

食物アレルギーの発症・重症化の予防に関する研究

—重症化予防と寛解誘導をめざした食事指導のための抗原性の臨床的評価に関する研究—

分担研究者 伊藤節子 同志社女子大学生活科学部食物栄養科学科
研究協力者 明石真未 同志社女子大学生活科学部食物栄養科学科
伊東佑美 同志社女子大学生活科学部食物栄養科学科

研究要旨

乳児期発症の食物アレルギーの経過は一般に良好であるが、一部の過敏な状態に陥った症例では微量の抗原を含む食品によりアナフィラキシー反応が惹起されることがある。このような重症例も含めて適切な食事指導により寛解を誘導するためには、実際に摂取可能な調理食品中の抗原量の評価法の確立と標準化が必要である。食品として摂取する場合には、加熱調理や副材料による不溶化も摂取後の消化や吸収の過程で大きな影響を及ぼすため、食品中の抗原性の評価には、原材料として使用された抗原量のみならず、加熱や副材料の影響も加味できる測定系が求められる。既存の特定原材料測定キットを用いて検討した結果、卵、牛乳、小麦に関しては、当初開発された従来法により検出される抗原は摂取する側からみた食品中の抗原の強さを反映していた。この方法による抗原量の定量により、負荷試験や食事指導に用いる食品の標準化が可能である。

A. 研究目的

乳児期発症の食物アレルギーの経過は一般に良好であるが、過敏な状態に陥った症例では微量の抗原を含む食品によりアナフィラキシー反応が惹起されることがある。このような重症例に対して適切な食事指導により寛解を誘導するためには、実際に摂取可能な調理食品中の抗原量の評価法の確立と標準化が必要である。

本年度は、食事指導に用いる食品の標準化に適用可能な臨床的に有用性の高い抗原量測定系を選定するための検討とその評価を行った。

B. 研究方法

乳幼児における食物アレルギーの原因として最も頻度が高く、加熱調理により抗原性の低下が期待できる卵を中心に、抗原性の評価法について検討した。加熱条件を変えた卵白、卵白凍結乾燥末、卵を用いた調理食品中の卵抗原量を特定原材料検出キット FASPEK 卵（卵白アルブミン）および従来の卵白アルブミン（以下 OA）検出キット、オボムコイド（以下 OM）検出キット（以下従来法 OA、従来法 OM とする）を用いて比較検討した。食品中の抗原の抽出と抗原抽出液の希釈はそれぞれのキットに添付された抽出液と検体希釈液を用いて行い、標準抗原を用いた検量線の範囲内に入るよう検体希釈液にて抗原抽出液を希釈して測定した。

乳幼児食物アレルギーの原因抗原として卵に

次いで頻度の高い牛乳、小麦についても同様の検討を行った。

C. 研究結果

固ゆで卵白を従来法 OA、OM、FASPEK（卵）にて抗原量を測定した結果を示す。

固ゆで卵白1g中の卵抗原：抽出法による相違

	従来法 抽出液 (OA)	従来法沈渣 FASPEK (OA)	従来法 抽出液 (OM)	FASPEK (OA)
固ゆで卵白 (12分)	43 μ g	482.8mg	32mg	310mg
固ゆで卵白 (20分)	31 μ g	232.2mg	9mg	170mg

固ゆで卵中のOAは加熱により凝固して塩不溶性となる
→ 吸収の低下 → 臨床の観点からは「低アレルギー化」

従来法 OA と FASPEK（卵）とはどちらも OA を検出する測定系であるが測定値は大きく異なっていた。従来法と FASPEK の測定法を比較検討すると、抽出法と抗体が異なっていた。前者は塩水溶液を抽出液として用い、遠心後の上清中の塩水溶性画分中の抗原量を測定するが、沈渣が多く認められた。沈渣中の塩不溶性画分中に抗原が多く残っていることはこの中の卵抗原を界面活性剤の含まれた抽出液を用いる FASPEK により定量することにより確認された。塩水溶液のモル濃度を変えて抽出しても同様の結果であった。この結果から加熱卵の従来法 OA による抗原量の低下は、

卵白の凝固による不溶化によっておこるみかけ上の抗原量の低下であることが明らかとなり、加工食品や調理食品中の原材料として用いた卵を検出するという特定原材料検出キットの本来の目的に関しては、FASPEK（卵）の方が従来法 OA に比べて格段に優れていると考えられた。水溶性である OM は従来法 OM の抽出液でよく抽出され、加熱時間を長くすることにより抗原性を低下させることが可能であった。

一方、食事指導に応用できる臨床的に有用な抗原性の評価には別の視点が必要である。

調理や加工過程でおこる卵白の凝固による不溶化も吸収の低下をきたし、臨床的な低アレルギー化の重要な要因であることから、抗原性の評価に反映させる必要があり、むしろ従来法が優れていると考えられた。

次に加熱凝固の影響を最小限度にした条件下にて、加熱による OA、OM の抗原性の変化を検出するために、低濃度の卵白溶液を作製した。Allergon 社の卵白凍結乾燥末を PBS(-)にて 1 mg/ml の濃度で溶解し、60°C30 分間、100°C30 分間、オートクレーブ 20 分間加熱後の抗原量を従来法 OA、OM および FASPEK（卵）にて測定した。卵白 1mg/ml の濃度ではいずれの加熱条件でも肉眼的な凝固は認められず、凝固による不溶化の影響がほとんどない状態で加熱による抗原性の評価が可能であった。60°C30 分間の加熱では OA、OM とともに検出される抗原量は未加熱の卵白溶液（＝生卵）中の抗原量と変わらず、100°C30 分間加熱では生卵中の抗原量に対して OA は 3.2%、OM は 1.2%にまで低下し、オートクレーブ処理では OA は 0.5%、OM は 0.03%にまで低下し、いずれの条件においても OM の方が加熱による抗原性の低減化がおりやすく、従来いわれていた現象とは異なる結果であった。これは OA の凝固によるみかけ上の抗原の低減化の影響がほとんどない状態で検討した結果であると考えられた。またこの検討から従来法 OA において用いられている抗体は未加熱 OA と反応するが FASPEK において用いられている抗体は未加熱 OA のみならず 100°C 加熱 OA もよく検出できることが明らかとなった。加熱条件を変化させた菓子類および料理中の卵抗原量を FASPEK および従来法 OA、OM による測定を行い比較検討した。その結果、FASPEK による測定値は原材料としての卵量をよく反映してはいたが、理論値を上回ることが多かった。従来

法で測定した食品中の卵抗原は原材料として用いた卵の量と加熱条件のみならず同時に用いる副材料によっても大きな影響を受け、小麦とともに混捏後に加熱すると OA のみならず OM も不溶化することが明らかとなった。一方、既成の食品ではみかけ上同じ製品でもメーカーにより、その中に含まれる卵抗原量は大きく異なり、この場合にも原材料としての卵量のみならず、焼成条件（温度と時間）の関与があることが明らかとなった。

従来法による測定結果は臨床的に経験する抗原性の強さと一致しており、この結果をそのまま重症例の食事指導を含めて臨床現場における食事指導に用いることが可能であった。

これらの条件と生体側の要因（卵白特異 IgE 抗体として測定できる OA 特異的 IgE 抗体のみを有する場合と OM 特異的 IgE 抗体も同時に有する場合）も考慮して、食品中の卵抗原量のランク付けを行うことは可能であり、現在作成中である。

牛乳抗原についても同様の検討を行ったところ、従来法と FASPEK による検討では、カゼインの測定値は両者間でほとんど同じであり、加熱の影響もほとんど受けなかった。 β -ラクトグロブリンは従来法では加熱による抗原性の低減化が認められたが、沸騰した牛乳でも生の牛乳の 5 分の 1 から 6 分の 1 にまで減少するにすぎなかった。

牛乳アレルギー児のために開発されたアレルギー用ミルクや部分分解乳中の抗原量を測定した結果は臨床的に認識されている抗原性と一致した。牛乳アレルギー児の抗原感作の程度に応じて、アレルギー用ミルクまたは部分分解乳の抗原性の強さと摂取量とを組み合わせることにより、積極的な寛解誘導に利用することが可能であり、現在実施中である。

小麦については加熱条件を変えて作製した生麩中のグリアジン量を測定することにより検討した。従来法と FASPEK による測定値との関係は OA と同様、加熱による不溶化が従来法における抽出効率の低下につながりみかけ上の抗原量の低下をもたらしたが、OA ほど顕著ではなかった。そのため小麦については使用量を減らす、あるいは代替品を用いる方が抗原の回避には実際的であると考えられた。

D. 考察

FASPEK は原材料中の抗原検出に優れた測定系

であり、従来法 OA, OM による食品中の卵抗原の測定結果は、加熱調理による抗原性の低下をよく反映していた。

加熱卵の従来法 OA による抗原量の低下は OA の凝固による見かけ上のものであり、OM は凝固しにくいため従来法 OM にてもよく検出できた。実際の臨床現場で経験する抗原性の強さは従来法による測定結果とよく一致し、食品中の卵の抗原量の評価に用いることが可能である。

食品を経口摂取する際に問題となる抗原性という観点からみると、従来法は FASPEK よりも有用性が高く、この測定系をうまく活用することにより、抗原量に基づく食物アレルギー児に対する食事指導の標準化が可能となると考える。牛乳、小麦についても同様の現象が認められた。

E. 結論

食品中の抗原を従来法と同様に塩水溶液により抽出し、その中の抗原量を測定することにより、食品を摂取後の抗原性の評価が可能であり、負荷試験時や寛解誘導を目指す食事療法における食品中の抗原量の標準化につながると考える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 伊藤節子:食物アレルギーの治療と予防-除去食療法の実際, 小児内科 2007;39:587-92
- 2) 伊藤節子:食物アレルギーの診断手順, 治療 2007;89:1861-6
- 3) 伊藤節子:乳幼児アトピー性皮膚炎における食物アレルギーの関与, 臨床免疫・アレルギー科 2007;47:551-8
- 4) 伊藤節子:食物アレルギーと栄養, 食物アレルギー研究会会誌 2007;7(2):53-7
- 5) 伊藤節子:消化管アレルギー, Topics in Atopy 2007;6(2):20-4
- 6) 伊藤節子:乳児期発症の食物アレルギーの関与するアトピー性皮膚炎, 日本小児アレルギー学会誌 2007;21:649-56
- 7) 伊藤節子:食物アレルギー診療ガイドライン 2005 解説 第9章食物アレルギーの治療 4. アナフィラキシーショックへの対応, 日本小児アレルギー学会誌 2007;21:723-6

