

安定群の間で差を認めなかったが、末梢気道抵抗とされる R5-R20 は不安定群で有意に高値であった (図 7)。他の末梢気道パラメーターとされる低周波リアクタンス積分値 AX と共振周波数 Fres も不安定群で有意に高値であり、末梢気道由来の NO と考えられる CaNO でみられた傾向と一致していた (図 8)。

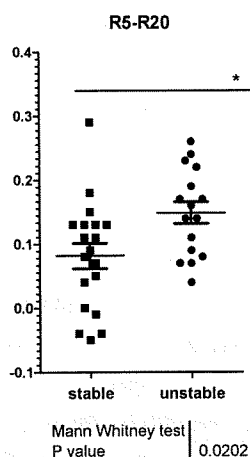


図 7 喘息症状と IOS による末梢気道抵抗 R5-R20

喘息症状の安定・不安定を従属変数、呼気 NO の各パラメーター、IOS の各パラメーターを説明変数として多重ロジスティック回帰解析を行うと、CaNO と Fres がそれぞれオッズ比 2.1 と 1.6 で有意となった。末梢気道由来の NO 高値および末梢気道抵抗上昇が不安定を予測すると考えられた。

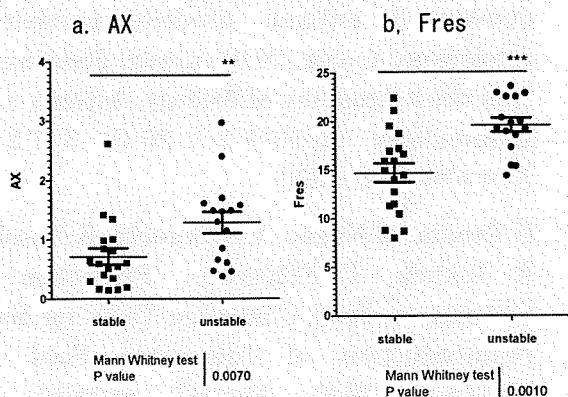


図 8 喘息症状と IOS の末梢気道抵抗パラメーター

D. 考察

小児アレルギー疾患の治療選択に際して、非侵襲的で簡便なバイオマーカーを利用した診断指針の確立のため、2つの検討を行った。

まず、食物アレルギーでは最終診断法である負荷試験がより多くの施設で安全に行うことができ

ることをめざして、誘発反応が軽症であるか＝一般診療所でも実施可能と考えられる例、重篤であるか＝設備・人員の整った専門病院での負荷試験実施が必要な例、を予測するマーカーを探索した。我々はこれまでに好塩基球の活性化マーカーである CD203c が食物アレルギーの有用な診断マーカーであることを報告してきたが、本研究では食物アレルギー診断普及のため、どこの施設でも実施できる一般的な検査の有用性について検討した。その結果、負荷陰性または軽症と予測される因子は、鶏卵においては 1) 年齢が 3~5 歳 2) アナフィラキシーの既往がない 3) オボムコイド特異 IgE クラスが 2 以下、4) 卵白 HRT 陰性、と考えられた。牛乳では 1) 牛乳特異 IgE が 0-2 歳ではクラス 1 以下、3 歳以上ではクラス 2 以下、2) 牛乳 HRT 陰性、3) アナフィラキシーの既往がないであった。小麦では 1) 小麦 RAST が 6 歳以上でクラス 3 以下、小麦 HRT 陰性、アナフィラキシーの既往がないことであった。病歴と検査を組み合わせることによって、負荷試験での誘発反応をある程度予測可能なことが明らかとなった。小麦のみ診断性能はやや劣るが、我々が昨年度までの好塩基球 CD203c 発現の検討で有用であることを見いだした ω 5 グリアジンに対する特異 IgE 抗体検査が一般化すれば、予測因子はさらに改善すると考える。

次に、呼気 NO 測定に関して、より詳細な検討を行った。一般に呼気 NO 濃度は気道の好酸球性炎症を反映し、喘息の診断、吸入ステロイドに対する治療反応性、治療効果の判定、増悪の予測などに有用とされている。しかし、呼気 NO は喘息がなくてもアレルギー性鼻炎の存在だけで高値となったり、症状が安定しているにも関わらず高値となるなど、非典型的なパターンをとることがしばしばあり、判定に苦慮する。アレルギー性鼻炎では上気道に好酸球性炎症が存在するが、気道の連続性のため、下気道でも中枢気道までではしばしば炎症が認められる。この場合は喘息は発症してなくても呼気 NO が上昇すると考えられる。また、喘息が寛解しても中枢気道では好酸球性炎症が残存しているため、NO が上昇する可能性もある。一方、喘息とくに重症の例では末梢気道の炎症が高度であることが報告されている。測定される NO の産生部位が同定できれば、これらの亜型を鑑別できるわけであるが、米国呼吸器学会・ヨーロッパ呼吸器学会 (ATS/ERS) 推奨の標準法、すなわち呼気流速 50ml/s による測定では NO の産生部位は同定で

きない。そこで、我々は呼気 NO 濃度の呼気流速依存性に基づいて肺における NO 産生動態をモデル化、異なる呼気流速での NO 測定値から部位別の NO 濃度を推定する方法を採用して検討した。その結果、呼気流速 50ml/s での NO 濃度が高値であるが、症状安定群と不安定群の間で差が認められない場合でも、肺胞(末梢性)NO は不安定群において安定群より有意に高値であることを見いだした。このことは、これまで重症喘息の生検・剖検によって観察されていた末梢気道炎症を非侵襲的かつ簡便に裏付けるものである。さらに、IOS でも末梢気道のパラメーターとされる R5-R20, AX, Fres がそれぞれ不安定群で高値であり、肺胞(末梢性)NO の所見と一致した。肺胞(末梢性)NO を測定することにより、よりテーラーメイド化した喘息のモニタリングが可能であることが明らかとなったと考える。

E. 結論

- 1) 食物経口負荷試験はガイドラインも策定されたが、ときにおこる重篤な誘発症状のために現状では体制の整った施設でのみ実施可能である。しかし、陰性または軽度のみ誘発が予測できれば、診療所レベルでも確定診断が可能となり、さらなる普及が期待できる。本研究で明らかとなった予測マーカーを利用することにより、より多くの食物アレルギー患者に適切な診断を受ける機会を提供できる。
- 2) 呼気 NO の詳細な測定によって、喘息の炎症の首座である末梢気道の炎症が評価できる可能性が示された。標準法による NO 測定のみならず、本研究で用いたモデル化解析を応用することにより、さらに的確な抗炎症療法の選択が可能となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tokuda R, Nagao M, Hiraguchi Y, Hosoki K, Matsuda T, Kouno K, Morita E, and Fujisawa T. Antigen-Induced Expression of CD203c on Basophils Predicts IgE-mediated Wheat Allergy. *Allergol Int.* 58 : 193-199(2009).
2. Fujisawa T, Nagao M, Hiraguchi Y, Hosoki K, Tokuda R, Usui S, Masuda S, Shinoda

M, Hashiguchi A, and Yamaguchi M. Biomarkers for allergen immunotherapy in cedar pollinosis. *Allergol Int.* 58 : 163-170. (2009).

