

厚生労働科学研究研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

リウマチアレルギー疾患の早期診断に関する研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 白川 太郎

平成 16 (2004) 年 4 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

リウマチアレルギー疾患の早期診断に関する研究 .....	1
------------------------------	---

### II. 分担研究報告

1. アレルギー疾患予防効果試験研究のためのフィールド作成 .....	5
2. アレルギーにおける粘膜免疫作成とサイトカイン関与検討 .....	9
マウスモデル開発	
3. 消化器上皮細胞に対するIL-4, IL-13の機能的影響に関する検討 .....	11
4. 腸内フローラをEPEC（腸管病原性大腸菌）で再建したマウスを .....	15
用いた経口免疫寛容の検討	
5. 乳幼児における腸内細菌叢とアレルギー発症の相関関係の解析 .....	17
6. アレルギー疾患関連遺伝子解析研究 .....	21
7. 沖縄県石垣市小児におけるアトピー性皮膚炎（Atopic dermatitis:AD） .....	23
と家族歴・血清IgE値・RASTの関係に関する研究	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	27
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	37
-----------------------	----

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）

リウマチアレルギー疾患の早期診断に関する研究

主任研究者 白川太郎

京都大学大学院医学研究科社会健康医学専攻健康要因学講座健康増進・行動学教授

分担研究者

清野宏（大阪大学微生物病研究所免疫化学教授） 古賀泰裕（東海大学医学部感染症学教授）  
園元謙二（九州大学大学院農学研究院教授） 中山二郎（九州大学大学院農学研究院助教授）  
小泉昭夫（京都大学大学院医学研究科環境衛生学教授） 出原賢治（佐賀医科大学学生化学教授）  
古江増隆（九州大学大学院医学研究院教授）

研究協力者

清原千香子（九州大学医学研究院講師） 大津暁子（京都大学大学院医学研究科助手）  
西間三馨（国立療養所南福岡病院院長） 小田嶋博（国立療養所南福岡病院小児科医長）  
庄司俊輔（国立療養所南福岡病院副院長） 柴田瑠美子（国立療養所南福岡病院小児科）  
山田達夫（福岡大学医学部内科教授） 久保千春（九州大学医学院心身医学教授）  
藤野武彦（九州大学健康科学センター教授） 山本哲郎（TTC株式会社社長）  
玉利真由美（理化学研究所研究員） 福田早苗（京都大学大学院医学研究科研究生）  
砂田孝一（九州芸術工科大学客員教授） 坪内美樹（京都大学大学院医学研究科院生）  
程雷（京都大学大学院医学研究科院生） 横山葉子（京都大学大学院医学研究科院生）

研究要旨：アレルギー疾患は急激に増加しており、その予防は国家的な急務である。その解決には、可能な限り早期に、非侵襲的な方法で発症を予測する診断法を開発することが必要である。現在、アレルギー発症の最も確実かつ早期の変化として便中腸内細菌の変化が注目されており、本研究ではまず、大量の便サンプル内の細菌パターンを判定する方法を開発した。ついで石垣島の幼児の血液サンプルの分析を行い、その妥当性を検討した。一方、腸内細菌が幼児の免疫系発達にどのような影響を及ぼすかについてマウスモデルを用いて検討したところ、所期に非常に重要な役割を演じていることが判明し、それに関連すると思われる遺伝子群も同定された。最後にこれらの結果の妥当性を検討するため、熊本県小国町でのフィールド作成を行い、新生児の追跡調査を行う準備を整えた。

A. 研究の目的

アレルギー疾患はいずれの年齢でも発症し、旧厚生省特別研究班の調査でも国民の38%が罹患する最も頻度の高い生活習慣

病であり、国民の QOL の立場から特に重要な疾患である。特に小児における罹患率が増加し、小児の死亡の重要原因であり、また小児救急医療費の 30%以上を占めることからその予防は厚生労働行政の急務であると考えられる。其の予防のためには出産直後からの早期診断が必要であるが、個体が小さく頻りに血液検査などの検査を行うことは成人と異なり容易ではない。乳児期の免疫系は主として消化管において形成されると考えられ、その形成には消化管の細菌相の形成が重要であると考えられている。したがって消化管細菌相と免疫能がアレルギー疾患発症児童では正常児童と成長につれどのように異なるのかを明らかにすることはアレルギーの発症機序を明らかにし、その予防対策を構築する上で必要であると考えられる。15年度には以上の目的を達成するため、13、14年度の成果を踏まえて（1）便中の細菌の分子遺伝学的な検査法の確立を行う、（2）腸管免疫系のマウスにおける実験モデルの確立、（3）ヒト個体のアレルギー疾患関連遺伝子解析との比較、そして（4）腸内細菌とアレルギーとの関連依拠しての一般集団における疫学調査の準備を行ってきた。

## B. 研究方法

1. 早期診断に向けての疫学調査：大規模な追跡調査を行う目的で①人口の入れ替わりが少ない地域であること（追跡調査が可能であること）、②健康への取り組みが熱心であること、③大気汚染その他の、他の発症要因が少ない地域であること、④年間の新生児誕生がある程度見込める地域であること、などの条件を満たす地区として、九州地方、東北地方を対象に選定を行なった。

2. マウスにおける解析：腸内細菌を再建したマウスに wild type と mutant type の病原性大腸菌を感染させ、免疫寛容の成立の有無を比較検討する。この免疫能は消化管のリンパ節に依存すると言われておりマウスによるリンパ節分布と免疫能についても

あわせて観察した。一方、消化管免疫能と細菌との関係の検討における IL-13 及びその受容体の発現と疾患感受性との関連について検討を行うため食物アレルギーも出る

動物を作成し、IL-13やIL-4により誘導される遺伝子群の動きを肺組織のRT-PCRを行って同定した。

3. 便の細菌相の検索：福岡市内の井植産婦人科医院での新生児を対象にして、入院1週間の便と退院後の1箇月毎の便の収集を行い、九大農学部で処理され細菌16sRNA cDNAを抽出してライブラリーを作成した。

4. ヒトアレルギー関連遺伝子解析：理化学研究所SRCセンター及び京都大学において、正常対照658名、小児喘息例384例、成人喘息例434例を収集して全ゲノムSNP解析を行った。対象SNPは遺伝子コード部分約100,000個から1次スクリーニングで抽出した約2000個を対象とした。

5. 倫理審査：本研究を遂行するにあたり、対象とする個人の臨床データの収集と採血に当たっては担当医師から統一のinformed consentを配布し、各人（乳幼児の場合は両親）に、この研究の不利益、危険性の排除に関する考慮、必要性和有用性を充分説明して同意を得た場合に限り研究を実施する。その後のデータは全て連結可能なID化を行い、匿名化しておく。遺伝子解析及び個人情報採取に当たってはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針等を遵守することとし、動物実験も含め当該施設における倫理委員会での審査を受けることとした。

