

Ⅰ－１ 気管支ぜん息の発症リスク低減に関わる因子の検索と管理・指導への応用に関する調査研究（ディーゼル排気微粒子について）

代表者：滝澤 始

【研究課題全体の目的、構成】

ディーゼル車両から排出される大気汚染物質、特に微粒子物質は都市部における微小粒子状物質の主要なものとして、その呼吸器系への健康影響が懸念され調査研究が進められてきた。その結果、近年増加する気管支ぜん息などのアレルギー性呼吸器疾患の増悪や発症への影響が示されてきたが、その機序の詳細については不明な点が残されている。私たちは、実際の大気環境中でありうる低い濃度で、かつ長期間継続的にディーゼル排気(Diesel Exhaust, DE)に曝露するマウスの系を確立し、気道の過敏性が亢進するとともにアレルギー炎症に関連の深いサイトカイン群の発現・産生が増強することを明らかにした。さらにぜん息モデル動物における急性期の増悪影響、慢性期での気道リモデリングへの影響、さらに発症への影響について報告してきた。これらの健康影響に対する有効な対策を講じる上で不可欠な課題が、個人における DE に対する感受性の差である。私たちは異なる 2 つのマウス系の比較検討から、その感受性要因として、抗オキシダント酵素、特に heme oxidase (HO)-1 とその発現調節因子 Nrf-2 を見出した。本調査研究では、以上の研究成果をふまえ、

- 1) まず実験モデルにおけるぜん息発症・増悪に関わる感受性遺伝子を、種々の手法を用いて同定し、
- 2) さらにこれらを危険因子としてスクリーニングするために適切なバイオマーカー開発を試みる。
- 3) 次に、感受性のある系統マウスに抗オキシダント物質を各種予防的に投与することにより、DE による喘息は症リスクが低減できるか否かを検証する。

以上の研究により、ディーゼル排気曝露に対する高リスク群のスクリーニングのためのバイオマーカーの開発と、健康被害のリスク低減のための化学予防を含む諸対策が、効率的かつ科学的根拠に基づいて実施するための基礎が確立されると期待する。

1 研究従事者（○印は研究リーダー）

- 滝澤 始 （帝京大学溝口病院第四内科）
- 工藤 翔二 （日本医科大学呼吸器感染腫瘍内科）
- 吾妻 安良太（日本医科大学呼吸器感染腫瘍内科）
- 李 英姫 （日本医科大学衛生学公衆衛生学）
- 菅原 勇 （結核研究所分子病理学）
- 幸山 正 （東京大学呼吸器内科）
- 山内 康宏 （東京大学呼吸器内科）

2 平成19年度の研究目的

今年度は、以上の結果をふまえ、DE 暴露によって引き起こされる気道炎症病態における酸化ストレスの役割を一層明らかにするために、以下の検討を行った。

1) 低濃度かつ長期間継続的にディーゼル排気粒子 (Diesel Exhaust Particles, DEP) の暴露によるマウス気道炎症反応への系統差 (DEP 単独の作用) をさらに追求し、DE 暴露と酸化ストレスとの関連を検討した。すなわち、主要な肺組織の抗酸化酵素である glutathione-S-transferase (GST)-M1 蛋白発現について Western blot 方法にてタンパクレベルで定量的に検討した。さらに、酸化ストレス指標である 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) の濃度について、高感度 8-OHdG Check ELISA キットにて検討した。また、液性免疫に与える影響を確認するために、血清中 IgG1, IgG2a, IgE の変化を ELISA 法にて検討した。

2) 続いて、低濃度かつ長期間継続的に DEP の曝露によるアレルギー性気管支ぜん息モデルでの気道炎症反応の系統差 (アレルギー気管支ぜん息病態に及ぼす影響) をさらに追求し、特に、好酸球と関連の深いサイトカイン・ケモカインおよび液性免疫への影響について検討した。すなわち、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) の上清の中 IL-5, Eotaxin, RANTES などのサイトカインのタンパク濃度について ELISA 法にて測定した。さらに、血清中 IgG1, IgG2a, IgE の濃度を ELISA 法にて検討した。

3) 抗酸化酵素の重要な転写因子である Nrf2 ノックアウトマウスにおける低濃度 DEP 曝露の気道炎症反応への影響について検討した。

4) さらに、本研究の成果をヒトに応用するための第一段階として、安全かつ有用なバイオマーカーの検索を目標に、ヒトボランティアにおける呼気濃縮液採取の基礎的検討を行った。

