
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

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森川 昭廣

平成18(2006)年3月

厚生労働省

目次

I. 総括研究報告書

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

主任研究者

群馬大学医学部小児生体防御学教授 森川 昭廣 1

II. 分担研究報告書

1) 乳児期におけるアレルギー性疾患の予知

母胎因子、新生児期皮膚バリア機能、臍帯血サイトカインによる

-乳児期のアレルギー性疾患についての前方視的検討-

分担研究者

群馬大学医学部小児生体防御学教授 森川 昭廣..... 5

2) RSウイルス感染がアレルギー発症に及ぼす影響および

-臍帯血を用いたアレルギー疾患の予知・予防法の確立-

分担研究者

岐阜大学医学部小児病態学教授 近藤 直実 9

3) 胎外因子としてのウイルス二重鎖RNA

-既存のアレルギー性炎症に及ぼす影響の in vivo での検討-

分担研究者

帝京大学医学部内科教授 大田 健 13

4) 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

分担研究者

昭和大学第一内科教授 足立 満 18

5) 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

千葉大学医学部小児病態学教授 河野 陽一 21

6) アレルギー疾患の発症に関する疫学的検討

分担研究者

国立病院機構 福岡病院診療部長 小田嶋 博 24

7) 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

群馬大学医学部小児生体防御学助教授 徳山 研一 27

8) 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

-Th1およびTh2サイトカイン存在下における検討-

分担研究者

獨協医科大学小児科助教授 吉原 重美 32

9) 正常ヒト肺線維芽細胞におけるEotaxin発現に対する

-デキサメサゾンの影響とその分子メカニズムの検討-

分担研究者

群馬大学医学部小児生体防御学講師 荒川 浩一 36

10) 周産期に起因する呼吸障害と乳児喘息

分担研究者

自治医科大学小児科 助教授 本間 洋子..... 41

III. 研究成果の刊行に関する一覧表..... 46

平成17年度 厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患など予防・治療研究事業
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

主任研究者 森川昭廣 群馬大学大学院小児生体防御学教授

研究要旨：

アレルギー疾患は、遺伝的要因と環境的要因（胎内・胎外因子）が複雑に絡み合っただけで発症していくと考えられている。近年、日本を含む世界各国においてアレルギー疾患患者の増加が報告され、胎内・胎外因子、および遺伝的要因との係わりが変化してきたことが考えられる。本研究は、アレルギー疾患（特に、気管支喘息）に係わる胎内・胎外因子の同定、特に感染因子を中心とした研究を行い、喘息の発症および増悪の阻止について寄与することを目的とする。本年度は以下の結果を得た。

1) 胎内因子

妊娠中および出生後早期の感染は、その後のアレルギー疾患発症と関連することが報告されている。今回、絨毛膜炎陽性の未熟児においては、臍帯血中の炎症性サイトカインが上昇し、乳児慢性肺疾患となり乳児反復性喘息の発症との関連が示唆された。乳児AD発症群では、出生コホート研究より母体感染との関連は認めなかった。

胎内因子として、乳児アトピー性皮膚炎発症に関わる諸因子の解明を検討する目的で出生コホート調査を行った。母体感染との関連は認めず、皮膚生理機能検査では、生後1ヶ月では、乳児AD発症群では非発症群と比較して有意差を認めたことより、皮膚生理機能における胎内から胎外環境への適応障害などの関与が想定された。一方、IL-7 や MIP-1 β は、T細胞分化やTh1タイプの免疫系の確立に関与することから、アトピー性皮膚炎発症において免疫応答の減弱が疑われた。乳児湿疹とAD発症群では、臍帯血サイトカインプロファイルが異なり、発症機序の違いが想定された。臍帯血サイトカインや皮膚生理機能はAD発症の予知因子となる可能性が示唆された。

母体 ureaplasma 感染は、新生児慢性肺疾患、さらに乳児期の反復性喘鳴と関連がみられた。遺伝的要因として、RSウイルス感染による喘鳴や感染後の喘鳴発症に CD14、IFN- γ 、IL-13 の遺伝子多型が関連している可能性が示唆された。

2) 胎外因子

出生後の感染と喘鳴発症との関係では、ウイルス感染により自然免疫系、特に TLR3 が活性化により、サイトカインが産生され炎症が進展することを明らかにした。喘鳴を呈する群では、獲得免疫系の Th1 系が抑制され、その結果 Th2 系が相対的に優位となり、喘鳴の発症誘導や増悪が進むものと考えられた。また、個体側の因子（胎内因子）として、Th1 サイトカインである IFN- γ 受容体 1 の遺伝子変異の関与が想定された。Th1 優位な環境では、Gene chip を用いた網羅的検討により、RSV 感染により、気管支喘息の病態と関連するようなサイトカインや接着分子の発現が減弱していた。さらに、RSV は抗原提示細胞からの IL-10 産生を誘導して IL-12 産生を抑制し、 $\gamma\delta$ T 細胞からの IFN- γ 産生を抑制することから、細気管支炎の発症、また細気管支炎後の反復性喘鳴に関与する可能性が示唆された。

本研究では、アレルギー疾患である気管支喘息の発症増悪要因を、環境因子である感染に焦点をあて胎内、胎外因子の視点から解析した。今後、明らかにされた因子を、更に詳しく検討して行くことにより、これらの因子に対して介入（除去・予防）した場合の効果を検討することも重要な課題である。

研究分担者

足立 満 (昭和大学医学部第一内科教授)
荒川浩一 (群馬大学大学院小児生体防御学講師)
大田 健 (帝京大学医学部内科教授)
小田嶋博 (国立療養所南福岡病院 診療部長)
河野陽一 (千葉大学医学部小児科教授)
近藤直実 (岐阜大学医学部小児病態学教授)
本間洋子 (自治医大小児科助教授)
徳山研一 (群馬大学大学院小児生体防御学助教授)
吉原重美 (獨協医科大学小児科助教授)
(アイウエオ順)

A. 研究目的

気管支喘息の発症は、生体側の感受性である胎内因子と環境要因である胎外因子が複雑に絡み合っただけで起こると考えられている。感受性のある個体が、環境因子の暴露を受けると、免疫学的機序を介して、気道炎症がおこり、さらに異常な修復過程により病理組織学的な変化であるリモデリングが起こるために、気道閉塞が早期に起こり気道過敏性が獲得されると想定されている。最近、小児気管支喘息発症率の上昇、低年齢化、緩解の遷延化が社会的問題となっている。気管支喘息は、60%以上が3歳未満の小児期早期に発症し、その

時期に症状が継続し重症であると、思春期や成人となってもout-growせず持ち越してしまうと考えられている。これらのことから、発症の危険性が高いと考えられる小児に対する発症予防と、既に発症してしまった患者に対する喘息治療の早期介入の重要性が叫ばれている。

環境因子の中で、感染は、気管支喘息の発症や増悪に非常に重要な役割を果たしていると考えられている。特に、RSウイルス(RSV)は、生後数年の間に、ほとんどの乳幼児が罹患するが、一部においては喘鳴を有する下気道感染を生じる。Martinezらの出生コホート研究では、58.5%が少なくとも一度は下気道感染となり、原因が明らかとなったもののうち44%がRSV感染であった。さらに、RSVによる下気道感染となった児は、6歳までは、4.3倍喘鳴が起こりやすかったと報告している。しかし、これらが、本当の喘息に移行するかは明らかとなっていない。未熟児、特に慢性肺疾患を持つ児においては、RSV感染は重症化することが多く、また反復性喘鳴を呈することも多い。気管支喘息の増加を鑑み、それに係わる胎内・胎外因子を同定していくことは、一次予防、二次予防にむけての非常に重要な課題であり、本研究を行う目的とした。

B. 研究の方法

(1) アレルギー疾患発症における胎内因子の影響

本研究において、胎内因子がその後のアレルギー疾患に影響を及ぼすかを検討する目的で、3つのプロジェクトが行われた。

1) 九州地区、関東地区、東北地区において共通の問診表を用い、1歳と2歳児の患者を持つ母親を中心に大規模な疫学調査を行い、アレルギー疾患の発症要因を検討した(小田嶋)。

2) Ureaplasmaなどによる胎内感染の指標として臍帯血のサイトカインを測定し、生後のCLD発症との関連性を検討した(本間)。

3) 乳児期アトピー性皮膚炎(AD)発症に関わる因子を解明する目的で、臍帯血サイトカイン、皮膚生理機能の測定(森川)、臍帯血中のIgE、フローサイトメーターによる表面マーカー、細胞内サイトカイン、臍帯血リンパ球のPHA刺激培養上清のサイトカインの測定を行ない、出生コホート調査を行った(岐阜)。