3. Fujisawa T, M Nagao, Y Hiraguchi, H Katsumata, H Nishimori, K Iguchi, Y Kato, M Higashiura, I Ogawauchi, and K Tamaki. Serum measurement of thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 in children with atopic dermatitis: elevated normal levels in infancy and age-specific analysis in atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 20 : 633 - 641(2009).
 4. 細木興亜, 長尾みづほ, 平口雪子, 徳田玲子, 藤澤隆夫. RSウイルス感染症入院例における退院後の喘鳴についての検討. *アレルギー* 58:1521-1529(2009).
 5. 細木興亜, 平口雪子, 徳田玲子, 長尾みづほ, 藤澤隆夫, 高松勇, 錦戸知喜, 吉田之範, 亀田誠, 土居悟, 森下雄大, 竹中学, 寺田明彦, 野田映子, 神田康司「初めて発作入院した」乳幼児喘息の臨床経過. *日本小児アレルギー学会誌.* 23:651 - 658(2009).
- ### 2. 学会発表
1. M Nagao, R Tokuda, H Tanida, K Hosoki, Y Hiraguchi, T Fujisawa. Basophil CD203c expression induced by egg white ovomucoid domain 3 antigen predicts persistent intolerance to egg. 2010 Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (2010年2月26日 - 3月2日 New Orleans, USA)
 2. H Tanida, M Nagao, Y Hiraguchi, K Hosoki, R Tokuda, T Fujisawa. Prediction of Severity in Food Challenge Tests for Safe Reintroduction of Allergenic Food in Children. 2010 Annual meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (2010年2月26日 - 3月2日 New Orleans, USA)
 3. Y Hiraguchi, H Tanida, K Hosoki, M Nagao, R Tokuda, T Fujisawa. Aeroallergen sensitization and TSLP/ECP levels in nasal fluid of infants with recurrent wheezing. 2010 Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and

- Immunology (2010年2月26日 - 3月2日 New Orleans, USA)
4. Y Machino, M Nagao, Y Ohya, T Fujisawa. Impact of Maternal Burden Having a Child with Food Allergy on Perception and Interpretation of Infant Emotion. 2010 Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (2010年2月26日 - 3月2日 New Orleans, USA)
 5. K Hosoki, A Nakamura, M Nagao, Y Hiraguchi, R Tokuda, H Wada, and T Fujisawa. Differential activation of eosinophils by "probiotic" Bifidobacterium bifidum and "pathogenic" Clostridium difficile. 2010 Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (2010年2月26日 - 3月2日 New Orleans, USA)
 6. 長尾みづほ、藤澤隆夫 ワークショップ「小児の肺機能検査のスタンダード」呼気NOの測定方法. 日本小児呼吸器疾患学会 (第42回) (2009年10月17-18日, 高崎市)
 7. 藤澤隆夫 教育セミナー「乳幼児の喘鳴:いかに対処すべきか」. 第42回日本小児呼吸器疾患学会 (2009年10月17-18日, 高崎市)
 8. 長尾みづほ、藤澤隆夫、小峯真紀、佐藤一樹、富川盛光、本村千華子、海老澤元宏、小田嶋博、赤澤晃、西牟田敏之、西間三馨. 小児気管支喘息における吸入ステロイド中止後経過の検討. 日本アレルギー学会秋期学術大会 (第59回) (2009年10月29-31日, 秋田)
 9. 徳田玲子、谷田寿志、細木興亜、平口雪子、長尾みづほ、藤澤隆夫. 鶏卵アレルギーの自然経過:バイオマーカーによる解析. 日本アレルギー学会秋期学術大会 (第59回) (2009年10月29-31日, 秋田)
 10. 藤澤隆夫 教育セミナー「ウイルス感染による喘息増悪の機序とSFCの作用」. 日本アレルギー学会秋期学術大会 (第59回) (2009年10月29-31日, 秋田)
 11. 細木興亜、長尾みづほ、平口雪子、徳田玲子、藤澤隆夫. ヒト好酸球に対する Probiotics の作用. 日本アレルギー学会秋期学術大会 (第59回) (2009年10月29-31日, 秋田)
 12. 谷田寿志、長尾みづほ、平口雪子、細木興亜、徳田玲子、藤澤隆夫. 日本アレルギー学会秋期学術大会 (第59回) (2009年10月29-31日, 秋田)
 13. 小嶋慈之、熊谷智彰、小谷佳子、平井博之、永田欽也、橋口明彦、徳田玲子、長尾みづほ、藤澤隆夫. 好塩基球 CD203c 発現定量検査:卵・牛乳アレルギー. 日本アレルギー学会秋期学術大会 (第59回) (2009年10月29-31日, 秋田)
 14. 平口雪子、谷田寿志、細木興亜、長尾みづほ、徳田玲子、藤澤隆夫. 反復喘鳴乳児の鼻汁中 TSLP と2年後の吸入抗原感作の関係. 日本アレルギー学会秋期学術大会 (第59回) (2009年10月29-31日, 秋田)
 15. 藤澤隆夫. 教育セミナー「軽症気管支喘息のマネジメント:JPGLの妥当性を考える」日本小児アレルギー学会 (第46回) (2009年12月5-6日, 福岡)
 16. 藤澤隆夫. シンポジウム「ガイドライン公開討論:喘息治療のグレーゾーンを検証する」重症度分類の再確認. 日本小児アレルギー学会 (第46回) (2009年12月5-6日, 福岡)
 17. 平口雪子、谷田寿志、細木興亜、長尾みづほ、徳田玲子、藤澤隆夫. 反復喘鳴乳児の鼻汁中 ECP と2年後の吸入抗原感作の関係. 日本小児アレルギー学会 (第46回) (2009年12月5-6日, 福岡)
 18. 長尾みづほ、谷田寿志、平口雪子、細木興亜、徳田玲子、藤澤隆夫. 食物アレルギー児の気道アレルギー合併について:後方視的解析. 日本小児アレルギー学会 (第46回) (2009年12月5-6日, 福岡)
 19. 谷田寿志、長尾みづほ、平口雪子、細木興亜、徳田玲子、藤澤隆夫. 思春期における吸入ステロイド中止後経過の検討. 日本小児アレルギー学会 (第46回) (2009年12月5-6日, 福岡)
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
分担研究報告書
アレルギーのテーラーメイド治療管理ガイドラインの確立と実用化

分担課題名：小児期発症気管支喘息の予後に関連する因子に関する研究

分担研究者 河野 陽一 千葉大学大学院医学研究院小児病態学 教授

研究要旨

7歳から20歳までの、小児期発症ダニ感作気管支喘息患者280名を患者、気管支喘息のない小児あるいは成人982名を対照として、下記の研究を行った。

1) 小児気管支喘息発症に関連する遺伝子多型

喘息発症との関連が複数の研究で明らかとされている遺伝子および本研究者の現在までの研究より関連性が強いと考えられる遺伝子を含め、27の遺伝子の多型について検討したところ、IL-13, TNF α 、リンフォトキシンA (LTA)、CTLA4、NOD1、CCL5、トロンボキサンA2受容体(TBXA2R)、C3、Suppressor of cytokine signaling 1(SOCS1)の9つの遺伝子の多型が小児期発症気管支喘息と関連していた。

2) 気管支喘息重症度と関連する遺伝子多型

日本小児アレルギー学会編の小児気管支喘息治療管理ガイドラインに示されている喘息重症度と遺伝子多型の関連を検討した。その結果、相関は弱いもののSOCS1多型とガイドライン重症度との間に有意な関連が認められた。また、吸入ステロイド使用量などをもとにした重症度との関係では、TBXA2RとIL-13の多型との関連が認められた。

