

予後に関連するものとしては、血清のIgE値、および肺機能の意義を検討した。また呼気中のNOについても検討し、アレルギーとは異なる因子として関与している可能性を推定された。

F. 健康危険情報

今回の我々の検討からは健康危険情報に相当するものは得られなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 壬生真人、小田嶋 博、柴田瑠美子、西間三馨：誕生月とアレルギー疾患（気管支喘息・アトピー性皮膚炎）発症についての検討、日本小児アレルギー学会誌、14:459-465、2000。

2) 小田嶋 博：なおも増え続けるアレルギー疾患—学校保健の問題点と対策、体育・課外活動、アレルギーの臨床、20:711-716、2000。

(3) 小田嶋 博：アレルギー疾患の診断、一般呼吸機能検査とアレルギー性呼吸器疾患との関連：小児、アレルギー科、9:(Supple.1):1-254-266、2000。

(4) 小田嶋 博：小児喘息の発症機序・病態と予後—小児喘息は自然に治るか？、medicina,37(2):214-216、2000。

2. 学会発表

(1) 小田嶋 博、中尾文也、本村千華子、西尾 健、東川昌紀、高林 明、柴田瑠美子、西間三馨：誕生月と気管支喘息の発症年齢との関連について、第13回日本アレルギー学会春季臨床大会、横浜、(発表予定)。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

今回の我々の検討からは相当するものは得られなかった。

診断とIgE

	n	IgE	log(IgE)	ダニ	スギ
BA + ?	69	#####	2.7	4.0	0.7
BA(-)	43	#####	2.3	2.9	0.7
BA(only)	12	#####	2.3	2.8	0.3
AD(only)	5	#####	1.9	2.2	0.6
AD	49	#####	2.6	4.0	0.9
AR, AC, P	83	#####	2.6	4.0	0.8
total	113	#####	2.5	3.6	0.7

表1：疾患とIgE

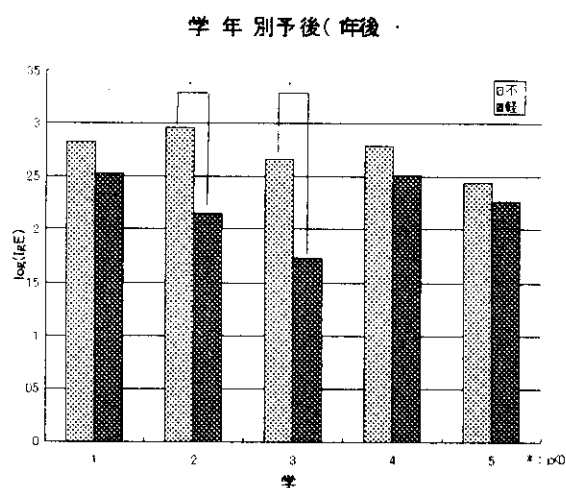


図1：1年後の予後とIgE

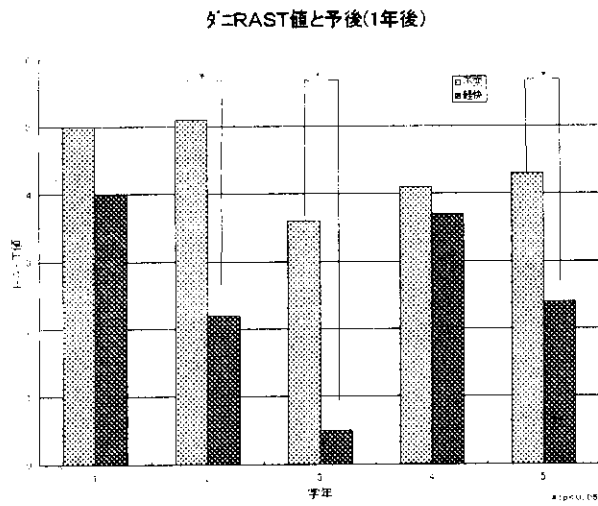


図2： 1年後の予後とダニ RAST 値

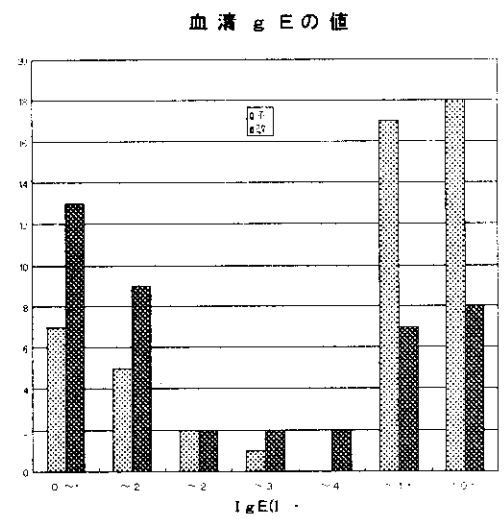
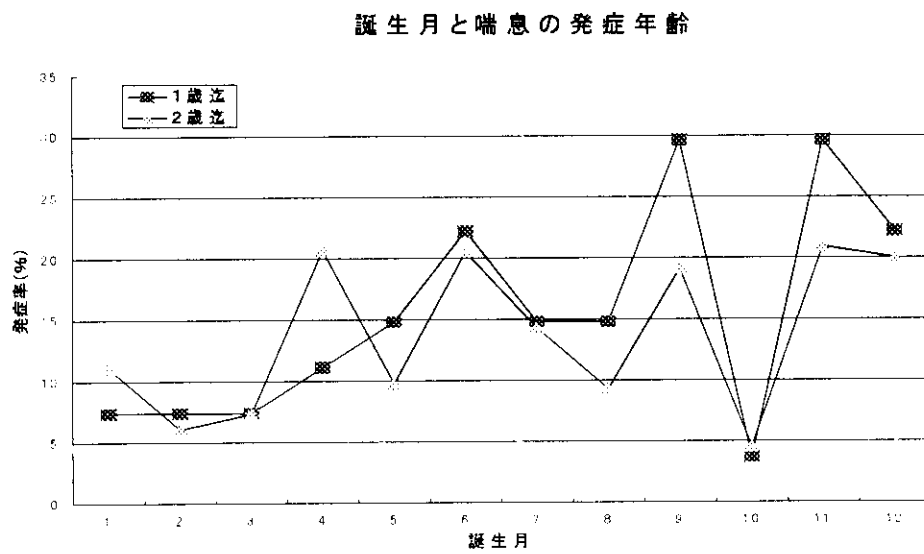


図3： 1年後の予後と血清 IgE



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）
アレルギー疾患に係わる胎内・胎外因子の同定に関する研究
研究課題名 “サイトカインと胎内因子”
-幼若モルモットの気道リモデリングの特徴について-

分担研究者 徳山研一
群馬大学医学部小児科講師

研究要旨：小児喘息における気道リモデリングの進展の特徴を明らかにする目的で異なる週齢の3群のモルモット（幼若（約200g）、成熟（約400g）、老齢（約800g））を感作し、抗原を反復曝露した。抗原の反復曝露は3群の動物の総気道壁、外壁層を濃度依存性に肥厚させた。一方、平滑筋層、内壁層については、幼若、成熟群では内壁層の肥厚が主体であり、老齢群では逆に平滑筋層の肥厚が優位と、肥厚の主体となる成分は年齢により異なっていた。そのメカニズムとして、幼若、成熟群における内壁層の肥厚には気道上皮細胞における細胞新生が関与し、老齢群における平滑筋層の肥厚は細胞肥大が関与している可能性が示唆された。以上の結果から、気道リモデリングの進展は動物の成熟度により変化する可能性が示唆された。

