

精神的ストレスによるアレルギー性気道炎症の増悪

伊藤 愛理, 伊藤 涼子, 梶川 聡子, 成瀬 茉耶, 野村 良子, 氏家由希子,
渡部香奈子, 大和田恵子, 奥山 香織*, 高柳 元明, 大野 勲
東北薬科大学病態生理学教室

Psychological stress exacerbates airway inflammation in a murine model of allergic asthma

Airi Ito, Ryoko ITO, Satoko KAJIKAWA, Maya NARUSE, Ryoko NOMURA, Yukiko UJIE, Kanako WATANABE,
Keiko OHWADA, Kaori OKUYAMA*, Motoaki TAKAYANAGI and Isao OHNO
Department of Pathophysiology, Tohoku Pharmaceutical University

(Received November 22, 2004)

Stress and other psychological factors have long been hypothesized to be associated with asthma symptoms. One of the fundamental features of bronchial asthma is chronic airway inflammation, characteristic of the infiltration and activation of inflammatory cells such as eosinophils and T lymphocytes. Psychological stress can modulate the inflammatory response through activation of hypothalamus-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system increasing the secretion of cortisol and catecholamines. However, the mechanisms linking stress and asthma are not well defined. Therefore, we investigated the effects of psychological stress on asthmatic airway inflammation using a murine model of allergic asthma. Female BALB/c mice and C57BL/6J mice were exposed to restraint stress (RS) during the antigen inhalation, which procedure was repeated 3 times for every seven days. Seven days after the last procedure, the mice were challenged with ovalbumin (OVA), and the airway inflammation was evaluated by the numbers of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluids. RS significantly increased the numbers of total cells and lymphocytes in BALB/c mice. In C57BL/6J mice, in contrast, the numbers of inflammatory cells were not significantly different between mice exposed and not exposed to RS. Our findings suggest that psychological stress can enhance antigen-induced airway inflammation and, furthermore, that genetic background is involved in the pathogenesis of stress-induced asthma. This model using female BALB/c mice may be useful to elucidate the mechanisms by which psychological stress exacerbates asthma symptoms.

Key words — psychological stress, allergic asthma, stress-induced asthma, airway inflammation

緒 言

気管支喘息は気道の慢性炎症と種々の気流制限により特徴付けられ、発作性の咳、喘鳴及び呼吸困難を示す。気道炎症による気流制限は、急性の気管支収縮、気道粘膜の腫脹、慢性的な

粘液栓形成および気道壁のリモデリングという4つの形態を示す。気道炎症には好酸球、2型ヘルパーT細胞 (Th2)、肥満細胞などの多くの炎症細胞の浸潤が関与し、気道粘膜上皮の損傷や気道過敏性の亢進が見られる¹⁾。ヘルパーT細

胞には, Th1とTh2があり, Th1細胞はインターロイキン (IL)-2, インターフェロン (IFN)- γ などを産生し, これらのTh1サイトカインは細胞性免疫反応に関与する. Th2細胞はIL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13などを産生し, 液性免疫反応に関与する^{2,3)}. アレルギー性炎症は, Th1とTh2のバランスが崩れ, Th2が優位になることにより引き起こされると考えられている.

気管支喘息患者の増加傾向の背景として, ストレスが増加しつつある社会世相を反映した心理的ストレス誘発性喘息患者の増加が指摘されている. 喘息患者のうち20~35%は精神的ストレスを受けている間に喘息の症状が悪化するという疫学的報告がある⁴⁾. さらに, 喘息患者に憂鬱や不安, 恐怖などの情動的な刺激を与えると, 喘息症状が悪化するという報告があることから, 心理的要因が喘息の症状の程度に関係しているのではないかと考えられている^{5,6)}. また, 前向き研究では, 精神的ストレスとアレルギー疾患を含めた様々な疾患との間の結びつきが明らかにされている.

喘息動物モデルを用いた検討では, 精神的ストレスは, 抗原を吸入させたマウスの気道過敏性を亢進し^{7,8)}, ヒトにおいては, 大学の定期試験という比較的慢性の精神的ストレスにさらされた喘息の学生において, 喀痰中のIL-5やIL-4の増加及びIL-2とIFN- γ の減少が認められ, また気道の好酸球も同様に増加することが報告されている⁹⁾. このように, 精神的ストレスはTh1とTh2のバランスを変え, Th2優位とすることにより, アレルギー性気道炎症を悪化させると考えられる. また, 慢性ストレスにより末梢のグルココルチコイド受容体のdown regulationが引き起こされ, コルチコステロイドの抗炎症作用が低下することも報告されている¹⁰⁾.

