

200/0795

---

平成13年度厚生科学研究

厚生労働省感覚器障害及び免疫・アレルギー等の研究事業

アレルギー疾患に係わる  
体内・胎外因子に関する研究

研究報告書

---

厚生労働省

# 目 次

## 1.総括研究報告書

### アレルギー疾患に係わる胎内・胎外因子に関する研究

主任研究者

群馬大学医学部小児科教授

森川 昭廣 ..... 1

## 2.分担研究報告書

### 1) 皮膚バリア障害の検討

分担研究者

京都大学大学院医学研究科皮膚病態学教授

宮地 良樹 ..... 5

### 2) アトピー遺伝子の検討

分担研究者

岐阜大学医学部小児科教授

近藤 直実 ..... 11

### 3) サイトカインと胎外因子

分担研究者

帝京大学医学部内科教授

大田 健 ..... 14

### 4) サイトカインと胎内因子

分担研究者

山口大学医学部小児科教授

古川 漸 ..... 19

### 5) 皮膚バリア障害の検討

分担研究者

横浜市立大学医学部皮膚科教授

池澤 善郎 ..... 23

### 6) アトピー遺伝子の検討

分担研究者

筑波大学臨床医学系小児科助教授

柴崎 正修 ..... 28

### 7) 疫学調査

分担研究者

国立療養所南福岡病院小児科医長

小田嶋 博 ..... 34

### 8) サイトカインと胎内因子

分担研究者

群馬大学医学部小児科講師

徳山 研一 ..... 39

### 9) アトピー遺伝子の検討

分担研究者

群馬大学医学部小児科助手

荒川 浩一 ..... 42

### 10) 神経原性因子と胎外因子

分担研究者

獨協医科大学小児科講師

吉原 重美 ..... 47

### 11) 疫学調査

分担研究者

ささきアレルギー科クリニック院長

佐々木 聖 ..... 50

### 研究要旨

昨年度において、当研究班では、アレルギー疾患患者増加に鑑み、遺伝的要因を含む胎内における因子と出生後の発症に及ぼす環境因子（胎外因子）について検討し、一定の成果をあげてきた。本年はさらにそれをおすすめ、アレルギー的または免疫的側面と、非アレルギー的側面である臓器過敏性について検討した。本年度においては以下の結果を得た。

#### （１）アレルギー的側面に係る因子

- 1) カモガヤ花粉症に連鎖した遺伝子座において新たな特異的な領域は 9q34.3 で、気管支喘息の遺伝子座と概ね共通するものであった。
- 2) 末梢血単核球で、IL-12、IL-18、PHA の刺激により IFN-gamma が十分に産生されない症例において、IFN-gamma の産生量の低下が遺伝子発現レベルで起こっている可能性が明らかとなった。
- 3) stat6 エクソン 1 における GT 繰り返し配列の多型は、小児気管支喘息と関連を認めたが、成人喘息ではコントロール群と差はなく、成人喘息では遺伝因子より環境因子が強いことが疑われた。
- 4) アレルギー疾患では、患者血漿中の TARC と MDC は、健常者に比較して有意に高値を示し、アレルギー疾患の新たなマーカーと考えられた。臍帯血では TARC および MDC ともに高値を示した。
- 5) アレルギー発症例の母乳中（1 ヶ月時）TGF-β1 は、平均 2.2 才時の追跡調査では、非発症例に比し有意に低値であり、母乳中の TGF-β1 は乳幼児期早期のアレルギー発症を抑制する可能性を示唆した。
- 6) 血清 IgE 値では、250IU/mL を境として喘息の予後と関連を認めた。子供の喘息の発症率は父親に喘息がある場合より母親に喘息がある場合に高く、母親由来の因子が関与する可能性を示唆している。

#### （２）非アレルギー的側面に係る因子

- 7) 乳幼児喘息群では、初回喘鳴群と比較して MMP-9 および ECP は高値を示した。また、MMP-9 と ECP では有意な相関を認め、乳児期から気道炎症による気道リモデリングが誘導される可能性が示唆された。
- 8) マウス喘息モデルで、特異抗体および気道過敏性は成熟マウス少量投与群 > 幼若少量投与群 = 成熟大量投与群 > 幼若大量投与群で、抗原量や年齢により感作、気道反応に違いが生じる可能性を示唆した。
- 9) マウス喘息モデルで、IGF-I 中和抗体は気道リモデリングや気道過敏性亢進を有意に抑制し、ICAM-1 の発現も抑制した。IGF-1 が接着分子を介して好酸球浸潤を増強し、気道炎症惹起に関与している可能性が考えられた。
- 10) アトピー性皮膚炎患者の皮膚表面から分離されたブドウ球菌の 70% 以上は黄色ブ菌で、それ以外のブ菌も、各種薬剤に対する感受性の低下や多剤耐性菌の検出頻度が高かった。アトピー性皮膚炎の皮膚症状や皮膚バリア傷害を考える上で、皮膚表在菌の果たす役割を考える必要があることが示唆された。
- 11) アトピー性皮膚炎モデルマウスでは、酸化チタンによる光触媒反応は無処置群と比較して、皮疹の発症が早まるとともにその程度も著しく、黄色ブ菌数の増加を早く認められた。一方、白色ワセリン処置群では皮疹の出現時期が遅く程度も軽度で、治療におけるスキンケアの有用性が示された。

このように、胎内・胎外因子をアレルギー的側面および非アレルギー的側面に分け、詳細に解明することで、アレルギー疾患の増加を防ぐ何らかの手だてを確立していくことが可能となると考えられる。

荒川浩一（群馬大学医学部小児科助手）

古川 漸（山口大学医学部小児科教授）

池澤善郎（横浜市立大学医学部皮膚科教授）

宮地良樹（京都大学大学院医学研究科皮膚病態学教授）

大田 健（帝京大学医学部内科教授）

吉原重美（獨協医科大学小児科講師）

小田嶋博（国立療養所南福岡病院小児科）

（アイウエオ順）

近藤直実（岐阜大学医学部小児科教授）

佐々木聖（ささきアレルギー科クリニック）

柴崎正修（筑波大学臨床医学系助教授）

徳山研一（群馬大学医学部小児科講師）

## A. 研究目的

近年、日本を含む世界各国においてアレルギー疾患患者の増加が報告されている。アレルギー疾患発症には、アレルギー的側面および非アレルギー的側面である臓器過敏性が重要な要因であるといわれているが、それぞれに関与する遺伝的要素（胎内因子）や環境的要素（胎外因子）に関しては不明な点が多い。これらの因子を明らかにしていくことにより、アレルギー疾患発症の予知予防に役立てることが本研究の目的である。

今年度、本研究では、アレルギー的側面に関与する因子として、遺伝的あるいは疫学的検討、Th1/Th2 バランスを規定するサイトカイン、ケモカインや増殖因子とアレルギー疾患発症との関連を検討した。一方、非アレルギー的側面に関しては、気道過敏性の獲得に関与する気道炎症および増殖因子の関与、乳幼児喘息と成人喘息における各因子の違い、アトピー性皮膚炎における皮膚バリア障害の成立機構に関与する黄色ブドウ球菌の関与を明らかにしていくことである。

## B. 研究の方法

### 遺伝学的検討：

カモガヤ花粉症患者の遺伝子座の同定と連鎖解析（柴崎）、アレルギー疾患患者における IFN- $\gamma$  プロモーター領域の遺伝子変異（近藤）、小児ならびに成人気管支喘息患者における stat6 エクソン 1（荒川）の遺伝子多型を解析した。

### 胎内・胎外因子と追跡調査：

羊水、母体血、臍帯血において、ケモカインのひとつである thymus and activation-regulated chemokine (TARC) や Macrophage-derived chemokine (MDC) を測定し、アレルギー疾患の新たなマーカーとなるかを検討した（佐々木）。母乳中において、増殖因子の一つである TGF- $\beta$  1 や IFN- $\gamma$  を測定し、胎内感染の有無と追跡調査によるアレルギー疾患発症との関連を検討した（古川）。

