

〔原 著〕

小児アレルギー疾患の遺伝的背景に関する研究

第2編 Affected Sib Pair Method による家系調査

東京慈恵会医科大学小児科学教室

赤澤 晃

東邦大学医学部第二小児科学教室

小屋二六

国立小児医療研究センターアレルギー免疫研究部

飯倉洋治

小児気管支喘息およびDF特異IgE抗体陽性患者の疾患感受性遺伝子とHLA haplotypeとの連鎖を検定し、その遺伝様式を推定するためアレルギー疾患を有する患児の26家系について家系分析を行った。その結果、罹患同胞対法で小児喘息家系では $\chi^2=4.9$ (有意差なし)、DF特異IgE抗体陽性患者では $\chi^2=6.2$ ($p<0.05$) で後者においてHLA haplotypeとの連鎖が証明された。さらにDF特異IgE抗体陽性患者の遺伝様式について検討したが、常染色体優性あるいは劣性のどちらともとれる結果であった。

Key words: allergic disease — asthma — HLA — inheritance

はじめに

アレルギー疾患は家系内集積性が認められるため、古くからその発症に遺伝的要因が関与していることが示唆され、アトピー素因、喘息の遺伝様式について優性遺伝説、劣性遺伝説などいくつかの遺伝様式が推定されてきた。しかし、アレルギー疾患の発症には多くの遺伝的要因に加え環境因子も重要な因子であり、その遺伝様式を推定するのは困難なことである。今回我々は小児アレルギー疾患児の家系分析を行い、HLAと小児喘息およびDF特異IgE抗体産生に主遺伝子効果を示す感受性遺伝子の分離を罹患同胞対法(affected sib pair method)により検討したので報告する¹⁾。

対象と方法

患者は国立小児病院アレルギー科外来通院中の喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎あるいはアレルギー性結膜炎を有する小児26家系を対象とした。問診、診察および採血は患児、両親と同胞について行い、血液型、HLA haplotypeの決定、血清IgE抗体の測定を全員についておこなった。発端者である対象患者の年齢は2歳から16歳までで平均8.2歳であった。26家系中二卵性双生児家系を14家系含んでいる。双生児の卵性診断は遺伝形質としてABO式血液型、MNSs式血液型、Lewis式血液型、Duffy式血液型、Kidd式血液型、Kell式血液型、P式血液型、Rhesus式血液型およびHLA haplotypeを双生児と両親、その他同胞について調べることにより一つ以上血液型あるいはHLA haplotypeがあわない場合のみを二卵性と判定し、今回の対象患者とした。

アレルギー疾患の診断は次のようにおこなった。喘息は臨床症状より呼吸性喘鳴を伴う呼吸困難発作を繰り返すもの、アトピー性皮膚炎は皮疹の形態は様々であるが、掻痒を伴う湿潤性あるいは乾燥性の苔癬化局面を有するものとした。アレルギー性鼻炎は、くしゃみ、水様性鼻汁、鼻閉を主徴とし、下鼻甲介粘膜の蒼白化と浮腫、腫脹のあるものとした。アレルギー

Received: October 29, 1990

Accepted: February 18, 1991

Abbreviations: DF *Dermatophagoides farinae*; DP *Dermatophagoides pteronyssinus*; HLA human leukocyte antigen; RAST radioallergen sorbent test

性結膜炎は掻痒感と流涙を繰り返すものとした。

HLA のタイピングには10ml のヘパリン加静脈血に同量の phosphate buffered saline (PBS) を加え2倍希釈し、比重1017の Percoll に重層して比重遠心分離法でリンパ球を採取した。得られたリンパ球をPBSにて洗浄し、5% heat inactivated fetal calf serum (HIFCS) 加 McCoy's 5a medium に浮遊し、ナイロン・カラム法により T リンパ球, B リンパ球に分離した。さらにそれぞれをモノクローナル抗体である T/B lympho-kwik, B lympho-kwik (One-Lambda 社製) を使用して T リンパ球, B リンパ球の純度を高めた。それぞれ細胞数が $1.5 \sim 2 \times 10^6$ /個/ml になるように調整し、microcytotoxicity assay により HLA タイピングを行った。

