

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 (国立病院機構福岡病院 統括診療部長)

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我々はこの3年間で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。

全国6地区の医療機関の外来患者に対して問診票による調査を行い、妊娠中、また出生後の感染やアレルギー疾患の状態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与することが示唆された。具体的には、妊娠中の母親のアレルギー症状、感染の数、また生後早期の感染、喫煙の関与が明らかにされた。また、RSウイルス感染について検討したが、これに関しては家族歴の重要性が確認された。

また、過去3年間にわたり、福岡市内の3地区6小学校の疫学調査を行い、呼吸器症状のみとめられる児においては肺機能と血液学的調査を実施。その値について分析した。また、呼気中のNOについても測定可能な症例では検討し、3年間の結果をまとめて検討した。その結果、喘息群は寛解群に比べ、末梢気道の閉塞が強いこと、また血清IgE値が寛解群に比べて明らかに高値であった。呼気中のNOは関連がみられなかった。また近年、one-airway one-diseaseが提唱されているが、鼻炎症状をみとめたものでは特に低学年においては喘息が寛解し難いことがわかった。

今後、これらの因子に対しての追跡研究により、年齢ごとの関与因子を明らかにしていきたい。

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 国立病院機構福岡病院小児科
川野 豊 横浜赤十字病院小児科部長
手塚純一郎 国立病院機構福岡病院小児科
渡辺美砂 東邦大学医学部小児科
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。われわれの西日本同一小学校の児童調査では、喘息 (BA) 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。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。そこでこれらの胎内・胎外因子の関与について、特に感染やアレルギー疾患の状況の発症への関与を明らかにしていくことを目的とする。

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、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。2003年度は1歳、2004、5年年度は2歳の子供のアレルギー疾患の発症に影響する因子について、母親の妊娠分娩歴、栄養、予防接種歴、ペット、喫煙環境、特に受動喫煙、既往歴、アレルギー疾患の有無について調査した。

また、international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC) 調査、および21年間持続している、福岡市内3地区6校での米国胸部疾患学会肺疾患部門 (American Thoracic Society Division of Lung Diseases : ATS-DLD) の質問票 (ATS-DLD 版) による調査を検討した。4校では1年生全員と、2~6年生は、前年にBAや呼吸器症状の認められた者について行った。残りの2校は1~6年生全員を対象とした。

胎外因子として、RSウイルス (以下、RSV) についての、国立病院機構福岡病院に平成12年11~16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名を対象に背景因子・予後について検討した。

また、アレルギーの早期発見のためにはIgE RAST値は必ずしも有効ではないため、これに代わる方法を検討した。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。

C. 研究結果

(1) 妊娠中の母親の状態：妊娠母体のアレルギーの症状の数が多いほど、子供の BA 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 BA 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 BA の発症率は相関した。

(3) 予防接種 (3 種混合) の接種回数が少ないほど、BA が発症しやすく、BCG 非接種群では、接種群に比べて BA の発症が有意に多かった。

(4) 出生時の体重は 1 歳時点ではアレルギーあり 3039 ± 457 g、アレルギーなし 2962 ± 427 g と有意な差がみられたが 2 歳児ではアレルギーあり 3060 ± 362 g はアレルギーなし 3008 ± 440 g に比べ高い傾向にあったが有意ではなかった。1 歳児にみられた在胎週数の関連は明らかでなかった。

(5) 栄養法との関連に関しては、1 歳では母乳のほうが人工乳よりもアレルギー有症率が高い疾患はアトピー性皮膚炎 (AD)、アレルギー性鼻炎 (AR)、食物アレルギー (FA) であり、母乳のほうが有症率の低いものは BA であった。統計学的に有意差があったのは BA のみであった。2 歳でもこの関係は変わらないが、AD、FA において母乳と人工乳の間に統計学的に有意差が認められた 1 年間で、AR 以外の疾患では明らかに母乳群では有症率が増加していた。BA でも有症率が増加するが、やはり母乳群の方が有症率が少なかった。

(6) 保育園の影響は 1 歳では明らかでなく 2 歳では通園の者に BA が多かった。有毛ペット保有群で、1 歳児における AD の発症率が有意に高く、2 歳における BA の発症率が高かった。

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、また遺伝的要因が児のアレルギー発症に関与することが示唆された。

(7) 福岡市での問診票調査では、BA の有症率と生後早期の環境因子との関係を検討した。ペット、喫煙、幹線道路の交通量として 1 日のトラックの走行数、食事内容、生後の抗生物質の使用などとの関係を検討したが、これらの因子と BA 有

症率との間に関係はなかった。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 BA 有症率には関連があった。家族の喫煙を「妊娠中から」と「生後から」で区別すると、「生後から」の喫煙群が非喫煙群に比べ児の BA の発症が多い傾向にあり。生後 2 年以内の上気道感染、BA の家族歴、保育環境は BA 有症率に関連がみられた。

(8) 小学校の BA 群と BA 寛解群の差についての検討では、%FVC、%PEF は全ての学年で有意差がなく、%FEV_{1.0} は 2 年生で、%MMF、%V₅₀ は、2 年生と 4 年生で、%V₂₅ は、2、4、5 年生で有意差があった。また、log(IgE) については、4 年生以外で有意差を認め、小学生ではアレルギーの関与の強いことが認められた。