8) Tokuko Mukoyama, Sankei Nishima, Masahiko Arita, Setsuko Ito, Atsuo Urisu, Motohiro Ebisawa, Hideo Ogura, Yoichi Kohno, Naomi Kondo, Rumiko Shibata, Makifumi Hurusho, Mitsufumi Mayumi, Akihiro Morikawa and Food Allergy Committee, Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical Immunology: Guidelines for Diagnosis and Management of Pediatric Food Allergy in Japan Allergolpgy International 2007;56:349-61

2. 学会発表

- 1) 伊藤節子:教育講演「赤ちゃんと子どもの食物アレルギーと海外旅行」, 第6回日本旅行医学会 (2007年日, 横浜) 4月15日, 東京)
- 2) 伊藤節子:ランチョンセミナー「食物アレルギーのガイドライン」, 第24回日本難治喘息・アレルギー疾患学会 (2007年5月27日, 東京)
- 3) 伊藤節子:イブニングシンポジウム6 アレルギー疾患の患者参画型診療「食物アレルギー」, 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2007年6月11日, 横浜)
- 4) 伊藤節子:食物アレルギーの治療, 第46回京滋臨床アレルギー懇話 (2007年7月28日, 京都)
- 5) 伊藤節子, 明石真未:アナフィラキシー反応を経験した食物アレルギー児の寛解誘導の試みと抗原特異的 IgG および IgG4 抗体の臨床的意義 (第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2007年10月31日, 横浜))
- 6) 伊藤節子:イブニングシンポジウム7 食物アレルギーの New Wave ; 抗原分析その臨床応用「調理による卵抗原の低アレルギー化の評価と寛解誘導への臨床応用」, 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2007年11月2日, 横浜)
- 7) Setsuko Ito: Pathogenesis, Prevention, and Management of Food Allergy: Clinical Point of View. International Conference on Food Factors for Health Promotion 2007 (2007/11/29, Kyoto, Japan)
- 8) 伊藤節子, 明石真未, 水谷佳保里, 伊東佑美: 臨床応用を目指した食品のアレルギー性の評価についての検討, 第11回京都小児喘息・アレルギー研究会 (2008年2月9日, 京都)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

食物アレルギーの病態解明と診断・治療の開発に関する研究
—鶏卵アレルギーの経口免疫療法とアレルギー特異的T細胞応答のトランスクリプトーム解析—

分担研究者 宇理須 厚雄 藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院小児科
研究協力者 柘植 郁哉 藤田保健衛生大学医学部小児科
近藤 康人 藤田保健衛生大学医学部小児科
中島 陽一 藤田保健衛生大学医学部小児科

研究要旨

鶏卵アレルギー患者を対象として、卵白抗原刺激による CD4 陽性細胞応答の解析を DNA microarray と real-time PCR を用いて行い、非アレルギー児と比較し、鶏卵アレルギー児で抗原刺激後に発現が有意に増加する cytokine inducible SH2-containing protein (CISH) を選択した。CISH の蛋白レベルでの発現を flow-cytometry にて行い、mRNA 同様、鶏卵アレルギー児では刺激後の反応が有意に増強していることを示した。また、CISH がアレルギー性炎症の惹起に重要な IL-4 産生細胞 (Th2) に偏在する可能性を検討する目的で、IL-4, IFN- γ に対する抗体を用いて、CISH との発現を検討すると、CISH は、IFN- γ 産生細胞 (Th1) よりも、IL-4 産生細胞 (Th2) に強く発現していた。

A. 研究目的

鶏卵白アレルギーの発症、寛解に関与する遺伝子の網羅的な検討を DNA microarray を用いて行い、病態の把握、治療反応性の予知に有用なマーカー遺伝子の探索を試みた。さらに、いまだ不明な点の多い発症・寛解の機序を明らかにすることで、より有効な治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

1. Microarray と Real-time PCR による解析

鶏卵アレルギー児と非アレルギー児の末梢血単核球 (PBMC) を、鶏卵白抗原存在下 16 時間培養した後、Magnetic cell sorter を用いて CD4 陽性細胞を分取した。CD4 陽性細胞から total RNA を抽出し、増幅・標識後に Agilent Human Whole Genome Array とハイブリダイズし解析した。Microarray 解析で選択した遺伝子発現の定量性は real-time PCR にて確認した。

2. Flow-cytometry による CISH の発現解析

鶏卵アレルギー児、非鶏卵アレルギー児の PBMC を鶏卵白存在下 7 日間培養した後に、PE-CD4、PC-5-CD25 で染色した。さらに fixation、permeabilization 処理後に FITC 標識 CISH のポリクローナル抗体で染色し FACS Calibur にて解析した。

3. Flow-cytometry を用いた CISH とサイトカイン産生能の検討

PBMC に卵白抗原および IL-4 を加えて 7 日間培

養した後、brefeldin 存在下に phorbol myristate acetate と ionomycin により 6 時間活性化した。その後、PC5 標識抗 CD4 抗体で染色後に、前述した方法で fixation と permeabilization 処理した後に、FITC 標識した CISH と、PE 標識した IL-4 を用いて染色し、同じく PE 標識 IFN- γ の Th1 細胞における CISH 発現と比較した。

すべての患者あるいはその保護者から本研究の目的、方法を説明した後、同意書を文書で得ている。

4. 統計

Real-time PCR での mRNA 発現、flow-cytometry 解析の統計学的検討は、Stimulation index (SI) (抗原刺激後 / 非刺激) を用いて Mann-Whitney の *U* 検定にて行った。

C. 研究結果

1. Microarray と Real-time PCR による解析

Microarray 解析により、非アレルギー児と比較して、抗原刺激後に、鶏卵アレルギー児で発現が 1.5 倍以上に増加する遺伝子を 43 個選択した。それらの遺伝子の発現を定量的に検討するため、鶏卵アレルギー患者 22 名と非アレルギー対照 7 名で Real-time PCR を行った。鶏卵アレルギー患者と非アレルギー対照を比較すると、cytokine inducible SH2-containing protein (CISH) の SI のみが非アレルギー対照と比べ、鶏卵アレルギー

ギー患者で有意に高値 ($p < 0.01$) であった (図1)。

2. Flow-cytometry による CISH の発現解析

Flow-cytometry を用いて、CISH の蛋白レベルでの発現を鶏卵アレルギー児 12 名と非鶏卵アレルギー児 7 名で比較した。CD4 陽性細胞中の CD25 陽性・CISH 陽性細胞は鶏卵白抗原刺激後に、非鶏卵アレルギー児と比較し鶏卵アレルギー児において有意に発現が増加していた (図2)。

3. Flow-cytometry を用いた CISH とサイトカイン産生能の検討

Th1、Th2 細胞における CISH の発現を比較するため、flow-cytometry を用いて、IFN- γ 細胞中の CISH⁺細胞と IL-4⁺細胞中の CISH⁺細胞の割合を比較検討した。鶏卵アレルギー児 7 名での検討にて、CISH の発現は IFN- γ 細胞 (median 26.9%, range 3.7-43.9%) よりも、IL-4⁺細胞 (median 49.3%, range 37.9-75.8%) で有意に増加していた。

D. 考察

CISH は suppressor of cytokine signaling (SOCS) protein family に属し、STAT を介したサイトカインシグナル伝達の負の調節因子として働いている。CISH の transgenic mice を用いた実験で、CISH の過剰発現は Th2 への分化を促すとの報告もある。今回、CISH が IFN- γ 産生細胞よりも、IL-4 産生細胞に多く発現していることを示し、CISH 発現が、T 細胞において、IFN- γ シグナルを抑制することで、Th2 の分化に関与しているのではと推測した。

こうした新発見が、食物アレルギーの病態の理解に役立つと共に、CISH 自体が新たな診断のマーカーとして臨床応用しうる可能性が考えられた。

E. 結論

CISH は鶏卵アレルギー児 CD4 陽性細胞で、卵白抗原刺激後に有意に発現が増加した。CISH は鶏卵アレルギーの病態形成に関与し、診断のマーカーとなる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

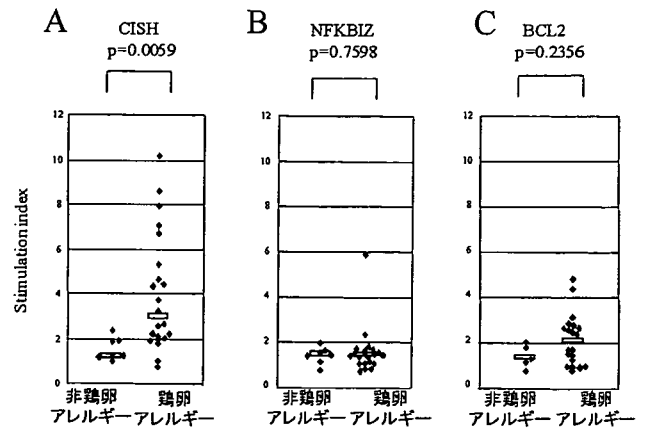


図1 A: CISH, B: NFKB1Z, C: BCL2のReal-time PCRによる発現量の、非鶏卵アレルギー児7名と鶏卵アレルギー児22名との比較

Stimulation index : 鶏卵白抗原刺激後の発現量 / 非抗原刺激時の発現量

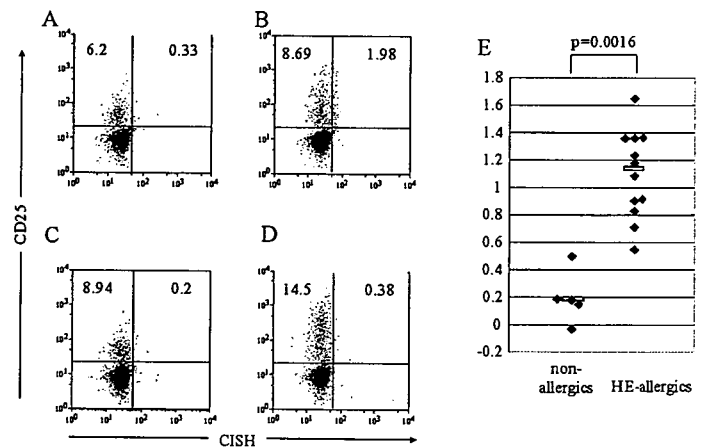


図2 A-D: Flow-cytometryによる、CD4陽性細胞分画におけるCISHとCD25の発現解析の代表例 A,B: 鶏卵アレルギー児、C,D: 非鶏卵アレルギー児。A,C: 非刺激時、B,D: 卵白抗原刺激後の結果。A-Dのグラフ内の数値は全細胞中の各象限における割合を示す