3) 呼吸機能と関連する遺伝子多型

気管支拡張薬吸入後のフローボリュームカーブの測定を行なえた190名の患者について、呼吸機能と遺伝子多型の関連を検討すると、末梢気道の変化の指標と考えられる%MMEF や%V50 と、LTA、IL-4R α と IL-13 の多型の関連が認められた。

研究協力者

下条 直樹 千葉大学大学院医学研究院
小児病態学 准教授
鈴木 洋一 千葉大学大学院医学研究院
公衆衛生学 准教授
岡本 美孝 千葉大学大学院医学研究院
耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 教授

とTh2サイトカインのバランス、自然免疫・炎症に関与する遺伝子の多型、さらに乳幼児期の生活環境等が関与する可能性を報告した。本年度における研究では、小児期の喘息発症および呼吸機能と遺伝子多型の関連を明らかにすることを目的とした。

A. 研究目的

小児の気管支喘息には自然寛解が存在することが知られている。しかし一方で成人まで喘息が遷延化し長期にわたり治療を必要とするものも少なくない。近年、小児の気管支喘息においても気道リモデリングが存在することが報告されており、このリモデリングの進行を予防することが小児の気管支喘息の予後を改善することに極めて重要であると考えられている。そのためにも小児期発症の気管支喘息の予後を規定する因子、気道リモデリングの形成に関わる因子を明らかにしなくてはならない。昨年度の研究では、小児気管支喘息の予後にはダニ感作レベルの程度が関連すること、またダニ特異IgE抗体量には、調節性サイトカイン

B. 研究方法

千葉大学大学院医学研究院小児病態学を含めて6カ所の小児科を受診中の7歳以上の小児気管支喘息患者について、現在までに複数の文献にて喘息との関連が報告されている遺伝子の多型を検討した。また、呼吸機能を測定している患者について呼吸機能マーカーと遺伝子多型の関連を検討した。遺伝子解析に用いるDNAは唾液から精製した。

(倫理面への配慮)

本研究は千葉大学大学院医学研究院倫理審査委員会の承認を受けて行われた。

C. 研究結果

1) 小児気管支喘息発症に関連する遺伝子多型

7歳から20歳までの、小児期発症ダニ感作気管支喘息患者280名を解析対象とした。対照として気管支喘息のない小児あるいは成人982名を用いた。喘息発症との関連が複数の研究で明らかとされている遺伝子および本研究者らの現在までの研究より関連性が強いと考えられる遺伝子を含め、27の遺伝子の多型について検討した。その結果、IL-13、TNF α 、リンフォトキシンA (LTA)、CTLA4、NOD1、CCL5、トロンボキサンA2受容体(TBXA2R)、C3、Suppressor of cytokine signaling 1(SOCS1)の9つの遺伝子の多型が小児期発症気管支喘息と関連していた。

2) 気管支喘息重症度と関連する遺伝子多型

本研究は本来、寛解患者と非寛解患者での遺伝子多型の比較解析を目的としているが、寛解患者数が少なく統計学的解析を行えなかった。そこで日本小児アレルギー学会編の小児気管支喘息治療管理ガイドラインに示されている喘息重症度と遺伝子多型の関連を検討した。その結果、相関は弱いもののSOCS1多型、TBXA2R多型とガイドライン重症度との間に有意な関連が認められた。また、吸入ステロイド使用量などをもとにした重症度との関係では、TBXA2R多型とIL-13多型との関連が認められた。

3) 呼吸機能と関連する遺伝子多型

気管支拡張薬吸入後のフローボリュームカーブの測定を行なえた190名の患者について、呼吸機能と遺伝子多型の関連を検討すると、末梢気道の変化の指標と考えられる%MMEFや%V50と、LTA、IL-4R α とIL-13の多型の関連が認められた。

D. 考察

小児、成人の気管支喘息の発症と関連する遺伝子多型についてはいくつかの報告があるが、一定の結果が得られていない。その理由の一つとして対象の不均一性があげられる。本研究では我が国の小児気管支喘息で主たる集団を構成するダニ感作気管支喘息患者を対象とし、さらに幼児期の喘鳴にはウイルス感染に伴う気管支炎に伴う喘鳴が多く含まれることから対象年齢を7歳以上として喘息の診断がより確実な患者を対象とした。複数の研究で喘息やアトピーと相関が確認されている遺伝子多型のうち、いくつかについて日本人小児の喘息発症との相関が再現され、それらは小児喘息の感受性遺伝子であることが強く示唆された。

また、喘息の予後因子と考えられる喘息重症度と末梢気道病変との関連についての解析からは、リモデリング、炎症に関与する遺伝子の多型が関与することが示唆された。今後、思春期以降の寛解、非寛解例調査患者数を増やして解析を進めたい。

E. 結論

小児気管支喘息の発症、重症度、末梢気道病変などと関連するいくつかの遺伝子多型を明らかとした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T, Harada M, Sakashita M, Suzuki Y, Shimojo N, Kohno Y, Fujita K, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Nakamura Y, Tamari M. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 124 : 779-85 (2009).
2. Suzuki Y, Hattori S, Mashimo Y, Funamizu M, Kohno Y, Okamoto Y, Hata A, Shimojo N. CD14 and IL4R gene polymorphisms modify the effect of day care attendance on serum IgE levels. *J Allergy Clin Immunol.* 123 : 1408-11 (2009).
3. Inoue H, Mashimo Y, Funamizu M, Shimojo N, Hasegawa K, Hirota T, Doi S, Kameda M, Miyatake A, Kohno Y, Okamoto Y, Tamari M, Hata A, Suzuki Y. Association study of the C3 gene with adult and childhood asthma. *J Hum Genet.* 53 : 728-38 (2008).

2. 学会発表

1. 鈴木洋一, 下条直樹, 真下陽一, 井上寛規, 有馬孝恭, 富板美奈子, 鈴木修一, 山出晶子, 星岡明, 青柳正彦, 佐藤一樹, 大川徹, 岡本美孝, 河野陽一, 羽田明. 血清IgE値に影響を与える環境要因と遺伝要因とその相互作用の検討. 日本アレルギー学会秋季学術集会

(第 57 回) (2007 年 11 月 1-3 日, 横浜)

2. 鈴木洋一、服部 聡、真下陽一、船水真紀子、
下条直樹、岡本美孝、河野陽一、羽田 明。
アレルギー感作におけ Gene-Environmental
Interaction について. 日本小児アレルギー
学会 (第 45 回) (2008 年 12 月 13-14 日, 横
浜)
3. 鈴木 洋一、真下 陽一、佐藤 正子、下条
直樹、広田 朝光、土居 悟、宮武 昭彦、
岡本 美孝、河野 陽一、玉利 真由美、羽
田 明. MMP13 遺伝子と喘息発症との相関。
日本アレルギー学会 (2009 年 10 月 29-31 日,
秋田)
4. Hattori S, Mashimo Y, Funamizu M,
Shimojo N, Okamoto Y, Kohno Y, Hata
A, Suzuk Y. CD14 -550C/T polymorphism
modifies the effect of daycare attendance
on total and specific IgE levels in children.
Annual meeting of American Society
of Human Genetics 2008. (2008 年 10 月
12-15 日 Philadelphia, USA)
5. Suzuki Y, Inoue Y, Mashimo Y, Yonekura S,
Horiguchi S, Shimojo N, Kohno Y, Okmoto
Y, Hata A. Association of the MMP9 gene
with cedar pollinosis in the Japanese
children Annual meeting of American
Society of Human Genetics 2009. (2009 年
10 月 21-24 日, Honolulu, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)
分担研究報告書
アレルギーのテーラーメイド治療管理ガイドラインの確立と実用化

