

ウイルス感染の遷延と関係することなどが判明している。さらにウイルス感染により気道上皮には傷害がもたらされ細胞の変性、膨化が認められる。その結果、上皮細胞由来の enkephalinase 減少などが起こり、ウイルス感染によるコリン作動性神経 M2 受容体機能障害の誘導によりネガティブフィートバックの低下による収縮反応の増加なども関与しこれらによる気道過敏性亢進が示唆されている。ウイルス感染と喘息増悪に関しては以上のような報告がなされているが未だ不明な点も多い。このような背景より、気管支喘息増悪リスクとしての環境要因の中でも最も重要な因子の一つと考えられるウイルス感染の詳細について検討することは極めて重要と考えられる。さらにその予防、治療法を考える上でもその詳細な解明が必要と考えられる。これらの観点より本研究を実施する。

## 研究方法

我々はインフルエンザウイルス感染により喘息患者の急性増悪が引き起こされることを、患者うがい液よりウイルスを PCR 法にて検出することにより証明している。また、培養気道上皮細胞にインフルエンザウイルスを感染させることにより好酸球、リンパ球に対し遊走活性のある RANTES が上皮細胞より発現されることを報告している。近年、好酸球、Th2 リンパ球に特異性が高いケモカインとして exotaxin が注目されており、上皮細胞からの exotaxin の発現を、インフルエンザウイルスを含めた様々な状況下で検討した。気道上皮細胞におけるサイトカイン/ケモカイン、接着分子の発現/調節につき様々な角度から検討/報

告を行ってきたか、これらの機序を分子生物学的視点から追求することは、喘息病態を理解する上で、また、将来の治療の進歩に不可欠であると考えられる。今回特に、また転写メカニズムの解明されていない exotaxin に焦点を置き、その promoter 領域の確定、転写活性、およびそれを調節する転写因子につき詳細を検討した。さらに気道上皮細胞の炎症形成への関与のさらなる詳細を検討するため接着分子である ICAM 1 発現機構の解析を核内蛋白質との関連で検討した。さらに炎症性サイトカインを刺激物質として使用する実験系は内外の比較的多数の研究施設で行われているがさらに我々はウイルス感染実験モデルとして dsRNA を刺激物質として用いた実験を行った。さらに気道上皮細胞と IL 17f との関連に関する検討を行った。気道上皮細胞培養系は大別すると培養ヒト気道上皮細胞とヒト気道上皮細胞(primary cell)を用いて実験を行うかヒト気道上皮細胞(primary cell)を用いて実験を行えばより生理的条件下に近づく。本研究においては培養ヒト気道上皮細胞を用いてテーターを蓄積しヒト気道上皮細胞(primary cell)との実験結果の対比を絶えず実施することによりその信頼性を高めている。

## 研究結果

気道上皮細胞は exotaxin を発現し、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL 1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ によりその発現は増強された。さらに、インフルエンザウイルス感染により著明な exotaxin が誘導された。気道上皮における IL-8、RANTES の発現は、ステロイド(dexamethasone)にて抑制を受け、その臨

床治療上の重要性か、*in vitro* の上皮細胞を焦点においた検討からも再確認された。

また気道上皮細胞は dsRNA 刺激により、時間経過とともに IL-6, IL-8, RANTES を測定した。上清中のサイトカインについての検討では IL-8, RANTES 濃度は dsRNA 刺激後 24、48、時間と増加が見られ有意 ( $P < 0.05$ ) にその産生増加が認められた。IL-8, RANTES の message については RT-PCR 法を用いて検討した結果 mRNA レベルでの発現が確認された。RANTES の promoter 領域を用いた発現実験において NF- $\kappa$ B、IRF の関与が確認された。さらに現在 TLR-3 との関係につき検討を加えている。

#### 考察

気道上皮細胞を用いた実験系において dsRNA 刺激より RANTES などのサイトカイン、ケモカインの産生が確認された。この結果はウイルス感染による喘息増悪機序の一部を説明し得るものと考ええる。すなわち感冒罹患により生体内でサイトカイン、ケモカインの産生増加が誘導され気道におけるアレルギー性炎症の増悪へと結びつくことか想定される。従来より気道感染の重要性が指摘されている。特に成人喘息における増悪因子として、上気道ウイルス感染は特に重要と思われる。我々の施設における調査にても、成人喘息の急性増悪原因の中で最も頻度が高いものとして急性上気道感染（ウイルス感染）を報告している。しかし、実際に増悪因子となるウイルスの同定に関する報告は少なくいまた不明な点も多い。また、ウイルス感染により喘息がどのような機序により増悪するのか、すなわち喘息気道粘膜への好酸球やリンパ球等の炎症細胞浸潤はもっとも重要

な病態であるが、この細胞浸潤／細胞の活性化がどのように引き起こされるのは不明である。また、ウイルス感染に限らず、喘息の基本病態は慢性の気道炎症細胞浸潤と気道上皮の傷害に伴う気道過敏性の亢進であるが、この病態を理解する上で、炎症細胞が気道へ浸潤する過程を解明することは非常に重要と考えられる。これらの観点より、ウイルス感染時の詳細な機序を検討する目的にて dsDNA, influenza などを使用し *in vitro* 実験系の確立を行いさらなる解明を目指す。

#### 結論

気管支喘息患者は小児において小児慢性疾患中でも上位を占め患者数が極めて多い疾患であり、年々その発症は低年齢化している。成人においても同様であり環境要因との関連を示唆する報告が認められる。このような観点より環境要因としての感染は極めて重要と考えられ本研究においては感染因子としてウイルスを取り上げこれらにつき臨床的検討さらには基礎的検討を行い気管支喘息悪化要因としての感染に対する考察を加えた。本研究においては上記のような成果が得られたが気管支喘息悪化要因としての感染については依然として不明な点も多い。今後はこれらの研究を進展させウイルスのみならずマイコプラズマ、クラミジア感染などにつきその実態を明らかとしさらに喘息の発症増悪に対しどのように関与するか検討を加えることも重要と考えられる。

今回我々は培養気道上皮細胞ウイルスの感染実験モデルとして dsRNA 刺激を行ったか、今後さらに primary cell culture を用い健常者ならびに喘息患者の気道上皮細胞につき同様の実験を試みたい。今回の研究結果より展

望した今後の方向性につき述べる。

1) dsRNA 刺激による培養気道上皮細胞のケモカイン産生、接着分子 (ICAM-1) 発現機序を解明する。2) 培養気道上皮細胞に dsRNA 刺激を行い新たな生理活性物質 (サイトカイン、ケモカインを含む) の産生ならびに接着分子 (ICAM-1) の発現を測定する。以上の研究結果より気道上皮細胞の気道炎症形成への関与ならびに病態への影響について考察する。2) 気道上皮細胞の炎症形成への関与のさらなる詳細を検討するためケモカイン (Eotaxin など) や ICAM-1 の発現機構の解析を核内蛋白質との関連で検討する。現在までに Eotaxin の promoter 活性は TNF- $\alpha$  刺激にて 2.5 倍、IL-4 刺激にて 1.5 倍さらにそのコンヒネーションにて 3.6 倍誘導されることか判明しており、この結果は NF- $\kappa$ B や STAT6 などの核内転写因子による作用と関連することか示唆されている。

本年度は感染病態と喘息との関連につき基礎的研究に重点をおいたか、インフルエンサウクチンに関する臨床的研究も現在進行中であり これらを含め感染に関する検討を継続する予定である。

#### 研究発表

##### 文献

- 1) Matsukura S, Kokubu F, Noda H, Tokunaga H, Adachi M, Expression of IL-6, IL-8 and regulated on activation, normal T cell, expressed and secreted (RANTES) on human bronchial epithelial cells, NCH-H292, induced by Influenza virus A J Allergy Clin Immunol 98,1080-1087 1996
- 2) Matsukura S, Kokubu F, Noda

