

(1) 気管支ぜん息の発症予防に関する調査研究

①ぜん息発症予防のための客観的評価指標によるスクリーニング基準

ぜん息患者の増悪及び未発症成人の発症の予測のための気道バイオマーカーの確立とその大気汚染物質の影響評価への応用に関する調査研究

研究代表者：滝澤 始

【調査研究の概要・目的】

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 (diesel exhaust particles, DEP) 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。私たちは、実際の大気環境中でありうる低濃度で長期間継続的に DEP に曝露するマウスの系を確立し、これらに対する感受性要因を追求し、抗オキシダント酵素 [heme oxidase (HO)-1 など] とその発現調節因子 Nrf-2 を見出した。さらにヒトにおいて呼気凝縮液 (exhaled breath condensates, EBC) 中のサイトカインなどを測定し気道炎症病態のバイオマーカーとして有用であり、さらに大気汚染状況との関連性を示してきた。

これらの研究によって得られた成果を個人レベルの健康被害対策に生かすためには、個人の大气中微粒子に対する感受性の差を適切なバイオマーカーによりスクリーニングする手法を確立する必要がある。そこで本調査研究では、ぜん息群および非ぜん息群において抗酸化酵素群の遺伝子多型の同定、EBC 中バイオマーカー (抗酸化活性を含む) の測定による気道炎症病態の解析を行い、発症・増悪との関連性を検討し、これらに大気汚染がどう影響するかを検討する。

これらの研究成果が高感受性群の抽出に応用できれば、ぜん息などのアレルギー疾患の発症予知や増悪予測の指標として有用であると期待される。

1 研究従事者 (○印は研究リーダー)

○滝澤 始 (杏林大学)	幸山 正 (帝京大学)	山内 康宏 (東京大学)
和田 裕雄 (杏林大学)	小山ひかり (帝京大学)	金 俊行 (帝京大学)
堀江 真史 (東京大学)	三上 優 (東京大学)	中村 益夫 (杏林大学)
本多 紘二郎 (杏林大学)	中本 啓太郎 (杏林大学)	野口 智史 (東京大学)
松崎 博崇 (東京大学)		

2 平成 25 年度の研究目的

今年度は 2 年間の研究の最終年度であり、各施設の倫理委員会の承認を得た上でインフォームドコンセントの得られたぜん息患者、慢性咳などの呼吸器症状とアレルギー素因を示しながらも未だぜん息の典型的表現型を示さない患者、および健常人を対象として、問診、臨床検査、呼気一酸化窒素濃度測定に加え、呼気凝縮液 (exhaled breath condensates, EBC) を採取する。抗酸化酵素群 (グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) P1 の遺伝子多型の同定を行う。臨床的所見と、それぞれの種々の内的外的要因との関連に加え、公開されている地域別大気汚染データや幹線道路からの距離と各マーカーの関連を統計学的に解析し、ぜん息患者の増悪及び未発症成人の発症の予測のための気道バイオマーカーの確立とその大気汚染物質の影響評価への応用を目指す。さらに 2 年間の調査研究の成果を総括して、今後の研究の発展の方向性ととも社会的な貢献の可能性についても考察する。

3 平成 25 年度の研究対象及び方法

- 1) 研究体制：患者の選定、説明と同意、サンプル採取と臨床的情報の記録は 3 施設で行う。
主要なサンプル測定は東大で独立して実施する。データの総括と解析は主として杏林大学で行う。
- 2) 研究の対象：各施設の倫理委員会の承認を得た上でインフォームドコンセントの得られたぜん息患者、慢性咳などの呼吸器症状とアレルギー素因を示しながらも未だぜん息の典型的表現型を示さない患者、および健常人を登録する。各種病態群の分類は、ぜん息や COPD のスクリーニングのために国際的評価が定まっている IPAG 診断・治療ハンドブック日本語版（慢性気道疾患プライマリケア医用ガイド 2005 International Primary Care Airways Group (IPAG)：日本呼吸器学会編）IPAG の問診表に基づいて行う。
- 3) 研究方法：調査項目：各群の診断は公表されたガイドラインに基づく診断基準で行う。
・必要な問診、臨床検査、呼気一酸化窒素濃度測定に加え、抗酸化酵素群(グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST)P1 の遺伝子多型の同定と呼気凝縮液(exhaled breath condensates, EBC)を採取する。EBC は R-tube により安静自発呼吸下 5～10 分間で採取し、抗酸化活性を含む EBC 中の分子マーカーを経時的に測定する(図 1)。



図 1 R-tube による呼気凝縮液の採取

- ・抗酸化活性を含む EBC 中の分子マーカーの測定：

フリーラジカル解析装置 FREE（医療機器届出番号：13B2X10066W00004 一般的名称：パックス式臨床化学分析装置 [イタリア製]）は、光度計と遠心分離機を備え、抗酸化力や活性酸素・フリーラジカルレベルを in vivo、in vitro の両面で総合的に分析する事が可能なラボ用分析システムである。サンプルの前処理から測定結果までこの装置 1 台で完結するシステムである。

- ・大気汚染データを経時的に収集する。

・各人の抗酸化酵素遺伝子多型の同定：採血により得られた genomic DNA を既報の論文に準じて（Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease：T Ishii, S Teramoto, H. Matsui, et al: Thorax 1999; 54: 693-696）、PCR primer と、Alw26I の制限酵素を用いて、検討を行った(図 2)。

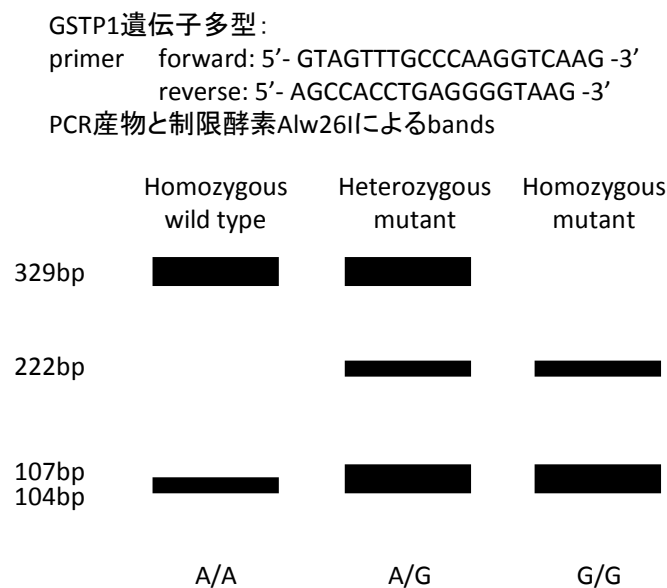


図 2 GSTP1 の遺伝子多型のモデル図

4) 解析: 各群における分子マーカーの比較、それぞれの種々の内的外的要因との関連に加え、公開されている地域別大気汚染データや幹線道路からの距離と各マーカーの関連を統計学的に解析する。川崎市公害監視センターから公開されている市内の一般局 (8 箇所) および自排局 (10 箇所) の大気汚染物質の濃度データと呼気凝縮液中の気道炎症マーカーの相関を検討した。各人の自宅または勤務地住所からもっとも近傍の測定局のデータを用いた。三鷹市地域の大気汚染データと呼気凝縮液中炎症マーカーの関連は、東京都環境局のホームページ

(http://www.kankyo.metro.tokyo.jp/air/air_pollution/result_measurement.html)、および大気汚染状況速報 (そらまめ君) (<http://soramame.taiki.go.jp/>) から公開されている市内の大気汚染物質の濃度データと呼気凝縮液中の気道炎症マーカーの相関を検討した。各人の自宅または勤務地住所からもっとも近傍の測定局のデータを用いた。

4 平成 25 年度の研究成果

今年度解析対象になった症例の臨床背景を表 1 に示した。

表 1. 解析対象者の臨床背景

	Kawasaki	Mitaka
n	89	64
Age	57.4±16.7	55.3±16.6
BH	1.60±0.09	1.61±0.09
BW	63.2±15.6	24.6±4.8
BMI	24.6±4.8	63.9±14.3
No2-pre-day	22.4±8.4	17.4±8.6
NO2-pre-month	17.6±4.5	18.0±5.8
PM2.5-pre-day	12.1±6.4	15.1±9.3
PM2.5-pre-month	12.7±3.5	14.0±3.5
IgE	734±1944	769±2148
Eos-count	268±253	360±491
VC	2.91±0.87	3.11±0.98
FVC	2.82±0.89	3.03±1.00
FEV1	2.20±0.80	2.18±0.87
FEV1/FVC	77.63±11.21	71.21±12.29

