

Fig. 1 アトピー性皮膚炎病巣部でのSOCS3の発現

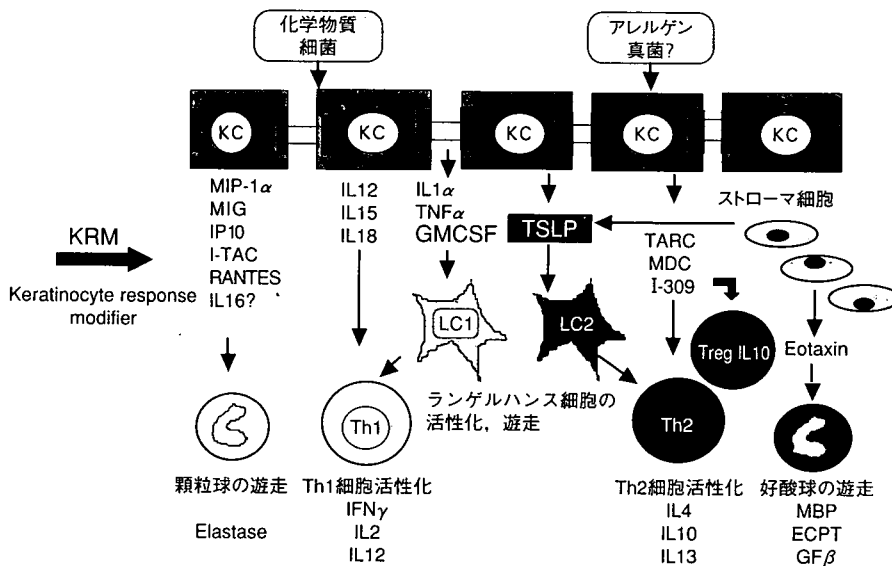


Fig. 2 アトピー性皮膚炎病巣部でのサイトカインネットワーク

する TSLP (thymic stromal lymphopoietin) と呼ばれる新規サイトカインがアトピー性皮膚炎病変部ケラチノサイトで強く発現していることが報告された⁹⁾。TSLP は IL7 と IL7R α を共有するが、IL7R γ c (IL7) と異なる TSLPR を用いている。TSLP は皮膚ケラチノサイトや肺線維芽細胞などのストローマ細胞より特異的に産生されることが明らかにされた。TSLP は Th1 疾患である接触皮膚炎や SLE では全く発現が見られず AD のような Th2 優位の病態下で誘導される可能性が強いと考えられる。このような病態にも SOCS3/SOCS5 による調節機序が作働しているのかもしれない。さらに興味深いことに AD 病変部では TSLP の高発現と近接して DC-LAMP⁺ 細胞の活性化 LC が多数観察されるとの報告がある (Fig. 2)。AD 患者血清での検討においては、最近 Th2 ケモカインの TARC や MDC などの血清レベルが AD の重症度と相関するという報告がなされているが相反する報告もあり今後の検

討が必要と考えられる¹⁰⁾。我々は Th1 ケモカインである IP10 の血漿レベルが軽症例で上昇し、重症化にともない正常化することを見いだしているが¹¹⁾、Th1/Th2 バランス説から考えるとお互いに AD の発症、進展への負の制御機構が存在する可能性も考えられるかと思われる。

皮膚リモデリングとサイトカイン

近年急性炎症から慢性炎症への移行や自然免疫から獲得免疫への移行に間葉系のストローマ細胞の役割が注目されている。ストローマ細胞としての線維芽細胞の役割が以下のような実験結果から明らかになりつつある¹²⁾。線維芽細胞の膜面上に存在する CD40 と炎症細胞から産生される CD40L の相互作用により線維芽細胞より産生される IL6, IL8, COX-2, ムコ多糖などが急性期の炎症を誘導する。NF κ B 伝達系で重要な役割を担う ReLBk/oマ

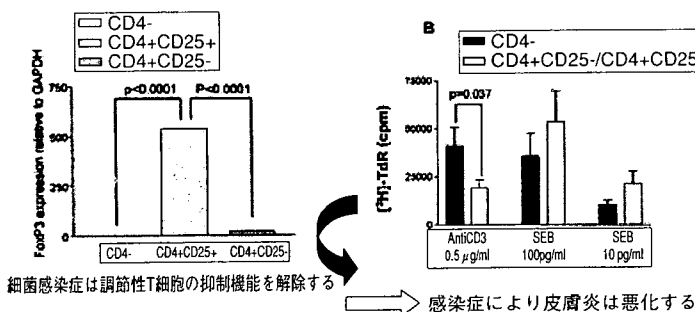


Fig. 3 調節性T細胞 (Treg) と感染症 (文献23より引用)