## C. 研究結果

1. 疫学調査の開始：大規模疫学調査として、昨年度より、プロバイオティクスを製造している3企業をオブザーバーに迎え小国町を中心とした研究会を立ち上げた。研究会

委員には、町の代表者を迎え、試験内容の理解を深めるとともに、アンケート調査などを中心にして町民に啓蒙活動を行った。第四回研究会では、オブザーバーによる、プロバイオティクスのアレルギー予防効果試験の提案が行われ、了承された。その後、町を中心として、NPO を立ち上げ、本研究の準備を整えた。この研究会の最初の研究として、まず、小国町における代替医療、プロバイオティクスの使用頻度を 3500 戸全ての住民にアンケート調査を実施するとともに、本研究の意義を徹底させるための説明会を繰り返し、毎月行なった。その結果、小国町では、約 35%の住民が代替医療などに関心があり、本研究の目的への理解も得られた。

2.再建マウスによる免疫寛容誘導：再建マウスにおける感染実験で Wild type 病原大腸菌 EPEC 株 (WT) の、Tir あるいは遺伝子を欠損させた EPEC 株 ( $\Delta$ Tir) に対する免疫寛容誘導について比較したところ、 $\Delta$  Tir を感染させたマウスでは免疫寛容の誘導が困難となった。

3. 腸管における免疫におけるリンパ節の重要性：一方、パイエル板以外にも M 細胞が存在することから、腸内細菌による免疫寛容は広くさまざまな場所で起こりうる可能性があり、それらの細胞の密度などがどのように影響するかが、免疫寛容に差を生み出すと考えられ、消化管におけるアレルギー反応の阻止に腸内細菌が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

4.腸管における TH2 サイトカインの役割：今年度はさらに喘息モデル動物での肺組織での解析を行い、これらのサイトカインによる誘導遺伝子を同定した後、喘息モデル動物での解析で 9 個の興味ある遺伝子を同定した。これらの遺伝子の動向がアレルギー腸炎モデルマウスでどのようになっているか解析した。その結果、9 遺伝子のうちで明らかに遺伝子発現の増強が見られた遺伝子は 15-LO(15-lipoxygenase) のみで

あることが示された。この遺伝子の発現は 3-6 倍発現が増強しており、炎症性腸疾患でも上昇していることが報告されている。今後食物アレルギーとの関連において遺伝子検索の必要があると考えられる。

5. アトピー遺伝子の解析：前年度に引き続き約 10,000 個の SNP (1 塩基置換) を比較して有意に頻度に差のある SNP が最終的に 37 個程度発見された。

6. 便のマイクロバイオーム診断法の確立：36 名の新生児の便につき約 415 クロームを抽出し、配列解析を行った。その結果、GRAM 陽性、陰性両種合わせて、41 種類の菌を同定した。その結果、16SrDNA によるライブラリーの作製は可能であり、大部分の細菌が診断可能であることが裏付けられた。興味深いことに、これらの菌の大部分は口腔内寄生菌であり、この結果から、乳児では口腔からの菌が腸内に定着している可能性が示唆された。また、抗生剤投与群では、フローラの多様性が低下する可能性が示され、これがアレルギーの発症に関連する可能性が考えられた。

#### D. 結論・考察

以上の結果から、新生児以降の免疫の発達にはリンパ節が重要な役割を担っており、またそれらのリンパ節でのサイトカインの産生能には遺伝的な差異があることが分かる。一方、その免疫を誘導する因子として消化管における細菌相の発育が消化管でのアレルギー反応に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。16SrDNA 法による迅速診断法が開発可能であることが判明し、またフィールドが確定したことにより、今後、この方法を用いて大規模な疫学調査を行い、その信頼性を高める作業が可能になった。

#### E. 研究発表

白川分担研究報告に記す。

**F. 健康危険情報**

特になし

**G. 知的所有権の取得状況**

(出願中)

- 1) 毛包幹細胞の培養によるアトピー性皮膚炎の診断
- 2) 遺伝子(TLR3,T-bet)とアレルギー性喘息の関連

**H..その他**

特になし

## リウマチアレルギー疾患の早期診断に関する研究 アレルギー疾患予防効果試験研究のためのフィールド作成

主任研究者 白川太郎

京都大学大学院医学研究科社会健康医学専攻健康要因学講座健康増進・行動学教授

研究協力者

程 雷（京都大学大学院医学研究科院生）坪内美樹（京都大学大学院医学研究科院生）

横山葉子（京都大学大学院医学研究科院生）

研究要旨：迅速な便中の菌の同定が可能になった場合には、そのシステムを使って、診断に対する妥当性、信頼性を検討する必要がある。そのためには、固定した集団を追跡するとともに、ターゲットとなる菌成分を投与し、アレルギー予防が可能であることを示すことが必要である。本目的のため昨年度に引き続いて熊本県小国町で委員会を設置し、新生児における追跡調査、及びプロバイオティクス投与試験を開始する準備を完了した。

### A.研究目的

過去 2 年間の研究により、便中の細菌のパターンがアレルギー発症に関連している可能性が示され、その迅速かつ大量処理可能な診断法の開発を行なってきた。さらにこれまでの研究で明らかにされた乳酸菌の効果を確認する目的で乳酸菌由来のプロバイオティクス投与により、アレルギー疾患が予防できることを確認すればこの診断法の妥当性を検討できると考えられる。そこで実際に日本人においてアレルギー予防効果があるか否かを検討することを目的に、フィールド調査を行う試験コホート作りを開始した。

### B.方法

フィールドの対象として人口の入れ替わりが少ない地域であること（追跡調査が可能であること）、②健康への取り組みが熱心であること、③大気汚染その他の、他の発症要因が少ない地域であること、④年間の新生児誕生がある程度見込める地域であること、などの条件を満たす地区として、熊本県小国町を選定した。

### C.結果

昨年度より、プロバイオティクスを製造している 3 企業をオブザーバーに迎え小国町を中心とした研究会を立ち上げた。研究

会委員には、町の代表者を迎え、試験内容の理解を深めるとともに、アンケート調査などを中心にして町民に啓蒙活動を行った。第四回研究会では、オブザーバーによる、プロバイオティクスのアレルギー予防効果試験の提案が行われ、試験準備を整えた。その後、この研究の実施部隊として、町、大学、企業間で NPO を開設して、この研究を行なう体制を整えた。その後倫理委員会に対する申請を行い、2 案（鼻アレルギーを対象とした成人への試験）はすでに承認を得られており、残る第 3 案（新生児に対するアトピー性皮膚炎の試験）も最終審議中である。

### D.考察・結論

アレルギー疾患予防は、生後早いうちに行うことが望ましい。アレルギー疾患発症予防には、早期の診断方法、予防方法の確立が不可欠である。特に、乳幼児では、出来るだけ侵襲性の低い簡便な方法が望ましい。また予防方法は、安全性・信頼性の高いものである必要がある。どの時期の腸内細菌叢の構成が、アレルギー性疾患発症と関わるのかを明らかにする一方で、日本人の腸内環境を整えることの出来るプロバイオティクスを決定する必要がある。こういった取り組みは、固定された集団での追跡調査を行って初めて可能となると思われる。

