

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23500775

研究課題名(和文) マウスを用いた運動誘発性気管支喘息モデルの作成とその解析

研究課題名(英文) The establishment and analysis of exercise induced asthma model in mice

研究代表者

鈴木 榮一 (SUZUKI, EIICHI)

新潟大学・医歯学総合病院・教授

研究者番号：30187710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：運動選手の集団は、一般集団と比較して、気管支喘息の罹患率が高いことが知られている。運動に伴う気管支収縮反応や気道炎症に及ぼす影響は、依然不明な点が多く、メカニズムの解明は、今後の効率の良い診断、さらには治療に大きく寄与すると考えられる。

今回の研究では、Balb/c系マウスとマウス用トレッドミルを用いて、強制運動モデルを作成した。メサコリンに対する気道過敏性の亢進および気道平滑筋の増生、粘膜下コラーゲン沈着は運動期間に相関して認められ、強度の運動に伴う気道のリモデリング形成と考えられた。詳細なメカニズムに関しては今後の検討課題である。

研究成果の概要(英文)：The prevalence of bronchial asthma is known to be higher in athlete population than general population. The influence for bronchoconstriction and airway inflammation is not fully elucidated and the investigation of these mechanisms will be contributed to precise diagnosis and proper treatment.

In this study, we established the murine model of forced exercise using Balb/c mice and treadmill for mouse. Airway hyperresponsiveness to methacholine, airway smooth muscle hyperplasia and the deposition of collagen on submucosal area were recognized and correlated with exercise duration. It is thought to be airway remodeling associated with strenuous exercise. The investigation of the mechanism in detail should be elucidated near future.

研究分野：総合領域

キーワード：運動誘発性喘息 マウス リモデリング 気道過敏性亢進

1. 研究開始当初の背景

生活習慣の欧米化(住居を含めた)や衛生環境の改善に伴い、本邦のアトピー性疾患の罹患率の上昇は著しい。その中にあって気管支喘息は現在では小児では約6%、成人でも3%以上の有病率といわれ、この10年近くで、倍増している。それに伴いトップアスリート内の気管支喘息罹患率も上昇していると考えられている。国立スポーツ科学センター(JISS)では2008年の北京五輪に参加するトップアスリートに対して、呼吸機能検査を行い、約10%のアスリートを喘息と診断した。また、ニュージーランド、イギリス連邦、オーストラリア、フィンランドでも、以前より10%以上の罹患率を報告しており、(Clin Rev Allergy Immunol 2006;31:259)、一般集団と比して、アスリート集団の方で気管支喘息罹患率が、高値であると報告されている(J Allergy Clin Immunol 1998;102:722)(J Allergy Clin Immunol 2000;106:267)(Respir Med 2003;97:955)。

アスリートの気管支喘息を診断・治療する上で、ドーピングとの兼ね合いが重要となり、特に受容体刺激型気管支拡張薬の使用に関しては、適切な診断とその結果の申請が必要となる。診断に際しては、さまざまな負荷試験の有用性が報告されているが、運動種目と負荷試験の陽性率との関係など不明な点が多い。すなわち運動に伴う、気管支収縮反応や気道炎症に及ぼす影響は、依然不明な点が多く、運動誘発性喘息(Exercise Induced Asthma : EIA,あるいは呼吸機能の変化から Exercise Induced Bronchoconstriction : EIB)のメカニズムの解明は、今後の効率の良い診断、さ

らには治療に大きく寄与すると考えられる。

EIAのメカニズムに関して、運動に伴う気道上皮傷害のメカニズムについてマウスモデルを使って報告されている(Am J Respir Crit Care Med 2007;175:442)。

しかしながら運動負荷が気管支喘息に治療効果があるという報告もあり、真の意味での運動が気道に及ぼす影響は不明である。

2. 研究の目的

我々は、10代の新潟県内のアスリートを対象に、アスリート集団における気管支喘息の解析を行ってきた(基盤研究C、課題番号20500613)。これまでの研究実績をまとめると、

(1) 中高校生のアスリート集団の気管支喘息の診断に、問診および呼吸機能検査が有用であり、さらに喘息の罹患率が約10%程度であり、冬季種目、耐久性種目に集積傾向がある(Allergol Int. 2010;59:53)

(2) 気管支喘息と診断されたアスリートに対し、吸入ステロイド(ICS)単剤は、ロイコトリエン受容体拮抗剤(LTRA)単剤よりも有用である(J Asthma. 2009;46:1032)。

