

Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, Fujisawa T, Ohta K, Yamamoto K, Morita Y, Hirai K : Expression of CXCR4 in Eosinophils : Functional Analyses and Cytokine-Mediated Regulation. J Immunol. 5935-5943 : 2000

Yamashita N, Tajima M, Nakano J, Arioka H, Arai H, Miyasaka T, Kubota S, Kawashima R: Induction of Apoptosis in Bronchial Eosinophils: Beneficial or Harmful ? Int Arch Allergy Immunol, 122(suppl 1): 40-43: 2000

大田 健 : 成人喘息の急性発作に対する治療, medicina, 37 (2) : 234-236, 2000

大田 健 : 成人喘息の治療, 免疫・Immuno Frontier : 55-59, 2000

大田 健 : 点滴静注製剤の使用の実際 - 成人, 臨床と薬物治療, 19 (6) : 39-41, 2000

大田 健 : 気管支喘息, 臨床医, 26 増刊号 : 230-235, 2000

大田 健 : 気管支喘息の慢性気道炎症 (今月号の表紙解説), 分子呼吸器病, 4 (3) : 195 : 2000

大田 健 : マウス喘息モデルの気道上皮 (今月号の表紙解説), 分子呼吸器病, 4 (4) : 265 : 2000

大田 健 : マスト細胞と好塩基球 応用研究例, 分子呼吸器病, 4 (4) : 43-47 : 2000

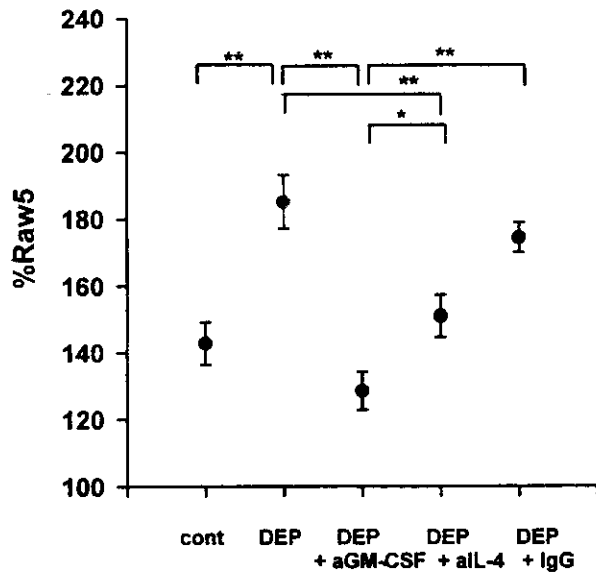
山下直美, 大田 健 : 免疫抑制剤, 呼吸, 19 (5) : 499-504 : 2000

山下直美, 大田 健 : 気管支喘息とPAF, アレルギー科, 9 (4) : 319-323 : 2000

大林王司, 大田 健 : 気管支拡張薬, 治療薬, 5 (3) : 28-30 : 2000

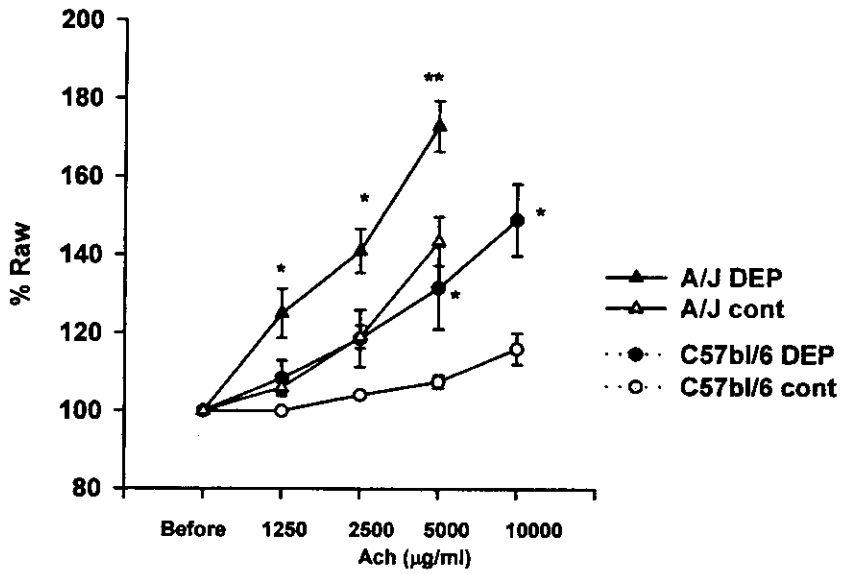
☒1

The effects of neutralizing antibody on airway hyperresponsiveness induced by DEP



