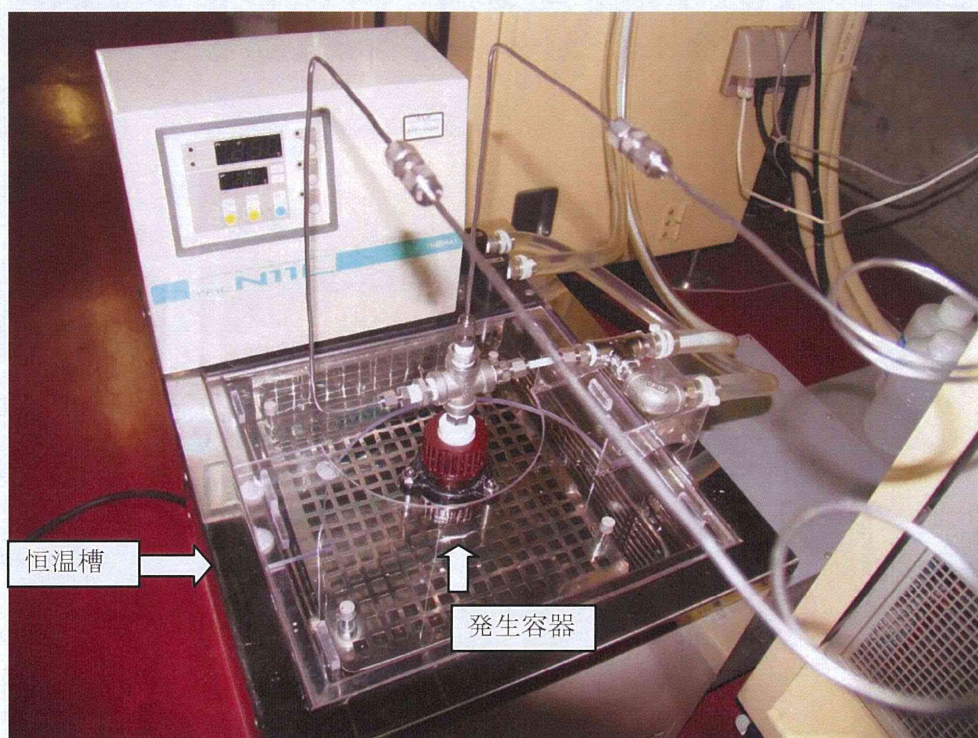
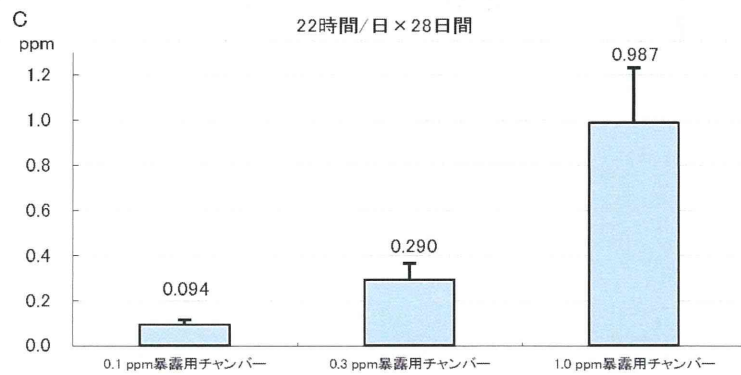
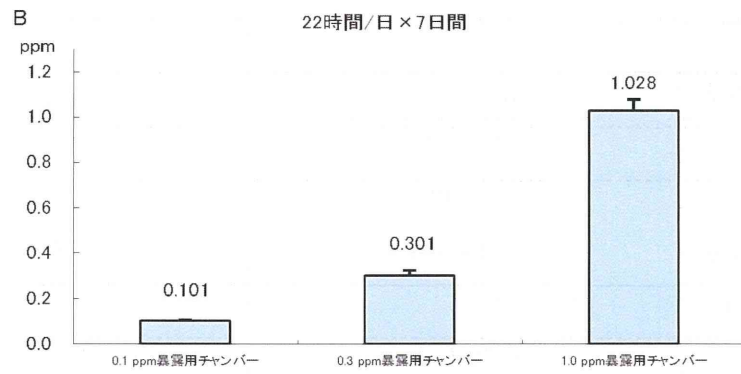
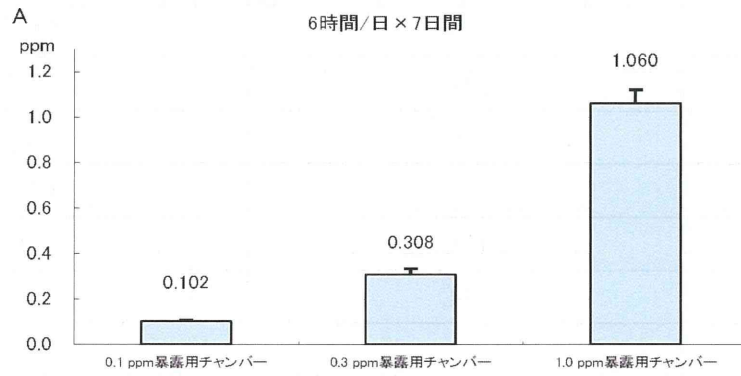


図ホルムアルデヒド-6. ホルムアルデヒド[®]の分析に用いた高速液体クロマトグラフ



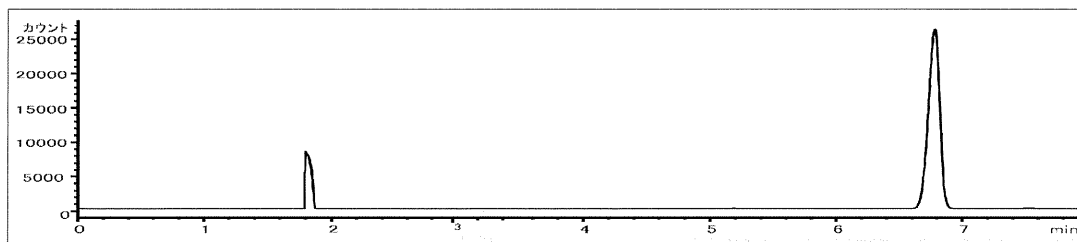
図ホルムアルデヒド-7. 恒温槽内に設置したホルムアルデヒドの発生



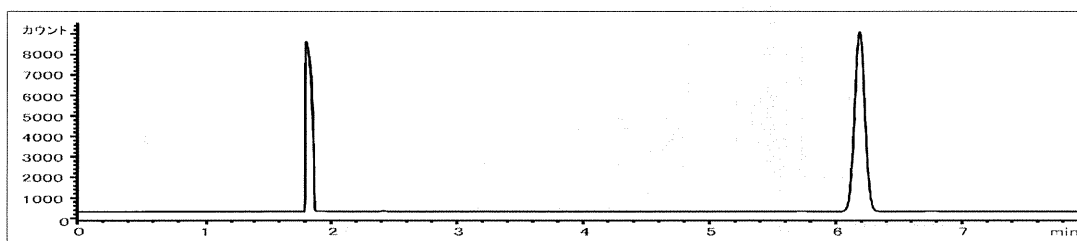
図ホルムアルデヒド・8 本実験におけるホルムアルデヒド暴露濃度の測定結果
 A: 6時間/日 × 7日間反復暴露の場合、B: 22時間/日 × 7日間反復暴露の場合、
 C: 22時間/日 × 28日間反復暴露の場合 (平均値 ± 標準偏差)。
 平均値をグラフ中に記載した

表キシレン-1 吸入暴露装置の設定条件とチャンバー内のキシレンの濃度

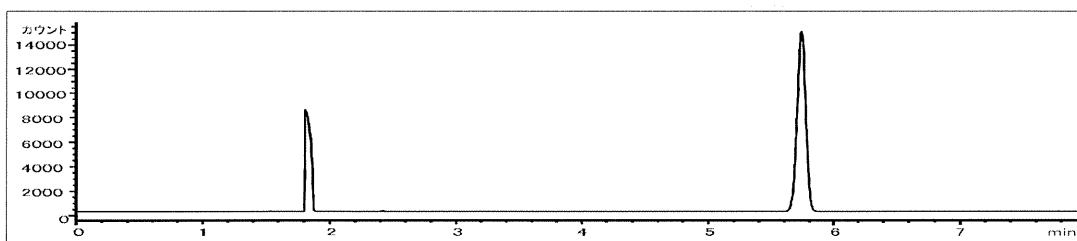
	検討 1	検討 2
恒温槽の温度	22℃	22℃
発生空気の流量	1.0 L/分	1.0 L/分
一次希釈空気の流量	10 L/分	10 L/分
冷却温度	17℃	17℃
再加熱温度	23℃	23℃
目標濃度 0.2 ppm		
一次希釈ガスの供給量	0.15 L/分	0.15 L/分
新鮮空気の供給量	212 L/分	212 L/分
測定値 ppm (目標濃度に対する%)	0.211 (106%)	0.220 (110%)
目標濃度 0.7 ppm		
一次希釈ガスの供給量	0.5 L/分	0.5 L/分
新鮮空気の供給量	212 L/分	212 L/分
測定値 ppm (目標濃度に対する%)	0.742 (106%)	0.699 (99%)
目標濃度 2.0 ppm		
一次希釈ガスの供給量	1.65 L/分	1.65 L/分
新鮮空気の供給量	212 L/分	212 L/分
測定値 ppm (目標濃度に対する%)	2.09 (105%)	2.02 (101%)
暴露時間	6 時間	22 時間



