

平成14年度
厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療等研究事業

研 究 報 告 書

第1分冊

厚 生 労 働 省

目次

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	群馬大学医学部小児科 教授	森川 昭廣 (107)
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	京都大学大学院医学研究科皮膚科 教授	宮地 良樹 (110)
アトピー遺伝子群の検討	岐阜大学医学部小児病態学 教授	近藤 直実 (113)
サイトカインと胎外因子	帝京大学医学部内科 教授	大田 健 (116)
アレルギー疾患発症及ぼす胎内感染の影響について	山口大学医学部生体・発達・感染医科学講座/小児科 教授	古川 漸 (119)
皮膚バリア障害の検討 第3報-アトピー性皮膚炎患者皮膚における角層中の神経成長因子量と皮疹の関係	横浜市立大学医学部皮膚科 教授	池澤 善郎 (122)
気管支喘息と花粉症の全ゲノム解析	筑波大学臨床医学系小児科 助教授	柴崎 正修 (125)
喘息・アレルギー疾患の発症に関する疫学的研究	国立療養所南福岡病院 診療部長	小田嶋 博 (127)
“サイトカインと胎内因子” 新生仔マウスのアレルギー性気道炎症の特徴とサイトカインの役割	群馬大学医学部小児科 助教授	徳山 研一 (130)
遺伝と胎内因子 アレルギー疾患におけるIL-4、IL-4RおよびSTAT6の遺伝子多型の解析	群馬大学医学部小児科 助手	荒川 浩一 (133)
神経因子と胎外因子 乳児喘息の発症に及ぼすRSウイルスによる細気管支炎の影響	獨協医科大学小児科 講師	吉原 重美 (136)
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胎外環境因子) -母体血、臍帯血、羊水での各種サイトカインの測定と出生後のアレルギー疾患の発症-	さきさきアレルギー科クリニック 院長	佐々木 聖 (139)
新生児期皮膚バリア機能の評価	群馬大学医学部小児科 教授	森川 昭廣 (142)

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

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働省免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）

総括研究報告書

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

研究主任者

森川昭廣

群馬大学医学部小児科教授

研究要旨

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といわれているが、それぞれに関与する遺伝的・環境的要因に関しては不明な点が多い。昨年度までに、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因子と出生後の発症に及ぼす胎外因子について検討し、一定の成果を上げてきた。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。以下の結果を得た。

1) 胎内因子

アレルギー疾患発症に関わる胎内因子として、連鎖解析によるアレルギー疾患発症関連遺伝子の同定、サイトカイン、アラキドン酸代謝産物関連の遺伝子多型の同定、血中や臍帯血中のケモカイン TARC と MDC とアレルギー疾患との関連、胎内感染児におけるアレルギー発症の有無などが詳細に検討され、アレルギー疾患の予知に寄与する可能性を示した。疫学的調査で妊娠中の母親のアレルギー症状や感染も発症背景因子に寄与し、また予後因子も明らかにされつつある。

2) 胎外因子

RSV 細気管支炎でクレオラ体は乳児喘息の発症予知に寄与し、アレルギー性気道炎症は年齢により変化する可能性を示した。GM-CSF などの増殖因子は気道上皮から産生され気道リモデリングや過敏性に関与している。アトピー性皮膚炎では角層中の NGF の増加は痒みや掻爬と関連し、皮膚バリア機能にタイトジャンクションの膜分子が関与している可能性を示した。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。

研究分担者

荒川浩一（群馬大学医学部小児科助手）

池澤善郎（横浜市立大学医学部皮膚科教授）

大田 健（帝京大学医学部内科教授）

小田嶋博（国立療養所南福岡病院 診療部長）

近藤直美（岐阜大学医学部小児病態学教授）

佐々木聖（ささきアレルギー科クリニック院長）

柴崎正修（筑波技術短期大学小児科 教授）

徳山研一（群馬大学医学部小児科助教授）

古川 漸（山口大学医学部生殖・発達・感染医科学講座/小児科教授）

宮地良樹（京都大学大学院医学研究科皮膚病態学教授）

吉原重美（獨協医科大学小児科講師）

（アイウエオ順）

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班の目的である。

今年度、本研究班では、アレルギー的側面では、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では、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、乳幼児および成人喘息における気道炎症を構成する因子の違い、角質層の NGF の役割、皮膚バリア機能の発達、さらにその成立機構に関与するタイトジャンクションの役割を明らかにしていくことである。

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

B. 研究の方法

遺伝学的検討：アレルギー疾患患者を発端者とする家系を対象として、連鎖陽性領域に存在するいくつかの候補遺伝子の多型を検出し、TDT 解析にて疾患

との関連を検索した(柴崎)。アレルギーの遺伝的素因としてIgEの産生抑制系であるTh1細胞より産生されるIFN- γ に注目し、さらにメディエーター遊離の段階まで系統的に分析した(近藤)。アレルギー疾患とIL-4、IL-4受容体、Stat6遺伝子多型との関連を明らかにすることを目的とした。(荒川)

胎内・胎外因子と追跡調査：羊水、母体血、臍帯血中のサイトカイン、増殖因子を測定し、その後のアレルギー疾患発症につき追跡調査をした(佐々木)。また、臨床的敗血症を呈した児と正常出生の児の追跡調査を行い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：RSウイルスによる急性細気管支炎後の乳児喘息発症機序を解明する目的で気道局所の痰中成分を検討した(吉原)。新生仔マウス喘息モデルにおける気道炎症と免疫学的反応を成熟マウスと比較した(徳山)。気管支喘息の病態形成にかかわるPDGFの気道上皮細胞からの産生を検討した。抗原特異的マウス喘息モデルにおいて、気道炎症およびリモデリングにおけるGM-CSFの役割を検討した(大田)。

皮膚バリア障害：

皮膚バリア機能の構成に重要なタイトジャンクションの表皮発生過程における分子構築の変化を検討した(宮地)。出生日-日令7までの新生児と1ヶ月健診で来院した乳児に対して角質水分量と水分喪失係数を測定した(森川)。皮膚バリア障害によるケラチノサイトからのNGF産生を介してアトピー性皮膚炎のかゆみが増強しているかを検討した(池沢)。

C. 結果

1) アレルギー疾患患者を発端者とする家系を対象に連鎖解析を行った結果、喘息では4q22のHPGDS、12q13のAID、6p21のTNF、17q13のPAFAHの多型が、アトピー性皮膚炎では5q32のSPINK5多型が疾患発症と関連していることを明らかにした。

