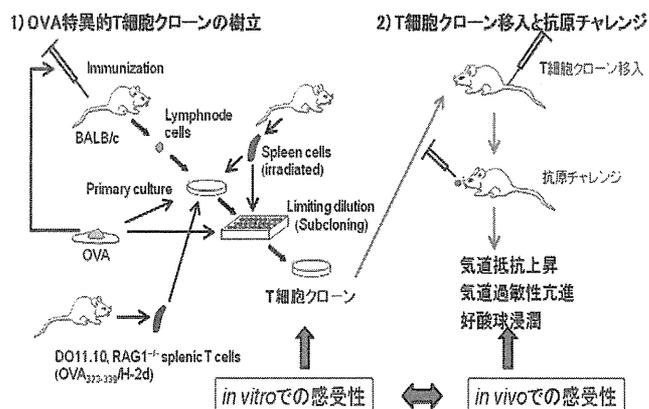


図2. ステロイド抵抗性喘息モデル—*in vitro*と*in vivo*の T 細胞ステロイド感受性比較

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た(図3a)、IC<sub>50</sub>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<sub>50</sub>は 1000 nM 以上となった。I<sub>max</sub>(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。

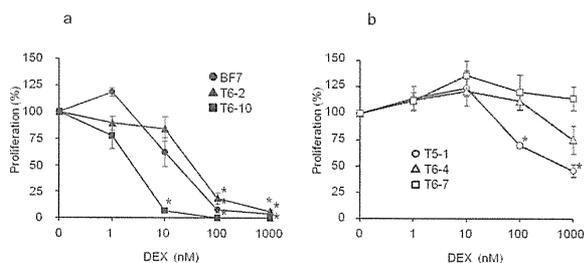


図 3 *in vitro*における T 細胞クローンの増殖  
\*  $p < 0.05$

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) <sup>1</sup>	27.2	32.3	2.4	664.5	>1000	>1000
	$I_{max}$ (%) <sup>2</sup>	92	93	100	67	48	31
IL-4 <sup>3</sup>	$\times 10^3$ pg/ml	12.2	ND	ND	ND	ND	ND
	$IC_{50}$ (nM)	31.9	-	-	-	-	-
	$I_{max}$ (%)	90	-	-	-	-	-
IL-5 <sup>3</sup>	$\times 10^3$ pg/ml	17.3	ND	23.2	ND	ND	ND
	$IC_{50}$ (nM)	28.9	-	5.7	-	-	-
	$I_{max}$ (%)	91	-	96	-	-	-
IL-13 <sup>3</sup>	$\times 10^3$ 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- $\gamma$ <sup>3</sup>	$\times 10^3$ pg/ml	ND	86.2	ND	103.2	178.0	137.2
	$IC_{50}$ (nM)	-	13.1	-	20.9	114.6	43.3
	$I_{max}$ (%)	-	96	-	92	73	80

<sup>1</sup>T 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。

<sup>2</sup> $I_{max}$  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。

<sup>3</sup>細胞培養開始 48 時間後の IL-4、IL-5、IL-13、IFN- $\gamma$  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- $\gamma$  : 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、T5-1、T6-4、T6-7 は DEX により抑制されないステロイド抵抗性の Th クローンとした。IL-4、IL-5、IL-13、IFN- $\gamma$  の産生は全ての T 細胞クローンで DEX

の用量依存的に抑制された(表 2)。しかしながら、 $IC_{50}$  はステロイド抵抗性の T 細胞クローンの方が高い傾向が見られた。

次いで、T 細胞クローン移入マウス喘息モデルを用いて、DEX 投与により気道への細胞浸潤にどのように影響を与えるかについて調べた。無処置 BALB/c マウスに各 T 細胞クローンを移入し、OVA チャレンジと DEX の皮下投与(0、1、3 mg/kg)を行った。気管支肺胞洗浄は OVA チャレンジの 48 時間後に行い、BALF に含まれるマクロファージ、好中球、好酸球、リンパ球数を計測した(図 4、5)。*in vitro* の実験においてステロイド感受性 T 細胞クローンに分類された BF7、T6-2、T6-10 を移入した場合は、BALF 中の好酸球数とリンパ球数は、投与した DEX の用量依存的に減少した。それに対して、ステロイド抵抗性 T 細胞クローンの T6-4、T6-7 を移入した場合は、BALF 中の好酸球数とリンパ球数は有意には減少しなかった。T5-1 を移入した場合は、3 mg/kg の DEX 投与により BALF 中の好酸球数が 30%減少した。

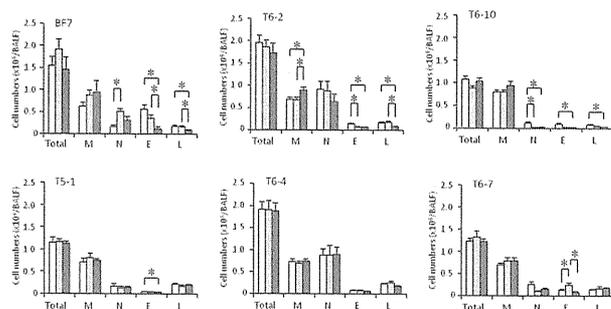


図 4. T 細胞クローン移入モデル BALF 中の炎症細胞数

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。図中、DEX 0 mg/kg : 白、DEX 1 mg/kg : 薄グレー、DEX 3 mg/kg : 濃グレー、Total : 総細胞数、M : マクロファージ、N : 好中球、E : 好酸球、L : リンパ球、とした。用いたマウス数は、BF7 (n=6)、T6-2 (n=7-11)、T6-10 (n=6-9)、T5-1 (n=6)、T6-4 (n=10-12)、T6-7 (n=5-13) である。\*  $p < 0.05$