したがって我々の作成したフィールドでの調査はそのモデルケースになることが期待される。現在倫理委員会での審議はほぼ終了しており、来年からの実施を行なうことで、その妥当性が検討されると期待される。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tanaka K, Roberts MH, Yamamoto N, Sugiura H, Uehara M, Mao X-Q, Shirakawa T, Hopkin JM: Heterogeneity of atopic eczema; a genetic variant of RANTES and high IgE level. *Clin. Exp. Allergy*(in press)
2. Hasegawa K, Hirota T, Obara K, Akahoshi M, Cheng L, Takahashi Shimizu M, Sekiguchi H, Kokubo M, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Mao X-Q, Tamari M, Shirakawa T: Association between genetic variation in the gene for ADAM33 and clinical severity of childhood asthma in the Japanese population. *Hum Genet*(in press).
3. Nakajima T, Iikura M, Okayama I, Matsumoto K, Uchiyama C, Shirakawa T, Yang X, Adra CN, Hirai K, Saito H: Identification of granulocyte subtype-selective receptors and channels by high-density oligonucleotide probe array. *J. Allergy Clin. Immunol.*2004;113(3):528-535.
4. Fukuda S, Ishikawa H, Koga Y, Yaiba Y, Nakashima K, Cheng L, Shirakawa T. Allergy and serum antibodies against bacterial species of predominant commensal intestinal microflora in schoolchildren. *J. Adoles. Health.*2004;34.未定
5. Shimada T, Cheng L, Ide M, Fukuda S, Enomoto T, Shirakawa T. Effect of lysed enterococcus faecalis FK-23 (LFK) on allergen-induced peritoneal accumulation of eosinophils in mice. *Clin Exp Allergy.* 2003;33:684-7.

6. Bottini N, Mao XQ, Borgiani P, Saccucci P, Stefanini L, Greco E, Fontana L, Hopkin JM, Shirakawa T: Genetic control of serum IgE level; a study of lowmolecular weight protein tyrosine phosphatase. *Clin. Genet.* 2003;63:228-231
7. Ouchi K, Suzuki Y, Shirakawa T, Kishi F. Polymorphism of SLC11A1(formerly NRAMP1) gene confers susceptibility to Kawasaki disease. *J Infect Dis* 2003;187:326-9.
8. Peisong G, Mao X-Q, Enomoto T, Feng Z, Gloria-Bottini F, Bottini E, Shirakawa T, Sin D, Hopkin JM. An asthma-associated genetic variant of STAT6 predicts low burden of ascaris worm infestation. *Genes Immunity.*2004;5:58-62.

1. 福田早苗, 白川太郎. プロバイオティクスによるアレルギー予防の試み. 最新医学 2003; 58(2): 88-92.
2. 程雷, 榎本雅夫, Hopkin JM, 白川太郎. Th1 誘導物質を用いたアレルギー治療と予防の試み. 最新医学 2003; 58(2): 82-87.
3. 中島加珠子, 井手亜里, 白川太郎. 微量元素の動態から見たアレルギー. 最新医学 2003; 58(2): 77-81.
4. 赤星光輝, 玉利真由美, 白川太郎. アレルギー疾患における最近の話題 オーバービュー-. 最新医学 2003; 58(2): 7-14.
5. 程雷, 笹原祐介, 三好彰, 白川太郎. アレルギーはなぜ増えているのか. 日本小児難治喘息アレルギー疾患学会誌 2003; 1(1): 7-14.
6. 赤星光輝, 玉利真由美, 清水麻貴子, 高橋尚美, 広田朝光, 小原和彦, 福田早苗, 中島加珠子, 笹原祐介, 程雷, 白川太郎. アレルギー疾患でのポストゲノム(テーラーメイド医療). アレルギーの臨床 2003; 23(1): 82-86

## 2.学会発表

1. 福田早苗, 白川太郎, 石川裕樹, 相場勇志, 古賀泰裕:アレルギー疾患と腸内細菌透過性に関する研究, 第13回日本疫学会, 福岡, 2003. 1.
2. 白川太郎:アレルギーの予防を考える(学術講演), 第26回日本位学会総会, 福岡シークホテル, 2003. 4. 4-6
3. 玉利真由美, 白川太郎:気管支喘息関連遺伝子への患者一対象研究を中心に(シンポジウム), 第15回日本アレルギー学会春季臨床大会, パシフィコ横浜, 2003. 5. 12-14.
4. 井手昌洋, 嶋田貴志, 榎本雅夫, 白川太郎, 安枝 浩:スギ花粉抗原の1型アレルギーモデルに対する乳酸菌FK-23菌抽出物(LFK)の効果, 第15回日本アレルギー学会春季臨床大会, パシフィコ横浜, 2003. 5. 12-14.
5. 三邊武幸, 三好 彰, 程 雷, 股敏, 時 海波, 白川太郎:アレルギー性鼻炎と大気汚染, 第15回日本アレルギー学会春季臨床大会, パシフィコ横浜, 2003. 5. 12-14.
6. 福田早苗, 白川太郎:プロバイオティクスを用いたアレルギー予防試験に関する取り組みー熊本県小国町研究ー, 第15回日本アレルギー学会春季臨床大会, パシフィコ横浜, 2003. 5. 12-14.
7. 白川太郎:新しい食の科学、フードバイオロジーー機能性食品によるアレルギー予防をモデルにー(特別講演), 第49回日本生理人類学会, 九州大学百周年記念講堂, 2003. 5. 16-17.
8. 白川太郎:職業・環境によるアレルギー疾患の遺伝的背景(特別講演), 第34回日本職業・環境アレルギー学会, 栃木県総合文化センター, 2003. 6. 27-78.
9. 白川太郎:遺伝要因と環境要因の相互作用:アレルギー疾患をモデルに(特別講演), 第10回日本免疫毒性学会, 相模原市民文化会館, 2003. 9. 25-26.

- 1) 毛包幹細胞の培養によるアトピー性皮膚炎の診断
- 2) 遺伝子(TLR3, T-bet)とアレルギー性喘息の関連

## G.危険情報

特になし

## F.知的所有権の出願・取得状況 (出願中)

「アレルギーにおける粘膜免疫形成とサイトカイン関与検討マウスモデル開発」

分担研究者： 清野 宏 東京大学医科学研究所 教授  
研究協力者： 権 美那 国際ワクチン研究所 部長・東大医科研 客員研究員

研究要旨

アレルギー疾患早期診断開発に向けて、アレルゲンが取り込まれる粘膜面での免疫機構の関与はほとんど未解明である。そこで、粘膜免疫と食物アレルギー発症メカニズムを解明する為に動物実験モデル開発を進めて来た。そこで OVA アレルギー性下痢モデルを開発し、その実験系を駆使して、病態形成の場である大腸に存在する各種粘膜免疫担当リンパ組織のアレルギー発症における生物学的役割を明らかにする。まず最初に Colonic patch (CP) 欠損マウスを作成しその関与を検討した。CP 欠損マウスにおいても全身感作後、OVA を連続経口投与する事でアレルギー性下痢が発症する。つまり、同組織はその病態形成に関与していない事が示唆された。

