

- 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】

気管支ぜん息等の発症・増悪リスクとして、1)ディーゼル排気微粒子(DE), 2)内分泌かく乱物質(いわゆる環境ホルモン)及び3)ウイルス感染を取り上げ、その影響を動物モデル、試験管内、または臨床検体を用いて検討した。また、4)喫煙以外のCOPDの発症因子解明を目的に、我が国初の大規模疫学調査(NICE study)のデータを用いて調査した。特に大気汚染物質の関与について検討した。

この目的遂行のため、以下の構成で研究班を組織した。

代表 工藤 翔二(日本医科大学第四内科)
滝澤 始(東京大学医学部附属病院呼吸器内科)
眞弓 光文(福井大学小児科)
足立 満(昭和大学第一内科)
永井 厚志(東京女子医科大学第一内科)

【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)

滝澤 始(東京大学医学部附属病院呼吸器内科)
菅原 勇(結核研究所分子病理学)
吾妻 安良太(日本医科大学第四内科)
李 英姫(日本医科大学公衆衛生学)
松本 亜紀(日本医科大学第四内科)

2. 平成17年度の研究目標

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。

1)ディーゼルエンジン微粒子の低濃度(100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)の曝露を先行して行い、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。以上の実験により、3年間の成果を総括し、ぜん息の発症、増悪への影響を明らかにする。

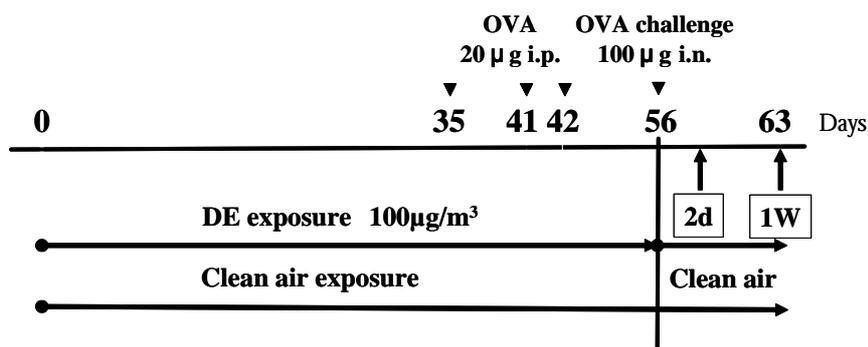
2)感受性が異なるBalb/cとC57B6の純系マウスでディーゼル曝露を行い、肺の組織学的検討、気管支肺胞洗浄などにより気道炎症を定量的に評価し、気道過敏性により生理学的にも評価する。さらにその分子病態の差から感受性遺伝子探索へとつなげる。

3. 平成 17 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 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) で反復暴露を行った。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 μg 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 μg の鼻腔内投与によりチャレンジした。

1) ぜん息様病態に対する DE 反復吸入暴露の影響：発症モデル

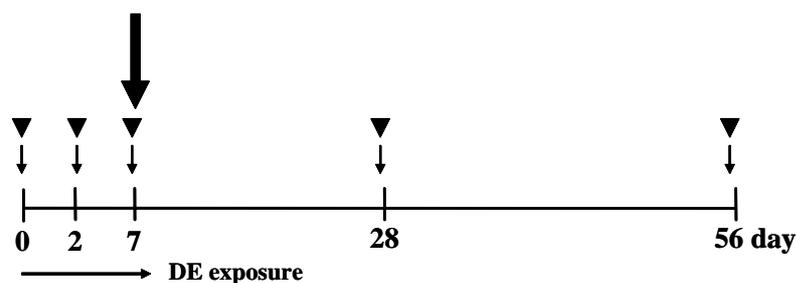
発症への影響を検討する目的で下記のような実験プロトコルを用いて、DE の先行暴露がぜん息病態の発症にどのような影響を及ぼすか検討した。



- 1. BAL (bronchoalveolar lavage)
- 2. 組織学的観察
- 3. Cytokine and chemokine mRNA の肺組織の発現 (RT-PCR)
- 4. Cytokine and chemokine タンパクの検出 (ELISA)
- 5. Flow cytometric analysis (BALF)
- 4. 気道過敏性測定

2) 反応性の異なる 2 つの系統での比較検討：

DE 感受性の差を詳細に検討比較することにより、その感受性分子を追及した。プロトコルは下記のようなものである。



- ↓ 気道過敏性の測定
- ▼ BAL, 肺組織の検討.
- ↓
 - ・RT-PCRによる:
 - Th1 / Th2 cytokinesの発現
 - 抗酸化酵素と関連遺伝子: HO-1, GST-M1 and Nrf2 mRNA
 - ・ウェスタンプロットによる HO-1 タンパクの解析

4 . これまでに得られた研究成果

1) 喘息モデル作成後 DE 曝露を継続した場合の影響 : 急性影響

純系マウスの BALB/c マウスに一日 7 時間、週 5 日、 $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ の清浄空気 (対照群) の条件で 3 ヶ月まで吸入を継続した。マウスのぜん息モデルとして、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。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た。以上の変化は、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。次に、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、DE 曝露後急性期に気道過敏性の増強が示された。

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 : 長期影響

1) の実験に比較して、BAL 液中の総細胞数と好酸球数などは長期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。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。3 ヶ月後では基底膜下の線維性肥厚が確認され、DE 曝露群では対象群より高度な可能性が示唆された。

肺組織のアレルギー性炎症において Th2 タイプのサイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13) の遺伝子発現が、DE の 1 ヶ月曝露により早期から増強し、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。気道過敏性への影響について、OVA 反復継続していると、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た。

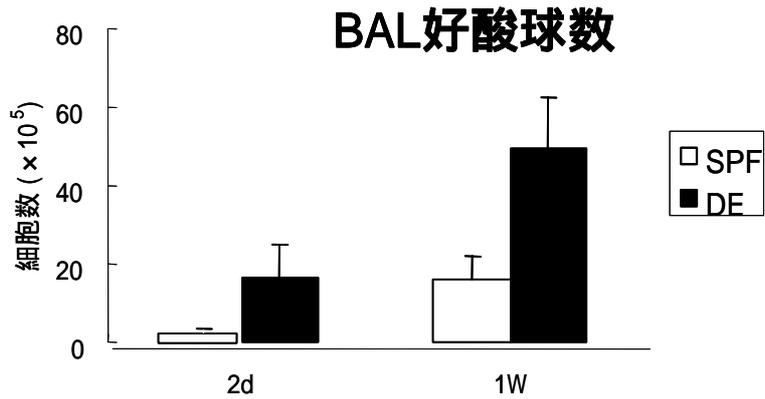
3) マウスの系統差 :

C57Black6 の方が Balb/c マウスより 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。予備的な検討として BAL 中細胞数や組織学的比較も行った。