呼気中の NO の値は寛解とは関係がなかった。高感度 CRP は明らかな関連が見出せなかった。

また AR 合併については、小学校 1、2 年生では AR のあるもので明らかに寛解が少なかった。小学校 3 年生以上ではこの関与はなかった。

(9) 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 T_H1 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 OVA 0.1 μg/ml、1 μg/ml の低濃度では 2.44 ± 0.46%、2.50 ± 0.51% であったが 10 μg/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 T_H1 球亜群においては、非刺激群と比較して OVA 0.1 μg/ml、1 μg/ml、10 μg/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。一方、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 T_H1 球亜群、CD8 陽性 T_H1 球亜群両方において、非刺激群と比較して OVA 0.1 μg/ml、1 μg/ml、10 μg/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。以上より、濃度依存性に症状とよく相関する結果が得られた。

D. 考察

これまでの報告から、小児期のアレルギー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_H1 球は出生前の胎児期からすでに認められ、アレルギーに対する胎内感作の可能性も指摘されている。本研究では出生前後の母体の症

状、生後の子供の罹患した疾患、症状、栄養、予防接種歴、およびペット・喫煙などの環境要因とアレルギー発症との関連を検討した。病院受診者のうち本研究に理解の得られた対象者をできる限り多く含むように努めた。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。

妊娠中の母親の状態についての報告は少ないが、最近、海外での検討でも、われわれと同様に、生後早期の上気道感染、集団保育環境、出生時の体重も関連があるとの結果が報告されている。これらの報告はいわゆる衛生仮説と異なる点もある。胎内、胎外環境の各影響因子はどのくらいの期間持続するのかが明らかではない。それぞれが、総量と質との関係において、さらに検討される必要がある。影響されてしまった場合に、何処まで、対策を持続するかも明らかにする必要がある。

また、小児では寛解が認められることから、寛解因子、増悪因子が胎外因子として重要である。過去2年間の症状の有無により、現症と寛解を分け差異を検討した。小学生ではアレルギーが大きな因子であった。また、近年 one-airway one-disease の考えもあるが、低学年では明らかに鼻炎がみられた方が予後が悪かった。

呼気中の NO に関しては、両群間で有意な差はなかった。BA の有無とは関連があるが、予後とは関連がなかった。

E. まとめ

出生前後の子供の免疫系に影響を与える因子のうち、感染とアレルギー症状に関する直接・間接の因子が重要であった。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が、これらの因子を更に詳しく検討することによって確認し、因子を除去、予防した場合の効果を検討することで、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。

F. 研究発表 (論文発表)

1. 川野豊, 森川みき, 渡邊美砂, 野間 剛, 小田嶋博 1 歳児のアレルギー疾患の発症に関与する因子に関する検討. 日小ア誌 17 (3) : 246-254. 2003.
2. 小田嶋 博 : 生活環境と喘息, 喘息 16 (3) : 65-71, 2003.
3. 小田嶋博 : 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) : 125-131. 2004.

4. 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
5. 小田嶋 博 : 喫煙と気管支喘息. 呼吸器科. 6 (6) : 567-575. 2005.
6. 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.
7. 小田嶋博 : 気管支喘息の診断と疫学 - 諸外国との比較 -. カレントセラピー 23 (4) : 8-13. 2005.
8. 小田嶋 博 : アレルギー疾患の疫学. Pharma Medica 23 (4) : 13-17. 2005.
9. 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.
10. Kawano Y, Morikawa M, Watanabe M, Ohshiba A, Noma T and Odajima H : Fetal growth promotion in allergic children. Ped. Allergy & Immunology 16 : 354-356. 2005.
11. 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 Journal of Allergy and Immunology 23, 1-6. 2005.
12. 小田嶋 博 : 喫煙の気管支喘息への影響. 日本小児アレルギー学会誌 19 (3) : 237-246. 2005.
13. 小田嶋博 : 小児気管支喘息の発症パターンと原因・危険因子の多様性. 喘息 18 (4) : 15-20. 2005.
14. 小田嶋博, 藤野時彦, 岡尚記, 濱崎雄平, 市丸智浩, 水元裕二, 松本重孝, 是松聖悟, 大庭健一, 熊本俊則, 野原薫 : 小児気管支喘息患者と保護者の Quality of Life の検討 - 九州・沖縄地区, 多施設検討報告 - アレルギー 54 (11) : 1260-1271. 2005. (学会発表)
1. 川野豊, 小田嶋 博, 他 : 小児アレルギー疾患の発症の予知に関する検討 (4 報) : 出生前の要因について. 第 53 回日本アレルギー学会. H. 15.10.23-25. 岐阜.
2. 川野豊, 小田嶋博, 他 : 小児アレルギー疾患の発症の予知に関する検討 (3 報) : 出生前の要因について. 40 回日小児アレルギー学会. H. 15.10.3-4. 岐阜.
3. 森川みき, 小田嶋博他 : 生後 1 年間の病歴とアレルギー疾患の発症に関する検討 (2 報) 第 15 回日本アレルギー学会春季大会. H. 15.5.12-14. 横浜.
4. 渡邊美砂, 小田嶋博他 : 小児アレルギー疾患発症の予知に関する検討 (7 報) : 1 歳児と 2 歳児の比較. 第 55 回日本アレルギー学会. H. 17.10.20-22. 岩手