A. 研究目的

本研究計画では腸管免疫の観点から特に腸管関連リンパ組織形成、粘膜免疫、食物アレルギーに関して、腸内環境の影響も含めて、そのクロストークを細胞・分子レベルで解明し、アレルギーの詳しい誘導メカニズムを明らかにする。そこで得られる新情報は新規の「アレルギー早期診断・予防ならびに治療法」開発への貴重な基礎科学的情報を提供する。

B. 研究方法

当研究班は食物抗原（例：OVA）によって全身感作された BALB/c マウスに同じ抗原を連続経口投与することにより、大腸に局限した抗原特異的 IgE 依存型アレルギー反応とそれに続く下痢症状が誘導される実験モデルの開発に成功している。全身感作された免疫担当細胞の大腸へのホーミングについて、大腸における誘導組織として知られている Colonic patch (CP) の関与を調べるために Lymphotoxin  $\beta$  受容体 (LT $\beta$ R) シグナル阻止状態を導入して、CP 欠損マウスを作成した。例えば、胎生期に LT $\beta$ R-Ig 複合タンパクを投与すると CP 欠損マウスが生まれてくる。そして、この CP 欠損マウスを使用して、食物アレルギー発症における CP とそこに存在する免疫担

当細胞の役割を検討した。

C. 研究結果

CP 欠損マウスにおいても、全身感作後に OVA 連続経口投与を開始すると大腸に局限したアレルギー性下痢症状が誘導された。さらに CP 欠損マウスの大腸の粘膜固有層には同様な処理をした正常マウスと同レベルの異常な OVA 特異的免疫応答の上昇が認められた。これらの結果は全身系免疫担当組織由来の OVA 特異的 T および B 細胞が大腸に局限してホーミングする際に、CP は関与しないことを示唆する。そこで、組織切片を観察してみると大腸では CP が欠損しているが孤立リンパ小節 (ILF) が多く見られ、大腸に局限したホーミングに ILF の関与が示唆された。

D. 考察

大腸に局限してアレルギーを誘導する脾臓由来 Th 細胞の大腸特異的ホーミング機構の解明が益々必要となり、CP は関与していないらしい。一方、その要としての ILF の重要性が示唆される結果が得られた。そこで、各リンパ節様組織形成に関わるプログラム炎症サイトカインならびにレセプターを欠損させることで、ILF 欠損マウスや、ILF・CP 欠損マウス

を作成してその解明に迫っていく。さらにこれら各種粘膜関連リンパ組織の抗原特異的 Th 細胞発達への関与やその大腸特異的ホーミングを単個細胞レベルで解析するために MHC クラス II-OVA ペプチドテトラマーの作成を開始した。

#### E. 結論

アレルギー性下痢誘導における大腸に存在する CP ならびに同リンパ組織由来免疫担当細胞の関わりがない事が示唆された。

#### F. 文献

1. Okuda, Y., Takahashi, I., Kim, J-K., Ohta, N., Iwatani, K., Kai, Y., Tamagawa, H., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kawano, S., Sasaki, Y., Hori, M., Takeda, K., Akira, S. and Kiyono, H. 2003. Development of colitis in STAT6-deficient TCR $\alpha$  mice: A potential of STAT6-independent IL-4 signaling for the generation of Th2-biased pathologic CD4<sup>+</sup> T cells. *Am. J. Pathol.* 162: 263-271
2. Tamagawa, H., Takahashi, I., Furuse, M., Yoshitake-Kitano, Y., Tsukita, S., Itoh, T., Matsuda, H. and Kiyono, H. 2003. Characteristics of claudin expression in follicle-associated epithelium of Peyer's patches: Preferential localization of claudin-4 at the apex of the dome region. *Lab. Invest.* 83: 1045-1053
3. Kweon, M-N. and Kiyono, H. 2003. Eosinophilic gastroenteritis: a problem of the mucosal immune system? *Curr. Allergy Asthma Rep.* 3: 79-85
4. Kobayashi, M., Kweon, M-N., Kuwata, H., Schreiber, R.D., Kiyono, H., Takeda, K., and Shizuo, A. 2003. Toll-like receptor-dependent production of IL-12p40 causes Chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 111: 1297-1308
5. Park, E.J., Takahashi, I., Ikeda J., Kawahara, K., Okamoto, T., Kweon, M-N., Fukuyama, S., Groh, V., Spies, T., Obata, Y., Miyazaki, J. and Kiyono, H. 2003. Clonal expansion of double-positive (DP) IELs by MICA expressed in mouse small intestinal epithelium. *J. Immunol.* 171: 4131-4139
6. Boyaka, P.N., Ohmura, M., Fujihashi, K., Koga, T., Yamamoto, M., Kweon, M-N., Takeda, Y., Jackson, R.J., Kiyono, H., Yuki, Y. and Kiyono, H. 2003. Chimeras of labile toxin one and cholera toxin Retain mucosal adjuvanticity and direct Th cell subsets via their B subunit. *J. Immunol.* 170: 454-462.
7. Hagiwara, Y., McGhee, J.R., Fujihashi, K., Kobayashi, R., Yoshino, N., Kataoka, K., Etani, Y., Kweon, M-N., Tamura, S., Kurata, T., Takeda, Y., Kiyono, H. and Fujihashi K. 2003. Protective mucosal immunity in aging is associated with functional CD4<sup>+</sup>T cells in nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue. *J. Immunol.* 15: 1754-1762.
8. Yuki, Y. and Kiyono, H. 2003. New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. *Rev. Med. Virol.* 13: 293-310
9. Jang, M.H., Kweon, M-N., Hiroi T, Yamamoto, M., Takahashi, I. and Kiyono, H. 2003. Induction of cytotoxic T lymphocyte responses by cholera toxin-treated bone marrow-derived dendritic cells. *Vaccine* 21: 1613-1619

リウマチアレルギー疾患の早期診断に関する研究  
—消化器上皮細胞に対する IL-4, IL-13 の機能的影響に関する検討—

分担研究者 出原賢治 佐賀大学医学部分子生命科学講座教授

研究協力者 有馬和彦、金地佐千子、増本清成、金地泰典  
（佐賀大学医学部分子生命科学講座助手）  
権美那（大阪大学微生物病研究所助手）  
清野宏（東京大学医科学研究所教授）

**研究要旨** 食物アレルギーにおいても気管支喘息やアレルギー性鼻炎と同様に、Th2 サイトカインである IL-4, IL-13 の重要性が指摘されている。しかし、IL-4, IL-13 によりどのような遺伝子が誘導され、アレルギー性腸炎の病態形成に関与しているかは不明なままである。この点を明らかにするために、経口卵白アルブミン投与によるアレルギー性腸炎モデルマウスの腸組織から RNA を採取して、卵白誘発喘息モデルマウスの肺組織で発現が増強した遺伝子の発現レベルを Real-Time RT-PCR 法にて解析した。解析を行った 9 遺伝子のうち、アレルギー性腸炎モデルマウスにて発現増強が認められたものは 15-lipoxygenase (15-LO) のみであった。15-LO はアラキドン酸代謝に関与して、15-hydroxyeicosatetraenoic acid を産生する酵素である。15-LO の発現は、全身投与も経口投与もしない群に比べて、経口投与のみ行う群では約 3 倍、両方の投与を行う群では約 6 倍増強していた。15-LO と気管支喘息との関連はすでに報告されているが、15-LO と腸管との関連としては、クローン病、潰瘍性大腸炎といった炎症性腸疾患における発現増強、あるいは腸上皮細胞のアポトーシスと関与が報告されているのみで、詳細はほとんど不明である。今後 15-LO の役割を明らかにすることは、食物アレルギーの病因解明につながると期待される。