3 平成19年度の研究の対象及び方法

1) 低濃度かつ長期間継続的 DEP 曝露による、アレルギー性気管支ぜん息モデルでの気道炎症反応の系統差 (アレルギー気管支ぜん息病態に及ぼす影響)

動物：生まれた直後の純系マウス雌 C57BL/6 と BALB/c を用いた。

実験群：コントロール群 (Cont)、DE 曝露群 (DE)

DE 曝露：100ug/m³、1日7時間、週5日間持続的に2ヶ月～6ヶ月間吸入させた。

実験スケジュール：

生まれた直後の C57BL/6 マウスと BALB/c マウスをランダムにコントロール群、DE 曝露群に分ける。コントロール群の飼育は結核研究所内の specific pathogen free (SPF) で行い、DE 曝露群は 100ug/m³ に DE チャンバーに入れて DE 曝露を施行しながら飼育した。DE 曝露 6 ヶ月後、以下の項目について検討した。

気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage, BAL)：気管を全身麻酔下に露出し、カニューレーションし、既報に準じて気管支肺洗浄を行い、遠心分離により気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) の上清の中 IL-5, Eotaxin, RANTES などのサイトカインのタンパク濃度について ELISA 法にて測定した。

蛋白抽出・Western blot 方法：全身麻酔下にて脱血 sacrifice し、速やかに肺を取り出し、液体窒素にて急速冷凍後 -80℃ にて凍結保存し、蛋白抽出に提供した。肺組織を抗酸化酵素である

glutathione-S-transferase(GST)-M1 蛋白発現について Western blot 方法にて定量的に検討した。

DNA 抽出・8-OHdG 測定：全身麻酔下にて脱血 sacrifice し、速やかに肺を取り出し、液体窒素にて急速冷凍後 -80℃にて凍結保存し、DNA 抽出に提供した。酸化ストレス指標である 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)の濃度について、高感度 8-OHdG Check ELISA キットにて検討した。

血清を採り、IgG1, IgG2a, IgE の濃度を ELISA 法にて検討した。

2) 低濃度かつ長期間継続的に DEP の曝露によるアレルギー性気管支ぜん息モデルでの気道炎症反応の系統差（アレルギー気管支ぜん息病態に及ぼす影響）：サイトカイン群への影響と液性免疫応答の検討

動物：生まれた直後の純系マウス雌 C57BL/6 と BALB/c を用いた。

実験群：Ovalbumin(OVA)群、DE+OVA 群

DE 曝露：100ug/m³、1 日 7 時間、週 5 日間持続的 6 ヶ月間吸入させた。

マウス喘息モデル作製：OVA 感作は day 0, 6, 7 に 20 μg、腹腔内投与により行い、day 21 に OVA 100 μg、点鼻によりチャレンジした。

実験スケジュール：生まれた直後の C57BL/6 マウスと BALB/c マウスをランダムに Ovalbumin(OVA)群、DE+OVA 群に分ける。Ovalbumin(OVA)群の飼育は結核研究所内の specific pathogen free (SPF) で行い、DE+OVA 群は 100ug/m³ の DE チャンバーに入れて DE 曝露を施行しながら飼育した。DE 曝露 21 週目から、OVA 感作をスタートし、OVA チャレンジ 24 時間後、以下の項目について検討した。

①気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage, BAL)：気管を全身麻酔下に露出し、カニュレーションし、既報に準じて気管支肺洗浄を行い、遠心分離により気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) の上清の中 IL-5, Eotaxin, RANTES などのサイトカインのタンパク濃度について ELISA 法にて測定した。

②血清を採り、IgG1, IgG2a, IgE の濃度を ELISA 法にて検討した。

3) Nrf2 ノックアウトマウスにおける低濃度ディーゼル排気粒子曝露の気道炎症反応への影響

C57BL/6、6 週令、Nrf2+/+と Nrf2-/- マウスを用い、①Control 群 ②DEP 群 を設定した。DEP は 100 μg/m³、平均 7 時間/日、5 日/週、8 週間曝露した。Control 群は SPF で飼育した。DEP 曝露 8 週後、AHR(BAXO)測定、肺病理組織学検討、BAL 細胞分画算定・上清の炎症性サイトカイン・ケモカイン測定(ELISA)、血清の IgE 濃度測定などを行った。