中枢神経系への刺激は, 内分泌-免疫系を介して, 炎症反応を修飾する. 精神的ストレスでは, 視床下部-下垂体-副腎皮質系 (HPA axis) や, 交感神経系が活性化され, コルチゾールやカテコールアミンの分泌が増加する¹¹⁾. これらのホルモンは, ナチュラルキラー細胞活性化, T細胞増殖, IL-2受容体発現, IFN- γ 産生, IL-12とその

受容体発現などに対して抑制的に作用する¹²⁾. しかし, 精神的ストレスにより喘息炎症が悪化する詳しいメカニズムは解明されていない. さらに, 同じ精神的ストレスがすべての喘息患者を悪化させるわけではなく, 個人差, 即ち遺伝的背景の違いがストレス性喘息の発症に影響することも考えられる.

そこで今回, ストレスによる喘息悪化の病態解明を目的として, マウス喘息モデルを用い, 精神的ストレスモデルとして代表的な拘束ストレス¹³⁾のアレルギー性気道炎症に対する影響を検討した. さらに, 遺伝的要因を検討するため, 主にTh2タイプの反応を示すBALB/c系及びTh1タイプの反応を示すC57BL/6J系マウスを用いて, 比較検討した.

実験材料及び方法

抗原感作, 抗原吸入と検体採取・処理

実験は, Kumagaiらの報告¹⁴⁾に従って行った. 以下にその手法を簡単に示す.

6~8週齢のBALB/c系雌性マウス及びC57BL/6J系雌性マウス(日本SLC, 東京, 日本)を使用した. 動物は実験に使用するまで明暗サイクル12時間(明期9:00~21:00, 暗期21:00~9:00), 室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ の一定環境下で1週間以上飼育した. なお, 動物には滅菌済みのマウス用固形飼料及び滅菌済みの水道水を自由に摂取させた. 実験は東北薬科大学動物実験指針に従って行った. 抗原として, 卵白アルブミン (OVA) (SIGMA, St. Louis, MO, USA) を用い, OVA/Alum (OVA 16mg/mL in Saline/Al(OH)₃ (和光純薬(株), 大阪, 日本) 8mg/mL in Saline) 500 μL の腹腔内投与にて感作した. 投与は5日間隔で2回行った. 2回目のOVA/Alum投与から12日後, マウスはプラスチックボックス内でOVA (5mg/mL) あるいはSalineを1時間吸入させ, 4時間後さらに1時間の吸入を行った. OVAの噴霧は, Bennet nebulizer (Sunrise Medical HHG Inc., Somerset, PA, USA) を用い, 流速10 L/minで行った. また, ストレス負荷群は, 吸入の開始から終了まで計6時間50 mL コニカルチューブ内にて拘束

した。対照としてストレス非負荷群はプラスチックボックス内及び飼育ケージ内を自由に行動させた。吸入及びストレスは7日間隔で3回繰り返し行った。最終の吸入及びストレスから7日後、OVAあるいはSaline吸入を行い、3日後に検体を採取した。Table 1に各群の詳細及びFig.1にタイムテーブルを示す。

Diethylether (和光純薬株) 麻酔下でマウスの眼窩よりヘパリン処理したキャピラリーで採血

Table 1. Experimental conditions of each group for stress exposure, antigen inhalation and antigen challenge.

	Days 17,24 31		Day 38
	RS	inhalation	challenge
S-·OVA/Sal	-	OVA	Saline
S-·OVA/OVA	-	OVA	OVA
S+·OVA/Sal	+	OVA	Saline
S+·OVA/OVA	+	OVA	OVA
S-·Sal/Sal	-	Saline	Saline
S-·Sal/OVA	-	Saline	OVA
S+·Sal/Sal	+	Saline	Saline
S+·Sal/OVA	+	Saline	OVA

し血液スメアを作成し、Diff-Quick (D-Q) 染色液 (国際試薬,神戸,日本) で染色し、細胞分画を算定した ($\times 1000$ で総細胞数200個以上観察)。また、血液20 μ LにRBC lysis buffer (3%氷酢酸, 3% D-Q II液) 400 μ Lを加え、30秒攪拌後、総白血球数を算定した。