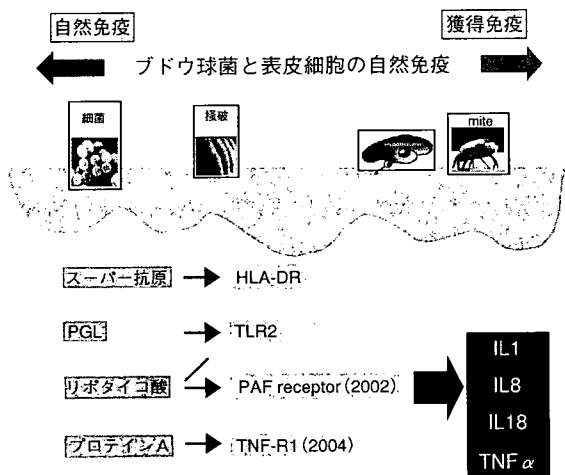


Fig. 4 ブドウ球菌と表皮細胞の自然免疫

ウスでは線維芽細胞の活性化 (Hyperreactive fibroblast) が生じ、多様なケモカイン産生と全身組織への著明な炎症細胞の浸潤により多臓器障害が生じることが報告されている。さらに線維芽細胞は SDF-1 (stroma-cell derived factor-1) を産生し、CXCR4陽性細胞の局所への浸潤を誘導するがその過剰産生により炎症細胞の局所への定着を延長させ、同じく線維芽細胞から産生される IFNβは炎症細胞のアポトーシスを抑制することにより炎症反応を遷延化させる。このような炎症細胞の局所からの消退機構の負の制御により慢性、遷延性の反応が生じると考えられている。AD慢性病巣の真皮では、真皮乳頭の延長、線維芽細胞の増殖亢進、コラーゲン線維の増加、末梢神経の増生、表皮内への伸展、血管の増生、血管内皮細胞接着分子の発現増強、粘膜型肥満細胞の増加、Th2型リンパ球、好酸球の浸潤、線維芽細胞のエオタキシン発現増強などの所見が見られる¹³⁾。組織肥満細胞より遊離したヒスタミンなどのケミカルメディエーターや TNFα, IL4, IL5などのサイトカインにより即時型と遅発型のいわゆるアレルギー性の炎症が生じる。IL4は血管内皮細胞に VCAM-1などの好酸球特異的細胞接着分子の発現誘導、線維芽細胞よりのエオタキシンなどの好酸球遊走性

ケモカイン産生を介して炎症反応を増幅させる¹⁴⁾。好酸球は TGFβなどの線維芽細胞増殖因子を産生することによりコラーゲンなどの細胞外マトリックスの産生、沈着を誘導すると考えられている。我々は精神的なストレスで神経終末より遊離されると考えられていたサブスタンスPが表皮ケラチノサイトなどの非神経細胞よりも自律性に誘導されること¹⁵⁾、サブスタンスPやヒスタミンが IL4誘導性の線維芽細胞よりのエオタキシン産生を著明に増幅させることを明らかにした^{16, 17)}。我々はまたサブスタンスPやヒスタミンが TGFβや PDGFなどによる線維芽細胞の増殖を亢進させることを報告している¹⁸⁾。このような実験的な事実から考えると、ADの慢性病巣の真皮ではアレルギー性の機序で生じた結合織の増生を非アレルギー的な機序やストレスなどで遊離されたサブスタンスPが増幅し、慢性化、難治化に向かわせる可能性も考えられる。このような一連の組織反応の中心的役割を果たすと考えられる TGFβに関しては喘息などの Th2性のアレルギー炎症での結合組織の増生などいわゆるリモデリングに関与すると考えられているが IgE産生を抑制するという実験的な事実も報告されており、喘息におけるパラドックスとしてその意義が再検討されている¹⁹⁾。実際我々の検討結果においても TGFβは IL4誘導性のエオタキシン産生を亢進させることが明らかになった²⁰⁾。

Th2 polarization と調節性 T 細胞

我々はAD患者のダニ貼付試験を施行した際、コントロールとしたテープストリッピングによる角質剥離のみ行った部位にも、ICAM-1などの細胞接着分子や LFA-1陽性のリンパ球浸潤を認めた²¹⁾。この現象の解釈として当時以下のような仮説を立てた。機械的な刺激のみでもケラチノサイトがサイトカインを産生し細胞接着分子の発現や、ケモカイン産生を誘導し、炎症の準備状態を作り出す。このような条件下で感染症や薬剤などアトピーアレルギーと関係のない因子により末梢血に細胞接着分子を発現したリンパ球が誘導されておれば、皮膚と循環

血中で異なる要因により誘導されたケラチノサイトとリンパ球により湿疹反応を生じるという考え方である²²⁾。最近ブドウ球菌由来スーパー抗原がアトピー性皮膚炎患者において調節性細胞 (regulatory T cell) の抑制作用を負に制御し、アレルギー反応を悪化させるとの報告がある²³⁾。ニッケルなどの接触皮膚炎病変部でもCCR8陽性の調節性細胞が存在し、そのリガンドであるCCL1 (I-309) の発現が見られる事が報告されている²⁴⁾。これらの報告より、ADにおいてもブドウ球菌の感染により、皮膚炎が増幅され湿疹反応がより強く発現し、より重篤な皮膚炎に進展するのかもしれない。なお最近、調節性T細胞への影響に加え、Fig. 4に示すようなブドウ球菌由来因子が異なる細胞表面レセプターを介して様々な表皮細胞の増殖や自然免疫型の免疫応答を誘導することが報告されており^{25, 26)}、今後の展開が期待される。

