

- 2 気管支ぜん息の発症・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

【 研究課題全体の目的、構成 】

これまでに研究により、気管支ぜん息等の発症リスクとしての環境要因の寄与が明らかになってきたが、それらの諸因子がどの程度関与しているかは未だ明らかではない。

そこで、気管支ぜん息の発症や増悪に関与する可能性のある因子として、大気中浮遊微粒子（特にディーゼルエンジン由来微粒子、以下 DEP）、各種環境ホルモン、ウイルスを取り上げ、これらの諸因子がぜん息の発症や増悪に及ぼす影響について、invitro、動物実験、可能な場合はぜん息症例の検体を用いて、検討する。また、慢性閉塞性肺疾患については、その自然歴が数十年と長期であることから、今回は主に非喫煙の慢性閉塞性肺疾患患者の背景を調査することにより、喫煙以外の環境要因の意義について検討する。これらの検討は、環境因子に対する個体差を決定する因子の解明にもつながると予想される。

具体的には、3つの小課題からなる研究グループを構成して、

【 小課題 1 】 気管支ぜん息の発症、増悪に及ぼす大気中浮遊微粒子、特にディーゼルエンジン由来微粒子の影響に関する調査研究

【 小課題 2 】 小児アレルギー疾患発症増加要因に関する調査研究

【 小課題 3 】 気管支ぜん息の発症、増悪に及ぼすウイルス感染の影響とその機序解明：発症、増悪の予防対策確立へ向けての調査研究

【 小課題 4 】 慢性閉塞性肺疾患の発症における喫煙以外の環境因子の役割に関する調査研究

をそれぞれ行うこととした。

【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 16 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、昨年度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用いる。昨年度の喘息の増悪への影響の評価をさらに詳細に検討する。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、前年度のプロトコールに加え、DEP 曝露開始後も週 1 回のアレルギーチャレンジを継続する群についても検討する。さらに、系統差および喘息発症への影響を検討するための実験系の作成をおこなう。

3．平成 16 年度の研究の対象及び方法

純系マウス (BALB/c、C57BL/6) を DEP 曝露チャンバー (結核研究所内) で環境中でもあり得る濃度 ($100 \mu\text{g}/\text{m}^3$) 反復曝露を行った。動物の DEP 曝露にあたっては、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 日の曝露時間を 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 に行なって感作したのち、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、1 群には清浄空気のみ吸入させた。さらに、次の 1 群では、週 1 回の OVA チャレンジを継続した。最後の 1 群はそのコントロールとした。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、無麻酔下で体プレシ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．これまでに得られた研究成果

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。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。長期にわたり OVA チャレンジを継続した群では清浄気、DEP 群とも基底膜下の肥厚が認められた。

肺組織のサイトカインの遺伝子発現では 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、ケモカイン、TARC、MDC も明らかに発現が増強した。

気道過敏性への影響では、DE 曝露 2 4 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。

invitro 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．平成16年度の研究成果

1) 喘息モデル作成後 DE 曝露を継続した場合の影響：

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3ヶ月まで吸入を持続した。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、invitro 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。

2) 喘息モデル作成後 OVA のチャレンジを1週間に1回行いつつ DE 曝露を継続した場合の影響：

1) の実験に比較して、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後も持続する所見が得られたが、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も1)の群よりも遷延持続化がみられた。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。さらに、3ヵ月後では基底膜下の線維性肥厚が確認された。そして、DE 曝露群ではやや対象群より高度な可能性が示唆された。

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。OVA 反復継続する喘息モデルにおいて、DE吸入によりむしろ気道過敏性が低下する傾向が観察され、その統計学的解析について現在検討中である。

3) マウスの系統差：

C57Black6の方がDE 単独吸入による気道過敏性の誘導は明らかであった。一方、OVA にとる気道過敏性亢進は従来の報告どおり、Balb/c マウスのほうが顕著であった。OVA による喘息モデルにおいてDE 曝露の影響をみると、C57B6の方が大きい傾向が認められた。

6. 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で詳細に検討した。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。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特にDE吸入曝露の急性期に示唆された。しかし、OVA チャレンジ反復継続群では、むしろ過敏性が低下する傾向が観察された。今後、さらに条件や検討数を増やして検討する予定である。

7. 今後の計画

1) ディーゼルエンジン微粒子の低濃度(100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)の曝露を3, 6ヶ月まで継続し、長期曝露によるぜん息発症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。

8. 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、より実際に近い暴露条件において、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即ちそ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 16 年度の研究目的

近年、アレルギー性疾患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 Th2 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。一方、妊娠に関連した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おり、女性で SLE などの膠原病の頻度が高いことから、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、胎児期から乳児期は免疫系の発達においても重要な時期であり、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環境が生じた場合、食物抗原や吸入性抗原に対して 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。昨年度の研究において、我々はステロイドホルモン受容体への結合が示唆されている内分泌攪乱物質のうち、ビスフェノール A とノニルフェノールが *in vitro* においてヒトナイーブ T 細胞の分化と単球由来樹状細胞の機能に影響を与えることを明らかにした。そこで、本年度はビスフェノール A とノニルフェノールが *in vivo* で胎児期および、母乳を介して母体経由で暴露されることで、次世代の子供のヘルパー T 細胞の分化にどのような影響を及ぼすかを検討した。

3. 平成 16 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、日本人の臍帯に検出され胎児への汚染の可能性が指摘されており、内分泌攪乱作用が示唆されている化学物質の中から、エストロゲンレセプターへの結合性が示唆されているものを選択した。その中で昨年度 *in vitro* の実験系でヒトナイーブ T 細胞の分化や樹状細胞の機能に影響を与える結果が得られた、ビスフェノール A とノニルフェノールを本年度の研究対象化学物質とした。

化学物質への暴露が *in vivo* で抗原特異的ナイーブ T 細胞の分化能にどのような影響を与えるかを解析するため、抗原特異的ナイーブ T 細胞が多く存在し、抗原特異的反応性を検出することができるようにオボアルブミン (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) を用いた。ヘテロのトランスジェニック雄マウスと野生型の雌マウスを

交配し、交配後から出産後授乳期間が終了する生後 21 日まで、母親マウスにビスフェノール A (1 ppm) またはノニルフェノール (0.1 ppm) を混合した飼料を与えた。生後 21 日目に血清を採取し、血清中の総 IgE を ELISA により測定した。また、同時に採集した脾臓から赤血球除去脾細胞を調整し、脾細胞中の OVA-TCR 発現細胞、CD4、CD8 陽性細胞の割合をフローサイトメーターで測定した。ヘテロの TCR-tg 仔マウスから分離した脾細胞は *in vitro* で OVA で刺激し、抗原特異的細胞増殖と抗原特異的サイトカイン産生をそれぞれサイミジン取り込み能と ELISA により測定した。

母親マウスへの経口投与により子マウスが暴露されるビスフェノール A 濃度をヒト胎児、新生児が暴露されている濃度と比較するために、母親と子マウスの血清中ビスフェノール A 濃度を日本エンバイロケミカル社製のビスフェノール A ELISA キット (最小検出感度 0.2 pg/ml) により測定した。また、ヒト臍帯血血清および、母乳中のビスフェノール A 濃度を同じキットにより測定した。

4. これまでに得られた研究成果

平成 16 年度の研究では化学物質がヒトのナイーブ T 細胞分化と樹状細胞の機能の及ぼす影響を *in vitro* で解析する方法を確立し、以下の結果を得た。

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

ビスフェノール A、ノニルフェノール、オクチルフェノール、DOP はナイーブ T 細胞の活性化と増殖には影響をしないが、IFN- γ の産生能を濃度依存的に抑制し、IL-13 の産生能の獲得に対しては、有意の抑制効果を示さなかった。また、ビスフェノール A においては 1 μ M の濃度でむしろ、IL-13 産生能の増強効果が認められた。したがって、検討したこれらの化学物質がヒトナイーブ T 細胞の活性化段階で作用した場合、Th2 細胞への分化を抑制することなく Th1 細胞への分化を濃度依存的に抑制すると考えられ、なかでも高濃度のビスフェノール A は Th2 細胞への分化を促進する可能性が示唆された。このことからナイーブ T 細胞が抗原暴露を受ける場合に今回検討した化学物質が作用すると、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。

