

抗性の好酸球性肺炎症例の免疫学的解析を実施した。

次いで、こうした難治例に対する治療介入のモデル構築を目指して、T細胞クローン移入マウスモデルを作成した。これまでの研究によって、好酸球性炎症におけるCD4⁺T細胞の重要性が示唆されており、CD4⁺T細胞から産生されるサイトカイン、なかでもL-4、IL-5は気道の好酸球浸潤と過敏性亢進に重要な役割を果たしていることが知られている。ことに、IL-5は、好酸球の局所浸潤と活性化に必須である。マウス喘息モデルでは、抗IL-5中和抗体の投与は、好酸球浸潤、気道過敏性亢進を抑制する。またIL-5ノックアウトマウスでは、正常マウスで観察される気道過敏性亢進が消失するが、IL-5の投与により通常の反応が回復することが知られている。一方で、好酸球性炎症は、多種多様の炎症細胞が関与する複合反応であることも指摘されている。抗原特異的なIgA、IgG、IgEといった免疫グロブリンや肥満細胞の気道過敏性亢進発症への関与が示唆されている。

そこで、本研究では、CD4⁺T細胞の好酸球浸潤・気道過敏性亢進における役割を明確にするために、抗原特異的モノクローナルCD4⁺T細胞をマウスに移入後、抗原チャレンジするモデルを作成した。能動感作マウスを用いたモデルでは、抗原特異的T細胞の誘導と共にIgE、IgG、IgAなどの免疫グロブリンの上昇が認められるが、この方法では、正常マウスと異なる点が移入された抗原特異的T細胞の存在のみであるため、好酸球性炎症におけるCD4⁺T細胞の役割を明確に示すことができる。

B. 研究方法

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または入院中の成人症例より、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、 $2 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度にて、AIM-V培地に懸濁した。20 nMのPhorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)と $1 \square \square \text{M}$ のionomycin (IOM)で24時間刺激した後、上清をハーベストした。一部のwellは、抗CD3抗体(OKT3、 $10 \square \text{g}/\text{ml}$)でcoatし、固相化抗CD3抗体刺激に用いた。抗CD28抗体は、 $1 \square \text{g}/\text{ml}$ で培養中に添加した。ダニアレルゲンによるT細胞からのIL-5産生を調べるために、D.f. extractの最終濃度0.1, 1, 10 mg/mlを加えて6日間培養した。上清中のサイトカイン(IL-5)濃度は、特異的サンドイッチELISAにて測定した。血清ECP値は、Pharmacia Upjohn社の協力により測定した。

FACS 解析

リンパ球活性化マーカーとして、CD3、CD4、CD8 陽性細胞における、CD25、CD69 の陽性率を比較した。上記の末梢血単核球を FITC あるいは PE ラベル抗体で 2 重染色し、FACS 測定した。

動物および試薬

6-14 週齢の BALB/c マウスを用いた。動物搬入後、一週間以上馴化飼育した後に実験に供した。実験期間中、水および食餌は自由に摂取させた。使用薬物は以下のものを使用した。Ficol-Paque はファルマシア、AIM-V 培地は Gibco、Fetal bovine serum (FBS) は、IS ジャパン、Hank's balanced salt solution (HBSS) はニッスイ、Complete Freund's adjuvant (CFA) は DIFCO、recombinant mouse IL-2 は Biosource、ペントバルビタールは東京化成、アセチルコリンはナカライテスク、パンクロニウムは三共、卵白アルブミン (OVA) は Sigma (Grade III)、5-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) は Molecular Probes より購入した。精製ビオチン化マウス抗 IL-2、IL-4、IL-5 抗体およびマウス IL-2、IL-4、IL-5 は Pharmingen より、マウス IL-2、IL-4、IL-5、 β -actin プライマーは Clontech より、GeneAmp RNA PCR kit は Perkin Elmer より購入した。抗 IL-2 抗体 (S4B6-1)、抗 IL-4 抗体(11B11)、抗 IL-5 抗体(TRFK-5)ならびに抗 IFN- γ 抗体(R4-6A2)は、ハイブリドーマを接種したマウス腹水より、アフィニティカラムを用いて精製したものを使用した。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

細胞培養およびアッセイ

Th clone は OVA により感作した動物の鼠径リンパ節より調製した。6 週齢の BALB/c マウスの foot pad に OVA 10 μ g と CFA 10 mg の混合物を投与することにより感作を行った。感作 7-14 日後に鼠径部リンパ節を無菌的に摘出し、HBSS に懸濁した。HBSS を用いて 3 回洗浄した後 10% FBS を含む AIM-V 培地に再懸濁した。抗原提示細胞には、非感作 BALB/c マウスより脾臓を摘出し、塩化アンモニウム低張処理により赤血球を除去して脾細胞を調製し、X線処理後、10% FBS を含む AIM-V 培地に懸濁し用いた。リンパ節細胞および脾細胞を各々 2×10^6 個および 5×10^6 個/well ずつ、総容量 1 ml/well となるように 24 穴プレートに混合播種し、37°C、5%v CO₂ 条件下で培養した。終濃度 100 μ g/ml の OVA を添加し、6 日目に recombinant mouse IL-2 を終濃度 10 U/ml に加えてさらに培養した。

初代培養 11 日目に生細胞を回収し、限界希釈を行った。生細胞 1, 3, 10 および 30 個/well を X線照射非感作マウス脾細胞 5×10^4 個/well、OVA 100 μ g/ml および IL-2 10 U/ml とともに 96 穴プレートにて各 24-30 well ずつ培養した。IL-2 は、培養開始 7 日目に再添加した。14-28 日目に鏡顕下で明らかな増殖反応を示した well の割合が総 well 数の 1/3 未満であった希釈段階の細胞を選択し、さらにサブクローニングを行って Th clone を樹立した。

樹立した Th clone は、10-14 日毎に新たに調製した非感作マウス脾細胞 5×10^6 個/well、OVA 100 μ g/ml および IL-2 10 U/ml とともに 24 穴プレートにて抗原刺激を行い、3-4 日毎に培地交換を行って IL-2 を添加した。

樹立した Th clone について、抗原特異的な

サイトカイン産生を検討した。最終抗原刺激から 10-14 日後の Th clone を回収し、Ficoll-Paque により精製した後 AIM-V 培地に 5×10^5 個/ml の濃度に再懸濁し、X線照射非感作マウス脾細胞 5×10^5 個/ml、OVA 100 μ g/ml とともに 96 穴プレートに播種した。24 時間後に上清を回収し、上清中 IL-2, IL-4, IL-5 ならびに IFN- γ 量を ELISA にて測定した。

T 細胞依存性好酸球性肺疾患モデル

Th clone (5×10^6 - 2×10^7 個)は HBSS 0.5 ml に懸濁し、非感作マウスに尾静脈より移入した。一部の Th clone は、蛍光色素である CFSE でラベルしたのちに移入した。すなわち、Th clone を 5 mM の CFSE を含む培地で 37°C、10 分間培養し、3 回洗浄後実験に供した。

細胞移入 24 時間後、OVA を吸入暴露することにより抗原チャレンジを行った。マウスを 50 ml のプラスチックチューブに入れた後、鼻部をチャンパー内に固定し、10% OVA 溶液を 20 分間吸入させた。OVA 溶液は pressure 型ネブライザー(De Vilbiss 社)を用いてミスト化した。抗 IL-2, IL-4, IL-5 ならびに IFN- γ 抗体は、抗原チャレンジ 30 分前および 24, 48, 120 時間後にそれぞれ 2 mg/body を静脈内投与した。