(2) アレルギー疾患発症における胎内因子と胎外因子の相互作用

1) RSVに対する自然免疫応答に重要な役割を果たすと考えられるCD14の遺伝子多型と、RSV細菌気管支炎の発症および罹患後の反復性喘鳴の関係を検討した(下条)。

2) 呼吸器感染時のRSV抗原陽性、陰性の乳幼児を対象に、喘鳴の発現の有無、アトピーの有無な

どで群分けを行い、感染急性期・回復期のToll like receptor (TLR)の発現、Th1・Th2系サイトカインの産生、アラキドン酸カスケードの検索、遺伝子検索を行った(近藤)。

3) IL-17Fの遺伝子多型と気管支喘息の関連について検討を行った(国分)

(3) アレルギー疾患増悪における胎外因子の影響

1) 気道上皮細胞培養系に対し、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行った。さらにその機序を自然免疫との関係で検討した(国分)。

2) ウイルス成分のひとつであるPolyI:Cが、アレルギー性気道炎症を増悪させるかどうかを、喘息モデルマウスを用いて検討した(太田)。

3) Th1またはTh2サイトカインを添加し培養したヒト気道上皮細胞において、RSV感染が誘導する遺伝子発現を網羅的に解析し比較検討した(吉原)。

4) 正常ヒト肺線維芽細胞におけるデキサメサゾンによるEotaxin発現への影響とその分子メカニズムについて検討した(荒川)。

5) 小児期発症と成人発症喘息モデルマウスの気管支肺胞洗浄液中の各種サイトカインの経時的変動を測定し、成熟度の違いとその役割を検討した(徳山)。

C. 結果

1) アレルギー疾患発症における胎内因子の影響

1) 出生時の体重に関しては、1歳時点でアレルギーあり群は、なし群と比較して有意に重かったが、2歳児では有意差は消失した。家族歴のある者でのアレルギー疾患発症率は1歳で31.6%、2歳では75.3%とその傾向が顕著となった。

2) 感染型と非感染型CLDの間で、IL-8(p=0.02)、IL-6(p=0.03)で有意差がみられた。また、絨毛膜羊膜炎(CAM)+群は、CAM(-)群と比較してIL-8は有意に高値であった。

3) 妊娠中のウイルス・細菌感染症の有無と、1歳までの乳児AD発症との関連は認めなかった。AD発症群では、生後1ヶ月での顔面の皮膚生理機能検査値は有意に高く、臍帯血中IL-7、MIP-1bは有意に低値を示した。家族歴では、母親のAD既往と有意な関連を認めた。出生時、生後6ヶ月時のTh1、Th2、Tc1、Tc2の陽性率はともに、アレルギーの家族歴の有無や6ヶ月時のADの有無で現在のところ差を認めていない。出生時のCD4+CD25+細胞の割合は6ヶ月にADを持つ群と持たない群で有意な差を認めなかった。

2) アレルギー疾患発症における胎外因子の影響

1) $\gamma\delta$ T細胞リガンドであるIPP刺激による末梢血 $\gamma\delta$ T細胞からのIFN- γ 産生は、RSVの存在下で抑制され、この抑制は抗IL-10抗体の添加お

よび IL-12 の添加により解除された。

2) TLR3 と TLR9 は、感染の急性期に発現が認められた。RSV 感染により喘鳴が誘発された患児では、PHA、IL-12 あるいは IL-18 で刺激された PBMCs からの IFN- γ の産生は、急性期には有意に低下し、回復期に回復していた。また、IL-13、IFN- γ 受容体 1 の遺伝子変異が認められた。

3) アレルギー疾患増悪における胎外因子の影響
1) 培養気道上皮細胞に対し dsRNA 刺激を実施したところ MIP-1 α 、RANTES、IP-10、MCP-1、SR-PSOX、IL-1R antagonist などの発現がみられた。その細胞内情報伝達は TLR3 を介し NF- κ b、IRF の関与が確認された。

2) アレルギー炎症に poly I:C の追加投与により気管支肺胞洗浄液において、OVA 単独チャレンジと比較して、好酸球、リンパ球、マクロファージが有意に増加し、気道過敏性も有意に亢進した。また、気道周囲の炎症細胞浸潤が増強し、TUNEL 陽性のアポトーシス細胞も増加した。

3) IFN- γ 添加後の RSV 感染細胞と比較して、IL-4 添加後の RSV 感染では、RANTES、CCL20 (LARC)、CXCR4、ICAM-1、VEGF、MMP 1、MMP 10、IL-1 β などの発現が増強していた。

4) 肺線維芽細胞において、DEX は、IL-4 刺激による Eotaxin 蛋白質および mRNA 産生を添加後 12、24 時間では抑制したが、48、72 時間後では反対に増強した。CHX、ACD の添加により Eotaxin mRNA の産生は抑制され、プロモーターアッセイでは、DEX の添加により活性が濃度依存性に抑制され早期の抑制との関連が示唆された。

5) 幼若および成熟マウスでは IL-4 は、1、2 週で有意に高値を示した。4、8 週では有意な増加は認められなくなった。一方、幼若マウスでは 1、2 週において IL-2 も有意に増加していた。

D. 考察

妊娠中および出生後早期の感染は、その後のアレルギー疾患発症と関連することが報告されている。今回の検討では、絨毛膜炎陽性の未熟児においては、臍帯血中の炎症性サイトカインが上昇し、乳児慢性肺疾患となり乳児反復性喘息の発症との関連が示唆された。乳児 AD 発症群では、出生コホート研究より母体感染との関連は認めなかったことより、アレルギー疾患の種類により感染との係わりが異なる可能性が示唆された。

出生後の感染との係わりでは、特に RSV 感染では、自然免疫、特に TLR3 が活性化され、ついで獲得免疫系が作動していくが、獲得免疫系の Th1 系が抑制され、その結果 Th2 系が相対的に優位となり、ひいては炎症性細胞でのアラキドン酸カスケードが作動し、アレルギーや喘鳴の発症誘導や増悪が進むものと考えられた。また、個体側の因子(胎内因子)として、Th1 サイトカインである IFN-

γ 受容体 1 の遺伝子変異の関与が想定された。これに関しては、*in vitro* における実験系においても示唆された。すなわち、Th2 優位では、RSV 感染により、Gene chip を用いた網羅的検討により、気管支喘息の病態と関連するようなサイトカインや接着分子の発現が増強していた。さらに、RSV は抗原提示細胞からの IL-10 産生を誘導して IL-12 産生を抑制し、 γ δ T 細胞からの IFN- γ 産生を抑制することから、細気管支炎の発症、また細気管支炎後の反復性喘鳴に関与する可能性が示唆された。

細気管支炎発症に関しては、RSV の受容体である CD14C(-550)T 多型において、T アリルは RSV 細気管支炎発症に対して予防的な遺伝素因である可能性があると考えられた。

In vitro および *in vivo* のウイルス感染モデルにおいては、種々のサイトカイン、ケモカインの産生が確認され、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および気道過敏性亢進へと結びつくことが想定された。また、アレルギー炎症の進展において、動物の成熟度により炎症の進展やサイトカイン産生に差異がみられたことにより、喘息発症時期でのアレルギー炎症や感染への曝露が喘息発症との係わりを示唆する可能性もある。一方、感染時には、ステロイドの全身投与により喘息増悪を治療することが推奨されているが、生体との係わりにおいて、ステロイドは 2 面性の効果を示すことが示唆されたため、注意を要する必要があると思われた。

感染以外のアレルギー疾患に係わる胎内、胎外因子では、乳児 AD の発症において、皮膚生理機能における胎内から胎外環境への適応障害が想定され、また、T 細胞分化や Th1 タイプの免疫系の確立に関与する IL-7 や MIP-1 β が低値を示したことより、AD 発症において免疫応答の減弱が関与していることが疑われた。

さらに、胎外因子は 1 歳では明らかでないものが 2 歳では関連をもってくる。また逆に胎内因子は 2 歳では 1 歳よりも影響が減ってくる可能性が示唆された。また、これらは、アレルギー疾患の種類によってその影響が異なることも推定された。

