

---

---

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15年度～17年度 総合研究報告書

主任研究者 森川昭廣

---

---

平成18年(2006)年3月  
厚生労働省

# 目次

## I. 総合研究報告書

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 ..... 7
- 2) 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 ..... 12
- 3) 胎外因子としての喫煙曝露・菌体成分  
分担研究者  
帝京大学医学部内科教授 大田 健 ..... 17
- 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 ..... 27
- 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 ..... 32
- 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 ..... 39
- 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 ..... 43
- 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—  
獨協医科大学小児科助教授 吉原 重美 ..... 48
- 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 ..... 58
- 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 ..... 65

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 72

IV. 研究成果の刊行物・別冊 ..... 77

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  
総合研究報告書

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 森川昭廣 群馬大学大学院小児生体防御学教授

研究要旨：

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、発症に関わる種々の要因が変化してきたことが疑われる。小児期のアレルギー性疾患発症に関与するとされる因子は、遺伝的な背景に加え、胎児期の環境（胎内因子）、出生後の栄養、生活様式、感染など（胎外因子）多様である。我々の研究班では、胎内因子として、アレルギー疾患発症と母体妊娠中における感染との関連を、妊娠中のウイルス性疾患や子宮付属器感染あるいは母体ウレアプラズマ保菌の観点から検討した。母体感染と乳児喘息発症との関連は明らかではなかったが、母体ウレアプラズマ感染は、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。また、母親がアレルギー症状をもち、妊娠中にアレルギーの症状の数が多きほど、子供の喘息発症率は高いことから、遺伝的背景が重要と考えられた。次に、胎内環境を反映すると考えられる臍帯血中のサイトカインの検討では、IL-7 や MIP-1b が低値なほど、喘鳴・乳児アトピー性皮膚炎発症が高いことを明らかにし、免疫学的な未熟性がアレルギー疾患発症に関与する可能性を示した。胎外因子として、疫学調査では出生後の気道感染、特にその頻度が多いほど喘息発症率が有意に高かった。また、RS ウイルス感染では、罹患した時に喘鳴を呈した児では Th1 系の反応が低下し、尿中アラキドン酸代謝産物が上昇していた。また、RS ウイルス感染による喘鳴や感染後の喘鳴発症に CD14、IFN- $\gamma$ 、IL-13 などの遺伝子多型が関連している可能性が示唆された。以上より、妊娠中あるいは出生後の感染への罹患は、少なくとも衛生仮説（感染への曝露が減少したことでアレルギー疾患が減少したという仮説）のようなアレルギー疾患発症阻止因子とはなりえない可能性が考えられた。また、素因を有する児に対する RS 感染への介入（予防や薬物療法）の必要性の有無は今後の重要な課題と思われる。

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）  
近藤直美（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ておりと考えられている。感受性のある個体が、環境因子の曝露を受けると、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に罹患し、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倍喘鳴が起りやすかったと報告している。しかし、これら喘鳴児が、本当の喘息に移行するかは明らかとなっていない。また、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。

(倫理面への配慮)

検体採取にあたっては、文書によるインフォームドコンセントを得て、検体は匿名性を保持し、対象検体に対する人権擁護上の配慮を行った。動物実験にあたっては、動物愛護の観点を配慮して行った。

## B. 研究の方法

### アレルギー疾患発症における胎内感染の影響

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間診表を用い、1歳および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が、早産児の慢性肺疾患(Chronic lung disease; CLD)の発症、さらには、その後の反復性喘鳴発症に関与するか、また胎内感染の指標として臍帯血のサイトカインを測定し、CLD発症との関連を検討した(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、荒川)、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、アレルギー疾患発症について出生コホート調査を行った(近藤)。

### 喘息発症における遺伝因子と胎内・胎外因子の相互作用

1) RSVとその後の反復性喘鳴との関連を検討するために、気道症状を認め入院した2歳以下の児で鼻汁吸引液の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(小田嶋)。

2) 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(河野)。

3)  $\gamma\delta$ T細胞のリガンドである isopentenyl pyrophosphate (IPP)刺激による *in vitro*でのIFN- $\gamma$ 産生系にRSVを共存させた場合のIFN- $\gamma$ 産生の抑制能、およびその抑制に対する抗サイトカイン抗体添加の効果を検討した。(河野)。

4) 呼吸器感染時のRSV抗原陽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)。

5) 気管支喘息患者についてIL-17Fの遺伝子多型の有無を検討し、気管支喘息の関連について検討を行った(足立)

### 気管支喘息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(足立)。

2) 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。TLRリガンドによる気道上皮細胞活性化を *in vitro*で網羅的に検討した。さらに、その結果をふまえ、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(大田)。

3) A549細胞にIFN- $\gamma$ あるいはIL-4を添加し、2日間培養の後にHEp-2細胞で増殖させたRSVを1時間感染させ、96時間培養後にtotal RNAを抽出し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clustering解析した。

(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 研究結果

### アレルギー疾患発症における胎内因子の影響

1) 1歳時点でアレルギー発症群は、非発症群と比較して出生体重は有意に重かった。母親の妊娠中一出産後のアレルギー罹患数と相関していた。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) 新生児期ureaplasma保菌は、感染型CLDや退院後の反復性喘鳴と関連していた。また、新生児期の酸素投与期間とも関連していた。感染型CLDでは非感染型CLDと比較しIL-8、IL-6は有意に高値を示した。また、絨毛膜羊膜炎陽性群は、陰性群と比較してIL-8が有意に高値であった。

3) 出生コホート調査では、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-1 $\beta$ 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発症の有無では差を認めなかった。また、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差を認めなかった。

#### 喘息発症における遺伝因子と胎内・胎外因子の相互作用

1) RSV下気道感染後の反復性喘鳴では、罹患月齢、罹患時の血清総IgE値、アレルギー疾患の家族歴とは有意な関係はなかったが、喘息の家族歴とは有意な関係を認めた。