#### A. 目的

気管支喘息やアレルギー性鼻炎では Th2 サイトカインである IL-4, IL-13 が重要な役割を持っていることが知られている。一方、食物アレルギーにおいても患者血清中における IL-4 の増加や、アレルゲン特異的 T 細胞からの IL-4, IL-13 産生増強といった気管支喘息やアレルギー性鼻炎との共通性が報告されている。昨年我々は気管支上皮細胞において IL-4, IL-13 により発現が増強し、同様に卵白誘発喘息モデルマウスの肺組織でも発現が増強している遺伝子を同定した。また、当研究班の分担研究者である清野、権らは、経口卵白アルブミン投与によるアレルギー性腸炎モデルマウスを作製し、IL-4, IL-13 の重要性を示している。そこで、食物アレルギーの病因の解明を目的として、気管支上皮細胞において IL-4, IL-13 により発現が変動し、かつ卵白誘発喘息モデルマウスの肺組織で発現が増強した遺伝子の発現が、経口卵白アルブミン投与によるアレルギー性腸炎モデルマウスの腸組織においてどのような挙動を示すか解析を行った。

#### B. 方法

研究協力者である権らが、従来通りマウスに卵白アルブミンを全身投与し、その後卵白アルブミンを経口投与してアレルギー性腸炎を発症させた。そのマウスから腸組織を採取し RNA を分離した。気管支上皮細胞において IL-4, IL-13 により発現が変動し、かつ卵白誘発喘息モデルマウスの肺組織で発現が増強した遺伝子として 9 遺伝子を取り上げ、これらの遺伝子発現について、分離した RNA を用いて Real-Time PCR 法にて定量解析を行った。解析は全身投与も経口投与もしない群、経口投与のみ行う群、両方の投与を行う群の 3 群間で行った。

#### C. 結果

9 遺伝子のうちアレルギー性腸炎モデルマウスにて明らかに発現増強が認められたものはアラキドン酸代謝酵素である 15-lipoxygenase (15-LO) のみであった。それ以外の遺伝子は発現自体が認められないか、3 群間で差異が認められなかった。15-LO について

は、全身投与も経口投与もしない群に比べて、経口投与のみ行う群では約3倍、両方の投与を行う群では約6倍の発現増強が認められた。

#### D. 考察

15-LO は 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE) を産生するアラキドン酸代謝に関与した酵素である。気管支喘息との関連はすでに報告されている。15-LO は気管支喘息の病変部位において発現が増強しており、気管支平滑筋の収縮、血管透過性の亢進、炎症細胞の浸潤といった反応を引き起こすプロ炎症性エイコサノイドだと考えられている。一方、腸管との関連としては、クローン病、潰瘍性大腸炎といった炎症性腸疾患において発現が増強されている、あるいは腸上皮細胞のアポトーシスに関与しているといった報告がわずかに見られるが、詳細はほとんど不明である。今後、アレルギー性腸炎モデルマウスの病態形成にどのようにこの 15-LO が関与しているのかが明らかにしていくことが期待される。

#### E. 結論

卵白誘発喘息モデルマウスの肺組織と共通して、アレルギー性腸炎モデルマウスの腸組織においても 15-LO の発現が増強していることが明らかとなった。これは、食物アレルギーの病態形成に 15-LO が関与していることを示唆しており、今後 15-LO の役割を明らかにすることは食物アレルギーの病因解明につながると期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 1) Izuhara K.

The Role of interleukin-4 and interleukin-13 in the non-immunologic aspects of asthma pathogenesis.

Clin Chem Lab Med · 2003 · 41 · 860-864.

##### 2) Yasunaga S, Yuyama N, Arima K, Tanaka H, Toda S, Maeda M, Matsui K, Goda C, Yang Q, Sugita Y, Nagai H, Izuhara K.

The negative-feedback regulation of the IL-13 signal by the IL-13 receptor  $\alpha 2$  chain in bronchial epithelial cells.

Cytokine · 2003 · 24 · 293-303.

##### 3) Masumoto K, Sakata Y, Arima K, Nakao I, Izuhara K.

Inhibitory mechanism of a cross-class serpin, the squamous cell carcinoma antigen 1.

J Biol Chem · 2003 · 278 · 45296-45304.

##### 4) Wongpiyabovorn J, Suto H, Ushio H, Izuhara K, Mitsuishi K, Ikeda S, Nakao A, Okumura K, Ogawa H.

Up-regulation of interleukin-13 receptor  $\alpha 1$  on human keratinocytes in the skin of psoriasis and atopic dermatitis.

J Dermatol Sci · 2003 · 33 · 31-40.

##### 5) Yokoi F, Hiraishi H, Izuhara K.

Molecular cloning of a cDNA for the human phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase.

J Biochem · 2003 · 133 · 607-614.

##### 6) Sakata Y, Arima K, Takai T, Sakurai W, Masumoto K, Yuyama N, Suminami Y, Kishi F, Yamashita T, Kato T, Ogawa H, Fujimoto K, Matsuo Y, Sugita Y, Izuhara K.

The squamous cell carcinoma antigen 2 inhibits the cysteine proteinase activity of a major mite allergen, Der p 1.

J Biol Chem · 2004 · 279 · 5081-5087.

##### 7) Izuhara K, Arima K.

Signal transduction of IL-13 and its role in the pathogenesis of bronchial asthma.

Drug News & Perspect · in press.

##### 8) Izuhara K, Arima K, Masumoto K, Kanaji S, Kanaji T.

IL-4 and IL-13: Their pathological roles in allergic diseases and their potential in developing new therapies-Update.

Medical Chemistry Reviews - online · in press.

##### 9) 出原賢治

インターロイキン4、インターロイキン4レセプター、インターロイキン13

分子生物学・免疫学キーワード辞典第2版、永田和宏、宮坂昌之、宮坂信之、山本一彦編集、医学書院、2003、p105-107、p112-113.

##### 10) 出原賢治、有馬和彦

IL-13・サイトカイン・ケモカインのすべてー基礎から最新情報までー

笠倉新平、松島綱治編集、日本医学館、印刷中。

##### 11) 出原賢治

アレルギー疾患の病因とその診断。

臨床化学・2003・32(1)・15-17.

##### 12) 有馬和彦、出原賢治

ヒトIL-4受容体と気管支喘息。

International Review of Asthma

2003・5(3)・72-79.