2) アレルギー患者ではIFN- γ 産生量の低下によるIgE産生抑制機構の破綻が想定されているが、IFN-

γ receptor1内に新たな点変異を認め、アレルギー発症に関与している可能性が示唆された。また、アラキドン酸カスケードのLTC4の遺伝子変異を明らかにした。

3) STAT6 exon 1のGT繰り返し配列の多型と転写調節領域、exon23非翻訳領域の多型では連鎖不平衡の関連が認められた。IL-4受容体Ile50Val多型とSTAT6の組み合わせはアレルギー疾患の予知に有用と考えられた。

4) 母親の血清、羊水、臍帯血においてIL-13が共に高値例より4例、臍帯血と母体血におけるIL-4高値例より3例のアレルギー疾患発症が認められ、臍帯血中のIL-4、IL-13がアレルギー疾患発症予知の指標になると考えられた。

5) 母のアレルギー歴陽性例で、胎内感染児は、胎内感染のない児と比較し5才までのアレルギー疾患発症率は有意に低値だった。胎内感染によってTh1が活性化したことにより、その後のアレルギー疾患発症が抑制された可能性が示唆された。

6) 乳児アレルギー患者を対象に調査した結果、気管支喘息の発症に、妊娠中の母親のアレルギー症状や感染も関連することが示唆された。

7) 乳児RSV急性細気管支炎で痰中Cr Bが陽性の患児は、乳児喘息に移行しやすく、さらに、痰中の好中球エラスターゼやECPが健常群と比較して有意に高値を示したことから、気道上皮傷害に好中球や好酸球性炎症の関与が示唆された。

8) マウス喘息モデルにおいて、血中IgE抗体価やBALF中好酸球数の増加の程度、気道過敏性発現、粘液分泌細胞の程度は、感作法ばかりでなく幼若および成熟マウスで異なっていた。

9) 気道上皮細胞はDEPやLPS刺激により濃度依存性にPDGF-ABの産生を示した。さらにこの産生はGM-CSFにより誘導され、オートクラインな活性化の関与が考えられた。

10) タイトジャンクション(TJ)の膜分子であるクローディン-6は、表皮発生過程のバリア機能の担い手で、胎生期表皮を覆うperidermのTJに特異的に局在し、完成した表皮にはその発現がみられないことを示した。

11) 新生児期の角質水分量の推移は、日令0-7まで比較的安定しており、生後1ヶ月で上昇した。

一方、水分喪失係数は、日令0-1に急激に減少し、その後は、安定していた。

12) 角層 NGF 量は、患者皮疹部では無疹部より著しく増加し、患者無疹部においても健常人皮膚より有意に高値であった。また、皮疹の重症度、掻破痕スコア、被験部位の痒疹スコア、および痒みの強さと正の相関を示した。

D. 考察および E. 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、胎内・胎外因子の検討を行った。アレルギー疾患において、アトピー候補遺伝子が見出され、アレルギー疾患の病態解明、予知予防に向けて臨床応用が目指せる可能性を示唆した。一方、胎内感染はアレルギー疾患発症を抑制しうる環境因子のひとつとなりうる可能性が示唆された。疫学的調査では気管支喘息の発症において、誕生月の関与は単に、生後の感染の影響だけではなく、妊娠中の母親のアレルギー症状や感染とも関連することが示唆された。

乳児 RSV 急性細気管支炎⇔ 気道炎症⇔ 乳児喘息という乳児喘息発症メカニズムが想定された。乳児喘息発症を予防する上で、RSV による気道炎症に対する早期介入が重要であると考えられた。気管支喘息においては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。PDGF、IGF-1、GM-CSF は喘息の病態形成に特有の機能を担っており、治療のターゲットとなり得ることが示唆された。表皮発生活動におけるタイトジャンクション分子構築の変化は、胎児期でのアレルゲンの経皮的侵入経路についての基礎的研究となった。アトピー性皮膚炎ではケラチノサイトによる NGF 産生が亢進し、それによる神経線維の表皮への伸長と痒みの増強、およびそれに伴う掻破が AD を悪化させる可能性を示唆するものと考えられた。

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つながる意義深いものに発展することが期待された。

研究協力者

相原道子 (横浜市立大学医学部附属市民総合医療センター 皮膚科助教授)

青木美奈子 (岐阜大学医学部小児病態学大学院)

有波忠雄 (筑波大学基礎医学系遺伝医学助教授)

大木康史 (群馬大学小児科教務員)

大柴晃洋 (東京医科歯科大学小児科)

笠原貴美子 (岐阜大学医学部小児病態学)

金子英雄 (岐阜大学医学部小児病態学講師)

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)

小林雄輔 (株式会社資生堂ライフサイエンス研究センター 皮膚科学研究所)

白川太郎 (京都大学大学院医学研究科健康増進行動学教授)

杉山幹雄 (群馬大学医学部小児科)

鈴木幸代 (群馬県立がんセンター小児科)

鈴木道子 (群馬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)

西尾 健 (国立療養所南福岡病院小児科)

西村秀子 (群馬県立小児医療センター医長)

野口恵美子 (筑波大学基礎医学系遺伝医学講師)

野間剛 (北里大学小児科講師)

針谷 毅 (株式会社資生堂ライフサイエンス研究センター 皮膚科学研究所)

藤本 昭 (大阪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病態学助手)

松原知代 (山口大学医学部生殖・発達・感染医科学講座/小児科助教授)

薫 博雄 (桐生厚生病院小児科医長)

三谷直子 (横浜市立大学医学部皮膚科助手)

森川みき (JR 仙台病院小児科医長)

森田和政 (京都大学大学院医学研究科皮膚生命科学講座皮膚科学分野助手)

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病態学大学院)

渡辺みづほ (岐阜大学医学部小児病態学医員)

渡辺美砂 (東邦大学医学部小児科)

分担研究報告書

分担研究者 宮地良樹 京都大学大学院医学研究科皮膚科教授

研究要旨 アトピー性皮膚炎においては、バリアー機能の異常により容易にアレルゲンが経皮的に進出し、炎症を生じる。このことは、アレルゲンの経皮的侵入が、様々な皮膚アレルギー疾患の病因となりうることを示唆している。近年、生後の表皮バリアー機能においてタイトジャンクション(以下 TJ)が重要であることが明らかとなった。一方、胎生期表皮では periderm と呼ばれる単層上皮が発生過程の表皮を保護し、その細胞間の TJ がバリアー機能を担っていることが知られている。本研究では、RT-PCR 法、蛍光抗体法、電子顕微鏡を用いた観察により、クローディン-6 が、胎生期表皮を覆う periderm の TJ に特異的に局在し、完成した表皮にはその発現がみられないことを示した。また、マウス線維芽細胞株である L 細胞に強制的に発現させることにより、クローディン-6 の TJ 形成能を示した。本研究の結果は、表皮発生過程における TJ の分子構築の変化を初めて示したものである。また、胎児期でのアレルゲンの経皮的侵入の有無については、まだ不明な点も多いが、本研究はその進入経路についての基礎的研究となるものである。