文 献

- Mihm MC Jr, Soter NA, Dvorak HF, Austen KF : The structure of normal skin and the morphology of atopic eczema. *J Invest Dermatol* 1976 ; 67 : 305-312
- Katayama I, Miyazaki Y, Nishioka K : Topical vitamin D3 (tacalcitol) for steroid-resistant prurigo. *Br J Dermatol* 1996 ; 135 : 237-240
- Vestergaard C, Bang K, Gesser B et al : A Th2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA+CCR4+ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin. *J Invest Dermatol* 2000 ; 115 : 640-646
- Katayama I, Bae SJ, Hamasaki Y et al : Stress response, tachykinin and cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol symposium proceeding* 2001 ; 6 : 81-86
- Katayama I, Yokozeki H, Nishioka K : Mast-cell-derived mediators induce epidermal cell proliferation: clue for lichenified skin lesion formation in atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 1992 ; 98 : 410-414
- Takayama K, Yokozeki H, Ghoreishi M et al : IL-4 inhibits the migration of human Langerhans cells through the downregulation of TNF receptor II expression. *J Invest Dermatol* 1999 ; 113 : 541-546
- Bailey, D. P. M. Kashyap, P. Mirmonsef et al : Interleukin - 4 elicits apoptosis of developing mast cells via Stat 6-dependent mitochondrial pathway. *Exp Hematol* 2004 ; 32 : 52-59
- Horiuchi Y, Bae SJ, Katayama I : Overexpression of the suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) in severe atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 2006 ; 31 : 100-104
- Soumelis V, Reche PA, Kanzler H et al : Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nature Immunol* 2002 ; 3 : 673-678
- Hijnen D, De Bruin-Weller M, Oosting B et al : Serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and cutaneous T cell- attracting chemokine (CTACK) levels in allergic diseases : TARC and CTACK are disease-specific markers for atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2004 ; 113 : 334-340
- Villagomez MT, Bae SJ, Ogawa I, Takenaka M, Katayama I : Tumour necrosis factor-alpha but not interferon-gamma is the main inducer of inducible protein-10 in skin fibroblasts from patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2004 ; 150 : 910-916
- Buckley CD, Pilling D, Lord JM et al : Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol* 2001 ; 22 : 199-204
- Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA : New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest* 2004 ; 113 : 651-657
- Bae SJ, Tanaka Y, Ogawa F et al : Inhibitory effect of cetirizine on histamine induced eotaxin production in normal human fibroblasts. *Current Therap Res* 2002 ; 63 : 128-140
- Bae S, Matsunaga Y, Tanaka Y, Katayama I : Autocrine induction of substance P mRNA and peptide in cultured normal human keratinocytes. *BBRC* 1999 ; 263 : 327-333
- ベ・サンゼ, 片山一朗 : ヒト線維芽細胞におけるIL13誘導性エオタキシン産生に対するフマル酸エメダスチンの効果. *アレルギー・免疫* 2002 ; 9 : 48-52
- 室田浩之, 中村敏明, 片山一朗 : ヒト樹状細胞のTARC産生におけるヒスタミンの影響と抗ヒスタミン薬. *アレルギー・免疫* 2005 ; 12 : 19-26
- Katayama I, Nishioka K : Substance P augments fibrogenic cytokine-induced fibroblast proliferation : possible involvement of neuropeptide in tissue fibrosis. *J Dermatol Sci* 1997 ; 15 : 201-206
- Rook GA : The TGF-beta1 paradox in asthma. *Trends*

- Immunol 2001 ; 22 : 299-300
20. ベ・サンゼ, 竹中 基, 濱崎洋一郎, 片山一朗 : Th2リンパ球と間質細胞のクロストークから見た皮膚リモデリング. 西日皮膚 2002 ; 64 : 502-503
21. Matsunaga T, Katayama I, Yokozeki H, Nishioka K : ICAM-1 expression on keratinocytes in mechanically-injured skin of a patient with atopic dermatitis. J Dermatol Sci 1996 ; 12 : 219-226
22. 片山一朗 : アトピー性皮膚炎・キーワードとその考え方(2) 皮膚のバリアー機能: 非免疫学的側面からみたアトピー性皮膚炎. 西日本皮膚科 1998 ; 60 : 674-680
23. Ou LS, Goleva E, Hall C, Leung DY : T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. J Allergy Clin Immunol 2004 ; 113 : 756-763
24. Cavani A, Nasorri F, Prezzi C et al : Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. J Invest Dermatol 2000 ; 114 : 295-302
25. Gomez MI, Lee A, Reddy B et al : Staphylococcus aureus protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. Gomez MI et al. Nat Med 2004 ; 10 : 842-848
26. Lemjabbar H, Basbaum C : Platelet-activating factor receptor and ADAM10 mediate responses to Staphylococcus aureus in epithelial cells. Nat Med 2002 ; 8 : 41-46

Cytokine Network in Atopic Dermatitis

Ichiro Katayama and Hiroyuki Murota

Department of Dermatology Integrated Medicine
Graduate School of Medicine, Osaka University
2-2, Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Key words : *Atopic dermatitis, Cytokine, Chemokine, Regulatory T cells, Innate Immunity*

It has been accepted that atopic dermatitis is regarded as Atopic Eczema/Dermatitis syndrome on the basis of clinical manifestations and recent advance on the pathomechanisms of atopic dermatitis. These include innate-type atopic dermatitis and acquired-type atopic dermatitis or intrinsic atopic dermatitis and extrinsic atopic dermatitis.

These recognitions are very important to manage the refractory patients with atopic dermatitis. In this review, I would like to summarize the recent findings on cytokine network in atopic dermatitis.

Skin Research, Suppl. 7 : 11 - 16, 2006

日本, 中国 (江蘇省・チベット自治区) の学童における アトピー性皮膚炎・皮膚バリア機能調査

1) 市立豊中病院皮膚科

2) 大阪大学大学院医学系研究科内科系臨床医学専攻情報統合医学講座皮膚科学教室

3) 南京医科大国際アレルギーセンター

4) 南京医科大学第一附属医院耳鼻咽喉科

5) 秋田大学医学部耳鼻科

6) 上海交通大学附属第六人民医院耳鼻咽喉科

7) 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻

8) 関西労災病院皮膚科

9) あおきクリニック・かゆみ研究所

澄川靖之¹⁾²⁾ 上木裕理子²⁾ 三好 彰³⁾ 程 雷³⁾⁴⁾ 殷 敏³⁾⁻⁵⁾
時 海波³⁾⁶⁾ 澄川真珠子⁷⁾ 幸野 健⁸⁾ 青木敏之⁹⁾ 片山一朗²⁾

【目的】日本, 中国におけるアトピー性皮膚炎の有症率と皮膚のバリア機能について調査を行い比較検討を行った。

【方法】中国チベット自治区ラサ市 68 名, 江蘇省宜興市 67 名, 兵庫県西宮市 99 名の小学 1 年生を対象に皮膚科検診を行い, その際に経皮水分蒸散量 (TEWL: transepidermal water loss), 角質水分量 (capacitance) を測定した。またラサ市, 宜興市, 大阪府大阪市の中学 1 年生を対象に入浴回数についてのアンケート調査を行った。

【結果】アトピー性皮膚炎の有症率は, ラサ 0%, 宜興 2.63%, 西宮 4.26% であった。TEWL は西宮が宜興・ラサに比し有意に高く, capacitance はラサが西宮・宜興に比し有意に低かった。また入浴回数はラサで月 2.2 回と西宮・宜興に比べ少なかった。

【結論】TEWL の増加に従いアトピー有症率が増加する傾向がみられた。生活習慣・環境の変化によりアトピー性皮膚炎の有症率や皮膚のバリア機能がどう影響を受けるか今後も調査を行っていく必要があると考えられた。