HLA クラス I 抗血清は, Terasaki HLA-ABC Oriental tray Lot #4, #5, Oriental (72) well tray Lot #2, #4, #6, #6A を使用し, A 座抗原 9 種, B 座抗原 18 種, C 座抗原 4 種について測定した。HLA クラス II 抗原は, Terasaki HLA-DRW tray Lot #22, #23, #24, #27, #28 を使用し, DR 抗原 9 種, DQW 抗原 2 種, DRW 抗原 2 種についてそれぞれ duplicate または triplicate で測定した。

血清 IgE 抗体の測定は採血後冷却血清分離を行い、測定まで -40°C で保存した。血清総 IgE 抗体は RIST 法で測定し、D.F., D.P. 抗原特異 IgE 抗体は RAST 法にて測定した。

罹患同胞対法は疾患発症に遺伝要因と環境要因が複雑に絡み合った多因子疾患の主遺伝子効果を示す疾患感受性遺伝子の分離を行う方法である¹⁾⁻³⁾。つまりヘテロ接合対である両親 (a, b) × (c, d) の子供の遺伝子型は (a, c), (a, d), (b, c), (b, d) のいずれかであり、患者 2 名の遺伝子型の組み合わせは 16 通りになり、このうち同一遺伝子型を 2 個共有する組み合わせは 4 通り、1 個共有する組み合わせは 8 通り、まったく共有しない組み合わせが 4 通りとなる。主遺伝子と標識遺伝子との間に連鎖がなければ罹患同胞が標識遺伝子を 2 個共有する場合、1 個共有する場合、まったく共有しない場合の割合は 1 : 2 : 1 となるが、主遺伝子の標識遺伝子が密に連鎖しているならば、疾患感受性遺伝子の頻度、および遺伝形式に依存してこの割合に偏りが生ずる。罹患同胞が 3 名以上いる場合は乱数表を用いて無作為に 1 組の罹患同胞を選び出し、仮説の検定は χ^2 検定を行う。 χ^2 値は次の式で求めた。

$$\chi^2 = \frac{(n_2 - n/4)^2}{n/4} + \frac{(n_1 - n/2)^2}{n/2} + \frac{(n_0 - n/4)^2}{n/4}$$

n_2 : 同一遺伝子型を 2 個共有する組数

n_1 : 同一遺伝子型を 1 個共有する組数

n_0 : 同一遺伝子型を全く共有しない組数

$n = n_2 + n_1 + n_0$

χ^2 が 5.99 以上なら 5% 水準で、9.21 以上となら 1% 水準で有意となる。

結 果

1) 疾患感受性遺伝子と HLA haplotype との連鎖の検討

対象とした 26 家系の家系図と HLA haplotype を父親が ab, 母親が cd として Fig. 1 に示した。黒丸と黒四角は喘息患者を示し、Fig. 2 では DF-specific IgE 抗体の陽性 (RAST Score 2 以上) のものを示している。喘息家系では 15 組の罹患同胞対のうち 2 個の HLA haplotype を共有する同胞対が 7 組、1 個の HLA haplotype を共有する同胞対が 7 組、全く HLA haplotype を共有しない同胞対が 1 組であり、期待値からの偏りは $\chi^2 = 4.9$ で有意ではなかった (Table 1)。次いで、DF-specific IgE 抗体の陽性の家系では 13 組の罹患同胞対のうち 2 個の HLA haplotype を共有する同胞対が 7 組、1 個の HLA haplotype を共有する同胞対が 5 組、全く HLA haplotype を共有しない同胞対が 1 組であり、期待値からの偏りは $\chi^2 = 6.2$ となり、5% の有意差をもって HLA と DF 特異 IgE 抗体の遺伝子が密に連鎖していることが明らかとなった (Table 1)。

アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎罹患同胞対については、罹患同胞対数が少ないため罹患同胞対法による検定は行えなかった。

2) 遺伝子様式の推定

HLA と連鎖が明らかとなった DF 特異 IgE 抗体の遺伝子様式を推定するため、HLA haplotype を 2 個、1 個、0 個共有する期待値 X, Y, Z を DF 特異 IgE 抗体の遺伝子の頻度 (p) 別に求め、観測値との偏りを計算した。それぞれの期待値は次の式で求めた。劣性遺伝モデルでは、 $X = N/(1+p)^2$, $Y = 2Np/(1+p)^2$, $Z = Np^2/(1+p)^2$ となり優性遺伝モデルでは、 $X = N(2-p)/D$, $Y = 2N(1+p(1-p))/D$, $Z = Np(2-p)/D$ で与えられる。ただし N は罹患同胞対数、 $D = 4(1+p(1-$

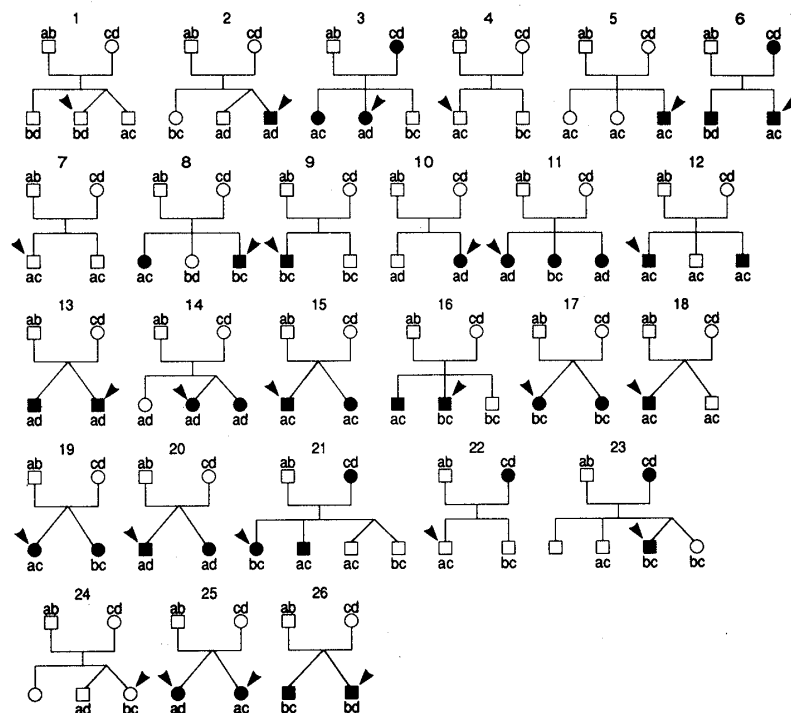


Fig. 1. Twenty-six nuclear families with bronchial asthma.
Dark : with bronchial asthma. Vacant : without bronchial asthma.