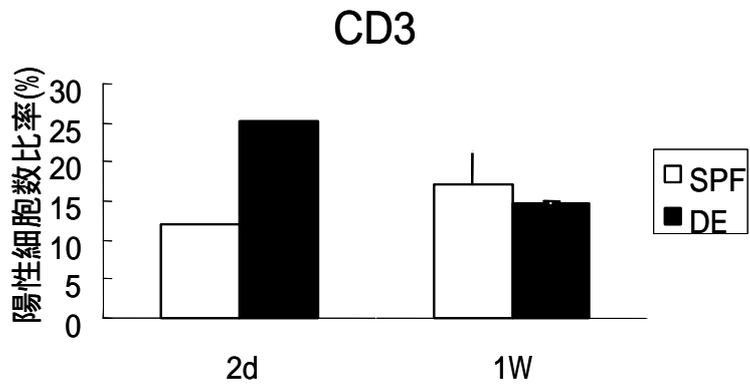
5 . 平成 17 年度の研究成果

1) DE 曝露を継続したのちぜん息モデルを作成した場合の影響 : 発症モデル

BAL 液中の総細胞数と好酸球数は DE 先行曝露による下図のように明らかに増加した。

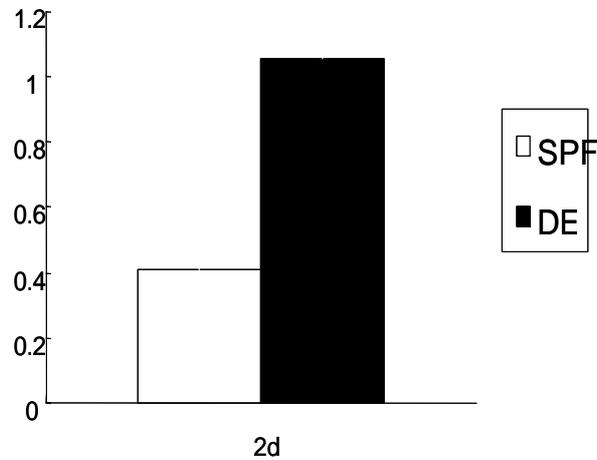


さらに、フローサイトメトリーにより、リンパ球の表面マーカーで明らかな CD3 陽性 T 細胞数の DE 曝露による増加が認められた。



肺の組織学的検討では、OVA チャレンジ 2 日後からみられた気道周囲、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、DE 先行曝露群で増強していた。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、DE の先行曝露で増強した。

IL-4/ beta-actin

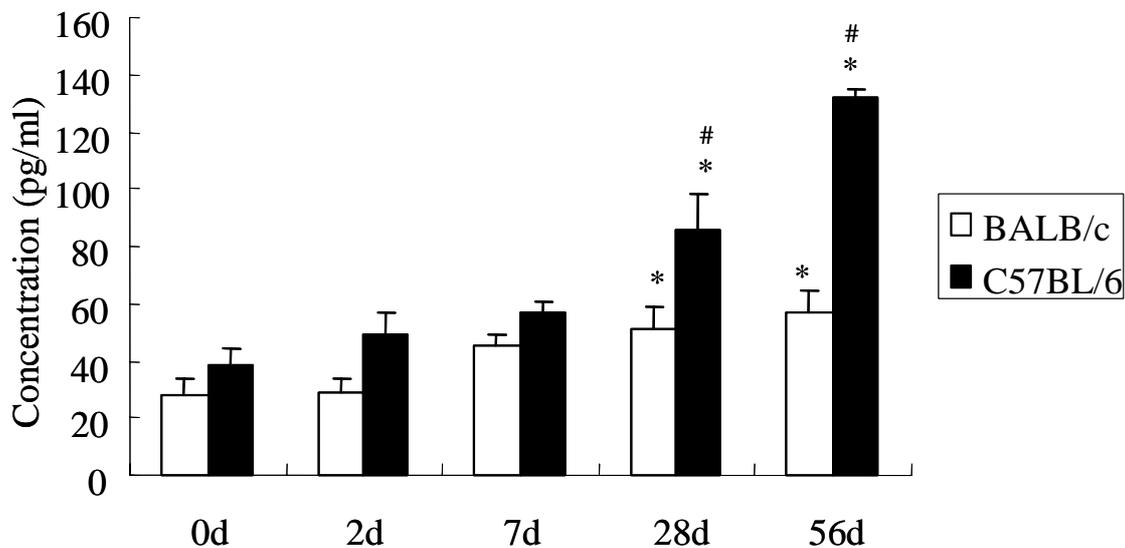


さらに、気道過敏性への影響を検討した。DE 先行曝露により、OVA チャレンジ後 2 日および 1 週間後の測定で、DE 先行群は有意に気道過敏性が亢進した。以上から、DE の低濃度先行反復曝露により、アレルギーぜん息様病態が起こりやすくなることが認められた。

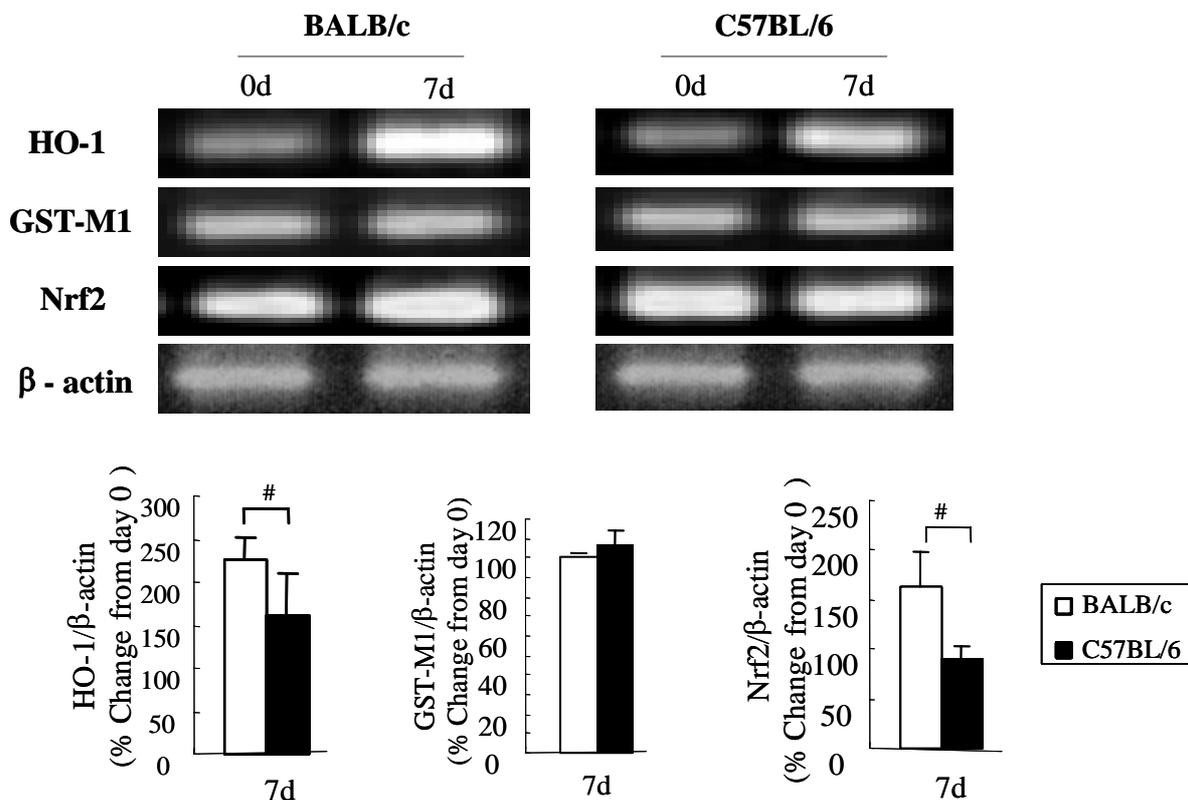
2) マウスの系統差 :

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。サイトカイン群の発現状況では、IL-4、IL-13 などの Th2 サイトカインの発現が下記のように明らかに C57B6 マウスで発現増強した一方、IFNgamma は有意に Balb/c で強かった。以上の変化は、他の気道炎症の指標や気道過敏性とよく一致していた。

IL-13



さらに、その差の原因を検討する過程で、両者でDEによるオキシダントストレスが重要と考え、抗オキシダント酵素群について発現状況を検討し、以下のように heme oxygenase (HO)-1 及びその調節因子 Nrf2 の増強が、DE 高感受性群 C57BL/6 マウスで有意に弱いことを見出した。一方、比較対照とした GST-M1 ではそのようなことはなかった。