4) ヒトボランティアにおける呼気濃縮液の採取に関する予備的検討

1. R-tube による呼気凝縮液の採取の検討

健常ボランティア 3 名において、R-tube (Respiratory Research Co, Charlottesville, VA) 〈図 IV-1〉を用いて、5 分、10 分、15 分での呼気凝縮液を採取を行った。

2. 呼気凝縮液の量の検討を行った。

3. EBC 中の微量サイトカインの MUST ag 法による測定

従来の ELISA の検出下限濃度より、10⁻¹～10⁻² の濃度まで検出可能な

MUSTag 法 (Synthera Technologies, Tokyo, Japan) 〈図 IV-2〉を用いることにより、EBC 内の微量なサイトカインを検出を試みた。

4. EBC 中の CuZn SODs の ELISA による測定

市販の ELISA キットにて行った。

5. EBC 中の 8-OHdG の ELISA による測定を行った。

4 平成 19 年度の研究成果

1) 低濃度・長期 (6 ヶ月) DEP 単独曝露により、前年度の成果として、BALB/c マウスでは、BALF 中マクロファージの遊走因子である MCP-1 が有意に上昇するとともに、DEP を貪食した肺胞マクロファージの気腔内への浸潤が増多し、他方明らかな炎症病巣は見られなかった。肺組織の抗酸化ストレス酵素である GST-M1 の発現がコントロール群と比較し増強していることにより、BALB/c マウスでは、DEP の酸化ストレスに対する抗酸化防御反応により自然免疫反応段階に止まっている可能性が示唆された。そこで、今年度は、肺局所の GST-M1 タンパクの発現をウェスタンブロット法で定量し、その BALB/c マウスでの増加を確認した。また、肺胞マクロファージの貪食能に関与する液性免疫反応として、血清中の IgG1, IgG2a の増加も確認でき、また酸化ストレスの指標とされる 8-OHdG の増加が BALB/c では DE 曝露によっても認められないことを見出した。

一方、低濃度・長期 DEP 単独曝露により、C57BL/6 マウスでは、リンパ球の浸潤を伴う明らかな気道周囲の炎症病巣が見られた。BALF 中 IL-12 の産生が有意に上昇していたが、抗酸化酵素の発現はコントロール群 (非曝露群) と比較し低下していることから、C57BL/6 では DEP の酸化ストレスに対する抗酸化防御反応が弱く、リンパ球を動員した炎症反応により生体のバランスを保持している可能性が示唆された。C57BL/6 マウスで低濃度・長期 DEP 単独曝露中一過性に観察された好酸球浸潤や気道過敏性の亢進は、以上の防御反応が一時的に充分発動されなかったためと推論された。以上のことをより明らかにするために、C57BL/6 における肺の抗酸化ストレス酵素である GST-M1 の発現を mRNA レベルに加えてウェスタンブロットによりタンパクレベルでも検討し、DE によって抑制されることを見出した。さらに、酸化ストレス指標である 8-OHdG の増加が確認された。以上の知見から、DE 単独の長期曝露による気道への影響の系統差には、酸化ストレスとその防御反応に違いが関与していることが強く示唆された。

2) OVA によるアレルギー性気道炎症発症病態において、低濃度・長期 DEP 曝露の影響は、アレルギーによるアレルギー性気道炎症の程度により、DEP の酸化ストレスに対する宿主の抗酸化防御反応に差異が生じる可能性が示唆され、抗酸化剤である NAC 投与により DEP の気道炎症病態への影響が明らかに抑制されることが確認された。従来、DEP は IgE 抗体の産生を増加することによりアレルギー性炎症反応を増悪させると報告されているが、今年度の追加実験の結果から、DEP の曝露により、いずれのマウスにおいても IgE の変化は認められなかった。OVA によるアレルギー性気道炎症発症病態において、低濃度・長期 DEP 曝露の実験系において、BALB/c マウスでの明らかなアレルギー性気道炎症病態の増悪が認められたが、これは DEP のアジュバントとしての作用ではなく、DEP による酸化ストレスが OVA によるアレルギー性気道炎症病態をさらに増悪させたと考えられた。

3) Nrf2 ノックアウトマウスにおける低濃度ディーゼル排気粒子曝露の気道炎症反応への影響
低濃度 DEP 曝露により、Nrf2^{-/-}マウスでは Nrf2^{+/+}マウスと比較し、

- ① 気道過敏性の明らかな増強が示された [図 1]。
- ② 肺組織像では PAS 陽性粘液細胞の増生が見られた [図 2]。
- ③ BALF 中マクロファージの有意に減少し、リンパ球、好酸球が有意に上昇した。
- ④ BALF 中 IL-13、TARC が有意に上昇した。
- ⑤ 血清中 IgE の濃度の変化は認められなかった。