分担課題名: 遺伝子情報の網羅的解析、および小児喘息におけるロイコトリエン受容体拮抗薬の
治療反応性予測遺伝子因子とテーラーメイド治療開発

分担研究者 松井永子 岐阜大学医学部附属病院小児科 講師

研究要旨

気管支喘息、アトピー性皮膚炎などアレルギー疾患の増加が大きな社会問題になっている。本研究の目的は、アレルギー疾患の病因・病態および治療反応性予測因子を系統的に検出できる遺伝子診断キットを中心とする診断システムを開発すること、および、その診断をもとにして各病因・病態に合致したテーラーメイド治療法を確立することである。今回は、気管支喘息の発症と ALOX5 遺伝子の多型と気管支喘息発症との関連解析を行うとともに、ロイコトリエン受容体拮抗薬の使用と QOL との関連解析を行った。

A. 研究目的

近年、気管支喘息、アトピー性皮膚炎などアレルギー疾患の増加が大きな社会問題になっている。本研究の目的は、アレルギー疾患の病因・病態および治療反応性予測因子を系統的に検出できる遺伝子診断キットを中心とする診断システムを開発することおよび、その診断をもとにして各病因・病態に応じたテーラーメイド治療管理ガイドラインを確立し、実用化をはかることである。

B. 研究方法

①アレルギーの病因遺伝子群の系統的、多角的な解明に基づいて、アレルギーの系統的遺伝子診断キットをインベダーアッセイ法を用いて開発した。さらに、新規 SNP との関連を検討する目的で、ジーンチップ (500K Mapping assay) を利用し、薬剤反応性と関連している SNP の検索を行った。

②気管支喘息の発症と ALOX5 遺伝子多型との関連解析を行った。

③抗アレルギー薬のうち、ロイコトリエン受容体拮抗薬の乳幼児喘息の即効性の検討を行った。あわせて、患者および保護者の QOL に関する調査を行い、薬剤による小児気管支喘息患者およびその保護者の QOL の変化についての検討を行った。

(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について十分に説明し十分な理解 (インフォームドコンセント) を得た上で採血が行な

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アレルギーの系統的遺伝子診断キットをインベダーアッセイ法を利用して構築した。ジーンチップ (500K Mapping assay) によるロイコトリエン受容体拮抗薬 (LTRA) の効果と SNP の関連解析では、GATA3 などの免疫関連遺伝子領域に存在する 22 種類の多型、IL-8, IL-19, TNF などのサイトカイン関連遺伝子領域に存在する 20 種類の多型が、有効性との関連 ($p < 0.001$) が認められた。

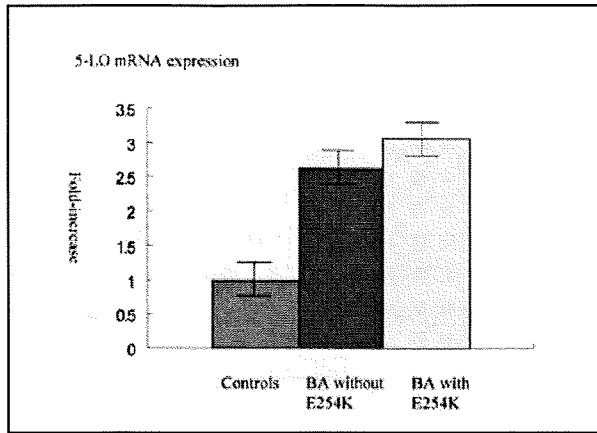
②気管支喘息の発症と ALOX5 遺伝子多型との関連解析を行った。21C>T, 270G>A, 760G>A, 1728A>G の 4 種類の多型を同定した。その中で、760G>A は気管支喘息症状の有無と関連していることが明らかとなった (表 1, $p = 0.017$)

表 1

	Non-allergic Bronchial (n=150)	Asthma(n=180)	P value
Allele frequency			
c. 760 G>A			
G	300	348	
A	0	12	0.0007
Genotype frequency			
GG	150	169	
GA	0	10	
AA	0	1	0.0170

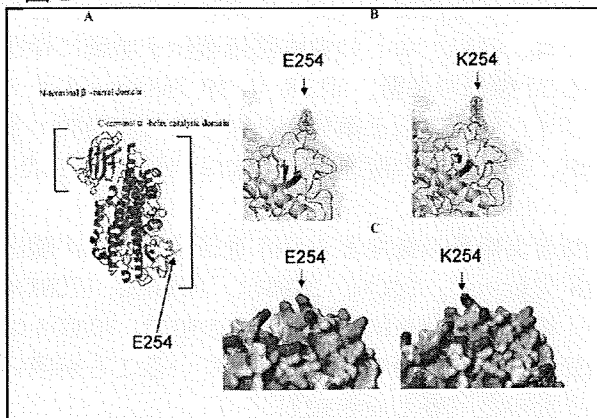
尿中のLTE4 排泄量は760G>A (E254K)を持つ症例は増加しており、5-L0 mRNA 発現量も増加していた(図1)。

図1



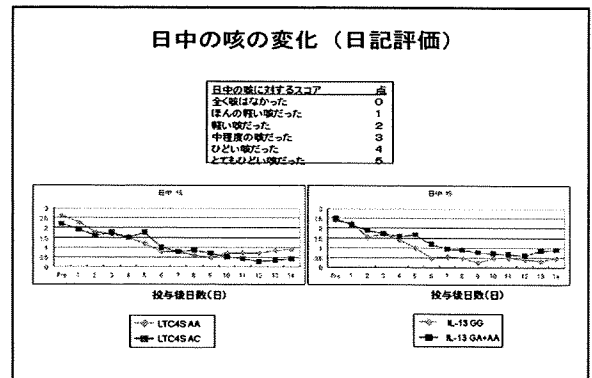
この機能的ちがいを構造学的に検討したところ、760G>A (E254K)は図3に示すように、C末の表面に位置しており、陰性荷電から陽性荷電へと変化することから結合に影響している可能性が示唆された。

図2



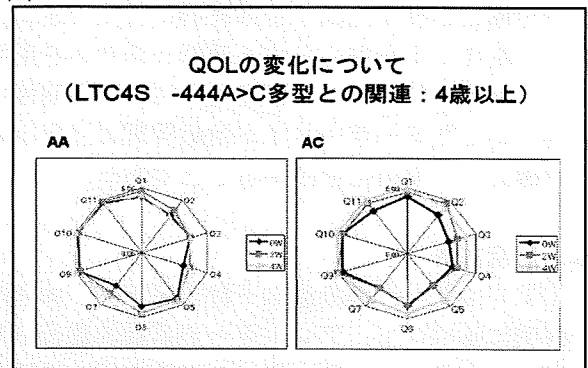
③抗アレルギー薬のうち、ロイコトリエン受容体拮抗薬の即効性の検討として、1~5歳の軽症持続型の気管支喘息患者を対象にモンテルカストを投与し、喘息日記およびQOL調査票の変化を確認した。図3に示すように日中の咳は、徐々に軽快し、投与7日目以降は軽快を維持していた。また、遺伝子多型と症状の変化についても検討し、LTC4s-444AC, IL-13 GGのほうがより症状が軽快している傾向が得られた。

