

食物アレルギーによるアトピー性皮膚炎の寛解と 末梢血単核球のサイトカイン産生能 — サイトカイン Messenger RNA 発現からの解析 —

千葉大学医学部小児科

富板美奈子 河野陽一 下条直樹 新美仁男

食物アレルギーの寛解の機序を明らかにするために、疾患活動期の鶏卵アレルギー患者9名、寛解期の患者8名、アレルギー歴のない健康児4名について、鶏卵の主要アレルゲンである ovalbumin (OVA) 刺激による末梢血単核球 (PBMC) の interleukin (IL)-4, IL-5, interferon (IFN)- γ の messenger RNA (mRNA) の発現を、reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法で解析した。その結果、疾患活動期の患者では、OVA 刺激により IL-5 の mRNA の発現が増強したのに対し、寛解患者・健康人では、IL-5 mRNA の発現の増強は認められなかった。IL-4 および IFN- γ の mRNA については、活動期、寛解期患者間で一定の変化は認められなかった。これらの3群において PBMC の OVA に対する芽球化反応には差が認められなかった。以上から、食物アレルギーにおける寛解の誘導は、食物アレルゲン特異的な T 細胞のクローン除去あるいはアネルギーによる可能性は低く、食物アレルゲンの刺激により誘導される PBMC のサイトカイン産生能のバランスの変化が関与することが強く示唆された。

Key words: cytokine — food allergy — mRNA — outgrow — RT-PCR

はじめに

吸入アレルゲンによる気管支喘息やアトピー性皮膚炎の病態には、IL-4やIL-5といったTh2タイプサイトカインの働きが重要であることが明らかにされている¹⁾²⁾。近年、食物アレルギーにおいても、ピーナツ、鶏卵、ミルクに対するアレルギーの患者PBMCより樹立した食物アレルゲン特異的T細胞株が、主としてTh2タイプのサイトカインを産生することが示されている^{3)~5)}。すなわち、食物アレルギーの患者においては、食物アレルゲンにより誘導されるサイトカインのThタイプには不均衡が認められる。一方、アレルギー

疾患には寛解という現象が知られており、特に乳幼児の食物アレルギーは一般に加齢に伴い寛解することが多い。アレルギー疾患の発症におけるサイトカインの重要性を考えると、寛解にはこのサイトカイン産生能の不均衡が是正されているのではないかと推測されるが、食物アレルギーの寛解の機序をサイトカイン産生能から解析した報告は認められない。

従来の食物アレルゲンに誘導されるサイトカイン産生能の解析は、樹立したT細胞株による解析が主であったが、T細胞株は限られた細胞の機能をみている可能性があり、また細胞株を樹立した条件による機能の偏倚の可能性も完全には否定できない。*in vivo*の細胞の状態を把握するには、細胞株よりも末梢血細胞を用いて解析することが望ましいと考えられる。しかしながら、末梢血において食物アレルゲンに特異的に反応する細胞の数は少なく産生されるサイトカインが微量であるために、食物アレルゲン刺激によって産生されるサイトカインを検出することは容易ではない。実際、Dorionら⁶⁾はピーナツアレルギー患者のPBMCをピーナツの主要アレルゲンである *Ara h II* で刺激したとき、IL-4のmRNAはRT-PCR法により検出することが可能であったが、培養上清中のIL-4を

Received: July 15, 1997

Accepted: February 23, 1998

Abbreviations: cDNA complementary DNA; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay; G3 PDH glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IFN interferon; IL interleukin; mRNA messenger RNA; OVA ovalbumin; OVM ovomucoid; PBMC peripheral blood mononuclear cells; RAST radioallergosorbent test; RT-PCR reverse transcription polymerase chain reaction; S.I. stimulation index

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法では検出することはできなかったと報告している。そこで我々は、疾患活動期と寛解期の患者における食物アレルギー刺激による PBMC からの IL-4, IL-5, IFN- γ 産生能を, RT-PCR 法を用いて mRNA レベルで比較解析した。

