

69 歳 104 件（男性 58 件、女性 46 件）で全体の 13%、60 ～ 64 歳 89 件（男性 58 件、女性 31 件）で全体の 11% と比較的高齢者が多かった。

死亡直前の動作は、就寝中 481 件（男性 271 件、女性 210 件）で全体の 24%、休憩・休息中 175 件（男性 114 件、女性 61 件）で全体の 9% の順に多かった。

死因が喘息死であるものについてさらに検討したところ、死亡年は 1995 年の 91 件（男性 50 件、女性 41 件）が最多であったが、死亡年ごとに明らかな差は認められなかった。月別では 10 月が 83 件（男性 53 件、女性 30 件）、12 月が 81 件（男性 54 件、女性 27 件）とそれぞれ全体の 10% で、次いで 1 月が 9% の 76 件（男性 42 件、女性 34 件）の順に多かった。年齢別では全体の 35% が 75 歳以上であり、696 件（男性 357 件、女性 339 件）、次いで 70 ～ 74 歳の 258 件（男性 151 件、女性 107 件）、65 ～ 69 歳の 242 件（男性 135 件、女性 107 件）の順であった。死亡直前の動作は、就寝中が全体の 24% で 191 件（男性 121 件、女性 70 件）、休憩・休息中が 11% の 92 件（男性 56 件、女性 36 件）であった。

## 2. 剖検肺 HE 染色標本を用いた気管支壁の質的变化

気管支喘息死例については粘液の有無、気道攣縮の有無、基底膜肥厚の有無（特に有りの場合は、高度あるいは中等度の 2 段階に分類した）、杯細胞増加の有無（これも基底膜と同様に、有りの場合は、高度あるいは中等度の 2 段階に分類した）とさらに分類し評価を行った。

### 1) (気管支全体面積に対する) 気管支内腔面積比

気管支喘息では気管支内腔は狭窄する事から、非気管支喘息例の内腔面積の方が大きいと推察された。実際、統計学的にも有意差が認められた。また、気管支喘息死例において粘液有り、気管支攣縮有り、杯細胞増加無し、基底膜肥厚高度の各々の場合についても非喘息例に比して気管支内腔面積比は統計学的有意差が認められた。

### 2) (気管支全体面積に対する) 気管支壁面積比

気管支壁面積は軟骨の認められる太い気管支レベルで計測した。壁面積は喘息例で気管支壁の肥厚が指摘されているが、計測値からも非喘息例では喘息例に比して壁面積は低値を示し、統計学的有意差が得られた。さらに、気管支喘息例で粘液有り、杯細胞の増加無し、基底膜肥厚高度、気管支攣縮有りの場合についても同様の結果が得られた。

### 3) (気管支全体面積に対する) 腺細胞面積比

気管支喘息では気管支腺の肥大も指摘されているが、今回の計測結果では非喘息例との統計学的有意差は得られなかった。

### 4) (気管支全体面積に対する) 平滑筋面積比

気管支平滑筋の肥大については非喘息例に対し統計学的有意差が得られ、気管支喘息例での平滑筋面積比が高値を示した。また、気管支攣縮有り、基底膜肥厚（有り、中等度、無しのいずれの場合も）、杯細胞増加（無し、有りのいずれの場合も）についても非気管支喘息例に対し統計学的有意差が得られた。

### 5) (気管支全体面積に対する) 基底膜面積比

基底膜肥厚は気管支喘息での特徴的な所見とされている。非喘息例との比較では基底膜面積比の高値は著明であった。気管支喘息例での粘液有り、基底膜肥厚（中等度、高度）、杯細胞増加有り、気管支攣縮有りのものについても非喘息例との間に統計学的有意差が認められた。

### 6) (気管支全体面積に対する) 気管支攣縮率

気管支攣縮率は気管支内腔面積を計測する際に、解析ソフトにより同時に計測されたものである。これについては気管支喘息例と非喘息例において明らかな有意差を認めることはできなかった。