EPO 活性は Strath の方法に準じて測定した。気管支肺胞洗浄液 50 μ l を 200 μ l の assay buffer、100 μ l の phenylenediamine hydrochloride (1 mM) /H₂O₂ (0.8 mM) とともに 37°C で 5 分間反応させた後、200 μ l の 4M H₂SO₄ を加えて反応を停止させた。反応液の 492 nm での吸光度を測定し、検量線より酵素活性を算出した。反応の特異性を確認する目的で Horseradish peroxidase, human

myeloperoxidase の反応性を測定したが、交叉性は確認されなかった。

病理組織学的検討

生理食塩水あるいは OVA チャレンジ後の動物を、ペントバルビタール麻酔により安楽死させ、直ちに肺を摘出して 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した。固定後、常法に従って 4 mm 厚のパラフィン切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica, TCS-NT) を用いて観察した。

Th clone 移入マウスにおける肺でのサイトカイン mRNA 発現は RT-PCR 法を用いて検出した。摘出した肺を、ホモジネート後 one-step acid guanidium isothiocyanate-phenol-chloroform 抽出法により RNA を抽出した。RT-PCR は Gene Amp RNA PCR kit を用いて行った。抽出した RNA から Moloney leukemia virus reverse transcriptase により cDNA を作成後、IL-2, IL-4, IL-5 ならびに β -actin primer を用いて DNA polymerase により増幅した。増幅産物は 2% アガロースゲル電気泳動・エチジウムブロミド染色により解析した。IL-2, IL-4, IL-5 ならびに β -actin の予想される大きさはそれぞれ 413, 357, 424, 540 bp である。

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮として、患者を対象とする調査、検査において、また、ヒト由来の細胞、組織等の試料を用いる場合には、ヘルシンキ宣言を遵守するとともに、わが国のヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)、疫学研究に関する倫理指針(平成 19 年文部科

学省・厚生労働省告示第1号)、臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)を遵守した。インフォームドコンセントを徹底するとともに、症例はコード化し、プライバシーの保護に万全を期した。実施に先立って研究者の施設における倫理委員会の承認を得たうえで、倫理規定に従って実施した。実験動物を使用する場合、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)及び研究者の施設における動物実験に関する倫理規定を遵守した。実験間のばらつきを考慮した上で、統計学的有意性を議論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. 研究結果

24時間培養上清中のIL-5値と血清ECP値との間に正の相関が認められた(p=0.03、図1)。IL-2、IL-4、IFN- γ 産生と血清ECP値の間には有意な相関は認められなかった。

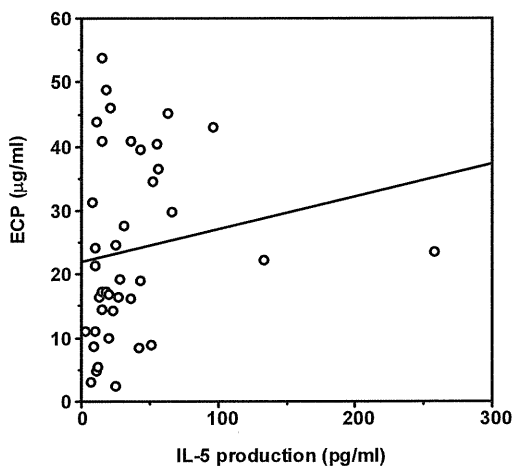


図1. 末梢血 T 細胞 IL-5 産生と血清 ECP の関連

今回末梢血 T 細胞 IL-5 産生値と血清 ECP 値との間に正の相関が認められたとの結果は、T細胞のIL-5産生能が *in vivo*における好酸球活性化に関連することを示している。そこで、気管支喘息におけるアトピー型、非アトピー型の2大病型について、サイトカイン産生と気道過敏性について比較、検討した。通年性の喘息症例で、スギアレルゲン等に対しては皮膚反応陽性、RAST陽性であるが、ダニアレルゲンに対してはIgE抗体が認められない群を、Mixed typeとして分類した。血中total IgE値は、アトピー型、非アトピー型、Mixed type喘息群において、 656 ± 174 、 217 ± 109 、 112 ± 95 IU/mlと、アトピー型喘息群において最も高値であった。1秒率では、 77.7 ± 2.0 、 74.7 ± 5.0 、 $88.6 \pm 6.5\%$ と、非アトピー型群において、やや軽症である傾向を認めた。気道過敏性(AchPC₂₀)においても、それぞれ $7,471 \pm 1,180$ 、 $7,637 \pm 3,408$ 、 $12,478 \pm 4,608$ と、同じ傾向を認めた。

表1. アトピー型、非アトピー型、Mixed type 喘息の免疫学的特徴

	Atopic	Mixed	Nonatopic
N	30	6	5
P+I	30.8 ± 6.8	33.2 ± 23.0	63.9 ± 6.6
Mite	145.2 ± 73.8	$37. \pm 6.0$	0.7 ± 0.0
AchPC ₂₀	7471 ± 1180	7637 ± 3408	1247 ± 4608
FEV _{1.0}	77.7 ± 2.0	74.7 ± 5.0	88.6 ± 6.5
Total IgE	656 ± 174	217 ± 109	112 ± 95

表 1 に示す如く、アトピー型、非アトピー型、Mixed type 喘息群においては、抗原非特異的活性化刺激 (PMA+ionomycin) により、IL-5 産生が顕著に誘導された (30.8±6.8、33.2±23.0、63.9±6.6 pg/ml)。アトピー型喘息群は全例がダニアレルギーの症例であり、抗原非特異的な活性化刺激に対する IL-5 産生の亢進のみならず、抗原特異的の刺激であるダニ抗原に反応した IL-5 産生が誘導されている (145.2±73.8 pg/ml)。アトピー型喘息においては、ダニアレルゲン反応性 T 細胞が、好酸球活性化因子 IL-5 を過剰産生することによって、気道粘膜において好酸球性炎症が惹起されるといふ、pathogenesis が推測される。非アトピー型喘息群においては、抗原非特異的活性化刺激 (PMA+ionomycin) により、IL-5 産生が顕著に誘導されるが (30.8±6.8 pg/ml)、ダニ抗原に反応した IL-5 産生は誘導されない (0.7±0.0 pg/ml)。興味深いことに、ダニアレルゲンに対する IgE 抗体のない Mixed type 喘息群において、ダニアレルゲンに反応した IL-5 産生が認められた (33.2±23.0 pg/ml)。この研究結果は、IgE 抗体の認められない喘息症例においても、ダニ抗原を認識して IL-5 を産生する T 細胞が存在することを示し、好酸球性炎症の成立機序を考える上で重要である。

アトピー型喘息群に限定し、気道過敏性 (AchPC₂₀) が 20,000 以上と以下の 2 群で比較すると、表 2 に示す如く、抗原非特異的活性化刺激 (PMA+ionomycin) に対する IL-5 産生は、気道過敏性を有する (20,000 以下) 症例で有意に高かった (30.8±6.8 vs 14.5±1.2 pg/ml)。ダニアレルゲン反応性の IL-5 産生においては、差はより顕著である (151.1±81.6 vs 0.9±0.5 pg/ml)。血中 total IgE 値には、有

