

B. 研究方法と結果

1) e-NO の測定

eNO の測定方法は測定器に直接呼気を入れる直接法 (On-line 法) があるが、測定器の重量と移動性の問題から特殊な袋に回収する Off-line 法が望ましいとされる。

i) On-line 法による e-NO 濃度の推移

On-line 法において e-NO 濃度の時間的推移を検討した。図 1 に示すように 6 歳児でも成人でも平均 5 秒後に一定になるため、Off-line 法では測定開始後 5 秒より呼気を回収した。また、呼気流速を 50ml/sec、呼気圧を 20~22cmH₂O とした結果、安定した値が得られるようになった。

ii) 対象と eNO の測定

健康者 31 名、喘息患者 55 名 (ICS 使用 16 名、非使用 39 名)、喘鳴 10 名、慢性咳嗽 9 名について IgE、RAST 等の検査を行うとともに、eNO の測定を行った。

その結果、図 2 に示すごとく、ICS 未使用の喘息患者はコントロール、喘鳴、慢性咳嗽のグループに比して有意に高値を示した。また、ICS を使用した患者では未使用群に比して有意に低値であった。また、喘鳴群や慢性咳嗽群での e-NO の上昇は見られなかった。

2) 呼気凝集液の (Exhaled Breath Condensate, EBC) 中の物質測定と e-NO との比較

すでに EBC 中にはアデノシン、アンモニア、過酸化水素、ロイコトリエンや各種サイトカインが含まれることが報告されている。今回、小児においてこれらが測定しうるかを検討した。方法としては、被験者 (6 歳以上の小児気管支喘息患者 16 名) に座位で安静呼気を約 20 分行い冷却後約 2ml の EBC を得、これを Multiplex Suspension Array System (Biorad) にて 27 種のサイトカイン、ケモカインを測定した。その結果、

i) 各種サイトカインと e-NO 疾患の比較

Eotaxin ならびに RANTES についてその測定値と e-NO の関係を図 3 に示した。X 軸の 1 は e-NO 50ppb 以上、2 は 50ppb 未満の喘息児、3 はコントロール群である。Eotaxin については e-NO が低い程 Eotaxin の高値を示したが、RANTES については有意な関連は認めなかった。INF- γ や MCP1 についても測定範囲 (図 4) のものと感度以下のものがあつた。多くの EBC サンプル中には測定しうる十分な濃度のサイトカインやケモカインの存在が認められなかった。

3) 重症心身障害児 (者) についての喘息診断基準について

i) アンケート調査

社会福祉法人希望の家療育病院の入院中の重症心身障害児 (者) 120 名の家族・保護者に研究目的を説明し、書類にて家族から同意の得られた 66 名について性別、年齢、基礎疾患、家族歴、入所後の症状等の調査を行った (表 1)。さらに一部は病棟医師から β 2 刺激薬に対する反応性等の聴取も行ったが、診断基準作成には至らなかった。

ii) 血液検査

表 2 に示した項目について検討を行った。また、IgE や RAST (ダニ、スギ、カンジダ、ブドウ球菌) や Th1、Th2 系サイトカインの測定も行った (表 2)。その結果では症状と検査結果の間には必ずしも十分な関連は得られなかった。

C. 考察

eNO の測定にはばらつきがあり、かつ測定方法にも問題があることが指摘されている。今回 e-NO については On-line 法と Off-line 法で値が相関するため呼気流速を 50ml/sec、呼気圧を 20-22cm とし吹きはじめて 5 秒後からサンプル採取することにより問題が解決した。今後この方法を標準法として用いるべきと考えられた。それにより全国的に同一基準でデータが得られ同じ基準で使用しうることが明らかになった。また、正常値については、小児では年齢とともに上昇することが判明した。今後これらの値と薬物等の関係をみる必要があるが、現在までの検討では ICS やモンテルカスト使用で低下することがわかっている、今後更に病像、e-NO 値、薬物反応性について検討するべきであろう。一方、EBC は成人ではその搾取にも侵襲がなく、重症者においても可能である。しかし、20 分程度の安静呼気が必要であり、小児にはやや困難であり、また、サンプルの中に物質が測定しうる濃度があるか、そして再現性さらにその意義等は不明な部分が多い。INF- γ 等が測定可能であったが、例数が少なく、それらの値と生理的意義測定値、さらにこれらと臨床症状について今後さらに検討の必要があろう。

今回 66 名の重症心身障害児 (者) について気管支喘息の診断基準を作成するべく、家族ならびに医療関係者に疫学的事項について、書面による調査ならびに免疫学的検査を行った。しかし、母数が少ないためか、それとも他の理由のためか、

従来の喘息診断基準である咳、喘鳴、呼吸困難を呈する患者は少なかった。またこれらの患者で IgE 高値を示したり、通常の吸入性アレルゲンであるダニやスギに対する反応は陽性例は 14 例中 4 例であった。すなわちアトピー性疾患の患者は、通常のポピュレーションよりやや少なかった。また、典型的呼吸困難発作を呈するよりは、多量の喀痰による喘鳴・陥没呼吸・咳嗽を呈する患者の方が多かった。さらにこれら喘鳴のある患者では $\beta 2$ 刺激薬の使用はいずれも効果ありと判定されており、従来の診断基準による判定が困難であった。

今後さらに例数を増加させ、検討を行いたい。

D. 結論

テーラーメイドの治療を行うためには患者からの各種情報と治療への反応性を比較することが重要である。その情報の 1 つとして呼気 NO や EBC が小児が測定しうることがわかり、さらに特に e-NO について標準的な方法が確立した。

一方、66 名の重症心身障害児 (者) について、疫学的ならびに免疫学的検討を行った結果、喘鳴を呈する患者は 14 名、20.6% であった。これらのうち陥没呼吸を呈する患者は 2 名であり、咳嗽が 10 名、14.5% に認められた。

$\beta 2$ 刺激薬の効果は 14 名、20.6% に認められたが、急速な呼吸器症状の改善なのか否かは不明であった。また、喘鳴を呈する患者の平均 IgE は 191.3IU/ml であった。さらに、喘鳴を呈する患者で RAST (ダニ) 2+以上の者が 3 名であった。今回の調査では数が少なく、重症心身障害児 (者) の喘息診断基準作成にはさらなる研究が必要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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)
2. 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)

3. 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)
4. 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)

2. 学会発表

1. 萩原里実、只木弘美、望月博之、村松礼子、荒川浩一、森川昭廣. 小児の呼吸器疾患における呼気中 NO 濃度の測定. 日本アレルギー学会秋季学術大会 (第 57 回) (2007 年)
2. 小山晴美、望月博之、村松礼子、只木弘美、萩原里実、高見暁、水野隆久、荒川浩一、森川昭廣. 学童における肺機能検査と呼吸抵抗測定の意義. 日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会 (第 25 回) (2008 年)
3. Tadaki H, Mochizuki H, Muramatsu R, Hagiwara S, Takami S, Mizuno T, Arakawa H, Yokota S, Morikawa A : Measurements of exhaled nitric oxide in healthy 6 to 12 year olds. *The 4th Congress of Asian Society for Pediatric Research*. 2008
4. 望月博之. 小児における呼気中一酸化窒素 (eNO) の測定と気道炎症の評価. 日本アレルギー学会春季臨床大会 (第 20 回) (2008 年)
5. 只木弘美、望月博之、高見暁、村松礼子、萩原里実、水野隆久、荒川浩一、森川昭廣. 小児における呼気 NO 値と肺機能・呼吸抵抗との関連. 日本アレルギー学会春季臨床大会 (第 20 回) (2008 年)
6. 小山晴美、望月博之、只木弘美、高見暁、萩原里実、村松礼子、水野隆久、荒川浩一. 学童における肺機能検査と呼吸抵抗測定の意義. 日本小児呼吸器疾患学会 (第 41 回) (2008 年)

7. 村松礼子. シンポジウム 2「喘息治療・管理ガイドラインにおける治療目標を達成するために」「気道炎症の評価を中心に」. 日本小児アレルギー学会 (第 45 回) (2008 年)

G. 知的財産権の出願・登録状況

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：小児気管支喘息における末梢気道の閉塞を示す患者に関する研究