## 3. 免疫染色による基底膜領域の検討

当教室で 1999 年（平成 11）から 2000 年（平成 12）に剖検された非気管支喘息死例と、東京都監察医務院にて剖検された気管支喘息死例各 20 例について免疫染色を行った。

10%ホルマリン固定パラフィン切片を脱パラシ、3%過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼ活性の除去を 3 分間行った。次に 0.5%トリプシン処理を 20 分間行い、抗原性の賦活化を行った。ブロッキングには normal goat serum を用い、一次抗体には抗ヒトラミニンポリクローナル抗体を 400 倍希釈して使用した。以下、

ABC 法で染色し、ヘマトキシリンで counter stain を行った。

非気管支喘息死例の HE 染色標本とラミニン染色標本を比較したところ、HE では多列線毛上皮細胞、線毛細胞、杯細胞が確認され、ラミニンでは上皮下に線状を呈する反応と基底膜様結合組織が一部観察された。

今回われわれが観察した気管支喘息例ではしばしば上皮細胞の消失が見られ、気管内には炎症性細胞を主体とした細胞成分を含む滲出物がつまっており、上皮は完全に消失していた。また、粘膜固有層には小型円形細胞の浸潤がみられた。HE 染色では上皮は一部残存あるいは消失しており、エオジン好染の基底膜の肥厚が認められた。しかし、免疫染色では同部位にラミニンの免疫反応はほとんど認められなかった。

また、気管支喘息では組織学的特徴として一般的に基底膜が肥厚するといわれているが、これは HE 染色ではエオジン好染する部分に当たる。同一例に免疫染色を施したところ、この部分には基底膜における lamina densa の構成成分であるラミニンの反応は陰性であり、存在していないことが判明した。少なくともこのことから基底膜の構成成分が従来からいわれていた lamina lucida、lamina densa、sublamina densa の 3 層で構成されるものでは無いことが推測された。

さらに、大部分の例で上皮細胞が完全に消失している症例での気管支の基底膜様結合組織ではラミニンは陰性であった。これに対し、上皮が一部残存している症例ではラミニン反応が陽性となった。

#### D. 考察

1. 気管支喘息患者の死因は気管支喘息死によるものが男性は 40%、女性では 38% である。また、自殺は男性が 10%、女性は 7% であり、平成 10 年度報告書と比較したところ、気管支喘息死は減少傾向にあるが、自殺の増加が認められた。死亡直前の動作は全体の約 35% が就寝中および休憩・休息中の安静時であり、運動中であるものは比較的少数であった。

2. 気管支喘息における気道リモデリングの指標とされる気管支平滑筋の肥大、気道壁肥厚、気道腔の狭窄、基底膜の肥厚については今回の検討で証明された。一方で、気管支腺の肥大お

よび気管支攣縮率の点では喘息死と非喘息死での有意差が認められなかった。

3. 気管支喘息死例のラミニン免疫染色標本からは、上皮下に一見基底膜と思われる結合組織が形成されていた。しかしこの部分は免疫染色のラミニン反応がほとんど陰性であり、この結合組織が基底膜構成成分から構成されるものでは無いと思われた。つまり、基底膜は気管支喘息では上皮に対する傷害により破壊され、消失してしまったと考えられ、この基底膜様結合組織の構成成分はフィブロネクチンやコラーゲンなどの細胞外マトリックス構造であると推察される。従って、気管支喘息で基底膜が肥厚するというのは基底膜以外の結合組織の蓄積により気道壁が肥厚する事によるものと考えられた。

#### E. 結論

1. 1989 年から 11 年間の喘息患者の死亡数は 1994 件（男性 1214 件、女性 780 件）で、死因は気管支喘息死が 807 件（男性 502 件、女性 305 件）であった。また、自殺は 175 件（男性 121 件、女性 54 件）であった。気管支喘息死での死亡直前の動作は、そのうちの約 35% が就寝中および休憩・休息中の安静時での発症であった。

2. 気管支喘息死と非気管支喘息死例の剖検肺での比較から、気管支喘息患者の組織学的所見とされる気管支内腔の縮小化、気管支壁の肥厚、平滑筋肥大、基底膜肥厚は明らかであった。

3. 気管支喘息では基底膜は上皮傷害により破壊され消失するが、基底膜成分以外の無構造物の形成が認められていた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

早乙女敦子、渡邊周永、畔柳三省、今野渉、藤多和信、長井敏明、飯倉洋治、徳留省悟：気管支喘息患者の死亡の実態。International Review of Asthma 2(3)：50-55,2000.

