

厚生労働科学研究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、胎外因子同定に関する研究
気管支喘息の胎外因子としてのウイルス感染、胎内因子としての遺伝子多型
研究分担者： 足立満 昭和大学第一内科教授

研究要旨：気管支喘息の悪化因子としてのウイルスによる上気道感染すなわち風邪症候群による症状の増悪は臨床上周知の事実であり、成人喘息の急性増悪原因の70%以上が上気道感染であることが報告されている。しかしながら、その詳細な機序については不明な点が少ない。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につき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。

ウイルス感染による喘息増悪の機序を解明する目的で気道上皮に着目し研究を実施した。気道内腔表面に存在する気道上皮は外界とのバリアー機能やその線毛運動などによる異物排除機能が研究の対象とされてきたが、近年気道上皮細胞へ種々の刺激を加えることによりサイトカイン、ケモカインなどの生理活性物質の産生放出やICAM-1などの接着分子の発現が観察されている。このことは気道上皮細胞が気道炎症形成にあたり積極的に何らかの役割を演じていることが想定される。今回我々は *in vitro* における気道上皮細胞培養系を確立し、これに対し炎症性サイトカイン刺激やウイルス感染モデルである dsRNA 刺激を行い新たな生理活性物質の産生などにつき検討を加えた。

さらに今年度は胎内因子として遺伝子を取り上げその中の IL-17F の喘息病態への関与につき検討を加えた。

研究協力者：

國分二三男 昭和大学第一内科助教授
松倉聡 昭和大学第一内科
川口未央 昭和大学第一内科
西村正治 北海道大学第一内科教授
檜澤伸之 北海道大学第一内科助教授

A. 研究目的

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。*in vitro* 気道上皮細胞培養系における検討は、近年注目されつつある分野であり現在までに気道上皮は

IL-6,8,GM-CSF,RANTES などの生理活性物質を産生し気道炎症特にアレルギー性炎症の形成に関与することが明らかとなっている。今回我々は *in vitro* 気道上皮細胞培養系を用い転写メカニズムの解明されていないサイトカイン/ケモカインの動態につき検討を加える。

また IL-17F は気道炎症との関連で注目されているが、アレルギー性炎症病態形成への関与についての詳細については不明な点が多い。我々は、気管支喘息における IL-17F の役割を *in vitro*, *in vivo* で検討するとともに、インフォームドコンセントが得られた気管支喘息患者について IL-17F 遺伝子解析を行った。

B: 研究方法

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/報告を行ってきたが、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。今回特に、まだ転写メカニズムの解明されていないサイトカイン/ケモカインに焦点を置き、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。ウイルス感染実験モデルとして dsRNA を用い気道上皮刺激を行い Real Time - PCR 法を用いて MIP-1 α , RANTES, IP-10, MCP-1, SR-PSOX, IL-1R antagonist などの炎症関連もしくは生体防御因子の発現を検討する。

さらに IL-17F は気道炎症との関連で注目されているが、アレルギー性炎症病態形成への関与についての詳細は不明な点が多い。我々は、気管支喘息における IL-17F の役割を in vitro, in vivo で検討するとともに、インフォームドコンセントが得られた気管支喘息患者について IL-17F 遺伝子解析を行い臨床的関連につき検討を加えた。

C: 研究結果

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。Real Time - PCR 法を用いて MIP-1 α , RANTES, IP-10, MCP-1, SR-PSOX, IL-1R antagonist などの炎症関連もしくは生体防御因子の発現の増強がみられた。RANTES の promoter 領域を用いた発現実験において NF- κ B, IRF の関与が確認された。さ

らに TLR-3 は気道上皮細胞においてはその細胞表面に発現しているものは僅かで細胞内に多く存在し細胞内情報伝達において重要な働きを行っていることが確認された。

気管支喘息患者についての IL-17F 遺伝子解析結果において exon3 に SNPS が確認された。野生型 IL-17F を有する気管支喘息患者においては呼吸機能 FEV1.0 の有意な低下が観察された。リコンビナント野生型 IL-17F と変異型 IL-17F を用いた in vitro 実験においても野生型 IL-17F においてのみに IL-8, GRO α の産生が見られた。

D: 考察

気道上皮細胞を用いた実験系において dsRNA 刺激より MIP-1 α , RANTES, IP-10, MCP-1, SR-PSOX, IL-1R antagonist などの炎症関連もしくは生体防御因子の発現が確認された。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。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が想定される。従来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。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。

IL-17F は IL-17 と同じ第6染色体(6p21)に存在し、その距離はわずか 50kbp である。IL-17ファミリーの中では最も高い50%の類似性を示す。産生細胞は活性化 CD4⁺T 細胞(Th0、1、2)、好塩基球、肥満細胞である。IL-17F mRNA は IL-17mRNA と異なり、肺や肝臓を中心に広範囲の組織で発現している。これらのことからIL-17Fは多機能を有して、多くの生体反応に関与していることが示唆される。機能として、気道上皮細胞から IL-6、IL-8、ICAM-1、内皮細胞から IL-6、IL-8、TGF β 、MCP-1、線維芽細胞から IL-8、G-CSF を誘導する。IL-17FR は同定されていないがシグナル伝達経路として MAPK(ERK1/2)を介する。抗原チャレンジ後の気管支喘息患者の BAL 中の細胞に IL-17F mRNA が発現することからアレルギー性気道炎症との関連が示唆されている。ヒト IL-17F 遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込み、経気道的にマウスに投与すると気道への著明な好中球浸潤が認められる。これらの知見よりIL-17Fは気道炎症性疾患に関与する注目べきサイトカインの一つである。今回の検討で、野生型 IL-17F を有する気管支喘息患者においては呼吸機能 FEV1.0 の有意な低下が観察された。リコンビナント野生型 IL-17F と変異型 IL-17F を用いた in vitro 実験においても野生型 IL-17F においてのみに IL-8、GRO α の産生が見られた。この結果は野生型 IL-17F の臨床像への関連を裏付けるものであると考えられた。