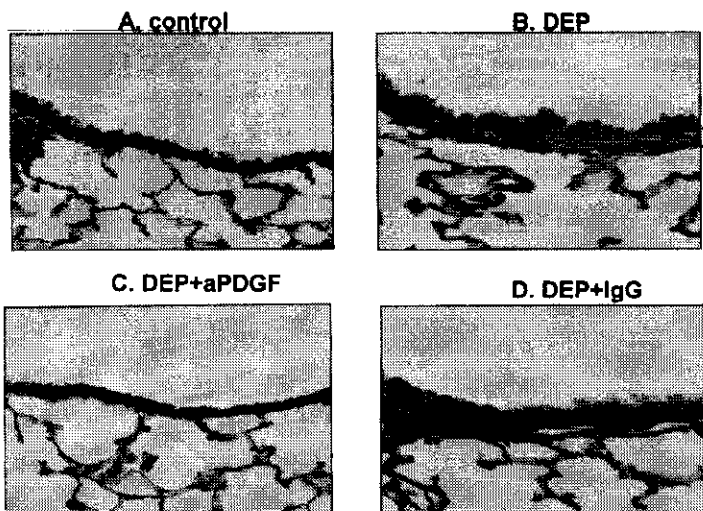
☒2

Airway hyperresponsiveness induced by DEP

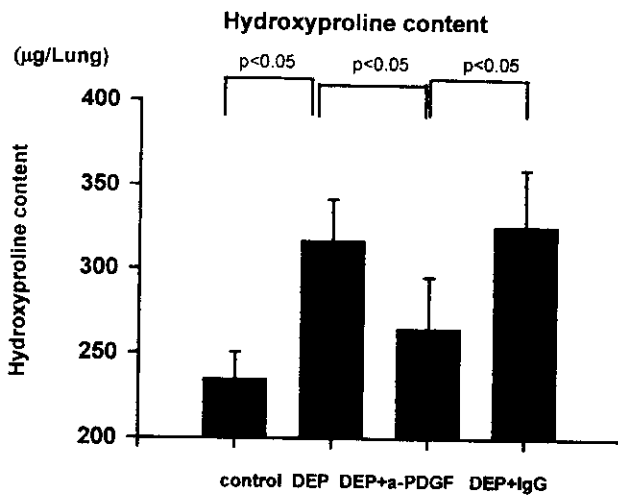


☒3

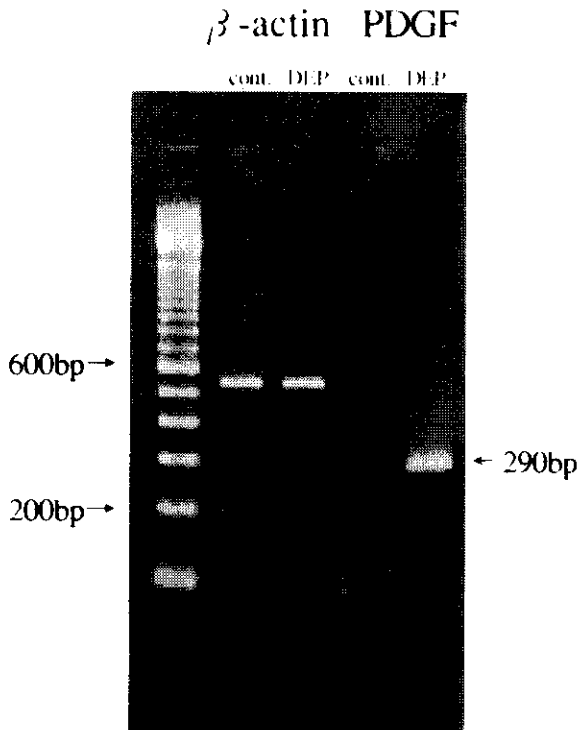
Elastic Van Gieson Stain



4

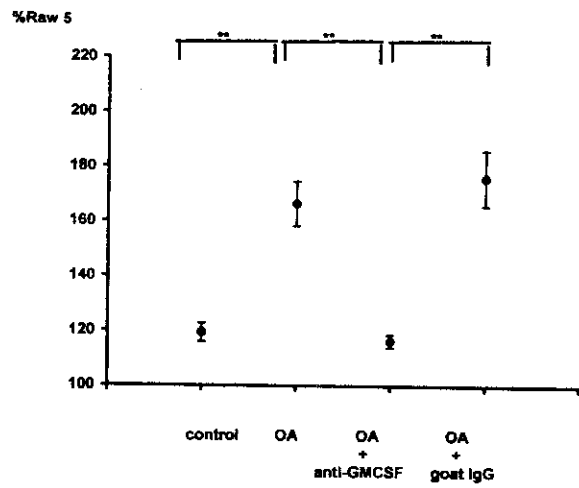


5



6

**Effect of anti-GMCSF neutralizing antibody on airway hyperresponsiveness induced by OA inhalation**



アレルギー疾患に係わる胎内・胎外因子同定に関する研究  
サイトカインの面からの検討

分担研究者氏名 古川 漸 山口大学医学部小児科教授

研究要旨

環境因子の関与は出生前の胎児期から影響を受ける。妊娠中の感染症は早期の環境因子として重要と考えられる。CD4+Tリンパ球のバランスの面から、アレルギー疾患はT helper (Th) 2 優位、感染症ではTh1 優位と考えられている。研究者らは、細胞内サイトカイン染色法によりサイトカイン産生臍帯血Tリンパ球の解析を行なった結果、胎内感染例ではIFN- $\gamma$ 産生CD3+臍帯血Tリンパ球が増加し、アレルギー家族歴のある例では、IL-4 産生CD3+Tリンパ球の増加がみられたことは、既に報告した。今年度は、これらの児のその後のアレルギー疾患の発症について検討した結果、平均1.5年後では、臍帯血IL-4 産生CD3+Tリンパ球増加例は、アレルギー疾患の発症がみられたが、臍帯血IFN- $\gamma$ 産生CD3+Tリンパ球増加例では、アレルギー疾患発症例はみられなかった。すなわち、胎内感染例では、早期のアレルギー発症はみられず、胎内感染が胎内因子の重要なもののひとつと考えられた。

研究協力者 松原知代  
(山口大学医学部小児科講師)

A. 研究目的

アレルギー疾患は遺伝的素因と環境因子から発症する疾患である。環境因子の関与は出生前の胎児期から影響を受ける。早期の環境因子は、妊娠中の母体のアレルギー曝露および妊娠中の感染症である。CD4+Tリンパ球はinterferon gamma (IFN- $\gamma$ )などを産生し細胞性免疫に関与するT helper (Th)1と、interleukin (IL)-4やIL-6などを産生しIgE産生や抗体産生など液性免疫に関与するTh2に分類される。Th1/Th2 バラン

スの破綻によって疾患が発症し、アレルギー疾患はTh2 優位、感染症ではTh1 優位と考えられている。研究者らは、細胞内サイトカイン染色法によりサイトカイン産生Tリンパ球の解析を行なった結果、胎内感染例ではIFN- $\gamma$ 産生CD3+Tリンパ球は増加し、その高値は破水後日数と関連がみられ、胎内感染の示標となった(図1)。一方、IL-4 産生CD3+Tリンパ球は、IFN- $\gamma$ 産生CD3+Tリンパ球に比し少数だったが、アレルギー家族歴のある児のIL-4 産生CD3+臍帯血Tリンパ球は増加していたことについて既に報告した(平成11年度報告書)(図2)。今年度はサイト

カイン産生臍帯血Tリンパ球を測定した児について、その後のアレルギー疾患発症の有無について追跡調査した。

#### B方法

##### 1) サイトカイン産生臍帯血Tリンパ球の測定

ヘパリン採血した臍帯血を Brefeldin A(BFA, 0.5mg/ml) 存在下に、Phorbol 12 Myristate 13 Acetate (PMA, 25ng/ml) と Ionomycin(1mg/ml)で刺激し37℃、7%CO<sub>2</sub> incubator 内で4時間培養する。刺激後のリンパ球を"FASTIMMUNE サイトカインシステム" (日本ベクトンディッキンソン社) を用いて細胞内サイトカインを染色しーサイトメトリーで3カラー解析した。細胞膜表面抗体として PerCP 標識抗 CD3 抗体を、細胞内サイトカインとして FITC 標識抗 IFN- $\gamma$ 抗体および PE 標識抗 IL-4 抗体を用いた。

##### 2) アレルギー疾患発症の追跡調査

サイトカイン産生臍帯血Tリンパ球を測定した児について、その後のアレルギー疾患 (気管支喘息、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーなど) 発症の有無について追跡調査を行っ

た。追跡期間は胎内感染がなくアレルギー家族歴がない児は9ヵ月から2年2ヵ月 (平均1年5ヵ月)、胎内感染児は9ヵ月から2年1ヵ月 (平均1年2ヵ月) およびアレルギー家族歴がある児は5ヵ月から1年6ヵ月 (平均10ヵ月) である。

#### C結果および今後の展望

アレルギー家族歴のある児の IL-4 産生CD3+臍帯血Tリンパ球は全例高値を示し、うち4例 (57%) に早期のアレルギー疾患の発症がみられた。最も高値 (2.6%) を示した児は母のアレルギーが重症で、生後3ヵ月よりアトピー性皮膚炎、食物アレルギーおよび気管支喘息を発症していた (表)。一方、IL-4 産生CD3+臍帯血Tリンパ球の増加を認めなかった正常新生児および胎内感染児では、アレルギー疾患の発症はみられなかった。すなわち、胎内感染児では、早期のアレルギー発症はみられず、胎内因子として胎内感染に注目すべきである。今後、サイトカイン産生臍帯血Tリンパ球を測定した児のさらにその後の追跡調査と、胎外因子として母乳中に含まれるサイトカインの影響について検討する。