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、喘息の発症への DE 曝露の影響を評価しうるモデルで詳細に検討した。DE 先行曝露により、肺洗浄液中の細胞数、好酸球が有意かつ著明に増加したほか、肺組織学的所見でも悪化を認め、さらに肺組織での 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 DE 吸入曝露により著明に増強した。これらの結果から、 $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ という低濃度反復の DE の吸入曝露がぜん息発症に関与するという新知見が得られた。3 年間の実験結果をまとめると、1) 喘息モデルでの急性影響：気道過敏性とサイトカイン発現の増悪を認めた。2) 長期持続モデルでの慢性影響：気道リモデリングへの増悪効果が示唆された。そして、3) DE 先行曝露の喘息発症への影響：明らかな気道炎症、気道過敏性への増悪効果がみられた。以上から、DE の反復曝露は、少なくともマウスモデルにおいては、ぜん息様病態の発症と増悪両面において悪影響があり、その程度は、 $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ という低濃度反復の条件下では、気道過敏性の程度として約 2 倍弱であった。

一方、DE を同じ条件で吸入曝露しても気道炎症や過敏性の獲得が 2 つの系統間で明らかな差が認められたことから、その反応性の差を解析することにより、高感受性の危険因子が追及できると考

えた。今年度は、詳細な分子レベルの比較検討を行い、Th2 サイトカイン群の発現が高感受性マウスで増強していることを確認し、さらにオキシダントストレスに対する重要な防御因子である H0-1 という抗オキシダント酵素の発現が、高感受性マウスで低いことをはじめて明らかにした。この知見は、DE の健康被害の高危険群のスクリーニングに道を開くものとして、今後の研究の出発点になると思われた。

7. 今後の課題

いままでの3年間の研究により、ディーゼル排気暴露をさまざまな条件で検討し、喘息の発症、増悪に関与することが示された。すなわち、先行曝露は発症に影響した。急性期にはぜん息増悪を起こし、慢性期には気道炎症や過敏性への影響は減弱した。しかし、気道の線維性肥厚への持続影響を認めた。

また、感受性の異なる2系統のマウスの検討から、感受性因子として、抗酸化酵素が示唆され、Nrf-2 などの転写因子の役割が推定された。

今後は、感受性群のスクリーニングに有効な方法の確立にむけた研究とともに、高感受性群での健康被害を防止する方法（化学予防）の確立の基礎的検討が急務と思われる。

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ギー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た。さらに異なる感受性をもつマウスの検討から、抗オキシダント酵素の発現の強弱が DE への感受性を決定する上で重要であることが示唆された。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。

- 2 - (2) 環境ホルモンの影響に関する検討

1. 研究従事者（印は研究リーダー）

眞弓 光文（福井大学小児科）

大嶋 勇成（福井大学）

塚原 宏一（福井大学）

2. 平成17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、食物アレルギーに始まり、アトピー性皮膚炎、気管支喘息と年齢とともに症状が変化していくアレルギーマーチを呈することが知られている。アレルギーマーチにおける一連の病態形成には 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、妊娠中、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すること、免疫調節作用をもつ CD4⁺CD25⁺調節性 T 細胞の分化に関与することが知られている。内分泌攪乱物質の中には女性ホルモン様作用を示すものが存在することから、内分泌攪乱物質への曝露がナイーブ T 細胞から Th2 細胞への分化や、調節性 T 細胞の増殖に何らかの影響を与える可能性が考えられる。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 細胞への分化や調節性 T 細胞の分化が攪乱された場合、本来なら免疫応答が誘導されず免疫寛容が生じるべき食物抗原や吸入性抗原に対し 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。これまでの研究において、内分泌攪乱作用が指摘されている Bisphenol A と Nonylphenol が経胎盤および、母乳を介する曝露により次世代のヘルパー T 細胞のサイトカイン産生能を変化させること明らかにした。本年度は、Bisphenol A と Nonylphenol への母体を介する曝露が、アレルギーマーチで最初に問題となる食物アレルギーの発症に関与する経口免疫の成立に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 平成 17 年度の研究の対象及び方法

検討対象は、胎児への汚染が問題視され日本人の臍帯に検出されると報告されている化学物質のうち、内分泌攪乱作用が示唆され、エストロゲンレセプターへの結合性が報告されているアルキルフェノール類を中心に選択した。昨年までの研究で、トランスジェニックマウスを用いた母体を介しての曝露実験で次世代の T 細胞のサイトカイン産生能に影響を与えることが認められた Bisphenol A および Nonylphenol を検討対象化学物質とした。

経口免疫寛容の評価方法としては、あらかじめ経口的に抗原を投与した後に、同一抗原を経皮的または腹腔内投与で免疫し、抗原特異的 T 細胞応答や抗原特異的抗体産生が抑制されるか否かで評価する方法が一般に用いられている。しかし、実際の食物アレルギーの病態を考えた場合、免疫寛容と抗原感作の成立に関与する抗原の生体への投与経路はいずれも経口となる。さらに、乳幼児期の食物アレルギー患者の発症機序を考えた場合、既に成立していた経口免疫寛容が破綻したとするより、成長発達過程で経口免疫寛容がうまく誘導されず、食物抗原に対する感作が誘導されたためである可能性が高い。そこで、抗原の経口投与により免疫寛容あるいは抗原感作のいずれが誘導されるかを解析できるモデルが必要となる。あらかじめ免疫を行わない場合、抗原特異的 T 細胞の存在頻度はきわめて低いため、抗原特異的 T 細胞数の変化やその性状を解析することは困難である。経口免疫寛容の成立には様々な機序が報告されているが、そのひとつに抗原特異的 T 細胞クローンの除去が上げられる。クローン除去が生じたか否かを判定するためには、経口的に抗原を投与した前後で抗原特異的 T 細胞の頻度の変化を評価できる必要があり、免疫を行うことなくあらかじめ抗原特異的 T 細胞の頻度を増加させるための方法が必要となる。そのため、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を用い、OVA の経口投与により抗原特異的 T 細胞数とその性状を解析できるようにした。

OVA 特異的 TCR 発現トランスジェニックマウスのヘテロの雄と野生型の雌のマウスを交配し、交配直後から生まれてきた仔マウスの離乳が完了する生後 21 日目まで、母親マウスに Bisphenol A あるいは Nonylphenol を混合した餌を与えた。昨年度の本研究で脾細胞のサイトカイン産生や細胞増殖に統計学的有意差を検出することができた Bisphenol A 1 ppm および Nonylphenol 0.1 ppm

を投与濃度として選択した。この混餌濃度での各化学物質の摂取量は、非妊娠時の雌マウスにおける体重と餌の消費量から推定した場合、Bisphenol A で 250 µg/Kg 体重/日、Nonylphenol で 25 µg/kg/日に相当すると推定された。

生まれてきた OVA 特異的 TCR 発現ヘテロ子マウスに対して生後 14 日目から、OVA を 3 回隔日経口投与した。OVA は PBS(-) に溶解し 200 mg/ml の濃度 (高用量投与) あるいは 2 mg/ml (低用量投与) に調整し、仔マウスの胃内に 100 µl づつ投与した (20 mg/マウス または 0.2 mg/マウス)。生後 21 日目に採血し、血清中 OVA 特異的 IgG1, IgG2a を測定した。また、脾臓を分離し、赤血球除去単核細胞を分離し、脾細胞中の OVA 特異的 T 細胞と CD4+CD25+T 細胞の割合をフローサイトメーターにより測定した。さらに、赤血球除去脾細胞を *in vitro* で培養し、OVA 刺激を加え、OVA 特異的細胞増殖能と、サイトカイン産生能をそれぞれサイミジン取り込み能、ELISA により測定した。