### 疫学調査：

福岡市内 3 地区 5 小学校での疫学調査によるアレルギー疾患発症や予後の検討をした。（小田嶋）

### 気道過敏性：

小児気管支喘息および初回喘鳴群における喀痰中の MMP-9 や ECP、好中球エラスターゼの測定により気道炎症およびリモデリングの発展に関して解明した（吉原）。新生仔マウスのアレルギー気道炎症モデルの作成と免疫応答および気道過敏性を評価した（徳山）。マウス気道過敏性モデルにおいて、気道炎症およびリモデリングにおける IGF-1 の役割を検討した（大田）。

### 皮膚バリア障害：

皮膚バリア障害に関与するブドウ球菌の役割を検討した（宮地）。アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いて、酸化チタンの光触媒反応による皮膚への影響を解明するとともに、白色ワセリンを用いたスキンケアの意義について検討した（池沢）。

## C. 結果および D. 考察

1) カモガヤ花粉症の症状と連鎖がみられた領域は 1p36.2、4q13.3、9q34.3 で、カモガヤ RAST 値と連鎖がみられたのは 4p16.1、11q14.3、16p12.3 であった。カモガヤ花粉症に特異的な新たな領域は 9q34.3 のみであり、カモガヤ花粉症に連鎖した遺伝子座は気管支喘息のそれと概ね共通するものであることを示した。

2) アレルギー患者の中には、IL-12、IL-18、PHA のいずれの刺激においても末梢血単核球からの IFN- $\gamma$  が十分に産生されない症例が存在した。それは mRNA の発現レベルで起こっている可能性が示された。また、インフルエンザウイルス感染時の IFN- $\gamma$  産生低下も同様に遺伝子発現レベルで起こっていることが明らかになった。

3) stat6 エクソン 1 における GT 繰り返し配列の多型と小児気管支喘息では関連がみられたが、成人喘息ではコントロール群と比較して差はみられなかった。これは、小児と成人気管支喘息発症における遺伝子座の関与の違いに関連する可能性もあり、さらに、成人喘息では遺伝的要因以外の環境要因が強い可能性も示唆された。

4) アレルギー疾患では、患者血漿中の TARC と MDC は、健常者に比較して有意に高値を示し、アレルギー疾患の新たなマーカーと考えられた。臍帯血では

母体血と比較して TARC および MDC ともに高値を示したが、TARC および MDC の間には相関関係は認められなかった。今後、ATS-DLT を用いて予後追跡調査を行い、アレルギー発症の予知因子となりうるかを検討する予定である。

5) 平均 2.2 才時の追跡調査で、アレルギー発症例の生後 1 ヶ月時点での母乳中の TGF- $\beta$ 1 は 124.1  $\pm$  27.4 pg/ml で、非発症例 442.9  $\pm$  513.2 pg/ml に比し有意に低値だった。細胞増殖抑制因子である TGF- $\beta$ 1 には免疫抑制作用があり、母乳中の TGF- $\beta$ 1 は乳幼児期早期のアレルギー発症を抑制する可能性があらと考えられた。

6) 血清の IgE と臨床経過との関連で、IgE 値が約 250 IU/mL を境として予後との関連があった。子供の喘息の発症率は父親に喘息がある場合は 6.1% であるのに対し母親に喘息がある場合には 17.5% と高く、どちらも無い場合には 3.3% であった。この両親ともに無い場合には子供は 91.5% に喘息が無かった。

7) 乳児気管支喘息群では、初回喘鳴群と比較して MMP-9 および ECP は高値を示したが、両群とも MMP-9 と ECP では有意な正の相関を認めた。初回喘鳴群では好中球エラストラーゼにも有意な正の相関を認めた。小児気管支喘息において、すでに乳児期から気道炎症による気道リモデリングが誘導される可能性が示唆された。

8) マウス喘息モデルで、OA 特異 IgE 抗体価および気道過敏性の亢進は成熟マウス少量投与群 > 幼若マウス少量投与群  $\approx$  成熟マウス大量投与群  $\gg$  幼若マウス大量投与群の順であった。今後、この系において幼若マウスと成熟マウス間でサイトカインがどのような役割の差異を演じているのか検討していく予定である。

9) マウス喘息モデルで、OA 全身免疫 + OA 吸入群において、OA 吸入期間に IGF-I 中和抗体を投与すると、気道過敏性の亢進が有意に抑制された。また、 $\alpha$ -IGF-I 投与群で ICAM-1 の発現が抑制された。IGF-I が接着分子発現亢進を介して、好酸球浸潤を増強し、気道炎症惹起に関与している可能性が考えられた。

10) AD 患者の皮膚表面から分離されたブドウ球菌は、70% 以上が *S. aureus* で占められ、それ以外のブドウ球菌についても、各種薬剤に対する感受性の低下や MRSA を含む多剤耐性菌の検出頻度も高かつ

た。今後、AD の皮膚症状や皮膚バリア傷害を考える上で、*S. aureus* 以外のブドウ球菌を含め、皮膚表在菌の果たす役割を考える必要があることが示唆された。

11) アトピー性皮膚炎モデルマウスでは、酸化チタンによる光触媒反応は無処置群と比較して、皮疹の発症が早まるとともにその程度も著しかった。また、皮表の *S. aureus* 数の増加を早く認められた。白色ワセリン処置群では皮疹の出現時期が遅く程度も軽度であった。アトピー性皮膚炎の発症における皮表の *S. aureus* の関与の重要性と、治療におけるスキンケアの有用性が示された。

#### D. 結論

アレルギー疾患におけるアレルギー的側面と非アレルギー的側面である臓器過敏性の獲得に分け、最新の知見をもとに、疫学的、遺伝学的、免疫学的手法さらに分子生物学的手法を用い、それに係わる胎内・胎外因子の検討を行った。アレルギー疾患において、アトピー関連遺伝子や候補遺伝子が見出され、一方、気管支喘息の疫学的調査では母親からの伝播が疑われた。また、胎児期および母乳を介したサイトカイン、ケモカインあるいは増殖因子の曝露は、アレルギー疾患発症あるいは抑制に関与している可能性が示された。

気管支喘息において、乳児期より気道炎症が存在し、気道過敏性亢進に関与し、また、その進展に増殖因子が関与していることが示唆された。アトピー性皮膚炎では黄色ブドウ球菌が、その発症と増悪に関与し、その対策も重要であることが考えられた。本研究は、アレルギー疾患である気管支喘息およびアトピー性皮膚炎の発症要因を多方面より検討し、アレルギー疾患の原因解明および治療にもつながる意義深いものに発展することが期待される。

研究協力者 (あいうえお順)

相原道子 (横浜市立大学医学部皮膚科講師)

青木美奈子 (岐阜大学医学部小児科大学院)

有波忠雄（筑波大学基礎医学系遺伝学医学助教授）  
有馬八重野（京都大学大学院医学研究科皮膚病態学  
研究生）  
大木康史（群馬大学小児科教務員）  
笠原貴美子（岐阜大学医学部小児科）  
金子英雄（岐阜大学医学部小児科講師）  
金子富志夫（帝京大学医学部内科助手）  
川野 豊（横浜赤十字病院小児科部長）  
木村知華子（国立療養所南福岡小児科）  
佐藤 哲（群馬中央総合病院小児科医長）  
佐藤一郎（横浜市立大学医学部皮膚科助手）  
白川太郎（京都大学医学研究科健康増進・行動学分  
野教授）  
鈴木道子（群馬大学医学部小児科大学院）  
寺本貴英（岐阜大学医学部小児科大学院）

中野純一（帝京大学医学部内科講師）  
西村秀子（原町赤十字病院小児科医長）  
野口恵美子（筑波大学臨床医学系小児科）  
野間剛（北里大学小児科講師）  
藤本 昭（友誼会総合病院産婦人科部長）  
松井永子（岐阜大学医学部小児科助手）  
松倉節子（横浜市立大学医学部皮膚科医員）  
松原知代（山口大学医学部小児科助教授）  
森川みき（J R 仙台病院小児科医長）  
山下直美（帝京大学医学部内科助教授）  
山田裕美（獨協医科大学小児科助手）  
吉川かおり（岐阜大学医学部小児科大学院）  
渡辺美砂（東邦大学医学部小児科）  
渡辺みづほ（岐阜大学医学部小児科大学院）