##### 研究協力者

##### 獨協医科大学法医学

早乙女敦子、渡邊周永、今野渉、長井敏明  
東京都監察医務院  
熊谷哲雄、山口吉嗣

## 研究要旨

気管支喘息の基本的病態は、単なる気道の可逆性攣縮ではなく、好酸球、活性化Tリンパ球、肥満細胞などの様々な炎症性細胞が関与する慢性の気道炎症であり、炎症によって気道反応性が亢進し、さらに不可逆的な器質的変化（リモデリング）が生じると考えられている。既に我々は卵白アルブミン24週間にわたる長期吸入曝露により気道壁肥厚を伴う慢性喘息モデルを確立している。今回、気道壁リモデリングが与える組織学的効果および薬理学的効果を気道平滑筋標本を用いて検討した。卵白アルブミン長期吸入感作にて作成したモデルにおける組織学的検討では基底膜、粘膜層、平滑筋層、全層に分けてそれぞれ各面積を算出した。基底膜においては肥厚について検討した結果、リモデリングモデル群ではいずれにおいてもコントロール群（溶媒の生理食塩水のみ吸入群）と比較し有意な各層面積の増大また基底膜の肥厚が認められた。薬理学的効果に関しては気道平滑筋の収縮及び拡張能はいずれもリモデリングモデル群で収縮能の増強効果、拡張能の低下を認めた。これらの結果は、気道壁肥厚は喘息発作時における狭窄が強く起こり、難治性喘息の一つの機序となっている可能性が示唆された。

### A. 研究目的

気管支喘息の概念は、気道の可逆性気管支平滑筋収縮から気道における慢性炎症へと大きく変遷した。近年喘息の病態が解明されるにつれて、上皮の剥離を伴う気道の再構築（リモデリング）が注目されてきている。即ち気道壁リモデリングは、気管支喘息において重症および難治化要因の一つと考えられるようになった。具体的には、上皮杯細胞の過形成、subepithelial fibrosis、血管新生、平滑筋の肥厚、粘膜下腺の肥厚などが生じてくる。また、慢性・重症喘息では、 $\beta$ 刺激薬の気管支拡張効果が低下する事が知られているが、これらの観点から我々はモルモットを用いて気道壁リモデリングモデルを作成し、組織学的検討、また、気管および気管支筋を摘出し気管リング、気管支リングを作成し、アナフィラキシー反応がisoproterenol (ISP) の気道平滑筋弛緩作用に与える影響、また、carbachol (CCH) の気道平滑筋収縮作用に与える薬理学的影響について気管支喘息の病態形成における気道壁リモデリングの与える影響について検討を行う。

### B. 方法

気道壁リモデリングモデルはHartley系雄性モルモット（感作開始時250g）を用い、卵白アルブミン(OA)を1日1回、10mg/mlのOAを6L/minの気流量で10分間、10日間連続反復吸入曝露して感作した。その後、同様の吸入曝露を週1回24週目まで実施した。コントロール群は溶媒の生理食塩水（生食）を用いて、吸入曝露した。同モデルからの気管及び気管支筋の標本をorgan bath内に懸垂し、 $2 \times 10^{-5}$  M histamineで収縮させ、ISPで段階的に弛緩させ、用量-反応曲線を求め比較検討した。同様に各濃度に対するCCHに対する収縮作用に関しても検討を行った。組織学的検討に関しては、全ての群において吸入における直接作用を否定するために、最終曝露5日後に気管、肺を摘出した。気道横断面積は、同程度の大きさの気道を計測対象とし、Jamesらの方法すなわち、測定した周長をそれぞれの円周とする正円面積へと補正し、それを拡張期面積として各々内腔面積で除して検討を行った。基底層は、エラスチカーワンギーソン染色標本により、有軟骨気道の長軸に対し、垂直横断切片が得られている粘膜部において、無作為に5箇所計測し、その平均値を算出した。