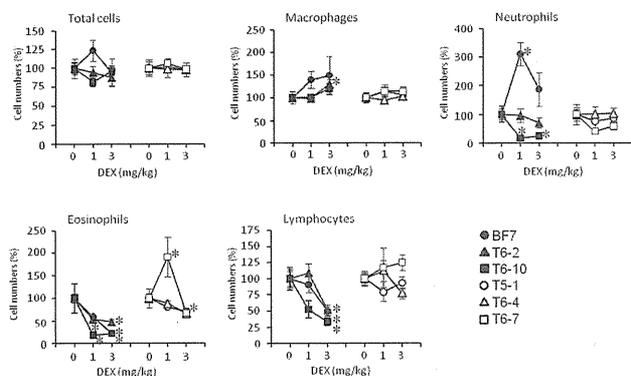


図5. T細胞クローンを移入したマウスから採取したBALF中の炎症細胞数の相対変化  
T細胞クローンを無処置BALB/cマウスに移入し、OVAチャレンジ、DEXの皮下投与を行った。チャレンジ48時間後にBALFを回収し、BALF中の炎症細胞を計測した。DEX 0 mg/kgの時の細胞数を100%とした相対値で表した。用いたマウス数は、BF7 (n=6)、T6-2 (n=7-11)、T6-10 (n=6-9)、T5-1 (n=6)、T6-4 (n=10-12)、T6-7 (n=5-13)である。\* p < 0.05 : Dex 0 mg/kgの時の細胞数と比較

以上の結果から、*in vitro*でのステロイド感受性解析によりステロイド感受性とステロイド抵抗性に分類されたT細胞クローンが、*in vivo*におけるステロイド感受性解析においても、ステロイド感受性のT細胞クローンを移入したマウスはステロイド感受性であり、一方でステロイド抵抗性のT細胞クローンを移入したマウスはステロイドに対して抵抗性を示すことがわかった。すなわち、*in vitro*で解析されたT細胞クローンのステロイド感受性は、*in vivo*におけるT細胞クローン移入喘息モデルのステロイド感受性と一対一で対応し得るものであった(図6)。好酸球は*in vitro*において、ステロイドに対して感受性が高いことは良く知られているが、*in vivo*における好酸球浸潤は、サイトカインや様々なシグナル、接着分子などの影響を受け、ステロイド感受性/抵抗性T細胞クローン移入マウスで、ステロイド反応性が異なると考えられる。

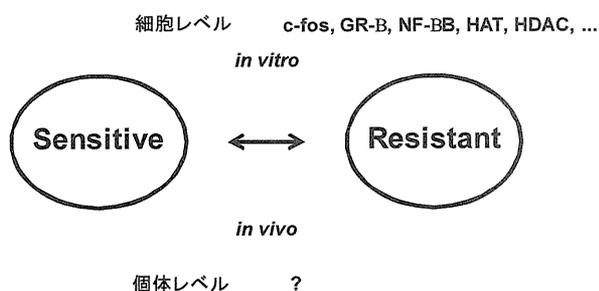


図6. *in vitro*と*in vivo*でのステロイド感受性が一

致する

ステロイド抵抗性の喘息患者から採取された末梢血T細胞は、ステロイド感受性が極めて低く、DEXに対するIC<sub>50</sub>は1000 nM以上であり、ステロイド感受性の喘息患者の約100倍であると見積もられている。我々のT細胞クローンのステロイド感受性解析では、ステロイド感受性のT細胞クローンとステロイド抵抗性のT細胞クローンのDEXに対するIC<sub>50</sub>は、20倍から500倍の差となった。ステロイド感受性が大変低いという点において、ステロイド抵抗性T細胞クローンとステロイド抵抗性の喘息患者から採取された末梢血T細胞は大変類似しており、我々のステロイド抵抗性T細胞クローンはステロイド抵抗性喘息のT細胞の性質を表していると言える。今回の結果は、ステロイド抵抗性T細胞クローンの移入によるステロイド抵抗性喘息モデルを構築したものと考えられる。

## (2) IgE非依存性、T細胞依存性喘息反応の研究

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3. 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)「気管支喘息の難治性の病態・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 7 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 8 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 24 hr 後に OVA または抗原エピートプの 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(図 8a)。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(図 8c)。

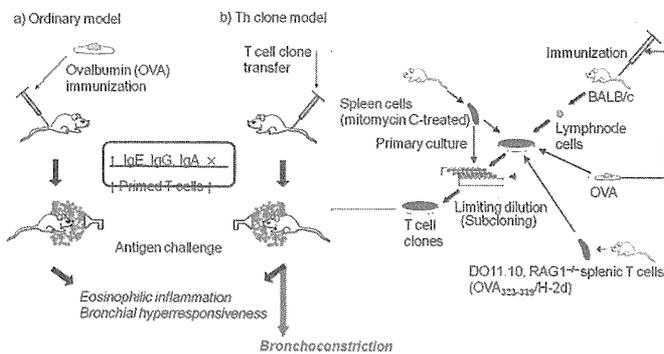
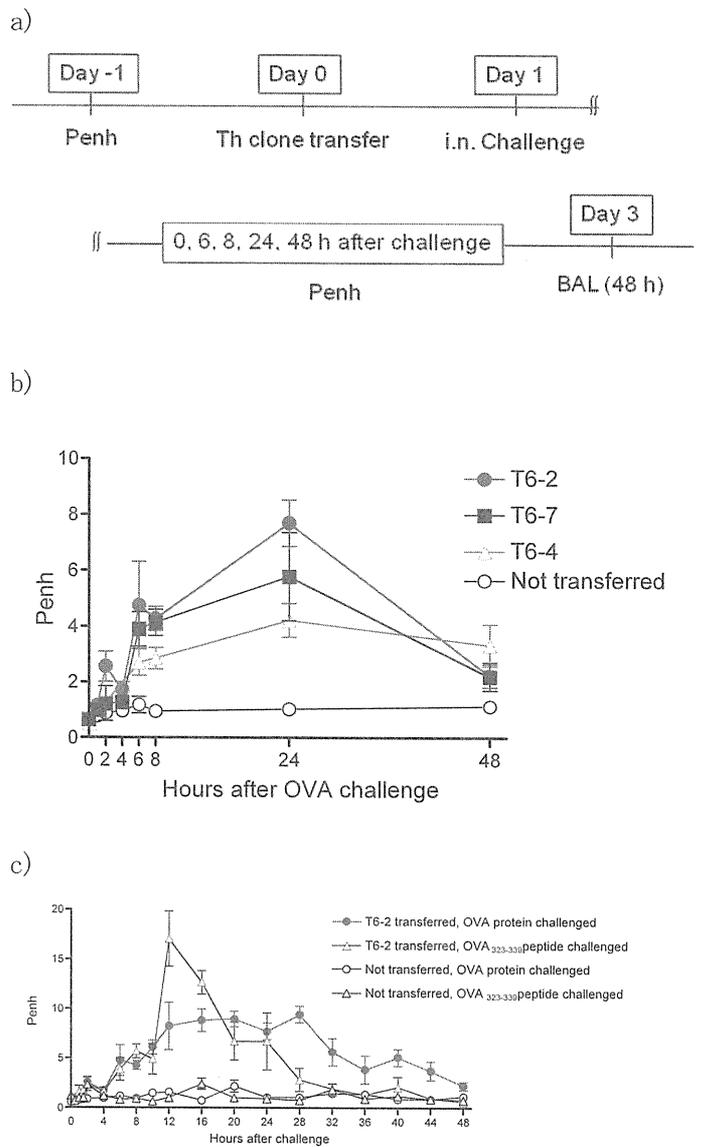