E: 結論

胎内・胎外因子として、感染と生体との係わりが重要であることが示唆された。妊娠中での感染曝露に関しては、その後の気管支喘息発症との関連は確認できなかったが、出生後においては、個体の感受性として、自然免疫の発現や獲得免疫として Th1/Th2 バランスの変異が、さらには、それを規定する遺伝子レベルの多型性が、反復性喘鳴あ

るいは気管支喘息の発症を規定していく可能性が示唆された。

また、乳児AD発症においては、皮膚の胎外環境への適応や免疫応答の未熟成が関与する可能性が示唆された。今後、これらの検討に基づき、喘息発症や増悪の予防にむけた保健指導を行っていただける可能性が考えられた。

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

川本典生

大木康史
黛 博雄
野間 剛
大柴晃洋
森川 みき
本村知華子
川野 豊
手塚純一郎
渡辺美砂
佐伯敏秋

岐阜大学大学院医学研究科

小児病態学 医員
群馬大学医学部小児科助手
伊勢崎市民病院小児科医長
北里大学小児科講師
東京医科歯科大学小児科
J R 仙台病院小児科医長
国立療養所南福岡病院小児科
横浜赤十字病院小児科部長
国立療養所南福岡病院小児科
東邦大学医学部小児科委員
北里大学小児科

研究協力者

杉山幹雄 群馬大学大学院小児科生体防御学

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

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

大木丈弘 自治医科大学大学院生

矢田ゆかり 自治医科大学小児科助手

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

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

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

鈴木僚子 群馬大学小児生体防御学

青木美奈子 岐阜大学大学院医学研究科
小児病態学 助手

金子英雄 岐阜大学大学院医学研究科
小児病態学 講師

松井永子 岐阜大学大学院医学研究科
小児病態学 併任講師

平成17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：乳児期におけるアレルギー性疾患の予知

：母胎因子、新生児期皮膚バリア機能、臍帯血サイトカインによる
乳児期のアレルギー性疾患についての前方視的検討

分担研究者 森川昭廣 群馬大学大学院小児生体防御学教授

研究要旨：一施設で1年間に出生した健康新生児群 269 名について、乳児期のアトピー性皮膚炎、喘鳴性疾患、食物アレルギーの発症を、生後1年経過後にアンケート調査した。これらの結果と、父母のアレルギー性疾患の家族歴、在胎期間中の母体感染症、早期新生児期および1ヶ月健診時の皮膚バリア機能、臍帯血サイトカイン・ケモカインとの関連を検討した。家族歴、母体感染症と、児のアレルギー性疾患との間に関連は認められなかった。アトピー性皮膚炎発症児においては、1ヶ月健診児の、頬部の表面水分量、角質膜厚は、それぞれ有意に低値、高値であり、また、臍帯血 IL-7、MIP-1 β が有意に低値であった。これらが、乳児期のアトピー性皮膚炎発症の予知因子となる可能性があると考えられた。

研究分担者

杉山幹雄 群馬大学大学院小児科生体防御学
荒川浩一 群馬大学大学院小児科生体防御学

A. 研究目的

近年、小児アレルギー疾患は増加している。アレルギーマーチは、ある一定の傾向をもってアレルギー症状が次々に現れてくることで、乳児アトピー性皮膚炎 (AD) や食物アレルギーを発症した乳児が、その後に喘息様気管支炎や気管支喘息、さらにアレルギー性鼻炎を発症していくということを示している。アレルギー性疾患の早期診断・介入は、各疾患の予後、患者のQOL改善、アレルギーマーチへの対策などの点から重要である。乳児期のアトピー性皮膚炎、喘鳴性疾患、食物アレルギーの発症が、早期新生児期および生後約1ヶ月時の皮膚バリア機能、アレルギー性疾患の家族歴、母胎感染症などの胎内環境、臍帯血サイトカイン・ケモカインと関連するのかを、一施設で1年間に出生した健康新生児群について前方視的に検討した。さらに、乳児湿疹との比較を行った。

B. 研究方法

対象は、開業産婦人科一施設で、2002年6月から2003年5月までに出生した健康新生児 297 名中、協力の同意が得られた 269 名である。性別は、男児 140 名、女児 129 名で、平均在胎週数 39.2 \pm 1.6 週、平均出生体重 3051 \pm 399 g であった。新生児仮死、新生児高ビリルビン血症などの病的新生児は、除外した。

家族歴に関しては、対象児の父または母全員に対し、アレルギー性鼻炎、小児期のアトピー性皮膚炎・気管支喘息・食物アレルギーの有無について、アンケート用紙および問診による家族歴調査を、出産時の医院滞在期間中に実施した。

胎内環境に関しては、同院の母体カルテの記載に基づいて、妊婦健診フォロー中の感染症罹患の有無 (上気道炎、胃腸炎、子宮付属気炎、尿路感染症、B群溶血性連鎖球菌・クラミジア検査陽性) を調査した。

皮膚バリア機能に関しては、角質膜厚水分量計 (アサヒバイオメド社製 ASA-M1) を使用して、表面水分量、角質膜厚を測定した。皮膚バリア機能の指標としては、従来、高周波交流を用いたインピーダンス法により、経皮水分喪失量を測定する方法が広く用いられてきた。今回使用した角質膜厚水分量計は、高周波交流に加えて、低周波交流を使用し表面水分量が測定可能であり、角質膜厚も近似により測定可能である。

出産時の産科滞在時期 (経膈分娩の場合は日齢 0 から 6 まで、帝王切開出生児の場合は日齢 8 まで)、毎日小児科回診を実施し、また、生後約1ヶ月に同院で行われる1ヶ月健診時とあわせて測定を行った。測定は、湿度温度一定の新生児室で、児が啼泣していないときにに行い、測定部位は、前額、頬部、前腕屈側、前胸部について行った。

出生時に採血された臍帯血中のサイトカインは、血清分離・凍結保存のうえ、バイオプレックスにより 17 種のサイトカイン、ケモカインを測

定した。

乳児期のアレルギー疾患の発症に関しては、出生1年経過後に、質問表を郵送し、返信ハガキに記入する方式で行った。回答が無かった家庭には、直接電話して回答を求めた。医師によりアトピー性皮膚炎と診断されている者を、アトピー性皮膚炎発症と判定した。

喘鳴性疾患については、喘鳴を2回以上反復したものの、医師から喘息または喘息様気管支炎であるとの診断を受けたものを、喘鳴性疾患発症と判定した。

C. 研究結果

アンケート回答が得られたのは269名中214名で、回収率は79.5%であった。

1) アレルギー性疾患の発症率

医師の診断によるアトピー性皮膚炎の発症は、27名(19.7%)、喘鳴性疾患が35名(16.4%)、食物アレルギーが15名(7%)であった。一方、1ヶ月健診時に乳児湿疹を認めたものは26名であった。

2) 家族歴との関連について

父、母のアトピー性皮膚炎、気管支喘息、季節性アレルギー性鼻炎(以下花粉症)の有病者は、それぞれ父では、12名、9名、63名で、母では12名、10名、55名であった。父母のアレルギー家族歴では、母親のAD既往と有意な関連を認めた。

表1 アトピー性皮膚炎と乳児湿疹発症の危険因子の比較

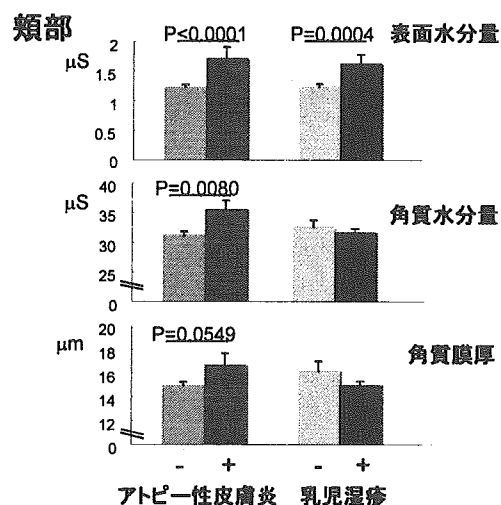
	Atopic dermatitis		P value	Infantile eczema		P value
	+	-		+	-	
乳児湿疹	n=27 (%)	n=186 (%)		n=26 (%)	n=187 (%)	
母親の年齢	27.7±3.0	28.2±4.3	0.534	27.7±3.8	28.2±4.2	0.551
母乳	14 (51.9)	102 (54.8)	0.771	13 (50)	103 (55.1)	0.626
父親アレルギー						
湿疹	2 (7.4)	10 (5.4)	0.669	2 (7.7)	10 (5.3)	0.627
喘息	1 (3.7)	8 (4.3)	0.885	2 (7.7)	7 (3.7)	0.348
花粉症	2 (7.4)	61 (32.8)	0.007	8 (30.8)	55 (29.4)	0.887
母アレルギー						
湿疹	4 (14.8)	8 (4.3)	0.027	3 (11.5)	9 (4.8)	0.163
喘息	1 (3.7)	9 (4.8)	0.794	1 (3.8)	9 (4.8)	0.827
花粉症	6 (22.2)	49 (26.3)	0.647	6 (23.1)	49 (26.2)	0.733
妊娠中感染						
細菌 ¹⁾	5 (18.5)	22 (11.8)	0.135	2 (7.7)	22 (11.8)	0.549
ウイルス ²⁾	11 (40.7)	81 (43.5)	0.783	15 (57.7)	77 (41.2)	0.1111