研究協力者 森田 和政
京都大学大学院医学研究科皮膚科助手

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎においては、バリアー機能の異常により容易にアレルゲンが経皮的に進出し、炎症を生じる。このことは、アレルゲンの経皮的侵入が、様々な皮膚アレルギー疾患の病因となりうることを示唆している。

タイトジャンクション(以下 TJ)は単層上皮細胞同士を密着させてバリアー機能を担う。皮膚においては、胎生期には単層上皮である periderm が皮膚表面を覆い、細胞間の TJ がバリアー機能を担う。

一方、表皮は重層扁平上皮であり、従来、角質層、細胞間脂質がバリアー機能において重要であるとされていた。

最近、表皮のバリアー機能の担い手

として TJ も必須であることが明らかとなった(Furuse et al, J Cell Biol, 2002)。つまり、表皮発生過程において、バリアー機能の担い手は、TJ から角質層+細胞間脂質+TJへと変化するといえる。

一方、TJの膜分子には、オクルディン、クローディンファミリーなどが知られている。このうち、クローディン-6は成人の組織では発現が乏しいため、胎生期型と推測されている。

本研究では、表皮バリアー機能の担い手の変化の詳細を知る目的で、表皮発生過程におけるクローディン-6の発現の変化を観察した。

なお、動物実験については動物愛護に充分配慮し、操作はジエチルエーテル麻酔下にて行った。

B. 研究方法

抗クローディン-6特異抗体を用いた蛍光抗体法をマウスの胎生期皮膚及び出生直後の皮膚に対して行い、表皮におけるクローディン-6の局在を観察する。次に、RT-PCR法によりmRNAレベルのクローディン-6の発現を観察する。更に、免疫電子顕微鏡法を用いて、クローディン-6の超微細局在を検討する。最後に、クローディン-6のTJ形成における機能を知るため、マウス線維芽細胞株(L細胞)にクローディン-6を強制発現させ、フリーズフラクチャー法により、TJ形成能について観察する。

C. 結果

まず、蛍光抗体法をもちいて、クローディン-6のマウス表皮発生過程での発現の変化を観察した。クローディン-6は胎生期 13.5 日のマウスの periderm の細胞間に発現が認められたが、新生仔マウスの表皮には発現が認められなかった。次に、RT-PCR 法により、マウス表皮発生過程でのクローディン-6 mRNA の発現変化を検討したが、同様に、新生仔マウス皮膚にはクローディン-6 mRNA は検出しえなかった。さらに、periderm でのクローディン-6の局在を免疫電子顕微鏡により観察したところ、periderm の細胞間の TJ にその局在が認められた。最後に、クローディン-6の TJ 形成における機能を知るため、マウス線維芽細胞株(L細胞)にクローディン-6を強制発現させたところ、発達したタイトジャンクションが形成された。

D. 考察

クローディン-6の表皮発生過程における発現変化が、TJ 機能の変化をもたらす可能性がある。一方、クローディン-1は periderm、表皮の両方に局在する(蛍光抗体法による。未発表データ)。クローディン-1ノックアウトマウスは生後すぐに皮膚からの水分喪失で死亡する。つまり、クローディン-1は完成した表皮のバリアー機能にとって

重要であるが、periderm のバリアー機能に対しては、クローディン-1の欠失は致命的な異常をもたらさない。よって、periderm のクローディン-1の機能は、クローディン-6等で代償される可能性がある。

代表的皮膚アレルギー疾患であるアトピー性皮膚炎では、表皮のバリアー機能異常のため、アレルゲンが容易に皮膚内に侵入する。このことは、アレルゲンの経皮的侵入が、様々な皮膚アレルギー疾患の病因となりうることを示唆している。しかし、アレルゲンの経皮的侵入が胎生期の皮膚で生じうるのかどうかについてはまだ不明な点が多い。

本研究は、胎生期におけるアレルゲンの経皮的侵入経路についての基礎的研究となるものである。今後は、ヒト表皮発生過程におけるクローディン-6の発現の検討、胎生期バリアー機能とアレルゲンの経皮的侵入の関係、クローディン-6の機能解析について、研究が進むことが期待される。

E. 結論

クローディン-6はマウス表皮発生過程において、胎生期表皮の periderm の TJ に特異的に局在し、完成した表皮においてはその発現は観察されなかった。また、クローディン-6は TJ を持たない L 細胞に強制発現させると TJ を形成した。本研究の結果は、表皮発生過程における TJ の分子構築の変化を初めて示したものである。また、クローディン-6が periderm の TJ 形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

F. 健康危害情報

特になし

G. 研究発表

1. 学会発表

日本研究皮膚科学会(2002年)

2. 論文発表

(1) Kazumasa Morita, Mikio Furuse, Yoko Yoshida, Masahiko Itoh,

Hiroyuki Sasaki, Shoichiro Tsukita,
Yoshiki Miyachi. Molecular
Architecture of Tight Junctions of
Periderm differs from that of the
Maculae Occludentes of Epidermis.,
J. Invest. Dermatol., 118,
1073-1079, 2002

(2) Kazumasa Morita, Yoshiki
Miyachi: Tight junctions in the skin
(Review), *J Dermatol Sci., in press*

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし

研究課題名：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

分担課題名：アトピー遺伝子群の検討

分担研究者 近藤 直実 岐阜大学医学部小児病態学・教授

研究要旨 気管支喘息をはじめとするアレルギー疾患の発症には遺伝的要因と環境要因とが深く関わっている。IgE の産生は Th2 細胞より分泌される IL-4 が産生促進に、Th1 細胞より産生される IFN- γ が産生抑制に関与している。私達はアレルギーの遺伝的素因として IgE の産生抑制系に注目して検討をすすめてきた。さらに本年度は、メディエーター遊離の段階まで系統的に分析した。その結果、アラキドン酸カスケードの LTC₄ の遺伝子変異を明らかにした。今後はこれらの臨床応用を目指す。

研究協力者

松井永子	岐阜大学医学部	小児病態学	助手
青木美奈子	岐阜大学医学部	小児病態学	大学院
金子英雄	岐阜大学医学部	小児病態学	講師
吉川かおり	岐阜大学医学部	小児病態学	大学院
渡辺みづほ	岐阜大学医学部	小児病態学	医員
笠原貴美子	岐阜大学医学部	小児病態学	

A 研究目的

気管支喘息をはじめとするアレルギー疾患の発症には遺伝的要因と環境要因とが深く関わっている。IgE の産生は Th2 細胞より分泌される IL-4 が産生促進に、Th1 細胞より産生される IFN- γ が産生抑制に関与している。私達はアレルギーの遺伝的素因として IgE の産生抑制系に注目して検討をすすめてきた。さらに本年度は、メディエーター遊離の段階まで系統的に分析した。

B 研究方法

アレルギー患者における Th1 および Th2 系サイトカインの動態を検討し、考えられる遺伝子レベルでの異常について検討した。対象をアレルギー患者およびコントロールとし、対象者の好中球より DNA を抽出し IL-12R β 2、IFN- γ R1 遺伝子を増幅、塩基配列を検討した。また、変異の存在する患者家系について変異解析をした。さらに、アラキドン酸カスケードに注目して存在する酵素遺伝子を検討した。尿中のアラキドン酸代謝産物をロイコトリエン E₄、トロンボキサン B₂ を測定し、尿中のロイコトリエン E₄ とトロンボキサン B₂ を測定し、非発作時、発作時で比較した。

特異な排泄量を示した症例を中心に酵素遺伝子の塩基配列を検討した。

C 研究結果

尿中 LTE₄ の測定結果を示す (図 1)。コントロール群に比べ、喘息患者の発作時および非発作時に尿中 LT 排泄量は有意差をもって増加していました。また、喘息患者群においても非発作時に比べ発作時では尿中 LT 排泄量は有意差をもって増加していた。喘息発作時および治療後の症状改善時における、尿中 LTE₄、11-dehydro-TXB₂ 排泄量の変化を示す (図 2)。発作時尿中 LTE₄/TXB₂ 排泄量は増加しましたが、治療により症状が改善しますと尿中 LTE₄ は速やかに低下した。

図 3 に LTC₄S の遺伝子を示します。現在報告されているプロモーター領域における遺伝子多型は翻訳開始部位の 444 塩基上流の A が C に置換する。

各エクソンについてオートシーケンサーで塩基配列を確認したところ、エクソン 1 内に G が A に変わる多型を発見した。これはアミノ酸置換があり、グルタミン酸がリジンに変わる。

現在この多型とアレルギーの関連につき検討を進めている。

D 考察・結論

アラキドン酸カスケードを示す。抗原抗体反応を含めた細胞への刺激が加わると、細胞膜構成成分であるリン脂質はすみやかに PLA₂ により代謝されアラキドン酸が生成される。生成されたアラキドン酸は COX

により PGs, TXs を合成する系、5LO により LTs の合成に向かう系とに分かれる。

代謝・合成された LTC₄, D₄, E₄ は CysLT と呼ばれ、おもに気管支や肺に分布するロイコトリエンレセプターに作用し、強力な気管支収縮を引き起こす。

1997 年 Sanak らにより、LTC₄S の-444 領域における多型の存在が初めて報告された。今回私たちは小児気管支喘息患者を対象に TXs, LTs の排泄量を測定し LTC₄S の遺伝子多型について検討を行ったところ、上記のような重要な知見が得られた。今後はその臨床応用をすすめる。

F 研究発表

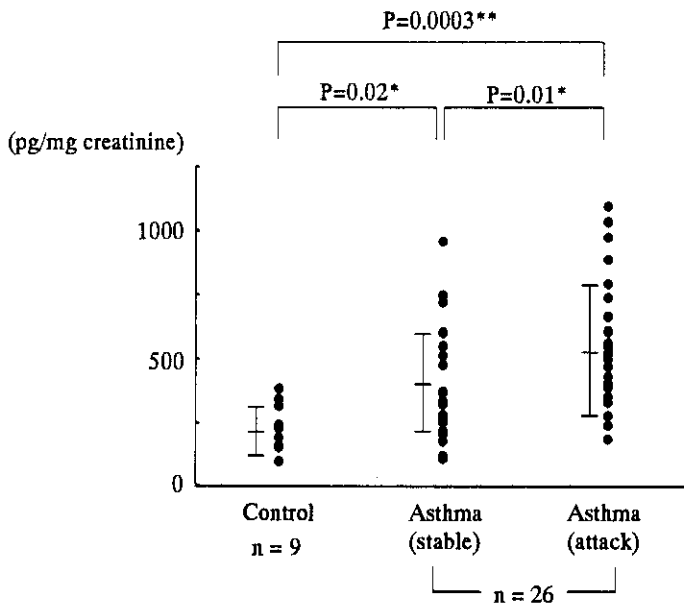
1.論文発表

- (1) Matsui, E., Kaneko, H., Fukao, T., Teramoto, T., Inoue, R., Watanabe, M., Kasahara, K., Kondo, N : Mutations of the IL-12 receptor β 2 chain gene as one of the causes of atopic diseases. Current Advances in Pediatric Asthma and Other Allergic Diseases, 37-42 (2002) JOMO NEWSPAPER Co., Ltd.
- (2) Sakaguchi, H., Inoue, R., Kaneko, H., Watanabe, M., Suzuki, K., Kato, Z., Matsushita, S., Kondo, N. Interaction among human leucocyte antigen-peptide-T cell receptor complexes in cow's milk allergy: the significance of human leucocyte antigen and T cell receptor-complementarity determining region 3 loops. Clin Exp Allergy 32, 762-770 (2002)
- (3) Suzuki, K., Inoue, R., Sakaguchi, H., Aoki, M., Kato, Z., Kaneko, H., Matsushita, S., Kondo, N. The correlation between ovomucoid-derived peptides, human leucocyte antigen class II molecules and T cell receptor-complementarity determining region 3 compositions in patients

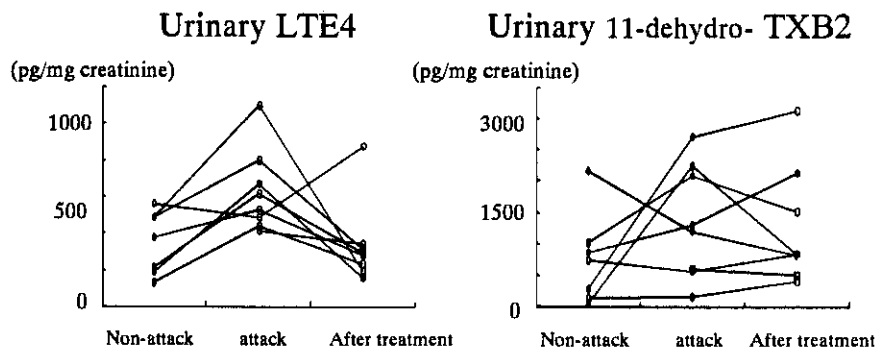
with egg-white allergy. Clin Exp Allergy 32,1223-1230 (2002)

