

(1) 気管支ぜん息の発症、増悪予防に関する調査研究

②環境因子による増悪予防のための健康管理手法

環境因子による増悪予防のための健康管理手法

研究代表者：相 良 博 典

【第 11 期環境保健調査研究の概要・目的】

PM2.5 や光化学オキシダントなどの環境因子によるぜん息患者の急性増悪は古くから知られているが、その発症機序や予防方法については未解明な部分が存在する。光化学オキシダントは増加傾向にあり、未だ環境基準に到達していない。本研究は光化学オキシダントとぜん息に焦点を当てた検討を計画した。光化学オキシダントとぜん息増悪の関連性を評価し、室内待機など既存の具体的な予防行動の有用性について評価を行い、より効果的な対策方法を策定する。ぜん息患者における光化学オキシダント高感受性群を遺伝学的な基礎検討を行い同定する。光化学オキシダント高感受性ぜん息患者における健康相談の有用性について前向き臨床試験により評価を行う。何れの研究計画も倫理委員会に承認されたうえで実施する。そして、患者権利に最大限の配慮を行い、十分な説明と文書での同意のもと遂行する。

1 研究従事者（○印は研究代表者）

○氏名（昭和大学医学部内科学講座呼吸器・アレルギー内科学部門）	相良博典
氏名（昭和大学医学部内科学講座呼吸器・アレルギー内科学部門）	大西 司
氏名（昭和大学医学部内科学講座呼吸器・アレルギー内科学部門）	鈴木慎太郎
氏名（山梨赤十字病院 呼吸器内科）	小田成人
氏名（小田原市立病院 呼吸器内科）	藤原明子
氏名（昭和大学医学部内科学講座呼吸器・アレルギー内科学部門）	本間哲也

2 平成 30 年度の研究目的

複合的環境因子によるぜん息増悪予防のための健康管理手法の確立のために以下の目的を立案した。下記の大項目を検討することを本研究の目的とする。

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none">1. ぜん息患者において、地域差を踏まえた大気中光化学オキシダントの上昇とぜん息増悪との関連性についての検討を行う。2. ぜん息患者において、地域差を踏まえた大気中光化学オキシダントの上昇時における予防行動(室内待機など)の低減効果についての検討を行う。3. 光化学オキシダントによるぜん息増悪の機序に関して、末梢血を用いた高感受性群の同定を目的とした基礎的な検討を行う。4. ぜん息患者において、光化学オキシダントによる増悪高感受性群を対象とした、健康相談などによる介入を行い、前向き臨床研究によりその有用性について検討する。 |
|---|

上記大項目を分子科学的もしくは遺伝学的手法を用いて検討することにより、光化学オキシダントとぜん息の関連性を見出し、最適なぜん息医療の実施に結び付けることが最終的な目標になる。

そのうえで、平成 29 年度の総括で下記の事項についての修整や追加の検討が求められた。

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">1. TSLP と光化学オキシダントとの因果関係の明確化2. 光化学オキシダント高感受性群の同定や介入の困難性3. 光化学オキシダント以外の交絡要因や修飾因子の調整手法 |
|--|

よって、平成 30 年度においては 29 年度の発展と上記に関して修整を加えたうえで検討を行うこととした。

3 平成 30 年度の研究対象及び方法

【対象・方法】

本研究を遂行するに当たって、各臨床研究施設において本研究計画の倫理委員会に諮り承認後に開始する。本研究参加に文書同意が得られたぜん息患者群を対象に前向き観察研究を行う。その中で同意が得られた患者を対象に、光化学オキシダント高感受性群の同定のために血液検体保存を行った。

環境因子によるぜん息において末梢血好酸球や Th2 細胞の関与が古くから指摘されてきたが、group 2 innate lymphoid cell (ILC2) がぜん息病態に関わっていることが最近明らかにされた。しかし、ILC2 と光化学オキシダントなどの環境因子との関連は未だ報告されていない。ILC2 関連蛋白として気道上皮細胞から分泌される TSLP が最近注目されている。そこで、本年においては、気道上皮細胞を用いて光化学オキシダントによる TSLP の発現に関して検討を加えることとした。好酸球関連の抗体治療薬が最近では使用可能であるが、その上流に存在する気道上皮細胞由来 TSLP の発現と光化学オキシダントの関連性を検討することにより、光化学オキシダントに感受性が高い群が簡便に抽出でき可能性についても検討予定である。