1) 気管支ぜん息患者における臨床病態と幹線道路までの距離に関する検討結果

本研究の参加者の自宅と幹線道路からの距離とぜん息患者の気道炎症をはじめとする各種臨床指標や重症度との相関を検討した。この結果、三鷹地区居住者の幹線道路からの距離と各種臨床指標については有意な相関は認められなかったが、幹線道路から 200m 未満と 200m 以上とで分けると、STEP5 の重症のぜん息患者は全員が 200m 未満に居住しており、幹線道路に住居が近い参加者でぜん息が重症であることが示唆された(図 3)。さらに、三鷹地区・川崎地区の居住者の幹線道路からの距離は、%FEV1、FEV1/FVC と統計的に有意な正の相関を認めた。

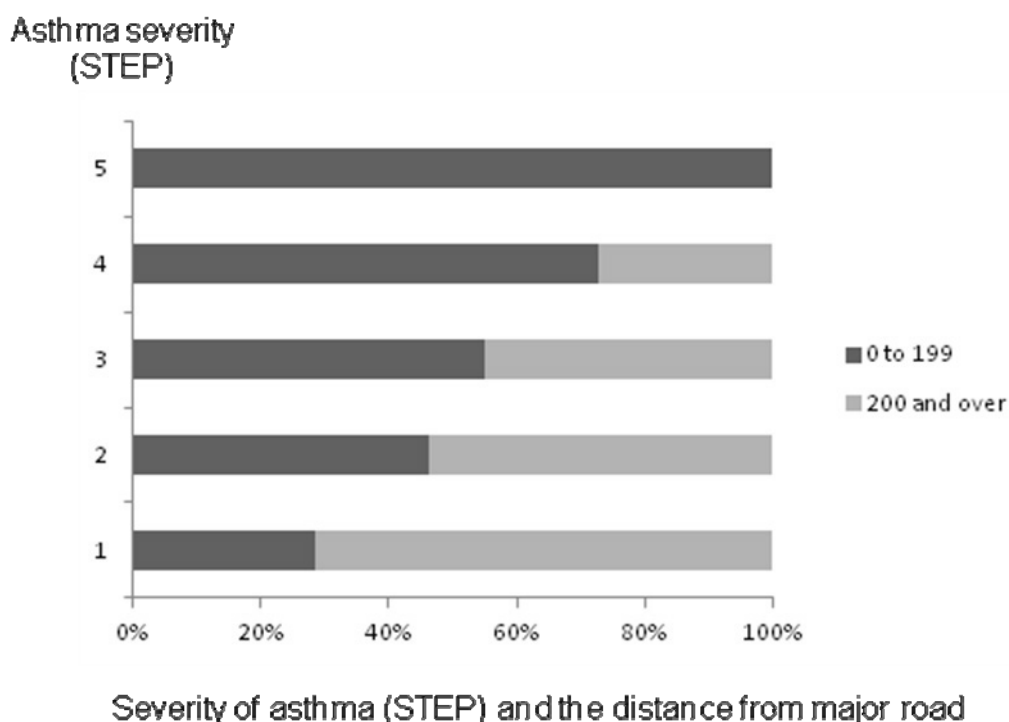


図3 ぜん息の重症度と自宅から幹線道路までの距離(m)との関連

2) 気管支ぜん息患者における臨床病態と大気汚染との関連性に関する検討結果：

次に、気管支ぜん息患者における臨床病態と大気汚染との関連性に関する検討するために、大気汚染物質の測定データとぜん息の各種臨床指標との相関性を検討した。前日の NO_2 濃度 ($\text{NO}_2\text{-PD}$) は、末梢血好酸球数 Eos と有意な相関を示し ($P < 0.01$)、%Eos とは相関する傾向を示した ($p = 0.085$)。一方、1 か月前の NO_2 濃度 ($\text{NO}_2\text{-PM}$) は FEV_1/FVC と有意な相関を示し ($p < 0.05$)、BW および BMI と相関する傾向を示した (それぞれ、 $p = 0.0764$, $p = 0.064$)。さらに、前日の NO_x 濃度 ($\text{NO}_x\text{-PD}$) は Eos および %Eos と有意な相関を示した ($p < 0.01$)。一方、前月の NO_x 濃度 ($\text{NO}_x\text{-PM}$) は BMI、 FEV_1/FVC と有意な相関を示し ($p < 0.01$ および $p < 0.05$)、呼気 NO とは相関する傾向を示した ($p = 0.0609$)。以上から、大気汚染の $\text{NO}_2\text{-PD}$ と $\text{NO}_x\text{-PD}$ 、 $\text{NO}_2\text{-PM}$ と $\text{NO}_x\text{-PM}$ はぜん息の気道炎症や呼吸機能の諸指標とそれぞれよく似た相関を示すと考えられた。

続いて、近年注目される大気汚染物質 $\text{PM}_{2.5}$ 濃度との関連性では、前日の $\text{PM}_{2.5}$ 濃度 ($\text{PM}_{2.5}\text{-PD}$) は Eos および %Eos と有意な相関を示した ($p < 0.001$) (図 4)。また、前月の $\text{PM}_{2.5}$ 濃度 ($\text{PM}_{2.5}\text{-PM}$) は、末梢血中好塩基球 Bas および %Bas と有意な相関を示した ($p < 0.05$)。一方、同様の解析を COPD 患者でも実施したが、以上の様な相関は認めず、以上の大気汚染物質濃度との関連性はぜん息にユニークであることもわかった。

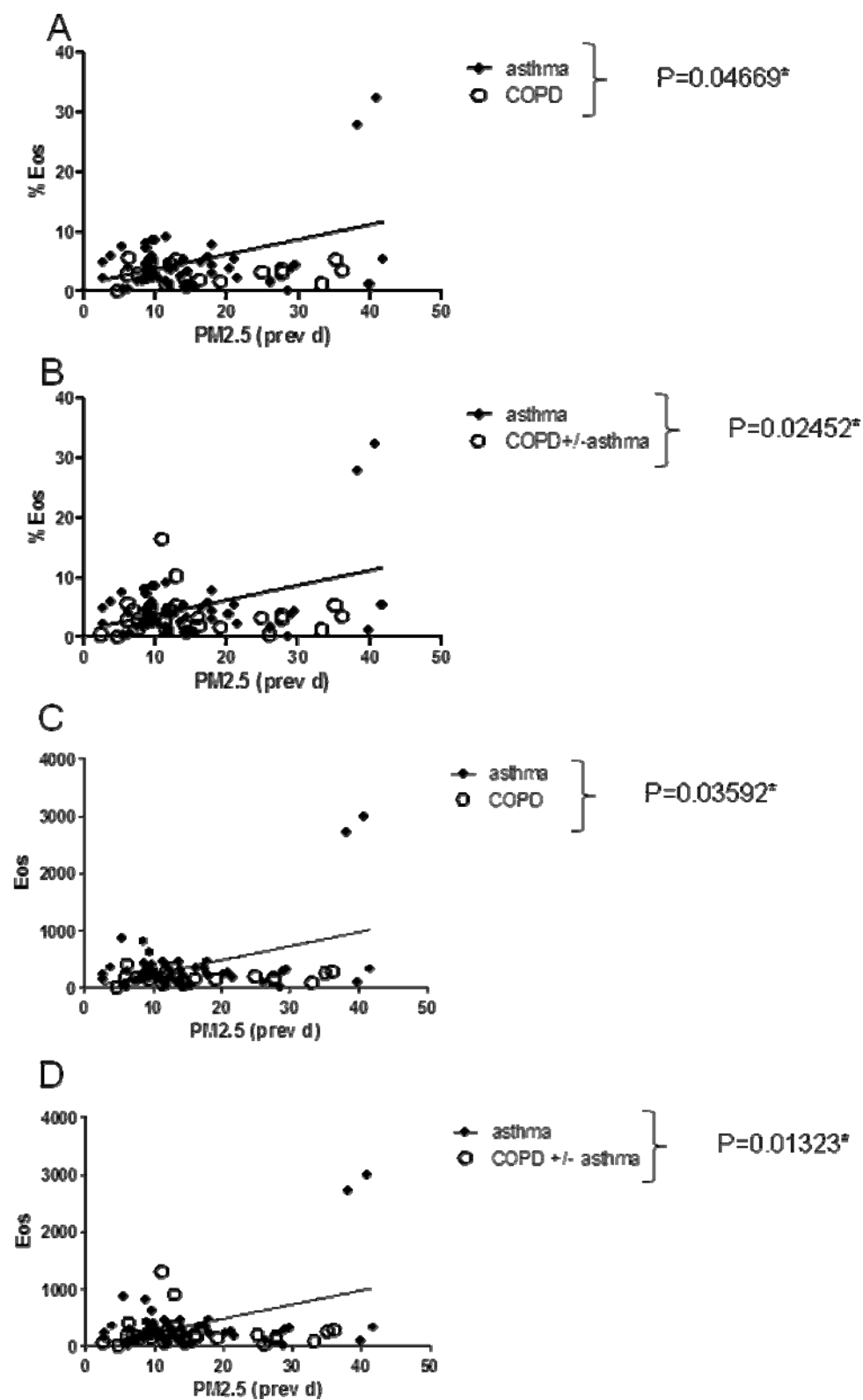


図4 大気汚染物質濃度と臨床指標：ぜん息とCOPDとの比較検討

3) 気管支ぜん息患者における EBC 中分子マーカーに関する検討結果

EBC H2O2 濃度と末梢血所見での検討では (図 5)、EBC H2O2 濃度は、%Eos、Eos とともに有意な相関を認めなかった。Neu および%Neu は、H2O2 が増加すると減少する負の相関の傾向を示した (それぞれ、 $p=0.086$, $p=0.0803$)。また、%Lym は統計学的に有意な正の相関 ($p<0.05$) を認めたが、Lym は有意な相関を認めなかった。