研究協力者：

大木康史 桐生厚生総合病院小児科部長
西村秀子 群馬県立がんセンター小児科
 医長
佐藤 哲 前橋赤十字病院小児科医長

A. 研究目的

近年、成人喘息では軽症例であっても慢性のアレルギー性炎症に伴う気道構造の再構築（リモデリング）が認められ、その成立にはGM-CSF、TGF- β などのサイトカイン、増殖因子が関与することが判明し、成人喘息は永続的な気道リモデリングをともなう慢性的な気道の炎症性疾患と認識されるに至った。一方、小児喘息では疫学的に寛解例が多いこともあり、アレルギー性炎症による気道リモデリングの進展とその修復機転は成人と異なる可能性がある。その原因としてGM-CSF、TGF- β などのサイトカインや増殖因子の役割が小児では異なっており、その結果生じる気道リモデリングの状態が異なっている可能性がある。しかしながら、慢性の炎症の結果生じる気道リモデリングに年齢による差異があるのか、あるとすればどのような点の特徴であるのか、など明らかではない。我々は気道におけるサイトカインの役割の年齢による差異を検討することが小児喘息が成人喘息と大きく違う点、即ち寛解が存在するという点についてそのメカニズムを知るうえで重要と考えている。今年度我々はまず、実験動物を用い、慢性の気道のアレルギー性炎症の結果生じる気道リモデリングが動物の成熟度により異なるのか否か、異なる場合どのような差異があるのか検討した。

B. 研究方法

1. 実験動物と感作、反復曝露方法

Hartley系雄性モルモットを実験開始時体重から、幼若 immature（約200g）、成熟 adult（約400g）、老齢 old（約800g）の3群に分け、卵白アルブミン ovalbumin（OA）皮下注射にて感作後、0.3または3.0% OA溶液を週2回5週間、第6週には5日間反復吸入した。OA感作・曝露の対照動物には、Freund's complete adjuvant（OA感作のためのアジュバント）のみを皮下注射し、OA溶液の希釈液（生理食塩水）を反復吸入したものをを用いた。反復吸入による気道組織の形態学的変化が細胞新生によるか否かを検討するため、吸入曝露日に毎回5'-Bromo-2'-deoxyuridine（BrdU）100 mg/kgをあわせて腹腔内投与した（図1）。

吸入装置としてはシズメ・メデイカル社製の実験動物用反復曝露装置を用いた。即ち、実験動物を、無麻酔下でユニットボックス（大きさ：11 x 17 x 21 cm）内に固定し、頭部のみ外部に出した状態にした。更に、1回に最高12匹を同一条件で同時に吸入させることが可能な吸入ボックス（Unit style hypersensitization box for guinea pigs, シズメ・メデイカル社製）に頭部を固定し、超音波ネブライザー（NE-U12, オムロン社製）にて、OA溶液（0.3または3.0%）あるいは生理食塩水を毎回10分間吸入させた。OAを感作後吸入曝露した動物では、全例とも多呼吸やチアノーゼなど呼吸パターンの変化を認めた。吸入10分以内に重篤な呼吸症状が出現した例では倫理的配慮から、その時点で吸入を中止した。吸入日には2 mlの蒸留水で希釈した50 mg/kgのBrdUを腹腔内にあわせて投与した。

3. 気道の組織の採取と染色

○Aの最終曝露後3日の時点で、動物を麻酔し脱血したのち気管から末梢肺までを取り出した。70%エタノールにて肺を膨張させた後、同溶液中に保存した。気道組織はパラフィン包埋し、6 μ mの厚さでスライスし、Hematoxylin and Eosin (H-E) 染色を施行した。同時にH-E染色を連続切片を用いてBrdUによる免疫化学染色も行った。

4. 気道組織の形態学的評価

1) H-E 染色標本:

Image-analyzing software (NIH Image ver. 1.58, USA) を用いてコンピューター解析し、断面積、壁厚を定量化した。即ち、摘出肺の膜性部気管支を直径サイズから2レベル(0.4mm未満と0.4mm以上)に分類し、気道壁の構成成分を内壁層、平滑筋層、外壁層の3部位に分け、それぞれの壁厚(順に T_i 、 T_m 、 T_o)を計測した(図1)。また、異なる週齢毎の優位な肥厚層の差異の有無を検討する目的で、便宜的に“thickness ratio”も求めた。“thickness ratio”は、

$$T_i / T_m$$

で求めた。即ち、平滑筋層に比べて、内壁層が優位に肥厚する場合、“thickness ratio”は増加し、逆の場合には減少する。

2) BrdU 染色:

BrdUは細胞増殖の活発に行なわれている細胞の核に取り込まれる。このため、気道の構成細胞のうち、特に上皮細胞、平滑筋細胞に注目し、その増殖状態を“proliferation index”として定量化した。“proliferation index”は以下の計算で求めた。即ち、気道上皮細胞、平滑筋細胞それぞれについて:

$$\frac{(\text{BrdU-陽性の核の総数})}{(\text{H-E染色にて染まった核の総数})} \times 100 (\%)$$

4. 吸入量の評価

各週齢の動物における気道への実際の○Aの到達量を把握するため、radio-isotope(RI)を用いて基礎実験として、以下の検討を行なった。実験動物としては、200g、400g、750gと生後週数の異なるモルモットを用いた。方法は ^{99m}Tc (20mCi)を標識したヒト血清アルブミン(HSA)を上記吸入器で15分モルモットに吸入してその気道を摘出し、各気道部位別のRI沈着量を、カウンター(Aloka)にてカウントした。気道は喉頭(Larynx)、気管(Trachea)、主気管支(Main

Bronchi)、肺内気道(Intrapulmonary airways)、および肺(lung)に分けてカウントした。

計算方法; 20mCiは吸入開始時の値なので、その後は経過とともに崩壊してゆく。臓器の放射線量を測定する時点をと t_0 とすると、今回の実験では、20時間17分が経過していた(=20.25時間として以後計算)。このため、20mCiが t_0 の時点でどの程度まで崩壊していたかを計算する。

($20e^{-0.693 \times t / T} = 20e^{-0.693 \times 20.25 / 6.0}$ で計算される)。そして、これを t_0 における基準値とする。そして、その後も各wellの測定までに崩壊は継続するため、その後の基準値としては、ある程度の時間が経っていれば基準値を設定しなおして計算をする必要が有る。1本の測定には1分15秒を要するので、動物毎に8.75分ずつ加算して補正した。

C. 研究結果

1. 各週齢群の気道壁の形態学的変化:

軟骨のない膜性部気道を大小2つの気道部位(気道径が0.4mm~0.7mmの部位と、0.4mm未満の部位)に分けて検討した。全週齢群で総気道壁、外膜層は濃度依存性に肥厚を認めた。一方、平滑筋層、内壁層については、3群で異なる傾向が認められた。即ち、幼若、成熟群では内壁層の肥厚が主体であり、老齢群では逆に平滑筋層の肥厚が優位と、肥厚の主体となる成分は年齢により異なっていた。Thickness ratioは0.4mm~0.7mmの部位において、幼若群では○Aの濃度依存性(対照液吸入群0.95、0.3%溶液吸入群1.0、3%溶液吸入群1.25)に増加したが、老齢群では逆に低下した(対照液吸入群1.1、0.3%溶液吸入群1.0、3%溶液吸入群0.7)。成熟群では両者の中間の値を示した(対照液吸入群1.15、0.3%溶液吸入群1.1、3%溶液吸入群1.0)。0.4mm未満の部位においても同様の傾向が認められた。気道上皮細胞のproliferation indexは3週齢群のうち幼若、成熟群で濃度依存性に増加した。即ち、0.4mm~0.7mmの部位において、対照液吸入群で順に2.5%および3%、0.3%溶液吸入群で順に5%および4%、3%溶液吸入群で順に12%および7%であったが、老齢群では増加を認めなかった(対照液吸入群で2%、0.3%溶液吸入群で3%、3%溶液吸入群で1.5%)。0.4mm未満の部位においても同様の傾向が認められた。一方、平滑筋細胞のproliferation indexは濃度依存性に3群の動物いずれも増加傾向を示したが、各群間に有意差は認めなかった。

2. 吸入方法と吸入量の評価

総霧化量に対する沈着量の割合を喉頭、気管

+主気管支, 肺内気道+肺の3部位に分けて検討した。動物の気道部位別の沈着量の総霧化量に対する割合(%)を図2に示す。喉頭、気管へのRIを標識したHSAの沈着量は週齢の増加に比例して増加し、幼若動物と老齢動物間で有意差を認めた。一方、今回の検討対象となった肺内気道+肺では沈着量に各週齢群毎の差は認められなかった。