Key words: atopic dermatitis — bathing custom — capacitance — epidemiology — transepidermal water loss

はじめに

アトピー性皮膚炎は皮膚疾患としてよく知られているが, 病因については諸説あるものの未だに不明である。また, アトピー性皮膚炎の有症率に関する報告は多数みられ, 対象年齢や調査地域, 調査方法などによ

り有症率に開きがみられるが, 先進国工業国で有症率が高いと考えられている。世界の有症率をまとめた報告では日本は最も有症率の高い群に属し, 中国は低い群に属している。この黄色人種間の差異の原因は不明であるが, 環境の相違が重要な因子の一つであることが考えられる。

Received: November 15, 2006

Accepted: May 11, 2007

Abbreviations: AU arbitrary unit; TEWL transepidermal water loss

澄川靖之: 市立豊中病院皮膚科 (〒560-8565 豊中市
柴原町 4-14-1)

E-mail: sumikawa@derma.med.asaka-u.ac.jp

我々は、現在のチベット自治区ラサ市・江蘇省宜興市の生活水準がかつての日本の高度成長期前、高度成長期時代に類似している点に着目し、今後の日本と同様にアトピー性皮膚炎の増加が見られるのかを調べるために定点調査を行っている。今回の調査ではアトピー性皮膚炎の有症率の相違に加えて、皮膚のバリア機能の測定と環境要因として入浴習慣についての調査を行った。さらにかつての日本の各々の時代の状況を再現することができるのではないかと考え、日本を含めた3者の比較検討を行った。

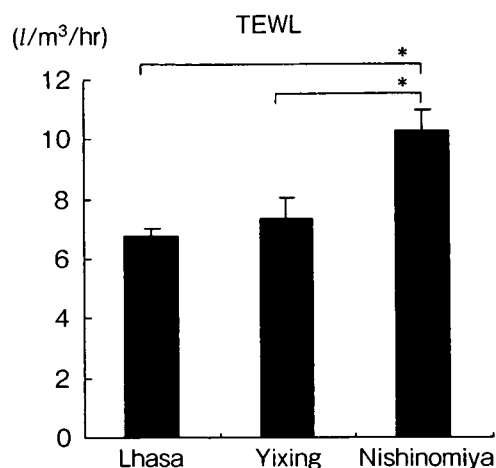
対象と方法

平成17年10月8～12日、チベット自治区ラサ市近郊小学校の1年生68名、中国の地方都市として江蘇省宜興市近郊小学校の1年生67名、平成18年3月22日、小学校入学を控えた日本の兵庫県西宮市の幼稚園児99名の同意の得られた児童を対象に皮膚科検診を行った。皮膚科検診では短時間で多数を診察する必要があったため、両肘窩を含め前腕を診察し、Hanifin-Rajkaの診断基準にある典型的部位である肘窩に紅斑を認める場合をアトピー性皮膚炎陽性と診断した。また、同時に皮膚のバリア機能を評価するために経皮水分蒸散量 (TEWL: transepidermal water loss)、角質水分量 (capacitance) を測定した。測定には corneometer: CM 825 tewameter: TM 300 (courage & Khazaaka, Cologne, Germany) を使用し、プローブを前腕内側の皮疹のない部位に当てることで測定した。測定時の条件は、ラサ: 気温 19℃ 湿度 30%、宜興: 気温 24℃ 湿度 60%、西宮: 気温 20℃ 湿度 52% であった。中国においては9月から新学期になるため、10月の中国における新入学1年生と3月の日本における卒園生では各々の集団の平均年齢が2カ月以内の差と考え、日本の卒園生を小学1年生と同等として扱い、以下小学1年生と表記した。また入浴習慣については小学1年生では質問の内容が理解できなかったため、内容が理解でき、入浴習慣も大幅に異ならないと考えられる中学1年生を対象にラサ市175名、宜興市129名、大阪府大阪市143名にアンケート調査を行った。アンケートでは、入浴回数と石鹸 (ボディークリームを含む) を使用した回数を尋ねた。

統計的解析は、ラサ、宜興、西宮間の比較にANOVAとTukeyを用いて検討した。統計ソフトはSPSS 12.0を用いた。有意水準は、5%未満とし、全ての値は、平

Table 1 Prevalence of atopic eczema in elementary school students in each cities

	Lhasa	Yixing	Nishinomiya
Symptoms of atopic eczema	0/69 (0%)	2/76 (2.6%)	4/94 (4.3%)



ANOVA, Tukey * $p < .05$

Lhasa n=68, Yixing n=66, Nishinomiya n=94

Fig. 1. TEWL in elementary school students in each cities.

均 ± 標準誤差で表記した。

結果

アトピー性皮膚炎の症状を呈する患児の割合は、ラサ69名中0名 (0%)、宜興76名中2名 (2.63%)、西宮94名中4名 (4.26%) であり (Table 1)、宜興では西宮に比較し少なく、ラサでは認められなかった。

TEWLは、ラサ 6.78 ± 0.21 、宜興 7.35 ± 0.72 、西宮 10.3 ± 0.64 (l/m³/hr) であり (Fig. 1)、西宮は中国 (宜興とラサ) に比し有意に高かった。なお宜興とラサ間においては有意な差はなかった。

capacitanceはラサ 23.9 ± 0.67 、宜興 34.2 ± 0.53 、西宮 31.3 ± 0.72 (AU: arbitrary unit) であった (Fig. 2)。ラサは西宮と宜興に比し有意に低く、また西宮と宜興間では、西宮のほうが有意に低かった。

また、現地の中学1年生を対象として入浴習慣を調査したところ、ラサでの入浴回数は個人によるばらつきが多いものの (月1回～6回) 平均月2.2回、石鹸の使用は平均月2.1回であった。一方宜興での入浴回数