- 小田嶋 博：喘息の発症の疫学. シンポジウム 12 乳児喘息 Most Early Intervention. 第 15 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 平成 15 年 5 月 12-14 日. 横浜.
5. 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.
 6. 小田嶋 博：「疫学的に見た喘息の病態と治療」、島根県小児医会、平成 16 年 5 月 30 日、島根.
 7. 小田嶋 博：「小児気管支喘息と喫煙の関連性」、第 21 回日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会、平成 16 年 6 月 19-20 日、宇都宮.
 8. 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.
 9. 柴田瑠美子、西尾 健、畠添路世、小田嶋 博、西間三馨、寺尾 浩：「3. 福岡市における乳幼児アトピー性皮膚炎の頻度と家族の疾患に対する意識調査」、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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 本村知華子、久保田典里子、井手康二、手塚純一郎、小林 博、渡辺恭子、岡田賢司、小田嶋 博、西間三馨、山田篤伸：「気管支喘息小児のアレルギー性鼻炎・喘息重症度と肺機能との関連」、第 41 回日本小児アレルギー学会、平成 16 年 11 月 27-28 日、東京.
 14. 手塚純一郎、井手康二、久保田典里子、小林博、本村知華子、岡田賢司、小田嶋 博、下田照文、西間三馨：「小児気管支喘息における気道炎症の評価～呼気中 NO および高張食塩水による誘発喀痰を用いて～」、第 41 回日本小児アレルギー学会、平成 16 年 11 月 27-28 日、東京.
 15. 小田嶋 博：小児喘息の成人への移行-QOL を考えながら. 第 5 回千葉喘息フォーラム. 平成 17 年 2 月 10 日. 千葉.
 16. 小田嶋 博、本村知華子、手塚純一郎、井手康二、西間三馨：小児気管支喘息におけるゴキブリ抗原に関する検討. 第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 平成 17 年 6 月 2-4 日. 岡山.
 17. 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. 平成 17 年 6 月 11 日. 東京.
 18. Nogami H., Kamikawaji N., Odajima H., Shimoda T., Shoji S. and Nishima S. : The predicting factors of airway hyperresponsiveness in the patients suffering from chronic cough. ATS 2005 San Diego International Conference.
 19. 小田嶋 博：小児喘息における早期介入. イブニングシンポジウム 10. 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 平成 17 年 10 月 20-22 日. 岩手.
 21. 本村知華子、久保田典里子、森安善生、ケイジ・スピヤント、手塚純一郎、渡辺恭子、岡田賢司、小田嶋 博、西間三馨、山田篤伸：気管支喘息幼児の喘息重症度と肺機能・アレルギー性鼻炎との関連. 第 42 回日本小児アレルギー学会. 平成 17 年 11 月 19-20 日. 福井.

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

背景と目的：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。

方法：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。気道組織は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。BALFは好酸球数と各種サイトカイン濃度(IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12、TNF- α 、IFN- γ)の経時的変化を検討した。

結果：1. 気道過敏性亢進：成熟マウスにおいては8週まで持続したが、幼若マウスでは4週の時点ですでに消失していた。2. 気道の組織学的変化：粘液分泌細胞は成熟マウスでは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。3. BALF中好酸球増多：曝露1週に比べ、両群の動物とも経時的に減少傾向を示したが、幼若マウスがより顕著であった。4. 両群の動物ともTh2サイトカインであるIL-4は1,2週で有意に高値を示した。幼若マウスでは成熟マウスと異なり、1,2週において、Th1サイトカインであるIL-2も有意に増加した。

考察：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。幼若マウスでは成熟マウスに比べて気道炎症、気道過敏性亢進とも早期に収束することが明らかになった。その機序は不明であるが、気道局所のサイトカイン産生の違いが異なる炎症の進展様式をもたらしている可能性が示唆された。

大木康史

群馬大学医学部
周産母子センター講師

黛 博雄

群馬県立小児医療センター
新生児科医長

A. 研究目的

小児喘息では疫学的に寛解例が多いこともあり、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は成人と異なる可能性がある。その原因として気道リモデリングに対する関与が推測されている GM-CSF、TGF- β などのサイトカインや増殖因子の役割が小児では異なっており、その結果生じる気道リモデリングの状態が異なっている可能性がある。しかしながら、気道リモデリングに年齢による差異があるのか検討した報告は殆どない。我々は小児喘息における気道リモデリングの特徴を検討し、気道におけるサイトカインの役割の年齢による差異を検討することが小児喘息が成人喘息と大きく違う点、即ち寛解が存在するという点についてそのメカニズムを知るうえで重要と考えている。

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变化を検討し、どのようなサイトカイン、増殖因子がこれらの変化に関与するかを同定するのを目的とした。

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、 $10 \mu\text{g}$ 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、気道過敏性を測定後、気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取し、更に気道組織を摘出した。

2. 気道過敏性の測定

気道過敏性は無拘束マウスに対し、霧化した 2 倍希釈系列のメサコリンを薄い濃度から順次吸入させることにより評価した。即ち、マウスを barometric plethysmographic chamber (Buxco electronics, Sharon, CT, USA) に入れ、連続的に pressure-time wave を測定した。気道閉塞の指標としては enhanced pause (Penh) を用いた (図 2)。Penh は気道抵抗と高い相関性を有することが知られている。メサコリン吸入は超音波ネブライザー (NE-U12, Omron) にて行ない、呼吸状態は各濃度のメサコリン吸入ごとに 3 分間記録し、平均値を求めた。気道過敏性の指標として、penh が前値の 200% を越えたメサコリン濃度を気道感受性 (sensitivity) とし、メサコリン最終濃度における penh の絶対値を気道反応性 (reactivity) とした。

3. BALF の採取と好酸球、サイトカインの測定

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。PBS の注入量は、チャレンジ開始後

1、2週後の幼若マウスでは0.3ml、4、8週後の幼若マウスでは0.4mlであった。成熟マウスはいずれのチャレンジ後も0.4ml採取した。BALFは800rpmで5分間遠沈して上清をサイトカインの測定に供した。沈殿物は0.3ml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。

BALFの上清について、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12、TNF- α 、IFN- γ をBio-Plexサイトカインアッセイキットを用いて測定した。

4. 気道の組織学的評価

BALF採取後、肺をエタノール液にて充填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. 気道過敏性の経時的変化