厚生科学研究費補助金（感覚障害及び免疫・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

アトピー性皮膚炎患者皮膚表面の staphylococci 分布に関する研究

分担研究者 宮地良樹 京都大学大学院医学研究科皮膚病態学教授

研究要旨 アトピー性皮膚炎のように、表皮脂質やセラミドなどの表皮脂質の減少などによってバリア機能が低下している皮膚では、皮膚の自浄作用だけでは通過菌を排除できず黄色ブドウ球菌が定着しやすい。また、皮膚常在菌である表皮ブドウ球菌が黄色ブドウ球菌に取って代わられるなど、その菌叢の変化についても注目を集めている。本研究ではアトピー性皮膚炎の皮膚症状とブドウ球菌の関係をj知る目的で、皮膚表在菌数、皮表から分離したブドウ球菌の種類と薬剤感受性および ceramide を栄養原とする培地中での生存株について、罹病期間の異なる2群のアトピー性皮膚炎群と他の疾患群および健康人群で比較検討した。アトピー性皮膚炎群では、皮表から分離・同定されたブドウ球菌の70%以上が黄色ブドウ球菌で占められ、健康人群に比べ、各種薬剤に対する感受性の低下や MRSA を含む多剤耐性菌の検出頻度も高かった。この傾向は罹病期間の長い重症群の方が軽症群より顕著であり、特に、皮膚科領域で汎用されている Gentamicin については Gentamicin 配合剤の使用頻度との関連が示唆された。ceramide を栄養原とする培地中での生存菌の ceramide 分解能の確認にまでは至らなかったが、今後、アトピー性皮膚炎の皮膚症状や皮膚バリア傷害を考える上で、黄色ブドウ球菌以外のブドウ球菌を含め、皮膚表在菌の果たす役割を考える必要がある。

研究協力者 有馬八重野  
京都大学大学院医学研究科  
皮膚病態学研究生

#### A. 研究目的

アトピー性皮膚炎(AD)における皮膚バリア傷害は角質細胞間脂質、特に ceramide が減少していることが知られているが、その原因については未だ十分に解明されていない。近年、細菌の産生する菌体外毒素が、superantigen として皮膚疾患での炎症を引き起こすことが提唱され、細菌が分泌するタンパクの、病変部位での炎症に果たす役割が注目されている。AD 患部には黄色ブドウ球菌(*S. aureus*) が高率で定着することが知られ

ており、黄色ブドウ球菌の生理と AD 疾患との関連について興味を持たれる。また、健康人皮膚表面の常在菌である表皮ブドウ球菌(*S. epidermidis*)が AD 患部では *S. aureus* 優位に取って代わられるなど、その菌叢の変化についても注目を集めている。本研究では、AD の皮膚症状とブドウ球菌の関係をj知る目的で、AD 患者の皮膚表在菌数、皮表から分離したブドウ球菌の種類と薬剤感受性および ceramide を栄養源とする合成培地中での生存株数について、罹病期間の異なる2群の AD 患者群と他の疾患群および健康人群で比較検討した。

#### B. 研究方法

## 【対象】

京都大学皮膚科を受診した罹病期間の長い成人型AD患者(KU)49例、実地皮膚科医を受診した軽症のAD患者(GP)66例、京都大学皮膚科を他の疾患で受診した患者(CC)21例および健常人(HC)27例。アトピー性皮膚炎の診断は日本皮膚科学会の定義に従った。対象の内訳とアトピー性皮膚炎群の重症度を図1に示した。

(倫理面への配慮)

研究対象者には本研究の内容、方法および予測される結果を十分に説明し、十分な理解(全員からの同意)を得た上で皮膚表在菌の採取が行われた。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。

## 【試験方法】

### 1) 皮膚表在菌数の測定

一般細菌(SCD寒天培地)およびブドウ球菌(マンニット食塩培地)検出用の2種類のコンタクトプレート(培地面を観察部位に10秒間接触)を用いて皮膚表在菌を採取した。37°C、24?48時間培養後のSCD寒天培地上のコロニー数を総菌数、マンニット食塩寒天培地を黄変したコロニー数を*S. aureus*数とした。

### 2) 菌種の同定試験

コンタクトプレート上の優勢株をマンニット食塩寒天培地上で分離培養後、N-IDテスト・SP-18(ニッスイ)による簡易同定試験、グラム染色、coagulase試験、catalase試験、DNA加水分解試験を実施し、ブドウ球菌の菌種を同定した(図2)。

### 3) 薬剤感受性試験(minimum inhibitory concentration, MIC)

化学構造の異なる9種類の薬剤に対する分離菌のMICをHart infusion brothを用

いた寒天希釈法(日本化学療法学会標準法、接種菌量 $10^6$  cells/ml)で測定した。

### 4) ceramideを栄養原とする合成培地中での生存株の確認

0.05% ceramide添加合成培地(0.05%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、0.05%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.5%  $\text{NaCl}$ 、0.05% Taurodexoxycholatr:pH 7.2)を用いて37°Cで15日間(3日毎、 $5\mu\text{l}$ → $100\mu\text{l}$ )継代培養後、マンニット食塩寒天培地上で生育が確認された株を生存株とした。

## C. 結果

### 1) 皮膚表在菌数(図3)

サンプル採取部位の皮膚表在菌数は、総菌数、*S. aureus*共に、AD群(KU,GP)>他疾患群(CC)、健常人群(HC)であった。AD群では、重症局面ほど多数の*S. aureus*が検出された(湿潤局面>乾燥局面>正常部位)。

### 2) 菌種の同定試験結果(表1)

今回分離、同定し得たブドウ球菌は385株であった。優勢株を分離した今回の方法では、AD群では皮膚表在ブドウ球菌の約70%(2群の平均)が*S. aureus*であり、罹病期間の長い重症群の方が軽症群より*S. aureus*の占める割合は高かった。他の疾患群からも多数の*S. aureus*が検出されたが、健常人群の93.5%は、*S. epidermidies*、*S. warneri*などのcoagulase negative staphylococci(CNS)で*S. aureus*の検出率は6.5%であった。

### 3) 薬剤感受性試験

化学構造の異なる9種類の薬剤(Penicillin G, Methicilin, Imipenem, Cefotiam, Vancomycin, Gentamycin, Clarithromycin, Minocycline, Ofloxacin)に対する分離株の薬剤感受性を測定した。



代表的 4 薬剤の累積百分率曲線を図 4 に示した。

#### 4) ceramide を栄養原とする培地中での生存菌数測定

ceramide を栄養原とする培地中での生存率は、AD 群とその他の群で差を認めなかった (表 2)。

#### D. 考察

近年、重症の AD 患者が増加し、特に難治性の皮疹を有する AD 患者が注目されていることから、本研究では AD 群を罹病期間の長い重症群と罹病期間の短い軽症群に分けて検討した。

皮膚表在菌数については従来の報告通り、AD 群からは多数の菌が検出され (図 3)、観察部位で採取したブドウ球菌 (優勢株) の 70% 以上が *S. aureus* であった。皮表から分離同定し得たブドウ球菌 385 株の薬剤感受性を MIC<sub>90</sub> で比較すると、健常人群 (HC) より疾患群 (KU, GP, CC) の方が感受性は低い (MIC<sub>90</sub> が高い) 傾向であった。特に、皮膚科領域で汎用されている Gentamicin については、健常人群 (0.25 μg/mL) や罹病期間の短い軽症のアトピー性皮膚炎群 (1 μg/mL) に比べ、罹病期間の長い成人型のアトピー性皮膚炎群 (64 μg/mL) や平均年齢の高い他の皮膚疾患群 (16 μg/mL) での感受性の低下が認められ、Gentamicin 配合剤の使用頻度との関連が示唆された。AD 群から検出された *S. aureus* 以外のブドウ球菌 (CNS) についても、健常人群に比べ、各種薬剤に対する感受性の低下や MRSA を含む多剤耐性菌の検出頻度も高かった。ceramide を栄養原とする培地中での生存株の ceramide 分解能の確認にまでは至らなかったが、今後、培地条件などを変更して

皮膚表在菌の ceramide 分解能について検討する必要があることが示唆された。

#### E. 結論

AD のようにバリア機能が低下している皮膚では、皮膚の自浄作用だけでは通過菌である *S. aureus* を排除できず多数の *S. aureus* が検出されるだけでなく、皮膚常在ブドウ球菌の薬剤感受性の低下が認められる。今後、AD の皮膚症状や皮膚バリア傷害を考える上で、*S. aureus* 以外のブドウ球菌を含め、皮膚表在菌の果たす役割を考える必要がある。

#### F. 健康危害情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 学会発表

第 30 回日本皮膚アレルギー学会

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし

	Atopic dermatitis		Clinical control	Healthy control
	KU	GP	CC	HC
Sex : numbers(%)				
Male	31 ( 63.3)	31 ( 47.0)	7 ( 33.3)	14 ( 51.9)
Female	18 ( 36.7)	35 ( 53.0)	14 ( 66.7)	13 ( 48.1)
Total	49 (100.0)	66 (100.0)	21 (100.0)	27 (100.0)
Age (years) : Mean±S.D.				
Male	29.6 ± 11.9	12.4 ± 8.8	51.9 ± 16.0	26.6 ± 6.4
Female	31.9 ± 14.7	13.9 ± 9.1	39.9 ± 19.4	25.3 ± 3.0
Total	30.5 ± 12.9	13.2 ± 8.9	43.9 ± 19.1	26.0 ± 5.0
Overall severity : numbers(%)				
Severe	5 ( 10.2)	2 ( 3.0)	-	-
Moderate	38 ( 77.6)	17 ( 25.8)	-	-
Mild	6 ( 12.2)	47 ( 71.2)	-	-
Total	49 (100.0)	66 (100.0)	-	-

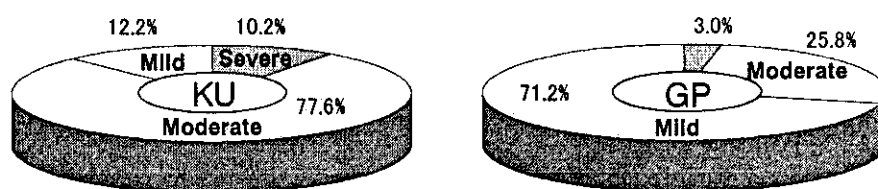


図 1 対 象

### Contact-plate technique

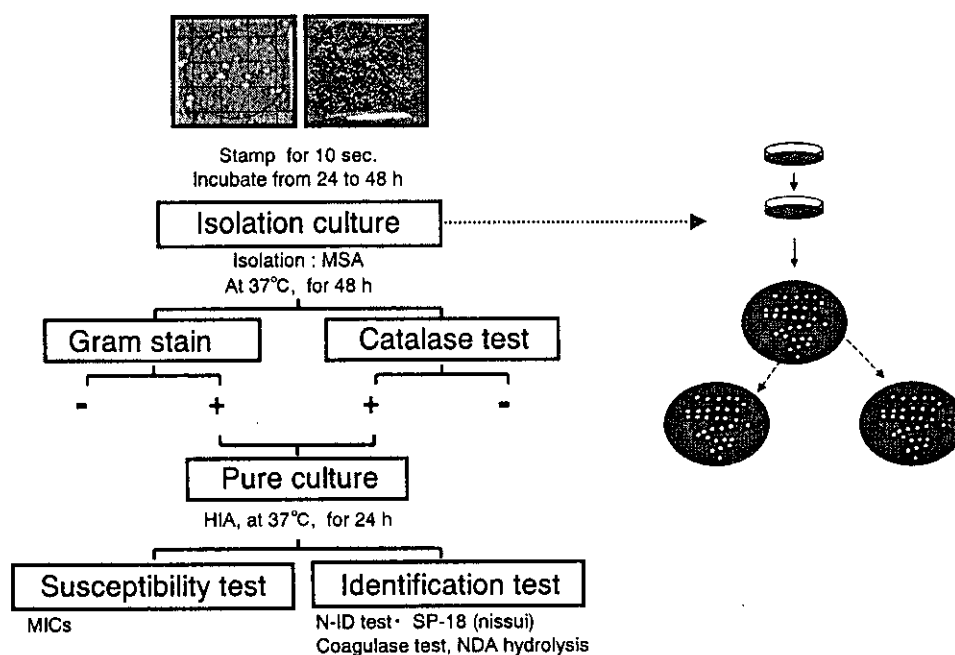


図 2 ブドウ球菌の分離・同定試験

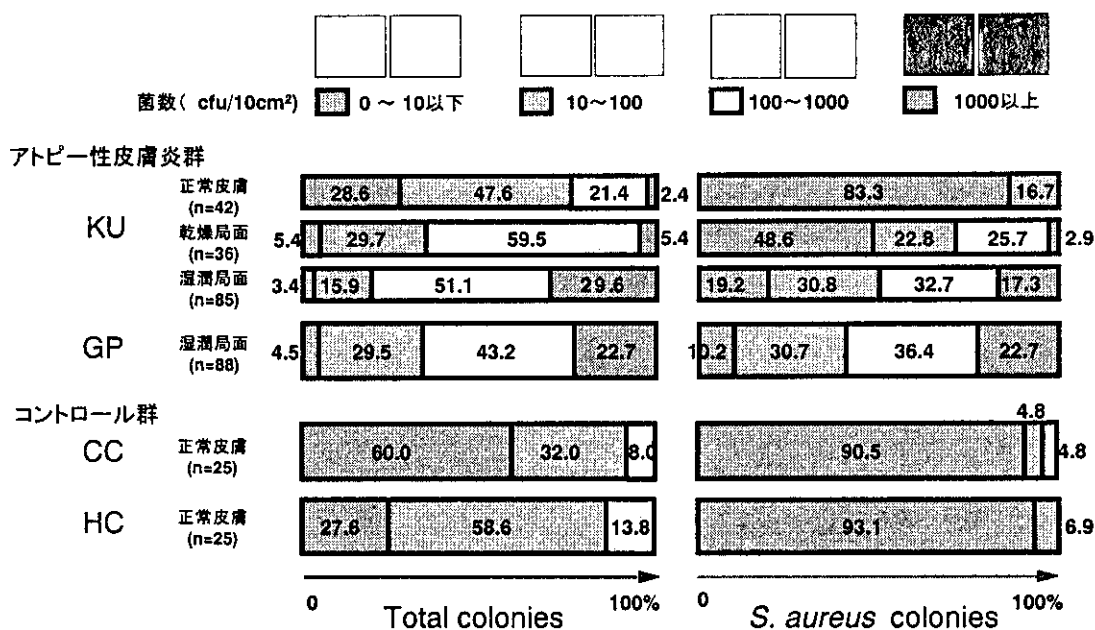


図3 コンタクトプレート法による皮膚表在菌数の比較

アトピー性皮膚炎(KU,GP)の皮膚表面からは多数の菌が検出され、重症局面ほど総菌数も黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)数も多い(湿潤局面>乾燥局面>正常部位)。

表1 皮膚表面から分離・同定されたブドウ球菌

	KU	GP	CC	HC
<i>S.aureus</i>	144 (85.2)	50 (51.5)	20 (74.1)	6 ( 6.5)
<i>S.epidermidis</i>	3 ( 1.8)	0 ( 0.0)	3 (11.1)	47 (51.1)
<i>S.warneri</i>	7 ( 4.1)	26 (26.8)	3 (11.1)	10 (10.9)
<i>S.xylosus</i>	3 ( 1.8)	4 ( 4.1)	0 ( 0.0)	13 (14.1)
<i>S.haemolyticus</i>	8 ( 4.7)	4 ( 4.1)	0 ( 0.0)	1 ( 1.1)
<i>S.cohnii</i>	1 ( 0.6)	3 ( 3.1)	1 ( 3.7)	4 ( 4.3)
<i>S.saprophyticus</i>	0 ( 0.0)	5 ( 5.2)	0 ( 0.0)	3 ( 3.3)
<i>S.hominis</i>	1 ( 0.6)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	4 ( 4.3)
others	2 ( 1.2)	5 ( 5.2)	0 ( 0.0)	4 ( 4.3)
Total	169 (100.0)	97 (100.0)	27 (100.0)	92 (100.0)

Numbers (%)

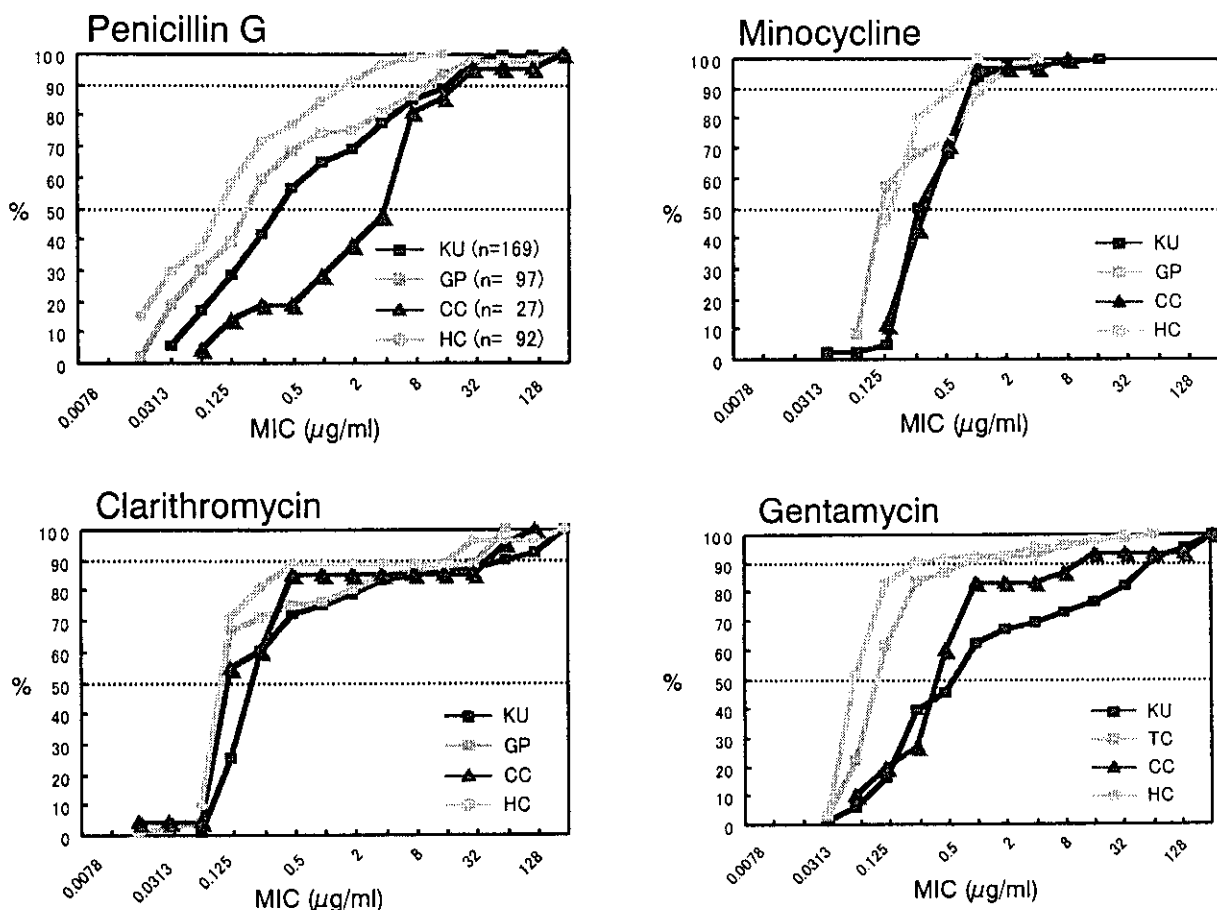


図 4 皮表から分離されたブドウ球菌(staphylococci)の薬剤感受性 (累積百分率曲線)

皮表から分離したブドウ球菌の感受性をMIC<sub>90</sub>と比較すると、健常人群に比べ、疾患群(KU,GP,CC)の方が高い傾向を示した。特にゲンタマイシンについては、健常人群(0.25µg/mL)や罹病期間の短い軽症のアトピー性皮膚炎群(1µg/mL)に比べ、罹病期間の長い成人型のアトピー性皮膚炎群(64µg/mL)や平均年齢の高い他の皮膚疾患群(16µg/mL)の方が高い。

表 2 ceramide を栄養原とする培地中での生存菌数

		numbers	%
Atopic dermatitis	KU	19 / 169	11.2
	GP	12 / 97	12.4
Clinical control	CC	2 / 27	7.4
Healthy control	HC	9 / 92	9.8

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：アトピー遺伝子とそれに及ぼすウイルス感染の影響

氏名 分担研究者 近藤直実

所属機関 岐阜大学医学部小児科・教授

**研究要旨** アレルギーの発症機序ならびにその病態、および病因遺伝子を解明する目的でアレルギー患者における Th1 および Th2 系のサイトカインの動態を検討し、その結果より考えられる遺伝子レベルでの異常について検討した。対象者の末梢血単核球分画を IL-12、IL-18 あるいは PHA で刺激し誘導される IFN-gamma の産生量を比較したところ、いずれの刺激においてもコントロール群に比較しアレルギー群では IFN-gamma の産生量は低い傾向にあった。さらにアレルギー患者の中に、いずれの刺激においても IFN-gamma が十分に産生されない症例が存在した。これらの症例は IFN-gamma の低下が遺伝子発現レベルで起こっている可能性があることが明らかとなった。一方、インフルエンザウイルス感染直後には、IFN-gamma の産生が低下し、同様に遺伝子発現レベルでおこなっていることが明らかとなった。

青木美奈子 岐阜大学医学部小児科大学院  
松井永子 岐阜大学医学部小児科助手  
金子英雄 岐阜大学小児科講師  
寺本貴英 岐阜大学医学部小児科助手  
渡辺みづほ 岐阜大学医学部小児科大学院  
吉川かおり 岐阜大学医学部小児科大学院  
笠原貴美子 岐阜大学医学部小児科

#### A. 研究目的

アレルギーの発症に関わるサイトカインの機能を明らかにし、その発症に関与するとおもわれる遺伝子変異を同定し、診断及び治療に応用する目的で、IFN-gamma に着目し、その機能および遺伝子変異について検討した。

#### B. 研究方法

アレルギー患者、および健常人の末梢血より末梢血単核球分画（以下PBMCs）を分離し1) 無刺激、IL-12、IL-18、PHAにて刺激し、24時間培養後、培養上清中のIFN-gamma、IL-2をそれぞれELISA法で測定した。2) IL-12、IL-18、PHAのいずれの刺激においてもIFN-gammaの産生が低値の症例を選択し、そのIFN-gamma messenger RNA の発現量についてMIMIC法を用いて検討した。3) またそれらの症例についてゲノムDNAを抽出し、IFN-gamma遺伝子のプロモーター領域の遺伝子変異の有無について検討した。4) さらにインフルエンザウイルス感染直後と回復後について上記と同様の検討を行った。

（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

血清IgEとPHA刺激したPBMCsにおけるIFN-gamma産生量の関係について検討した。血清IgEとIFN-gamma産生量は負の相関を示し、IFN-gammaはIgEの産生に対して抑制的に働いていると考えた。

IL-18はIL-12と共にTh1の分化誘導およびIFN-gamma産生誘導の中心的役割を担い、IgE産生抑制系に重要な役割を果たしていると考えられる。そこでPBMCsをIL-12、IL-18で刺激し、そのIFN-gamma産生について検討した。IL-12刺激によるIFN-gamma産生量とIL-18刺激によるIFN-gamma産生量は正の相関を示した。

IL-12、IL-18刺激によるIFN-gamma産生とPHA刺激によるIFN-gamma産生とそれぞれ比較した。IL-12刺激におけるIFN-gamma産生とPHA刺激によるIFN-gamma産生は正の相関を示し、IL-18刺激によるIFN-gamma産生とPHA刺激によるIFN-gamma産生も正の相関を示した。

PHA刺激、IL-12刺激、IL-18刺激におけるIFN-gamma産生量を比較したところ、PHA刺激、IL-12刺激におけるIFN-gammaの産生量はコントロール群に比較しアレルギー群で優位に低い傾向を示した(図1)。さらに、アレルギー患者のなかで、IL-12、IL-18、PHAのいずれの刺激においてもIFN-gammaが十分に産生されない症例が認められた(表1)。

それらの症例の培養上清中のIL-2を測定したところ、IL-2産生量はコントロールと同程度であったため、IFN-gammaが十分に産生されない原因として遺伝子及びその発現レベルでの異常が示唆された。

そこで、IFN-gammaのmRNAレベルでの産生量をMIMIC法を用いて検討した(図2)。その結果、IFN-gammaの産生量の低下はmRNAレベルで起こっていることが明らかとなった。

インフルエンザウイルス感染時において、感染直後にはIFN-gamma産生が低下しており回復後にはその値は回復した。さらに、これもmRNAレベルで起こっていることが示された。

この結果に基づき、IFN-gamma遺伝子の発現を調節する領域での遺伝子変異の有無について検討した。IL-12、IL-18のシグナル伝達経路はIFN-gammaのプロモーターに至るまで共通経路はなく(図3)、IFN-gammaのプロモーターにはSTAT, AP-1, NF- $\kappa$ Bなどの機能発現調節に重要な部位が存在していることより、この部位に共通の遺伝子変異がないか検討した。現在のところ、有意な遺伝子変異は同定されていないが、今後、その他の部分についても検討を進めていく予定である。

#### D. 考察

アレルギー患者において、IFN-gamma産生量は低い傾向を示し、IgE産生の抑制機構が破綻しアレルギーの病態を引き起こすことは、以前より明らかとなっているが、IL-12、IL-18にて誘導されるIFN-gammaの産生量もアレルギー患者においては低い傾向を示した。またその低下はmRNAレベルで起こっていることが明らかとなった。また、IFN-gammaの発現を調節する領域、とくにプロモーター領域に着目し遺伝子変異の有無について検討したが、現在のところ有意な変異は認められていない。文献的にはIFN-gamma遺伝子の1st intronのCA繰り返し配列数を検討し、13繰り返し配列がアレルギー患者において優位に高いとの報告もあるため、今後IFN-gamma遺伝子の発現調節機構に関わる因子とアレルギー発症との関係についてさらに検討をすすめていく。

さらに、インフルエンザ感染時のIFN-gamma産生の低下から、遺伝的に規定された異常と環境刺激による異常が共通の機構で発現している可能性も示された。

#### E. 結論

IL-12、IL-18、PHA のいずれの刺激においても、IFN-gamma の産生量が低下している症例が存在し、それは遺伝子発現レベルで起こっている可能性があること、およびインフルエンザウイルス感染時のIFN-gamma産生低下も同様に遺伝子発現レベルで起こっていることが明らかになった。

#### F. 研究発表

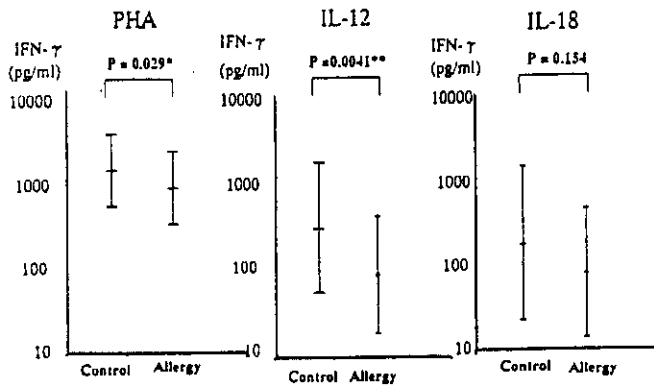
##### <論文発表>

- (1) Kondo N, Fukutomi O, Agata H, Motoyoshi F, Shinoda S, Kobayashi Y, Kuwabara N, Kameyama T, Orii T. The role of T lymphocytes in patients with food-sensitive atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 91:658-668.1993
- (2) Kondo N, Matsui E, Kaneko H, Fukao T, Teramoto T, Inoue R, Watanabe M, Aoki M, Kasahara K, Morimoto N. Atopy and mutations of IL-12 receptor beta 2 chain gene. *Clin Exp Allergy.* 31,1189-1193.2001
- (3) Kondo, N., Matsui, E., Kaneko, H., Fukao, T., Teramoto, T., Inoue, R., Watanabe, M., Kasahara, K., Morimoto, N. Reduced interferon-gamma production and mutations of the interleukin-12 receptor beta(2) chain gene in atopic subjects. *Int Arch Allergy Immunol* 124, 117-120 (2001)

##### <学会発表>

- (1) 青木美奈子、松井永子、金子英雄、渡辺みづほ、田中洋子、木全かおり、鈴木清高、伊上良輔、寺本貴英、加藤善一郎、笠原貴美子、近藤直実：  
アレルギー患者におけるIFN- $\gamma$ プロモーター領域における遺伝子多型の検討。日本小児アレルギー学会(第38回)(2001年9月6日、小倉)
- (2) 近藤直実、松井永子、金子英雄、伊上良輔、加藤善一郎、青木美奈子、渡辺みづほ、坂口平馬、鈴木清高、田中洋子、吉川かおり、笠原貴美子：  
シンポジウム：喘息発症における遺伝因子と環境・感染との関わり(遺伝子生態医学)。日本アレルギー学会総会(第51回)(2001年10月30日、福岡)
- (3) Kondo N：国際学会シンポジウム：Clinical and genetic research of food allergy in childhood. The 9<sup>th</sup> Korea-Japan Joint Allergy Symposium (2001 November 2-3, Jeju Island, Korea)

<図1>

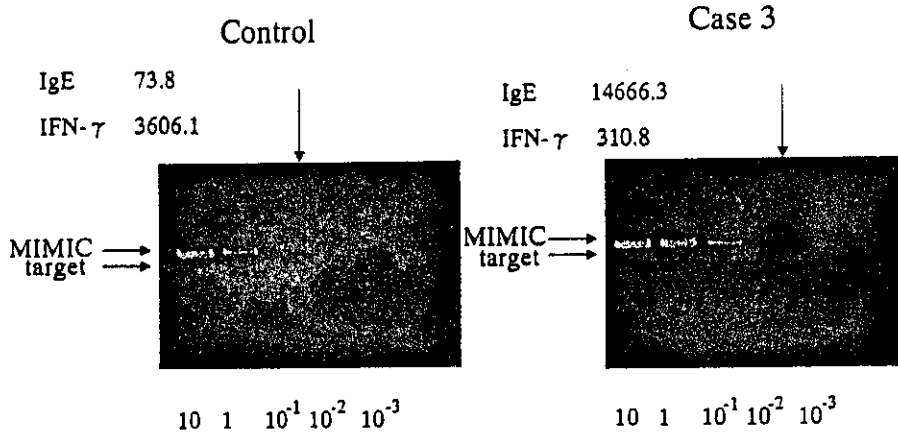


<表1>

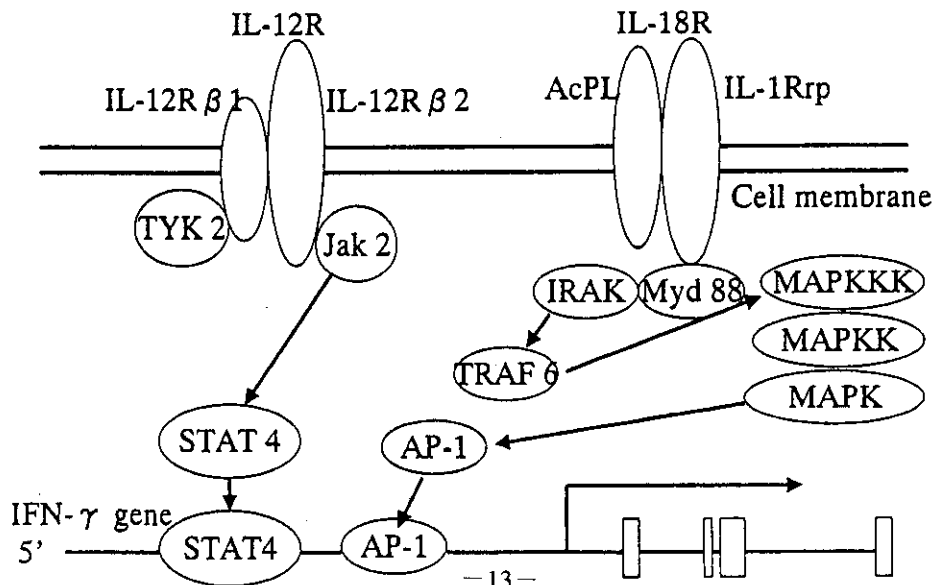
アレルギー患者のうちIL-12,IL-18,PHA刺激におけるIFN- $\gamma$ の産生量が低値の症例

No.	名前	年齢	性別	IgE	RAST	最高値	症状	IFN- $\gamma$ (pg/ml)		IL-2 (U/ml)	
								IL-12刺激	IL-18刺激	PHA刺激	PHA刺激
1	K.M	28	M	2889	6	AD	15.6	15.6	463.8	1.392	
2	K.K	4	F	3782	6	AD	87.9	39.5	926.3	3.254	
3	Y.H	1	F	14666.3	6	AD	80	130	310.8	2.154	
4	S.S	19	F	15000	5	AD	66.5	15.6	269.8	1.64	
5	N.R	9	M	517.5	6	BA	15.6	15.6	199.8	5.436	
6	K.R	8	M	907	6	BA	25.4	15.6	165.3	1.037	
7	E.T	3	F	996.5	6	BA	16.5	21.5	137.2	1.445	
8	S.Sa	9	F	1500	6	BA	15.6	60.8	646.8	1.019	
9	H.M	10	F	1581.6	2	BA	15.6	27.3	530.5	1.108	
10	K.T	5	M	1200	6	AD+BA	36.8	15.6	856.2	1.214	
11	K.Ta	5	M	5400	6	AD+BA	76.3	20	706.3	35.981	
Normal range								(54.1-2328.4)	(20.2-1667.3)	(605.3-3498.3)	(1.15-66.8)

<図2> IFN- $\gamma$  m-RNAの発現量の比較



<図3> IL-12,IL-18のシグナル伝達経路とIFN- $\gamma$ 遺伝子の構造



**アレルギー性疾患に係わる胎内・胎外因子の同定に関する研究**  
**—サイトカインと胎外因子—**

分担研究者：大田 健 （帝京大学医学部内科教授）

気管支喘息の病態形成にかかわるサイトカインとして線維芽細胞増殖のprogression factorであるIGF-Iの関与検討することを試みた。抗原特異的な気管支喘息のマウスモデルを作成し、IGF-Iの作用を中和することにより、気道炎症および気道のリモデリングにどのような影響を与えるかを評価した。OA+alumで免疫し、OA特異的IgE抗体を誘導後、OA吸入によりIGF-Iの産生が増加するが、IGF-Iの作用を抑制すると炎症細胞浸潤および気道過敏性の亢進が抑制された。IGF-Iは喘息の病態形成時に気道炎症および気道リモデリン形成の両者に関与していることが示唆された。

研究協力者：山下直美（帝京大学医学部内科助教授）、中野純一（帝京大学医学部内科講師）、金子富志人（帝京大学医学部助手）

**A. 目的** 喘息の増加に関与している胎内・胎外因子を明らかにし、アレルギー性疾患の予知予防に役立てることが、当該研究班の主題である。我々は、その中で喘息の発症に関連する非アレルギー的側面である臓器過敏性—気道過敏性に焦点を絞って研究を進めてきた。気道過敏性は気管支喘息の病態形成の重要な因子であり、その獲得には遺伝的因子と後天的因子として胎内、胎外因子、サイトカイン、増殖因子が関与している。本研究では、各種因子の関与をマウスのモデルを用いて明らかにすることを目的とした。昨年度は線維芽細胞の増殖因子のcompetence factorのPDGFの関与を検討し、気道過敏性の亢進および気道リモデリング形成に関与していることを報告した。今年度は、さらに抗原特異的に発症する喘息モデルで線維芽細胞の増殖因子とし

てprogression factorであるIGF-Iについて検討を進めた。

**B. 方法** A/JマウスおよびBalb/cマウスを用いて検討した。OA曝露群は予めOA+alumで免疫し、OA特異的IgE抗体を誘導した。OA特異的IgE抗体はELISA法を用いて測定した。OA20mg/mlの10分間吸入し、気道炎症を惹起した。マウスは以下5群に分けて検討した。

1) コントロール群 2) OA全身免疫群 3) OA全身免疫+OA吸入群 4) OA全身免疫+OA吸入+aIGF-I 5) OA全身免疫+OA吸入+mIgG (sham control) 気道過敏性はアセチルコリン(Ach)吸入前後の気道抵抗をプレシスモボディボックス法で検討し評価した。肺胞洗浄液(BALF)を採取し、細胞数、細胞分画を検討した。IGF-Iの産生は特異的プライマーを用いてRT-PCRおよびreal-time PCRをもちいて定量した。蛋白はwestern blot法で検討した。

肺の線維症モデルとしてはC57b1/6マウスにシリカを点鼻したモデルを用いた。



C. 結果 OA吸入により、気道局所に好酸球を中心とする炎症細胞の浸潤を認め、気道過敏性の亢進を示した。気道抵抗は気管切開を行うで拘束法で5mg/ml Ach吸入後、コントロール群 ( $144 \pm 11.4\%$ ,  $n=5$ ) に対しOA吸入群 ( $203 \pm 17.3\%$ ,  $n=5$ ) に有意に上昇した。無拘束法にても50mg/ml Ach吸入後500%に有意に上昇した。Ach吸入前の気道抵抗はコントロール群とOA吸入群で差異がなく、比較の簡便さのため、気道抵抗はAch吸入前の値に対する%表示を用いた。さらに、OA全身免疫のみの群では気道過敏性の亢進を認めなかった。OA吸入群ではIGF-IのmRNAの誘導および蛋白(western blot法)を検出した(図1)。OA吸入期間にIGF-Iの作用を中和抗体で抑制すると、気道抵抗の上昇が2.5および5mg/ml Ach吸入時の両者で有意に抑制された( $p < 0.01$ ) (図2)。BALFを検討すると、好酸球を中心とする炎症細胞浸潤がa-IGF-I投与群では細胞浸潤も著明に抑制された(図3)。この炎症細胞の減少がアポトーシス誘導によるかを検討する目的でつぎに、BALF細胞中のアポトーシス細胞の割合をPI染色およびAnexinV染色しフローサイトメトリーで検討した。aIGF-I中和抗体投与群で、アポトーシス細胞はBALF中5%で増加は認めなかった。

IGF-Iが作用するには、IGFBPが関与している。IGFBP3は特に単独で平滑筋および線維芽細胞の増生にも関与していることが報告されている。肺のmRNAを抽出し、cDNAアレイをもちいて発現を検討すると、IGF-I受容体mRNAの発現はOA吸入、OA吸入+aIGF-I投与で増加を認めなかった。IGFBP3はOA吸入群で増加し、aIGF-I投与群では減少傾向を認めた(図4)。

OA特異的IgE抗体価はOA吸入+shamIgG群とOA吸入+aIGF-I投与群で差異を認めなかった。病理組織像を検討すると、aIGF-I投与群ではOA吸入群と比較して気道粘膜下の細胞浸潤および基底膜部の肥厚線維化が抑制された(図5)。

肺の線維化に対してIGF-Iの中和が効果を発揮するかを検討する目的でシリカを用いた肺線維症モデルについて、IGF-I中和抗体の効果を検討した。シリカ点鼻投与と同時に抗IGF-I中和抗体を全身投与した。2週間後、肺を摘出し、肺の膠原線維量をハイドロキシプロリンを定量することにより評価した。図5に示すようにハイドロキシプロリン量はシリカ投与により上昇するが、aIGF-I投与群では抑制される傾向を示した(図6)。

D. 考察 IGF-Iは線維芽細胞のprogression factorであるが、他にT細胞の増殖、アポトーシスの抑制などにも関与する因子である。今回、IGF-Iを中和することにより、線維化のみでなく気道炎症も抑制できた。BALF中の細胞のアポトーシスをフローサイトメトリーで検討したが、aIGF-I投与群にアポトーシス細胞が増加している所見は得られなかった。接着分子ICAM-1の発現を検討したが、OA吸入群で血管内皮および気道上皮でのICAM-1の発現が亢進するが、aIGF-I投与群で発現が抑制される傾向を示し、IGF-Iが接着分子発現亢進を介して、好酸球浸潤を増強し、気道炎症惹起に関与している可能性も考えられた。また、IGF-IはIGFBP3とコンプレックスを作成が調整されること、さらにIGFBP3単独でも気道平滑筋や線維芽細胞増生の方向に働くことが知られている。本喘息モデルでも、OA吸入後、肺のIGFBP3mRNAの発現増加を認め、aIGF-I中和抗体投与群では

低下傾向を認めている。FreeのIGF-Iを中和することによりさらにIGFBP3の発現も抑制する方向に働き全体として炎症を抑制を抑制する方向に働いている可能性も考えられる。

今回のaIGF-Iの投与群では気道炎症も抑制したので、気道リモデリングに対する直接効果は不明であった。しかし同時に線維化の究極のモデルといえるシリカ投与により誘導された線維症についてはこのaIGF-Iが線維化抑制に働く知見を得た。そこで、喘息の気道リモデリングでの線維化抑制に直接関与しているかについてもさらに検討を進めている。

**E. 結論** 喘息においてIGF-Iは気道炎症および気道リモデリング惹起に関与していると考えられた。

#### **D. 業績**

誌上報告

Miyamasu M, Sekiya T, Ohta K et al: Variations in the human CC chemokine eotaxin gene. *Gene Immun* 2:461-3,2001.

Nagase H, Kudo K, Ohta K et al: Chemokine receptor expression profile eosinophils at inflamed tissue sites: Decreased CCR3 and increased CXCR4 expression by lung eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 108:563-569,2001.

Yamashita N, Sekine K, Ohta K et al: Platelet-derived growth factor is involved in the augmentation of airway responsiveness through remodeling of airways in diesel exhaust particulate-treated mice. *J Allergy Clin Immunol* 107:135-141, 2001

Iwasaki T, Yamashita N, Ohta K et al: Atopic NC/Nga mice as a model for allergic asthma. *J Vet Med Sci* 63:413-419,2001.

Ohta K, Yamashita N, Nakano J et al. In vivo effects of apoptosis in asthma examined by murine model. In *Arch Allergy Immunol* 124:259-261,2001

Ken Ohta Apoptosis and Its Induction in Eosinophils Activated with IL-5.

*ACI International*, 13: 262-267: 2001

大田 健 気道リモデリング *Medical Practice*, 18 (5) : 791-793 : 2001

山下直美、大田 健 気管支喘息の動物モデル p88~93 *Annual Review 呼吸器* 2001 中外医学社

Ken Ohta *Obstructive Lung Disease. Internal Medicine*,40:162-164:2001

学会報告

Yamashita N, Arai H, Ohta K et al. Fibrogenic cytokine production by airway epithelial cell. *American Thoracic Society Meeting San Francisco* 2001

山下直美、大田 健: シンポジウム 気道過敏性とサイトカイン 第41回呼吸器学会 東京  
大田 健: シンポジウム 第41回炎症学会 東京

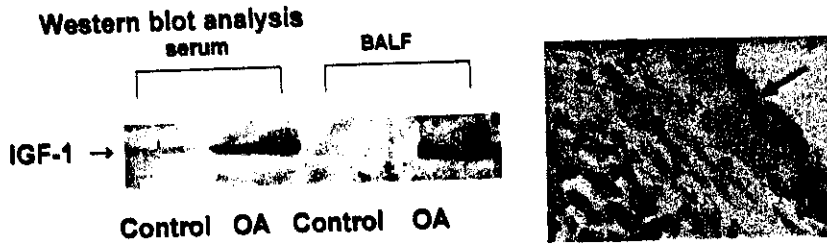
倉持美知雄他: 気道上皮細胞からのPDGF産生 第41回日本呼吸器学会総会, 東京, 2001

新井秀宜他: 気道リモデリングと気道過敏性の関連についての検討 第86回臨床呼吸生理研究会, 東京, 2001

田下浩之: マウス喘息モデルにおける樹状細胞関連ケモカインの発現についての検討 第51回日本アレルギー学会総会, 福岡, 2001

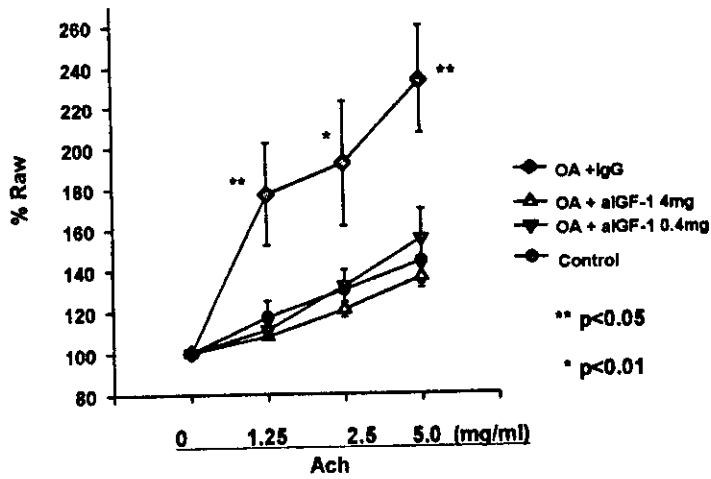
☒ 1

### IGF-1 synthesis



☒ 2

### Bronchoconstriction induced by acetylcholine



☒ 3

### BALF cell analysis

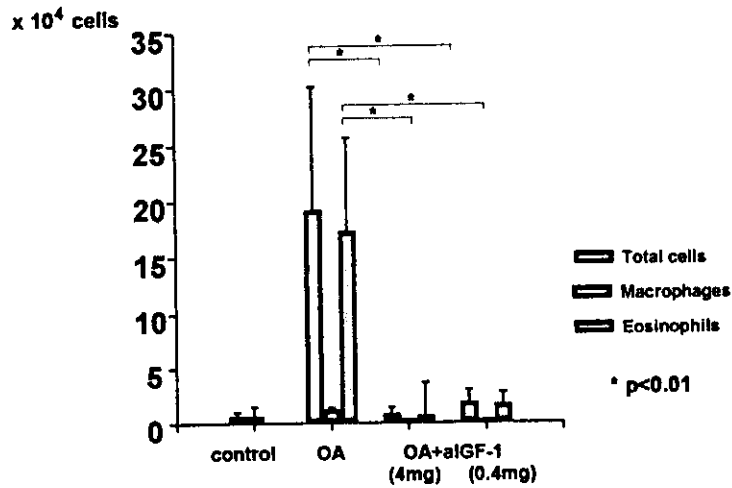


图4

### mRNA expressions

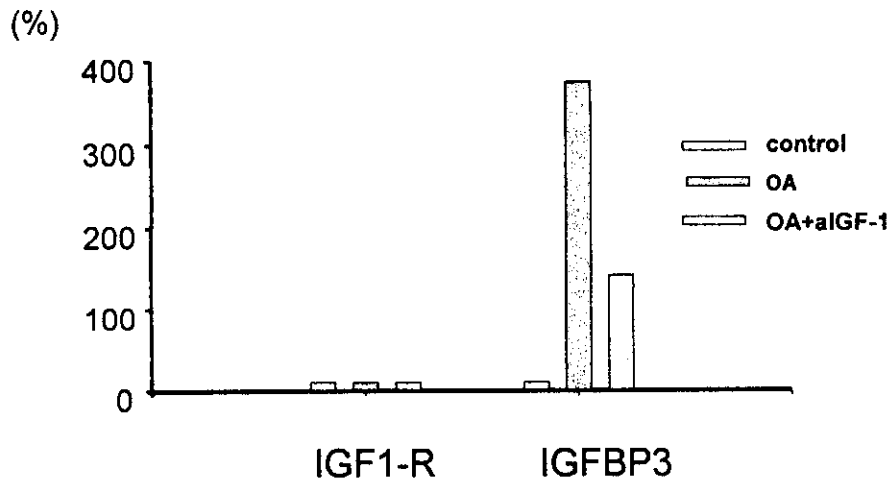


图5

### EVG stain



图6