E: 結論

今回我々は in vitro 実験系において基礎的検討を行いウイルス感染に対する考察を加えた。気道上皮細胞を用いた実験系においてに

dsRNA 刺激より種々のサイトカイン、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する。感冒罹患により好酸球炎症の増悪ならびに好中球炎症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が想定された。この結果より、喘息増悪因子としてのウイルス感染は極めて重要と考えられた。今後はこれらの研究を進展させ基礎的検討のみならず臨床的検討も行いその実態を明らかとし喘息増悪に対する関与へのさらなる検討を加えることが重要と考えられる。また喘息増悪の過程において好中球の関与は重要と考えられた。好中球炎症のみならず好酸球炎症に深く関わりとされるIL-17Fに関し、その遺伝子多型と臨床像とが関連しその重要性が示唆された。

感染は喘息のみならず全ての疾患においてその病態を修飾し大きな影響を及ぼす。しかしながら現時点では一部のウイルスを除いてはその感染に対する根治療法はない。このような観点より、気管支喘息病態に対するウイルス感染の影響を検討することは極めて重要でありその予防、治療法を考える上で詳細な解明が必要と考えられる。

F: 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 Tcell,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 Pasific 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 S., Huang 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 2003
- 10) Matsukura S., Kokubu F., Adachi M., Schleimer RP. et al. Differential regulation of eotaxin expression by IFN-g in airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 111;1337-1344 2003
- 11) Kawaguchi M., Kokubu F., Matsukura S., Huang SK, Adachi M. Induction of CXC Chemokines, GRO-a 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
- 12) Matsukura S., Kokubu F., Kurokawa M., Kawaguchi M., Ieki K., Odaka M., Suzuki S., Watanabe S., Adachi M. et al; Molecular mechanisms of repression of eotaxin expression with fluticasone propionate in airway epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* 134;12-20 2004
- 13) Ieki K., Matsukura S., Kokubu F., Kurokawa M., Kawaguchi M., Odaka M., Suzuki S., Watanabe S., Adachi M. et al; Double-stranded RNA activates RANTES gene transcription through co-operation of NF-kB and interferon regulatory factors in human airway epithelial cells *Clin Exp Allergy* 34;745-752 2004
- 14) Kawaguchi M., Kokubu F., Matsukura S., Ieki K., Odaka M., Suzuki S., Watanabe S., Huang SK, Adachi M; Induction of GM-CSF by a new cytokine ML-1

- (IL-17F), via Raf-1 MEK ERK pathway.
J Allergy Clin Immunol 114; 444-450 2004
- 15) Kawaguchi M., Adachi M., Oda N., Kokubu F., SHuang SK; IL-17F cytokine family. J Allergy Clin Immunol 114; 1265-73 2004
- 16) Watanabe S., Kokubu F., Matsukura S., Suzuki S., Kawaguchi M., Odaka M., Kurokawa M., Adachi M.; Prevention of asthma exacerbation with vaccination against influenza in winter season Allergology Int (in press)
- 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
- 5) 松倉聡 國分二三男 足立満 他:平滑筋におけるケモカインの発現とリモデリングにおける役割 (シンポジウム) アレルギー 2004 53:2
- 学会発表
- 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

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

Respiratory syncytial virus F タンパクは TLR4 および CD14 を介して認識され、Th1 型の免疫反応が誘導される。したがって TLR4、CD14 の発現および機能の低下は RSV 感染時の Th1 反応の誘導不全をきたし、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がある。昨年度の研究から日本人には TLR4 遺伝子多型がないことが明らかとなったため、本年度の研究では CD14 遺伝子多型との関連を検討した。また CD14 遺伝子多型によって影響される可溶性 CD14 (sCD14) が RSV に対する自然免疫応答に与える影響を調べた。

- 1) 51 名の RSV 細気管支炎患者にアンケートを郵送し、RSV 細気管支炎後喘鳴と CD14 (-159) 遺伝子多型について検討したが、両者間に有意な関係は認めなかった。
- 2) しかしながら、アトピー群と非アトピー群間での CD14 (-159) 多型を比較すると遺伝子型 CC の頻度がアトピー群で多い傾向が認められた。
- 3) RSV 細気管支炎後の反復性喘鳴には、個体の素因以上に兄弟数や保育の有無などの感染への曝露の機会の多さが関連していると考えられた。
- 4) 単球系培養細胞 THP-1 を RSV で刺激する実験では、LPS 刺激と同様に sCD14 は濃度依存的に RSV 刺激による IL-12p40 の産生を増強させることが明らかとなった。

今後、sCD14 値により影響を与える他の CD14 遺伝子多型の検討およびエンドトキシン量などの環境因子の解析が細気管支炎後の喘鳴・喘息の発症に重要と考えられる。

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)
菱木はるか (千葉大学大学院医学研究院小児病態学)	石和田稔彦 (千葉大学医学部附属病院助手)
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)
石川信泰 (千葉市立青葉病院小児科医長)	沼田朋子 (千葉市立青葉病院小児科)
黒崎知道 (千葉市立海浜病院小児科部長)	山口賢一 (千葉市立海浜病院主任医長)
本多昭仁 (旭中央病院小児科医長)	青柳正彦 (国立療養所下志津病院アレルギー科医長)