気道過敏性は、曝露1週後では両群ともに同等の亢進を認めた。その後、曝露期間に比例して気道過敏性の亢進は減弱傾向を示したが、成熟マウスでは8週の時点まで持続していた。一方、幼若マウスでは4週の時点ですでに気道過敏性亢進は消失した。

2. BALF中好酸球数

曝露1週後では、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あった。

3. 気道の組織学的変化

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。

4. BALF中サイトカイン

成熟マウスではTh2サイトカインであるIL-4のみ1,2週で有意に高値を示した。4,8週ではIL-4は有意の増加は認められなくなった。幼若マウスでも成熟マウスと同様にIL-4は1,2週で有意に高値を示し、4,8週では有意の増加は認められなくなった。一方、成熟マウスと異なり、幼若マウスでは1,2週において、Th1サイトカインであるIL-2も有意に増加した。

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。

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。また、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。

幼若マウスで成熟マウスに比べて気道炎症、気道過敏性亢進ともに早期に収束する理由を明らかにする目的で気道局所のサイトカイン産生を測定した。その結果、Th 2 サイトカインである IL-4 の時間的变化は幼若マウスと成熟マウスで差を認めなかったが、Th 1 サイトカインである IL-2 は幼若マウスでのみ有意に高値であった。このことは炎症の進展に伴い産生されるサイトカインの量あるいは質が生体の成熟段階によって異なること、その結果気道炎症の進展が異なってくる可能性を示唆しており興味深い。今後アレルギー性炎症におけるサイトカイン、特に炎症を収束に向かわせる方向に働くサイトカインや増悪させる方向に働くサイトカインが同定されれば、喘息の予後を変えうる治療薬の開発に結びつく可能性があり、興味深い。

E. 研究発表

1. 論文発表

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.

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

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

Mochizuki H, Arakawa H, Tokuyama K, Morikawa A. Bronchial sensitivity and bronchial reactivity in children with cough variant asthma. *Chest* 2005 128:2427-2434

徳山研一：小児気管支喘息のリモデリングとアーリーインターベンション-特集に寄せて-。アレルギーの臨床 23 (10) 758, 2003

徳山研一：粘液分泌細胞。アレルギーと免疫 10(8):56-61, 2003.

徳山研一：気道リモデリング。最近話題の用語-知っておきたい豆知識〈小児科増刊号〉44: 137, 2003.

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.

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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 徳山研一: プロカテロールドライシロップ. 呼吸 24(8):687-693, 2005.
- 徳山研一: 小児の発熱. 健康通信(発行:上毛新聞社出版局) 第4号 30-31, 2005.
- 徳山研一、海老沢元宏、David B Allen: 小児喘息の吸入ステロイド療法における安全性. International review of asthma 7(1):8-28, 2005.
- 徳山研一: “ニューロペプチド研究会”のあゆみ. アレルギーと神経ペプチド 1:45-48, 2005.
- 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.
- 森川昭廣、滝沢琢己、徳山研一: 気管支喘息におけるプロピオン酸ベクロメサゾン (HFA-134a-BDP: キュバールTM) の使用経験. VII. 今後の展開～小児領域を中心に～. アレルギー・免疫 12(3):114-119, 2005.
- 鈴木雅登、徳山研一: 小児における咳嗽と喘息. 呼吸と循環 53(6): 589-594, 2005.
- 鈴木雅登、徳山研一: 小児気道感染とアレルギー. Pharma Medica 23(4): 23-28, 2005.
- 河野美幸、徳山研一: 受動喫煙と小児喘息. アレルギーの臨床 25(5):361-365, 2005.
- 水野隆久、徳山研一: ウイルス感染と喘息. ALLERGIA TRENDS 7(2):10-13, 2005.
- 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.
- 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.

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

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 気道感染ウイルスのひとつである RSV 感染は、細気管支炎の発症や罹患後の反復性喘鳴さらに小児気管支喘息の発症に関連する胎外因子のひとつであり、気管支喘息増悪因子としても重要視されている。今回、RSV 感染が、気管支喘息発症や増悪にどのように関与しているかを解明する目的で、ヒト気道上皮細胞 (A549) における RSV 感染によって発現誘導する遺伝子群を、Gene Chip (Affymetrix) を用いて網羅的に解析を行った。その結果、A549 細胞における RSV 感染によって、対照 (非感染細胞) と比較して、I 型 IFN 誘導遺伝子群 (IFIT1, ISG15 など)、炎症性サイトカイン群 (IL-6, IL-1 β など)、CC および CXC ケモカイン群 (RANTES, MCP-1, IL-8 など) が強く発現していた。さらに、同様の方法を用いて、RSV 感染が A549 細胞において誘導する気道リモデリング関連分子 (特に成長因子と MMP) の発現を網羅的に解析した。その結果、A549 細胞における RSV 感染によって、対照と比較して、IGFBP1, VEGF, FGF, TGF などの約 20 種の成長因子と、MMP 1, 7, 10, 14 の 4 種の MMP が感染後 48 時間以降に特に強く発現していた。以上の成績から RSV 感染は、気道上皮細胞において感染防御や気道炎症細胞浸潤さらに気道リモデリングに関与する遺伝子群を発現誘導し、気管支喘息の発症や増悪の病態に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。一方、近年、気道ウイルスに対する宿主側の免疫応答の個体差が、気道ウイルス感染による気道アレルギー疾患発症に関連するとの報告が散見されている。そこで、宿主側の Th1・Th2 バランスと、RSV 感染との相互関連を明らかにする目的で、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同様に解析し比較検討した。その結果、RSV 感染のクラスタリングによる遺伝子発現パターンは、IFN- γ 前処置 + RSV 感染によるそれとは相違していた。また、IFN- γ 前処置 + RSV 感染と比較して、RSV 感染で強く発現を示した遺伝子の中には、RANTES, CCL20 (LARC), CXCR4, ICAM-1, VEGF, MMP-1, MMP-10, IL-1 β などが含まれていた。以上より、宿主側の感染前の十分な IFN- γ の存在は、RSV 感染による気道炎症に及ぼす種々の遺伝子発現を抑制する可能性が示唆された。したがって、宿主側の感染前の Th1・Th2 バランスは、RSV 気道感染による気道炎症の病態に大きく関与していることが考えられた。