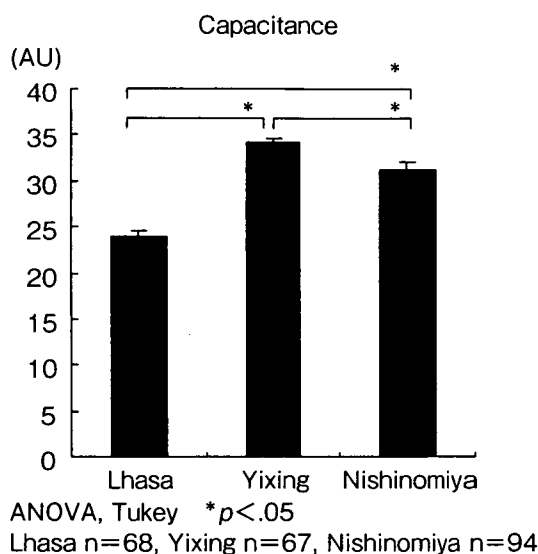


Fig. 2. Skin capacitance (arbitrary unit) in elementary school students in each cities.

Table 2 Frequency of taking a bath and using soap in junior high school students in each cities

	Lhasa (n = 175)	Yixing (n = 129)	Osaka (n = 143)
Taking a bath	2.2/month	6.4/week	7.7/week
Using soap	2.1/month	5.6/week	7.3/week

は平均週 6.5 回、石鹸の使用は平均週 5.6 回であり、大阪の入浴回数平均週 7.7 回、石鹸使用平均週 7.3 回を下回った (Table 2)。

考 察

アトピー性皮膚炎の病態は徐々に解明されつつあるが、未だ不明な点が多い。我々は宜興とラサの学童のアトピー性皮膚炎の有症率を調査するとともに皮膚のバリア機能に着目し、評価のために TEWL, capacitance の測定を行った。またこれらに影響を及ぼすのではないかと考えられた入浴習慣についても質問紙調査を行った。

アトピー性皮膚炎の病態と密接に関連する皮膚のバリア機能の低下メカニズムについては 2 つの仮説が提唱されている。“inside-outside” 仮説は皮膚における炎症が角層を破壊しバリア機能を低下させるという考え方である²⁾。一方、“outside-inside” 仮説は乾皮症などが先行し、皮膚のバリア機能が低下していることにより

アトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患を増悪させるとしている³⁾。この“outside-inside” 仮説によれば、物理的にバリアを破壊されたマウスの表皮角化細胞は TNF- α をはじめ様々なサイトカインを放出する事が知られ⁴⁾、それにより炎症が惹起されると考えられている。この仮説に基づきアトピー性皮膚炎の病態を解析するアプローチの一つとして角質のバリア機能の評価が試みられている。

角質バリア機能を評価する非侵襲的方法として TEWL, capacitance を測定する方法がよく用いられている⁵⁾。アトピー性皮膚炎では皮疹部だけではなく無疹部においても TEWL の上昇を認めると報告されている⁶⁾。一方、capacitance は乾皮症を伴うアトピー性皮膚炎では低下しているが、臨床的に乾皮症を伴っていないアトピー性皮膚炎では正常と変わらないと報告されており、臨床的な乾皮症の有無を評価することが可能である⁷⁾。近年、TEWL や capacitance がアトピー性皮膚炎の臨床スコアと相関すると報告がなされている⁸⁾。これらからアトピー性皮膚炎の病態を解析する上で TEWL, capacitance は有用であると考えられる。またアトピー性皮膚炎患者と健常人で TEWL, capacitance を比較した調査では、手背、前腕内側、背部のいずれの測定においてもアトピー性皮膚炎患者の方が健常人に比較し TEWL が高く capacitance が低かったと報告されている⁹⁾。本調査ではこの結果を踏まえ前腕部のみの測定とした。

本調査結果では西宮、宜興、ラサの小学 1 年生を比較したところ、アトピー性皮膚炎の有症率の上昇に伴い TEWL が上昇する傾向が見られた。このことは、皮膚のバリア機能障害に伴う TEWL の上昇がアトピー性皮膚炎の発症あるいは増悪に関連があることが示唆された。また、角質水分量がラサの小学 1 年生でもっとも低く、臨床的にも乾燥肌に思われた。しかし TEWL も低くアトピー性皮膚炎患児を認めなかったことからラサの小学生の皮膚のバリア機能は保たれているように考えられた。一般的にアトピー性皮膚炎は乾燥する冬場に悪化するといわれているが、乾燥状態の続くチベットにおいてアトピー性皮膚炎は認められなかった。このことから、乾燥した環境に居住すること自体は増悪因子である可能性はあるものの発症に必須な因子ではないのではないかと考えられた。

ドイツの小学生を対象とした調査ではアトピー性皮膚炎患児と健常児の TEWL, capacitance を比較したところ有意な差は認められなかったと報告されてい

る¹⁰⁾。これは児童が十分に室温に順応できなかったため有意な差が出なかったのではないかと推測され、集団調査の場合環境条件を厳密にコントロールするのが困難であると指摘している。今回の調査においても環境の条件をコントロールすることは不可能であるため限界があるものの、TEWL、capacitanceの推奨される測定条件が気温22℃以下、湿度40~60%とされており¹¹⁾、比較的妥当性があると考えられた。また、今後同時期に測定することで経時的変化を観察することは可能と考えられる。

これまでも日本の入浴習慣の調査が行われており、入浴習慣は皮膚の性状を変化させる大きな因子であるとされ、アトピー性皮膚炎予備群の形成に与える可能性があると考えられている¹²⁾。このようにバリア機能・有症率に影響を及ぼす因子として入浴習慣は重要と思われる。日本における月の各年代別入浴回数について調査では、中高生に当たる13~18歳ではほぼ100%毎日入浴していると報告されている¹³⁾。今回の調査においても大阪市の中学生を対象としたアンケート結果でも平均週7.7回であり、ほぼ毎日入浴していると考えられた。入浴の質についての調査では外来患者に対するアンケート調査で80%以上がバスタブ浴であるとの報告¹²⁾や小学生を対象とした調査で1年生の約94%、6年生で90%以上がバスタブ入浴しているという報告¹⁴⁾がある。中国の入浴習慣についての調査を行ったところ、中国での入浴習慣はシャワー浴中心で回数も日本に比べて少なく、特にラサにおいては日本の1割以下であった。一方、昼間のシャワー浴で学童のアトピー性皮膚炎の改善に効果があったという報告もあり¹⁵⁾、入浴回数だけでなく質的な影響もバリア機能・有症率に影響を及ぼした可能性があると考えられた。今後も調査を継続してライフスタイルの変化により回数だけではなく、入浴の質も変化していくかどうか追っていく必要がある。