脱血後マウスの胸部を開き、気管にカニューレを挿入、固定後気管及び肺を摘出した。カニューレよりphosphate-buffered saline (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 8.1 mM, KH_2PO_4 1.47 mM含, pH 7.4) (和光純薬株) 0.25 mLを注入し2回洗浄した。回収した気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid (BALF)) は200 \times g, 4 $^{\circ}\text{C}$ で3分間遠心後、上清の量を測定し、チューブに移し-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。BALFはEnzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) によるサイトカイン及びケモカイン測定に用いた。

上清回収後の細胞残渣は、0.1% fetal bovine serum (ICN, Costa Mesa, CA, USA) 含PBS 0.1 mLで再浮遊し、0.02 mLを0.1% Trypan blue 0.02 mLに加え、総白血球数を算定した。残りの0.08 mLは、300 rpm, 2分間サイトスピン (Thermo Shandon, Runcorn, UK) にかけて、乾燥後D-Q染

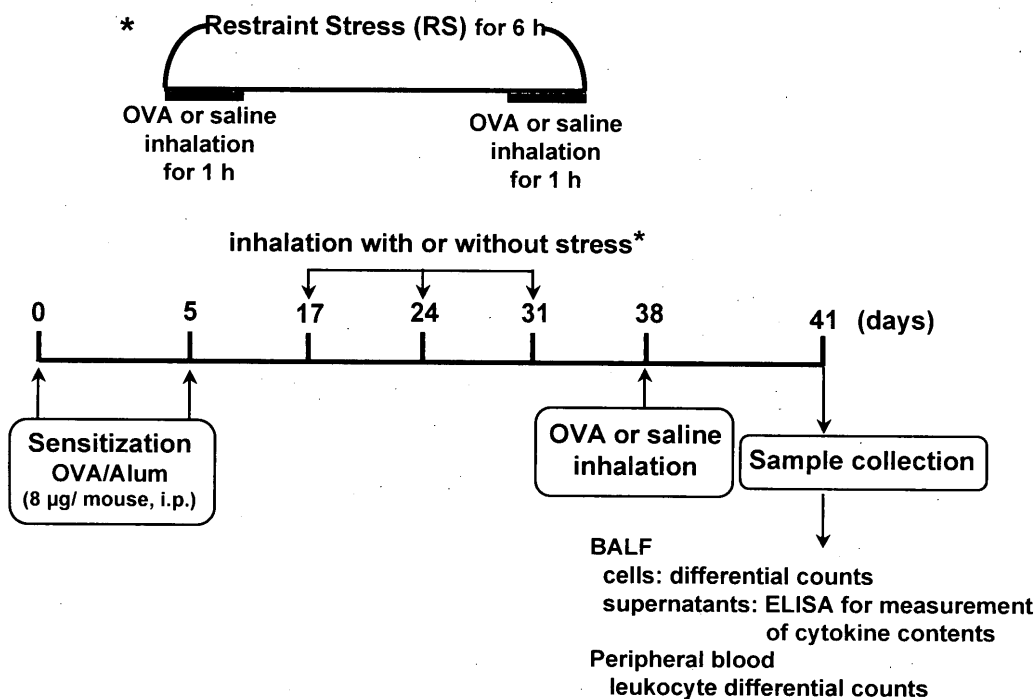


Fig. 1. Diagrammatic representation of the protocols for sensitization, challenge and stress for experiments.

色液で染色し, 細胞分画を算定した (×1000で総細胞数200個以上観察).

結 果

サイトカイン及びケモカインの測定

BALF中のIL-4, RANTES及びEotaxin量は, それぞれのELISA kit (AN 'ALYZA (TECHNE Corporation, Minneapolis, MN, USA))を用いて, 付属プロトコルに従い測定した. なお, それぞれの測定範囲はIL-4; 7.8~500 pg/ml, RANTES; 7.8~500 pg/ml, Eotaxin; 15.6~1000 pg/mlである.

統計処理

データはmean ± S.D.で表した. Mann-WhitneyのU検定で統計処理し, P<0.05を有意差有りとした.

