Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Airway remodeling of murine chronic antigen exposure model

土屋, 貴昭

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2005-03-22
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙2815
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002815

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【１４８】

氏　　名・（本　籍）	土屋　貴昭	（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学　位　記　番　号	博ろ第１９４０号	
学位授与の　要　件	学位規則第５条第２項該当	
学位授与の　日　付	平成17年３月２２日	

【 学位論文題目 】

Airway Remodeling of Murine Chronic Antigen Exposure Model
（マウス長期感作モデルにおける気道リモデリング）

審　査　委　員

主　査　教　授　錦織　千佳子

教　授　西尾　久英

教　授　尾原　秀史

【はじめに】

気管支喘息は気道炎症、気道過敏性、気道改変（気道リモデリング）に特徴づけられる。気道リモデリングには杯細胞の過形成、気道上皮の脱落、基底膜固有層下の網状層の線維造成による肥厚、気道平滑筋の肥厚、炎症性細胞浸潤などが含まれる。T リンパ球、特に Th2 リンパ球は Th2 サイトカインを介し、これら気道リモデリングに大きな役割を果たしている。Th2 サイトカインである IL-4 は、B リンパ球からの IgE の分泌増加、肥満細胞の成熟、接着因子 VCAM-1 の活性化などを引きおこす。一方、Th-1 サイトカインである IFN-gamma は肥満細胞や好酸球の成熟を抑制する。気管支喘息における気道リモデリングの研究はほとんどが急性期のもので、慢性期の気道リモデリングを検討したものは少なかった。そのため、本研究では異なった遺伝背景を持つ２種類のマウスである BALB/c マウスと C57BL/6 マウスを用いて、長期感作モデルを作成し、気管支肺胞洗浄液中の細胞分画、サイトカインおよび組織学的変化を検討した。

【方　法】

1. 動物

６週齢の雄の BALB/c マウスと C57BL/6 マウスを使用した。

2. 抗原感作

感作は 8μg の ovalbumin（OVA）と 2mg の aluminum hydroxide を０、５日目にマウスの腹腔内に投与した。２回目の腹腔内投与の１週間後より 0.5%の OVA の吸入曝露を週２回１時間ずつ行ない、それぞれ３，５，７週間行う群を作成した。対象は生理食塩水を腹腔内に投与し、生理食塩水の吸入を行った。

3. 気管支肺胞洗浄（BAL）

最終吸入の 24 時間後に BAL を生理食塩水 0.4mL で３回行い、総細胞数、細胞分画を検討した。

4. サイトカイン測定

BAL 液中の IL-4 と IFN-gamma を ELISA キットにて測定した。

5. 肺組織検討

肺を進展固定し、標本は hematoxylin and eosin (HE)染色と、elastica van-Gieson (EVG) 染色で評価した。

6. 形態計測検討

Wang らの方法に修正を加え行った。HE 染色で直径 100-200μm の気管支の横断面に対し、気管上皮周囲径（Pi）、基底膜周囲径（Pb）、外膜周囲径（Po）、それぞれに対応する面積（Ai、Ab、Ao）をプラニメーターで計測した。Ab を気道のサイズの指標とし、上皮面積比（Ae ratio : Ab－Ai／Ab）、上皮下面積比（As ratio : Ao－Ab／Ab）を求めた。

【結　果】

１．BAL 液の細胞分画

BALB/c マウスでは、好酸球とリンパ球は３、５週間曝露群で有意に増加していたが、７週間曝露群では有意差を認めなかった。C57BL/6 では、リンパ球が３、７週間曝露群で有意に増加していた。好酸球は３、５週間曝露群で有意に増加していたが、７週間吸入曝露後では有意差を認めなかった。

２．BAL 液のサイトカイン

非感作・非吸入のマウスと、感作・吸入を行ったマウスの BAL 液の IL-4 と IFN-gamma を測定した。IL-4 は BALB/c マウスでは３、５、７週間曝露群で高値を維持したが、C57BL/6 マウスでは有意な増加を認めなかった。IFN-gamma は BALB/c マウスでは５週間曝露後の感作群で有意な増加を認めたが、C57BL/6 マウスでは有意な増加を認めなかった。BALB/c マウスでは IFN-gamma の増加する時期は、IL-4 に比べて遅かった。

３．肺組織

BALB/c マウスの HE 染色組織変化は、気管支上皮の肥厚、上皮下組織と血管への好酸球、好中球、リンパ球の集族を３週間曝露群で認めた。しかし、この所見は５週間後で減少し、７週間後では消失していた。C57BL/6 マウスの HE 染色組織変化は上皮下組織に少数の炎症細胞の集族を３から７週間曝露群で認めた。炎症細胞の集族の程度は BALB/c マウスに比し、少なかった。上皮下組織の肥厚は３から７週間後まで持続していた。この上皮下組織の肥厚は EVG 染色で、膠原線維であった。