本研究で用いる光化学オキシダントの測定データは環境省が提供する環境省大気汚染物質広域監視システム（通称 そらまめ君）情報を活用する。ぜん息患者日誌や臨床検査データなどの観察を通じて、患者 QOL のみならず、社会的経済損失、医療経済的負担などを地域性や大気中光化学オキシダント濃度を踏まえて解析並びに考察を行うことを可能とする。

外来通院中の患者にそらまめ君の活用を啓発することによる、ぜん息症状の変化についての検討を行った。具体的には、末梢血液中 TSLP が 500 (pg/ml) 以上を示した患者群に対して、そらまめ君を日々閲覧することを啓発した。日々の光化学オキシダントの発生状況による、行動変容を促すことによる、ぜん息症状の変化について記録することを計画した。

4 平成 30 年度の研究成果

本年の研究成果として下記の三点が主に挙げられる。

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">1. 光化学オキシダント関連物質による気道上皮細胞からの TSLP の発現2. そらまめ君活用によるぜん息症状スコア (ACT) の改善3. 光化学オキシダントに関連する交絡因子の検討 |
|--|

光化学オキシダント関連物質として、過酸化水素水 (H_2O_2) が挙げられる。また、IL-13 はぜん息に関連する重要なサイトカインであり、TSLP を誘導することは過去にも報告されている。そこで、過酸化水素水 (200nM) および IL-13 (100ng/ml) を正常気道上皮細胞 (NHBE 細胞) に添加し、24 時間後に上清を回収し、TSLP を ELIS 法で測定した。また、添加後 6 時間で細胞成分を回収し、RNA を抽出し cDNA を作成後に real time RT-PCR 法で TSLP mRNA を測定した。結果、過酸化水

素水単独では TSLP は誘導されなかったが、IL-13 との刺激で誘導増強が見られた (図 1)。

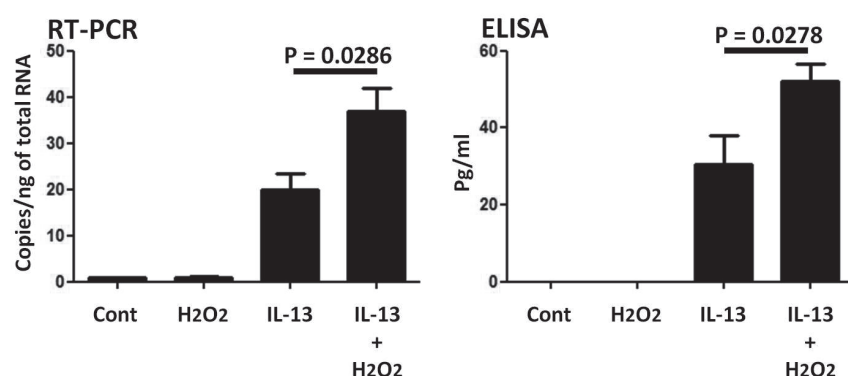


図 1. 正常気道上皮細胞 (NHBE 細胞)を IL-13 (100ng/ml)や過酸化水素水 (H₂O₂, 200nM)で刺激した。24 時間後に上清成分を回収し ELISA 法で TSLP 蛋白、6 時間後に細胞成分を回収し real time RT-PCR 法で TSLP mRNA を測定した。

次に前年度で確認された、TSLP 高発現群 (末梢血液中 500pg/ml 以上)におけるそらまめ君の閲覧啓発によるぜん息症状スコア (ACT)の変動について検討した。そらまめ君の光化学オキシダントの高発現日には屋内退避などの行動変容を促すことによる影響を検討した。結果、小人数ではあったが有意な改善は認められないものの、改善傾向を認めた (図 2)。

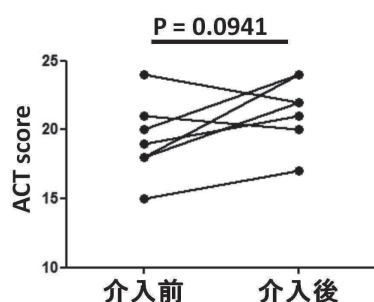


図 2. 末梢血液中 TSLP 高発現群(500pg/ml 以上)において、屋内退避などの行動変容をそらまめ君閲覧のもと、1 か月間の短期間で検討した。

最後に、交絡因子について検討を行った。同時期に発生している、PM_{2.5} などの大気汚染物質と光化学オキシダントとの発生状況について相関性を検討したが、おおむね PM_{2.5} の発生と光化学オキシダントの発生については相関性を認めた。しかし、光化学オキシダントは主として太陽光が強い夏場に発生することや、先の検討において光化学オキシダント関連物質が気道上皮細胞から TSLP を発現することからも、光化学オキシダントはぜん息の悪化要因であることが推察された。