分担研究者 海老澤 元宏 国立病院機構相模原病院臨床研究センター
アレルギー性疾患研究部 部長

研究要旨

末梢気道狭窄病変(%V50<70%)を有する患児は成人喘息の危険因子であるため、末梢気道病変を有する患児について、SNPsを用いた遺伝的解析、胸部CTを用いた画像的解析、治療面から吸入ステロイドの粒子径を変えての解析等総合的なアプローチを試み、末梢気道病変を有する患児の特徴を解明することを目的とした。末梢気道病変とSNPsに関してはIL-13(Arg110Gln)において、GG、AG、AAの割合は%V50<70%群(n=30)で33.3%、36.7%、30.0%、%V50>80%群(n=34)で58.8%、32.4%、8.8%とカイ2乗検定でp<0.05にて有意差を認めた。末梢気道病変をCTによる画像的に評価することに関しては、吸気条件での平均肺野濃度やLAAの測定は小児においても末梢気道病変を示すことが示唆された。粒子径の大きいFP-DPI(3.3 μ m)使用群で粒子径のより小さいHFA-BDP(1.1 μ m)へ変更することで末梢気道病変の改善がみられるかどうかの臨床的検討を行った。エントリーできた症例は20例(男児15例、女児5例)で、両群間%V50に対する効果に有意差はなく、小児で使用する用量ではFPもBDPも同等の効果を示した。末梢気道病変は遺伝的背景を持つ可能性が示唆された。

研究協力者

富川 盛光 国立病院機構相模原病院
小児科医師
新実 彰男 京都大学大学院医学研究科
内科学講座呼吸器内科学准教授

hydrofluoroalkane-134a beclomethasone
dipropionate (HFA-BDP)の粒子径1.1 μ m)による治療反応性の違いについてクロスオーバー試験にて前向きに検討する。本研究は前向き研究のため時間がかかるので、H19年度から開始した。

A. 研究目的

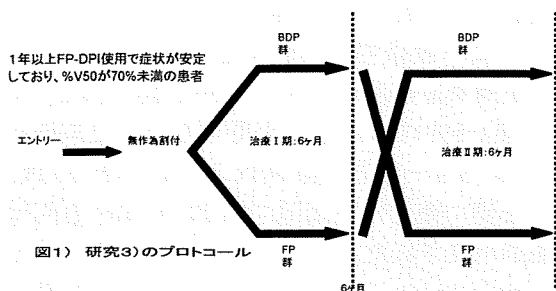
成人気管支喘息患者の中でも、小児期に喘息に罹患し一度寛解した人たちの特徴は、小児期において呼吸機能で%V50の低下など、既に末梢気道狭窄を示していた例が多くみられ、また、運動誘発喘息にみられるように気道過敏性が亢進している例も多くみられる。末梢気道病変(%V50の低下)を有する小児気管支喘息患児の特徴を知るために以下の3つの研究を行った。1)末梢気道病変を有する小児気管支喘息患児の臨床的背景因子と遺伝的背景因子(SNPs: single nucleotide polymorphism)について検討する。2)胸部CTを用いた末梢気道病変を有する小児気管支喘息患児のリモデリングの検討を画像的に検討する。3)治療の面から末梢気道病変を有する小児気管支喘息患児に対する吸入ステロイド(ICS)の粒子径の違い(fluticasone dipropionate-dry powder inhaler(FP-DPI)の粒子径3.3 μ m、

B. 研究方法

1)末梢気道病変を有する小児気管支喘息患児群と、年齢をあわせた末梢気道病変のない患児群を対照群に、同意を得られた児に対してSNPs解析を岐阜大にてInvader assayにて行った。それぞれの群に対して喘息発症年齢、吸入ステロイド導入年齢、入院回数について比較を行った。

2)末梢気道閉塞患児群と、年齢をあわせた末梢気道閉塞のない患児を対照群に、同意を得られた児に対して、当院のhigh-resolution CT(HRCT(4列)(SIEMENS社))を用いて最大吸気・最大呼気での2回撮影した。放射線の被曝量を減らすため、全肺野の撮影ではなく、気管分岐部上下4cmの撮影とした。CTデータ匿名化を行い、京都大学呼吸器科で解析を行った。解析は気管分岐部と分岐部上下3cmの3スライスでの平均値を用いた。平均肺野濃度(MLD)(HU)とlow attenuation area(LAA)(%)に関して肺機能検査との相関をみた。

3) 国立病院機構相模原病院小児科を受診している患者で以下の項目を満たすものを対象とした。6歳以上の小児気管支喘息患者で、1年以上FP-DPIを使用中の症状の安定した肺機能測定が可能で、%V50が70%未満、かつβ2刺激薬吸入後のFEV1.0の増加率が12.5%以上又は増加量200ml以上を示す患者。同意取得後無作為割付を行い、FP(50-200μg/day)→BDP(同量)群(I群)と、BDP→FP群(II群)の2群に分け、6ヵ月後に薬剤を変更し、計12ヶ月経過観察を行う。エントリー時に患者背景、気道の可逆性等について測定する。2ヵ月毎の定期受診に日記による症状の確認と、肺機能検査を行った。気道過敏性試験は必須項目とし、薬剤切り替えの6ヶ月時、検査終了時に測定した。



(倫理面への配慮)

この研究は、全て国立病院機構相模原病院の倫理委員会にて承認され実施している。

C. 研究結果

研究1)について参加の同意が得られ、かつ解析し得た症例は全部で80例、このうち、%V50<70%群は30例、%V50>80%群は34例で、この2群間での比較を行った。その背景は表1に示す。平均年齢で%V50<70%有意に年齢が高かったが、その他の背景因子には有意差はなかった。

表1. 研究1)の患者背景

	%V50<70	%V50>80	統計
症例数	30	34	
平均年齢	11.7	9.9	p=0.045
男女比	26:4	23:11	n.s.
平均発症年齢(歳)	2.50	2.74	n.s.
ICS開始平均年齢(歳)	7.93	6.85	n.s.
発症からICS開始までの期間(年)	3.86	3.24	n.s.
平均入院回数(人)	1.87	1.45	n.s.
平均重積回数(人)	0.37	0.38	n.s.

IL-13(Arg110Gln)において、GG, AG, AAの割合は%V50<70%群(n=30)で33.3%, 36.7%, 30.0%、%V50>80%群(n=34)で58.8%, 32.4%, 8.8%とカイ2乗検定でp<0.05にて有意差を認めた(表2)。他に測定したTGF-β1(T-509C)、MIF(C-173G)、IL-4Rα(Val50Ile)、IL-12β(C3757T)では特に有意差を認めなかった。

表2. IL-13(Arg110Gln)と%V50の関係

IL-13		GG	AG	AA	計
Arg110Gln	V50<70	10	11	9	30
P=0.047	V50>80	20	11	3	34
	計	30	22	12	64

研究2)については撮影した11症例中解析の終了した9例について検討した。平均年齢、平均発症年齢、気道過敏性に差はなかった(表3)。

表3. CT撮影した症例の患者背景

	%V50<70%	%V50>100%
例数(男児:女児)	6(5:1)	3(0:3)
平均年齢	12	13
アトピー型: 非アトピー型	7:0	3:1
平均発症年齢	2.7	2.3
平均入院回数	3	1.8
Ach PC20(μg/ml)	13048	12047

%V50で2群に分けて検討すると、平均肺野濃度は%V50>100%で-809.9HU、%V50<70%で-866.6HUと有意に高かった(図2)。また、LAAについても%V50>100%で8.9%、%V50<70%で21.8%と%V50>100%で有意に低かった(図3)。

図2. %V50と平均肺野濃度の吸気条件での比較

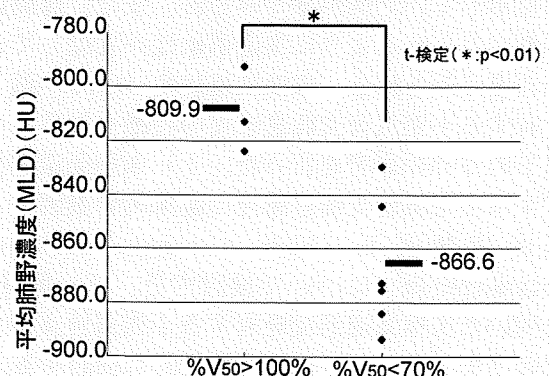
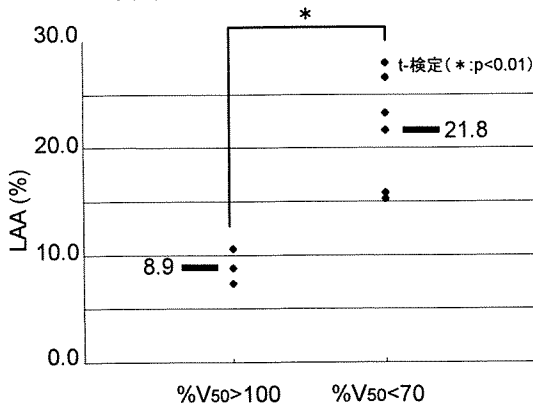