D. 考察

小児喘息では疫学的に寛解例が多いこともあり、アレルギー性炎症による気道リモデリングの進展過程は成人と異なる可能性がある。この点を明らかにする目的で我々は異なる週齢のモルモットを感作し、抗原を反復曝露することにより、慢性のアレルギー性炎症モデルを作成した。更にその結果もたらされる気道リモデリングの状態が実験動物の成熟度によりどのような差異が形成されるのかを検討した。

慢性曝露の影響を成熟度の異なる動物間で比較する場合、投与する刺激が異なる動物間でほぼ同一であることが必要である。我々は、これらの点を明らかにする目的で、各週齢の動物が実際にどの位抗原を吸入しているかをRIを用いた実験で確認した。その結果、喉頭、気管へのRIを標識したHSAの沈着量は週齢の増加に比例して増加した。一方、肺内気道+肺では沈着量に週齢毎の差は認められず、ほぼ同様の抗原量を吸入していることが確認された。

軟骨のない膜性部気道を大小2つの気道部位(気道径が0.4mm~0.7mmの部位と、0.4mm未満の部位)に分けて検討した。全週齢群で総気道壁、外壁層は濃度依存性に肥厚を認めた。一方、平滑筋層、内壁層については、3群で異なる傾向が認められた。即ち、幼若、成熟群では内壁層の肥厚が主体であり、老齢群では逆に平滑筋層の肥厚が優位と、肥厚の主体となる成分は年齢により異なっていた。この差をより明らかにする目的で内壁層と平滑筋層の肥厚の比率(thickness ratio)を求めたところ、幼若群で最も内壁層優位で、成熟群、老齢群の順に低下した。

気道上皮細胞のproliferation indexは3週齢群のうち幼若、成熟群で濃度依存性に増加したが、老齢群では増加を認めなかった。一方、平滑筋細胞のproliferation indexは濃度依存性に3群の動物いずれも増加したが、各群間に有意差は認めなかった。以上のことから、幼若、成熟群における内壁層の肥厚には気道上皮細胞における細胞新生が部分的に関与し、一方、平滑筋層の肥厚は平滑筋細胞の肥大が関与している可能性が示唆された。

E. 結論

慢性の気道のアレルギー性炎症の結果生じる気道リモデリングは動物の成熟度により、その主たる反応部位が事なる可能性があり、リモデリングのメカニズムについても成熟度により変化する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表 該当事項なし

2. 学会発表

1) Ohki Y, Tokuyama K, Nishimura H, Arakawa H, Kato M, Mochizuki H, Morikawa A. Maturational changes in airway remodeling after chronic exposure to allergen in guinea pigs. Congress on Lung Health and European Respiratory Society 10th Annual Congress, Florence, Italy, 2000 (Eur Respir J 16 (s31): 284s)

2) 大木康史、徳山研一、西村秀子、嵯峨礼子、加藤政彦、荒川浩一、望月博之、森川昭廣：抗原反復曝露動物の気道リモデリングにおける加齢の影響(細胞増生の検討)。第50回日本アレルギー学会総会(アレルギー49:1002, 2000)

3) 徳山研一：小児喘息と成人喘息の差異を考慮した治療法の展望、第37回日本小児アレルギー学会シンポジウム：吸入ステロイドを超えた喘息治療の展望、2000年11月、前橋。

4) 大木康史、徳山研一、佐藤 哲、西村秀子、嵯峨礼子、加藤政彦、荒川浩一、望月博之、森川昭廣：抗原反復曝露により惹起される気道リモデリングの加齢による差異。第37回気道過敏性研究会。2001年3月、東京。