3) 胎内環境との関連について

母体の感染症の有無は、ウイルス性感染症(上気道炎、胃腸炎)71名、クラミジア陽性者9名、B群溶連菌7名、尿路感染症6名であった。母体のウイルス性感染症(上気道炎、胃腸炎)、細菌感染症(B群溶連菌またはクラミジアに対する治療、尿路感染症)と、出生後のアトピー性皮膚炎について、それぞれ関連を検討した。在胎期間中の感染症と、発症の有無の関連は認められなかった。

4) 皮膚バリア機能との関連について

頬部や額部の表面水分量は、AD発症群が非発症群と比較し、生後1ヶ月時の値では、有意に高くなっていた。また、角質膜厚も、生後1ヶ月ではAD発症群では有意に高かった。一方、胸部や前腕皮膚の水分量との関連は認めなかった。

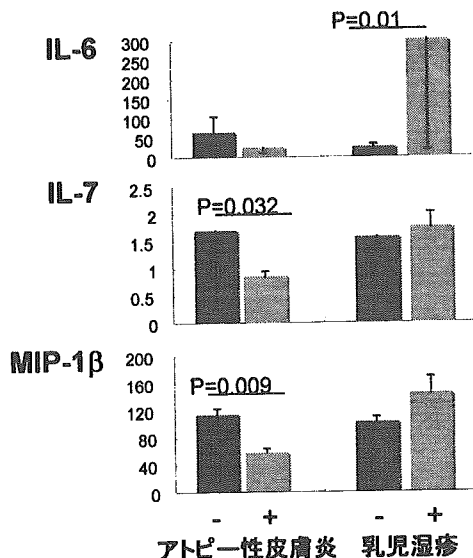


5) 臍帯血サイトカインとの関連について

AD発症群では、非発症群と比較し臍帯血中IL-7、MIP-1βは有意に低値を示した。

6) 乳児湿疹群

1ヶ月健診で乳児湿疹(医師が診断)を認めたのは26名で、その後ADを発症した児は6名であった。乳児湿疹群では、この群では、頬部の表面水分量のみ有意に高い値を示した。臍帯血中のIL-6は有意に高く、MIP-1βは高い傾向を示した。



D. 考察

乳児期の、アトピー性皮膚炎、喘鳴性疾患、食物アレルギーの発症率、および家族歴との相関に関しては、従来の報告と、ほぼ同水準にあり、今回の調査対象で母集団とした新生児群が、特に変異のないものであると考えられる。

母胎環境に関しては、在胎中の母胎感染症が、幼児期も含めた喘鳴性疾患発症と関連することが知られている。今回我々が、1施設で約1年間に出生した健康新生児について、乳児期の喘鳴性疾患について前方視的に検討した結果では、この傾向は認められなかった。対象とした児は、今後、加齢とともにアレルギー性疾患を新たに発症するかどうかについて、追跡を続ける必要がある。

皮膚バリア機能に関しては、従来、経皮水分喪失量が、その指標として汎用されてきた。また、経皮水分喪失量の増大が、皮膚の乾燥、炎症の惹起につながり、アトピー性皮膚炎の発症・増悪因子となることが知られている。我々の検討で、経皮水分喪失量は、表面水分量と良く相関することを、すでに報告した。今回、健康新生児について広範な測定を行った結果、アトピー性皮膚炎を乳児期に発症した児の群では、非発症群に比べ、表面水分量が、早期新生児期には差が認められないが、1ヶ月健診時には、有意差を以って高値であることが確認された。このことより、乳児アトピー性皮膚炎を発症した児では、皮膚バリア機能は、出生直後には変化を認めないが、生後約1ヶ月の時点では、すでに低下が始まっている可能性が考えられる。

アトピー性皮膚炎発症機序のひとつに、Th 1系、

Th 2系サイトカイン分泌不均衡があげられている。臍帯血中のサイトカイン値と、出生後のアトピー性皮膚炎発症については、これまでの検討が少ない。われわれの今回の検討では、IL-7、MIP-1βという異なる系列の値が、アトピー性皮膚炎発症群で、ともに有意に低値であった。このことは、アトピー性皮膚炎発症機序が、サイトカインの作用のみで、すべてを明確に説明することが、容易でないことを示唆していると思われる。これら、有意に低値を示したサイトカインについて、in vitroにおける知見と、調査対象のアトピー性皮膚炎発症の今後の消長をさらに追跡することが必要と考えられる。

E. 結論

1施設で出生した健康新生児 269名の、乳児期におけるアレルギー性疾患の発症率は、追跡調査が可能であった 214名中、アトピー性皮膚炎が 42名 (19.7%)、喘鳴性疾患が 35名 (16.4%)、食物アレルギーが 15名 (7%)であった。

父、母のアトピー性皮膚炎、気管支喘息、季節性アレルギー性鼻炎と、児のアトピー性皮膚炎、喘鳴性疾患の発症の有無については、有意な相関は認めなかった。

在胎期間中の母胎感染症と、乳児期のアトピー性皮膚炎、喘鳴性疾患の発症について、それぞれ、有意な相関は、認められなかった。

皮膚バリア機能に関しては、アトピー性皮膚炎発症群の方が、非発症群より、生後約1ヶ月時の、頬部の表面水分量が有意に多く、角質膜が有意に薄かった。

臍帯血サイトカイン値に関しては、アトピー性皮膚炎発症群が、非発症群より、IL-7、MIP-1βが、ともに有意に低値であった。

以上より、乳児期のアトピー性皮膚炎発症に関して、アレルギー疾患の家族歴、母胎感染症は、予測因子となる可能性は低く、生後約1ヶ月児の皮膚バリア機能と、臍帯血の IL-7、MIP-1βは、予測因子になる可能性が示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki M, Arakawa H, Kobayashi Y, Tamura K, Mochizuki H, Tokuyama K, Tamari M, Mao X-Q, Shirakawa T, Izuhara K, Morikawa A. Stat6 Variants in child and adult asthma. *Allergology International*, 53:241-244, 2004.

- 2) Suzuki M, Arakawa H, Tamura K, Takizawa T, Mochizuki H, Tokuyama K, Tamari M, Mao X-Q, Shirakawa T, Morikawa A. Dinucleotide repeat polymorphisms in the Signal transducers and activators of transcription 6 (Stat6) gene in allergic diseases. *Allergology International*, 53:235-240, 2004.
- 3) Arakawa H, Morikawa A. The genetics of pollinosis. *Clin Exp Allergy, Reviews*, 4:3-7, 2004.
- 4) 望月博之、森川昭廣；小児呼吸器疾患の主要症状と最近の考え方(総説) *小児科臨床* 57 巻 8 号 Page1755-1763(2004. 08)
- 5) 望月博之、森川昭廣；小児の慢性咳嗽の診断と治療(総説) *日本小児科学会雑誌* 108 巻 7 号 Page956-964(2004. 07)
- 6) 望月博之、森川昭廣；小児の気道過敏性とウイルス感染(総説) *日本小児アレルギー学会誌*(0914-2649)18 巻 1 号 25-31(2004. 03)
- 7) 望月博之、森川昭廣；呼吸器感染症に対する鎮咳・去痰薬の使用法 *小児内科*、36 巻 1 号 68-73(2004. 01)
- 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

