

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、とく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、実際の大气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・増悪にかか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20年度の研究目的

今年度は、以上の結果をふまえ、DE 曝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) 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アレルギー性喘息モデルを作成し、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。

2) さらに、昨年度の研究でヒトにおいて、安全かついくつものバイオマーカーの測定が可能であった、呼気濃縮液採取と測定の基礎的検討を、健常者とともに気管支喘息患者においても行った。

3 平成20年度の研究の対象及び方法

1) 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

＊C57BL/6 および BALB/c マウス、6週令、Nrf2+/+と Nrf2-/- マウスにおける検討

C57BL/6 および BALB/c マウス、6週令、Nrf2+/+と Nrf2-/- マウスを用い、①OVA 群 ②DEP+OVA 群を設定した。DEP は 100 μ g/m³、平均7時間/日、5日/週、8週間曝露した。Control 群と OVA 群はクリーンルーム内で飼育した。アレルゲンは、卵白アルブミン(OVA)使用し、DEP 曝露5週間から始め、day 0、6、7 に OVA 20 μ g 腹腔内投与し感作を行った。Day 21 (DEP 曝露後8週間)に OVA100 μ g 経鼻的投与により、アレルギー性喘息状態を誘発した。OVA 誘発後翌日、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。

2) 健常者および気管支喘息患者における呼気濃縮液の採取とその測定に関する初期的検討

帝京大学医学部附属溝口病院の倫理委員会の承認のもと、説明と同意の上で協力いただいた健常ボランティアと本病院受診中の気管支喘息患者、さらに比較対象として、特発性間質性肺炎患者(以下 IIP)である。すなわち、健常者非喫煙者 7例、気管支喘息 25例、IIP 16例である。このうち、液が回収されなかったり、6項目すべての測定ができなかったサンプルを除いた 54サンプルを解析の対象とした。同一患者で、複数回の測定例を含む

1. R-tube による呼気凝縮液の採取の検討

R-tube (Respiratory Research Co, Charlottesville, VA)を用いて、5分での呼気凝縮液の採取をおこなった。

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) を用いることにより、EBC 内の微量なサイトカインの検出を試みた。

4. 健常者、喘息患者、特発性間質性肺炎の比較を行った。

4 平成20年度の研究成果

I. Nrf2 ノックアウトマウスを用いた喘息モデルの検討

1) C57BL/6、6週令、Nrf2+/+とNrf2-/-マウスにおける検討

C57BL/6、6週令、Nrf2+/+とNrf2-/-マウスを用い、①OVA群 ②DEP+OVA群を設定した。DEPは100 μ g/m³、平均7時間/日、5日/週、8週間曝露した。Control群とOVA群はクリーンルーム内で飼育した。アレルゲンは、卵白アルブミン(OVA)使用し、DEP曝露5週後から始め、day 0、6、7にOVA 20 μ g 腹腔内投与し感作を行った。Day 21 (DEP曝露後8週間)にOVA100 μ g 経鼻的投与により、アレルギー性喘息状態を誘発した。OVA誘発後翌日、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。