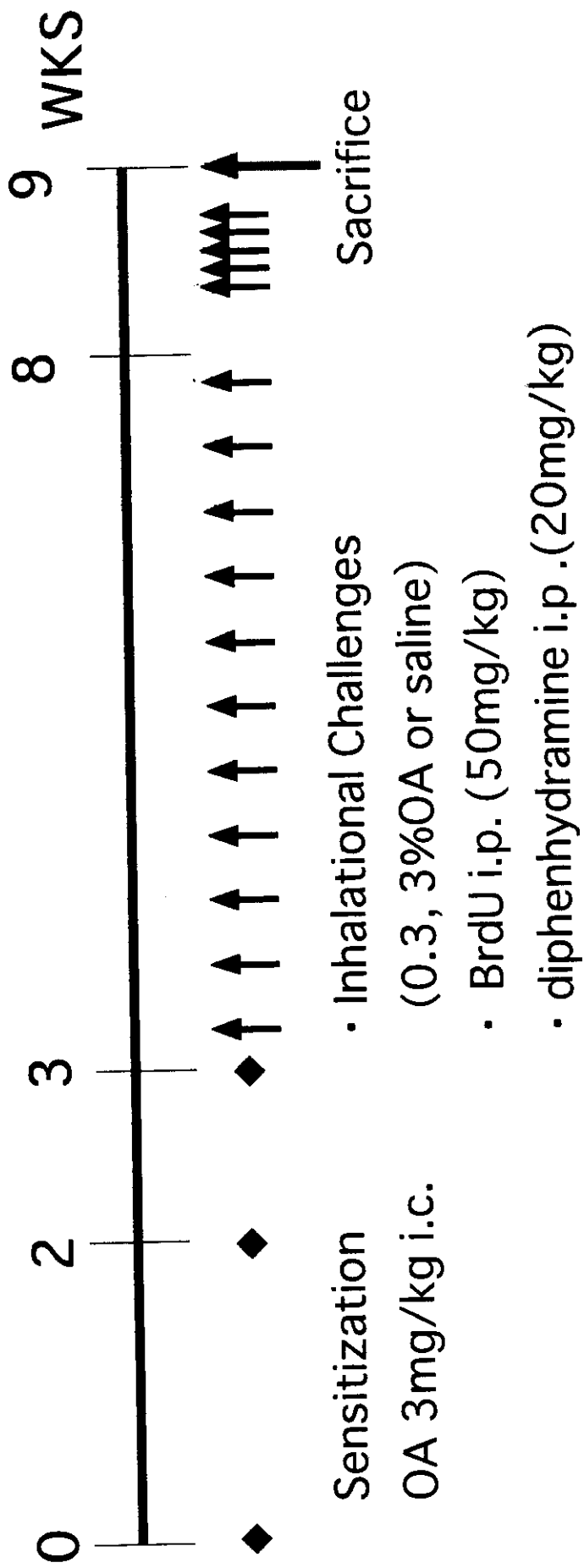


図1 実験プロトコール

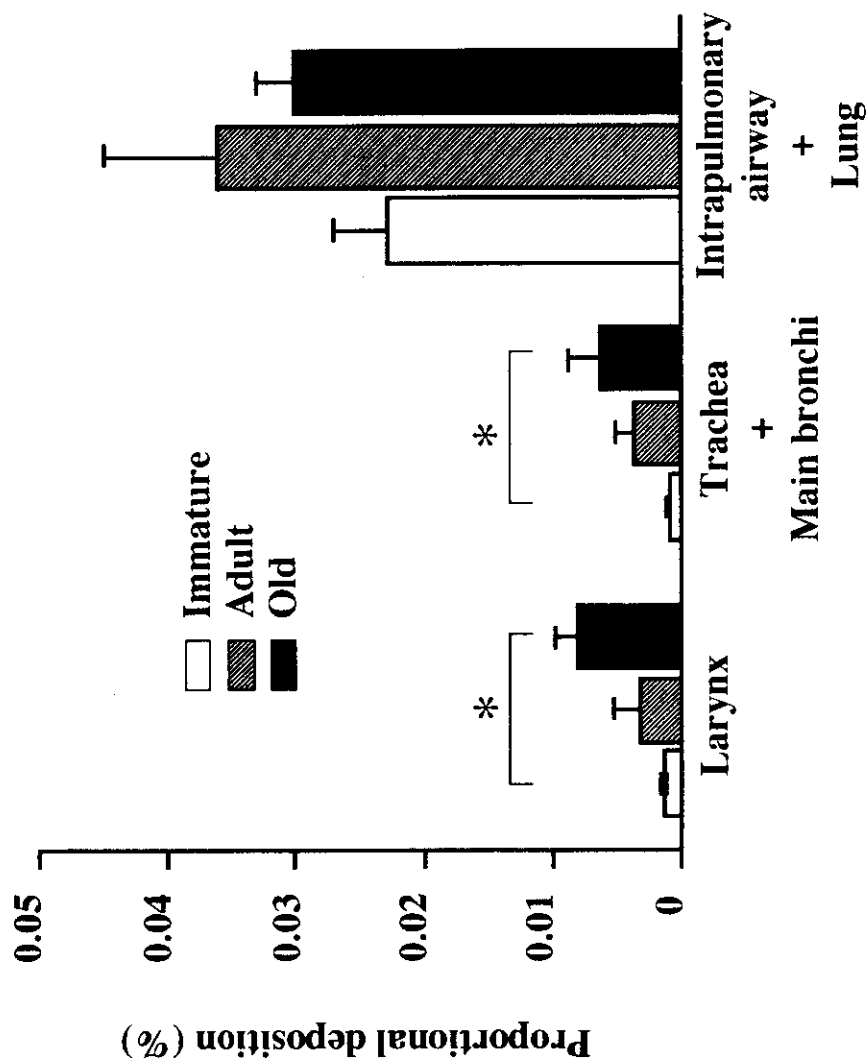


图2 亚喉部沉积的气溶胶化^{99m}Tc-标记的人血清白蛋白在具有不同体重的动物中的沉积。气道被分为喉部、气管和主支气管，以及肺内气道和肺。对每个部分所示的对照动物的比例沉积值。开放条表示0.3%和3%OA，分别。值表示为 \pm SEM。* $p < 0.05$ 组间。

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）
研究課題名：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
分担課題名：アトピー遺伝子の検討

分担研究者 荒川浩一 群馬大学小児科・助手

研究要旨 アレルギー疾患の発症には種々の環境因子と遺伝因子が複雑に関与していると考えられている。最近、アトピー素因を規定するいくつかの遺伝子、特に Th2 サイトカインやそのレセプター遺伝子の多型性が報告されている。今回、Th2 サイトカインである IL-4 および IL-13 の受容体の下流にある細胞内シグナル伝達物質である STAT6 (signal transducers and activators of transcription 6) において、新しい遺伝子多型性をみとめ、アレルギー疾患児において新規多型との関連を検討した。STAT6 遺伝子における新規多型は、エクソン1のGT繰り返し配列部位に認め、GT繰り返し数の違いにより13～16の4種類のアレルが認められた。13/15アレルのヘテロ接合体は、アレルギー疾患群においてコントロール群と比較して有意に多く認められた。しかしながら、患者血清中のIgEレベルとの相関は認められず、さらに、既報のIL-4受容体(Q576R)遺伝子多型との関連は認められなかった。今後は、さらに症例数を増やして検討を行い、また、STAT6 遺伝子の転写調節領域などの他の部位における多型の検討や、STAT6の発現、および機能解析を行っていく予定である。

鈴木道子 群馬大学小児科大学院
田村一志 群馬大学小児科大学院
小林靖子 群馬大学小児科医員
鈴木幸代 群馬県立がんセンター小児科

A. 研究目的

アレルギー疾患の発症には、種々の環境因子（胎外因子）と遺伝因子（胎内因子）が複雑に関与していると考えられている。最近、胎内因子としてアトピー素因を規定するいくつかの遺伝子、特に Th2 サイトカインやそのレセプター遺伝子の多型性が報告されている。Th2 サイトカインであるインターロイキン4 (IL-4)、IL-13の生理活性は、重複するところが多いことが知られている。すなわち、アトピー性皮膚炎や気管支喘息などのI型アレルギーでは、B細胞に作用しIgEへのクラススイッチを誘導し、IgE産生を促す。また、T細胞そのものに対してTh2細胞への分化を誘導するほか、マスト細胞の活性化や、気道粘膜組織へ直接作用することで、気管支喘息の

発症に関与すると考えられている。IL-4、IL-13のシグナル伝達機構は、他のサイトカインファミリーと同様に細胞膜上に発現したレセプターに結合することにより、細胞内にシグナルを伝達する。IL-4レセプター (IL-4R) には2つのタイプが存在する。一つはIL-4R α 鎖とIL-2 γ 鎖よりなるI型IL-4Rで、他方はIL-4R α 鎖とIL-13R α 1鎖よりなるII型IL-4Rである。II型IL-4RはIL-13とも結合できるためIL-13Rでもある。

リガンドの結合によりヘテロ二量体を形成したレセプターは、シグナル伝達物質を活性化する。そのうち、Jak-STAT経路では、チロシンキナーゼであるJak分子が活性化され、それに引き続き転写因子であるSTAT分子が活性化される。レセプターの会合により、互いが近傍に位置することによって、Jak分子およびレセプターは相互にリン酸化を起こす。IL-4、IL-13刺激によりIL-4 α がチロシンリン酸化されると、STAT6がSH2ドメインを介して、IL-4R α

のリン酸化されたチロシン残基に結合した後、それ自体がリン酸化されホモ二量体を形成し核内に移行して、いろいろな遺伝子転写を増強する。この標的遺伝子としては、B細胞におけるMHCクラスII遺伝子やgermline C ϵ 遺伝子などがある。

これまで、IL-4、IL-4R、IL-13、IL-13Rに関して、その遺伝子多型とアトピー性疾患との関連性について、いくつかの報告がみられているが、その下流である細胞内シグナル伝達物質に関しての遺伝子多型性に関しての報告はみられていなかった。

B. 研究方法

対象は、アレルギー疾患患者60名、コントロール54名。アレルギー疾患に関しては、気管支喘息34名、アトピー性皮膚炎36名、アナフィラキシー12名（一部重複あり）。STAT6の遺伝子座は染色体12q13.3-q14.1にあり、23のエクソンから構成されており、エクソン1および2はアミノ酸をコードしていない非翻訳領域である。今回、ヒトSTAT6遺伝子で、各エクソンがエクソン-イントロン境界領域を含めて増幅できるようにプライマーを設定しPCRを行った。増幅したPCR産物を用いて、SSCP法さらには直接塩基法で検討した。

（倫理面への配慮）

研究対象者には本研究の内容、方法および予想される結果を十分に説明し十分な理解（インフォームドコンセント）を得た上で採血が行われた。また倫理面でも、結果による不利益は全く生じないか、または配慮が充分になされることから問題がないと判断された。

C. 研究結果

SSCP法にて、バンドパターンより遺伝子多型性のスクリーニングを行った結果、エクソン1のバンドに一部異なるパターンを認めた。SSCPにて異なるバンドパター

ンを認めたサンプルに関して、オートシーケンサーを用いて、直接塩基法を行い塩基配列の解析を行った。その結果、GTの繰返し配列の部位において、その繰返し数に差が認められた。次に、GT繰返し部位における多型の確認のため、ジーンスキャン法を用いて検討した。その結果、GT繰返し数の違いにより4種類のアレル（A1～A4）が検出された。

各アレルにおいてアレルギー疾患群およびコントロール群で比較した結果、A1アレルはアレルギー疾患群において、一方、A3アレルはコントロール群において有意ではなかったものの多く認められる傾向があった（表1）。次に遺伝子タイプでは、アレルギー疾患群で、有意にA1/A3のヘテロ接合体が多く認められた。一方、A3のホモ接合体に関しては、コントロール群に多い傾向がみられた（図1、表2）。この多型に関しては、既報のIL-4R遺伝子多型とは関連は認められなかった。

アレルギー疾患群において、A1/A3ヘテロ接合体を有する群と他の遺伝子タイプを示す群について血清総IgEについて検討した結果、両群間に差は認められなかった（図2）。