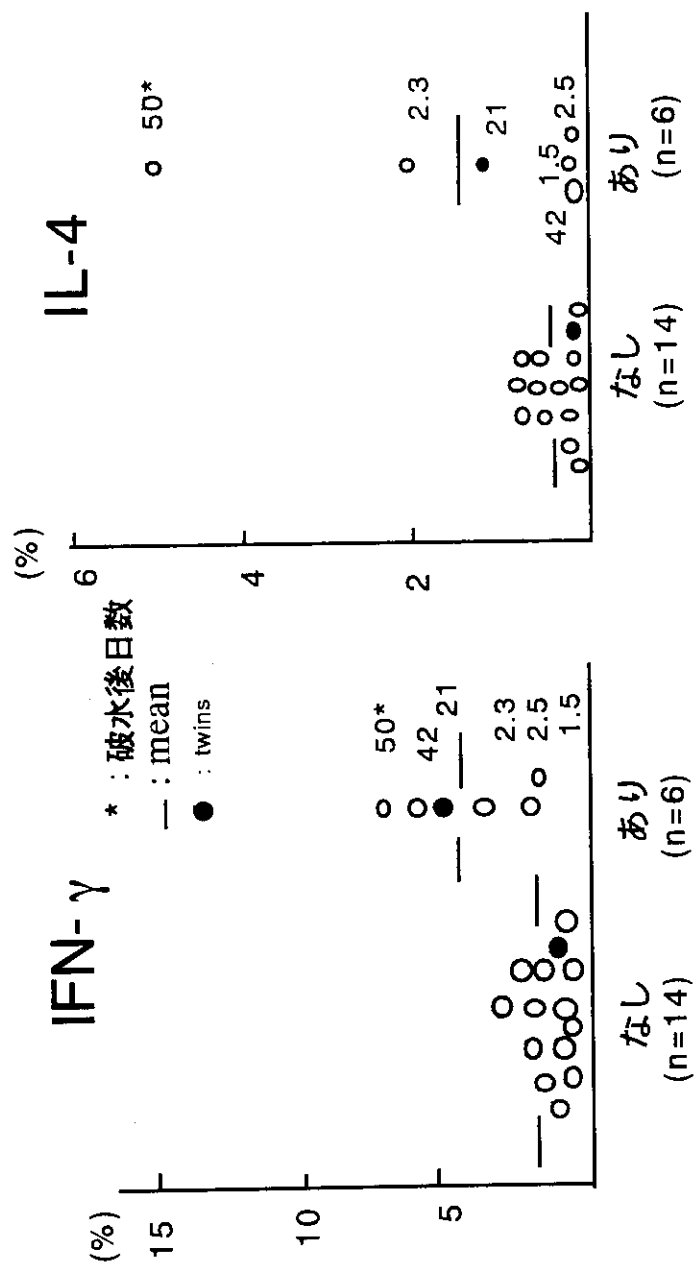


図1 胎内感染例のサイトカイン産生臍帯血 Tリンパ球

数値は CD3+Tリンパ球に占めるサイトカイン産生 CD3+Tリンパ球のパーセント。  
胎内感染例の IFN- $\gamma$ 産生臍帯血 Tリンパ球は増加し、その増加は破水後日数と正の相関がみられた。



表 臍帯血 IL-4 産生 CD3+Tリンパ球高値例の追跡調査

	年 齢	診 断・症 状	発 症 年 齢
1	1Y4M	AD, FA, BA (卵白)	3M (AD, FA)
2	1Y3M	AD	3M
3	6M	—	—
4	1Y6M	AD, FA (卵白)	4M
5	8M	AD	1M
6	7M	—	—
7	5M	—	—

AD: atopic dermatitis    FA: food allergy    BA: bronchial asthma  
 Y: year    M: month



厚生省科学研究補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業）  
アレルギー疾患に係わる胎内・胎外因子の同定に関する研究  
皮膚バリア障害の検討ー皮膚バリア障害と皮表の黄色ブドウ球菌ー

分担研究者 池澤善郎 横浜市立大学医学部皮膚科教授

研究要旨 アトピー性皮膚炎（AD）患者の乾燥病変において、バリア障害と皮膚常在菌の変化、特に黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）との関係について検討した。対象は横浜市大皮膚科に外来受診した乾燥症状が主体の軽症および中等症の AD 患者で、経表皮水分蒸散量と角層コンダクタンスの測定および同部位の細菌の検出を施行した。結果は皮膚生理パラメーターが乾燥とバリア障害を示す部位から好気性菌が多く検出され、しかも常在菌叢に占める *S. aureus* の割合が著しく高くなっていった。同菌のヒアルロニダーゼ活性は検出されたすべての患者の菌で陽性であった。以上より、AD の乾燥病変ではバリア障害によりヒアルロニダーゼ産生性黄色ブドウ球菌が増殖し、それが AD の増悪遷延化を促す可能性が考えられた。乾燥病変に対し単なる保湿のみでなく本来の皮膚常在菌叢を回復させることが AD の皮疹の改善に有効であると考えられた。

研究協力者：相原道子1、勝山雅子2

- 1 横浜市立大学医学部皮膚科学教室
- 2 株式会社資生堂ライフサイエンス研究センター

#### A. 研究目的

アトピー性皮膚炎（以下 AD）患者では、健常人と比較して皮膚の保湿能やバリア機能が低下している。このバリア機能の低下は、皮疹部以外のいわゆるアトピー皮膚においてもみられ、外界からの様々な刺激を受けやすくなることに加えてダニなどのアレルゲンの皮膚からの侵入を容易にし、AD の発症や増悪を促すとされている。一方、AD の皮疹部、特に湿潤病変から黄色ブドウ球菌（以下 *S. aureus*）が高率、高密度に検出される。健常人皮膚からは *S. aureus* はほとんど検出されないことから、このことは AD の増悪因子の一つとして *S. aureus* が何らかの関与をしている可能性を示している。しかしながら、これまでに AD の乾燥病変部や単なる乾燥皮膚の常在細菌が AD 病変に何らかの影響を与えているかどうかについては検討されていない。AD 患者の皮膚バリア機能の低下が皮膚常在細菌

叢にも変化を及ぼすとすれば、*S. aureus* が乾燥部皮膚でも増殖し、それが何らかの機序を介して AD の発症や増悪に関与している可能性が考えられる。

そこで、AD 患者のびらんや湿潤を認めない乾燥病変において、バリア障害と皮膚常在菌の変化、特に *S. aureus* との関係について検討した。

#### B. 研究方法

##### 1) 対象

横浜市大医学部附属病院皮膚科に外来受診した AD 患者のうち、乾燥症状（落屑、軽度の苔癬化）が主体の軽症および中等症の患者を対象とした。皮膚生理パラメーターの測定と同時に皮膚好気性菌の検出を 15 名（男 5 名、女 10 名、年齢 7-38 歳、平均年齢 23 歳）の患者で施行した。また、皮膚に常在する好気性および嫌気性菌の酵素活性について 45 名（男 17 名、女 28 名、年齢 3-55 歳、平均年齢 23 歳）の患者で測定した。なお、以下の検査は危険性がなく、またすべて患者の同意を得て施行しており、倫理面には問題がないと判断された。

##### 2) 皮膚生理パラメーターの測定

両側前腕屈側の皮疹部または乾燥皮膚の経表皮水分蒸散量 (transepidermal water loss: TEWL(tewa meter; COURAGE+KHAZAKA electronic GmbH, Koeln, Germany))、角層コンダクタンス (skicon-100; IBS 社)、皮表 pH (pH meter D-12; Horiba 社) の測定を施行した。