対象と方法

1) 対象

対象は、経口負荷試験で症状の増悪が確認された活動期の鶏卵アレルギーによるアトピー性皮膚炎患者 (A 群) 9 例, 以前は経口負荷により症状が増悪したが、現在は経口負荷を行っても症状の増悪が認められない寛解期の鶏卵アレルギーによるアトピー性皮膚炎患者 (O 群) 8 例, 健康幼児 (H 群) 4 例である。健康幼児は、問診および診察において、本人及び2親等内の家族にアレルギー歴のないものとした。これらの対象者について、年齢と卵白に対する radioallergen sorbent test (RAST) 値を表 1 に示した。

アトピー性皮膚炎の診断は、日本皮膚科学会「アトピー性皮膚炎の定義・診断基準に関するワーキンググループ」による「アトピー性皮膚炎の定義・診断基準案」によった。

卵白の経口負荷試験は、卵白の凍結乾燥粉末とプラセボ (太陽化学株式会社より供与) を用い、single blind 法で行った。

2) OVA の精製

OVA は Sigma 社の grade VII を、Bernhisel-Broadbent ら⁷⁾の方法に準じ、high-performance liquid chromatography にて再精製した後、実験に用いた⁸⁾。精製した OVA 標品は、OVA 特異的およびオボムコイド (ovomucoid; OVM) 特異的モノクローナル抗体 (ダイナボット社加藤博士より供与) を用いた ELISA 法で、OVM の混入が無いことを確認した。

3) PBMC の分離および培養

治療により皮疹が軽快した時期にヘパリン採血した患者の末梢血から、単核球を Ficoll-Paque による比重遠心法で分離した。得られた PBMC を、 1×10^6 /ml の濃度で 10% ヒト血清、2mM グルタミンおよび抗生物質 (ペニシリン 100U/ml, ストレプトマイシン 100 μ g/ml) を含む RPMI1640 培養液 (GIBCO BRL, New York, USA) に浮遊させた。96 ウェル培養プレート

Table 1 Subjects

	Case	Age	RAST to egg white (PRU/ml)
Active	1	2y6mo	0.9
	2	6y4mo	<0.3
	3	1y8mo	0.8
	4	2y7mo	2.9
	5	3y9mo	2.9
	6	1y3mo	3.5
	7	10mo	8.4
	8	1y7mo	13.6
	9	2y3mo	1.19
Outgrow	1	5y2mo	<0.3
	2	3y9mo	<0.3
	3	4y4mo	<0.3
	4	6y9mo	<0.3
	5	2y8mo	1.4
	6	10y8mo	1.6
	7	2y6mo	1.64
	8	6y5mo	0.54
Healthy	1	2y3mo	<0.3
	2	3y1mo	<0.3
	3	1y1mo	<0.3
	4	3y6mo	NT

NT : not tested

(Costar, Cambridge, USA) の各ウェルに 200 μ l ずつ細胞浮遊液を注入し、OVA を 50 μ g/ml の濃度になるよう添加し、37°C, 7%CO₂ 下に培養した。

4) RT-PCR 法および Southern blot 法による IL-4, IL-5, IFN- γ の mRNA の半定量

OVA 添加 18 時間後に細胞を回収し、acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 法により total RNA を抽出した⁹⁾。1 μ g の total RNA から oligo dT を primer として 42°C 15 分間、総量 20 μ l で逆転写反応を行い、complementary DNA (cDNA) を作成した。続いて総量 20 μ l の cDNA のうち 1 μ l を、各サイトカインに対する特異的 primer (表 2) を用いて PCR 法で増幅した。コントロールとして glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3 PDH) を用いた。PCR の条件はいずれも denature 94°C 1 分, annealing 60°C 1 分, extension 72°C 1 分を 1 サイクルとし、35 サイクル行った。

Table 2 PCR primers

mRNA species	5'primers	3'primers	Products size
G3PDH	5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3'	5'-CATCTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3'	983bp
IL-4	5'-CCTCTGTTCTTCCTGCTAGC-3'	5'-CCGTTTCAGGAATCGGATCA-3'	315bp
IL-5	5'-ATGAGGATGCTTCTGCATTTG-3'	5'-TGGCCGTCAATGTATTTCTTTATTAA-3'	302bp
INF- γ	5'-TCTGCATCGTTTTGGGTTCG-3'	5'-CAGCTTTTTCGAAGTCATCTC-3'	320bp