OVAアレルギー喘息発症病態において、低濃度DEP曝露により、Nrf2-/-マウスではNrf2+/+マウスと比較し、

① 気道過敏性が有意に亢進した(図1)。

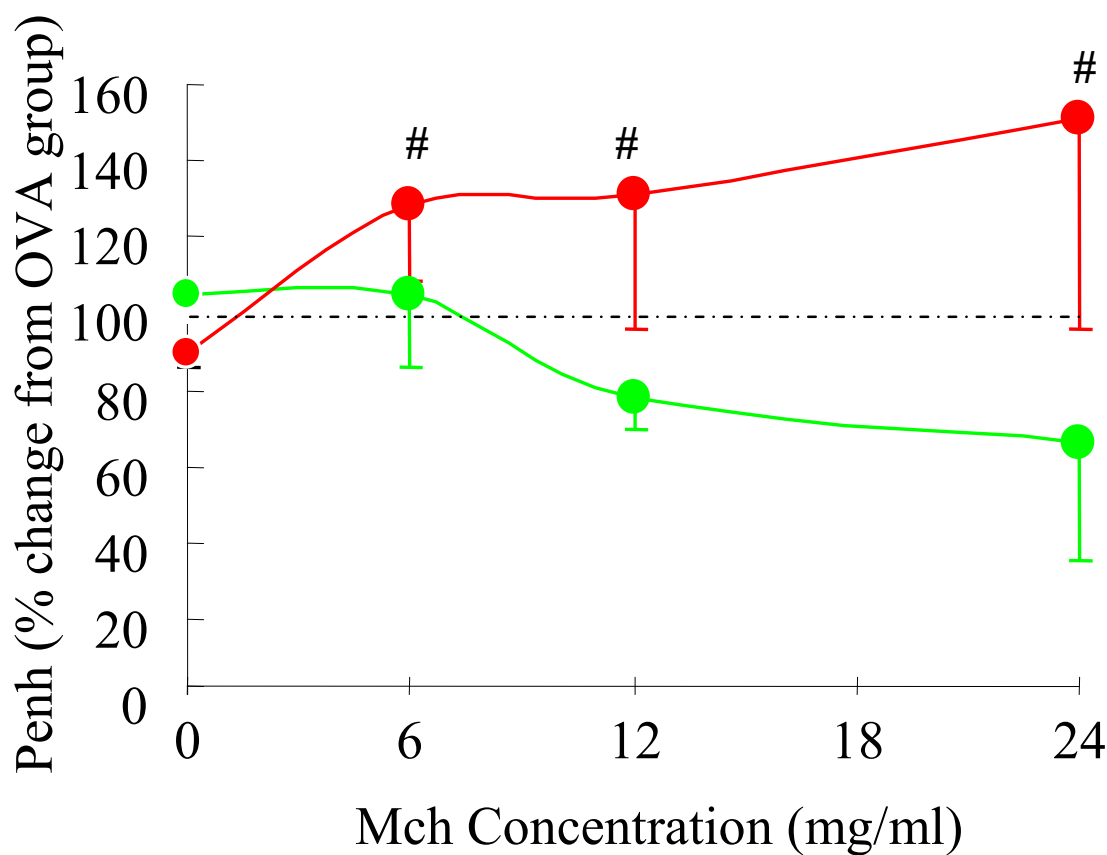


図1 C57B6, Nrf2 ノックアウトマウス(上段)とその野生型マウス(下段)の喘息モデルにおける気道過敏性

② 肺組織像では、明らかな気管支周囲の炎症細胞の浸潤、およびPAS陽性粘液細胞の増生が見られた。

③ BALF中好中球、リンパ球、好酸球が有意に上昇した(図2)。

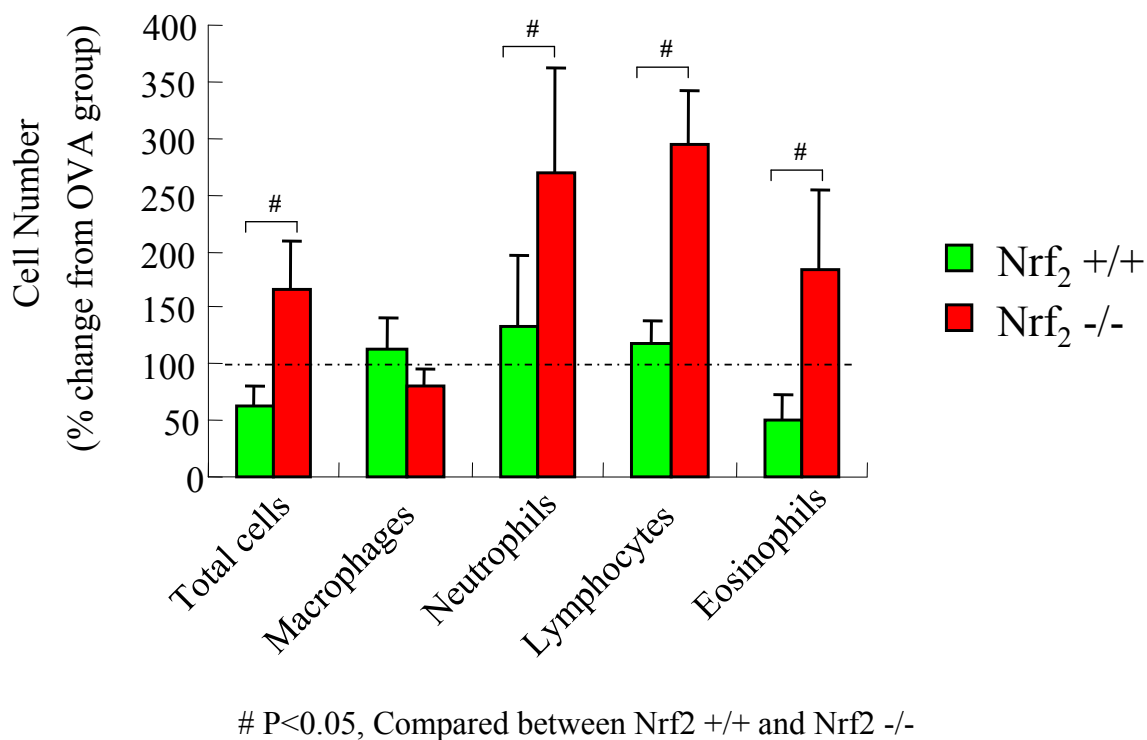


図2 BALF中の細胞分画算定

Nrf-2 ノックアウトマウス（各右）においてリンパ球および好酸球が有意に増加した。

④ BALF中 IL-4, IL-13, IL-12 上昇する傾向が見られ、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。

2) BALB/c、6週令、Nrf2+/+と Nrf2-/- マウスにおける検討

C57B6と同様に作成したモデルで検討した結果、DE単独曝露においては、気道過敏性の増強が認められた。一方、喘息モデルにおいては、DEの曝露による過敏性の亢進は明らかでなかった（図3）。