5 第 11 期環境保健調査研究の総括

(1) 第 11 期環境保健調査研究における各年度の目標 (計画)

【平成 29 年度】

本年度は主に、光化学オキシダントと血液中 TSLP の関連性について検討を加えることとした。TSLP はぜん息において重要な蛋白であることは既にわかっており、TSLP に関する知見を公害ぜん

息分野に応用することにより、簡便でかつ有効な公害関連ぜん息に対する解決案を提案することが可能であると考えられる。よって、本年は主に公害関連ぜん息における TSLP などのぜん息において重要な蛋白発現について検討した。

【平成 30 年度】

平成 29 年度の総括で指摘された事項を主な研究対象とした。指摘事項を検討することにより、より深化した内容となった。本年度の最終的な目標は前年度で解明された公害関連ぜん息における TSLP の重要性を基に、そらまめ君などの既存のソフトを有効活用することを目標とした。

(2) 第 11 期環境保健調査研究における研究成果

【平成 29 年度】

【研究成果概要】

平成 29 年度の研究目的を達成するために環境省が提供する環境省大気汚染物質広域監視システム（通称 そらまめ君）情報を参照し、本研究参加施設間の光化学オキシダントの変動性を検討した。地域により、また季節によりその変動性の多様性が確認された。そして、重症ぜん息患者 80 例を対象に、中間解析を行った。今回の中間解析の目的は、血液ぜん息マーカーと地域性との関連に焦点を当てた。具体的には血液ぜん息バイオマーカーとして ILC2 関連分子群（TSLP や IL-33、IL-13）や好酸球関連分子群（IL-5）、Th2 関連分子群（IL-13）を試験的に測定した。血液ぜん息バイオマーカーと光化学オキシダントとの関連性を見出すことが可能であれば、今後の研究展開がより簡便になると考えている。血液ぜん息バイオマーカー測定の結果、TSLP が安定的にどの患者においても測定しうることが確認された。最後に地域性と TSLP 発現について検討したところ、サンプル数が少ないものの、地域性が存在する可能性が示唆された。

本検討に参加した、重症ぜん息患者 80 例の約 80% が女性であり、平均年齢は 54 歳（中央値 52 歳）であった。年間発作も 1 回以上経験しており、加療薬剤として中用量から高用量の吸入ステロイドを使用していた。そして、その大多数は長時間作用型 β_2 刺激薬や長期作用性吸入抗コリン薬、ロイコトリエン受容体拮抗薬などの併用薬を二種類以上使用していた。また、血中総 IgE の平均値は 481 IU/ml（中央値 291 IU/ml）であり、末梢血好酸球数の平均値は 325 / μ l（中央値は 90 / μ l）であった。また、測定した TSLP の平均値は 293 pg/ml（中央値は 9.1 pg/ml）、IL-33 の平均値は 1.1 pg/ml（中央値は 0 pg/ml）、IL-13 の平均値は 183 pg/ml（中央値は 0 pg/ml）、IL-5 の平均値は 8.8 pg/ml（中央値は 0 pg/ml）であった。TSLP が 45 人の対象者で測定できたのに対して、IL-33 や IL-13、IL-5 はほとんど測定できなかった（図 3）。なお、血液ぜん息バイオマーカーは 80 名とも同じ月に測定し、季節性の影響を限定する事に配慮した。

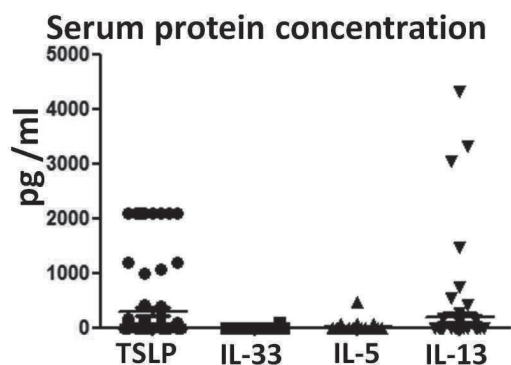


図 3. 各種の血液ぜん息バイオマーカーの測定状況。TSLP 蛋白と IL-13 が比較的安定的に測定可能であった。

次に TSLP と各種血液ぜん息バイオマーカーとの相関を検討した (図 4)。TSLP は IL-13 とのみ有意な相関が得られ、その関連に ILC2 が関わっていることが示唆された。