研究課題名：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

分担課題名：RS ウイルス感染がアレルギー発症に及ぼす影響および

臍帯血を用いたアレルギー疾患の予知・予防法の確立

分担研究者 近藤 直実 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学・教授

研究要旨 アレルギー疾患の発症には、遺伝的要因と環境要因が相互に影響し合っていると考えられている。ウイルス感染が免疫系に及ぼす影響を検討し、アレルギー発症の誘導や増悪への関わりを分子生物学的に解析した。また、これらの影響の背景を探る目的で臍帯血と生後6ヶ月の免疫の変化を調査した。特にRSウイルス感染時に喘鳴を来した群では、急性期にTh1が低く、また、この群に喘息関連遺伝子の一部に変異が認められた。RSウイルス感染に対する免疫系の反応が遺伝的背景などにより個体ごとに異なり、その遺伝的因子にRSウイルス感染という環境要因が影響して喘鳴などの症状を惹起する事が示唆された。さらに、臍帯血での免疫バランスがその後のアレルギー発症にも影響する可能性も示唆された。

研究協力者

青木美奈子	岐阜大学医学部付属病院 小児科 助手
金子英雄	岐阜大学医学部付属病院 小児科 講師
松井永子	岐阜大学大学院医学系研究科 小児病態学 併任講師
川本典生	岐阜大学医学部付属病院 小児科 医員

マーカーの解析を行い、TLR, Th1 および Th2 細胞, 調節性 T 細胞の割合などをフローサイトメーターにより測定した。また、末梢血単核球を刺激・培養し、産生される Th1, Th2 系サイトカインを測定した。尿中のアラキドン酸代謝物質の測定を行った。また、遺伝子検索を行った。

<臍帯血と生後6ヶ月の比較検討>

臍帯血を採取し、生後6ヶ月に医師による診察と採血を行った。血清 IgE を測定し、Th1, Th2, 調節性 T 細胞の割合をフローサイトメーターにより測定した。

(倫理面への配慮)

研究対象者には本研究の内容、方法および予想される結果を十分に説明し理解(インフォームドコンセント)を得た上で採血・採尿が行われた。また倫理面でも、結果による不利益は全く生じないか、または配慮が充分になされることから問題がないと判断された。

A. 研究目的

アレルギー疾患の発症には、遺伝的要因と環境要因が相互に影響し合っていると考えられている。環境要因の一つとして乳幼児期に受けるウイルス感染がアレルギーの発症に大きな影響を与えている事が明らかとなってきた。ウイルス感染が自然免疫系と獲得免疫系とそれら相互に及ぼす影響を検討し、アレルギー発症や増悪への関わりを分子生物学的に解析した。また、胎内因子の検討として臍帯血中のT細胞、サイトカインについても検討を加えた。

B. 研究方法

乳幼児を対象に、呼吸器感染時に、RS ウイルス抗原の検査を行い、RS ウイルス抗原陽性群、陰性群、喘鳴の発現の有無、アトピーの有無などによって群分けを行った。感染急性期・回復期に血液、尿をサンプリングした。血液より細胞内サイトカイン産生細胞と表面

C. 研究結果

(1) RSウイルス感染の急性期および回復期の細胞表面のTLRの発現には差を認めなかった。(2) RSウイルス感染の急性期および回復期のPHA刺激による末梢血単核球からのIFN- γ , IL-4の産生を検討した(図1)。RSウイルス感染時に喘鳴を認めた群においては、回復期のIFN- γ の産生が急性期に比べて有意に高値を示す事がわかった。これに対し、PHA刺激におけるIL-4の産生には有意な差を認めなかった。(3) RSウイルス感染が末梢血中のTh1, Th2細胞のバランスに与える影響の解

h1, Th2細胞のバランスに与える影響の解析を行った。3歳以下のRSウイルス感染患者の急性期において、喘鳴の有無で群分けを行って比較した。Th1, Th2, Th1/Th2比ともに両者の間に有意差を認めなかった。ところが、生後6ヶ月以下の初感染に限って比較を行ったところ、Th2, Th1/Th2比は有意差を認めなかったものの、Th1については、喘鳴群で有意に低い値を示した(図2)。(4) RSウイルス感染の急性期と回復期の尿中ロイコトリエンE4、11-デヒドロトロンボキサンB2濃度を測定し、その変化について検討した。RSウイルス感染急性期では、尿中ロイコトリエンE4、11-デヒドロトロンボキサンB2共に上昇している傾向を認めた。また、11-デヒドロトロンボキサンB2については特に顕著に上昇を認め、RSウイルス感染を認めなかった喘息発作群と比較してもより高値を認めた。(5) ウイルス感染により喘鳴をきたしやすい素因を遺伝子レベルで解明するため、個々の症例の遺伝的要因について検討した。ゲノム上に存在する喘息関連遺伝子の中で、IL-13、IFN- γ 受容体1の遺伝子変異がRSウイルス感染により喘鳴をきたした症例で認められた(表1)。

(6) 臍帯血と生後6ヶ月の血漿中IgEは正の相関関係を認めた(図3)。(7) 生後6ヶ月時にアトピー性皮膚炎と診断された人と認めなかった児について、臍帯血のCD4+CD25+細胞を確認した。CD4+CD25+細胞

(Regulatory T細胞)は、コントロールとアトピー性皮膚炎の間で、有意な差を認めなかった。続いて、生後6ヶ月時にアトピー性皮膚炎と診断された人の、生後6ヶ月時点でのCD4+CD25+細胞を比較したが、優位な差を認めなかった(図4)。CD25はIL-2Raであり、活性化細胞にも発現するとされるが、Regulatory T細胞に特異的に発現するFoxp3を染色したが、これも現時点では有意差を認めなかった。

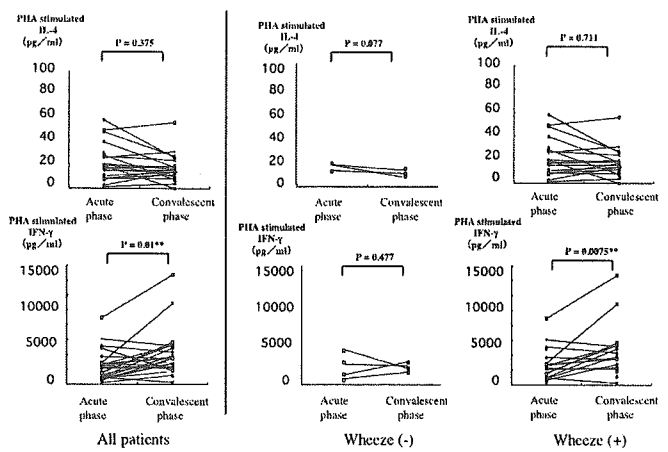


図1 RSウイルス感染時の末梢血単核球分画からのサイトカインの産生

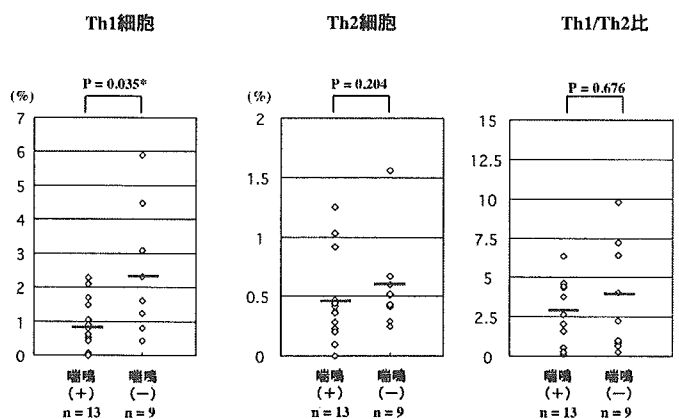
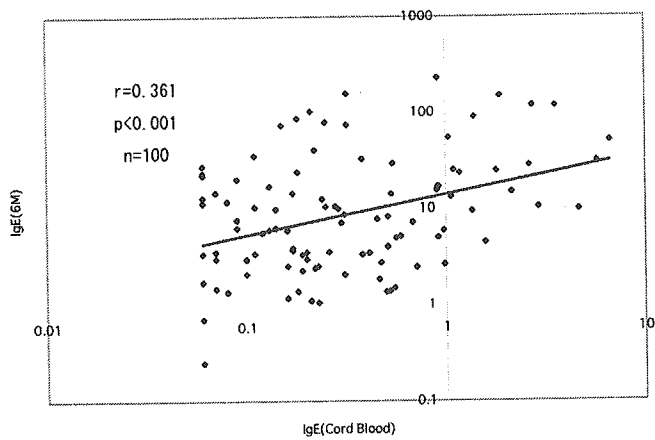