- H, Watanabe H, Fukuchi K, Gomi K, Adachi M, Expression of ICAM-1 on human bronchial epithelial cells after Influenza virus infection Allergology Int 45,97-103 1996
- 3) Adachi M, Matsukura S, Tokunaga H, Kokubu F, Expression of cytokines on human bronchial epithelial cells induced by Influenza virus A Int Arch Allergy Immunol 113,307-311 1997
- 4) Kokubu F, Matsukura S, Kuga H, Kawaguchi M, Tomita T, Noda H, Tokunaga H, Imai T, Adachi M Cytokine production by bronchial epithelial cells after influenza virus A infection The Proceedings of the 5th West Pacific Allergy Symposium pp227-236 1997
- 5) Matsukura S, Kokubu F, Adachi M et al, Expression of RANTES by normal airway epithelial cells after Influenza virus A infection Am J Respir Cell Mol Biol 18,602-609 1998
- 6) 川口未央 國分二三男 足立満 他, IL-17 による培養気道上皮細胞の ICAM-1 の発現に対する影響 アレルギー 48,1184-1187 1999
- 7) Kawaguchi M, Kokubu F, Adachi M et al, Influenza Virus A stimulates expression of eotaxin by bronchial epithelial cells Int Arch Allergy Immunol 122,44-49 2000
- 8) Kawaguchi M, Kokubu F, Matsukura Shuang SK, Adachi M Influenza virus A stimulates expression of eotaxin by nasalepithelial cells

- Clin Exp Allergy ,31(6) 873-80  
2001
- 9) Kawaguchi M, Kokubu F, Kuga H, Matsukura S, Hoshino H, Ieki K, Adachi M, Huang SK Modulation of bronchial epithelial cells by IL-17  
J Allergy Clin Immunol 108 804-809  
2001
- 10) Matsukura S, Kokubu F, Adachi M, Schleimer R P et al  
Differential regulation of eotaxin expression by IFN- $\gamma$  in airway epithelial cells  
J Allergy Clin Immunol 111,1337-1344  
2003
- 11) Murakami M, Matsukura S, Kokubu F, Adachi M, Kudo I et al  
Cellular arachidonate releasing function of novel classes of secretory phospholipase A2  
J Biol Chem 278 10657-67 2003
- 12) Kawaguchi M, Kokubu F, Matsukura S, Huang SK, Adachi M, et al  
Induction of CXC Chemokines, GRO- $\alpha$  expression and ENA-78 by ML-1 (IL-17F) involves activation of Raf-1 MAPK ERK1/2 pathway  
J Pharm Exp Ther 307 1213-1220 2003
- 13) Ieki M, Matsukura S, Kokubu F, Adachi M et al, Double-stranded RNA activates RANTES gene transcription through cooperation of NF- $\kappa$ B and IFN regulatory factors in human airway epithelial cells  
Clin Exp Allergy 2004(in press)
- 学会発表  
研究成果
- 1) 國分二三男 松倉聡 足立満 ケモカインネットワークとウイルス感染(シンポジウム) アレルギー 2002 51 182
- 2) 松倉聡 國分二三男 足立満 他 ウイルス感染とケモカイン innate immunity との接点(シンポジウム) アレルギー 2002 51 828
- 3) 松倉聡 國分二三男 足立満 他 ケモカイン産生統御 発現調節 (シンポジウム) アレルギー 2002 51 821
- 4) 松倉聡 國分二三男 足立満 他 ウイルス感染と innate immunity(シンポジウム) アレルギー 2003 52 778

# 自然免疫による病原体の認識機構とアレルギー疾患の発症に関する研究

分担研究者

河野 陽一

千葉大学大学院医学研究院小児病態学教授

## 研究要旨

TLR4, CD14 は Respiratory syncytial virus F タンパクのレセプターであることが最近明らかにされた。この結果は TLR4, CD14 の機能に関連する遺伝子多型が RSV 細気管支炎の発症および細気管支炎後の反復性喘鳴および喘息発症に関与する可能性を示唆する。そこで本研究では、以下の研究を行った。

- 1) 日本人の TLR4, CD14 遺伝子多型の有無を調査した。海外で報告されている機能的変化を伴う TLR4 多型は日本人では見いだせなかったか、CD14 のプロモーター領域である-159 の C/T 多型の存在を確認した。
- 2) プレリミナリーな検討では成人 CD14 陽性細胞からの RSV 刺激による IL-12 産生は CD14 多型により異なる可能性が示唆された。
- 3) 2003-2004 冬期に流行した RSV による細気管支炎入院患者を対象として CD14 多型を解析した。結果は CC 4 名、CT 8 名、TT 5 名であり、日本人の多型頻度と比較して、特に TT 多型を有する児に RSV 細気管支炎が多い結果は得られなかった。すなわち RSV 細気管支炎の発症には現在のところ CD14 多型の関与は明確ではない。今後患者の追跡調査により、感染後の反復性喘鳴の発症と CD14 多型の関連を明らかにする予定である。さらに症例数を増やすとともに、他のパラメーターによる群別を行い解析を進める。

## 研究協力者

下条直樹 (千葉大学大学院医学研究院小児病態学講師)

井上祐三朗 (千葉大学大学院医学研究院小児病態学)

富板美奈子 (千葉大学医学部附属病院助手)

鈴木修一 (千葉大学大学院医学研究院小児病態学)

星岡 明 (千葉県こども病院アレルギー科主任医長)

山出晶子 (千葉県こども病院アレルギー科)

青柳正彦 (国立療養所下志津病院アレルギー科医長)

沼田朋子 (千葉市立青葉病院小児科)

## A 研究目的

乳児期において、腸内細菌からの刺激による Th1 反応性の獲得が不十分であったり気道感染症に際して適切な Th1 型の抗ウイルス免疫応答が誘導されないことか、Th1/Th2 バランスを Th2 に相対的に偏倚させアレルギー疾患の発症につながる可能性が考えられている。自然免疫における細菌やウイルスの成分の認識には Toll-like Receptor (以下 TLR), CD14 等が関わっており、一般に Th1 型の免疫反応を誘導する。したがって、TLR, CD14 の発現低下や機能不全は、Th1 反応の誘導不全、それに引

き続くアレルギーの発症に関与すると考えられる。小児気管支喘息の発症寄与因子として RSV 細気管支炎への罹患があるか、自然免疫における RSV の認識には TLR4, CD14 が関与していることか最近明らかとなった。本研究では小児アレルギー疾患において、これらの分子の発現・機能の解析および各分子の遺伝子多型を解析し、自然免疫のアレルギー疾患発症への関与およびその個体差との関連を検討する。

## B 方法

本院および協力病院通院中の小児アレルギー疾

患患者、RSV細気管支炎などの重症ウイルス性呼吸器感染症既往者、対照として健常人で十分なインフォームトコンセントが得られた症例を研究対象とする。末梢静脈血単核球からDNAを抽出したのち、PCR法により各遺伝子を増幅し、TLR4, CD14の遺伝子多型との相関を比較検討した。

TLR4, CD14の遺伝子多型を有する個体の末梢血単核球からCD14陽性細胞を分離し、RSV刺激によるサイトカイン産生能を解析した。

RSV細気管支炎で入院を要する乳児についてインフォームトコンセントを取得し、TLR4, CD14多型を解析する。さらに本患者を追跡し反復性喘鳴の有無を調査する。これによりTLR4, CD14多型とRSV細気管支炎後の喘鳴・喘息の関連を明らかとする。

### C 研究結果

現在までにTLR4の機能に関連する遺伝子多型として海外で報告されているAsp259Gly, Thr359Ileについて、無作為に抽出した成人50名の多型を解析した。その結果、259位はすべてAspであり多型は認められなかった。また、359位はすべてThrであり多型は認められなかった(図1)。このように海外でTLR4の機能に関して報告された多型は日本人では存在しないと考えられた(表1)。CD14の多型については、すでに我が国でも-159のC/T多型が報告されているが、我々の結果も同様であり、CD14の日本人での多型の存在を確認した。