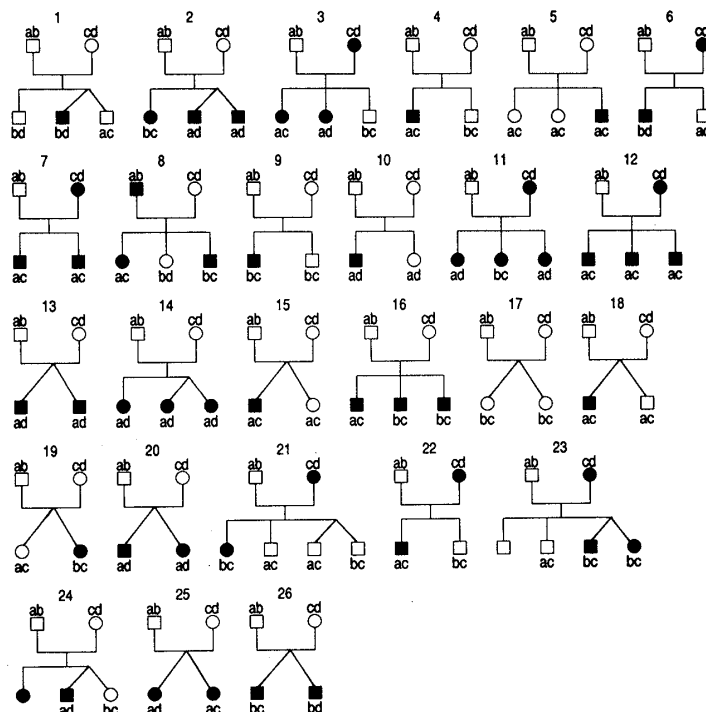


Fig. 2. Twenty-six nuclear families with specific IgE to *Dermatophagoides farinae*.
Dark : DF-specific IgE RAST score is over 2. Vacant : DF-specific IgE RAST score is zero.

Table 1 Tests of genetic hypothesis on asthma and on IgE antibody production to DF based on HLA haplotype

Two affected sibs shared haplotypes	Asthma		DF positive	
	Observed	Random expected	Observed	Random expected
Two	7	3.75	7	3.25
One	7	7.5	5	6.5
None	1	3.75	1	3.25
Total	15	15	13	13
χ^2		4.9		6.2*

*: $p < 0.05$.

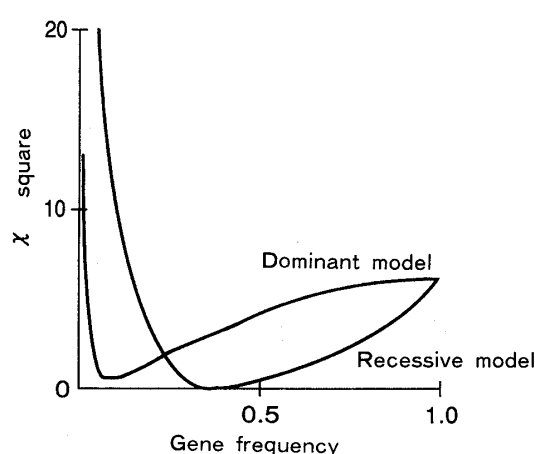


Fig. 3. Inference of mode of inheritance and gene frequency for D.F. specific IgE antibody by affected sib pair method.

$p)) + p(1-p)^2$ である。DF 特異 IgE 抗体の遺伝子の頻度 (p) を 0 から 1 まで変化させた場合の観測値と期待値 X, Y, Z の偏りを χ^2 値でみると Fig. 3 に示すようになった。適当な遺伝子頻度を想定しても劣性遺伝モデル、優性遺伝モデルのどちらも χ^2 値は低く劣性遺伝仮説、優性遺伝仮説ともに棄却できなかった。

考 案

ヒトの MHC である HLA は第 6 染色体短腕に位置し、その多型性から genetic marker としても重要であり、強直性脊椎炎と HLA B27 抗原との連鎖に代表されるように多くの疾患でその連鎖が検討されてきた。アレルギー疾患に関しても数多くの population study が行われてきたが特定の HLA 抗原との有意な連鎖はみだされていない⁴⁾⁻¹⁵⁾。family study では同一家系

