

- 2 気管支ぜん息等の発症・増悪リスクとしての環境要因の寄与の程度に関する研究

代表者 : 工藤 翔二

【研究内容1】

- 2 - (1) ディーゼル排気粒子の影響に関する検討

1. 研究従事者(印はリーダー)

滝沢 始 (東京大学)	菅原 勇 (結核研究所)
吾妻 安良太 (日本医科大学)	平松久弥子 (日本医科大学)
松本 亜紀 (日本医科大学)	

2. 平成15年度の研究目的

ディーゼルエンジン由来微粒子(DEP)の喘息発症と増悪への寄与を検討するために、第5期研究に引き続き結核研究所内のディーゼル暴露施設を利用し、低濃度・長期暴露系における純系マウスのアレルギー性気道炎症モデルを樹立する。肺洗浄液中の炎症細胞、肺サイトカイン遺伝子発現の変動や気道過敏性を目安として、対照群と比較しつつ検討する。今年度は、喘息の増悪への影響を主に検討する。さらに、喘息発症への影響を検討するための実験系の作成をめざす。

3. 平成15年度の研究の対象及び方法

純系マウス(BALB/c、C57BL/6)をDEP暴露チャンバー(結核研究所内)で環境中でもあり得る濃度($100 \mu\text{g}/\text{m}^3$)反復暴露を行った。動物のDEP暴露にあたっては、実際の環境汚染状況になるべく近似した条件で行うように、1日の暴露時間を7時間、週5日行った。喘息様アレルギー性気道炎症モデルの作成は、まず、卵白アルブミン(OVA) $20 \mu\text{g}$ の腹腔内注射をday 0、6、7に行って感作したのち、day 21、22にOVA $100 \mu\text{g}$ の鼻腔内投与によりチャレンジした。ここから2群にわけ、1群には上記のDE曝露を行い、他の1群には清浄空気のみ吸入させた。最後のチャレンジ後、2日、1、2、3、4週間後に、麻酔下に脱血死させ、下記のような処置を行った。

- 1) 経時的に気管支肺胞洗浄(bronchoalveolar lavage、BAL)と組織学的検索を行う。
- 2) サイトカイン等の遺伝子発現につき、肺組織からRNAを抽出し、半定量的RT-PCRにより検出する。
- 3) 無束縛、無麻酔下で体プレチスモグラフ法によりアセチルコリン吸入時の気道抵抗を測定し、非特異的な気道過敏性を調べる。

4 . 平成 1 5 年度の研究成果

純系マウスのBALB/cマウスに一日7時間、週5日、100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ が清浄空気(対照群)の条件で1ヶ月吸入を継続した。BAL液中の総細胞数と好酸球数は1週間後をピークに著明に増加したが、DEおよび対照群間の比較では有意差は認めなかった。好中球およびリンパ球数も1週間後をピークに増加したが、やはり両群間で有意差はなかった。一方、マクロファージ数は1週間後に減少したが、これも両群間で有意差はなかった。さらに、フローサイトメトリーにより、リンパ球の表面マーカーで調べたが、明らかなT細胞の数の両群間での有意差はなかった。

肺の組織学的検討では、OVA チャレンジ2日後から気道周囲、血管周囲への軽度の好酸球を主体とした炎症細胞浸潤、及び杯細胞増生・粘液分泌亢進が見られ始めていた。それが1週間後にピークとなり、その後2週間目からは軽減傾向を示していた。しかし、DE曝露群と対象群の間で著明な変化は認めなかった。

肺組織をすりつぶして、mRNAを抽出し、各種のサイトカインの遺伝子発現状況を検討した。アレルギー性炎症においてTh2タイプのサイトカインと呼ばれる、IL-4、IL-5、IL-13の遺伝子発現が明らかに誘導されたが、DEの1ヶ月曝露では、これらの遺伝子発現が早期から増強し、かつ長引く傾向がみられた。また、TH2タイプのリンパ球に対する遊走因子として重要性が明らかにされているケモカイン、TARC、MDCも明らかに発現が増強した。一方、いわゆるTh1タイプのサイトカインといわれるINF- γ とIL-2は両群とも極めて低レベルであった。

さらに、気道過敏性への影響を検討した。DE曝露24時間後では、DE群で亢進が示唆されるものの、有意差はなかった。DE曝露1週間後では、DEの吸入そのものによる気道過敏性の誘導が示唆された。喘息モデルにおいてDE吸入によりさらに気道過敏性が増強されるかどうか、現在検討中である。

次に、*in vitro*の系において、TH2タイプのリンパ球に対する遊走因子として重要性が明らかにされているケモカイン、TARCが実際に発現・産生されているか否かを、ヒト気管支上皮細胞の培養系で検討したところ、DEP刺激で明らかに誘導された。