### 3) 皮膚の菌採取と分離培養、菌数測定

両側前腕屈側の皮疹部表面から菌を採取し、分離培養を行なった。常在菌の採取、測定はスタンプ瓶法を用いた。すなわち、サンプリング液 (pH7 のリン酸緩衝液) を染み込ませた滅菌バット (直径 27mm) を皮膚に 30 秒間押しつけ、それを一定のサンプリング液中に分散させることにより菌を回収した。回収した菌液を SCDLP 培地 (日本製薬株式会社製) に塗布し、30℃ で培養した。成育したコロニー数を数え、全好気性菌数 (*S. aureus* も含む)、*S. aureus* 数を算出した。酵素活性の測定の際には前腕および前額から菌を採取し、好気性および嫌気性培養を行った。嫌気性培養には GAM 培地 (日水製薬株式会社製) に LP 希釈液 (日本製薬株式会社製) を加えたものを用い、37℃ で培養した。

### 4) 細菌の酵素活性の測定

培養した菌を各種酵素検出用培地に移して培養し、各種酵素活性の有無をそれぞれのコロニーについて判定した。酵素活性は、リパーゼ、プロテアーゼ、ヒアルロニダーゼについて測定した。

## C. 研究結果

### 1) AD 患者の前腕屈側部皮膚の生理パラメーターと検出される *S. aureus* 数

AD 患者 15 名で両側前腕屈側部皮膚の生理パラメーターを測定した。角層の水分量を表す角層コンダクタンスの平均は AD 患者で  $6.7 \pm 1.9 \mu S$  で健常人平均  $18.9 \pm 2.0 \mu S$  より明らかに低値であり、表皮のバリア機能を表す TEWL は AD 患者で  $39.2 \pm 3.2 g/m^2 \cdot hr$  で健常人平均の  $5.0 \pm 0.5 g/m^2 \cdot hr$  より高値であった。これらの値は AD 患者における皮膚の強い乾燥とバリア障害を示すものであり、特に TEWL は測定した全部位で  $15 g/m^2 \cdot hr$  以上であった。皮表 pH は  $4.8 \pm 0.3$  で健常

人の  $4.41 \pm 0.31$  よりはやや高値であったが全測定部位で 4.5-5.5 の間に分布しており、皮表の酸性は保たれていた (表 1)。

これらの患者すべてについて生理的パラメーター測定を行った前腕屈側皮膚表面の菌採取を施行したところ、30 ヶ所すべてで好気性菌が検出された。検出された総好気性菌数は  $7-106 cfu/cm^2$  であり、そのうち、*S. aureus* が検出されなかったのは 5 ヶ所で、そのうちの 3 ヶ所は総好気性菌数が  $102 cfu/cm^2$  以下であった (図 1)。*S. aureus* が両側とも陰性であった症例は 1 例のみで、3 例は左右いずれか一方から、また残りの 11 例は両側から *S. aureus* が検出された。その菌数をみると、被験部位 30 ヶ所中 23 ヶ所 (77%) で  $102 cfu/cm^2$  以上の *S. aureus* が検出された。この値はこれまで報告されている健常人の同部の正常値 ( $10 cfu/cm^2$  以下) と比較すると著しく高かった。さらに、検出された *S. aureus* が多いほど総好気性菌に占める *S. aureus* の割合が高く、103 以上の *S. aureus* が検出された全部位で、*S. aureus* が総好気性菌の 80% 以上を占めた (表 2)。今回、紅斑や落屑などの皮疹の程度と総好気性菌数および *S. aureus* 数との間に一定の傾向はみられなかった。

なお、生理パラメーターの値と *S. aureus* 数とのあいだに相関は見られなかった。

### 2) AD 患者の前額部および前腕屈側部皮膚から検出された菌の酵素活性

AD 患者 45 名の前額部および前腕屈側部より好気性菌および嫌気性菌を分離培養した。なお、測定部位の角層コンダクタンスの平均値は  $5.9 \pm 6.9 \mu S$  であり、乾燥を示していた。検出された総菌数は前額部で  $3-105 cfu/cm^2$ 、前腕屈側部で  $4-106 cfu/cm^2$  に分布しており、健常人のそれ (前額で約  $102-104 cfu/cm^2$ 、前腕屈側部で  $10-102 cfu/cm^2$ ) より高い傾向を示した。前額および前腕屈側部における  $102 cfu/cm^2$  以上の *S. aureus* 検出率はそれぞれ 71% (30/42)、64% (29/45) であった。

分離された菌のうち主に検出された *S. aureus*、*S. epidermidis*、*Propionibacterium acnes* について各酵素活性を測定した。菌が検出された患者数のうち各酵素

活性を有する菌をもつ患者数を数えて陽性率としてあらわした(表3)。その結果、リパーゼ活性は *S. aureus*、*S. epidermidis* で 100%、ヒアルロニダーゼ活性は *S. aureus* で 100%、*Propionibacterium acnes* で 76%の患者から検出された菌で陽性であったが、その他の菌では認められなかった。またプロテアーゼ活性は *S. aureus* の 6%に、*Propionibacterium acnes* の 45%に認められた。

#### D. 考察

AD 患者における乾燥性皮膚病変とその常在細菌叢、特に *S. aureus* との関係を検討した。

健常人の皮膚では、通常皮脂量の多い前額部からはある程度の細菌は検出されるものの、前腕屈側部からはほとんど検出されない。検出される菌種は主に、*S. epidermidis*、*Propionibacterium acnes* であって、*S. aureus* は健常人皮膚からはほとんど検出されない。

今回、角層コンダクタンスと TEWL の値が健常人より乾燥およびバリア障害を示している群で行なった皮膚常在細菌叢の検討では、びらんや湿潤を伴わない乾燥性病変であるにもかかわらず、好気性菌が多く検出された。しかも常在菌叢に占める *S. aureus* の割合が著しく高くなっていた。これは、乾燥性病変で既に皮膚常在細菌叢が異常をきたしていることを示していた。

これらの菌の酵素活性をみたところ、*S. epidermidis* では全くみられなかったプロテアーゼ、ヒアルロニダーゼ活性が *S. aureus* では認められ、特にヒアルロニダーゼ活性は 100%で陽性であった。*S. aureus* はプロテアーゼやヒアルロニダーゼを産生することにより角質層を破壊し、深部へと侵入するとされる。これがさらに皮膚バリア機能を障害し、様々な刺激物質やアレルゲンの侵入をさらに容易にすると考えられる。そのため、今回検出された皮表に定着した多数の *S. aureus* は、AD の悪化を促進する要因の一つである可能性が考えられた。

また、*S. aureus* の細胞壁成分(主としてタイコ酸とペプチドグリカン)はヒト好塩基球からのヒスタミン遊離活性を有している。そのため、*S. aureus* の定着部位は他部位より搔痒が著しくなり、搔破を引き起こして