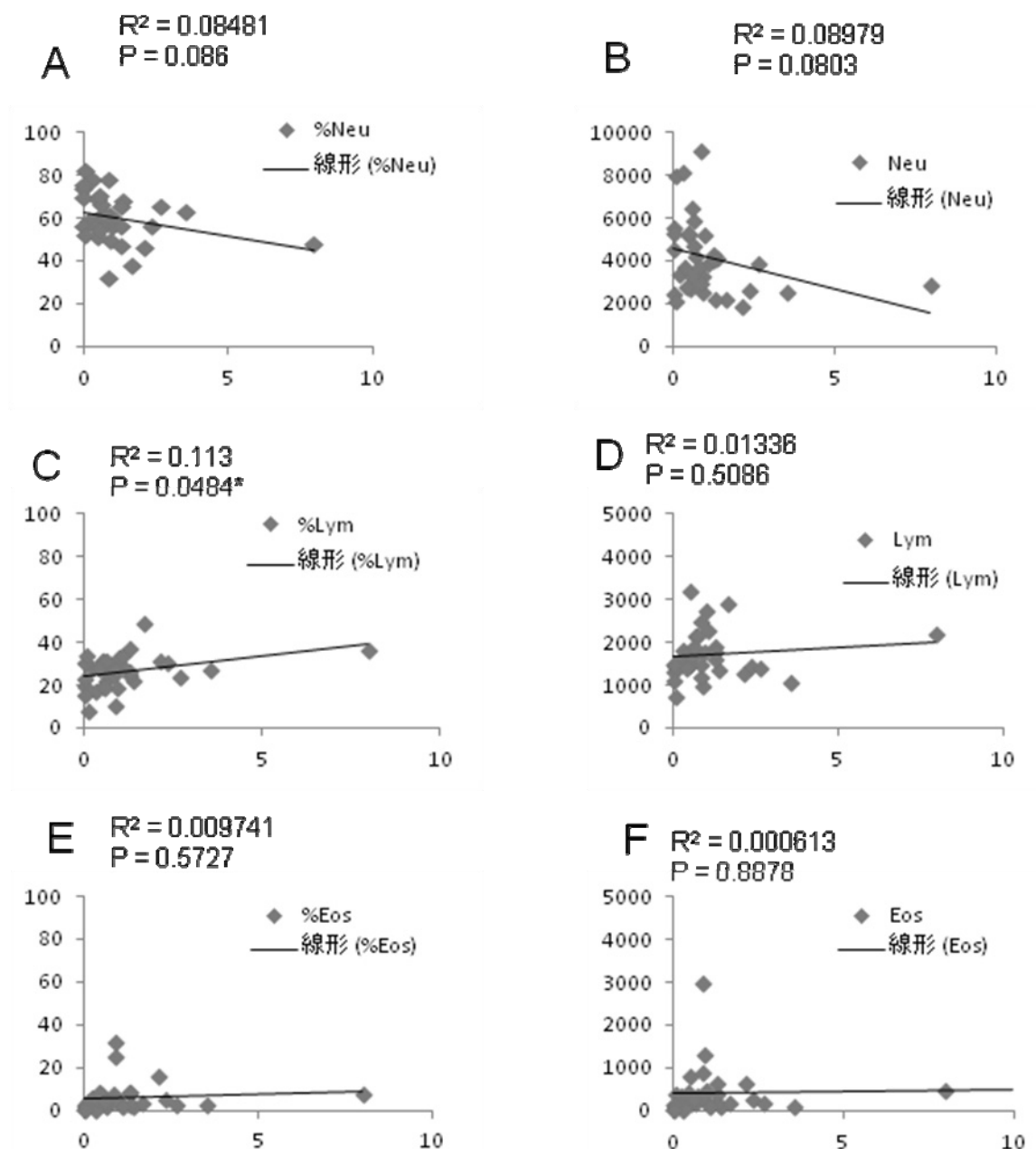


図 5 EBC H2O2 レベルと末梢血指標との関連

一方、気管支ぜん息患者では EBC H2O2 濃度は呼気 NO と有意な正の相関を認め、ぜん息気道炎症と相関すると考えられた ($p=0.0107$, 図 6)。

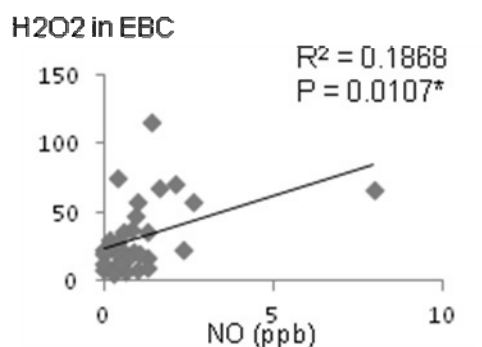


図6 EBC H2O2 レベルと呼気 NO 濃度：有意な正の相関を認めた

4) ぜん息患者における EBC 中酸化ストレスマーカーと大気汚染物質の濃度との関連性の検討
 続いて、大気汚染の測定値と個人の EBC 中酸化ストレスとの関連性を追求するために、大気汚染の指標と EBC 中 H2O2 との相関を検討した。その結果、呼気凝縮液中の H2O2 は NO2 の前月値と有意な相関を認めた(図 7)。

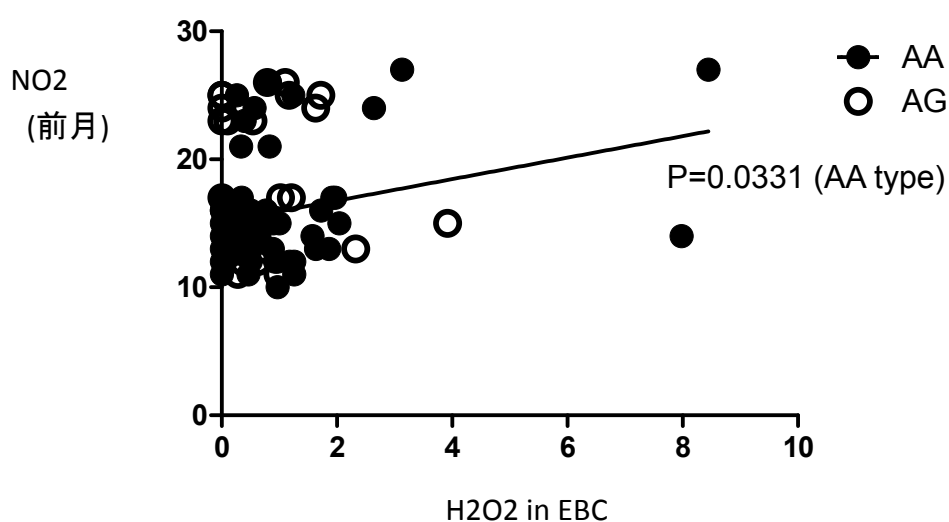


図7 ぜん息の EBC 酸化ストレスマーカーと大気汚染物質との関連性：前月の NO2 と有意な正の相関を認めた ($r=0.30$, $p=0.03$)。

一方、EBC 中酸化ストレスマーカーは PM2.5 濃度とは有意な相関は認めなかった (図 8)。

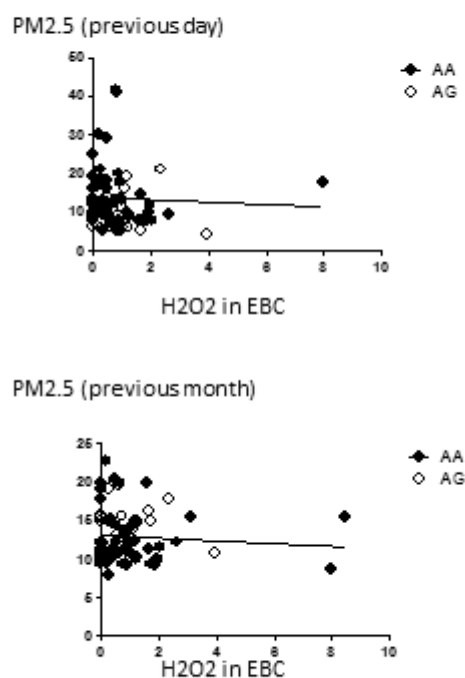


図8 EBC 中酸化ストレスマーカーと PM2.5 濃度：前月、前日ともに有意な相関は認めなかった

EBC 中酸化ストレスマーカーは、幹線道路と居住地との距離、NO₂-PD、NO_x-PD、NO_x-PM、とは有意な相関を認めなかった。

5) GST-P1 の遺伝子多型の解析結果：

表 2 に GSTP-1 遺伝子多型を解析した結果を示す。

表 2 GSTP-1 遺伝子多型の結果

	Kawasaki	Mitaka	Total
AA	43	36	79
AG	15	17	32
Not determined	6	36	42

6) ぜん息患者における遺伝多型と各種臨床指標

まず、AA 群と AG 群との年齢、BMI、喫煙量、合併症等に差がなく、ぜん息の症状にも差は認めなかった。両群では、呼吸機能検査の指標である VC、FEV₁、FVC 等に有意な差を認めなかった。白血球の数、その分画を検討したところ、Eos が AA 群 405 ± 507 、AG 群 215 ± 119 と AA 群が多い傾向が認められたものの、有意な差ではなかった。呼気 H₂O₂ は AA 群 1.116 ± 1.792 、AG 群 $0.6846 \pm$