一方、日本全域の小学生を対象に実施されたアトピー性皮膚炎の有症率調査では、地方によりばらつきがあるものの7.4%から15%程度であったと報告されている¹⁶⁾。ばらつきの要因はアトピー性皮膚炎の有症率に影響を与える因子として季節要因をあげており、検診実施の月により有病率に影響を及ぼした可能性について言及している¹⁴⁾。また別の調査によれば春・秋が夏・冬に比較し瘙痒感は減少していたという報告もある¹²⁾。今回の調査では西宮の有症率は4.7%と低めに出ているが、西宮で調査を行った時期は3月

で比較的的温暖で過ごしやすく、検診時に症状が収まっていた可能性を否定できないと考えられた。一方宜興の調査も10月で過ごしやすい時期であったため有症率が低く出ている可能性がある。

日本で有症率の経時変化をとらえた研究では1992年と2002年で比較したアレルギー疾患有症率の報告がある¹⁷⁾。これによるとアレルギー性鼻炎・結膜炎、喘息は増加しているもののアトピー性皮膚炎は減少(17.8%→13.8%)している。また1992年に比べ2002年では都市部、中間部、非都市部別有症率で差が見られなくなったとしている。これは日本では環境がある一定水準に達し、アトピー性皮膚炎においてはこの10年間で増悪因子が増加していないことを示唆している。また減少している要因には環境が改善した可能性も否定できないが、他のアレルギーが増加していることを考えると日本皮膚科学会がアトピー性皮膚炎の標準治療ガイドラインを確立し、治療が標準化されたことも一因かもしれない。

過去チベットの調査ではアトピー性皮膚炎の有症率は0%であったと報告されている¹⁸⁾。今回の我々の調査でもチベットにおいては0%であった。しかしながら、近年急激に近代化が進められ、また鉄道による輸送も開始されたため今後大量の物資の流入によりライフスタイルが変化していくことが予想される。

片山ら¹⁹⁾は日本における都市部と非都市部におけるアトピー性皮膚炎の有症率が非都市部で少ない原因について言及し都市環境がアトピー性皮膚炎に与える影響について、①住宅、室内環境、②生活様式の都市化、③大気汚染を中心とする都市環境の3つをあげている。現在のラサは通気性のいい石造りの家で気密性は低く食事は伝統的に穀物、乳製品、果物中心である。また車の台数も少なく人力車や自動2輪を改造した車両が人、農作物の運搬に使用されている。一方宜興ではコンクリート造りの建物に冷暖房が取り付けられ、食事も外資系のファーストフード店も見受けられることから西洋化が進んでいると考えられた。車の台数も多く、周辺では高速道路網も発達しつつある。それぞれ日本のかつての高度成長期前、高度成長期に似通っているため、それぞれの地域で今後追跡調査するだけではなく日本を含めた3者を比較することにより各々の時代の状況を現在に再現できるのではないかと考えられた。

本調査では中国沿岸部と特に調査自体行うのが困難であり、今までに報告のないチベット自治区における

アトピー性皮膚炎の有症率、入浴習慣と角層のバリア機能について現状を報告し、それぞれ学童集団における有症率、皮膚のバリア機能、環境因子を比較検討した。本調査では短時間での集団検診という時間的な制約があり、患児であっても皮膚症状のないところ1カ所しか測定できなかった。そのため個々の患児における皮膚の症状、アトピー性皮膚炎の有無、そのほかの環境要因と、皮膚バリア機能との関連性を検討するにいたらなかった。今後時間をかけて調査する機会が得られれば検討課題としたい。

今後生活習慣・社会が変化していくことによりアトピー性皮膚炎の有症率がどう影響されるのかさらなる経時的な調査を行っていく必要があると考えられた。また今回、調査日程や予算的な問題もあり調査人数は100人弱にとどまったが、この調査結果から更なる大規模調査を行うことで新たな知見を得られる可能性が示唆された。

中国での調査に協力いただきました江蘇省宜興市第二人民医院 鮑永生先生・陳衛春先生、宜興市・ラサ市の学校教諭の皆様、一緒に同行し調査を手伝っていただきました東京医療保健大学 上田伸男先生、昭和大学藤ヶ丘耳鼻科 三辺武幸先生、愛知医科大学耳鼻科 稲川俊太郎先生・佐藤圭先生、日本経済新聞社 中村雅美様、天王寺区のアンケート調査でお世話になりました湯川研一先生・浅埜都先生に深く感謝いたします。

文 献

- Williams H, Robertson C, Stewart A, Ait-Khaled N, Anabwani G, Anderson R, et al. Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 125-38.
- Leung DY. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 860-76.
- Elias PM, Wood LC, Feingold KR. Epidermal pathogenesis of inflammatory dermatoses. *Am J Contact Dermat* 1999; 10: 119-26.
- Wood LC, Jackson SM, Elias PM, Grunfeld C, Feingold KR. Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. *J Clin Invest* 1992; 90: 482-7.
- 田上八郎. アトピー性皮膚炎と皮膚のバリア機能. *アレルギー* 2005; 54: 445-50.
- Werner Y, Lindberg M. Transepidermal water loss in dry and clinically normal skin in patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 1985; 65: 102-5.
- Werner Y. The water content of the stratum corneum in patients with atopic dermatitis. Measurement with the Corneometer CM 420. *Acta Derm Venereol* 1986; 66: 281-4.
- Kim DW, Park JY, Na GY, Lee SJ, Lee WJ. Correlation of clinical features and skin barrier function in adolescent and adult patients with atopic dermatitis. *Int J Dermatol* 2006; 45: 698-701.
- Loden M, Olsson H, Axell T, Linde YW. Friction, capacitance and transepidermal water loss (TEWL) in dry atopic and normal skin. *Br J Dermatol* 1992; 126: 137-41.
- Eberlein-Konig B, Schafer T, Huss-Marp J, Darso U, Mohrenschlager M, Herbert O, et al. Skin surface pH, stratum corneum hydration, transepidermal water loss and skin roughness related to atopic eczema and skin dryness in a population of primary school children. *Acta Derm Venereol* 2000; 80: 188-91.
- Pinnagoda J, Tupker RA, Agner T, Serup J. Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis* 1990; 22: 164-78.
- 西岡 清, 荒井美奈. 入浴習慣のアンケート調査. *皮膚病診療* 1997; 19: 1137-42.
- 服部 瑛, 田村多繪子. 入浴と石鹸の使用状況について. *皮膚病診療* 2000; 22: 80-6.
- 占部和敬. 乳児を除く小児アトピー性皮膚炎の疫学. *皮膚の科学* 2004; 4 (増): 5-12.
- 望月博之, 滝沢琢己, 荒川浩一, 加藤政彦, 徳山研一, 森川昭廣, 他. アトピー性皮膚炎に対する小学校でのシャワー浴の有用性. *日見誌* 2003; 107: 1342-6.
- 佐伯秀久. 小学校検診による全国規模のアトピー性皮膚炎有病率調査結果. *皮膚アレルギー学会誌* 2005; 13: 180-6.
- 西間三馨. 西日本小学児童におけるアレルギー疾患有症率調査. *日小ア誌* 2003; 17: 255-68.
- 幸野 健, 青木敏之, 高岡正敏, 上田伸男, 植田美津江, 程 雷, 他. チベット自治区学童のアトピー性皮膚炎調査. *日皮ア誌* 2002; 10: 176-9.
- 片山一郎, 松永 剛, 横関博雄, 西岡 清. 都市環境とアトピー性皮膚炎. *アレルギーの臨床* 1994; 14: 271-4.

A SURVEY OF ATOPIC DERMATITIS AND SKIN BARRIER FUNCTIONS
IN JAPANESE AND CHINESE SCHOOL STUDENTS

Yasuyuki Sumikawa¹⁾²⁾, Yuriko Ueki²⁾, Akira Miyoshi³⁾, Lei Cheng³⁾⁴⁾,
Min Yin³⁾⁻⁵⁾, Hai-Bo Shi³⁾⁶⁾, Masuko Daitoku Sumikawa⁷⁾, Takeshi Kono⁸⁾,
Toshiyuki Aoki⁹⁾ and Ichiro Katayama²⁾

¹⁾*Department of Dermatology, Toyonaka Municipal Hospital*

²⁾*Department of Dermatology Course of Integrated Medicine Graduate School of Medicine, Osaka University*

³⁾*International Center for Allergy Research, Nanjing Medical University*

⁴⁾*Department of Otorhinolaryngology, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University*

⁵⁾*Department of Otolaryngology, Akita University School of Medicine*

⁶⁾*Department of Otorhinolaryngology, Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University*

⁷⁾*School of Health Sciences, Faculty of Medicine, Kyoto University*

⁸⁾*Department of Dermatology, Kansai Rosai Hospital*

⁹⁾*Aoki Dermatology and Allergy Clinic, Laboratory for Itch*

Background: The comparative studies of the prevalence of atopic dermatitis and skin barrier functions in Japanese and Chinese were performed.

Methods: Clinical investigations were performed in 68 elementary school students in Lhasa, Tibet Autonomous Region and 67 students in Yixing, Jiangsu Province in China, and 99 students in Nishinomiya, Hyogo in Japan. Transepidermal water loss (TEWL) and capacitance were measured. Questionary survey about bathing frequency was also performed for students in Lhasa, Yixing and Osaka.

Result: The prevalence rate of atopic dermatitis was 0% in Lhasa, 2.63% in Yixing, 4.26% in Nishinomiya. TEWL of students in Nishinomiya was higher than that in Yixing and Lhasa. Capacitance of students in Lhasa was lower than that in Nishinomiya and Yixing. The frequency of taking a bath in Lhasa was about 2.2 times per month and fewer than that in Nishinomiya and Yixing.

Conclusion: There was tendency that the prevalence of atopic dermatitis increased according to increase of TEWL. It was thought that more investigations are necessary whether the development of habitat and environment influence the prevalence of atopic dermatitis and skin barrier function.

連載シリーズ

アトピー性皮膚炎におけるスキンケア (全4回)

望月 博之

群馬大学大学院小児生体防御学分野

第1回 スキンケアの必要性

1. アトピー性皮膚炎とスキンケア

アトピー性皮膚炎は乳児期からみられる代表的な慢性皮膚疾患である。皮膚の特徴的な湿疹に強い痒みを伴うことが特徴であるが、この疾患は世界的に増加傾向にあること、さらに最近の本邦の調査では10%近くの小児が罹患していることが報告されている。その発症においては、遺伝的な素因と後天的な環境因子の双方の影響が考えられているが、特に家族歴に喘息などのアレルギー疾患がみられる小児では、発症率が高いといわれている。

アトピー性皮膚炎の患児の皮膚は、「乾燥しやすく、がさがさしている」「皮膚の感染症を生じやすい」などの特徴のほか、痒みの閾値が低下してい

ることが指摘されている。これらは正常な皮膚の機能が保てない状態であり、皮膚を外界から防御する機能、いわゆるバリアー機能の低下は明らかである。このバリアー機能とは、外界の刺激物から生体を守るための皮膚の重要な機能であるが、体内の水分が過剰に蒸散するのも防いでおり、皮膚の恒常性を保つのに重要な働きをしている¹⁾。アトピー性皮膚炎でみられるバリアー機能の低下の原因として、皮膚の角質層におけるセラミドの不足が考えられている。セラミドは脂質の一種で、角質層の細胞と細胞の間に存在する(図1)。アトピー性皮膚炎の患者ではセラミドが欠乏しているため、細胞間から水分が失われやすく、かつ、化学物質やアレルゲンなどが外界から入りやす