以上から、DE に対する気道反応の感受性因子として Nrf2 が重要な役割を演じていることが明らかにされた。

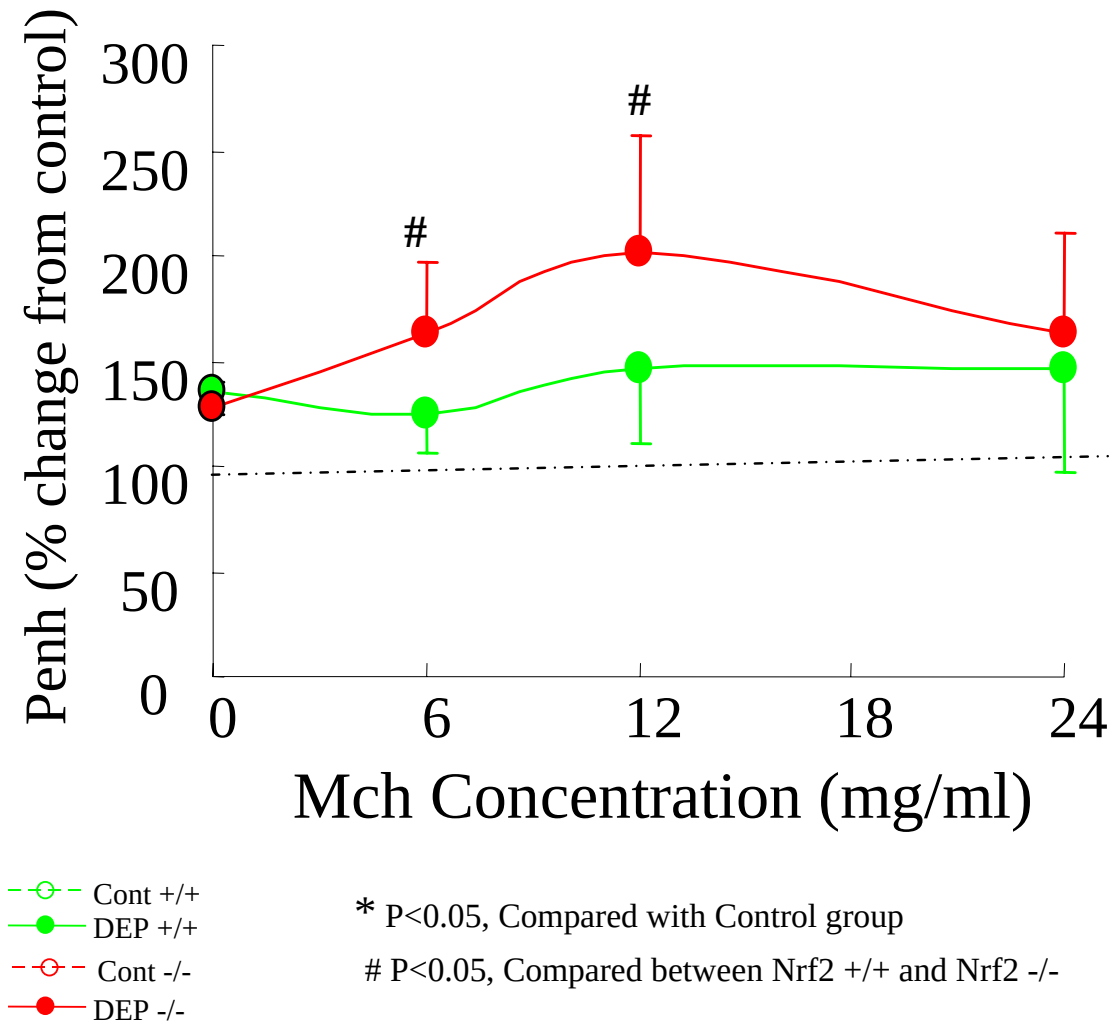


図 1

気道過敏性は Nrf2 欠損マウスで有意に亢進した

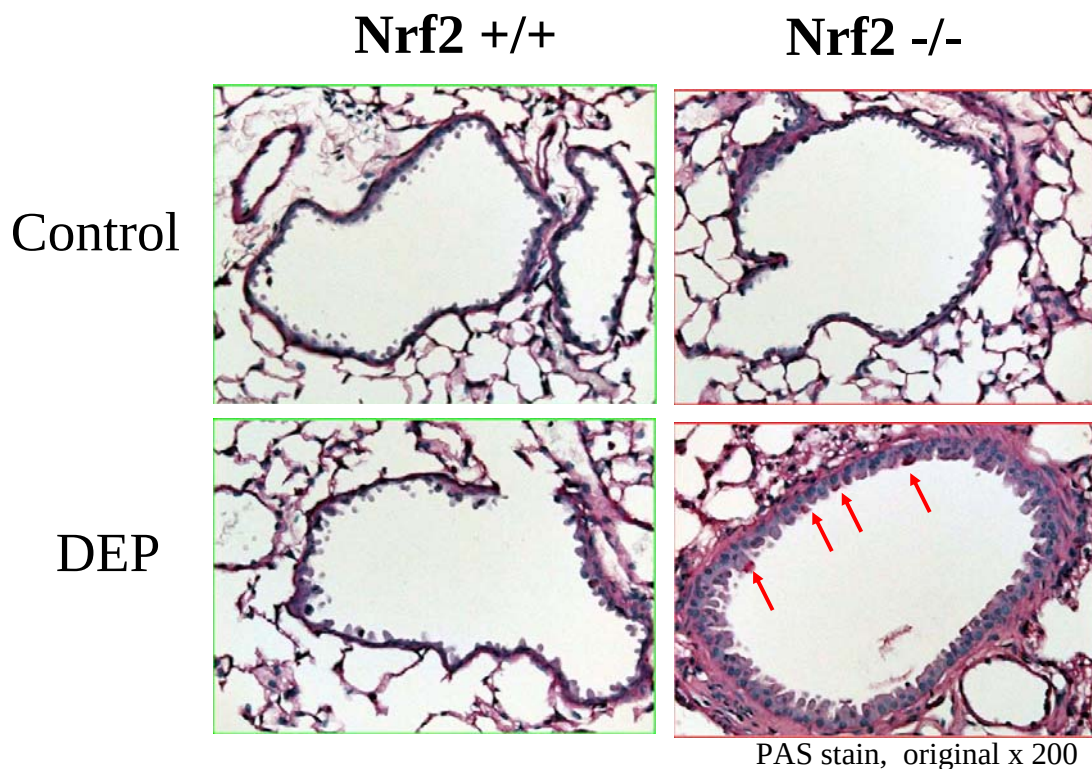


図 2

肺病理組織像：Nrf2 欠損マウスでは PAS 陽性細胞が増加した

4) ヒトボランティアによる呼気濃縮液の採取法に関する予備的検討

従来の DE 暴露のバイオマーカーは血清、尿、喀痰、などいずれも簡易かつ侵襲性のないサンプルの採取に一長一短がある。最近、報告が増えてきた呼気濃縮液は安静換気によって採取されるサンプルでかつ気道の炎症病態の解析に有用性が認められている。前年度まで検討してきたマウスでの実験的検討の成果をヒトに還元するためには、適切なサンプルの採取法の確立が必須である。そこで、今年度は、ボランティアにおける呼気濃縮液(exhaled breath condensates, BEC)の採取法に関する予備的検討を行った。その結果、健常成人においては、

1. EBC の採取量は、時間とともに増加する。
2. EBC 採取は、呼吸回数には依存しない。
3. 現在使用可能な高感度サイトカイン定量法である MUSTag 法では、IL-1a, IL-8, EGF, VEGF は検出感度以下であり、FGF, HGF は測定可能であった。