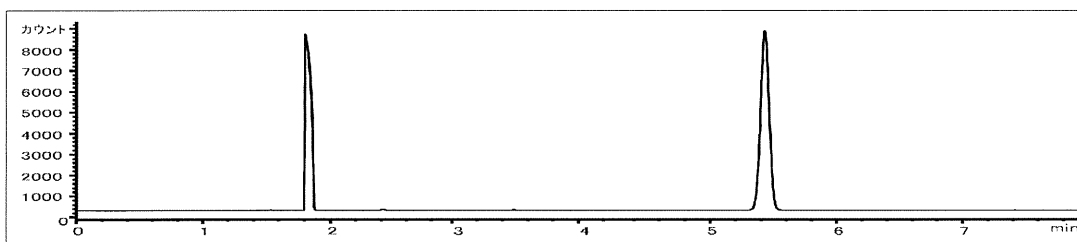
図キシレン-1-1 *o*-キシレン標準品



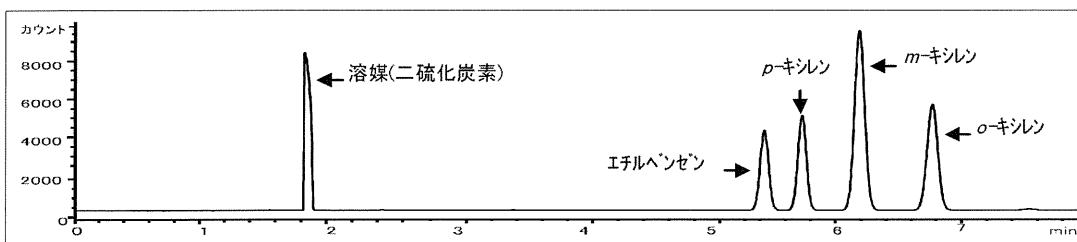
図キシレン-1-2 *m*-キシレン標準品



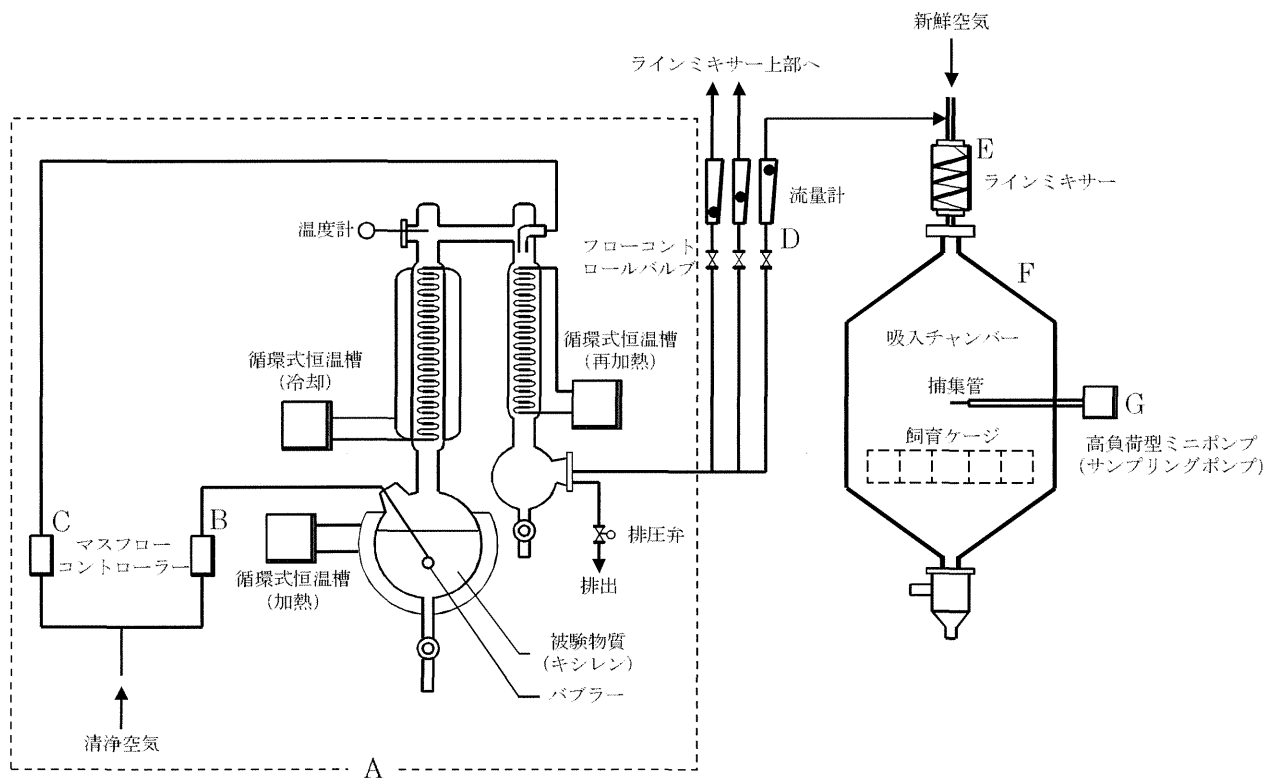
図キシレン-1-3 *p*-キシレン標準品



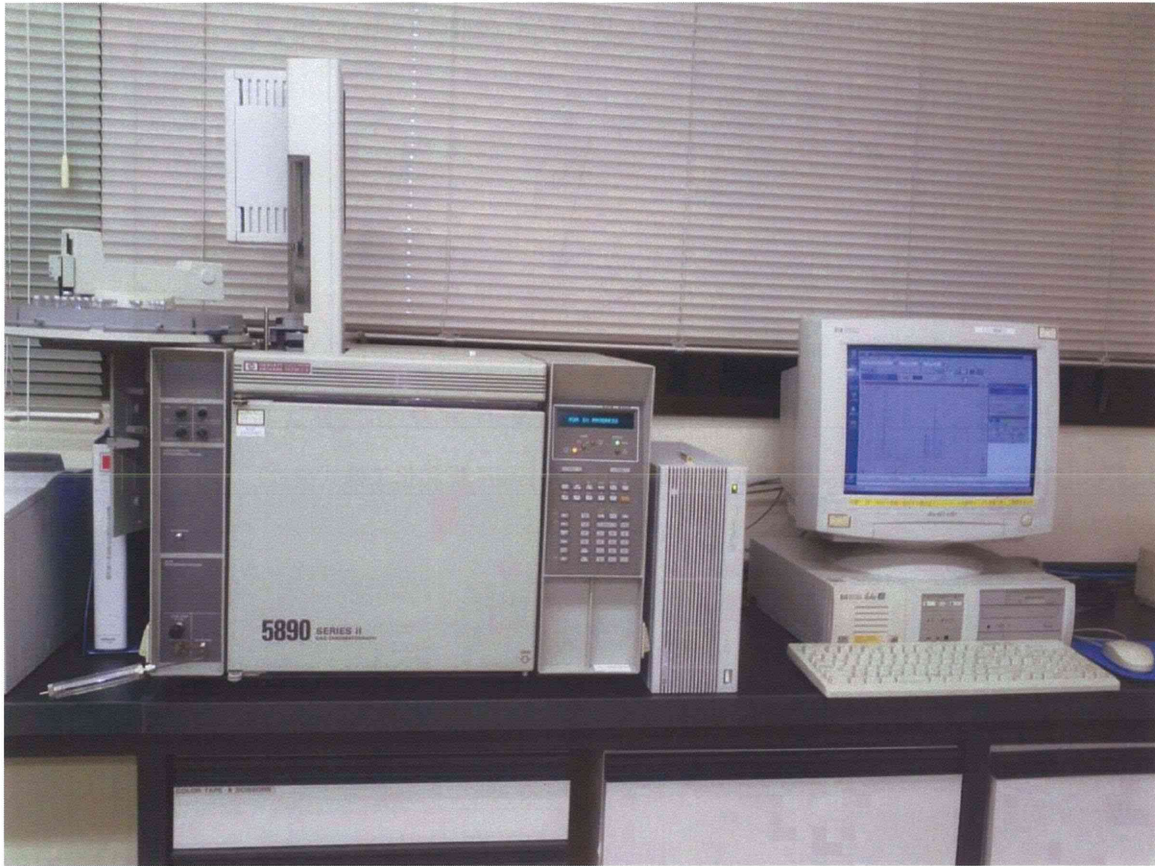
図キシレン-1-4 エチルベンゼン標準品



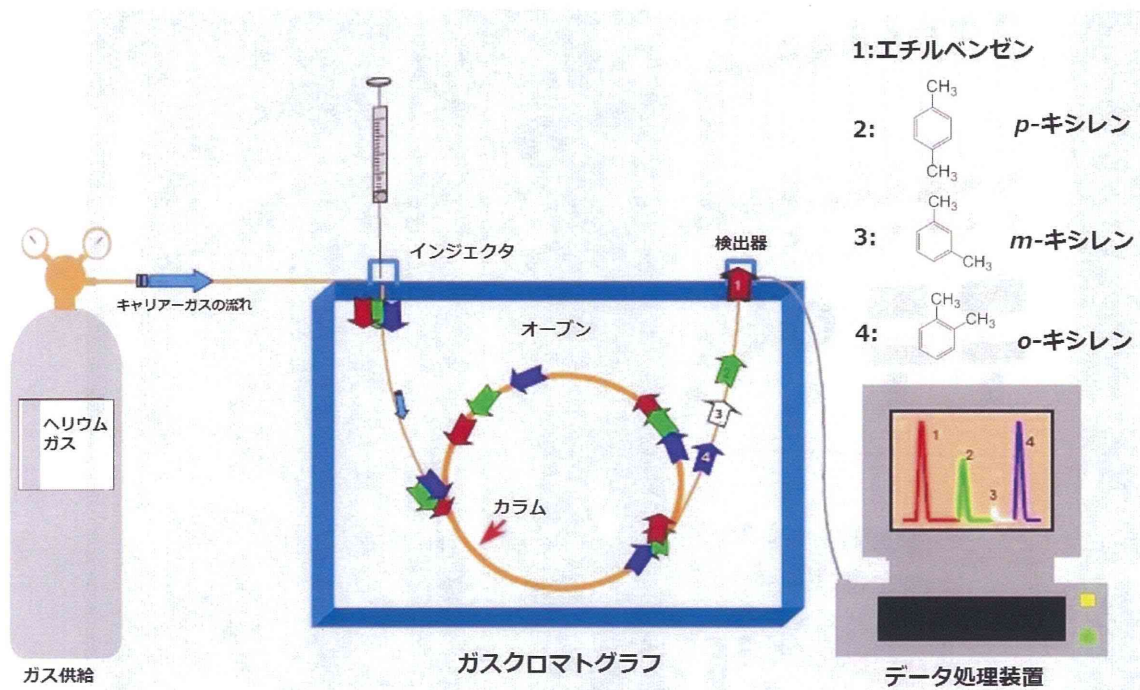