E: Flow-cytometryによる、CD4陽性細胞分画におけるCD25+CISH+細胞の発現解析 非鶏卵アレルギー児5名と鶏卵アレルギー児12名における、抗原刺激後のCD25+CISH+細胞と非刺激時CD25+CISH+細胞の差の比較

- 1) Tsuge I, Okumura A, Kondo Y, Itomi S, Kakami M, Kawamura M, Nakajima Y, Komatsubara R, Urisu A. Allergen-specific T-cell response in patients with phenytoin hypersensitivity; simultaneous analysis of proliferation and cytokine production by carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) dilution assay. *Allergology International* 2007;56:149-155
- 2) Mukoyama T, Nishima S, Arita M, Ito S, Urisu A, Ebisawa M, Ogura H, Kohno Y, Kondo N, Shibata R, Hurusho M, Mayumi M, Morikawa A. Guidelines for Diagnosis and Management of Pediatric Food Allergy in Japan. *Allergol Int.* 2007 ;56:349-361
- 3) Seiki K, Oda H, Yoshioka H, Sakai S, Urisu

A, Akiyama H, Ohno Y. A Reliable and Sensitive Immunoassay for the Determination of Crustacean Protein in Processed Foods. J Agric Food Chem. 2007 55:9345-9350.

- 4) Yamakawa H, Akiyama H, Endo Y, Miyatake K, Sakata K, Sakai S, Toyoda M, Urisu A. Specific detection of wheat residues in processed foods by polymerase chain reaction. Biosci Biotechnol Biochem. 2007 ;71:2561-2564.
- 5) Yano T, Sakai Y, Uchida K, Nakao Y, Ishihata K, Nakano S, Yamada T, Sakai S, Urisu A, Akiyama H, Maitani T. Detection of walnut residues in processed foods by polymerase chain reaction. Biosci Biotechnol Biochem. 2007;71:1793-1796.
- 6) Taguchi H, Watanabe S, Hirao T, Akiyama H, Sakai S, Watanabe T, Matsuda R, Urisu A, Maitani T. Specific detection of potentially allergenic kiwifruit in foods using polymerase chain reaction. J Agric Food Chem. 2007;55:1649-1655.
- 7) Yamakawa H, Akiyama H, Endo Y, Miyatake K, Sakata K, Sakai S, Moriyama T, Urisu A, Maitani T. A Specific Detection of Soybean Residues in Processed Foods Using Polymerase Chain Reaction. Biosci Biotechnol Biochem 2007; 71, 269-272.

2. 学会発表

- 1) 中島陽一、柘植郁哉、加藤牧子、近藤康人、小松原亮、平田典子、松山温子、宇理須厚雄：鶏卵アレルギーにおける卵白抗原特異的な cytokine inducible SH2-containing protein (CISH) 発現の解析、第19回日本アレルギー学会春季臨床大会、横浜、平19、6月
- 2) 中島陽一、柘植郁哉、加藤牧子、近藤康人、小松原亮、平田典子、各務美智子、川田康介、宇理須厚雄：鶏卵アレルギーにおける卵白抗原特異的な cytokine inducible SH2-containing protein (CISH) 発現の解析、第57回日本アレルギー学会秋季学術大会、横浜、平19、11月
- 3) 山田一恵、中島陽一、小松原亮、河村牧子、各務美智子、近藤康人、柘植郁哉、宇理須厚

雄、木村 守、鳥居新平：加熱脱オボムコイド卵白による経口免疫療法－卵白特異的 Th1・Th2 サイトカインと IgG4 の検討－、第57回日本アレルギー学会秋季学術大会、横浜。平19、11月

- 4) 中島陽一、柘植郁哉、加藤牧子、近藤康人、小松原亮、平田典子、各務美智子、川田康介、宇理須厚雄：鶏卵アレルギー児におけるアレルギー特異的 T 細胞応答の解析、第44回日本小児アレルギー学会、名古屋、平19、12月
- 5) 柘植郁哉、中島陽一、小松原亮、平田典子、加藤牧子、各務美智子、川田康介、近藤康人、山田一恵、木村 守、宇理須厚雄：食物アレルギーの寛解－アウトグローと経口免疫療法－、第44回日本小児アレルギー学会、名古屋、平19、12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

食品成分による食物アレルギーの制御に関する研究

分担研究者 穠山 浩 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部
研究協力者 佐伯 宏樹 北海道大学大学院 水産科学研究科
森山 達哉 近畿大学 農学部応用生命化学科
手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部
酒井 信夫 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部

研究要旨

(1) 実験動物を用いた食品成分の感作抑制に関する研究 α -カロテン摂取群は標準粉末飼料を摂取させた対照群と比較して、IgE、IgG1 抗体価の抑制傾向が認められ、 β -カロテン摂取群では対照群と比較して IgE、IgG1 抗体価の有意な抑制が確認された。カロテノイド投与群の脾臓細胞より CD4⁺T 細胞を単離し、GATA3 及び t-bet の mRNA を定量したところ、対照群に比べ低い値を示した。FCM を用いて腸管膜リンパ節 (MLN) 中のリンパ球サブセット構成を調べたところ、 α -カロテン摂取群、 β -カロテン摂取群ともに Foxp3 陽性 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン陽性細胞の割合が対照群と比較して有意に減少していた。

(2) 魚卵抗原解析 イクラ(シロザケ卵)の主要抗原であるビテロジェニン断片(いわゆる β' -c)のアミノ酸一次配列について、未決定領域を調査した。ニジマス-ビテロゲニン分子内の演繹アミノ酸配列を鋳型として、 β' -c の一次構造を検討したところ、分子量 16 kDa 成分の N 末端配列から 104-113、115-126、130-137 を明らかにした。これらの配列は、ニジマス・ビテロジェニンのアミノ酸内部配列とほぼ一致した。

(3) その他の食品抗原解析 主に成人における果実・種実類などの植物性食物アレルギーの原因抗原の探索を行った結果、成人における果実・種実アレルギーは花粉症と関連するクラス 2 食物アレルギーに属することが多く、特に Bet v 1 ホモログや Bet v 2 ホモログ、ソーマチンライクプロテインなどの汎アレルゲンが重要と考えられた。また果物以外に、大豆においてもこのクラス 2 が発症しており、新しいタイプの大豆(豆乳)アレルギーであると考えられた。従って、これらのアレルギーでは、花粉抗原に対する RAST やプロット、ELISA 等の結果によって、果物・種実でのアレルギー発症リスクを推測することも可能と考えられた。

A. 研究目的

本研究では、オボアルブミン(OVA)経口連続投与で感作が誘導可能な B10A マウスを用いてカロテン強化食摂取の食物アレルギー発症抑制への影響について検討した。また魚卵、果実、コチニール色素等の食物アレルゲンの解析についても検討した。魚卵のアレルゲン解析では、魚卵(イクラ)アレルギーの発症機構とその免疫交差性を検討するための基本情報として、昨年を引き続いて主要抗原タンパク質の一次構造解析を進めた。果実・種実類のアレルゲン解析では、主に成人における果実・種実類などの植物性食物アレルギーの原因抗原の探索を行った。果実アレルギーでは、花粉症抗原やラテックス抗原との交差反応性を発症基盤とする「クラス 2 食物アレルギー」が多いので、果実抗原と花粉抗原の交差性についても検討した。また、豆乳に特異的に発症するアレル

ギーが多発しているのもので、その原因抗原の解析についても検討した。

B. 研究方法

[実験動物を用いた食品成分の感作抑制に関する研究]

B10A マウスに OVA 1 mg/匹を 9 週間連日経口投与し、9 週後に、血清中 OVA 特異的抗体価、ヒスタミン濃度、ASA 後の体温の測定を行った。また、MLN 中リンパ球のポピュレーションを FCM により解析した。CD4⁺T 細胞を脾臓より単離し RNA を抽出後、GATA3、T-bet 及び Foxp3 の mRNA を Real-Time PCR により定量した。 α -カロテン及び β -カロテンは標準粉末飼料に混合 (2 mg/100 g) して経口投与を開始する 2 週間前から自由摂取させた。

[魚卵抗原解析]

シロザケ卵(イクラ)より主要抗原であるピテロジェニン断片(β' -c)を生成し、これをメルカプトエタノール処理してSDS-PAGEに供し、16 kDaと18 kDa成分に分離した。16 kDaをSDS-PAGEゲルから切り出してトリプシン消化した後、逆相HPLCに供して複数のタンパク質断片を分取し、それぞれアミノ酸配列分析に供した。

[その他の食品抗原解析]

バナナ、モモ、大豆(豆乳)などから抽出液を作製し、アレルギーを発症した患者の血清を用いて、イムノブロットング法やELISA法によって原因抗原の探索を行った。臨床に関しては治療の一環として行われた特異的IgE-RAST試験、プリックテストやプリック・プリックテスト等の結果を参考にした。花粉抗原はBet v 1、Bet v 2の組換え体やプリック用エキスをを用いた。

コチニール色素を産生するエンジムシからRNAを抽出し、cDNAに逆転写後、N末配列情報と内部配列解析の結果から5'-RACEと3'-RACEの解析を行った。その後タンパク質をコードするcDNAをクローニングして発現タンパク質の同定を行った。

C. 研究結果

[実験動物を用いた食品成分の感作抑制に関する研究]

α -カロテン群、 β -カロテン群共にCD4⁺T細胞を単離し、Th1及びTh2のmaster regulatorであるGATA3及びt-betのmRNAを定量したところ、対照群に比べ低い値を示した。MLN中リンパ球のポピュレーション解析の結果、Foxp3陽性 α 4 β 7インテグリン陽性細胞の割合が対照群と比較して α -カロテン群、 β -カロテン群共に有意に減少していた。

