

表5 特異的IgEデータ (旭川3)

検体No	total IgE (IU/m)	特異的IgE抗体							自己申告アレルギー	アレルギー原因	ペット飼育
		ハウスダスト	ゴアヒコウヒダ	ネコ上皮	小麦	大豆	牛乳	卵白			
A3-02	2	0	0	0	0	0	0	0	アトピー		
A3-03	40	0	1	0	0	0	0	0	鼻炎		
A3-04	3	0	0	0	0	0	0	0			
A3-05	5	0	0	0	0	0	0	0	鼻炎		
A3-06	27	0	0	0	0	0	0	0			
A3-07	55	0	0	0	0	0	0	0	食物	イクラ	
A3-08	4	0	0	0	0	0	0	0			
A3-09	69	0	0	0	0	0	0	0	アトピー、蕁麻疹		
A3-10	6	0	0	1	0	0	0	0			
A3-11	19	0	0	0	0	0	0	0	蕁麻疹		
A3-12	253	0	0	1	0	0	0	0			ネコ
A3-13	<10*	0	0	0	0	0	0	0			
A3-14	4	0	0	0	0	0	0	0			イヌ
A3-15	3972	3	4	0	0	0	4	4	アトピー、鼻炎、結膜炎、食物	卵、牛乳、ダニ、ハウスダスト	
A3-16	398	0	0	0	0	0	0	0			
A3-17	2	0	0	0	0	0	0	0			ネコ
A3-18	187	0	0	0	0	0	0	0	アトピー	卵、ダニ	
A3-19	75	0	0	0	0	0	0	0	アトピー、結膜炎		
A3-20	159	0	4	0	0	0	0	0	喘息		
A3-21	17	0	0	0	0	0	0	0			

陽性者数/全数	1/20	3/20	2/20	0/20	0/20	1/20	1/20	全体	5/20	食物ア
比率	5.0%	15.0%	10.0%	0%	0%	5%	5%		25.0%	

表6 特異的IgEデータ (旭川4)

検体No	total IgE (IU/m)	特異的IgE抗体							自己申告アレルギー	アレルギー原因	ペット飼育
		ハウスダスト	ゴアヒコウヒダ	ネコ上皮	小麦	大豆	牛乳	卵白			
A4-01	13	0	±(0~1)	0	0	0	0	0			
A4-02	95	0	0	0	0	0	0	0			ネコ
A4-03	6	0	0	0	0	0	0	0			イヌ
A4-04	54	0	0	0	0	0	0	0	アトピー、食物、蕁麻疹	卵	
A4-05	8	0	0	0	0	0	0	0			
A4-06	27	0	0	0	0	0	0	0	喘息		
A4-07	1	0	0	0	0	0	0	0			
A4-08	40	±(0~1)	2	0	0	0	0	0			
A4-09	3	0	0	0	0	0	0	0			
A4-10	1	0	0	0	0	0	0	0	喘息		
A4-11	28	0	0	0	0	0	0	0			
A4-12	2	0	0	0	0	0	0	0			
A4-13	7	0	0	0	0	0	0	0	鼻炎		
A4-14	11	0	0	0	0	0	0	0			
A4-15	57	0	0	0	0	0	0	0	アトピー		

陽性者数/全数	1/15	2/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	全体	2/15	食物ア
比率	6.7%	13.3%	0%	0%	0%	0%	0%		13.3%	

表7 特異的IgEデータ (旭川5)

検体 No	total IgE (IU/mL)	特異的IgE抗体							自己申告 アレルギー	アレルギ原因	ペット 飼育	両親のアレルギ既往歴
		ハウスダスト1	ゴアロウ ウヒダ	ネコ上 皮	小麦	大豆	牛乳	卵白				
A5-01	159	1	2	0	0	0	0	2	アトピー			
A5-02	23	0	1	0	0	0	0	0				
A5-03	102	0	1	0	0	0	0	0				
A5-04	4	0	0	0	0	0	0	0				母-食物
A5-05	11	0	0	0	0	0	0	0				
A5-06	124	1	3	0	0	0	0	0	アトピー、鼻炎			父-喘息、鼻炎、結膜炎、母-喘息、鼻炎、結膜炎、蕁麻疹
A5-07	110	1	3	3	0	0	0	0	食物	卵		父-アトピー、鼻炎、母-アトピー、鼻炎
A5-08	6	0	0	0	0	0	0	0				母-喘息、アトピー、鼻炎、結膜炎
A5-09	5	0	0	0	0	0	0	0	アトピー			父-アトピー、食物
A5-10	300	0	0	0	0	0	0	0	鼻炎			母-鼻炎、蕁麻疹
A5-11	3	0	0	0	0	0	0	0				
A5-12	71	0	0	0	0	0	0	0			ハムスター、イヌ	父-鼻炎、母-鼻炎
A5-13	37	±(0~1)	2	0	0	0	0	0	喘息		ハムスター	
A5-14	187	0	2	0	0	0	0	0				父-喘息、母-結膜炎
A5-15	5	0	0	0	0	0	0	0				

陽性者数/全数	4/15	7/15	1/15	0/15	0/15	0/15	1/15	全体 7/15	食物アレルギー 1/15
比率	26.7%	46.7%	6.7%	0%	0%	0%	6.7%	46.7%	6.7%

表8 特異的IgEデータ (旭川6)

検体 No	total IgE (IU/mL)	特異的IgE抗体							自己申告 アレルギー	アレルギ原因	ペット 飼育	両親のアレルギ既往歴
		ハウスダスト1	ゴアロウ ウヒダ	ネコ上 皮	小麦	大豆	牛乳	卵白				
A6-01	3	0	0	0	0	0	0	0				父-喘息、アトピー
A6-02	33	0	0	0	0	0	0	0	アトピー			母-蕁麻疹
A6-03	8	0	0	0	0	0	0	0				
A6-04	105	0	0	0	0	0	0	0				母-結膜炎
A6-05	4	0	0	0	0	0	0	0				父-アトピー
A6-06	152	0	2	2	0	0	0	0				父-アトピー
A6-07	36	0	0	0	0	0	0	0			ネコ	父-鼻炎
A6-08	6	0	0	0	0	0	0	0	アトピー			母-喘息、アトピー、鼻炎、結膜炎、食物
A6-09	2	0	0	0	0	0	0	0				
A6-10	7	0	0	0	0	0	0	0				
A6-11	380	0	0	0	0	0	0	0	アトピー	卵白、カニ、エビ		父-喘息、母-鼻炎
A6-12	1	0	0	0	0	0	0	0				母-鼻炎
A6-13	66	0	0	0	0	0	0	0				
A6-14	9	0	0	0	0	0	0	0				父-鼻炎、結膜炎、母-鼻炎
A6-15	46	0	0	0	0	0	0	0				