4. 主要な抗酸化酵素の一つ Cu/ZnSOD は測定感度以下。
5. 酸化ストレスマーカーである 8-OHdG は、測定可能であった。
6. また、検出された個々のデータにおいては、採取時間に影響されなかった。

5 考察

DE 暴露に対する感受性が異なる 2 つの系統マウスでの比較を、低濃度・長期（6 ヶ月）DEP 単独曝露により行い、BALB/c マウスでは、BALF 中マクロファージの遊走因子である MCP-1 が有意に上昇するとともに、DEP を貪食した肺胞マクロファージの気腔内への浸潤が増多し、明らかな炎症病巣は見られなかった。肺組織の抗酸化ストレス酵素である GST-M1 の発現がコントロール群と比較し増強していることにより、BALB/c マウスでは、DEP の酸化ストレスに対する抗酸化防御反応により自然免疫反応段階に止まっている可能性が示唆された。そして今年度は、前年度に課題とされた酸化ストレス応答をより詳細に検討し、低感受性マウスである BALB/c における肺局所の GST-M1 タンパクの発現をウェスタンブロット法で定量し、その DE 長期曝露による増加を確認した。また、肺胞マクロファージの貪食能に関与する液性免疫反応として、血清中の IgG1, IgG2a の増加も確認でき、また酸化ストレスの指標とされる 8-OHdG の増加が BALB/c では DE 曝露によっても認められないことを見出した。