[魚卵抗原解析]

β' -cのトリプシン消化断片から、4種類の新規アミノ酸配列、“I: QKGEVGLYA”、“II: SHGLQEVYFDSN”、“III: IKVVDWMK”、“IV: SSVS”を得た。ニジマス-ピテロゲニンのc-DNA配列から得たアミノ酸内部配列を鋳型として、 β' -c中の配列を求めたところ、IはN末端104-113番目、IIは同115-126番目、IIIは同130-137番目、IVは同164-167番目であった。また別手法で調査していた同104-113番目(QKGEVGVYA)の配列を再確認した。これらの配列とニジマス-ピテロゲニン内部配列の相同性は

92%と極めて高かった。

[その他の食品抗原解析]

バナナに反応する患者の血清を用いて解析したところ、30-33 kDa付近のバンドの他にも20 kDa付近のバンドにも反応が見られた。これらを同定したところ、前者はキチナーゼ、後者はバナナのソーマチンライクプロテインであった。モモでは14-18 kDa付近に多くのバンドがIgE結合性を示し、これらはプロフィリンやBet v 1ホモログであると推測される。豆乳に反応する患者は、シラカバ・ハンノキのRASTが有意に高く、かつほぼ全例でBet v 1に反応した。また、この反応は豆乳によって阻害されたことから、豆乳のアナフィラキシーの原因抗原は大豆のBet v 1ホモログ(PR-10ファミリー)であると推測された。

コチニール色素の主要アレルゲンと思われる分子量約38 kDaのタンパク質のcDNAをクローニングした。

D. 考察

[実験動物を用いた食品成分の感作抑制に関する研究]

カロテン摂取は抗原経口感作を抑制し、食物アレルギー発症を抑制する作用が示唆された。そのメカニズムについては、脾臓細胞由来CD4⁺T細胞のTh1及びTh2のmaster regulatorの測定から、カロテノイド強化食によって抗原感作の抑制が示唆された。腸管においてカロテンの代謝産物であるレチノイン酸がMLN中リンパ球のFoxp3陽性 α 4 β 7インテグリン陽性細胞の分化を促進することによるアクティブサブプレッションによる抗原経口感作の抑制と考えられたが、 α -カロテン群、 β -カロテン群共にFoxp3陽性 α 4 β 7インテグリン陽性細胞は対照群より抑制された。

[魚卵抗原解析]

今回、イクラの主要抗原である β' -cについて、新たな配列分析の結果を得たが、サケ科魚類卵黄タンパク質との一次配列相同性の高さを再確認するものであった。この事実は、 β' -cをサケ科卵共通の主要抗原とみなす考えを支持している。さらに、C末端近傍配列、“SSVS”を得たことは、 β' -cの完全配列の決定に大きく貢献する知見である。

[その他の食品抗原解析]

バナナでは、ヘベインドメインを有するキチナ

ーゼの他にも、花粉抗原としても知られている PR-5 ファミリーに属するソーマチンライクプロテインが IgE 結合性を示したことから、本分子もバナナのアレルゲン候補分子と推測された。モモでは、よく知られた LTP の他にも、プロフィリンや Bet v 1 ホモログが抗原として発症に関与している例もあると推測された。豆乳アレルギーでは、シラカバ・ハンノキによる花粉症が先行し、大豆中の Bet v 1 ホモログ (Gly m 4) が交差抗原として発症している可能性が強く示唆された。コチニール色素主要アレルゲンの cDNA より予測されたタンパク質のアミノ酸一次構造は NCBI データベースには存在しないため新規であると考えられるが、ハチのアレルゲンであるホスホリパーゼと一部相同性を示した。

E. 結論

[実験動物を用いた食品成分の感作抑制に関する研究]

近年、腸管免疫系の制御性 T 細胞の分化誘導において、レチノイン酸が重要な役割を担うことが報告されていることから、カロテノイド強化食が腸管免疫系における制御性 T 細胞の分化誘導に及ぼす影響を調査することが必要と考えられた。来年度、さらにメカニズム解析を継続する。

[魚卵抗原解析]

新たに β' -中の 34 個のアミノ酸配列を得た。この結果は、サケ科魚卵間で一次配列相同性がきわめて高いことを示す内容で、サケ科魚卵間のアレルゲン交差性が、アレルゲンタンパク質の一次構造の類似性に起因することを示唆している。

[その他の食品抗原解析]

成人における果実・種実アレルギーは花粉症と関連するクラス 2 食物アレルギーに属することが多く、特に Bet v 1 ホモログ (PR-10 ファミリー) や Bet v 2 ホモログ (プロフィリン)、ソーマチンライクプロテインなどの汎アレルゲンが重要と考えられた。また果物以外にも、大豆においてもこのクラス 2 が発症しており、新しいタイプの大豆 (豆乳) アレルギーであると考えられた。従って、これらのアレルギーでは、花粉抗原に対する RAST やプロット、ELISA 等の結果によって、果物・種実でのアレルギー発症リスクを推測することも可能と思われる。コチニール色素の製造時に、本研究で同定したアレルゲンタンパク質の除去が可能となれば、抗原感作及び惹起の両面から

予防できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yano, T., Sakai, Y., Uchida, K., Nakao, Y., Ishihata, K., Nakano, S., Yamada, T., Sakai, S., Urisu, A., Akiyama, H., Maitani, T. Detection of walnuts residues in processed foods by polymerase chain reaction, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **71**, 1793-1796 (2007)
- 2) 穉山浩, 酒井信夫, 安達玲子 “食物アレルギー表示における特定原材料等の検査法に関する最新動向と今後の展望について” FFI ジャーナル, **212**, 1006-1015 (2007)
- 3) 穉山浩, 酒井信夫, 佐伯宏樹, 渡辺一彦, 赤澤晃, 宇理須厚雄, “アレルゲンの交差反応性” 小児内科, **39**, 558-563 (2007)
- 4) Yamakawa, H., Akiyama, H., Endo, Y., Miyatake, K., Sakata, K., Sakai, S., Toyoda, M., Urisu, A., Specific detection of wheat residues in processed foods by polymerase chain reaction, *Biosci, Biotechnol, and Biochem*, **71**, 2561-2564 (2007)
- 5) Seiki K., Oda H., Yoshioka H., Sakai S., Urisu A., Akiyama H., Ohno Y., A reliable and sensitive immunoassay for the determination of crustacean protein in processed foods, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 9345-9350 (2007)
- 6) Sakai, S., Matsuda, R., Adachi, R., Akiyama, H., Maitani, T., Ohno, Y., Oka, M., Abe, A., Seiki, K., Oda, H., Shiomi, K., Urisu, A. Interlaboratory Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay kits for the determination of crustacean protein in processed foods, *Journal of AOAC International*, **91**, 123-129 (2008)
- 7) Amano H, Negishi I, Akiyama H, Ishikawa O. Psychological Stress can Trigger Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice: An Inhibitory Effect of Corticotropin-Releasing Factor. *Neuropsychopharmacology*. **33**, 566-573 (2008)
- 8) Amano H., Akiyama H., Bienenstock J. Differential corticosterone responses to stress in

the lung in two strains of Flinder rats. *Clinical and Experimental Allergy*, in press (2008).

- 9) 森山達哉, 光山英由, 矢野えりか, 大羽美香, 橘田和美, 川本伸一, 穠山浩, 宇理須厚雄, 高橋浩司, 羽鹿牧太, 小川正, 河村幸雄「食物アレルギータンパク質の近赤外蛍光標識プローブによる検出」*日本食品科学工学会誌*, 54巻, 11号 468-476 (2007)

2. 学会発表

- 1) Akiyama, H. "Dietary apple procyanidins inhibit the development of oral sensitization and food allergies!" the 3rd International Conference on Polyphenols and Health ICPH2007 (2007. 11)
- 2) Akiyama, H. "Prevention of food allergy development by food factors" the International Conference on Food Factors for Health Promotion ICOFF2007 (2007. 11)
- 3) 穠山浩「アレルギー物質食品表示の現状と検知法」第44回日本小児アレルギー学会総会 (2007. 12)
- 4) Doi, H., Shibata, H., Shoji, M., Sakai, S., Akiyama, H. "Innovative ELISA system for the detection of walnut protein in processed foods" 121st. AOAC International Annual Meeting & Exposition (2007. 9)
- 5) 酒井裕美子, 矢野竹男, 内田浩二, 中尾義喜, 石畑公江, 仲野茂, 山田敏広, 酒井信夫, 穠山浩, 米谷民雄「PCR法を用いた食品中のクルミの検知法について」*日本食品化学学会第13回学術大会* (2007. 6)
- 6) 鈴木友紀子, 水谷友海, 中村幹彦, 伊藤敦, 穠山浩, 酒井信夫, 近藤一成, 米谷民雄, 加藤重城, 秋元政信「水晶発振子(QCM)によるオボアルブミンの検出について」*日本食品化学学会第13回学術大会* (2007. 6)
- 7) Sakai, S., Matsuda, R., Sato, Y., Adachi, R., Akiyama, H., Shiomi, K., Urisu, A., Maitani, T., Ohno, Y. "Interlaboratory evaluation of two kinds of ELISA kits for the determination of crustacean protein in processed foods" 121st. AOAC International Annual Meeting & Exposition (2007. 9)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

食物アレルギーの免疫学的制御に関する研究

分担研究者 大嶋 勇成 福井大学医学部附属病院小児科 講師

研究協力者 眞弓 光文 福井大学医学部病態制御医学講座小児科学 教授

研究要旨

食物アレルギー患者に経口トレランスを誘導することでアウトグローを計る方法を検討するため、OVA 特異的 T 細胞レセプター発現トランスジェニックマウス (OVA-TCR-tg) を用いて OVA 感作が成立した状態から経口トレランスを誘導する方法の基礎的検討を行った。OVA を腹腔感作し、OVA の経口投与で即時型アレルギー性下痢症状を呈する OVA-TCR-tg に、OVA 感作を行った野生型マウスの脾臓から分離した CD8 陽性 T 細胞を輸注すると、即時型アレルギー症状の発症が抑制された。CD8 陽性 T 細胞の代わりにリコンビナント IL-10 を投与しても、即時型アレルギー症状を抑制することは出来なかった。一方、IL-10 ノックアウトマウスの CD8 陽性 T 細胞の輸注では即時型アレルギー症状を抑制が不完全であることから、CD8 陽性 T 細胞の即時型アレルギー症状抑制機構には CD8 陽性 T 細胞の IL-10 産生能以外の機能も関与していると考えられた。感作成立後の食物アレルギー症状の抑制には IL-10 産生を持つ抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞を誘導する方法が確立が有用と考えられた。

