

I - 3 気管支ぜん息発症に関わる因子の検索と検査手法の開発に関する研究

代表者：眞弓光文

I - 3 - (1) 気管支ぜん息の発症に関わる免疫遺伝因子の解明と検査手法の開発に関する研究

1. 研究従事者

眞弓 光文（福井医科大学小児科）	竹之内 喜代輝（チェスト技術研究所）
清水 芳雄（国立仙台高等専門学校）	丸太 勝弘（チェスト技術研究所）
赤坂 徹（国立療養所盛岡病院）	浅倉 富子（チェスト技術研究所）
森川 昭廣（群馬大学医学部小児科）	羅 智靖（順天堂大学医学部免疫）
片村 憲司（京都大学医学研究科発達小児科）	平岡 政弘（福井医科大学小児科）
淀井 淳司（京都大学ウイルス研究所感染防御）	近藤 直実（岐阜大学医学部小児科）
松下 祥（熊本大学医学研究科免疫識別）	田中 敏郎（大阪大学医学部第三内科）
平尾 敬男（兵庫県立塚口病院小児科）	伊藤 節子（武田病院小児科）

2. 研究目的

気管支ぜん息の発症予防のための取り組みを効率的に行うためには、気管支ぜん息の発症に関わる因子を明らかにし、発症の危険性の高い児を同定することが重要である。気管支ぜん息の発症は複数の免疫遺伝因子に規定され、その遺伝的に規定された体質は複数の環境因子の影響を受けて変化すると考えられるが、この遺伝的に規定された体質が環境因子によりどのように影響を受けるかを明らかにするためにも、遺伝因子を解明し、環境因子との両者の関連性を明らかにする必要がある。気管支ぜん息の発症に関与すると考えられる遺伝子多型は、これまでも世界各国の研究者よりいくつか報告されているが、日本人集団におけるその意義は必ずしも明らかではなく、むしろ気管支ぜん息の予知因子としては否定的な結果が多い。本研究は、日本人集団における気管支ぜん息の発症に関わる免疫遺伝因子を同定し、あわせて、その因子の検査法を確立することにより、気管支ぜん息の発症を制御する機構を明らかにして、気管支ぜん息発症の危険性の高い小児の予測を可能とし、発症の危険性の高い児に対して適切な治療や保健指導を行って、気管支ぜん息の発症を予防し、気管支ぜん息患者の減少をはかることを目的とする。

3. 研究の対象及び方法

以下の項目を調査研究対象とした。

- (1) 気管支ぜん息発症予測におけるアトピー性皮膚炎罹患の意義
- (2) 気管支喘息の発症を規定する遺伝因子としての(1) FcεR1β鎖遺伝子、(2) IL-4遺伝子イントロン転写調節領域、(3) IgE遺伝子Iε領域、(4) IL-4、IL-5、IL-6、IL-12受容体β鎖、およびIL-13遺伝子の5'転写調節領域、(4) IL-4受容体遺伝子、(5) β2アドレナリン受容体遺伝子、(6) PAF acetylhydrolase遺伝子、(7) Paraoxonase遺伝子、(8) methylenetetrahydrofolate reductase 遺伝子、(8) IL-10遺伝子プロモーター領域、(9) TGF-β1遺伝子プロモーター領域、(10) IL-12受容体遺伝子の多型性
- (3) 気管支喘息の発症におけるHLAの関与とその機序
- (4) 気管支喘息発症予測臍帯血マーカーとしての臍帯血好中球活性化酸素産生能の意義とRSウイルス

の好酸球活性化作用

- (5) 気管支喘息の発症に関与するFcεRIシグナル伝達異常、IL-12シグナル異常、PGE2、IL-6、IL-18の役割
- (6) ヘルパーT細胞の分化やサイトカイン産生を制御する機能性食品の同定およびその成分の解明とそれによるアレルギー疾患発症予防と治療の可能性
- (7) 気管支喘息の発症やその病態におけるチオレドキシンおよびCD23の作用
- (8) 小児の気道過敏性測定を可能にするためのアストグラフの開発と改良

項目1)では、昨年度までに4年間にわたり気管支ぜん息の発症の有無を追跡調査した乳児期に発症したアトピー性皮膚炎患者146名の調査結果およびその免疫遺伝的因子や環境要因を統計的に解析し、アトピー性皮膚炎乳児におけるその後の気管支ぜん息発症の実態と発症危険因子を同定する。

項目2)では、対象遺伝子の多型性の有無を同定し、気管支喘息患者と対照との比較検討により、その多型性が気管支ぜん息の発症や病態形成を規定するかどうかを明らかにする。

項目3)では、抗原提示におけるHLA class IIの多型性がヘルパーT細胞のTh1、Th2への機能的分化に関与するかどうかを検討して、アレルギー発症におけるHLA多型性の意義を明らかにする。

項目4)では、臍帯血好中球活性化酸素産生能を測定した59名におけるアレルギー疾患発症の有無を1歳まで追跡調査し、気管支喘息発症予測臍帯血マーカーとしての臍帯血好中球活性化酸素産生能の意義を明らかにする。また、RSウイルス感染が好酸球の活性化にどのような影響を与えるかを検討し、気管支ぜん息発症に関わるRSウイルスの役割を解析する。

項目5)では、アレルギー疾患におけるFcεRβ鎖の遺伝子変異、IL-12レセプター遺伝子変異の意義をその遺伝子産物の機能解析をすることにより明らかにし、また、アレルギー患者におけるPGE2、IL-6の産生の特徴とその役割を検討する。さらにアトピー性皮膚炎モデルマウスを用いて、アレルギー発症におけるIL-18の役割を検討する。

項目6)では、ヘルパーT細胞の分化やサイトカイン産生を制御する機能性食品を同定し、その成分と機序を明らかにして、アレルギー疾患発症予防と治療の可能性を検討する。

項目7)では、チオレドキシンの炎症におよぼす調節作用、気管支ぜん息発作時における血清チオレドキシン濃度の測定、チオレドキシンのケモカイン作用の有無を明らかにすると共に、CD23の発現・放出機構およびCD23のレセプターであるCD21の発現機構を明らかにして、気管支喘息の発症やその病態におけるチオレドキシンおよびCD23の作用を検討する。

項目8)では、小児の気管支ぜん息患者における気道過敏性測定を可能にするために必要なアストグラフの改良点を明らかにし、それにしたがって改良する。

4.平成11年度の研究成果

1)気管支ぜん息の発症予測因子としての乳児アトピー性皮膚炎の位置づけの解析

平成6年度に登録したアトピー性皮膚炎乳児169名におけるその後4年間の各年毎のぜん息発症の有無と発症を規定する因子の調査結果を解析し、以下の結果を得た。(1)4年間に気管支ぜん息と診断された患者は36%、未だぜん息とは診断されていない喘鳴群を加えると46%であった。(2)気管支ぜん息発症年齢は1歳が5名、2歳が14名、3歳が12名、4歳が4名、5歳が1名で、2歳と3歳に発症のピークがあった。アトピー性皮膚炎乳児における気管支ぜん息の発症はほとんどが5歳までに発症することが示された。