(3) しかしアスリートの中には非運動時には喘息様症状はなく、呼吸機能も正常で、EIA症状が唯一認められる症状であることがあり、こういった症例の特徴として、喀痰中の好酸球比率が低値(好中球が高値)であり、アトピー素因の少ないことが挙げられる。このような症例ではICSもLTRAのいずれも反応しにくい(投稿準備中)。

(4) 気管支喘息の診断に利用されている呼気中の一酸化窒素(NO)測定においては、診断に必ずしも有用でなく、特に冬季種目、耐久性種目においては、呼気中一酸化窒素値と呼吸機能検査に相関関係がない(投稿準備中)。

以上の研究結果から、以下の課題について取り組みたい。

(1) 運動そのものに対する気道傷害の関与。特に運動強度や温度・湿度との関係。さらに

運動そのものにより、メサコリンに対する気道過敏性は亢進するのか？またそのメカニズムは？

(2) アレルギー性気道炎症（いわゆるアトピー型気管支喘息）は、運動によって増悪するのか？またそのメカニズムは？

(3) 運動によって起こった気道傷害は不可逆的なのか。運動をやめても永続的に傷害は残存するのか？

以上の課題を明らかにするためには、動物モデルで作成して、運動による気道に与える影響を解析することが、病態解明の一助となると考察した。

3. 研究の方法

実験動物としてマウスを使用する。運動負荷に関しては、マウスの強制運動測定器をメルクエスト社（富山 日本）のTMS4（マウス用トレッドミル）を利用した。これを使って、週5日のプログラムで運動するプロトコルを作成した。1日あたりの運動時間・運動量はビルドアップ方式として、以前の報告(Am J Respir Crit Care Med 2007;175:442)を参考に設定した。

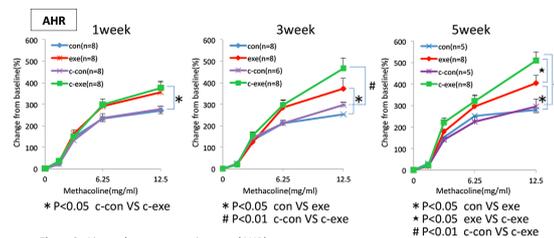
評価する項目として、気道過敏性検査（メサコリンに対する）BALF中の細胞分画（リンパ球、好中球、リンパ球）BALF中のサイトカインの発現（ELISA）組織学的解析（好酸球浸潤、杯細胞形成、気道リモデリングの評価）肺組織ホモジェナイズ後のRNA、蛋白の解析などとした。特に組織学的解析では、HE染色、PAS染色、TUNEL法を用い、上皮の傷害を組織学的に検討するとともに、免疫染色にて、気管支平滑筋・粘膜下基質の肥厚の有無、さまざまなケモカイン（MCP-1, MIP, RANTES, TARC, IP-10 など）やVEGF, HGF, PDGF, IGF-1などの成長因子の抗体を使用した染色も行う。

また今までのアスリートの喘息患者の解析から、冬季種目の喘息においては、アトピー素因が少なく、呼気NOの低値が多く、喀

痰中の好酸球比率が低いなどの特徴がある。直接的に証明はできていないが、こういった症例は上皮傷害が強いタイプと考えられ、したがって、低温条件（5 未満）も負荷条件にいれ、室温条件（20 前後）との違いについても検討する。

4. 研究成果

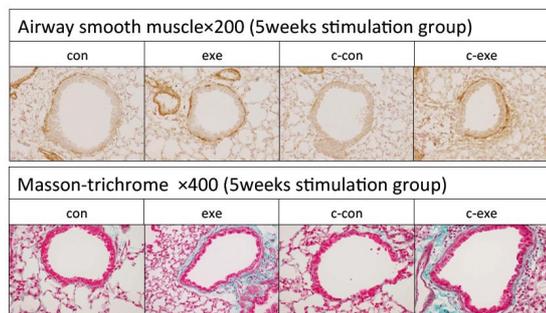
メサコリンに対する気道過敏性の亢進が見られており、運動期間に相関があった。運動期間1週間では、気道過敏性の亢進は軽度であるが、3週間 5週間と長期間になるに従い、顕著な変化となった。特に低温条件ではその傾向が強くなった。気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞の増加は軽度であったが、肺胞マクロファージ分画の有意な増加を認めた。

