

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

地域集団でのコホート研究による便中細菌診断妥当性の研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 白川 太郎

平成 17 (2005) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

- 地域集団でのコホート研究による便中細菌診断妥当性の研究 1
(資料)
アレルギーに関する質問票 7

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 13
2. 腸管免疫の変化とアレルギー発症への関与を検討する 17
マウスモデル開発
3. Th2型免疫反応の生理的あるいは病理的意義の解明 21
4. 経口免疫寛容成立における腸内細菌トランスロケーションの役割 25
5. 糞便細菌叢検査データの小児アレルギー早期予知への応用 27
6. 小国町におけるアレルギー性疾患発症予防に関する前向き 31
疫学調査
7. 沖縄県石垣市乳幼児におけるアトピー性皮膚炎 (Atopic dermatitis:AD) ... 39
追跡調査に関する研究

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 41

IV. 研究成果の刊行物・別刷 55

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）

地域集団でのコホート研究による便中細菌診断妥当性の研究

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（東京大学医科学研究所感染免疫教授） 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）
古江増隆（九州大学大学院医学研究院皮膚科学教授） 出原賢治（佐賀大学医学部分子生命科学教授）
柴田瑠美子（国立病院機構福岡病院小児科医長） 林純（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（国立病院機構福岡病院院長）	小田嶋博（国立病院機構福岡病院小児科）
庄司俊輔（国立病院機構福岡病院副院長）	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）	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）
砂田壱一（九州大学工学研究院客員教授）	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

過去 3 年間の実績を踏まえて、次のステップとして、便中の細菌の診断とアレルギー発症の関連を解析するため新生児から 2 年の追跡結果と照合した結果、アレルギー発症に関連する一連の細菌群を絞り込むことが可能になった。石垣島のフィールドを使ってアトピー性皮膚炎のサンプルを集めて、妥当性の検討を行なう準備を構築するとともに、熊本県小国町で、乳酸菌のアレルギー予防効果を検証するための新生児の追跡調査を開始した。これらの基礎的な機序を解明する目的でアレルギー性腸炎モデルマウスを使って解析をする準備を行なった。

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。16 年度には以上の目的を達成するため、13-15 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を熊本県小国町と石垣島で行ってきた。

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、熊本県小国町、沖縄県石垣島を選定した。

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：福岡市内の井樋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 c DNA を抽出してライブラリーを作成した。また新生児のアレルギー症状を2年に渡り、追跡し、その結果を便中の細菌の変化と照合した。

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。また石垣島のサンプルを用いてアトピー性皮膚炎発症のサンプルから DNA を抽出し、遺伝子会席の準備を行った。

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。本エンドより、小国町における新生児の追跡調査を開始した。また石垣島においては、6歳以下の児童におけるアレルギー症状調査を行うとともに、アトピー性皮膚炎の臨床診断をおこなった。

2. アレルギー性腸炎も出るマウス
清野らによって開発されたアレルギー性腸炎モデルマウスは、人食物アレルギーのモデルと考えられ、このマウスを SPF, GF 下で飼育し、比較することで、免疫系への影響を分子遺伝学的に見る実験を開始する準備を行なった

3. アトピー遺伝子の解析：前年度に引き続き約 85,000 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 17 個程度発見された。またアトピー性皮膚炎関連として 2 つの遺伝子が関連することが示された。

4. 便のマイクロアレイ診断法の確立：36 名の新生児の便につき約 415 クローンを抽出し、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。2 年間の症状追跡結果とあわせて、クラスター分析を開発した。その結果、食物アレルギー群、喘息・アトピー性皮膚炎発症群は異なる細菌パターンを示すことが明らかになった。また、アレルギー発症群ではいくつかの特定の細菌のパターンが見出された。

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た。またフィールドでの新生児の試験が開始され、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。この情報と石垣島でのフィールド調査、遺伝子情報を組み合わせて早期にアトピー性皮膚炎の発症を予測できる可能性が示された

E. 健康危険情報

とくになし

F. 研究発表

1. 論文発表

(1)Tomita Y, Tomida S, Hasegawa Y, Suzuki Y, Shirakawa T, Kobayashi T, Honda H: Artificial neural network approach for selection of susceptible

single nucleotide polymorphisms and construction of prediction model on childhood allergic asthma. *BMC Bioinformatics*.2004; 5(1):120.

(2)Kamada F, Suzuki Y, Shao C, Tamari M, Hasegawa K, Hirota T, Shimizu M, Takahashi N, Mao XQ, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Chiba Y, Aoki Y, Kure S, Tamura G, Shirakawa T, Maysubara Y: Association of the hCLCA1 gene with childhood and adult asthma. *Genes Immun*. 2004; 5(7):540-7.

(3)Cheng L, Enomoto T, Hirota T, Shimizu M, Takahashi N, Akahoshi M, Matsuda A, Dake Y, Doi S, Enomoto K, Yamasaki A, Fukuda S, Mao XQ, Hopkin JM, Tamari M, Shirakawa T: Polymorphisms in ADAM33 are associated with allergic rhinitis due to Japanese cedar pollen. *Clin Exp Allergy*. 2004; 34(8):1192-201.