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ビスフェノール A、ノニルフェノール、オクチルフェノール、DOP の添加は、誘導されてくる樹状細胞の生細胞数に影響しなかったが、IL-10 産生能を抑制した。また、樹状細胞上の CD86 発現はノニルフェノールにより増強された。IL-10 は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関与するとされることから、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。ノニルフェノールによる未熟樹状細胞の CD86 発現増強は、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た。

以上の結果から、エストロゲン受容体への結合性が示唆されているビスフェノール A やノニ

ルフェノールはヒトナイーブT細胞に直接作用することや、抗原提示細胞である樹状細胞機能への作用を介して間接的にT細胞免疫応答に影響をあたえることが考えられた。また、今回用いた *in vitro* でのヒトナイーブT細胞の活性化と樹状細胞の分化誘導培養系は化学物質のヒト細胞への影響をスクリーニングするために有用と考えられた。

5．平成16年度の研究成果

1) 化学物質の仔マウスの出生に与える影響

1 ppm のビスフェノールAまたは0.1 ppm のノニルフェノールを混餌投与した母マウスから生まれてきた仔マウスの雄雌比率と、化学物質を投与しなかった母マウスから生まれてきた仔マウスの雄雌の比率との間には差が認められず、トランスジェニックマウスの出生自体に対してこれらの化学物質は影響しないと考えられた。しかし、母マウスから経胎盤、経母乳的に化学物質に暴露されたと考えられる仔マウスの授乳期終了時点生後21日目の体重を比較すると、化学物質非暴露群に比べて暴露群では体重が少ない傾向が認められ、体重増加に影響することが示唆された。

2) 化学物質の仔マウス脾細胞組成に与える影響

仔マウスの脾細胞中T細胞サブセットは、OVA 特異的 TCR 発現トランスジェニック仔マウスにおいては、ビスフェノールA投与群の雄仔マウスとノニルフェノール投与群の雄および雌仔マウスではそれぞれ、コントロールの化学物質非投与群に比べ、CD4 陽性 T 細胞およびOVA-TCR 発現 T 細胞の割合が有意に減少していた。

野生型仔マウスの脾細胞におけるCD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞の割合を検討すると、野生型雄仔マウスではビスフェノールA、ノニルフェノール投与によりCD4 陽性 T 細胞およびCD8 陽性 T 細胞の割合がコントロール群に比べ減少していた。また、CD4 陽性 T 細胞に比べCD8 陽性 T の減少程度が大きいため脾細胞におけるCD4/CD8 比はビスフェノールAおよび、ノニルフェノール投与群において増加が認められた。一方、雌仔マウスでは有意の減少傾向を認めることは出来なかった。

3) 化学物質が仔マウスの抗原特異的サイトカイン産生能に与える影響

OVA 特異的 TCR を発現するトランスジェニック仔マウスから脾細胞を分離し、*in vitro* でOVAによる刺激を行い、OVA 特異的細胞増殖とサイトカイン産生能を測定した。その結果、脾細胞の抗原特異的細胞増殖は雄雌ともにノニルフェノール投与群でコントロール群に比較して減弱していた。一方、ビスフェノールA投与群ではコントロール群と変わらない細胞増殖能を示した。

トランスジェニック仔マウスの脾細胞の抗原特異的IL-4産生は、ビスフェノールA投与群の雄マウスにおいて、コントロール群の雄マウスに比較して高値を示した。しかし、雌マウスにおいては有意の傾向を認めなかった。一方、ノニルフェノール投与群ではコントロール

群と比較して雄マウスで IL-4 産生の低下が認められた。また、IL-4 以外の Th2 サイトカインである IL-13 の産生に関しても、ビスフェノール A 投与群の雄マウスにおいて、コントロール群の雄マウスに比較して抗原と特異的 IL-13 産生は高値を示したが、雌マウスにおいては有意の傾向を認めなかった。

一方、Th1 サイトカインである IFN- γ の産生に関しては、ビスフェノール A 投与群およびノニルフェノール群ともにコントロール群に比べ低値を示した。しかし、雌マウスでは、コントロール群と化学物質投与群とでは有意の差を認めなかった。

4) 化学物質が仔マウスの血清 IgE 値に与える影響

母マウスにビスフェノール A またはノニルフェノールを混餌投与した場合の生後 21 日目のトランスジェニック仔マウスの血清中 IgE 濃度を測定するとノニルフェノール投与群の雌マウスでコントロール群に比べ有意に高値を示した。雄マウスにおいても血清ノニルフェノール投与群では高値を示す傾向を示したが、コントロール群の雄マウスの血清 IgE 値のばらつきが大きく、統計的に有意とはならなかった。

5) 化学物質が仔マウスの CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞の出現に与える影響

生後 21 日目のトランスジェニック仔マウスの脾臓の CD4 陽性 CD25 陽性細胞の割合と、CD4 陽性細胞中における CD25 陽性細胞の割合をフローサイトメーターにより測定した結果、ビスフェノール A 投与群、ノニルフェノール投与群のどちらもコントロール群と比較して、CD4 陽性 CD25 陽性細胞の割合の減少が認められた。

6) ヒト臍帯血およびマウス血液中ビスフェノール A 濃度の比較

母体経由での暴露実験に用いた化学物質の投与量により今回、仔マウスがどの程度化学物質に実際に暴露されたか、またその暴露レベルがヒト胎児、新生児が暴露されているレベルとどの程度の差があるのかを確かめるためヒト臍帯血血清中と化学物質を投与した母マウスと仔マウスの血清中の化学物質の濃度測定を行った。現在、利用可能な測定法でマウスの微量の血液中化学物質濃度する方法としては、ビスフェノール A の ELISA キットしか入手出来ない状況であるため、ビスフェノール A のみを測定した。

ビスフェノール A の ELISA キットで測定した結果、仔マウスの生後 21 日目の時点で母マウスの血清中ビスフェノール A 濃度は、 1.41 ± 0.66 ng/ml (0.70 ~ 2.33 ng/ml) であった。一方、同時に採血した仔マウスの血清中ビスフェノール A 濃度は、 3.971 ± 2.40 ng/ml (0 ~ 6.74 ng/ml) であり、母親マウスより仔マウスの血清中ビスフェノール A 濃度は高値を示す傾向が認められた。

ヒト生体試料中のビスフェノール A 濃度をマウスの血清中の濃度と比較するために同一の ELISA キットを用いて測定した。その結果、臍帯血の血清では 102 検体中 48 検体が測定感度以下であり、最高値 19.27 ng/ml、中央値は 0.46 ng/ml であった。また、母乳中のビスフェ

ノールA濃度は72検体中15検体が測定感度以下であり、最高値 17.46 ng/ml、中央値は 2.10 ng/ml と臍帯血血清中濃度より高値をとる傾向が認められた。

6．考察

化学物質の母体への暴露による次世代免疫系への影響を検討した結果、ビスフェノールAとノニルフェノールへの経胎盤および経母乳暴露により主に雄仔マウスにおいてT細胞免疫系に影響が観察された。性差が生じた原因が、エストロゲンレセプターを介した化学物質の作用によるものかは今後明らかにしていく必要がある。母体経由でのビスフェノールAへの暴露により、仔マウスの脾細胞の抗原特異的サイトカイン産生能はIL-4およびIL-13産生が増強しIFN- γ が抑制されるようなTh2にシフトしたサイトカイン産生パターンを示した。妊娠中、授乳中を通じて母マウスにはOVAが投与されていないことから、このサイトカイン産生パターンはナイーブT細胞の抗原特異的サイトカイン産生能を反映したものと考えられ、ビスフェノールAの影響下で分化したナイーブT細胞にはTh2細胞側にシフトした形でのサイトカイン産生のプライミングが生じていると考えられる。