では同一 haplotype との関連が報告されているがその遺伝様式に関する報告はなかった。

今回我々はアレルギー疾患の疾患感受性遺伝子と HLA の連鎖を検定し、その遺伝様式を推定するため 26 家系の家系調査を行った。その主遺伝子効果を示す疾患感受性遺伝子の分離には罹患同胞対法を用い、小児気管支喘息例と DF 特異 IgE 抗体陽性例で HLA との連鎖を検定したところ、喘息例では HLA との有意な連鎖は認められなかった。小児喘息の発症は HLA と連鎖する単一遺伝子では説明できず、気道過敏性、アレルゲンに対する免疫応答など遺伝的要因と考えられる多くの因子があり、そこに環境要因が複雑に関わっているため、その主たる疾患感受性遺伝子の分離ができなかったと考えられる。しかし非常に沢山の小児喘息を集め臨床症状で分類し、症例数をさらに増やすことによって HLA との連鎖を見出すことも可能と考えられる。

DF 特異 IgE 抗体陽性例では DF 特異 IgE 抗体産生遺伝子が HLA と有意に連鎖していることが証明されたが、その遺伝様式については劣性遺伝モデル、優性遺伝モデルのいずれも当てはまりどちらかに決定することはできなかった。特異抗原に対する免疫応答遺伝子、免疫抑制遺伝子と HLA との連鎖を検定した報告はスギ花粉抗原に対する IgE 抗体産生、溶連菌細胞壁抗原に対する T 細胞増殖反応、HBs 抗原に対する IgG 抗体産生の低応答性が単純優性遺伝するという報告がある¹⁶⁾¹⁷⁾。さらに北尾らはスギ花粉症、カモガヤ花粉症患者、ダニによるアレルギー性鼻炎患者では健常対象者に比して HLA DQw3 の出現頻度が高いことから、DQw3 座あるいはこれに非常に近接して特異抗原に対する IgE 抗体クラスの免疫応答にかかわる遺伝子が存在する可能性を示唆している¹⁸⁾。今回 DF 抗原に対する IgE 抗体産生能の遺伝様式を決定できなかった要因として、使用していた抗原には抗原性を示すいくつかの蛋白質が含まれていることもあげられる。今後は精製抗原に対する同様の解析も必要と考えられた。

稿を終るにあたり本研究の御指導、御校閲を頂いた東京慈恵会医科大学小児科学教室前川喜平教授に深謝致します。さらに本研究に御協力頂いた、慈恵医大小児科勝沼俊雄先生、海老澤元宏先生、元国立小児病院二宮分院植草忠先生に感謝致します。本研究の一部は文部省科研費 No.

61480485による.