5 . 考察

DE低濃度における喘息マウスモデルを作成した。今年度は、喘息の増悪へのDE曝露の影響を評価しうるモデルが確立された。肺洗浄液中の細胞数、分画に有意な変化は認めなかったが、肺組織でのTh2サイトカインやTARC、MDCというTH2リンパ球に対するケモカインの発現の増強が見られた。TARCについては、*in vitro*でもDEPによる発現増強効果が確認された。この効果はNACにより抑制できた。さらに、喘息のもっとも普遍的な生理学的特徴である非特異的な気道過敏性の誘導が示唆された。今後、さらに検討数を増やして検討する予定である。

6. 次年度以降の計画

1)ディーゼルエンジン微粒子の低濃度(100 µg/m³)の曝露を3、6ヶ月まで継続し、長期曝露によるぜん息増悪への影響の度合いを、気道の組織学的所見、肺洗浄液中の細胞成分、および気道過敏性への影響から検討する。

2)感受性が異なる Balb/c と C57B6 の純系マウスでアレルゲン(卵白アルブミン)の経気道的な投与を行い、ぜん息様病態の実験モデルの作成後ディーゼル曝露を行い、肺の組織学的検討、気管支肺胞洗浄などにより気道炎症を定量的に評価し、気道過敏性により生理学的にも評価する。

7. 社会的貢献

気管支ぜん息の発症や増悪に影響する因子に関しては、まず、大気中浮遊粒子状物質とくにディーゼルエンジン微粒子の呼吸器への影響に関して、気道にぜん息様の病態を惹起しうることやアレルゲン吸入反応を増強することが報告されている。本研究では、マウスのぜん息モデルにおいて、さまざまな時相に低濃度持続吸入を感受性の異なる純系マウスに行うことにより、より実際に近い曝露条件において、ディーゼルエンジン微粒子がぜん息発症や増強に与える影響を評価できると期待される。以上の成果は、気管支ぜん息等の発症予防対策策定にいっそうの科学的根拠を与えると予想され、対策をより効果的に、しかも効率的に実行するために活用できる。

【研究内容2】

- 2 - (2) 環境ホルモンの影響に関する検討

1. 研究従事者(印はリーダー)

眞弓 光文 (福井大学) 大嶋 勇成 (福井大学)
塚原 宏一 (福井大学)

2. 平成15年度の研究目的

近年、アレルギー性疾患の増加が社会的問題となっており、小児科領域においてもアトピー性皮膚炎や気管支喘息の増加と発症の若年化、重症化の傾向が指摘されている。小児のアレルギー性疾患はアトピー型が大多数を占めており、その病態形成には IL-4、IL-5、IL-13 を主に産生する Th2 タイプのヘルパーT細胞と、IgE が重要な役割を果たしていると考えられている。抗原刺激を未だ受けていないナイーブT細胞から Th2 細胞への分化には様々な因子が関与していることが明らかにされてきており、in vitro の実験において種々のステロイドホルモンも Th1/Th2 細胞の分化に影響を与える可能性が報告されている。なかでも、女性ホルモンは胎児が母体から異物として拒絶されるのを防ぐのに重要な Th2 優

位の胎内環境の維持に関与していると考えられている。また、女性において SLE などの膠原病の頻度が高いことから、自己反応性の Th2 細胞の誘導が性ホルモンにより生じやすくなっていると考えられている。一方、内分泌攪乱物質の中には、エストロゲンレセプターへの結合性が示唆されているものが存在しており、その中の一部のものは日本人臍帯にも検出されることが報告されている。従って、女性ホルモン様作用を持つ内分泌攪乱物質は Th2 細胞への分化を誘導する可能性が予測され、その作用によってアレルギー性疾患発症にも何らかの影響を与えていることが予測される。

内分泌攪乱物質は胎児への影響や母乳中への排泄が問題視されているが、胎児期、新生児期、乳児期は免疫系の発達においても重要な時期であり、小児期のアレルギー性疾患の特徴であるアレルギーマーチがスタートする時期でもある。従って、この時期に内分泌攪乱物質により Th2 細胞への分化が促進されるような生体内の環境が作られた場合、食物抗原や吸入性抗原のように本来は生体に侵襲性を持たない抗原に対して免疫寛容が誘導されるべきなのに、Th2 細胞の感作と抗原特異的 IgE 産生が誘導されることが予測され、その結果アレルギー性疾患発症へと繋がる危険性が考えられる。

本年度の研究では、ステロイドホルモン受容体への結合性が示唆されている内分泌攪乱物質を対象として、これらの物質の中にナイーブ T 細胞から Th2 細胞への分化を促進する作用を有するものが存在するかどうかを *in vitro* の実験系およびコホート研究を用いて明らかにすることにより、気管支ぜん息の発症に関与する環境要因としての環境ホルモンの影響を明らかにすることを目的とする。

3. 平成 15 年度の研究の対象及び方法

検討対象とする化学物質としては、胎児への汚染が問題視されており、日本人の臍帯に検出されると報告されている内分泌攪乱作用が示唆される物質の中から、エストロゲンレセプターへの結合性が示唆されている bisphenol A をはじめとしたアルキルフェノール類を中心に選択した。

