

氏名(本籍)	川本典生(岐阜県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位授与番号	甲第 650 号		
学位授与日付	平成 18 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	Age-related changes in intracellular cytokine profiles and Th2 dominance in allergic children		
審査委員	(主査) 教授 近藤 直実		
	(副査) 教授 清島 満	教授 高見 剛	

### 論文内容の要旨

ヒトのCD4細胞はIFN- $\gamma$ などを産生するTh1とIL-4などを産生するTh2などに分類される。気管支喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患において、このTh1, Th2バランスの破綻が指摘されている。

近年、フローサイトメーターを用いることによって、サイトカイン産生細胞の割合をシングルセルレベルで解析できるようになった。これまでに、成人のアレルギーにおいてはフローサイトメーターを用いたTh1, Th2の測定が行われてきているが、小児のアレルギーにおいては、Th1, Th2に関する報告はほとんどない。また、CD8陽性細胞中のIFN- $\gamma$ などを産生するTc1とIL-4などを産生するTc2も重要であると考えられる。

小児期の疾患において考慮すべき加齢による影響についても、不明な点が多い。そのため、年齢とTh1, Th2, Tc1, Tc2の関係を検討し、さらに、アレルギー疾患と健康人との間でTh1, Th2, Tc1, Tc2を比較した。

#### 1. 研究方法

##### 1) 対象 1

0~40歳の34人を健康人群とした。健康人群は、アレルギー疾患に罹患しておらず、血清IgEが各々の年齢の正常範囲内であるものとした。1~3歳のアトピー性皮膚炎9人と2~6歳の気管支喘息5人を無作為に抽出した。また、健康人群のうち、1~3歳の者5人をアトピー性皮膚炎のage-matched controlとし、また2~6歳の者5人を気管支喘息のage-matched controlとした。

##### 2) 対象 2

151人の臍帯血について解析した。臍帯血は臍帯静脈より採取し、同時にアレルギーの家族歴を確認した。両親がともにアレルギー疾患を持たない群をグループ1、両親のうち少なくとも一人がアレルギー疾患を持つ群をグループ2とした。また、家族歴の影響をより強くした条件で確認するために、別のグループ分けを行った。3親等内にアレルギー疾患がない群をグループ3とし、両親ともにアレルギー疾患を持つ群をグループ4とした。

##### 3) 細胞内サイトカインの解析

0.5mlのヘパリン加血に0.5mlのRPMI-1640を加え、phorbol myristate acetateとionomycin, breferrdin Aを最終濃度がそれぞれ25ng/ml, 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/mlとなるように添加して、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーターにて4時間培養した。その後CD4, CD8の細胞表面染色を行い、FACS Lysing Solutionにて溶血と固定、FACS Permeabilizing Solutionにて細胞膜透過処理をした上で、細胞内IFN- $\gamma$ , IL-4を染色した。

##### 4) 陽性率と絶対数の算出

CD4またはCD8細胞中のIFN- $\gamma$ 産生細胞の百分率をそれぞれTh1%, Tc1%とした。また、CD4またはCD8細胞中のIL-4産生細胞の百分率をそれぞれTh2%, Tc2%とした。採血と同時に白血球数と血液像、CD4, CD8陽性細胞を測定し、これらより、Th1, Th2, Tc1, Tc2の絶対数を算出した。

##### 5) 統計学的な処理

Th1, Th2, Tc1, Tc2と年齢の相関はSpearman's rank correlationを用いて検討した。アレルギー患者などの統計処理にはMann-Whitney U-testを用いて検討した。正確な統計解析のため、すべての統計処理に出生後の日数を用いた。p<0.05を統計学的に有意とした。

## 2. 結果

### 1) 健常人の解析

34人の健常人において、Th1%, Th2%, Tc1%は年齢と正の相関関係を認めしたが ( $r=0.880$ ,  $p<0.001$ ,  $r=0.571$ ,  $p<0.001$ ,  $r=0.799$ ,  $p<0.001$ ), Tc2%は年齢と相関を認めなかった。Th1/Th2比は年齢と正の相関関係を認めしたが ( $r=0.555$ ,  $p<0.001$ ), Tc1/Tc2比は年齢と相関を認めなかった。27人の健常人のTh1, Tc1の絶対数は年齢と正の相関関係を認めしたが ( $r=0.708$ ,  $p<0.001$ ,  $r=0.458$ ,  $p=0.016$ ), Th2, Tc2の絶対数については年齢と相関を認めなかった。

### 2) 臍帯血の解析

Th1%, Th2%, Tc1%, Tc2%を151人の臍帯血において検討し、その平均値 (±標準偏差) はそれぞれ、0.264 (±0.266), 0.203 (±0.299), 0.542 (±0.666), 0.025 (±0.052) であった。グループ1は32人で、グループ2は80人であった。グループ1とグループ2のTh1, Th2, Tc1, Tc2は有意差を認めなかった。グループ3は18人で、グループ4は21人であった。グループ3とグループ4のTh1, Th2, Tc1, Tc2は有意差を認めなかった。

### 3) アトピー性皮膚炎の解析

1～3歳のアトピー性皮膚炎の患者とage-matched controlとを比較した。Th1, Tc1, Tc2はこの2つの群の間に有意差を認めなかったが、Th2はアトピー性皮膚炎群で有意に高値であった ( $p=0.009$ )。

### 4) 気管支喘息の解析

2～6歳の気管支喘息の患者とage-matched controlとを比較した。Th1, Tc1, Tc2はこの2つの群の間に有意差を認めなかったが、Th2は気管支喘息群で有意に高値であった ( $p=0.016$ )。

## 3. 考察

本研究により、Th1, Th2, Tc2細胞の陽性率は年齢が進むにつれて増加する事を明らかにした。サイトカイン産生細胞はほとんどが、メモリー/エフェクターT細胞であることが報告されている。Th1, Th2, Tc1, Tc2などのサイトカイン産生細胞は臍帯血ではほとんどみられないが、加齢に伴って増加する。従って、臍帯血ではほとんどがナイーブT細胞であるが、年齢とともにメモリー/エフェクターT細胞が増加していく事が考えられる。これらの事から、小児のアレルギー疾患を解析する場合には、健常人とアレルギー患者の年齢を厳密にそろえて比較する必要があると考えられた。アレルギー疾患におけるサイトカイン産生細胞については成人ではいくつかの報告がみられるものの、小児においては報告がほとんどない。そこで、健常人とアレルギー患者を、年齢をそろえて比較した。臍帯血において、アレルギーの家族歴の有無によって、サイトカイン産生細胞の割合に差を認めなかったが、小児期のアトピー性皮膚炎、気管支喘息において、年齢をそろえた健常人と比べてTh2が高い割合を示したため、アレルギー疾患の発症にはTh2が関わっている可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 川本典生は、フローサイトメーターによる細胞内サイトカイン産生細胞の検出手法を用いて、健常人とアレルギー疾患患者について検討した。その結果、健常人では加齢に伴ってTh1, Th2, Tc1, Tc2の割合が増加することを示した。臍帯血においては、これらの値が非常に低く、アレルギーの家族歴の有無によって、差を認めなかった。年齢をそろえて健常人と比較したところ、小児のアトピー性皮膚炎と気管支喘息においては、Th2の割合が高いことを示した。この研究は小児科学ならびに免疫、アレルギー学の研究の進歩・発展に少なからず寄与するものと認める。

---

[主論文公表誌]

Age-related changes in intracellular cytokine profiles and Th2 dominance in allergic children  
Pediatric Allergy and Immunology 17, 125-133 (2006).