##### 13) 出原賢治

- サイトカインを標的とした治療法。  
医学のあゆみ・2003・207(8)・570-573.
- 14) 有馬和彦、坂田資尚、出原賢治  
プロテアーゼインヒビターによるアレルギー治療  
戦略。  
アレルギー科・2003・16(4)・351-356.
- 15) 出原賢治  
われらが Molecular Research.  
分子呼吸器病・2003・7(4)・373-374.
- 16) 出原賢治、有馬和彦、安永晋一郎  
アレルギー疾患における遺伝因子の機能的解析と  
その臨床応用—IL-13 を中心に—。  
Inflammation and Regeneration・2003・23(1)・  
23-28
- 17) 出原賢治  
IL-13 研究の新展開。  
最新医学・2003・58(2)・240-244
- 18) 出原賢治  
分子標的治療の現状と将来  
Asthma Frontier 2003・2003・2(1)・47-53
- 19) 有馬和彦、出原賢治  
IgE 産生と遺伝因子  
喘息・2004・17(1)・27-32.
- 20) 坂田資尚、有馬和彦、高井敏朗、櫻井済、増本清  
成、松尾洋、出原賢治  
IL-4/IL-13 が誘導するタンパク質分解酵素阻害  
物質による主要ダニ抗原 *Der p1* の阻害。  
呼吸・2004・23(2)・S26-S28.
2. 学会発表
- 1) Yuyama N, Yasunaga S, Arima K, Tanaka H, Toda S,  
Maeda M, Matsui K, Goda C, Yang Q, Sugita Y, Nagai  
H, Izuhara K.  
The Negative-Feedback System of the IL-13 Signal by  
IL-13 Receptor  $\alpha 2$  Chain in Bronchial Epithelial Cells.  
2003KEYSTONESYMPOSIA, 2003.4.3,  
KEYSTONE(USA).
- 2) 有馬和彦、坂田資尚、増本清成、出原賢治、高井  
敏朗  
プロテアーゼ/プロテアーゼインヒビター相互作用  
を基盤としたアレルギー疾患治療戦略。  
第 15 回日本アレルギー学会春季期臨床大会、  
2003.5.14, (シンポジウム)
- 3) 出原賢治  
リンパ球機能に対する遺伝要因と環境要因の影響。  
第 43 回日本リンパ網内系学会総会, 2003.6.5, (シ  
ンポジウム)
- 4) 本庄栄二郎、重松秀樹、黒沢敬子、黒木良太、有  
馬和彦、出原賢治  
野生型及び R110Q 変異体ヒトインターロイキン-  
13 の大腸菌での発現調製及びその性質。  
日本農芸化学会 2003 年度大会 2003.4.2.
- 5) Sakata Yasuhisa, Arima Kazuhiko, Masumoto Kiyonari,  
Takai Toshiro, Sakurai Wataru, Yuyama Noriko, Matuo  
Yo, Izuhara Kenji.  
Squamous cell carcinoma antigen(SCCA)2, a member of  
the ovalbumin-serpin family, inhibits the enzymatic  
activity of the house dust mite allergen, *Der p1*.  
第 76 回日本生化学会大会, 2003.10.18. (口頭発表、  
ポスター)
- 6) Kiyonari Masumoto, Yasuhisa Sakata, Kazuhiko Arima,  
Yoshinori Suminami, Fumio Kishi, Kenji Izuhara.  
Inhibitory mechanism of a cross-class serpin, squamous  
cell carcinoma antigen 1.  
第 76 回日本生化学会大会, 2003.10.18. (ポスター)
- 7) 出原賢治  
Th2 型サイトカインを標的としたアレルギー疾患  
に対する分子標的治療の現状と展望。  
第 53 回日本アレルギー学会総会, 2003.10.24. (教  
育セミナー)
- 8) 有馬和彦、出原賢治  
創薬応用をめざした IL-13/IL-13 受容体相互作用  
の解析。  
第 53 回日本アレルギー学会総会, 2003.10.25. (シ  
ンポジウム)
- 9) 加藤武、高井敏朗、坂田資尚、安枝浩、出原賢治、  
奥村康、小川秀興  
組換えダニ主要アレルゲン *Der p1*, *Der f1* のプロテア  
ーゼ活性の解析。  
第 53 回日本アレルギー学会総会, 2003.10.23. (口  
頭発表)
- 10) 出原賢治  
アレルギー疾患の遺伝要因同定に関する研究。  
第 50 回日本臨床検査医学会総会, 2003.10.30.(臨床  
検査医学会学会賞(学術賞)受賞講演)
- 11) 有馬和彦、出原賢治、白川太郎、山下哲次、寺田  
透、松尾洋  
IL-13 遺伝子上に存在する一塩基多型の気管支喘息  
における診断的意義とその機能ならびに構造解析。  
第 50 回日本臨床検査医学会総会, 2003.10.30. (ポ

スター)

- 12) 出原賢治、坂田資尚、有馬和彦、西奈津子、濱崎雄平、湯山則子、杉田雄二、南雲文夫、山下哲次  
新しい気管支喘息の病態マーカーとしての  
SCCA(扁平上皮細胞癌抗原)の意義。  
第 50 回日本臨床検査医学会総会, 2003.10.29. (ポスター)
- 13) 坂田資尚、有馬和彦、高井敏朗、増本清成、出原賢治  
IL-4/IL-13 による主要ダニ抗原 Der p1 に対する防御機構。  
第 33 回日本免疫学会総会・学術集会, 2003.12.8-10.  
(口頭発表)

## G. 知的所有権の出願・取得状況

### 1. 特許取得

名称：プロテアーゼ阻害剤

国際予備審査請求中

国際出願番号：PCT/JP03/09998

厚生労働省科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
分担研究報告書

腸内フローラを EPEC（腸管病原性大腸菌）で再建したマウスを用いた経口免疫寛容の検討

分担研究者 古賀 泰裕， 東海大学医学部感染症学研究室 教授

### 研究要旨

アレルギー発症の環境要因として腸内フローラを構成する腸内常在細菌の役割が注目されている。本研究では腸内常在細菌が持つどのような性質が GALT 成熟を促し経口免疫寛容を誘導するののかについて検討を行った。

EPEC は腸管細胞内へ内在化 (internalization) する性質を持つが、これに関与する Tir 遺伝子欠損 EPEC 株 ( $\Delta$ Tir) と親株 (WT) のいずれかを用いて無菌マウスの腸内フローラを再建した。その結果、WT 再建マウスでは OVA に対する経口免疫寛容が成立したが、 $\Delta$ Tir 再建マウスでは成立しなかった。それぞれの群の MLN のサイトカイン産生能を調べたところ WT 再建マウスでは  $\Delta$ Tir 再建マウスに比べ有意に高い産生が認められた。

### A. 研究目的

アレルギー発症の環境要因として、感染症を引き起こす病原微生物と並んで、腸内フローラを構成する腸内常在細菌もアレルギー発症に関わる重要因子であることが強く示唆されている。腸内フローラを持たない無菌マウスでは GALT (gut-associated lymphoid tissue) が未発達で、Hygiene Hypothesis を裏付けるように Th2 免疫反応が過剰で、経口免疫寛容が成立し難い。我々は腸内フローラを構成する常在細菌の持つどのような性質が GALT 成熟を促し経口免疫寛容を誘導するのかを明らかにすることを目的としている。その一つの試みとして、今回の検討を行なった。