In vitro での検討に用いるヒト T 細胞や樹状細胞の前駆細胞である末梢血液単球は、福井大学医学部附属病院輸血部において、自己血輸血の目的で採血された血液の処理過程で生じる不要成分であるパuffyコートから分離した。血液使用にあたり、研究目的への使用への許可をインフォームドコンセント書面により取得した後分離に供した。

末梢血パuffyコートからヘルパー T 細胞の前駆細胞となるナイーブ CD4 陽性 T 細胞を MACS 磁気ビーズ分離システムを用いて分離し、内分泌攪乱物質の存在下で抗 CD3 抗体と CD86 のトランスフェクタントで刺激活性化を行い、増殖分化したヘルパー T 細胞を再刺激してそのサイトカイン産生能を測定した。

また、ナイーブ T 細胞の分化を制御する樹状細胞の機能に及ぼす内分泌攪乱物質の作用を検討するため、末梢血液単球を IL-4 と GM-CSF で培養することで樹状細胞を誘導する系に内分泌攪乱物質を添加し、誘導された樹状細胞機能の表面マーカーやサイトカイン産生能を評価した。

小児の免疫系の発達に与える影響が大きいと考えられる胎児期から乳幼児期にかけての内分泌攪乱物質の暴露状況を評価するため、その暴露経路と考えられる臍帯血、母乳のサンプル収集を行うと共に、これらの乳児を追跡調査してアレルギー疾患の発症の有無を検討することにより、胎児期、新生児期における内分泌攪乱物質の被曝状況が生後のアレルギー疾患の発症におよぼす影響を明らかにする。

4. 平成15年度の研究成果

1) in vitro でのヒトナイーブT細胞の分化に及ぼす化学物質の影響

本年度、検討を行った Bisphenol A、nonylphenol、Octylphenol、DOP は $1 \cdot M$ の濃度までではナイーブ CD4 T細胞の活性化と増殖には影響を与えなかったが、Th1 サイトカインである IFN- γ の産生能を濃度依存的に抑制した。一方、Th2 タイプのサイトカインである IL-13 の産生能の獲得に対しては、検討したこれらの化学物質は $1 \cdot M$ の濃度でも有意の抑制効果を示さなかった。また、Bisphenol A においては $1 \cdot M$ の濃度でむしろ、IL-13 産生能の増強効果が認められた。

2) in vitro でのヒト樹状細胞の機能的分化に及ぼす化学物質の影響

単球から樹状細胞への分化を誘導する培養系への Bisphenol A、nonylphenol、Octylphenol、DOP の影響は、 $1 \cdot M$ の添加でも誘導されてくる樹状細胞の生細胞数に無添加の場合とで有意な差を認めなかった。サイトカイン産生能に対する影響は単球のドナー個体間で影響の程度に差が大きいものの、T細胞依存性の刺激である CD40 ライグランド + IFN- γ 刺激または、RNA ウイルスによる刺激に相当する poly I:C 刺激に対する IL-12 産生はこれらの化学物質により増強された。一方、IL-10 の産生能に対しては検討した化学物質は抑制効果を示した。

樹状細胞の抗原提示機能に關与する補助刺激分子の CD86 の発現は nonylphenol により増強された。しかし、他の補助刺激分子でもある CD54 の発現には nonylphenol を含め、今回検討した化学物質は影響を与えなかった。

3) in vivo での暴露評価のための臍帯血、母乳の収集

本研究目的への利用のインフォームドコンセントを得た臍帯血、母乳の収集を開始し、臍帯血を収集した児を追跡調査する体制を整えた。

5. 考察

本年度検討し得た bisphenol A、nonylphenol、Octylphenol、DOP はヒトナイーブT細胞の活性化段階で作用した場合に Th2 細胞への分化を抑制せず、Th1 細胞への分化を濃度依存的に抑制すると考えられた。なかでも bisphenol A は高濃度では Th2 細胞への分化を促進する可能性が示唆された。これらの結果は、今回検討した化学物質がナイーブT細胞が末梢において初めて抗原暴露を受ける場合に作用すると、Th1/Th2 バランスを Th2 優位の免疫応答の状態へとシフトさせる作用を示す可能性が考えられた。

一方、ナイーブT細胞に対する主要な抗原提示細胞である樹状細胞の機能に関しては、樹状細胞サブセットのうち単球由来の樹状細胞機能に及ぼす影響を検討した。IL-10 はオートクライン、パラクライン的に作用することで樹状細胞機能の内因性の抑制因子となり、また、調節性T細胞 Tr1 細胞への分化に誘導にも關与するとされることから、Bisphenol A、

nonylphenol、Octylphenol、DOP による IL-10 産生能の抑制は、樹状細胞の異常な活性化に繋がる可能性が示唆された。

さらに、CD86 の発現が弱い未熟な段階の樹状細胞は免疫寛容の維持に関与すると考えられているが、nonylphenol は未熟樹状細胞の CD86 発現を増強させたことは、抗原提示機能を増強し免疫寛容の破綻に繋がる可能性が考えられる。補助刺激分子の CD86 を介する刺激は Th2 分化の誘導に重要で、CD54 を介する刺激は Th1 分化の誘導に重要との報告もある。Nonylphenol が CD54 の発現を増強することなく、CD86 の発現のみを増強したことは、補助刺激分子による Th1/Th2 細胞誘導刺激のバランスにも何らかの影響を与えることが示唆される。