0.6931、およびNO値はAA群 35.7 ± 27.1 、AG群 25.2 ± 15.8 とAA群が高値である傾向を認めた。さらに、CRPはAA群が 0.85 ± 1.58 、AG群が 0.15 ± 0.14 とAA群が高値である傾向を認め、IgEはAA群が 658 ± 1117 、AG群が 177 ± 214 とAA群が有意に高値であった ($p < 0.05$) (図9)。

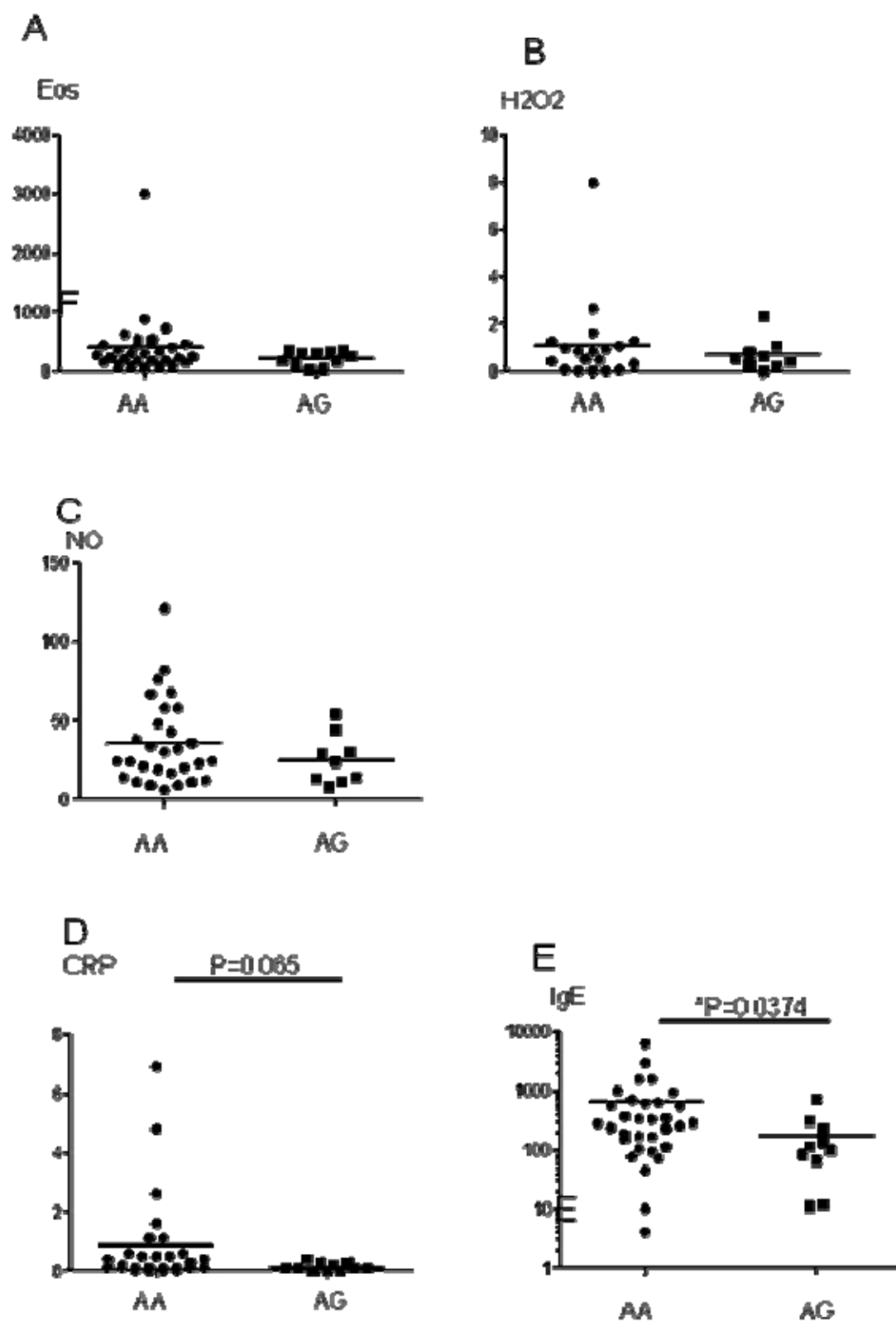


図9 GST-P1 遺伝子多型とぜん息臨床指標

7) 気管支ぜん息患者の遺伝子多型と大気汚染との関連：

次に抗酸化ストレス酵素GSTP-1の遺伝子多型による個人EBCストレスマーカーと大気汚染との関連について検討するため、AA型とAG型に分けて、それぞれ大気汚染の指標と臨床指標との関連を検討した（表3）。

まず、自宅と幹線道路との距離と関連する臨床指標は、AA型患者では%Lym（ $p<0.01$ ）、Neu（ $p<0.05$ ）、WBC（ $p<0.05$ ）と関連を認めた。NO₂-PD（前日）は%Eos（ $p<0.001$ ）、EOS（ $p<0.0001$ ）と有意な関連を認めた。NO_x-PD（前日）は、NO₂-PD とほぼ同様の結果で、%Eos（ $p<0.0001$ ）、EOS（ $p<0.0001$ ）、Bas（ $p<0.05$ ）と有意な関連を認めた。PM_{2.5}-PD は、AA型患者で IgE と有意な関連を示し（ $p<0.05$ ）、Lym と関連する傾向を認めた。また、Eos および%Eos はAA型患者、AG型患者双方で有意な関連あるいは、その傾向を認めた。PM_{2.5}-PM は、AA型患者で H₂O₂ と関連を認めたが、有意な関連ではなかった（ $p=0.0675$ ）。AG型患者では、%Bas、Bas、Eos、NO と有意な関連を認めた（いずれも、 $p<0.05$ ）。さらに、AA型患者では、呼吸機能検査と自宅と幹線道路との距離（1秒量、1秒率、V₂₅）と有意な関連を認めた（図10に幹線道路までの距離と%1秒量との関連を示す）。また、前日のNO₂値とV₅₀/V₂₅と有意な関連を認めた。さらに、前月のPM_{2.5}とV₅₀/V₂₅と有意な関連を認めた。そして図7に示したようにAA型では前月のNO₂平均値と呼気凝縮液H₂O₂とが有意な関連を示した。以上のように、AA型では大気汚染状況と臨床検査指標の多くが有意に関連することが分かった。

表 3. GST-P1 遺伝子多型によるぜん息患者臨床指標と大気汚染

Genotype	AA	P value	AG & AA	P value	AG	P value
Distance	%Lym**	0.0082			Eos*	0.0468
	Neu*	0.0241			IgE	0.0847
	%Neu	0.0811				
	WBC*	0.0164				
NO ₂ -PD	%Eos***	0.0003			TARC*	0.0404
	Eos***	<0.0001				
	Baso	0.513				
NO _x -PD	%Eos***	<0.0001			TARC*	0.0376
	Eos***	<0.0001				
	%Neu	0.0851				
	Bas*	0.0446				
NO ₂ -PM	Eos*	0.0196			%Lym	0.0741
	NO	0.0712			Lym*	0.0271
	V ₅₀ /25	0.0767			FEV1	0.0731
					V ₂₅ *	0.0426
					V ₅₀	0.081
NO _x -PM	%Eos*	0.0335			%Lym*	0.026
	Eos*	0.031			Lym	0.0593
	V ₅₀ /25	0.0585			FEV1	0.0726
	NO	0.0724			V ₅₀	0.0867

					V25 TARC**	0.0523 0.0032
PM2.5-PD	IgE* Lym	0.0401 0.0721	%Eos*** Eos*	0.0031 & 0.0483 0.0158 & 0.0987		
PM2.5-PM	H2O2	0.0675			%Bas* Bas* Eos* NO*	0.0382 0.0377 0.0495 0.0366