### B. 研究方法

EPEC はヒト小児に下痢を引き起こす病原菌で腸管上皮に接着する際、III型分泌系と称される一連の菌由来産物を用いる。その一つが Tir (translocated intimin receptor) と呼ばれる EPEC 由来分子で、接着に際して EPEC から分泌

された Tir が腸管上皮に打ち込まれ細胞表面に発現する。次に EPEC 表面に分布した intimin と呼ばれる構造物が Tir と特異的に結合することで EPEC は腸管上皮細胞に強く接着する。その結果、EPEC は internalization により細胞内へ侵入する。Wild type EPEC 株 (WT) の、Tir 遺伝子を欠損させた EPEC 株 ( $\Delta$ Tir) はこのような internalization による細胞内侵入ができなくなる。我々は無菌マウスに WT あるいは  $\Delta$ Tir を生下直後に経口接種して、腸内フローラをこれらの単一菌種で再建したマウスを作り実験に用いた。WT 再建マウスでは EPEC に対する血清抗体価が上昇し、 $\Delta$ Tir 再建マウスではそれが生じないことは前回の報告で述べた。OVA に対する経口免疫寛容を誘導するために 5 週令の WT-あるいは  $\Delta$ Tir 再建マウスに 1 日 1 回 5mg の OVA を 4 回連続経口投与した。寛容成立の有無を調べるために OVA 1  $\mu$ g in Alum 0.1mg をその後 2 週間おきに 4 回腹腔内免疫し最後の免疫から 1 週間後に採血し OVA に対する血中抗体価を測定した。経口投与を行わず

OVA 1 $\mu$ g in Alum 0.1mg 腹腔内免疫のみを行なった群の血清を標準血清としその血清抗体価を100unit/mlとした。さらに、GALT内のCD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>T細胞数およびin vitroでのIL-10産生能についても検討した。

#### C. 研究結果

OVA-specific IgG1抗体価は、OVA経口投与および非投与について、conv.,GF,WT再建,  $\Delta$ Tir再建でそれぞれ0.7  $\pm$  0.2vs10.2  $\pm$  1.2, P<0.01;26.4  $\pm$  4.1vs10.0  $\pm$  1.4,NS;0.8  $\pm$  0.2vs10.6  $\pm$  1.0, P<0.01;12.4  $\pm$  3.9vs10.9  $\pm$  1.4,NSであった。すなわちOVA経口投与により免疫寛容が成立したのはconv.および無菌マウス腸内フローラをWTで再建した群であり、GFあるいは $\Delta$ Tir再建群では成立が認められなかった。次にこれらのマウス群のPP, MLN, spleenのCD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>T細胞数を調べたところ、MLNにおいてWT再建によりこの調節T細胞の増加が観察された。しかし、 $\Delta$ Tir再建では観察されなかった。さらにWT再建によりPP, MLN細胞の2C-11刺激によるIL-10産生増加が認められた。

#### D. 考察

腸管上皮細胞にinternalizationと呼ばれる侵襲性を持つwild type EPECで、無菌マウスの腸内フローラを再建したWT再建マウスでは、conv.マウスと同様に経口で投与した抗原(OVA)に対して経口免疫寛容が成立した。一方、EPECのTir遺伝子を欠損させた $\Delta$ Tirで再建した $\Delta$ Tir再建マウスでは経口免疫寛容の導入に対して抵抗性であった。かつ寛容成立の機序としてGALTでの調節T細胞の誘導および抑制性サイトカインの産生が示唆された。従って経口免疫寛容能を獲得させるに足る腸内フローラには、EPECの様な侵襲性を持つ細菌が必要であると考えられる。

#### E. 結論

アレルギー発症予防に働く腸内フローラ構成細菌の持つべき特性として、侵襲性の有無が重要であると示唆された。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1)Ushiyama A., Tanaka K., Aiba Y., Shida T., Takagi A., Mine T., Koga Y., Lactobacillus gasserii OLL2716 as a probiotic in clarithromycin-resistant Helicobacter pylori infection J Gastroenterol Hepatol. 2003 ;18(8):986-991.
- (2)Shiba T., Aiba Y., Ishikawa H., Ushiyama A., Takagi A., Mine T., Koga Y., The suppressive effect of bifidobacteria on Bacteroides vulgatus, a putative Pathogenic microbe in inflammatory bowel diseaseMicrobiol Immunol. 2003;47(6):371-8.
- (3)Hiroki I., Yuuji A., Mutsumi N., Yoshitani O and Yasuhiro K., Suppression of Periodontal Pathogenic Bacteria in the Saliva of Humans by the Administration of Lactobacillus Salivarius TI2711 J.Jpn.Soc. Periodontol. 2003;45:105-112
- (4)Yasuhiro K., Effect of intestinal flora on immune system Medical Science Digest 2003; 29 (13)

##### 2. 学会発表

石川裕樹、古賀泰裕

「経口免疫寛容成立における腸内細菌の役割」  
第33回日本免疫学会総会・学術集会  
2003年12月8日—10日、福岡市

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 分担研究報告書

### 乳幼児における腸内細菌叢とアレルギー発症の相関関係の解析

分担研究者 園元謙二（九州大学大学院農学研究院教授）  
中山二郎（九州大学大学院農学研究院助教授）

#### 研究要旨

新生児における免疫系の発達は、腸内細菌に大きく影響を受けると考えられている。しかし、アトピーなどの生後一年以内に発症する乳幼児のアレルギーと腸内細菌叢との関連性は明らかではない。本研究は、細菌叢とアレルギー発症の関連性を実験疫学的に調査し、解明することを最終目的としている。まず、糞便およびさい帯血のサンプリングに協力可能な新生児ボランティア36名を登録し、生後2ヶ月間の糞便サンプルを採取した。この36名のボランティアから、さい帯血中のIgE値の高低、抗生物質の投与の有無の生育条件がなるべく異なるボランティア9名を選出し、日本人乳幼児の糞便中に存在する代表的細菌（グラム陰性菌17種、グラム陽性菌24種）の16S rDNAの配列データベースの構築、および細菌叢の変動パターンを解析した。その結果、菌種レベルで変動を見た場合にはその変動パターンは各ボランティア間でかなり異なるものの、属レベルあるいは細菌のタイプでその変動パターンを捉えた場合、生後すぐに、*Pseudomonas* 属細菌が観察され、その後一週間以内に、*Enterococcus*、*Streptococcus*、*Staphylococcus* 属のような通性嫌気性細菌、さらに *Klebsiella* や *Enterobacter* 属などの大腸菌群が出現し、1ヶ月後に *Bifidobacterium* 属細菌が出現するという共通の変動パターンが確認された。また、この共通パターンが生後直後の抗生物質投与により完全に破壊される傾向が観察された。今後、これらの方法を用いて、多検体の乳児糞便の細菌叢を解析し、それとアレルギー発症の関連性を統計的に解析することにより、日本人幼児のアレルギー発症のマーカーとなる特定細菌種の同定、あるいはアレルギー発症に高リスクを示す腸内細菌叢の変動パターンを見つけ出すことができると期待される。