図3. %V50とLAAの吸気条件での比較



吸気条件で平均肺野濃度は%V50 と有意な正の相関を、LAA は%V50 と有意な負の相関を示した(図4、5)。

図4. 吸気条件(気管分岐部と分岐部上下3cmの平均)

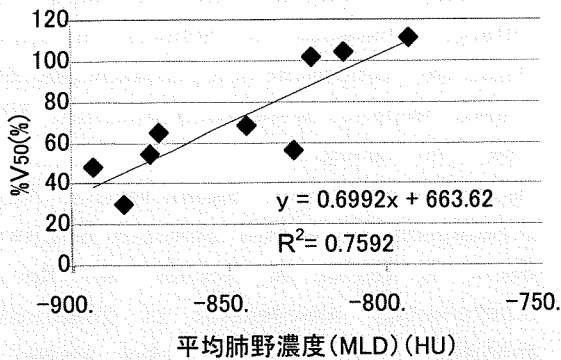
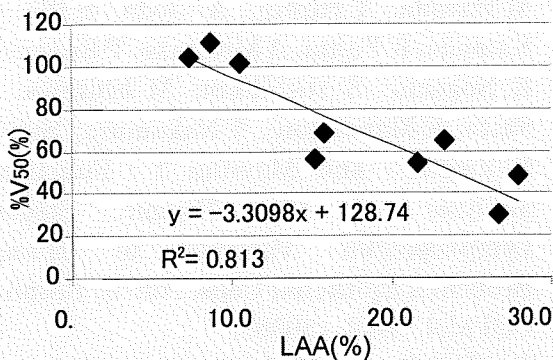


図5. 吸気条件(気管分岐部と分岐部上下3cmの平均)



研究3) についてエントリー症例は20例(男児15例、女児5例)、平均年齢は12.7歳(8-22歳)、全例アトピー型喘息である。喘息罹病期間は9.2年(5-18年)で治療を加味した重症度は軽症持続型が8例、中等症持続型が10例、重症持続型は2例であった。無作為割付によりI群は11例、II群は9例であった(表4)。

研究途中での喘息症状増悪や通院拒否によるドロップアウトは、I群は2例、II群は3例であり、解析し得た症例はそれぞれ9例、6例であった。呼吸機能の変化は primary endpoint である%V50

の平均についてはI群 55.1→58.0→59.7%、II群 52.8→57.0→60.8%であった(図6)。FP投与期間、BDP投与期間をそれぞれまとめるとI群 57.9→59.1%、II群 55.9→60.7%であり、いずれにおいても有意差を認めなかった(図7)。

6ヶ月ごとの%FEV1.0、AchPC20 についても有意な変化はみられなかった。

表4. 患者背景		I群	II群
例数		11	9
平均年齢(歳)(range)*		14.4(8-22)	10.7(8-12)
男女比		2.67	3.5
平均罹患年数(年)(+/SEM)		10.5(+/-1.3)	7.6(+/-0.7)
重症度	重症持続型	1	1
	中等症持続型	5	5
	軽症持続型	5	3
治療薬 平均IXΣ投与量(μg)/日		140	117
平均 AchPC20 (μg/ml)(+/SEM)		6490(+/-2292)	3938(+/-1350)
平均%FEV1.0(%) (+/SEM)		85.6(+/-2.7)	79.0(+/-2.4)
平均%V50(%) (+/SEM)		56.0(+/-2.4)	54.0(+/-2.8)

図6. %V50のI群、II群での変化

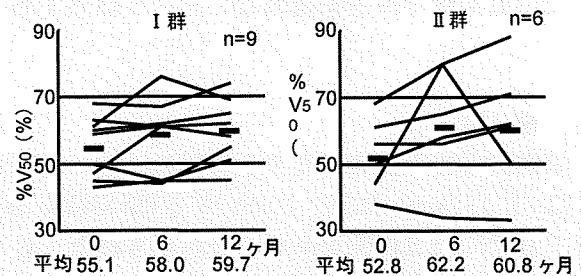
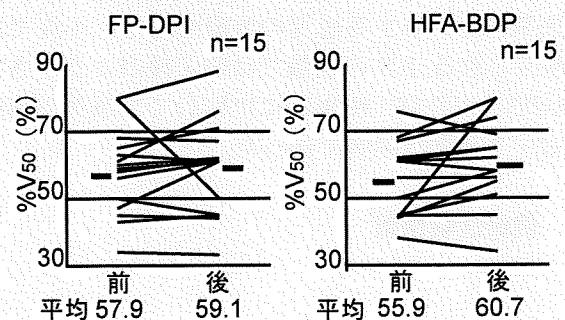


図7. %V50のFP-DPI、HFA-BDPまとめた投与期間前後での比較



D. 考察

SNPs解析については、現時点でIL-13(Arg110Gln)においてGGが%V50>80%群で有意に出現頻度が高いことが示され、末梢気道閉塞を示す児は、ある程度遺伝的背景と関連があるこ

とが示された。

CTに関しては、末梢気道閉塞により肺胞の含気が増えるとCT値が低くなり、平均肺野濃度は低下する。今回の我々のデータも平均肺野濃度は吸気時の%V50と正の相関を示し、%V50の2群間で比較すると有意に末梢病変のある症例では平均肺野濃度が低くなっていた。また、LAAに関しては末梢気道閉塞が存在するとエアトラップにより、CT値の低い面積比が高くなる。今回の我々のデータも吸気時の%V50と負の相関を示し、%V50の2群間で比較すると有意に末梢病変のある症例ではLAAが高くなっていた。以上より、小児においても肺機能検査で%V50にて末梢気道病変をきたしている患児では、胸部CTの画像上でも末梢気道病変を示すことが示された。今後、治療の経過の指標にも応用できると考えられた。

ICSの剤型変更に関しては、%V50の変化は6ヶ月までで比較すると、FP投与期間、BDP投与期間いずれにおいても、改善傾向はあるが、成長障害を認めないICS通常量での末梢気道病変に対する効果は同等であると考えられた。成人では高用量ではBDPの方が優れているという評価があるが小児での通常量では差を認めないという結果であった。

E. 結論

末梢気道狭窄病変を有する患児のSNPsに関してはIL-13(Arg110Gln)において、GGが%V50>80%群で有意に出現頻度が高いことが示された。CTでの末梢気道病変の評価に関して、小児でも吸気時の平均肺野濃度やLAAの測定は末梢気道病変を画像的に評価するのに有用と考えられた。末梢気道狭窄病変を有する患児の治療面では、小児で通常投与されるICSの用量では粒子径のより小さいHFA-BDPはFP-DPI使用群に比較して末梢気道病変に対する効果は同等であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Y Hitomi, M Ebisawa, M Tomikawa, T Imai, T Komata, T Hirota, M Harada, M Sakashita, Y Suzuki, N Shimojo, Y Kohno, K Fujita, A Miyatake, S Doi, T Enomoto, M Taniguchi, N Higashi, Y Nakamura and

M Tamari : Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 124 : 779 - 785 (2009).

2. 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).
3. Motohiro Ebisawa : 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).
4. Richard E Goodman, Stefan Vieths, Hugh A Sampson, David Hill, Motohiro Ebisawa, Steve L Taylor & Ronald van Ree : Allergenicity assessment of genetically modified crops - what makes sense?. *Nature biotechnology*. 26 : 73 - 81 (2008).
5. M Harada, T Hirota, A Jodo, S Doi, M Kameda, K Fujita, A Miyatake, T Enomoto, E Noguchi, S Yoshihara, M Ebisawa, H Saito, K Matsumoto, Y Nakamura, Steven F Ziegler, and Mayumi T : Functional analysis of the Thymic Stromal Lymphopoietin Variants in Human Bronchial Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* (2008).
6. 海老澤元宏 : シンポジウム 学校におけるアレルギー疾患の管理と支援今後の具体的取り組みの方向を探る—小児アレルギー科医の立場から. *日本医師会雑誌*. 137 : 42-44 (2008).
7. H Tachimoto, M Ebisawa : Effect of Interleukin - 13 or Tumor Necrosis Factor-Alpha on Eosinophil Adhesion to Endothelial Cells under Physiological Flow Conditions. *Int Arch Allergy Immunol*. 143(suppl1) : 33 - 7(2007).
8. H Tachimoto, M Ebisawa, B. S. Bochner : CCR3-active chemocines influence

eosinophil adhesion to endothelial cells under static and flow conditions, *Clinical and Experimental Allergy Reviews*. 7 : 1 - 4(2007).