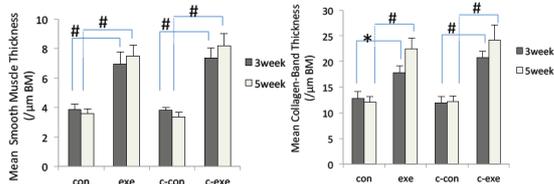


（上図：メサコリンに対する気道抵抗

con：未運動・未冷気刺激群、exe：運動群、c-con：冷気刺激群、c-exe：冷気運動群）

好中球、好酸球の変化はなかった。気道上皮の形態的变化はないものの、気道平滑筋の増生、粘膜下コラーゲン沈着はそれぞれ SMA染色、Masson-Trichrome 染色で評価したが、運動刺激によりそれぞれの増生を認めた。





(上左図: SMA 陽性細胞(気道平滑筋)の面積、上右図: 粘膜炎下コラーゲン沈着面積, con: 未運動・未冷気刺激群、exe: 運動群、c-con: 冷気刺激群、c-exe: 冷気運動群)

さらに運動期間に相関しており、長期間の運動(比較的強度の強い)に伴う、気道リモデリングの変化を証明することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

1. Hoshino Y, Koya T, Kagamu H, Tsukioka K, Toyama M, Sakagami T, Hasegawa T, Narita I, Arakawa M and Suzuki E. Effect of inhaled corticosteroids on bronchial asthma in Japanese athletes. Allergol Int. 2015;64:145-9. 査読有

[学会発表](計8件)

1. マウスを用いた運動誘発性気管支収縮モデルの解析. 月岡啓輔, 小屋俊之, 青木亜美、竹内寛之、外山美央、黒川允、木村夕香、林正周、坂上拓郎、長谷川隆志、鈴木栄一、成田一衛. 2015年5月27日. 高輪プリンスホテル(東京)
2. アスリートにおける呼吸機能の経年変化についての検討. 木村夕香, 小屋俊之, 青木亜美、竹内寛之、月岡啓輔、外山美央、黒川允、林正周、坂上拓郎、長谷川隆志、鈴木栄一、成田一衛、荒川正昭. 第64回日本アレルギー学会春季臨床大会.

2015年5月26日. 高輪プリンスホテル(東京)

3. Keisuke Tsukioka, Toshiyuki Koya, Hiroyuki Takeuchi, Ami Aoki, Mio Toyama, Makoto Kurokawa, Yuka Kimura, Masachika Hayashi, Takuro Sakagami, Takashi Hasegawa, Eiichi Suzuki, Ichiei Narita. Analysis of the Mechanism of Exercise Induced Bronchoconstriction in Murine Model. American Thoracic Society International Conference. 2015年5月17日. Denver, USA.
4. 小屋俊之, 月岡啓輔, 島賢治郎, 外山美央, 黒川允, 林正周, 坂上拓郎, 長谷川隆志, 荒川正昭, 鈴木栄一, 成田一衛. 吸入ステロイド単剤に効果不十分なアスリートの喘息症例における追加薬剤の効果について. 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2014年5月10日. 国立京都国際会館(京都)
5. 小屋俊之, 月岡啓輔, 島賢治郎, 外山美央, 黒川允, 林正周, 坂上拓郎, 長谷川隆志, 荒川正昭, 鈴木栄一, 成田一衛. アスリートの喘息における呼吸機能、気道過敏性およびバイオマーカーの特徴. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2013年11月30日. ホテルニューオータニ(東京)
6. 小屋俊之, 月岡啓輔, 島賢治郎, 外山美央, 坂元宏隆、星野芳史, 坂上拓郎, 古川俊貴、長谷川隆志, 荒川正昭, 鈴木栄一, 成田一衛. アスリート喘息症例におけるブデソニド/フォルモテロール配合剤の効果. 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2013年5月12日. パシフィコ横浜(神奈川、横浜)
7. 小屋俊之, 田中純太, 荒川正昭, 当科に

において診断したアスリート喘息患者の解析。第23回臨床スポーツ医学会総会。2012年11月4日。新横浜プリンスホテル（神奈川、横浜）

8. Y. Hoshino, T. Koya, H. Sakamoto, Y. Kimura, T Furukawa, T. Sakagami, T. Hasegawa, E. Suzuki, M. Arakawa, I. Narita. Analysis of bronchial asthma in Japanese athlete population. American Thoracic Society International Conference. 2012年5月20日. San Francisco, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 榮一 (SUZUKI, EIICHI)
新潟大学・医歯学総合病院・教授
研究者番号：30187710

(2) 研究分担者

長谷川 隆志 (HASEGAWA, TAKASHI)
新潟大学・医歯学総合病院・准教授
研究者番号：90361906

小屋 俊之 (KOYA, TOSHIYUKI)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：90444158

(3) 連携研究者

なし