2.学会発表

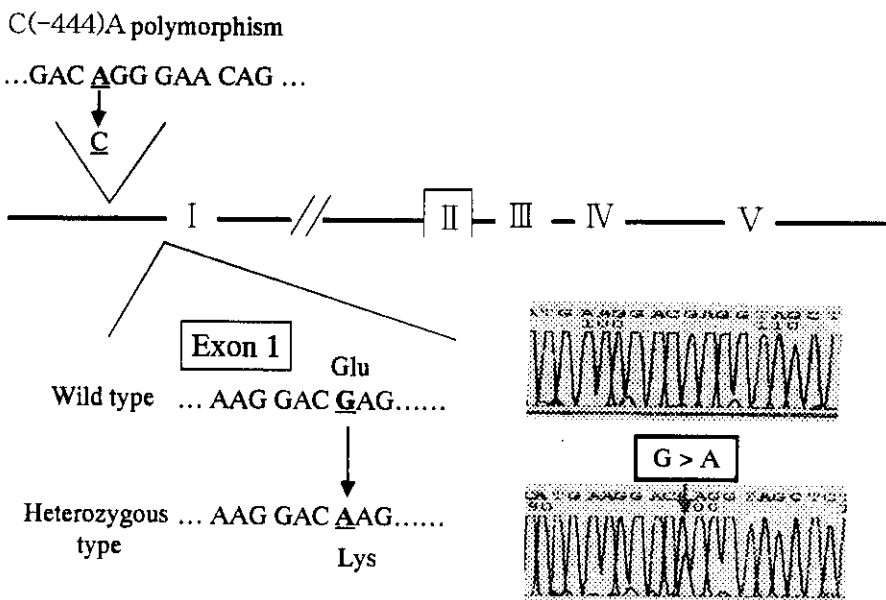
- (1) Kondo N, Kato Z : 国際学会シンポジウム : Genomics and proteomics in allergic diseases : 4th APAPARI 2002 (Asian Pacific Association of Pediatrics Allergy, Respiriology and Immunology) , 9th TPAIS (9TH Biennial Meeting of The Trans-Pacific Allergy and Immunology Society) , 11th PSCAI (The Pediatric Society for Clinical Pharmacology, Allergy and Immunology) (2002年9月20日, 東京)
- (2) 近藤直実, 他 : ウイルス感染による IgE 産生抑制系の分子異常. 日本アレルギー学会総会 (第 52 回) (2002 年 11 月 29 日, 横浜)



☒1 Urinary LTE4



☒2 Time-course study of the levels of urinary LTE4, TXB2 in asthmatic attack



☒3 LTC4S gene

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PDGFの気道上皮細胞からの産生を検討した。気道上皮細胞はDEPやLPS刺激に最初にさらされる細胞であるが、これらの刺激により濃度依存性にPDGF-ABの産生を示した。同様にマクロファージからもPDGF-ABが産生された。さらにこの産生はGM-CSFにより誘導された。DEP、LPS刺激により気道上皮細胞はGM-CSFを産生するが、GM-CSFを介するオートクラインな活性化の関与が考えられた。

抗原特異的なマウスの喘息モデルで、GM-CSFを中和することにより、気道炎症および気道過敏性が抑制できた。この抑制は抗原暴露を開始したのち、すでにアレルギー炎症が起こり初めてから中和抗体を投与しても認められた。

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

気管支喘息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が、その中で、我々は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。我々は大気汚染物質の一つであるディーゼル排気微粒子（DEP）の経気道投与が気道過敏性を誘導し、抗GM-CSFおよび抗PDGF中和抗体を用いた検討より、GM-CSFおよび線維芽細胞増殖のcompetence

factorであるPDGFが気道炎症および気道リモデリングを惹起し、気道過敏性を誘導することを示してきた。GM-CSFは好酸球寿命延長し、好酸球炎症遷延化の他に抗原提示細胞の成熟にも関与するサイトカインである。今年度は抗原特異的喘息モデルでのGM-CSFの関与を検討するとともに、ヒトでのGM-CSFおよびPDGF産生について明らかにすることを試みた。

B. 方法

遺伝的に気道過敏性を有するA/Jマウスをもちいて検討した。刺激因子として、DEPおよびアレルギーとして卵白アルブミン（OA）を用いた。気道過敏性はアセチルコリン吸入前後の気道抵抗をプレシスモボダイボックス法で検討し評価した。

ヒト肺胞マクロファージは気管支肺胞洗浄により採取した。気道上皮細胞は肺癌患者の手術肺より気管支断端を採取し使用した。mRNAを採取し、それぞれの特異的プライマーをもちいてreal-time PCRで定

量的にサイトカインmRNAの発現を解析した。サイトカイン蛋白の産生はELISAを用いて検討した。

C. 結果

DEP曝露で誘導される気道過敏性と同様にOA特異的に気道過敏性を誘導する喘息モデルでも、抗GM-CSF中和抗体投与により好酸球炎症および気道過敏性が抑制された。すでにOA吸入を開始し、炎症が惹起された群に途中から抗GM-CSF中和抗体を投与した群でも気道過敏性を抑制した (Fig1)。DEPという環境因子による炎症とともにアレルギー特異的炎症においてGM-CSFの関与が重要であることが示された。

DEP曝露で直接刺激を受ける細胞はマクロファージと気道上皮細胞である。マウス喘息モデルでもDEP曝露により、気道上皮細胞およびマクロファージがPDGFを産生していた。そこでヒトでの産生を検討すると、DEP曝露によりヒト気道上皮細胞株BEAS-2B細胞はPDGFを産生した (Fig. 2)。同じ個体からのサンプルではないがヒト気道上皮細胞およびマクロファージからの産生量は同じレベルであった (Fig3)。この産生はmRNAの発現誘導を伴ったde novoの産生であった。さらにGM-CSFを添加することによりPDGFの産生が誘導された。

D. 考察

気管支喘息の難治化の要因として、気道のリモデリングが注目されている。気道のリモデリングの一つである基底膜部の肥厚は粘膜下に存在する線維芽細胞と平滑筋由来と考えられている筋線維芽細胞 (myofibroblast) による細胞外マトリックス (extracellular matrix:ECM) の形成と血管内皮細胞の増殖による血管の新生により起こる^{29,31)}。液性因子として、基底膜部の肥厚および線維化には、fibrogenic サイトカイン (TGF- α , TGF- β , PDGF) やIL-1, GM-CSF, TNF等の関与が想