9. K Hatsushika, T Hirota, M Harada, M Sakashita, M Kanzaki, S Takano, S Doi, K Fujita, T Enomoto, M Ebisawa, S Yoshihara, H Sagara, T. Fukuda, K Masuyama, R Katoh, K Matsumoto, H Saito, H Ogawa, M Tamari, and A Nakao : Transforming growth factor- β 2 polymorphisms are associated with childhood atopic asthma, *Clinical and Experimental Allergy*. 37 : 1165-74(2007).

2. 学会発表

1. M Ebisawa : Japanese asthma guideline. The Allergy and Immunology Society of Thailand (2009 年 4 月, Bangkok, Thailand,)
2. M Ebisawa, C Sugizaki : Prevalence of allergic diseases during first 7 years of life in Japan. 2010 AAAAI Annual Meeting (2010 年 3 月, New Orleans, LA, USA,)
3. 柳田紀之 富川盛光 黒坂了正 佐藤さくら 井口正道 小俣貴嗣 今井孝成 宿谷明紀 海老澤元宏 : ブデソニド懸濁液の気管支喘息中発作に対する治療効果 (第一報). 第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2009 年 6 月, 岐阜)
4. 富川盛光, 宇都宮朋宏, 柳田紀之, 井口正道, 小俣貴嗣, 今井孝成, 宿谷明紀, 海老澤元宏 : 2. 末梢気道狭窄を有する小児気管支喘息児に対する HFA-BDP の有用性に関する検討—最終報—. 日本アレルギー学会秋季学術大会 (第 59 回) (2009 年 10 月, 秋田)
5. 宇都宮朋宏, 柳田紀之, 佐藤さくら, 井口正道, 小俣貴嗣, 今井孝成, 富川盛光, 宿谷明紀, 海老澤元宏 : 3. 乳幼児持続型喘息患者へアドオンしたブデソニド吸入懸濁液の中止方法の検討. 日本アレルギー学会秋季学術大会 (第 59 回) (2009 年 10 月, 秋田)
6. 人見祐基, 海老澤元宏, 富川盛光, 今井孝成 小俣貴嗣, 広田朝光, 原田通成, 鈴木洋一, 下条直樹, 河野陽一, 玉利真由美 : 5. NLR family 遺伝子多型と食物アナフィラキシーとの関連解析. 日本アレルギー学会秋季学術大会 (第 59 回) (2009 年 10 月, 秋田)

7. 佐藤さくら, 小俣貴嗣, 杉崎千鶴子, 井口正道, 今井孝成, 富川盛光, 田知本寛, 斎藤明美, 安枝浩, 海老澤元宏 : 115. アレルギーマーチの進展因子と予防に関する研究 (第 2 報). 日本小児アレルギー学会 (第 46 回) (2009 年 12 月, 福岡)
8. 富川盛光, 黒坂了正, 柳田紀之, 井口正道, 小俣貴嗣, 今井孝成, 宿谷明紀, 海老澤元宏 : 末梢気道狭窄を有する小児気管支喘息児に対する HFA-BDP の有用性に関する検討—第 1 報—. 日本アレルギー学会春季臨床大会 (第 20 回) (2008 年 6 月, 東京)
9. 黒坂了正, 柳田紀之, 小俣貴嗣, 今井孝成, 富川盛光, 田知本寛, 宿谷明紀, 海老澤元宏 : 気管支喘息重責発作に対するプロカテロール持続吸入療法 (第二報). 日本アレルギー学会春季臨床大会 (第 20 回) (2008 年 6 月, 東京)
10. 海老澤元宏 : 小児アレルギー疾患の発症・進展・重症化の予防対策について. 日本アレルギー学会秋季学術大会 (第 58 回) (2008 年 11 月, 東京)
11. 富川盛光, 黒坂了正, 柳田紀之, 井口正道, 小俣貴嗣, 今井孝成, 宿谷明紀, 海老澤元宏 : 末梢気道狭窄を有する小児気管支喘息児に対する HFA-BDP の有用性に関する検討—第 2 報—. 日本小児アレルギー学会 (第 45 回) 2008 年 12 月, 横浜)
12. 海老澤元宏, 森川昭廣, 西間三馨 : 医療サイドから望む学校におけるアレルギー対策, 日本小児アレルギー学会 (第 44 回) (シンポジウム 1 園・学校とアレルギー) (2007 年 12 月, 名古屋)
13. 富川盛光, 海老澤元宏 : 小児気管支喘息における末梢気道炎症の重要性, 日本アレルギー学会春季臨床大会 (第 19 回) (イブニングシンポジウム 4 末梢気道炎症に対する吸入ステロイド療法) (2007 年 6 月横浜)
14. 黒坂了正, 宿谷明紀, 小俣貴嗣, 今井孝成, 富川盛光, 田知本寛, 海老澤元宏 : 小児気管支喘息大発作におけるプロカテロール持続吸入療法の有用性及び副作用に関する検討. 日本アレルギー学会春季臨床大会 (第 19 回) (2007 年 6 月, 横浜)
15. 富川盛光, 黒坂了正, 佐藤さくら, 小俣貴嗣, 今井孝成, 田知本寛, 宿谷明紀, 海老澤元宏 : 小児気管支喘息管理・治療ガイドライン 2005 (JPGL2005) に沿った治療における QOL の改

善. 日本アレルギー学会春季臨床大会 (2007
年 6 月, 横浜)

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：小児アレルギー疾患の予後予測因子の確立に関する研究

分担研究者 藤澤 隆夫 国立病院機構三重病院臨床研究部 部長

研究要旨

小児アレルギー疾患に対してテラーメイド化治療を行うためには、非侵襲的かつ簡便に測定できるバイオマーカーの実用化が必要である。我々は3年間の研究において、食物アレルギーと気管支喘息について新規検査法を開発し、診断と予後予測に有用なマーカーをみいだした。

まず、小児の食物アレルギーでもっとも頻度の多い鶏卵アレルギーについて、好塩基球の活性化マーカーCD203c 発現定量によって鶏卵アレルギーの診断と予後の予測ができることを明らかにした。負荷試験で確定した232名の鶏卵アレルギー患者の検討で、卵白抗原によるCD203c 発現は非加熱卵を含む耐性獲得者と何らかの症状が誘発される。それ以外の患者の鑑別に、オボムコイドによるCD203c 発現は加熱卵までは耐性がある者とそうでない者の鑑別に高い診断性能を示した（ROC解析による曲線下面積AUC：0.89, 0.85）。次に、鶏卵に非耐性の患者が1年後に耐性を獲得できるか否かの診断にはオボムコイドドメイン3によるCD203c 発現定量が有用であった（AUC 0.89）。さらに、現存の検査法と病歴を組み合わせることによって、負荷試験での反応が軽症か重篤かを予測することも鶏卵、牛乳、小麦において明らかにした。これによって、負荷試験を考慮する際に、一般診療所で施行可能か、専門病院で行うべきかを判定することが可能となる。

気管支喘息では、思春期に症状が安定して吸入ステロイド（ICS）を中止した例の経過を後方視的に解析、寛解維持と再燃に関わる因子を検討した。その結果、ICS中止前の無発作期間が6ヶ月以上であると寛解が維持しやすいことが明らかとなった。しかし、ICS総投与期間が長い例が再燃しやすいこともわかり、重症度そのものも予後を左右すると考えられた。次に、気道炎症マーカーである呼気NOの実用化を目指した検討も行った。一般に呼気NOは気道の好酸球性炎症を反映し、ICS治療反応性を予測できるとされるが、高値でも症状がない例など非典型例ではしばしば判定に苦慮する。そこで、異なる呼気流速で測定することにより肺の部位別のNO濃度を推定する手法を応用して、不安定例では肺胞（末梢性）NOが高値であることを見いだした。Impulse oscillometry（IOS）による気道抵抗測定でも不安定群で末梢気道マーカーが高値を示した。この週報で、喘息病態の首座である末梢気道の炎症が同定可能となり、よりの確な抗炎症療法の選択が可能となる。

以上、食物アレルギーと気管支喘息の予後判定に関連するバイオマーカーを明らかにした。

研究協力者

長尾みづほ	国立病院機構三重病院臨床研究部
徳田 玲子	国立病院機構三重病院臨床研究部
平口 雪子	国立病院機構三重病院臨床研究部
細木 興亜	国立病院機構三重病院臨床研究部
谷田 寿志	国立病院機構三重病院臨床研究部