為差は認めなかった (600±181、1,140±661 IU/ml)。IgE 産生は、T 細胞の IL-4 産生に規定されることが知られている。この結果は、好酸球性炎症に結びつく T 細胞 IL-5 産生が、IL-4 産生と別個に制御されていることをうかがわせるものである。すなわち、ダニ特異的 IgE 抗体があるだけでは、気道過敏性に必ずびつかないが、好酸球活性化作用を有する IL-5 の産生が誘導されると気道過敏性がもたらされるものと推測される。

表 2. アトピー型喘息における T 細胞 IL-5 産生と気道過敏性の関連

	AchPC ₂₀	
	<20,000	20,000<
N	30	3
P+I	30.8±6.8	14.5±1.2
Mite	151.1±81.6	0.9±0.5
ECP	23.6±3.8	35.4±19
FEV _{1.0}	76.9±2.1	85.0±2.8
EO	543±68.2	660±141
Total IgE	600±181	1,140±661

最後に、気道過敏性 (AchPC₂₀) が、2,000 以下 (高度)、2,000 以上 20,000 以下 (中程度) と 20,000 以上 (なし) の 3 群で、IL-5 産生について解析した (表 3)。1 秒率では、74.6±5.1、77.3±2.1、85.2±2.8% と気道狭窄の程度と気道過敏性の程度 (AchPC₂₀) が、相関することが明らかである。histamin に対する気道過敏性 (HisPC₂₀) も概ね AchPC₂₀ と同じ分布をとっていた (669±266、1,280±384、7,262±4,269)。AchPC₂₀ が 20,000 以上の群では、抗原非特異的活性化刺激 (PMA+ionomycin) に対する IL-5 産生は、11.0±1.9 pg/ml と低値

で、気道過敏性を有する群では高かった (32.9 ± 15.5 , 34.5 ± 7.5 pg/ml)。concanavalin A に対する IL-5 産生は、気道過敏性の程度順に、 35.0 ± 18.3 , 18.2 ± 3.0 , 12.5 ± 6.3 pg/ml であった。

表 3. 気道過敏性の程度別にみた免疫学的特徴

	AchPC ₂₀		
	<2,000	<20,000	20,000<
N	16	29	8
P+I	32.9 ± 15.5	34.5 ± 7.5	11.0 ± 1.9
ConA	35.0 ± 18.3	18.2 ± 3.0	12.5 ± 6.3
FEV _{1.0}	74.6 ± 5.1	77.3 ± 2.1	85.2 ± 2.8
Eo	580.6 ± 108.5	532.1 ± 60.1	356.7 ± 96
HisPC ₂₀	669 ± 266	1280 ± 384	7262 ± 4269
Total IgE	387 ± 111	557 ± 203	521 ± 287

以上の研究結果は、T 細胞 IL-5 産生が *in vivo* において、好酸球性炎症疾患の組織障害あるいは機能障害に関連することを示唆している。われわれは、原因不明の好酸球性肺炎症例における末梢血 T 細胞 IL-5 産生を解析した。臨床経過を図 2 に示す。典型的な肺浸潤と好酸球増多を初発症状とする症例で、ステロイドパルス療法にもかかわらず、末梢血好酸球は 40% 以上を維持していた。

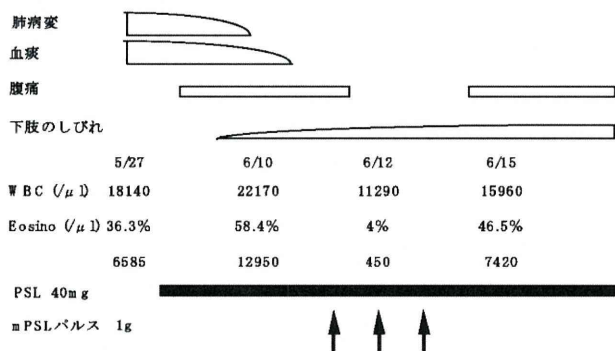


図 2. ステロイド抵抗性の好酸球性肺炎症例

in vitro におけるステロイド感受性を解析したところ、IL-5 産生はデキサメサゾン 100 nM によっても抑制されず、ステロイド抵抗性の状態にあったことが判明した (図 3)。

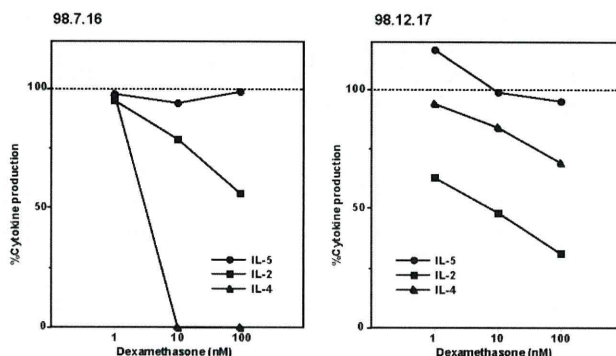
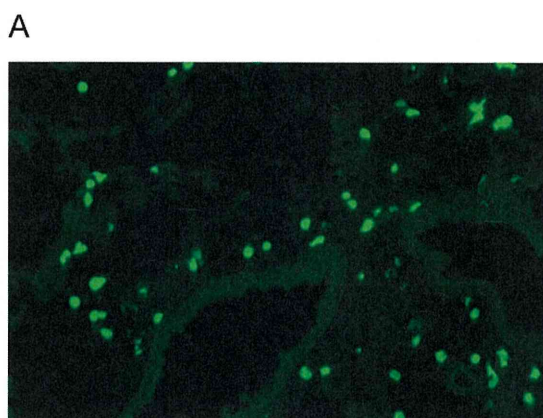
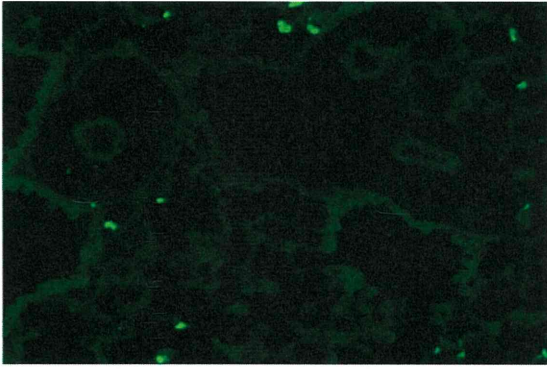


図 3. 好酸球性炎症症例における末梢血 T 細胞のステロイド抵抗性

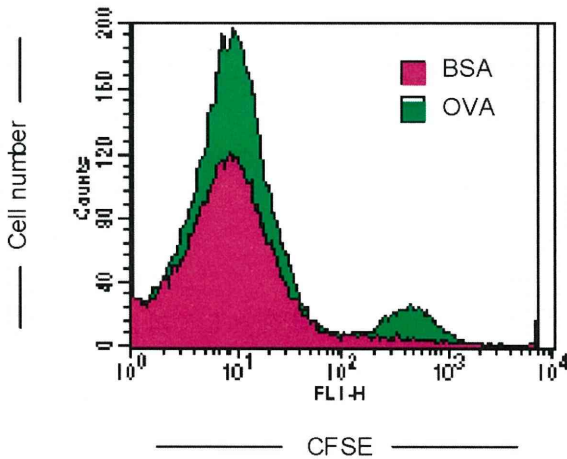
好酸球性炎症モデル研究としては、まず、移入した Th clone の抗原チャレンジによる肺への集積の有無を検討した。CFSE ラベルを施した Th clone は、生理食塩水チャレンジ群では血管壁周囲に若干観察される程度であったが (図 4 B)、抗原チャレンジ群では、暴露 24 時間後で顕著な Th clone の気道粘膜内への浸潤が観察された (図 4 A, C)。この反応はチャレンジ 48 時間後にピークを迎え、96 時間後でも観察された (図 4 D)。