一方、ナイーブ T 細胞から Th1 細胞への分化誘導の鍵を握るサイトカインである IL-12 の樹状細胞による産生が今回検討した化学物質により増強したことは、補助刺激分子を介する刺激とサイトカインを介する刺激が Th1/Th2 バランスの点からは反対の作用を示すことも考えられる。樹状細胞からナイーブ T 細胞が抗原刺激を受ける場合にどの影響がより優位に作用するかは今後検討を加えていく必要がある。さらに、実際の生体においては単球由来樹状細胞以外の樹状細胞サブセットの関与も考えられることから、別のサブセットに対する影響も検討する必要があると考えられる。

6. 次年度以降の計画

本年度に同定されたナイーブ T 細胞からヘルパー T 細胞への分化や樹状細胞機能に影響を与える可能性が示唆された bisphenol A や nonylphenol を中心にその作用機序を明らかにする。樹状細胞からナイーブ T 細胞が抗原刺激を受ける場合にナイーブ T 細胞に対する直接作用と樹状細胞の IL-12 産生に対する作用のどちらの影響がより優位となるかを明らかにするため、単球由来樹状細胞からのアロ抗原刺激を利用してナイーブ T 細胞を活性化させ、化学物質がナイーブ T 細胞の分化にどのような影響を与えるかを解析する。

内分泌攪乱物質の添加時にエストラジオールやテストステロンを同時に加え、性ステロイドの存在下での化学物質の影響を解析し、今回観察された化学物質の作用が性ステロイドレセプターを介するシグナルに依存するものかどうかを検討し、その作用機序を明らかにする。

in vitro の実験で同定された Th1/Th2 分化に影響する内分泌攪乱物質を、妊娠・授乳中の母親マウスに投与し、得られた仔マウスの脾細胞を用いて、母体に投与された内分泌攪乱物質が次世代の T 細胞免疫応答にどのような影響を与えるかを解析するために in vivo の実験モデルを作成する。抗原特異的に反応するナイーブ T 細胞の反応を解析するため、オボアルブミン(OVA)特異的 T 細胞レセプター(TCR)を発現するトランスジェニックマウス(tg)を用い、ヘテロのトランスジェニック雄マウスと野生型雌マウスを交配し、交配後から出産後授乳期間が終了するまで、母親マウスに化学物質を混合した飼料を与え、授乳期間終了時の TCR-tg 仔マウスから分離した脾細胞を用いて抗原特異的反応性を解析する。

保存収集した臍帯血および母乳中の環境ホルモン測定と、臍帯血ドナー児および、授乳児のアレルギー症状の追跡結果により、環境ホルモンとアレルギー発症の関連性について

の解析を試みる。

7. 社会的貢献

内分泌攪乱物質は胎児への影響や母乳中への排泄が問題視されているが、胎児期、新生児期、乳児期は免疫系の発達においても重要な時期であり、小児アレルギー性疾患で問題となる食物抗原やダニ抗原などの吸入性抗原に対する感作が成立する時期でもある。また、小児期のアレルギー性疾患の特徴であるアレルギーマーチがスタートする時期とも一致する。従って、この時期における内分泌攪乱物質による Th2 細胞への分化の促進と Th1 細胞応答の抑制は、アレルギー性疾患の発症に重要な鍵を握っていると考えられる。これまで、アレルギー性疾患の発症予防に関しては、食物制限やダニ除去など主に抗原除去といった点に注意が向けられていた。しかし、本研究により内分泌攪乱物質が抗原感作において Th2 を誘導するようなアジュバンド作用があることが証明することが出来れば、抗原除去以外に内分泌攪乱物質に対する環境対策を加えることにより、Th2 誘導のアジュバンド的作用をへらすことで、抗原対策に加えて新たな予防戦略を提唱することが出来、アレルギー性疾患発症の抑制といった点に貢献することが期待される。

また、本研究により *in vitro* と *in vivo* での T 細胞の免疫応答に対する化学物質の影響の評価方法が確立できれば、新たな化学物質の生体への危険性を評価するシステムを確立することが可能となり、化学物質のリスクのスクリーニングシステムにも応用できることが期待される。

【研究内容3】

- 2 - (3) ウイルス感染の影響に関する検討

1. 研究従事者(印はリーダー)

足立満(昭和大学第一内科) 國分二三男(昭和大学第一内科)

松倉聡(昭和大学第一内科) 加藤政彦(群馬県立小児医療センターアレルギー科)

河野茂(長崎大学第二内科) 松瀬厚人(長崎大学第二内科)

山谷睦雄(東北大学老年呼吸器内科) 井上博雅(九州大学胸部疾患研究施設)