食物アレルギーについては、最終診断は経口負荷試験によって行われるが、しばしば重篤な誘発症状をおこすことがあり、安全で非侵襲的な診断法が求められているが、一般に用いられる特異IgE抗体測定も診断性能には限界があるのが現状である。そこで、我々は好塩基球の細胞反応性を定量する手法の臨床的実用化を目指した。さらに、現存の検査法についても組み合わせることにより診断性能を向上させることを試みた。

気管支喘息は思春期に寛解することが多いが、吸入ステロイド（ICS）による長期管理をいつ中止

A. 研究目的

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が求められている。

すればよいのかの基準が存在しない。そこで、思春期喘息患者において、ICS の安全な中止基準を明らかにすることを目的に ICS 中止後の予後に関連する因子をレトロスペクティブに解析した。

また、抗炎症療法を行う際、気道炎症のマーカーとして呼気 NO が臨床応用されるようになってきた。呼気 NO 高値は吸入ステロイドの反応性を予測し、低下すると薬剤の減量を考えることができる。しかし、中には高値でも無症状である例があり、データ解釈に苦慮することも少なくない。そこで、肺における NO 産生のモデル化で部位別 NO 濃度を推定して、治療対象となる末梢気道の炎症をよりの確に検出することを試みた。

B. 研究方法

1) 鶏卵アレルギーの新規診断法の確立

対象：卵白特異 IgE 抗体陽性で鶏卵アレルギーが疑われた 232 例を対象とした。経口負荷試験により診断を確定、非耐性 (definitive egg allergy:DEA)、加熱卵のみに耐性で非加熱卵に非耐性 (raw egg allergy:REA)、加熱卵と非加熱卵ともに耐性 (tolerant egg allergy;TEA) の 3 群に分けた。DEA の患者については 1 年後に再度負荷試験を行い、はじめに行った検査で 1 年後の予後が予測できるか解析した。

好塩基球 CD203c 発現定量：Beckman Coulter 社製の Allergenecity kit を用いてフローサイトメトリーにて解析した。簡略に述べると、被検者より採取した EDTA 加血液にそれぞれの抗原を添加、キット添付の活性化液 (EDTA でキレートされたカルシウムを補充する)、PC7 標識抗 CD3 抗体、FITC 標識抗 CRTH2 抗体、及び PE 標識抗 CD203c 抗体と 15 分反応させた後、溶血、洗浄、0.1%ホルムアルデヒド固定を経て、フローサイトメリーにて解析した。散乱光によって分画した単核球中、CD3(-)CRTH2(+)細胞を好塩基球として同定、この細胞群に発現する CD203c の蛍光強度を定量した。

2) 食物経口負荷試験の誘発反応重症度予測

対象：鶏卵、牛乳、小麦の経口負荷試験を行った 273 名を対象とした。負荷試験はのべ 1046 回 (男：女 195:78) であった。

方法：負荷試験による誘発症状を軽症 (陰性または皮膚か粘膜症状のみ)、重症 (皮膚以外の臓器症状やアナフィラキシー (多臓器症状) を呈した) に分類、特異 IgE 抗体、ヒスタミン遊離テスト (HRT)、食物アレルギーを中心とする病歴との関

連を解析した。

3) ICS 中止後の予後に関わる因子の解析

症状安定により ICS を中止後、1 年以上経過を観察できた喘息児 40 例について ICS 中止後の予後に関連する臨床的因子、呼吸機能などを診療録からレトロスペクティブに解析した。

4) 呼気 NO 濃度のモデル解析

アレルギー外来通院中で呼気 NO を測定し 30 以上の高値を認めた喘息患者 40 名を対象に、半年以上完全に無発作の状態の患者を“安定群”、軽症を含め何らかの発作を認める患者を“不安定群”と分類した。アメリカ呼吸器学会・ヨーロッパ呼吸器学会 (ATS/ERS) 標準法による呼気流速 50ml/s での測定に加え、さらに 3 つの呼気流速 (低流速、中流速、高流速) で NO を測定した。そして、呼気 NO 濃度が呼気流速に依存する原理に基づいて肺における NO 動態の非線形モデルを仮定した Högman と Meriläinen のアルゴリズム (Respir Med 2002; 96:24-30) を適用して、肺泡 NO 濃度 (CaNO)、気道壁 NO 濃度 (CawNO)、NO 拡散能 (DawNO)、最大 NO 流量 (JawNO) を算出した。同時に、impulse oscillometry も行い、全気道抵抗 R5、中枢気道抵抗 R20、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 を測定した。

(倫理面への配慮)

研究計画は国立病院機構三重病院倫理審査委員会にて承認を受け、被検者には説明・同意を得た。

C. 研究結果

1) 鶏卵アレルギーの新規診断法の確立

負荷試験の結果、対象は表 1 のように分類されたが、3 群間に年齢、血清総 IgE 値に有意差はなかった。

表 1 負荷試験による鶏卵アレルギー診断

	N	男/女	平均月齢±SD
Definitive egg allergy (DEA)	167	81/86	44.1±30.0
Row egg allergy(REA)	31	15/13	29.2±23.7
Tolerant egg allergy (TEA)	34	11/23	32.8±14.5

卵白抗原による CD203c 発現は DEA、REA 群で濃度依存的に誘導されたが、TEA では明らかな上昇

はみられなかった。一方、オボムコイドによる CD203c 発現は DEA 群でのみ濃度依存的に誘導されたが、REA と TEA 群では明らかな上昇はみられなかった。これらより、寛解例(TEA)と何らかの除去を必要とする鶏卵アレルギー (DEA または REA) は卵白による CD203c 発現で、少なくとも加熱卵は摂取可能である部分的寛解を含む寛解例 (TEA または REA) と全く鶏卵を摂取できない例 (完全除去必要) はオボムコイドによる反応で診断できる可能性があるため、ROC 解析を行ったところ、TEA と REA+DEA では卵白による CD203c 発現が、TEA+REA と DEA の鑑別ではオボムコイドによる CD203c 発現定量が高い診断性能を示した(表 2)。

表2 鶏卵アレルギーにおける抗原特異 CD203c 発現定量の診断性能(ROC 解析)

TEA vs REA+DEA (卵白 CD203c)		TEA+REA vs DEA (オボムコイド CD203c)	
CD203c cut off >12.75		CD203c cut off >7.925	
AUC	0.886	AUC	0.850
PPV	97.0	PPV	91.4
NPV	45.3	NPV	57.6
sensitivity	82.3	sensitivity	76.6
specificity	85.3	specificity	81.5

特異 IgE 抗体の診断性能は上記それぞれの鑑別に関して、AUC は卵白 IgE 0.75, オボムコイド IgE 0.79 と CD203c より有意に低かった。

次に、DEA と診断された患者の診断時のオボムコイドおよびオボムコイドドメイン 3 (OM-DM3) による CD203c 発現を 1 年後の耐性、非耐性で比較したところ、非耐性群は耐性群より有意に高値であった。とくに、DM3-CD203c は非耐性群、耐性群の差がより顕著であった。そこで、1 年後の耐性獲得の有無の予測性能を検討するために、ROC 曲線による解析を行ったところ、OM-DM3 CD203c 発現定量での AUC は 0.893、最大の尤度比を得るカットオフ値での感度は 91.7%、特異度 87.7%、陽性予測率 94.7%、陰性予測率 78.6%であった。OM-DM3 CD203c は 1 年後の予後を高い診断効率で予測できることがあきらかとなった (図 1)。

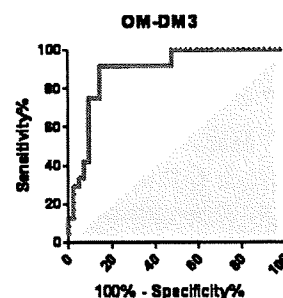


図 1 OM-DM3-CD203c 発現の診断性能

2) 既存検査による負荷試験誘発反応重症度の予測
A. 鶏卵：加熱卵による負荷試験結果とオボムコイド特異 IgE 抗体 (OM-IgE) との関係を年齢別で検討すると(図 1)、0~2 歳ではクラス 1 以上で 96%、3~5 歳ではクラス 3 以上で 89%、6 歳以上ではクラス 2 以上で 100%が重症の反応を起こしていた。3~5 歳ではクラス 2 以下ならば重症反応を起こす可能性が比較的少ないと考えられた。