G3PDH については、PCR 産物を 1% アガロースゲルで電気泳動しエチジウムブロマイドで染色した。IL-4, IL-5, INF- γ については PCR 産物を 1.5% のアガロースゲル上で電気泳動し、ナイロンフィルター (Amersham, Buckinghamshire, England) に転写した。DNA は紫外線照射および 80°C 加熱でフィルターに固定させた。digoxigenin でラベルした internal probe で、フィルターを 42°C で一晩 hybridization した後、洗浄した。フィルター上に残った probe を、アルカリフォスファターゼ結合ヒツジ抗 digoxigenin 抗体と、enhanced chemiluminescent detection system (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) を用いて検出した。PCR 産物量は、Atto 社製 densitometer で解析した。各々のサンプルについて対応する G3PDH と各サイトカインの densitometer での測定値の比をとり、個人別に抗原刺激の有無での mRNA の増減を比較した。抗原刺激をしたときのサイトカイン/G3PDH 比の値が抗原刺激のないときのサイトカイン/G3PDH 比の値の 2 倍以上になったものを増加、1/2 倍以下を減少、その間を不変と定義した。この基準はアガロースゲル上のバンドを肉眼で観察したときの濃度差とほぼ相関していた。

5) T 細胞芽球化反応

PBMC を OVA 添加後 6 日間培養し、7 日目に 0.5 μ Ci/ウェルの ^{3} H-thymidine を添加した。続いて 8~18 時間後に液体シンチレーションカウンターで、 ^{3} H の cpm を測定した。OVA 刺激による PBMC の cpm を、OVA 無添加で培養したときの cpm に対する比 (stimulation index : S.I.) で表した。

6) 検定

有意差検定には Mann-Whitney U test を用いた。

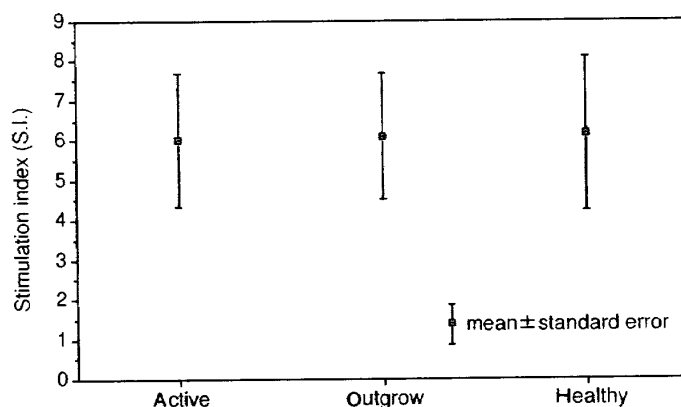


Fig. 1. Proliferative response of lymphocytes stimulated with OVA.

Stimulation index was calculated as below.

stimulation index (S.I.) =

$$\frac{\text{mean cpm in culture stimulated with antigen}}{\text{mean cpm in unstimulated culture}}$$

結 果

1) T 細胞芽球化反応

OVA 刺激に対する各群の PBMC の芽球化反応の結果を図 1 に示した。A 群の S.I. は 6.01 ± 1.67 (平均 $\pm$ 標準誤差)、O 群の S.I. は 6.09 ± 1.71 、H 群の S.I. は 6.16 ± 1.95 であった。すなわち、いずれの群においても、OVA 刺激により T 細胞の芽球化反応が認められ、その程度に統計学的に有意差は認められなかった。

2) サイトカイン mRNA の発現

図 2 に、代表例の Southern blot 法の結果を示す。また、表 3 にこれらのバンドのデンシトメーター解析の結果を示す。

各サイトカインの mRNA の OVA 刺激による変化を、増加、減少、不変のいずれかに分類し、表 4 に示した。IL-5 については、A 群では 9 例中 7 例が抗原刺激により mRNA の発現量が増加したのに対し、O 群で