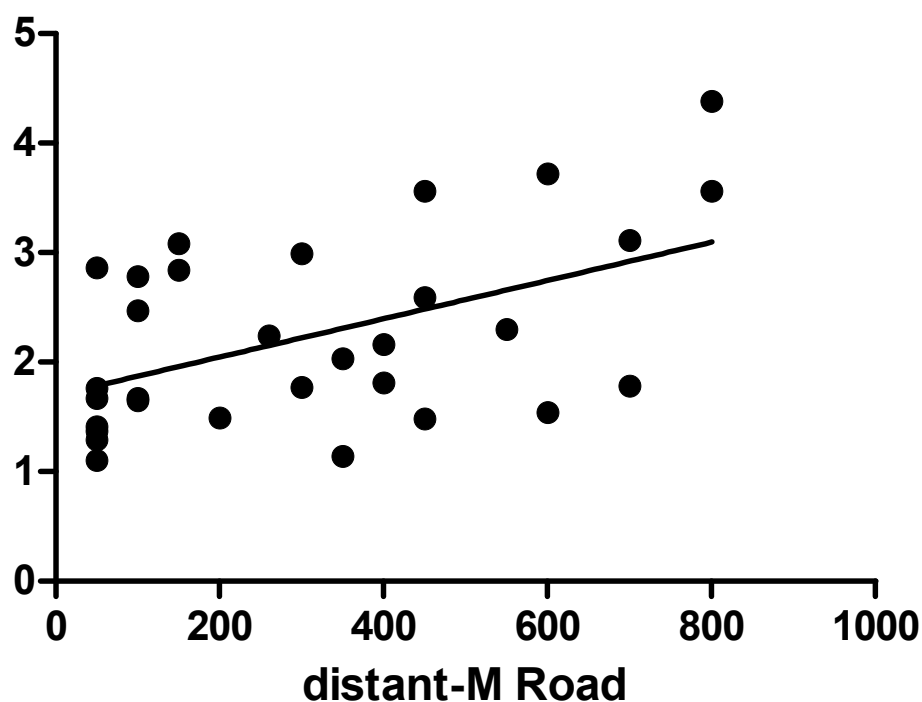


図10 幹線道路までの距離と%1秒量との相関

5 ぜん息患者の増悪及び未発症成人の発症の予測のための気道バイオマーカーの確立とその大気汚染物質の影響評価への応用に関する調査研究の総括

(1) 各年度の目標（計画）

【平成24年度】

平成24年度は初年度であり、各施設の倫理委員会の承認を得た上でインフォームドコンセントの得られたぜん息患者、慢性咳などの呼吸器症状とアレルギー素因を示しながらも未だぜん息の典型的表現型を示さない患者、および健康人を登録する。各群の診断は公表されたガイドラインに基づく診断基準で行う。問診、臨床検査、呼気一酸化窒素濃度測定(FeNO)に加え、抗

酸化酵素群(グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST), HO-1, Nrf-2)の遺伝子多型の同定と呼気凝縮液(exhaled breath condensates, EBC)を採取する。これらのサンプル採取とその保存管理は予備的に実施済みではあるが、各施設でスムーズに管理・実施できるかの実証を行う。ついで、解析項目として、各群における分子マーカーの比較、抗酸化酵素の遺伝子多型による差のありなし、それぞれの種々の内的外的要因との関連に加え、公開されている地域別大気汚染データや幹線道路からの距離と各マーカーの関連を統計学的に解析する。

1) 研究の対象と役割分担：各施設の倫理委員会の承認を得た上でインフォームドコンセントの得られたぜん息患者、慢性咳などの呼吸器症状とアレルギー素因を示しながらも未だぜん息の典型的表現型を示さない患者、および健常人を登録する。各種病態群の分類は、ぜん息やCOPDのスクリーニングのために国際的評価が定まっているIPAG診断・治療ハンドブック日本語版(慢性気道疾患プライマリケア医用ガイド 2005 International Primary Care Airways Group (IPAG)：日本呼吸器学会編) IPAGの問診表に基づいて行う。

2) 研究方法：調査項目：各群の診断は公表されたガイドラインに基づく診断基準で行う。

- ・必要な問診、臨床検査、呼気一酸化窒素濃度測定に加え、抗酸化酵素群(グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST), HO-1, Nrf-2)の遺伝子多型の同定と呼気凝縮液(exhaled breath condensates, EBC)を採取する。

- ・増悪およびぜん息発症イベントを経時的に調査する。

- ・EBCはR-tubeにより安静自発呼吸下5分間で採取し、抗酸化活性を含むEBC中の分子マーカーを経時的に測定する。

- ・抗酸化活性を含むEBC中の分子マーカーの測定：

フリーラジカル解析装置FREE(図3)(医療機器届出番号：13B2X10066W00004 一般的名称：パック式臨床化学分析装置[イタリア製])は、光度計と遠心分離機を備え、抗酸化力や活性酸素・フリーラジカルレベルをin vivo、in vitroの両面で総合的に分析する事が可能なラボ用分析システムである。

- ・公開されている大気汚染データを経時的に収集する。

- ・各人の抗酸化酵素遺伝子多型の同定：採血により得られたgenomic DNAを既報の論文に準じて(Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease：T Ishii, S Teramoto, H. Matsui, et al: Thorax 1999; 54: 693-696)、PCR primerと、Alw26Iの制限酵素を用いて、検討を行う。

3) 解析：各群における分子マーカーの比較、それぞれの種々の内的外的要因との関連に加え、公開されている地域別大気汚染データや幹線道路からの距離と各マーカーの関連を統計学的に解析する。川崎市公害監視センターから公開されている市内の一般局(8箇所)および自排局(10箇所)の大気汚染物質の濃度データと呼気凝縮液中の気道炎症マーカーの相関を検討した。各人の自宅または勤務地住所からもっとも近傍の測定局のデータを用いた。EBCのデータとの相関関係をみるにあたり、過去の大気汚染曝露という観点からは、直近1年間の平均値、直近1ヶ月間の平均値、及びリアルタイムの曝露データとして当日のデータを用いた。三鷹市地域の大気汚染データと呼気凝縮液中炎症マーカーの関連は、東京都環境局のホームページ(http://www.kankyo.metro.tokyo.jp/air/air_pollution/result_measurement.html)、および大気汚染状況速報(そらまめ君)(<http://soramame.taiki.go.jp/>)から公開されている市内の大気汚染物質の濃度データと呼気凝縮液中の気道炎症マーカーの相関を検

討した。各人の自宅または勤務地住所からもっとも近傍の測定局のデータを用いた。EBC のデータとの相関関係をみるにあたり、いままでの結果を参考に、過去の大気汚染曝露という観点からは、直近 1 年間の平均値、直近 1 ヶ月間の平均値、及びリアルタイムの曝露データとして EBC 採取当日のデータを用いた。

【平成 25 年度】

今年度は 2 年間の研究の最終年度であり、各施設の倫理委員会の承認を得た上でインフォームドコンセントの得られたぜん息患者、慢性咳などの呼吸器症状とアレルギー素因を示しながらも未だぜん息の典型的表現型を示さない患者、および健常人を対象として、問診、臨床検査、呼気一酸化窒素濃度測定に加え、呼気凝縮液(exhaled breath condensates, EBC)を採取する。抗酸化酵素群(グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)P1)の遺伝子多型の同定を行う。臨床的所見と、それぞれの種々の内的外的要因との関連に加え、公開されている地域別大気汚染データや幹線道路からの距離と各マーカーの関連を統計学的に解析し、ぜん息患者の増悪及び未発症成人の発症の予測のための気道バイオマーカーの確立とその大気汚染物質の影響評価への応用を目指す。さらに 2 年間の調査研究の成果を総括して、今後の研究の発展の方向性とともな社会的な貢献の可能性についても考察する。