2. 平成15年度の研究目的

ウイルス感染は気管支喘息をはじめとする慢性呼吸器疾患の増悪因子として重要である。感冒症状を有する喘息発作患者においては喘息症状悪化とライノウイルス感染とに有意の関係が認められている。気道感染の原因ウイルスとしてはライノウイルスのみでなく RS ウイルス、インフルエンザ、パラインフルエンザウイルス、アデノウイルスなどのウイルスが重要とされているが、それぞれのウイルスにより喘息病態に如何に関与するかを検討す

ることが必要と考えられる。現在ウイルスにより異なるサイトカイン、ケモカインの産生が誘導されることや接着分子発現増強に関与することなどが判明している。またウイルス感染によって惹起される病態においては Th1 優位の免疫状態が増幅されることが想定されるが、これによりアレルギー性気道炎症がどのような影響を受けるかについての詳細は明らかではない。このような状況より気管支喘息の発症、増悪リスクとしてのウイルス感染の機序につき検討を加えその対策についても考察する予定である。本研究班では本年度は基礎的検討を行い、その結果を踏まえてアレルギー病態への関与の詳細を検討するとともに次年度以降に臨床的検討ならびに治療への応用を予定している。

3. 平成15年度の研究の対象および方法

In vitro 実験系ならびに in vivo 実験系を用いてアレルギー性炎症とウイルス感染の関係を明らかにする。In vitro 実験系においては細胞内情報伝達における促進および抑制系因子の解明を行う。In vivo 実験系においてはウイルス感染によるアレルギー性炎症発症への関与を検討する。さらに喘息病態の重要因子である気道分泌について検討を行った。

具体的方法

1) In vitro 実験系を用いてアレルギー性炎症とウイルス感染の関係を明らかにする目的で気道上皮細胞培養系を用い dsRNA、RS ウイルス、アデノウイルスなどの感染を行った。その後に産生されるケモカインやその産生機序の解明を試みた。RS ウイルスに関しては気道上皮細胞へ好酸球由来組織傷害性蛋白質である MBP、EPO を添加しその変化を観察した。さらに気道上皮細胞ならびに粘膜下腺におけるムチン産生とライノウイルス感染との関係を検討した。

1) In vivo 実験系においてはダニ感作マウスを用いて RS ウイルスのアレルギー性気道炎症に対する影響を観察する目的で一回感作実験と複数感作実験を実施した。

4. 平成15年度の研究成果

In vitro 実験系ではウイルス感染(dsRNA)により細胞内情報伝達において NF- κ B、IRF-3 の関与が示唆された。また SOCS-3 の関与により Th2 優位な状況が惹起されることが示唆された。RS ウイルス感染と好酸球由来の組織傷害性蛋白質である MBP EPO により気道上皮細胞の傷害、アポトーシスに相乗効果がみられた。さらにライノウイルス感染においては気道粘膜下腺において MUC5AC の発現が亢進し同時にムチン合成も増加した。この増加はマクロライド系抗生 EM により抑制された。In vivo 実験系においては RS ウイルスの少量単回投与ではアレルギー反応は抑制されたが、複数回投与では Th2 優位な免疫反応を誘導しアレルギー性炎症を増悪させることが明らかとなった。

以上の結果よりウイルス感染がアレルギー炎症と深く関わるということが明らかとなった。ウイルス感染細胞は刺激によりケモカイン、サイトカインの産生が誘導されアレルギー性炎

症の増悪に關与することが判明した。さらにウイルス感染時に關与する因子としては IP-10、RANTES、IL-8 などが主体となりその病像を修飾することが判明した。RS ウイルス感染と好酸球由来の組織傷害性蛋白質との気道上皮細胞への影響については両者の添加により上皮障害が相乗的に觀察された。そしてその障害にはアポトーシスの増加が關与するものと考えられた。ライノウイルス感染による気道粘膜下腺におけるムチン合成増加は MUC2、3、5AC、5B、6 の合成増加が關与し NF- κ B、tyrosine kinase、MAP kinase の關与が示唆された。またマクロライド系抗生 EM によりライノウイルス感染とムチン合成は抑制されたが、これは EM による NF- κ B への關与が示唆されたものである。マウス実験モデルにおいては RS ウイルスの少量単回投与ではアレルギー反応は抑制されたが、複数回投与では Th2 優位な免疫反応を誘導しアレルギー性炎症を増悪させることが明らかとなった。今回用いた RS ウイルス量は本来炎症を惹起する量ではないため肺炎などの感染モデルではなく少量感染によるアレルギー性炎症への影響を觀察するための実験モデルであり一回感作実験では IFN 増加など Th1 へのシフトがみられアレルギー抑制へと影響したが、複数感作実験においては Th2 優位の免疫反応の増幅によりアレルギー性気道炎症増悪に關与することが明らかとなった。