(4)Hasegawa K, Tamari M, Shao C, Shimizu M, Takahashi N, Mao XQ, Yamasaki A, Kameda F, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Tamura G, Matsubara Y, Shirakawa T, Suzuki Y: Variations in the C3, C3a receptor, and C5 genes affect susceptibility bronchial asthma. *Hum Genet*.2004.

(5)Fukuda S, Ishikawa H, Koga Y, Aiba Y, Nakashima K, Cheng L, Shirakawa T: Allergic symptoms and microflora in schoolchildren. *J Adolesc Health*. 2004;35(2):156-8.

(6)Kiyohara C, Yoshimasu K, Shirakawa T, Hopkin JM: Genetic polymorphisms and environmental risk of lung cancer: a review. *Rev Environ Health*. 2004; 19(1):15-38.

(7)Hirota T, Obara K, Matsuda A, Akahoshi M, Nakashima K, Hasegawa K, Takahashi N, Shimizu M, Sekiguchi H, Kokubo M, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Kishi F, Suzuki Y, Saito H, Nakamura Y, Shirakawa T, Tamari M: Association between genetic variation in the gene for death-associated protein-3(DAP3) and adult asthma. *J Hum Genet*. 2004; 49(7):370-5.

- (8)Shao C, Suzuki Y, Kamada F, Kanno K, Tamari M, Hasegawa K, Aoki Y, Kure S, Yang X, Endo H, Takayanagi R, Nakazawa C, Morikawa T, Morikawa M, Miyabayashi S, Chiba Y, Karahashi M, Saito S, Tamura G, Shirakawa T, Matsubara Y:Linkage and association of childhood asthma with the chromosome 12 genes. *J. Hum. Genet.* 2004; 49:115-22
- (9)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 probearray. *J.Allergy Clin Immunol.*2004; 113:528-35.
- (10)Akahoshi M, Ishihara M, Remus N, Uno K, Miyake K, Hirota T, Nakashima K, Matsuda A, Kanda M, Enomoto T, Ohno S, Nakashima H, Casanova JL, Hopkin JM, Tamari M, Mao XQ, Shirakawa T:Association between IFNA genotype and the risk of sarcoidosis. *Hum Genet.* 2004; 114:503-9.
- (11)Reisong G, Mao XQ, Enomoto T, Feng Z, Gloria-Bottini F, Bottini E, Shirakawa T, Sun D, Hopkin JM: An asthma-associated genetic variant of STAT6 predicts low burden of ascaris worm infestation. *Genes Immun.*2004; 5:58-62.
- (12)Shimada T, Cheng L, Enomoto T, Yang X, Miyoshi A, Shirakawa T: Lysed enterococcus faecalis FK-23 oral administration reveals inverse association between tuberculin responses and clinical manifestations in perennial allergic rhinitis: a pilot study. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2004; 14(3):187-92.
- (13)Shimada T, Cheng L, Yamasaki A, Ide M, Motonaga C, Yasueda H, Enomoto K, Enomoto T, Shirakawa T: Effects of lysed enterococcus faecalis FK-23 on allergen-induced serum antibody responses and active cutaneous anaphylaxis in mice. *Clin Exp Allergy.* 2004; 34(11): 1784-8.
- (14)Chinami M, Yano Y, Yang X, Salahuddin S, Turner H, Shirakawa T, Barford D, Adra CN: Binding of HTm4 to KAP/CDK2/Cyclin A complex enhances the phosphatase activity of KAP, dissociates cyclin A, and facilitates KAP dephosphorylation of CDK2. *J Bio Chem.* 2005; In Press
- (15)Akamatsu R, Maeda Y, Hagihara A, Shirakawa T: Interpretations and attitudes toward healthy eating among Japanese workers. *Appetite.* 2005; 44(1):123-9.
2. 学会発表
国際学会
1. Taro Shirakawa: A whole genome SNP search for asthma in the Japanese population. 招待講演, The 6th Asia Pacific Congress of Allergology and Clinical Immunology, Tokyo, 2004.10.4-7.
 2. Lei Cheng, Tadao Enomoto, Tomomitsu Hirota, Makiko Shimizu, Mitsuteru Akahoshi, Akira Matsuda, Mayumi Tamari, Taro Shirakawa: TLR3 gene is associated with Japanese cedar pollinosis. The 6th Asia Pacific Congress of Allergology and Clinical Immunology, Tokyo, 2004.10.4-7.
 3. Lei Cheng, Tadao Enomoto, Tomomitsu Hirota, Akiko Yamasaki, Mitsuteru Akahoshi, Akira Matsuda, Mayumi Tamari, Taro Shirakawa: Association of the ADAM33 gene with Japanese cedar pollinosis. The 6th Asia Pacific Congress of Allergology and Clinical Immunology, Tokyo, 2004.10.4-7.
 4. Kazuko Nakashima, Shinsuke Kunimura, Mina Tsubouchi, Lei Cheng, Taro Shirakawa: Comprehensive research of allergic disease: mechanism of action from gene and trace elements kinetics. CAARI 2004, University of North Texas, 2004.10.10-15.
- 国内学会