図 7、Th クローン移入喘息モデル



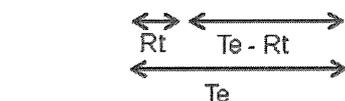
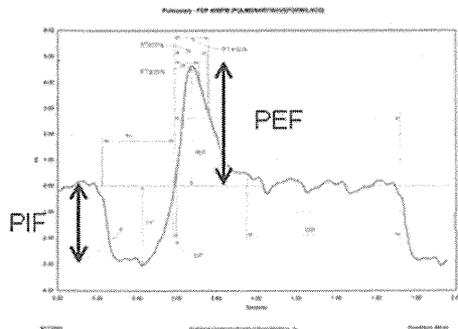
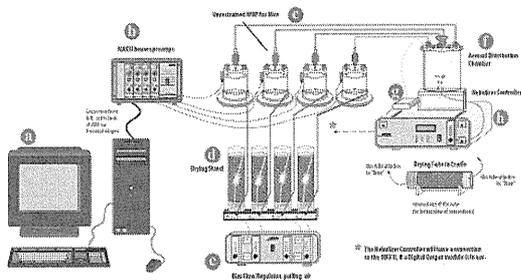
\*, #, p < 0.05 vs not transferred mice

図 8、Th クローン移入後の Penh の推移

DO11.10 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 または抗原エピートプの 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 ( $R_i$ ) の上昇を認めた(図 9b)。

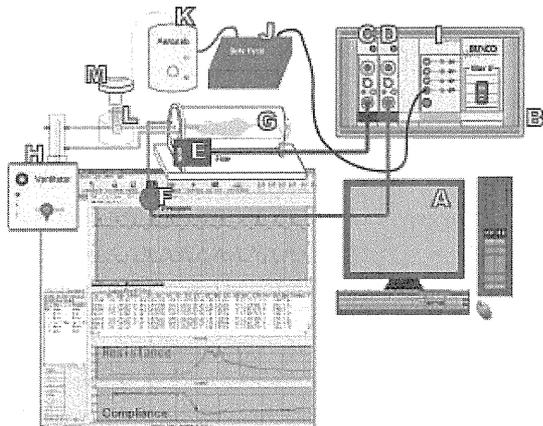
a)



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

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

b)



Raw: airway resistance  
 RL: lung resistance covariance,  
 lung resistance isovolumetric  
 Cdyn: dynamic compliance covariance,  
 dynamic compliance isovolumetric

図9、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

可逆性の気流閉塞は、喘息を特徴付ける重要な病態であり、従来は、IgEを介したマスト細胞の活性化によって化学伝達物質が放出されて気道抵抗が上昇する機序だけが知られていたが、今回のわれわれの研究成果から、液性免疫以外に、気流閉塞を生じさせる機構が存在し、Th細胞がエフェクター細胞であることが、はじめて *in vivo* のレベルで明らかになった (図10)。

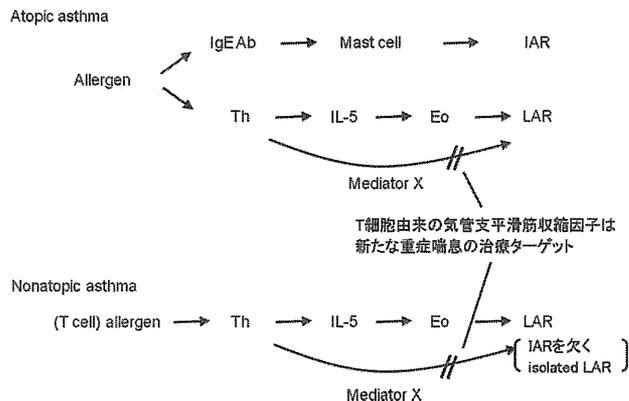


図10、T細胞は、気道炎症、過敏性、リモデリングに加えて、気流閉塞を惹起するエフェクター細胞である

さらに、T細胞由来のいずれの因子が気流閉塞に結びつくのかを解明する目的に、まず、好酸球浸潤、気道過敏性、気流閉塞の関連を解析した (表4)。

表4. T細胞依存性の好酸球浸潤、気道過敏性、気流閉塞の関連

Clone	Cell infiltration in BALF			AHR (%)	OVA-induced bronchoconstriction	
	Total Cells (%)	Eo (%)	Neut (%)		Penh	RL
BT1	233	-	105	93	→	NT
BT2	NT	NT	NT	NT	NT	NT
BT3	230*	729	208	63	→	NT
BF3	NT	NT	NT	NT	NT	NT
BF3.1	NT	NT	NT	NT	NT	NT
BF4	344	4638	78	192*	→	NT
BF7	412	15438	61	116	→	NT
B5-6	NT	NT	NT	NT	NT	NT
T5-1	349*	330	765*	349*	→	NT
T5-2	844*	22,660	303*	113	→	NT
T5-4	67	579	54	89	→	NT
T5-6	162	33,700	325*	116	→	NT
T6-1	198	114	97	381*	→	NT
T6-2	222	2,341*	857*	160	↑	↑
T6-3	232	33	20	45	→	NT
T6-4	572*	3,232*	1,448*	173*	↑	NT
T6-7	399*	1,481*	1,034*	111	↑	NT
T6-8	95	327*	118	246	→	NT
T6-9	83	14*	10*	100	→	NT
T6-10	71	10*	5*	117	→	NT