TLR4の多型は日本人では認められなかったが、CD14多型は存在したため、CD14 -159のC/T多型についてCCとTTの個体からCD14陽性細胞を分取し、加熱処理により不活化したRSV刺激による上清中のサイトカインを測定した。その結果、TTはCCと比較してRSV刺激によるIL-12産生が低値であった(図2)。

2003-2004年冬期に流行したRSV感染による細気管支炎患者34名からCD14多型の検索と追跡を承諾するインフォームトコンセントを取得した。対象患者は先天的な呼吸器疾患患者は除外している。これらの患者の中にはRSV細気管支炎の前にすでに喘鳴を呈していた患者が含まれており、RSVが検出された初回喘鳴児でCD14多型が現在解析できているのは17名である。CD14多型では、CC 4名、CT 8名、TT 5名であり、特にTT多型を有する児にRSV細気管支炎が多い結果は得られていない。現在、対象となる症例数を増やしている。

### D 考察

我が国では、欧米と異なりTLR4の遺伝子多型が存在しないことからTLR4の機能にはCD14の多型が関与する可能性が示唆される。

CD14 TT多型はLPS刺激による末梢血単核球からのIL-6産生がCCに比して有意に低値であることから報告されていることから、RSV刺激によるサイトカイン産生にもCD14多型による差異が存在する可能性はある。我々の実験ではRSV刺激によるCD14陽性細胞からのIL-12産生はCCに比してTTで低値をとる傾向が認められたか、解析数が少なくまた結論は出せない。今後解析数を増やす予定である。

一般的にCD14 TTは血清IgE低値との関連が指摘されているが、その関連も乳幼児と小児期以降では異なっているとの報告もあり、今後CD14多型と血清IgE値の関連を本コホートで調べる予定である。

2003-2004冬期で入院を要したRSV細気管支炎患者を対象としたCD14の-159C/T多型の解析では、Tアレルが多い、またはCアレルが少ない結果は得られていない。この結果は、すくなくともRSV細気管支炎の罹患そのものにはCD14多型の有無は関連しないことを示唆している。しかし、TTではRSV感染

の重症化の可能性があり、現在最低酸素分圧などの指標をもとに重症度との関連を解析している。また、RSVへの抵抗性の低下からTTが反復する細気管支炎の罹患、ならびに反復性喘鳴に関連する可能性があり、これらの患者の追跡調査の結果が期待される。乳幼児のRSV感染時のサイトカイン産生におけるCD14多型の効果を明らかにするために、新生児臍帯血からのCD14陽性細胞のRSV刺激によるサイトカイン産生の解析を予定している。

RSV 細気管支炎の発症、その後の反復性喘鳴・喘息発症に関与する可能性のあるTLR4, CD14 遺伝子多型の日本人での存在の有無が明らかとなった。プレリミナリーな検討では成人CD14 陽性細胞からのRSV 刺激によるIL-12 産生はCD14 多型により異なる可能性が示唆されている。

RSV 細気管支炎の発症しやすさについてはCD14 多型との関連が認められていない。今後、症例数を増すとともに他のパラメーターによる群別を行い解析を進める予定である。また、細気管支炎後の反復性喘鳴との関連については追跡調査を行ってゆく。

図1 TLR4 Thr359Ile genotyping

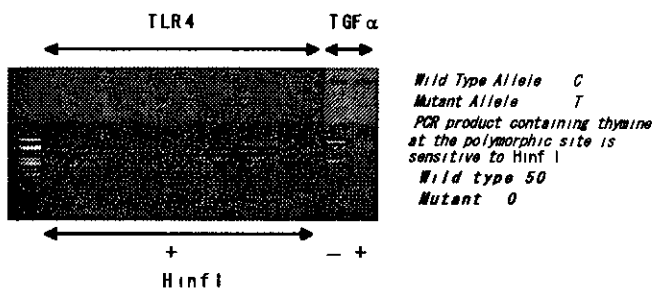


図2 RSV刺激による成人CD14陽性単球からのサイトカイン産生へのCD14多型の影響

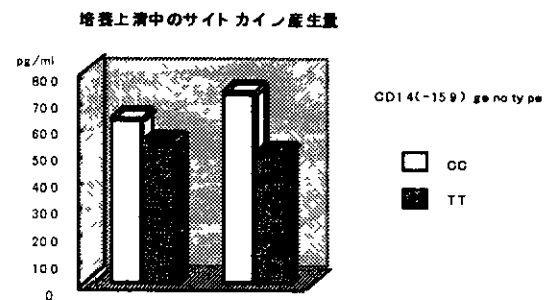


表1 TLR4 多型解析の結果

TLR4多型	機能	多型の有無	
		海外	日本人
359	低下	あり	なし
259	低下	あり	なし

E 結論

アレルギー疾患にかかわる胎内/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検討

分担研究者氏名 小田嶋 博 (国立療養所南福岡病院 診療部長)

アレルギー疾患は近年、増加している。その原因についての検討は簡単ではないが、何らかの因子を持ったものが、胎内、胎外の何らかの因子の関与によって発症することは確かである。今回、われわれは、疫学的検討によっていくつかの興味ある結果を得た。

6施設の外来患者に対して問診票による調査を行い、妊娠中、また出生後感染やアレルギー疾患の関与が推定された。すなわち、出生前後の子供の免疫系に影響を与えるいくつかの因子が子供のアレルギー発症に関与することが示唆された。大きくは、感染とアレルギー症状に関する直接・間接の因子また影響結果である。

このような要因を可能な限り回避することでアレルギー発症を予防することができる可能性がある。と推定される。今年度に明らかにされた因子をさらに症例を増やし、また、更に詳しく検討して行くことによって、確認する必要がある。さらに、これらの因子を除去、予防した場合の効果を検討することでこれらの因子の実際の関与が確認される。今後、このような、検討を行っていくことか必要であるか、次年度にはさらに、例数を増やし、また経過を観察することで、得られた因子を確認し、さらに、粘液的学的検討を加え、確認してゆきたい。

研究協力者

野間 剛 北里大学小児科講師  
大柴晃洋 東京医科歯科大学小児科  
森川 みき JR仙台病院小児科医長  
本村知華子 国立療養所南福岡病院小児科  
川野 豊 横浜赤十字病院小児科部長  
手塚純一郎 国立療養所南福岡病院小児科  
渡辺美砂 東邦大学医学部小児科委員  
佐伯敏秋 北里大学小児科

後3年間の研究においては、これらの因子についてさらに詳しく検討し発症への関与を明らかにしていくことを目的とする。

B, 研究方法

九州地区、関東地区、東北地区の各地域において共通の問診表を用い、アレルギー疾患の発症要因を検討する。主に生後1年から2年の患者を持つ母親を中心に胎内、胎外因子の関与について調査を行った。今年度は、1歳の子供のアレルギー疾患の発症に影響する因子を解明するため、問診票により、母親の妊娠分娩歴、栄養、予防接種歴、ペント、喫煙環境、さらに患者罹患歴、アレルギー疾患の有無について調査した。

また、international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC)調査、および本年まで21年間持続している、福岡市内3地区6校でのアメリカ胸部疾患学会肺疾患部門

(ATS-DLD)の問診票の日本版改訂版による質問票(ATS-DLD版)による喘息の調査結果の検討した。これは、小学校1年生には全員また、2年生以降は、前年に喘息や呼吸器症状の認められた者について行い、6年生まではこの方法で追跡した。また、途中で転入した生徒についても実施した。

A, 研究目的

近年、小児のアレルギー疾患は急速に増加を続けている。われわれの西日本11県約40,000人を対象とした同一小学校対象の、同一地区、同一方法の児童調査では、喘息は10年間で約1.4倍、20年間で約2倍に増加している。喘息以外のアレルギー疾患もその多くが増加を続けている。このような急激な増加の原因を明らかにすることは重要である。アレルギー疾患は、胎内、胎外の因子が複雑に絡み合って発症すると考えられている。すでにわれわれは、誕生月によりアレルギー疾患の発症が異なることを報告した。そして、その原因としては生後の感染の罹患また妊娠中の母親の状態が関連していると推定された。さらに、この母親の状態の内容としては、感染や、アレルギー疾患の状況も一つの重要な要因と推定された。今