は抗原刺激により mRNA の発現量が増加したものは 8 例中 1 例, H 群では 4 例中 2 例であった。A 群と O 群の間には 5 % の危険率で有意差が認められた ($p = 0.014$)。IL-4 については, A 群では抗原刺激により mRNA の発現量が増加したものは 9 例中 4 例, 不変であったものは 4 例, 減少したものは 1 例であった。O 群では抗原刺激により mRNA の発現量が増加した

ものは 8 例中 2 例, 不変であったものは 8 例中 6 例, 減少したものは認められなかった。H 群では抗原刺激により mRNA の発現量が増加したものは 4 例中 1 例, 不変であったものは 4 例中 3 例, 減少したものは認められなかった。すなわち, いずれの群においても, 抗原刺激により IL-4 の mRNA の発現は変化しない症例が多かった。IFN- γ については, A 群では抗原刺激により mRNA の発現が増加したものは 9 例中 7 例, 減少したものは 9 例中 1 例, 不変であったものは 9 例中 1 例であった。O 群では, 抗原刺激により mRNA の発現が増加したものは 8 例中 3 例, 減少したものは 8 例中 2 例, 不変であったものは 8 例中 3 例であった。H 群では抗原刺激により mRNA の発現が増加したものは 4 例中 3 例, 減少したものは認めず, 不変であったものは 4 例中 1 例であった。いずれの群間においても, 統計学的有意差は認めなかった。

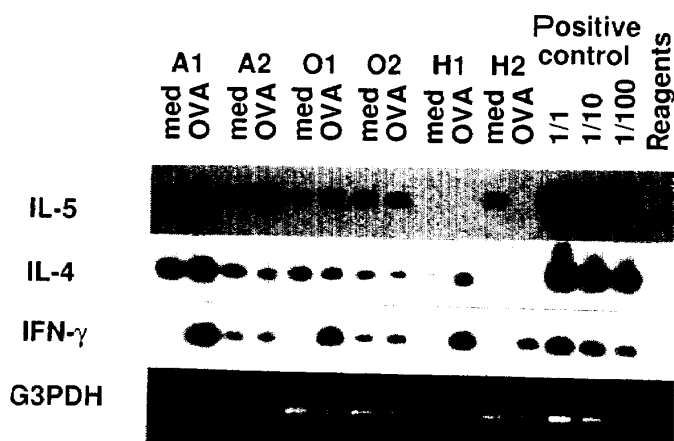


Fig. 2. IL-5, IL-4 and IFN- γ mRNA expression with or without OVA stimulation (Southern Blotting).

考 察

食物アレルギーの寛解の機序を明らかにするために, 鶏卵アレルギーによるアトピー性皮膚炎の寛解患

Table 3 Cytokine mRNA signal intensity for IL-5, IL-4 and INF- γ for OVA stimulated and unstimulated PBMC from subjects

	A 1		A 2		O 1		O 2		H 1		H 2	
	med	OVA	med	OVA	med	OVA	med	OVA	med	OVA	med	OVA
IL-5/G3PDH	0.68	2.86	0.38	1.73	0.16	0.45	0.28	0.31	ND	ND	0.26	ND
IL-4/G3PDH	1.72	3.34	0.43	0.64	0.30	0.55	0.26	0.26	0.59	1.36	0.03	0.11
IFN- γ /G3PDH	0.16	2.7	0.31	0.58	0.09	0.71	0.21	0.25	0.33	1.04	0.02	0.18

Value represent ratio(message intensity with corresponding cytokine/message intensity with G3PDH). ND: no band seen on southern blot. Number of each subject corresponds to that in Fig. 2. A: active, O: outgrow, H: healthy.