図キシレン-1-5 被験物質 (キシレン ロット番号 : TGP8162)



図キシレン-2 吸入暴露装置のシステム (キシレン)

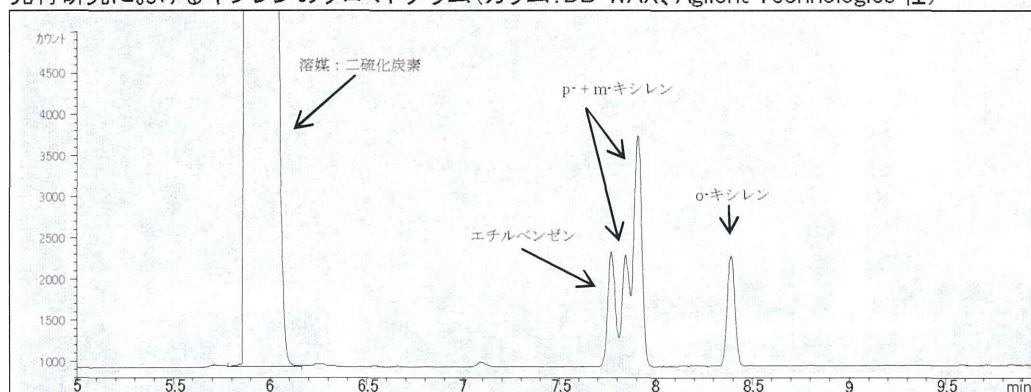


図キシレン-3 キシレンの分析に用いたガスクロマトグラフ

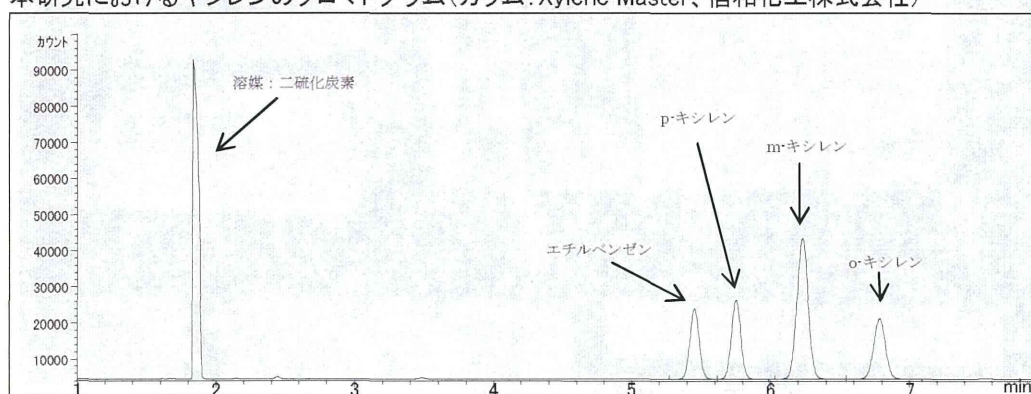


図キシレン-4 ガスクロマトグラフにより分離されたキシレン中の異性体と不純物

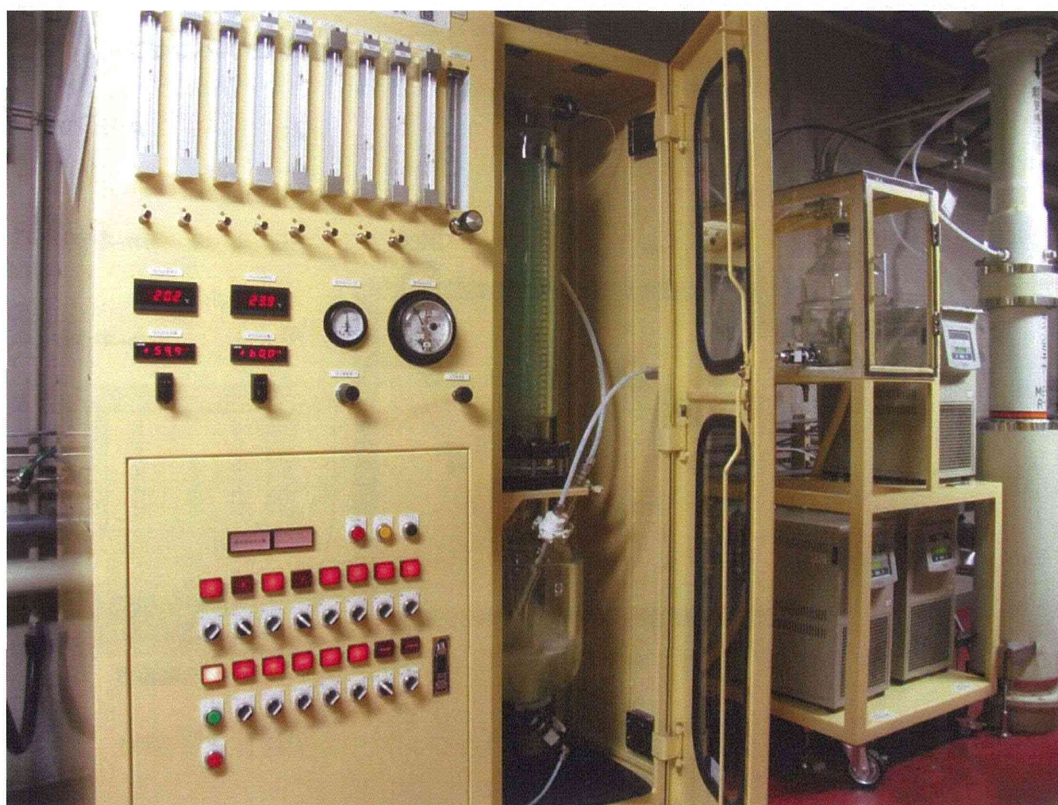
先行研究におけるキシレンのクロマトグラム(カラム:DB-WAX、Agilent Technologies 社)