4. これまでに得られた研究成果

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

Bisphenol A、Nonylphenol、Octylphenol、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、高濃度の Bisphenol A は IL-13 産生能を増強した。これらの結果は、ナイーブ T 細胞が抗原刺激を受ける際にこれらの化学物質に暴露されると Th1/Th2 バランスが Th2 へとシフトする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過程で Bisphenol A、Nonylphenol、Octylphenol、DOP に暴露されると、誘導されてくる樹状細胞の IL-10 産生能は抑制された。また、Nonylphenol への暴露は樹状細胞の CD86 発現を増強した。樹状細胞機能の内因性の抑制因子である IL-10 産生能が抑制され、補助刺激分子の CD86 発現が増強することから、樹状細胞の異常な活性化に繋がる可能性が示唆された。

3) 胎盤・母乳経由での化学物質への暴露が次世代免疫系に及ぼす影響

1 ppm の Bisphenol A または 0.1 ppm の Nonylphenol を混餌投与した母マウスから生まれてきた仔マウスの脾細胞中の 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、Nonylphenol 投与群では、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。また、CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞の割合は、Bisphenol A 投与群、Nonylphenol 投与群のどちらもコントロール群と比較して減少していた。

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 刺激を行った結果、脾細胞の抗原特異的細胞増殖は Nonylphenol 投与群でコントロール群に比較して減弱していた。OVA 特異的 IL-4 産生能・IL-13 産生能は、Bisphenol A 投与群の雄仔マウスにおいて、コントロール群の雄仔マウスに比べ高値を示した。一方、Th1 サイトカインである IFN- γ の産生に関しては、Bisphenol A 投与群および Nonylphenol 投与群ともにコントロール群に比べ低値を示した。

母マウスに Bisphenol A または、Nonylphenol 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総 IgE 濃度を測定すると Nonylphenol 投与群はコントロール群に比べ高値

を示した。

これらの結果から、胎盤・母乳経由での Bisphenol A あるいは Nonylphenol への暴露は次世代の仔マウスの T 細胞反応性に影響を与えることが示唆された。

5 . 平成 17 年度の研究成果

1) 化学物質への経母体暴露が脾細胞の OVA 特異的細胞増殖に及ぼす影響

仔マウスの赤血球除去脾細胞を調整し、*in vitro* で OVA による刺激を行い細胞増殖反応を測定した。その結果、OVA の経口投与を行わない場合、OVA 特異的細胞増殖は Nonylphenol 暴露群では非暴露群に比べ低下していた (図 1)。一方、Bisphenol A 暴露群は非暴露群と有意な差を認めなかった (図 2)。OVA の経口投与を行なった場合には、非暴露群、暴露群とも OVA 非投与の場合と比べ抗原特異的細胞増殖反応の抑制が認められ、経口免疫寛容が誘導されていることが示唆された。OVA 経口投与による細胞増殖反応の抑制効果は低用量より高用量の OVA 投与で強く認められた。しかし、高用量 OVA の経口投与でも OVA 特異的細胞増殖は完全に抑制されることはなく、一部増殖活性が残存することが観察された。OVA の経口投与により抑制された状態での OVA 特異的細胞増殖を比較した場合、OVA の高用量、低用量投与のいずれの場合でも、Bisphenol A 暴露群、Nonylphenol 暴露群ともに非暴露群より高値を示し、母体経由での Bisphenol A、Nonylphenol への暴露により経口免疫寛容の誘導が減弱していると考えられた。

2) 化学物質への経母体暴露が脾細胞の OVA 特異的サイトカイン産生に及ぼす影響

仔マウスから生後 21 日目に分離した赤血球除去脾細胞 *in vitro* で培養し、1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の OVA を添加し、抗原特異的サイトカイン産生を測定すると、OVA 特異的細胞増殖反応の結果に一致して、OVA の経口投与により OVA 特異的 IL-4、IL-13、IFN- γ の産生は著明に抑制された (図 3)。産生された IL-4、IL-13 の培養液中濃度は、化学物質への暴露の有無に関わらず、測定感度以下のものが大部分であったため、解析することはできなかった。しかし、ELISA で測定可能であった IFN- γ の産生に関しては、Bisphenol A 暴露群および Nonylphenol 暴露群の雄仔マウスでは非暴露群に比べ OVA 特異的 IFN- γ 産生量は多かった。雌仔マウスでは暴露群と非暴露群の間に有為の差を認めなかった。この結果は、細胞増殖反応に比べ、サイトカイン産生能に関しては経口免疫寛容が強力に誘導されること、弱いながらも経口免疫寛容の誘導に Bisphenol A、Nonylphenol への母体経由での暴露がなんらかの影響を与える可能性が考えられた。Th2 タイプのサイトカインの産生量が OVA 経口投与後では測定感度以下のものが多くなったが、IFN- γ の産生量も OVA 経口投与を行わない場合に比べて著明に抑制されていることから、Bisphenol A、Nonylphenol への母体経由での暴露が OVA 経口投与による Th1、Th2 反応の抑制効果のどちらにより影響を与えるかは、結論づけることは出来なかった。

3) 化学物質への経母体暴露が脾細胞中の OVA 特異的 T 細胞比率に与える影響

母体経由で化学物質に暴露された仔マウスの生後 21 日目の脾臓中の OVA 特異的 T 細胞の割合をフローサイトメトリーにより KJ1-26 陽性細胞の割合として求めた (図 4)。その結果、化学物質への非暴露群と Bisphenol A への暴露群では高容量の OVA の経口投与により OVA 特異的 T 細胞の割合は OVA 非投与に比べ有為に減少していた。しかし、Nonylphenol 暴露群の雌仔マウスでは、OVA の経口投

与による OVA 特異的 T 細胞の割合の減少は認められず、雌仔マウスでは、逆に OVA の経口投与により OVA 特異的 T 細胞の割合が増加していた。Nonylphenol 暴露群では OVA 経口投与なしの状態での OVA 特異的 T 細胞比率がもともと非暴露群より小さいことを考慮すると、Nonylphenol 暴露により、クローン除去が抑制されていると考えられた。

4) 化学物質への経母体暴露が脾細胞中 CD4⁺CD25⁺T 細胞の割合に与える影響

生後 21 日目に分離した脾細胞中の調節性 T 細胞数を推定するため CD4⁺CD25⁺細胞の割合をフローサイトメーターにより測定した。OVA の経口投与が行われていない場合では、全脾細胞に占める CD25⁺CD4⁺T 細胞の割合と CD4⁺T 細胞中に占める CD4⁺CD25⁺T 細胞の割合はともに雄の Bisphenol A 暴露群と雌の Nonylphenol 暴露群においてそれぞれの非暴露群に比べ少ない傾向が認められた(図 5)。

OVA 特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウスに OVA を経口投与し、経口免疫寛容を誘導した場合、CD4⁺CD25⁺T 細胞が増加することが報告されている。また、OVA 経口投与により増加した CD4⁺CD25⁺T 細胞は調節性 T 細胞としての機能を示すことが報告されている。この報告と一致して、OVA を経口投与した場合、化学物質への非暴露群では CD4⁺CD25⁺T 細胞の割合は PBS (-) を投与したものより増加していた。一方、非暴露群に対し、Bisphenol A 暴露群では OVA 投与により CD4⁺CD25⁺T 細胞の割合の増加はほとんど認められなかった。また、Nonylphenol 暴露群では雄の仔マウスにおいて、むしろ OVA 経口投与により CD24⁺CD4⁺T 細胞の割合の減少が認められた。