D. 考察

今回我々は、Th2サイトカインであるIL-4およびIL-13の細胞内シグナル伝達物質であるSTAT6のエクソン1におけるGT繰返し配列であるマイクロサテライトにおいて新しい遺伝子多型を認め、アレルギー疾患児においてA1/A3ヘテロ接合の頻度が有意に多かった。A1アレルの頻度がアレルギー疾患群で多い傾向であったことより、A1アレルがアレルギー疾患との関連を示唆している。しかしながら、A1ホモ接合体では、コントロール群と差がないことより、A1アレルそれ自体がアレルギーと関連するものではない可能性もある。一方、A1アレルからの発現調節が、他の

因子（環境因子など）により修飾されている可能性も考えられる。今回の、我々の検討では総 IgE との関連は認められず、何らかの別の機序も想定される。マスト細胞の活性化によるアレルギー疾患との関連、気道粘膜組織へ直接作用することによる気管支喘息との関与も考えられる。

E. 結論

今回私たちは、STAT6 gene において新規多型を見つけた。多型は、エクソン1のGT繰り返し部位に認め、GT繰り返し数の違いにより4種類のアレルが認められた。A1/A3アレルのヘテロ接合体は、アレルギー疾患群と有意な相関関係を示したが、IgEとの相関は認めなかった。今後、さらに症例数を増やして検討を行い、さらに、STAT6 遺伝子の転写調節領域などの他の部位における多型の検討や、STAT6 の発現、および機能解析を行っていく必要があると思われる。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

論文発表

該当論文なし

学会発表

(1) 田村一志、荒川浩一、鈴木幸代、加藤政彦、望月博之、徳山研一、森川昭廣：細胞内シグナル伝達物質 STAT6 遺伝子の exon1 における GT 繰り返し配列の新規多型とアレルギー疾患との関連、日本小児アレルギー学会（第37回）（2000年11月3日～11月4日、群馬）

(2) 鈴木道子、荒川浩一、田村一志、望月博之、加藤政彦、徳山研一、森川昭廣：細胞内シグナル伝達物質 STAT6 遺伝子の新規多型とアレルギー疾患、日本小児アレルギー学会（第37回）

(3) 小林靖子、荒川浩一、田村一志、渡部登志雄、加藤政彦、望月博之、徳山研一、森川昭廣：アトピー候補遺伝子（IL-4 と IL-4R）とネフローゼ症候群との関連、日本小児アレルギー学会（第37回）

(4) 荒川浩一、田村一志、鈴木道子、森川昭廣：サイトカイン細胞内シグナル伝達物質の遺伝子多型。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

H 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

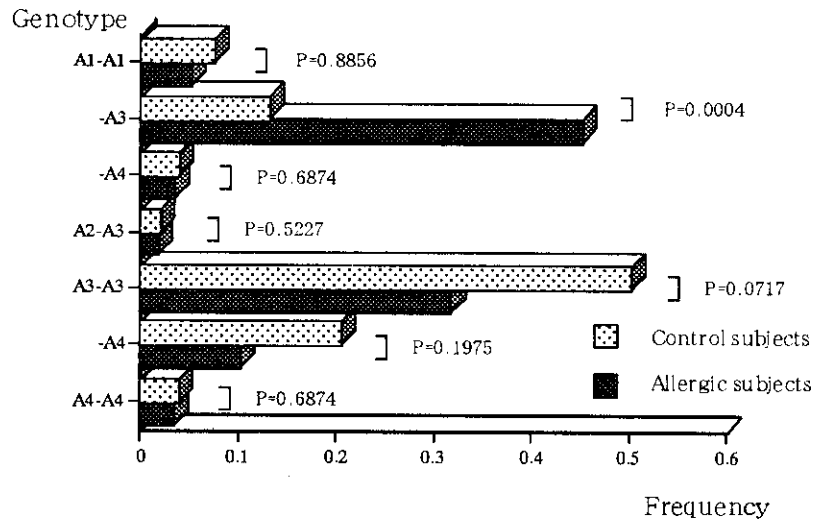


Fig.1 Comparison of frequency distribution of genotypes containing the GT repeat polymorphism at the STAT6 gene locus between 60 subjects with allergic disease and in 54 control subjects.

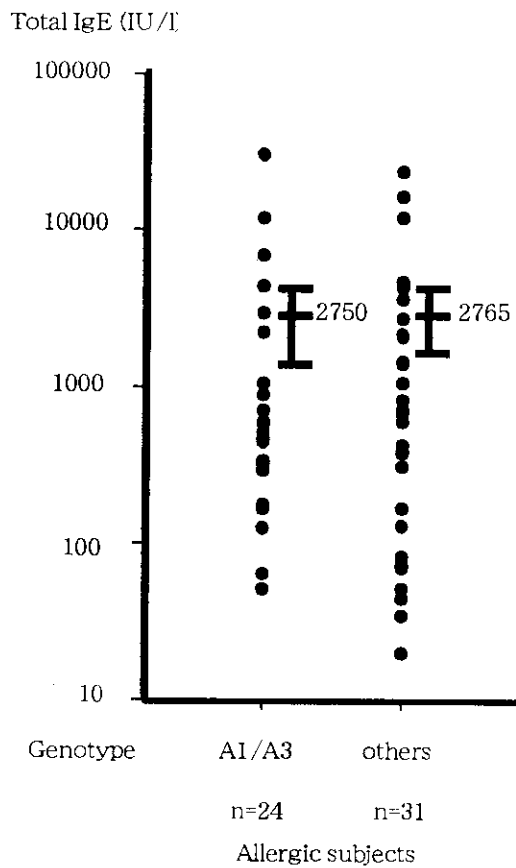


Figure 2. Comparison of total IgE in the group of allergic subjects that carried an A1/A3 heterozygote and the group that did not.

Table 1

Allele	Size (bp)	Control		Atopy		p
A1	326	17	0.1574	35	0.2917	0.0242
A2	328	1	0.0093	1	0.0083	0.5245
A3	330	73	0.6759	72	0.6000	0.2929
A4	332	17	0.1574	12	0.1000	0.2713
total		108		120		

Table 2

Genotype	Control		Atopy		p
A1-A1	4	0.0740	3	0.0500	0.8856
-A3	7	0.1296	27	0.4500	0.0004
-A4	2	0.0370	2	0.0333	0.6874
A2-A3	1	0.0185	1	0.0167	0.5227
A3-A3	27	0.5000	19	0.3167	0.0717
-A4	11	0.2037	6	0.1000	0.1975
A4-A4	2	0.0370	2	0.0333	0.6874
total	54		60		

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）

アレルギー疾患に係わる胎内・胎外因子の同定に関する研究

小児気管支喘息の気道炎症、気道上皮傷害、気道過敏性成立機序に関する検討

分担研究者 吉原 重美 獨協医科大学小児科講師

研究要旨

小児アレルギーの代表的疾患のひとつである気管支喘息において、その気道過敏性亢進に影響を及ぼす胎内・胎外因子に関しては不明な点が多い。そこで今回、気道過敏性亢進に関連性の高いと考えられる気道上皮傷害と気道炎症について検討した。気管支喘息患児の痰中に気管支上皮細胞の集塊(Creola Body ; CrB)が検出された。また、乳児喘息に CrB 陽性例が多く、低年齢喘息児に気道上皮剥離が起りやすいことが示唆された。さらに、CrB の出現と痰中 IL-8、好中球エラスターゼとの関連性があり、乳児喘息の気道炎症・上皮傷害を起こす機序に好中球が関与することが示唆された。また、CrB 陽性患児は、喘鳴が遷延化することがわかった。

はじめに

近年、気管支喘息の病態は好酸球を中心とする炎症細胞による気道炎症に起因していることが明らかになってきた。また、特異的抗原刺激によるアレルギー性炎症のほかに、ウイルス感染、タバコの煙、冷氣などの非特異的刺激の炎症によっても気道過敏性が亢進する。1995年の NHLBI / WHO の「喘息管理・予防のグローバルストラテジー」1)に、気管支喘息の気道閉塞や気道過敏性亢進は、好酸球、T細胞(Th2)、肥満細胞など多くの炎症細胞浸潤が関与し、それに基づく慢性気道炎症が原因であると定義されている。この慢性気道炎症により、気道粘膜上皮が傷害され、気道知覚神経過敏や気道壁リモデリングを生じ気道過敏性が亢進する 2-5)。すなわち、気道過敏性亢進の機序として、慢性気道炎症と気道上皮