Table 4 Cytokine mRNA expression by PBMC stimulated with OVA

	Active (n = 9)			Outgrow (n = 8)			Healthy (N = 4)		
	Increase	Decrease	No change	Increase	Decrease	No change	Increase	Decrease	No change
IL-5	7*	0	2	1	2	5	2	1	1
IL-4	4	1	4	2	0	6	1	0	3
IFN- γ	7	1	1	3	2	3	3	0	1

Message intensity with each cytokine was standardized by comparing with message intensity with G3PDH in the same sample as shown in Table 3. OVA-specific induction or reduction of cytokine mRNA expression was assessed by calculating ratio of mRNA message in the sample with OVA-stimulation to that with unstimulated sample, and categorized into 3 groups based on the ratio; increase, decrease, and unchanged. *indicated numbers of subjects.

者と疾患活動性のある患者について、OVA 刺激による PBMC のサイトカイン産生能を、mRNA の発現から解析した。解析するサイトカインとして、B 細胞のクラススイッチに働き IgE 産生を促進する IL-4、好酸球の遊走因子である IL-5、IgE 産生に関して IL-4 と拮抗的に働く IFN- γ を対象とした。その結果、活動期にはアレルゲン刺激により PBMC の IL-5 の mRNA 発現は増強されるが、寛解期には増強されないことが明らかとなった。

IL-5 の疾患活動性における関与は、ダニをアレルゲンとする気管支喘息患者においても報告されている。すなわち、ダニアレルゲン刺激による末梢血単核球からの IL-5 産生が活動期の喘息患者においては亢進しており、ステロイド療法による喘息治療にともなって IL-5 産生が低下するとの報告がある¹⁰⁾。また、本研究で、IL-5 mRNA の変化が主体であった理由の一つに、対象患者が食物アレルギーによるアトピー性皮膚炎の症例であったことがあげられる。アトピー性皮膚炎患者において、アレルゲンチャレンジ後の late phase reaction を起こしている皮膚局所では、IL-5 の mRNA の発現の亢進が認められている¹¹⁾。Bonifer ら¹²⁾によれば、アトピー性皮膚炎患者の皮膚病変部および PBMC から樹立したダニ特異的 T cell clone は、concanavalin A 刺激で IL-5 を産生する。また、アトピー性皮膚炎の急性期の部位には主として IL-4 の mRNA が強く発現するが、慢性期になった部位では IL-5 の mRNA の発現が増強しているといわれる¹³⁾。このようにアトピー性皮膚炎において IL-5 が重要な役割を果たしており、食物アレルギーによるアトピー性皮膚炎の寛解には、疾患活動期に認められるアレルゲン刺激による IL-5 産生の亢進の抑制が重要な要因になっていると考えられた。

一般に食物アレルゲンに対する IgE 抗体は、寛解に伴って低下することから IL-4 の疾患活動性への関与も考えられる。しかしながら、今回の解析からは、活動期と寛解期におけるアレルゲン特異的な IL-4 の mRNA の発現量の変化が認められなかった。その理由の一つには、IL-4 の mRNA は無刺激でも多くの症例で発現しており、アレルゲン特異的な発現の変化を検出することが困難であったためと考えられる。我々の今回の実験結果と同様に、Tang ら¹⁴⁾もアトピー性皮膚炎の小児の PBMC は、無刺激でも IL-4 の mRNA を発現していることを報告している。すなわち、対象とした患者の PBMC は体内ですでに何らかの刺激を

受けて活性化していると推測される。今回対象とした食物アレルギー寛解患者の多くは、すでにダニに対する感作が成立しており、吸入したダニアレルゲンによる刺激を受けて PBMC が活性化されている可能性もある。

IL-4 は IL-5 と共に Th2 タイプの代表的なサイトカインであり、両者の発現には相関が認められることが多い¹⁵⁾¹⁶⁾。しかしながら、今回の我々の実験結果では以上のように食物アレルギーの活動性においては IL-4 よりも IL-5 の関与が強く、アレルゲン特異的な IL-4 産生誘導の寛解における役割は明らかにされなかった。