- 1) 研究体制：患者の選定、説明と同意、サンプル採取と臨床的情報の記録は 3 施設で行う。
主要なサンプル測定は東大で独立して実施する。データの総括と解析は主として杏林大学で行う。
- 2) 研究の対象：各施設の倫理委員会の承認を得た上でインフォームドコンセントの得られたぜん息患者、慢性咳などの呼吸器症状とアレルギー素因を示しながらも未だぜん息の典型的表現型を示さない患者、および健常人を登録する。各種病態群の分類は、ぜん息や COPD のスクリーニングのために国際的評価が定まっている IPAG 診断・治療ハンドブック日本語版(慢性気道疾患プライマリケア医用ガイド 2005 International Primary Care Airways Group (IPAG)：日本呼吸器学会編) IPAG の問診表に基づいて行う。
- 3) 研究方法：調査項目：各群の診断は公表されたガイドラインに基づく診断基準で行う。
 - ・必要な問診、臨床検査、呼気一酸化窒素濃度測定に加え、抗酸化酵素群(グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)P1)の遺伝子多型の同定と呼気凝縮液(exhaled breath condensates, EBC)を採取する。EBC は R-tube により安静自発呼吸下 5～10 分間で採取し、抗酸化活性を含む EBC 中の分子マーカーを経時的に測定する。
 - ・抗酸化活性を含む EBC 中の分子マーカーの測定：
フリーラジカル解析装置 FREE (医療機器届出番号：13B2X10066W00004 一般的名称：パック式臨床化学分析装置 [イタリア製]) は、光度計と遠心分離機を備え、抗酸化力や活性酸素・フリーラジカルレベルを in vivo、in vitro の両面で総合的に分析する事が可能なラボ用分析システムである。サンプルの前処理から測定結果までこの装置 1 台で完結するシステムである。
 - ・大気汚染データを経時的に収集する。
 - ・各人の抗酸化酵素遺伝子多型の同定：採血により得られた genomic DNA を既報の論文に準じて (Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease：T Ishii, S Teramoto, H. Matsui, et al: Thorax 1999; 54: 693-696)、PCR primer と、Alw26I の制限酵素を用いて解析した。

4) 解析:各群における分子マーカーの比較、それぞれの種々の内的外的要因との関連に加え、公開されている地域別大気汚染データや幹線道路からの距離と各マーカーの関連を統計学的に解析する。川崎市公害監視センターから公開されている市内の一般局および自排局の大気汚染物質の濃度データと呼気凝縮液中の気道炎症マーカーの相関を検討した。各人の自宅または勤務地住所からもっとも近傍の測定局のデータを用いた。三鷹市地域の大気汚染データと呼気凝縮液中炎症マーカーの関連は、東京都環境局のホームページ(http://www.kankyo.metro.tokyo.jp/air/air_pollution/result_measurement.html)、および大気汚染状況速報(そらまめ君)(<http://soramame.taiki.go.jp/>)から公開されている市内の大気汚染物質の濃度データと呼気凝縮液中の気道炎症マーカーの相関を検討した。各人の自宅または勤務地住所からもっとも近傍の測定局のデータを用いた。

(2) 研究成果

【平成 24 年度】

1) 気管支ぜん息患者における EBC 中各種分子マーカーの地域差に関する検討結果

前年度までの検討で、川崎地区で観察された大気汚染物質濃度との関連性が、三鷹地区ではみられなかったことから、両地域間で大気汚染濃度の比較を行うとともに、EBC 中各種分子マーカー濃度に差があるか否かを検討した。すなわち、平成 23 年度から 24 年度に至るまでの呼気凝縮液サンプルのうち、比較的気象条件が安定していたと想定される平成 24 年および平成 25 年 1~2 月のものを選び、川崎市と三鷹市における大気汚染物質の濃度を比較した。その結果、三鷹地区(A)と川崎地区(B)との大気中浮遊粒子状物質の濃度($\mu\text{g}/\text{m}^3$)の比較において、有意に川崎地区のほうが高かった($p<0.001$)。さらに、同時期における川崎市と三鷹市の間で EBC 中各種分子マーカー濃度に差があるか否かを検討した。その結果、EBC 中の HGF のみ川崎市の方が高い傾向にあったが有意ではなく、その他の分子マーカーにも 2 地区の間で有意な差は認めなかった。一方、EBC の pH は川崎地区のサンプルで有意に低く、酸性に傾いていた。このことは、川崎地区のぜん息患者群の気道炎症病態において、より酸化ストレスがかかっていることを示唆するデータであった。

2) 気管支ぜん息患者における EBC 中酸化ストレスマーカーと臨床像に関する検討結果

今回は EBC の酸化ストレスマーカーとして、d-ROMs 呼気 Test / 呼気凝縮液中の酸化度(過酸化水素)を測定し、種々の臨床パラメーターとの相関を検討した。年齢と性別による測定値の変動は認められなかった。続いて、気管支ぜん息群と非ぜん息群で EBC d-ROMs 呼気 Test を比較した。ぜん息群(A群)で非ぜん息群(B)と比較して有意に高値を認めた。EBC pH と d-ROMs 呼気 Test / 呼気凝縮液中の酸化度(過酸化水素)の相関:有意な相関を認めなかった。

EBC 中の酸化度(H2O2)と治療ステップとの間には有意な相関を認めなかった。

血清中総 IgE 値と EBC H2O2 との相関を検討したが、有意な相関は見られず、呼気 FeNO との相関も認めなかった。さらに、気道閉塞の指標として%FEV1 を選び、EBC 酸化ストレスマーカーとの相関を検討したが、有意な相関関係は認めなかった。

3) 大気汚染と EBC 酸化ストレスマーカーの関連性に関する検討:

今回は、大気中微小粒子状物質(ほぼ PM10 に匹敵、 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)と EBC データとの相関を検討したが、有意な相関関係は認めなかった。

4) ぜん息患者群における抗酸化酵素遺伝子多型の検討

今年度は初年度であることから、遺伝子解析に関する各施設の倫理委員会の承認に時間を要したため、サンプリングに十分な期間を確保できなかった。現時点では、以下に述べるように同意の得られたぜん息患者における GSTP1 の遺伝子多型の少数例における検討が可能であった。GSTP1 の遺伝子多型については、Gilliland FD らがアレルギー性鼻炎患者においてアレルゲンと DEP の鼻腔内チャレンジを行い、homozygous wild type (A/A: Ile/Ile) ではそのほかの多型に比較して有意に IgE やヒスタミンの上昇と鼻炎症状の悪化を認めている (Lancet. 2004 Jan 10;363(9403):119-25.)。現在までに検討できた 6 症例では homozygous wild type (A/A: Ile/Ile) が no 2, 3, 5, 6 で、hetero (A/G: Ile/ Val) は no 4, 8 であった。なお今回のサンプル内には homo mutant (G/G: Val/Val) は認めなかった。この検討により、本研究計画によって有効にサンプルが採取され、抗酸化酵素の遺伝子多型が同定できることが確認された。今後、症例数を増やしてそれぞれの多型と EBC 中酸化ストレスマーカーや pH との関連を追究してゆく。

【平成 25 年度】

研究も最終年度となり、サンプルの収集と解析も順調に進行するようになり、平成 24 年度と比べ解析結果もより充実したものとなった。

1) 気管支ぜん息患者における臨床病態と幹線道路までの距離に関する検討結果

本研究の参加者の自宅と幹線道路からの距離とぜん息患者の気道炎症をはじめとする各種臨床指標や重症度との相関を検討した。この結果、三鷹地区居住者の幹線道路からの距離と各種臨床指標については有意な相関は認められなかったが、幹線道路から 200m 未満と 200m 以上とで分けると、STEP5 の重症のぜん息患者は全員が 200m 未満に居住しており、幹線道路に住居が近い参加者でぜん息が重症であることが示唆された。さらに、三鷹地区・川崎地区の居住者の幹線道路からの距離は、%FEV1、FEV1/FVC と統計的に有意な正の相関を認めた。

2) 気管支ぜん息患者における臨床病態と大気汚染との関連性に関する検討結果：

気管支ぜん息患者における臨床病態と大気汚染との関連性に関する検討するために、大気汚染物質の測定データとぜん息の各種臨床指標との相関性を検討した。前日の NO₂ 濃度 (NO₂-PD) は、末梢血好酸球数 Eos と有意な相関を示し ($P < 0.01$)、%Eos とは相関する傾向を示した ($p = 0.085$)。一方、1 か月前の NO₂ 濃度 (NO₂-PM) は FEV1/FVC と有意な相関を示し ($p < 0.05$)、BW および BMI と相関する傾向を示した (それぞれ、 $p = 0.0764$, $p = 0.064$)。さらに、前日の NO_x 濃度 (NO_x-PD) は Eos および %Eos と有意な相関を示した ($p < 0.01$)。一方、前月の NO_x 濃度 (NO_x-PM) は BMI、FEV1/FVC と有意な相関を示し ($p < 0.01$ および $p < 0.05$)、呼気 NO とは相関する傾向を示した ($p = 0.0609$)。以上から、大気汚染の NO₂-PD と NO_x-PD、NO₂-PM と NO_x-PM はぜん息の気道炎症や呼吸機能の諸指標とそれぞれよく似た相関を示すと考えられた。PM_{2.5} 濃度との関連性では、前日の PM_{2.5} 濃度 (PM_{2.5}-PD) は Eos および %Eos と有意な相関を示した ($p < 0.001$)。また、前月の PM_{2.5} 濃度 (PM_{2.5}-PM) は、末梢血中好塩基球 Bas および %Bas と有意な相関を示した ($p < 0.05$)。一方、同様の解析を COPD 患者でも実施したが、以上の様な相関は認めず、以上の大気汚染物質濃度との関連性はぜん息にユニークであることもわかった。