BALB/cマウスにおける炎症応答

BALB/cマウスにおける, 拘束ストレスのBALF炎症細胞に対する影響について検討を行った. 抗原吸入と同時にストレス負荷を行うと, 最後の抗原曝露 (S+・OVA/OVA) により見られる総細胞数およびリンパ球数はストレス非負荷群 (S-・OVA/OVA) と比較して有意に増加していた. 好酸球数は, ストレス負荷群 (S+・OVA/OVA) においてストレス非負荷群 (S-・OVA/OVA) に比較して増加傾向が見られたものの, 有意ではなかった (Fig.2-A). 一方, Saline吸入と同時のストレス負荷群においては, 最後の抗原曝露

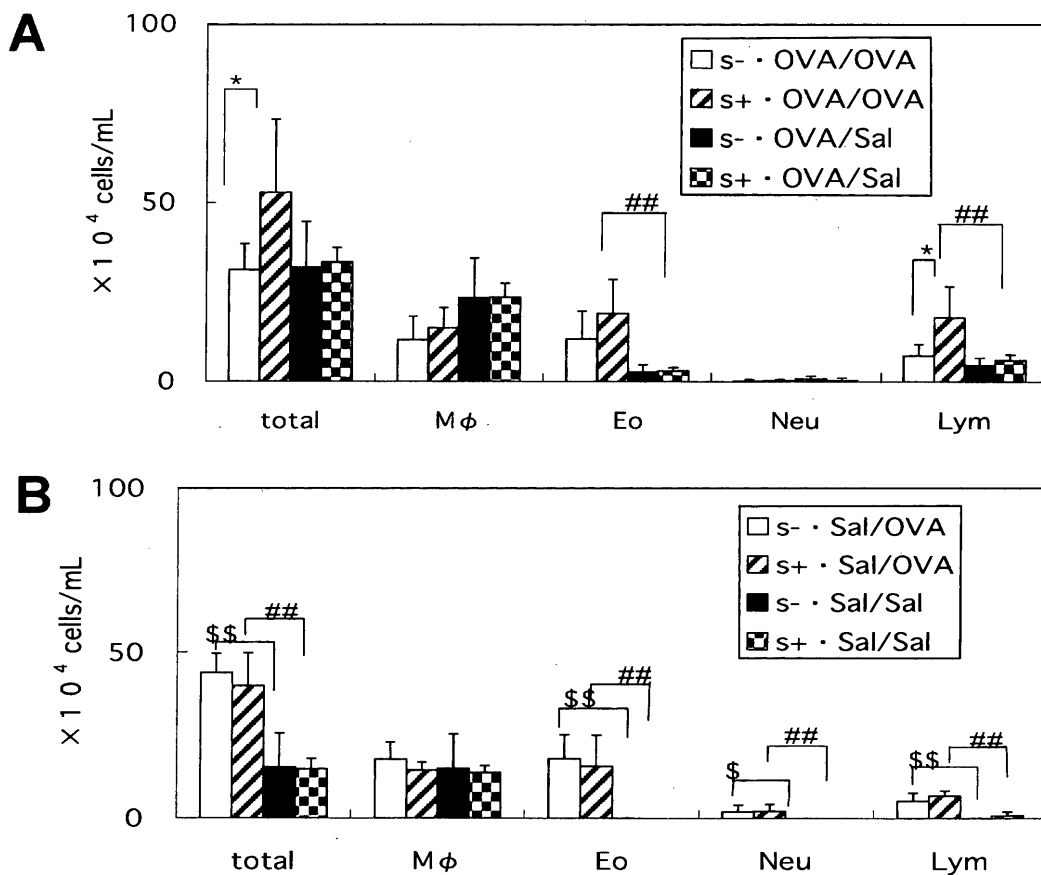


Fig. 2. The effect of restraint stress on the accumulation of inflammatory cells after antigen challenge in BALB/c mice. Sensitized-BALB/c mice were exposed to restraint stress for 6hr with OVA (A) or saline (B) inhalation as described in materials and methods. 3days after antigen or saline challenge, the numbers of total cells (total), macrophages (Mφ), eosinophils (Eo), neutrophils (neu) and lymphocytes (Lym) in BALF were counted. Opened, striped, closed and hatched columns represent unstressed mice with OVA challenge, stressed mice with OVA challenge, unstressed mice with saline challenge and stressed mice with saline challenge, respectively. Data are expressed as mean ± S.D. (n=4-8). *p<0.05: compared with unstressed mice with OVA challenge, **p<0.01: compared with stressed mice with saline challenge, \$\$\$p<0.01: compared with unstressed mice with saline challenge.

(S+・Sal/OVA) による炎症細胞の変化はストレス非負荷群 (S-・Sal/OVA) と比較していずれの細胞分画でも有意ではなかった (Fig.2-B).