2) RSV細気管支炎児は健康人と比べ、CD14C(-550)T多型において、有意にCCの割合(CC vs CT+TT)およびCアレルの頻度が高かった。CD14C(-159)多型とは有意な関係はなかった。RSV細気管支炎後の反復性喘鳴の有無とCD14C(-159)TおよびCD14C(-550)T多型の間に有意な関係はなかった。

3)  $\gamma\delta$ 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- $\gamma$ 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。

4) TLR3とTLR9は、RSV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- $\gamma$ 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- $\gamma$ 受容体1の遺伝子多型が認められた。

5) IL-17Fの遺伝子多型については野生型において呼吸機能低下などの臨床像と関連がみられた。

#### 気管支喘息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 $\alpha$ 、RANTES、IP-10、MCP-1、SR-PSOX、IL-1R antagonistの発現がみられた。その細胞内情報伝達はTLR3を介しNF- $\kappa$ B、IRFの関与が確認された。

2) TLRリガンドによる気道上皮細胞活性化を網羅的に検討した結果、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した。In vivoでは、アレルギー性炎症にpoly I:C追加投与により気管支肺胞洗浄液において好酸球、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。気道周囲の炎症細胞浸潤も増強し、TUNEL陽性のアポトーシス細胞も増加した。

3) IFN- $\gamma$ 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、MMP1、MMP10、IL-1 $\beta$ などの発現が増強していた。

4) 肺線維芽細胞において、IL-4刺激による

Eotaxin産生をDex添加後24時間までは抑制したが、24時間以降では反対に増強した。早期の抑制には転写活性の抑制が関与し、後期の増強には蛋白合成を介した系が重要であることが示唆された。

5) 成熟マウスでは、気道過敏性、炎症細胞浸潤、粘液分泌細胞スコア、BALF中好酸球数は週数を経ても持続したが、幼若群では低下した。成熟マウスではIL-4は有意に高値を示した。一方、幼若マウスではIL-4に加え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、新生児慢性肺疾患となり、その後の反復性喘鳴との関連が示唆された。一方、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母体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、個体側の因子として、IL-13やIFN- $\gamma$ 受容体1の遺伝子多型の関与が想定された。これに関しては、in vitroにおける実験系で、Gene chipを用いた網羅的検討により、Th2優位では、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、 $\gamma\delta$ T細胞からのIFN- $\gamma$ 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アレルは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、アレルギー性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-1β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。

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。

## 6 結論

アレルギー疾患発症と増悪に係わる胎内・胎外因子として、感染と生体との相互作用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、アレルギー疾患の種類により発症との係わりが異なる可能性が示唆された。また、個体の感受性として、自然免疫の発現(toll-like receptor 3)や獲得免疫としてTh1/Th2バランスの変容が、さらには、それを規定する遺伝子レベルでの多型性が、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きける可能性が考えられた。

## 7 研究発表

### 1) 国内

口頭発表	150件
原著論文	17件
それ以外(レビュー等)の発表	118件

そのうち主なもの

論文発表

- 1) 水野隆久、徳山研一：ウイルス感染と喘息. ALLERGIA TRENDS 7(2):10-13, 2005.
- 2) 水野隆久、徳山研一：乳児期の喘鳴およびウイルス感染関連喘息. 小児科診療 68(8):74-80, 2005.
- 3) 本間洋子：新生児の感染症 慢性肺疾患(CLD)と微生物 小児科診療, 67:469-474, 2004
- 4) 村松礼子、荒川浩一、小児アトピー性皮膚炎、アレルギー科、20:142-147, 2005.
- 5) 荒川浩一、森川昭廣、乳幼児喘息と学童喘息

の病態、およびその差異、アレルギー科、19:106-112, 2005

6) 小田嶋 博：小児気管支喘息の最近の疫学と増加要因. 小児科 46 (2) : 541-550. 2005.

7) 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.

8) 青木美奈子、松井永子、金子英雄、川本典生、笠原貴美子、近藤直実：ウイルス感染による免疫アンバランスと遺伝要因. アレルギーの臨床 25、56-59、2005.

9) 小児気管支喘息の発症・増悪に及ぼす感染症(ウイルスを含む)の役割 基礎と臨床 Innate immunityと気管支喘息：下条直樹、井上祐三朗、富板美奈子、藤井克則、菱木はるか、石和田稔彦、青柳正彦、西牟田敏之、河野陽一、日本小児アレルギー学会誌18:19-24, 2004.

10) 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

学会発表

1) 徳山研一：日本における乳幼児喘息治療シンポジウム2：乳幼児喘息治療の最前線、第42回日本小児アレルギー学会、2005.11(福井)

2) 本間洋子：Ureaplasmaと新生児感染. 第49回日本未熟児新生児学会教育講演 2004.12(横浜)

3) 鈴木慎太郎 國分二三男 松倉聡 川口未央 足立満：ウイルス感染と気管支喘息シンポジウム第17回日本アレルギー学会春季臨床集会 2005.10(岡山)

4) 荒川浩一、森川昭廣：乳児アトピー性皮膚炎発症因子に関する前方視的検討：乳児湿疹とに比較、第42回日本小児アレルギー学会 2005.11(福井)

5) 鈴木僚子、荒川浩一：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、第42回日本小児アレルギー学会 2005.11(福井)

6) 小田嶋 博：気管支喘息の経過に対する妊娠ならびに出産の影響. 第18回小児気管支喘息治療管理研究会. 2005.6(東京)

7) 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 2004.5(群馬)

8) 近藤直実：イブニングシンポジウム2：ウイルス感染と喘息・アレルギー -遺伝子生態医学の視点から-. 第44回日本呼吸器学会学術講演会 2004.3(東京)

9) 井上祐三朗、下条直樹、富板美奈子、河野陽一：RSV への自然免疫応答に対する可溶性 CD14 の影響について第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2005.6 (岡山)