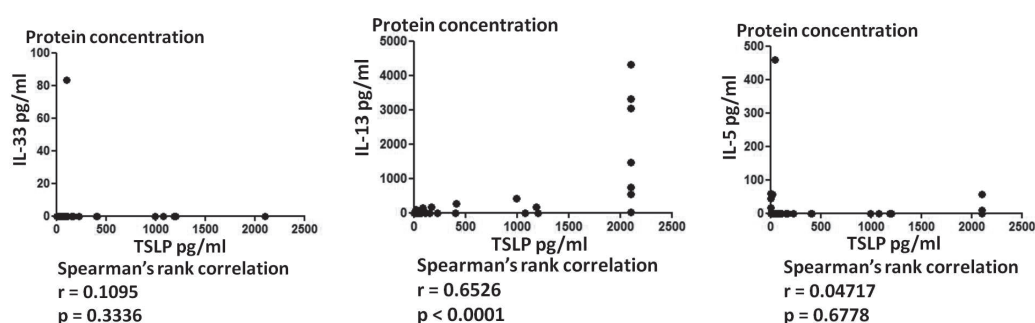


図 4. 血液中 TSLP と IL-33、IL-13、IL-5 との相関図。TSLP と IL-13 にのみ相関を認めた。

そして、IL-13 の発現状況により TSLP の発現を検討したところ、TSLP が 500 以上と未満で、層別化できる可能性が示唆された。更に、TSLP を 500 pg/ml で二群に分けて検討したところ、図 4 と同様に、TSLP と IL-13 の関連性が示唆された (図 5)。

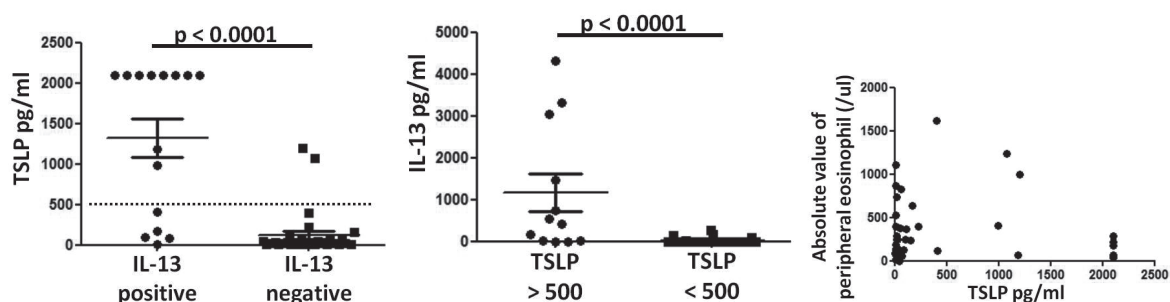


図 5. 血液中 TSLP と IL-13 の関連性。TSLP が 500 以上と未満で層別化でき可能性が示唆された。TSLP と末梢血好酸球数は相関を認めなかった。

最後に TSLP 発現と対象者住居地域の関連性について検討したところ、郵便番号 142 地域 (主に東京都品川区) と 145 地域 (主に東京都大田区) では TSLP 発現の差がある可能性が示唆された。そ

して、TSLP 測定時の光化学オキシダント発生量を比較したところ、142 地域で有意に光化学オキシダントの発生量は多かった。しかし、対象患者数が少ないことから今後は患者の臨床的背景、幹線道路からの距離、居住地一日滞在時間なども含めて検討する必要がある（図 6）。