また、3回のSaline吸入群においては、ストレス負荷および非負荷どちらにおいても最後の抗原曝露 (S+・Sal/OVAおよびS-・Sal/OVA) は、Saline吸入 (S+・Sal/SalおよびS-・Sal/Sal) に比べ炎症細胞の有意な増加を誘導した (Fig.2-B)。しかしながら、3回の抗原吸入群においては、ストレス負荷群では最後の抗原曝露 (S+・OVA/OVA) によりSaline曝露群 (S+・OVA/Sal) と比較して炎症細胞の有意な増加が見られたも

の、ストレス非負荷群においては抗原曝露 (S-・OVA/OVA) とSaline曝露 (S-・OVA/Sal) の間に有意な差は見られなかった (Fig.2-A)。

末梢血中の白血球に対する拘束ストレスの影響について検討を行った。先に述べたようにストレス負荷OVA吸入群 (S+・OVA/OVA) とストレス非負荷OVA吸入群 (S-・OVA/OVA) の間には、抗原曝露による気道炎症細胞 (総細胞, リンパ球) の集積に有意な差が見られた (Fig.2-A) が、末梢血白血球には、これら2群の間に有意な差が見られなかった (Fig.3-A)。3回のSaline吸入群においてはストレス負荷群では最後の抗原曝露