文 献

- 1) Yasuda, N. and Sasazuki, S.: Affected sib pair method for searching major gene in multifactorial disease. *Jpn. J. Human. Genet.* 27, 295-311, 1982.
- 2) Thomson, G. and Bodmer, W.F.: The genetics of HLA and disease associations. In "Measuring Selection in Natural Populations" (ed. by F. B. Christinsen and T.M. Fenchel), Springer-Verlag, Berlin, pp.545-564, 1979.
- 3) 笹月健彦, 西村泰治, 武藤正彦, 五島 寛: HLA に関するデータの統計学的解析法. "最新免疫研究法" (山村雄一, 林 秀男 編), 医学書院, 東京, pp.279-293, 1988.
- 4) 遠藤文子: 気道, 肺疾患の免疫遺伝学的検討. 日気食会報 28, 237-247, 1977.
- 5) Wagatsuma, Y., Yakura, H., Nakayama, E. and Wakisaka, A.: Inheritance of asthma in families and its linkage to HLA haplotypes. *Acta Allergol.* 31, 455-462, 1976.
- 6) 北尾友幸, 定永恭明, 宇野正志, 温永 明, 増山敬祐, 石川 哮: 鼻アレルギー患者の遺伝的研究 第3報 スギ花粉症患者の HLA クラス I, II 抗原について. 日耳鼻 91, 509-515, 1988.
- 7) 北尾友幸, 定永恭明, 宇野正志, 温永 明, 増山敬祐, 石川 哮: 鼻アレルギー患者の遺伝的研究 第4報 カモガヤ花粉症患者の HLA クラス I, II 抗原について. 日耳鼻 91, 516-521, 1988.
- 8) Marsh, D.G., Freidhoff, L.R., Ehrlich-Kautzky, E., Bias, W.B. and Roebber, M.: Immune responsiveness to *Ambrosia artemisiifolia* (short ragweed) pollen allergen Amb a VI (Ra6) is associated with HLA-DR5 in allergic humans. *Immunogenetics* 26, 230-236, 1987.
- 9) Mendell, N.R., Amos D.B., Blumenthal, M.N., Gleich, G.J. and Yunis, E.J.: Ra3 skin test response and HLA-A2, antigen E and IgE: Evidence of interactions between antigen E and HLA. *Human Immunology* 4, 63-70, 1982.
- 10) Mullarkey, M.F., Thomas, P.S., Hansen, J.A., Webb, D.R. and Nisperos, B.: Association of aspirin-sensitive asthma with HLA-DQw2. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133, 261-263, 1986.
- 11) 平谷一人, 浅井貞宏, 広田正毅, 福島喜代康, 門田淳一, 他: 喘息家系における皮内反応, RAST, および血清総 IgE に関する遺伝学的検討. 日胸疾患誌 25, 825-834, 1987.
- 12) 塚本祐壮, 一色 玄, 赤丸敏行, 谿 忠人, 有地滋: 小児気管支喘息患者の個体差と HLA. 体質学会誌 49, 106-113, 1985.
- 13) Nakai, Y., Kano, T., Moriuchi, J., Wakisaka, A., Aizawa, M., et al.: Association between the MB system and asthma in the Japanese. *Human Immunology* 4, 265-270, 1982.
- 14) Svejgaard, E., Jakobsen, B. and Svejgaard, A.: Studies of HLA-ABC and DR antigens in pure atopic dermatitis and atopic dermatitis combined with allergic respiratory disease. *Acta Derm. Venereol. (Stockh)* 114, 72-76, 1985.
- 15) Miyamoto, Y., Yoshimura, A., Yoshioka, K., Ichinose, C., Taku, K. and Harada, Y.: Families of children with bronchial asthma. *Bull. Inst. Const. Med. Kumamoto Univ.* 30, 247-254, 1980.
- 16) Watanabe, H., Matsushita, S., Kamikawaji, N., Hirayama, K., Okumura, M. and Sasazuki, T.: Immune suppression gene on HLA-Bw54-DR4-DRw53 haplotype controls nonresponsiveness in humans to hepatitis B surface antigen via CD8+ suppressor T cells. *Human Immunology* 22, 9-17, 1988.
- 17) Matsushita S, Morimoto, C., Schlossman, S.F. and Sasazuki, T.: Monoclonal antibody 4B4 blocks suppression of the immune response to *Cryptomeria Japonica* pollen antigen. *Human Immunology* 22, 1-7, 1988.
- 18) 武藤正彦: スギ花粉症の免疫遺伝学的解析. お茶の水医学雑誌 31, 123-136, 1983.

INVESTIGATION OF THE GENETICS OF ALLERGIC CHILDREN, THE SECOND REPORT
—Family Study to Determine the Major Gene in Allergic Disease Using Affected Sib Pair Method—

Akira Akasawa

Department of Pediatrics, Jikei Medical University

Niroku Koya

Second Department of Pediatrics, Toho University

Yoji Iikura

Department of Allergy and Immunology, National Children's Medical Research Center

Twenty-six families with allergic siblings were investigated to define the mode of inheritance of asthma and DF specific IgE antibody production in children. The affected sib pair method was used to establish the linkage between disease susceptibility genes and HLA antigens. The affected sib pair method revealed that in asthmatic families $\chi^2=4.9$ (no significance) and in DF-specific IgE positive families $\chi^2=6.2$ ($p<0.05$). This study suggests that the gene of DF-specific IgE antibody production is linked to HLA haplotypes, but the mode of inheritance of DF-specific IgE antibody production couldn't be defined.