## C. 結果

### 組織学的検討

#### ・粘膜層

粘膜層の面積の面積について、生理食塩水曝露群と比較しリモデリングモデル群では有意に大きかった。

#### ・平滑筋層

平滑筋層面積は、粘膜層同様にリモデリングモデル群において有意に大きかった。

#### ・基底層

基底層の厚さは、抗原曝露群で有為に肥厚していた。

### 気道過敏性

ヒスタミン吸入における気道過敏性は生理食塩水曝露群と比較しリモデリングモデル群において有意に亢進していた。

### 薬理的検討

Isoproterenol における気道平滑筋拡張効果の検討では生理食塩水曝露群と比較しリモデリングモデル群において弛緩効果の低下を認めた。一方、Carbachol における気道平滑筋収縮能の検討では生理食塩水曝露群と比較しリモデリングモデル群において有意に収縮能の増強効果が認められた。

## D. 考察

気管支喘息の基本病態の概念が、気管支平滑筋の生理学的収縮から気道粘膜の炎症へと変遷し、好酸球を中心とする慢性気道炎症の重要性が示されてきた。また、喘息患者の気道粘膜生検を安全に行うことが可能になり、今まで剖検肺で見られていた基底膜肥厚の大部分は実際には気道上皮の基底膜でなく、主としてその直下の結合織成分の肥厚に起因していることが明らかになった。1993年WHOを中心として発行された喘息の国際指針（Global Initiative for Asthma）は、これらの病理学的変化が慢性・難治性喘息における不可逆的な気道閉塞の原因であると指摘し、気道壁リモデリングの概念が生まれた。この気道壁リモデリングに関し、各研究室で様々な検討が行われており、その機序が徐々に解明されつつある。

今回我々は、気道壁リモデリングが与える組織学的効果および薬理的効果を気道壁肥厚を伴うモルモット慢性喘息モデルを作成し、気道

平滑筋標本を用い検討した。組織学的には基底膜、粘膜層、平滑筋層、全層に分けてそれぞれ壁の肥厚について検討した結果、リモデリングモデル群では気道壁の肥厚が認められたが、生理食塩水曝露群では全てにおいて有意な肥厚は見られなかった。薬理的効果に関しては気道平滑筋の収縮及び拡張能はいずれもリモデリングモデル群で収縮能の増強効果、拡張能の低下を認めた。気道壁の肥厚に関しては、非喘息対照群と比較し喘息患者では10~100%、喘息死患者では、50~300%の横断面積の増加があり、平滑筋面積に限れば同様に25~150%、50~230%の増加が見られたという報告があり、気道壁肥厚の程度が強くなるとともに喘息が重症化すると考えられる。また、気道壁肥厚は、気道収縮による呼吸機能の変化に重大な影響を与えることが知られており、40%の平滑筋収縮では、非発作時における気道抵抗の上昇率は15%にすぎないが、喘息死患者においては、それが290%に及ぶことを理論上計算された気道抵抗の変化率から算出している報告もある。我々の結果はこれらのを支持するものであり気道壁肥厚は喘息発作時における狭窄が強く起こり、また、 $\beta$ 刺激薬の応答の低下を示しており重症喘息の一つの機序を示唆させるものであった。気道壁リモデリングに伴う気道壁の肥厚と臨床症状、呼吸器能障害および気道過敏性亢進との関連性を示す報告もあり、リモデリングの改善が喘息の病態、予後、治療に与える影響は大きい。これらの機序にアレルギー性機序が関与していることを我々は既に報告しているが、今後、肥厚した気道壁を標的とした治療法の開発が望まれる。