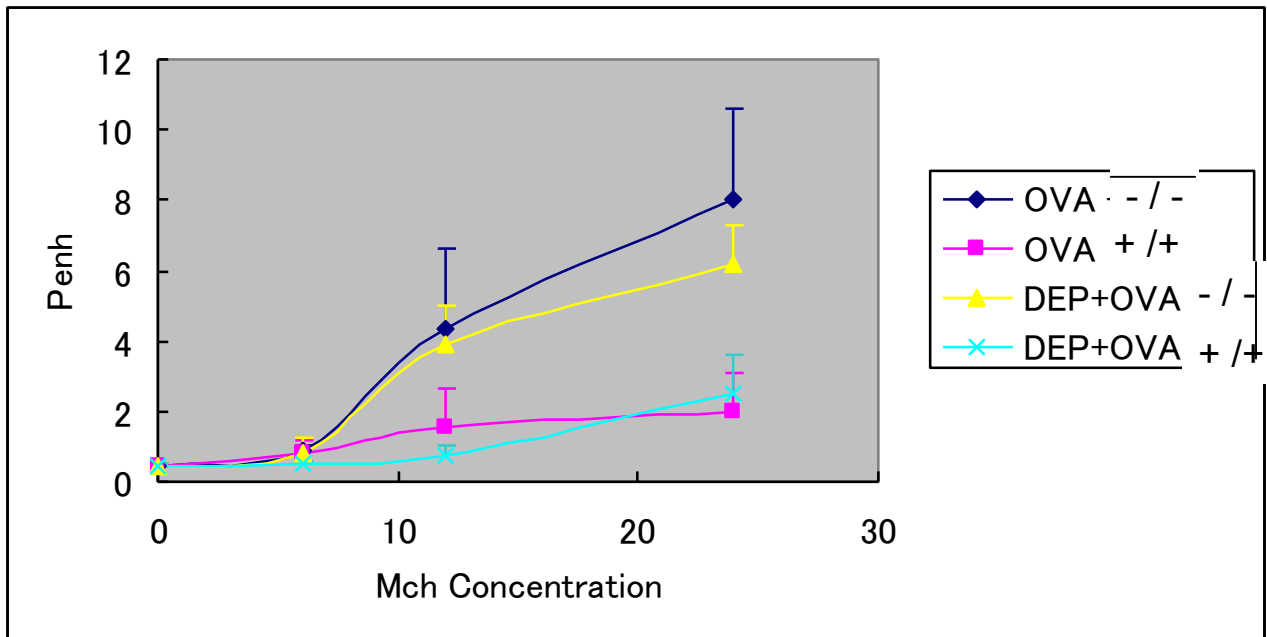


図3 喘息モデルにおいて、Nrf2 ノックアウトマウスの気道過敏性が亢進したが、DEP 曝露の影響は明らかでなかった。

BAL 細胞では、好酸球数がノックアウトマウスで増加した（図4）。

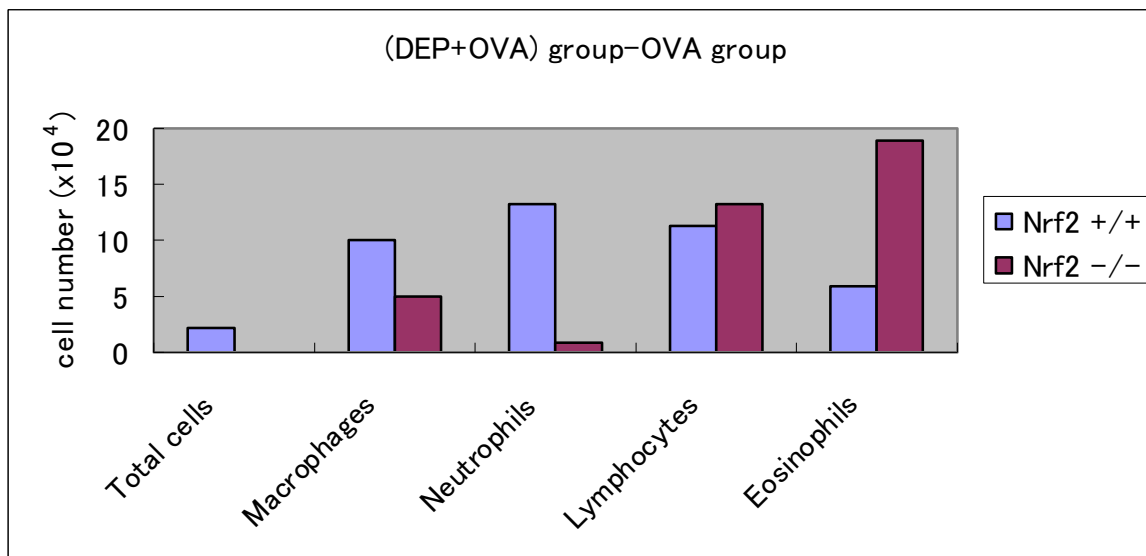


図4 BAL 中の細胞分画 BAL 細胞では、好酸球数がノックアウトマウス（各右）で増加した。

肺の組織学的所見では Nrf2 ノックアウトマウスで明らかに炎症が増強した（図5）。

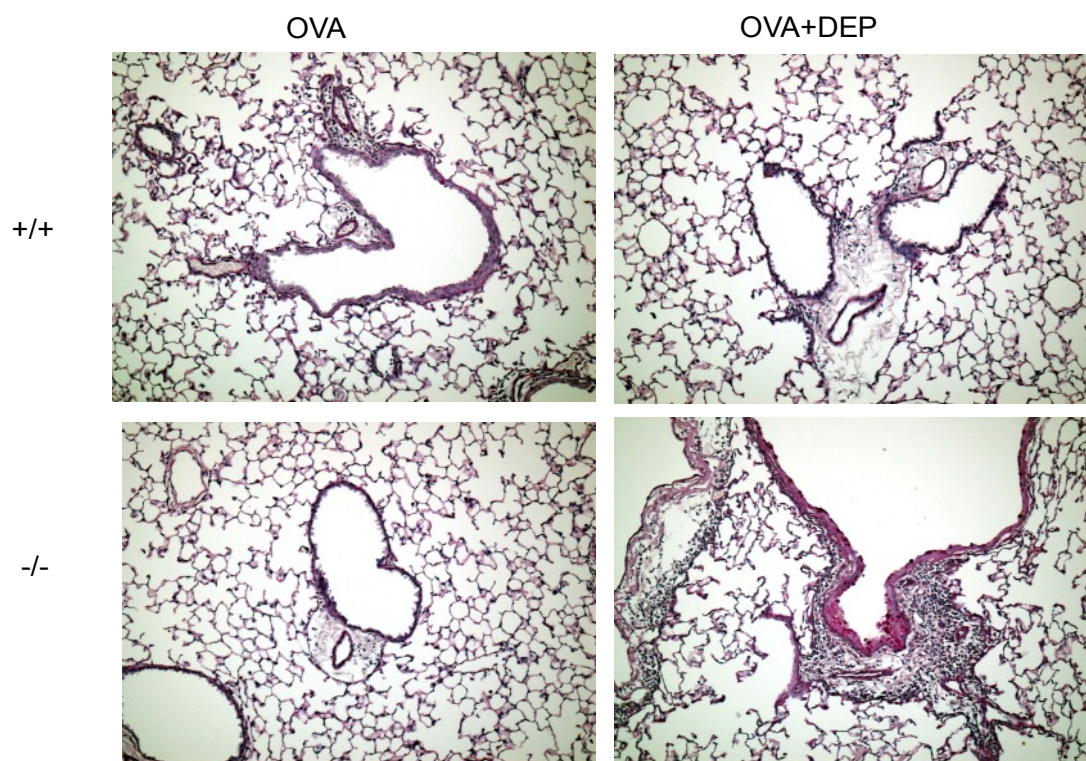


図5 肺の組織学的所見。Nrf2 ノックアウトマウスで明らかに炎症が増強した。

II. 健常者および気管支喘息患者における呼気濃縮液の採取とその測定に関する初期的検討

帝京大学医学部附属溝口病院の倫理委員会の承認のもと、説明と同意の上で協力いただいた健常ボランティアと本病院受診中の気管支喘息患者、さらに比較対象として、特発性間質性肺炎患者（以下 IIP）である。すなわち、健常者非喫煙者 7 例、気管支喘息 25 例、IIP 16 例である。このうち、液が回収されなかったり、6 項目すべての測定ができなかったサンプルを除いた 54 サンプルを解析の対象とした（同一患者で、複数回の測定例を含む）。

R-tube による呼気凝縮液の採取量の検討では、大多数の症例で $400 \mu\text{L}$ 以上のサンプルの採取が可能であったが、一部で、サンプルが取れない場合があった。その原因は不明である。採取量と疾患などとの関連は明らかでなかった。

次に、従来の ELISA の検出下限濃度より、 $10^{-1} \sim 10^{-2}$ の濃度まで検出可能な MUSTag 法 (Synthera Technologies, Tokyo, Japan) を用いることにより、EBC 中の微量なサイトカインの検出を試みた。その結果、vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF), basic fibroblast growth factor (FGF) の 3 種の増殖因子は全例で測定可能であった。また、IL-1 receptor antagonist (IL1Ra), IL-8, epidermal growth factor (EGF) も一部の健常者と大多数の疾患患者で可能であった。また、統計的な有意差はなかったが、健常者群より喘息、特発性間質性肺炎群で高い傾向を示した。

以上から、5 分間の安静換気により、健常者および疾患患者において、測定に十分な量の呼気濃縮液が採取可能なこと、さらに少なくとも 6 種のバイオマーカーが測定可能であることが示され、今後の疫学的な調査においても、この方法が個人の感受性などを推測する上で有用であることが示唆された。

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、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。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。

一方、低濃度・長期 DEP 単独曝露に対して感受性を示した 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。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。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。

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。C57B6 および BALB/c の 2 系統の Nrf2 ノックアウトマウスを用いた今年度の研究から、Nrf2 が喘息モデルマウスにおいても、DEP 吸入曝露の影響に大きな役割を果たしていることが強く示唆された。

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。第二の進展は、呼気濃縮液の利用に実効性がみえてきたことである。昨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、成長因子やサイトカインを測定しえた。今後、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。候補マーカーとしては、pH, 8-isoprostane, 8-OHdG、malondialdehyde などがあげられる。

ごく最近、Schroer ら(30)は 570 人のコホートにおいて、DEP を含む大気汚染と持続性の喘鳴との関連を調べ、Glutathione S-transferase (GST) P1 の遺伝子多型 Val(105) allele との関連を示した。これらの遺伝子レベルの結果を、より一般化して効率的な健康被害予防策につなげるためには、私たちの研究展開がいっそう重要性を増すと思われる。

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。昨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、今年度には、以上の検査を踏まえて、C57B6 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した。両者の反応性に差が認められたものの、いずれの実験系においても Nrf2 が喘息モデルにおいて重要な役割を占め下。以上から 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明らかになった。