皮疹のさらなる悪化を起こすことが考えられる。

上記のバリア障害の促進のほかにも、*S. aureus* が AD の病変形成に及ぼす影響については、種々の報告がなされている。特に細菌性スーパー抗原については AD 発症への関与を示唆する報告が多数なされている。*S. aureus* の産生する毒素である enterotoxin (SE)、toxic shock syndrome toxine-1 (TSST) は細菌性スーパー抗原であり、T 細胞を刺激活性化させ種々のサイトカインを産生させる。AD 患者末梢血単核球はこれらのスーパー抗原に対して正常人コントロールより高い反応性を示し、高い IL-4 産生を認めるとする報告がみられる。また、ケラチノサイトはスーパー抗原に直接反応して TNF- $\alpha$ などのサイトカインを分泌するほか、自己の抗原提示能を高める。これらのいずれもが AD の炎症の増悪遷延化に寄与しているものと思われる。さらに、AD 患者において *S. aureus* やその産生毒素に特異的な IgE 抗体産生が報告されている。特に中等症以上の AD では SEA、SEB に対する抗体が 60-80%の頻度で検出されるとされ、SE 特異的 IgE が AD の発症に関与している可能性が示唆される。

以上述べたように、*S. aureus* はバリア障害、サイトカイン産生分泌促進、ケラチノサイトの活性化、特異的 IgE 抗体産生など様々な面から AD の発症増悪に関与していると考えられ、AD の乾燥部における *S. aureus* の除去は AD の治療に有用と考えられた。主として搔破によるびらん部の除菌目的で行われてきた従来のポピドンヨードやグルコン酸クロルヘキシジンなどを用いた消毒療法は刺激性が強く、またアレルギー性接触皮膚炎を生じることにより AD の皮疹をかえって悪化させることがある。さらに後者では、即時型アレルギー反応によるショックなどが問題となる。そのため、AD 治療を目的とした新たな除菌方法の開発が必要であると考える。

#### E. 結論

AD の乾燥皮膚病変ではバリア障害が認められ、*S. aureus* が増殖していた。

AD の乾燥皮膚では従来の保湿剤外用によるバリア機能

の回復が重要であることはいうまでもないが、  
 102cfu/cm<sup>2</sup> 以上の *S. aureus* が認められる患者では保湿  
 剤のみのスキンケアでは *S. aureus* の減少は困難と思わ  
 れる。*S. aureus* を減少させ *S.epidermidis* の皮表に占め

る割合を増加させて本来の皮膚常在菌叢を回復させる  
 ことを目的とした、低刺激性でかつ新たなアレルギー  
 反応を引き起こすことのない除菌療法の開発が今後の  
 課題と考えられ、現在研究中である。

表1 アトピー性皮膚炎患者の前腕屈側皮疹部の生理パラメーター (n=30)

	AD患者測定値	健康人平均値
角層コンダクタンス	6.7±1.9 μS	18.9±2.0 μS*
TEWL	39.2±3.2g/m <sup>2</sup> ·hr	5.0±0.5 g/m <sup>2</sup> ·hr*
皮表pH	4.8±0.3	4.41±0.31**

\* 高橋元次：香粧会誌、21、50-55、1997より引用

\*\* 遠藤 薫、他：日皮会誌、110、19-25、2000より引用



図1 アトピー性皮膚炎患者の乾燥病変から検出された好気性菌数および  
 黄色ブドウ球菌数の分布

表2 アトピー性皮膚炎患者の前腕屈側皮疹部における *S. aureus* 数と  
総好気性菌数に占める割合 (n=30)

検出された <i>S. aureus</i> 数 (cfu/cm <sup>2</sup> )	好気性菌検出 部位数	<i>S. aureus</i> / 総好気性菌数 > 0.8 であった検出部位数 好気性菌検出部位数
0	5	—
1-10	2	1/2 (50%)
10<, ≤10 <sup>2</sup>	0	—
10 <sup>2</sup> <, ≤10 <sup>3</sup>	6	4/6 (67%)
10 <sup>3</sup> <, ≤10 <sup>4</sup>	9	9/9 (100%)
10 <sup>4</sup> <, ≤10 <sup>5</sup>	4	4/4 (100%)
10 <sup>5</sup> <, ≤10 <sup>6</sup>	3	3/3 (100%)
10 <sup>6</sup> <, ≤10 <sup>7</sup>	1	1/1 (100%)

表3 アトピー性皮膚炎患者の皮膚常在菌の酵素活性 (陽性率%)

	lipase	protease	hyaluronidase
<i>S. aureus</i>	100	6	100
<i>S. epidermidis</i>	100	0	0
<i>Propionibacterium acnes</i>	22	45	76

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業）  
アレルギー疾患に関わる胎内・胎外因子の同定に関する研究

分担研究者 柴崎正修 筑波大学臨床医学系小児科助教授

カモガヤ花粉症の全ゲノム連鎖解析を行った。臨床症状は染色体 1p36.2、4q13.3、9q34.3 領域と連鎖し、総 IgE 値は 3P24.1、5q33.1、12q24 と連鎖することが明らかになった。9q34 はこれまでに気管支喘息や他のアトピー形質との連鎖が報告されていない新しい領域であり、この領域にはカモガヤ花粉症に特異的な遺伝子が存在する可能性が示唆された。

#### A 研究目的

アレルギー疾患のような多因子性遺伝疾患の遺伝子座を同定するためには全染色体レベルでの系統的な検索が不可欠である。1996年、Daniels らは英国系白人で全ゲノム解析を行い、4番染色体(D4S426)、11q13、13q14.1-q14.3、16番染色体(D16S289)に認められ連鎖していたと報告した。1997年、CSGA グループはアフリカ系米国、白人、ラテン系米国人で、気管支喘息の全ゲノムスクリーニングを行い、アフリカ系では 5p15 と 17p11.1-q11.2、白人では 5q23-q33、6p21.3-q23、11p15、12q14-q24.2、13q21.3-qter、14q11.2-q13、19q13 であり、ヒスパニックでは 2q33、12q14-24.2、21q21 領域に連鎖を認めている。1998年、Ober らは米国人フラッター派教徒の家族で、アトピー・気管支喘息の遺伝子座の分析を行い、5q23-31、12q15-q24.1、19q13、21q21 との連鎖を報告した。また、1999年、Wjst らの独・北欧人でアトピーと 2qter、6p21.3、9pter-9qter、12q13 との連鎖を報告している。2000年に、我々はダニアレルギーのある日本人小児喘息患者で気管支喘息/アトピー形質との連鎖をゲノムレベルで解析

し、有意の連鎖は 5q31-q33（最大ロッド値；MLS=4.3）、4q35（MLS=2.74）、13q11（MLS=2.87）に認められた。その他、6p22-p21.3（MLD=2.13）、12q21-q23（MLS=1.92）、13q14.1-q14.3（MLS=1.93）に認められることを報告した。その結果は、白人と日本人では気管支喘息/アトピーの発症に関与する遺伝子多型に大きな類似性があることが示唆していた。

花粉症も喘息と同様に家族性遺伝素因が関係する疾患と考えられている。花粉症と喘息は合併することが少なくない。このことは、すべてではなくとも、いくつかの共通の遺伝因子が両者の発症に関与している可能性を示唆している。一方、喘息は室内塵ダニ感作と、花粉症は花粉抗原感作と関連しており、免疫応答遺伝子レベルでの違いが病像を分けている可能性は大いにあり得る。したがって、花粉症は喘息と共通の遺伝子と別の遺伝子の両者が関与している可能性を示唆される。それ故に、花粉症の発症に寄与する遺伝子を探索し、これまでに報告された気管支喘息/アトピーの結果と比較することは、重要なことと考えられる。