傷害が重要と考えられる。

現在、確実な気道炎症・上皮傷害の評価法として、成人においては、気管支粘膜生検標本、気管支肺胞洗浄液、喀痰を用いる検査がある。小児においては、侵襲的検査は困難であり、痰中検査がより客観的な気道炎症・上皮傷害の程度を知る上で重要と考える 6,7)。

そこで、今回、小児気管支喘息の痰を用いて気道炎症の指標となるサイトカイン(LL-5,IL-8,TNF- α)、好酸球、好中球、ECP、好中球エラスターゼ、ブラジキニン、気道上皮傷害の指標となる気管支上皮細胞の集塊 ; Creola Body(CrB)について検討した。

対象および方法

対象

(1) 気道上皮傷害と気道炎症

気管支喘息患児 87 例の痰を採取し、痰

中成分を確認できた 65 例(生後 6 月～10 歳、平均年齢 3.4 ± 0.4 歳)を対象に検討した。

(2) 気道上皮傷害と乳児喘鳴の遷延化

乳児喘鳴 23 例(CrB(+))群;15 例,CrB(-)群;8 例)を対象に検討した。

方法

痰中細胞成分において、好酸球、好中球はハンセル染色で、CrB はパバニコロー染色を用いて検討した(8,9)。サイトカインの測定は、LL-5 (pg/ml)、IL-8 (pg/ml)は CL-EIA 法で、TNF- α (pg/ml)は EIA 法を用いた。また、ECP (μ g/l)、ブラジキニン (pg/ml)は RIA 法、好中球エラスターゼ(μ g/l)はラテックス凝集法で測定した。

なお、対象者あるいはその保護者に、本研究の目的等を説明し、理解・同意を得てから痰を採取し研究サンプルとして使用した。

統計

統計は、Mann-Whitney's U test を用いて、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結果

(1) 気道上皮傷害と気道炎症

1) 痰中 CrB は、60%に認め、特に 2 歳未満では、76%(19/25 例)に認めた。

2) CrB(+))群の平均年齢は、 1.8 ± 0.1 歳であり、CrB(-)群の 5.8 ± 0.7 歳と比較して有意に低年齢であった。それ以外のアレルギーと関連する諸因子では、血清総 IgE 値、特異 IgE 抗体 (ダニ)、アレルギー家族歴において有意差を認めなかった。

3) CrB(+))群の痰中好酸球出現率は、2 歳未

満は 42%、2 歳以上は 65%に認めた。

4) CrB(+))群において、痰中 IL-8 は 7468.2 ± 1953.6 および好中球エラスターゼは 2072.4 ± 419.0 であり、CrB(-)群 347.9 ± 72.6 、 438.5 ± 125.7 と比較して有意な高値を示した($p < 0.05$)。

5) CrB(+))群において、痰中 LL-5 は 17.0 ± 9.1 および ECP は 257.1 ± 103.1 であり、CrB(-)群 35.2 ± 11.3 、 812.1 ± 581.7 と比較して両群間で有意差を認めなかった。

6) CrB(+))群において、痰中 TNF- α は 738.2 ± 215.1 およびブラジキニンは 1292.0 ± 1196.6 であり、CrB(-)群 228.2 ± 96.6 、 321.0 ± 98.4 と比較して両群間で有意差を認めないものの、CrB(+))群で高値傾向を示した。

(2) 気道上皮傷害と乳児喘鳴の遷延化(図 1)

退院後、1 月間の喘息発作点数は、CrB(+))群で 33.7 ± 5.4 点であり CrB(-)群 4.3 ± 0.9 と比較して有意な高値を示した($p < 0.05$)。

考察

成人において、CrB は気管支喘息に特異的に出現し、好酸球性気道炎症の指標となる痰中の好酸球や ECP および気道過敏性と相関することが報告されている(10,11)。今回の成績から、小児気管支喘息においても、CrB は出現し、特に、乳児喘息に多く検出された。この結果から低年齢喘息児に気道上皮剥離が起こりやすいことが示唆された。また、CrB(+))群において、痰中 IL-8 と好中球エラスターゼが CrB(-)群と比較して有意な高値を示すことや痰中 LL-5 と ECP が両群間に有意な差異がないことから、

低年齢の気道上皮傷害に、好酸球のみでなく好中球による気道炎症の関与が重要であると考えられた。また、CrB(+)群で、退院後1ヵ月間の喘息発作点数が有意に高値であることから、CrBは、喘鳴の遷延化の予測因子となることが推察された。

今後、小児気管支喘息の発症、増悪および進展（気道壁リモデリング）における気道過敏性亢進の病態解明およびそれらに影響を及ぼす胎内・胎外因子、すなわち、アレルギー、ウイルス感染、ストレスなどの諸因子との関連性についても継続して研究する予定である。

結論 (図2)

上記の成績から、乳児喘息の気道炎症、気道上皮傷害に好中球が重要な役割を担っていることが示唆された。また、痰中CrBの検出は小児気管支喘息の気道過敏性亢進の間接的指標となる重要なひとつの因子と考えられた。

文献

- 1) Global initiative for asthma. Global strategy for asthma management and prevention, NHLBI / WHO workshop report. NIH, NHLBI, 1995
- 2) Barnes PJ: Respiratory pharmacology. In: Murray JF& Nadel JA (eds), Textbook of Respiratory Medicine, 2ed, Saunders, pp251-322, 1994
- 3) Yoshihara S, Nadel JA, Figini M, Emanuelli C, Pradelles P, Geppetti P: Endogenous nitric oxide inhibits bronchoconstriction induced by cold-air inhalation in guinea pigs-Role of

kinins-. Am. J. Resp. Crit. Care Med. 17, 547-552, 1998.

4) 吉原重美: 神経ペプチド. 日本小児呼吸器疾患学会誌, 8, 8-19, 1997.

5) 吉原重美, 有阪 治: 気管支喘息の病因と診断. 呼吸と循環 48, 837-841, 2000.

6) 山田裕美, 吉原重美, 有阪 治: 気管支喘息と痰中 Creola Body. 小児科 41, 11-15, 2000.

7) 吉原重美, 有阪 治: 小児の気道過敏はどのように調べるか. Clinical Case-Oriented: 症例に学ぶ気管支喘息治療, メジカルビュー社, 234-237, 2000.

8) 西牟田敏之, 平野清美: アレルギー検査法 2; 喀痰検査. アレルギーの領域 2, 1477-1481, 1995.

9) Nagayama Y, Odazima Y, Nakayama S, Toba T, Funabashi S: Eosinophils and basophilic cells in sputum and nasal smears taken from infants and young children during acute asthma. Pediatr Allergy Immunol, 6, 204-208, 1995

10) Naylor B: The shedding of the mucosa of the bronchial tree in asthma. Thorax, 17, 69-72, 1962.

11) Tateishi K, Motojima S, Kushima A, Fukuda T, Makino S: Comparison between allergen-induced and exercise-induced asthma with respect to the late asthmatic response, airway responsiveness, and creola bodies in sputum. Ann Allergy Asthma Immunol, 77, 229-237, 1996.

図 1.