図2 6ヶ月以下のRSウイルス初感染時における末梢血中Th1, Th2細胞の割合

IL-13	Arg 110 Gln G to A	G/G	G/A	A/A	n
RSV(-) wheeze (-)		7 (70%)	3 (30%)	0 (0%)	n=10
RSV(-) wheeze (+)		1 (9%)	9 (81%)	1 (9%)	n=11
RSV(+)	wheeze (-)	2 (50%)	1 (25%)	1 (25%)	n=4
RSV(+)	wheeze (+)	2 (11%)	13 (76%)	2 (11%)	n=17

IFN- γ R1	Leu 467 Pro T to C	T/T	T/C	C/C
RSV(-) wheeze (-)		10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
RSV(-) wheeze (+)		9 (82%)	2 (18%)	0 (0%)
RSV(+)	wheeze (-)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
RSV(+)	wheeze (+)	16 (89%)	2 (11%)	0 (0%)

表1 サイトカインおよびその受容体の遺伝子多型



* 臍帯血はIgAが1mg/dl未満であるもののみ抽出

図3 臍帯血と生後6ヶ月のIgEの相関

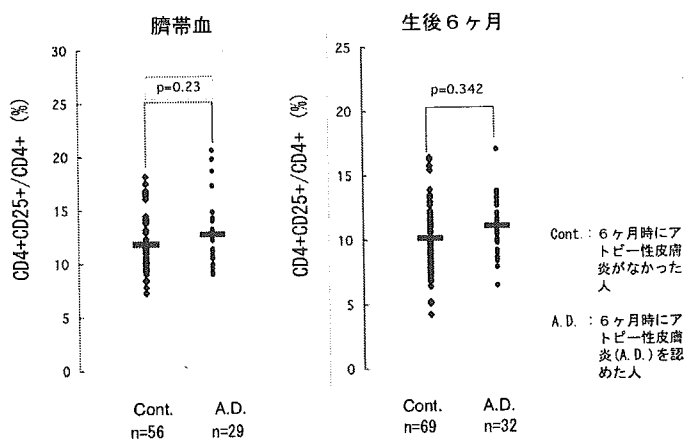


図4 臍帯血と生後6ヶ月の調節性T細胞

D. 考察および結論

RSウイルス感染により自然免疫が活性化され、ついで獲得免疫系が作動する。RSウイルス感染によりある種のTLRが活性化され、ついで獲得免疫系のTh1系が抑制され、その結果Th2系が相対的に優位となりひいては炎症性細胞でのアラキドン酸カスケードが作動し、アレルギーや喘鳴の発症誘導増悪が進むものと考えられた。さらに、これらの反応が引き起こされやすい遺伝的要因の存在が考えられた。

また、アレルギー発症に関わる胎内因子として、今年度は臍帯血のデータを得ている。

臍帯血と生後6ヶ月のTh1, Th2について検討したところ、Th1, Th2については、有意に

生後6ヶ月で高値を示しており、生後6ヶ月までの間に、年齢とともにTh1, Th2が発達してゆく事の現れであると考えられた。また、RSウイルスに感染して、喘鳴をきたす群は、このTh1が低く、Th2が優位になっている傾向にあり、ウイルス感染やその他の抗原暴露などにより、徐々にナイーブT細胞がTh1, Th2細胞に分化していく過程で、Th2への分化しやすい個体が、その後の繰り返す喘鳴やアレルギー発症へとつながっていく可能性があることが示唆された。

さらに、臍帯血のIgEと生後6ヶ月のIgEとの間に正の相関を認めており、臍帯血での免疫バランスがその後のアレルギー発症にも影響する可能性も示唆された。

これらの対象者の追跡調査を続ける事で、アレルギー発症に関わる胎内因子、さらにはウイルス感染の意義付けがより明らかになると考えられる。

E. 研究発表

<論文発表>

- (1) Tatebayasi K, Matsui E, Kaneko H, Fukao T, Kasahara K, Kondo N. IL-12B promoter polymorphism associated with asthma and IL-12B transcriptional activity. Allergology International. 54: 345-349 (2005)
- (2) Yoshikawa K, Matsui E, Kaneko H, Fukao T, Inoue R, Teramoto T, Shinoda S, Fukutomi O, Aoki M, Kasahara K, Kondo N. A novel single-nucleotide substitution, Glu 4 Lys, in the leukotriene C4 synthase gene associated with allergic diseases. Int J Mol Med. 16: 827-831 (2005)
- (3) Kondo M, Suzuki K, Inoue R, Sakaguchi H, Matsukuma E, Kato Z, Kaneko H, Fukao T, Kondo N. Characterization of T-cell clones specific to ovomucoid from patients with egg-white allergy. J Investig Allergol Clin Immunol. 15 :107-111(2005)
- (4) Kondo M, Fukao T, Teramoto T, Kaneko H, Takahashi Y, Okamoto H, Kondo N. A common variable immunodeficient patient who developed acute disseminated encephalomyelitis followed by the Lennox-Gastaut syndrome. Pediatr Allergy Immunol. 16:357-360 (2005)
- (5) Kawamoto N, Kaneko H, Takemura M, Seishima M, Sakurai S, Fukao T, Kasahara

K, Iwasa S, Kondo N: Age-related changes in intracellular cytokine profiles and Th2 dominance in allergic children. Pediatric Allergy and Immunology (in press)

<学会発表>

(1) Kondo N : 国際学会シンポジウム : Symposium 1 : The hygiene hypothesis: true or false? (衛生仮説). APAPARI KAPARD Joint Congress 2005 (2005年4月7日, 韓国)

(2) Kaneko H, Matsui E, Aoki M, Kawamoto N, Asano T, Kondo N. 国際学会シンポジウム : Immune responses to viral infections and allergy. APAPARI KAPARD Joint Congress. 2005 (2005年4月7日, 韓国)

(3) Kawamoto N, Kondo N, Kasahara K, Takemura M, Kaneko H : Free Paper2-1: Age related changes in interacellular cytokine production of T cell . APAPARI KAPARD Joint Congress 2005(2005年4月8日, 韓国)

(4) 青木美奈子 松井永子 川本典生 館林宏治 櫻井里美 金子英雄 深尾敏幸 寺本貴英 近藤直実 : RS ウイルス感染によるアレルギー発症機構の分子遺伝学的検討. 日本小児科学会学術集会 (第 108 回) (2005年4月22日~24日 東京)

(5) 川本典生 近藤直実: 臍帯血と小児アレルギー疾患の細胞内サイトカインの検討. Airway Club in Sendai (第 14 回) (2005年9月10日 仙台)

(6) 川本典生, 深尾敏幸, 櫻井里美, 金子英雄, 松井永子, 竹村正男, 清島満, 白春栄, 張改秀, 岩砂眞一, 近藤直実: 臍帯血解析を含む出生コホート研究による小児アレルギー疾患の評価と発症予測(第 1 報). 日本アレルギー学会秋期学術大会 (第 55 回) (2005年10月20日~22日 盛岡)

(7) 川本典生, 深尾敏幸, 櫻井里美, 金子英雄, 松井永子, 竹村正男, 清島満, 白春栄, 張改秀, 岩砂眞一, 近藤直実 : 出生コホート研究による小児アレルギー疾患の評価~発症予測に向けた臍帯血解析~. 日本アレルギー学会 (第 42 回) (2005年11月19日, 福井)