## E. 結論

リモデリングモデル群は、生理食塩水曝露群と比較し基底膜、粘膜層、平滑筋層、全層において有意な肥厚を認め、収縮能の増強、拡張能の低下が観察され、気道壁の肥厚形成が難治性喘息の一つの機序となっている可能性が示唆された。

研究要旨 1. 吸入ステロイドは喘息気道における基底膜下肥厚を減少させ、そのメカニズムとして MMP-9・TIMP-1 の発現を介した作用が考えられた。2. 吸入ステロイドは喘息気道における血管新生と血管拡張を抑制することが明らかになった。

#### A. 研究目的

1. 吸入ステロイド薬は抗炎症作用を有する現在、最も効果的な喘息の治療薬である。喘息患者における不可逆的気道変化の原因とされる基底膜肥厚の気道リモデリングに対する吸入ステロイドの作用について、特に細胞外基質 (extracellular matrix:ECM) の代謝の面よりその機序を解明することを目的とした。2. また血管新生 (増生) と毛細血管拡張も気道リモデリングの特徴のひとつである。吸入ステロイド薬は気道への炎症細胞浸潤抑制作用を有するが、その血管系への作用については不明である。そこで、吸入ステロイド薬の喘息気道の vascularity に与える影響について解明することを目的とした。

#### B. 研究方法

1. 対象は軽症から中等症の喘息患者である。方法は気管支鏡下に気管支生検を行い、吸入ステロイド (BDP 800 $\mu$ g/day:BDP 群) と対照として吸入ステロイド未投与群の二群に分け、6ヶ月後に再度気管支生検を施行し collagen typeIII の免疫染色を行い基底膜下に沈着した厚さを測定した。同時に matrix metalloproteinase(MMP)-9 とその阻害物質である tissue inhibitors(TIM P)-1 の発現率を比較検討した。2. 1と同様の方法で検査を行い、気

道粘膜を collagen typeIVにより血管内皮細胞を染色し血管数と血管の粘膜全体にしめる割合 (血管占拠率) を比較検討した。同時に collagen type III の免疫染色を行い上皮基底膜の厚さを測定した。

(倫理面への配慮)

研究の主旨を十分に説明し、理解の得られた対象者のみに限定し文章にて承諾をえた。ドロップアウトした場合でも何ら不利益を与えないこととした。気管支生検は安全性が確立しているが、検査時の偶発的出来事に対しては適切な処置 (中止を含め) をとる論旨の説明を行った。

#### C. 研究結果

1. BDP 群は未投与群に比べ有意に collagen typeIII の沈着減少を認めた。さらに粘膜下組織における MMP-9 の有意な発現減少と TIMP-1 の発現増加を認めた。また collagen type III の沈着と上皮 MMP-9 の発現率との間に、粘膜下組織の MMP-9 の発現率との間に有意な相関が得られた。2. BDP 群は未投与群に比べ有意に気道組織中の血管数ならびに血管占拠率を減少させた。さらに血管占拠率の変化と collagen type III の変化との間には有意な相関が認められた。臨床成績では BDP 群においてのみ FEV<sub>1</sub>、%FEV<sub>1</sub> および気道過敏性の改善が認められた。

#### D. 考察

1. 気道リモデリングには MMP-9 と

TIMP-1 のアンバランスが重要な役割を果たしていると考えられる。今回、吸入ステロイドによる気道リモデリング予防の作用として MMP-9 の発現低下と TIMP-1 発現増加を介したメカニズムが考えられた。しかしながら、BDP は同時に炎症細胞も減少をさせるため直接作用か炎症細胞由来のサイトカイン等を介した間接作用かは不明である。2. BDP は気道の vascularity を減少させると同時に基底膜下組織の肥厚を改善させた。さらにこのメカニズムについては血管新生因子の発現抑制が考えられ現在検討中である。

#### E. 結論

1. 吸入ステロイド薬は基底膜肥厚を抑制し、そのメカニズムとして MMP-9・TIMP-1 の発現を介した作用が考えられた。
2. 吸入ステロイド療法は喘息の血管新生と血管占拠率の増加を改善させた。

#### F. 健康危険情報

特に治療薬、検査等で問題となった症例はいなかった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hoshino M, et al. Inhaled corticosteroids decrease subepithelial collagen deposition by modulation of the balance between matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:356-363.
2. Hoshino M, et al. Inhaled corticosteroids decrease vascularity of the bronchial mucosa in patients with asthma. *Clin Exp Allergy* 2001 (in

press).