A. 研究目的

乳幼児期の食物アレルギー患者の多くは成長とともに原因食物を摂取しても症状が出なくなることが知られている。このアウトグローの機序として消化能力の発達に加え、経口トレランスが関与していると考えられている。食物アレルギーの治療としては原因食物の除去が基本となるが、原因食物の誤食に危険性や、食事制限による患児や家族への負担が問題となる。そこで、食事制限に代わる治療手段として経口トレランスを誘導することで食物アレルギーのアウトグローを導く方法が期待される。

昨年度までの研究で、抗原特異的 IgE の存在下でも大量の抗原の経口投与の反復によりクローン除去、アナジー誘導、TGF- β 産生細胞の誘導、CD4+CD25+T 細胞の増加が生じ、経口トレランスが誘導されることを明らかにしてきた。そこで、抗原特異的 IgE に加え、抗原特異的 Th2 細胞が存在する状況で、経口トレランスを誘導しようような抗原投与方法を確立することが可能であるか否かを検証し、食物アレルギーの新規治療法として応用するための基礎的の検討を行った。

B. 研究方法

IgE 依存性の即時型下痢症状を呈する食物アレルギーモデルとして報告された Brandt ら (JCI 112:1666) の方法に準じ、野生型マウスと OVA 特異的 T 細胞レセプター発現トランスジェニッ

ク (OVA-TCR-tg) マウスに OVA をアラムと共に腹腔免疫し、*in vivo* で抗原特異的 IgE と Th2 細胞を誘導した。その後で OVA を隔日で経口投与し即時型下痢症状の発現と、アナフィラキシー症状による低体温の発現の有無を観察した。

昨年度の本研究において、OVA 感作を行った野生型マウスの脾臓から分離した CD8 陽性 T 細胞を抗原感作成立後の OVA-TCR-tg マウスに輸注し、OVA 経口負荷投与を行なうと即時型下痢症状およびアナフィラキシー症状が抑制されること、また、その際、腸間膜リンパ節単核球の OVA 特異的サイトカイン産生能のうち IL-10 の産生能が増加していること、腸間膜リンパ節における IL-10 の mRNA の発現が増強していることが観察された。そこで、本年度は、CD8 陽性 T 細胞を輸注するかわりにリコンビナント IL-10 を投与することで即時型アレルギー症状を抑制することが可能か否かを検討した。また、抑制機能の発現に CD8 陽性 T 細胞の IL-10 産生能が関与しているかを明らかにするため、OVA 感作を行った IL-10 ノックアウトマウスの脾臓より分離した CD8 陽性 T 細胞を輸注し、即時型アレルギー症状の抑制効果を検討した。

CD8 陽性 T 細胞の中で調節性 T 細胞様機能を発揮する細胞群のマーカーとし CD122 や CD103 などが報告されている。そこでこれらの細胞表面マーカーを用いて分離した CD8 陽性 T 細胞が食物アレルギー症状抑制効果を示すか否かを検討した。

実験動物の取り扱い、実験方法に関しては、福井大学医学部動物実験委員会での承認を受けた上で実施した。

C. 研究結果

1) リコンビナント IL-10 投与による即時型下痢症状抑制効果

OVA 感作を行った OVA-TCR-tg マウスにリコンビナント IL-10 2 μ g/mouse を腹腔内投与あるいは経静脈投与し、投与 2 時間後に OVA の経口チャレンジを行った。その結果、リコンビナント IL-10 前投与では即時型下痢症状の抑制効果は認められず、むしろ、反復投与により下痢症状の悪化を認めた。

2) IL-10 欠損 CD8 陽性 T 細胞輸注による即時型下痢症状抑制効果

OVA 感作 IL-10 ノックアウトマウスの脾細胞から分離した CD8 陽性 T 細胞を輸注した場合、即時型下痢症状の出現は OVA の経口投与 4 回目以降に約半数の OVA-TCR-tg マウスに認められ、即時型下痢症状の抑制効果は、野性型マウス由来 CD8 陽性 T 細胞を輸注した場合に比べ減弱していた。

3) 輸注した CD8 陽性 T 細胞の表面マーカーの解析

これまで文献上、調節性 CD8 陽性 T 細胞の表面マーカーとして報告されているものの発現を測定した。その結果、輸注に用いた脾細胞 CD8 陽性 T 細胞分画には、CTLA-4 陽性細胞や LAG-3 陽性細胞、CD28 陰性細胞はほとんど検出されず、CD122 陽性細胞は 10%以下、CD103 陽性細胞は 30%前後存在していた。CD122 あるいは CD103 陽性細胞の割合を、OVA 非感作マウスと OVA 感作マウスでは比較しても、陽性比率には有意な差を見出せなかった。

4) CD8 陽性細胞の CD103 の発現の有無による抑制機能の違い

OVA 感作野性型マウス脾臓から分離した CD8 陽性 T 細胞をさらに CD103 陽性細胞と陰性細胞に分離し、それぞれを輸注した後、OVA 経口チャレンジを行ったが、CD103 の発現の有無に関わらずアレルギー症状発現抑制効果を認めた。

D. 考察

即時型食物アレルギー症状が抑制された OVA-TCR-tg マウスでは、腸間膜リンパ節単核球の OVA 特異的 IL-10 産生能が増加し、経口チャレンジ後の腸間膜リンパ節における IL-10 mRNA

発現が増加していることから、腸管膜リンパ節における IL-10 産生増強を誘導する CD8 陽性 T 細胞が即時型食物アレルギー症状を抑制する可能性が考えられた。しかしながら、炎症性腸疾患モデルで症状抑制効果が報告されている方法に準じてリコンビナント IL-10 を投与しても即時型アレルギー症状は抑制されなかった。IL-10 で抑制効果が認められない原因としては、炎症性腸疾患と異なり即時型アレルギー症状の抑制には、より大量の IL-10 が局所で産生される必要性や、IL-10 の投与径路・投与時期などが不適等であった可能性が考えられる。しかし、近年、IL-10 分泌 *Lactococcus lactis* を抗原感作時に経口投与しても即時型食物アレルギー症状の軽減は期待されても発症を完全に抑制できないことが報告されている (Frossard CP J Allergy Clin Immunol 2007)。一般に経口免疫寛容は抗原感作成立後は成立前に比べ誘導されにくいことから、消化管局所で IL-10 産生が増加した環境を誘導するだけでは即時型アレルギー症状を抑制することは困難であると考えられた。

一方、IL-10 欠損 CD8 陽性 T 細胞の輸注では抑制効果を認めるものの、その程度が減弱していたことから、CD8 陽性 T 細胞の IL-10 産生能が即時型アレルギー症状抑制機構の成立に部分的には関与していると考えられた。

マウスの喘息モデルにおいては CD8 陽性 T 細胞が CD4 陽性 CD25 陽性調節性 T 細胞機能を増強することで作用するとの報告もあることから、CD4 陽性 CD25 陽性調節性 T 細胞を介する機序など IL-10 を介する機序以外の作用機序の関与を考慮する必要があると考えられた。

一方、抑制機能を呈する CD8 陽性 T 細胞は CD103 陽性細胞分画、陰性細胞分画のいずれにも存在することから、CD103 は調節性 CD8 陽性 T 細胞のマーカーとならないと考えられた。

E. 結論

即時型アレルギー性下痢症状を IL-10 投与により抑制することは出来ず、即時型食物アレルギーの治療には、抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導法を確立することが重要と考えられた。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohshima Y, Yamada A, Tokuriki S, Yasutomi M, Omata N, Mayumi M. Transmaternal exposure to bisphenol A modulates the development of oral tolerance. *Pediatr Res* 62:60-64(2007)
- 2) Tokuriki S, Ohshima Y, Yamada A, Ohta N, Tsukahara H, Mayumi M, Leukotriene D4 enhances the function of endothelin-1-primed fibroblasts. *Clin Immunol* 125:88-94(2007)
- 3) Kobata R, Tsukahara H, Ohshima Y, Ohta N, Tokuriki S, Tamura S, Mayumi M. High levels of growth factors in human breast milk. *Early Hum Dev.* 84:67-9 (2008)
- 4) Omata N, Ohshima Y, Yamada A, Yasutomi M, Tokuriki S, Mayumi M. A case of milk-protein-induced enterocolitis associated with enterotoxigenic E coli and MRSA infections. (in press)
- 5) 大嶋勇成 食物アレルギーの診断 負荷試験の適応. *小児内科* 39 :578-580(2007)
- 6) 大嶋勇成 アレルギー性炎症の発症機序 *日本小児科学会誌* 111:16-22(2007)
- 7) 大嶋勇成 気道構成細胞と喘息 樹状細胞喘息 *20:17-21(2007)*
- 8) 大嶋勇成 小児気管支喘息の急性発作への対応と治療: 救急外来・病院での対応 *Pediatric Allergy for Clinicians* 3:19-21(2007)
- 9) 大嶋勇成 日韓招待講演報告: Roles of dendritic cells in allergic inflammation: A new therapeutic target for bronchial asthma. *日本小児アレルギー学会誌* 21:345-352(2007)
- 10) 大嶋勇成 アレルギー疾患に対する免疫療法の現状と展望 *日本小児アレルギー学会誌* 21:263-270(2007)
- 11) 大嶋勇成 内因性 Th2 アジュバントとしての TSLP Allergy From the Nose to the Lung *5:13-17(2007)*
- 12) 大嶋勇成、眞弓光文 衛生仮説とその検証 呼吸器コモンディズィーズの診療: 気管支喘息のすべて p67-71(2007) 大田健、一ノ瀬正和編文光堂