一方、低濃度・長期 DEP 単独曝露により、C57BL/6 マウスでは、リンパ球の浸潤を伴う明らかな気道周囲の炎症病巣が見られた。BALF 中特異的免疫をリンクする重要なサイトカインである IL-12 の産生が有意に上昇し、DE に対する感受性は IL-12 に依存する可能性が示唆された。抗酸化酵素の発現は、コントロール群（非曝露群）と比較し低下していることから、C57BL/6 では DEP の酸化ストレスに対する抗酸化防御反応が弱く、リンパ球を動員した反応によって生体のバランスをとっている可能性が示唆された。また、低濃度・長期 DEP 単独曝露により、C57BL/6 マウスでは曝露期間 6 ヶ月の時点で、気腔内への好酸球浸潤が認められ BALF でも確認されたが、この反応がさらに曝露を継続すると喘息類似のアレルギー性炎症病態に進展していくのか否かは不明である。昨年度の短期曝露で認められた気道過敏性の亢進と同様、DE 曝露による酸化ストレスと生体の抗酸化防御反応のダイナミックなバランスにより時期によって異なる反応が観察されるのかもしれない。前年度の短期間曝露でも認められた IL-13 の増加が 6 ヶ月間という長期にわたる曝露によっても認められたことは、この影響が慢性曝露によって恒常的に及ぼされる影響であることを強く示唆する。DE 曝露により、気管支局所においては IL-13 によってもたらされる「喘息準備状態」と抗酸化防御機構による「ネガティブフィードバック」とが微妙なバランスをとっていることが類推される。そこで、今年度は、C57BL/6 マウスにおいても、酸化ストレス応答を検討した。肺の抗酸化ストレス酵素である GST-M1 の発現を mRNA レベルに加えてウェスタンブロットによりタンパクレベルでも検討し、DE によって抑制されることを見出した。さらに、酸化ストレス指標である 8-OHdG の増加が確認された。

以上の知見から、DE 単独の長期曝露による気道への影響の系統差には、酸化ストレスとその防御反応に違いが関与していることが強く示唆された。

さらに、今年度の主要テーマであったアレルギー性喘息モデルでの感受性の差については、昨年度に続き検討した。OVA によるアレルギー性気道炎症発症モデルにおいて、BALB/c マウスのほうがより顕著な増悪影響を受けた。すなわち、DE 低濃度・長期曝露により、好酸球を主体とした炎症細胞の浸潤や、杯細胞の増生などが明らかに増悪した。それに比較して、C57BL/6 マウスの喘息モデルでは DE に感受性は低く、DEP による明らかな影響が認められなかった。この原因の詳細は不明であるが、ひとつの可能性として、DE 単独曝露に対する低感受性マウスである BALB/c マウスにおいて強く誘導された抗酸化ストレス酵素 GST-M1 の発現が、アレルギー喘息モデルではむしろ減弱することが観察された。つまり、OVA によるアレルギー気道炎症病態が成立することに伴って、気道局所の

抗酸化防御機構が減弱したため、DEP の酸化ストレスに対する宿主抗酸化防御反応が低下し、DEP のアレルギー気道炎症反応への増悪作用が顕著に現れた可能性が示唆された。

さらに、抗酸化剤であるNAC投与によりDEPの気道炎症病態への影響が明らかに抑制されることが確認された。従来、DEPはIgE抗体の産生を増加することによりアレルギー性炎症反応を増悪させると報告されているが、今年度の追加実験の結果から、DEPの曝露により、いずれのマウスにおいてもIgEの変化は認められなかった。OVAによるアレルギー性気道炎症発症病態において、低濃度・長期DEP曝露の実験系において、BALB/cマウスでの明らかなアレルギー性気道炎症病態の増悪が認められたが、これはDEPのアジュバントとしての作用ではなく、DEPによる酸化ストレスがOVAによるアレルギー性気道炎症病態をさらに増悪させたと考えられた。