A. 研究目的

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 反応の誘導不全をきたし、感染症に引き続くアレルギーの発症に関与すると考えられる。respiratory syncytial

virus (RSV) 細気管支炎への罹患は小児気管支喘息の発症寄与因子として知られているが、自然免疫における RSV の認識にも TLR4、CD14 が関与していることが最近明らかとなった。本研究では TLR4、CD14 の発現・機能に關係する遺伝子多型と RSV 細気管支炎後の反復性喘鳴の關係を検討する。昨年度の研究から日本人には TLR4 遺伝子多型がないこと、CD14 遺伝子多型は存在するこ

とが明らかとなったため、本年度の研究ではCD14遺伝子多型との関連を検討した。またRSVに対する自然免疫応答におけるCD14の役割を確認するために、RSVの認識に与える可溶性CD14(sCD14)の効果をin vitroの実験系で解析した。

B. 方法

2003-2004年冬期以前にRSV細気管支炎の診断で千葉大学小児科および協力病院に入院した2歳未満の小児でインフォームドコンセントが得られた症例を対象とした。51名のRSV細気管支炎患者に、細気管支炎後の反復性喘鳴の有無、喘息家族歴、兄弟数、集団生活の有無などに関するアンケートを郵送し、43名(84%)から回答を得た。このうち、出生時体重が2500g以下、NICU入院の既往、およびRSV細気管支炎罹患以前の反復性喘鳴を認めた患者を除いた28名(男子14名、女子14名)について、CD14遺伝子多型との関連について解析を行った。血清総IgEまたは特異IgE値に基づいて評価したアトピー素因の有無とCD14(-159)遺伝子多型との関係については45名を対象として解析した。

RSV刺激によるin vitroでの単球系培養細胞株THP-1からのサイトカイン産生に対するsCD14添加の効果を検討した。

統計学的解析は、 χ^2 二乗検定およびFisherの直接法にて行った。

C. 研究結果

RSV細気管支炎後反復性喘鳴の有無とCD14遺伝子多型との間に有意な関連は見いだせなかった(表1)。

一方、RSV細気管支炎後の反復性喘鳴がある群は、アンケート施行時における兄弟数が有意に多かった($P=0.018$)。(図1)また、RSV細気管支炎後の反復性喘鳴がある群は、アンケート施行時に集団保育がされている傾向があった($P=0.09$) (表2)。

アトピー群と非アトピー群間でのCD14(-159)多型を

比較すると遺伝子型CCがアトピー群で多い傾向が認められた($P=0.087$) (表3)。

RSV刺激により単球細胞株THP-1は各種のサイトカインを産生する。そこで、IL-12p40を指標として、培養液中に異なる濃度のsCD14を加えてRSV刺激によるTHP-1細胞の反応性を検討した。その結果、LPS刺激と同様に(図2) sCD14は濃度依存的にRSV刺激によるTHP-1からのサイトカイン産生を増強させることが明らかとなった(図3)。

D. 考察

今年度の解析では、CD14(-159)遺伝子多型とRSV細気管支炎後の反復性喘鳴には統計学的な関連は見いだせなかった。しかし、CD14(-159)多型の頻度をアトピー群と非アトピー群間で比較すると遺伝子型CCの頻度が非アトピー群で多い傾向が認められたことから、少なくとも現在までの海外での報告にあるように我が国でもCD14(-159)多型が乳幼児のアトピー素因と関連する可能性がある。RSV細気管支炎後の反復性喘鳴とアトピーの関連が指摘されていることから症例数を増やすことによりCD14(-159)多型と細気管支炎後の喘鳴の関係が明らかになる可能性がある。今年度は細気管支炎の診断を厳密に行った結果として解析対象患者数が少なかったため、2004-2005年冬期のRSV細気管支炎患者を登録・追跡し、さらに数年以上以前にRSV細気管支炎に罹患した既往のある小児を対象に反復性喘鳴の有無とCD14(-159)多型について解析を進めている。

昨年度の調査からRSV細気管支炎の罹患しやすさ、そして本年度の調査から細気管支炎後の反復性喘鳴の有無とCD14多型の関連は認められていない。しかしsCD14を培養系に加えるとRSV刺激による単球細胞株からのサイトカイン産生がsCD14の濃度依存的に増加したことから、少なくともCD14がRSVの認識に関与することが確かめられた。Sofermanらは、RSV細気管支炎罹患時のsCD14値の多寡がその後の反復性喘鳴の有無と関連す

ることを報告しており、CD14分子がRSVに対する自然免疫応答に関与している可能性は高い。Guerraらは、臍帯血中sCD14が低値の群では生後1年以内の反復性喘鳴のリスクが高いことを示している。したがって、機能に関連したTLR4遺伝子多型が存在しないと考えられる日本人においてはRSVによる細気管支炎の重症化・その後の反復性喘鳴にCD14の関与はより大きな可能性がある。

CD14多型は血清sCD14値の多寡に関与しているとの報告は多く、sCD14値がRSV細気管支炎後の反復性喘鳴・喘息と関連するならば、CD14遺伝子多型との関連も予想される。我々の解析では、関連が認められなかったが、最近の研究から血清sCD14値の多寡にはCD14(-159)以外のプロモーター多型が関与する可能性が示されている。そこで、来年度の研究では(-159)以外の遺伝子多型についても検討する予定である。