NT: Not tested

好酸球浸潤、気道過敏性の誘導と、気流閉塞の誘導とは必ずしも関連が認められないことから、図10の仮説が支持される。

次に、非アトピー型喘息症例における、IL-5産生誘導抗原による遅発型喘息反応誘導メカニズムを解明するために、われわれは、commercially availableなヒト正常気管支平滑筋細胞を用いた、3次元 collagen gel による簡便な収縮測定系を確立した。本年度はこのアッセイ系を用いて、characterizationを進めた。従来は、ウシやモルモット等の気管リングをマグヌス管に牽引する評価系がよく用いられたが (BeasLey et al, J. Appl. Physiol. (1989) 66; 1685, Gosens et al, Br. J. Pharmacol. (2002) 137; 459)、動物種の違いによる収縮差が生じる可能性があり、ヒト気管リングの収縮実験系も報告されてはいるものの (Cerrina et al, Prostaglandins (1989) 37; 457, Norel et al, Br. J. Pharmacol. (1999) 126; 867)、手術摘出の気管支を用いることから、供給面からの制約がある。

SAP2に反応したT細胞IL-5産生、および吸入誘発時に isolated LAR の認められる症例から、PBMCを分離し、SAP2と培養48時間後の上清を、濃縮、透析後に、本ゲルにアプライした。SAP2反応性のLARが認められる症例のT細胞培養上清では、平滑筋ゲルの収縮活性が認められた。即時型喘息反応を欠く遅発型反応陽性者のPBMC培養上清は、気管平滑筋ゲルの収縮を惹起したが、陰性者の培養上清には収縮活性を認めなかった。ヒスタミン、メサコリン、ロイコトリエンなど既知の収縮物質とは、タイムコース、アンタゴニストに対する反応が異なることを明らかにした。

さらに、収縮物質の同定を進める目的に、LARが惹起される症例の末梢血単核球より、T細胞受容体を介する活性化に伴って、収縮活性を産生するT細胞クローンを樹立した (図11)。

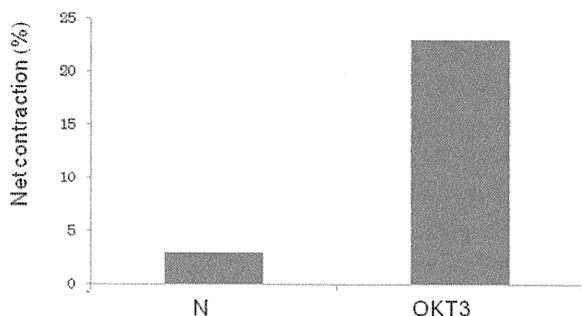


図11. ヒト CD4<sup>+</sup> T細胞クローンによる活性化依存性の平滑筋収縮活性

次に、既知のアンタゴニストの効果を検討した。H1 アンタゴニストの pirlamine、ロイコトリエンアンタゴニストの montelukast、M1 アンタゴニストの atropine と 30分 preincubation した後に、収縮反応を惹起した。Pirlamine 1 μM、montelukast 1 μM、atropine 1 μM は、それぞれ histamine 1 μM、LTD4 1 μM、methacholine 1 μM の収縮を 90%以上抑制したが、T細胞上清による収縮反応を抑制しなかった (data not shown)。この結果からは、喘息分野の既知の平滑筋収縮物質とは異なることが強く示唆される。

IgE非依存性、T細胞依存性喘息反応の分子基盤をさらに解明する目的に、マウスクローンをを用いて *in vitro* 研究を実施した。若年マウスの気管支組織をコラーゲンゼ処理し、マウス気管支平滑筋細胞の初代培養を行った。2継代目でコラーゲンゲルに封入し、ゲルを平滑筋に見立てて、収縮アッセイ系として確立した。次いで、OVA特異的マウスT細胞クローンを固相化抗CD3抗体で刺激し、24時間後に上清を回収、透析し、収縮アッセイのサンプルとした。サンプルをアプライした後、マウス平滑筋ゲルの収縮を経時的に記録、解析した。実験の概要を図12に、結果を図13に示す。

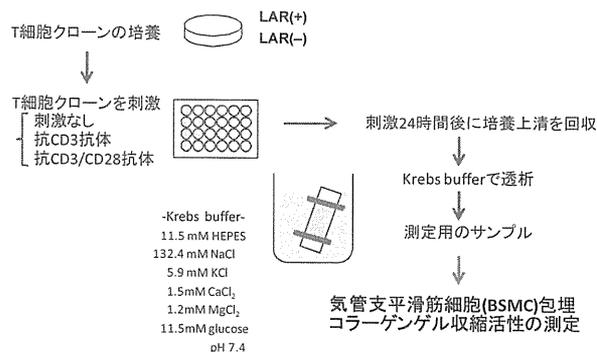


図12. *in vitro*におけるT細胞クローン由来気管支平滑筋収縮活性の測定系

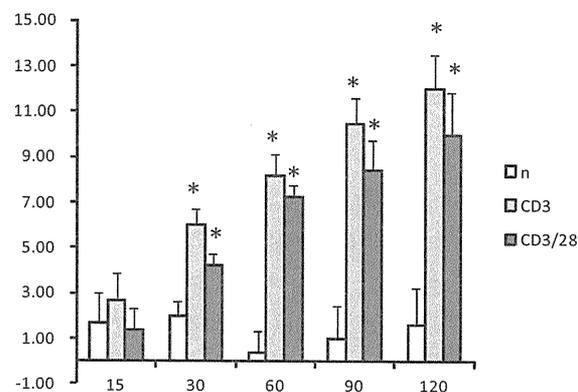


図13. T6-2由来マウス気管支平滑筋ゲル収縮活性 (\*:p<0.05, compared to n)