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

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、罹患後も喘鳴が遷延し喘息に移行する報告もある。また、近年、胎内または生後早期の初

期免疫応答が、その後の適応免疫応答に重要な影響を与えることから、宿主側素因が、気道ウイルス感染による気道アレルギー疾患発症に関連するとして報告が散見される。今回我々は、RSV感染が、気管支喘息発症や増悪にどのように関与しているかを解明する目的で、RSV側(以下a)からと宿主(個体)側(以下b)からのアプローチを、Gene Chip(Affymetrix)を用いた網羅的な遺伝子発現解析の方法で試みたので報告する。

・B. 研究方法

a: A549細胞(ヒトII型肺胞上皮細胞)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。

b: A549細胞にTh1サイトカイン(IFN- γ)およびTh2サイトカイン(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(long株)を1時間感染させ、洗浄後培養した。感染の対照として1%FCSを用いた。96hr後に感染細胞を回収し、total RNAを抽出、同様の方法で遺伝子発現量を定量的に検討し解析した。

C. 研究結果

a: シグナル値100を超えた検出可能な約12,000の遺伝子のうち、1)A549細胞におけるRSV感染によって、対照と比較して、約50~200種類の遺伝子が強く発現誘導された(Fig. 1)。2)これらにはI型IFN誘導遺伝子群(IFIT1,ISG15など)、炎症性サイトカイン群

(IL-6,IL-1 β など)、CCおよびCXCケモカイン群(RANTES,MCP-1,IL-8など)が含まれていた(Fig. 2-5)。3)I型IFN誘導遺伝子群は、RSV感染早期から強く発現し、96時間後も持続していた。4)炎症性サイトカイン群は、RSV感染後48時間をピークとする発現が認められた。5)ケモカイン群においても、感染後48時間をピークとする発現が認められた。しかし、CCケモカイン群のうち、Th2反応、好酸球遊走活性を示すMDC, Eotaxin, TARCの強い発現は認められなかった。6)72種の成長因子のうち約20種が対照と比較して強く(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(Table 1)。7)23種のMMPのうちMMP 1,7,10,14が対照と比較して48時間以降に強く(2倍以上)発現していた(Table 2)。

b: 1)シグナル値100を超えた検出可能な13,560の遺伝子のうち、対照と比較して強く(2倍以上)発現した遺伝子数は、RSV感染;1542、IFN- γ 前処置+RSV感染;390、IL-4前処置+RSV感染;1285だった(Fig.6)。2)RSV感染およびIL-4前処置+RSV感染のクラスタリングによる遺伝子発現パターンは類似しており、IFN- γ 前処置+RSV感染による遺伝子発現パターンとは相違していた。3)IFN- γ 前処置+RSV感染と比較して、RSV感染およびIL-4前処置+RSV感染で特に強く発現(2倍以上)を示した658の遺伝子の中には、RANTES, CCL20(LARC), CXCR4, ICAM-1, VEGF, MMP-1,MMP-10, IL-1 β などが含まれていた(Table 3)。

D. 考察

従来より、下気道ウイルス感染は、気道上皮

傷害や気道炎症, 気道過敏性亢進を誘導することが認識されている。今回の検討で、RSV 感染は、気道上皮細胞において I 型 IFN 誘導遺伝子群や炎症性サイトカイン, ケモカイン, 成長因子および MMP の気道リモデリング関連分子などを発現誘導することを確認した。したがって、RSV 感染は、少なくとも急性期には、これら遺伝子群の強力な刺激因子となり、気管支喘息と同様の主要な気道炎症細胞を活性化・誘導し、気道組織傷害や修復反応に関与する可能性が考えられた。

一方で、下気道ウイルス感染の罹患により、全例が気管支喘息を発症するわけではないことは明らかである。気道ウイルスと喘息発症との関連性を検討した最近の報告では、罹患する気道ウイルスの種類や暴露量, 感染のタイミング, 宿主側素因などの関与が挙げられている。今回の我々の検討では、ヒト気道上皮細胞における RSV 感染による遺伝子発現は、感染前の Th1 あるいは Th2 サイトカインの存在下で差異を認め、特に IFN- γ 前処置 + RSV 感染では、気道炎症に関連する遺伝子の抑制が認められた。このことは、宿主側に IFN- γ の存在が不十分な条件(生後早期の感染, アトピー素因の存在, アレルゲン感作がすでに成立している個体など)がある場合、RSV 感染による気道炎症が遷延し気管支喘息への進展につながる可能性を示唆していると考えられた。

E. 結論

RSV 感染は、気道上皮細胞において感染防御や気道炎症細胞浸潤さらに気道リモデリングに関与する遺伝子群を発現誘導し、気管支喘息の発症や増悪の病態に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。さらに、宿主側の感染前の Th1・Th2 バランスは、RSV 気道感染による気道炎

症の病態に大きく関与していることが示唆された。

F. 発表

1. 論文発表

- 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.
- Yamada Y, Yoshihara S, Arisaka O: 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: Endogenous cannabinoid receptor agonists inhibit neurogenic inflammations in guinea-pig airway. *Int Arch Allergy Immunol*, 138, 80-87, 2005.
- Yoshihara S, Yamada Y, Abe T, Lindén A, Arisaka O: Association of epithelial damage and signs of neutrophil mobilization in the airways during acute exacerbations of pediatric asthma. *Clin Exp Immunol*, in press, 2006.
- 吉原重美、山田裕美、小野三佳、福田典阿部利夫: 気道炎症のモニタリング、喀痰、ECP, LTE4, NO. 西間三馨/森川昭廣編, 図説: 小児喘息の特徴—病態と薬物療法を中心に—, メディカルレビュー社, pp. 104-129, 2003.
- 吉原重美: 気道炎症マーカーとしてのクレオラ体の検査. 小児外来診療のコツと落とし穴 1、小児喘息診療, 中山書店, pp22-23, 2003.