(3) 気管支ぜん息発症の危険因子として、1年目の調査結果では遺伝因子(気管支ぜん息の家族歴、男性、ダニアレルギーに対する高感受性)の強い関与が示されたが、2年目以降にはこれらの遺伝因子の関与の度合いは低下した。(4) 4年間を通じて気管支ぜん息の発症因子として最も重要なものは経過中のダニアレルギーの獲得であったが、ダニ特異 IgE 抗体陽性であることの相対危険度は年を経る毎に低下し、年少児ほどダニアレルギーの獲得が気管支ぜん息の発症に結びつきやすかった。(5) 気管支ぜん息を発症したグループは発症しなかったグループに比べて有意に血清総 IgE 値が高値で、ダニ特異 IgE 値も高く、食物抗原特異的 IgE 抗体価の低下も見られず、IgE 産生系の感受性亢進が認められた。これらの結果から、アトピー性皮膚炎を発症した乳児では、その後の気管支ぜん息の発症を予防するために、1歳までの早期からダニアレルギー予防の対策を行うことが必要であることが示された。

2) 気管支喘息の発症を規定する遺伝子の解析

- (1) FcεRIβ鎖遺伝子のコドン237にはGlu/Glyへの多型が存在し、気管支ぜん息およびアトピー性皮膚炎患者においてはその多型頻度がそれぞれ33%、31%と、正常対照の16%に比べて有意に高値であり、Glu237Glyの遺伝子多型が気管支ぜん息やアトピー性皮膚炎発症に関与する可能性が示された。
- (2) IL-4遺伝子イントロン転写調節領域、IgE遺伝子Iε領域、IL-5、IL-6、IL-12受容体β鎖、およびIL-13遺伝子の5'転写調節領域には遺伝子の多型性は存在しなかった。
- (3) IL-4遺伝子の5'転写調節領域(IL-4-525C/T)、IL-4受容体遺伝子(IL-4R-Val50Ile、IL-4R-Gln576Arg)、β2アドレナリン受容体遺伝子(β2ADR-Arg16Gly、β2ADR-Gln27Glu)の多型性の検討では、IL-4R-Val50Ileの使用頻度がアトピー性疾患患者で高く、IL-4受容体の遺伝子多型がI型アレルギー疾患の発症に関与している可能性が示されたが、これ単独ではI型アレルギー疾患の発症予測マーカーとしての精度は不十分であった。β2ADR-Arg16GlyとIL-4R-Val50Ileの組み合わせがアトピー型喘息患者で増加していることが明らかになった。
- (4) PAF分解酵素であるPAF acetylhydrolase遺伝子のexon 9には遺伝子多型(994G T)が存在し、酵素活性を規定している。この多型頻度は気管支ぜん息患者と一般対照との間で有意差は認めなかったが、5年以上経過しても中等症以上の気管支喘息患者に多い傾向があり、気管支ぜん息の遷延化、重症化に関与する可能性が明らかになった。また、男児でこの遺伝子多型を有する者は、有さない者に比べて、年長になってもぜん息を発症する傾向が見られた。
- (5) Paraoxonase遺伝子のcodon 192にはGln/Argの遺伝子多型が存在するが、この遺伝子多型と気管支ぜん息の発症やその病態との関連性は認められなかった。methylenetetrahydrofolate reductase遺伝子の多型性も有意ではなかった。
- (6) IL-10遺伝子プロモーター領域(571C A)、TGF-β1遺伝子プロモーター領域(509C T)の遺伝子多型は日本とアメリカでは非常に異なり、日本人集団ではこれらの遺伝子多型は血清IgE値の高低と関係なく、食物アレルギーの発症とも関連性を認めなかった。
- (7) IL-12レセプターβ2鎖遺伝子に異常(2496del91)を同定し、IL-12受容体β2鎖遺伝子異常によるI型アレルギー疾患発症の可能性を明らかにした。

3) 気管支喘息の発症におけるHLAの関与とその機序の解析

異なるHLA class II分子は細胞内で異なる蛋白分子と会合し、この差はDR、DQ、DP間のみならずDQの対立遺伝子産物間においても認められた。T細胞に抗原提示を行う際に、抗原提示細胞がHLA class IIのDRを

用いる場合には炎症性サイトカインが、DQやDPを用いる場合には抗炎症性サイトカインをより強く誘導するため、HLA-DQ/DP拘束性のT細胞はDR拘束性のT細胞に較べてTh2有意なサイトカイン産生パターンを示すことを明らかにした。また、 β -lactoglobulinは特定のHLA class II分子によりT細胞に提示されていたが、これを認識するT細胞受容体は多彩であることを明らかにした。その結果、HLA class II分子の多型性がアレルギー疾患の発症に関与することを示唆した。

4) 気管支喘息発症予測臍帯血マーカーとしての臍帯血好中球活性化酸素産生能の意義とRSウイルスの好酸球活性化作用の解析

気管支ぜん息の発症を予測する臍帯血マーカーとして、59名の新生児の臍帯血好中球を採取し、これをウミホタルルシフェリン誘導体で刺激した時の活性化酸素産生能を測定し、その児を追跡調査し、1歳時点でのアレルギー疾患発症の有無との関連性を検討した。1歳までにアレルギー疾患を発症した児では臍帯血好中球の活性化酸素産生能が高い傾向が見られた。また、アレルギー疾患家族歴陽性群では陰性群に比べて臍帯血好中球の活性化酸素産生能が高い傾向が見られた。

気管支ぜん息発症のきっかけとなることが知られるRSウイルス感染について、RSウイルスは好酸球の細胞接着能の亢進を介してPAFによる活性化酸素産生能を亢進させることが明らかになった。

5) 気管支喘息の発症に関与するFc ϵ R1シグナル伝達異常、IL-12シグナル異常、PGE₂、IL-6、IL-18の役割の解析

Fc ϵ R1 β 鎖遺伝子のITAMのチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換するとFc ϵ R1を介するマスト細胞の活性化の程度が半減することを明らかにし、マスト細胞の活性化におけるFc ϵ R1 β 鎖遺伝子のITAMが関与していることを明らかにした。また、IL-12受容体 β 2鎖遺伝子の異常(2496del91)によりIL-12の刺激伝達が伝わらず、ガンマイインターフェロンの産生が障害されることを明らかにし、IL-12受容体 β 2鎖遺伝子の異常によりヘルパーT細胞のTh1、Th2への分化がTh2優位に偏移して、I型アレルギー疾患が発症する可能性を示した。