### C, 研究結果

- (1) 妊娠中の母親の状態 妊娠中の母体のアレルギーの症状の数が多いほど、子供の喘息発症率は高かった。母親がアレルギー症状をもつ場合、子供が高率に喘息を発症し、それは生後、母親が多数のアレルギー症状を持つ場合に著しかった。
- (2) 家族のうちアレルギーを有する人の数と、子供の喘息の発症率は相関した。
- (3) 予防接種に関しては3種混合の摂取回数が少ないほど、喘息が発症しやすく、BCG非接種群では、接種群に比べて喘息の発症が有意に多かった。
- (4) 出生時の児の体重が大きい方がアレルギー疾患の有症率が高かった。出生時の妊娠月数が少ない方が喘息の発症が多かった。

以上より、出生前後の母親の感染症状、アレルギー症状や子供の予防接種のほか、遺伝的要因が子供のアレルギー発症に関与することが示唆された。

- (5) 福岡市での問診票調査では、喘息の有症率と生後早期の環境因子との関係を検討した。喘息患者の有症率との関係を検討した。ペット、喫煙、幹線道路の交通量として1日のトラックの走行数、食事内容、生後の抗生物質の使用などとの関係を検討した。しかし、これらの因子と喘息有症率との間には有意な関係はみられなかった。しかし、喫煙に関しては、現在の喫煙は関連がなかったが、生後1年以内の家族の喫煙と喘息有症率との間には関連がみられた。また、このほか、生後2年以内の上気道感染、喘息の家族歴、保育環境は喘息のい有症率との間に関連がみられた。
- (6) 気道感染の時期と回数も関係する。

### D, 考察

これまでの報告から、小児期のアレルギー性疾患発症に関与するとされる因子は、栄養、環境、生活様式、遺伝、乳児期の感染など多様である。一方、アレルギー特異的Tリンパ球は出生前の胎児期からすでに認められ、アレルギーに対する胎内感作の可能性も指摘されている。本研究では出生前後の母体の症状、生後の子供の罹患した疾患、症状、栄養、予防接種歴、およびペット・喫煙な

どの環境要因とアレルギー発症との関連を検討した。本調査は病院受診者のうち本研究に理解の得られた対象者をできる限り多く含むように努めた。今回の検討により妊娠中の母親の状況の頻度と子供のアレルギー症状発症率か有意に関連したこと、また母体の感染が胎児の免疫系に影響を与えることか推察された。

妊娠中の母親の状態に関しての報告は少ないか、最近、諸外国でも、幾つかの報告かなされている。海外での検討報告でも、われわれの報告と同様に、生後早期の上気道感染、日本での保育園に相当する集団保育環境などが関連すると報告されている。また、出生時の体重も関連かあるとの我々と同様の結果がこの1、2年に出されている。

これらの報告はいわゆる衛生仮説と異なる点もみられる。胎内、また、生後の環境の影響は、生後どのくらいの期間にわたって持続するのかわからない。この点に関しては、最近、精力的な検討か報告され、生後数年間と、その後では、影響因子が異なる場合も報告されている。環境因子は、それぞれか、総量と質との関係において、さらに検討される必要かあることは言うまでもない。この点に関してはすでに、母乳育児に関しては古くから前方視的研究かなされている。そして、幼児期までは関連か見られても、学童期、思春期になると影響がなくなってくることか報告されている。環境因子に一旦影響かしてしまった場合に、何処まで、治療を継続していくべきかという点からも明らかにする必要かある。

また、感染の影響に関しては、ウイルスか細菌か、更に、その種類によっても異なるかと推定されている。これらについても、幾つかの検討か開始されつつある状況であり、今後、明らかかされていくであろう。われわれの問診による追跡調査でも、明らかかして行きたいと考えている。

さらに、サイトカインなど、免疫系に与える影響にかんしても検討される必要かあると考えられ、昨年度から、症例を絞って検討を開始している。

### E, まとめ

今回の検討より、出生前後の子供の免疫系に影響を与えるいくつかの因子か子供のアレルギー発症に関わることが示唆された。それは、大きくは、感染とアレルギー症状に関する直接・間接の因子また影響結果である。

このような要因を可能な限り回避することでア

アレルギー発症を予防することかできる可能性があると推定される。今年度に明らかにされた因子をさらに症例を増やし、また、更に詳しく検討して行くことによって、確認する必要がある。さらに、これらの因子を除去、予防した場合の効果を検討することでこれらの因子の実際の関与が確認される。今後、このような、検討を行っていくことが必要であるが、次年度にはさらに、例数を増やし、また経過を観察することで、得られた因子を確認し、さらに、粘液学的検討を加え、確認してゆきたい。

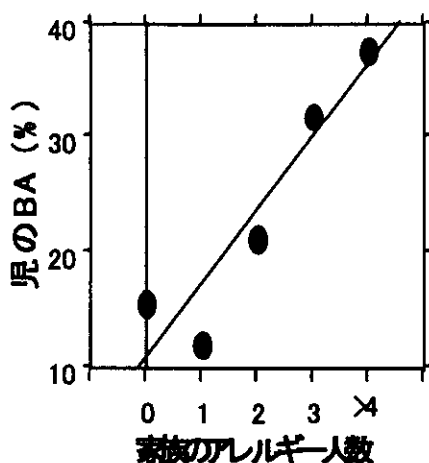
F、研究発表

(論文発表)

- 1、川野 豊、森川みき、渡邊美砂、大柴晃洋、野間 剛、小田嶋 博 1歳児のアレルギー疾患の発症に関与する因子に関する検討、日本小児アレルギー疾患学会誌、17(3) 246-254、2003

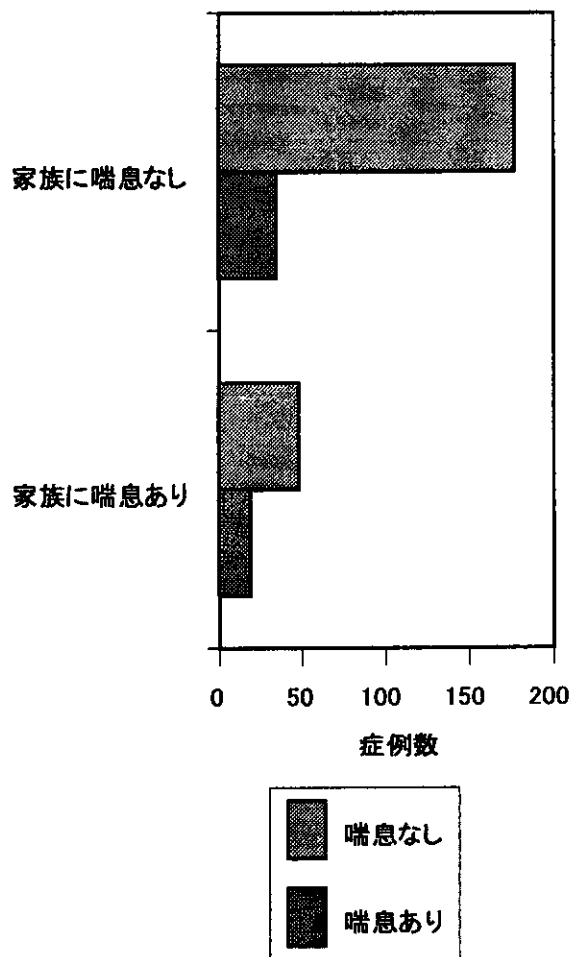
- 2、小田嶋 博 生活環境と喘息、喘息 vol 16 No 3、メディカルレビュー社、東京、2003、p65-71 (学会発表)

- 1、川野 豊、森川みき、渡邊美砂、大柴晃洋、野間 剛、小田嶋博 小児アレルギー疾患の発症の予知に関する検討 (第 4 報) 出生前の要因について、第 53 回日本アレルギー学