2. 学会発表

- 1) 大嶋勇成、山田彰子、徳力周子、眞弓光文 ミニシンポジウム: 小児気管支喘息の治療・管理 ER型救急診療体制での小児喘息患者の発作時対応の問題点と JPGL2005 の影響 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会 2007/6/10-12 横浜
- 2) 安富素子、金谷由字子、大嶋勇成、眞弓光文 アウトグロー後の食物アレルギー児に発症した食物依存性運動誘発アナフィラキシーの1例 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会号 2007/6/10-12 横浜
- 3) 大嶋勇成、山田彰子、徳力周子、眞弓光文 ロイコトリエン D4 が線維細胞機能におよぼす抑制効果 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 2007/11/1-3 横浜
- 4) 山田彰子、大嶋勇成、徳力周子、眞弓光文 CD8+ T 細胞による即時型食物アレルギー症状抑制効果の検討 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 2007/11/1-3 横浜
- 5) 大嶋勇成 シンポジウム: 食物アレルギーの免疫学 動物モデルからの提言 第44回日本小児アレルギー学会 2007/12/8,9 名古屋
- 6) 安富素子、大嶋勇成、眞弓光文 ワークショップ: Young allergist の集い 樹状細胞機能からみた自然免疫とアレルギー性炎症との接点 第44回日本小児アレルギー学会 2007/12/8,9 名古屋
- 7) 大嶋勇成 急性発作時の対応 福井喘息座談会 2007.10.20 福井
- 8) 大嶋勇成 北陸地区における小児喘息実態調査結果報告 *Airway Forum in Fukui 2007* 2003/2/2 福井市
- 9) 大嶋勇成 乳幼児喘息の診断と治療の現状と問題点 福井県病院薬剤師会学術講演会 2003/10/3 福井市

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

アレルギー性疾患発症と自然免疫に関する研究 —アレルギー疾患における自然免疫関連遺伝子多型の検討—

分担研究者 玉利 真由美 理化学研究所遺伝子多型研究センターアレルギー体質関連遺伝子研究チーム
研究協力者 広田 朝光 理化学研究所遺伝子多型研究センターアレルギー体質関連遺伝子研究チーム

研究要旨

アレルギー性疾患の発症・重症化因子を明らかにするために、自然免疫の TLR signaling に関連した遺伝子多型について症例対照相関解析を行った。エクソン周辺 100bp を含む領域について遺伝子多型を同定し、Haploview を用いて連鎖不平衡マップを作成、Tag SNPs を選定した。コントロール（非喘息 745 例）、小児喘息 548 例、成人喘息 468 例を用いて相関解析を行った。TGFB は古くより気道炎症の制御、気道リモデリングに重要な役割を果たすと考えられている。TGFB2 は肺で強く発現し、TGFB1 により強く誘導されること、またレポーターアッセイの結果から、気道上皮細胞において感受性アレルによる TGFB2 発現増加が小児喘息発症に影響する可能性が示された。今回の検討では日本人集団では K421K、rs3775073 多型と成人喘息発症との相関が認められた。さらにこれらの多型の機能解析を進めて行く。

A. 研究目的

アレルギー発症進展重症化に関与する体質要因について遺伝子多型を用いた症例対照相関解析を用いて明らかにする。特に自然免疫の TLR signaling に関連した遺伝子多型について症例対照相関解析を行い、さらに相関の認められた遺伝子については機能解析を行い、遺伝子多型が病態に及ぼす影響について検討し、分子レベルでの病態解明を行う。

B. 研究方法

データベースより各候補遺伝子のゲノム構造を入手し、エクソン周辺 100bp を含む領域について喘息患者 24 名において塩基配列を決定し、遺伝子多型を同定する。それらを Haploview を用いて連鎖不平衡マップを作成し、Tag SNPs の選定を行う。選定された遺伝子については TaqMan 法、及び Invader 法を用いてタイピングを行い、相関解析を行う。用いるサンプルはコントロール（非喘息 745 例）、小児喘息 548 例、成人喘息 468 例である。さらに広い範囲に存在する遺伝子については HapMap project による LDmap による遺伝子多型情報より intron 部分の TagSNP の選び出しも合わせて行う。自然免疫、炎症に関連する遺伝子についてデータベースより各候補遺伝子 Tag SNPs の選定を行う。必要に応じ、詳細な SNPs の同定を行う。

C. 研究結果

TGFB2 遺伝子プロモータ領域にある多型 (rs10482719, $P=0.0037$) 3' UTR 上にある多型 (rs900, $P=0.00041$) と小児アトピー性喘息との相関を見いだした。これらの多型と血清総 IgE 値や重症度との相関は認めなかった。TGFB2 蛋白は喘息患者及び非喘息コントロール例の気道上皮細胞に強く発現しており、気道上皮細胞 BEAS2B において TGFB2 mRNA は TGFB1 により強く誘導されることが明らかとなった。さらに BEAS2B 細胞を用いたレポーターアッセイにおいて、感受性アレルにおいて転写活性の増強が認められた。

TLR6 遺伝子上に 37 個（エクソン上に 10 個、アミノ酸の変化する多型 3 個を含む）の遺伝子多型を認めた。頻度が 10%以上、連鎖不平衡を加味し、5 つの SNPs で検討した結果、エクソン上の SNP (K421K、rs3775073, $P=0.0060$) と成人喘息発症との相関を認めた。しかし成人喘息重症度と多型との相関は認めなかった。

食物アレルギーについてはこれまで 331 例を収集しタイピングに向け、DNA 抽出、大量タイピングに向けたサンプルの Quality control 等の準備を進めている。

D. 考察

TGFB は古くより気道炎症の制御、気道リモデリングに重要な役割を果たすと考えられている。TGFB2 は肺で強く発現し、TGFB1 により強く誘導されること、またレポーターアッセイの結果か

ら、気道上皮細胞において感受性アレルによる TGFβ2 発現増加が小児喘息発症に影響する可能性が示された。TLR6 はアフリカ系アメリカ人において Ser249Pro 多型と気管支喘息発症との相関が報告されている。今回の検討では日本人集団では Ser249Pro の多型は認められなかったが、K421K、rs3775073 多型と成人喘息発症との相関が認められた。TLR6 は TLR2 とヘテロダイマーを形成し、マイコプラズマの菌体成分を認識する。マイコプラズマは上皮上に存在し、喘息の重症化に関連する事がこれまで報告されており、今後、相関を認めた SNP と連鎖不平衡にある SNPs の機能解析を進めるとともにマイコプラズマ感染との関連についても検討が必要と考えられた。

E. 結論

本年度は小児および成人気管支喘息の発症に関連する遺伝子多型を TGFβ2, TLR6 遺伝子上に見いだした。TLR6 については機能解析を進めて行く。この他の遺伝子多型についても現在検討中であり、さらに食物アレルギーについても順次検討を行なう。これらの多型が病態に影響するメカニズムと通じてアレルギー発症や重症化の病態の解明を行なっていく。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Harada, M., Nakashima, K., Hirota, T., Shimizu, M., Doi, S., Fujita, K., Shirakawa, T., Enomoto, T., Yoshikawa, M., Moriyama, H., Matsumoto, K., Saito, H., Suzuki, Y., Nakamura, Y., Tamari, M.: Functional Polymorphism in the Suppressor of Cytokine Signaling 1 Gene Associated With Adult Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 36:491-496, 2007
- 2) Onouchi, Y., Tamari, M., Takahashi, A., Tsunoda, T., Yashiro, M., Nakamura, Y., Yanagawa, H., Wakui, K., Fukushima, Y., Kawasaki, T., Nakamura, Y., Hata, A.: A genomewide linkage analysis of Kawasaki disease: evidence for linkage to chromosome 12. *J Hum Genet.*, 52:179-190, 2007.
- 3) Matsuda, A., Ebihara, N., Kumagai, N., Fukuda, K., Ebe, K., Hirano, K., Sotozono, C., Tei, M., Hasegawa, K., Shimizu, M., Tamari, M., Namba, K., Ohno, S., Mizuki, N., Ikezawa, Z., Shirakawa, T., Hamuro, J., Kinoshita, S.: Genetic polymorphisms in the promoter of the interferon gamma receptor 1 gene are associated with atopic cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 48:583-589, 2007.
- 4) Miyatake A, Fujita M, Nagasaka Y, Fujita K, Tamari M, Watanabe D, Nakano N, Hidari KI, Suzuki Y. The new role of disodium cromoglycate in the treatment of adults with bronchial asthma. *Allergol Int.* 2007;56:231-9.
- 5) Kamada F, Mashimo Y, Inoue H, Shao C, Hirota T, Doi S, Kameda M, Fujiwara H, Fujita K, Enomoto T, Sasaki S, Endo H, Takayanagi R, Nakazawa C, Morikawa T, Morikawa M, Miyabayashi S, Chiba Y, Tamura G, Shirakawa T, Matsubara Y, Hata A, Tamari M, Suzuki Y. The GSTP1 gene is a susceptibility gene for childhood asthma and the GSTM1 gene is a modifier of the GSTP1 gene. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007;144(4):275-86.
- 6) Hatsushika K, Hirota T, Harada M, Sakashita M, Kanzaki M, Takano S, Doi S, Fujita K, Enomoto T, Ebisawa M, Yoshihara S, Sagara H, Fukuda T, Masuyama K, Katoh R, Matsumoto K, Saito H, Ogawa H, Tamari M, Nakao A. Transforming growth factor-beta(2) polymorphisms are associated with childhood atopic asthma. *Clin Exp Allergy.* 2007;37:1165-74.
- 7) Enomoto H, Noguchi E, Iijima S, Takahashi T, Hayakawa K, Ito M, Kano T, Aoki T, Suzuki Y, Koga M, Tamari M, Shiohara T, Otsuka F, Arinami T. Single nucleotide polymorphism-based genome-wide linkage analysis in Japanese atopic dermatitis families. *BMC Dermatol.* 2007;7:5.
- 8) Wakahara K, Tanaka H, Takahashi G, Tamari