アトピー性皮膚炎患者末梢血単核球にPGE₂とIL-6の産生亢進が認められることを明らかにした。PGE₂はTh2細胞の分化を誘導し、一方、IL-6はIL-4によるTh2細胞分化を抑制するサイトカインであることを明らかにし、アレルギー患者においてヘルパーT細胞の機能的分化の調節が行われている可能性を示した。

血清IL-18濃度の測定系を開発し、アトピー性皮膚炎患者やアトピー性皮膚炎モデルマウス(NC/Nga)では血清中のIL-18濃度の上昇が見られ、アトピー性皮膚炎の病態形成にIL-18が関与している可能性を示した。しかし、IL-18に対する中和抗体を投与してもNC/Ngaにおけるアトピー性皮膚炎の発症は阻止できないことを明らかにした。

6) ヘルパーT細胞の分化やサイトカイン産生を制御する機能性食品の同定およびその成分の解明とそれによるアレルギー疾患発症予防と治療の可能性の解析

柿の葉のエキスおよびそこに含まれるフラビノイドであるアストラガリンは好塩基球からのヒスタミン遊離を抑制し、アトピー性皮膚炎モデルマウスであるNC/Ngaマウスに皮膚炎発症前から投与するとアトピー性皮膚炎の発症を抑制することを明らかにした。また、フラビノイドのあるものは好塩基球のTh2サイトカイン(IL-4、IL-5、IL-13)分泌を抑制する作用を有することを明らかにした。さらに、アブラナ科を中心とする緑色野菜の摂取により、n3系列の不飽和脂肪酸が上昇することを明らかにした。これらの結果は

機能性食品の意義を明らかにするとともに、これらの食品やその成分によりアレルギー疾患になりやすい遺伝的素因を変化させうる可能性を示した。

7) 気管支ぜん息の発症やその病態におけるチオレドキシシンおよびCD23の作用に関する解析

生体内の酸化還元制御蛋白であるチオレドキシシンは、p38 MAP kinaseの活性化を抑制し、気道上皮細胞の活性化やサイトカイン産生を抑制すること、気管支ぜん息発作時には血清チオレドキシシン値が上昇すること、循環血液中のチオレドキシシン濃度を上昇させることにより白血球の血管外漏出を抑制することを明らかにし、チオレドキシシンは気管支ぜん息で見られるアレルギー性炎症を抑制する可能性を示した。

IgEの低親和性受容器であるCD23 (FcεRII)には細胞膜上に発現されず血清中に放出される分子量約40kdの細胞膜欠失型アイソフォームが存在することを明らかにし、また、CD23のレセプターであるCD21の発現が還元作用を持つ物質により低下することを明らかにして、CD23の発現・放出制御機構およびCD21の発現制御機構が気管支ぜん息の病態に関与する可能性を示した。

8) 小児の気道過敏性測定を可能にするためのアストグラフの開発と改良

小児気管支ぜん息における気道過敏性の役割を明らかにするためには、小児の標準的な気道過敏性測定装置の開発が必要である。気道過敏性測定装置アストグラフに小児でも使用できるよう改良を加え、内径10mm以上のマウスピースが適切であることを明らかにすると共に、息漏れ、唾飲み込みなどによる測定上のアーチファクトを取り除くためにアルゴリズムを加えて解析する方法を明らかにした。その結果、小児の呼吸機能の測定がこれまで以上に正確かつ安全に行えるようになった。

5. 考察

アトピー性皮膚炎を有する乳児は幼児期にいたって高率に気管支ぜん息を発症するが、今回の調査研究により、その標準的な統計データと危険因子およびその経年推移が明らかに出来た。遺伝因子の関与が主に1-2歳という幼児期早期に見られるのは興味深い結果であった。また、ダニ特異的IgE抗体が産生されるようになると気管支ぜん息が発症しやすくなることもあらかじめ予想されたことではあったが、年少児ほどダニ特異IgE抗体の産生が気管支ぜん息の発症に結びつきやすいという結果は、気管支ぜん息の発症を予防するためのダニ除去指導をアトピー性皮膚炎発症早期から行うことが重要であることを示すものであった。

気管支ぜん息などのアレルギー疾患の発症や病態形成に関与すると考えられる多くの遺伝子(14遺伝子18領域)の多型性の日本人集団における妥当性を検討した結果、これまでに報告された遺伝子は、いずれも単独では、気管支ぜん息の発症を予測するマーカーとしてはその精度が不十分であることが判明した。気管支ぜん息のように、その発症や病態形成に多数の因子が関与していると考えられる疾患では、その原因遺伝子の解析も様々なパラメーターごとに区別して行うことが必要であることが示されると同時に、いくつかの候補遺伝子を組み合わせることにより、より正確な気管支ぜん息発症予測が可能となることが示唆された。

さらに、気管支ぜん息を予知する臍帯血マーカーとして、好中球活性化酸素産生能、HLA class IIの多型性、ミルクアレルギーにおけるHLA class II多型とT細胞抗原レセプターの相関、ヘルパーT細胞の機能的分化機構とインターフェロン、IL-4、IL-6、IL-7、IL-12、IL-18の役割、気道炎症におけるp38MAPKの役割とチオレドキシシンによるその制御、CD23分子サブタイプの特異的識別法の開発、機能食品とその成

分によるアレルギー疾患を起こしやすい体質の改変の可能性、気道過敏性測定装置を小児へ適応するための改良などの各研究項目においても、順調な研究の進展が得られた。

6．今後の課題

本研究班はこれまでの調査研究を通して、気管支ぜん息の発症を早期に予知することにより気管支ぜん息の発症を予防することを目的として、気管支ぜん息の発症予知に有用な多くの因子や病態形成に関与する因子を同定し、その検出法を示してきた。その成果から見た今後の課題として、(1)アトピー性皮膚炎を有する乳児におけるその後の気管支ぜん息の発症を予防するために、アトピー性皮膚炎発症早期からのダニ除去を中心とした環境整備が必要であることが示唆されたが、環境整備の指導法とそれにより実際にどれだけ気管支ぜん息の発症が予防できるかを解明すること、(2)気管支ぜん息の発症に関与する遺伝子多型の更なる解明による予測精度の向上をはかること、(3)気管支ぜん息の発症や病態形成に関わる細胞、分子、遺伝子とその機序を解明し、その知見を気管支ぜん息の治療や発症予防へとつなげることがあげられる。