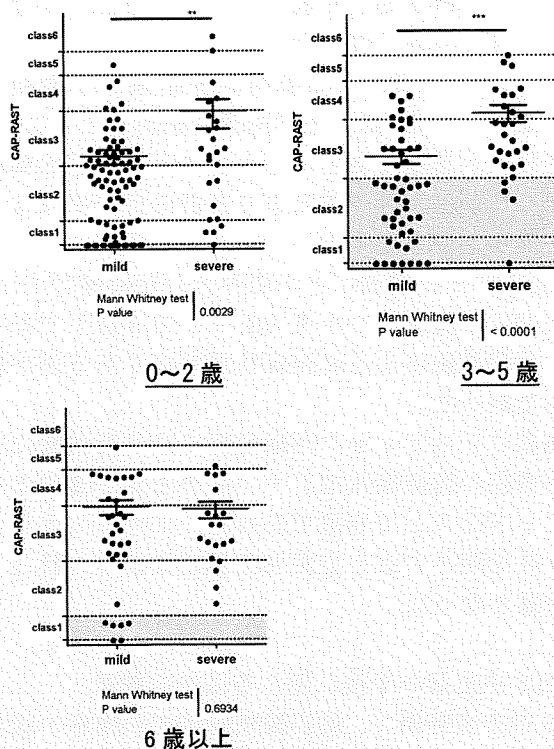


図 2 鶏卵負荷試験による誘発症状とオボムコイド特異 IgE 抗体：年齢別の検討

OM-IgE と卵白 HRT との組み合わせを検討すると、卵白 HRT が陰性かつ OM-IgE クラス 2 以下であると、負荷試験による誘発症状が軽症である例が約 96%となり、高い確率で軽症を予測できると考えられた。

多重ロジスティック回帰解析では負荷試験における重症の誘発症状はアナフィラキシー既往、

OM-IgE クラス 3 以上がそれぞれオッズ比 4.5, 3.1 で有意であった。アナフィラキシー既往を除外すると OM-IgE クラス 3 以上、卵白 HRT 陽性がオッズ比 3.7, 1.3 で有意となった。

B. 牛乳：牛乳による負荷試験結果と牛乳特異 IgE 抗体 (牛乳 IgE) との関係性を年齢別で検討すると、0~2 歳ではクラス 1 以上で 100%、3~5 歳ではクラス 3 以上で 84%、6 歳以上ではクラス 3 以上で 100%が重症の反応を起こしていた。

牛乳 IgE と牛乳 HRT との組み合わせを検討すると、牛乳 HRT が陰性かつ牛乳 IgE クラス 2 以下であると、負荷試験による誘発症状が軽症である例が約 93%と、比較的高い確率で軽症を予測できると考えられた。

多重ロジスティック回帰解析では負荷試験における重症の誘発症状はアナフィラキシー既往のみがオッズ比 19.5 で有意であった。アナフィラキシー既往を除外すると牛乳 IgE クラス 3 以上がオッズ比 6.4 で有意となった。

C. 小麦：小麦による負荷試験結果と小麦特異 IgE 抗体 (小麦 IgE) との関係性を検討したところ、誘発症状が重症であるほど小麦 IgE が高値の傾向があったが、鶏卵や牛乳より各群のデータはオーバーラップが多かった。

小麦 IgE と小麦 HRT との組み合わせの検討では、小麦 HRT が陰性かつ小麦 IgE クラス 3 以下であると、負荷試験による誘発症状が軽症である例が約 77%であった。

多重ロジスティック回帰解析では負荷試験における重症の誘発症状はアナフィラキシー既往のみがオッズ比 5.2 で有意であった。アナフィラキシー既往を除外すると小麦 HRT 陽性がオッズ比 2.6 で有意となった。

3) ICS 中止後の予後に関わる因子の解析

ICS 中止後経過で、最終観察時点での喘息の状態は図 3 のごとくで、寛解を維持していた例は 20%のみであったが、再燃後再び寛解という間欠型に近い例を含めると 47.5%が予後良好と考えられた。27.5%では ICS 再開を必要としていたが、ICS 非再開例を含めて再燃は 52.5%であった。

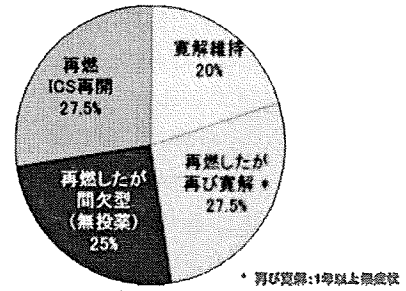


図 3 観察最終時点での予後

寛解と再燃に影響を与える因子を解析したところ、ICS 中止前の無発作期間が 6 ヶ月以上の群では 6 ヶ月未満の群に比べて、有意に寛解維持できた期間が長かった。ICS 中止理由と予後の関係をみると、医師の判断ではなくアドヘレンス不良のために中止になった例で再燃が多いことも明らかとなった。

一方、ICS 再開が必要な例は中止前の ICS 投与期間が有意に長く、中止後の予後は疾患自体の重症度にも依存する可能性が示唆された。

4) 呼気 NO 濃度のモデル解析

呼気 NO が 30~100ppb の高値例において、標準呼気流速 NO 値を喘息安定群と不安定群の間で検討したところ、差を認めなかった。しかし、肺胞 NO 濃度 (CaNO) は不安定群で有意に高値であった (図 4)。

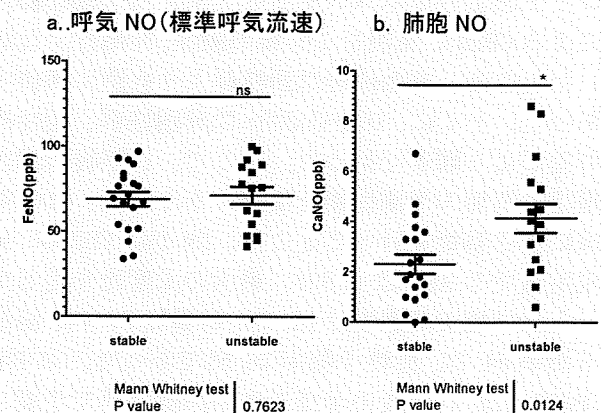


図 4 呼気 NO 高値例 (30-100ppb) における肺胞 NO

IOS のパラメーターで検討すると、全気道抵抗を表す R5、中枢気道抵抗を表す R20 は安定群と不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 5)。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った。CaNO と合わせ、末梢気道病変を反映していると考えられた。

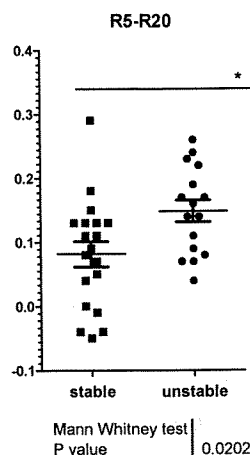


図5 喘息症状とIOSによる末梢気道抵抗 R5-R20

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。

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の検討を行った。

まず、食物アレルギーの新規診断法として、好塩基球 CD203c 発現定量の有用性を明らかにした。CD203c 分子は好塩基球に恒常的に発現しており、膜型酵素の一種であるが、IgE を介する刺激で、短時間に発現が増強する。この反応は全血で行うため、好塩基球に結合している特異 IgE 抗体、細胞自体の反応性、血清性分などの総合的作用を測定することとなり、特異 IgE など抗体のみの測定より、生体に近い反応を評価できると考えられる。実際、鶏卵アレルギーの診断効率は非常に高いことが証明できた。さらに、刺激する抗原の種類によって、臨床病型の分類も可能であることを示した。卵白抗原は鶏卵全般へのアレルギー、オボムコイドは非加熱卵に対するアレルギー、オボムコイドドメイン 3 は 1 年後の非寛解を予測すると考えられた。

また、既存の検査と病歴を組み合わせることによって食物経口負荷試験における誘発反応の重症度予測も可能であることを示した。食物アレルギー

一の最終診断法である負荷試験はときに重篤な反応を伴うが、事前に予測することができればより安全に行うことができるとともに、軽症例は一般診療所で、重症例は専門病院でと効率的な医療が可能となる。

次に、ICS 中止後の気管支喘息の予後では、中止前の無発作期間が短い場合、早期に再燃することが明らかとなった。気管支喘息治療の基本は ICS による抗炎症療法であるが、無発作期間が長い、すなわち気道炎症の十分な抑制を続けることが予後改善に寄与する。少なくとも 6 ヶ月以上の無症状期間を確認後に ICS 中止を考慮すべきであると考えられた。