長野県にはカモガヤ花粉症の多発地域があ

る。アレルギー性疾患の遺伝学的基盤を明らかにするために、この地域の罹患同胞家族を対象に日本人におけるカモガヤ花粉症の感受性遺伝子座の全ゲノム解析を行った。

## B 研究方法

【対象】長野県松川町にはリンゴの樹の下草として移植されたカモガヤが群生しており、カモガヤ花粉症多発地域になっている。研究の対象はこの地域に住むカモガヤ花粉症の同胞とその両親である。花粉症の診断基準はカモガヤ花粉飛散期である5月から8月にかけて鼻炎および結膜炎症状を有し、カモガヤCAP-RASTが3.5UA以上の症例とした。臨床症状のほかに、総IgE値、カモガヤ特異RAST値を遺伝形質として解析した。家系数48。分析家族人数は188名、罹患同胞対数は63であった。

【遺伝子解析】溶血法で分離した白血球からフェノール法によりDNAを抽出し、ABI PRISM Linkage Mapping Setの400遺伝マーカー（平均10cM間隔）をPCR法で増幅し、Genescanソフトウェアを装備したABI PRISM 3100 DNA Sequencerで電気泳動を行い、遺伝子型を同定した。

【連鎖解析】花粉症形質のノンパラメトリック多点連鎖解析は、コンピュータープログラムMAPMAKER/SIBSを用いて解析した。血清総IgE値およびカモガヤ特異IgE抗体値との連鎖はHasemann.Enston解析プログラムを用いて、定量的に解析した。連鎖はKuruglyakとLanderの基準を用いてSignificant及びsuggestiveに分けた。

【倫理面での配慮】この研究に関して、筑波大学倫理委員会での承認を受け、対象者全員からインフォームドコンセントをた。

## C 研究結果

1p36.2、4q13.3、9q34.3の3領域に臨床症状との連鎖(suggestive linkage)が認め

られた。陽性RAST形質と連鎖する遺伝子領域は認められなかった。3p24.1、5q33.1、12q24の3領域に血清総IgEとの有意の連鎖が認められた。これらの連鎖領域を表にまとめて示した。カモガヤ花粉症との連鎖は最大ロッド値(MLS)で、血清総IgE値、カモガヤRAST値との連鎖はロッドスコアで示した。

## D 考察

前回、我々はダニアレルギー陽性の日本小児気管支喘息患者で全ゲノム連鎖解析を行い、喘息形質は4q35、5q31-q33、6p22-p21.3、12q21-q23、及び13q14.1-q14.3と連鎖することを明らかにした。今回の研究では、花粉症形質と喘息形質には共通する連鎖領域がみられなかったが、唯一、5q33領域が共通する連鎖領域であった。この領域は多くの研究者によって、喘息、気道過敏性、アレルギー関連因子との連鎖が報告されており、花粉症の発症にも影響を与える重要な遺伝子を含んでいると考えられた。

1q34はHutter教徒における気管支喘息の全ゲノム解析において連鎖のみられた領域である。また、この領域は高IGE症候群と連鎖するとの報告がある。さらに、4q13.3領域はダニアレルギーと連鎖することが報告されている。しかし、9q34は、アレルギー疾患関連因子との連鎖の報告がなく、カモガヤ花粉症に特異的な新たな連鎖領域である可能性が示唆された。高IGE値と連鎖する5q33.1と12q24はこれまでに多くの研究者たちにより連鎖があると報告されている。また、3p24.1はフッター教徒で気管支喘息と連鎖があると報告された領域である。

一方、今回の研究では、定量的解析によってカモガヤ特異RAST値と連鎖する領域は認められなかった。この原因としては、カモガヤ特異IGE値が大多数の症例で一様に高値で、罹患同胞対間に差を認めにくいことが原因と

考えられた。

6p23HLA 領域はカモガヤ花粉症及び特異 IgE 値との連鎖が期待されたが、今回の解析は連鎖を否定するものであった。ここで使用された抗原は粗アレルゲンであり、カモガヤ花粉自身物理化学的性状は多様性に富んでいることによるのかもしれない。

## E 結論

カモガヤ花粉症の全ゲノム連鎖解析を行った。臨床症状は染色体 1p36.2、4q13.3、9q34.3 領域と連鎖し、総 IgE 値は 3P24.1、5q33.1、12q24 と連鎖することが明らかになった。9q34 はこれまでに気管支喘息や他のアトピー形質との連鎖が報告されていない新しい領域であり、この領域にはカモガヤ花粉症に特異的な遺伝子が存在する可能性が示唆された。

## F 健康危険情報

特になし。

## G 研究発表

### 1. 論文発表

1. Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Yamakawa-Kobayashi K, Yokouchi Y, Takeda K, Matsui A, Hamaguchi H. Mutation screening of interferon regulatory factor 1 gene (IRF-1) as a candidate gene for atopy/asthma. *Clin Exp Allergy*. 2000; 30:1562-7.

2. Yokouchi Y, Nukaga Y, Shibasaki M, Noguchi E, Kimura K, Ito S, Nishihara M, Yamakawa-Kobayashi K, Takeda K, Imoto N, Ichikawa K, Matsui A, Hamaguchi H, Arinami T. Significant evidence for linkage of mite-sensitive childhood asthma to chromosome 5q31-q33 near the interleukin 12 B locus by a genome-wide search in Japanese families. *Genomics*. 2000 ;66:152-60.

3: Nakahara C, Wada T, Kusakari J,

Kanemoto K, Kinugasa H, Shibasaki M, Nagata M, Matsui A. Steroid-sensitive nephrotic syndrome associated with Kimura disease. *Pediatr Nephrol*. 2000 14:482-5.

4: Nakahara C, Kamoda T, Kinugasa H, Kanemoto K, Takeda K, Shibasaki M, Horigome H, Matsui A. Simultaneous onset of nephrotic syndrome and insulin-dependent diabetes mellitus in a case with hypereosinophilia syndrome. *Clin Nephrol*. 2000 ;53:312-4.

5. Horigome H, Sekijima T, Ohtsuka S, Shibasaki M. Life threatening coronary artery spasm in childhood Kimura's disease. *Heart*. 2000;84(2):E5.

### 2. 学会発表

1. M Shibasaki, Y. Yokouchi, T. Arinami, K. Kobayashi, K. Takeda, A. Matsui, H. Hamaguchi : Mutation screening of histamine H1 receptor gene (HRH1) as a candidate for asthma.

World Congress on Lung Health: 10<sup>th</sup> ERS Annual Congress, Florence, 30 Sep, 2000

2.