7．社会的貢献

小児の気管支ぜん息罹病率は依然として高い水準にある。気管支ぜん息は一旦発症すると長期にわたる治療が必要な疾患であり、重症化すれば長期入院が必要となったり、時には死亡する事態も起こりうる。したがって、小児における気管支ぜん息の発症を予防して患者数を減少させることは、少子高齢化社会が進行し社会保障の見直しが迫られている現在、重要な社会的要請である。この気管支ぜん息の発症を予防するための保健指導を効率的・効果的に実施するためには、個々の対象者における気管支ぜん息を発症する危険性の強弱を同定することが重要であるが、そのためには気管支ぜん息の発症や病態形成に関与する因子とその検出法を明らかにすることが不可欠である。本研究はこれらの社会的要請に答えるべく、小児気管支ぜん息の発症と病態形成機構を明らかにすることを通して、小児気管支ぜん息の発症に関わる因子の同定とその測定法の開発を目指すものである。これまでの研究成果により、気管支ぜん息の発症を予測しうるマーカーやその検出法の開発、気管支ぜん息の発症や病態形成に関わる細胞、蛋白、遺伝子の同定とその作用機序の解明に具体的成果が得られた。今後、小児気管支ぜん息の発症を予測する手法に更なる改良を加えて予測精度を向上させ、それに基づいて同定された気管支ぜん息発症の危険性の高い小児に対して気管支ぜん息発症予防のための適切な治療や保健指導を行うことにより、気管支ぜん息の発症を予防して気管支ぜん息患者数を減少させることが可能となると期待され、その社会的貢献は大である。

8．3年間のまとめ

(1)3年間の調査研究により、アトピー性皮膚炎乳児はその後の4年間に36%が気管支ぜん息を発症し、発症に関与する遺伝因子として、気管支ぜん息の家族歴を有すること、男性であること、ダニアレルギーに対する高感受性があげられた。気管支ぜん息の発症を予防するためにダニ対策を主体とした環境整備の指導を行う場合は、アトピー性皮膚炎発症早期から行う必要があることが明らかとなった。

(2)気管支喘息の発症を規定する遺伝子の解析は、これまでに候補遺伝子として報告された遺伝子を含む14遺伝子の18領域について、その解析系を開発して検討した。FcεR1β鎖遺伝子のGlu237Glyの多型、IL-4R遺伝子のVal50Ileの多型、PAF acetylhydrolase遺伝子の多型など、気管支ぜん息の発症や重症化に関係する遺伝子を同定したが、それぞれ単独での予測の精度は必ずしも十分とは言えなかった。今後、

β 2ADR 遺伝子の Arg16Gly 多型を含め、これらの遺伝子多型の組み合わせにより、より精度の高い予測が可能かどうかを明らかにすることが必要である。また、Fc ϵ RI β 鎖遺伝子の ITAM のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換すると Fc ϵ RI を介するマスト細胞の活性化の程度が半減することを明らかにし、マスト細胞の活性化に Fc ϵ RI β 鎖遺伝子多型が関与していることを明らかにした。また、IL-12 受容体 β 2 鎖遺伝子の異常 (2496del191) により IL-12 刺激が伝わらず、ガンマインターフェロンの産生が障害されることを明らかにし、IL-12 レセプター β 2 鎖遺伝子の異常によりヘルパー T 細胞の Th1、Th2 への分化が Th2 優位に偏移して、I 型アレルギー疾患が発症する可能性を示した。

(3) 気管支ぜん息の発症における HLA の関与とその機序の解析により、抗原提示細胞と T 細胞は HLA class II 分子/抗原/T 細胞レセプターの相互作用を介してお互いにシグナルを伝え合い、HLA class II 分子はヘルパー T 細胞の Th1 細胞、Th2 細胞への分化に影響を与えることを明らかにした。さらに、T 細胞に抗原提示を行う際に抗原提示細胞が HLA class II 分子の DR を用いる場合には炎症性サイトカインが、DQ や DP を用いる場合には抗炎症性サイトカインをより強く誘導するため、HLA-DQ/DP 拘束性の T 細胞は DR 拘束性の T 細胞に較べて Th2 有意なサイトカイン産生パターンを示すことを明らかにして、HLA class II の多型性が気管支ぜん息の発症に関与することを示唆した。

(4) ナイーブヘルパー T 細胞の Th1 細胞、Th2 細胞への分化に IL-7 が重要な役割を果たしていることを示唆した。また、アトピー性皮膚炎患者末梢血単核球に PGE2 と IL-6 の産生亢進が認められること、PGE2 は Th2 細胞の分化を誘導し、一方、IL-6 は IL-4 による Th2 細胞分化を抑制するサイトカインであることを明らかにし、アレルギー患者においてヘルパー T 細胞の機能的分化の調節が行われている可能性を示した。さらに、血清 IL-18 濃度の測定系を確立して、アトピー性皮膚炎の病態形成における IL-18 の重要性を示唆した。

(5) 気管支ぜん息の発症を予測する臍帯血マーカーとしての臍帯血好中球活性酸素産生能の意義の検討では、傾向は見られたものの、ぜん息発症予測臍帯血マーカーとしての精度は不十分であった。気管支ぜん息発症のきっかけとなることが知られる RS ウイルス感染について、RS ウイルスは好酸球の細胞接着能の亢進を介して PAF による活性酸素産生能を亢進させることを明らかにした。

(6) 柿の葉のエキスは好塩基球からのヒスタミン遊離や Th2 サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13) 分泌を抑制することを介して、マウスモデルにおけるアトピー性皮膚炎の発症を抑制することを示し、この成分がフラビノイドであることを明らかにした。アブラナ科を中心とする緑色野菜は n3 系列の不飽和脂肪酸を上昇させ、アレルギー疾患の発症を予防する可能性を示唆した。

(7) 生体内の酸化還元制御蛋白であるチオレドキシンは p38 MAP kinase の活性化を抑制すること、気道上皮細胞の活性化やサイトカイン産生を抑制すること、気管支ぜん息発作時には血清チオレドキシン値が上昇すること、循環血液中のチオレドキシン濃度を上昇させることにより白血球の血管外漏出を抑制することを明らかにし、チオレドキシンは気管支ぜん息で見られるアレルギー性炎症を抑制する可能性を示した。また、IgE の低親和性受容器である CD23 (Fc ϵ RII) には細胞膜上に発現されず血清中に放出される分子量約 40kd の細胞膜欠失型アイソフォームが存在すること、CD23 のレセプターである CD21 の発現が還元作用を持つ物質により低下することを明らかにし、CD23 の発現・放出制御機構および CD21 の発現制御機構が気管支ぜん息の病態に関与する可能性を示した。

(8) 小児の標準的な気道過敏性測定装置の開発・改良を目的として、気道過敏性測定装置アストグラフを小児でも使用できるように改良し、内径 10mm 以上のマウスピースが適切であることを明らかにすると共に、息漏れ、唾飲み込みなどによる測定上のアーチファクトを取り除くためにアルゴリズムを加えて解析する方法を開発して、小児の呼吸機能の測定がこれまで以上に正確かつ安全に行えるアストグラフを開発した。