アトピー性皮膚炎患者における IFN- γ の役割は、一定の見解が得られていない。Shinbara ら¹⁷⁾は食物によるアトピー性皮膚炎の病態における IFN- γ の積極的な関与を示唆しているが、IFN- γ の産生の低下が疾患の発症に関わるという報告もある¹⁸⁾。Tang ら¹⁹⁾は、アトピー性皮膚炎患者では IFN- γ 産生が低下していると報告し、その機序は IFN- γ の細胞外への分泌の異常によるとしている。今回の解析では IFN- γ は、活動期の患者ではアレルゲン刺激により mRNA の発現は増強したが、寛解患者では一定の傾向をとらなかった。このことから、IFN- γ はアトピー性皮膚炎の発症に関与している可能性があるが、寛解の機序には関わっていないと考えられた。

これら IL-4 あるいは IL-5、IFN- γ は、T 細胞のみならず好酸球や好塩基球からも産生される。そこで、我々が PBMC を用いて測定したサイトカイン mRNA の産生細胞は T 細胞とは限定できない。しかし、抗原刺激により誘導されたサイトカインであること、また気管支喘息患者の PBMC をダニ抗原で刺激し、フローサイトメトリーにより解析すると、T 細胞の細胞質中に IL-4 や IL-5 が誘導されること（青柳ら²⁰⁾）などと併せて考えると、今回測定したサイトカイン mRNA は主に T 細胞に由来することが強く示唆される。また、A 群、O 群のいずれもアレルゲン刺激による芽球化反応がほぼ同程度に認められたことから、アレルゲン特異的な T 細胞はクローン除去やアネルギーになっている可能性は低い。そこで、寛解の状態を T 細胞機能からまとめると、寛解は食物アレルゲン特異的な T 細胞の産生するサイトカインのバランスの変化が最も重要な要因となって誘導されると考えられる。