5. 考察

ウイルス感染は気管支喘息をはじめとする慢性呼吸器疾患の増悪因子として重要である。喘息患者を対象として実施したアンケート調査においても気道感染は喘息の増悪因子として最も重要であった。現在までウイルス感染と気管支喘息特に気道過敏性との関連についてはウイルス特異的 IgE 産生やケミカルメディエーターである LTC₄、ヒスタミン、プロスタグランジンなどの關与が報告されている。またウイルス感染において防御機構の中心的役割を担うウイルス特異的 CD8T 細胞が IL-4 刺激によって IL-5 産生を行い好酸球浸潤に關与しウイルス感染時の喘息悪化、ウイルス感染の遷延と關係することなどが判明している。さらにウイルス感染により気道上皮には傷害がもたらされ細胞の変性、膨化が認められる。その結果、上皮細胞由来の enkephalinase 減少などが起こり、ウイルス感染によるコリン作動性神経 M2 受容体機能障害の誘導によりネガティブフィードバックの低下による収縮反応の増加なども關与しよる気道過敏性亢進が示唆されている。このような種々の因子の關与によりウイルス感染時の気道炎症は増悪するが、その詳細については未だ不明な点も多い。本研究においては、このような背景より気管支喘息増悪リスクとしてのウイルス感染を環境要因の中でも最も重要な因子の一つと考えその相互關係の詳細について検討を行った。以上のようにウイルス感染は気管支喘息増悪リスクとしての環境要因の中でも最も重要な因子と考えられるが、本年度得られた結果よりアレルギー性炎症発症にも關与することが明らかとなった。今後はその詳細についてさらなる検討を加えるとともに臨床研究を並行して行い治療への展望をも含めて研究を進めていく予定である。

6. 次年度以降の計画

in vitro におけるウイルス感染実験系においては、これに対し炎症性サイトカイン刺激や dsRNA、ライノウイルス、RS ウイルス、インフルエンザ、パラインフルエンザウイルス、アデノウイルス刺激を行いケモカインなど生理活性物質の産生、粘液産生への影響を解明する。気道上皮と好酸球活性化に関する機序の詳細を検討する。さらにウイルス感染時喘息患者の鼻汁、喀痰、血液など臨床検体を測定することによりヒトの感染病態に如何なる因子が重要であるかを検討する。

7. 社会的貢献

気管支喘息の発症 / 増悪の因子として、近年さまざまな要因が報告されているが、従来より気道感染の重要性が指摘されている。特に成人喘息における増悪因子として、上気道ウイルス感染は特に重要と思われる。成人喘息の急性増悪原因の 70%以上が上気道感染であることが報告されている。以上のように気管支喘息の悪化因子としてのウイルスによる上気道感染すなわち風邪症候群による症状の増悪は臨床上周知の事実であるが、その詳細な機序については不明な点が少なくない。また喘息の発症要因としての感染については肯定的報告、否定的報告がともにみられ一致した見解が得られていない。よって本研究においてはこれらの関係を解明しその予防対策および増悪防止策を検討することは社会的にも重要と考えられる。

さらに近年のアレルギー疾患罹患率増加は著しく気管支喘息患者数も増加を辿っている。感染は喘息のみならず全ての疾患においてその病態を修飾し大きな影響を及ぼす。しかしながら現時点では一部のウイルスを除いてはその感染に対する根治療法はない。このような観点より、気管支喘息病態に対するウイルス感染の影響を検討することは極めて重要でありその予防、治療法を考える上で詳細な解明が必要と考えられる。

【研究内容 4】

- 2 - (4) 喫煙以外の環境要因の影響に関する検討

1. 研究従事者(印はリーダー)

永井 厚志 (東京女子医科大学)	青柴和徹(東京女子医科大学)、
西村正治(北海道大学)	高橋敬治(至誠堂総合病院)、
栗山喬之(千葉大学)	足立満(昭和大学)、
西村浩一(京都桂病院)	一ノ瀬正和(和歌山県立医科大学)、
石岡伸一(石岡内科クリニック)	相澤久道(久留米大学)

2. 平成15年度の研究目的

近年行われた全国的な疫学調査(Nippon COPD Epi-demiology Study: NICE study1)によればわが国には530万人以上の慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者がいると推定されており、この予防対策は高齢化社会にあって不可欠の課題である。COPDの発症因子は喫煙と関連づけられているが、同調査によれば非喫煙者の4.7%がCOPD患者であると推定された。わが国における平均喫煙率を30%と見積もると40歳以上の非喫煙者のうち3.5%がCOPD患者となり無視し得ない数値となる。しかしながらこれまでに喫煙以外のCOPDに関わる発症因子についてはほとんど研究が行われていない。本研究ではNICE study1により確認された非喫煙者COPD患者と非喫煙健常者の背景因子を比較調査することにより、COPDに至る喫煙以外の危険因子を抽出することを目的とした。