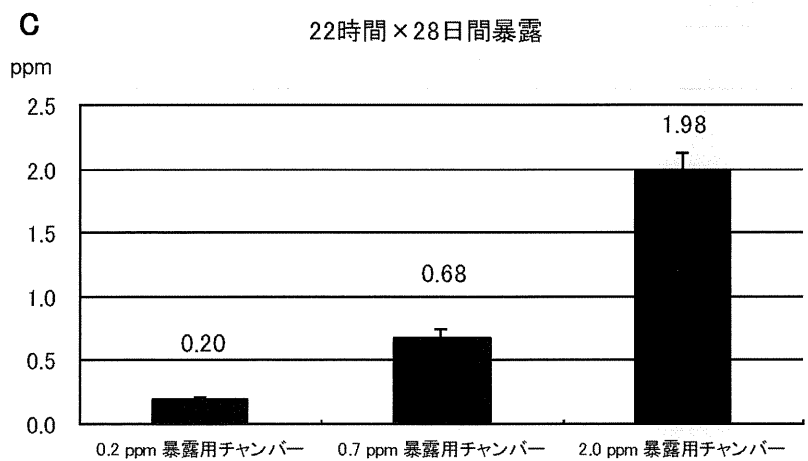
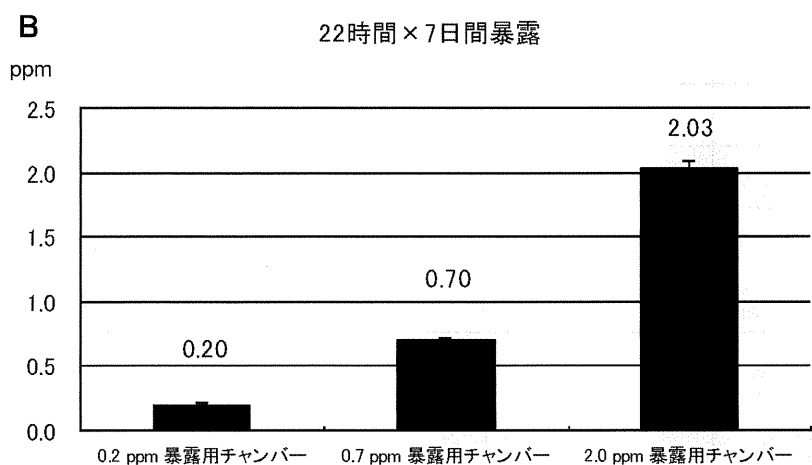
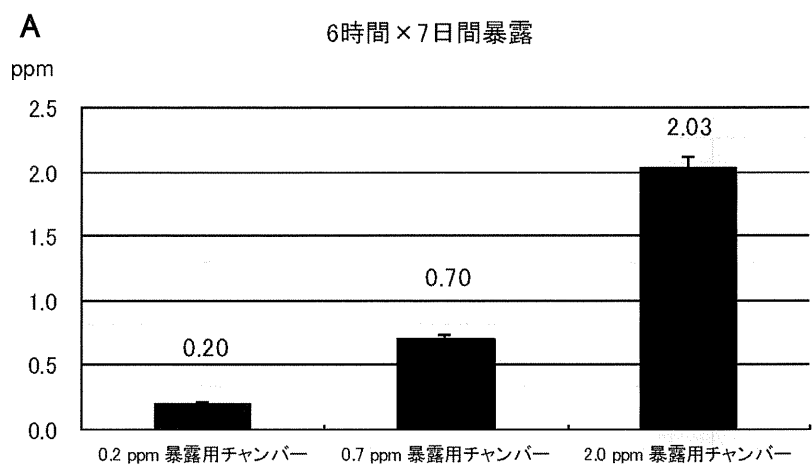
本研究におけるキシレンのクロマトグラム(カラム:Xylene Master、信和化工株式会社)



図キシレン-5 キシレンのクロマトグラム(先行研究及び本研究の分離状況)



図キシレン-6 キシレンの発生装置



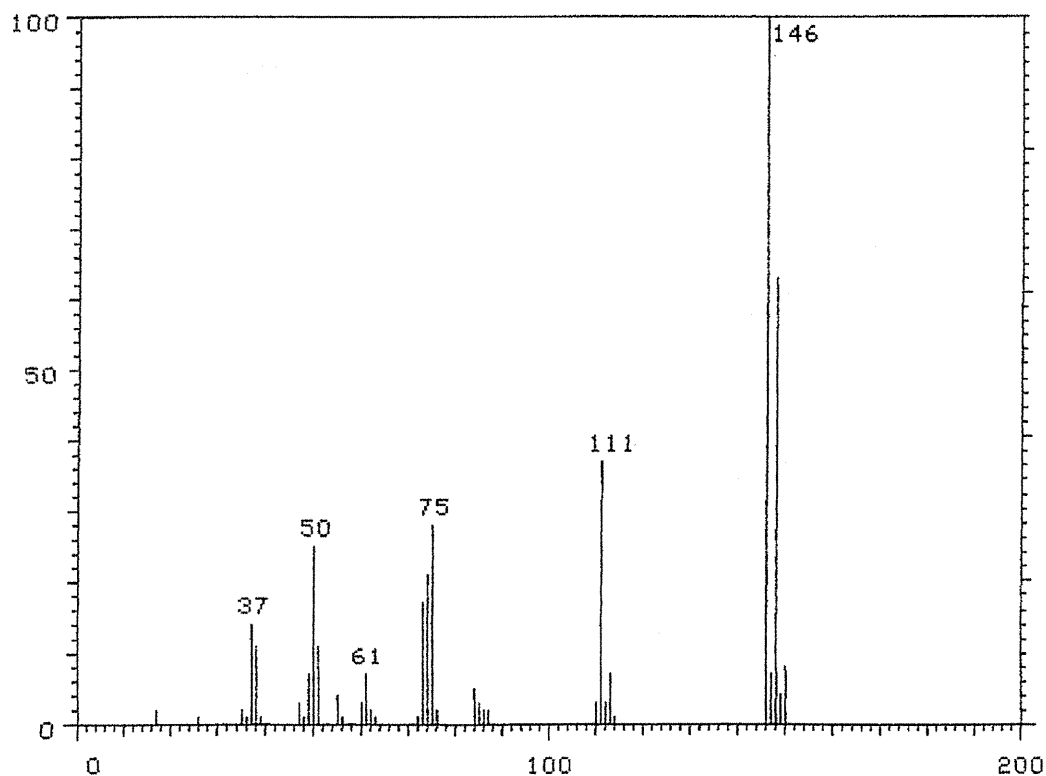
図キシレン-7 本実験におけるキシレン暴露濃度の測定結果

A: 6時間/日×7日間反復暴露の場合、B: 22時間/日×7日間反復暴露の場合、
C: 22時間/日×28日間反復暴露の場合 (平均値±標準偏差)。

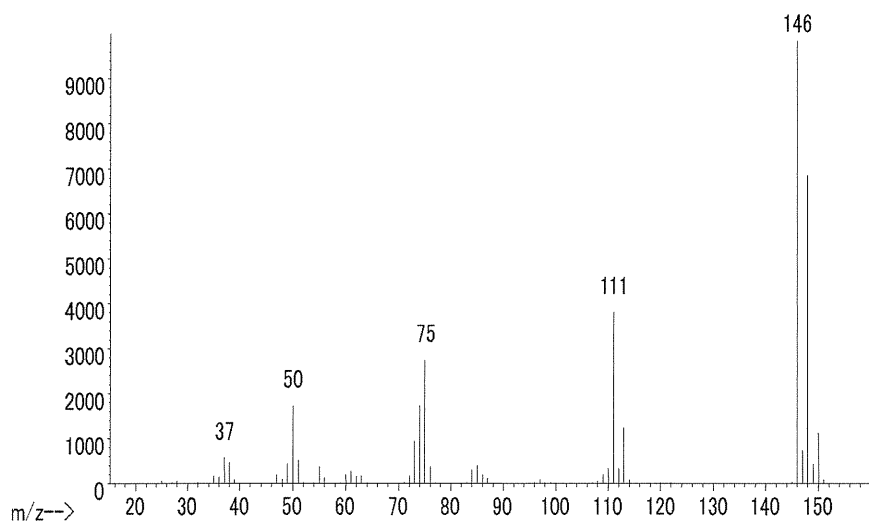
平均値をグラフ中に記載した

表パラジクロロベンゼン-1 吸入暴露装置の設定条件とチャンバー内の
パラジクロロベンゼンの濃度

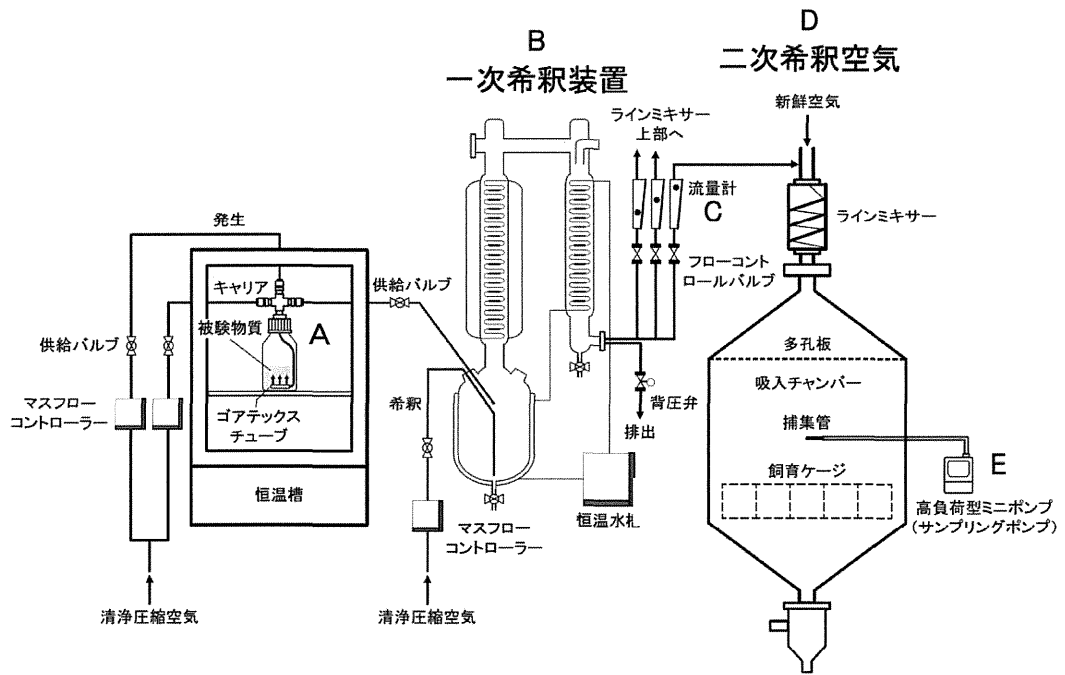
	検討 1	検討 2
恒温槽の温度	27°C	27°C
発生空気流量	0.2 L/分	0.2 L/分
一次希釈空気の流量	10 L/分	10 L/分
新鮮空気の供給量	212L/分	212L/分
目標濃度 0.04 ppm		
フローメータの流量	0.82 L/分	0.80 L/分
測定値 ppm (目標濃度に対する%)	0.0418 (105%)	0.0381 (95.2%)
目標濃度 0.12 ppm		
フローメータの流量	2.35 L/分	2.40 L/分
測定値 ppm (目標濃度に対する%)	0.112 (93.3%)	0.110 (91.7%)
目標濃度 0.40 ppm		
フローメータの流量	7.20 L/分	7.50 L/分
測定値 ppm (目標濃度に対する%)	0.372 (93.0%)	0.387 (96.8%)
暴露時間	6 時間	22 時間