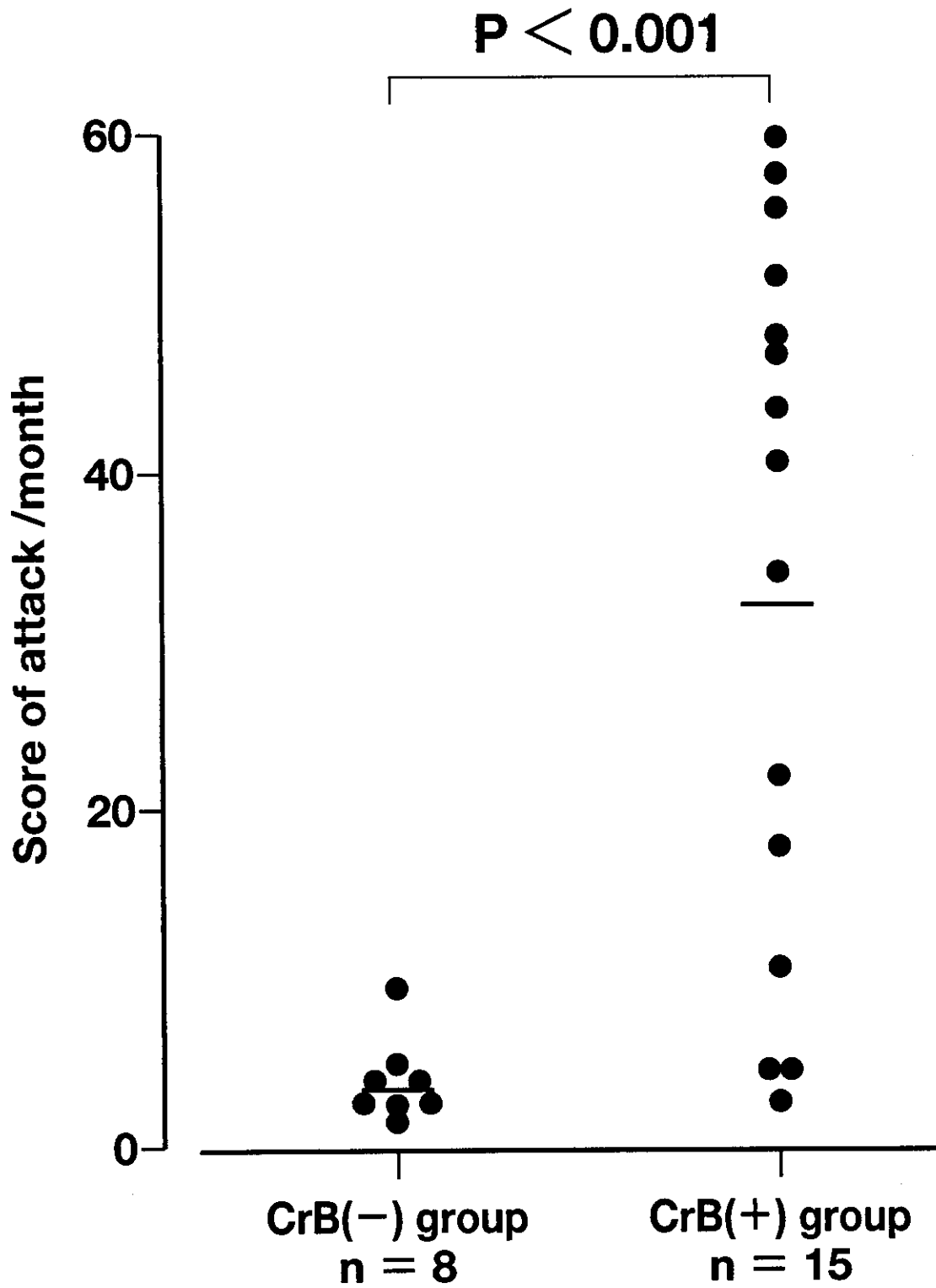


図 1. 乳児喘鳴の痰中 Creola Body (CrB)と 1 ヶ月間の喘息発作点数
(文献 5)より引用)

図 2.

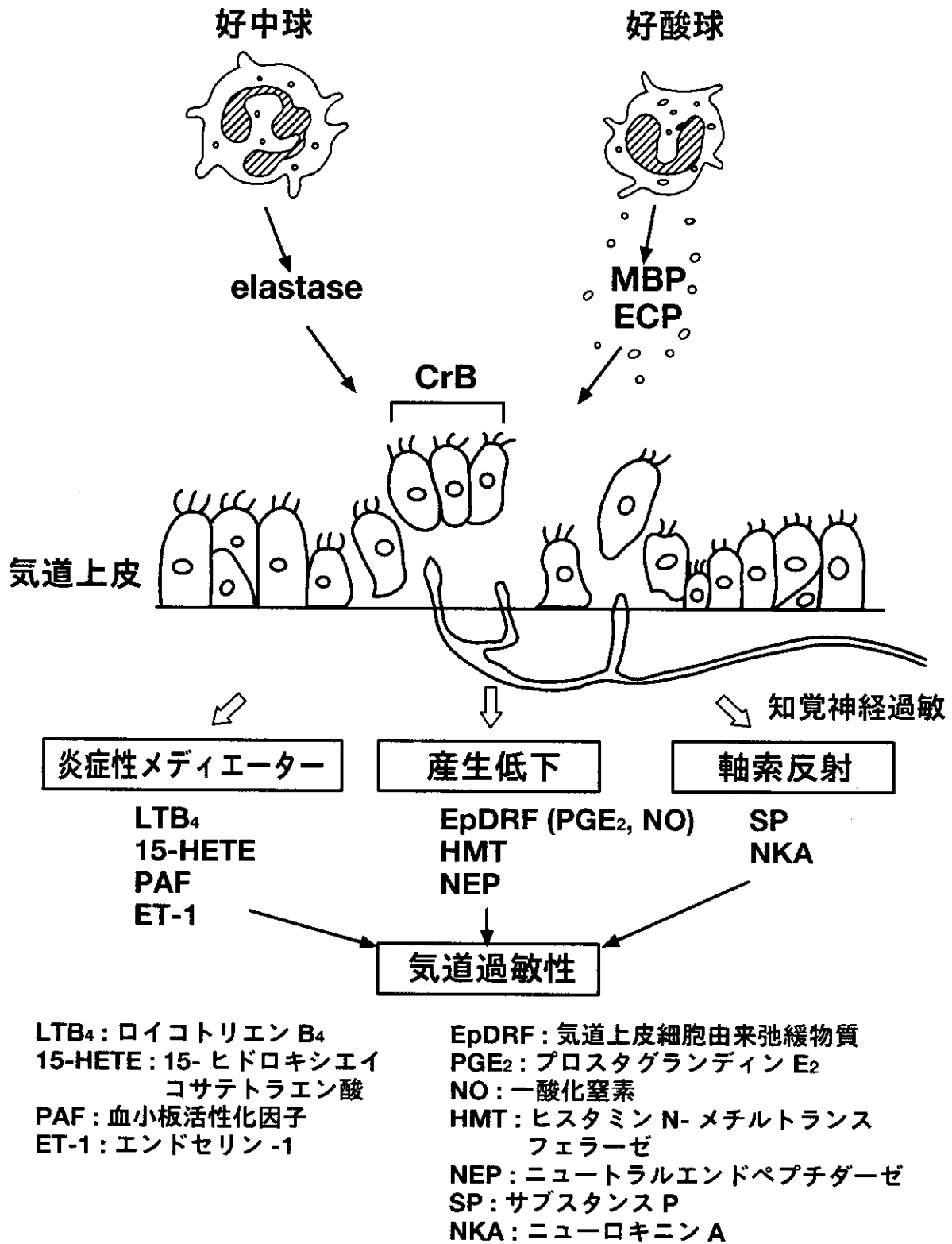


図 2. 乳児および小児喘息の痰中 Creola Body (CrB), 好中球と気道過敏性

(文献 5)より引用)

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）

アレルギー疾患に係わる胎内・胎外因子の同定に関する研究

アレルギー疾患の予知と予防（感作発症に及ぼす胎内環境因子と体外環境因子）

分担研究者 佐々木 聖（ささきアレルギー科 院長）

研究要旨

- ・アレルギー性鼻炎・気管支喘息・アトピー性皮膚炎患者血漿中 TARC は健常者に比較し、有意に高値を示した。(p<0.001)
- ・総 IgE と TARC の相関性は母体血、臍帯血では認められなかった。また、いずれの疾患群においても認められなかった。
- ・TARC は血清では有意な高値を示すことから、測定材料は血漿が望ましいと考えられた。
- ・以上より血漿中 TARC はアレルギー疾患の新たなマーカーと考えられ、またその測定はアレルギー疾患の病態解明に有用であると考えられた。