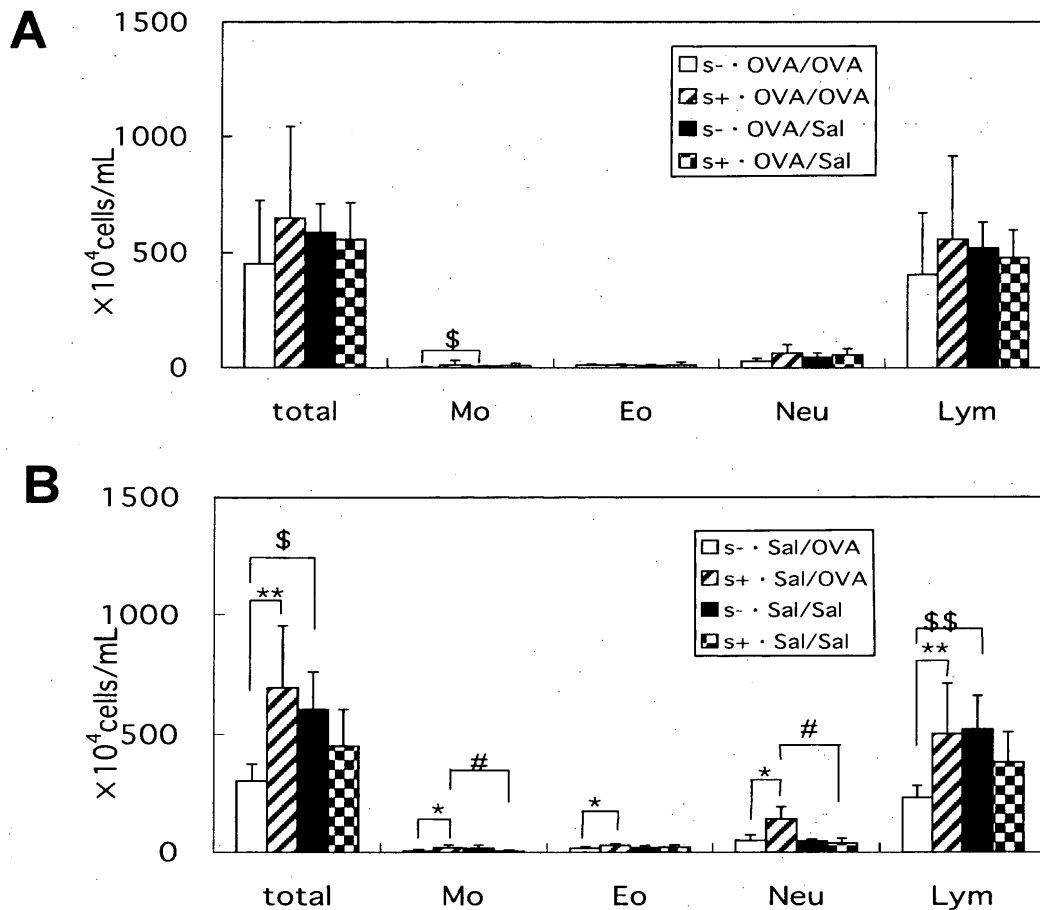


Fig. 3. The effect of restraint stress on leukocyte counts in peripheral blood of BALB/c mice. Sensitized-BALB/c mice were exposed to restraint stress for 6 hr with OVA challenge as described in materials and methods. 3 days after antigen challenge peripheral blood were obtained and the numbers of total cells (total), monocytes (Mo), eosinophils (Eo), neutrophils (neu) and lymphocytes (Lym) were counted. Opened, striped, closed and hatched columns represent unstressed mice with OVA challenge, stressed mice with OVA challenge, unstressed mice with saline challenge and stressed mice with saline challenge, respectively. Data are expressed as mean \pm S.D. (n=4-8). * p <0.05: compared with unstressed mice with OVA challenge, # p <0.05, ** p <0.01: compared with stressed mice with saline challenge, \$ p <0.05, \$\$ p <0.01: compared with unstressed mice with saline challenge.

(S+・Sal/OVA) により Saline 曝露 (S+・Sal/Sal) と比較して単球と好中球の有意な増加が見られた。また, ストレス非負荷群では最後の抗原曝露 (S-・Sal/OVA) により Saline 曝露 (S-・Sal/Sal) と比較して総細胞数とリンパ球の有意な減少が見られた。一方, 最後の抗原曝露群において, Saline-ストレス負荷群 (S+・Sal/OVA) は Saline-ストレス非負荷群 (S-・Sal/OVA) に比べ, すべての炎症細胞において有意な増加を示した (Fig3-B)。

C57BL/6J マウスにおける炎症応答

C57BL/6J マウスにおける拘束ストレスによる BALF 中の炎症細胞に対する影響について検討を行った。抗原吸入と同時にストレス負荷を行うと, 最後の抗原曝露により誘導される BALF 中の炎症細胞は, 総細胞数およびすべての分画でストレス非負荷群と比較して有意な変化は見られなかった (Fig.4)。

BALF 中サイトカインに対するストレスの影響

BALB/c マウスにおける抗原曝露3日後のOVA-ストレス負荷群 (S+・OVA/OVA) とOVA-ストレ

ス非負荷群 (S-・OVA/OVA) の間には, 上に述べたように BALF 炎症細胞に有意な差を認められたが BALF 中の IL-4, RANTES および Eotaxin はいずれにおいても有意な差は見られなかった (Table 2)。

考 察

今回, ストレスによる喘息悪化の病態解明を目的として, マウス喘息モデルを用い, 精神的ストレスモデルとして代表的な拘束ストレス¹³⁾ による影響を検討した。

抗原吸入と同時に繰り返しのストレス負荷により, 気道の炎症細胞の集積は有意に増加した。この結果は, 慢性的なストレスが喘息での気道炎症を増大させるという Forsythe ら⁷⁾ の報告に一致している。一方で, Saline 吸入下での繰り返しのストレス負荷によっては気道の炎症細胞に有意な変化が見られなかった。このことより, 抗原存在下での繰り返しの精神的ストレスが喘息炎症の増悪に重要であることが示された。ストレスにより気道の炎症細胞は有意に増大していたが, ストレスの有無で末梢血中の白血球数に変化は見られなかった。このことより, ストレ