1. 白川太郎: 子供のアトピー, 基調講演, 第4回日本生理人類学会市民公開シンポジウム, 大阪朝日生命ホール, 11.24.2004.
 2. 白川太郎: プロバイオティクスを用いたアレルギー予防の試み, 特別講演, 第8回腸内細菌学会, 東京大学弥生講堂, 6.3-4.2004.
 3. 白川太郎: アレルギー・アトピー性疾患の疫学と遺伝子解析, シンポジウム, 第126回日本医学会シンポジウム, 日本医師会館, 6.24.2004.
 4. 白川太郎: 遺伝子情報に基づく新しいアレルギー医療, 第21回日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会ランチョンセミナー, 栃木県総合文化センター, 6.20.2004.
 5. 玉利真由美, 白川太郎: アレルギー関連遺伝子—本邦の状況, シンポジウム, 第54回日本アレルギー学会, パシフィコ横浜, 11.4-6.2004.
 6. 嶋田貴志, 程 雷, 元永知恵, 榎本雅夫, 白川太郎: マウスの系統差研究, シンポジウム, 第54回日本アレルギー学会, パシフィコ横浜, 11.4-6.2004.
 7. 程 雷, 榎本雅夫, 山崎暁子, 三好彰, 白川太郎: 疫学と遺伝学からみた hygiene hypothesis, シンポジウム, 第54回日本アレルギー学会, パシフィコ横浜, 11.4-6.2004.
 8. 三邊武幸, 三好彰, 程 雷, 殷 敏, 時海波, 白川太郎, 稲川俊太郎, 中山名峰, 稲福繁, 中村晋: アレルゲンの暴露とアレルギー性鼻炎, 第54回日本アレルギー学会, パシフィコ横浜, 11.4-6.2004.
 9. 上田哲也, 新実彰男, 松本久子, 竹村昌也, 山口将史, 松岡弘典, 水口正義, 白川太郎, 三嶋理晃: 健常者におけるカプサイシン咳感受性トACE遺伝子多型, 第54回日本アレルギー学会, パシフィコ横浜, 11.4-6.2004.
 10. 鎌田文顕, 鈴木洋一, 青木洋子, 誤繁夫, 松原洋一, 長谷川耕一, 玉利真由美, 白川太郎: 補体系 C3, C3AR1, C5 遺伝子の多型は喘息発症リスクに影響する, 第54回日本アレルギー学会, パシフィコ横浜, 11.4-6.2004.
 11. 鈴木洋一, 鎌田文顕, Chao Chenchen, 玉利真由美, 白川太郎, 松原洋一: 喘息発症における遺伝子検査ノ有用性の検討, 第54回日本アレルギー学会, パシフィコ横浜, 11.4-6.2004.
 12. 三邊武幸, 三好彰, 程 雷, 殷 敏, 時海波, 白川太郎, 稲川俊太郎, 中山明峰, 稲福繁, 中村晋, 松井猛彦: アレルゲンの暴露とアレルギー性鼻炎, 第41回日本小児アレルギー学会, 都市センターホテル, 11.27-28.2004.
 13. 鎌田文顕, 鈴木洋一, 青木洋子, 誤繁夫, 松原洋一, 長谷川耕一, 玉利真由美, 白川太郎: 補体系 C3, C3AR1, C5 遺伝子の多型は喘息発症リスクに影響する, 第41回日本小児アレルギー学会, 都市センターホテル, 11.27-28.2004.
 14. 白川太郎: 乳酸菌によるアレルギー予防の試み, 特別講演, 日本学術会議・日本乳酸菌学会シンポジウム, 九州大学視聴覚ホール, 12.17.2004.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
とくになし

アレルギーに関する質問票

この質問票では、「アレルギー疾患予防研究」に必要な、現在までにアレルギー疾患と関係が深いと言われている項目をお聞きしています。主に、お子様の基本属性(性別、生年月日など)、アレルギー、その他の症状に関する質問で構成されています。この質問票の結果は、全て統計的に処理され、個人が特定される形で結果が公表されることはありませんので、ご安心下さい。また、ご回答いただいた質問票は厳重に保管し、本調査の担当者のみ閲覧します。

* 回答方法 *

すべての質問に対して、空欄にあなたの答えを書くか、あてはまる番号に○をつけて下さい。間違えた場合には、消しゴムで消すか、×をつけて書き直して下さい。複数回答可とあるもの以外は、答えは原則として1つです。

答えのチェック方法の例： 年齢 (1) 歳

①. はい 2. いいえ

京都大学大学院医科学研究科健康増進・行動学 教授 白川 太郎
井樋病院 院長 井樋 邦雄
株式会社 TTC 代表 山本 哲郎

ご不明な点・ご質問等がございましたら、下記までお問い合わせください

*研究内容・結果に関するお問い合わせ先

京都大学大学院医学研究科健康増進・行動学 教授 白川 太郎
大学院生(実施担当) 坪内 美樹
〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町
電話 075-753-4451 FAX 075-753-4452
E-mail hphb@pbh.med.kyoto-u.ac.jp

*事務局連絡先

株式会社 TTC 担当 伏木 聖子
〒150-0021 東京都渋谷区恵比寿西 1-20-2
西武信用金庫恵比寿ビル6F
電話 03-5459-5329 FAX 03-5459-5685