陽性者数/全数	0/15	1/15	1/15	0/15	0/15	0/15	0/15	全体 1/15	食物アレルギー 0/15
比率	0%	6.7%	6.7%	0%	0%	0%	0%	6.7%	0%

表9 特異的IgEデータ (旭川7)

検体No	total IgE (IU/mL)	特異的IgE抗体							自己申告 アレルギー	アレルギー原因	ペット飼育	両親のアレルギー既往歴
		ハウスダスト	コブシ	ネコ上皮	小麦	大豆	牛乳	卵白				
A7-01	39	0	0	0	0	0	0	0	鼻炎			父-鼻炎
A7-02	13	0	0	0	0	0	0	0				母-鼻炎
A7-03	6	0	0	0	0	0	0	0				母-喘息
A7-04	9	0	0	0	0	0	0	0	蕁麻疹			母-アトピー、蕁麻疹
A7-05	839	1	3	0	0	0	±	±				父-鼻炎、母-食物
A7-06	16	0	0	0	0	0	0	0	喘息、食物			父-蕁麻疹、母-喘息、蕁麻疹
A7-07	2	0	0	0	0	0	0	0	結膜炎、蕁麻疹			母-鼻炎
A7-08	34	0	0	0	0	0	0	0	アトピー、結膜炎			父-鼻炎、結膜炎、母-喘息、鼻炎
A7-09	225	0	0	0	0	0	0	0				父-鼻炎、母鼻炎
A7-10	1	0	0	0	0	0	0	0				
A7-11	7	0	0	0	0	0	0	0				
A7-12	1	0	0	0	0	0	0	0				
A7-13	4	0	0	0	0	0	0	0				
A7-14	2	0	0	0	0	0	0	0	鼻炎		和	母-喘息、鼻炎
A7-15	56	0	0	0	0	0	0	0				母-蕁麻疹
A7-16	13	0	0	0	0	0	0	0			ウサギ、和	父-喘息、鼻炎、結膜炎、蕁麻疹、母-アトピー、鼻炎、食物
A7-17	18	0	0	0	0	0	0	0				
A7-18	<1	0	0	0	0	0	0	0				
A7-19	81	0	1	0	0	0	0	0	アトピー			母-鼻炎
A7-20	2	0	0	0	0	0	0	0				母-鼻炎
A7-21	15	0	0	±	0	0	0	0	アトピー		イヌ	父-鼻炎、結膜炎、母-鼻炎、結膜炎、食物
A7-22	73	1	2	0	0	0	0	0	喘息、蕁麻疹	ハウスダスト、ダニ		母-鼻炎、蕁麻疹
A7-23	7	0	0	0	0	0	0	0	喘息			父-鼻炎、母-鼻炎
A7-24	184	1	4	0	0	0	1	1				
A7-25	13	0	0	0	0	0	0	0				

陽性者数/全数	3/25	4/25	1/25	0/25	0/25	2/25	2/25	全体 5/25	食物アレルギー 2/25
比率	####	16.0%	4.0%	0%	0%	8.0%	8.0%	20.0%	8.0%

表10 総IgE濃度による分類

1) 東久留米市1

IgE conc (IU)	人数 (名)	アレルギー特定人数(名) (陽性率 %)	食物IgE陽性者数(名) (陽性率 %)	両親アレルギー既往歴有 (名)
≥100	10	9 (90.0%)	0 (0.0%)	9
<100	22	2 (9.1%)	1 (4.5%)	13
計	32	11 (34.4%)	1 (3.1%)	22

2) 東久留米市2

IgE conc (IU)	人数 (名)	アレルギー特定人数(名) (陽性率 %)	食物IgE陽性者数(名) (陽性率 %)	両親アレルギー既往歴有 (名)
≥100	15	10 (66.7%)	2 (13.3%)	10
<100	31	3 (9.7%)	0 (0.0%)	22
計	46	13 (28.3%)	2 (4.3%)	32

3) 旭川市1

IgE conc (IU)	人数 (名)	アレルギー特定人数(名) (陽性率 %)	食物IgE陽性者数(名) (陽性率 %)	両親アレルギー既往歴有 (名)
≥100	3	2 (66.7%)	0 (0.0%)	2
<100	10	1 (10.0%)	0 (0.0%)	4
計	13	3 (23.1%)	0 (0.0%)	6

4) 旭川市2

IgE conc (IU)	人数 (名)	アレルギー特定人数(名) (陽性率 %)	食物IgE陽性者数(名) (陽性率 %)	両親アレルギー既往歴有 (名)
≥100	5	5 (100.0%)	0 (0.0%)	2
<100	18	4 (22.2%)	0 (0.0%)	7
計	23	9 (39.1%)	0 (0.0%)	9

5) 旭川市3

IgE conc (IU)	人数 (名)	アレルギー特定人数(名) (陽性率 %)	食物IgE陽性者数(名) (陽性率 %)	両親アレルギー既往歴有 (名)
≥100	5	3 (60.0%)	1 (20.0%)	3
<100	15	2 (13.3%)	0 (0.0%)	7
計	20	5 (25.0%)	1 (5.0%)	10

6) 旭川市4

IgE conc (IU)	人数 (名)	アレルギー特定人数(名) (陽性率 %)	食物IgE陽性者数(名) (陽性率 %)	両親アレルギー既往歴有 (名)
≥100	0	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0
<100	15	2 (13.3%)	0 (0.0%)	7
計	15	2 (13.3%)	0 (0.0%)	7

7) 旭川市5

IgE conc (IU)	人数 (名)	アレルギー特定人数(名) (陽性率 %)	食物IgE陽性者数(名) (陽性率 %)	両親アレルギー既往歴有 (名)
≥100	6	5 (83.3%)	1 (16.7%)	4
<100	9	2 (22.2%)	0 (0.0%)	4
計	15	7 (46.7%)	1 (6.7%)	8

8) 旭川市6

IgE conc (IU)	人数 (名)	アレルギー特定人数(名) (陽性率 %)	食物IgE陽性者数(名) (陽性率 %)	両親アレルギー既往歴有 (名)
≥100	3	1 (33.3%)	0 (0.0%)	3
<100	12	0 (0.0%)	0 (0.0%)	7
計	15	1 (6.7%)	0 (0.0%)	10

9) 旭川市7

IgE conc (IU)	人数 (名)	アレルギー特定人数(名) (陽性率 %)	食物IgE陽性者数(名) (陽性率 %)	両親アレルギー既往歴有 (名)
≥100	3	2 (66.7%)	2 (66.7%)	2
<100	22	3 (13.6%)	0 (0.0%)	15
計	25	5 (20.0%)	2 (8.0%)	17