5) 化学物質への経母体暴露が抗原特異的 IgE、IgG 値に及ぼす影響

母体経由で化学物質に暴露された仔マウスの生後 21 日目の血清中の OVA 特異的 IgG 1 と OVA 特異的 IgG2a 値を測定した(図 6、図 7)。その結果、低用量の OVA の経口投与では高用量と比較して、OVA 特異的 IgG1 値、OVA 特異的 IgG2a 値ともに高値を示した。低用量の OVA の経口投与後の OVA 特異的 IgG1 と OVA 特異的 IgG2a 値は、Bisphenol A 暴露群の雄仔マウスにおいて非暴露群の雄仔マウスよりも高値を示した。一方、高用量の OVA の経口投与後では、Nonylphenol 暴露群の雄仔マウスにおいて、非暴露群の雄仔マウスより OVA 特異的 IgG1 値、OVA 特異的 IgG2a 値ともに高い値をしめした。雄仔マウスでは、Bisphenol A 群、Nonylphenol 暴露群ともに OVA の投与量に関わらず、非暴露群に比べ OVA 特異的 IgG1 値、OVA 特異的 IgG2a 値に統計的に有意な差はみとめなかった。

OVA 特異的 IgE の測定は、OVA の経口投与の有無や化学物質への暴露の有無に関わらず、測定感度以下であったため、化学物質への暴露が抗原特異的 IgE 産生に与える影響を評価することはできなかった。

6. 考察

今回検討した経口免疫寛容の誘導条件下では、母体経由での Bisphenol A や Nonylphenol への暴露は、抗原特異的細胞増殖反応を指標とした場合、免疫寛容の誘導を減弱させる可能性が示唆された。また、その作用機序としては抗原経口投与により誘導されるべき CD4⁺CD25⁺調節性 T 細胞の誘導がかかりにくいこと、加えて Nonylphenol への暴露の場合、抗原特異的 T 細胞のクローン除去が減弱していることが関与していることが示唆された。

経口免疫寛容の成立過程では、一過性に抗原特異的 T 細胞が活性化おきること、細胞性免疫より液性免疫の方が経口免疫寛容が成立しにくいことが知られている。また、経口免疫寛容は、離

乳完了後より、離乳期においては誘導されにくいことが報告されている。今回の実験では OVA 投与が離乳完了前であったことから、低用量の OVA 経口投与では十分な経口免疫寛容が誘導されず、抗原特異的 IgG1、IgG2a 産生が惹起されたと考えられ、高用量では経口免疫寛容による抑制効果で抗原特異的 IgG1、IgG2a が低値を示したとも考えられる。Bisphenol A や Nonylphenol への暴露群で、抗原特異的 IgG1、IgG2a が非暴露群より高値をしめしたのは、OVA 投与により惹起された抗原特異的 IgG1、IgG2a 産生に対する抑制機構が Bisphenol A や Nonylphenol への暴露により減弱したためと考えられる。

抗原特異的サイトカイン産生は、Th1・Th2 サイトカインとも OVA 投与により著明に抑制されたため、Bisphenol A や Nonylphenol への暴露が Th1・Th2 のどちらにより影響するかは結論づけることは出来なかった。しかし、抗原特異的 IgG1、IgG2a の産生がそれぞれ Th2、Th1 反応により制御されることから Bisphenol A や Nonylphenol への暴露は抗原特異的反応に関して、Th1、Th2 反応のどちらかを誘導させるというよりも、免疫制御機構に影響すると考えられた。

7. 今後の課題

経口免疫寛容の成立機序は投与される抗原量により異なることが知られている。今回の実験に用いた抗原量はマウスの体重から換算した場合、高用量では約 2 g/kg に相当する。この量を授乳期の乳児の体重に換算すると約 20 g の食物抗原量に相当し、人口乳を飲んでいる乳児が摂取する牛乳抗原の量に相当すると考えられる。一方、母親が卵を食べた場合、母乳中に検出される卵白の抗原成分は $\mu\text{g/ml}$ オーダーと報告されていることから母乳栄養児は mg オーダーの卵白抗原を摂取することになるため、今回の実験で用いた低用量の抗原量よりさらに少ない抗原量となる。そのため、今回実験で用いた低用量の抗原量よりさらに少量の抗原投与で誘導される経口免疫寛容に対する母体経由での Bisphenol A や Nonylphenol への暴露の影響も確認していく必要がある。

今回の実験では母体経由での Bisphenol A や Nonylphenol への暴露により経口免疫寛容の誘導が影響を受けることが明らかとなった。この免疫寛容の誘導の異常が他の粘膜免疫系にもおいても起こりうるのか、特に、吸入性抗原による気道粘膜で誘導される免疫寛容に対する影響を検討していくことが、アレルギーマーチの進展と気管支喘息発症の危険因子となるか否かを明らかにする上で重要と考えられる。

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、この時期における内分泌攪乱物質による免疫寛容を誘導する機構の異常は、アレルギー性疾患の発症だけでなく、自己免疫疾患の発症にも影響する可能性が考えられる。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を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免疫制御機構に影響を与える可能性が明らかとなれば、抗原除去以外にアレルギー性疾患発症抑制対策として内分泌攪乱物質に対する環境対策が重要であることを示すことが期待される。

また、これまでの一連の研究で確立した *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は、新たな化学物質の生体免疫系への危険性を評価する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。

- 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 . 研究目的

気管支喘息の基本病態は慢性の気道炎症細胞浸潤と気道上皮の傷害に伴う気道過敏性の亢進である。この病態は、好酸球やリンパ球などの炎症細胞が気道へ浸潤することにより形成される。アレルギー性気道炎症がウイルス感染によりどのように変化修飾を受けるのであろうか。すなわちウイルス感染時にいかなる因子の関与により好酸球やリンパ球などの炎症細胞は活性化され気道炎症増悪が誘導されるか。さらに T 細胞機能からアレルギー疾患の発症を考えると、Th2 細胞側に偏倚していると考えられるアレルギー疾患の病態をウイルス感染からどのように考えるのか。ウイルス感染は Th1 細胞を優位に誘導すると考えられており感染はアレルギー疾患発症に抑制的に作用するであろうと考える hygiene hypothesis なども提唱されている。感染により Th1 /Th2 細胞垂集団はどのような影響を受け、それに対応するサイトカインの変化は如何なるものか。ウイルス感染時における炎症細胞群の変化ならびに活性分子群、サイトカイン、ケモカインはアレルギー疾患の発症に、どのように関与しているのか。また従来、非特異的免疫機構といわれてきた自然免疫 innate immunity もアレルギー性炎症の病態と関わることが明らかとなったが、気道上皮細胞と Toll-like receptor さらにウイルス感染との相互関係につき新たな知見も集積されつつある。

本研究においては、このような観点よりアレルギー性気道炎症とウイルス感染の関係を検討する。

3 . 研究対象、方法、研究成果ならびに考察

1) ウイルス感染による喘息増悪の機序に関する検討

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。

対象、方法と研究成果

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、dsRNA 刺激し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 , IL-6, GM-CSF などのサイトカインや IP-10, IL-8, ENA-78, GRO- , MIP-1 , 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

用は認められず siRNA による結果より NFkB , IRF-3 の関与が示唆された。

さらに代表的な共刺激分子である B-7 ファミリー分子のなかで B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-DC が無刺激の上皮に発現していたが、dsRNA 刺激で発現が増強したのは B7-H1 と B7-DC であった。この発現増強は高濃度のデキサメサゾンで軽度抑制され、エンドゾーム輸送阻害剤のクロロキンで著明に抑制された。

考察

2 本鎖 RNA はエンドゾームで TLR3 に結合して気道上皮細胞を活性化し、共刺激分子である B7-H1 と B7-DC の発現を増強することが示唆された。B7-H1 と B7-DC は、活性化 T 細胞に発現する受容体である PD-1 を介して T 細胞活性化を制御していることが知られており、ウイルスが感染した気道上皮は共刺激分子の発現を増強することによってウイルス特異的細胞障害性 T 細胞の機能を調整している可能性が考えられる。また抗原感作の際に 2 本鎖 RNA が作用すると IL-13 の選択的な産生亢進を介して喘息反応の増強をもたらす可能性が考えられた。2 本鎖 RNA は抗原提示細胞に作用しているものと考えられるが、IL-13 がどのような細胞群から選択的に産生されているか現在検討を進めている。