B



C



D

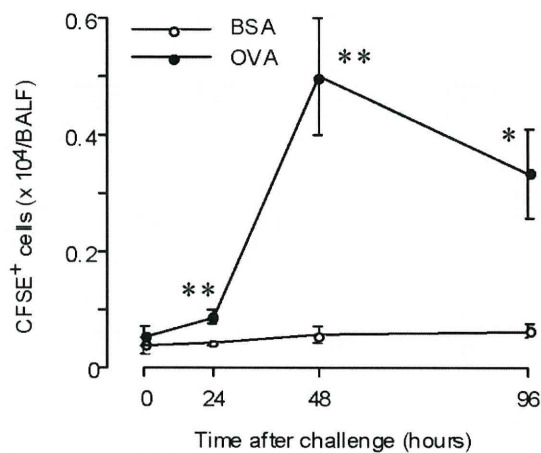


図4. CFSE ラベル Th クローンの組織集積

Th clone 移入マウスにおける抗原誘発好酸球浸潤は、抗原チャレンジ24時間後から好酸球数が上昇し、192時間後にピークに達し、その後減少した。また、好酸球活性化の指標であ

る EPO 活性も同様に抗原吸入後から上昇し、96 時間後に最大値に達した。以上の結果は、抗原特異的な免疫グロブリンが存在しない本モデルにおいても、気道内に集積した好酸球が活性化され脱顆粒を起こすことを示唆している (図5)。

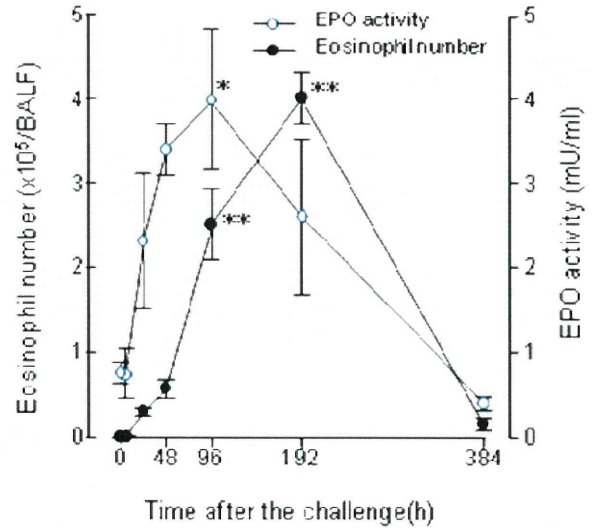


図5. Th クローン移入モデルにおける抗原吸入後好酸球浸潤と EPO 活性の推移

抗原チャレンジによって引き起こされた好酸球浸潤と気道過敏性亢進反応の関連を調べる目的で、Th clone 移入マウスでの抗原チャレンジ後のアセチルコリンに対する気道反応性の経時変化について検討した。アセチルコリンに対する気道反応性は、抗原チャレンジ後 48 時間から有意に上昇し、192 時間後に最大となった。この反応性の上昇は 2 週間後も持続し、4 週間後によろやく抗原チャレンジ前の水準に回復した (図6)。反応性亢進の程度は OVA により能動的感作をおこなった抗原誘発マウス気道過敏性亢進モデルと比較しても遜色ないものであった。

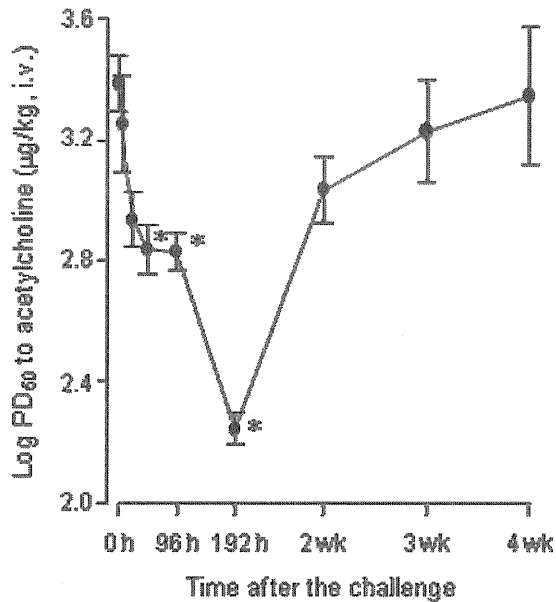


図6. Th クローン移入モデルにおける気道過敏性の推移

実験方法の概要を図7に示す。

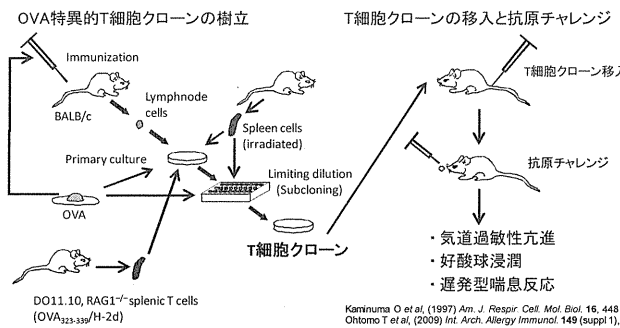


図7. T細胞クローン移入喘息モデル

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。樹立したThクローン移入の24hr後にOVAまたは抗原エピトープのp323-339を経鼻的にチャレンジし、経時的に好酸球浸潤、気道過敏性を評価した。

これまでに実施した約20個のクローンの解析からは、LAR、好酸球浸潤、気道過敏性の誘導は各々独立した現象と考えられた(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 (%)
	Total Cells (%)	Eo (%)	Neut (%)	
BT1	233	-	105	93
BT3	230*	729	208	63
BF4	344	4638	78	192*
BF7	412	15438	61	116
T5-1	349*	330	765*	349*
T5-2	844*	22,660	303*	113
T5-4	67	579	54	89
T5-6	162	33,700	325*	116
T6-1	198	114	97	381*
T6-2	222	2,341*	857*	160
T6-3	232	33	20	45
T6-4	572*	3,232*	1,448*	173*
T6-7	399*	1,481*	1,034*	111
T6-8	95	327*	118	246
T6-9	83	14*	10*	100
T6-10	71	10*	5*	117

NT: Not tested

気道内好酸球浸潤におけるIL-5の役割を検討する目的で、さまざまなサイトカイン産生パターンを示すTh cloneを移入・抗原チャレンジした際の、浸潤好酸球数と産生サイトカイン量の相関関係について検討した。各Th cloneはそれぞれ 5×10^6 個づつマウスに移入し、抗

原チャレンジ 96 時間後に気管支肺胞洗浄を行った。その結果を図 8 に示す。浸潤好酸球数と IL-5 産生量は有意に相関したが ($r^2=0.92$)、IL-2 ($r^2=0.12$)、IL-4 ($r^2=0.23$)、および IFN- γ ($r^2=0.0070$) との間に相関関係はみられなかった。また、IL-5 を多く産生する Th clone では、アセチルコリンに対する気道反応性の有意な亢進がみられたが、IL-5 の産生量が少ない Th clone では、反応性亢進は認められなかった。