I-3-2 気管支ぜん息の発症に関するコホート調査と保存血清サンプルの有効利用に関する研究

1. 研究従事者

- 森永 謙二 (大阪府立成人病センター調査部)
- 佐藤 真一 (大阪府立成人病センター集団検診第1部)
- 吉田 政弘 (大阪府立公衆衛生研究所公衆衛生部医動物室)
- 高垣 裕 (大阪府立公衆衛生研究所公衆衛生部)
- 藤村 正哲 (大阪府立母子保健総合医療センター病院)
- 加納 栄三 (大阪府藤井寺保健所)
- 豊島 協一郎 (大阪府立羽曳野病院アレルギー小児科)

2. 平成 11 年度の研究目的

本研究は、出生時に家庭環境を中心にアンケート調査を実施し、6歳までフォローアップすることにより、ぜん息発症の危険因子を明らかにするとともに、母親及び臍帯血、3歳及び6歳児健診時に採取した血清を用いて、予知・予測のための検査手法の集団への応用による妥当性を評価することを目的とする。

具体的には今年度は以下の目的を掲げて、研究を行った。

- 1) 子供の食生活が喘息発症に及ぼす影響を、6歳児及び3歳児の血清脂肪酸組成を測定することにより明らかにする。
- 2) 保存されている3歳児血清のIL-4及びIL-18を測定し、アレルギー疾患(アトピー性皮膚炎)の予知マーカーとして有意かどうかを検討する。
- 3) レクチンは糖鎖に結合する構造を内部に持つ蛋白質で、免疫学的産物や酵素ではない蛋白質の総称であるが、血清中に存在するマンナン結合蛋白(MBP)、肺のサーファクタントや羊水中に存在するサーファクタントA,D(SP-D,A)などが見つかっている。ヒト肺のサーファクタントA,D(BALF)が特異的IgE抗原とダニ抽出物との結合を阻止する働きがあるとする報告があることから、血清中に存在するコレクチンであるマンナン結合蛋白(MBP)を測定し、喘息発症抑制因子の可能性を検討する。
- 4) 喘息児の居住歴の異動(出産時と6歳時)を調べ、地域別の異動率の差異を検討する。

3. 平成 11 年度の研究の対象及び方法

- 1) 大阪府下3病院(大阪府立母子総合保健医療センター、市立堺病院、愛染橋病院)で出産した2,279人の新生児についてアンケートを実施した。6歳の時点で呼吸器症状(咳、痰、喘鳴)やアレルギー疾患の発生・有症状等についてアンケートを実施し、1,643人から回答が得られた(回収率72.1%)。なお、3歳時点では1,007人については血清総IgE及びコナヒョウヒダニ特異的IgE(RAST)を調べている。また、6歳時にも同じ検査項目を727人について調べ、これらの検査で調べた残存血清は-70~80で凍結保存している。
- 2) 6歳時点での喘息児68人と対照児(6歳までに喘息及びアトピー性皮膚炎の症状のなかった児)136人の血清脂肪酸組成を調べた。測定した脂肪酸は、ラウリン酸(C12:0)、ミリスチン酸(C14:0)、ミリストレイン酸(C14:1 5)、パルミチン酸(C16:0)、パルミトレイン酸(C16:1 7)、ステアリン酸(C18:0)、オレイン酸(C18:1 9)、リノール酸(C18:2 6)、 ω -リノレン酸(C18:3 6)、リノレン酸(C18:3 3)、アラキジン酸(C20:0)、エイコセン酸(C20:1 9)、エイコサジエン酸(C20:2 6)、5-8-11エイコサトリ

エン酸(C20:3 9)、ジホモ - - リノレン酸(C20:3 6)、アラキドン酸(C20:4 6)、エイコサペンタエン酸(C20:5 3)、ベヘニン酸(C20:0)、エルシン酸(C22:1 9)、ドコサテトラエン酸(C22:4 6)、ドコサペンタエン酸(C22:5 3)、リグノセリン酸(C24:0)、ドコサヘキサエン酸(C22:6 3)、ネルボン酸(C24:1 9)の 24 種類である。対照児は喘息児 1 例につき、性をマッチさせ、同一病院でその喘息児の生年月日の最も近い前後各 1 例を選んだ。

喘息群と非喘息群のこれらの血清脂肪酸組成の差を、コナヒョウヒダニ特異的 IgE 抗体(RAST)の陰性・陽性別に比較、検討した。また、喘息群と非喘息群で、n-6 系多価不飽和脂肪酸であるリノール酸(C18:2)、アラキドン酸(C20:4)、及び n-3 系多価不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸(C20:5)、ドコサヘキサエン酸(C22:6)との相関を調べた。

さらに、3 歳及び 6 歳時点でともに喘息症状のある児 25 人と対照児(3 歳及び 6 歳時点でともに喘息及びアトピー性皮膚炎の症状のなかった児)50 人についての 3 歳時血清脂肪酸組成も調べた。対照児の選び方は 1)と同じである。

上記の喘息群と対照群の各血清脂肪酸組成の平均値の有意差検定は、parametric の t 検定及び一部については non-parametric の Wilcoxon 検定及び Median 検定を行った。

3) 3 歳児血清の IL-4 及び IL-18 を 6 歳及び 3 歳時点でアトピー性皮膚炎症状のある児 43 人、3 歳時点ではアトピー性皮膚炎の症状はなかったが 6 歳時点でその症状がある児 26 人、3 歳も 6 歳もともに症状がなかった児 26 人の 3 群について ELISA 法を用いて測定した。

平均値の有意差検定は 2)と同様である。カットオフ値を $M + 1SD$ で分けた群の有意差も χ^2 検定を行った。

4) 6 歳児の血清中に存在するコレクチンであるマンナン結合蛋白(MBP)を、6 歳児で喘息症状があり、かつコナヒョウヒダニ特異的 IgE 抗体(RAST)が 5 以上の強陽性者 34 人、並びに 6 歳時点及び過去にも喘息症状もなく、かつコナヒョウヒダニ特異的 IgE 抗体(RAST)が 5 以上の強陽性者 52 人について、ELISA 法を用いて測定した。

5) 6 歳時点で喘息症状のあった 122 人、及びその対照(対照児は喘息児 1 例につき、性をあわせ、同一病院でその喘息児の生年月日の最も近い前後各 1 例) 244 人の妊娠中アンケートに記載されていた住所と 6 歳時アンケートに記載されていた住所を調べ、居住歴の異動率を調べた。