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

免疫アレルギー疾患に関わる胎内・胎外因子の同定に関する研究班
胎外因子としてのウイルス二重鎖 RNA

- 既存のアレルギー性炎症に及ぼす影響の *in vivo* での検討 -

分担研究者：大田 健 帝京大学医学部内科学講座教授

アレルギー疾患、特に気管支喘息増悪の原因としてウイルス等の感染が深く関与している。種々の菌体成分の認識受容体として、10種のヒト Toll-like receptor (TLR)が同定されて以降、菌体成分認識機構が急速に明らかになってきた。感染によるアレルギー性炎症増悪機構を明らかにする目的で、平成16年度は、TLRリガンドによる気道上皮細胞活性化を *in vitro* で網羅的に検討し、TLR3リガンドであるウイルス二重鎖RNA (double-stranded RNA: dsRNA)アナログ (poly I:C)のみがケモカイン産生と細胞死を誘導することを示した。ウイルス感染が喘息病態を悪化させることは、*in vivo* の動物実験モデルで証明されてきているが、いかなるウイルス成分が責任分子であるかは明らかではない。平成17年度は以上の結果をふまえて、ウイルスdsRNAが既存のアレルギー性気道炎症を *in vivo* で増悪させうるかどうかを、OVA感作、チャレンジによる喘息モデルマウスを用いて明らかにすることを目的とした。気管支肺胞洗浄液 (BALF)における細胞成分は、OVAチャレンジで好酸球、リンパ球数が増加していたが、poly I:Cを引き続き点鼻すると好酸球、リンパ球、マクロファージが有意に増加し、気道過敏性も有意に亢進し、TUNEL陽性のアポトーシス細胞も増加した。また、poly I:C追加投与で、BALF中のRANTES濃度が有意に増加し、BALF細胞のIFN- γ mRNAが増加した。以上のことから、dsRNAは、好酸球、リンパ球などの炎症細胞集積増強、RANTESを中心としたケモカイン産生増強、肺構築細胞のアポトーシス誘導、IL-4、IFN- γ 産生細胞の集積を惹起し、アレルギー性気道炎症を増悪させ、気道過敏性を亢進させることが示された。ウイルス成分のひとつであるdsRNAのみによっても、既存のアレルギー性炎症は増悪し、気道過敏性は亢進したことから、ウイルスdsRNAは喘息増悪に関与する胎外因子であることが強く示唆された。また、dsRNA/TLR3経路の阻害はウイルス感染による気管支喘息増悪の治療標的候補たりうる可能性も想定された。

研究協力者：長瀬洋之 (帝京大学医学部内科助手)、山下直美 (武蔵野大学薬学部教授)

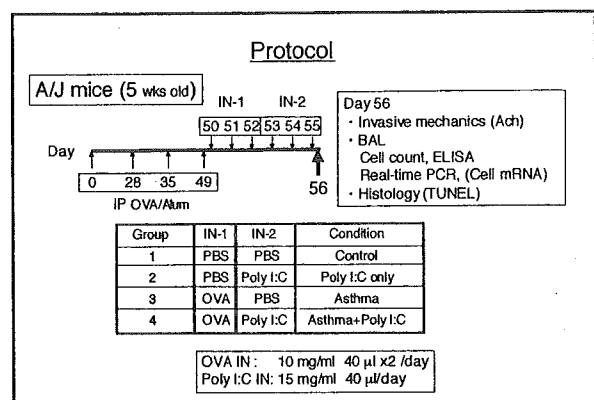
A 研究目的 気管支喘息死にもつながりうる喘息急性増悪の原因として、感染が深く関与している。喘息増悪の 80% にウイルス感染が関与していることや、クラミジア、マイコプラズマによる増悪の可能性が報告されている。このような菌体成分は近日同定されてきた 10 種のヒト Toll-like receptors (TLRs) によって特異的に認識される。気道上皮細胞は外界環境からのバリアとして存在し、ウイルス感染下ではケモカイン産生等を介して生体を防御しようとする一方、この結果惹起される炎症がアレルギー性炎症を増悪させる可能性が示唆されている。従って、気道上皮細胞がいかなる TLR リガンドで活性化され、いかなる菌体成分を認識するかを明らかにすることは、感染によるアレルギー性炎症増悪機構を解明する上で重要である。平成 16 年度は、TLR リガンドによる気道上皮細胞活性化を *in vitro* で網羅的に検討し、TLR3 リガンドである poly I:C のみがケモカイン産生と細胞死を誘導することを示した。Poly I:C はウイルス二重鎖 RNA (dsRNA) のアナログであり、気道上皮細胞がウイルス特異的に活性化されることや、TLR3 を介した気道上皮細胞活性化と細胞死がアレルギー性炎症増悪に寄与している可能性が示唆された。

ウイルス感染が喘息病態を悪化させることは、*in vivo* の動物実験モデルで証明されているが、いかなるウイルス成分が責任分子であるかは明らかではない。本年度は以上の *in vitro* の結果をふまえて、ウイルス成分のひとつである dsRNA が胎外因子として既存の

アレルギー性気道炎症を増悪させるかどうかを、喘息モデルマウスを用いて明らかにすることを目的とした。

B 方法 5 週齢の A/J マウスを用い、OVA 腹腔感作、OVA 点鼻チャレンジによる喘息モデルの作成後、poly I:C を 3 日間点鼻投与し、気道過敏性測定、気管支肺胞洗浄、病理学的検討、アポトーシス解析を行った。4 群を用意し、全例に OVA 腹腔内投与による感作を行った。その後の点鼻処理は 4 群に分けて検討した。第 1 群は PBS 点鼻のみのコントロール群、第 2 群は PBS 点鼻の後に poly I:C 電日を行ったウイルス感染単独モデル群、第 3 群は OVA 点鼻チャレンジを行った、喘息モデル群、第 4 群は OVA 点鼻チャレンジ後に引き続き poly I:C 点鼻を行った、喘息+ウイルス感染モデル群とした (図 1)。

図 1: 実験プロトコル



C 結果および考察

気管支肺胞洗浄液 (BALF)における細胞成分は、OVA チャレンジ (喘息モデル群)で好酸球、リンパ球数が増加していたが、poly I:C を引き続き点鼻すると (喘息+ウイルス感染群)、好酸球、リンパ球、マクロファージが有意に増加し (図 2)、気道周囲の炎症細胞浸潤が増強し (図 3)、TUNEL 陽性のアポトーシス細胞も増加した (図 4)。気道過敏性も有意に亢進した (図 5)。

図 2: BALF 細胞分画

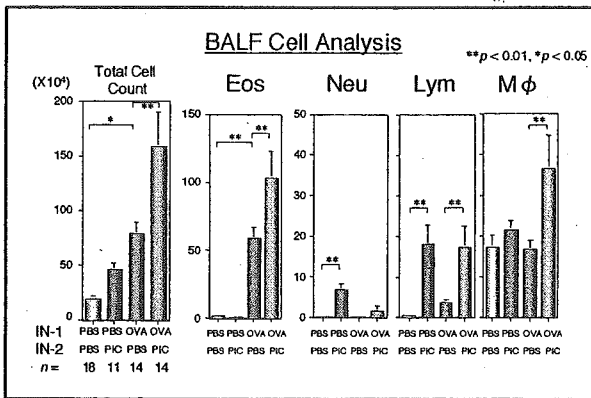


図 3: 病理組織学的所見

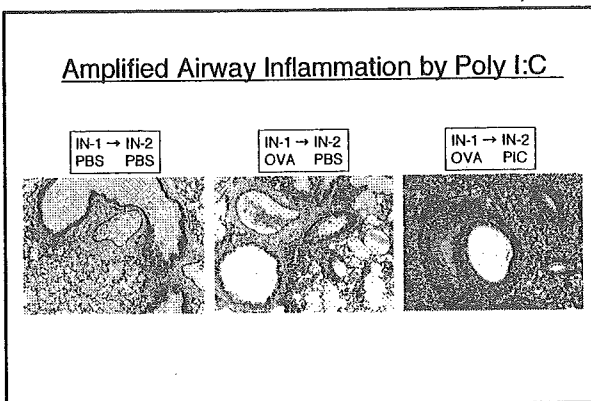


図 4: アポトーシス細胞解析

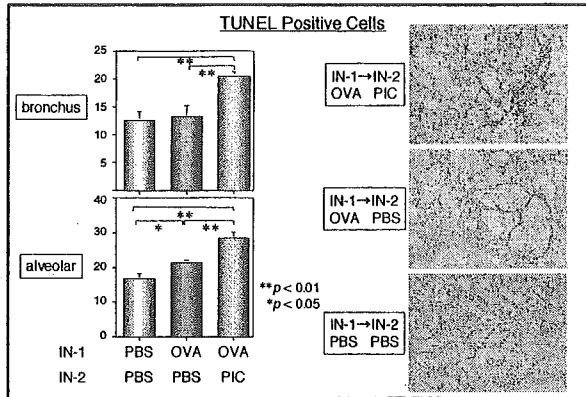
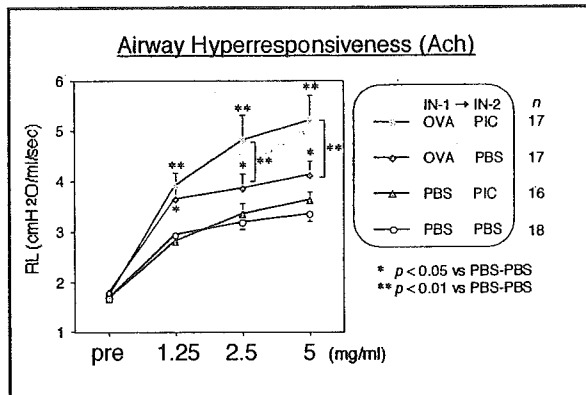
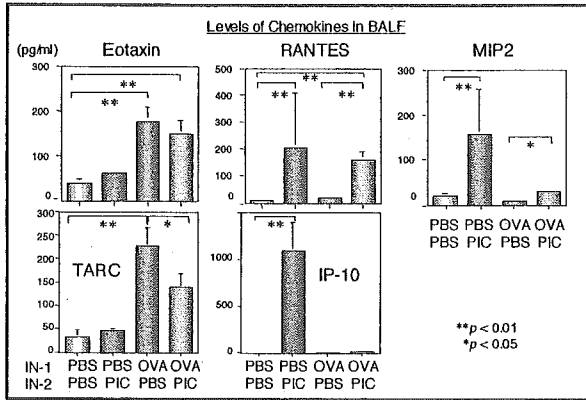