2) ライノウイルス、RS ウイルスによる in vitro 感染実験

対象および方法

ライノウイルスや RS (Respiratory syncytial) ウイルスは気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の急性増悪を引き起こすが、感染を抑制する抗ウイルス薬が実用化されていない。COPD の治療薬として広く用いられている beta2-刺激薬は急性増悪抑制効果が報告されている。本年度は beta2-刺激薬ライノウイルス感染を抑制するのではないかと考え検討した。ヒト気管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。塩酸プロカテロール (0.1 micro M) を上皮細胞に作用させ、培養液ライノウイルス量、可溶性 ICAM-1 量およびサイトカイン量を測定した。

研究成果

培養液ライノウイルス量が塩酸プロカテロールで明らかに減少した。細胞培養液中可溶性 ICAM-1 濃度が塩酸プロカテロールで、ライノウイルス感染前後で減少した。一方で、塩酸プロカテロールによって、ライノウイルス RNA 進入経路である酸性エンドゾーム数および蛍光強度は変化しなかった。さらに、ライノウイルスで増加する培養液中の IL-1beta、IL-6 が減少した。

考察

ヒト気管上皮細胞培養実験より、ライノウイルス 14 型を感染に対し塩酸プロカテロールの抑制効果がみられ臨床的有用性が示唆された。

3) dsRNA 刺激による気道上皮細胞とマウス喘息モデルによる検討

対象と方法

我々は一昨年前から、培養ヒト気道上皮の共刺激分子発現における合成 2 本鎖 RNA (poly IC) の作用を検討してきたが、今回はさらにマウス喘息モデルを用いて、感作成立相における 2 本鎖 RNA 投与の影響について検討した。

研究成果

感作時に poly IC を投与することによって吸入アセチルコリンに対する気道過敏性は増強し、BALF

の好酸球数は著明に増加したが、マクロファージ数や好中球数、リンパ球数には有意の変化はみられなかった。BALF の IL-5, IL-10, IFN-gamma 濃度を ELISA で測定したところ、poly IC 投与群と対照群とで差がみられなかったが、IL-13 濃度は poly IC 投与群でより高値を示した。また、BALF の好酸球数と IL-13 濃度の間には有意の正の相関関係がみとめられた。抗原吸入曝露の段階で IL-13 阻害剤を腹腔内投与して内因性 IL-13 の作用をブロックした条件下では、抗原感作時の poly IC 投与による気道過敏性と好酸球性炎症の増強効果はみとめられなかった。また、抗原感作の 3 日前、あるいは 3 日後に poly IC を投与してもこのような喘息反応の増強作用はみられなかった。

考察

マウス喘息モデルを用いて、感作成立相における 2 本鎖 RNA 投与の影響について検討した。その結果 poly IC の気道炎症増悪作用が認められウイルス感染の重要性が示唆された。

4) マウス喘息モデルによる RSV 感染の影響についての検討

対象および方法

本研究は、ウイルス感染が気管支喘息のアレルギー性気道炎症に与える影響を動物モデルにおいて明らかにすることを目的として、ダニアレルゲン感作によりアレルギー性気道炎症を生じ、Respiratory Syncytial Virus (RSV) に感染し得る BALB/c マウスを用いて実験を行った。

研究成果

i) 少量 RSV 初感染はダニアレルゲン特異的 Th2 反応の抑制を介して先行するアレルギー性気道炎症を抑制したのに対して、再感染は Th2 反応増強を介してアレルギー性気道炎症を増悪させた。ii) 特異的 cysLTs 受容体拮抗薬は Th2 特異的なサイトカイン抑制効果を介して RSV 再感染によるアレルギー性気道炎症の増悪を抑制した。ステロイドの抗炎症効果はより強力であったがサイトカイン抑制効果は非特異的であった。iii) 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、樹状細胞移入によるアレルギー性気道炎症の発症は抑制された。一方、ダニアレルゲンパルス時に RSV 感染により気道に産生される cysLTs が存在すると樹状細胞移入によるアレルギー性気道炎症は増悪した。iv) ダニアレルゲン感作 RSV 初感染マウス肺組織から分離した樹状細胞は移入されたマウスのアレルギー性気道炎症の発症を抑制したのに対して、再感染マウス肺組織から分離した樹状細胞はアレルギー性気道炎症を増悪させた。これらの変化は、移入されたマウスの縦隔リンパ節におけるダニアレルゲン特異的サイトカインプロファイルと関連していた。

考察

小児期のウイルス感染を喘息発症のリスクファクターとする意見がある一方で、小児期のウイルス感染により喘息に代表されるアレルギー疾患は抑制されるという、所謂 hygiene hypothesis もあり、ウイルス感染と喘息の関連は未だに明らかになっていない。本研究より、この多様性の原因としてウイルス量や感染回数、樹状細胞、cysLTs などが複雑に関与していることが明らかとなり、将来的には樹状細胞や cysLTs を標的とした治療によりウイルス感染による喘息の増悪や発症が抑制できる可能性が示唆された。

5) 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

当センターの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、また血液を採取した(約 1 ml)。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またはケモカインを測定した。

研究成果

平成 15 年 10 月より平成 17 年 6 月までの期間、当センター外来受診および入院したのべ 302 名(男児 183 名、女児 119 名、平均年齢 4.0 歳)の喘息児のうち発作時がのべ 123 名、発作なしがのべ 179 名であった。1) 発作時 123 名のうち、ウイルス学的検索をし得た 80 名中、ライノウイルスが 28 名、RS ウイルスが 25 名、その他が 6 名で、検出されなかったものが 21 名であった(表 1)。シーズン別の検討では、ライノウイルスは 5 月に最も多く検出され次に 12, 11 月が多かった。一方、RS ウイルスは 11 月に最も多く、次いで 6, 10 月に多く検出された。2) 末梢血中好酸球数、ECP、サイトカインを検査し得た児(喘息発作時 38 名、非発作時 51 名)では、ECP および IL-1b, IL-4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, GM-CSF, G-CSF, IFN-g, TNF-a, MCP-1, MIP-1a がそれぞれ統計学的に有意に上昇していた。

考察

呼吸器感染は、喘息の発症および増悪の原因として重要である。呼吸器感染の原因としては、ウイルス、細菌、マイコプラズマ、クラミジアなどがあるが、このうち喘息の発症および増悪因子として最も重要なのはウイルスと考えられる。小児の喘息発作の原因のうち感染によるものの中では、ライノウイルスと RS ウイルスがほとんどであり、ウイルス感染による喘息発作時の病態には、ウイルスによる直接的な好酸球の活性化および気道上皮を介して二次的な活性化を来している可能性が考えられた。今後その詳細な機序をさらに解明することによりウイルス感染喘息の早期予防治療に役立つ可能性が考えられた。

4 . 今後の課題

感染は気管支喘息のみならず全ての気道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。このような観点からも、ウイルス感染の影響を検討することは極めて重要である。予防、治療法を考える上でもその実態を明らかにすべく今後も研究を進展させさらなる詳細の解明が必要と考えられる。