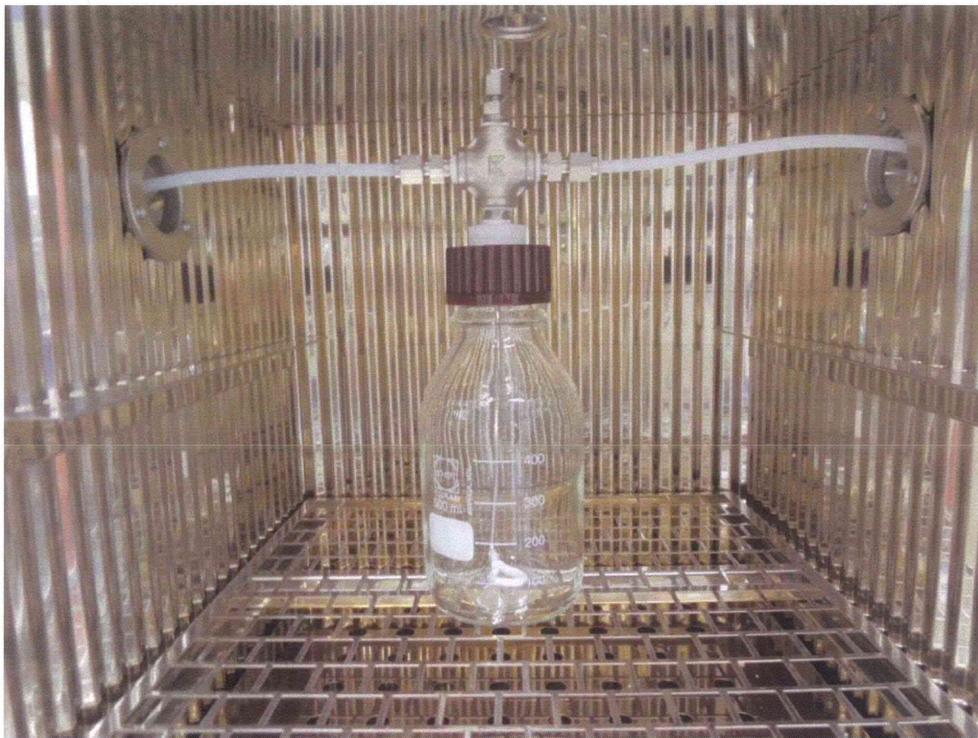
図パラジクロロベンゼン-1-1 被験物質のマススペクトル



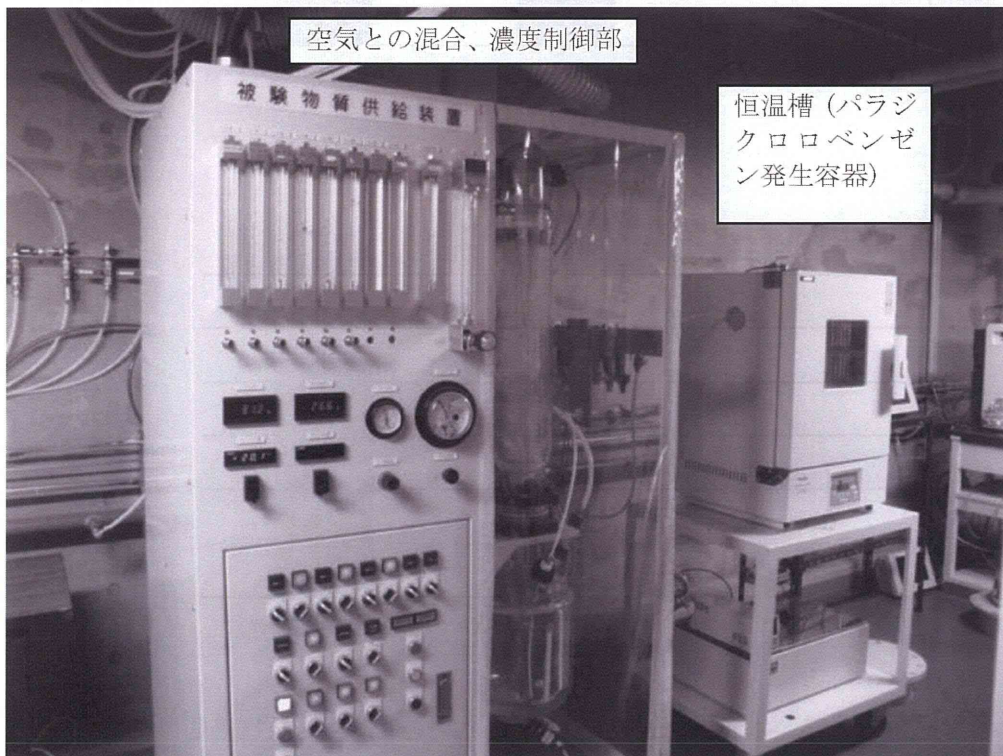
図パラジクロロベンゼン-1-2 パラジクロロベンゼンのマススペクトル (文献データ)
 (McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data.
 6th ed. New York, NY:John Wiley and Sons.)



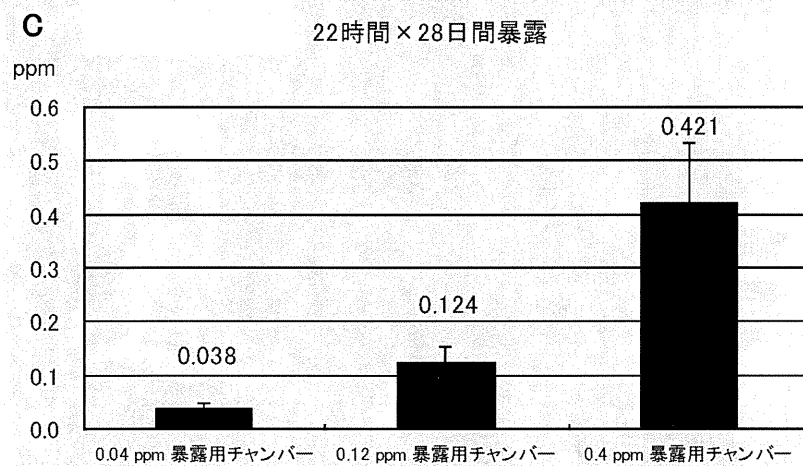
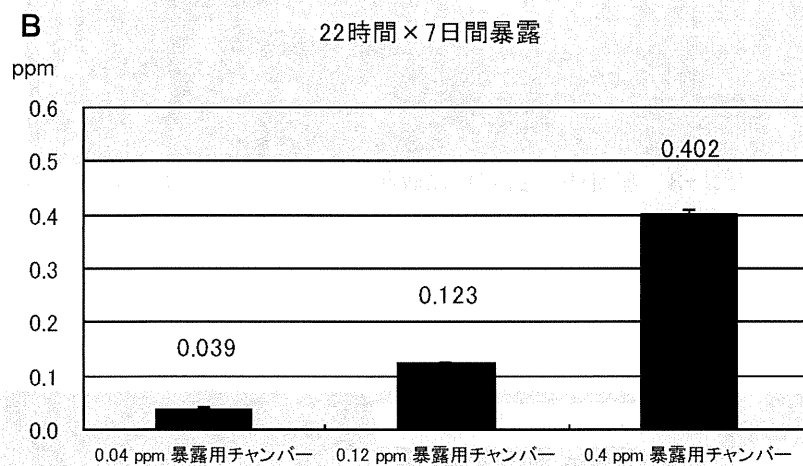
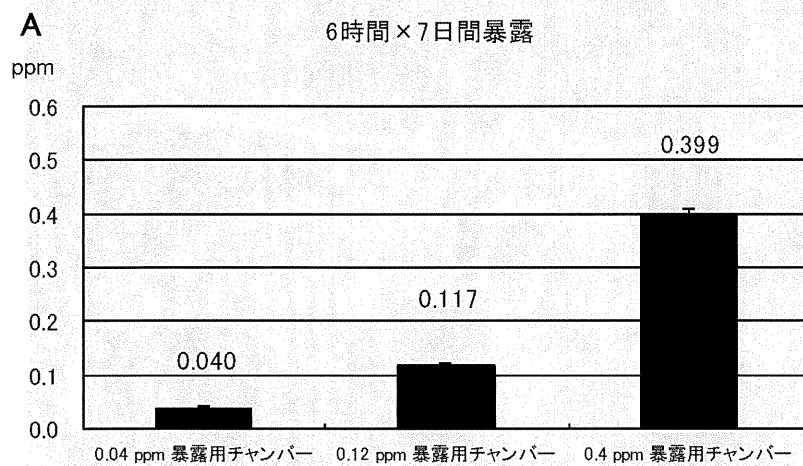
図パラジクロロベンゼン-2 吸入暴露装置のシステム (パラジクロロベンゼン)