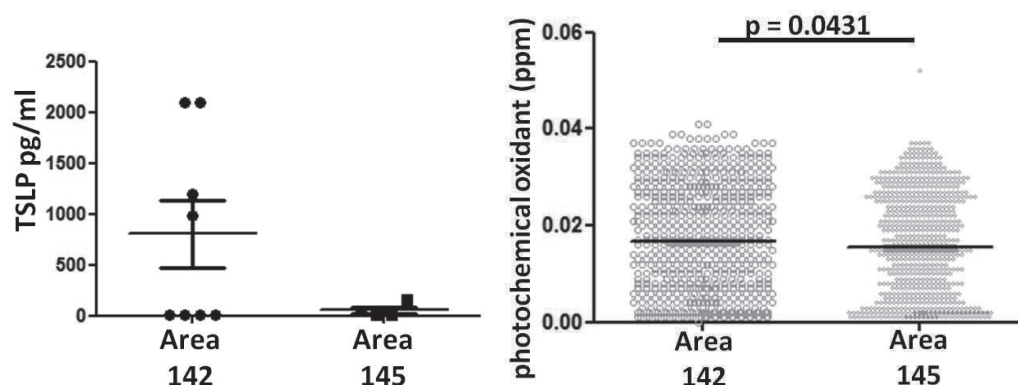


図 6. 血液中 TSLP 発現と住居地域における光化学オキシダントの比較。郵便番号 142 地域(東京都品川区)住居ぜん息患者は、145 地域（東京都大田区）より血液中 TSLP 発現が高く、142 地域は月間の光化学オキシダントの発生量が 145 地域より多かった。

【平成 30 年度】

【研究成果概要】

平成 30 年度においては主に、前年度の総括に指摘された事案について検討を加えた。

1. TSLP と光化学オキシダントとの因果関係の明確化
2. 光化学オキシダント高感受性群の同定や介入の困難性
3. 光化学オキシダント以外の交絡要因や修飾因子の調整手法
 1. に関しては、基礎実験的手法を用いて、光化学オキシダント関連物質（ H_2O_2 ）による TSLP の発現が確認された。
 2. に関しては、高感受性群の同定は費用対効果の側面から困難であることから、TSLP 抗発現群においてそらまめ君の有用性について検討を加えた。その結果として限定的ではあるが、その有用性が確認された。
 3. に関しては、他の公害関連物質と光化学オキシダントの発生に相関性を認めた。しかし、光化学オキシダントが主に夏季に発生することから、ぜん息患者における季節的悪化要因になる可能性が示唆された。よって、今後とも検討を加える予定である。

本年度の検討により、前年度の総括で指摘された事項を踏まえて、本研究の方向性を示すことができた。今後の方向性は下記に記す。

1. に関しては、光化学オキシダント関連物質がどのように TSLP 発現に関与するかについては、不明な点が多い。公害関連物質が TSLP 発現に関与するとの報告は乏しく、本研究およびその結果に新規性を認める。また、TSLP には中和抗体が現在開発されており、治療可能なターゲット蛋白である。本研究で用いたモデルを基に、TSLP の発現機序について検討することにより、新たな診断もしくは治療ターゲットの創出につながる可能性が示唆される。

2. に鑑定は、そらまめ君などの既存のソフトを用いることにより、ぜん息症状の緩和に役立つ可能性が示唆された。本手法により、ぜん息症例の個別化医療に役立つ可能性が示唆された。今後の広域化および対象症例数を増やすことにより、その有用性について検討を行う予定である。

3.に関しては、ぜん息などの特定疾患をターゲットとした公害関連物質に関連する研究における今後の方向性が示唆された。個々の公害関連物質は互いに相関性を持ちつつも、その特殊性を認める。よって、地域性、季節性などを重視した戦略の必要性があると考えられた。ぜん息患者の個別化医療のみならず、地域性や季節性など多軸的な運用を図ることにより、本研究調査並びに研究助成において有用な結果が見出せるものと思われた。よって、本研究推進においては、光化学オキシダントが活性化する夏季により重点を置いて検討することが望ましいと考えられた。また、より広域な研究対象地域を今後の研究計画に盛り込む予定である。

6 期待される活用の方向性

本研究を引き続き遂行することにより、下記の目標が達成されと考えている。

1. 光化学オキシダント高感受性群の設定とともに効率的な予防事業の運営
2. 光化学オキシダントと ILC2 を中心とした自然免疫との関連を見出すことにより、自然免疫における予防事業の在り方について新機軸の創出の可能性
3. 本研究に従事する若手医師研究員を増やすことにより、予防事業に精通した次世代の担い手の養成に寄与する

上記目標を達成すべく、研究課題を随時立案し検討する。

なお、本検討からそらまめ君の活用を啓発することにより、ぜん息症状の改善が示唆された。スマートフォンにおけるアプリ開発などを通じて、そらまめ君を活用することにより公害関連ぜん息の改善に寄与する可能性が示唆された。

【学会発表・論文】

現時点でなし。