- M, Nasu R, Toyohara T, Takano H, Saito S, Inagaki N, Shimokata K, Nagai H. Repeated instillations of *Dermatophagoides farinae* into the airways can induce Th2-dependent airway hyperresponsiveness, eosinophilia and remodeling in mice. Effect of intratracheal treatment of fluticasone propionate. *Eur J Pharmacol.* 2008; 578: 87-96.
- 9) atsumoto K, Tamari M, Saito H. Involvement of eosinophils in the onset of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 121: 26-27.
- 10) Hirota T, Harada M, Sakashita M, Doi S, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Ebisawa M, Yoshihara S, Noguchi E, Saito H, Nakamura Y, Tamari M. Genetic polymorphism regulating ORM1-like 3 (*Saccharomyces cerevisiae*) expression is associated with childhood atopic asthma in a Japanese population. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 in press
2. 学会発表
- 1) 第19回藤沢市内科医学会 特別講演 気管支喘息の遺伝要因と薬剤の効果について グランドホテル湘南 2階 松竹 3/17/2007
- 2) 独立行政法人 理化学研究所 遺伝子多型研究センターシンポジウム, SNP から疾患遺伝子解明へ 品川インターシティホール アレルギー体質と感染症、SNPs を使ったアプローチ 3/29/2007
- 3) ATS 2007 The American Thoracic Society's International Conference, San Francisco Functional Polymorphism in the Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS1) Gene Associated with Adult Asthma, Poster Discussion Session, [D23] GENE: ENVIRONMENT INTERACTIONS IN THE IMMUNE RESPONSE PHENOTYPE Room 121/124 (Lower Level), Moscone Center 5/23/2007
- 4) 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会 ミニシンポジウム 2 アレルギー性鼻炎 MS2-6 成人スギ花粉症の疫学および遺伝学的解析-福井大学におけるボランティア 1042人の検討- 6/10/2007
- 5) 第27回六甲カンファレンス 京都ウエステイン都ホテル 喘息の増悪化とその対応 II. 増悪をきたす内因とその予防 8/4/2007
- 6) 日本人類遺伝学会第52回大会 SOCS1 遺伝子多型と成人気管支喘息発症との相関 東京新宿、京王プラザホテル 9/13/2007
- 7) 第17回小児気道アレルギー研究会 アレルギー性疾患の最新の研究から患者教育まで セッション III アレルギー性疾患の遺伝研究 気管支喘息関連遺伝子 東京新宿センチュリーハイアットホテル 10/7/2007
- 8) アレルギー性鼻炎治療研究会 entry 第7回セミナー 東京大手町、東京パレスホテル IgE 抗体 アレルギー体質と遺伝子多型について 10/13/2007
- 9) ASHG Annual meeting of American Society of Human Genetics San Diego Poster Session Polymorphisms of RIG-I are associated with adult bronchial asthma 10/25/2007
- 10) 第26回大和アレルギー研究会 遺伝子多型を用いた気管支喘息の病態解析. 特別講演 近畿大学付属奈良病院 11/13/2007
- 11) 中国地区上気道アレルギー研究会 リーガロイヤルホテル広島 特別講演 アレルギー疾患と感染症 2/2/2008
- 12) 第26回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 スポンサードレクチャー 大阪、ホテル阪神 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析 2/21/2008
- 13) 日本アレルギー協会 アレルギー研修会 2008 I. トピックス アレルギー関連遺伝子研究と創薬 3/7/2008
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

アレルギー性疾患の発症と環境アレルゲンに関する研究

分担研究者 安枝 浩 国立病院機構相模原病院臨床研究センター室長
研究協力者 西岡 謙二 国立病院機構相模原病院臨床研究センター
齋藤 明美 国立病院機構相模原病院臨床研究センター
永井 智 花王株式会社ハウスホールド研究所

研究要旨

アレルゲン曝露の実態を正しく反映する室内環境アレルゲンの測定法を確立することを目的として、従来からある掃除機法とは異なる新たなサンプリング方法について検討を加え、その有用性を評価した。医療用粘着テープをヒトの皮膚表面に貼付するテープ法では、アトピー性皮膚炎乳児を対象にした調査で、本法によるダニアレルゲン Der 1 量と気道症状発現との間に関連のあることが見いだされた。また、シャーレを一定期間室内に放置した後に回収するシャーレ法では、その測定値は従来の掃除機法による測定値よりも室内空気中のダニアレルゲン濃度をよく反映していることが確認された。両方法ともに簡便で、患者にかける負担がきわめて少ないサンプリング方法であるので、ダニアレルゲン曝露の指標としてさまざまな疫学調査への応用が期待される。

A. 研究目的

アレルギー性疾患における感作、発症、増悪には環境アレルゲンに対する曝露が密接に関わっている。これまで、室内環境アレルゲン曝露の指標には、掃除機法で集めた室内塵中のアレルゲン量が主に用いられてきた。しかし、室内環境アレルゲンは吸入性アレルゲンであり、空気中に浮遊しているアレルゲン粒子が気道を介して体内に入ってくる。特にダニアレルゲンの場合には、発生源である室内塵中の汚染量が曝露量(空気中濃度)を正確に反映しているとは限らないということが明らかにされている。アレルゲン曝露の実態を正しく反映する室内環境アレルゲンの測定法を確立することを目的として、掃除機法以外のサンプリング方法について検討を加え、その有用性を評価した。

B. 研究方法

今年度は2種類のサンプリング方法について検討した。医療用粘着テープ(テガダーム, 6 cm x 7 cm)をヒトの皮膚表面、寝具表面に貼付するテープ法、直径84 mmのプラスチックシャーレを一定期間(1週間-3ヶ月)室内のタンス上などに放置した後に回収するシャーレ法(Petri dish法)である。

テープ法では、初診時に頬部皮膚表面のダニアレルゲン(Der 1)量とダニに対する感作の有無を調べた1歳未満のアトピー性皮膚炎乳児70例を対象にして、初診時の頬部皮膚表面Der 1量と

その後の1年間における気道症状発現との関係を調べた。

シャーレ法では、まず、基本的な測定精度の評価、およびシャーレに堆積するDer 1量の室内床面からの高度依存性についての評価を行った。さらに、37家庭の寝室、居間におけるシャーレ法Der 1量、寝具表面からのテープ法Der 1量と従来の掃除機法Der 1量との関係、およびシャーレ設置時に一定の条件で発塵(寝室では寝具の上げ下げ、居間では床面の掃除機掛け)をさせたときのエアサンプリング法による捕集Der 1量との関係について解析した。

サンプリングした試料中のDer 1量は、掃除機法によるものは比色法ELISAで、テープ法、シャーレ法、エアサンプリング法によるものは高感度蛍光ELISAで測定した。

C. 研究結果

初診時に頬部皮膚表面のDer 1量を測定した乳児70例のうち、1年間経過を追えたのは62例で、そのうち喘鳴を認めたのは17例であった。その17例の皮膚表面からのテープ法Der 1量は、喘鳴を認めなかった45例のDer 1量よりも有意に高値であった。また、初診時ダニ陽性例の割合は、有意ではないが喘鳴陽性群の方が高かった(図1)。

同一箇所3枚のシャーレを並べて同時にサンプリングしたときの測定値の変動係数は7.3%から116%(平均45.4%, n=19)であり、テープ法における測定値のバラツキとほぼ同じ

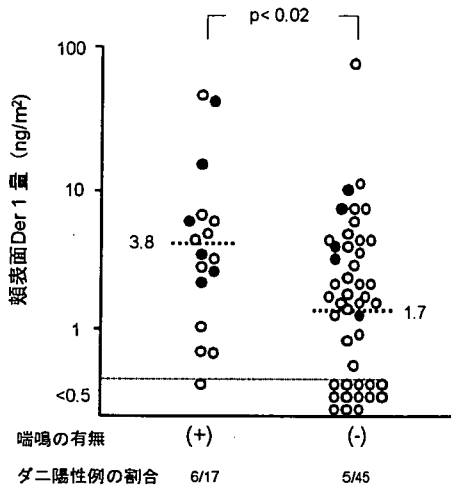


図1 初診時の頬表面 Der 1 量とその後 1 年間における喘鳴の有無 (●: 初診時ダニ陽性例, ○: ダニ陰性例).

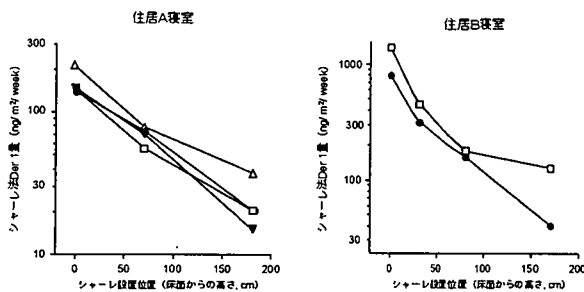


図2 同一寝室におけるシャーレ設置位置と堆積塵中 Der 1 量. 住居 A では 3 カ所で 4 回, 住居 B では 4 カ所で 2 回サンプリングを行った.

レベルであった。同一室内の高さの異なる位置に設置したシャーレに堆積する Der 1 量は、再現性をもって設置位置が高いほど低値になり、高さ 100 cm の位置では床面のおよそ 1/5 であった (図 2)。

37 家庭の寝室、居間におけるシャーレ法 Der 1 量と寝具、居間床面からの掃除機法 Der 1 量との間には有意な相関は見られなかったが、寝室におけるシャーレ法 Der 1 量と寝具表面からのテープ法 Der 1 量、居住者の皮膚表面 Der 1 量との間には有意な正の相関が見られた (図 3, 4)。さらに、発塵時のエアサンプリング法 Der 1 量とシャーレ法 Der 1 量、寝具表面テープ法 Der 1 量はよく相関した (図 5)。

掃除機法、シャーレ法、発塵時のエアサンプリング法の 3 種類すべてのサンプリングを実施し得たフローリングが主体の居間 8 室とカーペットが主体の居間 8 室の各種 Der 1 量を比較した (図 6)。

掃除機法ではカーペットが主体の居間の方が

10 倍以上 Der 1 量は高値であったが、シャーレ法、エアサンプリング法では両群間の Der 1 量に有意な差は認められず、むしろフローリングが主体の居間の方が Der 1 量は高値であった。

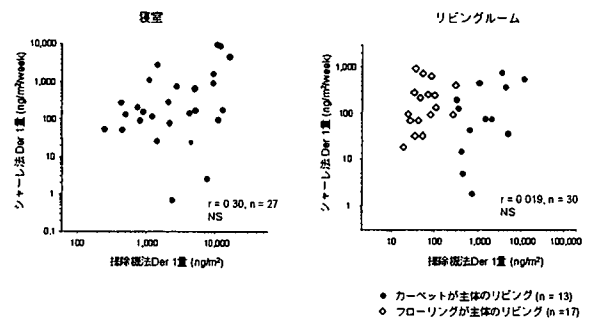


図3 シャーレ法 Der 1 量と従来の掃除機法 Der 1 量の関係.