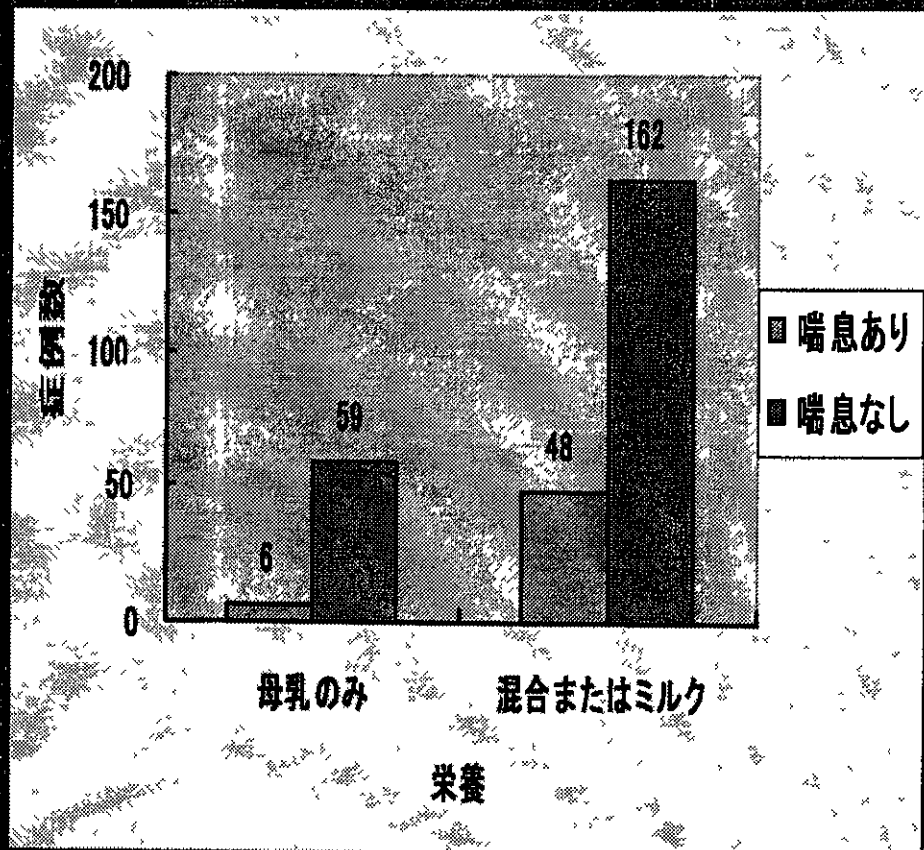
会

平成 15 年 10 月 23 ~ 25 日、岐阜



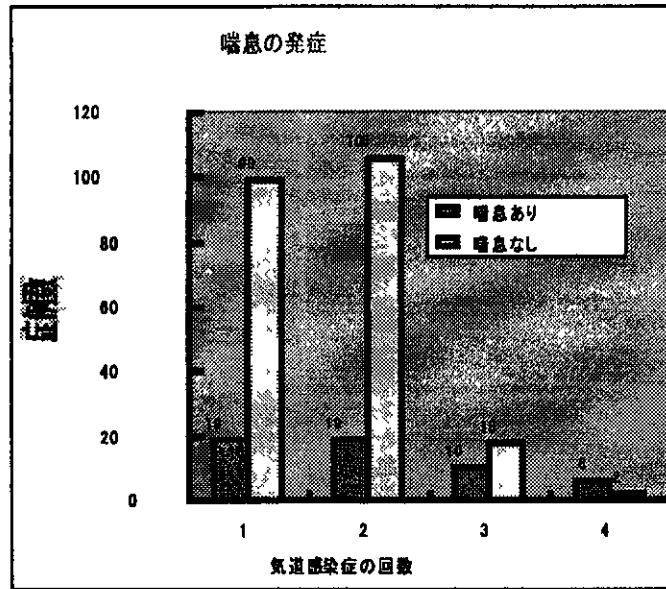
- 2、川野 豊、森川みき、渡邊美砂、大柴晃洋、野間 剛、小田嶋 博 小児アレルギー疾患の発症の予知に関する検討 (第 3 報) 乳幼児の要因について、第 40 回日本小児アレルギー学会、平成 15 年 10 月 3-4 日、岐阜
- 3、森川みき、渡邊美砂、大柴晃洋、川野 豊、野間 剛、小田嶋 博 生後 1 年間の病歴とアレルギー疾患の発症に関する検討 (第 2 報) 第 15 回日本アレルギー学会春季臨床大会、2003 年 5 月 12-14 日、横浜
- 4、小田嶋 博 喘息の発症の疫学、シンポジウム 12、乳児喘息 Most Early Intervention 第 15 回日本アレルギー学会春季臨床大会、20 横浜 03 年 5 月 12-14 日、横浜

# 母乳とアレルギー

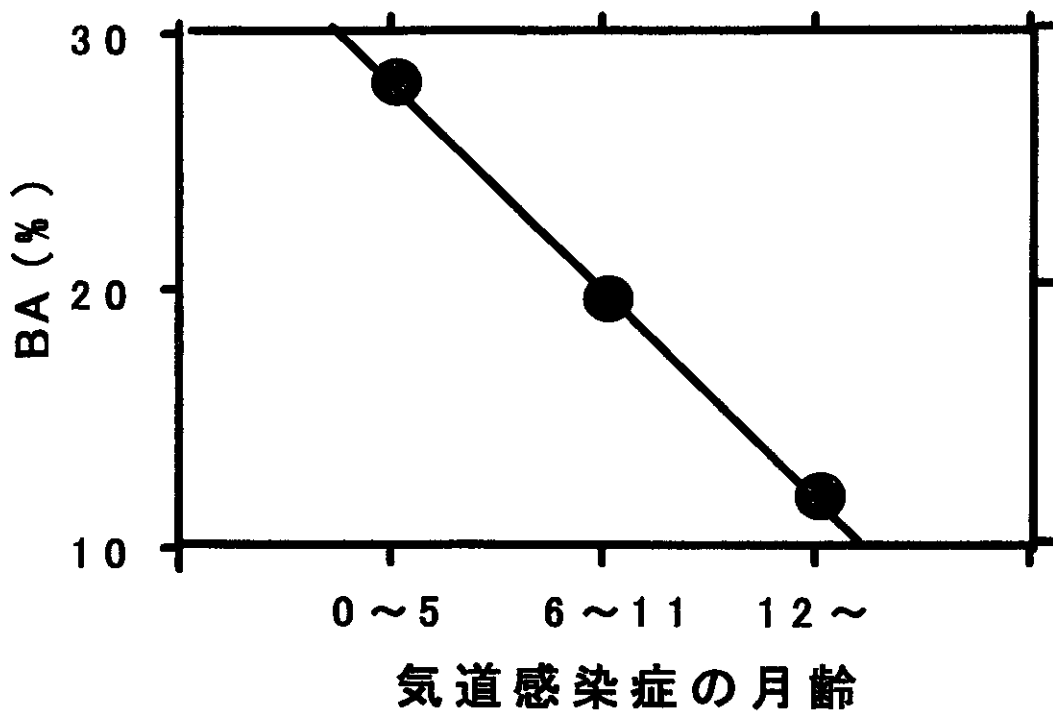


Yates Chi=5.0088, P<0.05

# 気道感染症の回数とアレルギー



Yate's CH=18.0496, P<0.01



平成 15 年度 厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業  
免疫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

研究課題名 “アレルギー気道炎症・リモテリング形成に  
果たす胎内胎外因子の役割”