3. 平成15年度の研究の対象及び方法

NICE study1におけるデータベースを使用した(Fukuchi Y, et al. Eur Respir J 24:1849, 2001)。NICE study1は、20都道府県で行われたpopulation-based、cross-sectionalおよびdescriptive designによる大規模疫学調査であり、それぞれの地区における被検者を年齢、性別、都市/郡部居住者の割合が日本の人口構成比を反映するように設定し、電話帳を用いて各地区に居住する世帯から年齢40歳以上の被検者を無作為抽出した調査研究である。被検者には調査への参加の同意を得た後、質問表を用いて呼吸器症状、喫煙歴、既往歴、アレルギー歴、職業歴などの情報が収集され、スパイロメトリを行いJRS COPDガイドラインの基準に従いCOPDの診断がなされた。実際に調査に参加した人数は2,666名であり、調査の結果、40歳以上の男性の8.5%(1996年の人口構成比に当てはめると530万人)がCOPD患者であると推定された。

平成15年度の私どもの研究ではNICE study1のデータベースを用いた調査解析が行われた。NICE study1ではCOPDと診断された非喫煙者は男性24名、女性40名であったが、それぞれの患者と年齢、居住地(大都市、中都市、小都市)、職業歴をマッチさせた非喫煙健常者(男性33名、女性130名)をデータベースから抽出して質問表の項目やスパイログラムについて比較した。

質問表では、1)咳、痰の有無と有症期間、2)息切れの有無と程度(Hugh-Fletcher-Jones分類)、3)喘鳴(ゼイゼイやヒューヒューの有無)、4)鼻炎症状、5)花粉症(鼻アレルギー、結膜炎)、6)過去の呼吸器疾患の有無、7)過去の胸部X線写真異常の有無、8)小児喘息の既往、9)呼吸器系薬の服用の有無、10)過去の職業歴(坑夫・鉱夫、大工、製材業、機械工、採石業、金属工、溶接工、石材業、ビル解体業、綿織工、石綿取り扱い業、羊毛加工業、美容業、化学工場作業員・工員、焼物・揚げ物の料理人、きのこ栽培または加工業、養豚・養鶏その他家畜を飼う仕事、穀物または動物飼料業者)、

11)近親者の喘息、アレルギー性鼻炎、結膜炎の有無が調べられた。スパイロメトリはチェスト社製 チェストグラフ Jr.101を用い、少なくとも3回測定されたうちの最大値が記

載された。得られたデータについての非喫煙 COPD 患者と非喫煙健常者間における統計学的解析には、フィッシャーの直接確率法、T 検定、カイ 2 乗検定が用いられた。

4. 平成 15 年度の研究成果

1) 非喫煙 COPD 患者と非喫煙健常者のスパイロメトリの比較

男性例における非喫煙 COPD 患者(24 名)と非喫煙健常者(40 名)のスパイログラムの平均値(± SD)は、FEV1/FVC 64.5 ± 8.0% vs 78.3 ± 6.3%(p < 0.01)、FEV1 predicted 79.8 ± 20.7% vs 98.4 ± 21.7% (p < 0.01)、FEV1 2.28 ± 0.69 L vs 2.81 ± 0.74 L (p < 0.01)、FVC 3.48 ± 0.88 L vs 3.59 ± 0.94 L (p = 0.6)であった。同様に女性例における非喫煙 COPD 患者(40 名)と非喫煙健常者(130 名)のスパイログラムの平均値(± SD)は、FEV1/FVC 64.2 ± 7.5% vs 79.2 ± 4.9%(p < 0.01)、FEV1 predicted 79.8 ± 17.9% vs 99.1 ± 15.4% (p < 0.01)、FEV1 1.59 ± 0.45 L vs 2.03 ± 0.40 L (p < 0.01)、FVC 2.45 ± 0.56 L vs 2.56 ± 0.48 L (p = 0.2)であった。

2) 非喫煙 COPD 患者と非喫煙健常者の質問表による背景因子の比較

2-A)男性例における比較

男性例の非喫煙 COPD 患者(COPD)と非喫煙健常者(control)の比較において p 値が 0.1 未満であった項目は、1)咳が 2 年以上続く(COPD 12.5% vs control 0%、p = 0.07)、2)胸郭形成術(人工気胸)の既往(COPD 12.5% vs control 0%、p = 0.07)、3)粉塵環境での職歴(COPD 33.3% vs control 12.5%、p = 0.08、COPD では大工 2 名、機械工 1 名、石綿取り扱い業 1 名、機織工 1 名が含まれた)、4)body mass index(BMI)の減少(p = 0.08)であった。一方、p 値が 0.1 以上であった項目は、1)痰の有無(COPD 4.2% vs control 3.0%、p = 1.0)、2)息切れの有無(p = 1.0、ただし息切れのある症例のなかでの比較では COPD 症例でその程度は高度であった p = 0.03)、3)夜間の喘鳴(COPD 16.7% vs control 6.1%、p = 0.4)、4)花粉症(鼻アレルギー、結膜炎)の有無(p = 1.0)、5)過去に呼吸器疾患(喘息 COPD 12.5% vs 3.0%、p = 0.3、慢性気管支炎、肺気腫 p = 1.0、びまん性汎細気管支炎 p = 0.4、副鼻腔炎 p = 0.2、肺結核 p = 0.7)との診断を受けたことがある、6)過去に胸部 X 線写真の異常を指摘されたことがある(p = 1.0)、7)小児喘息の既往、8)呼吸器系薬の使用の有無、9)近親者の喘息(COPD 4.2% vs control 12.1%、p = 0.4)、アレルギー性鼻炎(p = 1.0)、結膜炎(p = 0.6)の有無であった。