表11 IgE値の高い3歳児のアレルゲン別 IgE 抗体測定

試料 No	総IgE (IU/ml)	検査項目														
		ハウスダスト1 (判定0～4)	コナヒョウヒダニ (判定0～4)	ネコ上皮 (判定0～4)	小麦 (判定0～4)	大豆 (判定0～4)	牛乳 (判定0～4)	卵白 (判定0～4)	ハルガヤ (判定0～4)	カモガヤ (判定0～4)	ブタクサ (判定0～4)					
H1-02	268	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H1-04	248	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H1-24	221	±	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H1-30	206	0	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H1-31	662	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H1-33	523	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H1-35	1593	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H1-37	428	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H2-01	226	0	±	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
H2-16	269	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H2-21	375	2	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H2-32	236	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H2-43	369	3	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H2-47	461	2	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
陽性者数/総人数		8/14	13/14	5/14	0/14	0/14	1/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14

表12 シラカバ特異的IgE抗体測定結果

検体No	total IgE (IU/mL)	シラカバ特異的IgE抗体 (0~6)	検体No	total IgE (IU/mL)	シラカバ特異的IgE抗体 (0~6)
A1-02	245	0	A5-01	159	0
A1-07	276	0	A5-03	102	2
A1-12	170*	2	A5-06	124	2
A2-04	238	0	A5-07	110	0
A2-10	112	0	A5-10	300	0
A2-18	246	0	A5-14	187	0
A2-20	112	0	A6-04	105	0
A2-23	213	0	A6-06	152	0
A3-12	253	0	A6-11	380	0
A3-15	3972	2	A7-05	839	0
A3-16	398	0	A7-09	225	0
A3-18	187	0	A7-24	184	0
A3-20	159	0			

表13 花粉アレルギー陽性者数の年度別推移

年度	花粉アレルギー陽性者数/被験者数*
H12	4/10 (40%) (内 スギ 3, カモガヤ 1)
H13	5/22 (23%) (内 スギ 4, カモガヤ 1)
H14	3/23 (13.0%) (内 スギ 1, シラカバ 2)