- ・山田裕美、吉原重美、有阪 治：気道ウイルス感染と喘息発症。小児科診療, 66: 1347- 1352, 2003.
- ・吉原重美、山田裕美、有阪 治：下気道ウイルス感染と喘息発症。医学のあゆみ, 207: 512-17, 2003
- ・吉原重美、山田裕美、有阪 治：好中球—アレルギー性の気道炎症と細胞—アレルギー・免疫、10、968-975、2003
- ・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.
- ・吉原重美、山田裕美、阿部利夫、有阪 治：小児気管支喘息の早期診断。小児科臨床, 58, 1987-1991, 2005
- ・山田裕美、吉原重美、有阪 治：気道ウイルス感染と喘息発症。Allergy from the nose to lung. 13: 12-16, 2005.
- ・山田裕美、吉原重美：乳幼児の気管支喘息における気道炎症—痰中 Creola Body からのアプローチ—。アレルギーの臨床 25:17-21, 2005.
- ・山田裕美、吉原重美、有阪 治：小児アレルギー疾患の ABC—乳児喘鳴性疾患と乳児喘息—。小児科診療 68:1469-1474, 2005.
- ・山田裕美：シンポジウム・乳児喘息の病態—痰からのアプローチを中心に—。第 21 回日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会講演集, 45-47, 2005.

2. 学会発表

- ・ 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. 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
- ・ 山田裕美、松本健治、橋本宣子、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の検討。第 53 回日本アレルギー学会総会、岐阜, 2003. 10.
- ・ 吉原重美、山田裕美、阿部利夫、有阪治：乳児の喘鳴と乳児喘息—アレルギーの立場から—。シンポジウム 2 乳児の喘鳴と乳児喘息。第 37 回日本小児呼吸器疾患学会、東京, 2004. 11.
- ・ 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, 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.
- ・ 吉原重美：乳幼児喘息の病態、第 25 回

六甲カンファレンス、京都、8月、2005

- 山田裕美：気道ウイルス感染と乳児喘息.
第5回埼玉喘息研究会，さいたま市，2月，
2005.

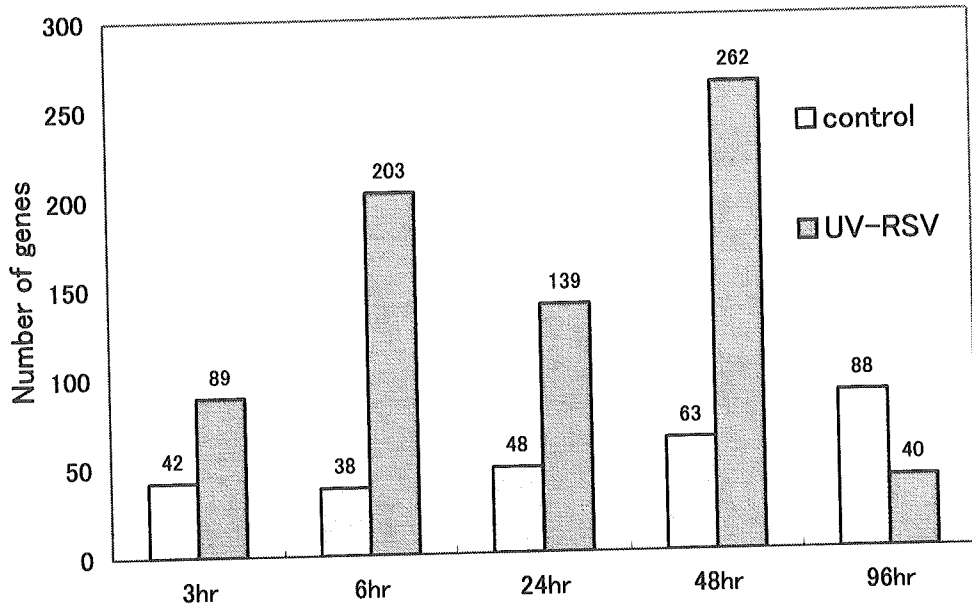


Fig.1 Kinetics of changes in total gene expression after RSV inoculation (the expression levels >5 fold)