10) 長瀬洋之、平井浩一、山下直美、足立哲也、中野純一、山本一彦、大田健：Toll-like 受容体刺激による気道上皮細胞からのケモカイン産生とサイトカインによる制御。第 54 回日本アレルギー学会総会 2004.11 (横浜)

## 2) 海外

口頭発表	18 件
原著論文	18 件
それ以外 (レビュー等) の発表	18 件

そのうち主なもの

論文発表

1) Koyama H, Tokuyama K, Nishimura H, Mizuno T, Mayuzumi H, Ohki Y, Arakawa H, Mochizuki H, Morikawa A. The effect of disodium cromoglycate on airway mucus secretion during antigen-induced late asthmatic response in a murine model of asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2005 138:189-196

2) Ohki Y, Tokuyama K, Mayuzumi H, Sato A, Koyama H, Takizawa T, Arakawa H, Mochizuki H, Morikawa A. Characteristic features of allergic airway inflammation in a murine model of infantile asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2005 138:51-58

3) 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- $\kappa$ B and interferon regulatory factors in human airway epithelial cells. *Clin Exp Allergy* 34:745-752 2004

4) 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.

5) Kawano Y, Morikawa M, Watanabe M, Ohshiba A, Noma T and Odajima H : A Study of the Factors Responsible for the Development of Allergic Diseases in Early Life. *Asian Pacific J of Allergy and Immunology* 23 : 1-6. 2005.

6) Odajima H and Nishio K : Clinical Reality of Asthma Death and Near-fatal Cases, in a Department of Pediatrics of a Japanese Chest Hospital. *Allergology International* 54:7-15, 2005.

7) Yamada Y, Yoshihara S, Arisaka O: Creola Bodies in wheezing infants predict the development of asthma. *Pediatr Allergy Immu*, 15:159-162, 2004.

8) 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.

9) Kondo N, Matsui E, Kaneko H, Aoki M, Kato Z, Fukao T, Kasahara K, Morimoto N. RNA editing of interleukin-12 receptor beta2, 2451 C-to-U (Ala 604 Val) conversion, associated with atopy. *Clin Exp Allergy* 34, 363-368, 2004.

学会発表

1) Honma Y, Yada Y, Takahashi, N and Momoi MY: Ureaplasma urealyticum infection in utero and Chronic lung disease of newborn. 6th International Congress on Pediatric Pulmonology Portugal Lisbon 2004. 2. 28-3. 2

2) Arakawa H, Suzuki T, Muzuno T, Mochizuki H, Tokuyama K, Morikawa A. Dexamethasone exhibits dual response to expression and production of eotaxin in the lung fibroblast. *Eur Respir J* 2005, Copenhagen.

3) Odajima H, Nogami H, Nishima S: Investigation of the correlation between the atmospheric PM2.5 concentration and the frequency of airway inflammation accompanied by fever and asthma attack ERS Sep 18-22, 2005, Copenhagen,

4) Yamada Y, Matsumoto K, Hashimoto N, Saikusa M, Kato A, Homma T, Saito H, Yoshihara S, Arisaka O: Comprehensive Analysis of mRNA expression profiles in human respiratory epithelial cells after inoculation with respiratory syncytial virus. 2004 March. The 60th AAAAI annual meeting, San Francisco.

5) Kondo N : Symposium 1 : The hygiene hypothesis: true or false? APAPARI KAPARD Joint Congress 2005. April. Seoul.

6) Yuzaburo Inoue, Naoki Shimojo, Akiko Yamaide, Shuichi Suzuki, Tomoko Matsuura, Minako Tomiita, Akira Hoshioka, Yoichi Kohno. The single nucleotide polymorphisms of CD14/TLR4 and subsequent development of recurrent wheezing after respiratory syncytial virus-induced bronchiolitis in Japanese children. World Allergy Congress 2005. June. Munchen

- 7) Morikawa A. Prevention and Early Intervention of Asthma in Children. APAPARI KAPARD Joint Congress 2005. April. Seoul.
- 8) Morikawa A. Signal transducers and activators of transcription 6 (Stat6) variants in children and adult asthma. World Allergy Congress 2005. June. Munchen
- 9) 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. Collegium Internationale Allergologica 25<sup>th</sup> Symposium, Aug. 28, Bornholm, Denmark, 2004.

渡辺美砂 東邦大学医学部小児科  
(あいうえお順)

## 8 知的所有権の出願・取得状況

### 1 特許取得

特になし

### 2 実用新案登録

特になし

### 3 その他

特になし

## 研究協力者：

青木美奈子 岐阜大学大学医学部附属病院小児科助手  
 青柳正彦 国立下志津病院小児科  
 井上祐三朗 千葉大学大学院医学研究院小児病態学  
 大木丈弘 自治医科大学大学院  
 大木康史 群馬大学医学部周産母子センター講師  
 金子英雄 岐阜大学大学医学部附属病院小児科講師  
 川口未央 昭和大学第一内科  
 川野 豊 横浜赤十字病院小児科部長  
 川本典生 岐阜大学大学医学部附属病院小児科医員  
 國分二三男 昭和大学第一内科 助教授  
 斎藤博久 同 免疫アレルギー研究部部長  
 佐伯敏秋 北里大学小児科  
 七種美和子 横浜市衛生研究所ウイルス研究室  
 下条直樹 千葉大学大学院医学研究院小児病態学  
 杉山幹雄 群馬大学大学院小児生体防御学大学院  
 鈴木 僚子 群馬大学大学院小児生体防御学大学院  
 堤 裕幸 札幌医科大学小児科教授  
 手塚純一郎 国立病院機構福岡病院小児科  
 長瀬洋之 帝京大学医学部内科学講座助手  
 野間 剛 北里大学小児科講師  
 深尾敏幸 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学  
 助教授  
 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  
 松倉聡 昭和大学第一内科助手  
 松本健治 国立成育医療センター研究所免疫アレルギー  
 研究部アレルギー研究室室長  
 黛 博雄 群馬県立小児医療センター新生児科医長  
 本村知華子 国立病院機構福岡病院小児科  
 森川みき J R 仙台病院小児科医長  
 矢田ゆかり 自治医科大学小児科助手  
 山下直美 武蔵野大学薬学部教授  
 山田裕美 獨協医科大学小児科助手