K. Takeda, M. Shibasaki, Y. Yokouchi, E. Noguchi, A. Matsui: Comparison of IL-4, IL-5 and IFN-gamma responses to *Dermatophagoides farinae* (Df) between mite-sensitive asthmatics, mite-sensitive nonasthmatics and nonallergic controls. World Congress on Lung Health: 10<sup>th</sup> ERS Annual Congress, Florence, 30 Sep, 2000

3. 柴崎 正修 : 小児気管支喘息に対するテラードメディスンの可能性。シンポジウム 6 「小児気管支喘息の病態と治療をめぐる最



近の進歩」。第 50 回日本アレルギー学会、2000 年 10 月（横浜）

4. 柴崎 正修：日本人小児気管支喘息の全ゲノムスクリーニング。シンポジウム（IV）

「アトピー遺伝子の解明とアレルギー性疾患の遺伝子治療」第 37 回日本小児アレルギー学会。2000 年 11 月（前橋）

5. 西尾 裕美、横内 裕佳子、柴崎 正修、梅林 芳弘、市川 栄子、小林 公子、有波 忠雄、大塚 藤男、濱口 秀夫。アトピー性疾患患者における IL-13 の機能的遺伝子多型の解析。第 50 回日本アレルギー学会、2000 年 10 月（横浜）

6. 竹田 一即、柴崎 正修、野口 恵美子、横内 裕佳子、市川 邦男、松井 陽。ダニアレルギー陽性の喘息患者、非発症者並びにダニアレルギー陰性の健常者におけるカンジダおよび Df 特異リンパ球反応とサイトカイン産生能の比較。第 37 回日本小児アレルギー学会。2000 年 11 月（前橋）

7. 横内 裕佳子、柴崎 正修、野口 恵美子、竹田 一則、古葉斜視、有波 忠雄、松井 陽。TNF $\alpha$  遺伝子転写調節領域の多型と小児気管支喘息発症との関係。第 37 回日本小児アレルギー学会。2000 年 11 月（前橋）

8. 野口 恵美子、柴崎 正修、横内 裕佳子、竹田 一則、市川 邦男、松井 陽、小林 公子、有波 忠雄、気管支喘息における IRF-1 遺伝子の多型解析。第 37 回日本小児アレルギー学会。2000 年 11 月（前橋）

9. 市川 邦男、柴崎 正修、浜野 建三、岩崎 栄作、馬場 実、松井 陽。非飼育家庭の喘息児におけるネコ、イヌによる感作上京について— 地方と都市部との比較。第 37 回日本小児アレルギー学会。2000 年 11 月（前橋）

H 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生省科学研究補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業）  
アレルギー疾患に係わる胎内・体外因子の同定に関する研究

分担研究者 小田嶋 博 国立療養所南福病院小児科医長

研究要旨

我々は疫学的検討を行なうことによって本研究班の研究目的に基づく検討を行なった。具体的には福岡市において経年的に続けられてきたアレルギー疾患に関する調査を分析し、発症に関する胎内・胎外因子について検討した。また、増悪、または軽快因子についても検討した。其の結果、血清 IgE は予後を規定する因子でありその具体的な値についても1つの目安を推定した。また誕生月と気管支喘息の発症率についても一定の関連を見出した。

A. 研究目的

小児の気管支喘息やアレルギー疾患は近年増加の傾向にある。その頻度は小学校1年生では気管支喘息が6-8%、アトピー性皮膚炎で約15%であり、何らかのアレルギー疾患を持つものは、約半数に近づいている。このような頻度の高い疾患について胎内・胎外因子について検討し、これを疫学的に把握し、この予知予防に努めることは予後の点でも、また、今後の医療経済的にもきわめて有用であると考えられる。ここでは、疫学的検討を行いながら、胎内・胎外因子の究明を行ないその確定と検証を行なう。また、そのように有効な検討を行なうために有用な問診項目とその有効な活用方法について検討し、胎内・胎外の因子を究明すること、およびそれによって得られた項目に対する有効な対策を行なうために有用な方法を推定することを目的とする。

B. 研究方法

福岡市内の3地区5小学校で1年生の全員と、2年生以上は前年度にアレルギー疾患を有すると判断された者に対して経年的に行ってきた疫学調査のデータを分析し、発症、予後との関連を検討する。また、疫学調査によって、胎外因子として考えられる項目の検討結果について整理し、今後の前方視的検討によって確認すべき問題について整理する。

小学校1年生についての検討から、誕生月と気管支喘息の発症率について検討し、関連があれば、それがどのような機序によっているのかを今後の検討で明らかにする。

また、上記とは別の福岡市内の小学校で全員に対してATS-DLDの問診表を用いて調査を行い、可能な限り、協力を得られた者に対して、肺機能と血液学的検査を実施し、この結果を分析して、胎外因子の検討

を行う。

C. 研究結果

①気管支喘息の罹患率は経年的に増加の傾向にあり、小学校1年生についてみると市内の中心での頻度は10%を越えているが、非都市部では6-7%である。これは、ここ数年で頭打ちの傾向のみられるアトピー性皮膚炎とは異なる結果であった。また、男子に多く、これも男女差が少ないまたは女子に多い傾向のあるアトピー性皮膚炎とは異なっていた。

②過去の分析から有病率との関連で共通している背景因子としては、家族歴にアレルギー疾患があるか、保育形態が託児所、母親、祖父母の分類で託児所である、2歳までの肺炎、気管支炎など呼吸器疾患の既往があるなどの関与が推定された。

③受動喫煙の影響に関しては、血清IgEの高値、肺機能の異常などとの関連が見出された。また、都市部ではむしろ、母親の喫煙よりも家族の喫煙が関連がみられた。気管支喘息の患者が家族にいるために注意しているためとも推定された。

④大気汚染物質と肺機能との間にも関連が認められた。また、年齢によって影響が異なることが推定された。

⑤予後に関連するものとしては血清IgE値について検討した。平成10年度に呼吸器症状を有する者が次年度にも同じく症状を有する群と次年度には症状が消失した群に分類し、両者の血清IgE値について比較検討した。

その結果、血清IgEの値によって1年後の予後がある程度、推測できる学年もあったが、すべての学年では同じ結論が得られなかった(図1, 2)。

また、血清IgEが200U/mL以下の者では軽快する者が持続する者よりも多かったが、250U/mL

以上の者では持続する者が多いことが分かった。また、血清の IgE RAST score についてみると 0 の者では症状が軽快する者が多く、2 以上では持続する者が多いことが分かった (図 3)。

⑥ 小学校全員での検討では呼気中の NO が気道疾患と非気道疾患とは異なり、アトピー性皮膚炎以外の気道アレルギーにおいては共通して高値が認められた。また、寛解例でも高値を示すものが観察された。従って、気道の炎症が気管支喘息の病態と関連することは明らかであるものの、その臨床経過とは必ずしも明らかに関連が認められなかった。NO はまた、喘息患者で軽快していった者について測定してもやはり高値のまま持続している者がある。このことから、呼気中の NO によって測定される炎症の関与の意義について今後さらに検討されなければならないであろう。

#### ⑦ 誕生月と気管支喘息の発症頻度 (図 4)

気管支喘息の発症頻度と誕生月の関連を検討するために福岡市内の小学校 5 校の 1 年生について ATS-DLD の問診票を用い、気管支喘息と診断されたものとアレルギー疾患がないとされた者を含めた中での、その頻度を求めてこれと誕生月との関連を検討した。その結果、冬から夏に掛けて生まれた者に比べて秋に生まれた者では発症率が高いことが分かった。この傾向は 1 歳までの発症者、2 歳までの発症者と分けて検討しても同様であった。

発症年齢に関しては、問診票のなかに、「何歳ではじめて症状が認められましたか」という質問があり、これに対する答えの年齢を発症年齢として分析した。その結果、1 歳までに発症した者、2 歳までに発症した者、3 歳までに発症した者のいずれにおいても、気管支喘息患者は、冬から夏に生まれた者にくらべ秋から冬に生まれた者の方が喘息の発症率が高いことがわかった。