図パラジクロロベンゼン-3 恒温槽 (27°C) に収納したパラジクロロベンゼン発生容器



図パラジクロロベンゼン-4 恒温槽 (パラジクロロベンゼン発生容器)、空気との混合、濃度制御部の外観



図パラジクロロベンゼン-5 本実験におけるパラジクロロベンゼン暴露濃度の測定結果
 A: 6時間/日×7日間反復暴露の場合、B: 22時間/日×7日間反復暴露の場合、
 C: 22時間/日×28日間反復暴露の場合 (平均値±標準偏差)。
 平均値をグラフ中に記載した

厚生労働科学研究補助金(化学物質リスク研究事業、H23-化学-一般-001)
化学物質の経気道暴露による毒性評価の迅速化、定量化、高精度化に関する研究
—シックハウス症候群を考慮した低濃度暴露における肺病変の確認、及び
中枢神経影響を包含する新評価体系の開発—
平成23年度～25年度 総合研究報告書
分担研究報告書

分担研究課題:「人への外挿にかかわる臨床的解析、及びヒト気道上皮細胞系による
毒性応答メカニズムの研究-経気道曝露モデルに対応した化学物質の
ヒト気道上皮細胞の遺伝子発現への影響-」

研究分担者 慶長直人 (公財)結核予防会 結核研究所 生体防御部
研究協力者 松下育美、土方美奈子 同部

研究要旨 化学物質が気道を通じて吸入される場合、低濃度でも人体に有害な影響を与えることが知られているが、どのような機構が背景にあるかは十分に明らかにされていない。シックハウス症候群について、ヒトの細胞モデル系を構築することは、そのメカニズムを知る上で重要な研究方法の一つと考えられる。ヒトの肺は常に外界の吸入粉塵や微生物に曝されており、そこに吸入化学物質が加わった場合、相乗的に気道系の炎症が惹起される可能性があり、我々はこれまでヒト気道上皮細胞株を用いて炎症応答に対するシックハウス症候群関連化学物質による *in vitro* での影響を検討し、正常のヒト気道細胞に近い BEAS2B 細胞株を poly I:C で刺激後、ホルムアルデヒドを添加することにより、IL-8 mRNA 発現量が有意に増強することを示してきた。平成23年度は、IL-8 遺伝子発現に関わるとされる p38MAPK, ERK1/2, JNK の3つの主要なシグナル伝達系に対する各種阻害剤の効果を検討し、poly I:C による IL-8 遺伝子発現がそれら3つの主要なシグナル伝達系に依存していること、特に JNK 系がホルムアルデヒドによる IL-8 遺伝子増強効果に関わっている可能性を示した。平成24年度は、さらに分泌される多数の生理活性物質を同時定量し、poly I:C とホルムアルデヒドの複合効果を検討した。またホルムアルデヒドに続いて4種の化学物質を用いた検討も開始し、平成25年度にはクロルピリホスでも、ホルムアルデヒドと同様の IL-8 産生増強効果が見られることを示した。一方、トルエン、アセトアルデヒド及びキシレンにおいては、IL-8 の mRNA 増強効果は明らかでなかった。クロルピリホスの効果もホルムアルデヒド同様に、IL-8 発現に関連した JNK などのシグナル伝達系を介したものであるかどうか、これら以外のシックハウス関連化学物質の影響についても今後の検討が必要である。

A. 研究目的

ヒトの肺は常に、外界の吸入粉塵や微生物に常に曝されており、吸入化学物質が加わった場合、相乗的に気道系の炎症が誘発される可能性がある。環境中の微量な化学物質に反応して精神や身体の不調を引き起こす「シックハウス症候群」に関連して指針に定められている13種の化学物質のうち我々はこれまでホルムアルデヒドを中心に検討を重ねてきた。気道上皮細胞の炎症応答に及ぼす影響を検討するため、ヒト気道上皮細胞株 BEAS2B を用いて、日常的な経気道性のウイルス曝露などを念頭に置いた poly I:C の低濃度刺激下での炎症応答に対する化学物質添加による *in vitro* での影響を定量

RT-PCR で検出する系を確立してきた。ホルムアルデヒドではさらに、培養上清中のサイトカイン、ケモカイン類を測定し、さらにシグナル伝達に関するタンパクのリン酸化について検討を行ない、poly I:C による IL-8 遺伝子発現がそれら3つの主要なシグナル伝達系に依存していること、特に JNK 系が IL-8 遺伝子増強効果に関わっている可能性を示してきた。

本研究班の3年間のうち、平成23年度は、特に、《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》の系で、ホルムアルデヒドによる IL-8 mRNA 発現増強効果の機序に迫るため、IL-8 遺伝子発現に関わるとされる p38MAPK, ERK1/2, JNK の3つの主要なシグナル伝達系に対す

る各種阻害剤の効果を検討した。

また、平成24年度は、さらに IL-8 以外に分泌される多数の生理活性物質を同時定量し、poly I:C とホルムアルデヒドの複合効果について検討した。ホルムアルデヒドに続いて「シックハウス症候群」に関連して指針に定められている 13 種の化学物質のうちのホルムアルデヒド以外の化学物質を用いた検討も開始した。

平成25年度はキシレン、クロルピリホス、トルエン、アセトアルデヒドについて、ヒト気道上皮細胞系による poly I:C の低濃度刺激下での炎症応答への影響を検討した。

B. 研究方法

B. 研究方法

「刺激物質」

外来性吸入粉塵や微生物を代表する物質として、作用機作がよく検討されており、構造の単純な Poly I:C を刺激物質として選択した。自然免疫系が病原体(特にウイルス)を認識する際のレセプターの agonist として知られている。

「化学物質」

シックハウス症候群関連 13 化学物質のうち平成23-24年度はホルムアルデヒド、平成24-25年度は、キシレン、クロルピリホス、アセトアルデヒド、トルエンの4種の化学物質を用いた。

「細胞」

これまでの検討から、ヒト気道上皮細胞株の中で最も正常の細胞に近い応答性を維持している安定した株化細胞として、BEAS2B を用いた。

「培養および刺激」

BEAS2B 細胞株を 25 cm² フラスコで培養し (5 × 10⁵ cells /flask)、90% confluent で、poly I:C (1, 10 μg/ml) で 24 時間刺激後、各化学物質を段階希釈して各々数段階の濃度で 3 時間添加した後、細胞を回収、total RNA を抽出した。

「遺伝子発現解析の RT-PCR」

細胞から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR を実施した。発現遺伝子 IL-8、RANTES などの mRNA 発現レベルを測定した。

1 μg の total RNA を random primer を用いて逆転写反応を行い、反応液量の 1/20 を 1 PCR 反応に供し、IL8 など mRNA 発現レベルを TaqMan Gene Expression Assay を用いた定量的 RT/PCR で測定した。内在性コントロールには Human GAPDH を用い、 $\Delta\Delta Ct$ 法で非刺激細胞での発現を 1 としたときの各細胞での相対発現量を算出した。

「シグナル伝達分子リン酸化検出のための western blotting」

培養・刺激後の細胞を、脱リン酸化阻害剤を添加した Lysis Buffer に溶解し、サンプルとした。サンプルを限外ろ過にて濃縮後、20 μg を SDS sample buffer に溶解、200V、50~60 分電気泳動(SDS-PAGE)を行い、引き続き polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に 20%メタノール含有の blotting buffer にて 160 mA、35 分で転写した。転写膜を 5% skim milk/TBS-T (1×TBS、0.1% Tween-20) で室温、1 時間ブロッキング後、各々推奨希釈濃度に 5%BSA/TBS-T にて希釈したリン酸化タンパク質特異的一次抗体 (p38MAPK, ERK 1/2 及び JNK) とともに、一晚振盪した。次に、PVDF 膜を洗浄後、HRP 標識二次抗体を含む 5%BSA/TBS-T 中で室温、1 時間インキュベートした。検出は、化学発光(ECL plus もしくは ECL Advance)により、CCD カメラにて画像取得後、Quantity One ソフトウェアを用いて解析を行った。

「IL-8 遺伝子シグナル伝達系に関する阻害剤の添加実験」

BEAS2B 細胞株を培養、Poly I:C (10 μg/ml) 存在下、24 時間刺激後に、シグナル伝達分子 p38MAPK, ERK 1/2 及び JNK 各々の阻害剤 SB203580, U0126 及び SP600125 (各 10mM) を添加して 1 時間プレインキュベートした。その後、ホルムアルデヒ