5 . 社会的貢献

ウイルス感染は気管支喘息の発症、増悪因子として重要であることが認識されている。小児、特に乳幼児における気管支喘息発作はウイルス感染など感染症を合併していることが多く、また RS ウイルスなどの特定の感染症に引き続いて気管支喘息が発症することは経験的に知られている。さらに成人においても喘息増悪因子としてのウイルス感染は臨床上最も遭遇頻度の高い問題である。このように感染、特にウイルス感染はアレルギー疾患の発症ならびにその増悪に関与することが示唆されているが、感染が如何なる機序によりアレルギー疾患の発症ならびに増悪に関与するのかは未だ不明な点が多い。アレルギー疾患は遺伝的要因と環境要因が複雑に関係しているが、乳幼児期におけるウイルス感染が気管支喘息や COPD の発症に関与するとの考えもある。すなわちある種の遺伝的背景をもつ集団においては乳幼児期における RS ウイルスなどの感染が将来の疾患発症リスクを増加させる可能性が考えられる。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検討し考察を加えた。

- 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 (印は研究リーダー)

永井 厚志 (東京女子医科大学第一内科)、青柴和徹 (東京女子医科大学)、辻隆夫 (東京女子医科大学)、福地義之助 (順天堂大学)、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 17 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。しかしながらこれまでに喫煙以外の COPD の発症因子についての研究はほとんどない。一方、COPD の発症率には地域差がみられることから、環境因子としての大気汚染の影響についての検討が必要である。そこで平成 17 年度においては、喫煙以外の COPD のリスク要因を解析するために大気汚染に焦点をあてた研究を行なった。

3 . 平成 17 年度の研究の対象及び方法

1) COPD 患者のデータベース

全国の COPD の有病率については NICE study1 におけるデータベースを使用した (Fukuchi Y, et al. Respiration 9:458-463, 2004)。NICE study1 は、18 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。被検者は居住地から半径 10 km 以内にある検査拠点施設 (全国 28 施設) でスパイロメトリの検査を受けた。したがって本研究では各検査施設ごとの COPD の有病率を求め、同施設周辺における大気汚染物質濃度との関係を検討した。

2) 大気汚染物質濃度のデータベース

大気汚染防止法に基づき、全国の大気環境常時監視測定局において都道府県等が測定した結果を環境省がとりまとめ、国立環境研究所が提供する「国立環境研究所環境データベース」大気環境月間値年間値データファイルを利用した。1986 年 ~ 2000 年までのデータを取得したが、1990 年代に SO₂ の測定局が減少に転じたため、1986 年 1990 年までの 5 年間のデータを採用した。測定値としては二酸化硫黄 (SO₂)、窒素酸化物 [NO_x (NO + NO₂)]、非メタン炭化水素 (NMHC)、浮遊粒子状物質 (SPM) の年間平均値を用いた。測定地の採用基準としては、1) 調査対象施設を中心とした半径 10 km の圏内にあること、2) 自排局 (自動車排出ガス測定局 : 交差点等幹線道路上など) や地下街など非居住地の測定局は除く、3) 測定値が複数の施設の圏内にある場合は、より近い施設に振り分ける、4) 1 つの施設に複数の測定局がある場合は平均値を用いることとした。また複数の都市規模の被

検者が検査を受けている施設では、施設所在地の都市規模に一致する被検者だけを対象とした。

1) 2) のデータベースを用いて大気汚染物質が COPD の有病率に与える影響について調査解析した。

4. これまでに得られた研究成果

平成 15 年度の NICE study1 のデータベースを用いた研究や平成 16 年度の健康診断受診者の解析研究から、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) 女性の割合が多いこと、2) 喀痰症状が少ないこと、3) 胸部 CT では気腫所見（LAA）が少ないこと、4) 女性例では喘鳴の既往が多いこと、5) 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た。したがって私どもの過去 2 年間の研究成績からは、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。

5. 平成 17 年度の研究成果

1) COPD 有病率の地域差

NICE study1 により明らかにされた COPD の有病率には地域差が認められた。男性で最も有病率の高かった地域は、福岡県久留米大学病院周辺（40.0%）、最も低かった地域は千葉県館山市安房医師会病院周辺（2.6%）、一方、女性の有病率が最高であった地域は東京都順天堂医院周辺（12.7%）、最低の地域は兵庫県公立八鹿病院周辺（0%）であった。この地域差の原因は喫煙歴やハイリスク職歴（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、石綿取り扱い業など）、居住都市規模（小規模：人口 10 万人未満；中規模：人口 10 万人以上 50 万人未満；大規模：人口 50 万人以上）の差では説明ができなかった。

2) COPD 有病率と大気汚染物質濃度との関係

非喫煙者について、大気汚染物質の濃度により、検査施設を「低・中・高」の 3 段階に分け、「濃度×発症の有無」についてクロス集計を行い、²検定を行なったところ、SO₂ についてのみ、濃度による COPD 有病率に違いが見られた[低濃度(~0.0061 ppm) 2.1%;中濃度(0.0061 ~0.0075 ppm) 6.8%;高濃度(0.0075 ppm ~) 6.5%、 $p < 0.05$; SO₂ 濃度と COPD 有病率との相関関係 $r = 0.36$]、調査対象地域の SO₂ 濃度は、低濃度地域の千葉県館山市や秋田県平鹿市（0.003 ppm）と比べて、高濃度地域の東京都新宿区では 0.008 ppm（2.5 倍）、江東区豊洲では 0.012 ppm（4.0 倍）に増加していた。さらに非喫煙者について、説明変数に「被験者の年齢」、「大気汚染物質の濃度」、「性別」を、目的変数に「COPD 発症の有無」を設定し、ロジスティック回帰分析を実施し、各説明変数の寄与の度合いを求めた。SO₂ の分析では、3 説明変数とも「被験者の年齢 ($p < 0.001$)」、「SO₂ の濃度 ($p < 0.05$)」、「性別 ($p < 0.01$)」でも有意な影響が認められた。それぞれの COPD 発症に対するオッズ比は年齢（50 歳-60 歳）では 1.9、SO₂（0.003-0.008 ppm）では 2.5、性別（女性-男性）では 3.0 であった。

喫煙者については、説明変数として「被験者の年齢」、「SO₂ の濃度」、「性別」に、「1 日あたりの喫煙本数」と「喫煙変数」を加え、ロジスティック回帰分析を行なった。喫煙の影響は「喫煙本数 ($p < 0.001$ 、オッズ比 20 本あたり 2.2 倍)」、「喫煙年数 ($p < 0.05$ 、オッズ比 20 年あたり 1.5)」とも見られたが、「SO₂」、「性別」については影響を検出できなかった。

一方、NO_x(NO + NO₂)、NMHC、SPM については、喫煙者、非喫煙者ともに COPD の発症リスクとして

の影響は検出できなかった。

表1 喫煙者と非喫煙者の COPD 発症リスク

| オッズ比 比較 | 非喫煙者 | 喫煙者 (現在または過去に喫煙歴あり) |
|----------------------------------|------|------------------------|
| 年齢 (50-60歳) | 1.9 | 2.1 |
| 性別 (女性-男性) | 3.0 | 影響認められず |
| SO ₂ (0.003-0.008ppm) | 2.5 | 影響認められず |
| 喫煙本数 (20本) | - | 2.2 |
| 喫煙年数 (20年) | - | 1.5 |

6. 考察

本研究では、大気汚染物質濃度と COPD 有病率との関係について調査解析した。その結果、非喫煙者については、SO₂ 濃度の増加が COPD 発症のリスク要因となることが知られた。非喫煙者において SO₂ が 0.005 ppm 増加した時の COPD 発症リスクは 2.5 倍に増加したが、これは 1 日 10 本、30 年間の喫煙リスクと同程度と見積もられた。一方、喫煙者については SO₂ 濃度の COPD 発症率への影響は見出せなかった。この理由としては喫煙による影響が SO₂ の影響を上回った可能性が考えられた。

今回の解析では NICE study1 による調査時期よりも 10 年前にさかのぼった 1986 年から 1990 年までの大気汚染物質濃度のデータを使用した。SO₂ の濃度は過去 20 年間で 1/6 に減少していることから、過去にさかのぼるほどに高汚染地域と低汚染地域との濃度差は大きくなると考えられる。さらに SO₂ は主に工場の高煙突から排出されるため、均一に拡散して調査地域内での濃度差が少なかったことが、本研究において SO₂ の影響を検出しえた理由と考えられる。