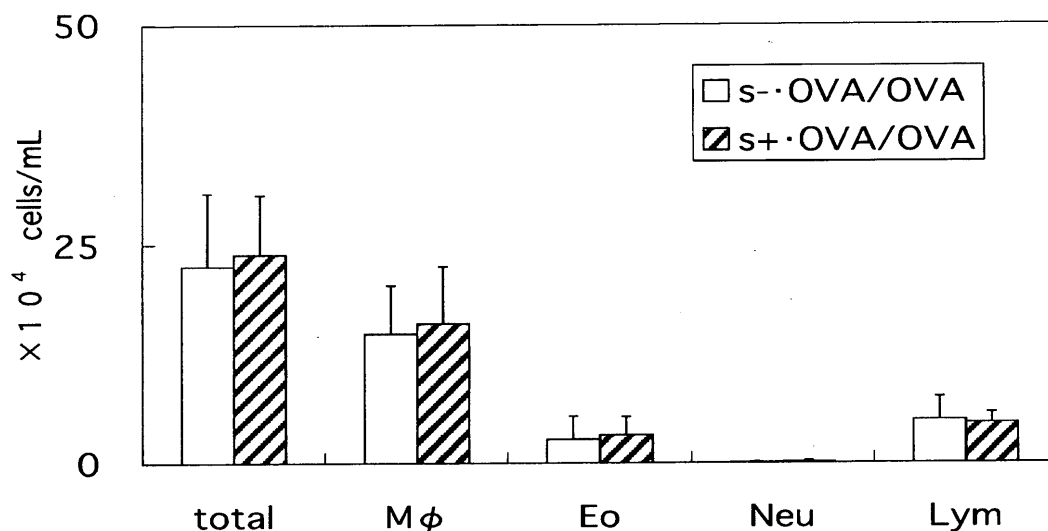


Fig. 4. The effect of restraint stress on the accumulation of inflammatory cells after antigen challenge in C57BL/6J mice. Sensitized-C57BL/6J mice were exposed to restraint stress for 6 hr with OVA inhalation as described in materials and methods. 3 days after antigen challenge, the numbers of total cells (total), macrophages (Mφ), eosinophils (Eo), neutrophils (neu) and lymphocytes (Lym) in BALF were counted. Closed and striped columns represent unstressed mice and stressed mice, respectively. Data are expressed as mean \pm S.D. (n=7).

Table 2. The effect of restraint stress on cytokine and chemokine contents in bronchoalveolar lavage fluids from BALB/c mice after antigen challenge.

	s-OVA/OVA	s+OVA/OVA
IL-4 (pg/mL)	ND	ND
RANTES (pg/mL)	6.6 ± 4.46*	12.55 ± 4.10*
Eotaxin (pg/mL)	ND	ND

*mean ± S.D. (n=4)

ND: not detected

スによる気道の炎症細胞集積の増大が単なる供給源, 即ち末梢白血球の増加によるものではなく, 白血球の炎症部位への移行の増大によることが示唆された。

慢性的な抗原曝露により, BALF中のIL-4が著しく増加することが知られている¹⁵⁾。また, マウスに精神的ストレスを与えるとTh1/Th2バランスが崩れ, Th2優位に傾くと報告されている¹¹⁾。今回のモデルではストレス負荷中にIL-4は検出されなかった。今回我々は抗原吸入3日後にBALFを回収し検討を行ったが, 抗原吸入24時間後のIL-4の増加が報告されている¹⁵⁾ので時間経過を追った検討が必要である。また, BALF中のEotaxinにはストレスによる有意な変化は見られなかった。BALF中の好酸球数に変化が見られなかったことは, 強い好酸球遊走活性を有するEotaxin¹⁶⁾に変化がなかったことを反映しているのかもしれない。また, ストレスによりBALF中のリンパ球が増大していたが, リンパ球遊走活性も有するRANTES¹⁷⁾に有意な変化が見られなかった。しかし, リンパ球遊走に関与する因子として, IL-16¹⁸⁾などが知られており, それらの因子がストレスにより影響を受けた結果BALF中のリンパ球が増大した可能性も考えられる。慢性的な抗原曝露によって, IL-13¹⁹⁾を含めた他のTh2サイトカインや, TGF- β ²⁰⁾, MCP-1などが誘導され, 炎症に促進的あるいはリモデリングへと関与する。今回確認したBALFの炎症細胞に見るストレスによる気道炎症の増悪には, それらの因子の発現変化も考えられる。抗原の繰り返し曝露による炎症反応の低下は, 免疫寛容として知られている²¹⁾。今回の実験でもストレスを伴わない単なる抗原吸入の繰り返

しは, 最終的に抗原曝露による有意な炎症反応を誘導できないという結果であった。しかし, ストレスを伴う抗原吸入の繰り返しでは抗原曝露により有意な炎症が認められた。さらに, 免疫寛容が誘導されないSaline吸入では, ストレスの有無にかかわらず, 抗原曝露はSaline曝露に比較して有意な炎症反応を惹起した。従ってストレスによる気道での炎症細胞集積の増大の一因として, 抗原に対する免疫寛容の抑制が考えられる。このことは喘息患者が, マウスと異なり日常生活の中で繰り返し曝露されているはずの同一抗原に対して, 決して免疫寛容は誘導されず, 発作を繰り返すこと背景に日常生活のストレスが関与することを示唆する。免疫寛容には, 抑制性サイトカインであるIL-10やTGF- β の関与が報告されている¹⁹⁾ことから, 今後これらのサイトカインの発現についても検討が必要である。また, マウスにおいて精神的ストレスがHPA axisや交感神経系を活性化し, コルチゾールやカテコールアミンの分泌を増加させるということも報告されている¹¹⁾。しかしながらコルチゾールは免疫を抑制し, カテコールアミンは β 受容体刺激により気管支平滑筋を弛緩させるので喘息悪化に関与することは考えにくい。