I. お子様について

- 1) 今日の日付 (200) 年 () 月 () 日
- 2) お子様の生年月日 (西暦) 年 () 月
- 3) お子様の性別 1. 男 2. 女
- 4) ご記入頂いた方はどなたですか?
1. 父 2. 母 3. 祖父母 4. その他 ()
- 5) 乳児期の栄養方法はどれにあてはまりますか? (分かる範囲でお答えください)
1. 母乳のみ 2. 人工乳のみ 3. 混合 4. 分からない
- 6) お子様の現在の身長・体重はどれくらいですか?
身長 () cm 体重 () kg
- 7) お子様が今までにうけた予防接種はどれですか? (分かる範囲でお答え下さい)
 - ① ポリオ生ワクチン 1. なし 2. あり 3. 分からない
 - ② 三種混合ワクチン 1. なし 2. あり 3. 分からない
(ジフテリア・百日せき・破傷風)
 - ③ ツベルクリン反応 1. なし 2. あり ⇒ (陰性・陽性)
3. 分からない
 - ④ BCG 1. なし 2. あり 3. 分からない
 - ⑤ はしか生ワクチン 1. なし 2. あり 3. 分からない
 - ⑥ 風しん生ワクチン 1. なし 2. あり 3. 分からない
 - ⑦ 日本脳炎ワクチン 1. なし 2. あり 3. 分からない
- 8) お子様は、現在、お医者さんにかかっていますか?
1. はい (理由:) 2. いいえ
- 9) お子様は、今までに抗生物質を使用したことがありますか?
1. はい 2. いいえ
⇒「2. いいえ」と答えた場合は質問Ⅱへすすんでください。
9-1)「1. はい」と答えた方にお聞きします。
それはいつ頃ですか? 分かる範囲でお答えください。
お薬の名前も分かればお書きください。
(歳 カ月) 頃 → (お薬の名前:)

Ⅱ～Ⅳはお子様の症状についてお尋ねします。

Ⅱ. 呼吸器について

1) お子様は今までに、胸がゼーゼー、またはヒューヒューしたことがありますか？

1. はい 2. いいえ

⇒「2. いいえ」と答えた場合は質問5)へすすんでください。

2) お子様は、今までに、ゼーゼーという発作が何回ありましたか？

1. ない 2. 1～3回 3. 4～12回 4. 13回以上

3) 今までに、お子様は喘鳴（呼吸をするときにゼーゼーとかヒューヒューと音がする）のための睡眠障害が、平均どのくらいありましたか？

1. 喘鳴によって目が覚めることはない 2. 1週間に一晩未満
3. 1週間に一晩、またはそれ以上

4) 今までにお子様は、1回の呼吸の間に1こと2ことしか会話が出来ないほどの重症な喘鳴がありましたか？

1. はい 2. いいえ

5) お子様は今までに喘息と言われたことがありますか？

1. はい 2. いいえ

5-1)「1. はい」と答えた方にお聞きします。それはいつ頃ですか？

(歳 カ月)頃

6) 今までに、お子様は運動中、または運動後に胸がゼーゼーいったことがありますか？

1. はい 2. いいえ

7) 今までに、お子様に夜間に乾いた咳がありましたか？

1. はい 2. いいえ

乾いた咳とは痰があまりない、もしくはない咳のことです。ふつう、コンコンとかケンケンといった感じの咳になります。この反対は湿った咳で、気管支炎とか肺炎のときによく出る咳です。ただし、カゼや呼吸器感染による咳は除きます。