分担研究者 徳山研一 群馬大学医学部小児科助教授

小児喘息は成人喘息と異なり寛解例が多い。その原因として、アレルギー性炎症による気道リモデリングの進展とその修復機転が小児と成人では異なる可能性がある。しかしながら、気道リモテリングの年齢による差異をヒトで検討するのは現時点では難点が多い。そこでマウス、特に幼若マウスの抗原反復曝露モデルを確立し、このモデルにおけるリモデリングの経時的変化を成熟マウスの病態と比較検討した。即ち、新生仔（日齢 3）および成熟（8 週齢）BALB/C マウスに、10 $\mu$ g の卵白アルブミン (ovalbumin, OA) を週 1 回ごと計 3 回腹腔内投与して感作した。次いで 2.5% OA 溶液を 1 週間に 3 回の頻度で吸入チャレンシした。チャレンジ開始後 1、2、4、8 週後の時点で、気道過敏性と気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の好酸球数の経時的変化について検討した。気道過敏性は最終チャレンシの 2 日後にメサコリンを吸入させ、enhanced pause (penh) の変化を定量した。気道過敏性の指標として、penh か前値の 200% を越えたメサコリン濃度を気道感受性 (sensitivity) とし、メサコリン最終濃度における penh の絶対値を気道反応性 (reactivity) とした。その結果、気道過敏性は、成熟マウスにおいては 8 週まで持続したが、幼若マウスでは 4 週の時点ですでに消失していた。一方、BALF 中の好酸球数は曝露期間に比例して両群の動物とも減少傾向を示したか、幼若マウスがより顕著で、4 週の時点で測定感度以下であった。

今回我々は、幼若マウスの慢性のアレルギー性気道炎症モデルを樹立することが出来た。その結果、幼若マウスでは成熟マウスに比べて気道過敏性は早期に収束することから、アレルギー性気道炎症は幼若動物では遷延しない可能性が示唆された。この結果は、小児喘息では寛解例が多いことを考える際に、興味ある現象と思われた。

## 研究協力者

大木康史

群馬大学医学部小児科助手

黛 博雄

群馬県立小児医療センター  
新生児科医長

### A 研究目的

成人喘息では軽症例であっても慢性のアレルギー性炎症に伴う気道構造の再構築（リモデリング）が認められる。このため、成人喘息は不可逆的な変化をとともなう慢性的な気道の炎症性疾患と認識されるに至った。

一方、小児喘息では成人喘息と比べ、疫学的に寛解例が多い。このことは、アレルギー性炎症による気道リモデリングの進展とその修復機転が小児と成人では異なる可能性を示唆している。

今年度我々は、上記の仮説を検討する目的で、新生仔マウスおよび成熟マウスにおいて、慢性のアレルギー性気道炎症モデルの作成を試みた。このモデルにおける気道過敏性と好酸球浸潤の経時的変化を検討した。

### B 研究方法

#### 1 プロトコール

新生仔（日齢 3）および成熟（8 週齢）BALB/C マウスに、10 mg の卵白アルブミン（ovalbumin, OA）を週 1 回ごと計 3 回腹腔内投与して感作した。次いで 2.5% OA 溶液を 1 週間に 3 回の頻度で吸入チャレンジした。チャレンジ開始後 1、2、4、8 週後の時点で、気道過敏性と気管支肺胞洗浄液（BALF）中の好酸球数を測定し、それぞれの経時的変化を検討した（図 1）。

### 2 気道過敏性の測定

気道過敏性は無拘束マウスに対し、霧化した 2 倍希釈系列のメサコリンを薄い濃度から順次吸入させることにより評価した。即ち、マウスを barometric plethysmographic chamber (Buxco electronics, Sharon, CT, USA) に入れ、連続的に pressure-time wave を測定した。気道閉塞の指標としては enhanced pause (Penh) を用いた（図 2）。Penh は気道抵抗と高い相関性を有することか知られている。メサコリン吸入は超音波ネブライザー（NE-U12, Omron）にて行ない、呼吸状態は各濃度のメサコリン吸入ごとに 3 分間記録し、平均値を求めた。気道過敏性の指標として、penh が前値の 200% を越えたメサコリン濃度を気道感受性（sensitivity）とし、メサコリン最終濃度における penh の絶対値を気道反応性（reactivity）とした。

### 3 BALF 中好酸球数の測定

気道過敏性の測定後、動物をペントバルビタールにて麻酔し、採血した。次いで、気管内に 24 ゲージのカニューレを挿入し、phosphate buffered saline (PBS) を注入し、BALF を回収した。BALF は 800rpm で 5 分間遠沈した。沈殿物は 0.3 ml の RPMI-1640 メディウムに再浮遊させ、好酸球数の算定に用いた。

### C 研究結果

#### 1 気道過敏性の経時的変化

気道過敏性は、曝露 1 週間後では両群ともに同等の亢進を認めた。その後、曝露期間に比例して気道過敏性の亢進は減弱傾向を示したが、成熟マウスでは 8 週の時点まで持続していた。一

方、幼若マウスでは4週の時点ですでに感受性、反応性の亢進はともに消失した。

## 2 BALF 中好酸球数の経時的変化

曝露1週間後では、両群の動物ともに著明なBALF中好酸球数の増加を認めた。その後、曝露期間に比例してBALF中好酸球数は両群ともに減少傾向を示したが、幼若マウスがより顕著で、4週の時点ではすでに測定感度以下となった。

## D 考察と結論

今回我々は、幼若マウスの慢性のアレルギー性気道炎症モデルを樹立することが出来た。その結果、幼若マウスでは成熟マウスに比べて気道過敏性、好酸球性気道炎症は成熟動物に比べ、早期に収束した。このことはアレルギー性気道炎症の進展は、個体の成熟段階によって異なる可能性を示唆しており、小児喘息では寛解例が多いことを考える際に、興味ある現象と思われた。

今後その詳細をより明らかにするため、以下の指標の経時的変化を検討する予定である。

(1) 組織学的検討 気道組織の炎症細胞浸潤、杯細胞化の経時的変化を比較する。

(2) 特異 IgE 抗体値の経時的変化を比較する。

(3) サイトカインの定量 Th1、Th2 サイトカイン、増殖因子などの経時的変化を比較する。

## E 研究発表

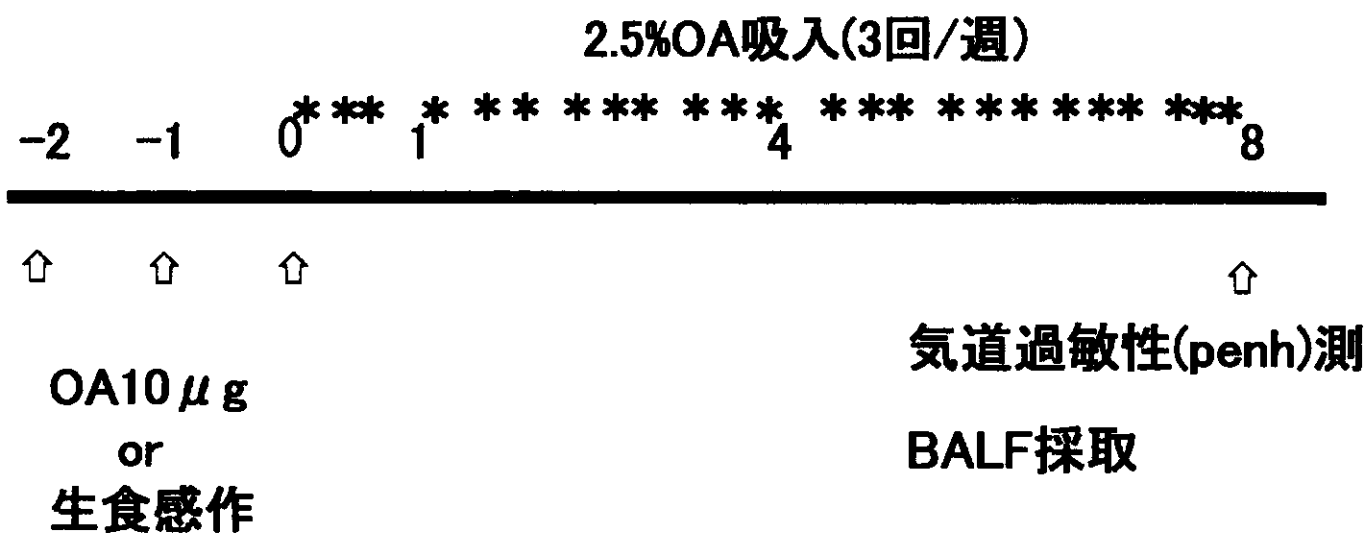
### 1 論文発表

- 1) 徳山研一 小児気管支喘息のリモデリングとアーリーインターヘンション-特集に寄せて- アレルギーの臨床 23 (10) 758, 2003
- 2) 徳山研一 粘液分泌細胞 アレルギーと免疫 10(8) 56-61, 2003
- 3) 徳山研一 気道リモデリング 最近話題の用語-知っておきたい豆知識〈小児科増刊号〉44 137, 2003

### 2 学会発表

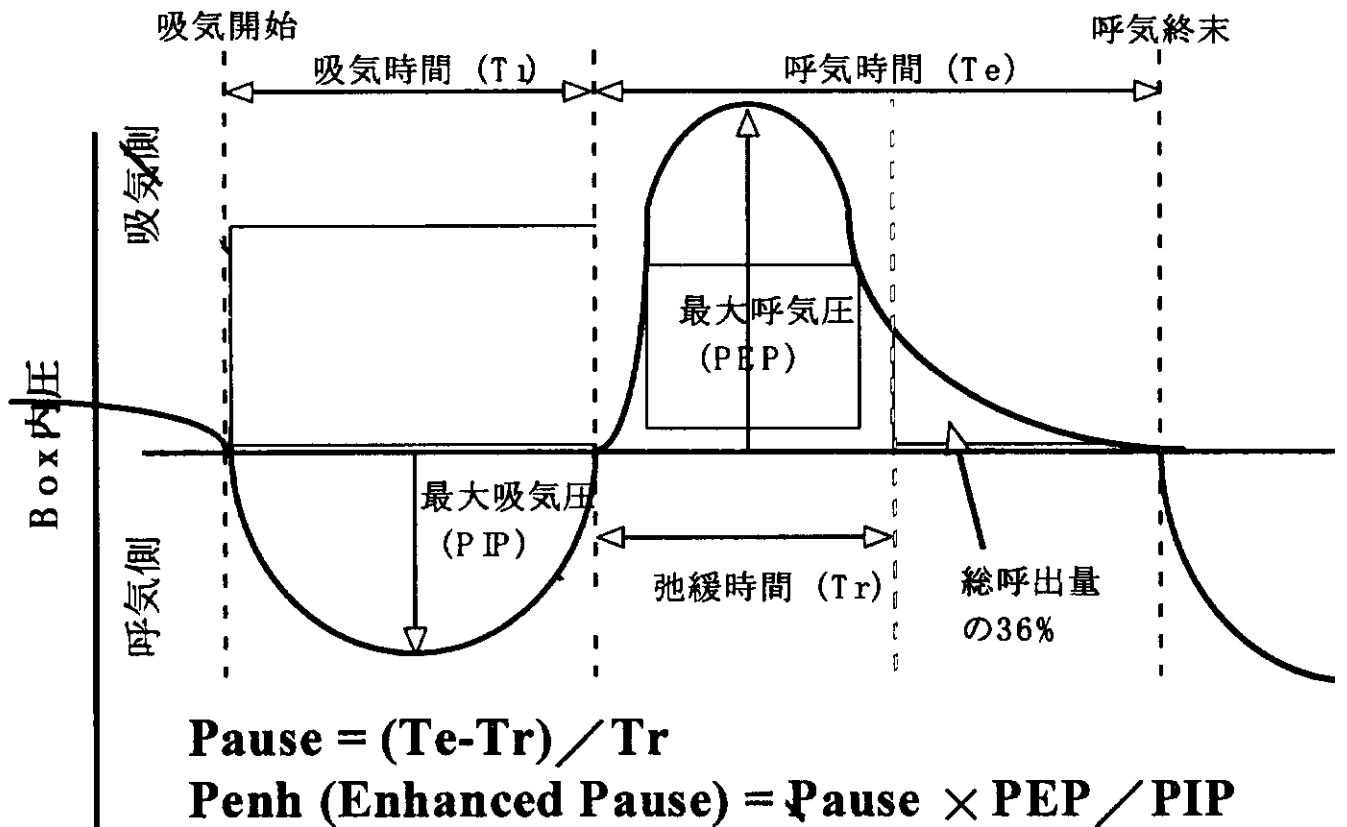
- 1) 徳山研一 小児気管支喘息の病態における気道炎症の役割、第7回北陸喘息研究会特別講演、2004 3 6、金沢市
- 2) 徳山研一 年少小児の気道病態からみた喘息治療の考え方、第10回近畿喘息と吸入療法研究会特別講演、2003 12 13、大阪市
- 3) 徳山研一 Early intervention (予知予防の視点から)、第40回日本小児アレルギー学会教育セミナー、2003 10 3、岐阜市
- 4) 徳山研一 小児気管支喘息の病態解明の進歩と今後の展望-気道炎症・気道リモデリングの側面から-、第18回東北小児喘息アレルギー研究会特別講演、2003 6 14、弘前市

# 図1. 実験プロトコール





## 図2. penhの算出方法



厚生労働科学研究費補助金（免疫・アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
免疫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  
—ヒト気道上皮細胞におけるRSV感染による遺伝子発現の網羅的解析—

分担研究者 吉原 重美 獨協医科大学小児科・講師

**研究要旨** 気管支喘息の発症および増悪に係わる胎外因子のひとつとして気道ウイルス感染が注目されている。今回、RSウイルス(RSV)感染によって誘導される喘息の発症・増悪の機序を解明する目的で、ヒト気道上皮細胞(A549)におけるRSV(long株)感染によって発現誘導する遺伝子群を、Gene Chip(Affymetrix)を用いて網羅的に解析を行った。その結果、RSV感染によって強く誘導される遺伝子は、感染24時間～48時間後に多いことが示された。また、対照群と比較して、約12000の遺伝子のうち、約50～200種の遺伝子が強く発現された。これらには、I型IFN誘導遺伝子群、炎症性サイトカイン群、ケモカイン群が含まれていた。以上の成績から、RSV感染は、気道上皮細胞において、様々な遺伝子を発現誘導し、innate-immunityによる感染防御や気道炎症細胞浸潤の病態に、重要な役割を果たしていることが示唆された。

**研究協力者：**

山田裕美 獨協医科大学小児科・助手  
松本健治 国立成育医療センター研究所  
アレルギー研究室室長  
齋藤博久 国立成育医療センター研究所  
免疫アレルギー研究部部長  
堤 裕幸 札幌医科大学小児科・教授  
七種美和子 横浜市衛生研究所  
ウイルス研究室

**A. 研究目的**

気道ウイルス感染が喘息発症・病態に影響を与えることは、特にライノウイルスやRSウイルス感染で知られている。すでに疫学的研究から、乳幼児期のRS、ライノ、パラインフルエンザなどの気道ウイルス感染が、喘息発症の危険率を高めることが報告されている。今回、RSV感染によって誘導される喘息の発症・増悪の機序を解明する目的で、ヒト気道上皮細胞(A549)におけるRSV(long株)感染によって発現誘導する遺伝子群を、Gene Chip(Affymetrix)を用いて網羅的に解析を行った。

**B. 研究方法**

A549細胞(ヒト気道上皮細胞)にHEp-2細胞で増殖させたRSV(long株)を1時間感染させた。対照として、UV照射によって不活化したRSV(UV-RSV)および1%FCSを用いた。経時的に回収した感染細胞からtotal RNAを抽出、Oligonucleotide Probe Array System(Affymetrix Gene Chip)を用いて遺伝子発現量を定量的に検討し、得られたデータをGene Springによって解析した。

**C. 研究結果**

- 1) ヒト気道上皮細胞におけるRSV感染によって、強く誘導される遺伝子は、感染24～48時間後に多く発現していた。
- 2) RSV感染上皮細胞において、対照と比較して、約12,000の遺伝子のうち、約50～200種類の遺伝子が強く発現誘導された(Fig 1)。
- 3) これらにはI型IFN誘導遺伝子群(IFIT1, ISG15 など)、炎症性サイトカイン群(IL-6, IL-1 $\beta$  など)、CCおよびCXCケモカイン群(RANTES, MCP-1, IL-8 など)が含まれていた。
- 4) I型IFN誘導遺伝子群は、RSV感染早期から強く発現し、96時間後も持続していた(Fig 2)。
- 5) 炎症性サイトカイン群は、RSV感染後48時間をピークとする発現が認められた(Fig 3)。

6) ケモカイン群においても、感染後48時間をピークとする発現が認められた。しかし、CC ケモカイン群のうち、Th2 反応、好酸球遊走活性を示すMDC, Eotaxin, TARCの強い発現は認められなかった(Fig 4, 5)。

#### D. 考察

RSV 感染は、気道上皮細胞において、様々な遺伝子を発現誘導した。それらには、感染後持続的に発現するI型IFN誘導遺伝子や、48時間後を発現ピークとする炎症性サイトカイン、CCおよびCXCケモカインが含まれていた。以上の結果より、RSVは気道上皮細胞に感染することで、直接的に感染防御反応を示すとともに、サイトカイン・ケモカインの発現を誘導することで、種々の炎症細胞を局所へ遊走・活性化する可能性が示唆された。

#### E. 結論

RSV 感染は、気道炎症を引き起こす胎外因子として重要であると考えられた。

#### F. 発表

##### 論文発表

(1)山田裕美、吉原重美、有阪 治 気道ウイルス感染と喘息発症 小児科診療, 66 1347-1352, 2003

(2)吉原重美、山田裕美、有阪 治 下気道ウイルス感染と喘息発症 医学のあゆみ, 207 512-17, 2003

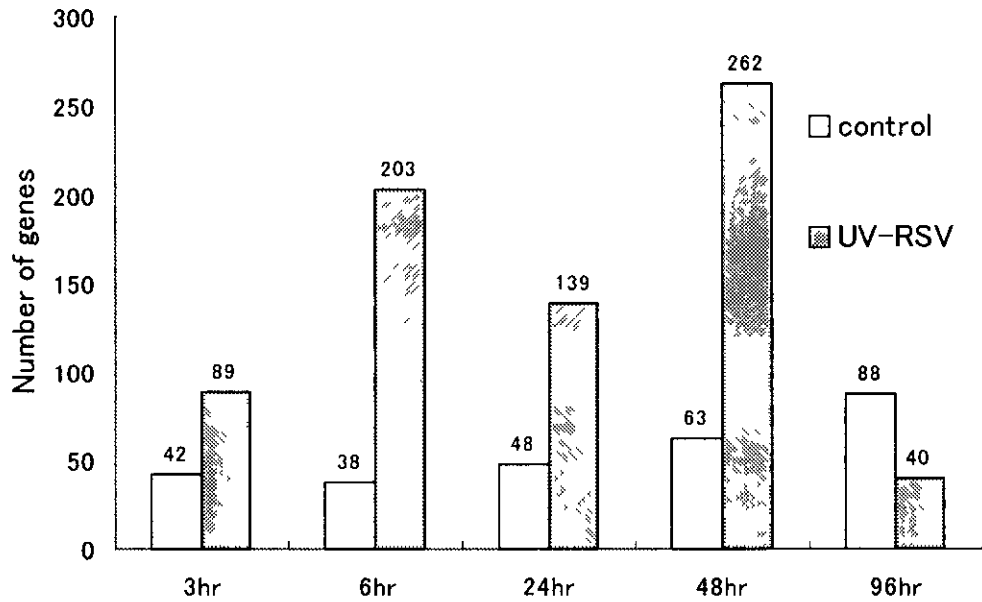
(3)吉原重美、山田裕美、小野三佳、福田典正、阿部利夫. 気道炎症のモニタリング、喀痰、ECP, LTE4, NO 西間三馨/森川昭廣編, 図説'小児喘息の特徴-病態と薬物療法を中心に-メディカルレビュー社, pp 104-129, 2003

(4)吉原重美、山田裕美、有阪 治 好中球-アレルギー性の気道炎症と細胞-アレルギー・免疫、10 968-975, 2003

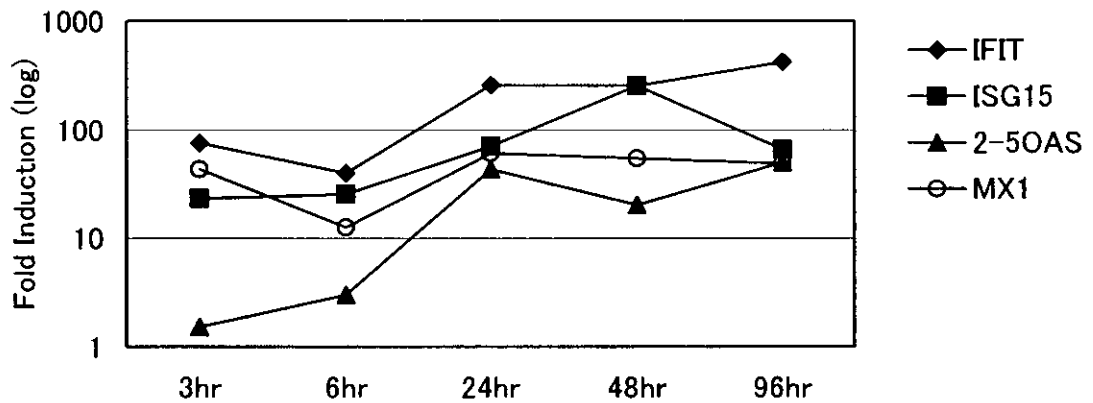
(5)吉原重美、山田裕美、有阪 治' 好中球-喘息に関する細胞をめぐって(最近の進歩)-第22回六甲カンファレンス記録集, 81-91, 2003

##### 学会発表

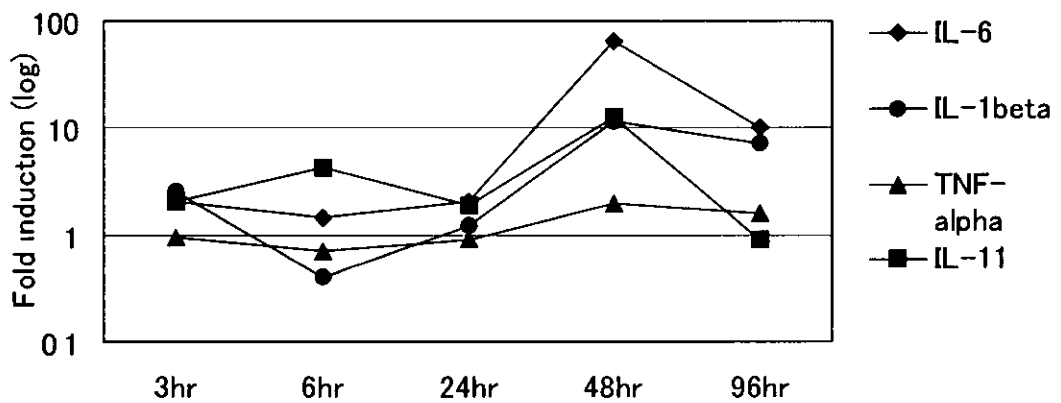
山田裕美、松本健治、橋本宣子、加藤 厚、本間俊樹、斉藤博久、七種美和子、吉原重美、有阪 治 ヒト気道上皮細胞におけるRSV感染による遺伝子発現の検討 第53回日本アレルギー学会総会、岐阜, 2003 10.



**Fig 1** Kinetics of changes in total gene expression after RSV inoculation (the expression levels >5 fold)



**Fig 2** RSV-inducible anti-viral response genes



**Fig 3** RSV-inducible cytokine genes