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。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。今年度は、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することできた。少なくとも多くの症例で十分量のサンプルが得られること、種々のバイオマーカーを測定可能であることが示された。今後、多数の健常者および喘息患

者で測定することにより、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

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〈図 3〉。

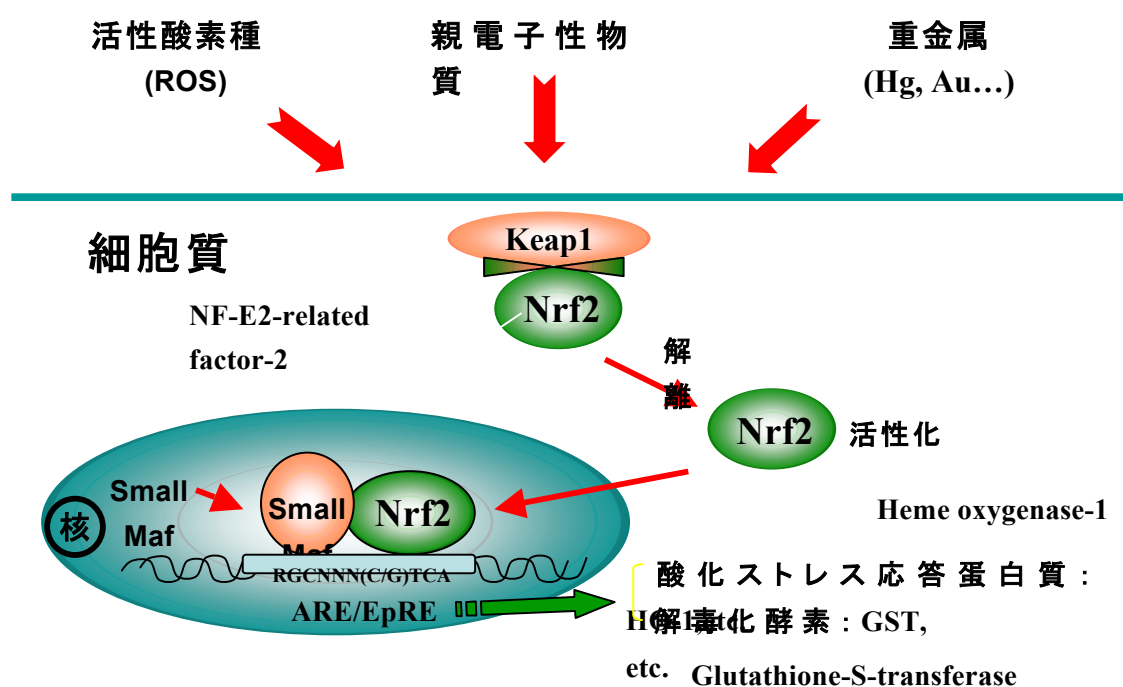


図 3 異物に対する Nrf2 反応のメカニズム

昨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。そして、今年度には、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

トマウスにおいて喘息モデルを作成し、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。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み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、成長因子やサイトカインを測定しえた。今後、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。候補マーカーとしては、pH, 8-isoprostane, 8-OHdG、malondialdehyde などがあげられる。

ごく最近、Schroer ら(30)は 570 人のコホートにおいて、DEP を含む大気汚染と持続性の喘鳴との関連を調べ、Glutathione S-transferase (GST) P1 の遺伝子多型 Val(105) allele との関連を示した。これらの遺伝子レベルの結果を、より一般化して効率的な健康被害予防策につなげるためには、私たちの研究展開がいっそう重要性を増すと思われる。

【発表学会・論文】

【発表】

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・サポー)
- 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 熊本市市民会館)
- 4) Y.J. Li, H. Takizawa, A. Azuma, I. Sugawara, Y. Yamauchi, T. Kohyama, T. Kawada, S. Kudoh:

Mouse Strain Differences in the Generation of Allergic Airway Inflammation by Prolonged Low-Dose Diesel Exhaust Particle Exposure, [Publication Page: A365] American Thoracic Society International Conference, 2008, Toronto