3) 気管支ぜん息患者における EBC 中分子マーカーに関する検討結果

EBC H₂O₂ 濃度と末梢血所見での検討では、EBC H₂O₂ 濃度は、%Eos、Eos とともに有意な相関を認めなかった。Neu および %Neu は、H₂O₂ が増加すると減少する負の相関の傾向を示した (それぞれ、 $p = 0.086$, $p = 0.0803$)。また、%Lym は統計学的に有意な正の相関 ($p < 0.05$) を認めたが、

Lym は有意な相関を認めなかった。一方、気管支ぜん息患者では EBC H2O2 濃度は呼気 NO と有意な正の相関を認め、ぜん息気道炎症と相関すると考えられた ($p=0.0107$)。

4) ぜん息患者における EBC 中酸化ストレスマーカーと大気汚染物質の濃度との関連性の検討

続いて、大気汚染の測定値と個人の EBC 中酸化ストレスとの関連性を追求するために、大気汚染の指標と EBC 中 H2O2 との相関を検討した。その結果、呼気凝集液中の H2O2 は NO2 の前月値と有意な相関を認めた ($r=0.30$, $p=0.03$)。一方、EBC 中酸化ストレスマーカーは PM2.5 濃度とは有意な相関は認めなかった。EBC 中酸化ストレスマーカーは、幹線道路と居住地との距離、NO2-PD、NOx-PD、NOx-PM、とは有意な相関を認めなかった。

5) GST-P1 の遺伝子多型の解析結果：

表 2 に GSTP-1 遺伝子多型を解析した結果を示したが、全部で 111 例で実施可能であった。ホモ AA が 79 例、ヘテロ AG が 32 例であった。未確定例がなお 40 例以上あり、現在解析中である。

6) ぜん息患者における遺伝多型と各種臨床指標

AA 群と AG 群との年齢、BMI、喫煙量、合併症等に差がなく、ぜん息の症状にも差は認めなかった。両群では、呼吸機能検査の指標である VC、FEV1、FVC 等に有意な差を認めなかった。白血球の数、その分画を検討したところ、Eos が AA 群 405 ± 507 、AG 群 215 ± 119 と AA 群が多い傾向が認められたものの、有意な差ではなかった。呼気 H2O2 は AA 群 1.116 ± 1.792 、AG 群 0.6846 ± 0.6931 、および NO 値は AA 群 35.7 ± 27.1 、AG 群 25.2 ± 15.8 と AA 群が高値である傾向を認めた。さらに、CRP は AA 群が 0.85 ± 1.58 、AG 群が 0.15 ± 0.14 と AA 群が高値である傾向を認め、IgE は AA 群が 658 ± 1117 、AG 群が 177 ± 214 と AA 群が有意に高値であった ($p<0.05$)。全般的に有意差のついた指標は総 IgE のみであったが、そのほか好酸球数、呼気 NO、EBC H2O2 などホモ AA 群で高い傾向を認め、気道炎症の程度が高いことを推測させた。

7) 気管支ぜん息患者の遺伝子多型と大気汚染との関連：

次に抗酸化ストレス酵素 GSTP-1 の遺伝子多型による個人 EBC ストレスマーカーと大気汚染との関連について検討するため、AA 型と AG 型に分けて、それぞれ大気汚染の指標と臨床指標との相関を検討した (表 3)。

まず、自宅と幹線道路との距離と相関する臨床指標は、AA 型患者では %Lym ($p<0.01$)、Neu ($p<0.05$)、WBC ($p<0.05$) と相関を認めた。NO2-PD(前日)は %Eos ($p<0.001$)、EOS ($p<0.0001$) と有意な相関を認めた。NOx-PD(前日)は、NO2-PD とほぼ同様の結果で、%Eos ($p<0.0001$)、EOS ($p<0.0001$)、Bas ($p<0.05$) と有意な相関を認めた。PM2.5-PD は、AA 型患者で IgE と有意な相関を示し ($p<0.05$)、Lym と相関する傾向を認めた。また、Eos および %Eos は AA 型患者、AG 型患者双方で有意な相関あるいは、その傾向を認めた。PM2.5-PM は、AA 型患者で H2O2 と関連を認めたが、有意な相関ではなかった ($p=0.0675$)。AG 型患者では、%Bas、Bas、Eos、NO と有意な相関を認めた (いずれも、 $p<0.05$)。

全体群での検討で有意な相関関係を認めた、1. 幹線道路からの距離と FEV1/FVC、2. EBC H2O2 と NO2 の前月値、3. PM2.5 前月値と血中好酸球数、4. BMI と好酸球数、および 5. NO2 の前日値と好酸球数の各項目について、AA 群と AG 群で個別に解析した。その結果は、AA 型患者では上記 5 項目とも統計学的に有意な相関を認めたが、AG 型では有意な相関を認めなかった。すなわち、以上の全体群で観察された有意な相関は AA 群の結果が反映されていたと考えられた。

6 期待される活用の方向性

いままでの研究により、ぜん息群および非ぜん息群において EBC の測定による気道炎症病態の解析を行い、EBC は採取も容易で再現性もあり、その微量分析によって得られる各種分子マーカーや pH は個人の気道炎症の指標として有用であることを示した。さらに、大気汚染データと有意に相関し、浮遊粒子状物質などが個人の気道炎症に対する寄与因子であることが明らかにされた。大気汚染物質に対する高感受性群の抽出に応用できれば、ぜん息などのアレルギー疾患の発症予知や一次予防の指標として用いることができると期待された。

本研究では、これらの成果を基盤として、EBC 中の pH や酸化ストレスマーカーを評価し、その個人差の決定要因である抗酸化酵素群の遺伝子多型も検討して、EBC 中バイオマーカーと高感受性の関連性をより明確にすることを目指した。当初指摘されたいくつかの問題点も解決しつつあるものもあった。すなわち、従来の大気汚染モニタリングでは DEP のよい代替指標とされる PM_{2.5} がほとんど測定されておらず、ぜん息気道炎症病態との直接的な相関解析が困難であったが、近年の越境汚染の現状から各地域で PM_{2.5} の測定点が充実され、平成 25 年度には PM_{2.5} と各種マーカーとの分析が可能となった。また、主任研究者の異動に伴い、主たる測定解析場所を川崎市と東京都三鷹市の 2 か所に増やしたものの、平成 24 年度はサンプル収集の体制や時間的制約があり、ぜん息気道炎症との相関は認めなかった点についても、平成 25 年度は症例数が増加した結果、EBC H₂O₂ 濃度と末梢血好中球との負の相関や%Lym との間に有意な正の相関を認めた。さらに、EBC H₂O₂ 濃度は呼気 NO と有意な正の相関を認め、ぜん息気道炎症と相関すると考えられた ($p=0.0107$, 図 6)。さらに重要なことは、EBC H₂O₂ と大気汚染物質との相関を検討した結果、呼気凝縮液中の H₂O₂ は NO₂ の前月値と有意な相関を認めた ($r=0.30$, $p=0.03$, 図 7)。一方、EBC 中酸化ストレスマーカーは PM_{2.5} 濃度とは有意な相関は認めなかった (図 8)。その他、EBC 中酸化ストレスマーカーは、幹線道路と居住地との距離、NO₂-PD、NO_x-PD、NO_x-PM、とは有意な相関を認めなかった。さらに、抗酸化酵素群の遺伝子多型の症例数がふえたことで、抗酸化ストレス防御能と大気汚染濃度および EBC の分子マーカー、とくに酸化ストレスマーカーとの関連性を解析できた。その結果、GSTP-1 のホモ AA 群が全般的に気道炎症マーカーが高値をとる傾向が認められた。大気汚染物質との関連性は GSTP-1 の遺伝子多型によって有意な差は認めなかったが、今後さらなる検討が必要である。

以上の検討から、ぜん息群において、EBC は採取も容易で再現性もあり、その微量分析によって得られる各種分子マーカーや pH は個人の気道炎症の指標として有用であることが示された。この手法が大気汚染物質に対する高感受性群の抽出に応用できれば、ぜん息などのアレルギー疾患の悪化予測の指標として用いることができると期待される。

本研究において全体群での検討で有意な相関関係を認めた、1. 幹線道路からの距離と FEV₁/FVC、2. 呼気凝縮液中 H₂O₂ と NO₂ の前月値、3. PM_{2.5} 前月値と血中好酸球数、4. BMI と好酸球数、および 5. NO₂ の前日値と好酸球数の各項目について、AA 群と AG 群で個別に解析した。その結果は、AA 型患者では上記 5 項目とも統計学的に有意な相関を認めたが、AG 型では有意な相関を認めなかった。すなわち、以上の全体群で観察された有意な相関は AA 群の結果が反映されていたと考えられた。