##### 2. 学会発表

1. 星野誠ら：シンポジウム：吸入ステロイド療法と early intervention-小児と成人の共通点と相違点-「気道炎症の観点より」。第 11 回日本アレルギー学会春期臨床大会，大阪，1999 年 5 月。
2. 星野誠：シンポジウム：気道壁のリモデリングの進展抑制は可能か-診断と治療の立場より-「MMP と TIMP-1 の発現と気道の Remodeling について」。第 11 回日本アレルギー学会春期臨床大会，大阪，1999 年 5 月。
3. 星野誠ら：喘息における吸入ステロイド療法の基底膜肥厚と MMP, TIMP に対する影響。第 49 回日本アレルギー学会総会，広島，1999 年 10 月。
4. 星野誠：シンポジウム：気道のリモデリングの治療は可能か。「MMP と TIMP」。第 12 回日本アレルギー学会春期臨床大会，福岡，2000 年 4 月。
5. Hoshino M, et al. Role of inhaled corticosteroids in subepithelial basement membrane deposition and MMP-9/TIMP-1 expression in asthma. World Congress on Lung Health and 10<sup>th</sup> ERS Annual Congress, Florence, Italy, 8/30-9/3, 2000.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

気管支喘息の改善、自然寛解機序の解明による根治療法の開発に関する研究

アレルギー反応におけるヒト好塩基球の化学伝達物質遊離のメカニズムに関する研究

分担研究者氏名： 三浦克志、飯倉洋治  
所属施設： 昭和大学小児科

研究要旨 ヒト末梢血好塩基球からのケミカルメディエータへの刺激伝達系の中で、Phosphatidylinositol-3 (PI-3) kinase の好塩基球での活性化と刺激伝達での役割を検討した。PI-3 kinase は IgE を介した刺激における ras-MEK-ERK の経路と細胞内カルシウムの上昇への経路を調節し、LTC<sub>4</sub> 産生や脱顆粒に関与していると推察された。

A, 研究目的: 好塩基球は末梢血に存在し、アレルギー炎症の遅発相において好酸球と共に炎症局所に浸潤し、ヒスタミンやロイコトリエン C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>)等のケミカルメディエータを放出する。これら好塩基球由来のケミカルメディエータは気管支喘息の遅発型や慢性型の気道収縮を惹起すると考えられている。これら好塩基球からのケミカルメディエータの刺激伝達系を解明することは将来の気管支喘息の治療法や治療薬の開発に繋がると考えられる。本研究はヒト末梢血好塩基球からのケミカルメディエータへの刺激伝達系の中で、Phosphatidylinositol-3 (PI-3) kinase の好塩基球での活性化と刺激伝達での役割を検討した。アレルギー炎症では多価抗原による IgE-IgE 受容体 (FcεRI) の凝集によって惹起される刺激伝達系が重要であり、その解明を主な目的とした。IgE-IgE 受容体 (FcεRI) の凝集を惹起させるためには抗 IgE 抗体を使用し、コントロールとしては IgE を介した刺激と同様にヒスタミ