Ⅲ. 鼻について

以下の 1)～6) 全ての質問は、お子様が風邪や流感（インフルエンザ）にかかっていないときとした場合におこるかどうかの質問です。

1) お子様は、今までに風邪や流感にかかっていないときにくしゃみ、鼻水、鼻づまりで困ったことがありますか？

1. はい 2. いいえ

⇒「2. いいえ」と答えた場合は質問5)へすすんでください。

1-1) 「1. はい」と答えた方にお聞きします。次のどの症状で困りましたか？

1. くしゃみ、^{みずばな}水鼻 2. 鼻づまり 3. くしゃみ、^{みずばな}水鼻、鼻づまり

2) 今までで、お子様が、これらの鼻症状（くしゃみ、鼻水、鼻づまり）に伴って眼がかゆくなったり、涙がとまらなくなったりしたことがありますか？

1. はい 2. いいえ

3) どの時期にお子様にそのような鼻症状がおこりましたか？

（当てはまる所に何か所でもチェックして下さい）

1. 1月 2. 2月 3. 3月 4. 4月 5. 5月 6. 6月
7. 7月 8. 8月 9. 9月 10. 10月 11. 11月 12. 12月

4) 今までで、お子様はこれらの鼻症状のためにどのくらい日常生活に支障をきたしましたか？

1. まったく支障がなかった 2. 少しだけ支障があった
3. 支障があった 4. かなり支障があった

5) 今までにお子様は、鼻アレルギー（季節性鼻炎、花粉症など）にかかったことがありますか？

1. はい 2. いいえ

5-1) 「1. はい」と答えた方にお聞きします。それはいつ頃ですか？

（ 歳 カ月）頃

6) 今までに、お子様は、医療機関で鼻アレルギー（季節性鼻炎、花粉症など）と診断されたことがありますか？

1. はい 2. いいえ

6-1) 「1. はい」と答えた方にお聞きします。それはいつ頃ですか？

（ 歳 カ月）頃

IV. 皮膚について

1) お子様は、この6ヶ月の間で出たり、ひっこんだりするかゆみをともなった湿疹で困ったことがありますか？

1. はい 2. いいえ

⇒「2. いいえ」と答えた場合は質問6)へすすんでください。

2) お子様は、今までに、そのようなかゆみを伴った湿疹は出たことがありますか？

1. はい 2. いいえ

⇒「2. いいえ」と答えた場合は質問6)へすすんでください。

3) お子様のそれらのかゆみを伴った湿疹は下記のような箇所に起こったことがありますか？

肘(ひじ)のくぼみ、膝(ひざ)のくぼみ、足首のまわり、目のまわり、 頬、臀部(しり)の下面、首や耳のまわりなど
--

1. はい 2. いいえ

4) お子様のこれらの湿疹は、今までに、まったくきれいに治った時がありますか？

1. はい 2. いいえ

5) 今までで、平均してどのくらいの頻度(回数)で、お子様は、このかゆみを伴った湿疹のために夜眠れないことがありましたか？

1. 12ヶ月の間、一度もなかった 2. 1週間に一晚未満
3. 1週間に一晚か、それ以上の頻度

6) お子様は今までに湿疹ができたことがありますか？

1. はい 2. いいえ

7) までの間で、お子様の皮膚は、全体的に乾燥肌(カサカサ)になっていますか？

1. はい 2. いいえ

8) お子様は、今までに、医療機関でアトピー性皮膚炎と診断されたことがありますか？

1. はい 2. いいえ 3. 疑いありといわれた

8-1)「1. はい」「3. 疑いありといわれた」と答えた方にお聞きします。それはいつ頃ですか？

(歳 カ月)頃

9) お子様は、現在、医療機関で皮膚に関して治療を受けていますか？

1. はい 2. いいえ

9-1)「1. はい」と答えた方にお聞きします。それはいつ頃からですか？

(歳 カ月)頃から

10) お子様の、現在行っている治療があれば、該当する番号と記号を丸で囲って下さい。

1. 治療はしていない
2. 外用薬 (a. 保湿薬 b. ステロイド c. イソジン
d. その他の外用薬)
3. 内服薬 (a. 抗アレルギー薬 b. その他の内服薬 c. 制限食
d. その他の治療)

V. お子様の食生活習慣について

1) 離乳食は、いつから始めましたか？

(生後)ヶ月頃から始めた

2) お子様は、牛乳を飲んでいますか？

1. 毎日飲む
2. ときどき飲む
3. 全然飲まない

3) お子様は、ヨーグルトを食べて (飲んで) いますか？

1. 毎日食べる (飲む)
2. ときどき食べる (飲む)
3. 全然食べない (飲まない)

4) お子様は、ヨーグルトはいつごろから食べ (飲み) 始めましたか？

1. 食べて (飲んで) いない
2. (生後)ヶ月くらいから食べ (飲み) 始めた

5) お子様に、食物によるアレルギーはありますか (ありました) か？

1. はい (具体的な食品名:)
2. 過去にあった
3. いいえ

※ 個人の結果 (検査の結果等) を希望されますか？

1. はい
2. いいえ

ご協力ありがとうございました。
書き忘れがないか、もう一度ご確認ください。

地域集団でのコホート研究による便中細菌診断妥当性の研究

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）、三好彰（南京医科大学教授）

山本哲郎（TTC 株式会社）、嵯維功樹（ELG 研究所）

研究要旨

過去 3 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。この目的で熊本県小国町では乳酸菌を用いた RCT 法による臨床試験も開始した。

A.研究目的

過去 3 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することである。

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、新生児ス遺跡調査に関しても 4 月 1 日より調査を開始した。

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り、便中細菌診断の妥当性の検討と、特定細菌の効果を同時に見れるフィールドが完成した意義は大きいと思われる。

E. 研究発表

1. 論文発表

(1)Tomita Y, Tomida S, Hasegawa Y, Suzuki Y, Shirakawa T, Kobayashi T, Honda H: Artificial neural network approach for selection of susceptible single nucleotide polymorphisms and construction of prediction model on childhood allergic asthma. *BMC Bioinformatics*.2004; 5(1):120.

(2)Kamada F, Suzuki Y, Shao C, Tamari M, Hasegawa K, Hirota T, Shimizu M, Takahashi N, Mao XQ, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Chiba Y, Aoki Y, Kure S, Tamura G, Shirakawa T, Matsubara Y: Association of the hCLCA1 gene with childhood and adult asthma. *Genes Immun*. 2004; 5(7):540-7.

(3)Cheng L, Enomoto T, Hirota T, Shimizu M, Takahashi N, Akahoshi M, Matsuda A, Dake Y, Doi S, Enomoto K, Yamasaki A, Fukuda S, Mao XQ, Hopkin JM, Tamari M, Shirakawa T: Polymorphisms in ADAM33 are associated with allergic rhinitis due to Japanese cedar pollen. *Clin Exp Allergy*. 2004; 34(8):1192-201.

(4)Hasegawa K, Tamari M, Shao C, Shimizu M, Takahashi N, Mao XQ, Yamasaki A, Kameda F, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Tamura G, Matsubara Y, Shirakawa T, Suzuki Y: Variations in the C3, C3a receptor, and C5 genes affect susceptibility bronchial asthma. *Hum Genet*.2004.

(5)Fukuda S, Ishikawa H, Koga Y, Aiba Y, Nakashima K, Cheng L, Shirakawa T: Allergic symptoms and microflora in schoolchildren. *J Adolesc Health*. 2004;35(2):156-8.

(6)Kiyohara C, Yoshimasu K, Shirakawa T, Hopkin JM: Genetic polymorphisms and environmental risk of lung cancer: a review. *Rev Environ Health*. 2004;

19(1):15-38.

(7)Hirota T, Obara K, Matsuda A, Akahoshi M, Nakashima K, Hasegawa K, Takahashi N, Shimizu M, Sekiguchi H, Kokubo M, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Kishi F, Suzuki Y, Saito H, Nakamura Y, Shirakawa T, Tamari M: Association between genetic variation in the gene for death-associated protein-3(DAP3) and adult asthma. *J Hum Genet*. 2004; 49(7):370-5.

(8)Shao C, Suzuki Y, Kamada F, Kanno K, Tamari M, Hasegawa K, Aoki Y, Kure S, Yang X, Endo H, Takayanagi R, Nakazawa C, Morikawa T, Morikawa M, Miyabayashi S, Chiba Y, Karahashi M, Saito S, Tamura G, Shirakawa T, Matsubara Y: Linkage and association of childhood asthma with the chromosome 12 genes. *J. Hum. Genet*. 2004; 49:115-22

(9)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; 113:528-35.

(10)Akahoshi M, Ishihara M, Remus N, Uno K, Miyake K, Hirota T, Nakashima K, Matsuda A, Kanda M, Enomoto T, Ohno S, Nakashima H, Casanova JL, Hopkin JM, Tamari M, Mao XQ, Shirakawa T: Association between IFNA genotype and the risk of sarcoidosis. *Hum Genet*. 2004; 114:503-9.

(11)Peisong G, Mao XQ, Enomoto T, Feng Z, Gloria-Bottini F, Bottini E, Shirakawa T, Sun D, Hopkin JM: An asthma-associated genetic variant of STAT6 predicts low burden of ascaris worm infestation. *Genes Immun*.2004; 5:58-62.

(12)Shimada T, Cheng L, Enomoto T, Yang X, Miyoshi A, Shirakawa T: Lysed enterococcus faecalis FK-23 oral administration reveals inverse association between tuberculin responses and clinical

manifestations in perennial allergic rhinitis: a pilot study. *J Invest Allergol Clin Immunol.* 2004; 14(3):187-92.

(13)Shimada T, Cheng L, Yamasaki A, Ide M, Motonaga C, Yasueda H, Enomoto K, Enomoto T, Shirakawa T: Effects of lysed enterococcus faecalis FK-23 on allergen-induced serum antibody responses and active cutaneous anaphylaxis in mice. *Clin Exp Allergy.* 2004; 34(11): 1784-8.

(14)Chinami M, Yano Y, Yang X, Salahuddin S, Turner H, Shirakawa T, Barford D, Adra CN: Binding of HTm4 to KAP/CDK2/Cyclin A complex enhances the phosphatase activity of KAP, dissociates cyclin A, and facilitates KAP dephosphorylation of CDK2. *J Bio Chem.* 2005; In Press

(15)Akamatsu R, Maeda Y, Hagihara A, Shirakawa T: Interpretations and attitudes toward healthy eating among Japanese workers. *Appetite.* 2005; 44(1):123-9.

2. 学会発表 国際学会

1. Taro Shirakawa: A whole genome SNP search for asthma in the Japanese population. 招待講演, The 6th Asia Pacific Congress of Allergology and Clinical Immunology, Tokyo, 2004.10.4-7.
2. Lei Cheng, Tadao Enomoto, Tomomitsu Hirota, Makiko Shimizu, Mitsuteru Akahoshi, Akira Matsuda, Mayumi Tamari, Taro Shirakawa: TLR3 gene is associated with Japanese cedar pollinosis. The 6th Asia Pacific Congress of Allergology and Clinical Immunology, Tokyo, 2004.10.4-7.
3. Lei Cheng, Tadao Enomoto, Tomomitsu Hirota, Akiko Yamasaki, Mitsuteru Akahoshi, Akira Matsuda, Mayumi Tamari, Taro Shirakawa: Association of the ADAM33 gene with Japanese cedar pollinosis. The 6th Asia Pacific Congress of Allergology and Clinical Immunology, Tokyo, 2004.10.4-7.
4. Kazuko Nakashima, Shinsuke Kunimura, Mina Tsubouchi, Lei Cheng, Taro Shirakawa: Comprehensive research of allergic disease: mechanism of action from gene and trace elements kinetics. CAARI 2004, University of North Texas, 2004.10.10-15.

国内学会

1. 白川太郎: 子供のアトピー, 基調講演, 第4回日本生理人類学会市民公開シンポジウム, 大阪朝日生命ホール, 1.24.2004.
2. 白川太郎: プロバイオティクスを用いたアレルギー予防の試み, 特別講演, 第8回腸内細菌学会, 東京大学弥生講堂, 6.3-4.2004.
3. 白川太郎: アレルギー・アトピー性疾患の疫学と遺伝子解析, シンポジウム, 第126回日本医学会シンポジウム, 日本医師会館, 6.24.2004.
4. 白川太郎: 遺伝子情報に基づく新しいアレルギー医療, 第21回日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会ランチョンセミナー, 栃木県総合文化センター, 6.20.2004.
5. 玉利真由美, 白川太郎: アレルギー関連遺伝子—本邦の状況, シンポジウム, 第54回日本アレルギー学会, パシフィコ横浜, 11.4-6.2004.
6. 嶋田貴志, 程 雷, 元永知恵, 榎本雅夫, 白川太郎: マウスの系統差研究, シンポジウム, 第54回日本アレルギー学会, パシフィコ横浜, 11.4-6.2004.
7. 程 雷, 榎本雅夫, 山崎暁子, 三好彰, 白川太郎: 疫学と遺伝学からみた hygiene hypothesis, シンポジウム, 第54回日本アレルギー学会, パシフィコ横浜, 11.4-6.2004.
8. 三邊武幸, 三好彰, 程 雷, 殷 敏, 時海波, 白川太郎, 稲川俊太郎, 中山名峰, 稲福繁, 中村晋: アレルゲンの暴露とアレルギー性鼻炎, 第54回日本アレルギー学会, パシフィコ横浜, 11.4-6.2004.
9. 上田哲也, 新実彰男, 松本久子, 竹村昌也, 山口将史, 松岡弘典, 水口正義, 白川太郎, 三嶋理晃: 健常者におけるカプサイシン咳感受性トACE遺伝子多型, 第54回日本アレルギー学会, パシフィコ横

浜,11.4-6.2004.

10. 鎌田文顕, 鈴木洋一, 青木洋子, 誤繁夫, 松原洋一, 長谷川耕一, 玉利真由美, 白川太郎:補体系 C3,C3AR1,C5 遺伝子の多型は喘息発症リスクに影響する,第54回日本アレルギー学会,パシフィコ横浜,11.4-6.2004.
11. 鈴木洋一, 鎌田文顕, Chao Chenchen, 玉利真由美, 白川太郎, 松原洋一:喘息発症における遺伝子検査ノ有用性の検討,第54回日本アレルギー学会,パシフィコ横浜,11.4-6.2004.
12. 三辺武幸, 三好彰, 程 雷, 殷 敏, 時海波, 白川太郎, 稲川俊太郎, 中山明峰, 稲福繁, 中村晋, 松井猛彦:アレルギーの暴露とアレルギー性鼻炎,第41回日本小児アレルギー学会,都市センターホテル,11.27-28.2004.
13. 鎌田文顕, 鈴木洋一, 青木洋子, 誤繁夫, 松原洋一, 長谷川耕一, 玉利真由美, 白川太郎:補体系 C3,C3AR1,C5 遺伝子の多型は喘息発症リスクに影響する,第41回日本小児アレルギー学会,都市センターホテル,11.27-28.2004.
14. 白川太郎:乳酸菌によるアレルギー予防の試み,特別講演,日本学術会議・日本乳酸菌学会シンポジウム,九州大学視聴覚ホール,12.17.2004.

G. 知的財産権の出願・登録状況

とくになし

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

地域集団でのコホート研究による便中細菌診断妥当性の研究
分担研究項目：腸管免疫の変化とアレルギー発症への関与を検討するマウスモデル開発

分担研究者氏名：清野 宏 東京大学医科学研究所 教授

研究協力者：日本大学松戸歯学部 教授 山本 正文
国際ワクチン研究所 部長 権 美那

研究要旨：アレルギーにおける腸管免疫機構と腸内環境の関与を検討する動物モデルの開発を目指した研究を展開している。本研究計画では、食物アレルギー制御における腸管関連リンパ組織 (GALT) の役割を検討することを最終目標に、まず各種腸管関連リンパ組織の発達・形成と、粘膜免疫誘導機構構築への影響を検討している。炎症性サイトカイン受容体である TNFR55 と LTβR を介したシグナルを修飾することで、パイエル板、腸管膜リンパ節、孤立リンパ小節の形成に異なる影響を及ぼす事が分かってきた。例えば、両受容体シグナル伝達系を阻止すると前者二つの GALT 形成不全がおき、IgA 産生系が極端に低下または消失する。つまり、腸内フローラにより誘導される生理的レベルの炎症性サイトカインを介した刺激が GALT 組織形成に重要な役割を果たしている事が示唆される。

A. 研究目的

アレルギー疾患発症における腸内環境の影響が注目を浴びている。つまり、アレルギー発症における第一線の生体防御バリアを構築している腸管免疫機構の変化とその関連性がうたわれているが、詳細な科学的裏付けは少ない。特にアレルゲンを取り込む消化管における粘膜免疫システムの発達機構とそれを取り巻く腸内細菌の影響についての検証が必要である。そこで、本研究計画では腸内細菌と腸管粘膜免疫システムの変化が及ぼすアレルギー発症への検討が可能なマウスモデルを開発する。

B. 研究方法

腸管粘膜免疫システムの中核と考えられているパイエル板に代表される腸管関連リンパ装置の組織機構とその維持に炎症性サイトカインが不可欠な事を証明してきた。そこで、TNFR・LTβR を介したシグナルを単独または両者欠損させた状況を TNFR-Ig・LTβR-Ig 複合タンパクを正常マウスに投与することで作り上げる。これらの方法を駆使する事でパイエル板欠損マウスや腸管膜リンパ節欠損マウスを作る事が可能となった。これらのマウスにより腸管免疫機構変化によるアレルギー発症への関与や腸内細菌による

炎症性サイトカインの誘導の役割などを検討する。

C. 研究結果

LTβR-Ig 処理をした妊娠マウスから生まれた産仔マウスではパイエル板が欠損しているが、粘膜免疫の中心的役割を果たしている IgA 産生系については、正常マウスに比較して低下しているものの、その応答性は維持されていた。さらに、TNFR-Ig・LTβR-Ig との混合処理群から生まれたマウスではパイエル板だけでなく腸管膜リンパ節も欠損していた。両リンパ節欠損マウスでは IgA 産系がほとんど作動していない事が分かった。今後は、我々が開発したアレルギー発症モデルを応用して、腸管免疫システムの変化による影響を検討する。

D. 考察

炎症性サイトカインとそのレセプターを介したシグナルは腸管免疫の根幹とも言える各種腸管関連リンパ組織の発達・形成に深く関わっている。さらに、我々は発達成熟化したパイエル板の維持に関しても LTβR を介したシグナルが重要であることも証明している。つまり、生理的レベルでの炎症性サイトカイン受容体を介し

たシグナルはGALT組織形成から発達・維持の過程において重要な役割をしている。今後、腸内環境における、この生理的レベルの炎症性サイトカインによるGALTを中心とした粘膜免疫応答機構の解明が、食物アレルギー発症との観点からも興味ある課題であろう。

E. 結論

炎症性サイトカインが腸管免疫を担当する粘膜関連リンパ組織の構築に深く関わっていることを個体レベルで証明する事が出来た。パイエル板だけではなく腸管膜リンパ節がIgAの誘導にあたって重要な役割を果たしている事が強く示唆された。さらに我々はこれらの炎症性サイトカインのシグナルは成熟化したパイエル板や腸管膜リンパ節などの組織維持にも深く関わって結果も得ている。これらの結果は、腸内フローラから送られる炎症性サイトカイン誘導シグナルが粘膜免疫担当組織の発達と維持に不可欠なことを示唆している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto, M., Kweon, M-N., P-D, Rennert, Hiroi, T., Fujihashi, K., McGhee, J.R., and Kiyono, H. 2004. Role of gut-associated lymphoreticular tissues in antigen-specific intestinal IgA immunity. *J. Immunol.* **173**:762-769
2. Shikina, T., Hiroi, T., Iwatani, K., Jan, M-H., Fukuyama, S., Tamura, M., Kubo, T., Ishikawa, H. and Kiyono, H. 2004. IgA class switch occurs in the organized nasopharynx and gut-associated lymphoid tissue, but not in the diffuse lamina proposal of airways and gut. *J. Immunol.* **10**: 6259-6264
3. Jang, M-H., Kweon, M-N., Iwatani, K., Yamamoto, M., Terahara, K., Sasakawa, G., Suzuki, T., Nochi, T., Yokota, Y., Hiroi, T., Tamagawa, H., Iijima, H., Kunisawa, J., Yuki, Y. and Kiyono, H. 2004. Intestinal villous M cells: A new antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc. Natl. Associ. Sci.* **16**: 6110-6115
4. Nochi, T., Yuki, Y., Terahara, K., Hino, A., Kunisawa, J., Kweon, M-N., Yamaguchi, T. and Kiyono, H. 2004. Biological role of Ep-CAM in the physical interaction between epithelial cells and lymphocytes in intestinal epithelium. *Clin. Immunol.* **113**: 326-339
5. Kiyono, H. and Fukuyama, S. 2004. Nalt-versus peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nature Rev. Immunol.* **4**: 699-710
6. Ueta, M., Nochi, T., Jang, M-H., Park, E-J., Igarashi, O., Hino, A., Kawasaki, S., Shinkina, T., Hiroi, T., Kinoshita, S. and Kiyono, H. 2004. Intracellularly expressed TLR2s and TLR4s contribution to an immunosilent environment at the ocular mucosal epithelium. *J. Immunol.* **173**: 3337-3347
7. Ohmura-Hoshino, M., Yamamoto, M., Yuki, Y., Takeda, Y. and Kiyono, H. 2004. Non-toxic Stx derivatives from *Escherichia coli* posses adjuvant activity for mucosal immunity. *Vaccine* **22**: 3751-7361
8. Yoshino, N., Lu, X-S. F., Fujihashi, K., Hagiwara, Y., Kataoka, K., Lu, D., Hirst, L., Honda, M., F.W, van Ginkel., Takeda, Y., Miller, C. J., Kiyono, H. and McGhee, J.R. 2004. A novel adjuvant for mucosal immunity to HIV-1 gp120 in nonhuman primates. *J. Immunol.* **173**: 6850-6857
9. Hino, A., Kweon, M-N., Fujihashi, K., McGhee, J.R. and Kiyono, H. 2004. Pathological role of large intestinal IL-12p40 for the induction of Th2-type allergic diarrhea. *The Am. J. Pathol.* **164**: 1327-1333
10. Mizushima, T., Ito, T., Kishi, D., Kai, Y., Tamagawa, H., Nezu, R., Kiyono, H. and Matsuda, H. 2004. Therapeutic effects of a new lymphocyte homing reagent FTY720 in interleukin-10-gene-deficient mice with colitis. *Inflamm*