免疫を行っていない状態で検出される血清総IgE値を規定する要素は不明であるが、アトピー素因を持つ児ではアレルギー性疾患を発症する前から、すでに血中IgEが高値を示すことが知られている。ノニルフェノールへの経母体暴露では雌仔マウスの血清IgE値が高値を示したことから、IgEを産生しやすい何らかの免疫学的異常がノニルフェノールへの暴露により生じている可能性が考えられる。

今回の実験では、野生型仔マウスにおいてビスフェノールAまたはノニルフェノールへの母体経由での暴露により、CD8陽性T細胞の割合が減少し、ヘテロOVA-TCRトランスジェニックマウスではCD4陽性T細胞中に占めるCD4陽性CD25陽性T細胞の割合が減少することが観察された。細胞構成の点からは、CD4陽性T細胞の機能に対し抑制的制御機能を担う細胞集団が減少していると考えられ、T細胞免疫応答の制御機構がこれらの化学物質により障害を受けている可能性が考えられる。

7．今後の計画

本研究で解析した仔マウスの免疫機能は、抗原による免疫を行う前のナイーブな状況での免疫応答性を見たものといえる。実際のアレルギー性疾患では食物抗原や吸入抗原への反復暴露により抗原感作が生じ、抗原特異的IgE産生と抗原特異的Th2細胞が誘導されていると考えられる。アレルギー性疾患の発症モデルを考える場合、どのような抗原感作の方法が、実際の患者でみられる免疫応答を反映したものとなるかは不明であるため、アレルギー性疾患発症の危険因子の解析という観点からは、化学物質への暴露下あるいは暴露後の抗原感作の条件をいろいろと変えて、抗原感作用成立への影響を検討していく必要があると考えられる。

アレルギーマーチでは食物アレルギー症状が早期から認められること。食物アレルギーでは経口免疫寛容の成立の異常が関与していることが予測されること。本年度の研究でT細胞

の免疫応答の抑制機構の異常が示唆されることから、次年度では経口免疫寛容の成立に与える母体経由での化学物質への暴露の影響を検討解析する。

8．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、胎児期から乳児期にかけては免疫系の発達においても重要な時期であり、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を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減らすことで、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、昨年度の本研究で確立した *in vitro* の解析系に加え、*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することが期待される。

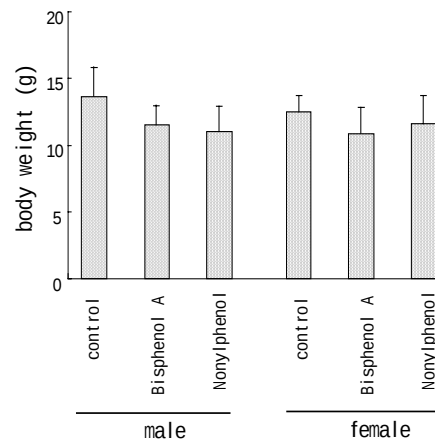


図1 化学物質への経母体暴露が子マウスの体重に与える影響
Bisphenol A とNonylphenolを妊娠・授乳期間中母マウスに混餌投与し、生後21日目の子マウスの体重を測定。

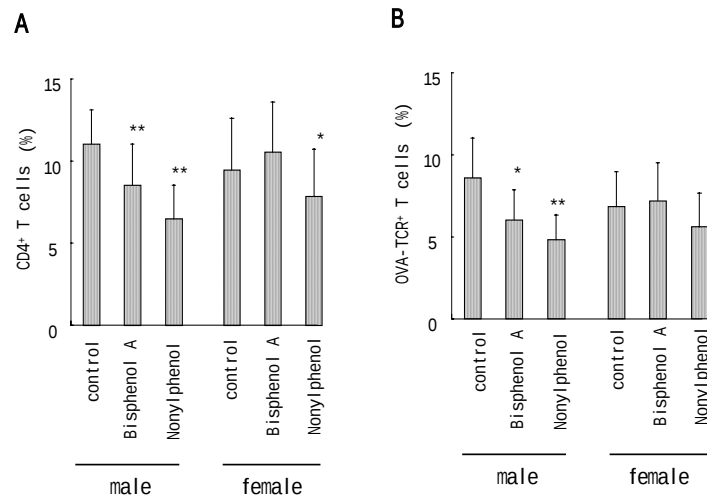


図2 トランスジェニック子マウス脾細胞組成に与える化学物質の影響
Bisphenol A とNonylphenolを妊娠・授乳期間中母マウスに混餌投与し、生後21日目のトランスジェニック子マウスの脾細胞中のCD4陽性T細胞(A)、OVA特異的TCR陽性T細胞(B)の割合をフローサイトメーターにより測定。

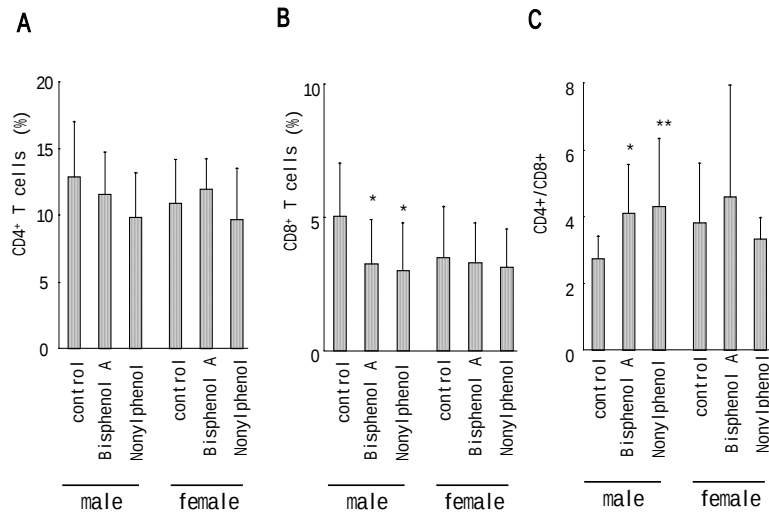


図3 仔マウス脾細胞組成にあたる化学物質の影響
Bisphenol A とNonylphenolを妊娠・授乳期間中母マウスに混餌投与し、生後21日目の野生型仔マウスの脾細胞中のCD4陽性T細胞(A)、CD8陽性T細胞(B)割合をフローサイトメーターにより測定し、CD4/CD8比 (C)を算出。

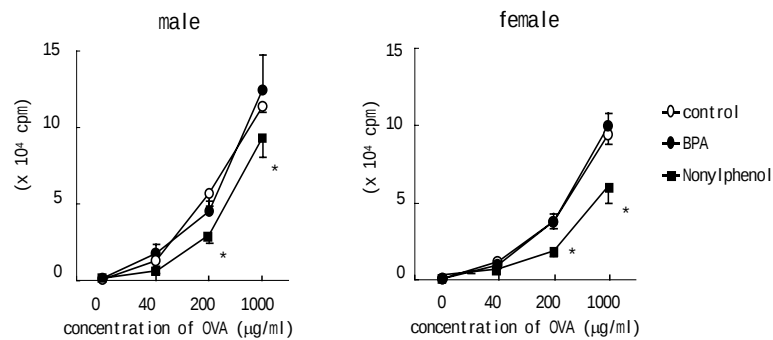


図4 仔マウス脾細胞の抗原特異的細胞増殖に与える化学物質の影響
Bisphenol A とNonylphenolを妊娠・授乳期間中母マウスに混餌投与し、トランスジェニック仔マウス脾細胞の抗原特異的細胞増殖を測定。

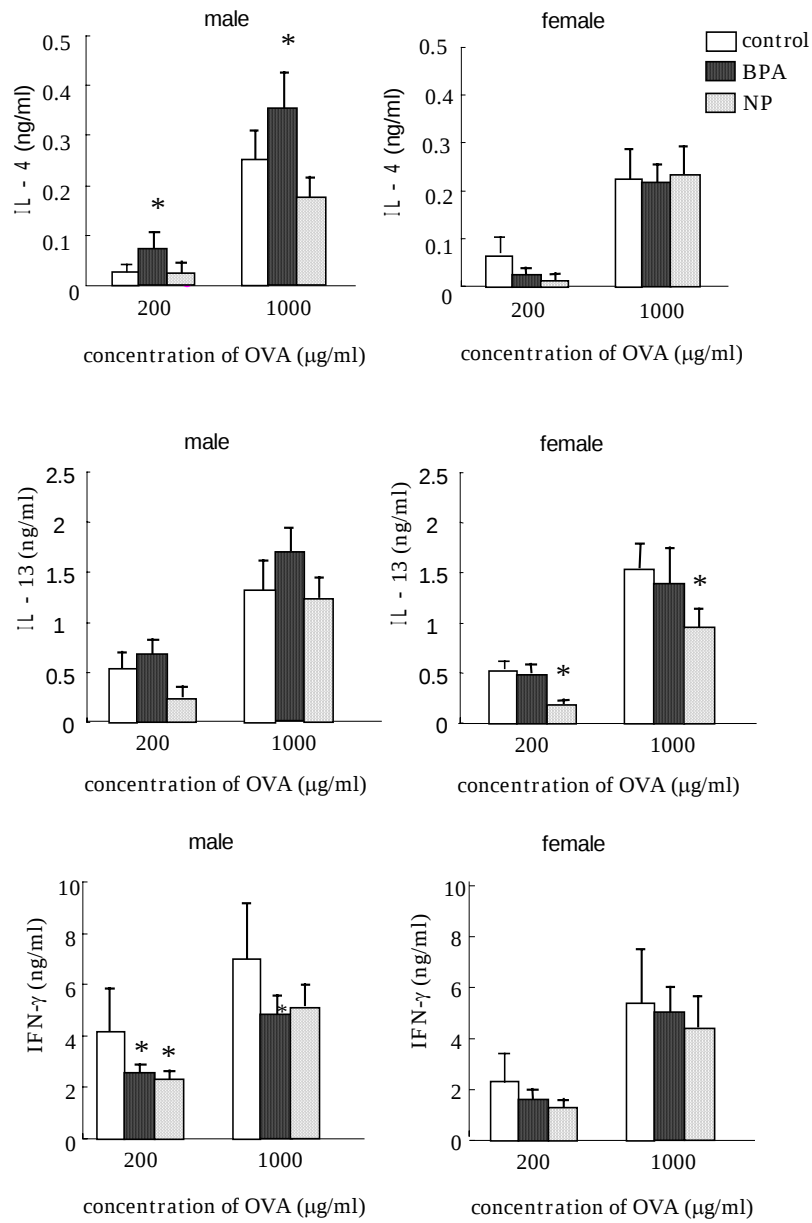


図5 仔マウス脾細胞の抗原特異的サイトカイン産生に与える化学物質の影響

Bisphenol A とNonylphenolを妊娠・授乳期間中母マウスに混餌投与し、トランスジェニック仔マウス脾細胞の抗原特異的 IL-4 (A)、IL-13 (B)、IFN-γ (C)産生を測定。

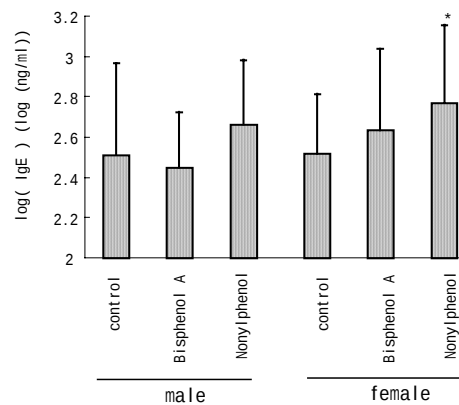


図 6 化学物質が仔マウスの血清IgE値に与える影響
Bisphenol A とNonylphenolを妊娠・授乳期間中母マウスに混餌投与し、
生後21日目のトランスジェニック仔マウスの血清中総IgE値を測定。

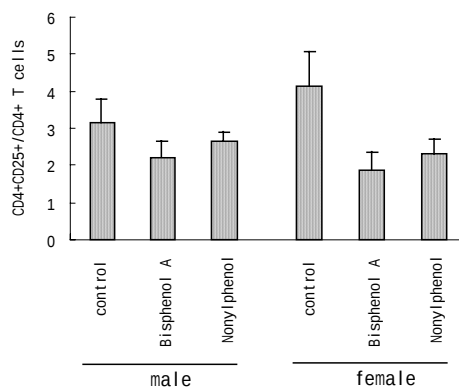


図 7 化学物質が仔マウスのCD4陽性CD25陽性T細胞の出現に与える影響
Bisphenol A とNonylphenolを妊娠・授乳期間中母マウスに混餌投与し、
生後21日目のトランスジェニック仔マウスの脾細胞のCD4陽性細胞中CD25
陽性T細胞の割合をフローサイトメーターにより測定。

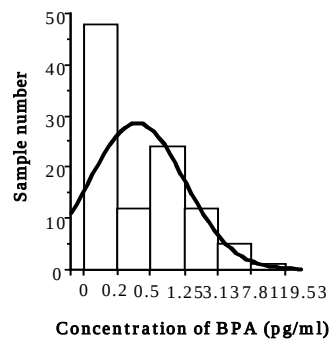
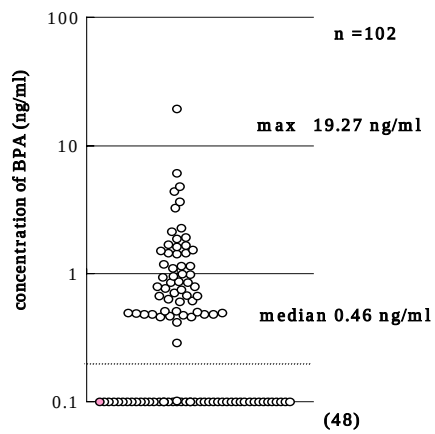


图 8 脐带血清中Bisphenol A浓度

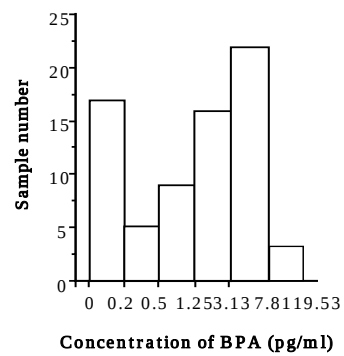
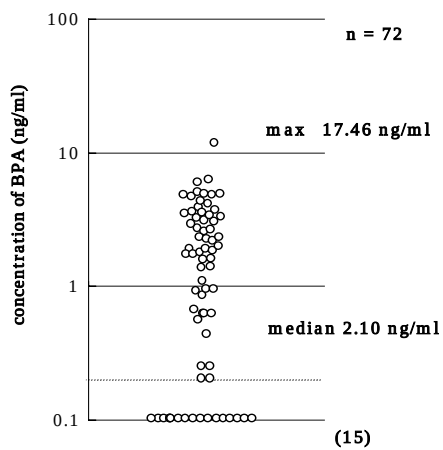


图 9 母乳中Bisphenol A浓度

【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)

ウイルス感染に関する研究グループ (リーダー : ○足立満)

- | | |
|-----------------|--------------------|
| 1. 昭和大学第一内科 | 足立満 國分二三男 松倉聡 川口未央 |
| 2. 長崎大学第二内科 | 河野茂 松瀬厚人 |
| 3. 群馬県立小児医療センター | 加藤政彦 |
| 4. 東北大学老年呼吸器内科 | 山谷睦雄 |
| 5. 九州大学胸部疾患研究施設 | 井上博雅 |

2. 研究要旨

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発症、増悪因子として重要である。気道感染の原因ウイルスとしてはライノウイルス、RS ウイルス、インフルエンザなどが重要とされている。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を認めている。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関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関与しウイルス感染時の喘息悪化、ウイルス感染の遷延と関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関与しこれらによる気道過敏性亢進が示唆されている。ウイルス感染と喘息増悪に関しては以上のような報告がなされているが未だ不明な点も多い。

このような背景より、気管支喘息発症、増悪リスクとしての環境要因の中でも最も重要な因子の一つと考えられるウイルス感染の詳細について検討することは極めて重要と考えられる。さらにその予防、治療法を考える上でもその詳細な解明が必要と考えられる。

本研究班では基礎ならびに臨床的検討を行い、その結果より病態への関与の詳細ならびに治療への応用を考える。

3. 研究対象、方法、研究成果ならびに考察

1) dsRNA 刺激による気道上皮細胞上の新規 B7 ファミリー分子発現誘導

研究対象および方法

主要組織適合抗原複合体 (MHC) クラス Ⅱ 分子と抗原の複合体が T 細胞上に発現している抗原特異的 T 細胞受容体 (TCR) と反応して生じる刺激だけではナイーブ CD4⁺ T 細胞を十分に活性化することはできず、協調的に作用し合う機能分子群が両者の細胞膜上に存在する。これら

は共刺激分子(costimulatory molecules)とよばれる。

気道のウイルス感染は、気管支喘息や COPD の増悪因子であり、その免疫制御の解明が重要である。種々の呼吸器ウイルスは気道上皮を標的細胞とするため、培養ヒト気道上皮細胞株 (BEAS-2B、16HBE) ヒト肺胞上皮細胞株 (A549) を研究対象とし、ウイルス関連分子である dsRNA の刺激における共刺激分子発現の検討を行った。方法としては、上記の各細胞を DMEM/F12+10%FCS+P/S を用いて培養し、細胞表面において共刺激分子である各種 B7 family 分子 (B7-1、B7-2、B7-H1、B7-DC) の発現を、蛍光標識抗体を用いて標識し、フローサイトメトリー法で測定した。また、上皮細胞を dsRNA アナログである polyIC で刺激し、B7-H1、B7-DC の発現に対する影響を検討した。さらに B7-H1、B7-DC の発現に対する Dexamethasone の影響を、無刺激条件下、および polyIC 刺激下で検討した。polyIC 刺激時、抗 IFN- γ 抗体による阻害効果を検討した。

研究成果

各細胞において、B7-H1、B7-DCは無刺激の状態で構成的に発現を認め、いずれもB7-H1の発現の方が著明であったが、B7-1 およびB7-2の発現は認めなかった。さらにBEAS-2B、及び 16HBE においてはpolyIC刺激で著明に発現が増強した。A549 では発現に明らかな変化は認めなかった。BEAS-2B上における無刺激下でのB7-H1、B7-DCの発現は、Dexamethasone で抑制を受けず、dsRNA 刺激後の発現は、B7-DCの発現のみ 10^{-6} M という高濃度のDexamethasoneで抑制されるにとどまった。サイトカイン刺激によるBEAS-2BのEotaxin、Rantesの産生はDexamethasone 10^{-8} ~ 10^{-7} Mで有意に抑制されたことから、B7-H1、B7-DCの発現は比較的ステロイド抵抗性であると考えられた。polyIC 刺激によりBEAS-2BはIFN- γ を産生したが、抗IFN- γ 抗体との共培養で、B7-H1、B7-DC両分子の発現増強を阻害されなかったことから、両分子の発現増強はIFN- γ 産生は関与しないと考えた。

考察

喘息の増悪に気道ウイルス感染は深く関わっており、託児施設や職場、老健施設などで周囲に波及するという側面も有する。ウイルス感染が喘息増悪を引き起こす機序を解明することは重要である。本研究でウイルス関連分子である dsRNA が気道上皮の B7-H1/B7-DC 発現を増強することを示した。これらの分子は T リンパ球に発現する PD-1 と結合し、リンパ球活性化を抑制することが知られている。ウイルス感染細胞は CTL を代表とする免疫系によって排除されるが、B7-H1/B7-DC-PD-1 系は CTL を抑制することで気道上皮におけるウイルス感染を遷延させている可能性がある。また dsRNA による B7-H1/B7-DC の発現増強はステロイド抵抗性を示すため、吸入ステロイドではウイルス感染の遷延を防止できない可能性がある。ウイルスによる喘息増悪の予防として、B7-H1/B7-DC-PD-1 系の人為的制御は検討に値する。

2) ウイルス感染による喘息増悪の機序に関する検討

目的

我々は、ウイルスの増幅過程において産生される二本鎖RNA (dsRNA) が、気道上皮細胞におけるサイトカイン、ケモカインや接着分子などの発現を増強し、これらの因子が喘息増悪

に関与する可能性があることを報告してきた。さらに、その機序につき検討を加えた。

方法ならびに結果

気道上皮細胞株BEAS-2BにおけるToll-like receptor (TLR)3の発現につき、RT-PCRおよびフローサイトメトリーにて検討した。また、細胞におけるTLR3の発現を抑制する目的にて、siRNAをBEAS-2Bに移入し、dsRNA50 μ g/mlにて刺激し24時間後にRNAを回収、標的遺伝子の発現をReal-Time PCRにて検討した。その結果、BEAS-2Bは恒常的にTLR3のmRNAを発現するが、細胞表面の発現は微量であると思われた。DsRNAは無処置のBEAS-2B細胞におけるIL-1 β , IL-6, GM-CSFなどのサイトカインやIP-10, IL-8, ENA-78, GRO- α , MIP-1 α , RANTES, LARCなどのケモカインおよび、ICAM-1, iNOSなどのmRNA発現を著明に増強させたが、siRNAによってTLR3の発現が抑制された細胞では、dsRNAによるこれらの発現は著明に抑制された。その一方で、細胞表面に発現するTLR3に対する抗体には、dsRNAのシグナルを抑制する作用は認められなかった。

考察

気道上皮細胞はおそらく細胞質内にTLR3を発現し、dsRNAはTLR3を介して様々なサイトカインやケモカインの発現を誘導し、気道炎症の構築に関与しているものと考えられた。

3) ウイルス感染の影響に関する検討 —動物モデル—

ウイルス感染が喘息のアレルギー性気道炎症に与える影響の多様性を動物モデルを用いて明らかにするべく、ウイルス感染とアレルギー感作の双方において重要な役割を演ずる気道の抗原提示細胞である樹状細胞に着目した。はじめにウイルスの直接感染が樹状細胞によるアレルギー反応の誘導に与える影響を検討する目的で、雌性BALB/cマウス骨髄よりGM-CSF刺激によってin vitroで誘導した樹状細胞にダニアレルゲンパルスとrespiratory syncytial virus (RSV)感染を行った後、この樹状細胞を別のナイーブBALB/cマウスの気道へ移入し、in vivoでアレルギー性気道炎症を惹起させた。引き続きRSV感染時に気道に増加するleukotrienes (LT)が間接的に樹状細胞に与える影響を検討する目的で、ダニアレルゲンパルスマウス骨髄由来樹状細胞にLTをパルスし、同様に別のナイーブマウスの気道へ移入した。

研究成果

RSVが直接ダニアレルゲンパルスマウス骨髄由来樹状細胞に感染した場合、樹状細胞の表面マーカーおよび産生するサイトカインプロファイルはダニアレルゲンパルス時のTh2誘導能を抑制する方向に作用した。樹状細胞のこれらの機能変化を反映して、RSVが直接感染した樹状細胞を移入したマウスでは、組織学的にアレルギー性気道炎症が抑制され、縦隔リンパ節におけるTh2優位のサイトカインプロファイルも抑制された。一方、ダニアレルゲンパルス時にLTも同時にパルスされた樹状細胞ではダニアレルゲン単独パルス時のTh2誘導能がさらに増強され、ナイーブマウス気道への移入により、ダニアレルゲン単独パルス樹状細胞よりもさらに強いアレルギー性気道炎症を誘導し、縦隔リンパ節におけるTh2優位のサイトカイン反応も増強された。

考察

呼吸器ウイルス感染がアレルギー性気道炎症に与える影響の多様性を、気道の主要な抗原提示細胞である樹状細胞への2つの経路から検討した。RSVが直接樹状細胞に感染した場合、樹状細胞によるアレルギー性気道炎症の発症は抑制される。一方、RSVが本来の宿主細胞である気道の上皮細胞に感染した場合に産生されるLTが、樹状細胞によるアレルゲン認識の場に共存すると、樹状細胞によるアレルギー性気道炎症の発症は増強される。生体内において、呼吸器ウイルス感染が樹状細胞に与える影響が、前者の直性効果優位になるのか、後者の間接効果優位になるのかは、ウイルスの量、アレルゲン暴露とウイルス感染のタイミング、LT産生量を規定する遺伝的要因など多くの要素が関与すると考えられ、ウイルス感染のアレルギー発症への効果の多様性の一端が示された。

4) ウイルス感染による気管支喘息の病態解明と早期予防に関する研究

気管支喘息(喘息)患者の数は世界中で増加の一途をたどっている。本邦での喘息患者数は、約200-300万人(全人口の約2-3%)であり、喘息での死亡は、毎年約4000人と推定されている。また、日本の重症喘息の有病率は米国の約1/5に対して死亡率は約1.5倍であり、喘息死亡率と重症喘息の比率は米国に比べ約7倍と極めて大きく、依然として重要な問題である。一方、喘息発作の原因の中で最も治療に難渋するのが感染によるものである。小児の喘息発作の原因ウイルスとしては、RS(respiratory syncytial)ウイルスやライノウイルスなどが重要であり、これらのウイルス感染により喘息を発症したり、症状が増悪し、頻回に入院加療を必要とすることも少なくない。一方、喘息は、好酸球、リンパ球、肥満細胞などの炎症性細胞を主体とした慢性の気道炎症性疾患と考えられている。特に、好酸球から放出される組織傷害性蛋白および活性酸素は気道炎症を惹起し、喘息などのアレルギー性疾患の病因、病態に重要である。したがって、感染喘息により増悪する気道炎症を抑制することが重要である。そこで今年度は、各シーズンにおける感染による喘息発作の原因ウイルスを同定し、好酸球の活性化およびサイトカイン産生を調べる。

研究対象及び方法

外来および入院喘息患者から、本人または両親から口頭および書面にてインフォームドコンセントを得た後、鼻咽頭よりぬぐい液を、また血液を採取する(約1ml)。春から冬の4シーズンの群に分け、ぬぐい液中のウイルス同定をPCR法またはウイルス抗原検索キットにて施行する。また血液中の好酸球数の測定、血清中の好酸球由来組織傷害性蛋白の一つであるEosinophil cationic protein (ECP)および血清中の17種類のサイトカイン(IL-1b, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 17, IFN-g, TNF-a, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1b)を測定した。なお、同定されたウイルスの種類によって、発作増悪および好酸球活性化の程度が異なることを検討する。

今年度は、平成15年10月より平成16年8月までに当センター外来受診および入院したのべ145名(男児90名、女児55名、平均年齢3.4歳)の喘息児のうち各検体を採取できた症例について解析を行った。

研究成果

当センター外来受診および入院したのべ 145 名（男児 90 名、女児 55 名）の喘息児のうち発作時がのべ 66 名、発作なしがのべ 79 名であった。

1) 発作時 66 名のうち、ウイルス学的検討を施行し得た 56 名の検討では、ライノウイルスが、18 名、RS ウイルスが 11 名で、各々、比較的通年性に検出された。その他では、インフルエンザ A、コクサッキー、コクサッキー/パラインフルエンザ 3 型の重複感染が各々 1 名ずつ検出された。発作重症度別の検討では、大発作 3 名（うちライノ 3）、中発作 24 名（うちライノ 15、RS 7、コクサッキー 1、コクサッキー/パラインフルエンザ 3 型 1）、小発作 5 名（うちライノ 1、RS 3、インフルエンザ A 1）であった。

2) 13 名の同一個人で入退院前後、すなわち喘息発作時、非発作時に末梢血中好酸球数、ECP、各種血清サイトカインを検討したところ、非発作時に比べ、発作時では、ECP が、サイトカインでは、IL-5、IFN- γ 、IL-2、IL-6、IL-10、G-CSF がそれぞれ統計学的に有意に上昇していた。以上より、喘息発作時では非発作時に比べ、好酸球の活性化の指標である ECP や IL-5 が有意に増加しており、喘息発作時に好酸球の活性化が関与していると考えられた。

考察

今年度の結果では、ウイルス学的に検索し得た症例数が少なかったためウイルス別には好酸球の活性化などを評価できなかったため、次年度以降、症例数を増やし、ウイルス別に、喘息の症状および好酸球の活性化や、サイトカイン産生などの相違を検討する。さらに、ステロイドなどの治療により、これらのウイルス感染喘息が早期に予防可能か否かについても併せて検討する予定である。以上の基礎的および臨床的研究により、喘息治療の中でも最も難しいとされる感染喘息の病態解明および、感染喘息により惹起されるヒト好酸球を中心とする慢性気道炎症を早期に制御することは、喘息における新しい治療につながると考えられる。ウイルス感染と好酸球性気道炎症の増強作用を検討した報告は国内外ではほとんど見当たらず、本研究は、極めて独創的で、感染喘息の早期予防や治療に貢献すると考えられる。

5) ライノウイルス感染についての検討

研究対象および方法

(1) 喀痰調整薬 L-カルボシステインのライノウイルス感染抑制効果を明らかにすることを目的として、ヒト気管上皮細胞および肺胞上皮細胞を試験管に培養し、ライノウイルス 14 型を感染させた。ヒト気管細胞培養は東北大学医学部倫理委員会の承認を得ている。L-カルボシステインを培養液に添加して細胞内ライノウイルス RNA 複製量、炎症性サイトカイン合成量を調べた。

(2) 喀痰調整薬 L-カルボシステインの COPD 患者における風邪予防効果、急性増悪予防効果を明らかにするため、慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者 102 名を半分に分け、L-カルボシステイン（1500mg/day）内服群を 51 名、非内服群 51 名とした。患者の同意を得て、両群における風邪および急性増悪回数を 12 ヶ月調べた。

研究成果

(1) 喀痰調整薬 L-カルボシステインは細胞内ライノウイルス増殖を抑制した。L-カルボシステインは感染受容体 ICAM-1 発現抑制および酸性エンドゾーム数を減少させた。また、炎症性サイトカイン合成抑制効果も明らかとなった。喀痰調整薬 L-カルボシステインの風邪予防・治療作用を有する可能性が示唆された。

(2) 12ヶ月間の観察期間で認められた風邪の累積回数は、L-カルボシステイン内服のコントロール群51名において209回、L-カルボシステイン内服群51名において102回と、明らかにL-カルボシステイン内服群で減少した。さらに、COPD急性増悪の累積回数もL-カルボシステイン内服のコントロール群において102回、L-カルボシステイン内服群において35回と、明らかにL-カルボシステイン内服群で減少した。細胞レベルで明らかとなったライノウイルス感染抑制効果がCOPDの風邪および急性増悪予防効果に関連していると示唆された。

考察

L-カルボシステインの感染受容体 ICAM-1 発現抑制および酸性エンドゾーム抑制を介したライノウイルス感染抑制効果が明らかとなった。ライノウイルス感染抑制薬の細胞レベルでの探究に関して、喀痰調整薬 L-カルボシステインのライノウイルス感染抑制効果を明らかにした。また、L-カルボシステインのCOPDにおける風邪および急性増悪予防効果を明らかにした。風邪の主因であるライノウイルスの感染抑制薬が存在していない現在において、L-カルボシステインライノウイルス感染抑制効果およびCOPD急性増悪予防効果が有用と示唆された。