４．形態計測検討

BALB/c マウスの Ae ratio は、３、５週間曝露群で有意に増加していたが、７週間後では差を認めなかった。C57BL/6 マウスの Ae ratio は３から７週間後のいずれも変化を認めなかった。BALB/c マウスの As ratio は、Ae ratio と同様の経過を示した。しかし、C57BL/6 マウスの As ratio は３から７週間曝露群のすべてで有意な増加を認めた。この点が BALB/c マウスと C57BL/6 マウスの最も異なる点であった。

【考　察】

BALB/c マウスは気道過敏性、アレルギー特異的 IgE、気道周囲組織への好酸球浸潤、

Th2 サイトカインの発現を認めることが証明されている。C57BL/6 マウスも気道過敏性が証明されているが、その程度は BALB/c マウスより弱いと報告されている。Zang らは、BALB/c マウスは C57BL/6 マウスと比べ、気道への好酸球浸潤を除き、Th2 サイトカイン mRNA の発現、抗原特異的 IgE と IgG1 が多いことを報告した。一方、Morokata らは C57BL/6 マウスは BALB/c マウスと比べ、血清中の抗原特異的 IgE、肺組織内での IL-4、IL-5 の発現と肺組織への好酸球浸潤の程度が高いことを報告した。また、肺線維症モデルでは、C57BL/6 マウスはブレオマイシンに高感受性を示し、BALB/c マウスはブレオマイシン抵抗性を示すことが一般に知られている。この点で、C57BL/6 マウスは慢性の抗原曝露や刺激により線維化を起こしやすいと考える。しかし、Sakai らは BALB/c マウスを用い、OVA 長期感作で上皮下組織の線維化を証明した。これは、感作や曝露の方法の多様性がマウスにおける長期感作モデルの気道リモデリング形成に影響を及ぼしたためと考える。

BALB/c マウスでは IL-4 は 3 から 7 週間曝露群で高値を示した。IL-4 は IFN-gamma よりも早期に増加したが、これは IL-4 の増加に伴い、IFN-gamma が相対的に抑制されたためと考えられる。一方、5、7 週間後に IFN-gamma が増加したのは、Th2 サイトカインの相対的抑制であると考えられる。C57BL/6 マウスでは IL-4 と IFN-gamma ともに 3 週間から 7 週間後まで変化を認めなかったが、上皮下面積の肥厚、As ratio の高値と BAL 液中のリンパ球の増加は 7 週間後まで認められた。このことは IL-4 と IFN-gamma ともに気道リモデリングに影響を及ぼさないことを示唆している。

C57BL/6 マウスでは、BAL 中細胞分画にて好酸球ではなくリンパ球が 3 から 7 週間後まで増加を認めたため、長期感作モデルの気道リモデリングにはリンパ球が関与したと考えられた。Foster らは、抗 CD4+T リンパ球モノクロナル抗体が上皮組織の線維化、上皮の肥厚、粘液産生細胞の増加を抑制したと報告している。この結果は我々の研究の結果を支持している。しかし、リンパ球と気道リモデリングの直接的な関係は今回の研究では明らかに出来なかった。

結論として、我々は C57BL/6 マウスで長期 OVA 感作モデルを作成し、膠原線維で構成される上皮下組織の肥厚と、BAL 液中のリンパ球の増加が認められた。C57BL/6 マウスは気道リモデリングのメカニズムを研究するのに有用な種であり、IL-4 および IFN-gamma ともに気道リモデリングには影響を及ぼさないと考えられた。

論文審査の結果の要旨

受付番号	乙 第1939号	氏　名	土屋貴昭
論文題目 Title of Dissertation	Airway Remodeling of Murine Chronic Antigen Exposure Model マウス長期感作モデルにおける気道リモデリング		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	錦織千佳子 西尾久英 [illegible]	
審査終了日	平成17年 3 月 2 日		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

気管支喘息は気道炎症、気道過敏性、気道改変（気道リモデリング）に特徴づけられる。気道リモデリングには杯細胞の過形成、気道上皮の脱落、基底膜固有層下の網状層の線維造成による肥厚、気道平滑筋の肥厚、炎症性細胞浸潤などが含まれる。T リンパ球、特に Th2 リンパ球は Th2 サイトカインを介し、これら気道リモデリングに大きな役割を果たしている。Th2 サイトカインである IL-4 は、B リンパ球からの IgE の分泌増加、肥満細胞の成熟、接着因子 VCAM-1 の活性化などを引きおこす。一方、Th-1 サイトカインである IFN-gamma は肥満細胞や好酸球の成熟を抑制する。気管支喘息における気道リモデリングの研究はほとんどが急性期のもので、慢性期の気道リモデリングを検討したものは少なかったため、本研究では異なった遺伝背景を持つマウスを用いて、長期感作モデルを作成し、気管支肺胞洗浄液中の細胞分画、サイトカインおよび組織学的変化を検討した。