図3



また、患者及び保護者のQOLについても確認したところ、全体としては投与前、投与2週間後、投与4週間後で、症状の改善とともにQOLの改善が得られた。また、遺伝子多型との関連も検討し、LTC4s-444ACの症例で、よりQOLの改善が顕著であった(図4)。

図4



D. 考察

増加を続けるアレルギー疾患患者の個々の病態を遺伝子レベルで整理し、分類することは、テーラーメイド医療を考える上で、非常に重要なことであると考えられる。多数報告のみられるアレルギー関連遺伝子多型情報を、臨床レベルで活用するためには、多くのサンプルを迅速に処理する必要があり、これを実現するために、遺伝子検出キットは、非常に有用であると考えられた。今後、診断、治療に着目した感受性、特異性の向上、薬理遺伝学的見地からの検討を十分に行い、テーラーメイド医療に活用していきたいと考える。

E. 結論

アレルギー疾患の遺伝子診断キットを開発した。

さらに、臨床へ応用するため、診断、治療に着目した感受性、特異性の向上、薬理遺伝学的見地からのさらなる検討が必要であると考えている。気管支喘息に関連する遺伝子多型の検討を行った。また、薬剤反応性を簡便に評価する方法としてQOL調査票が利用できることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 松井永子, 近藤直実, 金子英雄, 川本美奈子, 折居建治: 小児気管支喘息患児におけるトシル酸スプラタストの有用性の検討. 小児科診療. 12: 159-172 (2009).

2. 学会発表

1. 川本典生, 深尾敏幸, 櫻井里美, 金子英雄, 新井隆広, 川本美奈子, 近藤應, 松井永子, 平山耕一郎, 岩砂眞一, 近藤直実: 臍帯血を用いた出生コホート研究—食物アレルギーに関わる遺伝子の検討—. ミニシンポジウム9: 小児アレルギーの病態と治療. 日本アレルギー学会春季臨床大会 (第21回) (2009年6月, 岐阜)

2. 川本美奈子, 大西秀典, 川本典生, 森田秀行, 松井永子, 金子英雄, 深尾敏幸, 白木 誠, 岩砂眞一, 近藤直実: 母乳栄養とアレルギー疾患発症との関連について. ミニシンポジウム14. 日本アレルギー学会春季臨床大会 (第21回) (2009年6月, 岐阜)

3. 川本美奈子, 川本典生, 大西秀典, 森田秀行, 深尾敏幸, 金子英雄, 松井永子, 近藤直実: 食物アレルギーの感作と発症について. ワークショップ4. 日本アレルギー学会秋季臨床大会 (第59回) (2009年10月, 秋田)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

近藤直実, 松井永子, 金子英雄, 青木美奈子, 近藤應: 遺伝子多型を利用した抗アレルギー薬の感受性予測方法 (特許出願中): 平成17年度

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表（平成 21 年度）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Morimoto M, Matsui E, Kawamoto N, Sakurai S, Kaneko H, Fukao T, Iwasa S, Shiraki M, Kasahara K, Kondo N	Age-Related changes of Transforming Growth Factor β 1 in Japanese children.	Allergol Int	58	97-102	2009
Kondo N, Matsui E, Nishimura A, Kaneko H.	Pharmacogenetics of asthma in children.	Allergy Asthma Immunol Res	2	14-19	2010
Kondo N, Nishimuta T, Nishima S, Morikawa A, Aihara Y, Akasaka T, Akazawa A, Adachi Y, Arakawa H, Ikarashi T, Ikebe T, Inoue T, Iwata T, Urisu A, Ebisawa M, Ohya Y, Okada K, Odajima H, Katsunuma T, Kameda M, Kurihara K, Kohno Y, Sakamoto T, Shimojo N, Suehiro Y, Tokuyama K, Nambu M, Hamasaki Y, Fujisawa T, Matsui T, Matsubara T, Mayumi M, Mukoyama T, Mochizuki H, Yamaguchi K, Yoshihara S.	Japanese pediatric guideline for the treatment and management of bronchial asthma 2008.	Pediatr Int	in press		2009
Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Orii KE, Li A, Kimura T, Hiroaki H, Kondo N, Shirakawa M.	Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling.	Proc Natl Acad Sci U S A	106	10260 10265	2009
Kato Z, Yamagishi A, Nakamura M, Kondo N.	Theophylline-associated status epilepticus in an infant: pharmacokinetics and the risk of suppository use.	World J Pediatr	5	316-318	2009
松井永子, 近藤直実, 金子英雄, 川本美奈子, 折居建治 他.	小児気管支喘息患児におけるトシル酸スプラタストの有用性の検討.	小児科診療	12	159-172	2009
Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T, Harada M, Sakashita M, Suzuki Y, Shimojo N, Kohno Y, Fujita K, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Nakamura Y, Tamari M.	Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma.	J Allergy Clin Immunol	124	779-85	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Inoue H, Mashimo Y, Funamizu M, Shimojo N, Hasegawa K, Hirota T, Doi S, Kameda M, Miyatake A, Kohno Y, Okamoto Y, Tamari M, Hata A, Suzuki Y.	Association study of the C3 gene with adult and childhood asthma.	J Hum Genet	53	728-38	2008
釣木澤尚実.	気管支喘息、成人期への移行.	小児科臨床ピクシス、年代別アレルギー疾患への対応	5	180-183	2009
釣木澤尚実、秋山一男.	喘息重症度と段階的薬物療法（長期管理）-成人	インフォームドコンセントのための図説シリーズ-喘息改訂3版-		34-45	2009
釣木澤尚実、秋山一男.	重症喘息の病態生理	アレルギー・免疫	16	1514 1522	2009
Tadaki H, Arakawa H, Mizuno T, Suzuki T, Takeyama K, Mochizuki H, Tokuyama K, Yokota S, Morikawa A.	Double-Stranded RNA and TGF α Promote MUC5AC Induction in Respiratory Cells.	The Journal of Immunology	182	293-300	2009
Wang j, Mochizuki H, Todokoro M, Arakawa H, Morikawa A.	Does Leukotriene Affect Intracellular Glutathione Redox State in Cultured Human Airway Epithelial Cells?	Antioxid Redox Signal	10	821-8	2008
Mayuzumi H, Ohki Y, Tokuyama K, Sato A, Mizuno T, Arakawa H, Mochizuki H, Morikawa A.	Age-Related Difference in the Persistency of Allergic Airway Inflammation and Bronchial Hyperresponsiveness in a Murine Model of Asthma.	Int Arch Allergy Immunol	143	255-62	2007
Suzuki T, Arakawa H, Mizuno T, Muramatsu K, Tadaki H, Takizawa T, Mochizuki H, Tokuyama K, Matsukura S, Morikawa A.	Differential Regulation of Eotaxin Expression by Dexamethasone in Normal Human Lung Fibroblasts.	Am J Respir Cell Mol Biol	38	707 - 14	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamamura K, Adachi T, Masuda T, Kojima Y, Hara A, Toda T, Nagase H, Ohta K.	Intracellular protein phosphorylation in eosinophils and the functional relevance in cytokine production.	Int Arch Allergy Immunol	149S1	45-50	2009
原 麻恵.	喘息コントロール状態と非侵襲的気道炎症マーカーとの関連	帝京医学雑誌	33	39-50	2010
長瀬洋之、大田 健.	気管支喘息のモニタリングをめぐって 呼気ガス	臨床免疫・アレルギー科	52	194-8	2009
M Harada, T Hirota, A I Jodo, S Doi, M Kameda, K Fujita, A Miyatake, T Enomoto, E Noguchi, S Yoshihara, M Ebisawa, H Saito, K Matsumoto, Y Nakamura, S F Ziegler, and M Tamari.	Functional analysis of the Thymic Stromal Lymphopoietin Variants in Human Bronchial Epithelial Cells.	Am J Respir Cell Mol Biol	40	368 - 74	2009
Ebisawa M.	How to Cope with Allergic Diseases at Schools in Japan – From the standpoint of a pediatric allergist –	Japan Medical Association Journal	52	164 - 167	2009
Tokuda R, Nagao M, Hiraguchi Y, Hosoki K, Matsuda T, Kouno K, Morita E, Fujisawa T.	Antigen-Induced Expression of CD203c on Basophils Predicts IgE - mediated Wheat Allergy.	Allergol Int	58	193-199	2009
Fujisawa T, Nagao M, Hiraguchi Y, Hosoki K, Tokuda R, Usui S, Masuda S, Shinoda M, Hashiguchi A, Yamaguchi M.	Biomarkers for allergen immunotherapy in cedar pollinosis.	Allergol Int	58	163-170	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujisawa T, M Nagao, Y Hiraguchi, H Katsumata, H Nishimori, K Iguchi, Y Kato, M Higashiura, I Ogawauchi, K Tamaki.	Serum measurement of thymus and activation - regulate d chemokine/CCL17 in children with atopic dermatitis:elevated normal levels in infancy and age-specific analysis in atopic dermatitis.	Pediatr Allergy Immunol	20	633 - 641	2009
細木興亜, 長尾みづほ, 平口雪子, 徳田玲子, 藤澤隆夫.	RS ウイルス感染症入 院例における退院後の 喘鳴についての検討.	アレルギー	58	1521-1529	2009
細木興亜, 平口雪子, 徳田玲子, 長尾みづほ, 藤澤隆夫, 高松勇, 錦戸知喜, 吉田之範, 亀田誠, 土居悟, 森下雄大, 竹中学, 寺田明彦, 野田映子, 神田康司.	「初めて発作入院し た」乳幼児喘息の臨床 経過.	日本小児アレル ギー学会誌	23	651 - 658	2009