気道炎症の評価では、呼気 NO 動態の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、喘息がなくてもアレルギー性鼻炎の存在だけで呼気 NO 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しばしば炎症が認められる。この場合、喘息を発症していなくても呼気 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 の産生部位が同定されれば、これらの亜型を鑑別できるわけである。我々は肺における NO 産生動態をモデル化する手法により部位別の NO 濃度を測定した。その結果、肺胞(末梢性)NO は症状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、非侵襲的かつ簡便な手法で裏付けることができたと考えられる。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、肺胞(末梢性)NO の所見と一致した。末梢気道病変の重要性をさらに支持する所見である。今後、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可能と考えられる。

E. 結論

食物アレルギーの診断に好塩基球 CD203c 発現

定量が有用であり、鶏卵アレルギーでは抗原病型分類も可能である。とくに、オボムコイドドメイン3による反応は1年後の非寛解持続を予測できる。食物特異IgE、食物特異HRTという既存検査とアナフィラキシー病歴の組み合わせによっても、負荷試験での重症な誘発反応をある程度予測できることも示された。

思春期の喘息で吸入ステロイドを中止可能かどうかを考慮する際には、中止前の無発作期間が重要である。

気道炎症の評価として、通常と呼気NO測定に加えて、肺胞NOを測定することによって末梢気道炎症の評価をすることができる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Masuda S, Fujisawa T, Katsumata H, Atsuta J, Iguchi K. High prevalence and young onset of allergic rhinitis in children with bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol.* 19 : 517-22(2008).
2. Fujisawa T, Katsumata H, Kato Y : House dust mite extract induces interleukin-9 expression in human eosinophils. *Allergol Int.* 57 : 1 - 6(2008).
3. Hiraguchi Y, Nagao M, Hosoki K, Tokuda R, Fujisawa T. Neutrophil Proteases Activate Eosinophil Function in vitro. *Int Arch Allergy Immunol.* 146 : 16 - 21(2008).
4. Nagao M, Hiraguchi Y, Hosoki K, Tokuda R, Usui T, Masuda S, Fujisawa T Allergen - induced basophil CD203c expression as a biomarker for rush immunotherapy in patients with Japanese cedar pollinosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 146:47-53(2008).
5. Tokuda R, M Nagao, Y Hiraguchi, K Hosoki, T Matsuda, K Kouno, E Morita, and T Fujisawa. Antigen - Induced Expression of CD203c on Basophils Predicts IgE - mediated Wheat Allergy. *Allergol Int.* 58 : 193-199(2009).
6. Fujisawa T, M Nagao, Y Hiraguchi, K Hosoki, R Tokuda, S Usui, S Masuda, M Shinoda, A Hashiguchi, and M Yamaguchi.

Biomarkers for allergen immunotherapy in cedar pollinosis. *Allergol Int.* 58 : 163 - 170(2009).

7. 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).
 8. 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).
 9. 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. T Fujisawa. Non - invasive measurement of airway inflammation in asthma : Is it possible to visualize 'invisible' airways? Special Lecture at 2008 Annual meeting of the Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology (2008年5月9日, Seoul)
 2. T Fujisawa. What is new in Eosinophil World: The Eos strikes back! Meet the Professor session at 2008 Annual meeting of the Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology (2008年5月9日, Seoul)
 3. T Fujisawa, M Mochizuki, Respiratory Symptoms in Preschool - age Children : The results of a questionnaire conducted in Japan. International meeting of American Thoracic Society (2008年5月18日, Toronto, Canada)
 4. 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)

5. 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)
6. 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)
7. 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)
8. 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)

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

小児期発症の気管支喘息の予後に関連する因子を明らかにする目的で研究を行い、以下の結果を得た。

A. ダニ特異 IgE 値と喘息の予後、ならびに IgE に影響を与える因子

1) ダニ特異 IgE 値と喘息経過

思春期を過ぎた小児期発症気管支喘息患者での非寛解群における血清総 IgE 値は寛解群に比較して有意に高値であった。また、非寛解群のコナヒョウヒダニ特異 IgE 値は寛解群に比べて有意に高値であった。3年間の追跡で喘息が軽快した群では大部分の児でコナヒョウヒダニ特異 IgE 値は低下していたのに対し、非軽快群ではほとんど低下は見られなく、高値のままであった。ダニ刺激による末梢血中 IL-10 産生数と IL-5 産生細胞数の比は非寛解群に比べて寛解群で有意に高値であった。また、血清総 IgE 値およびヤケヒョウヒダニ特異 IgE 抗体値は MMP9 5546G/A 多型と有意な相関が認められた。

2) 特異 IgE、非特異 IgE に与える環境因子／遺伝因子相互作用

血清総 IgE 値、ヤケヒョウヒダニ特異 IgE 抗体値について幼児期の保育園通園の有無と CD14-550C/T 多型に相互作用が認められた。

B. 気管支喘息と関連する遺伝因子多型の解析

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、気管支喘息のない小児あるいは成人982名を対照として、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。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・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-4Ralpha、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

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。本研究は、小児期発症の気管支喘息の予後に関連する因子を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 千葉大学大学院医学研究院小児病態学および関連病院の小児科でフォローしている小児期発症で思春期以降までフォローできている気管支喘息患者を臨床的寛解群と非寛解群に分け、それぞれの群での血清総IgE、コナヒョウヒダニ特異IgE値を測定した。また一部の患者においてはコナヒョウヒダニ特異IgE値の経年の推移を2群間で比較した。寛解群、非寛解群でのダニ刺激による末梢血単核球中のIL-10およびIL-5産生細胞数をELISPOT法により検討した。

2) ダニ特異IgE値を規定する因子として、自然免疫、炎症関連分子であるCD14およびmatrix metalloproteinase 9 (MMP9)の遺伝子多型、幼児期の生活環境等について千葉市内小学生約400名を対象として検討した。

3) 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) ダニ特異IgE値と喘息の予後、ならびにIgEに影響を与える因子

思春期を過ぎた小児期発症気管支喘息患者での非寛解群における血清総IgE値は平均722 IU/mlであり、寛解群での平均220 IU/mlに比較して有意に高値であった。非寛解群のコナヒョウヒダニ特異IgE値は121 UA/mlであり、寛解群の28 UA/mlに比べて有意に高値であった(表1)。3年間の追跡で喘息が軽快した群では大部分の

児でコナヒョウヒダニ特異IgE値は低下していたのに対し、非寛解群ではほとんど低下せず、高値のままであった(図1)。ダニ刺激による末梢血中IL-10産生細胞数とIL-5産生細胞数の比は非寛解群に比べて寛解群で有意に高値であった(図2)。血清総IgE値およびヤケヒョウヒダニ特異IgE抗体値はMMP9 2127G/T多型とは関連がなかったが、5546G/A多型と有意な関連が認められた(図3、図4)。

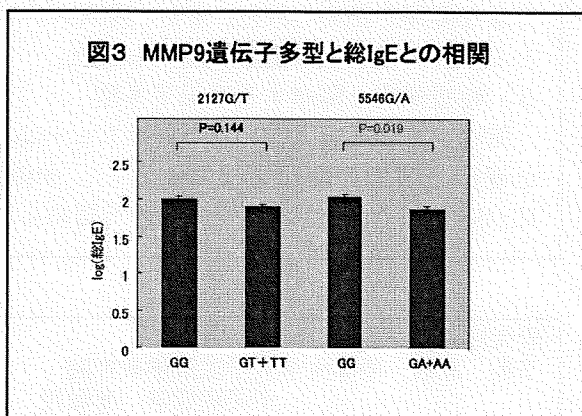
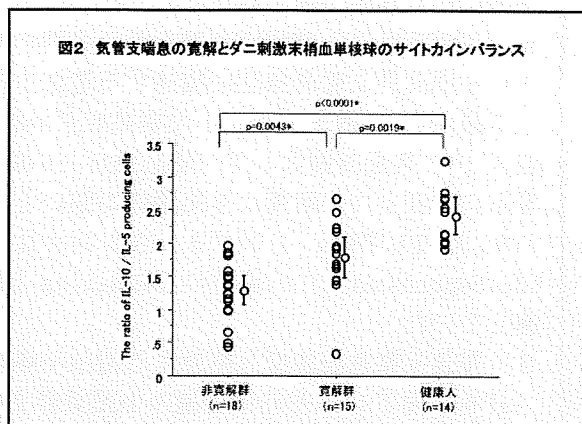
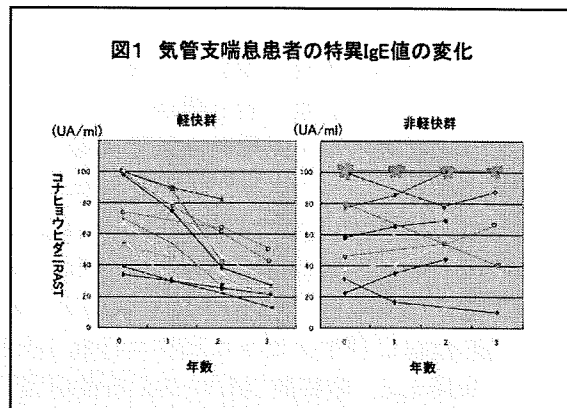
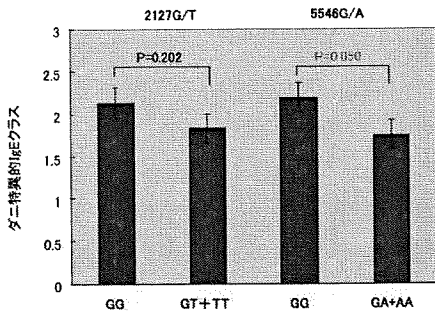