4. 平成 11 年度の研究結果

1) 血清脂肪酸組成の検討

6 歳児では、喘息症状群の方が多価不飽和脂肪酸(PUFA)の 5-8-11 エイコサトリエン酸(C20:3, n-9)が有意に低く(t 検定、 $p < 0.05$)、アラキドン酸(C20:4)も有意(t 検定、 $p < 0.05$ 及び Wilcoxon 検定、 $p = 0.016$)に低かった。またドコサヘキサエン酸(C22:6)も有意(t 検定、 $p < 0.05$ 、Wilcoxon 検定、 $p = 0.001$ 、Median 検定、 $p = 0.001$)に低かった。n-3 系脂肪酸合計でも、喘息群で有意(t 検定、 $p < 0.05$ 、Wilcoxon 検定、 $p = 0.008$ 、Median 検定、 $p = 0.038$)に低かった。n-6/n-3 は喘息群で有意(Wilcoxon 検定、 $p = 0.011$ 、Median 検定、 $p = 0.018$)に高かった。

両群のうちコナヒョウヒダニ特異的 IgE 抗体(RAST)が陽性の者についてみると、喘息群でアラキドン酸(C20:4)及びドコサテトラエン酸(C22:4)が有意(t 検定、 $p < 0.01$)に低かった。またドコサヘキサエン酸(C22:6)も有意(t 検定、 $p < 0.05$)に低かった。

6 歳の時点で喘息児の 3 歳時の血清と非喘息児の 3 歳時の血清を調べた結果では、飽和脂肪酸のなか

のパルミチン酸(C16:0)が喘息群で有意(t 検定, $p < 0.05$)に高く、ベヘニン酸(C22:0)、リグノセリン酸(C24:0)が有意(t 検定, $p < 0.05$)に低かった。一価不飽和脂肪酸ではパルミトレイン酸(C16:1)及びオレイン酸(C18:1)が喘息群でそれぞれ有意(t 検定, $p < 0.05$ 、t 検定, $p < 0.01$)に高かった。多価不飽和脂肪酸ではリノール酸(C18:2)、アラキドン酸(C20:4)、ドコサヘキサエン酸(C22:6)が喘息群でそれぞれ有意(t 検定, $p < 0.01$ 、Wilcoxon 検定, $p = 0.009$ 、Median 検定, $p = 0.035$ 、t 検定, $p < 0.01$ 、Wilcoxon 検定, $p = 0.004$ 、Median 検定, $p = 0.002$ 、t 検定, $p < 0.05$ 、Wilcoxon 検定, $p = 0.041$ 、Median 検定, $p = 0.035$)に低かった。n-6系脂肪酸合計でも、喘息群で有意(t 検定, $p < 0.01$ 、Wilcoxon 検定, $p = 0.004$ 、Median 検定, $p = 0.009$)に低かった。n-3系脂肪酸合計でも、喘息群で有意(Median 検定, $p = 0.035$)に低かった。(表 1)

表 1. 6 才時喘息症状別血清脂肪酸組成 (3 歳時)、2 群間の平均値の差の検定

脂肪酸組成 (%)	6 歳時	6 歳時喘息	Parametric t-検定	Non-parametric	
	喘息 (+) (n=25)	喘息/アトピー (-) (n=50)		Wilcoxon 検定	Median 検定
飽和脂肪酸(SFA)	35.86 ± 2.52	35.00 ± 1.73	$p < 0.1$	-	-
ラリジン酸(C12:0)	0.22 ± 0.22	0.25 ± 0.64		-	-
ミスチン酸(C14:0)	1.33 ± 0.58	1.23 ± 0.65		-	-
パルミチン酸(C16:0)	24.49 ± 1.46	23.80 ± 1.38	$p < 0.05$	-	-
ステアリン酸(C18:0)	8.38 ± 1.51	8.11 ± 0.71		-	-
アラキジン酸(C20:0)	0.27 ± 0.04	0.28 ± 0.04		-	-
ベヘニン酸(C22:0)	0.64 ± 0.14	0.72 ± 0.13	$p < 0.05$	-	-
リグノセリン酸(C24:0)	0.53 ± 0.12	0.61 ± 0.14	$p < 0.05$	-	-
一価不飽和脂肪酸(MUFA)	27.35 ± 3.42	24.79 ± 3.48	$p < 0.01$	-	-
パルミトレイン酸(C16:1)	2.13 ± 0.90	1.77 ± 0.60	$p < 0.05$	-	-
オレイン酸(C18:1)	23.91 ± 2.99	21.62 ± 3.22	$p < 0.01$	-	-
エイコセン酸(C20:1, n-9)	0.23 ± 0.07	0.22 ± 0.22		-	-
トコトリエン酸(C24:1, n-9)	1.00 ± 0.28	1.08 ± 0.24		-	-
多価不飽和脂肪酸(PUFA)	36.80 ± 4.59	40.21 ± 4.02	$p < 0.01$	-	-
5-8-11 イコサトリエン酸(C20:3)	0.09 ± 0.05	0.08 ± 0.03		-	-
n-6 系脂肪酸 計	32.06 ± 4.01	34.95 ± 3.56	$p < 0.01$	$p = 0.004$	$p = 0.009$
リノール酸(C18:2)	25.44 ± 3.43	27.66 ± 2.83	$p < 0.01$	$p = 0.009$	$p = 0.035$
-リルン酸(C18:3)	0.39 ± 0.20	0.35 ± 0.17		-	-
エイコザン酸(C20:2)	0.18 ± 0.03	0.17 ± 0.03		-	-
ジホモ-リルン酸(C20:3)	1.05 ± 0.24	1.04 ± 0.21		-	-
アラキドン酸(C20:4)	4.80 ± 0.99	5.55 ± 1.13	$p < 0.01$	$p = 0.004$	$p = 0.002$
ドコサトリエン酸(C22:4)	0.19 ± 0.05	0.18 ± 0.04		-	-
n-3 系脂肪酸 計	4.65 ± 1.51	5.18 ± 1.61		$p = 0.095$	$p = 0.035$
リルン酸(C18:3)	0.56 ± 0.15	0.57 ± 0.26		-	-
エイコザン酸(C20:5)	0.82 ± 0.64	0.90 ± 0.56		$p = 0.276$	$p = 0.516$
ドコサン酸(C22:5)	0.50 ± 0.16	0.50 ± 0.13		-	-
ドコサヘキサエン酸(C22:6)	2.76 ± 0.84	3.21 ± 0.95	$p < 0.05$	$p = 0.041$	$p = 0.035$
n-6/n-3 比	7.48 ± 2.14	7.37 ± 2.27		$p = 0.645$	$p = 0.194$
PUFA/SFA	1.04 ± 0.18	1.15 ± 0.15	$p < 0.01$	-	-

6 歳児と同様にコナヒョウヒダニ特異的 IgE 抗体(RAST)が陽性の者についてみると、有意($p < 0.05$)の差を示す脂肪酸組成はなかったが、陰性の者では、喘息群でオレイン酸(C18:1)、エイコセン酸(C20:1)、ド