われわれは、さらに commercially available なヒト正常気管支平滑筋細胞を用いた収縮測定系を用いて、characterizationを進めた(図14)。本システムは、培養細胞を用いるため、ロットによるばらつきが小さいメリットがある。

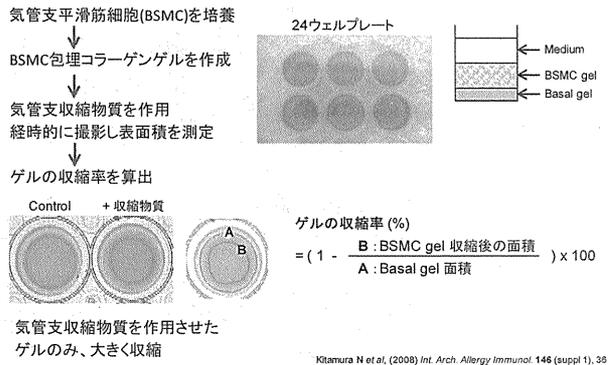


図14. 培養ヒト気管支平滑筋細胞ゲルを用いたT細胞由来平滑筋収縮活性の測定法

LARを惹起するTh cloneの刺激上清を、培養ヒト気管支平滑筋細胞ゲルにアプライし、収縮活性を検出した(図15)。

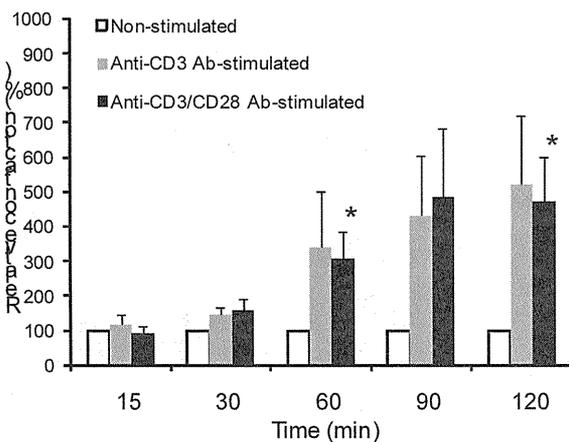


図15. 培養ヒト気管支平滑筋細胞ゲルを用いたT6-2由来平滑筋収縮活性の測定

#### E. 結論

個体レベルと細胞レベルのステロイド抵抗性喘息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。

マウスTh clone 受身移入によるIgE非依存性喘息反応のモデルを確立した。T細胞が気流閉塞を惹起する必要十分条件であることをはじめて証明した。LAR惹起クローンの上清は、平滑筋ゲル収縮活性を示した。さらに、Commercially availableな培養ヒト気管支平滑筋細胞を用いた収縮反応測定系を樹立し、T細胞受容体を介する活性化に伴って、収縮活性を産生するヒトT細胞クローンを樹立した。また、ヒスタミン、メサコリン、ロイコトリエンなど既知の収縮物質とは、タイムコース、アンタゴニストに対する反応が異なることを明らかにしている。分子量、等電点より、未知の喘息症状発現機序の存在が示唆される。気管支平滑筋収縮活性分子の性状、および産生するT細胞のcharacterization(表面マーカー、産生誘導cytokineなど)につき解析中である。これまでのわれわれの調査研究の成果として、難治性喘息症例では、非アトピー型が過半を占め、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・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現状が確認されている。現行の治療で効果が十分に得られない重症症例群にとっては、T細胞依存性、IgE非依存性の気流閉塞メカニズムの解明が大いなる福音をもたらすものと期待される。

#### F. 健康危惧情報 該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kitamura, N., Kaminuma, O., Ohtomo, T., Kiyokawa, N., Kobayashi, N., Suko, M., and Mori, A. Evaluation of cysteinyl leukotriene-induced contraction of human cultured bronchial smooth muscle cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 149 (Suppl 1):83-86, 2009.
2. Ohtomo, T., Kaminuma, O., Kitamura, N., Suko, M., Kobayashi, N., and Mori, A. Murine Th clones confer late asthmatic response upon antigen challenge. *Int. Arch. Allergy*