一方、NO_x や SPM については COPD の発症率に対する影響を検出することはできなかった。その理由としては、1) 今回調査した一般局 (一般環境大気測定局) での NO_x 濃度はほとんどが環境基準以下の低値であったこと、2) NO_x や SPM の主たる発生源は自動車であることから、その影響は一般局で測定された濃度解析には反映されなかったことが考えられる。

7. 今後の課題

本研究においては、大気汚染物質が喫煙以外の COPD の環境要因である可能性が示された。COPD 発症リスクへの影響は SO₂ についてのみ観察されたが、本汚染物質についてはすでにその対策が講じられ、現在までに環境中の濃度は急激に減少していることを考慮すると、本格的な対策が講じられる以前の SO₂ の増加が COPD の発症に影響したと考えられる。一方、NO_x と SPM については COPD の発症リスクとしての影響を確認できなかった。NO_x や SPM の影響を解析するためには自排局 (自動車排出ガス測定局) の環境測定データを用いるとともに、被検者の居住エリアを住宅街と幹線道路沿いとに分離したうえでの曝露評価が必要と考えられる。

8. 社会的貢献

過去 3 年間の研究から喫煙以外の環境因子を含む COPD の発症リスクを明らかにした。喫煙以外の COPD の発症リスクとして、1) 性差 (女性)、2) 職歴 (粉塵職場環境)、3) 喘息素因、4) 大気

SO₂ 濃度の 4 点が抽出された。非喫煙者における COPD の発症リスクは、女性では 3 倍、SO₂ 濃度については 0.005 ppm の増加あたり 2.5 倍に増加するものと見積もられた。以上の成績から COPD の発症には喫煙以外にも遺伝要因（性差、喘息素因）と環境要因（職場や屋外の大気汚染）が複合的に寄与することが明らかになった。一方、喫煙者においてはこれらの要因の寄与がみられなかったことから、喫煙が他要因を上回る COPD の発症リスクであることが確認された。

【研究課題全体の総括】

近年我が国で増加が懸念される気管支ぜん息は、複雑かつ複合的な要因が関与すると考えられるが、そのうちの想定される発症・増悪リスクとして、1) デーゼル排気微粒子(DE)、2) 内分泌かく乱物質（いわゆる環境ホルモン）及び3) ウイルス感染を取り上げ、その影響を動物モデル、試験管内、または臨床検体を用いて検討した。また、従来考えられていたよりも大幅に有病率が高いことが明らかとなった COPD については、その4) 喫煙以外の COPD の発症因子解明を目的に、我が国初の大規模疫学調査（NICE study）のデータを用いて調査した。特に大気汚染物質の関与について検討した。

気管支ぜん息に関する研究では、これらの3要因について、同一の研究組織において3年間継続して検討を進めることができた。研究班内での相互の討論を通じて、ぜん息の発症・増悪の要因を多面的に追求できたことは意義深いと思われる。

- 1) DE においては、ぜん息モデルマウスでの増悪への急性および慢性影響、さらに先行曝露によるぜん息モデル発症に与える影響を検討した。実際の汚染環境に匹敵する低濃度反復曝露によってぜん息モデルでの発症・増悪への影響を明らかにした点で画期的と思われる。さらに、感受性の異なる2系統の検討により、その分子機構を追求し、高感受性因子に関して抗オキシダント酵素群の意義が示唆されたことは意義深い。今後の高リスク群のスクリーニング法の開発や化学予防への道を開いたことは重要と思われる。
- 2) 内分泌かく乱物質（いわゆる環境ホルモン）では、胎盤、母乳を介しての曝露が次世代免疫系にどのような影響をあたえるかを検討した。試験管内の検討ではこれら物質の添加によりアレルギー反応に重要な役割を果たす Th2 リンパ球への分化誘導作用などが認められた。さらに、胎児期から乳児期における内分泌攪乱物質への曝露による経口免疫寛容誘導機構の障害は、アレルギー性疾患の発症のみならず、自己免疫疾患の発症にも影響する可能性が考えられる。内分泌かく乱物質（いわゆる環境ホルモン）による以上の知見はきわめてオリジナリティの高い研究成果と考えられる。
- 3) ウイルス感染では、各種ウイルスを気道上皮に感染させる実験系やマウスの実験系においてウイルス感染により誘導されるサイトカイン群が明らかになり、さらにその細胞内機構の詳細が判明したことにより、新たなぜん息増悪に対する予防・治療手段の開発へつながると期待される。

COPD と大気汚染物質の関連については、

- 4) 我が国初の全国疫学調査である NICE study1 のデータおよび東京女子医科大学検診センターのデータにより、非喫煙 COPD 患者での背景因子として、男性では粉塵環境での職歴（大工、機械工、石綿取り扱い、機織工など）、女性では喘鳴の既往が非喫煙 COPD 患者の特徴として抽出された。また、気道分泌症状が強く、画像上気腫病変が少ないことなども注目された。さらに国立環境研究所が提供する「国立環境研究所環境データベース」大気環境月間値年間値データファイルを利用し、COPD の有病率には地域差があることが示され、その原因のひとつとして大気中の二酸化硫黄（SO₂）濃度の変動が寄与していることが明らかにされた。喫煙以外の COPD の環境要因として大気汚染物質の影響が示唆された今回の結果は、海外からも注目されるであろう。

【3年間のまとめ】

気管支ぜん息に関する研究では、以上の3要因について、3年間継続して検討を進めることができた。DE においては、低濃度反復長期曝露の実験形を確立し、ぜん息モデルマウスでの増悪への急性および慢性影響、さらに先行曝露によるぜん息モデル発症に与える影響を検討した。実際の汚染環境に匹敵する低濃度反復曝露によってぜん息モデルでの発症・増悪への影響を明らかにした点で画期的と思われる。さらに、感受性の異なる2系統の検討により、その分子機構を追求し、高感受性因子に関して抗オキシダント酵素群の意義が示唆されたことは意義深い。今後の高リスク群のスクリーニング法の開発や化学予防への道を開いたことは重要と思われる。内分泌かく乱物質（いわゆる環境ホルモン）では、胎児期から乳児期における内分泌攪乱物質への曝露が、アレルギー性疾患の発症に影響する可能性が考えられ、今後とも詳細なリスク評価が必要であることを示唆した。ウイルス感染では、各種ウイルスを気道上皮に感染させる実験系やマウスの実験系においてウイルス感染により誘導されるサイトカイン群が明らかになり、さらにその細胞内機構の詳細が判明したことにより、新たなぜん息増悪に対する予防・治療手段の開発へつなげると期待される。

COPD と大気汚染物質の関連については、我が国初の全国疫学調査である NICE study1 のデータのデータにより、非喫煙 COPD 患者での背景因子として、大気中の二酸化硫黄（SO₂）濃度の変動が寄与していることが明らかにされた。喫煙以外の COPD の環境要因として大気汚染物質の影響が示唆された今回の結果は、海外からも注目されるであろう。

以上、ディーゼル排気微粒子、内分泌攪乱物質のぜん息やアレルギー病態の発症および増悪因子としての関与が明らかにされた。またその分子機構の一部が解明された。これらが、ヒトへの影響をスクリーニングする手法の開発へ貢献しうると思われる。ウイルス感染のぜん息増悪因子としての重要性が明らかになり、その分子機構や治療薬剤の作用の特徴や限界が明確にされた。COPD の非喫煙発症因子として大気汚染物質が寄与しうることを明らかにできた。以上の知見は、より科学的根拠に基づいた、効率的な大気汚染対策立案に役立つと期待される。