ド (10 μ M)を加え、一定時間後 (リン酸化検出用には、0, 15, 30min 後、mRNA 発現は3時間後)に細胞を回収し、解析した。

「生理活性物質の測定」

poly I:C とホルムアルデヒドの複合効果については、培養上清に分泌される生理活性物質を、Bio-Plex サスペンションアレイシステムを用いた。対象は、27種類のサイトカイン等の生理活性物質 (IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, FGF-2, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , VEGF) を選択、同時測定した。

(倫理面への配慮)

個人に由来するヒト検体を用いておらず、公に入手される細胞株のみを用いている。

C. 研究結果

「IL-8 遺伝子発現に関わるシグナル伝達系の同定」

IL-8の遺伝子発現に関わると考えられる細胞内シグナル伝達系として、p38MAPK, ERK1/2, JNK の3つの主要な経路が報告されている。これまでの検討により、いずれの系も poly IC により、リン酸化が誘導されることを示してきたが、これらのシグナル伝達系が我々の《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》の刺激応答系で、IL-8 遺伝子発現に直接の影響を及ぼしているかどうかは不明であった。そこで、本実験では、IL-8 遺伝子発現に対する p38MAPK, ERK1/2 及び JNK 阻害剤の効果を検討した。

予想通り、どの阻害剤においても、IL-8 mRNA の発現の抑制が観察されたが、特に p38MAPK, ERK1/2 の阻害剤の効果は大きく、JNK の阻害剤の効果は部分的であったが認められた。一方、阻害剤によるシグナル伝達分子のリン酸化阻害効果は、特に ERK1/2 で著明に認められたが、JNK では

部分的であった(図省略)。

ホルムアルデヒドによる増強効果が観察された JNK の系をさらに検討するため、poly I:C による刺激 24 時間後に、JNK 阻害剤をさらに高濃度(2, 10, 20 μ M)添加して、その後ホルムアルデヒドを加えて、3 時間後に細胞を回収したところ、IL-8 の遺伝子発現は、阻害剤の濃度依存的に減少したが、高濃度でも抑制効果は部分的であった(図1)。

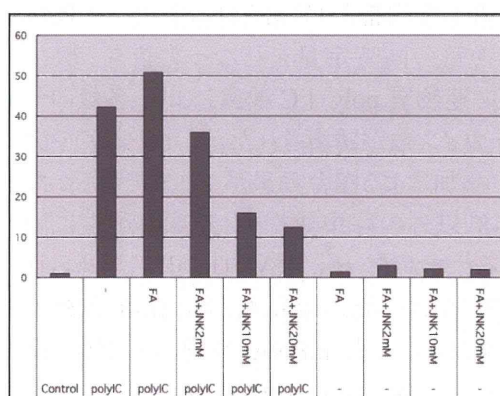


図1 JNK 阻害剤の濃度依存的 IL-8 mRNA の発現抑制

「ホルムアルデヒドによ CCL5(RANTES) の遺伝子発現の抑制傾向」

好中球性炎症に関連の深い IL-8 に対して、好酸球性炎症に関係の深い RANTES の遺伝子発現を同一の系で検討したところ、RANTES はホルムアルデヒドにより、むしろ遺伝子発現の抑制傾向が認められた(図2)。

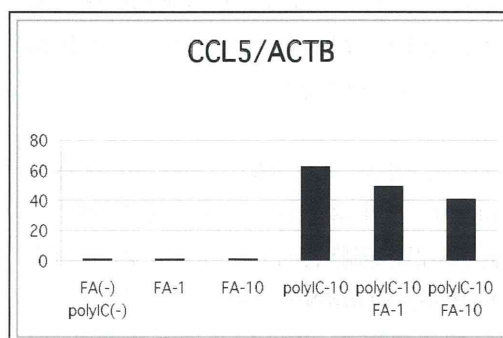


図2 ホルムアルデヒドによる CCL5 (RANTES) の遺伝子発現の抑制 (ACTB で補正)

「ホルムアルデヒドと poly I:C の免疫炎症関連遺伝子発現への影響」

ヒト気道上皮細胞株を用いる *in vitro* の解析系にて、微生物関連物質 (polyI:C) とホルムアルデヒドとの複合効果がほかの免疫炎症関連遺伝子にも見られるかどうか、気道上皮細胞より分泌される多数の生理活性物質の同時定量を行なった結果、微生物関連物質 poly I:C 曝露により、多数のサイトカイン類が誘導されたが、ホルムアルデヒド添加による複合効果がこれまで明らかな IL-8 以外の好中球やリンパ球の遊走に関わるケモカイン(ex. RANTES)にも認められる傾向にあった。しかしながら、IL-8 以外の効果は必ずしも mRNA 発現量の変化とは並行していなかった(図省略)。

「キシレンと poly I:C の IL-8 遺伝子発現への影響」

ホルムアルデヒド以外の化学物質として、キシレン(1, 10, 100, 1000 μ M)を新たに選択し、BEAS2B 細胞株を poly I:C (1, 10 μ g/ml)もしくは LPS(10, 100 ng/ml)で 24 時間刺激後、化学物質を 3 時間添加することにより、サイトカイン mRNA の定量を実施し、同様な効果が認められるか否か検討したが、特に poly I:C 1 μ g/ml では、キシレンの低濃度の添加によって、IL-8 の mRNA 発現量に大きな変化は見られず、高濃度では細胞死が見られた(図表省略)。

「クロルピリホス、トルエン、アセトアルデヒドと poly I:C の IL-8 遺伝子発現への影響」

BEAS-2B 細胞株を用いてインターロイキン 8 (IL-8) の mRNA 発現量を指標にして、微生物関連物質 (polyI:C) と上記3種の化

学物質との複合効果が見られるか否かを検討した。すなわち、A: クロルピリホス (2.85, 28.5, 285 μ M)、B: トルエン (10, 100, 1000 μ M)、C: アセトアルデヒド (50, 500, 5000 μ M)を選択し、poly I:C (1, 10 μ g/ml)で 24 時間刺激後、各種化学物質を 3 時間添加することにより、IL-8 mRNA の定量を実施した。その結果、クロルピリホスにおいては、IL-8 の産生増強の効果が認められたが、その他、トルエン、アセトアルデヒドにおいては、IL-8 の mRNA 発現量に明らかな増強効果は認められなかった(図3A, B, C)。

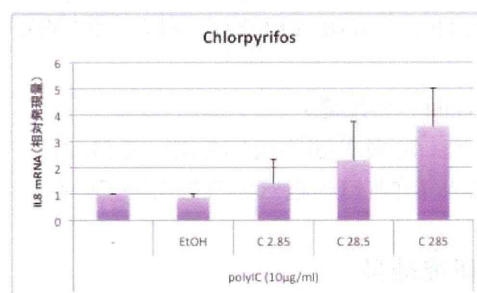


図3A

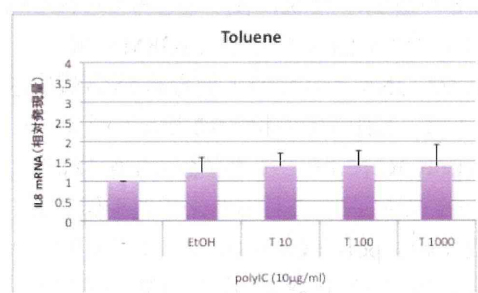


図3B

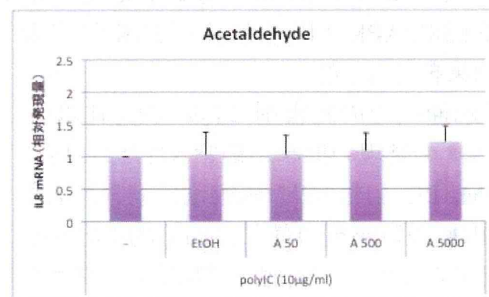


図3C

図3 Poly I:C (10 µg/ml) 存在下 24 時間、(A)クロルピリホス、(B)トルエン、(C)アセトアルデヒド添加後3時間の IL-8 の遺伝子発現レベル

D. 考察

IL-8 の遺伝子発現に関わると考えられる細胞内シグナル伝達系として、p38MAPK, ERK1/2, JNK の3つの主要な経路が報告されている。これまでの検討により、いずれの系も poly I:C により、リン酸化が誘導されることを示してきたが、これらのシグナル伝達系が我々の《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》の系で、IL-8 遺伝子発現に直接の影響を及ぼしているかどうかについては不明であった。

平成23年度、この p38MAPK, ERK1/2, JNK の3つのシグナル伝達系に対する阻害剤の効果を検討した結果、polyIC 刺激により気道上皮細胞のIL8発現増強に至るシグナル伝達系については、p38MAPK および ERK1/2 系がおそらく重要な役割を果たしているものと思われた。しかしながら、ホルムアルデヒド併用により、これらふたつの系がさらに増強されている明確な証拠は得られなかった。一方、ホルムアルデヒド併用によるIL8 遺伝子発現増強時には JNK のリン酸化亢進がみられ、JNK 系は、《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》の系において、polyIC 刺激単独より、むしろホルムアルデヒド併用時の増強効果に関与している可能性が示唆された。(図4)。

ホルムアルデヒドによる遺伝子発現の様式は、遺伝子により IL-8 のように増強するもの、RANTES のように減弱傾向にあるものとパターンが異なるため、それらが JNK のみで説明がつくかどうかは今後の検討を要するものと思われる。