アトピー性皮膚炎以外の消化器症状や即時型反応を呈する食物アレルギー患者における寛解の機序についても今後さらに解析を進める必要があると思われる。

が、今回の研究からは、食物アレルギーによるアトピー性皮膚炎の寛解においては、特にアレルゲン特異的なIL-5産生の低下が重要であることが示された。

本研究にあたり、ご指導とご助言を頂いた千葉大学高次機能制御研究センター生体情報分野、徳久剛史教授ならびに幡野雅彦助教授に深謝いたします。また、非アレルギー児の血液を提供していただいた小児外科学教室の大沼直躬教授、統計処理に関してご指導いただいた社会保険船橋中央病院小児科斎藤公幸先生に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Kay, A.B.: TH2-type cytokines in asthma. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 796, 1-8, 1996.
- 2) Leung, D.Y.M.: Atopic dermatitis; immunobiology and treatment with immune modulators. *Clin. Exp. Immunol.* 197, 25-30, 1997.
- 3) Katsuki, T., Shimojo, N., Honma, K., Tsunoo, H., Kohno, Y., et al.: Establishment and characterization of ovalbumin-specific T cell lines from patients with egg allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 109, 344-351, 1996.
- 4) Nakajima, H., Hachimura, S., Nishiwaki, S., Katsuki, T., Shimojo, N., et al.: Establishment and characterization of alpha sl-casein-specific T-cell lines from patients allergic to cow's milk; unexpected higher frequency of CD8⁺T-cell lines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97, 1342-1349, 1996.
- 5) Higgins, J.A., Lamb, J.R., Lake, R.A. and O'Hehir, R.E.: Polyclonal and clonal analysis of human CD4⁺ T-lymphocyte responses to nut extracts. *Immunology* 84, 91-97, 1995.
- 6) Dorion, B.J., Burks, A.W., Harbeck, R., Williams, L.W., Trumble, A., et al.: The production of interferon- γ in response to a major peanut allergy, *Ara h* II, correlates with serum levels of IgE anti-*Ara h* II. *J. Allergy Clin. Immunol.* 93, 93-99, 1994.
- 7) Bernhisel-Broadbent, J., Dintzis, H.M., Dintzis, R.Z. and Sampson, H.A.: Allergenicity and antigenicity of chicken egg ovomucoid (*Gald* III) compared with ovalbumin (*Gal d* I) in children with egg allergy and in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 93, 1047-1059, 1994.
- 8) Honma, K., Kohno, Y., Saito, K., Shimojo, N., Horiuchi, T., et al.: Allergenic epitopes of ovalbumin (OVA) in patients with hen's egg allergy; inhibition of basophil histamine release by haptenic ovalbumin peptide. *Clin. Exp. Immunol.* 103, 446-453, 1996.
- 9) Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159, 1987.
- 10) Doi, S., Gemou-Engesaeth, V., Kay, A.B. and Corrigan, C.J.: Polymerase chain reaction quantification of cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with acute exacerbations of asthma; effect of glucocorticoid therapy. *Clin. Exp. Allergy* 24, 854-867, 1994.
- 11) Vowels, B.R., Rook, A.H., Cassin, M. and Zweiman, B.: Expression of interleukin-4 and interleukin-5 mRNA in developing cutaneous late-phase reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 96, 92-96, 1995.
- 12) Bonifer, R., Neumann, C., Meuer, S., Schulze, G. and Herrmann, F.: Interleukin 5 expressing allergen-specific T-lymphocytes in patients with house dust mite sensitization; analysis at a clonal level. *J. Mol. Med.* 73, 79-83, 1995.
- 13) Hamid, Q., Boguniewicz, M. and Leung, D.Y.M.: Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J. Clin. Invest.* 94, 870-876, 1994.
- 14) Tang, M.L.K. and Kemp, A.S.: Spontaneous expression of IL-4 mRNA in lymphocytes from children with atopic dermatitis. *Clin. Exp. Immunol.* 97, 491-498, 1994.
- 15) Eigenmann, P.A., Huang, S.-K. and Sampson, H.A.: Characterization of ovomucoid-specific T-cell lines and clones from egg-allergic subjects. *Pediatr. Allergy Immunol.* 7, 12-21, 1996.
- 16) Kay, A.B., Ying, S., Varney, V., Gaga, M., Durham, S.R., et al.: Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin 3 (IL-3), IL-4, IL-5, and Granulocyte/Macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J. Exp. Med.* 173, 775-778, 1991.
- 17) Shinbara, M., Kondo, N., Agata, H., Fukutomi, O., Kuwabara, N., et al.: Interferon- γ and interleukin-4 production of ovalbumin-stimulated lymphocytes in egg-sensitive children. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 77, 60-66, 1996.
- 18) Tang, M.L.K., Kemp, A.S., Thorburn, J. and Hill, D.J.: Reduced interferon- γ secretion in

- neonates and subsequent atopy. *Lancet* **344**, 983-985, 1994.
- 19) Tang, M. and Kemp, A.: Production and secretion of interferon-gamma (IFN- γ) in children with atopic dermatitis. *Clin. Exp. Immunol.* **95**, 66-72, 1994.
- 20) 青柳正彦, 下条直樹, 佐藤好範, 渡辺博子, 関根邦夫, 他: フローサイトメトリーを用いた気管支喘息患者末梢血免疫担当細胞の活性化に関する解析. *アレルギー* **46**, 1243-1250, 1997.

ALLEGEN-INDUCED CYTOKINE MESSENGER RNA EXPRESSION OF PERIPHERAL
BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN ACTIVE AND
REMISSION OF FOOD ALLERGY

Minako Tomiita, Yoichi Kohno, Naoki Shimojo and Hiroo Niimi
Department of Pediatrics, School of Medicine, Chiba University

Substantial part of patients who suffer from food allergy outgrow their allergic reaction. Moreover the mechanisms of this phenomenon are poorly understood. We studied cytokine mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from children with egg allergy, nine patients on active stage and eight were outgrown, and four healthy controls, by use of reverse transcription polymerase chain reaction. Following ovalbumin (OVA) stimulation *in vitro*, active patients demonstrated increasing IL-5 mRNA. In comparison, no increasing expression of IL-5 mRNA was observed in outgrown and healthy children. IL-4 and IFN- γ mRNA expression has no tendency either to increase or to decrease in all three groups. There was no difference of proliferative responses for OVA among these groups suggesting that outgrown patients' PBMC did not fall into anergy or clonal deletion. These data suggested the change in balance of cytokine production of PBMC which were stimulated by allergen is a trigger for "outgrow" of food allergy.