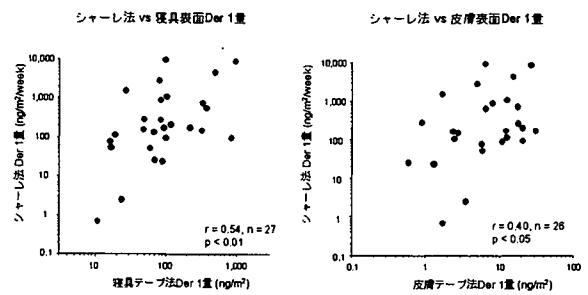


図4 シャーレ法 Der 1 量とテープ法 Der 1 量の関係(寝室).

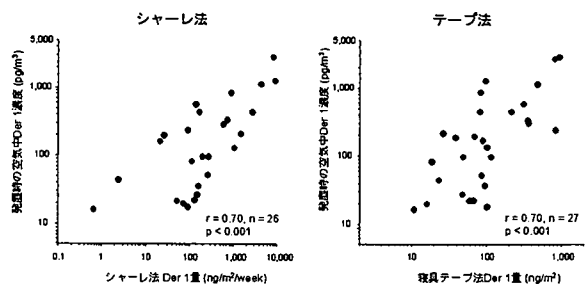


図5 発塵(フン上げ下げ)時の寝室内空气中 Der 1 濃度とシャーレ法 Der 1 量、寝具テープ法 Der 1 量の関係.

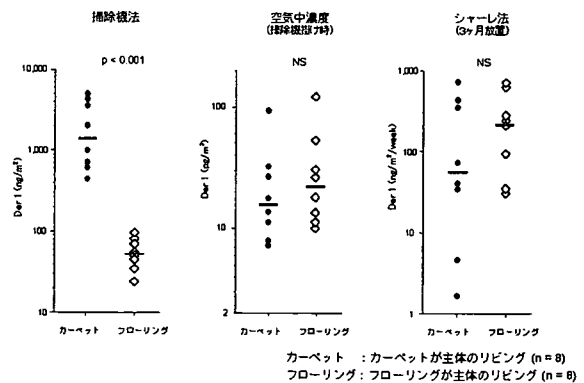


図6 リビングルームの床材と各種 Der 1 量の比較.

D. 考察

テープ法, シャーレ法はともに簡便で, 患者にかかる負担がきわめて少ないサンプリング法である。とくに, テープ法による皮膚表面からのサンプリングでは, 外来診療時にサンプリングを行うだけで患者の曝露状況を把握することができる。この簡便なテープ法による調査で, 乳幼児期におけるダニアレルゲン曝露・感作と気道症状発現との間に有意な関連を見いだすことができた。

シャーレ法 Der 1 量, テープ法 Der 1 量は掃除機法 Der 1 量とは相関せず, エアサンプリング法 Der 1 量とよく相関した。これらの結果は, シャーレ法, テープ法による測定値は掃除機法とは異なり, 汚染の指標としてよりも曝露の指標として有用であることを強く示唆している。

床からカーペットを除去するというのはダニ対策の基本である。実際, 掃除機法で評価した床面の汚染量はフローリングの方が圧倒的に低い。しかし, 掃除機掛け時の室内空气中アレルゲン濃度や, 普段の生活中に空气中に舞い上がってシャーレ上に落下してくるアレルゲン量には, カーペットとフローリングで差は見られない(図6)。すなわち, ダニアレルゲンの曝露を回避するためには, カーペットを除去して汚染を低減化するだけでは十分ではない。汚染の低減化に加えて, 曝露を回避するための効率的な対応策の確立とそれの実践が必要である。このような対応策の確立という目的にもシャーレ法は有用である。

E. 結論

テープ法, シャーレ法はいずれも簡便で, 患者にかかる負担がきわめて少ないサンプリング法である。現在進行中の乳幼児を対象にしたコホート研究において, ダニアレルゲン曝露の指標としての有用性が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 安枝浩. アレルゲン分析とその臨床応用. アレルギー 56: 1249-1253, 2007.
- 2) 安枝浩. 環境アレルゲン. 総合臨牀 56: 1840-1844, 2007.
- 3) 安枝浩. 小児アレルギー疾患と室内環境アレ

ルゲン. 小児科 48: 1187-1193, 2007.

2. 学会発表

- 1) Kawarai S, Shirai H, Sakaguchi M, Ohmori K, Yasuda N, Yasueda H, Ikeda K, Tsujimoto H. Effect of house dust mite (HDM) avoidance measure on the clinical symptoms in dogs with atopic dermatitis (AD). AAAAI 63rd Annual Meeting 2007. 2. 23. San Diego, USA
- 2) Watanabe R, Murakami S, Kato S, Yoshikawa M, Yasueda H, Hirose M. Effects of heating systems on diffusion of mite allergens in occupational spaces based on experiments and CFD analysis. Roomvent 2007 2007. 6. 13. Helsinki, Finland
- 3) 永井智, 高野勝幸, 高橋佑輔, 松井千春, 静野聡仁, 榎本雅夫, 齋藤明美, 安枝浩. 室内環境整備技術の開発 XV. 住居内堆積塵の Der 1 汚染実態と対策. 第 19 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2007. 6. 10. 横浜
- 4) 藤野美菜, 岩田利江, 宮沢博, 安枝浩. 保育園におけるダニアレルゲン量と個人曝露量に関する研究. 平成 17 年度空気調和・衛生工学会大会 2007. 9. 12. 仙台
- 5) 齋藤明美, 安枝浩, 秋山一男. 気管支喘息患者宅の室内環境アレルゲン量調査と患者指導の有用性. 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2007. 11. 1. 横浜
- 6) 西岡謙二, 齋藤明美, 轡田和子, 秋山一男, 安枝浩. アトピー性皮膚炎乳幼児における皮膚表面ダニアレルゲン量と喘息発症の関係. 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2007. 11. 1. 横浜
- 7) 岸幹二, 鈴木重雄, 高野恵, 齋藤明美, 安枝浩, 大西成雄. 室内環境中のダニ抗原量の 1 年間の推移-防ダニカバーの効果-. 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2007. 11. 1. 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

Respiratory syncytial virus (RSV) 感染と小児気管支喘息発症に関する研究

分担研究者 下条 直樹 千葉大学大学院医学研究院小児病態学准教授
研究協力者 井上 祐三朗 千葉大学大学院医学研究院小児病態学
鈴木 洋一 千葉大学大学院医学研究院公衆衛生学准教授
星岡 明 千葉県こども病院診療部長
青柳 正彦 めいわこどもクリニック院長
本多 昭仁 国保旭中央病院小児科部長
小野 靖彦 おの小児科院長

研究要旨

RSV に対する応答性には個体差が存在することが示唆されるがその詳細は明らかになっていない。今年度は RSV 細気管支炎発症と関連する炎症・免疫分子の遺伝子多型を明らかとすることを目的として研究を行った。RSV 細気管支炎患者は平均年令 7 か月の乳児 67 名で、対照は乳幼児期に喘鳴を認めなかった小学生 203 名である。RSV 細気管支炎患者と対照の間に性別、出生体重、年長同胞数、集団生活の有無、受動喫煙、母乳栄養の頻度に差はなかった。遺伝子多型は過去に喘息や細気管支炎について国内外から報告があり、日本人において多型の存在が確認されているものについて PCR 法を用いて解析した。その結果、GSTP1 Ile105Val 多型、RANTES C(-28)G 多型、RANTES A(-403)G 多型、IL-17F His161Arg 多型が RSV 細気管支炎発症と関連することが明らかとなった。これらは現在までに海外で報告されておらず、日本人において重要な RSV 細気管支炎発症関連遺伝子多型と考えられる。RSV 細気管支炎発症には炎症と関連する遺伝子の関与が大きく、それらの遺伝子多型により細気管支炎の発症リスクが規定されていることが示唆された。これらの遺伝子多型は RSV 細気管支炎発症リスクの予測にも有用と思われる。

A. 研究目的

乳児の細気管支炎は Respiratory syncytial virus (RSV) を主要原因ウイルスとする下気道感染症で、反復性喘鳴、喘息発症のリスクを高めることが知られている。一方、ほとんどすべての小児は 3 歳までに RSV に罹患するとされているが大部分の感染は上気道感染で終息して下気道感染には進展しない。以上から RSV に対する応答性には個体差が存在することが示唆されるがその詳細は明らかになっていない。そこで今年度は RSV 細気管支炎発症における炎症・免疫分子の遺伝子多型を明らかとすることを目的とした。

B. 対象と方法

RSV 細気管支炎患者は 67 名(平均年令 7 か月)で、2 才以上の児、低出生体重児、先天性心疾患などの先天性疾患を有する児、入院前に喘鳴を呈していた児は除外した。対照は乳幼児期に喘鳴を認めなかった千葉大学教育学部附属小学校児童 203 名(6-12 才)である。RSV 細気管支炎患者と対照の間に性別、出生体重、年長同胞数、集団生活の有無、受動喫煙、母乳栄養の頻度に差はない

(表 1)。遺伝子多型は過去に喘息や細気管支炎について国内外から報告があり、日本人において多型の存在が確認されているものについて PCR 法を用いて解析した。統計解析は χ^2 乗検定を用いて行なった。遺伝子多型解析については保護者より書面にて同意を得た。

C. 研究結果

RSV 細気管支炎、気管支喘息の発症と関連することが報告されているおよそ 20 の炎症、自然免疫関連分子の遺伝子多型について検討した。その結果、いくつかの遺伝子多型と RSV 細気管支炎発症に関連が認められた。以下に主な遺伝子多型とその頻度について示す。GSTP1 Ile105Val 多型: Val/Val が RSV 細気管支炎患者では 5.8%であったのに対し対照小児では 1.2%と有意に少なかった ($p=0.012$) (図 1)。RANTES C(-28)G 多型: CC が RSV 細気管支炎患者では 89.6%であったのに対し対照小児では 70.9%と有意に少なかった ($p=0.0021$) (図 2)。RANTES A(-403)G 多型: GG が RSV 細気管支炎患者では 59.7%であったのに対し対照小児では 39.9%と有意に少なかった