- Immunol.* 149 (Suppl 1):2-6, 2009.
3. 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. Role of multidrug resistance-associated protein 1 in the pathogenesis of allergic airway inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 296:L30-L36, 2009.
  4. Kitamura, N., Motoi, Y., Mori, A., Tatsumi, H., Nemoto, S., Miyoshi, H., Kitamura, F., Miyatake, S., and Kaminuma, O. Suppressive role of C-terminal binding protein 1 in IL-4 synthesis in human T cells. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 382:326-330, 2009.
  5. Kaminuma, O., Kitamura, F., Miyatake, S., Yamaoka, K., Miyoshi, H., Inokuma, S., Tatsumi, H., Nemoto, S., Kitamura, N., Mori, A., and Hiroi, H. T-box transcription factor is responsible for distorted Th2 differentiation in human peripheral CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123:813-820, 2009.
  6. Suzuki, K., Kaminuma, O., Yang, L., Motoi, Y., Takai, T., Ichikawa, S., Okumura, K., Ogawa, H., Mori, A., Takaiwa, F., and Hiroi, T. Development of transgenic rice expressing mite allergen for a new concept of immunotherapy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 149 (Suppl 1):21-24, 2009.
  7. Yamaoka, K., Okayama, Y., Kaminuma, O., Katayama, K., Mori, A., Tatsumi, H., Nemoto, S., and Hiroi, T. Proteomic approach to Fc $\cdot$ RI aggregation-initiated signal transduction cascade in human mast cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 149 (Suppl 1):73-76, 2009.
  8. Kitamura, N., Katagiri, Y., Itagaki, M., Miyagawa, Y., Onda, K., Okita, H., Mori, A., Fujimoto, J., and Kiyokawa, N. The expression of granulysin in systemic anaplastic large cell lymphoma in childhood. *Leuk. Res.* 33:908-912, 2009.
  9. Ebisawa, T., Numazawa, K., Shimada, H., Izutsu, H., Sasaki, T., Kato, N., Tokunaga, K., Mori, A., Honma, K., Honma, S., and Shibata, S. Self-sustained circadian rhythm in cultured human mononuclear cells isolated from peripheral blood. *Neurosci. Res.* 66:223-227, 2010.
  10. Ohtomo, T., Kaminuma, O., Yamada, J., Kitamura, N., Abe, A., Kobayashi, N., Suko, M., and Mori, A. 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, 2010.
  11. Kitamura, F., Kitamura, N., Mori, A., Tatsumi, H., Nemoto, S., Miyoshi, H., Miyatake, S., Hiroi, T., and Kaminuma, O. 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, 2010.
  12. Kaminuma, O., Suzuki, K., and Mori, A. Effect of sublingual immunotherapy on antigen-induced bronchial and nasal inflammation in mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 152 (Suppl. 1):75-78, 2010.
  13. Katoh, S., Maeda, S., Fukuoka, H., Wada, T., Moriya, S., Mori, A., Yamaguchi, K., Senda, S., and Miyagi, T. 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, 2010.
  14. Seki, M., Kimura, H., Mori, A., Shimada, A., Yamada, Y., Maruyama, K., Hayashi, Y., Agematsu, K., Morio, T., Yachie, A., and Kato, M. Prominent eosinophilia but less eosinophil activation in a patient with Omenn syndrome. *Pediatr. Int.* 52:e196-e199, 2010.
  15. Abe, A., Ohtomo, T., Koyama, S., Kitamura, N., Kaminuma, O., and Mori, A. Comparative analysis of steroid sensitivity of Th cells *in vitro* and *in vivo*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 155 (Suppl 1):110-116, 2011.
  16. Kitamura, N., Mori, A., Tatsumi, H., Nemoto, S., Hiroi, T., and Kaminuma, O. Zinc finger protein, multitype 1 suppresses human Th2 development via down-regulation of IL-4. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 155 (Suppl 1):53-56, 2011.
  17. Katoh, S., Kaminuma, O., Hiroi, T., Mori, A., Ohtomo, T., Maeda, S., Shimizu, H., Obase, Y., and Oka, M. 2011. CD44 is critical for A crucial role of airway accumulation of antigen-specific Th2 cells, but not Th1 cells, induced by antigen challenge in mice. *Eur. J. Immunol.* 41:3198-3207, 2011.
  18. Suzuki, K., Kaminuma, O., Yang, L., Takai, T., Mori, A., Umezū-Goto, M., Ohtomo, T., Ohmachi, Y., Noda, Y., Hirose, S., Okumura, K., Ogawa, H., Takada, K., Hirasawa, M., Hiroi, T., and Takaiwa, F. Prevention of allergic asthma by

- vaccination with transgenic rice seed expressing mite allergen: induction of allergen-specific oral tolerance without bystander suppression. *Plant Biotech. J.* 2011 (in press)
19. Kaminuma, O., Ohtomo, T., Mori, A., Nagakubo, D., Hieshima, K., Yoshie, O., Ohmachi, Y., Noda, Y., Kitamura, F., Katayama, K., Suzuki, K., Motoi, Y., and Hiroi, T. Selective down-regulation of Th2-mediated airway inflammation in mice by pharmacological intervention of CCR4. *Clin. Exp. Allergy* 2011 (in press)
  20. Fukutomi, Y., Taniguchi, M., Tsuburai, T., Tanimoto, H., Oshikata, C., Ono, E., Sekiya, K., Higashi, N., Mori, A., Hasegawa, M., Nakamura, H., and Akiyama, K. Obesity and aspirin intolerance are risk factors for difficult-to-treat asthma in Japanese nonatopic women. *Clin. Exp. Allergy* 2012 (in press)
  21. Abe, A., Koyama, S., Ohtomo, T., Kitamura, N., Kaminuma, O., and Mori, A. Murine T cell-derived contractile activity for human bronchial smooth muscle cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2012 (in press)
  22. Kaminuma, O., Kitamura, N., Mori, A., Tatsumi, H., Nemoto, S., and Hiroi, T. NFAT1 and NFAT2 differentially regulate IL-17A expression in human T cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2012 (in press)
  23. Saeki, M., Nishimura, T., Kaminuma, O., Szuki, K., Takai, T., Mori, A., Takaiwa, F., and Hiroi, T. Inhibition of allergen-induced airway inflammation by oral immunotherapy with transgenic rice seeds independently of IgE synthesis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2012 (in press)
  24. 森 晶夫 : 喘息の病態の分子学的研究 update, *Progress in Medicine*;29(1):41-44, 2009
  25. 森 晶夫 : 最近の喘息研究の動向—非アトピー機序へのフォーカス、アレルギー・免疫;16(2):7-8, 2009
  26. 森 晶夫 : 喘息と CD8<sup>+</sup>細胞 (CTL)、Annual Review 呼吸器 2009 (工藤翔二、土屋了介、金沢実、大田健編)、中外医学社、東京 p.84-90, 2009
  27. 森 晶夫 : 難治性喘息の疫学 (日本と世界)、第 28 回六甲カンファレンス 難治性喘息をめぐる (森川昭廣、足立満、秋山一男、大田健、東田有智編)、ライフサイエンス出版、東京 p.15-26, 2009
  28. 森 晶夫 : 現在の喘息治療状況の中での難治性喘息の疫学、病態と診断、治療法は?、EBM アレルギー疾患の治療 2010-2011 (秋山一男、池澤善郎、岩田力、岡本美孝編)、中外医学社、東京 p.10-17, 2009
  29. 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
  30. 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
  31. 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
  32. 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
  33. 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
  34. 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
  35. 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
  36. 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
  37. 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
  38. 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
  39. 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
  40. 森 晶夫 : 高 IgE 症候群、呼吸;30(2):151-153, 2011
  41. 森 晶夫 : 国際アレルギー学会(WAO)国際科学会議報告、日本アレルギー協会関東支部だより;9:4-7, 2011
  42. 森 晶夫 : アレルギーをめぐるトレンド抗 IgE 抗体療法、皮膚アレルギーフロンティア;9(2):126-129, 2011
  43. 森 晶夫 : アレルギー病因論の新しい展開と重症アレルギーを特徴付けるステロイド抵抗性に