*血清中総IgEが200IU/mlを越え、かつ何らかの特異的IgEが検出された血清を使用

図1 総IgE濃度と検出された特異的IgEの数の関係

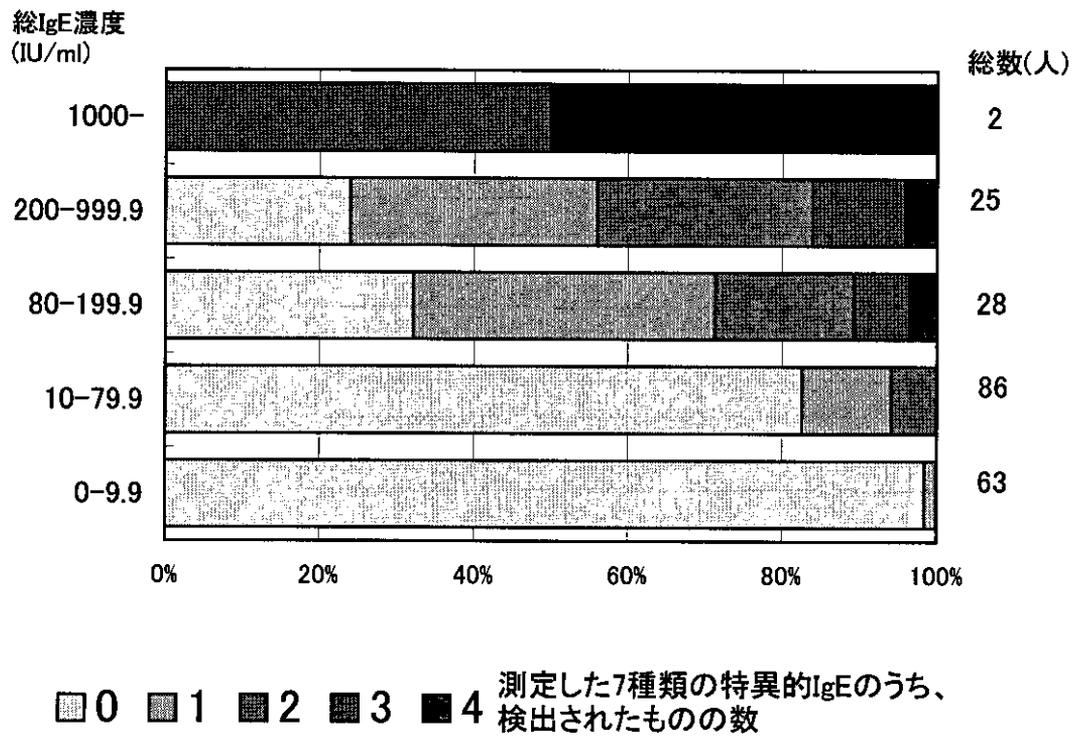


図2 年度別特異的IgE保持率

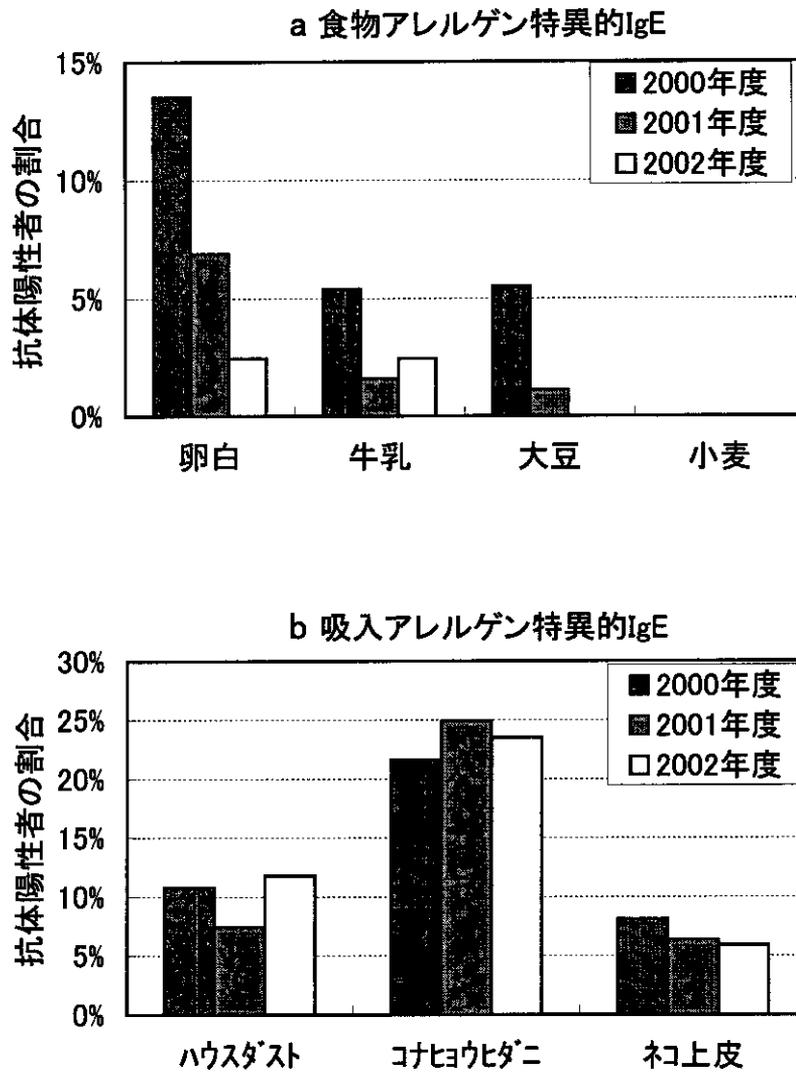
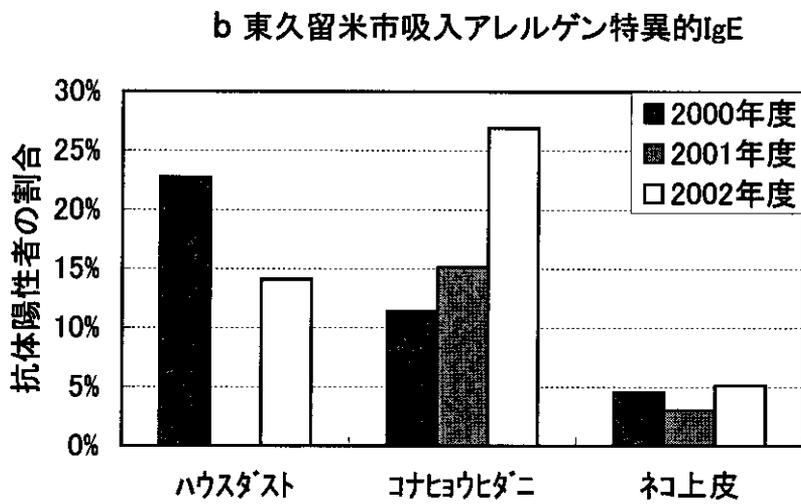
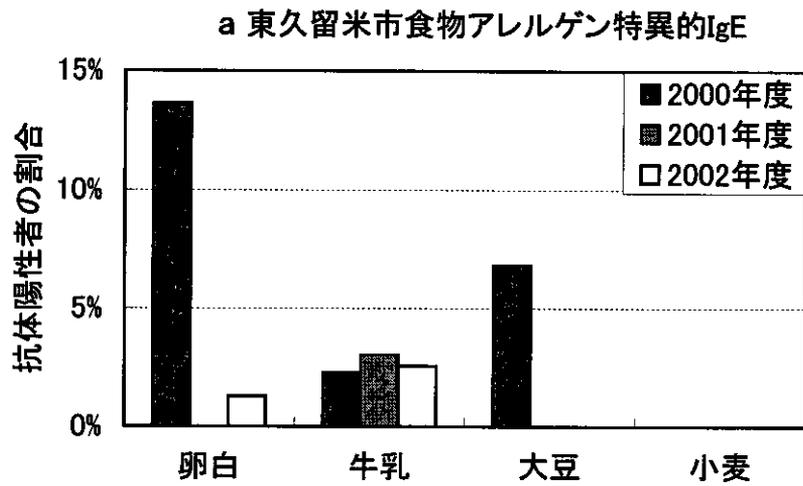


図3 東久留米市年度別特異的IgE保持率



厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
（分担）研究報告書

生活環境汚染物質による小児での毒性評価のための
免疫指標の開発に関する研究

—小児での毒性評価指標としてのサイトカインバランスの解析—

（分担）研究者 大沢基保 帝京大学薬学部教授

研究要旨

本分担研究では、小児における免疫影響の評価指標の一つとして、Type 1, Type 2 のサイトカイン mRNA の発現量とそのバランス（比率）の測定法の開発と評価法の確立を目的としている。今年度は、前年度にサンプル測定の有効性を確認したハイスループット PCR 法によるサイトカイン mRNA 測定法を、多サンプルの測定に適するよう改良し、3 歳児末梢血と人臍帯血の Type 1 (IFN- γ) と Type 2 (IL-4) の各サイトカインの測定調査に適用した。3 歳児血液サンプルには 2 地域（東久留米と旭川）の 159 例、人臍帯血は 13 例を用いた。2 地域の 3 歳児血液サンプルの比較では、サイトカインバランスに有意差はなかったが、両サイトカインとも発現量は旭川の方が高かった。また、2 地域とも昨年度調査した横浜市旭区の 3 歳児血液サンプルの値と比べると、IFN- γ の値が特に低く、サイトカインバランスとしては Type 2 優位の側にあった。これらの結果は、免疫影響の地域差や年次変化を反映している可能性があり、今後同一地域での継続的な調査が必要である。次に、臍帯血サンプルでは、すべてにおいて IFN- γ mRNA は検出されず、IL-4 mRNA は 3 歳児とほぼ同程度の発現量を示した。これは、ヘルパー T 細胞種のバランスが幼年期に Th2 優位から Th1 優位にシフトすると言われていることを裏付け、臍帯血サンプルが胎児に対する環境要因の影響を評価し、小児期への免疫影響を予測する上で有用であることを示唆している。

研究協力者

大塚文徳（帝京大学薬学部助教授）
高橋和子（帝京大学薬学部助手）

A. 研究目的

免疫機能の調節に関わるヘルパー T 細胞 (Th) のサブセットである Th1, Th2 の機能のバランスは、免疫能及びその異常

の発現に重要な役割を果たしている。Th1 細胞はその産生サイトカイン (Type 1 サイトカイン) を介して主として細胞性免疫を誘導し、Th2 細胞はその産生サイトカイン (Type 2 サイトカイン) を介して液性免疫を誘導する。そのため、Th1, Th2 細胞の機能バランスの代わりに、Type 1 サイトカインと Type 2 サイトカインの産生量のバランスが、免疫機能の状態あるいは免疫影響を評価する指標として用いられるようになってきた。種々の免疫関連疾患やアレルギーで、Type 1 サイトカインあるいは Type 2 サイトカインの一方の過剰な産生や、それらのバランスが偏ることが知られている^{1, 2)}。

分担研究者らは、サイトカインバランスの測定法として、前年度にハイスループット PCR 法で得られるサイトカイン mRNA 量を指標とする、血液中の Type 1 と Type 2 のサイトカインバランスの測定法の有効性を確認した。この場合、Type 1 と Type 2 のサイトカイン mRNA としては、Th1, Th2 各細胞により特異的に産生される IFN- γ と IL-4 の各 mRNA を測定した。今年度は、生活環境による小児の免疫影響評価に適用できる免疫指標の開発の一環として、このサイトカイン mRNA によるサイトカインバランスの測定法を確立し、小児の健康影響調査および臍帯血での調査に適用することを目的とした。そのため、2 地域 (東京・東久留米市と北海道・

旭川市) の 3 歳児の血液サンプルと、臍帯血サンプル (旭川市のみ) について、サイトカインバランスの測定と解析を行った。なお、各血液サンプルは、インフォームド・コンセントによる調査への協力同意者から得られたサンプルである