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. 滝澤 始: ディーゼル排気の長期曝露動物モデル. *呼吸器科* 2008;14(3): 246-252.
3. Song HM, Jang AS, Ahn MH, Takizawa H, Lee SH, Kwon JH, Lee YM, Rhim TY, Park CS. Ym1 and Ym2 expression in a mouse model exposed to diesel exhaust particles. *Environ Toxicol.* 2008 Feb;23(1):110-6.
4. 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.* 2008 Mar;34(3):125-39.
5. Li YJ, Takizawa H, Azuma A, Kohyama T, Yamauchi Y, Takahashi S, Yamamoto M, Kawada T, Kudoh S, Sugawara I. Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to airway inflammatory responses induced by low-dose diesel exhaust particles in mice. *Clin Immunol.* 2008 Sep;128(3):366-73. Epub 2008 Jul 9.
6. Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Itakura S, Kamitani S, Kato J, Nagase T. Clarithromycin inhibits fibroblast migration. *Respir Med.* 2008 Dec;102(12):1769-76. Epub 2008 Aug 12.
7. Yamaya M, Azuma A, Tanaka H, Takizawa H, Chida K, Taguchi Y, Mikasa K, Kadota J, Kudoh S. Inhibitory effects of macrolide antibiotics on exacerbations and hospitalization in chronic obstructive pulmonary disease in Japan: a retrospective multicenter analysis. *J Am Geriatr Soc.* 2008 Jul;56(7):1358-60.
8. Li YJ, Takizawa H, Azuma A, Kohyama T, Yamauchi Y, Kawada T, Kudoh S, Sugawara I. The Effects of Oxidative Stress Induced by Prolonged Low-Dose Diesel Exhaust Particle Exposure on the Generation of Allergic Airway Inflammation Differ between BALB/c and C57BL/6 Mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2008 Sep 12;1-15. [Epub ahead of print]

【3年間のまとめ】

大気中汚染物質による健康影響が個人の感受性の差に大きく関連していることは、抗酸化酵素のひとつ Glutathione-S-transferase (GST)のサブタイプの遺伝子多型が、気道の抗酸化ストレスに対する防御機構に影響し、DEP 曝露によるアレルギー性鼻粘膜反応の強度に影響することなどから示唆されてきた。したがって、DEP による呼吸器障害の高感受性群をスクリーニングする簡便かつ感度の高い手法や、高感受性群に対する効率的な防御手段や化学予防の可能性が検討されることが重要であると考えてきた。そのための研究戦略として、まず第一に動物実験において、DEP に対する感受性を決定する因子を見出すことと、そのためのスクリーニング法を確立することを

目指してきた。

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、

1) DEP に対する感受性の異なる 2 つの純系マウス、すなわち C57Black/6 マウス及び Balb/c マウスを用いて検討し、DE 単独曝露の影響に関しては、全体としてみると C57BL/6 マウスは DE に感受性が高く、BALB/c マウスは DE に感受性が低いことが確認された。そのメカニズムとして、DE による酸化ストレスに対する宿主側の抗酸化防御反応の違いによると考えられた。

2) 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。

3) さらに、酸化ストレス応答に主要な調節因子である Nrf2 に着目し、そのノックアウトマウスにおいて同様の検討を行った。低濃度 DEP 曝露および喘息モデルにおいて、全体としては気道過敏性の明らかな増強、肺組織像では PAS 陽性粘液細胞の増生、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。また、BALF 中 IL-13、TARC が有意に上昇した。

以上により、Nrf-2 およびこの転写因子で調節される抗酸化ストレス酵素群が、DEP による呼吸器影響の決定因子であることを強く示唆するものであった。

4) 続いて、DE 曝露のバイオマーカーをヒトにおいて測定するための足がかりとしてヒトボランティアにおける呼気濃縮液の採取とその再現性などを検討した。呼気凝縮液採取時間は、5 分間で妥当と考えられた。同意を得た喘息患者においても採取と測定を実施して、成長因子やサイトカインを測定しえた。今後、喘息病態における酸化ストレス状態の検討、さらには DE 曝露状況との関係についても展望したい。候補マーカーとしては、pH, 8-isoprostane, 8-OHdG、malondialdehyde などがあげられる。動物モデルで得られた遺伝子レベルの結果を、より一般化して効率的な健康被害予防策につなげるためには、私たちの研究展開がいつそう重要性を増すと思われる。