IV. 研究成果の刊行物・別冊

Age-Related Changes of Transforming Growth Factor β 1 in Japanese Children

Masahiro Morimoto¹, Eiko Matsui¹, Norio Kawamoto¹, Satomi Sakurai¹, Hideo Kaneko¹, Toshiyuki Fukao¹, Shinichi Iwasa², Makoto Shiraki², Kimiko Kasahara¹ and Naomi Kondo¹

ABSTRACT

Background: Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) is an important factor in immunomodulation. The expression of TGF β 1 has been shown to be influenced by the C-509T polymorphism in the TGF β 1 gene. We investigated age-related changes of plasma TGF β 1 levels in a birth-cohort study. In addition, the genotypes of the C-509T polymorphism were investigated in allergic and non-allergic subjects.

Methods: Sixty-four neonates who met the following criteria were enrolled in this cohort study: 1) full-term vaginally delivery; 2) underwent DNA polymorphism analysis; and 3) questionnaire forms were filled out by parents at 0, 6 and 14 months of age. The umbilical cord blood at 0 months and peripheral blood at 6, and 14 months were collected. Plasma TGF β 1 levels were measured at 0, 6 and 14 months of age. Genomic DNA was extracted from their umbilical cord blood. The genotype of the subjects was examined for the presence of C-509T.

Results: The plasma TGF β 1 level at 6 months was the highest of the 3 measurements (at 0, 6, and 14 months of age). The TGF β 1 levels at 14 months in allergic subjects were significantly higher than those in non-allergic subjects ($p = 0.03$). All subjects with bronchial asthma ($n = 3$) had the TT genotype of the C-509T polymorphism.

Conclusions: The plasma TGF β 1 levels change with age. In addition, TGF β 1 may play a role in the pathogenesis of bronchial asthma.

KEY WORDS

bronchial asthma, single nucleotide polymorphism (SNP), transforming growth factor β 1 (TGF β 1), umbilical cord blood

INTRODUCTION

Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) is a 25 kDa disulfide-linked homodimeric multifunctional cytokine. TGF β 1 may be the most important growth factor related to immunomodulatory effects because knockout mice died of massive inflammatory lesions.¹ The role of TGF β 1 in allergic diseases have been reported.²⁻⁴ The levels of TGF β 1 concentration were found to be higher in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with asthma compared with subjects without asthma.³ The expression of TGF β 1 was found to be influenced by polymorphisms in the TGF β 1 gene, some of which may be associated with bronchial

asthma and other diseases.^{4,5} In particular, the T allele of the C-509T polymorphism within the TGF β 1 gene was associated with elevated serum TGF β 1 levels and also associated with elevated levels of total IgE in allergic asthma patients.^{5,6}

In this study, we investigated the age-related changes of TGF β 1 levels in a birth-cohort study. In addition, C-509T within the TGF β 1 gene in subjects with asthma was compared with non-allergic subjects.

METHODS

SUBJECTS

Sixty-four neonates born at Iwasa Maternity Hospital in Gifu Prefecture between November 2005 and July

¹Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Gifu University and ²Iwasa Maternity Hospital, Gifu, Japan.
Correspondence: Eiko Matsui, MD, PhD, Department of Pediatrics, Gifu University Graduate School of Medicine, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan.

Email: eikom@gifu-u.ac.jp
Received 3 December 2007. Accepted for publication 22 July 2008.
©2009 Japanese Society of Allergology

Table 1 Characteristics of subjects

Gender	Male	32	Female	32
Birth body weight (g)	Mean±SD	3137.1 ± 400.5 (range: 2410–4026g)		
Gestational week	Mean±SD	39w3d ± 1w2d (range: 37w6d–41w1d)		
Family history of allergy	Father	With allergy 25		
		Without allergy 32		
		No record 7		
Mother	With allergy 34			
	Without allergy 24			
	No record 6			
Family smoking history with 1 or both parents still smoking	Present	16	Absent	48