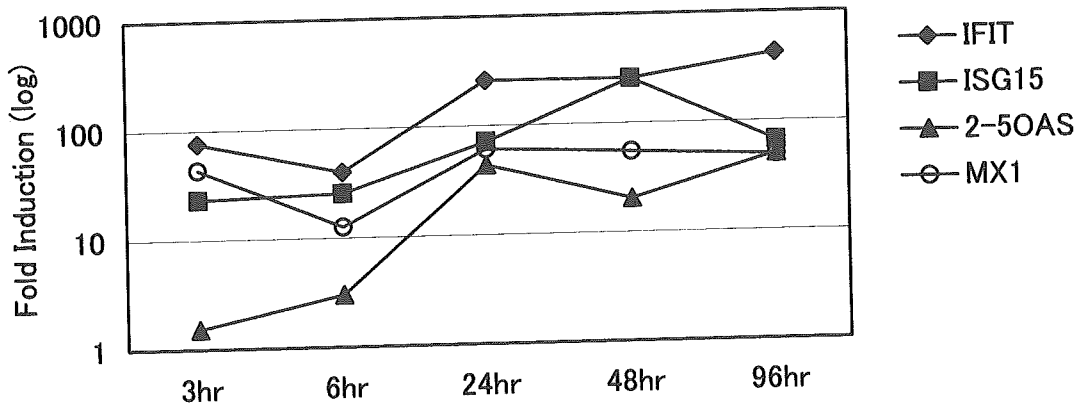


Fig.2 RSV-inducible anti-viral response genes

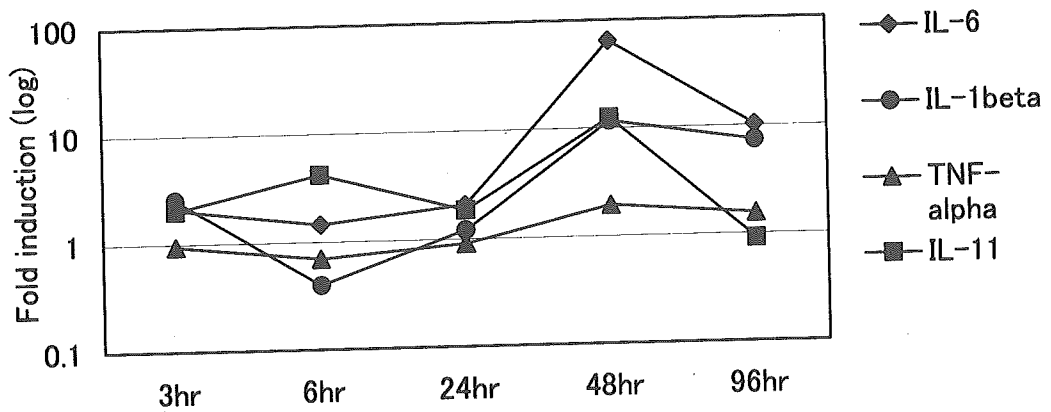


Fig.3 RSV-inducible cytokine genes

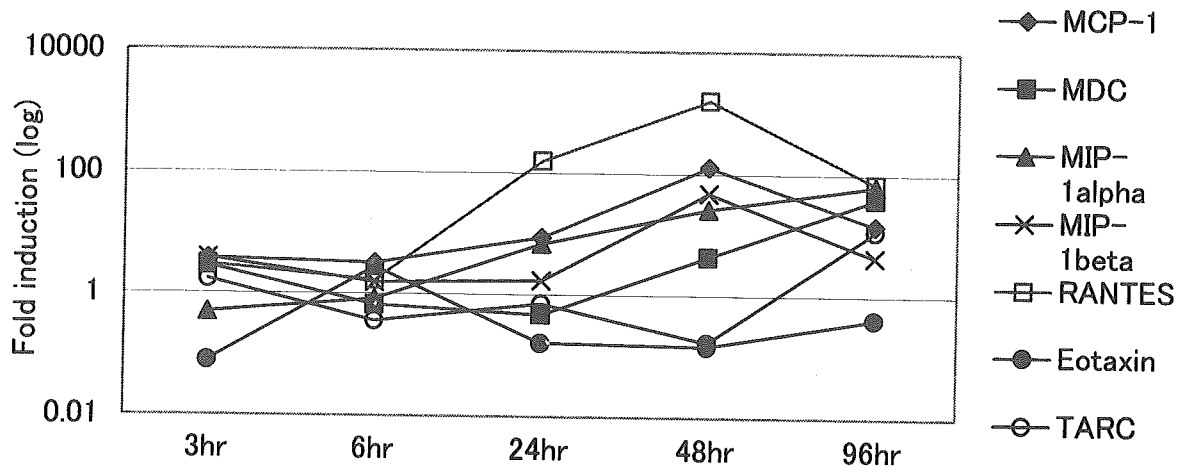


Fig.4 RSV-inducible CC chemokine genes

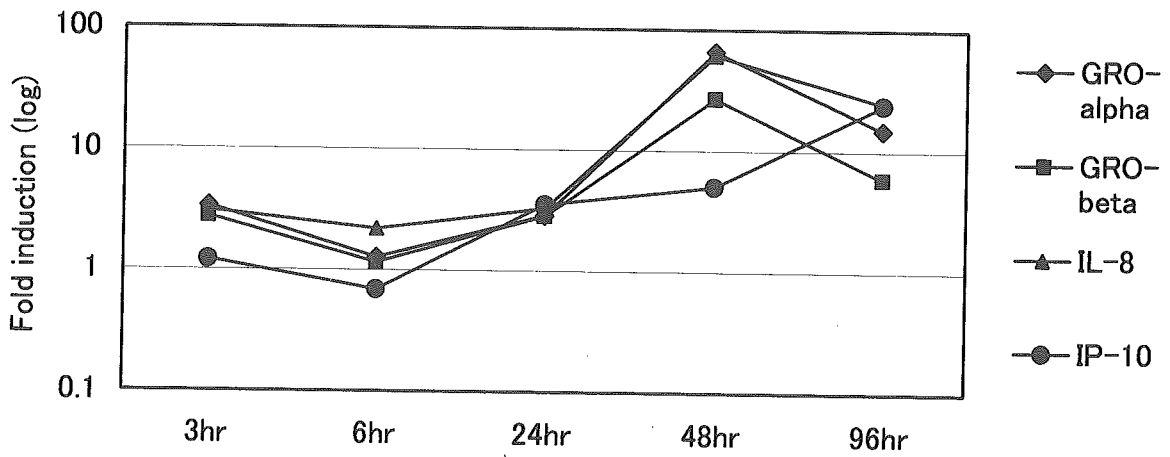


Fig.5 RSV-inducible CXC chemokine genes

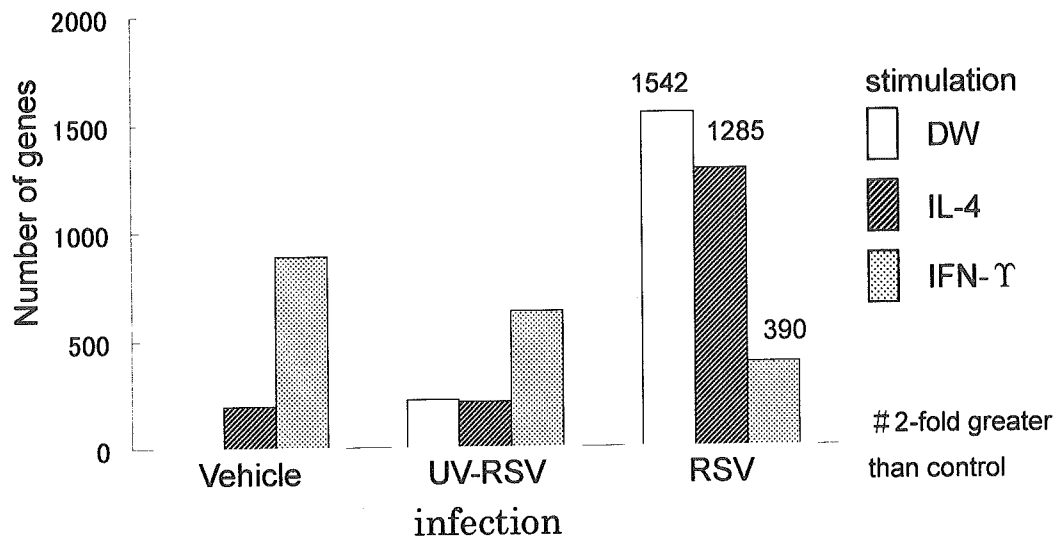


Fig.6 Upregulated[#] expression genes with RSV-infection after stimulated by cytokines

Table. 1 RSV-inducible growth factor genes

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

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

Table. 2 RSV-inducible MMP genes

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

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

Table. 3 Gene expression ratio compared to INF- γ +RSV

Common name	Expression ratio*	
	RSV	IL-4+RSV
CCL5(RANTES)	6.3	3.0
CCL20(LARC)	30.9	9.1
CXCR4	38.2	53.4
ICAM-1	4.6	5.0
VEGF	7.8	7.5
MMP-1	85.4	40.7
MMP-10	24.5	13.6
MUC3B	6.9	4.7
IL1- β	2.5	2.5

* the expression ratio compared to INF- γ +RSV exposed cells

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：正常ヒト肺線維芽細胞におけるエオタキシン発現に対する
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 荒川浩一 群馬大学大学院小児生体防御学講師

研究要旨：感染やアレルゲン曝露による気管支喘息の急性増悪時には、ステロイドの投与が行われる。その作用は、多岐にわたるが、ステロイドは、気道上皮に対しエオタキシン産生を低下させ、好酸球性炎症を抑制する可能性が示唆されている。しかしながら、線維芽細胞に対する効果は不明である。今回、正常ヒト肺線維芽細胞（NHLF）における IL-4 依存性エオタキシン産生に対するステロイドの影響を検討した。NHLF 培養液中にデキサメタゾン（DEX）を添加し、同時に IL-4 で刺激した。24, 48, 72 時間後の培養上清中のエオタキシン蛋白質、mRNA を ELISA 法、real-time PCR 法にて測定した。また、プロモーターアッセイにより分子機序を検討した。NHLF において、DEX は、IL-4 刺激によるエオタキシン蛋白質および mRNA 産生を添加後 24 時間では抑制したが、48 時間、72 時間後では反対に増強した。DEX は、DEX は細胞増殖には影響を及ぼさなかった。プロモーターアッセイでは、Stat6 結合領域を介して IL-4 の刺激で活性化を受けるが、DEX の添加により活性が低下し濃度依存性がみられた。DEX は線維芽細胞のエオタキシン産生に対して 2 相性の反応を呈した。その分子機序として、あとから生成される何らかの蛋白質の関与が推定された。

研究協力者

鈴木僚子 群馬大学小児生体防御学

下に存在する線維芽細胞に対する効果は不明である。

A. 研究目的

気管支喘息における気道炎症においては、好酸球が重要な役割を果たしており、IL-5 やエオタキシンなどのサイトカインがメディエーターとして介在している。肺線維芽細胞はエオタキシンを産生する細胞のひとつであり、また、末梢気道では、上皮下に好酸球の集積が強いことが知られている。

また、気管支喘息の増悪時の治療にステロイドの全身投与がしばしば用いられている。ステロイドは上皮細胞においてエオタキシンの産生を低下させるといわれているが、上皮

IL-4 は、IL-4 受容体複合体に結合し、JAK, STAT 系を介してエオタキシンの転写を起こす。JAK 1, 3 がリン酸化し、この JAK により、STAT 6 (signal transducers and activators of transcription) がリン酸化を受け、二量体を形成し、核内に情報を伝達する。STAT6 は、STAT6 binding site に結合して、エオタキシンの転写が始まる。

正常ヒト肺線維芽細胞において、IL-4 依存性エオタキシン産生がみられるかどうか、また、エオタキシン産生に対するステロイドの効果について検討する。