定されている。これらサイトカインの刺激により線維芽細胞が活性化され、病変局所へ遊走し、その場で増殖して、ECMを産生する。マクロファージはこれらfibrogenicサイトカインを産生する主要な細胞の一つであるが、本検討では気道上皮細胞も主要な産生源となりえることを示した。GM-CSFは単独で発現増強させることにより、肺の線維化を誘導することが報告されているが、PDGF産生誘導を介した経路も存在することが考えられた。

E. 結論

DEP曝露およびLPS曝露は気道上皮細胞および肺泡マクロファージ刺激を介して、喘息の気道リモデリング形成に関与していることが考えられた。喘息における気道リモデリングにもGM-CSFのオートクラインを介する活性化が関与する可能性が考えられた。

D. 業績

1. Sekiya, T., Tsunemi, Y., Miyamasu, M., Ohta, K., Morita, A., Saeki, H., Matsushima, K., Yoshie, O., Tsuchiya, N., Yamaguchi, M., Yamamoto, K., Tamaki, K., and Hirai, K. (2003) *Immunogenetics* 54, 742-745.
2. Komiya, A., Hirai, K., Iikura, M., Nagase, H., Yamada, H., Miyamasu, M., Ohta, K., Morita, Y., Ra, C., Yamamoto, K., and Yamaguchi, M. (2003) *Int Arch Allergy Immunol* 130, 40-50.
3. Yamashita, N., Tashimo, H., Ishida, H., Kaneko, F., Nakano, J., Kato, H., Hirai, K., Horiuchi, T., and Ohta, K. (2002) *Cell Immunol* 219, 92-97.

4. Yamamoto, T., Yamashita, N., Kuwabara, M., Nakano, J., Sugimoto, H., Akiyama, K., Hirai, K., Ishii, A., Uehara, Y., and Ohta, K. (2002) *Ann Genet* 45, 109-113.
5. Nagase, H., Kudo, K., Izumi, S., Ohta, K., Kobayashi, N., Yamaguchi, M., Matsushima, K., Morita, Y., Yamamoto, K., and Hirai, K. (2001) *J Allergy Clin Immunol* 108, 563-569.

Fig.1 Effect of α -GM-CSF neutralizing antibody on airway hyperresponsiveness induced by OA inhalation

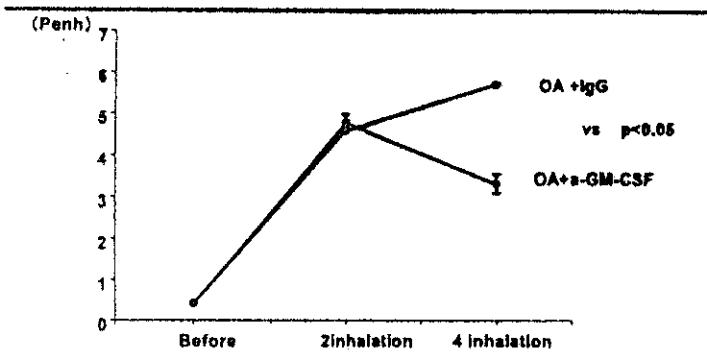


Fig3A PDGF-AB biosynthesis *in vitro* by primary culture of bronchial epithelial cells

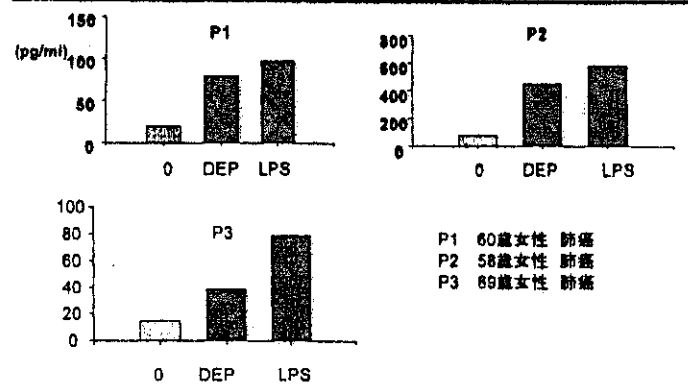


Fig.2 PDGF-AB biosynthesis *in vitro* by BEAS2B cells

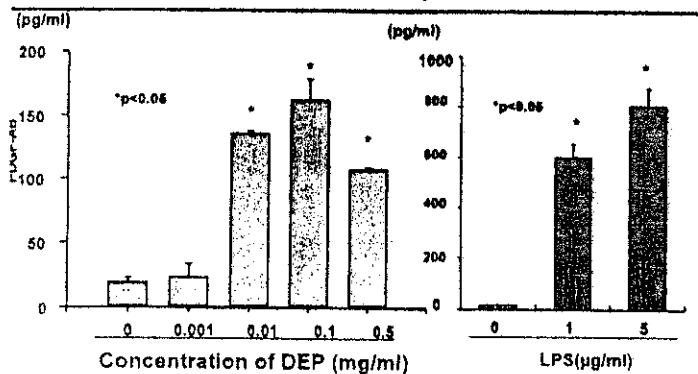
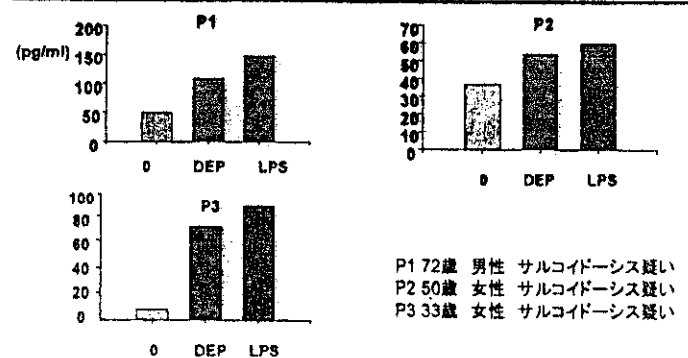


Fig3.B PDGF-AB biosynthesis *in vitro* by primary culture of bronchial epithelial cells