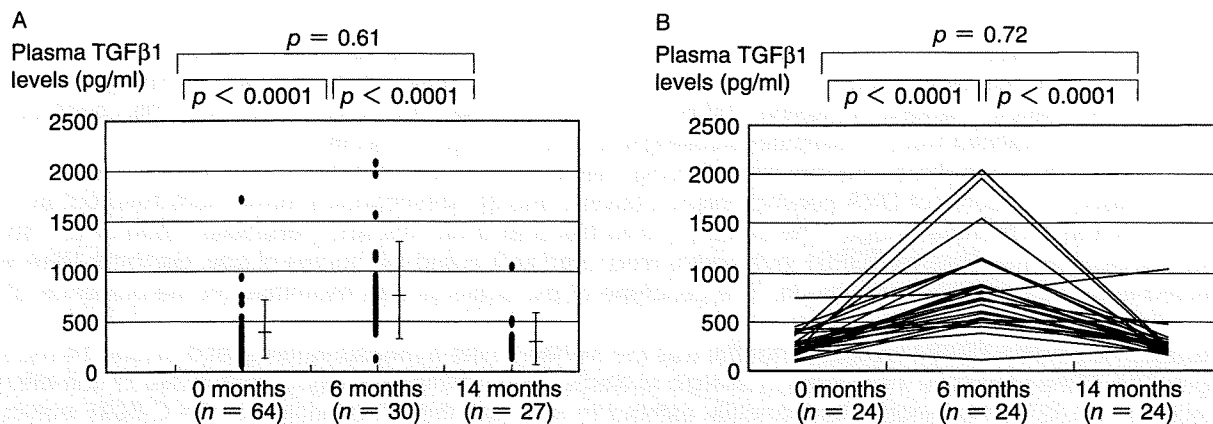


Fig. 1 (A) Plasma TGFβ1 levels at 0, 6, and 14 months of age. (B) Changes of plasma TGFβ1 levels in 24 subjects whose data were available at all three points.

2006, and satisfying the following criteria were enrolled in this cohort study: 1) full-term vaginally delivery; 2) underwent DNA polymorphism analysis; and 3) questionnaire forms were filled out by parents at 0, 6 and 14 months of age. Informed consent, including DNA analysis, was obtained from the parents of the neonates during their stay in the hospital. This cohort study was approved by the Ethical Committee of the Graduate School of Medicine of Gifu University. Umbilical cord blood samples were collected from 64 neonates and peripheral blood samples were also collected for analysis from 30 subjects at 6 months and from 27 subjects at 14 months of age. Subjects who were given a diagnosis of atopic dermatitis and bronchial asthma during the follow-up over a period of 14 months after birth, were classified as having those diseases. Allergic subjects were defined as those who were given a diagnosis of atopic dermatitis and/or bronchial asthma and non-allergic subjects were defined as those having neither atopic dermatitis nor bronchial asthma during the 14-month observation period. Some data of the recruited population are summarized in Table 1.

ASSAYS FOR PLASMA IgE LEVELS AND PLASMA TGFβ1 LEVELS

Plasma samples obtained from heparinized blood were kept at -30°C . Plasma IgE levels were determined by chemiluminescent enzyme immunoassay and plasma TGFβ1 levels were measured with a human ELISA kit (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA); the detection range was 31.2–2000 pg/ml.

DETECTION OF C-509T WITHIN THE TGFβ1 GENE

Genomic DNA was extracted from the heparinized umbilical cord blood using a Sepagene kit (Sanko Junyaku, Tokyo, Japan). The TGFβ1 gene was amplified and sequenced using the PCR technique and an ABI 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primers used for amplification of the DNA fragments were the forward primer at position -737–718 (5'-CAGACTCTAGAGACTGTCAG-3') and the reverse primer at position -320–338 (5'-GTCACCAGAGAAAGAGGAC-3').

STATISTICAL ANALYSES

The relations between age and plasma in TGFβ1 lev-

Age-Related Changes of Transforming Growth Factor β 1

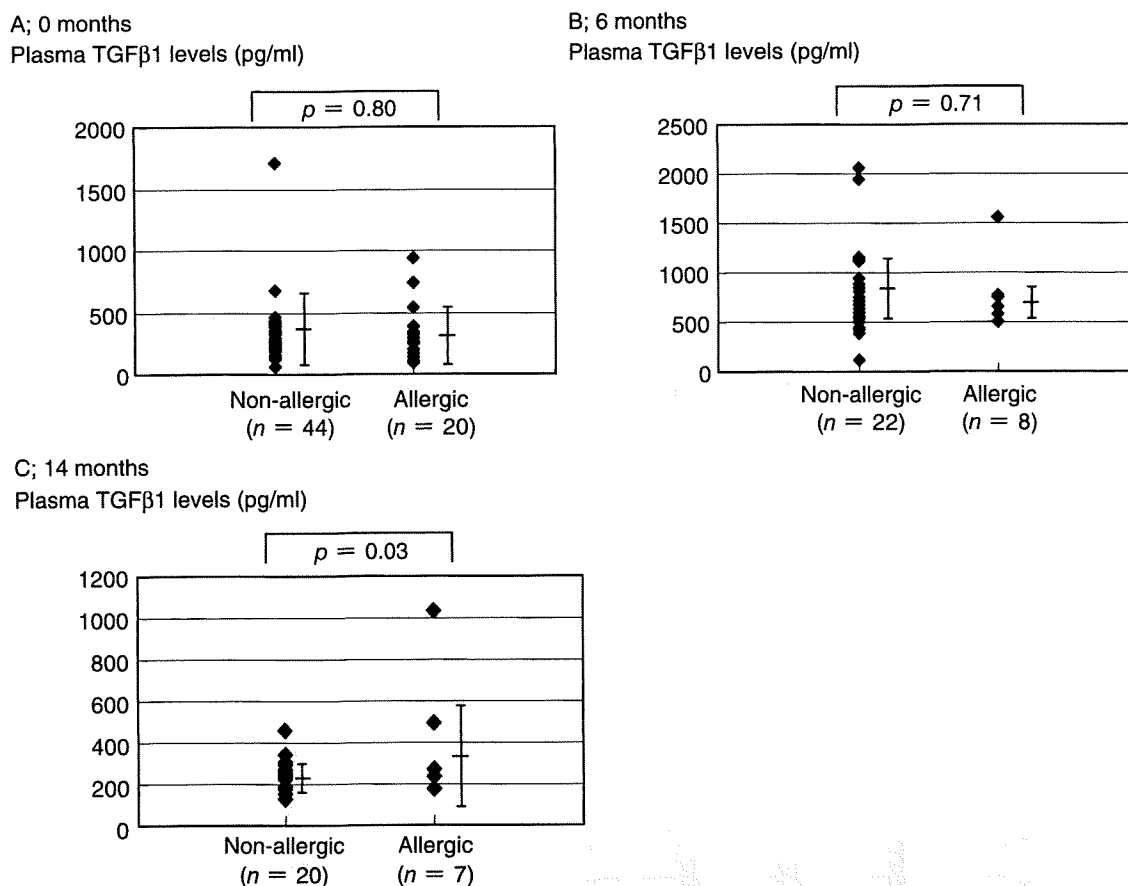


Fig. 2 Plasma TGF β 1 levels of non-allergic and allergic subjects at 0 months (A), 6 months (B) and 14 months (C) are shown. The plasma TGF β 1 levels at 14 months of age in allergic subjects were significantly higher than those in non-allergic subjects ($p = 0.03$, C).

els were determined by using the Mann-Whitney unpaired U-test. Pearson's correlation coefficient was used for statistical analysis of plasma IgE levels and TGF β 1 levels. The chi-square test was performed for statistical analysis of allergic symptoms and C-509T within the TGF β 1 gene. Probability (p) values of less than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

RESULTS

ALLERGIC DISORDERS AND SYMPTOMS IN SUBJECTS

By the age of 14 months, 20 of the 64 subjects were allergic and 44 were non-allergic as defined in the Methods. Of the 64 subjects, 19 had atopic dermatitis and 3 had bronchial asthma, while two subjects suffered from both atopic dermatitis and bronchial asthma. Peripheral blood samples were collected at 6 months of age in 30 subjects and at 14 months of age in 27 subjects.