Nrf2は、DEへの感受性の異なる2つの系統のマウスにおいて有意な発現の差を認めた抗酸化酵素群の転写調節因子として決定的な因子である。そこで、以上の検査を踏まえてNrf2ノックアウトマウスにおける低濃度ディーゼル排気粒子曝露の気道炎症反応への影響を検討した。C57Black/6の遺伝背景をもつNrf2ノックアウトマウスでの検討で、低濃度長期のDEP曝露により、Nrf2^{-/-}マウスではNrf2^{+/+}マウスと比較し、気道過敏性の明らかな増強が示された。肺組織像ではPAS陽性粘液細胞の増生が見られた。さらに、BALF中マクロファージの有意に減少し、リンパ球、好酸球が有意に上昇した。リンパ球、好酸球に関連の深いサイトカイン群のうちBALF中IL-13、TARCが有意に上昇した。一方、血清中IgEの濃度の変化は認められなかった。この事実は、DEの喘息病態悪化要因はIgE抗体誘導におけるアジュバント作用ではないことを示唆した。

以上から、DEに対する気道反応の感受性因子として、抗酸化酵素群の転写調節因子Nrf2が重要な役割を演じていることが明らかにされた。

本研究の将来における究極の目標は、ヒトのDEに対する高感受性群を安全かつ確実にスクリーニングするために、適切なバイオマーカーとその測定法を開発することになる。近年、さまざまなバイオマーカーが提唱される中で注目されつつあるのが、呼気濃縮液の利用である。

そこで、今年度はヒトボランティアによる呼気濃縮液の採取法に関する予備的検討も行った。呼気濃縮液は安静換気によって採取されるサンプルでかつ気道の炎症病態の解析に有用性が認められている。前年度まで検討してきたマウスでの実験的検討の成果をヒトに還元するためには、適切なサンプルの採取法の確立が必須である。そこで、今年度は、ボランティアにおける呼気濃縮液(exhaled breath condensates, BEC)の採取法に関する予備的検討を行った。その結果、健常成人においては、EBCの採取量は、時間とともに増加すること、EBC採取は、呼吸回数には依存しないこと、現在使用可能な高感度サイトカイン定量法であるMUSTag法では、IL-1a, IL-8, EGF, VEGFは検出感度以下であり、FGF, HGFは測定可能であったことなどが明らかとなった。また、マウスの実験で高感受性群において上昇が確認された酸化ストレスマーカーである8-OHdGは、測定可能であった。また、検出された個々のデータにおいては、採取時間に影響されなかった。今回の検査結果により、呼気凝縮液採取時間は、5分間で妥当と考えられる。

6 次年度以降の計画

Nrf2 は、DE への感受性の異なる 2つの系統のマウスにおいて有意な発現の差を認めた抗酸化酵素群の転写調節因子として決定的な因子である。今年度の実験によって、DE に対する気道反応の感受性因子として、抗酸化酵素群の転写調節因子 Nrf2 が重要な役割を演じていることが明らかにされた。

そこで、来年度には、以上の検査を踏まえて、C57Black/6 の遺伝背景をもつ Nrf2 ノックアウトマウスに加えて、BALB/c の遺伝背景をもつ Nrf2 ノックアウトマウスにおける低濃度ディーゼル排気粒子曝露の気道炎症反応への影響を検討する。そして、両者の反応性を比較することにより、DE 暴露による生体影響と DE によって及ぼされる酸化ストレスとの関連性が一層明らかになると期待される。続いて、これらノックアウトマウスにおいて、アレルギー性喘息モデルを作成し、喘息病態への影響を詳細に検討する。同時に、その際の酸化ストレスの程度や抗酸化ストレス酵素群への影響も観察したい。

本研究の将来における究極の目標は、ヒトの DE に対する高感受性群を安全かつ確実にスクリーニングするために、適切なバイオマーカーとその測定法を開発することになる。近年、さまざまなバイオマーカーが提唱される中で注目されつつあるのが、呼気濃縮液の利用である。今年度のヒトボランティアによる呼気濃縮液の採取法に関する予備的検討により、安静換気下での EBC の採取量は、時間とともに増加すること、EBC 採取は、呼吸回数には依存しないこと、サイトカイン群の少なくとも一部は測定可能であったことなどが明らかとなった。また、マウスの実験で高感受性群において上昇が確認された酸化ストレスマーカーである 8-OHdG は、測定可能であった。今回の検査結果により、呼気凝縮液採取時間は、5分間で妥当と考えられる。来年度は、これらの成果をもとに、より多数例のボランティアでの検討とともに、同意を得た喘息患者においても採取と測定を実施して、喘息病態における酸化ストレス状態の検討、さらには DE 暴露状況との関係についても展望したい。