2-B)女性例における比較

女性例の非喫煙 COPD 患者(COPD)と非喫煙健常者(control)の比較において p 値が 0.1 未満であった項目は、1)夜間の喘鳴がある(COPD 12.5% vs control 2.3%、p = 0.02)、2)過去に喘息と診断されたことがある(COPD 17.5% vs control 1.5%、p = 0.0006)、3)呼吸器系薬の使用の有無(p = 0.02、気管支拡張薬に限れば p = 0.01)であった。一方、p 値が 0.1 以上であった項目は、1)咳がある(COPD 5.0% vs control 5.4%、p = 1.0)、2)痰(COPD 17.5% vs control 16.2%、p = 1.0) 2)息切れ(p = 0.3)、3)花粉症(鼻アレルギー、結膜

炎)の有無($p = 0.8$)、4)過去に喘息以外の呼吸器疾患(慢性気管支炎・肺気腫 $p = 0.14$ 、びまん性汎細気管支炎、副鼻腔炎 $p = 1.0$ 、肺結核 $p = 1.0$ 、胸郭形成術・人工気胸 $p = 1.0$)との診断を受けたことがある、5)過去に胸部 X 線写真の異常を指摘されたことがある($p = 0.3$)、6)小児喘息の既往(COPD 5.9% vs control 3.7%、 $p = 1.0$)、7)近親者の喘息(COPD 12.5% vs 8.5%、 $p = 0.5$)、アレルギー性鼻炎(COPD 17.5% vs 8.5%、 $p = 0.13$)、結膜炎(COPD 7.5% vs 3.1%、 $p = 0.3$)の有無、8)粉塵環境での職歴、9)BMI($p = 0.3$)であった。

5. 考察

NICE study1 におけるデータベースから抽出した非喫煙 COPD 患者と年齢、居住地(大都市、中都市、小都市)、職業歴(highrisk job)をマッチさせた非喫煙健常者とを比較解析した。その結果、男性では1)長期間続く咳、2)胸郭形成術(人工気胸)の既往、3)粉塵環境での職歴(大工、機械工、石綿取り扱い、機織工)、4)BMI の減少、女性では1)夜間の喘鳴、2)過去に喘息と診断されたことがある、4)呼吸器系薬、特に気管支拡張薬の使用頻度が高い、が非喫煙 COPD 患者の特徴として抽出された。

以上の結果から、男性と女性の非喫煙者では COPD の発症要因が異なる可能性が示唆された。すなわち男性では環境要因として粉塵職歴の関与が考えられた。一方、女性では環境要因として抽出されたものはなかったが、夜間の喘鳴や過去に喘息と診断された症例が高頻度にみられた。この理由として、NICE study1 の登録においては喘息発作の既往が明らかでない症例は COPD から除外されたが、軽度の喘息患者が COPD 症例に含められた可能性が考えられる。しかし、男性ではこのような喘鳴との関連性が明らかではなかったことから、女性における特徴として喘息と COPD の病因や症状に共通点が存在する可能性も考えられた。一方、男性では女性とは異なり、長期間続く咳や体重減少が高頻度にみられた。この点からも非喫煙者にみられる COPD では男性と女性ではその病因や症状が異なる可能性が示された。なお今回の検討では、統計解析の必要上、COPD 患者と健常者の居住地(大都市、中都市、小都市)をマッチさせたために、大気汚染の影響については十分な結果を得ることはできなかった。

6. 次年度以降の計画

平成 16 年度においては東京女子医大成人医学センターの検診受診者のデータベースから、非喫煙 COPD 患者と非喫煙健常者を抽出し、居住地、問診内容、呼吸機能検査、胸部 CT を含めた比較調査を行う。特に居住地については地図を用いて幹線道路から自宅までの直線距離を測定し、大気汚染との関連を意識した調査・解析を行う。さらに胸部 CT 画像から低吸収域(LAA)の程度を判定して COPD の診断をより確実なものにするとともに、問診や呼吸機能検査値と LAA との関係についても検討する。平成 15 年度の研究結果と併せ、COPD に関わる喫煙以外の環境因子を抽出することを目的とする。

7. 社会的貢献

国内外も含め、喫煙以外の COPD に関わる発症因子・環境因子についてほとんど研究が行われていない。しかし、わが国においては非喫煙者の 4.7%が COPD 患者であると推定され、その要因を明らかにし予防対策を講じることは重要な課題である。平成 15 年度の研究では、全国的な大規模疫学調査(NICE study1)のデータベースを解析した結果、非喫煙 COPD の発症に関連する因子の一部が明らかにされた。そこで次年度に研究を進め、最終的な目標として喫煙以外の COPD に関連した危険要因とその回避あるいは除去の可能性、対策についての具体策を提言することを含め社会的貢献を果たしたい。