CHANGES IN PLASMA TGF β 1 LEVELS BY AGE

Plasma TGF β 1 levels at 0, 6, and 14 months of age

are shown in Figure 1A. Plasma TGF β 1 levels were 306.2 ± 230.9 pg/ml (M \pm SD) at 0 months ($n = 64$), 805.3 ± 428.4 pg/ml at 6 months ($n = 30$), and 273.6 ± 175.8 pg/ml at 14 months ($n = 27$). Plasma TGF β 1 levels at 6 months of age were significantly ($p < 0.0001$ for each) higher than those in both 0 months and 14 months.

TGF β 1 levels were measured at all 3 points in all 24 subjects (data shown in Fig. 1B). The plasma TGF β 1 levels at 6 months of age were significantly ($p < 0.0001$ for each) higher than at both 0 and 14 months. This pattern was observed in 22 of the 24 subjects whose plasma TGF β 1 levels were measured at all 3 points.

RELATIONSHIP BETWEEN PLASMA TGF β 1 LEVELS AND ALLERGIC DISEASES OR PLASMA IgE LEVELS

Figure 2A, B, C show plasma TGF β 1 levels at 0, 6, and 14 months of age in non-allergic and allergic subjects. The plasma TGF β 1 levels at 14 months of age in allergic subjects were significantly higher than those in the non-allergic subjects ($p = 0.03$, Fig. 2C).

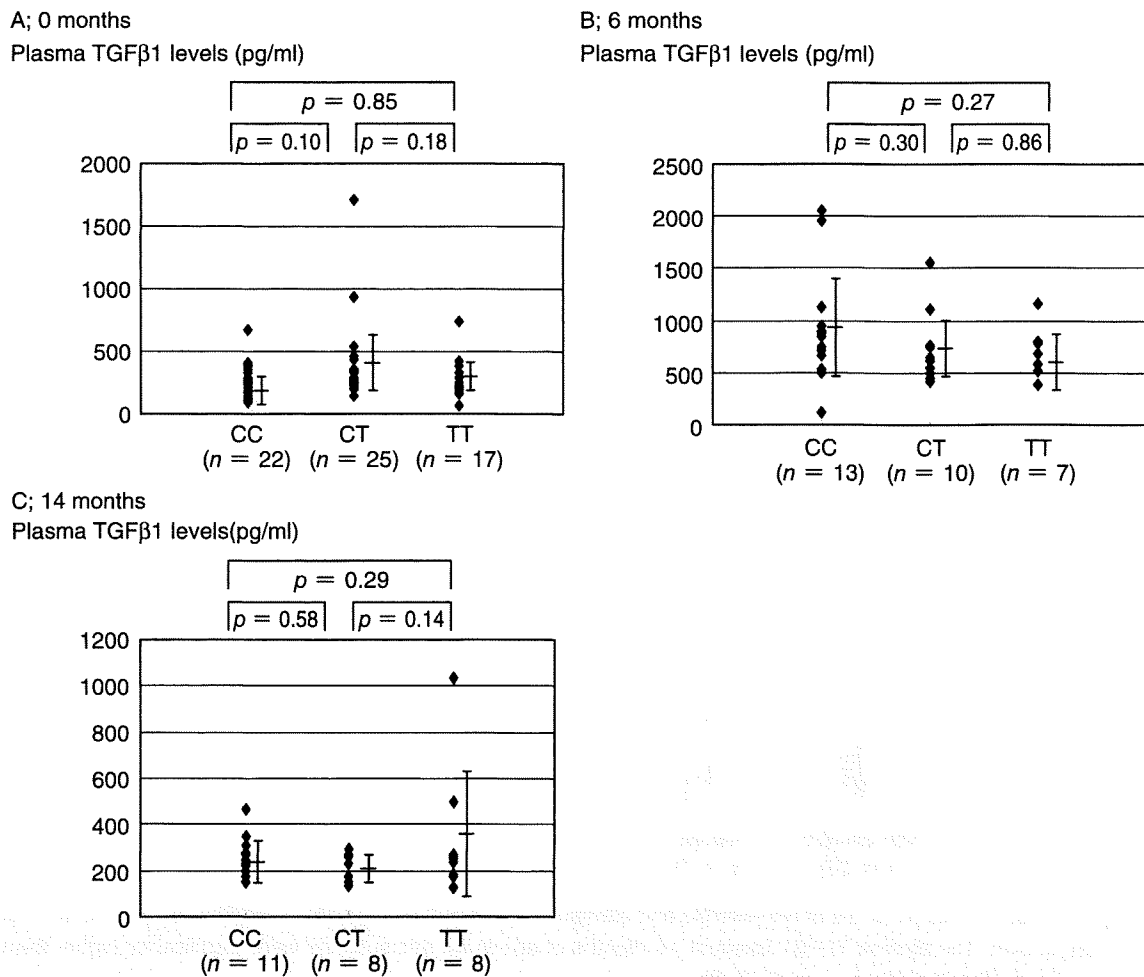


Fig. 3 Relationship between C-509T SNP of TGFβ1 gene and plasma TGFβ1 levels at 0 months (A), 6 months (B) and 14 months (C) is shown.

We also investigated the relationship between plasma IgE levels and TGFβ1 levels at 0, 6 and 14 months of age and found no significant relations (0 months; $p = 0.368$, 6 months; $p = 0.778$, 14 months; $p = 0.818$, data not shown).

PLASMA TGFβ1 LEVELS AND TGFβ1 C-509T POLYMORPHISM

Among the 64 subjects, 22, 25 and 17 were classified as genotype CC, CT, and TT, respectively. As shown in Figure 3, these genotypes were not significantly related with plasma TGFβ1 levels at either 0, 6, or 14 months of age.

TGFβ1 C-509T POLYMORPHISM AND ALLERGIC DISEASES

The genotypes of TGFβ1 C-509T polymorphism were not associated with the prevalence of atopic dermatitis at 6 months of age (Table 2) and 14 months of age (Table 3). However, the TT genotype was present in the TGFβ1 gene (C-509T) in all 3 patients with

asthma at 14 months of age (Table 4). Furthermore, the TGFβ1 levels ($M \pm SD$; 651.42 ± 544.79 pg/ml) in patients with asthma having the TT genotype in the TGFβ1 gene (C-509T) were higher than the TGFβ1 levels ($M \pm SD$; 243.75 ± 89.19 pg/ml) in subjects without asthma (CC, CT or TT genotypes) at 14 months.

DISCUSSION

TGFβ1 is a multifunctional cytokine that has immunomodulatory effects produced by airway epithelial cells, eosinophils, helper T type 2 lymphocytes, macrophages, and fibroblasts. An important finding in this study is the changing pattern of plasma TGFβ1 levels over time at 0, 6, and 14 months of age. Plasma TGFβ1 levels at 6 months of age were the highest among these 3 measured age points. This pattern was observed in 22 of the 24 subjects whose plasma TGFβ1 levels were available at all 3 points. Statistically, the plasma TGFβ1 level at 6 months of age was significantly higher than that at 0 months and at 14