B. 研究方法

1. 血液サンプルの採取・保存ならびに RNA 調製

3 歳児 (東久留米・旭川、計 159 名) から採取した血液 (0.5 ml) は、PAXgene 試薬 (PreAnalyti X/QIAGEN) 1.38ml が入ったプラスチックチューブ (IWAKI:2236-012) に添加し、穏やかに 10 回転倒混和した。また、臍帯血サンプル (13 サンプル各 2.5 ml) には 6.9ml の PAXgene 試薬を用いた。これらのサンプルは、常温で 2 時間以上放置後、RNA 調製時まで -20°C で凍結保存した。

上記血液サンプルを室温で融解してよく攪拌し、4000 x g で 10 分間遠心して得た沈査を RNase-free の超純水 1ml で再懸濁・遠心を 2 回繰り返して洗浄した。RNA の単離は PAXgene の精製キットマニュアルに従って行った。すなわち、沈査に含まれるタンパクを Protainase K によって分解した後、シリカゲルメンブレンを装着したミニカラムに添加し、遠心によって RNA をトラップした。エタノールを含む溶液で洗浄後 RNase-free の超純水でメ

ンブレンより RNA を抽出した。

2. RNA の定量と保存

単離した RNA サンプル $1\mu\text{l}$ を 8 倍に希釈して分光光度計 (GeneQuant Pro; Amersham Pharmacia Biotech) によりその濃度を測定した。各サンプルは定量値に基づいて $10\text{ ng}/\mu\text{l}$ に希釈し、 -80°C に保存した。

3. コントロール用増幅産物の精製

成人男子のボランティアから採取した血液サンプル 0.5ml を前述の PAX gene システムによって処理し、total RNA を得た。この RNA 160ng を用いて RT-PCR を行いアガロースゲル電気泳動した後、予想される塩基長の増幅産物 (cDNA) を含むゲルを切り取り、QIAquick Gel Extraction Kit によって精製した。回収された各増幅産物は分光光度計 (GeneQuant Pro; Amersham Pharmacia Biotech) によりその濃度を測定し、各々 $1 \times 10^7\text{ copies}/\mu\text{l}$ となるように $\text{TE}_{7.5}$ で希釈して -20°C に保存した。また、増幅に用いたプライマーを用いて各精製 cDNA をシーケンシングし、その塩基配列を確かめた (Thermo Sequenase Cy5.5 Terminator Sequencing Kit <Amersham Biosciences> および Long-Read Tower 高速自動シーケンシングシステム <Amersham Biosciences>)。

4. RT-PCR と増幅産物の定量

RT-PCR は Ready To Go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences) を用い、逆転写

後に PCR プライマーを添加する 2 ステップ法によって行った。RT-PCR Beads を適量の RNase-free の精製水で溶解し、total RNA (IFN- γ 、IL-4 mRNA 測定には 100 ng 、G3PDH mRNA 測定には 50 ng) と $1\mu\text{l}$ の oligo(dT)12-18 ($0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$) を加えて全量を $47.5\mu\text{l}$ とし、 45°C 、30 分間逆転写した。 95°C 5 分加熱して逆転写酵素を失活させた後、それぞれに対する増幅用プライマーセット $2.5\mu\text{l}$ (12.5 pmole each) を添加して PCR を行った。PCR の条件は、 95°C 5 分で cDNA を変性させた後、 90°C 70 秒、 60°C 70 秒、 72°C 115 秒の反応を 34 サイクル (G3PDH の場合は 22 サイクル) 繰り返し、最後に 72°C 10 分間の伸長反応を行った。

RT-PCR による定量のために、精製した各 cDNA の希釈系列を作成し、RNA サンプルの代わりに反応液に添加して PCR を行い検量線を作成した。IFN- γ と IL-4 cDNA においては反応当たり $1 \times 10^6\text{ copies}$ から、G3PDH cDNA では $1 \times 10^8\text{ copies}$ から、2 倍希釈によってそれぞれ 8 点の濃度系列を作成した。

反応終了後、泳動用色素液 (50 mM EDTA 、 $50\% \text{ glycerol}$ 、 $0.3\% \text{ Bromophenol blue}$) $5\mu\text{l}$ を添加し、その $5\mu\text{l}$ を 1.1% アガロース電気泳動に供した。泳動用緩衝液は $0.5 \times$ トリス-ホウ酸-EDTA 緩衝液を用い、増幅産物の染色のためアガロースゲルには $10,000$ 倍希釈した GelStar (FMC

Bioproducts) を含有させた。泳動終了後、トランスイルミネーター (330nm) 上で DNA を検出し、ポラロイド写真を撮影した。増幅産物の定量は、写真をスキャナーによってコンピュータに取り込み (600dpi ; グレイスケール)、画像処理プログラム (Photoshop Element) および画像解析プログラム (NIH Image Ver1.60) によって行った。

定量値の統計解析は、ノンパラメトリック検定である Mann-Whitney の U 検定を用いた。

C. 研究結果および考察

1. RT-PCR 法の変更点について

本年度の測定に用いた RT-PCR 法は、基本的に昨年度開発した方法に基づいているが、サンプル数が大幅に増加したため、G3PDH mRNA の測定に関し若干の改変を行った。

G3PDH mRNA の存在量は、IFN- γ 、IL-4 mRNA に比べると数千倍多く、サイトカイン mRNA と同一条件では測定できない。昨年度まではサンプル数が限られていたためサイトカインと G3PDH mRNA の測定を同時に行うことを念頭に入れ、RNA サンプルはサイトカインの測定に用いるものを 2000 倍に希釈し、すべて同一サイクル数を用いて PCR を行っていた。今回、希釈の手間を省くためにサイトカイン測定と同じ濃度の RNA サンプルを用いて G3PDH

mRNA の測定も行うこととし、そのために PCR の条件を検討して反応当たりに用いる total RNA 量を 50 ng (サイトカイン測定の場合の半分量)、PCR サイクル数を 22 という条件に変更した。

2. 3 歳児血液サンプル

1) 東京都東久留米市と北海道旭川市のサンプル間の比較

東京都東久留米市並びに北海道旭川市在住の 3 歳児から得た血液サンプル (それぞれ 47 サンプルおよび 112 サンプル、計 159 サンプル) に関して、ハイスループレット RT-PCR 法を適用して測定した結果を表 1 に示す。また、表 1 の結果をグラフ化したものが図 1-図 6 である。

G3PDH mRNA の発現量は昨年同様個人差があり、最低値と最大値では 7-10 倍の開きがある。また、東久留米と旭川のサンプルを比較すると、東久留米の方が旭川よりも平均値で約 1.4 倍高い値を示した (表 1、図 1)。今回はサンプル数が多く、一つの標的 mRNA 測定には 2 回の RT-PCR が必要であったため、この結果には PCR 間の差あるいは電気泳動ごとの差異が反映されている可能性も考えられた。そこで、東久留米 47 サンプルと旭川 33 サンプルを同時に PCR して電気泳動したもののみに限って比較を行っても有意な差が認められた (データは図示していない)。これらの結果は、構成的発現遺伝子としてデータの標準化に汎用される

G3PDH mRNA の発現には個人差のみならず地域差も存在している可能性があり、今後その意味には注意を払う必要があると思われる。

Type 1 サイトカインである IFN- γ および Type 2 サイトカインである IL-4 mRNA 発現レベルの分布を図 2-5 に示す。Total RNA 当たりで見た場合、両サイトカインともにその発現量の平均値は旭川の方が高い。しかし、IFN- γ mRNA 発現量に関して両地域の差は有意ではなく ($p=0.2745$)、比較的高発現している 10 サンプルの影響が大きいものと考えられる (図 3)。一方、IL-4 mRNA 発現量に関しては旭川と東久留米間には有意差があり ($p=0.0171$)、この場合高発現サンプル 4 例を除いてもなお有意である ($p=0.0364$) (図 4)。以上の傾向は、G3PDH mRNA 当たりで補正するとさらに顕著となり、この場合 IFN- γ mRNA も有意差を示す ($p=0.0419$) (図 4、5)。これらの結果より、G3PDH mRNA 量による補正の有無に関わらず旭川のサンプルでは東久留米に比較して IFN- γ 、IL-4 mRNA の発現量が高く、これらのサイトカインレベルには何らかの原因で地域差が存在する可能性が考えられる。一方、Type 1 サイトカインと Type 2 サイトカインの比率で見た場合は両地域で差は認められなかった (表 1)。また、それぞれのサイトカイン mRNA が検出限界以下であるためにサイトカインの比率が計算できないサン

ブルの割合に関しても両地域で際だった差はなく、Type 1/Type 2 サイトカインバランスは両地域間でほぼ同一であることが示唆される。

次に各サンプルの IFN- γ と IL-4 mRNA レベルを対散布図で表した結果を図 6 に示す。total RNA 量当たり、あるいは G3PDH mRNA コピー数当たりのどちらで見ても IFN- γ mRNA 量が高値のサンプルは IL-4 mRNA 量が低く、逆に IL-4 mRNA 量が高値のものは IFN- γ mRNA 量が低い傾向にある。この結果は、それぞれのサイトカインが互いに相手の産生を抑制するという知見と一致している。

2) 昨年度の測定値との比較

昨年度の 3 歳児サンプルは東久留米と横浜市旭区で採取したものであるが、東久留米のサンプルからの RNA 調製は本年度と異なっている。そこで全く同じ方法を適用した旭区のデータとの比較を行った。

今年度の東久留米・旭川のサンプルにおける G3PDH mRNA 発現レベルの平均値は、昨年度旭区のサンプルよりも 2 倍前後高く、IL-4 mRNA レベルも同様に高い傾向を示した。それとは逆に、東久留米・旭川 IFN- γ mRNA レベルは昨年度の旭区と比べると 1/2 以下であることから、昨年度の測定との比較では特に IFN- γ mRNA の発現レベルに顕著な差があることがわかる (表 1)。図 7 にはサイトカイン mRNA の

量を G3PDH mRNA 量で補正し、対散布図において比較している。昨年の旭区のサンプルの IFN- γ mRNA を極端に高発現していた 3 例 (10^6 コピーの G3PDH mRNA 当たり 10000 コピー以上) を除いても今年度の東久留米・旭川のサンプルにおける IFN- γ mRNA レベルの分布とは明らかに差があり、統計的にも有意である ($p < 0.0001$)。また、昨年度の旭区サンプルの IL-4 mRNA は今年度の東久留米のサンプルよりもやや高発現しているサンプルが多いようであるが、今年度の旭川とほぼ同じ発現レベルである。以上のことから、今年度のサンプルは両地域ともに昨年度の横浜市旭区と比較して、特に IFN- γ mRNA の発現量が低く、より Type2 サイトカイン優位となっていることが示唆される。今後同一地域における測定を継続して行い、年次変化の有無とその意味を考察することが重要であると考えられる。

3. 臍帯血サンプルの測定

環境要因の胎児への影響を調べるための試料として臍帯血が有用であるかどうかを検討するため、旭川医科大学医学部付属病院で採取された臍帯血 13 例に関して、IFN- γ および IL-4 mRNA 発現レベルを測定した³⁾。各サイトカイン mRNA 発現レベルの分布図 (図 8) から明らかなように、IFN- γ mRNA はすべてのサンプルにおいて検出できなかった。一方、IL-4 mRNA の発現はすべてのサンプルで認められ、

そのレベルは今年度測定した 3 歳児とほぼ同等と思われる。従って、臍帯血サンプルでは Type 2 サイトカイン優位すなわち Th2 優位であることが推察される。これは、Th1/Th2 バランスが幼年期に Th2 優位から Th1 優位へシフトするという考え方と一致し、Th1/Th2 バランスをサイトカイン mRNA の発現量によって測定することの妥当性を裏付けるとともに、臍帯血サンプルが胎児に対する環境要因の影響を評価する上で有用であることを示唆している。

D. 結論

今年度は、mRNA による Type1/Type2 サイトカインバランスの測定法の確立と、3 歳児血液および臍帯血サンプルへの適用について検討した。3 歳児血液サンプルのサイトカインバランスについては、地域間の比較と年度間の比較を試みた。

その結果、

1) 免疫影響調査では大量のサンプルを測定するため、サンプルの希釈の手間を省くことが必要になった。そのため、サイトカイン測定と同じ濃度の RNA サンプルを用い IFN- γ 、IL-4、G3PDH mRNA の測定を行う条件を検討し、確立した。

2) 3 歳児の血液サンプルのサイトカイン mRNA 発現量およびサイトカインバランスについて、東久留米と旭川のサンプルについて比較したところ、Type 1、Type 2

両サイトカインの mRNA 発現量は旭川の方が高く、地域差が認められた。一方、両サイトカインの mRNA の比率については有意な地域差は無かった。このことから、サイトカインバランスだけでは見かけ上の差が無くても、各サイトカイン発現量には差がある場合もあるので、サイトカイン指標は各サイトカイン mRNA 発現量とそれから求めたサイトカインバランスの両方を考慮すべきことが明らかとなった。この点を考慮すれば、サイトカイン指標は、小児における免疫影響の地域差を反映しうる有効な指標であることが示唆された。

3) 3 歳児の血液サンプルのサイトカイン mRNA 発現量およびサイトカインバランスについて、昨年度の測定データと比較したところ、今年度のサンプルは両地域（東久留米と旭川）とも昨年度の横浜市旭区の測定データと比較して、IFN- γ mRNA の発現量が低く、より Type2 サイトカイン優位となっていることが示唆された。この値が、3 歳児全体の経年変化を示唆していると解釈すると、前年度よりサイトカインバランスが Type2 サイトカイン優位の側に移行し、小児集団の免疫状態がアトピーのような液性免疫の異常によるアレルギーの感受性が高まる方向にシフトしていると考えられる。このような経年変化は、主に生育生活環境の差を反映している可能性がある。しかし、こ

のデータは同一地域での経年データではないため、地域差あるいはその他の要因の差を反映している可能性もあり、経年変化であることを証明するためには、より多くの同一地域での経年的調査を実施する必要がある。

4) 本研究班が確立したハイスループット PCR 法は、臍帯血サンプルのサイトカイン mRNA 発現量の測定に適用しうることが実証された。旭川市で得られた臍帯血サンプルでは、IFN- γ mRNA は検出されず、IL-4 mRNA のみが検出され、胎児期は高度に Type2 サイトカイン優位であることが検証された。胎児期は免疫器官の形成期であり免疫機能の臨界期にあたる。そのため、臍帯血において Type1, Type2 サイトカインの産生能に異常がある場合には、免疫器官の形成異常も予想され、出生後から小児期にわたりより持続的な免疫影響をもたらす可能性があり、臍帯血での異常値はその予知指標として有用と考えられる。また、その指標値は、異常妊娠や投薬等の治療を伴う場合を除き、胎児に対する母胎環境については母親の生活環境の影響を反映するものと位置づけられる。これらの観点からの評価意義を明らかにするためには、さらに種々の臍帯血での調査が必要である。

E. 参考文献

- 1) Shearer, G.M., Mechanisms Ageing Development, 94:1-5, 1997.
- 2) 大沢基保, 第6回免疫毒性研究会・要旨集, p. 5-6, 1999.
- 3) 笹本繁、大塚文徳、高橋和子、吉田貴彦、大沢基保, 日本薬学会第123年会・要旨集-3、p. 193, 2003.

表1-1 東久留米

Sample	mRNA copies / 100 ng total RNA			mRNA copies/10 ⁶ copies of G3PDH mRNA		Cytokine Ratio	
	G3PDH	IFN- γ	IL-4	IFN- γ	IL-4	IFN- γ /IL-4	IL-4/IFN- γ
H1-01	78653290	21784	20677	277	263	1.05	0.95
H1-03	68516532	22287	30232	325	441	0.74	1.36
H1-04	58061673	29477	54208	508	934	0.54	1.84
H1-08	54944084	19664	24138	358	439	0.81	1.23
H1-11	114157644	17668	31536	155	276	0.56	1.78
H1-13	76512535	21382	76520	279	1000	0.28	3.58
H1-14	74430045	24245	115888	326	1557	0.21	4.78
H1-15	127480047	19034	37865	149	297	0.50	1.99
H1-16	34848166	0	23801	0	683	0.00	-
H1-18	129251135	20890	126096	162	976	0.17	6.04
H1-19	96738461	21988	39221	227	405	0.56	1.78
H1-21	78653290	19392	41785	247	531	0.46	2.15
H1-22	103647763	19482	221375	188	2136	0.09	11.36
H1-23	62208583	32503	41492	522	667	0.78	1.28
H1-25	117351678	50336	95840	429	817	0.53	1.90
H1-26	172690942	71357	176750	413	1024	0.40	2.48
H1-27	20346326	0	23801	0	1170	0.00	-
H1-28	37855835	21683	104282	573	2755	0.21	4.81
H1-31	89052530	29340	144130	329	1618	0.20	4.91
H1-32	77575528	31756	48097	409	620	0.66	1.51
H1-33	54944084	0	156826	0	2854	0.00	-
H1-36	40559594	0	19962	0	492	0.00	-
H2-02	148373345	20420	85637	138	577	0.24	4.19
H2-05	80853942	18596	22498	230	278	0.83	1.21
H2-07	26082230	0	46763	0	1793	0.00	-
H2-08	54944084	16443	49123	299	894	0.33	2.99
H2-09	16315920	25164	27204	1542	1667	0.92	1.08
H2-13	95412884	61486	50882	644	533	1.21	0.83
H2-19	94105470	24815	210737	264	2239	0.12	8.49
H2-20	36825490	0	20823	0	565	0.00	-
H2-21	103647763	56022	23468	541	226	2.39	0.42
H2-24	51281436	16627	22657	324	442	0.73	1.36
H2-25	73410154	17917	54208	244	738	0.33	3.03
H2-27	62208583	0	34556	0	555	0.00	-
H2-28	30778720	18946	24653	616	801	0.77	1.30
H2-29	16542598	21184	60666	1281	3667	0.35	2.86
H2-30	40559594	40637	19822	1002	489	2.05	0.49
H2-31	63072851	41982	75451	666	1196	0.56	1.80
H2-32	18220017	19573	0	1074	0	-	0.00
H2-37	20628998	18000	18346	873	889	0.98	1.02
H2-38	79746025	0	23140	0	290	0.00	-
H2-39	27945088	0	17464	0	625	0.00	-
H2-40	47207094	0	65548	0	1389	0.00	-
H2-41	34848166	19848	18737	570	538	1.06	0.94
H2-45	56481373	24479	44516	433	788	0.55	1.82
H2-47	105087748	44187	70822	420	674	0.62	1.60
H2-48	40559594	28533	115888	703	2857	0.25	4.06
Average	67949339	21897	60811	377	993	0.50	2.57
SD	36594868	16548	52260	348	806	0.51	2.30

表1-2 旭川(1)

Sample	mRNA copies / 100 ng total RNA			mRNA copies/10 ⁶ copies of G3PDH mRNA		Cytokine Ratio	
	G3PDH	IFN- γ	IL-4	IFN- γ	IL-4	IFN- γ /IL-4	IL-4/IFN- γ
A1-01	9792688	0	0	0	0	-	-
A1-02	17241703	19034	36556	1104	2120	0.52	1.92
A1-03	68516532	40261	109546	588	1599	0.37	2.72
A1-04	30356969	19212	23304	633	768	0.82	1.21
A1-06	12904613	18596	17464	1441	1353	1.06	0.94
A1-07	10348336	0	0	0	0	-	-
A1-08	25724834	0	39777	0	1546	0.00	-
A1-09	8184722	0	19003	0	2322	0.00	-
A1-10	17724111	0	17963	0	1013	0.00	-
A1-11	25024665	0	19962	0	798	0.00	-
A1-13	14018382	0	17712	0	1263	0.00	-
A2-01	50578742	20221	19272	400	381	1.05	0.95
A2-02	33435165	20410	19408	610	580	1.05	0.95
A2-03	32079457	26733	120884	833	3768	0.22	4.52
A2-04	29530724	0	45147	0	1529	0.00	-
A2-05	45292971	20988	23140	463	511	0.91	1.10
A2-06	47862945	18339	34073	383	712	0.54	1.86
A2-07	19521336	27747	80382	1421	4118	0.35	2.90
A2-08	84270904	32503	48779	386	579	0.67	1.50
A2-09	36825490	20988	113468	570	3081	0.18	5.41
A2-10	32977013	17834	89959	541	2728	0.20	5.04
A2-11	58868328	25078	82677	426	1404	0.30	3.30
A2-12	17241703	0	27785	0	1611	0.00	-
A2-13	6840786	18770	29393	2744	4297	0.64	1.57
A2-14	9014653	0	17837	0	1979	0.00	-
A2-15	27945088	0	111882	0	4004	0.00	-
A2-16	37337108	19123	164742	512	4412	0.12	8.61
A2-17	34848166	18946	22340	544	641	0.85	1.18
A2-18	73410154	21784	106506	297	1451	0.20	4.89
A2-19	57266072	30453	183078	532	3197	0.17	6.01
A2-20	24681760	46943	37336	1902	1513	1.26	0.80
A2-21	25024665	18573	32895	742	1315	0.56	1.77
A2-22	24343553	0	21267	0	874	0.00	-
A2-23	50594162	0	167849	0	3318	0.00	-
A3-02	70403162	57685	66688	819	947	0.87	1.16
A3-03	99034970	23689	158022	239	1596	0.15	6.67
A3-05	91306925	28354	67092	311	735	0.42	2.37
A3-06	60496061	14872	29714	246	491	0.50	2.00
A3-07	93813499	33012	56323	352	600	0.59	1.71
A3-09	63175064	24019	162862	380	2578	0.15	6.78
A3-11	41630991	17845	116873	429	2807	0.15	6.55
A3-12	88387280	153914	57352	1741	649	2.68	0.37
A3-15	61154968	30665	121181	501	1982	0.25	3.95
A3-17	53121621	40435	107407	761	2022	0.38	2.66
A3-18	43474574	0	90714	0	2087	0.00	-
A3-20	78034441	17549	149671	225	1918	0.12	8.53
A3-21	42312990	24130	64317	570	1520	0.38	2.67
A4-01	113395722	263280	91262	2322	805	2.88	0.35
A4-02	100657362	65304	271972	649	2702	0.24	4.16
A4-03	24617351	36704	139219	1491	5655	0.26	3.79
A4-04	46646122	28485	521786	611	11186	0.05	18.32
A4-05	65261888	0	38052	0	583	0.00	-
A4-06	53991861	64111	285421	1187	5286	0.22	4.45
A4-07	61487108	62363	88018	1014	1431	0.71	1.41
A4-08	55174396	0	54980	0	996	0.00	-
A4-09	114630799	198324	400138	1730	3491	0.50	2.02
A4-10	86025687	30524	438037	355	5092	0.07	14.35
A4-11	44186775	86841	199941	1965	4525	0.43	2.30
A4-12	27883339	0	31753	0	1139	0.00	-
A4-13	6745838	0	46435	0	6883	0.00	-
A4-14	34255719	24241	113400	708	3310	0.21	4.68
A4-15	12713286	0	95199	0	7488	0.00	-
A5-03	67783798	31817	30809	469	455	1.03	0.97
A5-04	46394150	0	36259	0	782	0.00	-
A5-05	18374513	0	0	0	0	-	-

表1-3 旭川(2)

Sample	mRNA copies / 100 ng total RNA			mRNA copies/10 ⁶ copies of G3PDH mRNA		Cytokine Ratio	
	G3PDH	IFN- γ	IL-4	IFN- γ	IL-4	IFN- γ /IL-4	IL-4/IFN- γ
A5-06	32449637	23256	32923	717	1015	0.71	1.42
A5-07	60496061	0	0	0	0	-	-
A5-08	36754735	0	34970	0	951	0.00	-
A5-09	39436059	0	0	0	0	-	-
A5-10	19822041	26582	54650	1341	2757	0.49	2.06
A5-11	44910644	20288	30075	452	670	0.67	1.48
A5-14	23959608	37044	127173	1546	5308	0.29	3.43
A6-01	46394150	0	30440	0	656	0.00	-
A6-02	46143539	30655	39455	664	855	0.78	1.29
A6-03	56996939	81101	149671	1423	2626	0.54	1.85
A6-04	18675524	0	0	0	0	-	-
A6-05	42084425	0	49621	0	1179	0.00	-
A6-06	36162323	28354	141761	784	3920	0.20	5.00
A6-07	42773852	0	190520	0	4454	0.00	-
A6-08	42312990	24579	38747	581	916	0.63	1.58
A6-09	29435269	0	101731	0	3456	0.00	-
A6-10	42542797	0	36259	0	852	0.00	-
A6-11	30407587	48031	57352	1580	1886	0.84	1.19
A6-12	87434962	116190	196355	1329	2246	0.59	1.69
A6-13	35966982	24353	35395	677	984	0.69	1.45
A6-14	65281888	27202	35395	417	542	0.77	1.30
A6-15	44426759	105957	38747	2385	872	2.73	0.37
A7-01	51145220	26460	228319	517	4464	0.12	8.63
A7-02	63175064	23689	106761	375	1690	0.22	4.51
A7-03	85098813	92274	58753	1084	690	1.57	0.64
A7-04	78034441	52662	120452	675	1544	0.44	2.29
A7-05	62156810	18504	129496	298	2083	0.14	7.00
A7-06	47926660	35539	32725	742	683	1.09	0.92
A7-07	94323011	53317	225581	565	2392	0.24	4.23
A7-08	50049041	80728	110697	1613	2212	0.73	1.37
A7-09	56689054	55832	259158	985	4572	0.22	4.64
A7-10	101753696	45793	135082	450	1328	0.34	2.95
A7-11	68894233	92700	133462	1346	1937	0.69	1.44
A7-12	119060468	198460	402559	1667	3381	0.49	2.03
A7-13	78884371	79987	280301	1014	3553	0.29	3.50
A7-14	105114865	51624	32923	491	313	1.57	0.64
A7-15	105686757	31525	106761	298	1010	0.30	3.39
A7-16	35196113	0	127173	0	3613	0.00	-
A7-17	44668046	26097	239609	584	5364	0.11	9.18
A7-18	57617735	44544	749371	773	13006	0.06	16.82
A7-19	51422996	54812	209827	1066	4080	0.26	3.83
A7-20	51145220	25152	35395	492	692	0.71	1.41
A7-21	50594162	18642	191673	368	3788	0.10	10.28
A7-22	37356852	34570	192833	925	5162	0.18	5.58
A7-23	49242352	161174	60188	3273	1222	2.68	0.37
A7-24	37968832	0	47283	0	1245	0.00	-
A7-25	53410131	27965	39934	524	748	0.70	1.43
Average	49354138	33807	104552	626	2227	0.46	3.53
SD	26394056	43923	113969	653	2100	0.58	3.47