4. 今後の計画

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しその予防法や治療法につき検討を加える予定である。

5. 社会的貢献

気管支喘息患者は小児において小児慢性疾患中でも上位を占め患者数が極めて多い疾患であり、年々その発症は低年齢化している。成人においても同様であり環境要因との関連を示唆する報告が認められる。このような観点より環境要因としての感染は極めて重要と考えられ本研究においては感染因子としてウイルスを取り上げこれらにつき臨床的検討さらには基礎的検討を行い気管支喘息悪化要因としての感染に対する考察を加えた。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

れており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。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。

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今後の検討が期待される。

【研究内容 4】

- 2 - (4) 喫煙以外の環境因子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)
辻 隆夫 (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 1 6 年度の研究目的

COPD の発症因子は喫煙と関連づけられているが、本邦で行われた全国的な疫学調査(Nippon COPD Epidemiology Study: NICE study1) によれば非喫煙者の 4.7%が COPD 患者であると推定されている。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である。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。平成 15 年度の研究では、NICE study1 で COPD と診断された非喫煙者と健常非喫煙者とを比較し、「4. これまでの成果」に記述した非喫煙 COPD 患者の特徴の一端が明らかにされた。そこで本年度の研究では東京女子医大附属成人医学センターの健診受診者のデータベースから、非喫煙 COPD 患者と喫煙 COPD 患者を抽出し、呼吸機能検査、血液検査、胸部 CT を含めた比較調査を行い、喫煙に関連しない COPD 患者の要因を明らかにすることを目的とした。

3 . 平成 1 6 年度の研究の対象及び方法

平成 15 年 7 月から平成 16 年 6 月までに東京女子医科大学附属成人医学センターに受診した健診者のデータベースのなかから、病歴とスパイロメトリー (FEV1 < 70%) の結果から COPD 患者を抽出した。それぞれの COPD 患者について喫煙歴、既往歴、家族歴、身長、体重、BMI、体脂肪率、スパイロメトリー (VC、%VC、FEV1、FEV1%)、血液検査 (末梢血白血球数、リンパ球数、好酸球数、総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、尿酸、総コレステロール、LDL コレステロール、HDL コレステロール)、胸部 CT 画像 [肺野低吸収域 (LAA)、気管支拡張像の有無] について調査した。抽出された COPD 患者の内訳は、喫煙継続者 43 名 (男性 43 名、女性 0 名)、過去喫煙者 76 名 (男性 69 名、女性 7 名)、非喫煙者 43 名 (男性 18 名、女性 25 名) であった。各データは mean または mean $\pm$ SEM として表示した。データの推計学的解析には χ^2 乗独立性の検定または分散分析を用いた。

4．これまでに得られた研究成果

平成 15 年度の研究においては、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（high risk job）をマッチさせた非喫煙健常者とを比較解析した。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、それぞれの患者と非喫煙健常者（男性 33 名、女性 130 名）がマッチされた。抽出された非喫煙 COPD 患者と非喫煙健常者の比較解析から、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、一方、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、3）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見られた。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。

5．平成 16 年度の研究成果

まず男女比の比較では、喫煙継続者（男性 100%）、過去喫煙者（男性 91%）に比べて非喫煙 COPD 患者（男性 42%）では女性の割合が多いことが知られた（ $p < 0.01$ ）。喫煙歴別にみた 1 秒率（FEV1/FVC）の比較では、非喫煙 COPD 患者（ $65.2 \pm 4.1\%$ 、mean $\pm$ SEM）、過去喫煙者（ $61.9 \pm 7.1\%$ ）、喫煙継続 COPD 患者（ $63.7 \pm 5.6\%$ ）で差はみられなかった。

自覚症状の比較では、喀痰症状がある割合は、非喫煙 COPD 患者（8.1%）、過去喫煙 COPD 患者（14.6%）、喫煙継続 COPD 患者（32.6%）であり、非喫煙 COPD 患者では有意に喀痰症状が少なかった（ $p < 0.01$ ）。患者の BMI、体脂肪率、高血圧や糖尿病の合併率については 3 群間で有意差はなかった。身長と体重は、非喫煙 COPD 患者に比べて喫煙継続 COPD 患者と過去喫煙 COPD 患者では有意に高値であったが（ $p < 0.01$ ）これは性差を反映した成績と考えられた。事実、男性例に限って解析すると 3 群間に身長と体重の有意差はみられなかった。

一方、家族歴の解析では、非喫煙 COPD 患者の家族には、喫煙継続 COPD 患者や過去喫煙 COPD 患者の家族と比べて、胃癌、膵臓癌、心不全、脳梗塞の罹患率が有意に高値であった（非喫煙 COPD 患者、過去喫煙 COPD 患者、喫煙継続 COPD 患者の家族歴の比較：胃癌 37.9% vs. 18.4% vs. 18.6%、 $P < 0.05$ ；膵臓癌 10.3% vs. 1.3% vs. 0%、 $p < 0.05$ ；心不全 10.0%、1.3%、0%、 $p < 0.05$ ；脳梗塞 34.5% vs. 7.9% vs. 23.3%、 $p < 0.01$ ）。しかし大腸癌、肺癌、肝臓癌、胆管癌、喉頭癌、乳癌、食道癌、腎臓癌、膀胱癌、甲状腺癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、白血病、脳腫瘍、骨肉腫、肺気腫、脳出血、肺結核、腎臓病、糖尿病、関節リウマチの家族歴の頻度については 3 群間で有意差はみられなかった。

末梢血白血球数は、喫煙による白血球数の増加作用を反映して、喫煙継続 COPD 患者では、非喫煙 COPD 患者や過去喫煙 COPD 患者に比較して有意に高値であった（ $6544 \pm 1464/\cdot l$ vs

5157 ± 1707/・l vs 5400 ± 1305/・l、 $p < 0.05$ ）。末梢血好酸球数については3群間で有意差はみられなかった（非喫煙 COPD 患者、過去喫煙 COPD 患者、喫煙継続 COPD 患者：112.7 ± 100.1/・l vs 158.9 ± 128.3/・l vs 176.0 ± 164.3/・l、 $p = 0.13$ ）。血液生化学検査値では、非喫煙 COPD 患者では、過去喫煙 COPD 患者と喫煙継続 COPD 患者に比べて、総コレステロール、LDL コレステロール、HDL コレステロール値が有意に高値であった（非喫煙 COPD 患者、過去喫煙 COPD 患者、喫煙継続 COPD 患者の総コレステロール値：219 ± 35 mg/dl vs 203 ± 29 mg/dl vs 194 ± 35 mg/dl、 $p < 0.01$ ）。非喫煙 COPD 患者における総コレステロール、LDL コレステロール、HDL コレステロール値の増加は男性例に限った解析でも観察されたことから、性差の影響のみでは説明はできないと考えられた。一方、血清総蛋白、アルブミン、総ビリルビン値については3群間で有意差はなかった。

胸部 CT の所見では、非喫煙 COPD 患者では過去喫煙 COPD 患者や喫煙継続 COPD 患者に比べて肺野低吸収域（low attenuation area：LAA）が認められる割合が有意に少なかった（5.7% vs 47.2% vs 57.1%、 $p < 0.01$ ）。一方、気管支拡張所見を有する割合については3群間で有意差はなかった（非喫煙 COPD 患者、過去喫煙 COPD 患者、喫煙継続 COPD 患者の胸部 CT で気管支拡張所見がみられた割合：31.4% vs 23.6% vs 14.3%、 $p = 0.15$ ）。