ン遊離や LTC<sub>4</sub> 産生を惹起する FMLP (細菌由来のペプチド) を使用した。

B, 研究方法: PI-3 kinase の活性化は p85 (PI-3 kinase 調節ドメイン) のリン酸化を免疫沈降後に、抗 phosphotyrosine 抗体にて immunoblotting を行い検討した。Syk のリン酸化も免疫沈降後に抗 phosphotyrosine 抗体 immunoblotting を行い検討した。MEK1 と ERK1/2 はそれぞれ抗 phospho-MEK 抗体と抗 phospho-ERK 抗体の immunoblotting にて検討した。Ras の活性化は、raf-1 の ras-binding domain (RBD) を含む GST-fusion protein にて affinity precipitation 後に抗 ras 抗体でイムノブロッティングを行って検討した。LTC<sub>4</sub> は RIA にて測定した。ヒスタミンは自動 fluorimetry にて測定した。細胞内カルシウム濃度の測定は fura2/AM でラベルし、デジタルビデオ顕微鏡にて解析した。

C, 研究結果: IgE を介した刺激 (抗 IgE 抗体) で p85 (PI-3 kinase 調節ドメイン) のリン酸化を誘

導したが、FMLPの刺激では検出できなかった。PI-3 kinase の選択的阻害剤である LY294002 で抗 IgE 抗体が誘導される MEK1 と ERK1/2 のリン酸化は抑制されたが、FMLP で誘導されたリン酸化は影響を受けなかった。同様に、抗 IgE 抗体で誘導されるヒスタミンの放出と LTC4 の産生は抑制されたが、FMLP で誘導されたそれらは影響を受けなかった。さらに、LY294002 により抗 IgE 抗体で誘導される ras の活性化も抑制され、細胞内カルシウムの上昇も抑制された。尚、ras の活性化には細胞内カルシウムの上昇が関与していないため ras の活性化は細胞内カルシウムの上昇とは非依存的に調節されていることが示唆された。一方、ras や細胞内カルシウムの上流でこれらを調節していると考えられている syk の活性には LY294002 は影響しなかった。

D, 考察: 以上のことと以前の我々の結果より、PI-3 kinase は IgE を介した刺激における ras-MEK-ERK の経路を調節することにより LTC4 産生に関与し、細胞内カルシウムの上昇への経路を調節することにより脱顆粒に関与していると推察された。一方、FMLP での刺激では PI-3 kinase を介さない他の経路によって脱顆粒や LTC4 産生が調節されていると推察された。FMLP の受容体からの刺激は百日咳毒素感受性の G 蛋白によって調節されており、IgE を介した刺激ではこの分子は関与しないため、これらの違った受容体の刺激では全く違った刺激伝達のメカニズムがあると考えられていた。今回の

結果はさらにその仮説を直接的に裏付けていると考えられた。

E, 結論: 本研究により IgE を介した刺激での PI-3 kinase のメデイエーター放出への役割とその刺激伝達系における関与のメカニズムを示した。PI-3 kinase は様々な受容体からの刺激伝達系で重要な役割を行っているため、直接アレルギーの治療薬に結びつけるのは難しいかもしれないが、これらの研究が将来のアレルギー治療薬へ結びつくと考えられた。

F, 研究発表

1, 論文発表

Phosphatidylinositol-3 kinase regulates p21 ras activation during IgE-mediated stimulation of human basophils.

Blood 2000, 96, 2199-2205



研究課題：小児アレルギー疾患に於ける遺伝子多型と重症度との関係

分担研究者：飯倉洋治、垂石香苗、戸部徹、養父佐知子、高橋 円

### 研究要旨

アレルギー疾患の遺伝的背景が問題になっているが、今回アレルギーと関係のある IL-4、IL-4R、IL-10、IL-13、TGFβ-1、FcεRIβ についての遺伝子多型の検討を行なった。その結果、これらは IgE の高低と、臨床症状と強く関係することが判明した。今後のアレルギー疾患児指導に将来重要な検査と言える。

### A. 研究目的

アレルギー疾患は遺伝的背景が複雑にからみ、発症した治療に対する反応性が異なってくる。また、小児アレルギー疾患は、アトピー性皮膚炎→気管支喘息と経過が長引くと主たる病変が移行してくることが屡ある。さらに、重症度を決める検査として、IgE 値、好酸球数、気道の過敏性等が日常診療に用いられているが、遺伝的背景の検討は十分なされていない。そこで、アレルギー関連遺伝子の多型情報を検討し、アレルギー疾患の重症度と比較し、予後の検討に使えるか否かの検討を行った。