図 5: アセチルコリンに対する気道過敏性



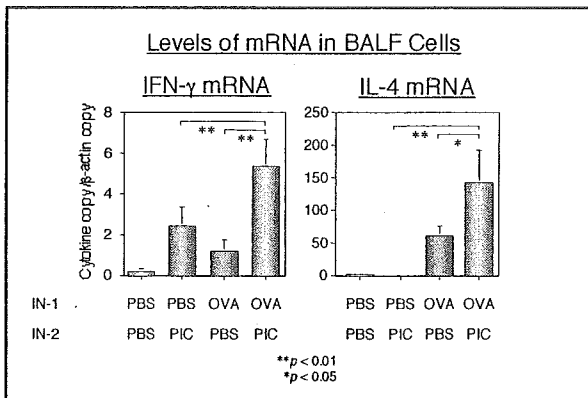
また、好酸球、リンパ球等の細胞集積が増強したメカニズムを明らかにする目的で、BALF 上清中のケモカイン濃度を測定した。好酸球指向性の eotaxin や Th2 リンパ球指向性の TARC 濃度は OVA 点鼻の喘息モデル群で上昇していたが、poly I:C の追加点鼻でのさらなる上昇は認められなかった。一方、好酸球、活性化リンパ球指向性の RANTES 濃度は OVA 点鼻後の poly I:C 追加投与で OVA 単独群に比して、有意な産生増強を認めた (図 6)。

図 6: BALF 中ケモカイン濃度



また、局所のサイトカイン環境が Th1/Th2 のいずれであるかを検討するために、BALF 細胞の IFN- γ 、IL-4 mRNA を測定したが、OVA 単独投与の喘息モデル群に比して、poly I:C 追加投与群では IFN- γ 、IL-4 双方の mRNA が増加していた (図 7)。

図 7: BALF 細胞 mRNA の検討



以上のことから、TLR3 リガンドである dsRNA は、好酸球、リンパ球などの炎症細胞集積増強、RANTES 等のケモカイン産生増強、肺構築細胞のアポトーシス誘導、IL-4、IFN- γ 産生細胞の集積を惹起することで喘息モデルマウスの気道炎症を増悪させ、機能的に気道過敏性を亢進させることが示された (図 8)。

図 8: 本検討の結果のまとめ

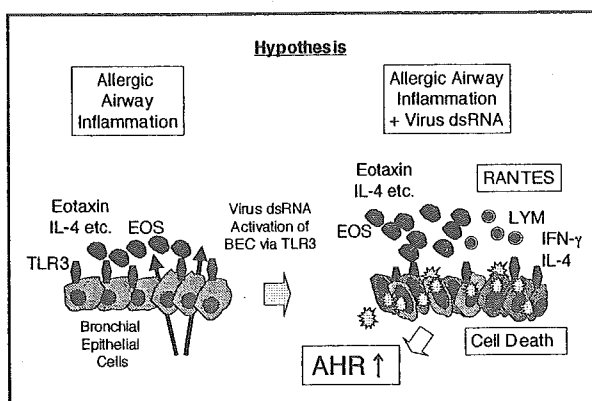
Summary					
	AHR	BALF Cell			
		EOS	NEU	LYM	M ϕ
Poly I:C only	→	→	↑↑	↑↑	→
Asthma	↑	↑↑	→	→	→
Asthma+Poly I:C	↑↑	↑↑↑	↑	↑↑	↑↑

	BALF Chemokine			BALF mRNA		Apoptosis
	Eotaxin	RANTES	MIP2	IFN- γ	IL-4	
Poly I:C only	→	↑	↑	↑	→	ND
Asthma	↑↑	→	→	→	↑	↑
Asthma+Poly I:C	↑↑	↑	↑	↑	↑	↑↑

dsRNA (poly I:C) could exacerbate allergic airway inflammation in murine model of asthma.

E 結論

ウイルス成分のひとつである dsRNA のみによっても、既存のアレルギー性炎症は増悪し、気道過敏性は亢進した。既存の喘息増悪に関与する胎外因子として、ウイルス dsRNA が関与することが強く示唆された。これらを図 9 に仮説として示す。dsRNA/TLR3 経路の阻害はウイルス感染による気管支喘息増悪の治療標的候補たりうる可能性も想定された。



1. 論文発表

1. Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol.* 2003 Oct 15;171(8):3977-82.
2. Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K. Comparison of Expression and Function of Toll-like Receptors in Eosinophils and Neutrophils. *Allergy Clin Immunol Int* (in press).
3. 長瀬洋之、大田健 喘息と Toll-like receptor. *Annual Review 呼吸器* 2005 73-78.中外医学社.
4. 長瀬洋之、平井浩一、大田健 好酸球と Toll-like

receptors (TLRs). *Asthma frontier* 3:20-28, 2004 医薬ジャーナル社.

5. 長瀬洋之、大田 健：自然免疫とアレルギー・気管支喘息 *呼吸と循環* 53(4):377-83, 2005.
6. 長瀬洋之：喘息とウイルス感染 *Annual Review 呼吸器* 2006、中外医学社、東京、66-71、2006.

2. 学会発表

1. Nagase H, Hirai K, Adachi T, Nakano J, Yamamoto K, Yamashita N, Ohta K: Effect of Toll-like receptor ligands on survival of human bronchial epithelial cells. 62nd American Academy of Allergy Asthma & Immunol Annual Meeting (AAAAI), San Antonio, USA, March, 2005.
2. Nagase H, Yamashita N, Adachi T, Nakano J, Ohta K: Toll-like Receptor 3 (TLR3) Ligand Exacerbates Pre-existing Allergic Airway Inflammation in Murine Asthma Model 63rd AAAAI, Miami, USA, March, 2006.
3. 長瀬洋之、平井浩一、大田 健: シンポジウム 3 アレルギー疾患の新治療戦略 2. 細胞表面の受容体を標的とする治療戦略 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会 盛岡 2005 年 10 月
4. 長瀬洋之、山下直美、足立哲也、中野純一、大田 健：TLR3 リガンド poly I:C がアレルギー性気道炎症に及ぼす影響 第 55 回日本アレルギー学会総会 盛岡 2005 年 10 月

平成17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

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

分担研究者 足立満 昭和大学第一内科教授

研究要旨：ウイルス感染は気管支喘息の発症、増悪因子として重要であることが認識されている。ウイルスによる上気道感染時の気管支喘息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%以上に関与することが報告されている。気管支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。この病態は、好酸球やリンパ球などの炎症細胞が気道へ浸潤することにより形成される。アレルギー性気道炎症がウイルス感染時にいかなる因子の関与によりその増悪が誘導されるのか。その詳細については不明な点が少ない。このような背景より環境要因の中でも感染は極めて重要と考えられるため、我々は感染因子としてのウイルス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検討を加えた。すなわち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。これらの結果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を想定させる。我々は *in vitro* における気道上皮細胞培養系を確立し、これに対しインフルエンザウイルス感染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/調節機序を分子生物学的観点から追求することは、その病態の理解や治療への発展に不可欠であると考えられる。よって感染時に重要と考えられるサイトカイン/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検討を加えた。

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* においてウイルス感染との関連について検討するとともに、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。

以上の結果より 気道上皮細胞を用いた実験系において 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考えられる。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。

研究分担者
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

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 dsRNA 刺激による転写メカニズムの解明につき検討を加えた。

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

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、気管支喘息患者における IL-17F の関与につき検討を行った。