図4 MMP9遺伝子多型とダニ特異IgEとの相関



2) 特異IgE、非特異IgE値に対する環境因子／遺伝因子相互作用

血清総IgE値、ヤケヒョウヒダニ特異IgE抗体値については幼児期の保育園通園の有無とCD14-550C/T多型に相互作用が認められた(表2)。

表2 特異IgEに対するCD14-550C/T多型と2歳までの保育園通園の関連

	CD14 Main effect P value*	Day care Main effect P value*	Gene-environmental Interaction P value*
Log10(total IgE) †	0.80	0.63	0.0046
Specific IgE class ‡			
Mite	0.097	0.010	0.00047
Cedar pollen	0.65	0.013	0.12
Atopy §	0.0072	0.00089	0.0097

*Adjusted for age, sex, number of siblings, and family history
†General linear model
‡Generalized linear model (Poisson distribution, log link function)
§ Logistic regression

3) 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(表3)。

表3 小児期の気管支喘息発症と関連する遺伝子多型

Gene	rsid*	allele	freq	Adm	Assoc	Dirn	Ref
CD14	rs1003	C/T	0.075	*	*	*	
TNF	rs180062	G/A	0.025	*	*	*	
IL13	rs112091	C/T	0.028	*	*	*	
B2M	rs104253	A/G	0.021	*	*	*	
ADAM33	rs112091	C/T	0.021	*	*	*	
CTLA4	rs104253	A/G	0.021	*	*	*	
SPINK5	rs112091	C/T	0.021	*	*	*	
TBXA2R	rs112091	C/T	0.021	*	*	*	
LTA	rs112091	C/T	0.021	*	*	*	
NOD1	rs112091	C/T	0.021	*	*	*	
C3	rs112091	C/T	0.021	*	*	*	
SOCS1	rs112091	C/T	0.021	*	*	*	
TSLP	rs112091	C/T	0.021	*	*	*	

4) 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・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、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(表4)。

表4 気管支喘息重症度と関連する遺伝子多型(1)

JPGL2008の重症度との多項ロジスティック解析
年齢、性別、ADAM33、MMP9 IL13、IL4R、CC16、CTLA、GPRA、LTA、NOD1、SPINK5、TBXA2R、TGFB、LTC4S、C3、IL12B、SOCS1、TSLPのSNPを用い、ステップワイズ法で有意の変数を選択

SOCS1とTBXA2Rの効果が有意

効果	尤度比検定		
	カイ2乗	自由度	有意確率
const	.000	0	.
age	13.695	3	.003
sex	2.787	3	.426
TBXA2R 795C/T	10.303	3	.016
SOCS1 SNP9	9.280	3	.026

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(表5)。

表5 気管支喘息重症度と関連する遺伝子多型(2)

理研の重症度分類との多項ロジスティック解析

Grade 1 発作時、 β 刺激剤のみ
Grade 2 テオフィリンのRTCと(または)インテール吸入をしている
Grade 3 吸入ステロイド、ベコタイド相当400 μ g/日以下投与
Grade 4 吸入ステロイド、ベコタイド相当400 μ g/日を超える投与

年齢、性別、ADAM33、MMP9 IL13、IL4R、CC16、CTLA、GPRA、LTA、NOD1、SPINK5、TBXA2R、TGFB、LTC4S、C3、IL12B、SOCS1、TSLPのSNPを用い、ステップワイズ法で有意の変数を選択

IL-13とTBXA2Rの2遺伝子の効果が有意

効果	尤度比検定		
	カイ2乗	自由度	有意確率
const	.000	0	.
age	9.790	3	.020
sex	3.322	3	.345
IL13110RQ	12.640	6	.049
TBXA2R 795C/T	13.595	3	.004

5) 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った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-4Ralpha, IL-13の多型の関連が認められた(表6、表7)。

表6 末梢呼吸機能と関連する遺伝子多型(1)

β刺激剤吸入後の%MMEFの直線重回帰分析

年齢、性別、ADAM33, MMP9, IL13, IL4R, CC16, CTLA, GPRA, LTA, NOD1, SPINK5, TBXA2R, TGFB, LTC4S, C3, IL12B, SOCS1, TSLPのSNPを用い、ステップワイズ法で有意の変数を選択。

有意な変数は、性別、LTA、IL-4 receptor-α、IL-13

遺伝子	標準化されていない係数			t 検定	有意確率	B の 95.0% 信頼区間	
	B	標準偏差	標準化係数			下限	上限
(定数)	.405	.190		3.120	.001	.148	.657
LTA T530/A	.145	.043	.252	3.235	.002	.055	.226
IL4RA 0551R	.112	.044	.194	2.531	.012	.025	.199
sex	.118	.044	.210	2.685	.008	.031	.205
IL13 -1126/T	.147	.047	.327	3.153	.002	.055	.239
IL13 R1100	-.078	.040	-.203	-1.979	.050	-.159	.003

表7 末梢呼吸機能と関連する遺伝子多型(2)

β刺激剤吸入後の%V dot 50の直線重回帰分析

年齢、性別、ADAM33, MMP9, IL13, IL4R, CC16, CTLA, GPRA, LTA, NOD1, SPINK5, TBXA2R, TGFB, LTC4S, C3, IL12B, SOCS1, TSLPのSNPを用い、ステップワイズ法で有意の変数を選択。

有意な変数は、性別とIL-13

遺伝子	標準化されていない係数			t 検定	有意確率	B の 95.0% 信頼区間	
	B	標準偏差	標準化係数			下限	上限
Z (定数)	.737	.062		14.245	.000	.635	.839
sex	-.082	.027	-.190	-3.032	.003	-.129	-.135
IL13-1126/T	-.047	.022	-.130	-2.078	.039	-.100	-.091

D. 考察

小児気管支喘息の予後にはダニ感作レベルの程度や変化が大きく関与することが示唆された。症例数が少なく、また症例・対照研究であることから、今後はより大規模な前方視的研究が必要と考えられるが、本研究からダニ特異 IgE 値を決定する因子の解析は喘息の予後を予測し、さらに寛解を誘導する方略を考える上で極めて重要であることが示された。本研究からは、調節性サイトカインである IL-10 と Th2 サイトカインのバランスなどの獲得免疫機能がそのひとつであることが示唆された。IL-10 は喘息患者においては低値であるとする報告と高値であるとする報告があるが、Th2 サイトカイン産生に対するカウンターレギュレーションと考えれば、IL-10/Th2 サイトカインバランスがよい指標と

なると思われる。

MMP は、細胞外マトリックスの分解、細胞表面のタンパク質の分解、サイトカインを含む生理活性物質のプロセッシング、など多岐にわたる作用を有する。本研究では、MMP9 が血清総 IgE やダニ特異 IgE 値に関与することが明らかとなった。アレルゲン特異 IgE 低下に MMP9 活性を制御する薬物が有用である可能性がある。

CD14-159C/T 多型の IgE 値への影響については相反する報告が出されている。近年、その原因として、遺伝子・環境因子の相互作用の存在が示唆されている。我が国において本研究で得られた結果と同様の報告は現在までなく、極めて重要な知見である。海外の結果と異なり、我々の検討では IgE 値との関連は CD14-159C/T 多型よりも CD14-550C/T 多型との関連が強いが、人種による遺伝子多型の連鎖不平衡の状況や頻度の差に由来するものなのか、まだ明らかになっていない。いずれにせよ、喘息をはじめとするアレルギー疾患の発症や経過には遺伝因子と環境因子の両方が関与し、それらが独立でなく相互作用を示すことは、極めて重要な意義を有する。ダニ特異 IgE の制御には単に環境調整をすれば良いのではなく、免疫関連分子の遺伝子多型も考慮しての対応が必要であると考えられる。

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。その結果、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。