今回の研究により、EBC H₂O₂ 濃度は呼気 NO と有意な正の相関を認めた。EBC の H₂O₂ は NO₂ の前月値と有意な相関を認めた ($r=0.30$, $p=0.03$)。一方、EBC 中酸化ストレスマーカーは PM_{2.5} 濃度とは有意な相関は認めなかった。そして個人の大气汚染に対する感受性の評価のためには

gene-environment interaction を考慮した検討すなわち抗酸化酵素遺伝子群の多型を考慮した調査研究が、必須であることが明らかになった。すなわち、GSTP1 多型の解析では AA ホモ群では、幹線道路からの距離と FEV1/FVC や、EBC 中 H2O2 と NO2 の前月値との相関を認めたが、AG 型では有意な相関を認めなかった。以上の全体群で観察された有意な相関は AA 群の結果が反映されていたと考えられた。すなわち、AA 型は少なくとも今回検討した喘息患者群での大気汚染物質の呼吸器影響に関しては高感受性を示す可能性が示された。今後の課題として、EBC H2O2 レベルから GSTP-1 の多型の推定が可能かどうか、ぜん息の悪化リスクの予想が可能かどうか、などの検討を一層進める必要がある。また、本研究では期間内に実施しえなかったが GSTP-1 以外の抗酸化ストレス酵素についても検討していきたい。気道の酸化ストレスマーカーとぜん息の臨床経過との関連性がより明確になれば、増悪や発症のハイリスク群の抽出とその効率的な対策の実施に寄与できると期待される。

今後の研究の展開に当たっては、対象者が大気汚染に暴露される期間、生活様式、喘息治療薬、治療による検査データの修飾、受動喫煙などの諸因子の影響を考慮して進める必要があると思われる。

【学会発表・論文】

平成 24 年度、25 年度業績

[発表]

1. 和田 裕雄, 竹田 紘崇, 中村 益夫, 柳下 由弥, 内田 麻耶, 秋山 陽子, 櫻井 梨奈, 西之野 梨奈, 滝澤 始, 後藤 元: COPD アセスメントテスト (CAT) の経時的変化 (会議録) 日本呼吸ケア・リハビリテーション学会誌 (1881-7319) 22 巻 Suppl. Page122s (2012. 10)
2. 本多 紘二郎, 和田 裕雄, 中村 益夫, 乾 俊哉, 田村 仁樹, 檜垣 学, 渡辺 雅人, 倉井 大輔, 皿谷 健, 石井 晴之, 後藤 元, 滝澤 始, 松本 丈武, 横井 秀格, 甲能 直幸: 手術前後の呼気中 NO 濃度を追跡しえた好酸球性副鼻腔炎合併ぜん息の 1 例 (会議録/症例報告) アレルギーの臨床 (0285-6379) 32 巻 8 号 Page770 (2012. 08)
3. 三上 優, 山内 康宏, 幸山 正, 堀江 真史, 齋藤 朗, 城 大祐, 滝澤 始, 長瀬 隆英: TNF superfamily の LIGHT は肺胞上皮細胞での TGF- β 1 刺激による上皮間葉転換 (EMT) を増強する (会議録) 日本呼吸器学会誌 (2186-5876) 1 巻増刊 Page322 (2012. 03)
4. 檜垣 学, 和田 裕雄, 安武 哲生, 中村 益夫, 本多 紘二郎, 三倉 真一郎, 新倉 保, 小林 富美恵, 菅間 博, 神谷 茂, 滝澤 始, 後藤 元: 喫煙曝露マウスにおける Interleukin-10 の役割 (会議録) 日本呼吸器学会誌 (2186-5876) 1 巻増刊 Page136 (2012. 03)
5. 西川 正憲, 長倉 秀幸, 草野 暢子, 小澤 聡子, 掛水 信将, 小野 容明, 駒瀬 裕子, 中村 陽一, 金子 猛, 滝澤 始, 秋山 一男, 中 佳一, 神奈川県内科医学会呼吸器疾患対策委員会: ぜん息予防・管理ガイドライン (JGL) 2009 の準拠状況からみた成人ぜん息診療 (会議録) アレルギー (0021-4884) 61 巻 3-4 Page462 (2012. 04)
6. 李 英姫, 清水 孝子, 平田 幸代, 稲垣 弘文, 新海 雄介, 吾妻 安良太, 滝澤 始, 武田 健, 川田 智之, 工藤 翔二: ディーゼル排気粒子の気道上皮細胞の遊走、および上皮間葉移行 (EMT) に及ぼす影響 (会議録) 日本衛生学雑誌 (0021-5082) 67 巻 2 号 Page284 (2012. 02)
7. 滝澤 始, 荏原 順一: 司会の言葉: シンポジウム 16: 気管支ぜん息の病態機序解明の新展

開 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2011. 11)

8. H. Takizawa et al.: Airway Inflammatory Markers In Patients With Asthma Are Correlated With Air Pollution 2012 ATS International Conference in San Francisco, California, USA, May 2012.

9. 滝澤 始: 大気汚染環境によるアレルギー疾患への影響。第 43 回日本職業・環境アレルギー学会, 神奈川、2013 年)7 月 5 日 (金)・6 日

10. 滝澤 始: ワークショップ: 環境因子と呼吸器疾患。大気汚染と呼吸器疾患: とくに PM2.5 について。第 23 回日本呼吸ケア・リハビリテーション学会学術集会、東京、2013. 10. 11.

11. Hajime Takizawa: Assembly Symposium: New Horizons in Clinical Respiratory Medicine. Impact of air pollution on lung health. The 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology: APSR 2013, Tokyo, 2013. 11. 14.

[論文]

1. 和田 裕雄, 檜垣 学, 三倉 真一郎, 滝澤 始: 【難治性ぜん息研究の新展開】難治化因子としての喫煙 受動喫煙も含めて (解説/特集) 呼吸器内科 (1884-2887) 21 巻 1 号 Page8-15 (2012. 01)

2. 小出 卓, 滝澤 始: COPD 診療をめぐる最近の進歩 細胞 (1346-7557) 44 巻 3 号 Page104-105 (2012. 03)

3. 滝澤 始: 吸入ステロイド薬は成人ぜん息の自然経過を修飾するか? Con の立場から (解説) ぜん息 (0914-7683) 25 巻 2 号 Page202-204 (2012. 11)

4. 本多 紘二郎, 滝澤 始: 気道の構造と機能 気道の免疫、病態 気道上皮の免疫機構 (解説/特集) 日本胸部臨床 (0385-3667) 71 巻増刊 PageS40-S46 (2012. 08)

5. 西川 正憲, 小野 容明, 松下 尚憲, 楠原 範之, 高田 信和, 高橋 正光, 宮川 政昭, 寺内 康夫, 松葉 育郎, 長谷 章, 富田 さつき, 橋本 隆平, 加藤 秀継, 宮入 朗, 中村 陽一, 駒瀬 裕子, 金子 猛, 滝澤 始, 秋山 一男, 中 佳一: 神奈川県における成人気管支ぜん息診療の実態 神奈川県内科医学会呼吸器疾患対策委員会・アンケート調査の結果 (原著論文) 神奈川医学会雑誌 (0285-0680) 39 巻 1 号 Page1-9 (2012. 01)

6. Li YJ, Shimizu T, Hirata Y, Inagaki H, Takizawa H, Azuma A, Kawada T, Sugawara I, Kudoh S, Sunazuka T, Omura S.

EM, EM703 inhibit NF- κ B activation induced by oxidative stress from diesel exhaust particle in human bronchial epithelial cells: Importance in IL-8 transcription. Pulm Pharmacol Ther. 2013 Jan 3. doi:pii: S1094-5539(12)00181-2. 10.1016/j.pupt.2012.12.010. [Epub ahead of print]

7. Mikami Y, Yamauchi Y, Horie M, Kase M, Jo T, Takizawa H, Kohyama T, Nagase T.

Tumor necrosis factor superfamily member LIGHT induces epithelial-mesenchymal transition in A549 human alveolar epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Nov 30;428(4):451-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.097. Epub 2012 Nov 3.

8. Wada H, Takizawa H.: Future Treatment for COPD: Targeting Oxidative Stress and Its Related Signal. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 2012 Jul 10. [Epub ahead of print]

9. Li YJ, Shimizu T, Hirata Y, Inagaki H, Takizawa H, Azuma A, Kawada T, Sugawara I, Kudoh

- S, Sunazuka T, Omura S. EM, EM703 inhibit NF- κ B activation induced by oxidative stress from diesel exhaust particle in human bronchial epithelial cells: Importance in IL-8 transcription. *Pulm Pharmacol Ther.* 26/3, 318-324 2013
10. Li YJ, Kawada T, Azuma A. Nrf2 Is a Protective Factor against Oxidative Stresses Induced by Diesel Exhaust Particle in Allergic Asthma. *Oxid Med Cell Longev* (Review). 2013, Article ID 323607 2013
11. 李英姫, 川田智之, 滝澤始: 大気汚染における遺伝子環境相互影響 (特集: 職業性肺疾患の最新動向) *呼吸器内科* 23/5, 516-520 2013.