コサテトラエン酸(C22:4)が有意(t検定, $p < 0.05$)に高かった。

2) アトピー性皮膚炎と IL-4, 18 の検討

6歳及び3歳時点でアトピー性皮膚炎症状のある児43人のIL-4は、3歳時点ではアトピー性皮膚炎の症状はなかったが6歳時点でその症状がある児26人に比べて高かった(t検定, $p < 0.1$ 、Wilcoxon検定、Median検定では有意差なし)が、IL-18は有意ではないものの低かった。しかし、3歳も6歳もともに症状がなかった児26人と比べて有意の差はIL-4, IL-18ともに見られなかった。(表2)

カットオフ値を $M+1SD$ で分けた場合、IL-18が 312.1 pg/ml 以下の占める割合は、3歳6歳ともに喘息群で95.3%、3歳(-)6歳(+)で80.8%、3歳(-)6歳(-)で80.8%で、3歳6歳ともに喘息群で多い傾向($p < 0.1$)がみられた。

表2. 3歳及び6歳時喘息症状別 IL-4, 18 の平均値($M \pm SD$)の比較

(pg/ml)	3歳(+) 6歳(+) (n=43)	3歳(-) 6歳(+) (n=26)	3歳(-) 6歳(-) (n=26)	計 (n=95)
IL-4	7.54 ± 6.53	5.04 ± 4.30	5.86 ± 4.51	6.40 ± 5.53
IL-18	207.20 ± 83.44	241.67 ± 109.49	222.12 ± 83.29	220.71 ± 91.38

3) 血清コレクチンの検討

コナヒョウヒダニ特異的 IgE 抗体(RAST)が5以上の強陽性者86人の血清中に存在するコレクチンであるマンナン結合蛋白(MBP)は、6歳児で喘息群の34人、非喘息群の52人の両群の平均値は有意の差は見られなかった。また、6歳時点でのアレルギー性鼻炎及びアトピー性皮膚炎の症状の有無別にみても有意の差はみられなかった(表3)。

表3. 6歳児でコナヒョウヒダニ IgE RAST 抗体強陽性(5,6)のアレルギー症状有無別血清コレクチン(MBP)値

(µg/ml)	喘 息		アレルギ-性鼻炎		アトピー性皮膚炎		計 (n=86)
	(+) (n=34)	(-) (n=52)	(+) (n=25)	(-) (n=61)	(+) (n=26)	(-) (n=43)	
平均値(M)	1.15	1.20	1.05	1.24	1.16	1.17	1.18
標準偏差(SD)	0.94	1.01	1.08	0.95	0.98	1.01	0.98

MBPと6歳時点のIgE値の相関は喘息群、非喘息群ともに相関はみられなかった。

カットオフ値を 0.50 µg/ml で分けてみた場合でも、6歳時点での喘息症状、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎の症状の有無で有意の差は認められなかった。

4) 出生から6歳時点までの居住地の異動率についての検討

男児では6歳時点での喘息群は77人で、うち妊娠中アンケートから29人が旧公害指定地区内に居住していた。このうち、6歳時点でのアンケートで7人が指定地区内から外へ異動していた。他方、妊娠中ア

ンケートから 48 人が旧公害指定地区外に居住していたが、6 歳時点でのアンケートで 1 人が指定地区外から内へ異動していた。6 歳時点で非喘息群の対象者 154 人について同様に調べると、地区内から外へ異動していたものは 18 人、逆に外から内に異動していたものは 3 人であった。女兒では 6 歳時点で喘息群は 45 人で、うち妊娠中アンケートから 12 人が旧公害指定地区内に居住していた。このうち、6 歳時点でのアンケートで 1 人が指定地区内から外へ異動していた。他方、妊娠中アンケートから 33 人が旧公害指定地区外に居住していたが、6 歳時点でのアンケートで 2 人が指定地区外から内へ異動していた。6 歳時点で非喘息群 90 人について同様に調べると、地区内から外へ異動していたものは 7 人、逆に外から内に異動していたものは 1 人であった。男女計でも、喘息児の旧公害指定地区内から外への異動率は 19.5%(8/41)であるのに対し、非喘息児では 36.8%(25/68)と、喘息児の異動率は有意(CI: 0.56-33.9%, $p<0.05$)に低かった。他方、喘息児の地区外からの異動率は 3.7%(3/81)に対し、非喘息児では 2.3%(4/172)で有意の差はなかった。(表 4)

表 4 喘息群(6 歳)とその対照児の異動(旧指定地区別)率の比較

異動(転居)	6 歳時喘息(+) n=122		*	6 歳時喘息(-) n=244	
	人数	割合		人数	割合
旧指定地区内 外	8/41	19.5%		25/68	36.8%
旧指定地区外 内	3/81	3.7%		4/176	2.3%

²検定で有意($p<0.05$)

5. 考察

今回の我々のコホート調査から、両親の喘息既往歴は、我々が調べた要因で最も大きなリスク要因であること(母親 IgE 値の方が母親の喘息既往歴よりもリスクは大きい)が示されたのは、種々の内外の病院ベースの調査と同様である。さらに、父親の喘息既往歴が男児の喘息発症に、母親の喘息既往歴が女児の喘息発症に大きく関与していることが示された。但し、父親の既往歴は母親からの情報であることに留意する必要がある。

母親の食生活が子供の食生活に大きな影響を及ぼしていることは当然考えられることであり、母親の妊娠前の食生活パターンと 6 歳での喘息発症の関連を調べた結果では、肉類及びインスタント食品の摂取頻度が多く、魚介類の摂取頻度が少ないほど喘息のリスクが高い傾向が得られた。

6 歳喘息児の血清脂肪酸組成を症例対照研究の手法で調べた結果では、喘息児は n-3 系脂肪酸、なかでもドコサヘキサエン酸(DHA)が有意($p<0.05$)に低かった。同様に 3 歳喘息児の血清脂肪酸組成を調べた結果でも、DHA が有意($p<0.05$)に低く、しかも n-6 系脂肪酸が喘息群で非喘息群に比べて低いものの、n-6/n-3 比は喘息群で高かった。

3 歳時のコナヒョウヒダニ特異的 IgE(RAST)が陰性の患児(6 歳)の母親の妊娠前魚介類摂取頻度が、その他の群に比べて低かったことから、3 歳以降でも魚介類摂取が喘息の発症を抑制する可能性があることを示唆するものと思われる。

このコホート調査からは、近年の欧米諸家の報告と同様、臍帯血 IgE は 6 歳での小児喘息発症の予知マーカーであることを示す結果は得られなかった。その他、比較的容易に測定できる血清マーカーで、喘息発症を予知するようなものは、これまでのところ得られていないが、それは喘息発症並びに抑制する要因