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：**生後1歳時における乳児アトピー性皮膚炎（AD）や喘鳴発症に関わる諸因子を解明する目的に、前方視的検討を行った。（対象と方法）開業産婦人科で出生した健康新生児で、父母の同意が得られた269名を対象に、アレルギー疾患の家族歴の調査、母親のカルテ記載に基づく妊娠中の感染症罹患歴の調査、臍帯血中の17種サイトカインの測定、角質膜厚水分量計による早期新生児期・1ヶ月健診時の皮膚生理機能の測定を行った。1ヶ月健診時に顔面湿疹の有無を1名の医師により判定した。1歳過ぎに郵送または電話問診によりAD発症の有無をアンケート調査した。生後1ヶ月の湿疹（乳児湿疹）やAD発症、喘鳴発症と各種因子との関連につき検討した。（結果）アンケートに対し213名（79.6%）より回答が得られ、医師によりADと診断された児が27名、喘鳴発症は35名であった。AD発症群は非発症群と比較し、1ヶ月健診時の頬部や額部の表面水分量、角質膜厚が有意に高く、臍帯血中IL-7、MIP-1bは有意に低値を示した。父母のアレルギー家族歴、母体の感染症罹患歴には有意差を認めなかった。喘鳴発症群では、在胎週数、出生体重、帝王切開、母親のアトピー性皮膚炎や喘息の既往歴と関連していた。一方、臍帯血サイトカインは喘鳴発症とは関連なく、喘鳴とアトピー性皮膚炎発症群において、IL-7、IL-17、MIP-1bが関連した。1ヶ月健診時において乳児湿疹を呈したものは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、臍帯血IL-6、MIP-1bが高い傾向を示した。（結論）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。

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、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、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。

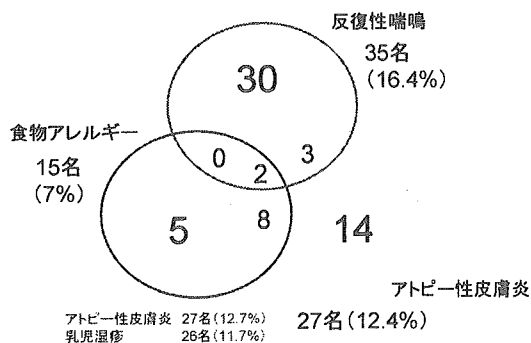
### C. 研究結果

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。

#### アンケート結果(213名:79%)



#### 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。喘鳴発症群では、母親の喘息とアトピー性皮膚炎の家族歴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 <sup>1</sup>	5 (18.5)	22 (11.8)	0.135	2 (7.7)	22 (11.8)	0.549
ウイルス <sup>2</sup>	11 (40.7)	81 (43.5)	0.783	15 (57.7)	77 (41.2)	0.1111

#### 3) 周生期因子について

アトピー性皮膚炎発症群では、男女比、在胎週数、出生体重、出産時の母親の年齢で非発症群と比較し有意差は認めなかった。一方、喘鳴を呈した群では、母親の年齢には差は認めなかったが、在胎週数や出生体重では有意な差を認めた。また帝王切開で出生した児に多く見られた。栄養法に関しては、ADや喘鳴発症群でも有意な差は認めなかった。

#### 喘鳴性疾患発症群と非発症群の比較

	乳児喘鳴		P	Odds (CI)
	+	-		
	n=35	n=178		
男女比	21/14	81/97	0.1197	1.798 (0.859-3.757)
在胎週数	39.5±1.2	40.0±1.0	0.0232	1.466(1.054-2.041)
出生体重	2976±348	3143±324	0.0078	1.002(1.000-1.003)
母親の年齢	27.5±4.7	28.3±4.1	0.3203	1.046(0.957-1.144)

#### 4) 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

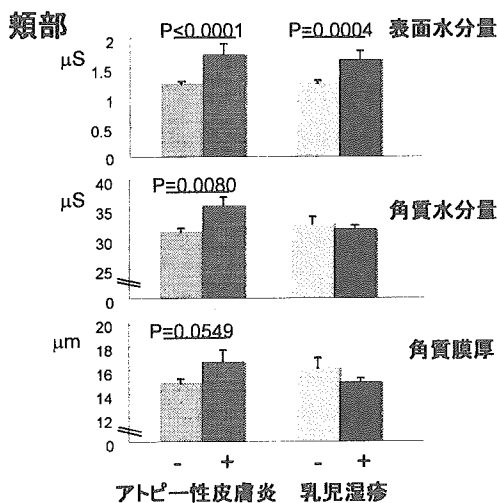
と喘鳴発症について、それぞれ関連を検討した。在胎期間中の感染症と、それらの発症の有無の関連は認められなかった。

### 喘鳴性疾患発症群と非発症群の比較

		Wheezing infants		p	Odd (CI)
		+	-		
		n=35	n=178		
帝王切開		9	20	0.027	2.735 (1.124-6.655)
母乳		22	94	0.277	0.661 (0.314-1.395)
アトピー性皮膚炎		5	22	0.375	0.846 (0.297-2.410)
乳児湿疹		6	20	0.333	1.634 (0.605-4.419)
父家族歴	全て	19	93	0.825	0.921 (0.445-1.907)
	喘息と湿疹	9	26	0.110	0.494 (0.208-1.173)
	喘息	4	14	0.492	0.662 (0.204-2.144)
母既往歴	全て	15	55	0.171	0.596 (0.284-1.251)
	喘息と湿疹	8	14	0.011	0.288 (0.110-0.752)
	喘息	2	8	0.756	0.776 (0.158-3.822)
妊娠中	細菌感染	6	23	0.507	1.394 (0.522-3.723)
	ウイルス感染 <sup>2)</sup>	19	73	0.150	1.708 (0.824-3.541)
	発熱	4	14	0.491	1.512 (0.466-4.898)