ついて、日本アレルギー協会アレルギー研修会  
主題：アレルギー診療 Update～病態に基づいた  
合理的な治療～ p. 1-10, 2011

44. 森 晶夫：重症喘息の病態と真菌抗原による非 IgE 依存性喘息反応、臨床免疫・アレルギー科;56(1):44-50, 2011
45. 森 晶夫、安部暁美、大友隆之、北村紀子、神沼修：重症喘息におけるステロイド治療抵抗性の機序解明とその治療法の開発、アレルギーア;40:96-101, 2011
46. 森 晶夫：アトピー型喘息と非アトピー型喘息の病態機序、第 30 回六甲カンファレンス 2010 年における気管支喘息のすべて (森川昭廣、足立満、秋山一男、大田健、東田有智編)、ライフサイエンス出版、東京 p. 33-40, 2011

## 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, Umezu-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、根本莊一、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. 12. 2-4 (大阪)
  29. 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-gamma 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
  30. Mori A, Kitamura N, Otomo T, Abe, A., and Kaminuma O. 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
  31. Mori A, Kitamura N, Otomo T, Abe, A., and Kaminuma O. 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
  32. Mori A, Kitamura N, Otomo T, Abe, A., and Kaminuma O. Role of T cells in late phase asthmatic response. The 8th Asia Pacific Congress of Allergy, Asthma, and Clinical Immunology 2010. Final program p. (Singapore) 2010/11/6-9
  33. Mitsui C., Taniguchi M., Higashi N., Ono E., Kajiwarra 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
  34. 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)
  35. 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)
  36. 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)
  37. 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)
  38. 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)
  39. 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)
  40. 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)
  41. 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 : 414, 2010. 5. 8 (京都)
42. 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)
  43. 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)
  44. 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)
  45. 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)
  46. 神沼 修、北村紀子、北村ふじ子、巽 英樹、根本荘一、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)
  47. 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)
  48. 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会秋季学術大会、アレルギー 59 (9) : 1283, 2010. 11. 27 (東京)
  49. 神沼 修、北村紀子、森 晶夫、巽 英樹、根本荘一、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会秋季学術大会、アレルギー 59 (9) : 1399, 2010. 11. 26 (東京)
  50. 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会秋季学術大会、アレルギー 59 (9) : 1400, 2010. 11. 27 (東京)
  51. 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会秋季学術大会、アレルギー 59 (9) : 1424, 2010. 11. 27 (東京)
  52. 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会秋季学術大会、アレルギー 59 (9) : 1446, 2010. 11. 26 (東京)
  53. 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会秋季学術大会、アレルギー 59 (9) : 1467, 2010. 11. 27 (東京)
  54. 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会秋季学術大会、アレルギー 59 (9) : 1477, 2010. 11. 27 (東京)
  55. Mori, A., Abe, A., Koyama, S., Kitamura, N., Yamaguchi, M., Tanimoto, H., Sekiya, K., Oshikata, C., Mitsui, C., Taniguchi, M., Ohtomo, M., Maeda, Y., Hasegawa, M., Akiyama, K., Ohtomo, T., and Kaminuma, O. 2011. Comparative Analysis of Steroid Sensitivity of Th cells *in vitro* and *in vivo*. 30th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Programme p.172 (Istanbul) 2011/6/11-15

56. Mitsui, C., Taniguchi, M., Fukutomi, Y., Higashi, N., Ono, E., Kajiwara, K., Tanimoto, H., Oshikawa, C., Sekiya, K., Tsuburai, T., Tsurikisawa, N., Ishii, T., Mori, A., Mita, H., Hasegawa, M., and Akiyama, K. 2011. Risk factors and characteristics associated with uncontrolled severe asthma in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. 30th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Programme p.146 (Istanbul)2011/6/13
57. Mori, A., Abe, A., Koyama, S., Kitamura, N., Yamaguchi, M., Mitsui, C., Oshikata, C., Tanimoto, H., Fukutomi, Y., Sekiya, K., Taniguchi, M., Maeda, Y., Ohtomo, M., Hasegawa, M., Akiyama, K., Ohtomo, T., and Kaminuma, O. 2011. T cell clone transfer model for steroid resistant asthma. European Respiratory Society 2011. (Amsterdam) 2011/9/18-22
58. 加藤茂樹、清水大樹、尾長谷靖、森 晶夫、岡三喜男：マウス喘息モデルの Th2 細胞性気道炎症における Neu1 シアリダーゼの役割、第 51 回日本呼吸器学会学術講演会、日本呼吸器学会雑誌 49 (増刊号) : 145, 2011. 4. 22 (東京)
59. 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：NSAID s 過敏喘息の難治化と CysLTs 過剰産生、第 51 回日本呼吸器学会学術講演会、日本呼吸器学会雑誌 49 (増刊号) : 179, 2011. 4. 22 (東京)
60. 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、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：環境中ダニアレルゲン量はアトピー型成人気管支喘息患者の臨床症状を反映する、第 51 回日本呼吸器学会学術講演会、日本呼吸器学会雑誌 49 (増刊号) : 180, 2011. 4. 22 (東京)
61. 関谷潔史、谷口正実、三井千尋、谷本英則、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：喘息大発作症例の臨床的検討、第 51 回日本呼吸器学会学術講演会、日本呼吸器学会雑誌 49 (増刊号) : 312, 2011. 4. 24 (東京)
62. 三井千尋、谷口正実、福富友馬、谷本英則、東憲孝、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：アスピリン喘息における持続的気流制限の検討、第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会、アレルギー 60 (3, 4) : 456, 2011. 5. 14 (千葉)
63. 谷本英則、谷口正実、竹内保雄、三井千尋、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、齋藤明美、中澤卓也、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アスペルギルス症 (ABPA) において、発症年齢による臨床的な違いはあるのか、第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会、アレルギー 60 (3, 4) : 463, 2011. 5. 14 (千葉)
64. 関谷潔史、谷口正実、三井千尋、福富友馬、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 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会、アレルギー 60 (3, 4) : 490, 2011. 5. 15 (千葉)
65. 安部暁美、神山 智、大友隆之、北村紀子、神沼 修、森 晶夫：ヒト気管支平滑筋細胞ゲルを用いた気管支収縮因子の探索、アレルギー・好酸球研究会 2011、抄録集 p. 6, 2011. 6. 18 (東京)
66. 神沼修、北村紀子、北村ふじ子、巽英樹、根本 莊一、宮武昌一郎、森 晶夫、廣井隆親：T 細胞の IL-17 産生に対する NFAT ファミリーの機能的相違、アレルギー・好酸球研究会 2011、抄録集 p. 24, 2011. 6. 18 (東京)
67. 佐伯真弓、鈴木一矢、西村友枝、神沼修、高井敏郎、大友隆之、森 晶夫、高岩文雄、廣井隆親：形質転換イネを用いたダニアレルギー治療米の開発、アレルギー・好酸球研究会 2011、抄録集 p. 29, 2011. 6. 18 (東京)
68. 押方智也子、釣木澤尚美、齋藤博士、粒来崇博、三井千尋、谷本英則、高橋健太郎、関谷潔史、美濃口健治、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と真菌感作喘息の病態における Th17 細胞の意義に関する検討、第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 60 (9, 10) : 1361, 2011. 11. 10 (東京)
69. 中澤卓也、森田裕司、齋藤明美、安枝 浩、三井千尋、高橋健太郎、関谷潔史、谷本英則、福富友馬、釣木澤尚美、押方智也子、粒来崇博、大友 守、前田裕二、森 晶夫、石井豊太、谷口正実、長谷川眞紀、秋山一男：セツキシマブに対する IgE 抗体とマダニ咬傷 第 2 報、第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 60 (9, 10) : 1364, 2011. 11. 10 (東京)
70. 西村友枝、佐伯真弓、神沼修、松村邦枝、米川博通、大友隆之、森 晶夫、廣井隆親：アレルギー性鼻炎発症における T 細胞の役割、第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 60 (9, 10) : 1402, 2011. 11. 11 (東京)
71. 三井千尋、谷口正実、東 憲孝、小野恵美子、梶原景一、福富友馬、谷本英則、高橋健太郎、

押方智也子、関谷潔史、粒来崇博、釣木澤尚美、美濃口健治、大友 守、前田裕二、森 晶夫、長谷川真紀、秋山一男：アスピリン喘息におけるアトピー要因、第61回日本アレルギー学会秋季学術大会、アレルギー 60 (9, 10) : 1444、2011. 11. 12 (東京)

72. Kaminuma O, Katoh S., Mori A., Hiroi T. : 抗原誘発気道内Th2細胞浸潤に対するCD44の選択的役割、2011 日本免疫学会総会、2011 Proceedings of the Japanese Society for Immunology 40:164, 2011. 11. 28 (幕張)
73. Watanabe N, Kaminuma O, Kitamura N, Mori A, Hiroi T : 抗原特異的Treg細胞によるTh1、Th2およびTh17細胞依存性腸炎に対する抑制効果

の検討、2011 日本免疫学会総会、2011 Proceedings of the Japanese Society for Immunology 40:176, 2011. 11. 28 (幕張)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

研究分担者 高橋 清（国立病院機構南岡山医療センター）

研究協力者

宗田 良（国立病院機構南岡山医療センター内科）  
岡田千春（国立病院機構本部人材育成キャリア支援室長）  
片岡幹男（岡山大学大学院保健学研究科）  
木村五郎、平野 淳（国立病院機構南岡山医療センターアレルギー科）  
金廣有彦、谷本 安（岡山大学病院呼吸器・アレルギー内科）

研究要旨

重症難治性喘息の予防と治療の対策を目的として、臨床と基礎の両面から検討した。(1) JGL2006の重症度分類による喘息症例を対象に呼気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(PSL5mg以上/日)との関連を検討した。喘息患者の呼気NOは、治療下においても健常人に比べて有意に高値であった。症状ステップ別の検討では、Step4群において呼気NOが高値であった。治療ステップ別の検討では、Step4群において呼気NOが高値の傾向であったが、各群に有意差を認めなかった。症状Step1症例において試案の重症度別に検討したところ、治療Step4a群で呼気NOが高値の傾向であった。従って、呼気NO値は治療下での喘息コントロール状態を反映し、十分な抗炎症療法が重症化予防に重要と考えられた。(2) 気道の炎症細胞は重症難治病態に深く関与していると考えられ、好塩基球における抗原提示能について検討した。末梢血単核球を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。その結果、IL-3との24時間培養によりCD203cの発現増強とともにHLA-DRの発現が誘導された。従って、好塩基球がアレルギー性炎症の場で活性化を受けると抗原提示能を有する可能性が示唆された。以上から、治療薬等の影響で抑制される炎症物質の中では、呼気NOが重症化抑制指標の一つとなり得ると考えられた。また、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示唆された。

A.研究目的

重症難治性喘息の予防と治療の対策を目的として、その臨床的特徴と炎症細胞からみた基礎的要因について検討した。(1) JGL2006 を基に見直した難治性喘息の臨床(重症度)分類試案に従って、難治性喘息の患者背景と気道の炎症指標から重症度基準と病態の関連性をこれまで検証してきた。その結果、呼気凝縮液中のCRPやalbumin、各種cytokineは重症よりも軽症や中等症持続型で高値であり、治療の影響を加味すると重症に至る前の段階でこれらの炎症指標を

参考にして症状に惑わされず確実に抑制する抗炎症療法を継続することが、重症化の予防に重要であると考えられた。また、呼気凝縮液中のH2O2やnitrite/nitrateはFEV1/PEFRと有意の負の相関を認め、気道閉塞の指標にも有用であり気道炎症抑制の指標および治療状況の把握として有用であった。今回は呼気凝縮液の採取よりもさらに簡便で繰り返しの測定が可能な呼気NO濃度について検討した。(2) 難治病態に重要な役割を果たすと考えられている気道の炎症細胞の関与を解明するために、これまでアレルギー