分担研究報告書

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

-アレルギー疾患発症に及ぼす胎内感染の影響について-

分担研究者 古川 漸 山口大学医学部生殖・発達・感染医科学講座/小児科 教授

研究要旨

アレルギー疾患の発症はTリンパ球の活性化の面から検討され、Th2の活性化またはTh1の抑制による相対的Th2優位になった場合に発症しやすいと考えられている。胎内感染の中で臨床的に頻度の高い臨床的敗血症(細菌感染症)では臍帯血のTh1⁺リンパ球の活性化がみられる。児のアレルギー疾患発症に及ぼす臨床的敗血症の影響について疫学的調査を施行した。1年間に県内産婦人科病院で出生した新生児810名について、児のその後のアレルギー疾患発症に関して母親への郵送法によりアンケート調査を施行した。回答は410例(回収率50.6%)に得られた。胎内感染例は38例(9.3%)だった。母のアレルギー歴陽性200例で、胎内感染児(23例)のアレルギー疾患発症率は26.1%で、胎内感染のない児の5才までのアレルギー疾患発症率49.7%に比し有意に低値だった。母のアレルギー歴陽性はアレルギー素因を有し、臍帯血Th2の活性化の存在が推測される。胎内感染によって臍帯血Th1が活性化したことにより、児のその後のアレルギー疾患発症が抑制された可能性が示唆された。出生時の細菌感染症はアレルギー疾患発症を抑制する環境因子のひとつとなりうる。

研究協力者

松原知代

(山口大学医学部生殖・発達・感染医科学講座/小児科助教授)

A. 研究目的

Tリンパ球はIFN- γ を産生し細胞性免疫に関与するTh1とIL-4を産生しIgE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、Th2の活性化、またはTh1の抑制による相対的Th2優位になった場合にアレルギー疾患が発症しやすいと考えられている。

感染症はアレルギー疾患の増悪や発症に影響を及ぼす事については種々の報告

がある。乳児期にRSウイルスによる細気管支炎に罹患した児は後に喘息を発症または肺機能が低下するとの報告がある。RSウイルス感染によりTh1タイプの免疫応答が障害され、結果としてTh2優位となり、アレルギー疾患が発症しやすくなると考えられている。一方、疫学調査から、乳児期の頻回の感染症はその後の喘息やアレルギー疾患の発症を抑えるとのHygiene hypothesisが報告されている。軽症の感染症の反復はTh1を活性化するからである。衛生環境の向上による軽症の感染症罹患の減少に伴い、Th1活性化の機会が減少し相対的にTh2優位となり、アレルギー疾患の増加につながるとの説である。

研究者らは胎内感染例の臍帯血IFN- γ とIL-4産生Tリンパ球をフローサイトメトリーで検索した結果、胎内感染例では臍帯血IFN- γ 産生Tリンパ球の増加がみられる事を既に報告した(Pediatr Int 43: 453-457, 2001)。すなわち胎内感染児ではTh1リンパ球の活性化がみられた。Th1リンパ球の活性化は児のその後のアレルギー疾患発症を抑制する可能性があると考えられ、胎内感染とアレルギー疾患発症との関連について多数例で疫学的な検討を行なった。

B.方法

1997年4月-1998年3月に県内産婦人科病院で出生した新生児810名について、母親への郵送法により、児のその後の

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)の発症についてアンケート調査を2002年4月-9月に施行した。調査時の児の年齢は4才6ヵ月-5才(平均4才9ヵ月)である。

新生児のカルテから臨床的敗血症例を胎内感染児とした。臨床的敗血症の定義は、1)白血球異常:>25,000 or <5,000)、2)CRP上昇:>0.5mg/dl、3)体温、循環系、呼吸器系、神経系、消化器系の症状のうち3つ以上の異常項目を満たし抗生物質により治療をおこなったものとした(Messer J. J Pediatr 1996)。

C.結果

回答は410例(回収率50.6%)に得られた。胎内感染例は38例(9.3%)だった。アレルギー家族歴は346例(84.4%)で、母のアレルギー歴は200例(48.8%)だった。アレルギー家族歴および母のアレルギー歴のある児とアレルギーの家族歴のない児に分けて、胎内感染が児のその後のアレルギー疾患の発症に及ぼす影響について検討した。

1)母のアレルギー歴陽性例(n=200)

胎内感染児(23例)のアレルギー疾患発症例は6例(26.1%)で、胎内感染のない児(177例)のアレルギー疾患発症率49.7%(88例)に比し有意に低値($p=0.033$ 、 χ^2 乗検定)だった。

2)母のアレルギー歴陰性例(n=210)

胎内感染児(15例)のアレルギー疾患発症例は4例(26.7%)で、胎内感染のない児(145例)のアレルギー疾患発症率25.6%(50例)と同程度だった。

3) 家族(2親等内)のアレルギー歴陽性例(n=346)

胎内感染児(33例)のアレルギー疾患発症例は9例(27.3%)で、胎内感染のない児(313例)のアレルギー疾患発症率43.5%(136例)に比し低い傾向がみられた(p=0.073)。

4) 家族(2親等内)のアレルギー歴陰性例(n=64)

胎内感染児(5例)のアレルギー疾患発症例は1例(20%)で、胎内感染のない児(59例)のアレルギー疾患発症率は7例(11.9%)で統計学的有意差はみられなかった。

D. 考察

アレルギー疾患発症に及ぼす胎内因子として胎内感染の影響について検討した。対象とした胎内感染症は臨床上多数みられる周産期の上行感染および産道感染による臨床的敗血症とした。母のアレルギー歴陽性例では、胎内感染児は胎内感染のみられなかった児に比して5才までのアレルギー疾患発症率が低値だった。母のアレルギー歴陽性はアレルギー素因を有し、臍帯血Th2の活性化の存在が推測される。胎内感染によって臍帯血Th1が活性化したことにより、児のその後のアレルギー疾患発

症が抑制された可能性が示唆された。

E. 結論

出生時の細菌感染症はアレルギー疾患発症を抑制しうる環境因子のひとつとなりうる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

1) 良沢 真奈美, 上野佳子, 松原知代, 古川 漸: アレルギー疾患発症におよぼす胎内感染の影響について. 第39回日本小児アレルギー学会. 2002年11月1日-2日. 盛岡.