#### 5) 皮膚バリア機能との関連について

AD発症群では、頬部や額部の表面水分量は、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。



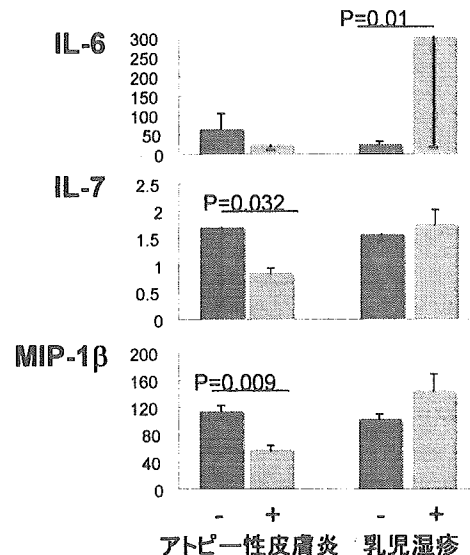
#### 6) 臍帯血サイトカインとの関連について

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。喘鳴発症群では、測定した全てのサイトカインに関して、非発症群と比較して、有意な差は認めなかったが、喘鳴あるいはAD発症群においては、有意な差も認めた。

#### 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、および家族歴との関連に関しては、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、Th1系、Th2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-1 $\beta$ 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-1 $\beta$ 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-1 $\beta$ は、予測因子になる可能性が示唆された。

#### E. 研究発表

1) 杉山幹雄、荒川浩一、森川昭廣他：新生児および1ヶ月時の皮膚バリア機能測定と乳児アトピー性皮膚炎発症の関連についての検討

第54回日本アレルギー学会 2004.11 (横浜)

2) 杉山幹雄、荒川浩一、森川昭廣他：新生児期における皮膚水分量指標と 在胎・出生歴の関連についての検討 日本小児アレルギー学会 2004.11 (東京)

3) 杉山幹雄、荒川浩一、森川昭廣他：乳児アトピー性皮膚炎発症因子に関する前方視的検討 第17回日本アレルギー学会 2005.5 (岡山)

4) 杉山幹雄、荒川浩一、森川昭廣他：乳児反復性喘鳴の発症因子に関する前方視的検討 第55回日本アレルギー学会 2005.11 (盛岡)

5) 荒川浩一、杉山幹雄、森川昭廣他：新生児および1ヶ月時の皮膚バリア機能測定と乳児アトピー性皮膚炎発症の関連についての検討 日本小児科学会 2005.4 (東京)

#### 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.

Allergy 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.

Allergy 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 卷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 卷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：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。環境要因の重要な1つにウイルス感染がある。IgE 産生抑制系と IgE 産生系の分子と遺伝子に着目し、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。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ことが示唆された。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（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	岐阜大学医学部附属病院 小児科 助手
金子英雄	岐阜大学医学部附属病院 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 兼任講師
川本典生	岐阜大学医学部附属病院 小児科 医員

#### A. 研究目的

気管支喘息などアレルギー疾患は、遺伝的要因と環境要因とが絡み合って発症する。遺伝的要因について、私共はアレルギーの病因となる遺伝子およびその発現の異常を解析してきた。このうち、IgE 産生制御機構の破綻を来す IL-12 R $\beta$ 2 鎖遺伝子異常を、さらに IL-18 R $\alpha$  鎖遺伝子異常をそれぞれ世界で初めて見出した。

一方、環境要因の重要な1つにウイルス感染がある。日常診療で RSV などのウイルス感染に引き続いて、気管支喘息発作が誘導されることはしばしば経験する。私共は、遺伝的要因とウイルス感染など環境要因との直接的な関わりを明らかにするため、遺伝子生態医学 (genetic ecological medicine Kondo N, による) とでもいうべき分野を新たに開拓して、環境要因が遺伝子・分子およびその発現に直接的に与える影響を検討している。このうち IgE 産生抑制系と IgE 産生系の分子と遺

伝子の発現に及ぼすウイルス感染の影響につき、幾つかの evidence を得たので報告する。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ので報告する。

#### B. 研究方法

(1)アレルギー患者および非アレルギー患者の末梢血リンパ球、単球分画を用いて検討した。検討項目は RS あるいはインフルエンザウイルス感染時、非感染時のサイトカイン産生量を測定した。MIMIC 法により PCR を用いて IFN- $\gamma$  の mRNA を定量した。IgE 産生に及ぼす感染、インターフェロンの影響として、IFN- $\alpha$  と IFN- $\beta$  が germline C $\epsilon$  transcript の発現に及ぼす効果につき PCR を用いて検討した。

(2)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マーカーの解析を行い、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。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、尿中のアラキドン酸代謝物質の測定を行った。また、喘息関連遺伝子の検索を行った。

(3) 臍帯血と生後6ヶ月の免疫バランスの変化を比較検討するために、同意を得た患者から出生時の臍帯血を採取し、生後6ヶ月に医師による診察と採血を行い、各々の血清 IgE 値を測定し、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解析した。

(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 Consent) 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。

C. 研究結果

(1) ウイルス感染前後に、特にアトピー群では IL-4 の産生には大きな変動がなかったのに対し IFN- $\gamma$  は大きな変動を示した。また IFN- $\gamma$  を産生誘導する IL-12 にも一部に変動がみられた。さらに、この変動につき、MIMIC 法により PCR を用いて IFN- $\gamma$  の mRNA を定量したところ IFN- $\gamma$  のタンパク量に相当して IFN- $\gamma$  の mRNA の発現量が増減を示した。すなわちウイルス感染による IFN- $\gamma$  のタンパク量の変動は mRNA の発現によって規定されていることが明らかになった。

(2) ウイルス感染時に産生誘導される IFN- $\alpha$  と IFN- $\beta$  が germline C $\epsilon$  transcript の発現に及ぼす効果につき PCR を用いて検討した。この transcript は IgE へのクラススイッチに重要である。その結果、IFN- $\alpha$  と IFN- $\beta$  は germline C $\epsilon$  transcript の発現を明らかに増加させた。このことからウイルス感染による IFN- $\alpha$  や IFN- $\beta$  の産生が germline C $\epsilon$  transcript の発現を増加させ、ひいては VDJ-C $\epsilon$  へのクラススイッチを促進させることが考えられた。

(3) 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- $\gamma$ , 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- $\gamma$  の産生が急性期に比べて有意に増加することがわかった。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。

(4) 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)。

(5) 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。(図 3)

(6) 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- $\gamma$  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。

(7) 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 4)。

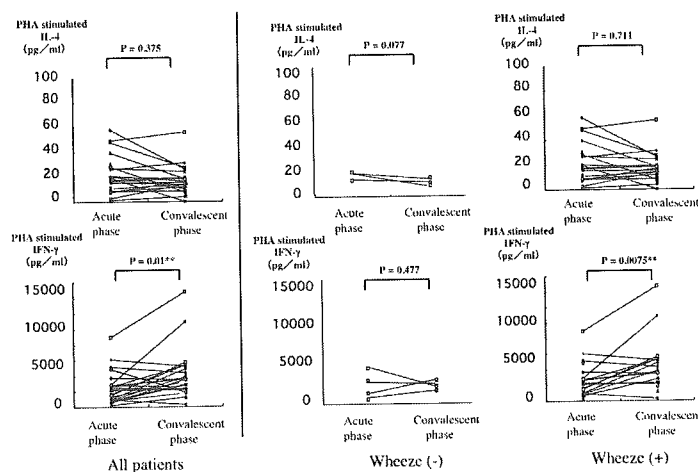


図 1 RS ウイルス感染時の末梢血単核球分画からのサイトカインの産生

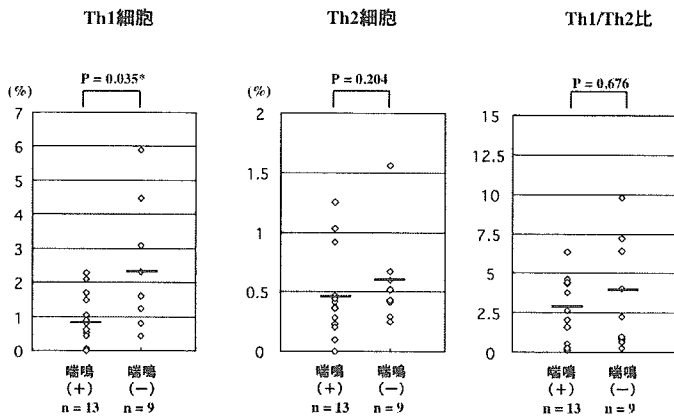


図2 6ヶ月以下のRSウイルス初感染時における末梢血中Th1, Th2細胞の割合

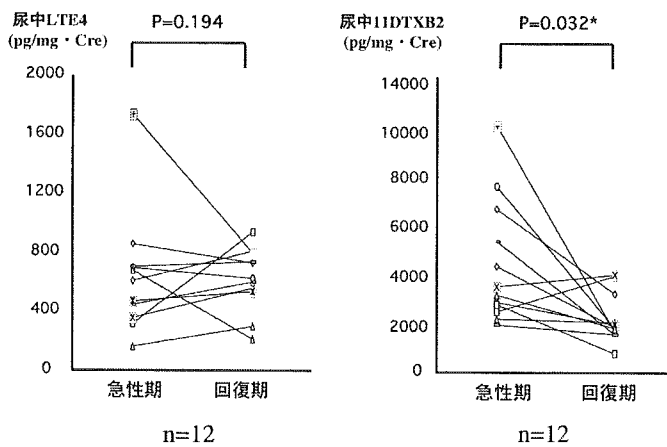
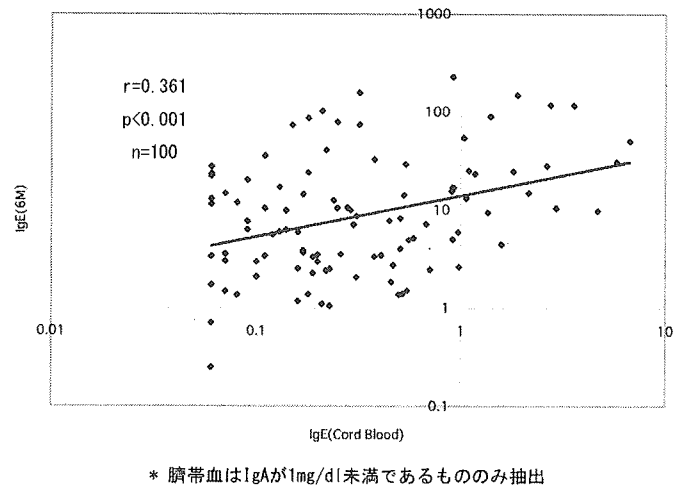


図3 RSV感染の期間の尿の尿中ロイコトリエンと11-デヒドロトロンボキサンB2レベル



\* 臍帯血はIgAが1mg/dl未満であるもののみ抽出

図4 臍帯血と生後6ヶ月のIgEの相関

#### D. 考察および結論

IFN- $\gamma$ はIgE産生抑制系の重要な分子である。ウイルス感染によるIFN- $\gamma$ の変動はTh1とTh2のアンバランスを来し、またIFN- $\gamma$ の減少はTh2を優位にし、ひいてはIgE産生の抑制がきかずに、その量に変化を来すものと考えられた。さらにウイルス感染によるIFN- $\alpha$ やIFN- $\beta$ の産生がgermline C $\epsilon$  transcriptの発現を増加させ、ひいてはVDJ-C $\epsilon$ へのクラススイッチを促進させることが考えられた。

特に、乳児喘息の発症・増悪因子として非常に重要なRSウイルスに感染時の免疫バランスの検討をさらに加えたところ、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、アレルギーや喘息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。アレルギー発症に関わる胎内因子として、臍帯血のデータを得た。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) Kato, Z., Jee, J., Shikano, H., Mishima, M., Ohki, I., Ohnishi, H., Li, A., Hashimoto, K., Matsukuma, E., Omoya, K., Yamamoto, Y., Yoneda, T., Hara, T., Kondo, N., Shirakawa, M: Structure of interleukin-18 and the binding mode. Nature Struct Biol. 10, 966-971 (2003)
- (2) Ohnishi, H., Kato, Z., Watanabe, M., Fukutomi, O., Ito, R., Teramoto, T., Kondo, N. Interleukin-18 is associated with the severity of atopic dermatitis. Allergology International.52,123-130. (2003)
- (3) Aoki, M., Matsui, E., Kaneko, H., Inoue, R., Fukao, T., Watanabe, M., Teramoto, T., Kato, Z., Suzuki, K., Suzuki, Y., Kasahara, K., Kondo, N. A novel single-



nucleotide substitution, Leu 467 Pro, in the interferon-gamma receptor 1 gene associated with allergic diseases. *Int J Mol Med.*12,185-191 (2003)

(4) Kondo, N., Matsui, E., Kaneko, H., Aoki, M., Kato, Z., Fukao, T., Kasahara, K., Morimoto, N. RNA editing of interleukin-12 receptor beta2, 2451 C-to-U (Ala 604 Val) conversion, associated with atopy. *Clin Exp Allergy* 34:363-368 (2004)

(5) Kondo, N., Matsui, E., Kaneko, H., Kato, Z., Teramoto, T., Shikano, H., Aoki, M., Ohnishi, H., Tatebayashi, K., Omoya, K., Kondo, M., Matsukuma, E., Kasahara, K., Morimoto, N. Genetic defects in downregulation of IgE production and a new genetic classification of atopy. *Allergy International.* 53:77-85 (2004)

(6) Yoshikawa K., Matsui, E., Inoue R., Kaneko H., Teramoto T., Aoki M., Kasahara K., Shinoda S., Fukutomi O., Kondo, N. Urinary leukotriene E4 and 11-dehydro-thromboxane B2 excretion in children with bronchial asthma. *Allergy International.* 53:127-134 (2004)

(7) Yamamoto, Y., Kato, Z., Matsukuma, E., Li A, Omoya, K., Hashimoto, K., Ohnishi, H., Kondo, N. Generation of highly stable IL-18 based on a ligand-receptor complex structure. *Biochem Biophys Res Commun.* 317:181-186 (2004).

(8) Omoya, K., Kato, Z., Kato, Z., Matsukuma, E., Li, A., Hashimoto, K., Yamamoto, Y., Ohnishi, H., Kondo, N. Systematic optimization of active protein expression using GFP as a folding reporter. *Protein Expr Purif.* 36:327-332 (2004).

(9) Asano T, Kaneko H, Terada T, Kasahara Y, Fukao T, Kasahara K, Kondo N. Molecular analysis of B-cell differentiation in selective or partial IgA deficiency. *Clin Exp Immunol.*136:284-90. (2004)

(10) Jiang, M., Tsukahara, H., Ohshima, Y., Zou, C., Ohta, N., Sato, S., Todoroki, Y., Hiraoka, M., Nambu, M., Tanaka, T., Yamaguchi, E., Kondo, N., Mayumi, M. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism in Patients with Bronchial Asthma. *International Medical Journal*11.

119-123 (2004)

(11) Tatebayashi 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)

(12) 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)

(13) 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)

(14) 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)

(15) 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) 近藤直実 : 会長講演 : アレルギーのオーダーメイド治療と21世紀型ポストゲノム. 日本小児アレルギー学会 (第40回) (2003年10月3日, 岐阜)

(2) 近藤直実, 松井永子, 加藤善一郎, 金子英雄, 深尾敏幸, 伊上良輔, 寺本貴英, 福富悌, 篠田紳司, 青木美奈子, 大西秀典, 笠原由貴子, 山本裕, 吉川かおり, 浅野勉, 長瀬朋子, 橋本和幸, 李愛蓮, 松尾直樹, 面家健太郎,

近藤應, 館林宏治, 船戸道徳, 松隈英治: シンポジウム: IgE 産生抑制系の遺伝子解析とその応用. 日本アレルギー学会総会 (第 53 回) (2003 年 10 月 25 日, 岐阜)

(3) 近藤直実: シンポジウム: 司会: 司会の言葉 アレルギーのゲノム解析とその臨床応用. 日本アレルギー学会春季臨床大会 (第 15 回) (2003 年 5 月 12 日, 横浜)

(4) 松井永子, 加藤善一郎, 浅野勉, 寺本貴英, 伊藤玲子, 青木美奈子, 長尾みづほ, 笠原貴美子, 近藤直実: シンポジウム: ウイルス感染におけるアレルギー病態の分子メカニズム. 日本アレルギー学会総会 (第 53 回) (2003 年 10 月 25 日, 岐阜)

(5) 近藤直実: イブニングシンポジウム 2: ウイルス感染と喘息・アレルギー — 遺伝子生態医学の視点から—. 日本呼吸器学会学術講演会 (第 44 回) (2004 年 3 月 31 日, 東京)

(6) 青木美奈子, 松井永子, 近藤直実 他: RS ウイルス感染と気管支喘息発症についての検討. 日本アレルギー学会 春期臨床大会 (第 16 回) (2004 年 5 月 12 日~5 月 14 日, 群馬)

(7) 青木美奈子, 松井永子, 近藤直実 他: ウイルス感染と免疫アンバランス. 日本小児アレルギー学会 シンポジウム (第 41 回) (2004 年 11 月 27 日~11 月 28 日, 東京)

(8) 近藤直実: イブニングシンポジウム 2: ウイルス感染と喘息・アレルギー — 遺伝子生態医学の視点から—. 日本呼吸器学会学術講演会 (第 44 回) (2004 年 3 月 31 日, 東京)

(9) 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, ソウル)

(10) 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, ソウル)

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

(12) 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)

(13) 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)

(14) 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)

(15) 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~. 日本小児アレルギー学会 (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  
胎外因子としての喫煙曝露・菌体成分  
分担研究者：大田 健 帝京大学医学部内科学講座教授

アレルギー性気道炎症及び気道過敏性は気管支喘息病態の重要な因子であり、その形成・獲得には遺伝的因子と種々の胎外因子が後天的因子として関与している。我々は胎外因子として、増殖因子、大気汚染物質のディーゼル排気微粒子 (DEP)、エンドトキシンが気道炎症、気道過敏性を増悪させることを明らかにしてきた。本研究班においては、胎外環境因子として、平成15年度は喫煙曝露を、平成16~17年度は種々の菌体成分のアレルギー性気道炎症に及ぼす影響について検討した。

喫煙曝露は単独で気道過敏性を惹起する方向には働かないものの、長期曝露により、好中球性気道炎症を惹起し、その悪化にはTNF- $\alpha$ およびMIP-2が関与していることが示唆された。本結果は喫煙が気道過敏性惹起に直接働かないことを示したものの、喘息患者に喫煙を許可するという形に解釈されるものではなく、同様に扱われている非特異的な刺激物質の気道への作用機序が異なることを示唆する所見である。

また、気管支喘息増悪の原因として感染が深く関与していることが疫学的に報告されているが、10種のヒトToll-like receptor (TLR)が近日同定されて以降、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リガンドの気道上皮細胞に及ぼす影響を*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、気道上皮細胞死を惹起することを明らかにした。平成17年度は、このdsRNAが*in vivo*で既存のアレルギー性気道炎症を増悪させようかどうかを、OVA喘息モデルマウスを用いて検討した。喘息病態形成後にpoly I:Cを追加点鼻すると気管支肺胞洗浄液 (BALF)中の好酸球、リンパ球が増加し、肺組織のアポトーシス細胞も増加、気道過敏性も亢進し、この過程へのRANTES, IL-4, IFN- $\gamma$ の関与が示唆された。poly I:Cはウイルス増殖過程で生成されるdsRNAのアナログである。種々のウイルスが*in vitro*で気道上皮細胞を活性化すること、*in vivo*で喘息モデルの病態を悪化させることが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かった。今回の*in vitro*, *in vivo*での検討により、ウイルスdsRNAが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 (元帝京大学医学部内科助教授、現武蔵野大学薬学部教授)、足立哲也 (帝京大学医学部内科講師)、中野純一 (元帝京大学医学部内科講師、現JA共済連)

## A. 目的

本邦では、いまだに喘息死患者が年3000人を越えている。気管支喘息病態においては、アレルギー性気道炎症及び気道過敏性が重要な因子であり、その形成・獲得には遺伝的因子と種々の胎外因子が後天的因子として関与している。我々は胎外因子として、増殖因子(平成11~13年度)、大気汚染物質のディーゼル排気微粒子(DEP)、エンドトキシンが気道炎症、気道過敏性を増悪させることを明らかにしてきた。本研究では、胎外因子としてさらに喫煙、感染が喘息病態に及ぼす影響を検討した。

喫煙が喘息病態に及ぼす影響は、直接気道収縮を引き起こす刺激物質として作用するのみならず、気道炎症を増悪させる喘息悪化因子として働くことも報告されている。平成15年度には、喘息モデルマウスの気道炎症、気道過敏性に喫煙曝露が及ぼす影響を検討した。

また、気管支喘息増悪の原因として感染が深く関与していることが複数の疫学的研究で明らかになっている。成人喘息増悪の80%に感冒様症状を認めること、学童喘息発作時には80%でウイルスが検出されることや、クラミジア、マイコプラズマによる増悪の可能性も報告されている。このような菌体成分を認識する受容体として10種のヒトToll-like receptor (TLR)が1997年に同定されて以降、菌体成分認識機構が急速に明らかになってきている。我々は、感染による喘息増悪機構を明らかにする目的で、喘息病態に中心的に関与することが想定されている好酸球におけるTLR発現、機能を検討し、ウイルス単鎖RNAの受容体であるTLR7/8リガンドが好酸球を活性化することを見いだしてきた。本研究ではまず、菌体成分の気道上皮細胞に及ぼす影響に注目した。

気道上皮細胞は外界環境からの最前線のバリアとして存在するが、ウイルス感染下ではケモカイン産生等を介して炎症を統御する一方、この結果惹起される過剰な炎症がアレルギー性炎症を増悪させる可能性も示唆されている。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が、その菌体成分認識機構には不明な点が多かった。平成16年度はTLRリガンドによる気道上皮活性化を*in vitro*で網羅的に検討することで、アレルギー疾患増悪に関わる胎外因子としての菌体成分を同定することを目的とした。さらに、平成17年度は、*in vitro*で同定された菌体成分が、*in vivo*の喘息モデルマウスのアレルギー性気道炎症をいかなる機序で増悪させるかを検討した。