#### A. 研究目的

乳児期の免疫系は主として消化管において形成されると考えられ、腸管内の細菌が個人の免疫系に大きな影響を与えていると予想される。したがって、腸内細菌叢と免疫能がアレルギー疾患発症幼児と健康幼児でどのように異なるかを明らかにすることはアレルギーの発症機序を明らかにし、その予防対策を構築する上で必要である。本研究では、近年目まぐるしい進歩を遂げている分子生物学的手法を用い、多数のボランティアの細菌叢を網羅的に解析し、日本人幼児のアレルギー発症のマーカーとなる特定細菌種の同定、あるいはアレルギー発症に高リスクを示す腸内細菌叢の変動パターンを見つけ出すことを目的としている。

#### B. 方法・計画

(1) 幼児腸内細菌の16S rDNA配列データベースの構築

乳幼児糞便より細菌のDNAを抽出し、PCR法により細菌の16S rDNAを増幅する。16S rDNAは細菌種特異的な配列を保持しており、逆にこの配列情報から細菌種の同定あるいは推測が可能である。増幅された16S rDNAを一分子ずつ大腸菌へクローニングし、それぞれを配列解析することによりボランティアの腸管内におよそどの種の細菌が存在するか網羅的に把握することができる。さまざまな環境下（さい帯血中のIgE値の高低、抗生物質の投与の有無、母乳か人工乳かなど）で生育している複数名の乳幼児ボランティアにおいてこの16S rDNAのクローニン

グ・配列解析を網羅的に行い、日本人乳幼児腸管内に存在し得る細菌種の 16S rDNA の配列データベースを構築する。

(2) DGGE 法および T-RFLP 法による各ボランティアの腸内細菌叢の経時解析

昨年度までの本研究において確立した T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 法および DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) 法による糞便細菌叢解析法を用いて、9名の乳幼児ボランティアの生後2ヶ月の細菌叢の変動をモニタリングした。

(倫理面への配慮)

上記研究における幼児ボランティアは、妊娠8ヶ月～9ヶ月目の母親学級にて病院長を通じて協力要請の説明文章を出し、参加承諾の同意を得たもののみを対象として行った。得られたサンプルはすべて匿名で扱い、得られたデータは外部には漏れぬよう厳重に保管している。以上の研究計画は京都大学倫理委員会の承認を得ている。

### C. 研究結果

(1) 新生児腸内細菌の 16S rDNA 配列データベースの構築

36名のボランティアから、さい帯血中の IgE 値の高低、抗生物質の投与の有無の生育条件がなるべく異なるボランティア9名を選出し、各ボランティアの糞便サンプルから増幅された 16S rDNA のクローンライブラリーより、それぞれ約10クローン、計415クローンを配列解析した。その結果、グラム陰性菌17種、グラム陽性菌24種に高い相同性を示す配列を得た。見出された細菌種の多くは腸内細菌かつ口腔細菌としてよく知られているものであり、新生児においては、口腔に定着した細菌が次々と腸管に流れ込み定着を始めていると推察される。

(2) DGGE 法および T-RFLP 法による各ボランティアの腸内細菌叢の経時解析

細菌叢迅速解析法の検討の結果、T-RFLP 法により(1)の研究で得られた細菌種の大部分が迅速簡便に検出できること、DGGE 法では *Enterobacteriaceae* の種特異的検出および *Bifidobacterium* 属細菌の高感度検出の二点において T-RFLP 法よりも優れていることが明らかとなった。生後数日間、抗生物質を投与され

たボランティアの細菌叢プロファイルと他のボランティアの細菌叢を T-RFLP および DGGE により比較すると、抗生物質を投与されたボランティアでは、全体的にバンド数が少ないのが特徴として見られた。特に、抗生物質投与のボランティアでは、DGGE 法において生後1ヶ月以降に主に観察される *Bifidobacterium* 属細菌のバンドが検出されなかった。他のボランティアにおいては、生後すぐに、*Pseudomonas* 属細菌が観察され、その後一週間以内に、*Enterococcus*、*Streptococcus*、*Staphylococcus* 属のような通性嫌気性細菌、さらに *Klebsiella* や *Enterobacter* 属などの *Enterobacteriaceae* が出現し、1ヶ月後に *Bifidobacterium* 属細菌が出現するという共通の変遷パターンが確認された。

### D. 考察

本研究にて作成した乳幼児腸内細菌の 16S rDNA 配列データベースは日本人乳幼児の腸内細菌叢の大部分を網羅していると考えられる。この 16S rDNA 配列データベースを活用した T-RFLP 解析を行うことにより、日本人乳幼児の大部分が腸内細菌を半定量的に検出できると考えられる。DGGE 法では *Enterobacteriaceae* の種特異的検出および *Bifidobacterium* 属細菌の高感度検出の二点において T-RFLP 法よりも優れており、この二点に着眼した細菌叢解析を行う場合には非常に有効であると考えられる。

### E. 結論

9名のボランティアを用いた、日本人乳幼児の代表的腸内細菌の 16S rDNA の配列データベースの構築、および DGGE 法および T-RFLP 法による細菌叢の変動パターンの解析の結果、菌種レベルで変動を見た場合にはその変動パターンは各ボランティア間でかなり異なるものの、属レベルあるいは細菌のタイプでその変動パターンを捉えた場合、共通の変動パターンが存在するが示された。そしてこの共通パターンは生後直後の抗生物質投与により完全に破壊される傾向が観察された。今後、同様の T-RFLP 法および DGGE 法を用いた糞便細菌叢の経時解析を、多数のボランティアで行ない、アレルギー発症の追跡データとの相関関係を統計的に解析することにより、日本人幼児のアレルギー発症のマーカー

一となる特定細菌種の同定、あるいはアレルギー発症に高リスクを示す細菌濃の変動パターンを見つけ出すことができると期待される。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Nakayama, J., A. D. L. Akkermans, and W. M. de Vos, "High-Throughput PCR Screening of Genes for Three-component Regulatory System Putatively Involved in Quorum Sensing from Low-G+C Gram-positive Bacteria" *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**(3), 480-489 (2003).
- (2) 麻生祐司, 永尾潤一, 中山二郎, 園元謙二, 乳酸菌の多様な新機能を求めて, 農芸化学, **77**(8), 741-743 (2003).
- (3) 中山二郎, 園元謙二, 腸内細菌のクォーラム

センシング, 腸内フローラ・宿主・細菌間の相互作用, 光岡知足編, 印刷中(2003).

### 2. 学会発表

1. 中山二郎, 黒木佑美子, Songjinda Prapa, 田中重光, 福田早苗, 清原千香子, 井槌邦雄, 白川太郎, 園元謙二「乳幼児における腸内細菌叢とアレルギー—疫学調査に向けて」日本農芸化学会2003年度大会(東京)
2. Songjinda Prapa, 黒木佑美子, 田中重光, 安藤瑞起, 福田早苗, 清原千香子, 井槌邦雄, 白川太郎, 中山二郎, 園元謙二「乳幼児における腸内細菌叢とアレルギー—分子生物学的解析法の検討」日本農芸化学会2003年度大会(東京)
3. 中山二郎, 園元謙二「腸内細菌のクォーラムセンシング」第12回腸内フローラシンポジウム(東京)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし