

ダニ特異的 I g E 値はアトピー性皮膚炎では 241.5±335.2UA/mL に対し、寛解群では 157.5±237.04 (p=0.013)、どちらも無いものは 123.6±180.33 (p=0.0418) とこの順に有意差が認められた。スギ特異的 I g E に関しては上記の順に 4.64±9.56、1.56±3.68、1.83±6.39 (各 UA/mL) であり、アトピー性皮膚では高い値が示された。

#### D. 考察

これまでの報告および昨年までのわれわれの調査ではほとんどのアレルギー疾患が増加しているのにも関わらず、アトピー性皮膚炎が減少していた。このことは、他に環境省サーベイランス調査でも同様に認められている。アレルギー疾患を考える上で重要な情報をわれわれに提供してくれる可能性がある。

また、環境因子としては感染と喫煙は関連ありとする報告の多いものであるため、今年度は喫煙を中心に検討したが、母親の喫煙には関連がある可能性が考えられた。喫煙率がわずかながら低下しているのでこれが前方視的調査でどう影響するのかに興味深い。また、近年スギ抗原はアトピー性皮膚炎に悪化因子として作用しているとの報告があり、今回のわれわれの小学校での調査での結果は興味深い。今年度だけの結果である可能性もあり、今後、例数を増やして検討する必要がある、低年齢での調査でもこの点にも注目する必要があるかもしれない。今後検討したいと考えている。

保育環境、感染の影響に関しても今後の検討課題であるが、基礎的検討も必要であり、その基になる疫学的調査を実施し、関連因子を予測してゆくことが必要であると考えられる。

#### E. まとめ

小児アトピー性皮膚炎の発症に関しては、喫煙の影響が感染とも関連して2次的に関連する可能性が推定された。また、アレルゲンとして、小学校1年生の段階では少なくともダニなどが関連すると推定され環境整備も重要である可能性が推定された。

#### F. 研究発表

(論文発表)

1. 小田嶋 博：学童期のアレルギー疾患の問題点. 鼻アレルギーフロンティア 6 (2) :16-22. 2006.

2. 小田嶋 博 (共著) :アトピー性皮膚炎診療ガイドライン 2006. 協和企画. 2006.
3. 小田嶋 博:タバコと呼吸器疾患 (受動喫煙を中心に). 日本小児呼吸器疾患学会誌 17 (1) : 50. 2006.
4. 小田嶋 博:生まれ月や性差などの関係は?. Q&A でわかるアレルギー疾患 2 (4) :309-311. 2006.
5. Kuroiwa C, Odajima H, BounLeua Oudavong, Zhuo Zhang, Miyoshi M : Prevalence of Asthma, Rhinitis, and Eczema among children in Vietiane city, LAO PDR. Southeast Asian J Trop Med Public Health 37(5) :1-9. 2006.
6. Nishio K, Odajima H, et al:Effect of inhaled steroid therapy on exhaled nitric oxide and bronchal responsiveness in childhood asthyma, J Asthma 2006;43:739-743.
7. Kurosaka F, Nakatani Y, Terada T, Tanaka A, Ikeuchi H, Hayakawa A, Konohana A, Oota K, Nishio H., Current cat ownership may be associated with the lower prevalence of atopic dermatitis, allergic rhinitis, and Japanese cedar pollinosis in school children in Himeji, Japan. Pediatric Allergy and Immunology:2006;17; 22-28.

(学会発表)

1. 小田嶋 博 : 気管支喘息の経過に対する妊娠ならびに出産の影響. 第19回小児気管支喘息治療管理研究会. 平成18年6月3日. 東京.
2. 佐藤 弘、小田嶋 博、本村知華子、手塚純一郎、津田恵次郎、西間三馨 : ISAAC による北九州市内小中学校児童のアレルギー疾患有症率. 第18回日本アレルギー学会春季臨床大会. 平成18年5月31日-6月1日. 東京.
3. 森川みき、渡邊美砂、川野 豊、佐伯敏亮、大柴晃洋、野間 剛、小田嶋 博 : 小児アレルギー疾患発症予知に関する検討 (第8報) : 受動喫煙の影響. 平成18年5月31日-6月1日. 東京.
4. 小田嶋 博 : ガイドライン改訂版をめぐって ~小児科の立場から~. 第11回那須ティーチン学術集会. 平成18年7月15・16日. 東京.
5. 小田嶋 博 : 小児喘息アレルギー疾患の治療管理と心的因子について. 第6回横浜心身症アレルギー研究会. 平成18年10月11日. 横浜.

## アトピー性皮膚炎発症と母乳の関連、特に母乳成分の解析に関する研究

分担研究者 近藤 直実 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学・教授

**研究要旨** 乳児期のアトピー性皮膚炎発症を考える上で、児が受けている栄養法の影響は避けては通れない問題である。母乳栄養児におけるアトピー性皮膚炎の発症機序を検討する目的で母乳中のサイトカイン、食物抗原の濃度測定、脂肪酸分析を行った。母乳中には、TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 が高濃度に存在していた。TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 は、免疫抑制作用を有し経口免疫寛容を誘導するものと考えられているため、その存在は児のアレルギー発症抑制に対して非常に重要なものと考えられた。食物抗原（オボアルブミン、オボムコイド、カゼイン、 $\beta$ -ラクトグロブリン）は、母乳中に検出され、児の経母乳感作の成立に関与する可能性が示唆された。母乳中の脂肪酸については、 $\omega$ 6系のリノール酸が全脂肪酸の約15%を占めていた。リノール酸の代謝産物であるアラキドン酸はアレルギー反応を促進するものと考えられており、児のアレルギー発症と関連する可能性があると考えられた。

### 研究協力者

深尾敏幸	岐阜大学大学院医学系研究科 小児病態学 助教授
金子英雄	岐阜大学医学部附属病院 小児科臨床助教授
松井永子	岐阜大学大学院医学系研究科 小児病態学 兼任講師
青木美奈子	岐阜大学医学部附属病院 小児科助手

### A. 研究目的

乳児期のアトピー性皮膚炎発症を考える上で、児が受けている栄養法の影響は避けては通れない問題である。

免疫学的な観点からは、母乳栄養が児にとって有効なものであることは明らかであるにも関わらず、最近では、母乳栄養児は人工乳栄養児よりも乳児期の重症なアトピー性皮膚炎の発症率が高いなど、アレルギー発症のリスクファクターと考えられる文献が散見される。また、母親の食生活の変化が、乳児アトピー性皮膚炎の増加に関わっているのではないかという意見もみられる。

そこで、本研究では、母乳栄養児におけるアトピー性皮膚炎の発症頻度や機序を検討すること、および母乳中の抗原の同定、成分の解析を行うことで実際にアレルギー疾患発症に関連する因子を同定し、アレルギー疾患の発症予防・予知につなげることを目的とする。

### B. 研究方法

(1) 当院にて出生し、保護者の同意を得た母児を対象とした。同意を得た対象者より生後7日前後の母乳を採取した。

(2) 母乳を4℃, 15000×g, 30分間遠心分離し、細胞層と脂肪層に分離したものの中間層を採取し、IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2の濃度をELISA法で測定した。

(3) 母乳中の食物抗原（オボアルブミン、オボムコイド、カゼイン、 $\beta$ -ラクトグロブリン）の濃度をELISA法で測定した。

(4) 母乳中の脂肪酸の濃度をガスクロマトグラフィー法にて測定した。

### （倫理面への配慮）

研究対象者には本研究の内容、方法および予想される結果を十分に説明し理解（インフォームドコンセント）を得た上で母乳採取が行われた。また倫理面でも、結果による不利益は全く生じないか、または配慮が充分になされることから問題がないと判断された。

### C. 研究結果

(1) 母乳中のサイトカインを測定した（表1）。IL-4は27.2%（11検体中3検体）、IFN- $\gamma$ は9.1%（11検体中1検体）で測定可能であったがいずれも低濃度であった。IL-10についてはすべての検体においても検出感度以下であった。TGF- $\beta$ 1およびTGF- $\beta$ 2についてはすべての検体にて測定可能であった。TGF- $\beta$ 1の濃度は平均±SD: 105.7±82.3pg/ml（最大値297.3pg/ml, 最小値36.9pg/ml）で、症例によってその濃度にばらつきを認めた。TGF- $\beta$ 2の濃度

は 平均±SD: 1288.6±1595.6 pg/ml (最大値 5890.2 pg/ml, 最小値 68.1 pg/ml)で母乳中に非常に高い濃度で存在することが明らかとなった。

(2) 母乳中の食物抗原を測定した(表2)。オボアルブミン(OVA), オボムコイド(OM), カゼイン,  $\beta$ -ラクトグロブリン(BLG)は、すべて母乳中で検出される症例が2例存在した。OVAは50% (12検体中6検体)で検出され、平均±SD: 4.5±5.8ng/mlで、OMは58.3% (12検体中7検体)で検出され、平均±SD: 10.5±9.7ng/mlであった。カゼインは41.6% (12検体中5検体)で検出され、平均±SD: 1.9±2.7ng/mlで、BLGは63.6% (11検体中7検体)で検出され、平均±SD: 1.2±1.3ng/mlであった。

(3) 母乳中の脂肪酸分析をおこなったところ、すべての症例においてオレイン酸、パルミチン酸、リノール酸の順で多く存在していた。 $\omega$ 6系、 $\omega$ 3系の脂肪酸はすべて測定可能であり、特に $\omega$ 6系のリノール酸は全脂肪酸の15%を占めていた(図1)。

#### D. 考察

母乳中のサイトカインについては、TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2が高濃度に存在していた。TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2は、免疫抑制作用を有し経口免疫寛容を誘導するものと考えられているため、その存在は児のアレルギー発症抑制に対して非常に重要なものと考えられる。今後、母乳中のTGF- $\beta$ 1, 2の濃度と児のアレルギー発症との関連についてさらなる検討が必要であると考えられる。また、母乳中に食物抗原が症例によっては認められた。母乳中の抗原移行と経母乳感作との関連については重要な課題であると考えられた。母乳中の脂肪酸については、 $\omega$ 6系のリノール酸が多く存在していることが明らかとなった。リノール酸の代謝産物であるアラキドン酸はアレルギー反応を促進するものと考えられており、その存在が児のアレルギー発症と関連する可能性があると考えられ、さらなる検討が必要と考えられた。

#### E. 結論

母乳中には、サイトカインの中で、TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2が高濃度で存在していた。食物抗原(オボアルブミン、オボムコイド、カゼイン、 $\beta$ -ラクトグロブリン)は、母乳中に検出され、児の経母乳感作の成立に参与する可能性が示唆さ

れた。母乳中の脂肪酸分析では、 $\omega$ 6系のリノール酸は全脂肪酸の15%を占めていた。

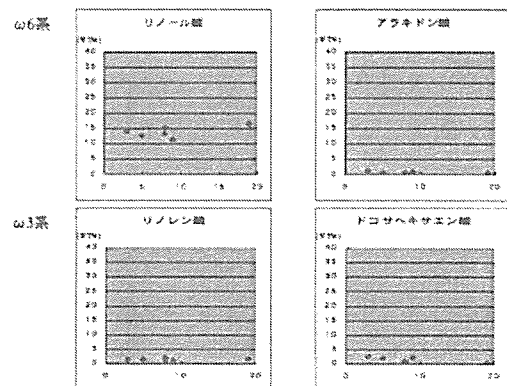
<表1> 母乳中のサイトカイン濃度

	測定できたサンプルの割合	平均±SD (pg/ml)
IL-4	27.2%	0.45±0.91
IFN- $\gamma$	9.1%	9.4±31.0
IL-10	0%	すべて測定感度以下
TGF $\beta$ 1	100%	105.8±82.3
TGF $\beta$ 2	100%	1288.6±1595.6

<表2> 母乳中の食物抗原濃度

	測定できたサンプルの割合	平均±SD (ng/ml)
オボアルブミン	50.0%	4.5±5.8
オボムコイド	58.3%	10.5±9.7
カゼイン	41.6%	1.9±2.7
$\beta$ -ラクトグロブリン	63.6%	1.2±1.3

<図1> 母乳中の脂肪酸濃度



#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

<論文発表>

1. Kaneko H, Matsui E, Asano T, Kato Z, Teramoto T, Aoki M, Kawamoto N, Lian LA, Kasahara K, Kondo N. Suppression of IFN-gamma production in atopic group at the acute phase of RSV infection. *Pediatr Allergy Immunol.* 17:370-375(2006)

2. Orii KE, Lee Y, Kondo N, McKinnon PJ. Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. Proc Natl Acad Sci U S A. 27;103:10017-10022(2006)
3. Teramoto T, Fukao T, Tomita Y, Terauchi Y, Hosoi K, Matsui E, Aoki M, Kondo N, Mikawa H. Pharmacokinetics of Beclomethasone Dipropionate in an Hydrofluoroalkane-134a Propellant System in Japanese Children with Bronchial Asthma. Allergology International 55: 317-320(2006)
4. Matsukuma E, Kato Z, Omoya K, Hashimoto K, Li A, Yamamoto Y, Ohnishi H, Hiranuma H, Komine H, Kondo N. Development of fluorescence linked immunosorbent assay (FLISA) for high throughput screening (HTS) of interferon-gamma. Allergology International. 55 : 49-54 (2006)
5. 近藤直実：第1章アトピー性皮膚炎の定義・疾患概念、病態生理・病因 3, 病因. アトピー性皮膚炎診療ガイドライン 2006, 4-6 監修 山本昇壮, 河野陽一 編集 協和企画 (2006)
6. 近藤直実：アトピー性皮膚炎. 小児疾患の診断治療基準 第3版. 258-259 五十嵐隆 責任編集、東京医学社 (2006)
7. 近藤直実：アトピー性皮膚炎. 小児内科 38 258-259 (2007)

談話会 (第51回) (2007年2月3日, 名古屋)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1、特許取得  
特になし
- 2、実用新案登録  
特になし
- 3、その他  
特になし

#### <学会発表>

1. Kondo N：国際学会シンポジウム：Symposium：Genetic factors and environmental in allergy. KAAACI-WAO Joint Congress 2006 & the 9<sup>th</sup> WPAS (2006年11月5日, 韓国)
2. 近藤直実：教育講演10：「アレルギー発症における遺伝子と環境」。日本アレルギー学会 (第56回) (2006年11月4日, 東京)
3. 近藤直実：講演：「環境が生体に及ぼす影響」。日本小児アレルギー学会 (第43回) (2006年11月25日, 東京)
4. 青木美奈子 金子英雄 近藤應 森田秀行 寺本貴英 松井永子 笠原貴美子 近藤直実：母乳栄養児におけるアトピー性皮膚炎発症についての検討ー症例検討および母乳中の食物抗原解析ー. 東海小児アレルギー

## アトピー性皮膚炎の小児におけるシャワー浴の効果に関する客観的指標の確定についての研究

分担研究者 望月博之 群馬大学大学院小児生体防御学分野講師

### 研究要旨

学童期のアトピー性皮膚炎はしばしば治療に抵抗性を示し、難治化することが知られている。この原因のひとつに患児が学校で体育や遊戯をすることにより、汗や埃による刺激から皮膚の痒みが増し、搔破を繰り返すことが推測される。これまでに我々は、汗による悪化が顕著となると考えられる梅雨前から学内の温水シャワーを利用し、アトピー性皮膚炎に対するシャワー浴によるスキンケアがアトピー性皮膚炎患児に有用であることを確認した。今回、このようなシャワー浴の効果に注目し、患児の汗や汚れを速やかに洗い流すことで、直接的、間接的な皮膚の傷害を避けることがアトピー性皮膚炎の改善に有用であるかについて、皮膚の非侵襲的、客観的な評価法により検討することを計画した。方法として、皮膚の性状、範囲の評価法の検討については、複数の検者による3段階の皮膚の性状評価と皮膚異常の範囲の評価を採用し、皮膚の表面および角質水分量、角質膜厚の測定については、位相差振幅検出方式角質膜厚・水分量計を用いて測定することとした。皮膚の透過性の測定についてはこれまでに良好な検査法がなかったため、新生児の皮膚色の評価に用いている市販の色彩色差計と無害な黄色色素を用いて、患児の皮膚の外側から内側への透過性亢進の評価法を確立させることを計画した。各種黄色色素を用い、貼付時間、濃度、貼付部位などの検討を健常者の皮膚で行なったところ、タートラジンが最も皮膚浸透性の評価に信頼性があることがわかった。さらに専用のパッチテストを考案し、一回に50ulの色素を用いること、皮膚曝露時間は30分で、パッチを取り除いた後、表面に付着した色素を界面活性剤にて除去することとした。次に、intraobserverとinterobserverのvariation評価を施行したが、良好な結果が得られた。本年度の我々の結果から、色彩色差計による皮膚深部への色素分子の到達性の評価を、患児の皮膚の透過性の評価法として用いるのは有意義であると考えられたため、今後、この方法を含む総合的な皮膚評価を体系化し、アトピー性皮膚炎の児でのシャワー浴の効果における客観的な評価へと進めていく予定である。

### 研究協力者

森川昭廣 群馬大学大学院小児生体防御学  
分野教授  
只木弘美 群馬大学大学院小児生体防御学  
分野

### A. 研究目的

平成15～17年度の厚生労働科学分担研究「アトピー性皮膚炎の有症率調査法の確立および有症率低下・症状悪化防止対策における生活環境整備に関する研究（班長：河野陽一）」において我々は「アトピー性皮膚炎患児における小学校でのシャワー効果の解析（分担研究者 森川昭廣、群馬大学大学院小児生体防御学分野）を行い、小学校の学校生活におけるスキンケアの必要性、またその実際的な方法について検討した。すなわち、平成16年度と平成17年度の2年間、シャワー施設のある群馬県内の7つの小学校で同時期に検討を行うことを計画した。結果として、シャワー浴が施行で

きた児童53名には全例に改善が見られ、保護者、養護教諭による評価も良好であり、学童のアトピー性皮膚炎の治療に対し、小学校でのシャワー浴によるスキンケアが有用であることが確認され。

今回、我々は、これらの結果をもとに、シャワー浴の効果に注目し、患児の汗や汚れを速やかに洗い流すことで、直接的、間接的な皮膚の傷害を避けることがアトピー性皮膚炎の改善に有用であるか否かについて、皮膚の非侵襲的、客観的な評価法により検討することを計画した。

### B. 研究方法

小児のアトピー性皮膚炎の患児に対し、外来診療レベルで施行可能な皮膚の非侵襲的、客観的な評価法を確立することを第一とした。

(1) 皮膚の性状、範囲の評価法の検討については、これまで、我々が用いてきた遠藤らの報告をもとにした複数の検者による3段階の皮膚の性状評価と皮膚異常の範囲の評価を採用することとした。

(2) 皮膚の表面および角質水分量、角質膜厚の測

定については、位相差振幅検出方式角質膜厚・水分量計を用いて測定することを計画した。これには、我々がこれまで使用してきた角質膜厚・水分量計 (ASA-M1) を用いて、角質膜厚(T)、表面水分量(P)、角質水分量(W)を、非侵襲的、かつ短時間で測定することとした。

(3) 皮膚の外側から内側への透過性亢進の測定について、これまでに核医学的な手法等はあるものの、再現性や侵襲性について利便性の高い検査法がないため、今回、新しく、小児の患者に対して使用可能な方法を検討することとした。

### C. 研究結果

これまでに我々は、新生児の皮膚色の評価に用いているコニカミノルタ社製、色彩色差計 (CR-400) を活用してきた。この色彩色差計は皮膚深部の色彩の評価が可能であり、再現性に優れているため、皮膚透過性の評価への応用が考えられた。

#### (a) 色素の選定

第一に安全である色素で黄色が好ましいこと、水溶性、脂溶性の別に分けて検討すること、分子量が適切であること、などを条件に選出した。ここで、食用色素、ビタミン類などに注目し、人体に安全な色素として、ビリルビン (MW 584)、タートラジン (MW 534)、ピクリン酸 (MW 229) を使用することを計画した。健常者の皮膚で行なったところ、タートラジンが塗布直後や洗浄後において、最も安定した結果がみられた (図1)。

#### (b) 貼付時間、濃度の選定

貼付時間については、外来での検討を考慮し、10分から30分間の透過性を検討し、濃度の選定については、1 mg/ml、10mg/ml、100mg/ml の別に分けて同様の検討を行った。この結果、30分間、10mg/ml の濃度が好ましいと思われた (図2)。パッチを取り除いた後、表面に付着した色素を界面活性剤にて除去することとした。

#### (c) 貼付部位、貼付法の検討

貼付部位は露出しやすく、機器の扱いが容易である部位として、前腕の屈部、貼付法とした。市販のガーゼ付き絆創膏が、使用に簡便で安定性があることがわかった。ガーゼの湿潤性を考え、1検体 50ul を使用することとした。

#### (d) 再現性について

再現性を検討するために、Intraobserver と Interobserver の variation 評価を施行したが、

上記の方法で良好な結果が得られた (表1)。

### D. 考察

皮膚の性状、皮膚異常の範囲等について、客観性のある指標を複数で施行し、皮膚の改善を総合的に評価することを計画した。本年度は特に患児の皮膚の外側から内側への透過性の評価法を中心に検討することとし、色彩色差計による皮膚深部の色素分子の到達性の評価を行ったが、良好な結果が得られた。この方法は簡便であり、非侵襲的、かつ再現性に優れるだけでなく、装置一式が軽量であるため、今後の検討に大きな意義を持つと考えられた。

### E. 結論

本年度の我々の結果から、色彩色差計による皮膚深部への色素分子の到達性の評価を、患児の皮膚の透過性の評価法として用いるのは有意義であると考えられた。今後、この方法を含む総合的な皮膚評価を体系化し、アトピー性皮膚炎の児での評価を進めていく予定である。

### F. 健康危機情報

なし

### G. 研究発表

学会発表、論文発表

なし

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 1、色彩色差計による色素の皮膚透過性測定

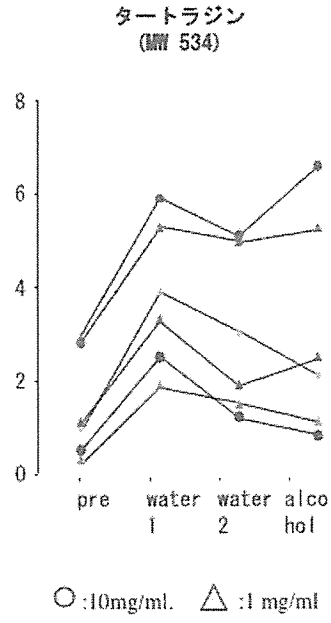


図 2、色素負荷前後の色彩色差変化  
(タートラジン10mg/ml、b\*について)

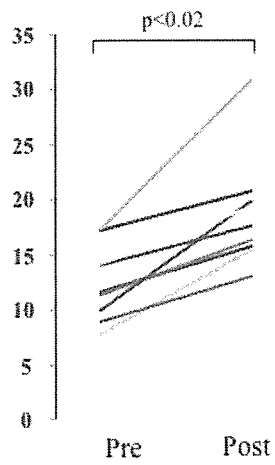


表 1、色彩色差計を用いた Intra- and interobserver variation

Method		SDD	RC	CC
L <sup>*</sup>	intraobserver	1.3	3.61	0.94
	interobserver	0.73	2.01	0.91
a <sup>*</sup>	intraobserver	0.46	1.26	0.97
	interobserver	0.73	2.02	0.84
b <sup>*</sup>	intraobserver	1	2.77	0.98
	interobserver	0.38	1.05	0.97

SDD: SD of the difference between the first and second measurements by a same observer (intraobserver) and those by different observer (interobserver)  
 RC: repeatability coefficient (the 95% confidence limit of difference)  
 CC: correlation coefficient



シャワー浴、スキンケアによるADの改善・予防効果の評価法の解析

分担研究者 片山一朗 大阪大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨 本研究では、大阪府下でのシャワー浴の効果解析と適切なシャワー浴の方法（季節、重症度による違い）を検討するとともに、アトピー性皮膚炎(AD)発症ハイリスク群の児に対する、スキンケアによる乳児AD発症予防の効果を検討することを目的とした。この目的のために、以下の2つを準備研究として行った。(1)平成18年6月から7月末までの間に、大阪大学医学部附属病院皮膚アトピー外来に通院中の患者66人を対象として、汗に関するアンケートを行った。66人中、24人(36.4%)が季節の変わり目に悪化し、21人(31.8%)が夏に皮膚炎が悪化すると答えた。汗を悪化因子と考えている患者は47人(71.2%)にのぼった。汗の対策として、シャワーをしている人が42人(63.6%)と最多であった。以上より、多くの人が悪化因子として汗を挙げており、対策としてはシャワー、エアコンが多かった。このことは、今回我々が検討予定としているシャワー浴の効果解析と適切なシャワー浴の方法、乳児のスキンケアの方法を検討することが、いかに大切であるかを再認識させる結果となった。今後当研究班においてさらに検討を加える予定である。

(2)ADの重症度判定の方法を確立するために、大阪大学医学部附属病院皮膚科アトピー外来に通院中の患者の重症度をObjective severity assessment of atopic dermatitis (OSAAD)を用いて評価した。解析対象の年齢は20-43歳であった。経皮水分蒸散量、水分量について、19人の平均値を求めて正常部、軽症部、重症部の間で有意差が出るか否かについて解析したところ、経皮水分蒸散量については正常部、軽症部、重症部で有意差を認めなかったものの、水分量では3群間で有意差を認めなかった。以上より、皮疹の重症度の指標としてOSAADは十分に実用的であるとは言えなかったが、経皮水分蒸散量は重症度の指標になりうることが示唆された。今後、経皮水分蒸散量を重症度の指標として研究を行う予定である。

研究協力者

中村 敏明 大阪大学医学部皮膚科講師  
室田 浩之 大阪大学医学部皮膚科助手  
北場 俊 大阪大学医学部皮膚科  
内藤 元彦 大阪大学医学部皮膚科  
堤 真理 大阪大学医学部皮膚科  
澄川 靖之 市立豊中病院皮膚科  
松本 千穂 箕面市立病院皮膚科  
佐野ほづみ 大阪厚生年金病院皮膚科  
中川 幸延 大阪厚生年金病院皮膚科

下・症状悪化防止対策における生活環境整備に関する研究」では、アトピー性皮膚炎(AD)の児童に対して学校でのシャワー浴を行ったところ、全例で改善を認め、保護者、養護教諭から高い評価が得られた(望月博之、森川昭廣 アトピー性皮膚炎における小学校でのシャワー浴の効果について 日本皮膚アレルギー学会雑誌第13巻174頁-179頁、2005年)。この研究を踏まえて、大阪府下でのシャワー浴の効果解析と適切なシャワー浴の方法(季節、重症度による違い)を検討するとともに、アトピー性皮膚炎発症ハイリスク群の児に対する、スキンケアによる乳児AD発症予防の効果を検討することを本研究の最終目的とする。この目的を達成するための準備研究として、ADの悪化因子としての汗に関するアンケートを行い、汗がどの程度悪化因子とし

A. 研究目的

平成15年-17年度に行われた「アトピー性皮膚炎の有症率調査法の確立および有症率(発症率)低

て考えられているか、また他の悪化因子にはどのようなものがあるかを調査した。さらに今後の研究において、皮疹の重症度を簡便に評価する方法を確立することが、正確なデータ解析のために不可欠であるとの認識から、アトピー性皮膚炎の重症度の評価方法についても検討を加えた。

## B. 研究方法

### (1) ADの悪化因子としての汗に関するアンケート

汗対策としてのシャワー浴の効果解析を進めるため、平成18年6月から7月末までの間に、大阪大学医学部附属病院皮膚アトピー外来に通院中の患者66人を対象として、汗に関するアンケートを行い、以下について質問を行った。

1. あなたの皮膚炎はどの季節に悪化しますか？
2. あなたの皮膚炎の悪化因子は何と考えますか？
3. 汗は悪化因子と考えますか？
4. 発汗を自覚しますか？
5. あなたの発汗パターンを教えてください
6. 汗で悪化する部位はどこですか？
7. 汗による皮膚炎の悪化のパターンを教えてください
8. 効果のある汗対策を教えてください
9. 会社、学校などにシャワー設備があれば使用したいですか？
10. 汗に関して何か意見がありましたら自由に述べて下さい

### (2) ADの重症度の判定

スキンケアによる早期介入の効果を検討する上でADの重症度判定の簡便法について検討した。皮膚のバリア機能を加味した評価法として、近年Objective severity assessment of atopic dermatitis (OSAAD)が報告されている (Sugarman JL et al. Arch Dermatol. 2003;139:1417-1422)。このOSAADを用いて、大阪大学医学部附属病院皮膚科通院中の患者の重症度判定を試みた。OSAADは、皮膚

の重症度を正常、軽症部、重症部と3つに分けて全身に占める割合を計算し、それぞれの経皮水分蒸散量、水分量を測定した結果と併せて、指数化したものである。このOSAAD scoreは、従来のAD重症度判定のスタンダードである、SCORADとも相関することが報告されている。

## C. 研究結果

### (1) 汗のアンケートについて

66人中、24人(36.4%)が季節の変わり目に悪化し、21人(31.8%)が夏に皮膚炎が悪化すると答えた。皮膚炎の悪化因子としては、汗45人(68.2%)、乾燥36人(54.5%)等であった。汗を悪化因子と考えている患者は47人(71.2%)にのぼった。汗をかいたときに悪化する部位は、首33人(50%)、背中22人(33.3%)、顔18人(27.3%)等であった。汗の対策として、シャワーをしている人が42人(63.6%)と最多で、エアコン24人(36.4%)が2番目に多かった。

### (2) ADの重症度の判定

2006年6月26日から2ヶ月の間に、大阪大学医学部附属病院皮膚科アトピー外来に通院中の患者のうち、同意の得られた19人(男性15人、女性4人)について検討した。年齢は20-43歳であった。経皮水分蒸散量(TEWL)、水分量(BSA)について、19人の平均値を求めて正常部、軽症部、重症部の間で有意差が出るか否かについて、解析した。正常部のTEWLは $10.81 \pm 5.21$  g/m<sup>2</sup>、軽症部のTEWLは $17.76 \pm 9.67$  g/m<sup>2</sup>、重症部のTEWLは $25.22 \pm 10.63$  g/m<sup>2</sup>であり、Wilcoxon signed-ranks検定では、正常部TEWLと軽症部TEWL間には $p < 0.01$ で有意差があり、また軽症部TEWLと重症部TEWLの間でも $p < 0.05$ で有意差を認めた。一方、正常部のBSAは $28.40 \pm 11.56$ 、軽症部のBSAは $24.27 \pm 9.68$ 、重症部のBSAは $26.63 \pm 14.48$ であり、Wilcoxon signed-ranks検定では、3群間で有意差を認めなかった。

## D. 考察

### (1) 汗のアンケートについて

多くの人が季節の変わり目や夏に皮膚炎が悪化し、その悪化因子として汗を挙げており、対策としてはシャワー、エアコンが多かった。このことは、今回我々が検討予定としているシャワー浴の効果解析と適切なシャワー浴の方法、乳児のスキンケアの方法を検討することが、いかに大切であるかを再認識させる結果となった。望月らは、群馬県の学童のシャワー浴により、ADのQOLが改善したと報告しているが、今後当研究班においてさらに検討を加える予定となっている。

### (2) ADの重症度の判定

Sugarman の報告では重症度と経皮水分蒸散量は有意に相関し、また重症度と水分量は有意に逆相関した。今回の我々の検討では、経皮水分蒸散量は重症度と有意に相関したが、水分量は有意差を認めなかった。その理由として、水分量の測定は周囲の環境湿度や測定部位による差が認められ、顔面、掌蹠は精神的発汗があり、測定には適さない可能性がある。

## E. 結論

成人 AD 患者の多くが汗を皮膚炎の悪化因子と考えており、汗対策としてシャワー、エアコンを活用していることが判明した。望月らの報告と合わせると、シャワー浴の効果解析と適切なシャワー浴の方法（季節、重症度による違い）を検討することが急務である。また、これらの検討のためにADの簡単な重症度判定の確立が望まれる。今回 OSAAD を用いて、その有用性を検討したが、水分量の測定に問題があった。一方経皮水分蒸散量については、正常部、軽症部、重症部の間で有意差を認めた。今後経皮水分蒸散量を重症度の指標として、シャワー浴の効果判定を行いたいと考えている。

## F. 健康危惧情報 なし

## G. 研究発表

中村敏明、北場俊、内藤元彦、堤真理、室田浩之、片山一郎: Objective Severity Assessment of Atopic Dermatitis (OSAAD) を用いたアトピー性皮膚炎の解析. 第27回近畿アトピー性皮膚炎談話会、大阪市、2006年10月21日

## H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

乳児早期のスキンケアによるアトピー性皮膚炎発症予防  
—乳児早期の生理的皮膚機能の変化：一般乳児での予備調査—

分担研究者 片岡葉子 大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター皮膚科主任部長

研究要旨

アトピー性皮膚炎の発症にはアレルギー素因と皮膚の機能の異常の2点が関わって成立すると考えられている。生後早期から皮膚の機能の維持、異常機能の是正を行うことに注目し、乳児アトピー性皮膚炎の発症予防を計画している。しかし、正常乳児における皮膚機能の生理的变化については過去にほとんど報告がなく、どの点に注目して介入すべきかまだ明らかではない。そこで、本研究では、予備調査として、生後早期の乳児の皮膚機能の変化を測定、把握することを目的とした。大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター産科で出生し、保護者の同意が得られた生後1週間以内の新生児40名に対し、経表皮水分蒸散量（TEWL）と角質水分量、皮脂量、黄色ブドウ球菌量を測定し、1ヶ月後、3ヶ月後も同様の測定を行い、その変化を追跡した。また家族歴としてアレルギー素因の有無を聴取した。

TEWLを経時的に見ると成長とともに上昇する傾向にあり、特に生後1週から1ヶ月の間に上昇するものが多く見られた。また湿疹病変を呈する例では明らかな上昇が見られた。黄色ブドウ球菌は頬部において最も多く検出され、また、何らかの皮膚症状を呈した例では脂漏性湿疹の例外を除いて多く検出された。今後引き続き例数を増やして検討する必要があるが、乳児期早期の皮膚の生理機能の変化のパラメータとしてTEWLと黄色ブドウ球菌コロニー数を測定することが有用であると考えられた。また、スキンケアからみたアトピー性皮膚炎発症の予防において、介入のポイントは生後1ヶ月前からのTEWLの上昇を防止するようなバリアー機能の保持、および黄色ブドウ球菌の付着を防ぐ工夫をすることであると推測された。

研究協力者

片山一朗	大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学講座皮膚科教授
中村敏明	大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学講座皮膚科講師
室田浩之	大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学講座皮膚科助手
西野 洋	大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター皮膚科医員
木嶋晶子	大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター皮膚科医員
猿丸朋久	大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター皮膚科非常勤医師
岸田寛子	大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター皮膚科非常勤医師
赤田 忍	大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター産婦人科部長
森本恭子	大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター看護師長

アトピー性皮膚炎の背景には大きく分けて、アレルギー素因と皮膚機能の異常という2つの要因が関与していると考えられている。皮膚機能の異常としては、セラミドを代表とする角質細胞間脂質の減少等によるバリア機能の低下、水分保持能の低下、細菌やウイルスに対して易感染性を持っていること等があげられる。一方、アトピー性皮膚炎の発症は乳児期なかでも生後2ヶ月から3ヶ月までの発症が最も多いとされている。この生後初期の発症を予防することは、アトピー性皮膚炎発症全体を減少させることになり、また、その後の年代での発症予防の参考となると考えられる。皮膚機能の異常という観点から発症の予防を検討することが本研究の大きな目的である。

生後直後から3ヶ月までの乳児の皮膚機能が大きく変化することは経験的に容易に予想される。しかし、この時期の皮膚機能について具体的にどのような変化があり、アトピー性皮膚炎を発症していく過程でどのような変化があるのか、明らかではない。発症の予防のために介入すべきポイントすなわち異常な皮膚機能のポイントを明確にす

A. 研究目的

ることがこの予備調査研究の目的である。

## B. 方法

大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター産科にて出生した健常新生児の母親に対し、本研究の趣旨を説明し、文書にて同意の得られた新生児を研究の対象とした。生後1週間以内（産科病棟新生児室内）、1ヶ月後（1ヶ月検診受診時、皮膚科外来）、3ヶ月後（皮膚科外来内）の3回、以下の項目について測定した。経皮水分蒸散量、皮膚水分量、皮脂量をそれぞれ Courage+Khazaka 社の TM300MP テヴァメーター（水分蒸散量測定装置）、CM825MP コルネオメーター（水分計）、SM815 セブメーター（皮脂計）を用いて測定した。これらの測定は室温 25～26℃、相対湿度 30～40% に設定した室内でおこなった。

また、ブドウ球菌選択培地フードスタンプ（ニッスイ）X-SA 培地、卵黄加マンニット培地の2種類のスタンプ培地を用いて皮膚の細菌培養を行なった。細菌培養については、直接培地が付着することによる被験児皮膚への傷害を回避するため、生理食塩水でぬらした滅菌濾紙を皮膚に接着させてサンプリングし、スタンプ培地に二次的に接着させる方法をとった。スタンプ培地は 37℃ 孵卵器で 24～48 時間培養し、黄色ブドウ球菌ならびに表皮ブドウ球菌のコロニー数を計測した。

被験者の家族歴として同意取得時に、両親、兄弟等のアレルギー疾患および乾燥肌、魚鱗癬の有無について母親から病歴を聴取した。また、石鹸・洗浄料や保湿剤の外用のスキンケアの方法についても母親から聴取した。

これらのデータを集計し、生後3ヶ月までの乳児期早期皮膚の生理機能は一般にどのように変化するか、また家族歴を有する児や、皮膚炎を発症した児の皮膚機能の特徴的変化を明らかにした。

## C. 結果

2007年3月15日現在までに40名の新生児が、本研究にエントリーされた。男女比は18:22であった。生下時体重は2225g～3890g、平均2902.6±393.4gであった。生後1週目の測定はほとんどの被験者において生後2～6日後におこなわれたが、この間に保育器内で管理されていた2児のみ保育器から一般新生児室に出てから生後10日後に測定した。

このうち生後月齢3ヶ月に達し3ヶ月後までで

一タの得られた被験者は8名、1ヶ月後までの被験者は17名、1週間のみ被験者は40名、1ヶ月以降受診なく脱落が2名であった。何らかの皮膚病変の見られたものは、1週間では1例において新生児中毒性紅斑（軽度）を認めたのみ、1ヶ月では neonatal acne が5例、脂漏性湿疹が1例、湿疹病変が1例にみられ、3ヶ月では乾燥皮膚を3例に、軽度の湿疹病変を2例に認めたが、明らかにアトピー性皮膚炎を思わせる症状のみ見られたものはなかった。1週間で新生児中毒性紅斑を認めた児は1ヶ月では皮膚は正常化していた。既に3ヶ月目の検診の終了した被験者のうち1ヶ月または3ヶ月時に何らかの皮膚症状のみ見られたものの皮膚症状の変化を表1に示す。総じて3ヶ月になると肉眼的にみて乾燥皮膚の傾向が出現することがわかる。1ヶ月時に acne の見られた3例のうち、1例は正常化し、2例は乾燥皮膚に転じていた。

1ヶ月時		3ヶ月時
湿疹病変	→	乾燥皮膚
正常	→	湿疹病変
脂漏性湿疹	→	正常
Acne	→	乾燥性紅斑
Acne	→	乾燥皮膚

家族歴については、アトピー性皮膚炎の家族歴については、母にあるもの4例、父にあるもの5例、兄弟にあるもの2例であった。気管支喘息およびアレルギー性鼻炎については母親に11例、父親にあるもの14例、兄弟にあるもの3例で、半数以上に何らかのアトピー素因をもつ家族歴が見られた。

頬部の TEWL は1週間時 22.60±7.88、1ヶ月時 35.49±15.38、3ヶ月時 29.7±13.17 であった。胸部はそれぞれ 23.87±8.35、43.31±14.39、44.56±11.80 であった。下腿はそれぞれ 15.68±6.30、32.68±8.78、35.74±11.31 であった。個人別にみると総じて頬部が高い傾向があり、皮膚症状を有する群では特に顕著であった。経時的に見ると概して成長とともに上昇する傾向があり特に生後1週から1ヶ月の間に上昇するものが多く見られた。また湿疹病変を呈する例では明らかな上昇が見られた。

頬部の角質水分量は1週間時 11.84±9.92、1ヶ月時 20.13±12.96、3ヶ月時 22.69±14.8 であ

った。胸部はそれぞれ  $6.42 \pm 7.52$ 、 $11.56 \pm 4.89$ 、 $14.35 \pm 6.88$  であった。下腿はそれぞれ  $7.52 \pm 7.18$ 、 $10.44 \pm 7.62$ 、 $12.35 \pm 6.08$  であった。全般に生後3ヶ月の間成長とともに上昇する傾向が見られ、また概して下腿は低いことがわかった。

ブドウ球菌コロニー数はX-SA培地、卵黄加マンニット培地ともに同様の結果を得た。全経過を通じてほとんど検出されないものと、極めて多数検出されたものと個人差が大きく見られた。黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌両者が検出されたもの、表皮ブドウ球菌のみ検出されたもの、両方とも検出されなかったものの3群に分けられるが、黄色ブドウ球菌が多数検出される例では表皮ブドウ球菌の数は少なかった。検出数を部位別に見ると頬部が顕著に高く検出された。コロニー数0個を一、1~10個を+、11~49個を++、50個以上を+++とすると何らかの皮膚症状を呈した例では+++が多かった。ただし脂漏性湿疹の1例では黄色ブドウ球菌は検出されなかった。Acneの例では黄ブ菌が多数検出されるものとされないものがあり、後に湿疹あるいは乾燥皮膚へと移行した例では多く検出された。

油分量は個体間においては0~291とデータにきわめて大きなばらつきがみられた。また同一人の同一部位においても複数回測定すると異なるデータが見られることが多かった。

#### D. 考察

生後3ヶ月までの早期乳児の皮膚生理機能について経時的に調査した報告は過去にほとんどない。本研究はまだ3ヶ月まで追跡し得た例数が8例と少なく、今後アトピー性皮膚炎の発症の可能性を予測させる皮膚病変を呈したものが2例程度しかないため、引き続き例数を増やして調査検討が必要であるが、今後の中核となる乳児アトピー性皮膚炎発症を予防する方法について、またその研究方法について方向を明確にすることができた。

皮膚機能の測定項目として、TEWL、角質水分量、黄色ブドウ球菌コロニー数を計測することは妥当な評価方法であることが確認された。反対に油分量は測定値に安定性が無く、評価の対象とすべきでないことが明らかとなった。黄色ブドウ球菌の検出に関しては、X-SA培地、卵黄加マンニット培地両者とも同様の検出感度であり、判別の容易なX-SA培地のみを選択すればよいことがわかった。

現段階までの本研究の結果において特に注目す

べき項目はTEWLの変化と黄色ブドウ球菌のコロニー数である。新生児のTEWLは生後1ヶ月ないし3ヶ月の間に上昇する傾向があり、この間に皮膚バリアー機能が低下することを示している。観察された皮膚症状のうち、最も多く見られたものは1ヶ月ではneonatal acneで、3ヶ月では乾燥皮膚であった。一般にneonatal acneは石鹸洗顔等の指導で自然軽快する皮膚病変であるが、日常診療では、本症を呈する児の一部がアトピー性皮膚炎に移行していくことを時に経験する。本研究の1ヶ月時にneonatal acneのみられた2例も3ヶ月になってacneは消失したものの乾燥皮膚、紅斑を呈していた。この2例とも皮膚病変の変化にもなって黄色ブドウ球菌数が著増しており、これはアトピー性皮膚炎発症の予測因子となるかもしれない。

#### E. 結論

乳児期早期の皮膚の生理機能の変化のパラメータとしてTEWLと黄色ブドウ球菌コロニー数を測定することが有用であろう。スキンケアからみたアトピー性皮膚炎発症の予防において介入のポイントは生後1ヶ月前からのTEWLを上昇させないようなバリアー機能の保持、黄色ブドウ球菌の付着を防ぐ工夫をすることであると推測される。

#### F. 健康危惧情報 なし

#### G. 研究発表 なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Eiji Matsukuma	Development of fluorescence-linked immunosorbent assay for high throughput screening of interferon- $\gamma$	Allergology international	55(1)	49-54	2006
近藤直実	アトピー性皮膚炎	小児内科	38	258-259	2006
佐伯 秀久	アトピー性皮膚炎の有病率	医学のあゆみ	217(4)	349-350	2006
佐伯 秀久	アトピー性皮膚炎の疫学調査	小児科診療	8	1133-1137	2006
Hidehisa Saeki	Prevalence of atopic dermatitis detemined by clinical examination in Japanese adults	Journal of Dermatology	33	817-819	2005

# Development of Fluorescence-linked Immunosorbent Assay for High Throughput Screening of Interferon- $\gamma$

Eiji Matsukuma<sup>1</sup>, Zenichiro Kato<sup>1</sup>, Kentaro Omoya<sup>1</sup>, Kazuyuki Hashimoto<sup>1</sup>, Ailian Li<sup>1</sup>, Yutaka Yamamoto<sup>1</sup>, Hidenori Ohnishi<sup>1</sup>, Hidenori Hiranuma<sup>2</sup>, Hisakazu Komine<sup>2</sup> and Naomi Kondo<sup>1</sup>

## ABSTRACT

**Background:** Human interferon-gamma (hIFN- $\gamma$ ) is produced by lymphocytes and has a variety of biological properties. Measurement of hIFN- $\gamma$  is widely used for various immunological responses for allergic or autoimmune diseases. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is an established immunoassay used to quantify cellular metabolites or cytokines. ELISA requires many incubation and wash steps and is not practically suitable for screening large numbers of samples.

**Methods:** We have developed a fluorescence-linked immunosorbent assay (FLISA) method for the detection of hIFN- $\gamma$ . We measured the 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) value of the hIFN- $\gamma$  production by interleukin (IL)-18 binding protein and anti-IL-18 monoclonal antibody. The IC<sub>50</sub> described by FLISA was compared with that by ELISA.

**Results:** We developed a new system for measuring hIFN- $\gamma$  using Allophycocyanine (APC) fluorescent protein and compared it with the previous method using Cy5.5. The proposed FLISA had a smaller coefficient of variation than ELISA, and the means of coefficient of variation using the same samples measured by ELISA and FLISA were, respectively, 11.1% and 3.8%, suggesting that the edge effect often giving non-specific results may be smaller in FLISA than in ELISA.

**Conclusions:** The improved FLISA system proposed is ideally suited for efficient measurements of hIFN- $\gamma$ . This homogeneous and multiplex method will be a powerful tool for high throughput screening for drug discovery research.

## KEY WORDS

enzyme-linked immunosorbent assay, fluorescence-linked immunosorbent assay, fluorometric microvolume assay technology, high-throughput screening, interferon-gamma

## INTRODUCTION

Several studies have shown that cytokines participate in the induction and effector phases of inflammatory responses in allergies. Studies of the cytokine network are important for identifying candidates for drugs or drug targets. In addition, measurement of cytokines is required for screening of drugs.<sup>1</sup> The regulation of human interferon-gamma (hIFN- $\gamma$ ) is particularly important for protective immunity in Th1 cells.<sup>2</sup> hIFN- $\gamma$  is implicated with interleukin (IL)-12 in the adoption of a Th1 phenotype. On the other hand, Th2 cytokines such as IL-4, IL-5, IL-10, and IL-13 af-

fect allergic responses.<sup>3,4</sup> Many studies have shown that hIFN- $\gamma$  secretion associated with IL-12 or IL-18 plays an important role in the Th1 and Th2 balance.<sup>5,6</sup> Hence, measurement of hIFN- $\gamma$  has been widely used for monitoring immune responses in allergic diseases such as atopic dermatitis.<sup>7,8</sup>

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is an established immunoassay used to quantify various cytokines. Conventional ELISA, which is not readily amenable for screening large numbers of samples in drug screenings, requires many processes and large quantities of antibody. For drug discovery and development, high throughput screening (HTS) would

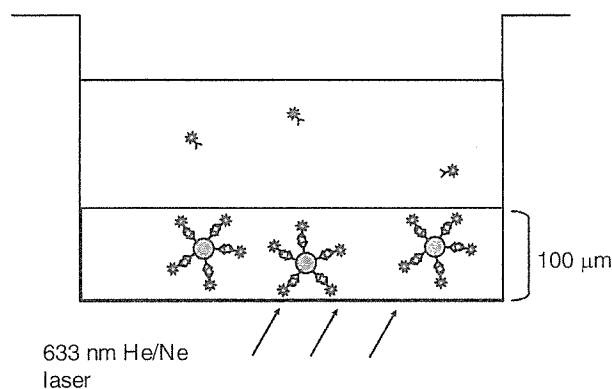
<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Gifu University, Gifu and <sup>2</sup>Applied Biosystems Japan, Ltd., Tokyo, Japan. Correspondence: Zenichiro Kato, M.D., Ph.D., Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, 1-1 Gifu University, Yanagido, Gifu 501-1193, Japan.

Email: zen-k@cc.gifu-u.ac.jp

Received 4 February 2005. Accepted for publication 5 July 2005.

©2006 Japanese Society of Allergology





**Fig. 1** Homogeneous assay is the main characteristic of FLISA. An FMAT<sup>®</sup> 8100 HTS has a macro confocal imaging system with a helium/neon laser, which automatically focuses on and scans fluorescent-bound beads resting on the bottoms of multiwell trays. Because the depth of focus, 100 µm, is small in comparison with the remaining volume, background fluorescence is minimal in relation to bead-bound fluorescence; thus, there are no washing steps to remove unbound fluorophores.

benefit from an immunoassay that requires minimal manipulation and uses just a small amount of the compounds required. Fluorescence-linked immunosorbent assay (FLISA) is particularly well suited for HTS.<sup>9</sup>

We have developed a FLISA method for the measurement of hIFN- $\gamma$ . We constructed the assembly of capture antibody and fluorescent conjugated detection antibody for our FLISA system. This system enables high throughput measurement of hIFN- $\gamma$  and could be applied to the assessment of other cytokines or chemical mediators in allergic responses.

## METHODS

### INSTRUMENTATION

A fluorescent microvolume assay technology (FMAT<sup>®</sup>) instrument consists of a detector (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) integrated with a bar code reader and robotic plate handler (Zymark Corp, MA, USA) that can accommodate 60 plates. An FMAT<sup>®</sup> 8100 HTS has a macro confocal imaging system with a helium/neon (He/Ne) laser (633 nm) which automatically focuses on and scans fluorescent-bound beads resting on the bottoms of multiwell trays. The laser performs 256 scans across an area 1 mm  $\times$  1 mm  $\times$  100 µm deep (Fig. 1). Because the depth of focus, 100 µm, is small in comparison with the remaining volume, background fluorescence is minimal in relation to bead-bound fluorescence; thus, there are no washing steps to remove unbound fluorophores. The emitted fluorescence passes through the same optical path as the excitation beam and through a dichroic beam splitter for detection by photomultiplier

tubes through the filters (680–730 nm).

### PREPARATION OF ANTIBODY COATED BEADS

200 µl of streptavidin beads (0.5% w/v; 6 µm bead diameter; SVP-60-55, Spherotech, were diluted in 800 µl of phosphate-buffered saline (PBS) + 0.01% sodium azide (NaN<sub>3</sub>). After centrifugation at 10,000 *g* for 2 minutes, the supernatant was discarded and resuspended in 1 ml of PBS + 0.01% NaN<sub>3</sub>. Next, a 4 µg portion of biotinylated mouse anti-hIFN- $\gamma$  monoclonal antibody (mAb) (AHC4539, Biosource, California, USA) was added to the streptavidin beads solution and incubated with gentle mixing for 18 hours at room temperature. Washing was repeated 2 times and the capture antibody coated beads were stocked in PBS + 0.01% NaN<sub>3</sub> ( $8.4 \times 10^6$  beads/ml) at 4°C.

### PREPARATION OF RECOMBINANT hIL-18 PROTEIN

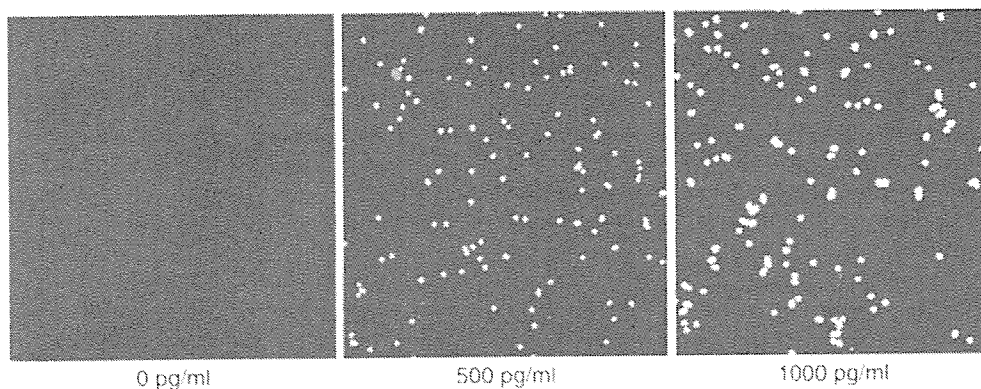
We used recombinant wild-type hIL-18 for the inhibition assay. Expression and purification were carried out as described previously with minor modifications.<sup>10-12</sup> The concentration of purified hIL-18 protein was estimated using the absorbance constant (6160) for hIL-18.

### PREPARATION OF hIFN- $\gamma$ BIOLOGICAL SAMPLE

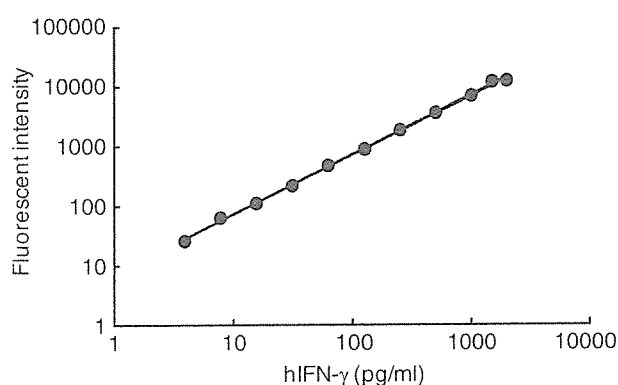
hIL-18 inhibition assay based on hIFN- $\gamma$  induction was carried out as previously described.<sup>13,14</sup> Briefly, human myelomonocytic KG-1 cells (ATCC CCL246) were grown in a culture medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, L-glutamine (2 mmol/L), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL). hIL-18 prepared at our laboratories (in a final concentration of 2 ng/ml) was preincubated with anti-hIL-18 mAb (Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan) or hIL-18 binding protein Fc chimera (IL-18BP) (Research and Development Systems Inc, Minneapolis, USA) (in final concentrations between 0 and 500 ng/ml) at 37°C for 1 hour and then 100 µl of the mixture added to 100 µl of KG-1 cells ( $3 \times 10^6$  cells/ml) per well in a 96-well plate (Nunc, Roskilde, Denmark), followed by incubation at 37°C for 24 hours in 5% CO<sub>2</sub>. The culture supernatants were collected, and the hIFN- $\gamma$  production in each of the samples was determined by ELISA (Japan Immunoresearch Laboratories, Co. Ltd., Takasaki, Japan) and FLISA. Data are presented as the percent inhibition of total hIFN- $\gamma$  production in the absence of hIL-18 antagonists. IC<sub>50</sub>, the concentration of antagonists required to inhibit 50% of hIFN- $\gamma$  production by KG-1 cells stimulated with hIL-18, was then calculated.

### FLUOROMETRIC MICROVOLUME IMMUNOASSAY FOR hIFN- $\gamma$

A 50 µl aliquot of sample or hIFN- $\gamma$  standard (Research and Development Systems Inc) was placed



**Fig. 2** Detection of fluorescence-linked beads in the wells with various concentrations of hIFN- $\gamma$ . The intensity of the bead-bound fluorescence increased according to the hIFN- $\gamma$  concentration.



**Fig. 3** The standard curve for hIFN- $\gamma$  obtained with FLISA. The linear dynamic range for hIFN- $\gamma$  was 3.9–1,500 ng/ml. Each data point represents the average of triplicate assays.

into a 96-well plate. 50  $\mu$ l of beads mixture (antibody beads:allophycocyanin (APC) conjugated mouse anti-hIFN- $\gamma$  mAb (554702, Pharmingen, California, USA):FLISA buffer (PBS, 1% BSA, 0.35 M NaCl, 0.1% Tween-20, 0.01% NaN<sub>3</sub>) = 100:6.4:6500) was then mixed with the sample or standard in each well and incubated for 4 hours overnight at room temperature in the dark. After incubation, the 96-well plate was scanned using the FMAT<sup>®</sup> scanner. The average fluorescence per bead was recorded.

## RESULTS

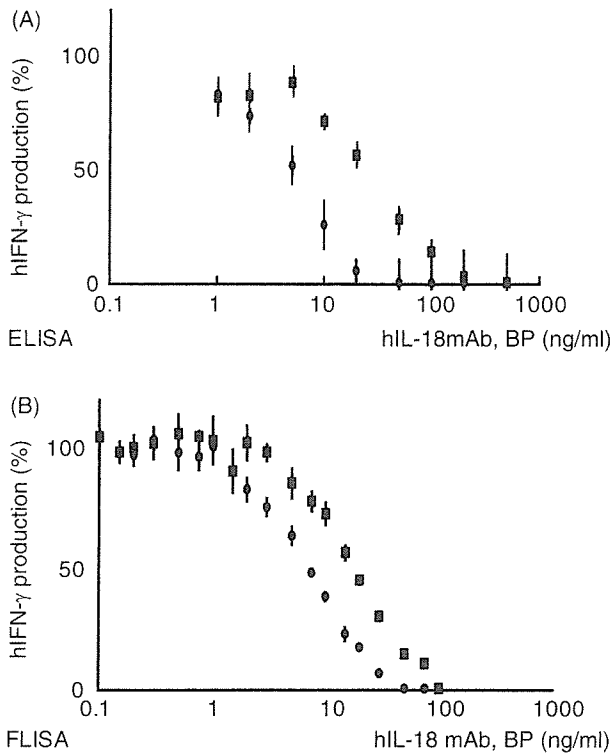
FMAT<sup>®</sup> 8100 HTS includes a bead-based assay system and is designed to negate the unbound fluorescent dye-labeled antibody. At measurement, FMAT<sup>®</sup> scans for fluorescent-bound beads resting on the bottom of multiwell trays (Fig. 1). No beads are found in the upper portions of the wells and non-specific fluorescence is not involved in background fluorescence intensity. In the lower 100  $\mu$ m of the wells, the signals of unbound fluorescent dye-labeled antibody are deleted due to the limited size and form of the beads. Actually, the fluorescence intensity of negative con-

trol wells is 31.6 + / - 2.1 and that of the wells, which have 3.9 pg/ml of the minimum IFN- $\gamma$  is 77.2 + / - 4.9. This is an obvious difference between negative control wells and minimum IFN- $\gamma$  wells.

A standard solution of hIFN- $\gamma$  was two-fold serially diluted in RPMI-1640 + 10% FCS. The intensity of the bead-bound fluorescence increased according to hIFN- $\gamma$  concentration (Fig. 2). A standard curve for hIFN- $\gamma$  was generated using the FMAT<sup>®</sup> scanner (Fig. 3). The linear dynamic range of hIFN- $\gamma$  by FLISA was 3.9–1500 pg/ml. These results indicate that our system can recognize minute changes of hIFN- $\gamma$  values. With previously established methods for IL-6 and IL-8, the linear dynamic ranges were 15.6–1000 pg/ml and 15.6–2000 pg/ml, respectively. Our FLISA system has an equivalent dynamic range comparable to these results,<sup>9</sup> a range that is sufficient to be applied in clinical use.

To test whether FLISA could accurately quantify hIFN- $\gamma$  in a biological sample, inhibition assays of hIL-18 were performed.<sup>15,16</sup> We measured about 150 samples using FLISA and about 90 samples using ELISA. Sample preparation time of FLISA was equal to that of ELISA. hIFN- $\gamma$  produced by KG-1 cells was measured using ELISA and FLISA (Figs. 4A, 4B). hIL-18 was neutralized by anti-hIL-18mAb or IL-18BP before stimulation. The IC<sub>50</sub>s for anti-hIL-18mAb and hIL-18BP using FLISA were 19.7 ng/ml and 5.2 ng/ml, respectively (Fig. 4B). Similarly, those using ELISA were estimated as 27 ng/ml and 5.4 ng/ml, respectively (Fig. 4A). However, as shown in Figure 4, the results of ELISA did not show a regression curve suitable for estimating precise IC<sub>50</sub> values. The means of the coefficient of variation using the same samples measured by ELISA and FLISA were respectively 11.1% and 3.8%, suggesting that the edge effect often giving non-specific results may be smaller in FLISA than in ELISA.

Our proposed FLISA method was modified to use a combination of capture antibody and fluorescent dye-labeled detection antibody. As shown in Figure 5,

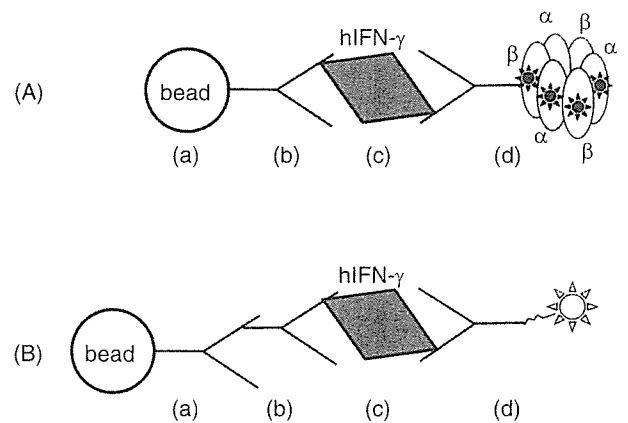


**Fig. 4** Inhibition assay of hIL-18 by hIL-18BP or anti-hIL-18 mAb. hIL-18 (final concentration 2 ng/ml) was incubated with two-fold dilutions of anti-hIL-18 mAb or hIL-18BP for 1 hour at 37°C. After this incubation, the mixtures were added to KG-1 cells, and after 24 hours hIFN- $\gamma$  was measured. The stimulation control of hIL-18 (2 ng/ml) was set at 100%, and the percent change was calculated for each concentration of anti-hIL-18mAb or hIL-18BP. Each data point represents an average of triplicate assays. **(A)** The inhibition curve measured by ELISA. **(B)** The inhibition curve measured by FLISA. The solid circle shows the inhibition of hIL-18 by hIL-18BP. The solid square shows the inhibition of hIL-18 by anti-hIL-18 mAb.

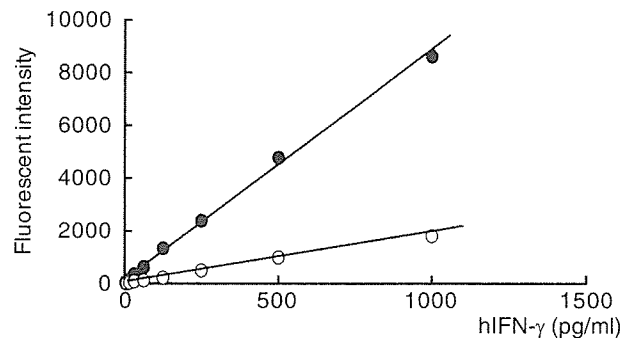
streptavidin beads and a biotinylated mouse anti-hIFN- $\gamma$  mAb were used as IFN- $\gamma$  capture particles and APC conjugated mouse anti-hIFN- $\gamma$  mAb was used as the IFN- $\gamma$  detection reagent. Previously, goat anti-mouse IgG (Fc) beads and mouse anti-hIFN- $\gamma$  mAb have been used as the IFN- $\gamma$  capture particles and Cy 5.5 conjugated mouse anti-hIFN- $\gamma$  mAb as the IFN- $\gamma$  detection reagent. Figure 6 shows our standard curve for IFN- $\gamma$  estimated IFN- $\gamma$  values in detail compared with that from the previously proposed FLISA method.

**DISCUSSION**

When measuring various cytokines, the effect of the environmental temperature is one of the factors influencing inter-experimental accuracy. ELISA requires washing and application of a detection antibody fol-



**Fig. 5** Schematic diagram of our FLISA method **(A)** and a previous method **(B)**. **(A)**: (a) streptavidin beads. (b) biotinylated mouse monoclonal anti-hIFN- $\gamma$  mAb. (c) hIFN- $\gamma$  sample. (d) APC conjugated mouse monoclonal anti-hIFN- $\gamma$  mAb beads. **(B)**: (a) goat anti-mouse IgG(Fc) beads. (b) mouse anti-hIFN- $\gamma$  mAb. (c) hIFN- $\gamma$  sample. (d) Cy5.5 conjugated mouse anti-hIFN- $\gamma$  mAb.



**Fig. 6** The standard curve for hIFN- $\gamma$  obtained with our newly proposed FLISA method (solid circles) and the previously reported FLISA method (open circles). The sensitivity of our method was about four-fold higher than that of the previously reported method.

lowing the first incubation, and washing and application of a detecting reagent following the second incubation. On the other hand, with FLISA, measurements can be performed following the first incubation. In all ELISA steps it is therefore very easy to expose the samples to environmental temperatures. The edge effect, which is the difference in temperature between the outer and inner wells, is therefore one of the factors resulting in inter-experimental errors.<sup>17,18</sup> Accurate screenings are very much required in working toward drug discoveries.<sup>19,20</sup>

We used two kinds of mouse hIFN- $\gamma$  mAb in our FLISA method; one a capture antibody, the other an APC conjugated antibody as a detection antibody. Measurements of hIFN- $\gamma$  in a previous report used a

goat anti-mouse IgG antibody as the bead-coating antibody and two kinds of mouse anti-hIFN- $\gamma$  mAb, a capture antibody and a Cy5.5 conjugated antibody (Fig. 5).<sup>21</sup> The sensitivity of our proposed FLISA method was about four-fold higher than that of previous methods (Fig. 6). That is, the minimum unit for measurement in our method is four times smaller; 0.5 pg/ml/fluorescence (FL) in the previous method by Komatsu *et al.*, 0.125 pg/ml/FL in our method. Therefore, we were able to obtain detailed IFN- $\gamma$  values. The sensitivity of the FLISA method proposed in this paper allowed the discrimination between differences.

The sensitivity of each method may depend on the structural difference between APC and Cy5.5. One APC molecule binds to one antibody. The APC is a trimer that consists of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub>. Each subunit has one fluorophore; so as a result an APC conjugated antibody contains six fluorophores (Fig. 5A).<sup>22</sup> However, one Cy5.5 binds to one antibody, and the Cy5.5 is a single fluorophore itself. Thus an antibody conjugated Cy5.5 has one fluorophore (Fig. 5B). Although the fluorescent dye/antibody ratio of APC is equal to that of Cy5.5, an APC conjugated antibody has six times as many fluorophores as a Cy5.5 conjugated antibody. The difference in fluorescence intensity may also be a factor increasing sensitivity.

To quantify hIFN- $\gamma$  in large amounts of sample, we developed a more efficient assay method than conventional ELISA, which can involve many incubation and washing steps, and requires large amounts of antibodies.<sup>9</sup> In contrast, our FLISA method is a homogeneous bead-based immunoassay that requires no wash steps. Over 100-fold less capture antibody is needed in FLISA than in conventional ELISA.<sup>7</sup> However, the most striking difference is the time required for the assay. In our study, the occupation time of the FLISA method was about 1 hour, demonstrating that FLISA can be performed in a much shorter time than conventional ELISA, which requires about 5 hours.<sup>23</sup> A minimal time requirement is a crucial factor for applications such as HTS in drug discovery research. FLISA is thus an attractive method as it involves less hands-on time and lower running costs.<sup>21</sup>

In immunological studies using FLISA, measurements of IL-6 and IL-8 and CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> lymphocyte counts in whole blood have been reported.<sup>9,24</sup> The bead-based system of the FLISA is readily applicable to any other plate-based assay, such as non-radioactive kinase, phosphatase, and protease assays. A multiplexed bead-based receptor-ligand binding assay has already been demonstrated using FLISA.<sup>25,26</sup> In addition, FLISA is capable of detecting and quantifying fluorescence on live cells, allowing for such diverse assays as apoptosis and cytotoxicity, and cellular immunoassays, and receptor ligand binding assays.<sup>25-28</sup> The FLISA system can be adapted for HTS

of large libraries of chemical and natural products, thus having a place in any laboratory that routinely performs multiple, repetitive assays.

## REFERENCES

1. Kelso A. Cytokines and their receptors; an overview. *Ther. Drug Monit.* 2000;**22**:40-43.
2. Zhu H, Yang J, Murphy TL *et al.* Unexpected characteristics of the IFN-gamma reporters in non-transformed T cells. *J. Immunol.* 2001;**167**:855-865.
3. Tran EH, Prince EN, Owens T. IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J. Immunol.* 2000;**164**:2759-2768.
4. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* 1997;**15**:749-795.
5. Ohnishi H, Kato Z, Watanabe M *et al.* Interleukin-18 is associated with the severity of atopic dermatitis. *Allergol. Int.* 2003;**52**:123-130.
6. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;**12**:53-72.
7. Shikano H, Kato Z, Kaneko H *et al.* IFN-gamma production in response to IL-18 or IL-12 stimulation by peripheral blood mononuclear cells of atopic patients. *Clin. Exp. Allergy* 2001;**31**:1263-1270.
8. Kondo N, Matsui E, Kaneko H *et al.* Genetic defects in downregulation of IgE production and a new genetic classification of atopy. *Allergol. Int.* 2004;**53**:77-85.
9. Swartzman EE, Miraglia SJ, Mellentin-Michelotti J, Evangelista L, Yuan PM. A homogeneous and multiplexed immunoassay or high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology. *Anal. Biochem.* 1999;**271**:143-151.
10. Kato Z, Jee J, Shikano H *et al.* The structure and binding mode of interleukin-18. *Nat. Struct. Biol.* 2003;**10**:966-971.
11. Omoya K, Kato Z, Matsukuma E *et al.* Systemic optimization of active protein expression using GFP as a folding reporter. *Protein Expr. Purif.* 2004;**36**:327-332.
12. Li A, Kato Z, Ohnishi H *et al.* Optimized gene synthesis and high expression of human interleukin-18. *Protein Expr. Purif.* 2003;**32**:110-118.
13. Konishi K, Tanabe F, Taniguchi M *et al.* A simple and sensitive bioassay for the detection of human interleukin-18/interferon- $\gamma$ -inducing factor using human myelomonocytic KG-1 cells. *J. Immunol. Methods* 1997;**209**:187-191.
14. Wu C, Sakorafas P, Miller R *et al.* IL-18 receptor beta-induced changes in the presentation of IL-18 binding sites affect ligand binding and signal transduction. *J. Immunol.* 2003;**170**:5571-5577.
15. Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T *et al.* Cloning of a new cytokine that induces IFN- $\gamma$  production by T-cells. *Nature* 1995;**378**:88-91.
16. Ushio S, Namba M, Okura T *et al.* Cloning of the cDNA for human IFN- $\gamma$ -inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J. Immunol.* 1996;**156**:4274-4279.
17. Oliver DG, Sanders AH, Hogg RD, Hellman JW. Thermal gradients in microtitration plates. Effects on enzyme-linked immunoassay. *J. Immunol. Methods* 1981;**42**:195-201.
18. Shekarchi IC, Sever JL, Lee YJ, Castellano G, Madden DL. Evaluation of various plastic microtiter plates with