今回の研究から、RSV細気管支炎後の反復性喘鳴には、個体の素因以上に兄弟数や保育の有無などの感染への曝露の機会の多さが関連していると考えられた。少な

くともRSV細気管支炎後の反復性喘鳴と遺伝子多型の関連の評価にはこのようなconfounding factorを考慮する必要があると考えられる。Zdolsekらのデータでは、アトピーと非アトピーでのsCD14値は学童期以降は有意な差をもってアトピー群で低い乳児期には差異がない。この結果は、乳幼児期のsCD14量に関してCD14遺伝子多型などの遺伝因子以外に環境因子の影響が大きいと考えられる。そこで、sCD14量の規定に関与する可能性のある環境因子として環境中のエンドトキシン量などの測定も必要と考えられる。

E. 結論

RSV細気管支炎の発症、その後の反復性喘鳴・喘息発症にはCD14(-159)多型の関与は明らかにできなかった。しかし、sCD14はRSVへの個体の免疫応答を規定していることから、他のCD14遺伝子多型の解析ならびにsCD14値を決定している環境因子の同定が細気管支炎後の喘鳴・喘息の発症に重要と考えられる。

表 1

CD14 C(-159)T多型と
RS細気管支炎・細気管支炎後喘鳴の関係

	CC	CT	TT
RS細気管支炎患者	6	12	10
RS細気管支炎後 喘鳴あり	1	6	3
RS細気管支炎後 喘鳴なし	5	6	7
健康人	18	36	20

† : $p > 0.05$ (χ^2 乗検定Yates補正)

図 1

細気管支炎後喘鳴と兄弟数の関係

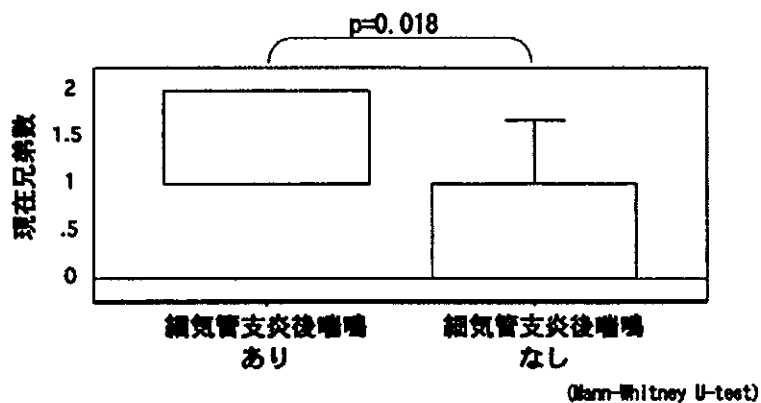


表 2

細気管支炎後喘鳴と集団保育の関係

	喘鳴あり	喘鳴なし
保育あり	5	3
保育なし	5	15

§ : $p=0.091$ (Fisher直接法)

図 2

LPS刺激での単球からのIL-12産生に対するsCD14の効果

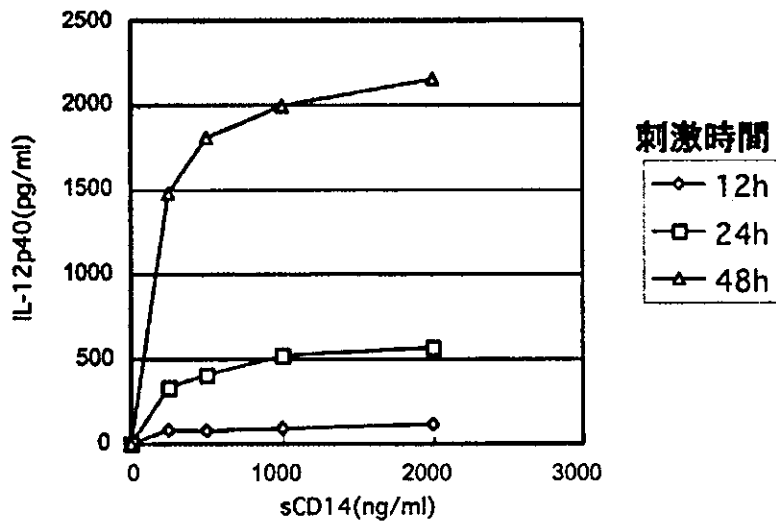
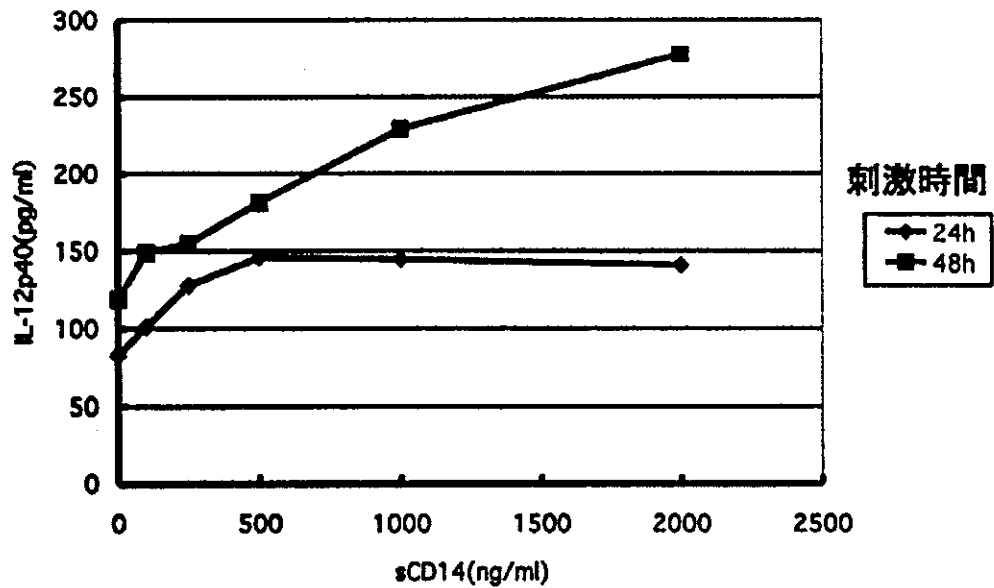


図 3

RSV刺激での単球からのIL-12産生に対するsCD14の効果



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。今年度は昨年度に引き続き、気管支喘息についての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子供の喘息の発症に関与すると推定された。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喘息発症に関わ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。また、感染に関してはRSウイルスについて検討したが、これに関しても先天的因子としての家族歴の重要性が確認された。

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。今後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。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、免疫学的検討を加え、確認して行く予定である。

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	J R 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

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。本研究においては、これらの因子についてさらに詳しく

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。

また、食物アレルギーの病因抗原の診断は、経口負荷試験、特異IgEの検出、リンパ球幼弱化テスト、リンパ球IL-2反応試験などにより行われる。CFSE(carboxy fluorescein diacetate ccinimidyl ester)色素は細胞蛋白を染色する作用があり細胞分裂した場合、その蛍光強度は減少するという性質を利用して細胞分裂パターンの解析することで抗原特異的細胞増殖を評価することが可能である。今回CFSE色素で染色した患者リンパ球の分裂パターンを、FACSを用いて解析し、アレルギー患者の病因抗原の診断をより客観的に評価し、安全かつ簡便に診断する方法を検討する。

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した。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。昨年度は、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、ペット、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が、今年度は2歳児を中心に検討した。

また、American Thoracic Society Division of

Lung Diseases(ATS-DLD)の問診票の日本版改訂版による質問票(ATS-DLD版)による喘息の調査を福岡市内3地区6小学校で実施した。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った。

胎外因子として、RSウイルス(以下、RSV)についての関与を検討するために、国立病院機構福岡病院に平成12年11月~平成16年11月に気道症状を認め入院した2歳以下の児613名の鼻汁吸引液のRSV抗原陽性例113名を対象として背景因子・予後について検討した。

(6)末梢血単核細胞におけるCFSE染色、抗原添加と培養比重遠心法にて分離した末梢血単核細胞をCFSEで染色後、OVA(Torii&Co.), 0.5%PHA(Sigma Chemicals, St. Louis, MO)を添加し37°C、5%CO₂存在下で6日間培養した。培養細胞をCD4、CD8抗原で2重染色し、FACSを用いそれぞれの細胞分裂相における細胞増殖を算定した。得られた成績はt-test検定により検定した。

C. 研究結果

(1)昨年度に続いて、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)出生時の児の体重が大きい方が喘息や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。

(4)福岡市小学校での小学校調査では、昨年度に引き続き、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、保育環境は喘息の有症率との間に関連がみられた。また、4小学校の1年~6年生、375名の問診票によって気道症状ありと診断された者に対して、F-V曲線と、IgEおよび、ダニ、スギ、ゴキブリに対する特異的IgE値を測定した。その結果、ゴキブリRAST score陽性の者は全学年では1が7.7%、2が5.6%、

3が1.9%であった。この値はスギ花粉や、ダニに比較して少なく、1年生から6年生での変化はみられなかった。

(5)RSVに関する検討では、反復性喘鳴と関連する背景因子は以下のごとくであった。RSVの罹患月齢、RSV罹患時の血清総IgE値、アレルギー疾患の家族歴は有意な関係がなかった。しかし、喘息の家族歴は有意な関係(P<0.05)があった。

(6)①健康者では単核細胞のCD4およびCD8はいずれも反応する陽性細胞は軽度であった。非刺激におけるCFSEによる細胞分裂は2次分裂相までみとめたが、PHAで刺激した場合は、CD4陽性リンパ球亜群(26.49±9.10%)、CD8陽性リンパ球亜群(34.73±9.09%)の両方において細胞の3次分裂相を示す蛍光強度減少細胞群の著しい細胞増殖を認めた。OVA、Df刺激した場合の細胞分裂は2次分裂相までであった。②鶏卵アレルギー患者では培養単核細胞のCD4陽性細胞は健康者に比べて増加した。OVAで刺激した単核細胞のCD4陽性リンパ球亜群において、蛍光強度減少細胞群は、非刺激群と比較してOVA0.1μg/ml、1μg/mlの低濃度では2.44±0.46%、2.50±0.51%であったが10μg/ml濃度においては5.47±1.03%と3次分裂相を示す有意な増加を認めた。培養単核細胞のCD8陽性細胞についても健康者に比べて増加した。一方、OVAで刺激単核細胞のCD8陽性リンパ球亜群においては、非刺激群と比較してOVA0.1μg/ml、1μg/ml、10μg/mlのいずれの濃度においても3次分裂相を示す蛍光強度減少細胞群の増加は認めなかった。

Df刺激の場合、単核細胞のCD4、CD8陽性の両リンパ球亜群において、非刺激群と比較し、Df0.01μg/ml、1.0μg/ml、10μg/ml濃度ではいずれの濃度においても3次分裂相を示す蛍光強度減少細胞群の増加は認めなかった。③鶏卵アレルギー患者改善群ではCD4、CD8陽性細胞は健康者に比べて増加していた。OVAで刺激したCD4陽性リンパ球亜群、CD8陽性リンパ球亜群両方において、非刺激群と比較してOVA0.1μg/ml、1μg/ml、10μg/mlのいずれの濃度においても3次分裂相を示す蛍光強度減少細胞群の増加は認めなかった。

D. 考察

小児気管支喘息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

に認められ、アレルゲンに対する胎内感作の可能性も指摘されている。昨年まで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が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が推察された。

我々の結果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は明らかではないが生後数年間と、その後では、影響因子が異なる場合も報告されている。また、感染の影響に関しても、ウイルスか細菌か、更に、その種類によっても異なると推定されている。これらについても、幾つかの検討が開始されつつある状況であり、今後、明らかにされていくであろう。われわれの間診による追跡調査でも、明らかに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があると考えられる。また、アレルギー患者の病因抗原の診断をより客観的に評価し、安全かつ簡便に診断する方法の研究も必要である。

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が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・間接の因子である。

F, 研究発表

(論文発表)

1. 小田嶋 博: 気道の生体防御と外的刺激. 室内空気質健康影響研究報告書—シックハウス症候群に関する医学的知見の整理—. 室内空気質健康影響研究会. 2004年. p. 57-65.
2. 小田嶋 博: 第2章 小児気管支喘息の疫学. 小児気管支喘息治療・管理ガイドライン 2002をどう読むか. 日本小児アレルギー学会誌. 18 (1): 85-86. 2004.
3. 小田嶋 博: アレルギー疾患の疫学調査と Hygiene hypothesis. アレルギー・免疫. 11 (4): 16-23. 2004.
4. 小田嶋 博: 母乳保育とアレルギー. 小児科. 45 (3): 352-356. 2004.
5. 西尾 健、小田嶋 博、西間三馨: 小児喘息発症の低年齢化. 小児科 45 (1) 別冊: 97-102. 2004.

6. 小田嶋 博: 1) 鼻アレルギーが小児喘息に及ぼす影響. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 76 (5) 増刊号: 125-131. 2004.

7. Hiroko Nogami, Hiroshi Odajima, Shunsuke Shoji, Terufumi Shimoda and Sankei Nishima: Capsaicin provocation test as a diagnostic method for determining multiple chemical sensitivity. Allergology International 53: 153-157. 2004.

8. 小田嶋 博: 気管支喘息国際疫学調査—ISAACの結果から—. 診断と治療 92 (8): 1305-1310. 2004.

9. 小田嶋 博: 喫煙と気管支喘息. 呼吸器科 6 (6): 567-575. 2005.

10. Hiroshi Odajima and Ken Nishio: Clinical Reality of Asthma Death and Near-fatal Cases, in a Department of Pediatrics of a Japanese Chest Hospital. Allergology International 54 (1): 7-15. 2005.

(学会発表)

1. 小田嶋 博: 「小児喘息有症率の変遷と増加要因」、シンポジウム 12 アレルギーは増えているか、第16回日本アレルギー学会春季臨床大会、平成16年5月12-14日、群馬。
2. 手塚純一郎、井手康二、久保田典里子、本村知華子、岡田賢司、小田嶋 博、西間三馨: 「当院におけるRSV抗原陽性例の検討」、第32回西日本小児アレルギー研究会、平成16年8月28-29日、福岡。
3. 小田嶋 博、西間三馨: 「喘息発作入院と大気中PM2.5濃度の関連についての検討」、第54回日本アレルギー学会総会、平成16年11月4-6日、神奈川。
4. 佐伯敏亮、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6報) 経時的な調査結果について」、第54回日本アレルギー学会総会、平成16年11月4-6日、神奈川。
5. 手塚純一郎、井手康二、久保田典里子、本村知華子、岡田賢司、小田嶋 博、西間三馨: 「当院におけるRSV抗原陽性例の検討」、第37回日本小児呼吸器疾患学会、平成16年11月19-20日、東京。

平成 16 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・リモデリング形成に
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、気道リモデ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 μ 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、気道過敏性を測定し、気管支肺胞洗浄液（BALF）を採取後、採血したのち気道組織を摘出した。昨年度はこのうち気道過敏性の経時的変化の特徴を報告した。今年度は BALF 中の好酸球数の経時的変化、気道組織における炎症細胞浸潤の程度、粘液分泌細胞増加の程度について検討した。その結果以下の結果を得た。

1. BALF 中の好酸球数：曝露期間に比例して両群の動物とも減少傾向を示したが、幼若マウスがより顕著で、4 週の時点で測定感度以下であった。
2. 気道組織への炎症細胞浸潤：成熟マウスでは 8 週曝露の時点まで浸潤の程度は変化なかったが、幼若マウスでは 4 週曝露後は 1 週曝露に比較して浸潤の程度は有意に低下した。
3. 粘液分泌細胞過形成：炎症細胞浸潤と同様の傾向を示した。即ち成熟マウスでは 8 週曝露の時点まで粘液分泌細胞過形成の程度は変化なかったが、幼若マウスでは 4 週曝露後は 1 週曝露に比較して浸潤の程度は有意に低下した。

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好酸球を中心とした炎症細胞浸潤、粘液分泌細胞過形成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 伊勢崎市民病院小児科医長

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る

慢性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管支肺胞洗浄液（BALF）中好酸球数

の経時的変化、気道組織における炎症細胞浸潤の程度、粘液分泌細胞増加の程度について検討した。

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 μ 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、気道組織を摘出した。昨年度はこのうち気道過敏性の経時的変化の特徴を報告した。今年度は BALF 中の好酸球数の経時的変化、気道組織における炎症細胞浸潤の程度、粘液分泌細胞増加の程度について検討した。それぞれの経時的変化を検討した。

2. 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。

3. 気道の組織学的評価

BALF 採取後、肺をエタノール液にて充満させたのち気管を結紮して摘出し、以下の検討を行った。

1) 炎症細胞浸潤の評価：組織を Hematoxylin and Eosin (H-E) にて染色した。炎症細胞浸潤の程度は Curtis らによる scoring system を用いてスコア化した (J. Clin. Invest. 1991; 88:1244.)。即ち、3 項目について浸潤の程度により、

それぞれ 0-3 の間でスコア化した。最大値は 9 であり、もっとも細胞浸潤が強く、0 はまったく炎症の見られない状態である。

2) 粘液分泌細胞過形成の評価：粘液分泌細胞内の粘液顆粒を染色する目的で組織を periodic acid-Schiff (AB/PAS) にて二重染色した。粘液分泌細胞過形成の程度は Trifilieff らによる 5 段階評価による半定量法を用いた (Am. J. Physiol. 2000; 279:L1120.)。即ち、各気道断面の粘液分泌細胞過形成の程度を 5 段階に分類し、その平均値をその個体のスコアとした。

C. 研究結果

1. BALF 中好酸球数

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 週の時点ですでに測定感度以下となった。

2. 炎症細胞浸潤

成熟マウスでは 8 週曝露の時点まで浸潤の程度は変化なかったが、幼若マウスでは 4 週曝露後は 1 週曝露に比較して浸潤の程度は有意に低下した。

3. 粘液分泌細胞過形成

炎症細胞浸潤と同様の傾向を示した。即ち成熟マウスでは 8 週曝露の時点まで粘液分泌細胞過形成の程度は変化なかったが、幼若マウスでは 4 週曝露後は 1 週曝露に比較して浸潤の程度は有意に低下した。

D. 考察と結論

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。昨年は気道過敏性の変化に焦点を当てて検討した。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成熟動物に比べ、早期に収束した。今年度はBALF中好酸球数、炎症細胞浸潤、粘液分泌細胞過形成について経時的変動を観察した。その結果、これらの病態も気道過敏性同様、幼若マウスでは成熟マウスに比べて早期に収束した。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) 特異 IgE 抗体値の経時的変化を比較する。

(2) サイトカインの定量：Th 1、Th2 サイトカイン、各種増殖因子 (TGF- β 、EGF など) の経時的変化を比較する。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Todokoro M, Mochizuki H, Tokuyama K, Utsugi M, Dobashi K, Mori M, Morikawa A. Effect of ozone exposure on intracellular glutathione redox state in cultured human airway epithelial cells. Inflammation. 2004 Apr;28(2):105-14.

2) 徳山研一: β 2 刺激薬の抗炎症効果. アレルギー・免疫 12(3):24-31, 2005.

3) 滝沢琢巳、徳山研一: 小児急性呼吸器疾患の呼吸機能(特集 診療に必要な呼吸機能の知識). 小児科 45(8):1393-1400, 2004.

4) 滝沢琢巳、徳山研一: 小児気管支喘息. 呼吸器ケア 2(11):1184-1192, 2004.

5) 徳山研一: 小児における咳喘息・慢

性咳嗽. アレルギーの臨床 24(13):1031-1034, 2004.

6) 徳山研一、梅野英輔、勝沼俊雄、亀田誠、坂本龍雄、濱崎雄平、増田敬、吉原重美: 小児気管支喘息に対する吸入抗コリン薬の使用状況—アレルギー専門小児科医を対象とした質問表による調査—。日本小児アレルギー学会雑誌 18(3):270-278, 2004.

7) 徳山研一: β 2 刺激薬の過去・現在(総論). (特集 気管支喘息治療における β 2 刺激薬). アレルギー科 17(4) 307-312, 2004.

8) 徳山研一: 小児でも咳喘息・アレルギー性咳嗽はあるのか. (特集 気管支喘息). 小児内科 36(4):541-544, 2004.

9) 鈴木雅登、徳山研一: 気管支喘息治療薬: β 刺激薬. 小児の臨床薬理学(小児科診療増刊号) 2004; 67 巻増刊: 207-214

2. 学会発表

1) 徳山研一: 乳幼児喘息の病態、第3回小児吸入療法フォーラム特別講演、2004. 10. 30、東京

2) 徳山研一: 小児気管支喘息と気道炎症・リモデリング、第37回茨城小児アレルギー研究会特別講演、2004. 10. 14、つくば市

3) 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

4) 徳山研一: 小児科領域における末梢気道炎症の評価と薬物療法、第19回薬物吸入療法研究会シンポジウム: 吸入ステロイド薬の新しい知見—気管支喘息における末梢気道炎症治療に対して—、2004. 6. 26、東京

5) 徳山研一: 乳幼児・小児喘息における早期介入、第16回日本アレルギー学会春季臨床集会 イブニングシンポジウム 8: 軽症喘息治療における early intervention の意義、2004. 5. 13 (前橋)

F. 知的財産権の出願・登録状況

- 1、特許取得
特になし
- 2、実用新案登録
特になし

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解析
・気道リモデリング関連分子の検討—

分担研究者 吉原 重美 獨協医科大学小児科・助教授

研究要旨 気道ウイルスのひとつであるRSV(Respiratory Syncytial Virus)感染は、小児気管支喘息の発症や増悪因子として重要視されているが、その機序には不明な点が多く残されている。一方、近年、小児喘息においてもすでに気道リモデリングが存在することが示唆されている。今回、RSV感染の気道リモデリングとの関連性を検討する目的で、RSV(long株)感染がヒト気道上皮細胞(A549)において誘導する気道リモデリング関連分子(特に成長因子、MMP)の遺伝子発現をGene Chip(Affymetrix)を用いて網羅的に解析した。その結果、ヒト気道上皮細胞におけるRSV感染によって、72種の成長因子のうち約20種が非感染細胞と比較して強く(2倍以上)発現誘導された。これらにはIGFBP1,VEGF,FGF,TGFなどが含まれ、感染後48時間以降に特に強く発現していた。また、23種のMMPのうちMMP 1,7,10,14が非感染細胞と比較して48時間以降に強く(2倍以上)発現していた。以上の成績からRSV感染は、気道のリモデリングに関与する遺伝子群を発現誘導し、気管支喘息の病態に関与している可能性が示唆された。

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
斎藤博久 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

一つとして重要である。今回、RSV感染の気道リモデリングとの関連性を検討する目的で、RSV感染が、気道上皮細胞(A549)において発現誘導する気道リモデリング関連分子の遺伝子群を、Gene Chip(Affymetrix)を用いて網羅的に解析を行った。

A. 研究目的

気道ウイルス感染が喘息発症の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。疫学的研究から、乳幼児期に細気管支炎に罹患した児は、肺機能の低下や呼吸抵抗の増大、気道過敏性の増悪が認められることや、喘鳴が遷延し喘息に移行する報告がある。一方で、近年、小児喘息においてもすでに気道上皮基底膜下肥厚を認め、気道リモデリングの存在を示唆する報告がある。気道ウイルス感染が気道リモデリングに関与する機序は明確ではないが、リモデリング発症機転に関与する環境要因の

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

ヒト気道上皮細胞におけるRSV感染によって、
1) シグナル値100を超えた72種の成長因子のうち約20種が非感染細胞と比較して強く(2倍以上)発現誘導された。これらにはIGFBP1,VEGF,FGF,TGFなどが含まれ、感

染後 48 時間以降に特に強く発現していた (Fig. 1)。2) 同様に、23 種の MMP のうち MMP 1,7,10,14 が非感染細胞と比較して 48 時間以降に強く (2倍以上) 発現していた (Fig. 2)。

D. 考察

今回、RSV 感染は、気道上皮細胞において成長因子や MMP の気道リモデリング関連分子を発現誘導することを確認した。気管支喘息における気道リモデリングは、傷害された気道組織の修復反応であるが、しばしば喘息に不利な影響を及ぼす。リモデリングの形成過程においては、IGF,FGF,TGF,VEGF などの成長因子が線維芽細胞,筋線維芽細胞,平滑筋細胞の増殖・分化や血管形成に作用している。また、MMP は基底膜下組織の線維化に関連する重要な酵素である。今回の結果より、RSV 感染が気道リモデリングに関与する機序のひとつとして、気道上皮細胞傷害を介するリモデリング関連分子への作用が考えられた。今後は、この結果が RSV 感染に特異的かどうか、可逆あるいは非可逆的反応かどうかなどを含めて検討していく必要がある。

E. 結論

気道上皮細胞における気道ウイルス (RSV) 感染は、気道リモデリングの発症および増悪因子として重要な環境要因である可能性が示唆された。

F. 発表

論文発表

Yumi Yamada, Shigemi Yoshihara, Osamu Arisaka: Creola Bodies in wheezing infants predict the development of asthma. *Pediatr .Allergy Immu.* 15:159-162, 2004.

Yoshihara S, Morimoto H, Yamada Y, Abe T, Arisaka O: Cannabinoid receptor agonists inhibit sensory nerves activation in guinea-pig airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 170: 941-946, 2004.

吉原重美, 有阪 治: 気管支喘息と自律神経. *小児内科* 36: 535-540, 2004.

吉原重美, 山田裕美, 有阪 治: RS ウイルスによ

る喘鳴と乳児喘息. *カレントセラピー*, 23:363-368, 2005.

学会発表

Y Yamada, K Matsumoto, N Hashimoto, M Saikusa, A Kato, T Homma, H Saito, S Yoshihara, O Arisaka :Comprehensive Analysis of mRNA Expression Profiles in Human Respiratory Epithelial Cells after Inoculation with Respiratory Syncytial Virus. The 60th American Academy of Allergy Asthma and Immunology annual meeting, San Francisco, March, 2004.

Yamada Y, Yoshihara S, Arisaka O: Association of epithelial damage and local neutrophil mobilization in the airways during acute exacerbations of childhood asthma. The 6th Asia Pacific congress of Allergology and Clinical Immunology, Tokyo, October, 2004

吉原重美: 会長講演『私の学んだ小児気管支喘息の基礎-臨床-教育』. 第 21 回日本小児難治喘息アレルギー疾患学会, 宇都宮, 6 月, 2004.

山田裕美, 松本健治, 加藤 厚, 本間俊樹, 齋藤博久, 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解析-気道リモデリング関連分子の検討. 第 16 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 群馬, 5 月, 2004

山田裕美, 吉原重美, 有阪 治: 乳児喘息の病態-痰からのアプローチを中心に-. シンポジウム「乳児喘息の発症、診断および治療」, 第 21 回日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会, 宇都宮, 6 月, 2004.

Gene description	Fold change*	
	48hr	96hr
IGFBP1	22.1	2.1
VEGF	13.8	2.2
EGF	7.5	2
FGF	3.1	2
TGF- β 2	1.2	2.9

Fig. 1 RSV-inducible growth factor genes

*the expression levels in RSV-exposed cells compared to UV-RSV exposed cells.

Gene description	Fold change*	
	48hr	96hr
MMP-10 (Stromelysin2)	29.4	30.3
MMP-7 (Matrilysin)	2.0	4.2
MMP-14 (MT1-MMP)	4.1	7.1
MMP-1 (Collagenase 1)	125.4	49.7

Fig. 2 RSV-inducible MMP genes

*the expression levels in RSV-exposed cells compared to UV-RSV exposed cells.