H. 知的所有権の取得状況

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・胎外因子の同定に関する研究

皮膚バリア障害の検討

第3報—アトピー性皮膚炎患者皮膚における角層中の神経成長因子量と皮疹の関係

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 皮膚バリア障害がケラチノサイトの NGF 産生亢進を介してアトピー性皮膚炎(AD)患者のかゆみの増強をきたしている可能性を検討した。AD 患者 24 名および健常人 28 名において、テプストリッピング法を用いて前腕あるいは上腕部の角層を採取し NGF 量を測定した。NGF 量は患者皮疹部では無疹部より著しく増加しており、患者無疹部においても健常人皮膚より有意に高値であった。また、NGF 量は皮疹の重症度、掻破痕スコア、被験部位の痒疹スコア、および痒みの VAS と正の相関を示した。以上より、AD ではケラチノサイトによる NGF 産生が亢進し、それによる神経線維の表皮への伸長と痒みの増強、およびそれに伴う掻破が AD を悪化させる可能性を示唆するものと考えられた。

研究協力者:

相原道子 横浜市立大学医学部附属市民総合
医療センター-皮膚科助教授

三谷直子 横浜市立大学医学部附属市民総合
医療センター-皮膚科医員

小林雄輔 株式会社資生堂ライフサイエンス研
究センター-皮膚科学研究所

針谷 毅 株式会社資生堂ライフサイエンス研
究センター-皮膚科学研究所

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎では、皮膚バリア障害に伴う被刺激性の亢進および炎症反応の結果、強いそう痒を伴い、掻破による皮膚バリアのさらなる破壊をきたす。神経線維染色では皮疹部において知覚神経(c-fiber)の伸長と表皮内への侵入が認められ、それが痒みの増強をきたすと考えられる。また最近、AD において表皮ケラチノサイトの神経成長因子(nerve growth factor : NGF)の発現が亢進しているとの報告があり、ケラチノサイトの NGF 産生亢進が c-fiber の表皮への伸長を促すと、考えられる。一方、動物実験では界面活性剤やアルコ-

ルなどで人為的に皮膚バリア障害を惹起すると c-fiber の表皮への伸長をきたすことが報告されている。

そこで、皮膚バリア障害がケラチノサイトの NGF 産生亢進を介してかゆみの増強とさらなる皮疹の悪化をきたしている可能性を検討するため、アトピー性皮膚炎患者の無疹部および皮疹部の角層 NGF を定量し健常人と比較した。

B. 研究方法

対象:横浜市立大学医学部附属病院皮膚科に通院中のアトピー性皮膚炎患者 24 名(男性 11 名、平均年齢 23.8 歳;女性 13 名、平均年齢 26.6 歳)および健常人 28 名(全例女性、平均年齢 31.3 歳)。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。

(倫理面での配慮) 研究対象者には本研究の内容、方法、予測される結果を説明し、十分な理解のもとに同意を得た上で角層の採取を行なった。また、倫理面においても結果による不利益は全く生じないことから問題がないと判断された。

方法:テプストリッピング法を用いて前腕あるいは上腕部の角層を採取した。採取された角層はテプごと

細切し、リン酸緩衝液に浮遊させ、氷上で2分間超音波処理の後遠心し、可溶性分画中のNGFをsandwich ELISA法にて測定した。測定値は角層蛋白量あたりのNGF量として表した。また、角層採取時に被験部位の発疹型（乾燥/落屑、紅斑、丘疹、掻破痕、苔癬化、痒疹、びらん/湿潤）および発疹の重症度をそれぞれ0-4の5段階に分けて記載するとともに、かゆみの程度のVisual Analog Scale (VAS)を記録し、NGF量との相関を検討した。

末梢血白血球数および好酸球数を測定した。

C. 研究結果

1 発疹部と無発疹部皮膚および健常人皮膚との比較

アトピー性皮膚炎患者の発疹部では無発疹部より角層NGFが約4倍の値を示し、有意に増加していた($P=0.006$)。健常人皮膚との比較においては、アトピー性皮膚炎患者では発疹部のみでなく無発疹部においても健常人皮膚より有意にNGFが高値であった(発疹部 $p<0.001$ 、無発疹部 $P=0.005$)。

2 発疹および痒みの程度による変化

角層NGF量は被験部位の重症度スコアと正の相関を示し($R=0.431$, $p=0.031$)、アトピー性皮膚炎が重症であるほどケラチノサイトから産生されるNGF量が多いことが示された。また、掻破痕スコア($R=0.403$, $p=0.045$)、痒疹スコア($R=0.340$, $p=0.095$)および痒みのVAS($R=0.335$, $p=0.10$)ともNGF量は正の相関を示したが、皮膚の乾燥/落屑、紅斑、丘疹、苔癬化、および末梢血好酸球数とは明らかな相関はみられなかった。発疹の重症度と掻破痕スコア、痒疹スコアをそれぞれ2未満と2以上で分けたところ、NGF量はいずれも2以上で高いスコアを示し、掻破痕スコアでは有意差が認められた($p<0.05$)。これらのことから、表皮のNGF量は紅斑や丘疹などの炎症所見より痒みの程度と相関関係にあることが示された。

D 考察:今回われわれは、テープストリッピングという慢性皮膚炎における痒みの増強とそれに伴う掻破による発疹の悪化にケラチノサイトが産生するNGFが関与

者にとって最も侵襲の少ない方法により角層のNGFの定量に成功した。アトピー性皮膚炎では角層のNGFは発疹部のみならず無発疹部においても健常人よりNGF量が高値であることが示された。角層のNGF量はケラチノサイトで産生されたNGF量を表すことから、この結果はアトピー性皮膚炎におけるケラチノサイトのNGF産生亢進を示していると考えられる。われわれは本研究の平成12年度報告で、AD患者では明らかに発疹の認められない部位においても皮膚バリア機能が障害されていることを既に報告している。今回の対象患者では皮膚バリア障害の機器による測定は行なっていないが、以前のNGF測定結果から、アトピー性皮膚炎患者皮膚では一見正常にみえる無発疹部においても皮膚バリア障害による表皮細胞の被刺激性亢進とそれによるケラチノサイトのNGF産生亢進が生じていると考えられた。表皮から分泌されるNGFの増加は神経線維の表皮内伸長をきたして機械的刺激による痒みの増強をもたらす。伸長した神経末端からはsubstance Pなどの神経ペプチドが分泌されることにより、肥満細胞からのヒスタミン遊離を介して痒みを生じると考えられる。われわれはこれまでに、conventional環境下で飼育すると血清IgE値の上昇を伴ってアトピー性皮膚炎様の発疹を発症するアトピー性皮膚炎モデルマウスであるNC/Ngaマウスの発疹部皮膚において、神経線維の伸長と表皮内への侵入を認めるとともに同部のsubstance Pの増加を定量的に証明している。さらにこれらのマウスで血中のNGFを測定したところ、SPS環境下ではNGFは低値であるが、conventional環境下では発疹の発症に伴って増加が認められた。増加の程度は特に発症初期に著しく、これらの動物モデルの実験結果はアトピー性皮膚炎の発症とNGFの関係を示唆するものと考えられた。今回のアトピー性皮膚炎患者の角層内NGF量測定結果でも、発疹の程度のほか、痒みの強さを表す掻破痕スコアや痒みVAS、痒疹の程度と正の相関を示したことから、アトピー-

していることが示唆された。