

厚生労働科学研究補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
総合分担研究報告書

気管支喘息の難治化の病態機序の解明と難治化の予防・治療法開発に関する研究
—マウス喘息モデルを用いた気道過敏性および気道リモデリング形成に関する基礎的研究—

研究分担者 田中 宏幸（岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室 准教授）

研究要旨

研究分担者らは、これまでにマウスの気管内にダニ抗原粗抽出物を反復気管内投与することにより喘息様病態形成が認められること、また、二本鎖 RNA である polyinosinic-polycytidylic acid (poly IC) をウイルス感染様刺激として用い検討した結果、poly IC の先行投与によりダニ抗原誘発気道炎症の増悪が認められることを先の厚生労働科学研究にて報告した。そこで、当該厚生労働科学研究では以下に示すように喘息様病態形成に及ぼすウイルス感染の影響を詳細に検討すると共に、ダニ抗原自身による免疫応答について検討を加えた。

1. 先行ウイルス感染による喘息病態促進における CD8 および LTB₄ の意義

初年度の平成 21 年度は、CD8 および LTB₄ の意義を検討した。その結果、poly IC を初回ダニ抗原投与前に投与した場合、ダニ抗原単独投与に比し、喘息様病態形成の有意な増強が認められた。これに対し、抗 CD8 抗体は BALF 中総白血球数ならびに好酸球数の増加を有意に抑制した。また、BLT₁ 拮抗薬も好酸球数の増加を有意に抑制した。以上の成績より、初回抗原曝露前にウイルス感染様刺激を加えると、喘息様病態形成が増強され、この反応は一部、CD8 および LTB₄ が関与している可能性が示唆された。

2. 喘息様病態形成ならびに重症化における IL-13 の意義

2 年目の平成 22 年度は、ダニ抗原による喘息病態形成および先行ウイルス感染による喘息発症の促進ならびに増悪における IL-13 の意義を中和抗体を用いて検討した。その結果、ダニ抗原による喘息様病態形成は抗 IL-13 抗体を気道内好酸球増多および軽微な気道過敏性が観察された時点から腹腔内投与すると、用量依存かつ有意に抑制された。また、同様の結果が poly IC 先行投与モデルの場合にも観察された。以上の成績より、ダニ抗原誘発喘息様病態形成ならびに先行ウイルス感染による喘息発症の促進・増悪機序には IL-13 が関与していること、また、治療標的としても極めて重要であることが示唆された。

3. 気道リモデリング形成に関与する細胞および機能分子の探索

最終年度の平成 23 年度は、ダニ抗原中に含まれている非メチル化 DNA の喘息様病態形成における意義を、TLR9 KO マウスならびにエンドソームの酸性化・成熟を阻害する chloroquine を用いて検討した。その結果、野生型および TLR9 KO マウス共に気道過敏性、BAL 液中好酸球増多、気道上皮杯細胞の過増生・肥厚、基底膜下における線維化形成が観察されたが、野生型マウスに比し TLR9 KO マウスでは、いずれの喘息様病態形成の減弱が認められ、この減弱は野生型マウスに chloroquine を腹腔内投与した際にも観察された。以上の成績より、ダニ抗原中に含まれる DNA は、むしろ喘息様病態形成に対し促進的に働くこと、また、この機構は気道粘膜における抗原提示の際に関与している可能性が推察された。

研究協力者

稲垣直樹（岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学
研究室・教授）

A. 研究目的

近年、アレルギー疾患患者数は漸増し、また、

その病態も難治化・慢性化している。その背景には、室外および室内環境因子の影響が無視できないが、詳細については不明な点が多い。我々は環境因子による喘息発症率の漸増ならびに難治化原因を探求するモデル確立を企図し、ダニ抗原をマウス気管内に反復投与することにより、いわゆるアジュバントを用いることなく、気道リモデリングを含む喘息様病態モデルを確立した。また、従前より疫学調査などで発症促進ならびに難治化因子として注目されているウィルス感染の影響を、一本鎖 RNA ウィルスが増殖する際に産生する二本鎖 RNA の模倣品である polyinosinic polycytidylic acid (poly IC) をマウス気管内に先行投与し、その後、極少量のダニ抗原を投与することにより検討した。その結果、poly IC の先行投与はダニ抗原誘発喘息様病態を有意に増強し、本反応は LPS/TLR4 に非依存的であり、一部のパラメーターはステロイド抵抗性を示すことを明らかにしている。

一般にウィルス感染細胞の認識ならびに排除には CD8⁺T 細胞が重要な役割を有すること、その遊走にロイコトリエン B₄ (LTB₄) が BLT₁ 受容体を介して関与する可能性が推察されている。従って、本反応においても CD8 および LTB₄ が関与している可能性が考えられる。そこで平成 21 年度研究では、CD8 に対する中和抗体および LTB₄ 拮抗薬を用いて、CD8⁺細胞ならびに LTB₄ の意義を検討した。

一方、ダニ抗原誘発マウス喘息様病態形成モデルでは、好酸球増多は IL-5 依存性に生ずるが、気道過敏性ならびに気道リモデリング形成は IL-5 非依存性かつ IL-13 依存性に生ずることをそれぞれの KO マウスを用いた結果から明らかにしている。しかしながら、IL-13KO マウスではダニ抗原に対する一次免疫応答が減弱したことから、病態形成の意義を明らかにすることはできなかったが、治療標的としての意義は不明のままである。そこで平成 22 年度の研究では、ダニ抗原気管内投与による喘息様病態形成における IL-13 の意義、ならびに先行ウィルス感染によるダニ抗原誘発喘息発症の促進ならびに増悪における IL-13 の意義を、それぞれ抗マウス IL-13 抗体を検討した。

前述のように、ダニ抗原は主要なアレルゲンであるが、どのように気道過敏性ならびに気道リモデリングなどの重症化病態形成が誘導されるか

については不明な点が多い。分担研究者らが実験に使用しているダニ抗原は市販の *Dermatophagoides farinae* 粗抽出物 (crude extract of Der f : ceDer f) であるが、粗抽出物中には DNA、LPS など種々の夾雑物が含まれており、それらが喘息様病態形成に影響を及ぼしている可能性も考えられる。

そこで最終年度の平成 23 年度は、ダニ抗原中に含まれている非メチル化 DNA の喘息様病態形成における意義を、TLR9 KO マウスならびにエンドソームの酸性化・成熟を阻害する chloroquine を用いて検討した。

B. 研究方法

1) Poly IC ならびにダニ抗原気管内投与による喘息様病態形成モデルの作成

実験は当教室のダニ抗原誘発マウス喘息モデルのプロトコールに準じて行った。すなわち、吸入麻酔下にてマウスの気管内に poly IC を投与した。その後、*Dermatophagoides farinae* (Der f) の粗抽出物を複数回投与して反応を惹起した。なお、今回用いたダニ抗原の用量は、それ自体でわずかに気道内好酸球増多が認められる程度の用量とした。最終抗原投与 48 時間後にアセチルコリンによる気道収縮反応を測定し、その直後に右肺は気管支肺胞洗浄(BAL)を行い、左肺は組織学的検討を行った。

2) 抗 CD8 抗体および BLT₁ 受容体拮抗薬の影響

抗 CD8 抗体(clone: 2.43)は、ATCC からハイブリドマを購入後、ヌードマウスの腹水から精製し、poly IC 投与時およびダニ抗原投与時に計 5 回腹腔内投与した。また、LTB₄ の受容体 BLT₁ 受容体拮抗薬は、poly IC 投与時およびダニ抗原投与時のそれぞれ前日、当日および翌日に経口投与した。

3) 卵白アルブミン誘発喘息モデル

実験は、当教室の卵白アルブミン誘発喘息モデルのプロトコールに準じた。すなわち、卵白アルブミン(OA)およびアジュバントとして水酸化アルミニウムゲルを用いてマウスを感作し、その後、OA 溶液を計 3 回吸入曝露した。最終抗原吸入 24 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。

4) ダニ抗原誘発マウス喘息モデル

実験は当教室のダニ抗原誘発マウス喘息モデ

ルのプロトコールに準じて行った。すなわち、吸入麻酔下にてマウスの気管内に *Dermatophagoides farinae* (Der f) の粗抽出物を複数回投与して反応を惹起した。最終抗原吸入 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。

5) 抗マウス IL-13 抗体の影響

抗マウス IL-13 抗体の投与はプロトコール 3) の場合、各抗原曝露前に腹腔内投与した。プロトコール 4) の場合、基礎検討の結果、5 回目のダニ抗原投与後において気道内好酸球増多ならびに軽微な気道過敏性が観察されることから、抗マウス IL-13 抗体の投与は 5 回目の Der f 投与直前から各抗原投与時に腹腔内投与した。プロトコール 1) の場合、抗マウス IL-13 抗体の投与は 4) と同様、5 回目の Der f 投与直前から各抗原投与時に腹腔内投与した。