#### D. 考察

以上の結果から、気管支喘息とアトピー性皮膚炎の相違によって現れているように、同じアレルギー性疾患でも臓器によって、異なった特性が認められる。これが胎内の因子によるものなのか、胎外の因子によるものなのか今後の検討課題である。家族歴で見ると限りはアレルギー疾患を有する者は有しない者に比べて 5 倍の発生しやすさであることが、環境庁の 3 歳時サーベイランスの結果として報告されていることとも一致するが、このことから、胎内での因子の関与 (または、胎外以外の因子の関与) が推定される。しかし、誕生月と気管支喘息の頻度の

結果をみると、胎外の因子の関与の大きさを考えないわけには行かない。

また、有病率に差を与えている胎外因子と考えられるもののうちで報告でも明らかなものとしては感染がある。今回の我々の検討でも 2 歳までの気道感染は気管支喘息の発症と関連がある。乳幼児期の患者の感染に関しては我々は経験的に集団保育に入ってから 1 年間は月に 1 回以上の感染、発熱があることを知っている。この点からも、保育形態に関する興味を持たれた。環境庁のサーベイランスにおいても環境が良好と推定される地域においても、低年齢の感染が頻度が高いところがあり、気管支喘息の頻度の高いところがあった。そこで保育形態について検討したところその地域においては、集団保育が昔から行われているなどの情報が入った。このような集団保育環境では感染の頻度が高く、また、気管支喘息の頻度が高いことが確認された。したがって、このような事実は胎外因子としての気道障害因子と推定される。

気管支喘息は、経年的に増加の傾向にあり、この傾向は今後も続く可能性が認められた。特に都市部においてはその傾向が強く、この都市部が自動車の交通量が多いことで象徴されている可能性があるため、やはり自動車の排出ガスを中心とした大気汚染物質との関係は今後も検討を続けていかなければならないだろう。大気汚染物質のうち、SO<sub>2</sub>、CO などについては、すでに福岡市でも減少が認められているが、NO<sub>2</sub> 及び SPM 或いは PM<sub>2.5</sub> に関しては、わずかながら増加の傾向が認められている。

今後、これらとの関係につれも分析していきたいと考えている。これに対して、アトピー性皮膚炎は近年頭打ちの傾向があり、福岡市内においてもその傾向が認められる。肺機能に関しては、浮遊粒子症物質による悪影響が報告されているため都市部においては、気道症状が誘発されるが、皮膚症状には影響がうけないという可能性も推定される。この点についての大気汚染物質との関連は、環境因子 (胎外因子) として今後検討を加えたい。またアトピー性皮膚炎は、女子が多く、気管支喘息は男子が多いという特徴の差も認められる。この疾患による男女の差異が何に起因するものであるかについては興味深いところである。これについても今後の検討が必要である。

誕生月については季節性の因子の関与を推定させる。誕生月に関しては、すでにアレルギー性鼻炎についても報告されており、われわれも外来患者に関

しては誕生月が関与することを報告している。これは平成7年からの約3年間の外来患者771名についての検討であるが、気管支喘息、アトピー性皮膚炎と診断された5歳以下の児で、誕生月の他に、総IgE値、RAST score（ヤケヒョウヒダニ、卵白）、IgG、鼻汁好酸球について検討した。その結果、これらのアレルギー疾患は春に生まれた児に少なく秋に生まれた児に多かった。また、総IgE、RAST score、IgG鼻汁好酸球の各値とも誕生月との間には有意な関係は認められなかった。その他の報告をみても、秋、冬に生まれた者にアレルギー疾患が多いとの報告はあるがその理由に関しては明らかではない。我々の検討でもダニや卵白抗原に対するIgE値には季節的影響がみられなかった。従って、アレルギーを介した影響ではない可能性が推定される。アトピー性皮膚炎に関しては乾燥する季節に早期に晒されることが原因としているものもある。また発生したあとの外来受診は3-5月に多いとされている。秋に生まれた児が半年後に気管支喘息やアトピー性皮膚炎として外来を初診することになる。これらの検討は一般の集団では行いにくく実際の報告も少ない。今回は小学校の1年生という広い範囲の集団での調査であり、これでの検討でも同様に秋に生まれた者で気管支喘息の頻度が高いことが認められたことは、やはり何らかの季節性の因子が気管支喘息の発症に関与しており、季節としては秋であると考えられる。誕生から発症までの期間が関連すると思われるが、これについては生後1歳までの発症と2歳までの発症に差がなかったことから、生後一定の期間において感染の関与がみられることが関連するということだけではないと推定される。感染自体は冬にインフルエンザを初めとするウイルス疾患が関与すると推定されるもののそれだけではないようである。発症年齢に関連がないとするならば、胎内での問題が関係するのかもしれない。胎生期における胎盤を介してのアレルギーの関与に関する報告もある。胎児期の一定の時期におけるダニの抗体の移行なども推定される。これらについては今後の検討課題である。

以上、のべた点に関しては疫学的な検討での解明が可能であると推定される。

予後との関連についてみると、発症因子とは異なると思われるが、悪化因子、軽快因子として検討することで、症状の持続のみならず、発症やアレルギー疾患相互の移行、アレルギーマーチとの関連で興味を持たれ、さらに発症に関する示唆も選られると考えられる。今回の検討で、血清のIgEの値が予

後と関連することが認められた。この点に関してはすでに我々も喘鳴群から翌年の調査時にそのままの者、改善する者、悪化して気管支喘息に確定されていくものに分けて検討した。やはりIgEの値との関連が認められた。また、すでに行われた調査でも250U/mLを境にして有症率、新規発症、軽快などにおいて差が認められるとの報告がある。また正常小児の上限をこの値とする報告もある。したがって、この辺の値が閾値として考えられる可能性がある。IgE RAST値に関しての検討でも0と2以上とに分けての検討では基本的には同様の結果を得ている。

小児期ではアレルギーの関与が多いとされているが今後、アトピー型、非アトピー型と分けての検討も必要と推定される。今回の検討ではIgE値で分類しているの、少なくとも高い値の者に関してはアトピー型であると推定されるために、分類せずに行なった結果と分類してから行なった検討結果では同様の結果が得られるものと推定される。小児期でIgEの関与する者が多いとされているが、アレルギーは予後・経過を考える上で重要な因子であることが再確認された。もちろん、我々の検討でも肺機能、特に末梢の閉塞性変化を示す指標に関しては喘鳴群における予後と有意な相関があることを報告してきた。したがってアレルギーのみではないが、アレルギーの程度、気道の障害の程度が症状の変化に関する大きな要因であることに 대해서는さらに今後の検討を要する。

## E、結論

小児の気管支喘息に関する胎内・胎外因子の一つとして季節性の因子、誕生月が認められたがこれがどのように関与するのか、またその詳細に関しては今後更に検討する必要がある。またアレルギー疾患、特に気管支喘息における、アレルギーの関与、気道障害因子の関与について今後、更に検討を加えることが必要であるが、これらについては疫学的な検討が可能であると推定される。

また、今年度の成果として気管支喘息患者は、近年罹患率が依然として増加していること、アトピー性皮膚炎とはいくつか異なる点があること、喘息患者の背景因子の検討として今後の疫学調査上、家族歴、保育形態、性別、誕生月による差異、疾患の既往などは重要な因子である。(特に誕生月に関しては、問診票に記載させないという方向があるが今後それをさせていく必要がある。)