が、複数絡み合っていることを示唆していると考えられる。

6. 今後の課題

現在の知見からは、小児喘息発症の予知として使える血清マーカーは得られていない。単一ではなく、複数のマーカーの組み合わせを考えていく必要がある。

両親の喘息既往歴が小児喘息の発症要因の最大リスク要因であることは、今回のコホート調査でも明らかであるが、大気汚染との関連は十分に解析されていない。大気汚染の影響を考慮する場合、室内での暖房による影響や、家族の喫煙（受動喫煙）の影響も考慮しなければならない。またこのコホート調査では、大気汚染の曝露指標としては、居住歴が代理指標となるが、転居歴を個々にチェックした上で評価する必要がある。

喘息発症の予防の観点からは、ヒョウヒダニ抗原への曝露を避ける等の家庭環境（寝具への掃除機掛け、寝室絨毯の使用禁止、受動喫煙の排除、等）に気を配ること、魚介類を多く摂取し、インスタント食品を控えるなどの食生活スタイルに気をつけることが重要である。従って、これらの予防対策を乳幼児期から地域ベースで取り組む介入実験を行い、予防対策の効果を判定することが今後の課題である。

7. 社会的貢献

ぜん息発症要因を探索するために、約 2,300 人を対象に出生から 6 歳までフォローした疫学調査は本邦では初めてのものである。家庭でのダニ抗原曝露以外に、出生時からの聞き取り調査では、親のアレルギー疾患の既往歴以外にも、母親の食生活が重要な因子として浮かび上がってきた。これらはプロスペクティブな観察から得られたもので、レトロスペクティブな観察よりはバイアスが遙かに少ない。

基礎研究で開発される予知・予測のための検査手法は、凍結保存された血清で確認が可能である。このようにして、この疫学調査で得られた出生時及び 3 歳時の血清を用いて、予知・予測のための検査が公衆衛生の施策として有効性のあるものかどうかを将来にわたって判断することが可能である。

8. 3 年間のまとめ

大阪府下 3 病院（大阪府立母子保健総合医療センター、市立堺病院、愛染橋病院）で過去約 1 年間に出生した約 2,300 人を 6 歳までフォローし（追跡率 72%）、6 歳時点での喘息患者と母親の出生前の食生活との関連及び 6 歳児の喘息児の血清脂肪酸組成を調べた。

母親の妊娠前の食生活で、肉類の摂取頻度が多い、インスタント食品の摂取頻度が多い、魚介類の摂取頻度が少ない母親の子供は喘息に罹患するリスクが高い傾向がみられた。

母親の既往歴では、ぜん息・ぜん息様気管支炎の既往は女兒及び男女計で、喘息症状あり群（以下、喘息群と呼ぶ）では 19.5%、11.2%と喘息症状なし群（以下、非喘息群と呼ぶ）の 4.4%、3.8%に比べて有意に高かった。父親の既往歴では、ぜん息・ぜん息様気管支炎の既往も男児及び男女計で、喘息群では 12.2%、8.4%と非喘息群の 1.9%、2.2%に比べて有意に高かった。

喘息群を 3 歳時点でのコナヒョウヒダニ特異的 IgE 抗体 (RAST) の陰性・陽性別にみると、RAST 陰性の喘息群 (19 人) では RAST 陽性の喘息群 (51 人) に比べて、有意 ($p < 0.05$) に母親の妊娠前の魚介類の摂取頻度が低かった。

母親の IgE 値 (出産前)、臍帯血 IgE 値の分布を 6 歳時点での喘息症状の有無別にみた結果では、女兒の喘息群と非喘息群で母親 IgE 値の平均値 (算術) に有意の差 ($p < 0.05$) がみられたのみであり、喘息群で臍帯血 IgE 値が高い傾向は見られなかった。

喘息児 1 例に対し対照 4 例(同じ病院で喘息児の誕生日の前後に生まれた同性の非喘息児)を選んで SAS logistic model を用いた多変量解析では、母親の妊娠前の肉類の摂取頻度のリスクは 2.02(95%CI:1.091-3.745)と有意に高かった。父親の喘息既往のリスクは男児の喘息児の場合に 3.50(95%CI:1.08-11.29)と有意に高く、母親の喘息既往のリスクは女児の喘息児の場合に 2.53(90%CI:0.96-6.66)と有意ではないものの高かった。

6 歳時点での喘息児 68 名と、同じ病院で喘息児の誕生日の前後に生まれた同性の非喘息児 136 名の血清脂肪酸組成を調べた結果、喘息群でアラキドン酸(C20:4)、ドコサヘキサエン酸 DHA(C22:6)が有意に低く、n-6/n-3 系脂肪酸比が有意に高かった。

両群のうちコナヒョウヒダニ特異的 IgE 抗体(RAST)が陽性の者についてみると、喘息群でアラキドン酸及びドコサテトラエン酸(C22:4)、DHA も有意に低かった。

3 歳及び 6 歳時点でもともに喘息症状のある児 25 人と対照児(3 歳及び 6 歳時点でもともに喘息及びアトピー性皮膚炎の症状のなかった児) 50 人についての 3 歳時血清脂肪酸組成を調べた結果では n-6 系脂肪酸、n-3 系脂肪酸ともに、喘息群で低かった。n-6 系脂肪酸では、リノール酸、アラキドン酸ともに喘息群で有意に低く、また n-3 系脂肪酸ではドコサヘキサエン酸が有意に低かった。

3 歳児血清の IL-4 及び IL-18 を 6 歳及び 3 歳時点でアトピー性皮膚炎症状のある児 43 人、3 歳時点ではアトピー性皮膚炎の症状はなかったが 6 歳時点でその症状がある児 26 人、3 歳も 6 歳もともに症状がなかった児 26 人の 3 群について ELISA 法を用いて測定した結果では、各群で有意の差は得られなかった。

6 歳児の血清中に存在するコレクチンであるマンナン結合蛋白(MBP)を、6 歳児で喘息症状があり、かつコナヒョウヒダニ特異的 IgE 抗体(RAST)が 5 以上の強陽性者 34 人、並びに 6 歳時点及び過去にも喘息症状のなく、かつコナヒョウヒダニ特異的 IgE 抗体(RAST)が 5 以上の強陽性者 52 人について、ELISA 法を用いて測定した結果、各群で有意の差は得られなかった。

6 歳時点での喘息群 122 人、及びその対照(対照児は喘息児 1 例につき、性をあわせ、同一病院でその喘息児の生年月日の最も近い前後各 1 例) 244 人の妊娠中アンケートに記載されていた住所と 6 歳時アンケートに記載されていた住所を調べ、居住歴の異動率を調べた結果、男女計で、喘息児の旧公害指定地区内から外への異動率は 19.5%(8/41)であるのに対し、非喘息児では 36.8%(25/68)と、喘息児の異動率は有意に低かった。他方、喘息児の地区外からの異動率は 3.7%(3/81)に対し、非喘息児では 2.3%(4/172)で有意の差はなかった。