6) TLR9 の意義と chloroquine の影響

実験は当教室のダニ抗原誘発マウス喘息モデルのプロトコールに準じて行った。すなわち、吸入麻酔下にて野生型マウスおよび TLR9 KO マウスの気管内に *Dermatophagoides farinae* (Der f) の粗抽出物を複数回投与して反応を惹起した。また、chloroquine はダニ抗原投与前日、当日および翌日に野生型マウスあるいは TLR9 KO マウスに腹腔内投与した。いずれの実験においても、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。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1) 抗 CD8 抗体および BLT₁ 受容体拮抗薬の影響

Poly IC を先行投与し、その後、ダニ抗原を反復投与することにより、ダニ抗原少量単独投与群に比し、気道過敏性、気道内好酸球増多、Th2 サイトカイン産生などがいずれも有意に増悪した。これに対し、抗 CD8 抗体は、気道過敏性ならびに Th2/Th1 サイトカイン産生バランスには影響を及ぼさなかったが、BALF 中総白血球数ならびに好酸球数の増加を有意に抑制した。また、BLT₁

拮抗薬も BALF 中好酸球数の増加を用量依存的かつ有意に抑制した。

2) 抗マウス IL-13 抗体の影響

① 卵白アルブミン誘発喘息モデル

まず基礎的検討として、従前の卵白アルブミンによる喘息モデルを用いて、本研究において使用する抗マウス IL-13 抗体の有効性ならびに用量決定を行った。対照として用いたラット IgG1 腹腔内投与群に比し抗 IL-13 抗体投与群では、OA 反復曝露による BALF 中好酸球増多、アセチルコリンに対する気道過敏性、血清中抗原特異的 IgE 値の上昇ならびに気道上皮における杯細胞の過増生の有意な減弱が観察された。

② ダニ抗原誘発マウス喘息モデル

PBS 投与群に比し、ダニ抗原反復投与群では、アセチルコリンに対する気道過敏性、気道内好酸球増多、血清中ダニ抗原特異的 IgG1 値の上昇、気道リモデリング形成などの喘息様病態が観察された。これに対し、抗 IL-13 抗体投与は、血清中抗原特異的 IgG1 値の上昇に対しては影響を及ぼさなかったが、気道過敏性、好酸球増多、気道上皮における肥厚、杯細胞の過増生および基底膜下の膠原繊維の沈着をいずれも有意に抑制した。

③ 先行ウイルス様刺激モデル

Poly IC を先行投与し、その後、ダニ抗原を反復投与することにより、ダニ抗原少量単独投与群に比し、気道過敏性、気道内好酸球増多、血清中抗原特異的 IgG1 値の上昇ならびに気道リモデリング形成がいずれも有意に増悪した。これに対し、抗 IL-13 抗体は血清中抗原特異的 IgG1 値の上昇には影響を及ぼさなかったが、気道過敏性、気道内好酸球増多、気道リモデリング形成を用量依存的かつ有意に抑制した。

3) TLR9 の意義と chloroquine の影響

市販品のダニ抗原抽出物中には DNA が含有されており、ダニ抗原の遺伝子情報からプライマーを作成し PCR にて確認したところ、ceDer f 中にはダニ由来の DNA が存在することを明らかにした。次いで、ダニ抗原を反復気管内投与することにより、その影響を検討した。その結果、野生型および TLR9 KO マウスにアセチルコリンに対する気道過敏性、BAL 液中好酸球を主体とした炎症性細胞数の増加、気道上皮における杯細胞の過増生・肥厚、基底膜下における線維化形成が観察されたが、野生型マウスに比し TLR9 KO マウスでは、予想に反し、いずれの喘息様病態形成の減

弱が認められ、この減弱は野生型マウスに chloroquine を腹腔内投与した際にも観察された。一方、本反応の普遍性を確認する目的で、ダニ抗原あるいは卵白アルブミンとアラムを混合し、マウスを能動的に感作し、その後、抗原を気管内投与し、それぞれの実験系において TLR9 の意義を検討した。その結果、先の気管内投与モデルとは異なり、いずれのパラメーターについても、野生型マウスと TLR9 KO マウスとの間に差は認められなかった。

D. 考察

1) 抗 CD8 抗体および BLT₁ 受容体拮抗薬の影響

本研究では、RNA ウィルスが産生する二本鎖 RNA の模倣品である poly IC による喘息様病態形成促進および難治化における CD8 および LTB₄ の意義を検討した。その結果、poly IC の先行投与による気道内総白血球数ならびに好酸球数の増加を抗 CD8 抗体は有意に抑制した。また、BLT₁ 拮抗薬は、気道内好酸球増を有意に抑制した。

周知のように CD8⁺ T 細胞はウィルス感染の際に感染細胞の認識ならびに排除に重要な役割を有していることが知られている。一方、近年、ウィルス感染などの刺激により、樹状細胞が外来抗原の提示を CD4⁺ T 細胞と同様に CD8⁺ T 細胞に対しても行うこと（クロスプレゼンテーション）が明らかになりつつある。本検討では、抗原曝露に先行してウィルス感染様刺激が宿主に入ることにより、喘息様病態形成が促進され、その一部に CD8⁺ T 細胞が関与することを明らかにした。従って、本モデルにおいても抗原提示の際に樹状細胞による CD8⁺ T 細胞へのクロスプレゼンテーションが行われた可能性が推察される。

さらに、LTB₄ が CD8⁺ T 細胞上に発現する BLT₁ を介して CD8⁺ T 細胞からの IL-13 産生を促進することがマウス喘息モデルを用いた検討により報告されており、ステロイド抵抗性喘息との関与も示唆されていることから、今後、ウィルス感染による喘息様病態形成促進機序を解明していくことは、発症機序のみならず重症化・難治化解明に繋がるものと思われる。

2) 抗マウス IL-13 抗体の影響

本研究ではダニ抗原による喘息様病態形成および先行ウィルス感染による喘息発症の促進ならびに増悪における IL-13 の意義を中和抗体を用いて検討した。その結果、抗 IL-13 抗体投与は、

いずれのモデルにおいても、血清中抗原特異的 IgG1 値の上昇に対しては影響を及ぼさなかったが、気道過敏性、好酸球増多、気道上皮における肥厚、杯細胞の過増生および基底膜下の膠原繊維の沈着をいずれも有意に抑制した。

本研究では、まず、抗 IL-13 抗体の投与用量の決定を目的とし、従来から喘息モデルとして汎用されている OA 誘発マウス喘息モデルを用いて検討を行った。その結果、抗体を各抗原吸入 1 時間前に腹腔内投与することにより、用量依存的かつ有意に血清中抗原特異的 IgE 値の上昇、気道過敏性、好酸球増多を抑制した。この結果から、抗 IL-13 抗体の投与量、投与ルートおよび投与タイミングを決定した。

そこで、次にダニ抗原誘発喘息様病態形成における IL-13 の意義を検討した。本モデルの気道過敏性は IL-4 および IL-13、好酸球増多は IL-4、IL-5、IL-13 依存性、気道リモデリング形成も IL-4、IL-5、IL-13 依存性であることをそれぞれの KO マウスを用いて明らかにしている。しかしながら、IL-13KO マウスでは、抗原特異的 IgE 値の低下が一次免疫時に観察されたため、IL-13KO マウスの表現型の説明として外来抗原に対する免疫獲得の低下がその後の病態形成に影響を及ぼした可能性も否定できない。そこで、本研究では KO マウスを用いることなく、治療的観点から中和抗体を用いてその意義を検討することとした。本研究では、前述のように、気道内に好酸球増多が認められ、軽微な気道過敏性が観察され、かつ、脾細胞を抗原刺激した際に Th2 サイトカイン産生が観察される時期から中和抗体を投与し、その影響を検討したところ、抗 IL-13 抗体は抗原特異的 IgG1 値の上昇に影響を及ぼすことなく、気道過敏性、気道炎症ならびに気道リモデリング形成を有意に抑制した。従って、ダニ抗原反復刺激による喘息様病態形成には IL-13 が重要な役割を有すること、また、治療標的としても有用であることが明らかとなった。

次いで、先行ウィルス感染による喘息発症の促進ならびに増悪における IL-13 の意義を検討した。これまでの検討から、ダニ抗原の気管内投与に先行して poly IC を気管内に投与すると、ダニ抗原少量投与に比し、喘息様病態形成が促進・増悪することを明らかにしている。この際、気道内では IL-13 産生量の有意な亢進が認められ、また、本発症促進・増悪には IL-13 が重要な役割を有することを IL-13KO マウスを用いた結果から明らかにしている。しかし、IL-13KO マウスの場合、

前述のように免疫応答自身が低下している可能性を認めないため、抗 IL-13 抗体を用いてその意義を検討した。その結果、前述のダニ抗原誘発喘息モデルと同様に、先行ウイルス刺激による喘息様病態形成の促進機構にも IL-13 が極めて重要な役割を有し、かつ、その中和抗体投与により治療も可能であることを明らかにした。今後、IL-13 産生細胞がダニ抗原単独モデルと poly IC 投与モデルとで異なるか否かなど、さらに詳細に検討する必要がある。

3) TLR9 の意義と chloroquine の影響

本研究では、ダニ抗原粗抽出物中に含まれる夾雑物の一つとしてダニ抗原由来の DNA に着目して検討を行った。はじめに市販品のダニ抗原中の DNA 含量を測定したところ、確かに DNA が含まれていることを確認した。次いで、この DNA がダニ抗原のものか否かを RT-PCR にて確認したところ、ダニ抗原由来 DNA 微生物であることが明らかとなった。ダニ抗原由来 DNA は非メチル化 DNA を配列中に含み、これを病原微生物関連分子パターン認識に重要な TLR9 が受容することが知られている。一般に、非メチル化 DNA が TLR9 を刺激すると、主として IL-12 などの Th1 誘導性のサイトカイン産生が顕著であることから、TLR9 の遺伝子欠損により本ダニモデルの喘息病態は悪化すると予想していた。しかし、予想に反し、野生型マウスに比し、むしろ TLR9 KO マウスでは反応の減弱が観察された。

そこで、本反応の普遍性を確認する目的でエンドソームの酸性化・成熟を阻害する chloroquine を用いて検討した。その結果、野生型マウスに chloroquine を投与すると、反応の減弱が観察されること、この減弱は TLR9 KO マウスとほぼ同程度の反応であること、TLR9 KO マウスに chloroquine を投与した場合、野生型マウスに chloroquine を投与した際の抑制以下まで影響は認められないことから、ダニ抗原による喘息様病態形成には TLR9 の関与が示唆された。

さらに、本反応の特異性を検証する目的でダニ抗原あるいは卵白アルブミンとアラムを混合し、マウスを能動的に感作し、その後、抗原を気管内投与し、それぞれ TLR9 の意義を検討した。その結果、両モデルともに野生型マウスと TLR9 KO マウスの間に差は認められなかった。このことは、ダニ抗原による気道感作において TLR9 が認識受容体として機能している可能性を示唆してお

り、非常に興味深い。今後、他の TLRs の意義やプロテアーゼの意義などを検討することにより、ダニ抗原による喘息発症機序の解明、ダニ抗原による喘息病態の難治化機序の解明に繋がると思われる。

E. 結論

ウイルス感染による喘息発症ならびに難治化には、CD8、LTB₄ならびに IL-13 が重要であることが明らかとなった。一方、ダニ抗原誘発喘息様病態形成において TLR9 が重要であることを明らかにした。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文

- 1) 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.
- 2) 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 A₂ receptor, on allergic asthmatic responses in guinea pigs. *Pharmacology* 2009; 84: 249-56.
- 3) 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.
- 4) Komai M, Tanaka H*, Nagao K, Ishizaki M, Kajiwara 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.

5) 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.

6) Yamashita H, Ito T, Kato H, Asai S, Tanaka H, Nagai H, Inagaki N: Comparison of the efficacy of tacrolimus and cyclosporine A in a murine model of dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis. *Eur. J. Pharmacol.* 645; 171-176: 2010.

7) Hyakkoku K, Hamanaka J, Tsuruma K, Shimazawa M, Tanaka H, Uematsu S, Akira S, Inagaki N, Nagai H, Hara H: Toll-like receptor 4 (TLR4), but not TLR3 or TLR9, knock-out mice have neuroprotective effects against focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 171; 258-267: 2010.

8) Shah MM, Miyamoto Y, Yamada Y, Yamashita H, Tanaka H, Ezaki T, Nagai H, Inagaki N: Orally supplemented *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 inhibits passive and active cutaneous anaphylaxis as well as 2,4-dinitrofluorobenzene and mite fecal antigen induced atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Microbiol. Immunol.* 54; 523-533: 2010.

9) Saito A, Tanaka H*, Usuda H, Shibata T, Higashi S, Yamashita H, Inagaki N, Nagai H: Characterization of skin inflammation induced by repeated exposure of toluene, xylene, and formaldehyde in mice. *Environ. Toxicol.* 26; 224-232: 2011.

10) Satou N, Ishihara K, Hiratsuka M, Tanaka H, Endo Y, Saito S, Iwakura Y, Leonard WJ, Hirasawa N.: Induction of thymic stromal lymphopoietin production by xylene and exacerbation of picryl chloride-induced allergic inflammation in mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 157;194-201: 2011.

11) Yamashita H, Takahashi K, Tanaka H, Nagai H, Inagaki N.: Overcoming food allergy through acquired tolerance conferred by transfer of Tregs in a murine model. *Allergy* 67; 201-209: 2012.

12) Takahashi G, Tanaka H, Higuchi N, Ikeda M, Inagaki N, Shichijo M: The potential role of PGD2 in nasal congestion observed in a guinea pig model of allergic rhinitis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press)

2. 総説

1) 田中宏幸、稲垣直樹、永井博弐：アレルギー性炎症におけるリモデリングのメカニズム。臨床免疫・アレルギー科, 52; 58-63: 2009.

2) 田中宏幸、山下弘高、稲垣直樹：気道アレルギーにおける抗原感作と発症への感染の関与アレルギーの臨床, 31; 47-52: 2011

3) 田中宏幸、山下弘高、稲垣直樹：気道アレルギーにおける抗原感作と発症への感染の関与アレルギー・免疫, 2012 (in press)

3. 学会発表

1) 田中宏幸、高橋 剛、若原恵子、橋本未樹子、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）

2) 田中宏幸：特別講演 アレルギー反応とプロスタグランジン D₂。第9回愛知成人喘息研究会（2009年9月、名古屋）

3) 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）

4) 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－免疫療法薬－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）

5) 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 ウィルス感染による喘息発症の促進機構－マウスモデルを用いた検討－。第60回アレルギー学会秋季学術大会（2010年11月、東京）

6) 田中宏幸：シンポジウム ダニ抗原誘発による喘息様病態の解析から見えてきた創薬ターゲット 生体機能と創薬シンポジウム 2011（2011年9月、東京）

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

研究分担者 烏帽子田 彰 広島大学大学院医歯薬総合研究科公衆衛生学教授

研究協力者 中村 裕之 金沢大学大学院医学系研究科環境生態医学・公衆衛生学教授

研究要旨 様々な酸化ストレス応答遺伝子多型と気管支喘息症との間あるいは気管支喘息症との重症度との間の関連を調べることによって、重症喘息症の診断法を確立し、予防法および治療法の開発、特に Tailor-made医療の実現の礎を築くことを目的とした。患者対照研究（相関解析）によって環境中の様々な酸化ストレスの状況において抗酸化作用を有するNAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1)と Glutathione S-transferase M1 (GSTM1)、アルギナーゼ1、アルギナーゼ2、環境中化学物質の代謝と密接な関係がある Nuclear erythroid 2 p45-related factor 2 (Nrf2)と Microsomal epoxide hydrolase (mEH)の遺伝子多型を、喫煙者と非喫煙者について重症（重症持続型としてJGL2006で規定されたStep 4の18人）、軽症（軽症間欠型、軽症持続型の30人）、および健常人（対照として50人）間で比較し、重症化におけるNQO1とGSTM1、アルギナーゼおよびNrf2 とmEHの役割について検討した。対象はすべて男性で、喫煙、非喫煙の割合は各群で差はなかった。相関解析によって、重症群のNQO1の遺伝子多型 Pro187SerおよびSer187Serの頻度が対照群に比べ有意に高い値を示した。喫煙者に限って分析したとき、重症群のNQO1の遺伝子多型であるnull型の頻度は対照群に比べ有意に高いことが認められた。またアルギナーゼ2の遺伝子多型 rs12885261 (C/T)、rs3742879 (A/G)の変異型 (TおよびG)と喘息症の重症化との関係が認められた。喫煙者あるいは過去の喫煙者においてのみ、Nrf2のプロモーター領域におけるTag遺伝子の多型 rs6726395(G/A)が喘息症の重症化との関係が認められた。mEHの遺伝子多型と喘息の間には有意な相関は認められなかった。以上の結果から、喘息症の重症化は、NQO1とアルギナーゼ2の遺伝子多型および喫煙とGSTM1およびNrf2の遺伝子多型との相互作用によって引きこされることが示唆された。喘息症の重症化がNQO1とアルギナーゼ2の遺伝子多型に大きく依存しているのは、治療の抵抗性と関係があると推測された。その詳細な病態の解明が今後の課題である。

A. 研究目的

気管支喘息症の発症および重症化に関わる遺伝子を同定することで、重症喘息症の診断法を確立し、予防法および治療法の開発、特に Tailor-made医療の実現の礎を築くことを目的とするために、抗酸化作用あるいは環境中の化学物質代謝と密接な関連がある蛋白の遺伝子多型と気管支喘息との間あるいは気管支喘息との重症度との関係を明らかにした。

B. 研究方法

東京都品川区五反田地区、京都市、山梨県牧丘町地区、金沢地区、富山地区において行われたアレルギー検診および病院研究によって、以下の対象者をリクルートし、患者対照研究（相関解析）を実施した。

対象は、すべて男性で重症群として JGL98 で規定された Step 4 の 15 例 (53.1±4.22 歳、平均値±標準誤差)、軽症群として Step 1-2 の 30 例 (48.3±2.94

歳)、これらの対照として、喘息、花粉症やアトピー性皮膚炎などのアレルギー歴を有さない健常群 50 例 (49.5±2.36 歳) である。これらの 3 群の間に年齢差はなく、また喫煙者の比もなかった。また重症群と軽症群は、いずれも健常群と比較して総 IgE 値 (RIST) は有意に高かったが、重症群と軽症群間には有意な差は認められなかった(表 1)。

調べた遺伝子は、環境中の様々な酸化ストレスの状況において抗酸化作用を有する NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) の遺伝子多型 Pro187Ser および Ser187Ser、Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) の遺伝子多型である null 型、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) および環境中化学物質の代謝と密接な関係がある Nuclear erythroid 2 p45-related factor 2 (Nrf2) のプロモーター領域における Tag 遺伝子の多型 rs6726395(G/A) と rs6721961(G/T)、Microsomal epoxide hydrolase (mEH) の遺伝子多型の Tyr113His と His139Arg であった。その多型の割合を喫煙者と非喫煙者について気管支喘息軽症、重症および健常人で比較し、重症化にその遺伝子の多型の役割について検討した。

C. 研究結果

相関解析によって、重症群の NQO1 の遺伝子多型 Pro187Ser および Ser187Ser を合わせた頻度 66.7% が対照群の 34.0% と比べ有意に高い値を示した。また、これらの関係は NQO1 の遺伝子多型においては認められなかったが、喫煙者に限って分析したとき、重症群の NQO1 の遺伝子多型である null 型の頻度 81.8% は対照群の 43.3% に比べ有意に高いことが認められた (表 2)。

また、軽症間欠型・軽症持続型、重症持続型、対照群の間でアルギナーゼ 1 の rs2749935(A/T) と rs2781659 (A/G) の頻度を比較した結果、rs2781659 (A/G) については全体では有意な差は認めなかったが、喫煙者の重症持続型の A/G あるいは G/G を有する頻度 81.8% は、対照群の 40% に比べ有意な高値を示した。アルギナーゼ 2 の rs12885261 (C/T)

と rs3742879 (A/G) では、全体におけるそれぞれの多型頻度 60% および 66.7% は対照群に比べ有意な高値を示した (表 3)。

また、喫煙者あるいは過去の喫煙者においてのみ、Nrf2 のプロモーター領域における Tag 遺伝子の多型 rs6726395(G/A) が喘息症の重症化との関係が認められた (表 4)。mEH の遺伝子多型と喘息の間には有意な相関は認められなかった (表 5)。

D. 考察

大気汚染は気管支喘息などのアレルギー性疾患の昨今の増加の重要な環境因子である。宿主側の重要な因子として酸化ストレス応答遺伝子の多型が、大気汚染物質に対する炎症反応の感受性を決定することが指摘されている。本相関解析によって、NQO1 の遺伝子多型 Pro187Ser および Ser187Ser と喘息症の重症化との関係が認められた。したがって喘息症の重症化は、NQO1 の遺伝子多型に大きく依存しているのは、治療の抵抗性と関係があると推測された。喫煙者あるいは過去の喫煙者においてのみ、GSTM1 の遺伝子多型 null 型が喘息症の重症化との関係が示された。したがって喫煙と GSTM1 の遺伝子との相互作用によって引きこされると示唆された。ニコチンなどの代謝における抗酸化ストレス応答活性の低下が喘息の重症化に寄与していると推測された。

またアルギニン経路が気道閉塞の発生に重要な働きを及ぼしていることや、アルギナーゼ活性の調節が喘息治療に役立つ可能性があることが示唆されている。喘息モデルを使用し抗原負荷後の肺組織において、アルギナーゼ I、II などの酵素遺伝子の発現が著しく上昇した実験などがある。アルギナーゼは Th2 サイトカインであるインターロイキン (IL) -4 や IL-13 により発現が増加し、実験的喘息モデルや喘息患者において mRNA や活性の上昇が認められている。アルギナーゼ 1 遺伝子の遺伝子変異と気管支拡張薬に対する反応の関連も知られている。本相関解析によって、アルギナーゼ 2 の遺伝子多型 rs12885261 (C/T)、rs3742879 (A/G) の変異型 (T および G) と喘息症の重症化

との関係が認められた。喘息症の重症化は、アルギナーゼ 2 の遺伝子多型に大きく依存しているのは、治療の抵抗性と関係があると推測された。喫煙者あるいは過去の喫煙者においてのみ、アルギナーゼ 1 の rs2781659 (A/G) の G と喘息症の重症化との関係が示唆された。喫煙とアルギナーゼ 1 の遺伝子との相互作用によって引きこされると示唆された。ニコチンなどの代謝における抗酸化ストレス応答活性の低下が喘息の重症化に寄与していると考えられた。

また喘息の重症化は喫煙と Nrf2 の遺伝子との相互作用によって引きこされると示唆された。ニコチンなどの代謝における抗酸化ストレス応答活性の低下が喘息の重症化に寄与していると推測さ

れた。mEH の遺伝子多型と喘息の間には有意な相関は認められなかった。この相関の欠如は、酸化ストレスとして作用する Benzo[a]pyrene の中間代謝産物の生成に、代謝におけるより上流の代謝酵素である CYP1A1 などの寄与の方が大きいことに起因すると推測された。

E. 結論

喘息症の重症化は、NQO1 とアルギナーゼ 2 の遺伝子多型および喫煙と GSTM1、アルギナーゼ 1、rf2 の遺伝子多型との相互作用によって引きこされることが示唆された。その詳細な病態の解明が今後の課題である。

表1 対象の特性(すべて男性)

群	人数	(平均値±標準誤差)			
		年齢 (歳)	RIST (U/ml)	喫煙#1: 非喫煙 (比)	合併症#2
対照	50 人	49.5±2.36	76.0±12.5	27:23	(-)
軽症間欠型、軽症持続型 (Step 1-2)	30 人	48.3±2.94	456±141**	16:14	(-)
重症持続型 (Step 4)	15 人	53.1±4.22	503±112**	8:7	(-)

#1喫煙者には過去の喫煙者も含む。#2花粉症、アトピー性皮膚炎, **p<0.01 (対照群と比較したとき)

表2 難治性喘息群、非難治性喘息群、対照群における NQO1 と GSTM1 遺伝子多型についての相関解析

Gene	Genotype Subgroup	Control (N=50)		Intermittent, mild persistent asthma (N=30)		Severe persistent asthma (N=15)	
		No	Frequency(%)	No	Frequency(%)	No	Frequency(%)
NQO1	Pro/Pro	33(20)	66.0(66.7)	15(12)	50.0(63.2)	5(5)	33.0(45.5)
	Pro/Ser, Ser/Ser	17(10)	34.0(33.0)	15(7)	50.0(36.8)	10(6)	66.7*(54.5)
GSTM1	Wild	27(17)	54.0(56.7)	14(7)	46.7(36.8)	6(2)	40(18.2)
	Null	23(13)	46.0(43.3)	16(12)	53.3(63.2)	9(9)	60(81.8*)

Figures in parentheses represents the number of the smoker males. Statistically significant difference as compared

to the value of control: *p<0.05

表3 軽症間欠型・軽症持続型、重症持続型、対照群におけるアルギナーゼ1および2の遺伝子多型についての相関解析

Gene and locus	Genotype Subgroup	Control (N=50)		Intermittent, mild persistent asthma (N=30)		Severe persistent asthma (N=15)	
		No	Frequency(%)	No	Frequency(%)	No	Frequency(%)
		Arginase I	A/A	27(17)	54.0(56.7)	14(7)	46.7(36.8)
rs2749935	A/T	23(13)	46.0(43.3)	16(12)	53.3(63.2)	8(7)	53.3(63.6)
	T/T						
Arginase I	A/A	28(18)	56.0(60.0)	13(6)	43.3(31.6)	6(2)	40.0(18.2)
rs2781659	A/G	22(12)	44.0(40.0)	17(13)	56.7(68.4)	9(9)	60.0(81.8)*
	G/G						
Arginase II	C/C	33(20)	66.0(66.7)	14(11)	46.7(52.7)	6(6)	40.0(54.5)
rs12885261	C/T	17(10)	34.0(33.3)	16(8)	53.3(47.3)	9(5)	60.0*(45.5)
	T/T						
Arginase II	A/A	35(21)	70.0(70.0)	15(12)	50.0(63.2)	5(5)	33.3(45.5)
rs3742879	A/G	15(9)	30.0(30.0)	15(7)	50.0(36.8)	10(6)	66.7**(54.5)
	G/G						

Figures in parentheses represent the number of the smoker males. Statistically significant difference as compared to the value of control: *p<0.05, **p<0.01

表4 軽症間欠型・軽症持続型、重症持続型、対照群におけるNrf2遺伝子多型についての相関解析

Locus	Genotype Subgroup	Control (N=50)		Intermittent, mild persistent asthma (N=30)		Severe persistent asthma (N=15)	
		No	Frequency(%)	No	Frequency(%)	No	Frequency(%)
		rs6726395	G/G	23(19)	46.0(63.3)	12(10)	40.0(52.6)
G/A	27(11)		54.0(36.7)	18(9)	60.0(47.4)	8(9)	53.3(81.8*)
A/A							
rs6721961	G/G	30(16)	60.0(53.3)	14(9)	46.7(47.4)	7(4)	46.7(36.4)
	G/T	20(14)	40.0(46.7)	16(10)	53.3(52.6)	8(7)	53.3(63.6)
	T/T						

Figures in parentheses represent the number of the smoker males. Statistically significant difference as compared to the value of control: *p<0.05

表5 軽症間欠型・軽症持続型、重症持続型、対照群におけるmEH遺伝子多型についての相関解析

Locus	Genotype Subgroup	Control (N=50)		Intermittent, mild persistent asthma (N=30)		Severe persistent asthma (N=15)	
		No	Frequency(%)	No	Frequency(%)	No	Frequency(%)
		Tyr113His	Tyr/Tyr	27(16)	54.0(53.3)	14(11)	46.7(57.9)
	Tyr/His	23(14)	46.0(46.7)	16(8)	53.3(42.1)	8(5)	53.3(45.5)
	His/His	28(17)	56.0(56.7)	13(9)	43.3(47.4)	6(5)	40.0(45.5)
His139Arg	His/Arg	22(13)	44.0(43.3)	17(10)	56.7(52.6)	9(6)	60.0(54.5)
	Arg/Arg						

Figures in parentheses represent the number of the smoker males.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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):280-287.
- 2) Tanaka T, Hitomi Y, Kambayashi Y, Hibino Y, Fukutomi Y, Shibata S, Sugimoto S, Hatta K, Eboshida A, Konoshita T, Nakamura H: The differences in the involvements of loci of promoter region and Ile50Val in interleukin-4 receptor α chain gene between atopic dermatitis and Japanese cedar pollinosis. *Allergol Int.*(in press)
- 3) Tomoaki KIMURA, Kiyoshi YAMAOKA, Shigetoshi

WAHASHI, Seiya UCHIDA, Yasutami TSUDA, Akira EBOSHIDA: Perceived Stress, Stressors, and Coping with the Stress among Participants in Health Promotion Events JPSS Vol.10 (in print)

2. 学会発表

- 1) 村上玄樹、鹿嶋小緒里、鳥帽子田彰
院内がん登録データによる治療の地域分析の検討
16-20/Oct./2011
第70回日本公衆衛生学会総会 秋田市
- 2) 村上玄樹、鹿嶋小緒里、鳥帽子田彰、林田賢史
院内がん登録データを用いた診療圏分析
21-23/Nov./2011
第31回医療情報連合大会 鹿児島市
- 3) 曾根智史 鳥帽子田彰
公衆衛生の人材育成システムづくりを考える
セッション 公衆衛生行政フォーラム1
16-20/Oct./2011
第70回日本公衆衛生学会総会 秋田市
- 4) 鳥帽子田彰 (講演)

環境と健康を考える in 高知

(NPO 法人ちさんネット

高知大学 国際・地域連携センター主催)

高知市 RKC ホール 23 / Oct. / 2011

G.知的所有権の出願・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

環境中化学物質の気管支喘息の重症化への影響と抗アレルギーフィルターの開発

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

研究協力者 人見 嘉哲（金沢大学医学系准教授）、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）、田中 宏幸（岐阜薬科大学准教授）、烏帽子田 彰（広島大学医歯薬総合研究科教授）

研究要旨 近年の文明国におけるアレルギー性疾患の増加の背景には、大気汚染をはじめとする環境中の化学物質に対する暴露機会の増加が指摘されている。本研究では、大気汚染物質である浮遊粒子状物質大気汚染物質であるディーゼル排気粒子（Diesel exhaust particulate, DEP）の成分である芳香族炭化水素（Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs）のアレルギーへの影響を *in vitro* および *in vivo* において系統的に評価し、さらにその影響を予防するためのフィルターを開発し、その予防効果を検証した。自動車排出物質（Diesel exhaust particulate, DEP）抽出物あるいはその成分である芳香族炭化水素（Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs）であるナフタレン、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-ニトロフェノールについて、開発した化学物質の除去を目的とした非晶質鉄および活性炭を含むフィルターの除去能を評価するため、DEPあるいはその成分を含む水を、それぞれ非晶質鉄あるいは活性炭のフィルターを用いてろ過し、フィルター処理後のサンプルのPAHsをGC/MSにて測定した。またDEP試験機（自社製）でディーゼル発電機より発生したDEP中の重金属、PAHsのフィルター性能の評価を行った。また吸着メカニズムの解明のためにPAHsの非晶質鉄の吸着性能などを検討した。その結果、ベンゾ(a)ピレンに対しては非晶質鉄フィルターが効果的であった。非晶質鉄は10nm以下のナノ粒子からなるFerrihydrite構造を有することが判明した。Ferrihydriteは一般的に重金属の吸着性に優れているが、我々の試験経過ではPAHsなどの有機物に対しても吸着性があることがわかった。特に分子量の大きい特にベンゾaピレン、ベンゾaアントラセンによるアレルギー促進作用を抑制できることがわかった。以上から、我々の開発したフィルターはDEP、特にPAHsによるアレルギー促進作用を抑制できることがわかった。

A. 研究目的

近年の文明国におけるアレルギー性疾患の増加の背景には、大気汚染をはじめとする環境中の化学物質に対する暴露機会の増加が指摘されている。さらには、気管支喘息症の増悪因子としても化学物質が関与することが考えられることから、化学物質における免疫毒性やアレルギー発症への影響を調べることは急務である。本研究では環境中の化学物質のアレルギーへの影響を *in vitro* および *in vivo* にお

いて系統的に評価し、さらにその影響を予防するためのフィルターを開発し、その予防効果を検証した。

B. 研究方法

1) *in vitro* 研究および *in vivo* 研究

A549 細胞へ自動車排出物質（Diesel exhaust particulate, DEP）抽出物あるいはその成分である芳香族炭化水素（Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs）であるナフタレン、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^aを添加し、CO₂ インキュベーターにて 18-48 hr 培養し、培地中産生された Interleukin-8 (IL8)濃度をサンドイッチ ELISA 法で測定した。また、アレルギーモデルマウスにて、これらの物質を投与し、気管支の好酸球および好中球の浸潤と気道過敏性を評価した (図 1)。

2) フィルターの除去能の評価

DEP 抽出物あるいはその成分である PAHs であるナフタレン、フルオレン、フェナントレン、フルオランテン、ベンゾ^a(a)アントラセン、ベンゾ^a(a)ピレン、p-ニトロフェノールの除去率について、我々の開発した非晶鉄および活性炭を含むフィルター (aFe) と既存のフィルターを比較するため、DEP あるいはその成分を含む水を、それぞれ aFe と既存のフィルターを用いてろ過し、フィルター処理後のサンプルの PAHs を GC/MS にて測定した。

3) 吸着メカニズムの解明

aFe の PAHs に対する吸着率の解明に特に粒状活性炭 AGC フィルターとの吸着特性の有意差が認められたベンゾ a ピレンへの吸着性のメカニズムをフロンティア理論にもとづいて検証した

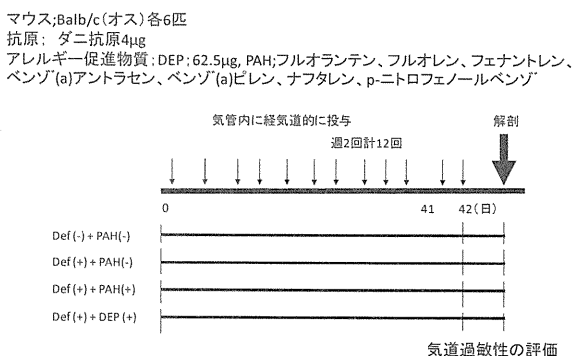


図 1 ダニアレルギー発症モデルマウスを用いた DEP および PAH のマウス気道過敏性への影響を調べる実験プロトコール

C. 研究結果

1) in vitro 研究および in vivo 研究

A549 細胞への PAHs の添加によって放出された Interleukin-8 (IL-8)濃度を図 2 に示した。フルオランテン、ナフタレン、ベンゾ^a(a)アントラセン、p-

ニトロフェノールが IL-8 の放出に対し量一反応関係が認められた(図 2)。またモデルマウス実験により、フルオランテン、ナフタレン、ベンゾ^a(a)アントラセン、p-ニトロフェノールが気道過敏性の亢進を認め、その亢進は、DEP に比較的近かった (図 3)。

2) フィルターの除去能の評価

除去能評価実験では、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(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 (図 4)。

また、非晶質鉄は 10nm 以下のナノ粒子からなる Ferrihydrite 構造を有することが判明した (図 5)。

3) 吸着メカニズムの解明

ベンゾ a ピレン赤の電子雲の最高占有軌道 (HOMO)の三角形の一辺の長さ約 5Å と aFe の結晶間隔の水素原子 (白) 間の距離が約 5.9Å との間で π 結合による核型吸着反応が起きるため、ベンゾ a ピレン、ベンゾ a アントラセンという約 5Å 程度の分子量の多い有機物の吸着に効果があることがわかった (図 6)。一方、分子量の少ないナフタレン、フルオレン、フェラントレン、p-ニトロフェノールなどは、三角形の一辺の長さが 4 Å と短いため、吸着性は弱いという吸着メカニズムが解明された。この理論は PAHs 溶液の除去率結果とも一致し、活性炭の低分子の有機ガスを吸着するファンデアワールスとは異なる挙動であるといえた。

D. 考察

数々の in vivo や in vitro の研究により、DEP は IgE 抗体の産生を助長するアジュバント作用、好酸球の遊走や炎症部位への浸潤の促進、気道の反応性亢進作用、肥満細胞や好塩基球からの Th2 タイプのサイトカイン産生の増加、鼻粘膜や気道の上皮細胞からの IL-6, IL-8, TNF-α、Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)、RANTES、ICAM-1 などの蛋白や Proinflammatory サイトカイン産生の増強作用を有

する。あるいは活性酸素種や窒素種を介しての炎症促進作用などが示されている。同時に NAD(P)H(quinone oxidoreductase (NQO1)), glutathione-S-transferase M1 (GSTM1), heme oxygenase-1 (HO-1)などの Phase 2 の代謝酵素や抗酸化酵素が DEP によるアレルギー反応を抑えることも示されている。本 in vitro および in vivo 実験により、DEP の成分のうち、フルオランテン、ナフタレン、ベンゾ^aアントラセン、p-ニトロフェノールの PAHs がアレルギー反応を引き起こすことが認められた。

DEP は炭素分子をコアとして亜鉛、アルミニウム、鉄などの金属をはじめ、Pyrene 類, Phenanthrene (Phe)類、Benzo[a]pyrene (BaP)などの PAH を含んでおり、Phe や BaP が IgE 産生細胞からの IgE 分泌を促進したり、ヒト気道上皮細胞からの IL-8 や GM-CSF などのサイトカイン産生を増強することが明らかとなっている。Schober らは、Phe や BaP による好塩基球からの IL-4 と IL-8 などのサイトカインの放出作用を認め、高親和性 IgE レセプター-(Fc ϵ RI)を介したシグナル伝達機構を通してアレルギー反応が助長されることを in vitro の系で証明している。動物実験では、BaP と 1-nitropyrene (1-NP) も鼻アレルギーを悪化させることが示されている。DEP を有機溶媒のジクロロメタンで抽出される有機化学物質 (Organic chemicals in DEP: DEP-OC) と、ジクロロメタンに溶けない残渣炭素粒子 (washed DEP) に分けた時、アレルギー性気道炎症は、washed DEP よりも DEP-OC と抗原との併用投与により顕著に認め、アレルギー性喘息を増悪させる DEP の主たる構成成分は、残渣炭素粒子ではなく、有機化学物質であると推測されている。

著者らの開発したフィルターを用いた除去能評価実験では、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。したがって、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、喘息の重症化の予防に有効であることが示された。

Ferrihydrite はナノ粒子からなり比表面積が 200m²/g 前後と高く、プラスイオンの重金属などの吸着材として広く使用されている。有機化合物の官能基などと配位結合して凝集体を形成して補足固定・分解除去できることも示されている (特開 2004-349519)。消臭、抗菌、防カビなどは、空気中の酸化物質からラジカル (不対電子) を生成して吸着した物質を分解する機能が有り、この活性作用は永久的なものであることも知られている (www.tokyo-zoen.co.jp)。このように Ferrihydrite は一般的に重金属の吸着性に優れているが、我々の研究では、このような吸着メカニズムが解明されたことから、PAHs、特に分子量の大きい特にベンゾ a ピレン、ベンゾ a アントラセンによるアレルギー促進作用を抑制できることがわかった。

E. 結論

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本フィルターは PAHs によるアレルギー反応を抑制できることから、従来のフィルターと違って喘息の重症化の予防に有効であることが示された。またその物理的機序として、Ferrihydrite の吸着の特性に基づくことが認められた。また、我々の開発したフィルターは PAHs、分子量の大きい特にベンゾ a ピレン、ベンゾ a アントラセンによるアレルギー促進作用を抑制できることがわかった。

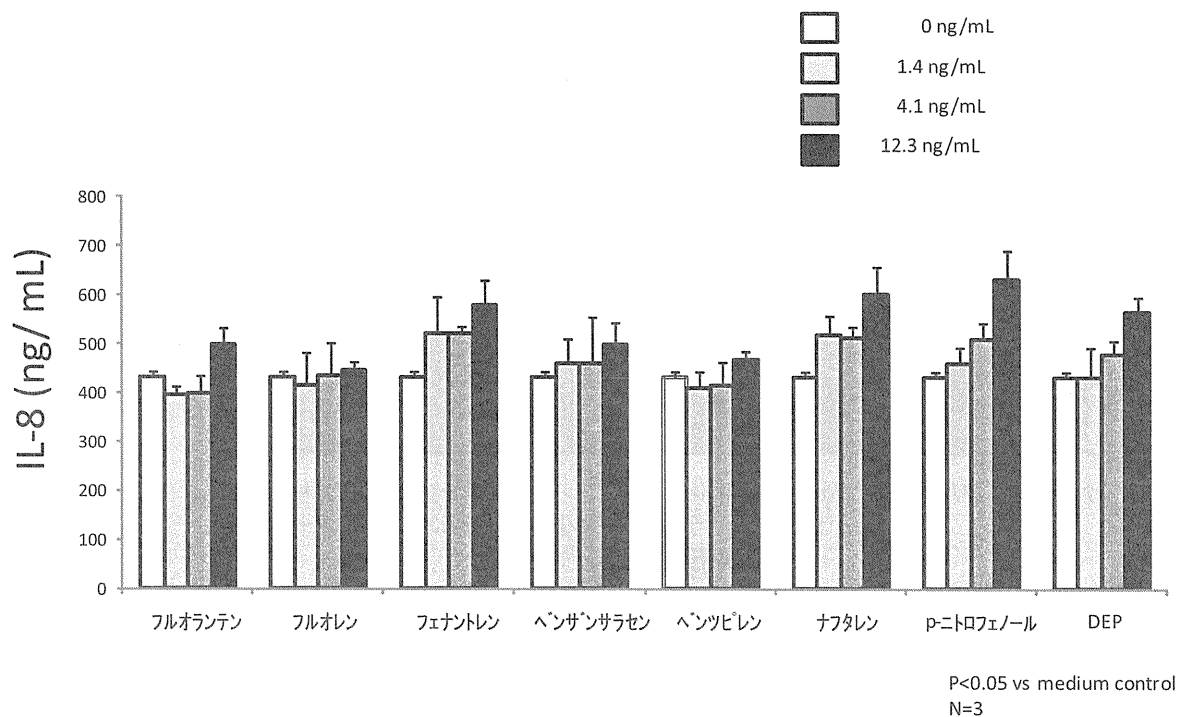


図 2 A549 細胞への PAHs の添加によって放出された Interleukin-8 (IL-8)濃度

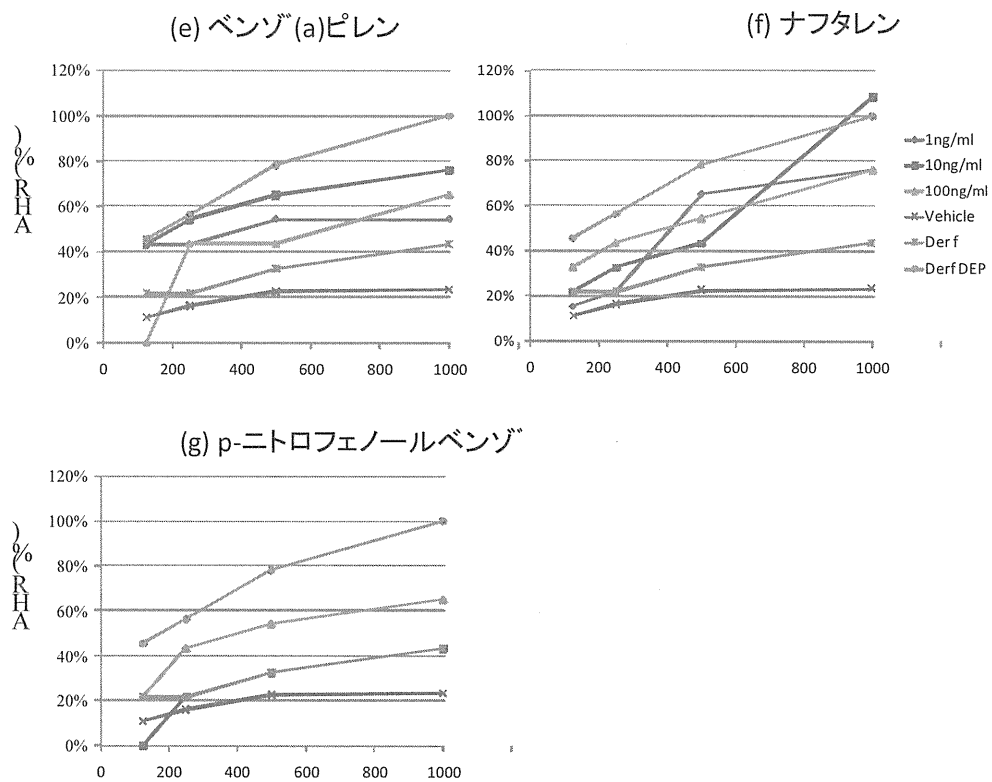


図 3 ダニアレルギー発症モデルマウスを用いた DEP および PAH((a) フルオランテン、(b) フルオレン、(c) フェナントレン、(d) ベンゾ(a)アントラセン、(e) ベンゾ(a)ピレン、(f) ナフタレン、(g) p-ニトロフェノールベンゾ) のマウス気道過敏性への影響

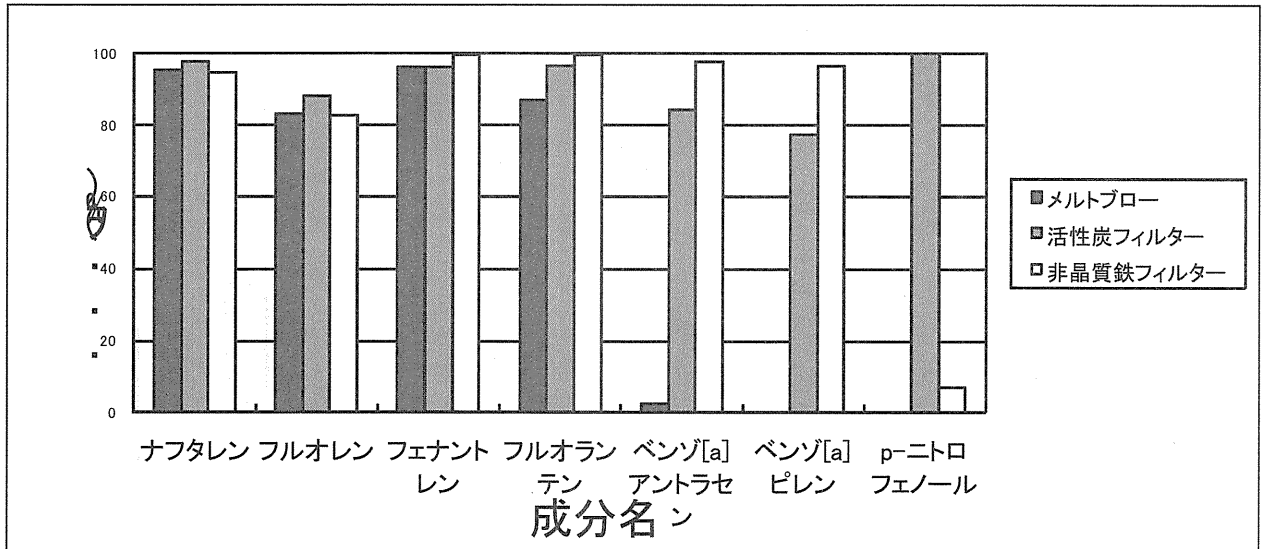


図 4 フィルターの除去能評価実験の結果

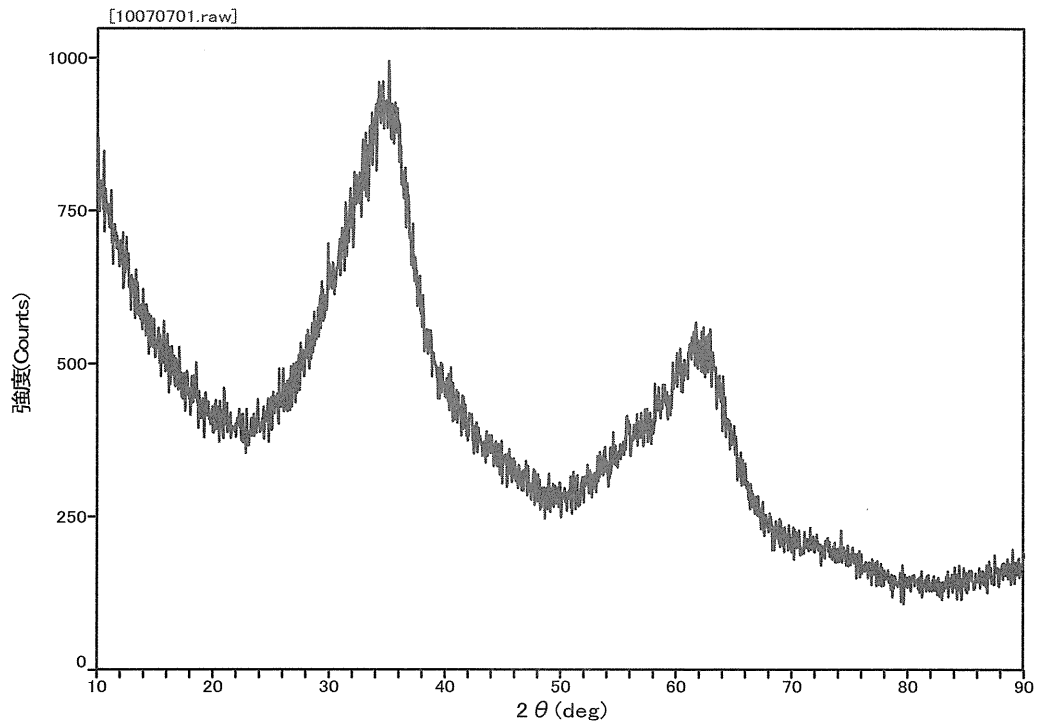


図 5 非晶質鉄水酸化物 aFe の吸着メカニズム

aFe は回折角を 2 つ有する典型的なフェリハイドライト構造で重金属を吸着する

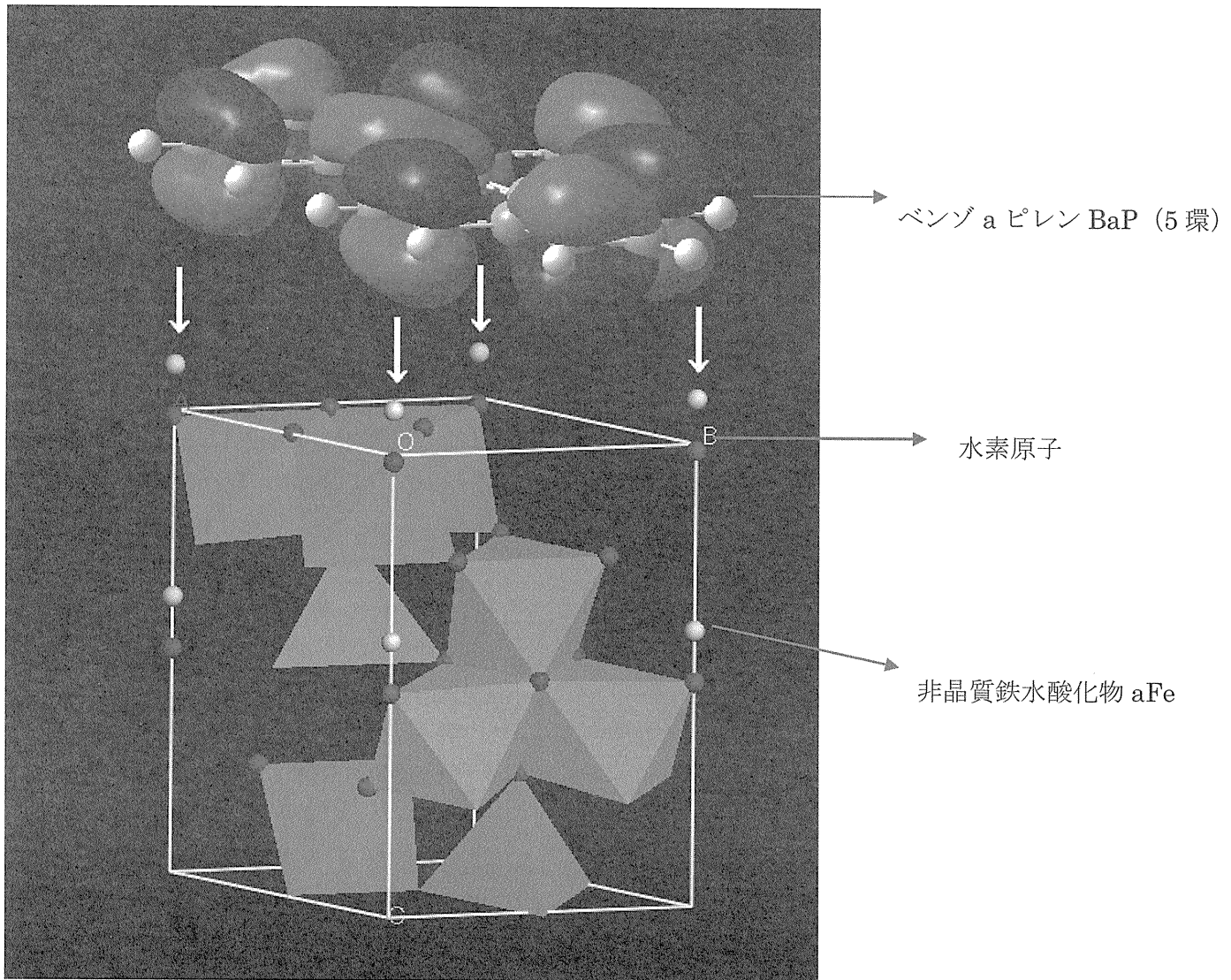


図 6 非晶質鉄水酸化物 aFe の吸着メカニズムの解析—フロンティア理論による PAHs 吸着 aFe の LUMO と BaP の水素原子の HOMO とが吸着される

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.* 2009,63(3):329-335.
- 2) 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.* 2009,113:49-55.

- 3) 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.* 2009,14(5):255-260.
- 4) Sekizuka N, Sakai A, Shimada K, Tabuchi N, Kameda Y, Nakamura H: Low serum secretory

- immunoglobulin A level and sense of coherence score at an early gestational stage as indicators for subsequent threatened premature birth. *Environ Health Prev Med.* 2009,14(5):276-83.
- 5) 山崎真平、人見嘉哲、神林康弘、日比野由利、中村裕之: スギ花粉症特異的QOLを用いたスギ花粉症予防・治療法の経済的評価. *日本予防医学学会雑誌* 2009, 4(3):29-34.
- 6) 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.* 2009,14:319-327.
- 7) Hayashi M, Sasahara S, Nakamura H, Umeda T, Usami K, Tomotsune Y, Yoshino S, Matsuzaki I: Association between life stress factor and mental health status of workers in Tsukuba Research Park City. *J Phys Fit Nutri Immunol.* 2009,19(3):212-221.
- 8) Tomotsune Y, Sasahara S, Umeda T, Hayashi M, Usami K, Yoshino S, Kageyama T, Nakamura H, Matsuzaki I: The association of sense of coherence and coping profile with stress among research park city workers in Japan. *Ind Health.* 2009,47(6):664-672.
- 9) 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.* 2010,64(1):52-6.
- 10) 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.* 2010,75(3):H87-92.
- 11) 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.* 2010,12(2):R64.
- 12) 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):280-287.
- 13) 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.* 2010,178(1):182-185.
- 14) 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.* 2010,25(6):604-611.
- 15) Sekizuka N, Sakai A, Aoyama K, Kohama T, Nakahama Y, Fujita S, Hibino Y, Hitomi Y, Kambayashi Y, Nakamura H: Association between the incidence of premature rupture of membranes in pregnant women and seismic intensity of the Noto Peninsula earthquake. *Environ Health Prev Med.* 2010,15(5):292-298.
- 16) 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.* 2010,28(10):2156-2160.

- 17) 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*. 2010,20(1):3-10.
- 18) 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*. 2010,33:1129-1136.
- 19) 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*. 2011,127(2):531-533.
- 20) Hatta K, Otachi T, Sudo Y, Hayakawa T, Ashizawa Y, Takebayashi H, Hayashi N, Hamakawa H, Ito S, Nakase R, Usui C, Nakamura H, Hirata T, Sawa Y, for the JAST study group.: Difference in early prediction of antipsychotic non-response between risperidone and olanzapine in the treatment of acute-phase schizophrenia. *Schizophr Res*. 2011,128:127-135.
- 21) Sugimoto N, Miwa S, Ohno-Shosaku T, Tsuchiya H, Hitomi Y, Nakamura H, Tomita K, Yachie A, Koizumi S: Activation of tumor suppressor protein PTEN and induction of apoptosis are involved in cAMP-mediated inhibition of cell number in B92 glial cells. *Neurosci Lett*. 2011,497(1):55-59.
- 22) Hirota R, Ngatu NR, Miyamura M, Nakamura H, Suganuma N.: Goishi tea consumption inhibits airway hyperresponsiveness in BALB/c mice. *BMC Immunol*. 2011,12:45.
- 23) Usui C, Hatta K, Doi N, Kubo S, Kamigaichi R, Nakanishi A, Nakamura H, Hattori N, Arai H: Improvements in both psychosis and motor signs in Parkinson's disease, and changes in regional cerebral blood flow after electroconvulsive therapy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011,35(7):1704-1708.
- 24) Fukutomi Y, Taniguchi M, Watanabe J, Nakamura H, Komase Y, Ohta K, Akasawa A, Nakagawa T, Miyamoto T, Akiyama K.: Time trend in the prevalence of adult asthma in Japan: Findings from population-based surveys in Fujieda City in 1985, 1999, and 2006. *Allergol Int*. 2011,60(4):443-8.
- 25) Hibino Y, Takaki J, Ogino K, Kambayashi Y, Hitomi Y, Shibata A, Nakamura H.: The relationship between social capital and self-rated health in a Japanese population: a multilevel analysis. *Environ Health Prev Med*. 2012,17(1):44-52.
- 26) Fukutomi Y, Kawakami Y, Taniguchi M, Saito A, Fukuda A, Yasueda H, Nakazawa T, Hasegawa M, Nakamura H, Akiyama K.: Allergen city and Cross-Reactivity of Booklice (*Liposcelis bostrichophila*): A Common Household Insect Pest in Japan. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012,157(4):339-348.
- 27) Fukutomi Y, Kawakami Y, Taniguchi M, Saito A, Fukuda A, Yasueda H, Nakazawa T, Hasegawa M, Nakamura H, Akiyama K.: Allergenicity and Cross-Reactivity of Booklice (*Liposcelis bostrichophila*): A Common Household Insect Pest in Japan. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012,157(4):339-348.
- 28) Konoshita T, Makino, Kimura T, Fujii M, Morikawa N, Wakahara S, Arakawa K, Inoki I, Nakamura H, Miyamori I, The Genomic Disease Outcome Consortium (G-DOC) Study Investigators: A crossover comparison of urinary albumin excretion as a new surrogate marker for cardiovascular disease among 4 types of calcium channel blockers. *Int J Cardiol*.(in press)
- 29) Tanaka T, Hitomi Y, Kambayashi Y, Hibino Y, Fukutomi Y, Shibata S, Sugimoto S, Hatta K,