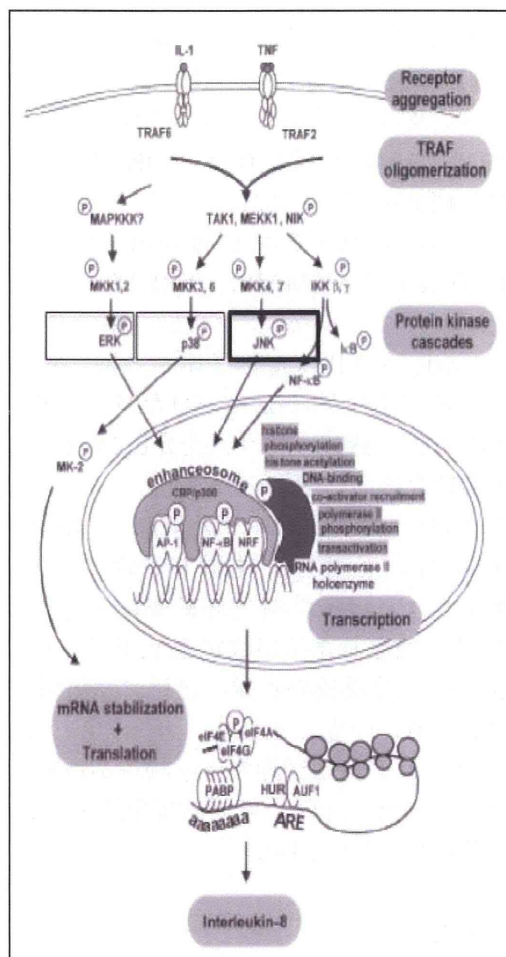


図4 IL-8 発現に関わる刺激伝達系

平成24年度の検討により、微生物関連物質 poly I:C 曝露により多数のサイトカイン類が誘導されることが示されたが、ホルムアルデヒド添加による複合効果については、これまで明らかな IL-8 以外の効果は実験誤差があり、必ずしも mRNA 発現量の変化とは並行しておらず、明解な結果が得られなかった。

キシレンにおいては、ホルムアルデヒドでみられた IL-8 の mRNA 増強効果は認められなかった

平成25年度、上記 *in vitro* の気道上皮細胞炎症応答検出系により、シックハウス関連 13 化学物質のうち、クロルピリホス、アセトアルデヒド、トルエンについて検討したところ、poly I:C 曝露を加えることにより、クロルピリホ

スでも、ホルムアルデヒドで見られたのと同様のIL-8産生増強効果が観察された。一方、トルエン及びアセトアルデヒドキシレンにおいては、キシレン同様、IL-8のmRNA増強効果は明らかでなかった。

ホルムアルデヒドでは、IL-8遺伝子発現に関わるとされるp38MAPK、ERK1/2、JNKの3つの主要なシグナル伝達系のうち、特にJNK系がIL-8遺伝子増強効果に関わっている可能性が明らかにされたが、クロルピリホスでも同様のシグナルを介しているかどうかは今後の検討が必要である。

クロルピリホスは、シロアリ駆除などに用いられる常温で固体の有機リン化合物であり、2003年のシックハウスによる健康被害防止のために建築基準法が改定され、現在、居室を有する建築物の新規の建材には使用が禁じられている。このとき、ホルムアルデヒドとクロルピリホス2種類の化学物質が規制対象となったことは、今回の結果を踏まえると、意義深いものである。

E. 結論

ヒト気道上皮細胞株を用いた*in vitro*系においては、微生物由来物質の存在により、複数の化学物質の吸入曝露による有害作用が増強される可能性を示しており、化学物質のヒトへの影響を見る際の細胞モデルとして有用と思われる。

《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》の系において、IL-8遺伝子発現に関わると報告されているERK、p38、JNKのリン酸化のうち、ホルムアルデヒドは、JNKのリン酸化を亢進して、IL-8遺伝子発現増強に関連する可能性が示唆された。また、微生物関連物質(poly I:C)とホルムアルデヒドとのIL-8遺伝子の発現増強作用は、シックハウス関連13化学物質すべてに共通ではないものの、複数の物質で見られることが明らかになった。この*in vitro*解析系は、ヒトへの外挿に有用である可能性を示し、微生物由来物質の吸

入により、症状が増強される可能性を示唆しており、吸入曝露による毒性を考える上で意義深い。今後、対象とした以外の化学物質についても同様の手法により比較することで、吸入曝露動物モデルにより得られた遺伝子発現様式と比較するための基礎データを得ることができるものと考えられる。また、逆に動物モデルで有意な遺伝子発現について今後、細胞モデル、臨床との対比が重要と思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

2) 雑誌

1. Hijikata M, Matsushita I, Tanaka G, Tsuchiya T, Ito H, Tokunaga K, Ohashi J, Homma S, Kobashi Y, Taguchi Y, Azuma A, Kudoh S, Keicho N. Molecular cloning of two novel mucin-like genes in the disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Hum Genet* 29 (2): 117-28, 2011.
2. Keicho N, Hijikata M. Genetic predisposition to diffuse panbronchiolitis. *Respirology* 6 (4): 581-8, 2011.
3. Kobayashi K, Yuliwulandari R, Yanai H, Lien LT, Hang NT, Hijikata M, Keicho N, Tokunaga K. Association of CD209 polymorphisms with tuberculosis in an Indonesian population. *Hum Immunol* 72 (9): 741-5, 2011.
4. Pitabut N, Mahasirimongkol S, Yanai H, Ridruechai C, Sakurada S, Dhepakson P, Kantipong P, Piyaworawong S, Moolphate S, Hansudewechakul C, Yamada N, Keicho N, Okada M, Khusmith S. Decreased granulysin and increased interferon-gamma levels in plasma of patients

- with newly diagnosed and relapse tuberculosis. *Microbiol Immunol* 55 (8): 565-73, 2011.
5. Ridruechai C, Sakurada S, Yanai H, Yamada N, Kantipong P, Piyaworawong S, Dhepakson P, Khusmith S, Keicho N. Association between circulating full-length osteopontin and IFN-gamma with disease status of tuberculosis and response to successful treatment. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 42 (4): 876-889, 2011.
 6. Asano K, Tryka E, Cho JS, Keicho N. Macrolide therapy in chronic inflammatory diseases. *Mediators Inflamm*. 2012: 692352., 2012.
 7. Hijikata M, Shojima J, Matsushita I, Tokunaga K, Ohashi J, Hang NTL, Horie T, Sakurada S, Hoang NP, Thuong PH, Lien LT, Keicho N. Association of IFNGR2 gene polymorphisms with pulmonary tuberculosis among the Vietnamese. *Hum Genet* 131 (5): 675-682, 2012.
 8. Keicho N, Matsushita I, Tanaka T, Shimbo T, Hang NT, Sakurada S, Kobayashi N, Hijikata M, Thuong PH, Lien LT. Circulating levels of adiponectin, leptin, fetuin-A and retinol-binding protein in patients with tuberculosis: markers of metabolism and inflammation. *PLoS One* 7 (6): e38703, 2012.
 9. Kobayashi K, Yuliwulandari R, Yanai H, Naka I, Lien LT, Hang NT, Hijikata M, Keicho N, Tokunaga K. Association of TLR polymorphisms with development of tuberculosis in Indonesian females. *Tissue Antigens* 79 (3): 190-197, 2012.
 10. Noguchi S, Hamano E, Matsushita I, Hijikata M, Ito H, Nagase T, Keicho N. Differential effects of a common splice site polymorphism on the generation of OAS1 variants in human bronchial epithelial cells. *Hum Immunol* 74 (3): 395-401, 2013.
 11. Noguchi S, Hijikata M, Hamano E, Matsushita I, Ito H, Ohashi J, Nagase T, Keicho N. MxA transcripts with distinct first exons and modulation of gene expression levels by single-nucleotide polymorphisms in human bronchial epithelial cells. *Immunogenetics* 65 (2): 107-114., 2013.
 12. Sapkota BR, Hijikata M, Matsushita I, Tanaka G, Ieki R, Kobayashi N, Toyota E, Nagai H, Kurashima A, Tokunaga K, Keicho N. Association of SLC11A1 (NRAMP1) polymorphisms with pulmonary *Mycobacterium avium* complex (MAC) infection. *Hum immunol* 73 (5): 529-536, 2012.
- ## 2. 学会発表
- ### 国際学会発表
1. Hijikata M, Matsushita I, Ito H, Ohashi J, Homma S, Taguchi Y, Azuma A, Kudoh S, Keicho N. Genetic analysis of two novel mucin-like genes in the disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. In: European Respiratory Society Annual Congress 2011, September 24 - 28, Amsterdam, Netherlands, 2011.
 2. Keicho N. Diffuse panbronchiolitis. In: 11th Killarney National Cystic Fibrosis Meeting, Feb 3-4, Killarney, Ireland, 2011.
 3. Matsushita I, Hijikata M, Ito H, Keicho N. Enhanced inflammatory response to formaldehyde in human bronchial epithelial cells. In: European Respiratory Society Annual Congress 2011, September 24 - 28, Amsterdam, Netherlands, 2011.
 4. Hijikata M, Yen NTB, Hang NTL, Hong NT, Sakurada S, Lan gN, Kobayashi N,