### B. 研究方法

昭和大学小児科を受診した気管支喘息、アトピー性皮膚炎患者の末梢血を 3 ml EDTA 採血し、ゲノム DNA を抽出、この手順は Promega 社の Wizard Genomic DNA Purification Kit を用いて行った。検討項目は FcεR1β、IL-4Rα、IL-10、TGFβ-1、IL-4、IL-13 の 6 種類で、臨床症状の判定は一人の医師による 4 段階評価で行った。

また、患者のアレルギー状態を検討する目的で、全患者の IgE 値を測定し、RAST スコアのダニの値を全例に検討した。

### C. 研究結果

1) 患者背景に関して：両疾患合わせて 115 人の検体を採取し、臨床症状、遺伝子多型 (SNPs) の検討を行なった。また、IgE 値を 200IU/ml 以下と 1,000IU/ml 以上の群に分け、今回は解析検討を行なった。

2) SNPs に関して：今回は 6 種類の遺伝子多型についての検討を行なった。

① IL-4、IL-4R、IL-13 に関して：

IL-4 受容体の α 鎖遺伝子は幾つかの多型が認められて、その中の一つ 1652A/G (Glu592Arg) 多型 (1652 番目の塩基 A が G に変異しており、592 番目のグルタミン酸がアルギニンに置換される coding SNP) はアトピーや血清総 IgE 高値に関与するとされている。

そこで、IgE 値が 200IU/ml 以下の群と 1,000IU/ml 以上の群に分け検討を行った結果、IL-4Rα の遺伝子多型が野生型ホモ接合体 (wt homo (A/A)) では、オッズ比が 1.21 (Fisher 検定 p=0.25) で、血清 IgE 高値と弱い相関が認められた。

IL-4 遺伝子プロモーター領域に於ける -590C/T 多型では、T-allele による IL-4 発現の上昇と IgE 値がオッズ比 6.8 で、カイ 2 乗検定および Fisher 検定でそれぞれ 0.005 および 0.01 であり、血清 IgE 高値と有意な相関が認められた。IL-13 遺伝子の 2044G/A (Arg 130Gln) 多型は血清 IgE 高値およびアトピー性皮膚炎に関与す

ると言われている。今回の研究で、遺伝子が hetero の場合、オッズ比 3.17 を示し、血清 IgE 値と強い相関がみられた。

②高親和性 IgE Fc $\epsilon$ RI $\beta$  に関して：6842 番目の塩基が A から G に置換することにより 237 番目のアミノ酸がグルタミンからグリシンに変異する c SNP が存在する。G-allele はオッズ比 3.11 で、統計学的に血清 IgE 値と強い相関を認めた。また遺伝子型が mt homo の患者は血清 IgE 値が高値で、ダニ抗原強陽性で、臨床的に改善が速やかに進まぬ症例が多いことが判明した。

③IL-10、TNF $\beta$  1 に関して：この遺伝子多型は -627C/A について検討、mt (A/A) homo はオッズ比 2.13 で IgE 高値と相関が認められた。TGF $\beta$  1 遺伝子型が wt homo である患者は RAST score のダニ強陽性である場合、血清 IgE 値が高くなる傾向が見られた。

#### D. 考案

今回の遺伝子多型と臨床症状、IgE 値を絡めて検討すると、アレルギー疾患に遺伝子多型の検討が非常に重要になってくると推察され、今後はもっと一般的に検査が行われると、より患者背景が把握でき、患者指導が適切に行えると推察される。

#### E. 結論

アレルギー疾患の遺伝的背景の検討には色々な項目が検討されているが、今回 SNP 検査を行ない、IgE 値との関連で検討していくと、今後非常に有用な検査と考えられ、重要な問題といえる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

飯倉洋治, 他: 第 12 回日本アレルギー学会 春季臨床大会, 2001 年 5 月, 於横浜.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし