

## 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

-胎内感染および母乳中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

アレルギー発症に及ぼす胎内因子として胎内感染および早期の胎外因子として母乳の影響について開始した。胎内感染の影響は多数例の疫学的検討を施行中である。母乳の影響は母乳中サイトカインの面から検討した。アレルギー家族歴の出生後の早期の胎外因子として母乳に注目し、母乳中サイトカインの面からアレルギー発症との関連について検討した。母乳中には多くのサイトカインが検出される。TGF- $\beta$ 1には免疫抑制作用があり、母乳中のTGF- $\beta$ 1は経口免疫寛容に関与しアレルギーを寛解に働く可能性が考えられる。また、IFN- $\gamma$ はIgE産生に抑制的に働きTh1を促進するサイトカインである。母乳中のTGF- $\beta$ とIFN- $\gamma$ を測定し、児のその後のアレルギー発症との関連について検討した。2才までのアレルギー発症例で母乳中TGF- $\beta$ 1が低値だったことから、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ると考えられた。

### 研究協力者

松原知代（山口大学医学部小児科助教授）

市山高志（山口大学医学部小児科講師）

### A. 研究目的

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、アレルギー疾患の発症に関与する胎内因子として胎内感染に注目してきた。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interferon gamma (IFN- $\gamma$ )産生CD3陽性Tリンパ球が高値を示した。Th1リンパ球

から産生されるIFN- $\gamma$ は、Th2リンパ球からのIgE産生を抑制することから、胎内感染での臍帯血IFN- $\gamma$ 産生CD3陽性Tリンパ球は、その後の早期のアレルギー疾患発症を減少させる可能性について報告した（平成12年度報告書）。今年度は、アレルギー発症との関連について、胎内感染が及ぼす影響について多数例の解析による疫学的検討を開始した。ついで出生後の早期の胎外因子として母乳に注目し母乳中サイトカインの面から検討した。

母乳中にはinterleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), transforming growth factor- $\beta$ 1

(TGF- $\beta$ 1) および IFN- $\gamma$  などのサイトカインが検出される。TGF- $\beta$ 1には免疫抑制作用があり、母乳中のTGF- $\beta$ 1は経口免疫寛容に関与しアレルギーを寛解に働く可能性が考えられる。また、IFN- $\gamma$ はIgE産生に抑制的に働きTh1を促進するサイトカインである。

アレルギーのある母親の母乳中にはTh2サイトカインであるIL-4, IL-5, IL-13が高値であることなどが報告されているが、実際にその母乳を摂取した児のその後のアレルギー発症に関する報告はみられない。また、母乳栄養とアレルギーとの関連では、母乳栄養が発症を抑制するとの報告と栄養法とは関連がないとする報告が多数あり結論が出ていない。研究者らは母乳中のTGF- $\beta$ とIFN- $\gamma$ を測定し、児のその後のアレルギー発症との関連について検討した

## B方法

### I 胎内感染が及ぼす影響に関する検討

1998年4月-1999年3月に山口県の産科病院で出生した児約1,000人について、その後のアレルギー疾患発症の有無を郵送法によりアンケート調査を行った。

調査項目は1) アレルギー疾患発症の有無、内容および発症時期および2) 妊娠分娩時の母体合併症(早期のウイルス感染症、周産期のウイルス感染症、周産期の細菌感染症)3) 新生児期の感染症の有無(臨床的敗血症)、4)

両親、兄弟のアレルギー家族歴である。

### II 母乳中サイトカインに関する検討

#### 1) 母乳中サイトカインおよびsecretory IgA (sIgA)測定

平成9年6月-8月に山口県内産婦人科医院にて出生した合併症のない児の母親32人から初乳および1ヵ月時の母乳を採取した。採取した母乳を20,000gで4℃、30分遠心分離し、脂肪を除去して上清(乳清)中のTGF- $\beta$ 1とIFN- $\gamma$ はR&D社のキットを用いてsandwichELISAで、乳清中sIgAはMDL社のsIgAテストキットを用いてEIAで測定した。

#### 2) アレルギー疾患発症の追跡調査

母乳中サイトカイン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、アレルギー性鼻炎など)発症の有無について電話による追跡調査を行った。追跡は平成12年2月と平成13年8月に2回施行した。

## C結果

### I 胎内感染が及ぼす影響に関する検討

現在追跡調査中である。

1998年4月-7月出生の児は251例だった。その児の中で、アレルギー家族歴のある児は46例(18.3%)、胎内感染(臨床的敗血症)併発例は16例(6.4%)だった(表1)。

### II 母乳中サイトカインに関する検討

#### 1) アレルギー疾患発症との関連:

(1) 平成12年2月(平均2.2才時)の第1回調査結果

第1回調査では、アレルギー疾患発症例は7例(21.9%)だった。アレルギー発症の母乳(1ヵ月時)中のTGF- $\beta$ 1は非発症例に比し有意に低値だった(表2)。発症例のIFN- $\gamma$ は非発症例に比し低い傾向がみられたが統計学的有意差はみられなかった。sIgAは差はみられなかった。

(2) 平成13年8月(平均3.3才時)の第2回調査結果

第2回調査で追跡しえた20例(62.5%)のうちアレルギー疾患の発症は12例(60%)だった。アレルギー疾患発症例と非発症例で母乳中(初乳、1ヵ月)のTGF- $\beta$ 1、IFN- $\gamma$ およびsIgAについてはすべて差がみられなかった(表3)。

D 考察および今後の展望

I 胎内感染が及ぼす影響に関する検討

アレルギー家族歴は、児のアレルギー疾患発症に影響を及ぼすことから、1)アレルギー家族歴のある例および2)アレルギー家族歴のない例に分類し、児のその後のアレルギー疾患発症への胎内感染の影響について検討すべきと考えられる。胎内感染併発の頻度は約10%以下と低く、さらに多数例での検討を施行する予定である。

II 母乳中サイトカインに関する検討

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は経口免疫寛容に関与する可能性があり、2才までのアレルギー発症例で母乳中TGF- $\beta$ 1が低値だったことから、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ると考えられた。

E 研究発表

学会発表

1) 古川 漸:アレルギーと感染の接点 第38回日本小児アレルギー学会. 2001. 10.7 北九州

2) Tomoyo Matsubara: Effect of infections in atopic disorders Annual Congress of Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory atopy disease 2001, 10 21, Seoul

F 知的所有権の取得状況

なし

表1 1998年4月-7月出生の児251例の内訳

	アレルギー家族歴	
	あり	なし
胎内感染		
あり	5	11
なし	41	194

表2 母乳(1ヵ月時) TGF-β1 値と児のアレルギー  
第1回調査時(平均2.2才時)

児のアレルギー	n	TGF-β1 pg/ml	IFN-γ pg/ml	secretory IgA μg/ml
あり*	7	124.1 ± 27.4	5.6 ± 2.5	171.7 ± 74.5
なし	25	442.9 ± 513.2	9.9 ± 5.7	233.1 ± 120.5
p		0.002	0.058	0.305

\* bronchial asthma 4, atopic dermatitis 2, egg allergy 1

表3 母乳(1ヵ月時) TGF-β1 値と児のアレルギー  
第2回調査時(平均3.3才時)

児のアレルギー	n	TGF-β1 pg/ml	IFN-γ pg/ml	secretory IgA μg/ml
あり*	12	251.4 ± 184.2	7.8 ± 5.5	265.9 ± 137.6
なし	8	396.5 ± 547.2	9.4 ± 5.0	185.8 ± 80.3
p		0.699	0.331	0.364

\* bronchial asthma 7, atopic dermatitis 3, allergic rhinitis 5

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

皮膚バリア障害の検討 第2報 — アトピー性皮膚炎モデルマウス (DS-Nhマウス) における光媒反応を用いた皮膚バリア障害による皮膚炎発症促進の試み —

分担研究者 池澤善朗 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) モデルマウスの一つである DS-Nh マウスは、conventional 境下で飼育すると皮膚炎の出現に先立って黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の増殖が皮表に認められる。このマウスにアナターゼ型酸化チタン含有軟膏を塗布後長波長紫外線 (UVA) を照射して皮表で光触媒反応を惹起し、皮膚バリア障害と *S. aureus* 感染および皮膚炎発症の関係を検討した。酸化チタン+UVA 照射群では無処置群と比較して皮疹の発症は2週間早く 12 週齢で皮疹が出現し、14 週齢以降は著しい皮疹が認められた。皮表の *S. aureus* の増加は無処置群より2週間早く14 週齢で認められた。白色ワセリン+UVA 照射群やUVA 照射のみの群では酸化チタン+UVA 照射群のような明らかな皮疹の発症促進効果はみられなかった。経表皮水分蒸散量は酸化チタン+UVA 照射6時間後から上昇し、18 時間後には処置前の約3倍に増加した。以上より、光触媒反応は皮膚のバリア機能障害をきたすことにより皮膚炎の発症を促進し、さらに皮表の *S. aureus* 増殖を促進して皮膚炎の重症化をきたしたと考えられた。

研究協力者:

佐藤一郎 横浜市立大学医学部皮膚科助手  
松倉節子 横浜市立大学医学部皮膚科医員  
相原道子 横浜市立大学医学部皮膚科講師

型 (アナターゼ、ルチル、ブルカイト) があり、アナターゼ型が高い光活性を有する。アナターゼ型酸化チタンに 400nm 以下の紫外線を照射すると活性酸素が産生され、強い酸化力によりすべての有機物は酸化分解される。今回、この動物モデルの皮表で光触媒反応を惹起することにより、皮膚バリア障害と *S. aureus* 感染および皮膚炎発症の関係を検討した。

B. 研究方法

アナターゼ型酸化チタン (以後酸化チタン) を白色ワセリン (サンホワイト) に 1mg/g の濃度で混和したものを DS-Nh マウス (10 週齢、conventional 環境下で飼育) に塗布し、長波長紫外線 (UVA) を 10J/cm<sup>2</sup> 照射する処置を週1回施行した。経時的に、皮疹の発症時期を観察するとともに皮疹の程度を 0-4 の5段階でスコア化し、皮表の *S. aureus* の分離培養 (黄色ブドウ球菌選択培地を用いたスタンプ法)、皮膚の経表皮水分蒸散量 (TEWL) の測定、皮膚生検、血清 IgE 値測定 (EIA 法) を行った。DS-Nh マウスに酸化チタン塗布のみ施行した群では皮疹の発症や皮表の *S. aureus* 数に影響を与えないことを確認したため、今回の実

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎 (以下 AD) 患者では、バリア機能が低下した皮膚で黄色ブドウ球菌 (以下 *S. aureus*) が増殖し、それが何らかの機序を介して AD の発症ないし悪化に関与している可能性が考えられている。アトピー性皮膚炎モデルマウスの一つである non-hair マウスである DS-Nh マウスは、conventional 環境下で飼育すると 15 週以降に掻痒を伴うアトピー性皮膚炎様の皮膚炎を自然発症し、さらに皮膚炎の発症から遅れて血清 IgE が上昇する。このマウスでは皮疹の出現に先立って黄色ブドウ球菌が皮表に認められるようになるため、その皮膚炎発症には *S. aureus* 感染が重要な役割を果たしていると考えられる。一方、光触媒反応とはある物質にある波長の光が当たると活性化して強い酸化力を有する状態になることをいう。実際の光触媒物質としては酸化チタンが用いられるが、酸化チタンには3種類の結晶

験のコントロールは白色ワセリン処置群、白色ワセリン塗布後 UVA 照射群、UVA 照射群、無処置群とした。また、黄色ブドウ球菌選択培地に培養した *S. aureus* に 1mg/ml の酸化チタン溶液を塗布して UVA を 10J/cm<sup>2</sup> 照射し、その抗菌活性を測定した。

### C. 研究結果

培地上の黄色ブドウ球菌を 1mg/ml 酸化チタンと UVA で処理したところ、無処理のものと比較してコロニー数は約半数に減少したが著減は認められなかった。よって、抗菌力はこの濃度では弱いものと考えられた。

無処置群では 14 週齢で軽微な皮疹が、16 週齢から紅斑・落屑・びらんなど明らかな皮疹が認められるのに対し、酸化チタン塗布後 UVA を照射した群(光触媒反応群)では発症が 2 週間早まり 12 週齢で皮疹が出現し、14 週齢以降は著しい皮疹が認められた(図1)。白色ワセリン処置群では無処置群より皮疹の出現時期が 19 週齢と遅く、またその程度も軽度であった。

皮表の *S. aureus* 数を測定すると、光触媒反応群では無処置群と比較して 2 週間早く 14 週齢で菌数の増加が認められた。これに対し白色ワセリン塗布群では無処置群より 4 週間遅れて 20 週齢で菌数が増加した(図2)。

マウスの無疹部の皮膚に酸化チタン塗布後 UVA を照射し、TEWL の変化を測定した。酸化チタン塗布単独では TEWL の変化は認められなかったが、UVA を照射した光触媒反応群では 12 時間以降 TEWL の増加が認められ、18 時間後には処置前の約 3 倍に増加した(図3)。以上より光触媒反応による皮膚バリア障害をきたしたのと考えられた。

血清 IgE 値は無処置群と光触媒反応群で差は認められなかったが、白色ワセリン処置の群では明らかな低下が認められた。白色ワセリン塗布後 UVA を照射した群や UVA 照射のみの群では光触媒反応群のような明らかな皮疹の発症促進効果はみられなかった(表1)。皮疹部の生検ではいずれの群でも表皮肥厚や真皮上層の炎症細胞浸潤などの湿疹反応が認められた。

### D. 考察

光触媒反応はその強い酸化力により殺菌作用を有し、アナターゼ型酸化チタンのプレートに紫外線を照射した場合には活性酸素の産生によりプレート上の菌はほぼ 100% 除菌されると報告されている。しかし今回の実験に使用した酸化チタン濃度では培地上で約 50% の除菌率であり、マウス皮表ではむしろ増菌効果を示した。これは、酸化チタンの光触媒反応による有機物分解反応が皮膚バリア障害を生じ、その結果常在細菌叢に変化が生じて *S. aureus* の増殖を引き起こしたと考えられた。皮疹との関係では、皮疹出現時期が *S. aureus* の増加時期より先行したことから光触媒反応による皮膚バリア障害が皮疹の出現を早め、その後 *S. aureus* の増殖によりさらに皮疹が増悪したのと考えられた。白色ワセリンを塗布したマウスでは皮疹の発症と *S. aureus* の増殖の抑制がみられ、皮膚バリア機能の維持が皮疹発症抑制に重要であることが示唆された。

*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である enterotoxin (SE)、toxic shock syndrome toxin-1 (TSST) は AD 患者末梢血 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。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。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ている。AD 患者皮膚における *S. aureus* の増殖は湿潤した皮疹部のみでなく皮膚バリア機能の障害された乾燥部位でも認められることをわれわれは報告している。今回の実験では、マウスに人為的に皮膚バリア障害を生じさせることにより皮疹の発症の早期化と重症化をきたしたことから、ヒトの AD においても同様の機序が働くものと考えられる。

### E. 結論

光触媒反応はアトピー性皮膚炎モデルマウスである DS-Nh マウスの皮膚のバリア機能障害をきたすことにより皮膚炎の発症を促進し、さらに皮表の *S. aureus* 増殖を促進して皮

膚炎の重症化をきたしたと考えられた。これに対し、白色ワセリンの塗布は *S. aureus* の増殖と皮疹の発症・増悪を抑制した。

以上より、アトピー性皮膚炎の発症・増悪における皮膚バリア障害とそれに引き続く *S. aureus* 増殖の関与の重要性が

示唆されるとともに、治療におけるスキンケアの有用性が示唆された。

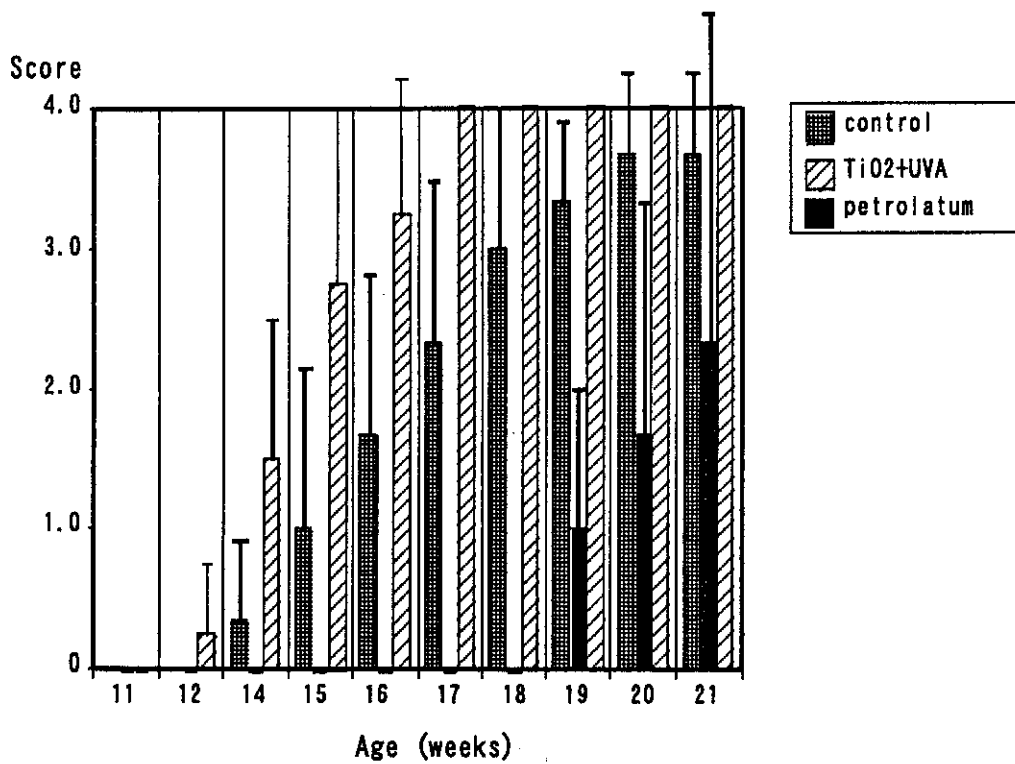


図1. 皮疹スコアの推移

Cfu/10 cm<sup>2</sup>

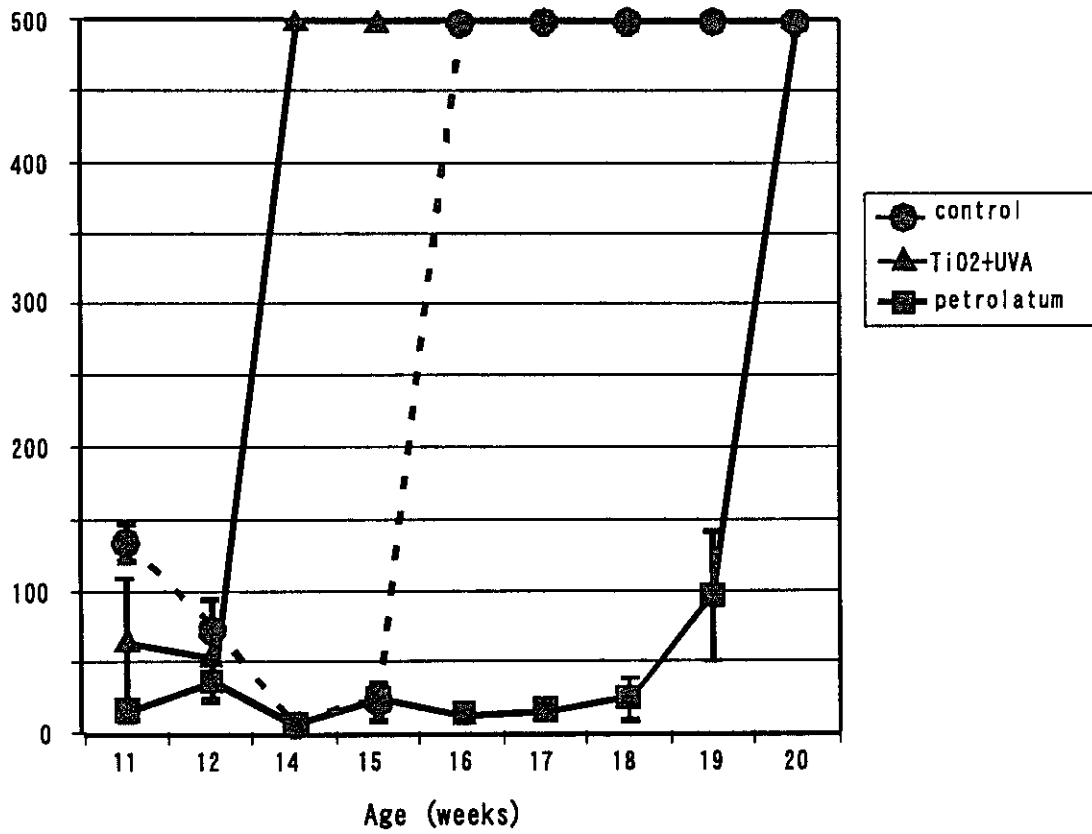


図2. 皮表の黄色ブドウ球菌数の推移

TEWL (g/hm<sup>2</sup>)

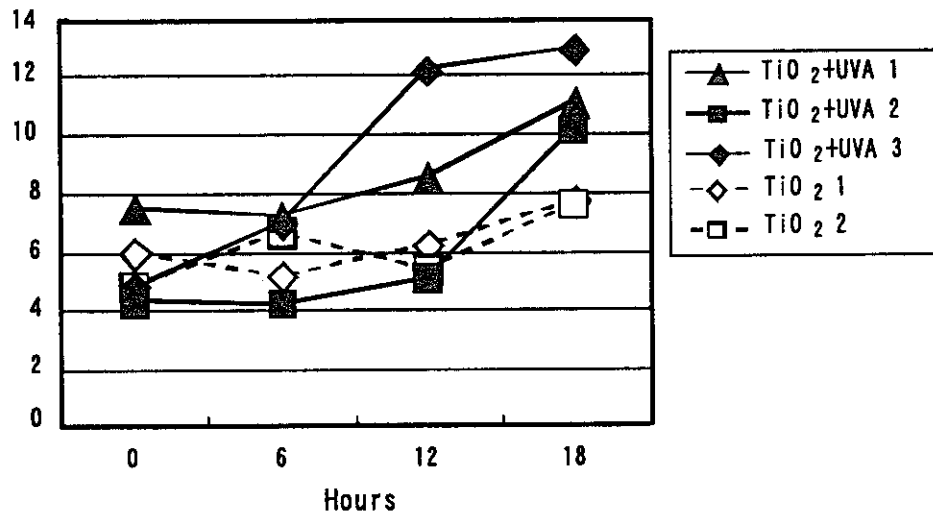


図3. 光触媒処置後のTEWLの推移



表1 白色ワセリンおよび酸化チタン塗布後 UVA 照射の影響

	mean of TEWL (g/hm <sup>2</sup> )*	mean of <i>S. aureus</i> (Cfu/cm <sup>2</sup> )	mean of skin score
TiO <sub>2</sub> +UVA (10 week-old)	4.73	259	0.25
TiO <sub>2</sub> +UVA (17 week-old)	7.03	>1000	4
Pet+UVA (10 week-old)	3.95	140	0.25
Pet+UVA (17 week-old)	3.80	50	1.5

4 mice of each group

\* non-lesional skin

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、IgE 値は 3p24.1、5q33.1、12q24 と、カモガヤ RAST 値は 4p16.1、11q14.3、16 p 12.3 ( $p < 0.001$ )と連鎖していた。連鎖の程度は全般に低く、ロッド値3を越える高いピークはみられなかった。観察された連鎖領域の大半は、これまでに気管支喘息の全ゲノム連鎖解析で報告された部位と共通するものであった。また、この領域には、IgE 産生やアレルギー性炎症反応の調節に関与する重要な遺伝子が多数存在する可能性が示唆されている。カモガヤ花粉症の候補遺伝子は、気管支喘息のそれと同様に、TH2 免疫反応に関与する抗原非特異的遺伝子の可能性が考えられた。

#### 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・北歐人でアトピーと2qter、6p21.3、9pter-9qter、12q13との連鎖を報告した。

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）にみられることを報告した。その他、6p22-p21.3（MLD=2.13）、12q21-q23（MLS=1.92）、13q14.1-q14.3（MLS=1.93）にも弱い連鎖が認められることを報告した。その結果から、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された。

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査し、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。

## 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。

**【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得た。

## C 研究結果

図1に連鎖解析の結果を示した。臨床症状は1p36.2、4q13.3、9q34.3の3領域と連鎖していた(suggestive linkage)。血清IgE値は

3p24.1、5q33.1、12q24の3領域と連鎖していた。カモガヤRAST値と連鎖がみられたのは、4p16.1、11q14.3、16p12.3( $p < 0.001$ )であった。また、ロッド値3を越える強い連鎖領域は一方も観察されなかった。また、カモガヤ花粉症は極めて抗原特異性の高い疾患であるが、6P23HLA領域との連鎖は認められなかった。表1に連鎖領域とピークロッド値のマーカーをまとめて示した。

## D 考察

今回の研究では、5q33領域は花粉症と気管支喘息の唯一共通する連鎖領域であった。この領域は、cytokine gene clusterと呼ばれる領域であり、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いる。今回の研究でも、この領域は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可能性が示唆された。

5q31-q33以外の領域、1p36.2、3p24、4p16.1、4q13.3、9q34.3、11q14.3、12q24、16p12は日本人の小児喘息患者では連鎖がみられなかった領域である。これまでの全ゲノム解析の結果と今回のカモガヤ花粉症の結果を表2にまとめてしめた。1p36は、この表中では連鎖を示すものはないが、OberらはHutteriteのsecond generation panelで1p36との連鎖を報告している。3p24はHutter教徒における全ゲノム解析で気管支喘息との連鎖がみられた領域である。4p16.1は高IgE症候群やダニアレルギーと連鎖することが報告されている。11q14.3はこれまでにアトピーとの関連が示唆されている高親和性IgE Fcレセプター遺伝子のある11q13の近傍である。12q24は多くの連鎖解析で喘息・アトピーとの連鎖が報告されている候補領域である。16p12.3はAustralia白人で報告されている。このように比較してみると4q13.3、9q34.3の2領域はカモガヤ花粉症と連鎖する新たな領域と思われる

る。

6p23HLA との連鎖が確認されなかったことは、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。

## F 健康危険情報

特になし。

## G 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yokouchi Y, Shibasaki M, Noguchi E, Nakayama J, Ohtsuki T, Kamioka M, Yamakawa-Kobayashi K, Ito S, Takeda K, Ichikawa K, Nukaga Y, Matsui A, Hamaguchi H, Arinami T. : A genome-wide linkage analysis of orchard grass-sensitive childhood seasonal allergic rhinitis in Japanese families. *Genes Immun.* 3:9-13,2002.
2. Noguchi E, Yokouchi Y, Shibasaki M, Kamioka M, Yamakawa-Kobayashi K, Matsui A, Arinami T.: Identification of missense mutation in the IL12B gene: lack of association between IL12B polymorphisms and asthma and allergic rhinitis in the Japanese population. *Genes Immun.* 2:401-3 2001
3. Noguchi E, Nukaga-Nishio Y, Jian Z, Yokouchi Y, Kamioka M, Yamakawa-Kobayashi K, Hamaguchi H, Matsui A, Shibasaki M, Arinami T.: Haplotypes of the 5' region of the IL-4 gene and SNPs in the intergene sequence between the IL-4 and IL-13 genes are associated with atopic asthma. *Hum Immunol.* 62:1251-7.2001
4. Noguchi E, Shibasaki M, Inudou M, Kamioka M, Yokouchi Y, Yamakawa-Kobayashi K, Hamaguchi H, Matsui A, Arinami T.: Association

between a new polymorphism in the activation-induced cytidine deaminase gene and atopic asthma and the regulation of total serum IgE levels. *J Allergy Clin Immunol.* 108 ; 382-6. 2001

### 2. 学会発表

1. Shibasaki M. Yokouchi Y. Noguchi E. Yamakawa-Kobayashi K. Takeda K. Ichikawa K. Matsui A. Nukaga Y. Arinami T. A genome-wide linkage analysis of *Orchard* pollenosis in Japanese children. World Congress on Lung Health: 11<sup>th</sup> ERS Annual Congress, Berlin, 29 Sep, 2001
  2. 石沢美佳、市川邦男、柴崎正修、松井 陽。卵アレルギー患児における麻疹ワクチンの反応についての検討。第 13 回日本アレルギー学会春期臨床集会（横浜）2001
  3. 柴崎正修、横内裕佳子、野口恵美子、竹田一則、市川邦男、小林公子、有波忠雄、松井 陽。カモガヤ花粉症の全ゲノム解析。第 38 回日本小児アレルギー学会（北九州）2001
  4. 野口恵美子、柴崎正修、竹田一則、市川邦男、小林公子、松井 陽、有波忠雄、濱口秀夫。AICDA 遺伝子変異と喘息発症との関連研究。第 51 回日本アレルギー学会（福岡）2001
  5. 柴崎正修。小児気管支喘息の全ゲノム解析。シンポジウム「気管支喘息と遺伝」。The 9<sup>th</sup> Symposium of Asthma in Tokyo（東京）2001
- ## H 知的財産権の出願・登録状況
- 特になし。

図1 カモガヤ花粉症の全ゲノム解析

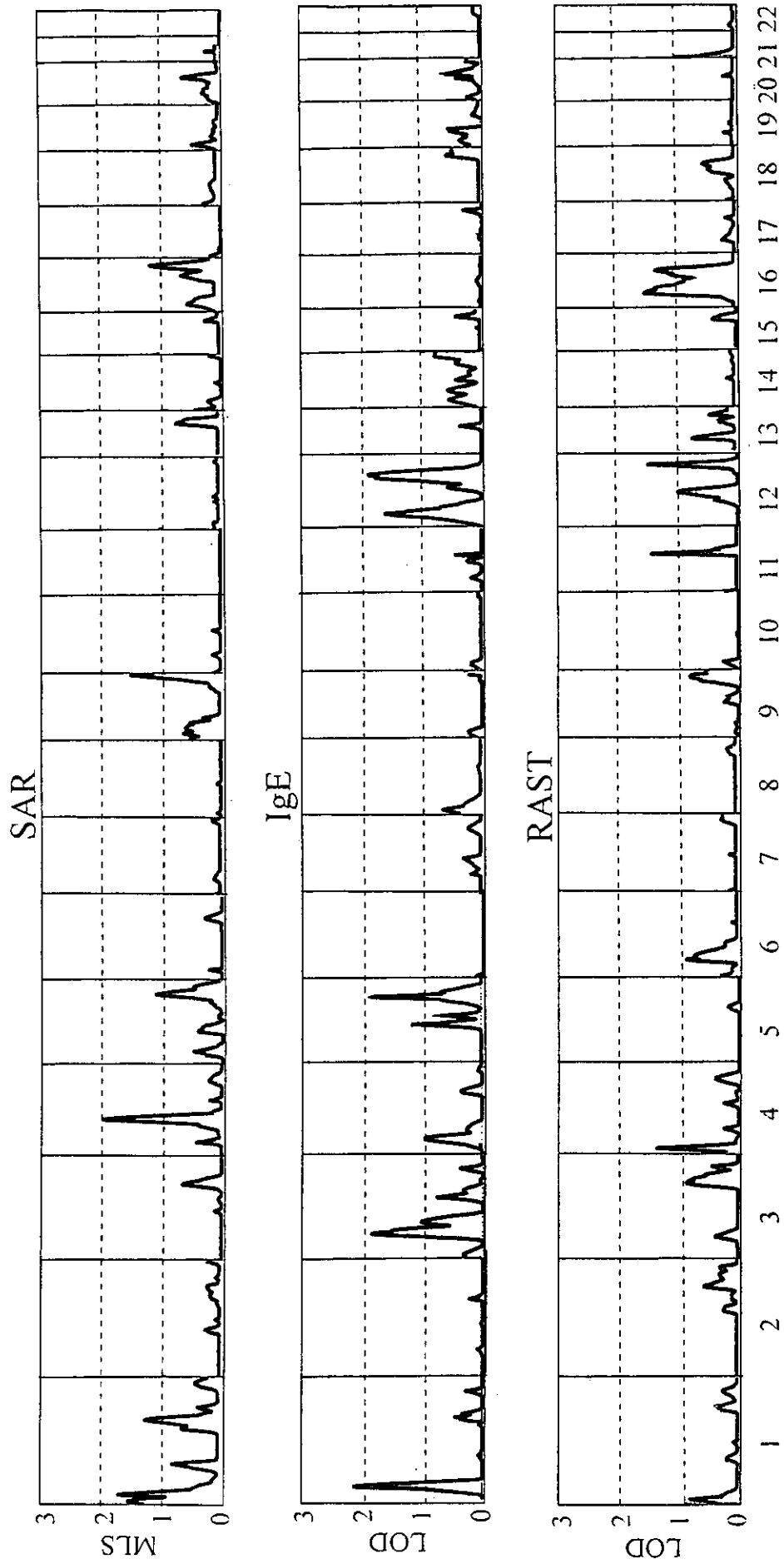


表1 連鎖陽性領域のまとめ

Chromosome	Marker	SAR		RAST		IgE	
		MLS	p	LOD	p	LOD	p
1 p 36.22	D12S2667	1.7*	<0.001			1.85**	<0.001
3 p 24.1	D3S1266						
4 p 16.1	D4S2935			1.47*	<0.001		
4 q 13.3	D4S392	2.01*	<0.001				
5 q 33..1	D5S410					1.92**	<0.001
9 q 34.3	D9S1826	1.52*	<0.001				
11 q 14.3	D11S4175			1.38*	<0.001		
12 p 13.1	D12S364					1.55*	<0.001
12 q 24.23	D12S86					1.83**	<0.001
16 p 12.3	D16S3046			1.41*	<0.001		

\*\*significant and \*suggestive evidence for linkage. P: empirical p value at the marker

表2 これまでに気管支喘息のゲノム解析で報告された陽性連鎖領域との比較

Chr.	Australian	CSGA	German	Hutterites	French	Japanese	Finnish	Orchard pollenosis
1			1q36		1p31			1p36.2
2		2q33	2pter 2q32					
3				3p24.3-p22				3p24.1
4	4q35		4q32-q35			4q35	4q23-q24	4p16.1 4q13.3
5		5p15 5q23-q31		5q23-q31		5q31-q33		5q33.1
6		6p21.3-p23	6p25-p21			6p22-p21.3		
7	7p15.7		7pter-p15				7p14-p15	
8								
9			9q32					9q34.3
10								
11	11q13	11p15	11q25		11p13 11q13			11q14.3
12		12q14-q24.2	12q13-q21	12q15-q24.1	12q24	12q21-q23		12q24
13	13q14	13q21.3-qter			13q31	13q14-q14.3		
14		14q11-q13						
15			15p					
16	16q22-q24							16q23.3
17		17p11.			17q12-q21			
18								
19		19q13		19q13	19q13			
20								
21		21q21		21q21				
22								
X,Y								

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

アレルギー疾患の発症に関する疫学的研究

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

昨年度の疫学的検討によって喘息の発症要因として、母親が喘息であること、誕生月が1, 2, 3月以外であることが認められた。また、予後に関連する因子として、血清のIgE値が関連することを報告した。今年度は、さらに、この誕生月の季節的因子が喘息の発症にどのように関与するのかについて更に検討を進めた。また、血清のIgE値の関連に付いても検討した。具体的には福岡市に3地区5小学校の1年生対して、問診票による調査を実施し、その誕生月と喘息の発症との関連に付いて検討した。また、背景因子の内、今年度は、胎内因子として親のアレルギー疾患の病歴、また、季節と関連する因子として、感染の関与について分析した。その結果、母親が喘息であること、さらに、感染、特に2歳までの感染の既往歴と喘息の発症との間に関連も見られることが分かった。これに基づいて、多施設の検討を行なうことにし、その検討を開始した。

研究協力者

野間 剛 北里大学小児科講師

森川みき JR仙台病院小児科医長

川野 豊 横浜赤十字病院小児科部長、

渡辺美砂 東邦大学医学部小児科

大柴晃洋 東京医科歯科大学小児科

本村知華子、佐藤 弘 国立療養所南福病院小児科

#### 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効な問診項目とその活用方法を検討し、胎内・胎外の因子を究明すること、および得られた項目の有効な対策方法を検討することを目的とする。

#### B. 研究方法

福岡市内3地区5小学校で1年生419人、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

を経年的追跡した疫学調査データを分析し、発症、予後との関連を検討する。また、疫学調査による胎外因子の検討結果を整理し、前方視的検討で確認できる項目を検討した。

小学校1年生419人で、誕生月と気管支喘息の発症率について検討し、関連があればどのような機序によるのかを、明らかにする。今年度の問診票としては国際、小児喘息およびアレルギー疾患調査（ISAAC）のものをを用いた。

①予後に関する検討：昨年度の検討で血清IgE値が200~300を中心としてその前後で予後に相違がみられた。これについて今年度は更に福岡市内3地区6小学校での疫学調査結果について分析検討し例数を増やして確認する。スギとダニのRASTスコアについては2を境に予後に相違が認められたがこれについても同様に確認する。②年齢と予後に関する検討：昨年度の検討ではアレルギー性の因子としての血清IgE値の予後に関する関与は、小学校2, 3年生について統計的に明らかであった。これが一般的なのか、そうであれば、何故そのような結果になるのか、について検討する。③肺機能と予後に関する検討：肺機能は予後に関しては昨年度の検討では明らかではなかった。しかし、過去にける検討では予後との間に一定の関係が認められたこともある。今年度の結果と合わせて検討する。④気管支喘息発症に関する検討：昨年度の検討では気管支喘息の発症率は誕生月と関連がみられ、特に低年齢における



気管支喘息の発症は春に生まれた者に少なかった。これについての多数での確認を行なう。⑤呼気中のNOと予後に関する検討：喘息患者の気道炎症の目安として、呼気中のNOの測定が有用であると報告されている。発症および予後との関連について検討する。⑥また、アレルギー疾患の発症に関して明らかなもの、性別、家族歴との関連を検討する。

C, 結果：①血清のIgEおよびRASTスコアと臨床経過との関連については昨年同様IgEは約250を境として予後との関連があった。RASTスコアについても2を境にして区切って考えてよいと思われた。②今回の呼気中のNOについての検討ではすべての年齢層において同様の傾向がみられるが、気管支喘息以外の合併症による影響が無視できなかった。しかし、結論的には、気道傷害の考えられるアレルギー疾患は鼻アレルギーをい含めて同様の値を示していた。③肺機能では今年度はその予後との関連傾向がみられた。特に末梢気道の指標とされるV50、V25に関してその傾向がみられた。④小児の気管支喘息はアレルギー因子の関与が臨床症状の変化において大きな要素を占めていることが分かった。⑤呼気中のNOは血清IgEとの相関が強く、予後とは僅かに関連がみられるのみであった。⑥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誕生月に関する検討では、今年度は、ISAACの間診票を用い、昨年用いられたATS-DLD間診票によって得られたと同じ傾向が扱られるかについて検討した。そのために独自の診断基準を設け、これによって小学校1年生について、健康児を含めて分析し、頻度として有症率を検討した。診断基準は「あなたのお子さんは今までに胸がゼーゼー、ヒューヒューといったことがありますか」「あなたのお子さんは今までに喘息といわれたことがありますか」のどちらにも「はい」と答えたもので、全児童に対する割合を有症率とした。また、初めて言われた時の年齢を発症年齢とした。年齢が上になると様々な因子の関与が増加すると推定されるので、2歳まで、3歳までに区切って検討した。その結果、喘息有症率と誕生月に関しては昨年と同様の傾向が認められた。しかし、僅かな変動もみられた(図1)。2歳までの呼吸器感染の無い者の数と喘息の頻度の間には鏡面像を示す関係がみられた(図2)。そこで3歳までの喘息有症率と上気道感染の関係を求め

ると、 $r = 0.448$ の相関傾向がみられた(図3)。また、喘息有症率と2歳までの上気道感染との間にも $r = 0.372$ の関連がみられた。そこで、例数を増やして検討するために、過去の2年間に遡って、3歳までの喘息の有症率と2歳までの呼吸器感染、および喘息有症率と2歳までの呼吸器感染との関連を検討し、相関関係にあることをみいだした(図4)。

今年度は福岡市内の小学校で検討していたが、福岡市での偏りが結果に関与している可能性も推定されるため、多施設での検討を行なうことを企画した。

#### D, 考察

昨年同様、今年度の結果でも、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た。

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比較的明らかなものとして感染がある。我々は経験的に集団保育に入ると頻繁な感染、発熱があることを知っている。保育形態に関する興味を持たれるが、環境が良好と推定される地域においても、低年齢の感染と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。

今年度の検討では、喘息に特徴的な気道の感染との関連を検討する為の、試験的検討として上気道感染の問題を取り挙げ、これと喘息の有症率について検討した。しかし、年齢がうえになると、多くの体外因子の関与が否定できない。そこで、2歳、3歳に区切って感染の関与について検討した。昨年度まではATS-DLDの調査について分析し、秋特に11月生まれの者に関しては喘息の発症が多いことをみいだしていたので、今年度はISAACの間診票の結果も同様のことが言えるかどうかについて検討した。しかし、ISAACの間診票ではその診断の基準がATS-DLDと異なる為、その診断基準について検討した。その結果、方法の項で述べたように基準を設定することで、間診票の相互間の整合性が得られやすい可能性が推定されたので、この基準を用いて喘息を診断し、これによってISAAC法での喘息の頻度についての検討をおこなうことにした。

その結果、昨年に引き続いて、誕生月と喘息の有症率の間に関連が見られることが分かった。そこでこの月別の有症率の推移に関して考察し、最も可能

性のあるものとして、生後早期の感染の可能性を考え、特に喘息の場合には上気道感染が昨年までの検討で推定されたため、これについて検討した。発症年齢によっても関与の仕方が異なると推定されたので、始めは6歳までの発症者について検討し、関与が推定されたので、さらに3歳までの発症者について検討した。

しかし、現在までの問診の状態では関与がこれ以上の分析ができない。また、諸外国の報告では、牧場で育ったものでは喘息が少ない、犬を子供が生まれる以前から飼っていると喘息が少ないなど、また、かえって、幼少児期に感染があったほうが喘息の頻度は少なくなるなどの仮説が散見される。以上の点から、さらに詳細な検討を行なうには、生後、早期の条件を詳細に検討する必要があることが推定される。そのためには、より詳細な前方視的検討が必要である。さらにその検討のためには、どのような感染が関与するのかを、分析予測する必要がある。さらにウイルス感染か、細菌感染か、ウイルスの種類は何か、不顕性感染の場合にはどうなるかなどの分析も必要になってくる。そのために、どのような問診が必要になるのかについてお検討しなければならぬ。次年度はそのような観点からも検討を加えようと考えている。

## 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、これについての因子の一つとして上気道の感染が大きなものであることが分かった。今後更に、どのように関与するのか、またその詳細に関しては生後早期の状態に関して、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疫学的な検討を行ないたい。

## 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)小田嶋 博：小児喘息における最新疫学事情、*Allergy 21<sup>st</sup> Century*, 6:10-12,2001.
- (2)西尾 健、小田嶋 博、西間三馨：呼気中NOからみた気道炎症と気道過敏性との関連、*日小ア誌*, 15 (1): 21—25、2001.
- (3)森川みき、小田嶋 博、大浦敏博：アレルギー

疾患患児におけるプロフィリン特異 IgE 抗体についての検討、*日小ア誌*, 15 (1): 112—117、2001.

- (4)小田嶋 博、久田直樹、水元裕二、浜崎雄平、熊本俊則、有山昭典、藤野時彦、宮里善次、木葉万里江、西間三馨：乳幼児におけるテオフィロンドライシロップの投与法について、一クリアランスと年齢、発作、発熱およびCRP値との関連についての検討— *日本小児アレルギー学会誌*, 15 (2): 227-234、2001.

- (5)小田嶋 博：気管支喘息とその周辺、*運動誘発喘息、呼吸と循環*, 49 (6): 515—523、2001.

- (6)小田嶋 博：思春期および20代早期の喘息の実態と対策、*アレルギー科*, 12 (1): 55—64、2001.

- (7)小田嶋 博：気管支喘息児と運動、学校体育について、*日本小児アレルギー学会雑誌*, 15 (3): 263—272、2001.

- (8)本村知華子、小田嶋 博、西間三馨：小児中葉症候群と気管支喘息の関連、*日本小児アレルギー学会雑誌*, 15 (3): 285—291、2001.

- (9)竹中 洋、小田嶋 博、小林隆弘、前島一仁：21世紀の大気汚染、環境と気道疾患、アレルギー、30: 3—18、2001.

- (10)小田嶋 博：疫学調査票の比較ならびにISAAC第III相試験に関する研究、公害研究被害補償予防協会委託業務報告書、同一地域、同一方法による小児気管支ぜん息等の動向把握と比較検討に関する研究報告、2000年度版、p.27-84.

### 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、第13回日本アレルギー学会春季臨床大会、横浜、2001.

- (2)小田嶋 博：小児喘息の実態とコントロール—特に学校で—長崎小児科医会、長崎2001年4月

- (3)小田嶋 博：抗アレルギー薬とearly intervention小児気道アレルギー研究会、名古屋、2001年4月

- (4)小田嶋 博：乳児喘息の臨床上の注意点、第6回鳥取県小児アレルギー研究会 平成13年6月

- (5)小田嶋 博：小児喘息治療戦略～学童でのQOL向上のために～第38回日本アレルギー学会 2001年10月6日、北九州市

- (6)本村知華子、田中能文、東川昌紀、西尾 健、中尾文也、岡田賢司、小田嶋 博、西間三馨：気管支喘息において吸入ステロイドが骨密度、骨代謝に与える影響 第38回日本アレルギー学会 2001年

10月日、北九州市

(7)小田嶋 博：シンポジウム、喘息の動向と変動要因—疫学的観点から—日本アレルギー学会総会 2001年10月29日、福岡

(8)小田嶋 博：小児喘息の発症予知、予防と気道過敏性 気道アレルギー研究会、2001年11月11日、大阪

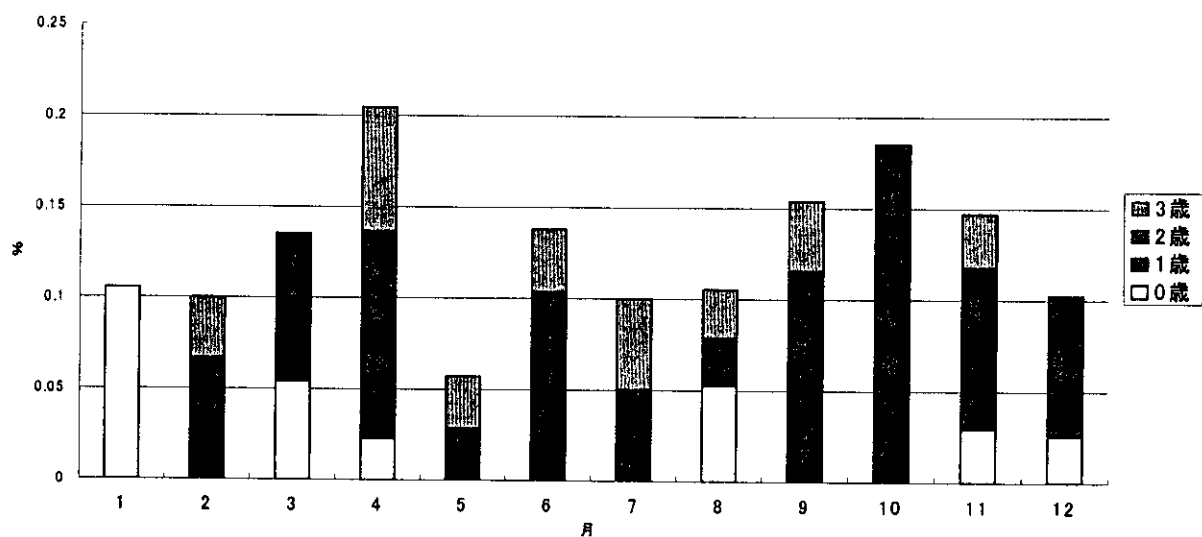
(9)小田嶋 博：シンポジウム、喘息の動向と変動要因—疫学的観点から—日本アレルギー学会総会、2001年10月29日、福岡

H、知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

今回は相当するものは得られなかった。

図1：誕生月と喘息有症率

誕生月と喘息発症年齢（2000年度1年生）



2、2歳までの呼吸器感染の有無の誕生月別推移

2歳までの呼吸器感染の有無の誕生月別の頻度

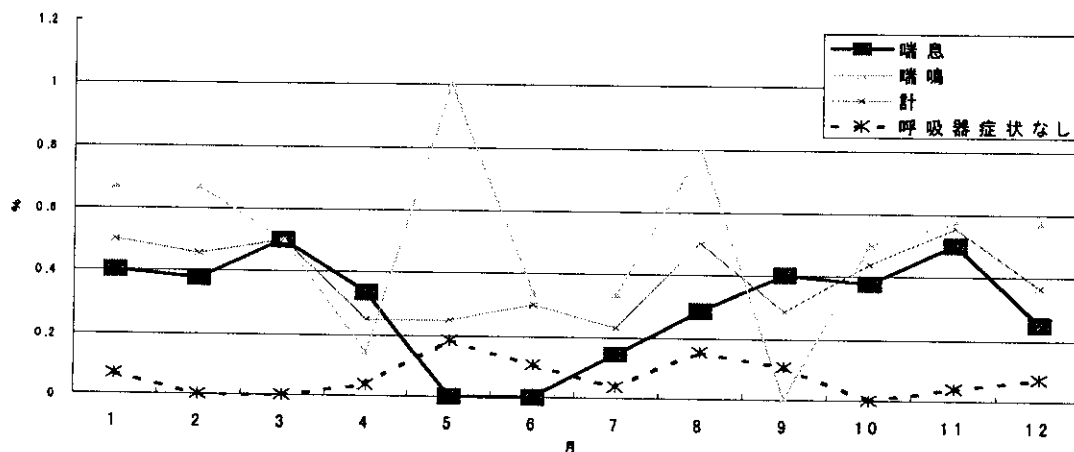


図3、3歳までの喘息罹患率と呼吸器感染

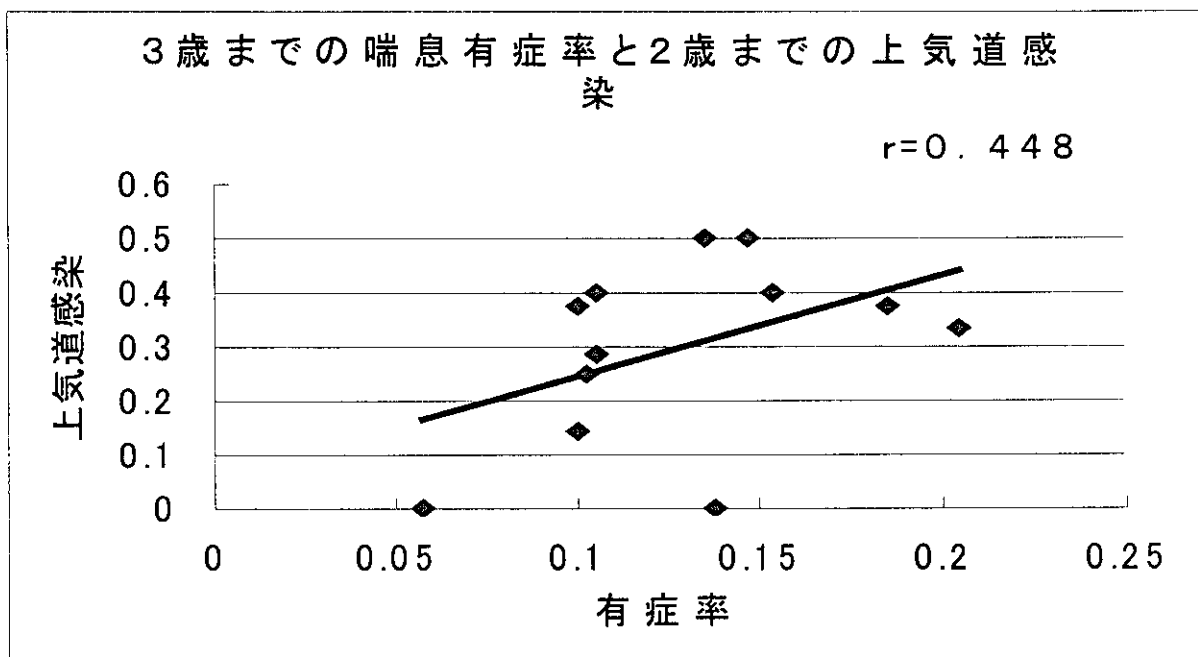


図4、3歳までの呼吸器感染と喘息有症率(2年間分)