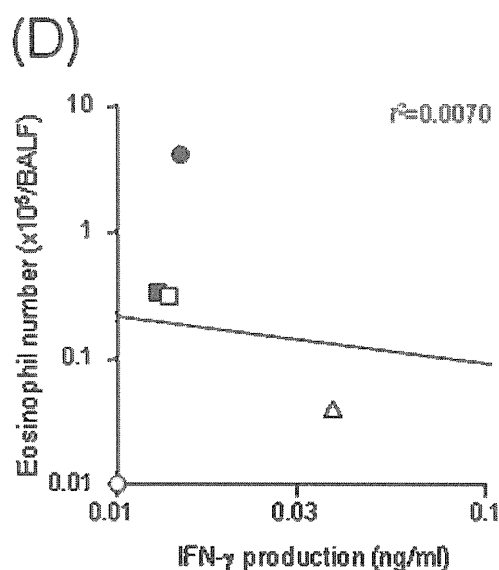
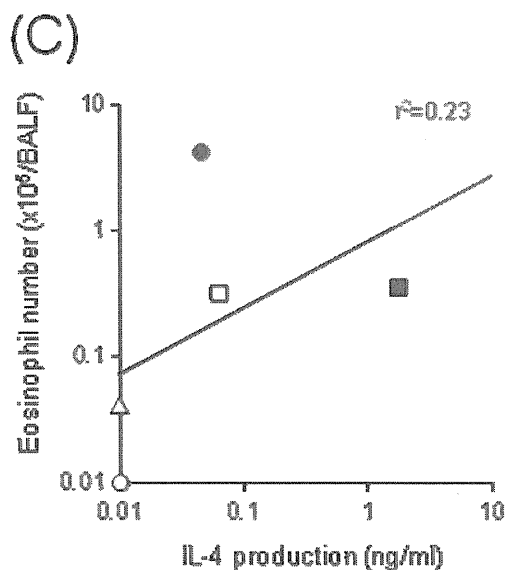
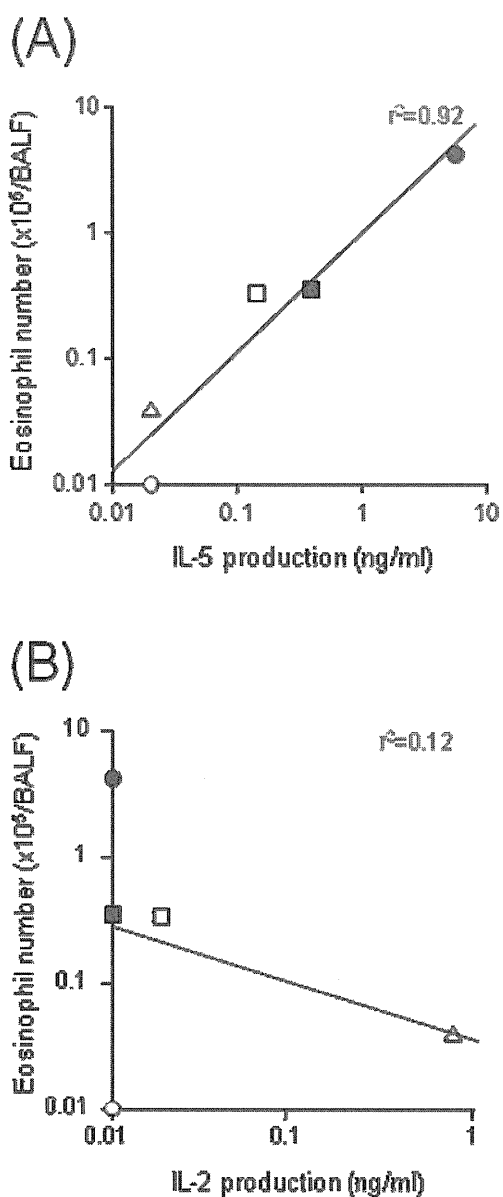


図 8. 移入 Th クローンが産生するサイトカインと肺好酸球浸潤の関連

Th clone 移入マウスにおける抗原誘発気道内好酸球浸潤ならびに気道過敏性亢進反応が、Th clone から産生されるどのサイトカインに依存するかを検討する目的で、抗 IL-2、IL-4、IL-5 ならびに IFN- γ 抗体の本モデルに対する作用を検討した。抗 IL-5 抗体は、この両者の反応をほぼ完全に抑制した (図 9)。一方、抗 IL-4、IFN- γ 抗体は両反応を増強したが、抗 IL-2 抗体は何の影響も与えなかった。生理食塩水吸入

群では、気道内好酸球浸潤ならびに気道過敏性亢進反応は観察されなかった。さらに、浸潤好酸球数と気道過敏性亢進の程度は有意な相関を示したが($r^2=0.92$)、これは Th clone の活性化により引き起こされる気道過敏性亢進反応が気道内好酸球浸潤と相関することを示している。

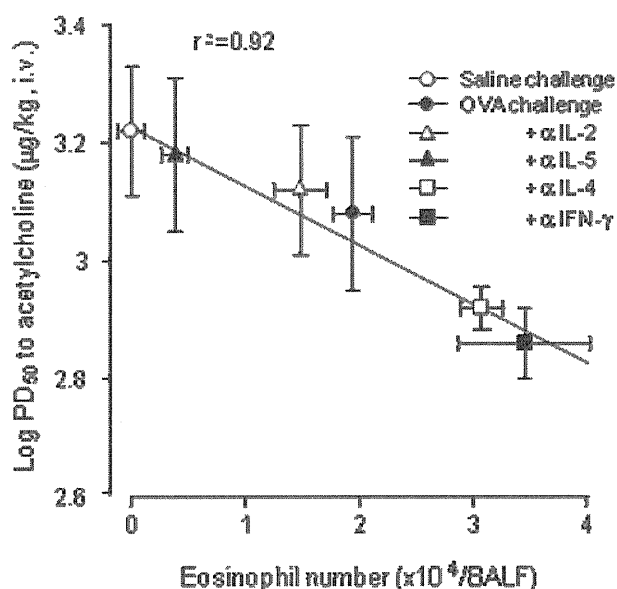


図9. サイトカイン中和抗体投与による好酸球浸潤と気道過敏性の関連

抗サイトカイン抗体の作用を確認する目的で、病理組織学的検討を行った。OVA 吸入 192 時間後の肺では、浮腫、炎症細胞の浸潤、杯細胞の増生と粘液分泌の亢進が確認された。高倍率で観察すると、好酸球の高度の浸潤が確認された。抗 IL-5 抗体はこの好酸球浸潤を抑制したが、単核球の浸潤には影響を及ぼさなかった。抗 IL-2, IL-4, IFN- γ 抗体は、いずれも上皮細胞の肥大、杯細胞の増生と粘液分泌の亢進、単核球浸潤に影響を及ぼさなかったが、抗 IL-4, IFN- γ 抗体については若干の好酸球浸潤増強作用が認められた。

好酸球性炎症は概ねステロイド治療に対するレスポンスが良好とされるが、このようにステロイド抵抗性の症例においては、治療に難渋することが多い。そこで、われわれは、ステロイド抵抗性の肺好酸球性炎症モデルの構築をめざして、樹立した T 細胞クローンのステロイド感受性をスクリーニングした。1 x 10⁷ 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 経鼻チャレンジを行い、移入 30 分前および移入 24 時間後に 0 (生理食塩水のみ), 1, 3 mg/kg のデキサメタゾンを経皮投与した。チャレンジ 48 時間後に無拘束呼吸機能解析装置 (BUXCO) を用いて塩化メサコリンによる気道抵抗を測定し、Penh (enhanced pause) 値で表示した。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。

その結果、肺好酸球浸潤は概ね移入した T 細胞クローンの IL-5 産生能に依存するが、クローン毎に、サイトカインの産生能、浸潤細胞の種類、程度、気道過敏性の誘導の有無は異なることが明らかになった。また、デキサメタゾンによって好酸球浸潤が用量依存的に抑制されるクローンとそうでないクローンが存在することがわかった。

D. 考察

血清 ECP 値は、好酸球活性化の指標としての有用性が確立されている。喘息患者は非発作時においても、健常者に比べて、血清 ECP 値が有為に高く、発作時では、さらに高値である。また、1 秒率、ピークフロー値などの呼吸機能

と逆相関する。気道過敏性が高い症例では血清 ECP 値が有為に高いことも明らかにされている。今回 IL-5 値と血清 ECP 値との間に正の相関が認められた結果は、T 細胞の IL-5 産生能が *in vivo* における好酸球活性化に関連することを示すものである。

現在までの国内外の研究成果から、気管支喘息の好酸球性炎症には T 細胞と T 細胞により産生されるサイトカインが重要であることが確立されている。殊に、活性化 T 細胞により産生される IL-5 は、好酸球に選択的に作用して、好酸球系前駆細胞の分化・成熟を促進すると同時に、成熟好酸球の生存延長・機能増強作用を有し、モデル動物のレベルにおいても、IL-5 ノックアウトマウスでは好酸球増多が起きないことや、抗 IL-5 中和抗体の投与によって、実験喘息モデルの好酸球浸潤・気道過敏性亢進が抑制されることから、好酸球性炎症に必須の因子であることが示されている。英国の Kay らは、気管支喘息における T 細胞の関与を提唱したパイオニアであり、気管支粘膜生検、気管支肺胞洗浄の所見から、1) 気管支喘息患者の気道炎症局所には、活性化 CD4⁺ T 細胞（ヘルパー T 細胞）の浸潤が顕著にみられ、2) 喘息の重症度・気道過敏性の程度と活性化 T 細胞数との間に相関が認められ、3) 粘膜に浸潤する好酸球数と T 細胞数とが相関し、さらに 4) 喘息患者では末梢血中にも、活性化 T 細胞数が増加していることなどから、気管支喘息の好酸球性炎症はヘルパー T 細胞と関連するとのコンセプトを提唱してきた。気管支粘膜の好酸球浸潤には、気道局所における T 細胞の数、活性化指標（CD25 など）や、IL-5 mRNA、蛋白の発現が関連するのみならず、末梢血中の T 細胞の活性化指標が相関するこ

とが報告されている。好酸球に対して増殖促進、活性化作用を有するサイトカインは、IL-5 の他に、GM-CSF、IL-3 等が存在するが、喘息患者では、主として IL-5 が好酸球活性化を担っていることも明らかになっている。われわれの研究結果は、これらの報告に合致するのみならず、T 細胞サイトカインの IL-5 が好酸球を *in vivo* で制御していることを示す点に価値がある。

われわれはこれまでに、1) アトピー型気管支喘息患者では、ダニアレルゲン刺激に反応した末梢 CD4⁺ T 細胞の IL-5 産生が、健常人に比べ亢進していること、2) アトピー型と非アトピー型の両病型の気管支喘息患者末梢 CD4⁺ T 細胞は、抗原非特異的的刺激(ホルボールエステル+Ca²⁺イオノフォア)に反応した IL-5 産生が、健常者に比べて有意に亢進しているが、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IFN- γ の産生には差がないこと、3) 有症状の喘息患者では IL-5 産生が特に亢進しているが、吸入ステロイド治療の治療効果に併行して、末梢 T 細胞の IL-5 産生が著明に低下すること、さらに 4) 無処置マウスに CD4⁺ T 細胞クローンを移入すると、T 細胞の IL-5 産生能に依存して、液性免疫の関与なしに、抗原吸入負荷に引き続いて気管支粘膜の好酸球性炎症および気道過敏性が生ずること等を明らかにしてきた。アトピー型・非アトピー型の喘息の 2 大病型は、ともに持続性の好酸球性炎症を特徴とし、IgE 抗体以外の点では、臨床的・病理学的に区別しえないほど酷似した病像を呈するが、われわれの研究成果から、非アトピー型（内因性喘息）では、血中に IgE 抗体の存在が認められなくても、T 細胞（IL-5 産生）のレベルにおいては hypersensitive（過敏症）であることが

示唆される。従来、IgE 抗体の有無 (B 細胞レベル) で、アトピー型と非アトピー型の 2 型に分けて把握されてきた気管支喘息は、T 細胞レベル (IL-5 産生) において統一的に理解することが可能である。

諸外国における免疫組織学的解析からは、喘息患者の気道粘膜には、IL-5 の mRNA を発現する Th 細胞が増加しており、その程度は好酸球浸潤の程度と相関することが知られている。IL-4、IL-5 産生細胞は、主として Th 細胞であり (70%は CD4+、残りが CD8+)、好酸球・マスト細胞の contribution は約 1/5 とされる。アトピー型・非アトピー型で CD4+、CD8+ の割合に違いはみられない。IL-4 の mRNA 陽性細胞は、アトピー非喘息患者においても増加しているが、IL-5 の mRNA 陽性細胞は、喘息患者に特異的である。T 細胞中にはサイトカイン蛋白は長時間とどまらないため、IL-4、IL-5 蛋白レベルの発現を検索すると、好酸球・マスト細胞がむしろより陽性となる。気管支肺胞洗浄 (Broncho-alveolar lavage; BAL) 液中に回収される Th 細胞には、IL-3、IL-4、IL-5、GM-CSF mRNA の発現が増加している。ステロイド治療は、BAL 液中の IL-4、IL-5 mRNA 陽性細胞数を減少させる一方、IFN- γ mRNA 陽性細胞数を増加させる。さらに、IL-4、IL-5、GM-CSF mRNA 陽性細胞数と、気道狭窄・気道過敏性の程度との間に相関がみられる。segmental challenge 後の BAL 液中 IL-5 濃度と好酸球数、活性化 T 細胞数との間に相関が認められている。

われわれの研究結果は、これらの海外の研究報告と異なり、好酸球性炎症の炎症局所を解析したものではないが、血液循環中においても喘息の病態毎に、T 細胞サイトカイン産生の指標

において、大きな違いが観察されることは、気管支喘息が、単なる肺の局所病変にとどまらず、全身的な病態を基盤に発症することを反映したものと考えられる。今後さらに、免疫学的な検索をおこなうことで、気道過敏性と免疫システムの関わりが解明されるものと期待される。

そこで、T 細胞依存的なモデルを解析した。無処置マウスに、Th clone を移入、抗原チャレンジを行うことにより、能動感作・チャレンジを行った抗原誘発気道過敏性亢進モデルと同等の気道好酸球浸潤、過敏性亢進が誘導されることが明らかになった。移入した Th clone は、CFSE ラベルを行った細胞を用いた病理組織学的検討で示されたように、抗原チャレンジにより肺に集積した。また気管支喘息でみられるように、好酸球浸潤と気道過敏性亢進の時間経過の間には相関が認められた。さらに、Th clone が産生するサイトカインのうち、好酸球浸潤、活性化に重要な役割を果たすと考えられている IL-5 が、これらの反応に関与することが示された。一般的な抗原誘発気道過敏性亢進モデルでは、その症状発現における T 細胞、抗原特異的免疫グロブリンの関与を分けて考えることが不可能であるが、本モデルでは、抗原特異的な IgA、IgG、IgE といった免疫グロブリンが存在しないにもかかわらず、好酸球浸潤ならびに過敏性亢進が惹起された。このことは、抗原特異的 Th 細胞の存在は、気道好酸球浸潤ならびに気道過敏性亢進を引き起こすための十分条件であることを示している。

浸潤好酸球数の上昇と並行して好酸球活性化指標である気管支肺胞洗浄液中 EPO 活性の上昇がおこり、それに引き続いて気道過敏性亢進反応が観察された。このことは、活性化した好酸球から放出された細胞傷害性蛋白が気道

上皮細胞を破壊し、その結果気道過敏性亢進が発症する可能性を示唆している。ヒト好酸球では、IgA, IgG といった免疫グロブリンが好酸球の脱顆粒反応に寄与していると考えられていたが、本研究ではこれらの抗原特異的免疫グロブリンの非存在下にもかかわらず、好酸球活性化がおきた。Platelet Activating Factor, C5a, 各種サイトカイン、ケモカイン等の好酸球活性化因子が知られているが、本モデルにおいて、どの因子が好酸球活性化に寄与しているかが興味深い。

気道過敏性の機序は未だ不明な点が多い。気道平滑筋における β アドレナリン受容体の感受性の変化によって、自律神経系の平衡がくずれ、アセチルコリンに対する気道過敏性亢進が認められる、あるいは、平滑筋自身のアセチルコリンやヒスタミンに対する反応性が増大することが気道過敏性亢進反応の原因との報告もみられる。Hamelmann らは、能動感作マウスでの気道過敏性亢進には、気道への好酸球浸潤に加え、IgE からの 2 次シグナルが必要と報告している。肥満細胞欠損マウスおよび同系統の正常マウスとの比較実験において、IgE 架橋活性を有する抗 IgE 抗体による肥満細胞の活性化は気道過敏性亢進反応を引き起こしたが、好酸球浸潤は認められなかった。T 細胞が直接気道反応性に影響するとの報告もある。マウス喘息モデルでは、抗 IL-4 抗体ならびに抗 IFN- γ 抗体の投与により、好酸球浸潤は変化しなかったが、気道過敏性亢進反応は抑制されていた。これらの結果は、気道好酸球浸潤が気管支喘息における病理学的特徴であるにもかかわらず、気道過敏性との関連に疑問を呈するものである。

これらの報告と本モデルとの相違の理由は現時点では明らかでない。本モデルでは、気道過敏性亢進の測定をチャレンジ 192 時間後に行っているが、好酸球浸潤と気道過敏性亢進の乖離が見られるモデルでは、気道過敏性をチャレンジ後比較的早く(~24 時間)に測定している。好酸球浸潤には、チャレンジ後早い段階では肥満細胞が関与し、それ以降の段階では CD4⁺ T 細胞が関与するとの解釈もされる。

気管支喘息症状の重症度ならびに気道過敏性と CD4⁺ T 細胞活性化、浸潤好酸球数が相関することから、CD4⁺ T 細胞と産生される IL-5 が重要な役割を果たす本モデルは、他のモデルと比較して、気管支喘息患者の病態をよりよく反映していると推察される。

CD4⁺ T 細胞自体が、好酸球浸潤とは無関係に気道過敏性を誘導するとの報告がされている。De Sanctis らは、spasmogen に対する気道反応性が高い系統のマウスの CD4⁺ T 細胞を反応性が低いマウスに移入することで、気道過敏性が亢進することを示している。しかし、本モデルでは、(1)Th clone 移入のみでは気道過敏性亢進は観察されず、抗原チャレンジを行うことによって初めて発症すること、(2)IL-5 産生量の少ない Th clone を移入したマウスでは気道過敏性亢進は認められないことから、IL-5 産生能力を持つ活性化された CD4⁺ T 細胞が気道過敏性亢進に必須であることを示唆している。気管支喘息患者においても、喘息の重症度と、CD4⁺ T 細胞活性化の指標である CD25 の発現増強や産生サイトカイン量の増加がよく相関することが知られている。以上より、気道過敏性亢進の成立には CD4⁺ T 細胞からのサイトカイン、とくに IL-5 の産生による気道への

好酸球浸潤ならびにその活性化が重要であることが示された。

Th2 細胞からは、IL-5 以外にも、IL-4, IL-13 などのサイトカインが産生されるが、これらが好酸球浸潤・気道過敏性亢進に関わっているとの報告もなされている。IL-4 は、動物モデルにおいても、Th2 細胞の分化・IgE の産生に必要不可欠であり、細胞浸潤に重要な役割を果たしている。IL-4 は血管内皮細胞での VCAM-1 発現を促進し、その結果選択的な好酸球浸潤を誘導する。また、IL-4 欠損マウスならびに抗 IL-4 抗体処置マウスでは気道過敏性亢進反応が消失する。一方で、IL-4 欠損マウスより調製した Th clone 移入マウスでは、気道過敏性亢進反応が、好酸球浸潤を伴うことなく発症するが、通常のマウスから調製した IL-4 を産生する Th clone を移入したマウスでは、好酸球浸潤・気道過敏性亢進がともに観察される。このように実験により結果の相違が認められるのは、気道過敏性における IL-4 ならびに好酸球の役割が複雑であることを示唆している。本モデルでは、抗 IL-4 抗体は気道内好酸球浸潤を増強し、これまでの報告との間に相違が認められた。気道好酸球浸潤・気道過敏性亢進での IL-4 の重要性を示した報告では、これらの測定を抗原チャレンジ後非常に早い時間で行っていることや、IL-4 欠損マウスを用いていることが、本モデルとの比較を難しくしていると考えられる。本モデルでの予備的な病理組織学的検討において、抗原チャレンジ後早い段階(48 時間後)では、抗 IL-4 抗体により好酸球浸潤が抑制される。したがって、IL-4 の気道内好酸球浸潤への関与は、時間経過や抗原チャレンジ後に関わってくる炎症細胞の組成により異なると考えられる。抗 IL-4 抗体の好酸球浸潤に対する作用を、時

間経過を追って調べるなどの詳細な検討が必要である。

IL-4 の生理的役割は多様であり、そのために IL-4 の気道過敏性亢進における役割の解析は難しい。近年、Hawker らは、*in vitro* において IL-4 が気道平滑筋の増殖を抑制することを示した。気道平滑筋層の肥厚は、気道径の減少を介して気道過敏性亢進に寄与すると考えられる。抗 IL-4 抗体の投与により、Th clone からの IL-4 により抑制されていた気道平滑筋の増殖が回復し、その結果気道過敏性が増強された可能性も考えられる。また、肥満細胞から産生されるヒスタミンおよびトリプターゼは、気道平滑筋の増殖を促進することから、IgE 産生を促進する IL-4 が肥満細胞の活性化を介して、好酸球浸潤とは関係なく直接気道過敏性亢進に関与するともいわれている。IL-4 の気道過敏性亢進への寄与はあいまいであるが、本モデルのような IgE・肥満細胞の経路が関わらない系を用いることで、明らかになる可能性がある。

抗 IFN- γ 抗体も、抗 IL-4 抗体と同様に本モデルで気道好酸球浸潤ならびに気道過敏性を増強した。これらは、IFN- γ の投与により好酸球浸潤ならびに気道過敏性誘導が抑制されたとの報告とも一致する。一方で、IFN- γ が直接気道過敏性を引き起こすとの報告も知られている。Iwamoto らは、抗原感作マウスモデルにおいて、IFN- γ は気道内への CD4⁺T 細胞の浸潤を抑制することにより気道内好酸球浸潤を調節することを示している。さらに、IFN- γ を産生する Th1 clone を Th2 clone とともに移入すると、Th2 clone 単独移入で認められる抗原誘発好酸球浸潤が抑制された。今回の結果は、これらの報告をまったく異なった条件下で確認していることになると思われる。Th clone か

ら産生された IFN- γ は、オートクラインに作用して更なる Th clone の移入を抑制し、その結果好酸球浸潤・気道過敏性亢進を調節している。

気道内好酸球浸潤および気道過敏性亢進は抗 IL-4 抗体と抗 IFN- γ 抗体によって増強されたにもかかわらず、*in vitro* での Th clone のこれらの産生量との間には相関が見られなかった。この相違の理由については不明であるが、これらのサイトカインは比較的少量でその作用を発現するために、今回用いた Th clone では、相関関係が認められなかったのかもしれない。あるいは、たくさんのサイトカインが産生される *in vivo* 系での解析は複雑であり、気道好酸球浸潤ならびに気道過敏性亢進に比較的大きく関与している IL-5 のみが際立った可能性が考えられる。

杯細胞の増生と気道粘液分泌の亢進は気管支喘息での典型的な病理学的特徴である。臨床において、気道粘液の過分泌は気道過敏性亢進反応に寄与していることが知られている。一方で、両者の乖離を示した報告も多い。マウス喘息モデルにおいて、ロイコトリエン拮抗薬は気道好酸球浸潤・気道粘液分泌亢進を抑制するが、気道過敏性亢進には影響を与えない。抗 CD49d 抗体を静脈内投与すると、気道好酸球浸潤は抑制されるが、気道過敏性亢進・粘液過分泌に変化は認められなかった。IL-4 を気道上皮細胞に強制発現すると、上皮細胞の肥厚、マクロファージ・リンパ球・好酸球・好中球浸潤を特徴とする炎症反応が認められる、気道過敏性は亢進しなかった。STAT-6 欠損マウスでは、気道好酸球浸潤・気道過敏性亢進・気道粘液過分泌は認められないが、前者 2 つは IL-5 の投与により回復した。本検討でも、抗 IL-5 抗体は杯

細胞の増生や粘液分泌亢進には影響を与えなかったが、このことは気道リモデリングにおけるサイトカインの複雑な役割を示唆している。

本結果は、気道過敏性亢進における IL-5 の重要な役割を明確に示している。しかしながら近年、ヒト型抗 IL-5 抗体が開発され、喘息を対象にした臨床試験が行われたが、抗 IL-5 抗体は、喘息患者での抗原誘発即時型気道収縮反応および遅発型気道収縮反応を抑制しなかった。このような治験では、試験検体が目標となるメディエーターを完全に中和した状態でなければ正確な判断を下せないが、この治験では IL-5 の生体内での中和は明らかに充分でなく、かなりの数の好酸球が喀痰中に存在していた。また、今回の実験で用いた抗 IL-5 抗体量は、100 mg/kg に相当するが、ヒトの治験では、最高用量でも 10 mg/kg である。これらの理由からヒトにおける抗 IL-5 抗体の治験は、有効性の判断が難しく、組織学的検討などの更なる結果が待たれる。

ステロイド抵抗性の問題は、好酸球性疾患の克服に向けての大課題である。今年度の研究成果として、ステロイド抵抗性肺好酸球浸潤モデルがはじめて確立された。今後、そのメカニズムの解析を進め、治療介入の糸口を見出したい。

E. 結論

これまでの研究成果から、好酸球性炎症には、活性化 T 細胞により産生される IL-5 の役割が重要であることが明らかになっている。初年度は、まず成人喘息症例（アトピー型 50 例・非アトピー型 50 例）を対象とし、*in vivo* における好酸球活性化の指標としての血清 ECP 値との関連につき検討した。24 時間培養上清中の

IL-5 値と血清 ECP 値の間に正の相関が認められた ($p=0.03$)。肺の好酸球浸潤には、局所における T 細胞の数、活性化指標 (CD25 など) や、IL-5 mRNA、蛋白の発現が関連するのみならず、末梢血中の T 細胞の活性化指標が相関することが報告されているが、われわれの知見は、T 細胞の IL-5 産生能が *in vivo* における好酸球活性化に関連することを示している。次いで、臨床的にステロイド抵抗性の好酸球性肺炎症例について、免疫薬理学的解析を行い、T 細胞レベルでのステロイド抵抗性の存在を裏付けた。本研究において、Th クローン移入により、抗原特異的 IgA, IgG, IgE といった免疫グロブリンが存在しないにもかかわらず、気道の好酸球性炎症および過敏性が誘導された。IL-5 を産生する T 細胞は、気道過敏性の十分条件であることが示された。T 細胞、IL-5 産生を制御する薬物は好酸球性炎症治療薬として有望と考えられた。本モデルは、ステロイド抵抗性の好酸球性炎症克服に向け、治療介入研究に有用と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Otomo, 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.

2) Kitamura, F., Kitamura, N., Mori, A., Tatsumi, H., Nemoto, S., Miyoshi, H., Miyatake, S., Hiroi, T., and Kaminuma, O. 2010. Selective down-regulation of Th2 cytokines by C-terminal binding protein 2 in human T cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 152 (Suppl 1):18-21

3) 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.

4) 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 Neu1 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.

5) 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.

6) 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.
- 7) 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.* 155 (Suppl 1):110-116.
- 8) 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.* 155 (Suppl 1):53-56.
- 9) 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.
- 10) 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. 2011. 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.* 9:982-990.
- 11) 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. 2012. Selective down-regulation of Th2-mediated airway inflammation in mice by pharmacological intervention of CCR4. *Clin. Exp. Allergy* 42:315-325, 2012.
- 12) 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. 2012. Obesity and aspirin intolerance are risk factors for difficult-to-treat asthma in Japanese nonatopic women. *Clin. Exp. Allergy* (in press)
- 13) Abe, A., Koyama, S., Ohtomo, T., Kitamura, N., Kaminuma, O., and Mori, A. Murine T cell-derived contractile activity for bronchial smooth muscle cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2012 (in press)
- 14) 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)

- 15) Saeki, M., Nishimura, T., Kaminuma, O., Suzuki, 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)
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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、長谷川真紀、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
- 21) 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
- 22) 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、長谷川真紀、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
- 23) 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
- 24) 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
- 25) 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
- 26) 森 晶夫 : 高 IgE 症候群、呼吸;30(2):151-153, 2011
- 27) 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
- 28) 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
- 29) 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

30) 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

31) 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) 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.* :S (New Orleans) 2010/2/26-3/2

2) 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. 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

3) Mori A, Kitamura N, Otomo T, Abe, A., 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

4) Mori A, Kitamura N, Otomo T, Abe, A., 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

5) Mori A, Kitamura N, Otomo T, Abe, A., Kaminuma O. IgE-independent, 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

6) Mitsui C., Taniguchi M., Higashi N., Ono E., Kajiwara K., Hikutomi 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、長谷川真紀、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 : 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