今回2系統のマウスを用いて検討を行ったことにより, 気道炎症に対するストレスの影響に系統差があることが明らかになった。我々の結果を支持するものとして, Shanksら²²⁾は, BALB/c及びC57BL/6Jマウスにフットショックストレスを与えると, BALB/cマウスにおいてはTh2反応が高められるが, C57BL/6JマウスにおいてはTh1及びTh2反応に変化は見られないことを報

告した。遺伝的背景の異なる2系統のマウスを用いた今回の結果によりストレス性喘息の病態形成には遺伝的因子が関与していることが示唆された。

精神的ストレスは、ヒトにおいて様々な疾患の発症や増悪に関与することが報告されている¹²⁾。喘息においてもストレスとの関連は知られており、喘息患者のうち20~35%ものヒトがストレスによる症状の悪化を経験するとの報告がある⁴⁾。疫学的報告だけでなく、ヒトにおいてストレスによりTh2サイトカイン増大を伴う気道炎症の増悪、気道過敏性亢進が引き起こされていることも報告されている⁶⁾。これらから、ストレスの増加しつつある現代社会において、今後さらにストレス性喘息が増加することが懸念される。従ってストレス性喘息のメカニズムの解明は重要であり、このためにはストレス性喘息モデルマウスは有用と考える。

参 考 文 献

- NHLBI/WHO Workshop report. Global strategy for Asthma Management and Prevention. 02-3659 (2002).
- Mosmann TR, Sad S., *Immunol. Today*, **17**, 138-46 (1996).
- Carter LL, Dutton RW., *Curr. Opin. Immunol.*, **8**, 336-42 (1996).
- Isenberg SA, Lehrer PM, Hochron S., *Psychosom. Med.*, **54**, 192-216 (1992).
- Miller BD, Wood BL., *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*, **33**, 1236-1245 (1994).
- Laube BL, Curbow BA, Fitzgerald ST, Spratt K., *Eur. Respir. J.*, **22**, 613-618 (2003).
- Joachim RA, Quarcoo D, Arck PC, Herz U, Renz H, Klapp BF., *Psychosom. Med.*, **65**, 811-815 (2003).
- Forsythe P, Ebeling C, Gordon JR, Befus AD, Vliagoftis H., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **169**, 220-226 (2004).
- Liu LY, Coe CL, Swenson CA, Kelly EA, Kita H, Busse WW., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **165**, 1062-1067 (2002).
- Makino S, Hashimoto K, Gold PW., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **73**, 147-158 (2002).
- Iwakabe K, Shimada M, Ohta A, Yahata T, Ohmi Y, Habu S, Nishimura T., *Immunol. Lett.*, **62**, 39-43 (1998).
- Chrousos GP., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **106**, 275-291 (2000).
- Madrigal JL, Caso JR, de Cristobal J, Cardenas A, Leza JC, Lizasoain I, Lorenzo P, Moro MA., *Brain Res.*, **979**, 137-145 (2003).
- Kumagai K, Ohno I, Okada S, Ohkawara Y, Suzuki K, Shinya T, Nagase H, Iwata K, Shirato K., *J. Immunol.*, **162**, 4212-4219 (1999).
- McMillan SJ, Lloyd CM., *Clin. Exp. Allergy*, **34**, 497-507 (2004).
- Dent G, Hadjicharalambous C, Yoshikawa T, Handy RL, Powell J, Anderson IK, Louis R, Davies DE, Djukanovic R., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **169**, 1110-1117 (2004).
- Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV., *Nature*, **347**, 669-671 (1990).
- Hidi R, Riches V, Al-Ali M, Cruikshank WW, Center DM, Holgate ST, Djukanovic R., *J. Immunol.*, **164**, 412-418 (2000).
- Schramm CM, Puddington L, Wu C, Guernsey L, Gharanee-Kermani M, Phan SH, Thrall RS., *Am. J. Pathol.*, **164**, 295-304 (2004).
- Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Merendino A, Pace E, Rizzo A, la Rocca AM, Bellia V, Bonsignore G, Bousquet J., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **156**, 591-599 (1997).
- Seymour BW, Gershwin LJ, Coffman RL., *J. Exp. Med.*, **187**, 721-731 (1998).
- Shanks N, Kusnecov AW., *Physiol. Behav.*, **65**, 95-103 (1998).