6 週齢の雄の BALB/c マウスと C57BL/6 マウスに、感作は 8μg の ovalbumin（OVA）と 2mg の aluminum hydroxide を 0、5 日目にマウスの腹腔内に投与することにより抗原感作を行った。2 回目の腹腔内投与の 1 週間後より 0.5%の OVA の吸入曝露を週 2 回 1 時間ずつ行ない、それぞれ 3，5，7 週間行う群を作成した。評価項目は、気管支肺胞洗浄（BAL）中の①総細胞数、細胞分画、②IL-4 と IFN-gamma の定量、③肺組織の hematoxylin and eosin (HE)染色と、elastica van-Gieson (EVG)で行った。形態計測検討として Wang らの方法の変法を行った。HE 染色で直径 100-200μm の気管支の横断面に対し、気管上皮周囲径（Pi）、基底膜周囲径（Pb）、外膜周囲径（Po）、それぞれに対応する面積（Ai、Ab、Ao）をプラニメーターで計測した。Ab を気道のサイズの指標とし、上皮面積比（Ae ratio：Ab－Ai／Ab）、上皮下面積比（As ratio：Ao－Ab／Ab）を求めた。

BAL 液の細胞分画は BALB/c マウスでは、好酸球とリンパ球は 3、5 週間曝露群で有意に増加していたが、7 週間曝露群では有意差を認めなかった。C57BL/6 では、リンパ球が 3、7 週間曝露群で有意に増加していた。好酸球は 3、5 週間曝露群で有意に増加していたが、7 週間吸入曝露後では有意差を認めなかった。

非感作・非吸入のマウスと、感作・吸入を行ったマウスの BAL 液の IL-4 と IFN-gamma を測定において、BALB/c マウスでは IL-4 は、3、5、7 週間曝露群で高値を維持し、IFN-gamma は 5 週間曝露後の感作群で有意な増加を認めたが、C57BL/6 マウスでは IL-4, IFN-gamma ともに有意な増加を認めなかった。

肺組織では、BALB/c マウスの HE 染色組織変化は、気管支上皮の肥厚、上皮下組織と血管への好酸球、好中球、リンパ球の集族を 3 週間曝露群で認めた。しかし、この所見は 5 週間後で減少し、7 週間後では消失していた。C57BL/6 マウスの HE 染色組織変化は上皮下組織に少数の炎症細胞の集簇を 3 から 7 週間曝露群で認めた。炎症細胞の集族の程度は BALB/c マウスに比し、少なかった。上皮下組織の肥厚は 3 から 7 週間後まで持続していた。EVG 染色によりこの上皮下組織の肥厚が、膠原線維によるものであることが明らかとなった。

形態計測検討では、BALB/c マウスの Ae ratio は、3、5 週間曝露群で有意に増加していたが、7 週間後では差を認めなかった。C57BL/6 マウスの Ae ratio は 3 から 7 週間後のいずれも変化を認めなかった。BALB/c マウスの As ratio は、Ae ratio と同様の経過を示した。しかし、C57BL/6 マウスの As ratio は 3 から 7 週間曝露群のすべてで有意な増加を認めた。この点が BALB/c マウスと C57BL/6 マウスの最も異なる点であった。

BALB/c マウスでは IL-4 は 3 から 7 週間曝露群で高値を示した。IL-4 は IFN-gamma よりも早期に増加したが、これは IL-4 の増加に伴い、IFN-gamma が相対的に抑制されたためと考えられる。一方、5、7 週間後に IFN-gamma が増加したのは、Th2 サイトカインの相対的抑制であると考えられる。C57BL/6 マウスでは IL-4 と IFN-gamma ともに 3 週間から 7 週間後まで変化を認めなかったが、上皮下面積の肥厚、As ratio の高値と BAL 液中のリンパ球の増加は 7 週間後まで認められた。このことは IL-4 と IFN-gamma ともに気道リモデリングに影響を及ぼさないことを示唆している。

C57BL/6 マウスでは、BAL 中細胞分画にて好酸球ではなくリンパ球が 3 から 7 週間後まで増加を認めたため、長期感作モデルの気道リモデリングにはリンパ球が関与したと考えられた。

以上本研究は、C57BL/6 マウスで長期 OVA 感作モデルを作成したこと、その観察から膠原線維で構成される上皮下組織の肥厚と、BAL 液中のリンパ球の増加していることを見出し、C57BL/6 マウスは気道リモデリングのメカニズムを研究するのに有用な種であり、IL-4 および IFN-gamma ともに気道リモデリングには影響を及ぼさないことを示した価値ある集積である。よって本研究は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。