7 社会的貢献

今年度は、将来のヒトにおける DE に対する高感受性群のスクリーニングに関して、大きな進展が 2つ見られた。

第一に、Nrf2 の DE 暴露によって引き起こされる気道炎症における重要な役割が明らかにされたことである。Nrf2 は、DE への感受性の異なる 2つの系統のマウスにおいて有意な発現の差を認めた抗酸化酵素群の転写調節因子として決定的な因子である。今年度の実験によって、DE に対する気道反応の感受性因子として、抗酸化酵素群の転写調節因子 Nrf2 が重要な役割を演じていることが明らかにされた。そこで、来年度には、以上の検査を踏まえて、C57Black/6 の遺伝背景をもつ Nrf2 ノックアウトマウスに加えて、BALB/c の遺伝背景をもつ Nrf2 ノックアウトマウスにおける低濃度ディーゼル排気粒子曝露の気道炎症反応への影響を検討する。そして、両者の反応性を比較することにより、DE 暴露による生体影響と DE によって及ぼされる酸化ストレスとの関連性が一層明らかになると期待される。続いて、これらノックアウトマウスにおいて、アレルギー性喘息モデルを作成し、喘息病態への影響を詳細に検討する。同時に、その際の酸化ストレスの程度や抗酸化ストレス酵素群への影響も観察したい。こうした一連の実験的研究により、DE による健康被害が酸化ストレスとその抗酸化防御との関連で明らかにされれば、高感受性ヒト群の的確なスクリーニングのためのバイオマーカーとして期待できると思われる。

第二の進展は、呼気濃縮液の利用に実効性が見えてきたことである。今年度のヒトボランティアによる呼気濃縮液の採取法に関する予備的検討により、安静換気下での EBC の採取量は、時間とともに

増加すること、EBC 採取は、呼吸回数には依存しないこと、サイトカイン群の少なくとも一部は測定可能であったことなどが明らかとなった。また、マウスの実験で高感受性群において上昇が確認された酸化ストレスマーカーである 8-OHdG は、測定可能であった。今回の検査結果により、呼気凝縮液採取時間は、5 分間で妥当と考えられる。来年度は、これらの成果をもとに、より多数例のボランティアでの検討とともに、同意を得た喘息患者においても採取と測定を実施して、喘息病態における酸化ストレス状態の検討、さらには DE 暴露状況との関係についても展望したい。

【発表学会・論文】

学会：

1)Ying-Ji Li, Aki Matsumoto, Hajime Takizawa, Arata Azuma, Tomoyuki Kawada, Isamu Sugawara, and Shoji Kudoh. Mouse Strain Differences in Airway Inflammatory Responses Caused by Long-Time Low-Dose Diesel Exhaust Exposure. 2007 ATS International Conference in San Francisco, 5/18-5/23, California. Poster Discussion session, C26 - Diesel Update.

2)李英姫、滝澤始、吾妻安良太、菅原勇、幸山正、山内康宏、高橋智、山本雅之、川田智之、工藤翔二. Nrf2 ノックアウトマウス喘息モデルにおける低濃度ディーゼル排気粒子曝露の気道炎症反応への影響. 第 11 回アレルギー・気道上皮細胞学術大会 (2007,12,8 東京シェーンバッハ・サボー)

3)李英姫、滝澤始、吾妻安良太、菅原勇、幸山正、山内康宏、高橋智、山本雅之、川田智之、工藤翔二. Nrf2 ノックアウトマウスにおける低濃度ディーゼル排気粒子曝露の気道炎症反応への影響. 第 78 回日本衛生学会総会 (2008, 3, 28-31 熊本市民会館)

論文：

1.Li YJ, Kawada T, Matsumoto A, Azuma A, Kudoh S, Takizawa H, Sugawara I. Airway inflammatory responses to oxidative stress induced by low-dose diesel exhaust particle exposure differ between mouse strains. Exp Lung Res. 2007;33:227-244.

2.Li YJ, Kawada T, Takizawa H, Azuma A, Kudoh S, Sugawara I, Yamauchi Y, Kohyama T. Airway inflammatory responses to oxidative stress induced by prolonged low-dose diesel exhaust particle exposure from birth differ between mouse BALB/c and C57BL/6 strains. Exp Lung Res. in press.