6．考察

東京女子医科大学付属成人医学センターに受診した健診者を対象とした調査において、非喫煙 COPD 患者は喫煙（喫煙継続および過去喫煙）COPD 患者に比べて、1）女性に多いこと、2）喀痰症状が少ないこと、3）胸部 CT では気腫所見（LAA）が少ないという特徴が明らかにされた。平成 15 年度に行われた NICE study I のデータ解析では、非喫煙 COPD 患者のうち女性例では喘鳴の既往が多いこと、男性例では粉塵職歴に従事した経験が多いことが示されている。したがって私どもの2年度に渡る研究成績からは、COPD に与える喫煙以外のリスク要因として、1）性差（女性）と2）粉塵職歴の影響が抽出され、非喫煙 COPD 患者の臨床症状としては、1）気道過分泌症状を欠くこと、2）喘鳴の頻度が高いこと、3）気腫病変が少ないという特徴が抽出された。特に喘鳴の頻度が高いことや胸部 CT で気腫病変を欠くという非喫煙 COPD 患者の特徴からは、喘息と非喫煙 COPD の病因や症状に共通点が存在する可能性が指摘された。

一方、非喫煙 COPD 患者の家族歴では喫煙 COPD 患者の家族歴に比べて、胃癌、膵臓癌、脳梗塞、心不全の病歴の頻度が高値であった。この理由については明らかではないが、これらの病歴では喫煙がリスク要因となることから、家族の喫煙による受動喫煙が非喫煙者の COPD 発症のリスク要因となった可能性が考えられる。しかし家族の喫煙歴については健診時に十分な聴取が行われなかったことから、現時点においてこの可能性の蓋然性について判断することは困難と考えられる。

7．今後の計画

これまでの研究からは、非喫煙 COPD 患者は喫煙 COPD 患者とは異なるリスク要因を有する可能性が示された。そこで次年度の研究においては、喫煙以外のリスク要因の解析として大気汚染に焦点をあてた研究を行なう予定である。すなわち NICE study Ⅰにより全国から抽出された COPD 患者の地域別発症率と財団法人環境情報普及センターより公表されている全国各地域の大気汚染物質（11 物質：SO₂、NO、NO₂、NO_x、CO、OX、NMHC、CH₄、THC、SPM、SP）のモニター濃度との関連性について検討を行なうこととする。大気汚染物質と COPD 発症率に有意な関係が認められれば、COPD に対する喫煙以外の環境因子の影響としてその危険性および対策について提言することを計画する。

8．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 年度と平成 16 年度の研究成果からは、非喫煙 COPD の発症に関連する因子や臨床的な特徴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。

【 研究課題全体の総括 】

21 世紀の環境対策には、科学的なエビデンスが要求される。これまでの疫学的研究に加え、環境因子が及ぼしうる健康影響の細胞レベル、分子レベルでの解明が欠かせない。そして、環境因子に対する個人差、すなわち感受性の相違の機構も解明される必要がある。

平成 16 年度は、

1) ディーゼルエンジン由来微粒子(DEP)の影響に関する調査研究

DE 低濃度における喘息マウスモデルを作成した。3 つの異なる実験系を用いて、喘息の発症や増悪への DE 曝露の影響を評価しうるモデルで詳細に検討した。喘息モデル作成後 DE 曝露群では、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。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特に DE 吸入曝露の急性期に示唆された。しかし、OVA チャレンジ反復継続群では、むしろ過敏性が低下する傾向が観察された。一方、基底膜下の線維性肥厚といった気道リモデリング所見が明らかに観察されるようになり、その点についてはいまだ明らかでないものの、DE による悪化傾向が示唆された。また、DE 曝露を先行させた系では、DE 曝露により明らかな気道過敏性の増強効果などが認められた。

2) 小児アレルギー疾患発症増加要因に関する調査研究

動物モデル、試験管内実験および臨床検体による検討を推進した。化学物質の仔マウスの出生や免疫反応に与える影響を検討し、1 ppm のビスフェノール A または 0.1 ppm のノニルフェノールを混餌投与した母マウスから生まれてきた仔マウス脾細胞組成に対して、OVA 特異的 TCR 発現トランスジェニック仔マウスにおいては、ビスフェノール A 投与群の雄仔マウスとノニルフェノール投与群の雄および雌仔マウスではそれぞれ、コントロールの化学物質非投与群に比べ、CD4 陽性 T 細胞および OVA-TCR 発現 T 細胞の割合が有意に減少していた。化学物質が仔マウスの抗原特異的サイトカイン産生能に与える影響では、IL-4 産生は、ビスフェノール A 投与群の雄マウスにおいて、コントロール群の雄マウスに比較して高値を示した。

ヒト臍帯血およびマウス血液中ビスフェノール A 濃度の比較では、臍帯血の血清では 102 検体中 48 検体が測定感度以下であり、最高値 19.27 ng/ml、中央値は 0.46 ng/ml であった。また、母乳中のビスフェノール A 濃度は 72 検体中 15 検体が測定感度以下であり、最高値 17.46 ng/ml、中央値は 2.10 ng/ml と臍帯血血清中濃度より高値をとる傾向が認められた。

3) ウイルス感染の影響に関する調査研究

試験管内実験、動物実験さらに臨床的検討を推進した。dsRNA 刺激により、気道上皮の IL-1

β , IL-6, GM-CSF などのサイトカインや IP-10, IL-8, ENA-78, GRO- α , MIP-1 α , RANTES, LARC などのケモカインおよび、ICAM-1, iNOS などの mRNA 発現が著明に増強したが、siRNA によって TLR3 の発現が抑制された細胞では、dsRNA によるこれらの発現は著明に抑制された。

動物モデルでの検討では、樹状細胞の表面マーカーおよび産生するサイトカインプロファイルはダニアレルゲンパルス時の Th2 誘導能を抑制する方向に作用した。樹状細胞のこれらの機能変化を反映して、RSV が直接感染した樹状細胞を移入したマウスでは、組織学的にアレルギー性気道炎症が抑制され、縦隔リンパ節における Th2 優位のサイトカインプロファイルも抑制された。一方、ダニアレルゲンパルス時に LT も同時にパルスされた樹状細胞ではダニアレルゲン単独パルス時の Th2 誘導能がさらに増強され、ナイーブマウス気道への移入により、ダニアレルゲン単独パルス樹状細胞よりもさらに強いアレルギー性気道炎症を誘導し、縦隔リンパ節における Th2 優位のサイトカイン反応も増強された。

臨床的検討では、ウイルス感染による気管支喘息の発作時 66 名のうち、ウイルス学的検討を施行し得た 56 名の検討では、ライノウイルスが、18 名、RS ウイルスが 11 名で、各々、比較的通年性に検出された。非発作時に比べ、発作時では、ECP や IL-5, IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-10, G-CSF がそれぞれ統計学的に有意に上昇していた。また、ライノウイルス感染に対する喀痰調整薬 L-カルボシステインの風邪予防・治療作用を有する可能性が示唆された。

4) 慢性閉塞性肺疾患の発症に関する調査研究

東京女子医科大学付属成人医学センターに受診した健診者を対象とした調査において、非喫煙 COPD 患者は喫煙（喫煙継続および過去喫煙）COPD 患者に比べて、1) 女性に多いこと、2) 喀痰症状が少ないこと、3) 胸部 CT では気腫所見（LAA）が少ないという特徴が明らかにされた。平成 15 年度に行われた NICE study I のデータ解析では、非喫煙 COPD 患者のうち女性例では喘鳴の既往が多いこと、男性例では粉塵職歴に従事した経験が多いことが示されている。したがって私どもの 2 年度に渡る研究成績からは、COPD に与える喫煙以外のリスク要因として、1) 性差（女性）と 2) 粉塵職歴の影響が抽出され、非喫煙 COPD 患者の臨床症状としては、1) 気道過分泌症状を欠くこと、2) 喘鳴の頻度が高いこと、3) 気腫病変が少ないという特徴が抽出された。特に喘鳴の頻度が高いことや胸部 CT で気腫病変を欠くという非喫煙 COPD 患者の特徴からは、喘息と非喫煙 COPD の病因や症状に共通点が存在する可能性が指摘された。

以上のように、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を多面的に展開し、DE、環境ホルモン、ウイルスのぜん息の悪化、発症に対する知見が集積された。喫煙以外の COPD のリスクファクターについても具体的に抽出されてきた。