アレルギー疾患の発症はアトピー素因といわれる遺伝子と種々の環境因子の複雑な相互作用によって発症する。

アトピー素因は IgE 抗体の関与した I 型アレルギー反応に基づく疾患を発症しやすい遺伝的素因と考えられるが、臨床的には日常存在する環境物質を抗原として認識し、総 IgE 抗体または特異 IgE 抗体を過剰に産生しやすい素因と考える。

現在 I 型アレルギー反応により引き起こされる疾患の病因遺伝子は決定されていない。アトピー疾患の発症に関与する IgE の遺伝子について、1989 年英国の oxford 大学の J. Hopkin と W. Cookson が第 11 番染色体長腕に位置し、母親系列を通して遺伝し発症すると発表した Atopic gene は大きな反響を呼び、それ以後のアトピー疾患に関与する遺伝子研究の引き金になった。

J. Hopkin らの atopic gene はアトピー疾患の家系の 60% にみられ、残り 40% は他の遺伝子の働きによるものとしており、世界的に追試の成績がみられるが賛否が分かれる。Marsh（米）らの第 5 番染色体長腕のサイトカインクラスターとの関連した遺伝子など、現在アトピー疾患に関与する

遺伝子について多くの報告がみられるが、主要効果遺伝子と確定されたものはない。これらによるアトピーの遺伝様式は単一の遺伝子異常や多型によるものではなく、複数の遺伝子が関与しており、アレルギー疾患発症を規定する共通の遺伝子と臓器特異的遺伝子によるものと考えられる。

したがってアレルギーの発症を予知するには遺伝子検索では困難であり、筆者らは新生児血総 IgE 値と父母のアレルギー歴にて予知しえる成績を発表している。即ち新生児より 7 年間の追跡調査で母親のアレルギー歴陽性で新生児血 IgE 値が 0.5u/ml 以上の場合は High Allergic Risk Newborn であり、さらにこれが 3 u/ml 以上の場合 6 歳までに全例アレルギー疾患を発症しているため、この値をアレルギー疾患発症の予測値 (prediction value) とした。

アレルギー疾患は経年的に増加がみられる。これを裏付けるように環境抗原、特に吸入抗原のチリダニ、スギ花粉、カモガヤ花粉や真菌抗原に対する感作陽性者が増加し、加えて感作年齢の若年化が著しく、そしてアレルギー疾患の初発年齢も若年化している。これらはライフスタイルの変化と

しての食生活、住居環境の変化による特異的環境因子の影響が大きく、さらに非特異的環境因子(NO₂、CO₂、SPM など)の影響も大きい。さらに感染症の歴史を考えた場合、ワクチンの発達、普及と、抗生物質の発達、普及が大きく影響していると考えられる。特に小児アレルギー疾患の増加の原因は、最近の環境因子の変化によりこれまで発症しなかったアトピー素因をもつ児においても発症するようになったのではないかと考えられる。小児アレルギー疾患では母親の胎内環境因子が重要であり、特に小児アレルギー疾患の予防を考える場合無視しえぬ要因である。胎児は羊水中で発育しこれを1日500ml以上も嚥下しており、羊水の胎児皮膚、消化管に与える影響は大きい。しかし、羊水が胎児に及ぼす影響を免疫アレルギー学的に検討した研究は内外共に稀有である。羊水中のサイトカインの測定ではアレルギー歴をもつ母の羊水中に IL-13 と IL-4 を検出される例が多く、一方アレルギー歴のない母体血と臍帯血の IFN- γ 値に高い相関を認めた。母体血・臍帯血、羊水中 IL-13 と IL-10 が共に検出される例に2才までのアレルギー発症が認められ、アレルギー発症予知因子となる成績をえた。

このように出生時に母体血、臍帯血、羊水を採取し、IgE値、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、IFN- γ 、IL-12等を測定した。これらの症例について出生2年後よりATS-DLTの調査用紙を用いアレルギー疾患の発症を調査し、これらの検査値がアレルギー疾患発症の予知指標となり得るか、検定している。さらに今回 CC ケモカインの一つである thymus and activation-regulated chemokine (TARC) は胸腺髄質の樹状細胞で産生され、TARCのレセプターである CCR4 を発現している

T細胞は Th2 細胞といわれていることより、TARCがアレルギー疾患発症を予知する指標の一つとなりえるかと考え、母体血と臍帯血について測定した。

【対象】

アトピー歴陽性母児 20組

【方法】

Quantikine human TARC Lmmunoassay (R&D Systems) 最低検出濃度：15.6pg/ml

【まとめ】

アレルギー性鼻炎・気管支喘息・アトピー性皮膚炎患者血漿中 TARC は健常者に比較し、有意に高値を示した。(p<0.001) (図1)しかし総IgEとTARCの相関性は、いずれの疾患群においても認められなかった。

TARCは血清では有意な高値を示すことから、測定材料は血漿が望ましいと考えられた。

以上より血漿中 TARC はアレルギー疾患の新たなマーカーと考えられ、またその測定はアレルギー疾患の病態解明に有用であると考えられたので出産前の母体血と出生時臍帯血について20組の Pair 血漿を用い TARC を測定した。

母体血では平均86.63pg/mlであったが、臍帯血では平均370.4pg/mlであり、臍帯血は母体血の4.2倍の高値を示した。母体血 TARC 値が臍帯血 TARC値より高値を示したのは2例のみである。対象の新生児はすべて経膣正常分娩である。母体血 TARC 値と臍帯血 TARC 値には相関は認められなかった。(図2) (図3)

これらの症例については ATS-DLT を用いたアンケート調査でアレルギー疾患の発症の有無との関係について検討中である。

アレルギー疾患における血漿中TARC

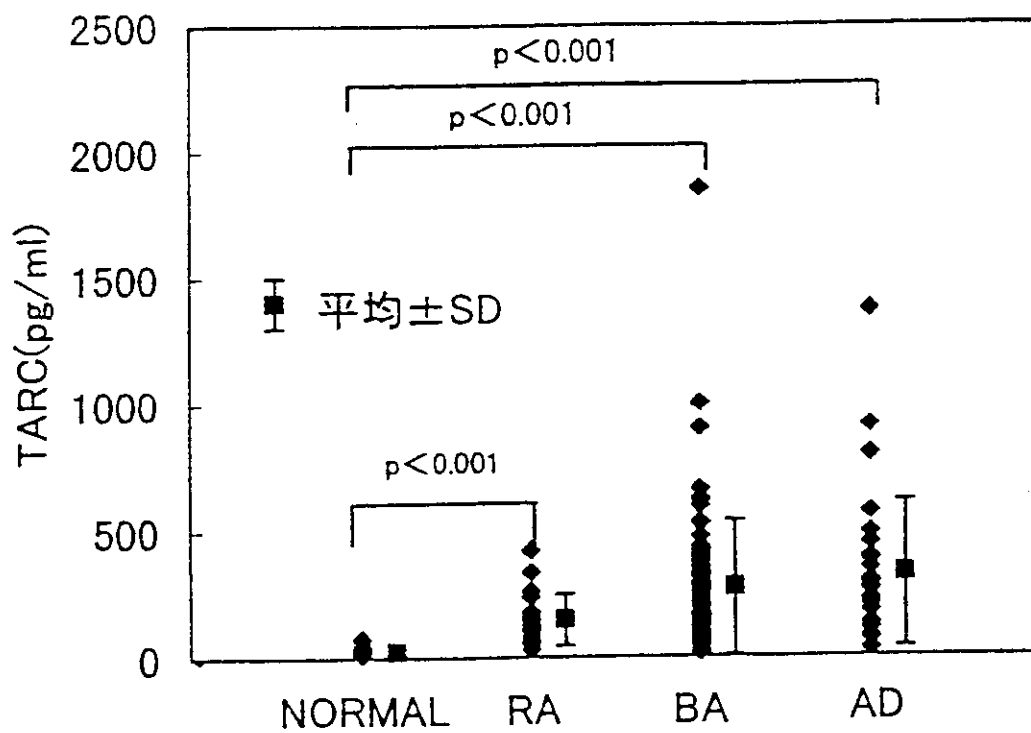


図 1