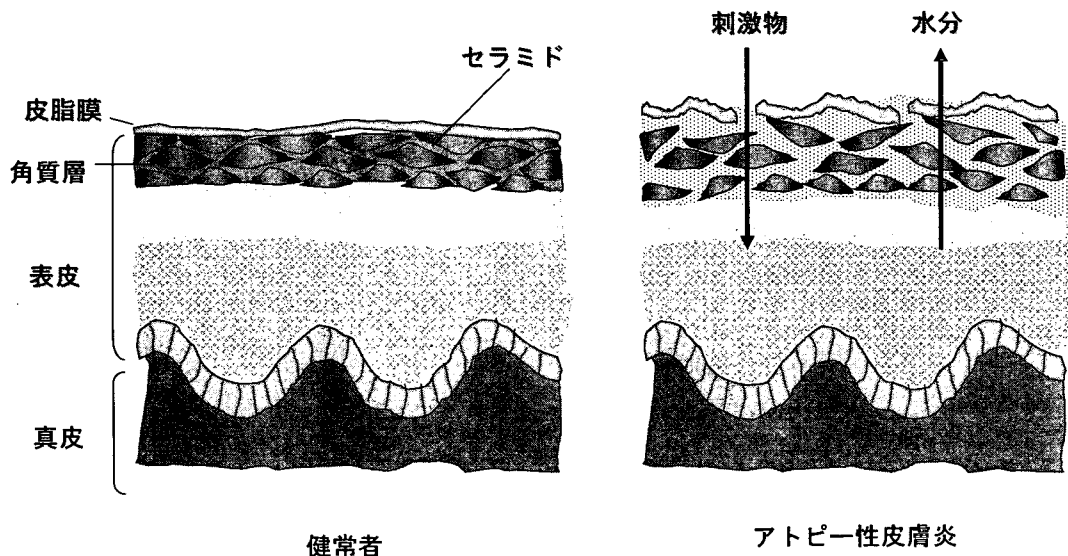


図1 皮膚の構造

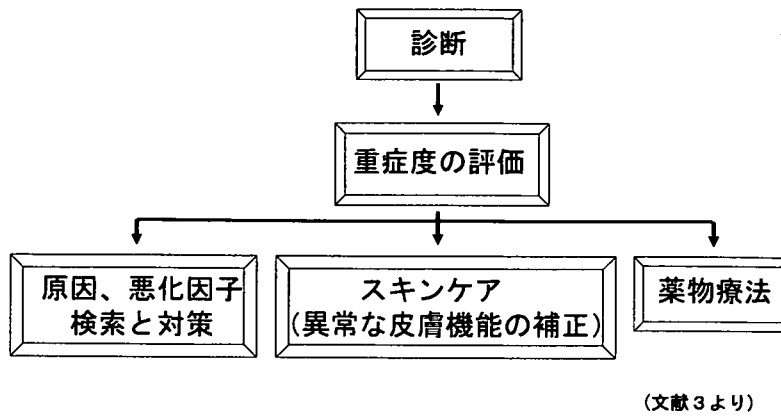


図2 治療ガイドラインの概要

なっていると考えられる²⁾。この双方の原因から、乾燥と刺激物により皮膚の痒みが生じ、これを引っ掻くことで、いわゆる itch-scratch cycle を引き起こし、さらに症状の悪化、慢性化が助長される。

これらのことから、皮膚を正常な状態で維持しようとするスキンケアは、アトピー性皮膚炎の治療にあたって重要である。近年、相次いでアトピー性皮膚炎のガイドラインが作成されているが³⁾、いずれも、スキンケアを重要視している(図2)。このシリーズで4回にわたり、アトピー性皮膚炎のスキンケアの実際について述べていくが、実践的なスキンケアについては次回から述べる予定である。

2. スキンケアの基本とは

アトピー性皮膚炎の治療において、ステロイド外用薬や抗ヒスタミン薬を中心とした薬物療法は

必須であるが、上述のごとく、日常での管理にスキンケアは欠かせない。スキンケアの基本は、(1) 皮膚の状態を正常に保つ、(2) 悪化因子を除く、の2点である。

皮膚の状態を正常に保つためには、保湿剤は重要で、その使用方法については熟知すべきである。近年では、外用薬以外にも、各種の皮膚の保湿効果を高める方法が検討されている。一方、悪化因子を除くことも基本である。図3に、年齢別の悪化因子を示した(図3)³⁾。

3. スキンケアの必要性

これまでに我々は、アトピー性皮膚炎の小児の日常生活で、どのようなものが悪化因子となるのか、小児期に群馬県内の病院に入院していた青年期から成人のアトピー性皮膚炎の患者を対象として、アトピー性皮膚炎の悪化因子に関するアン

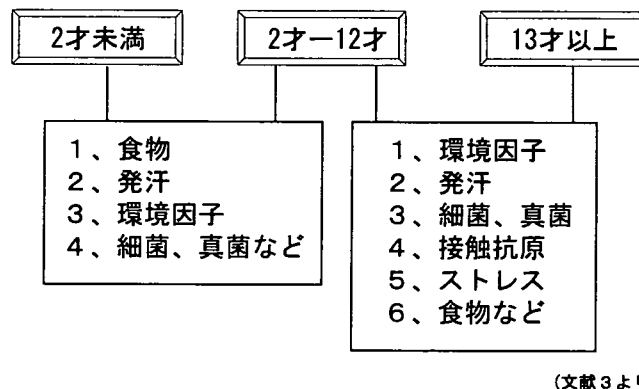


図3 年齢別の悪化因子

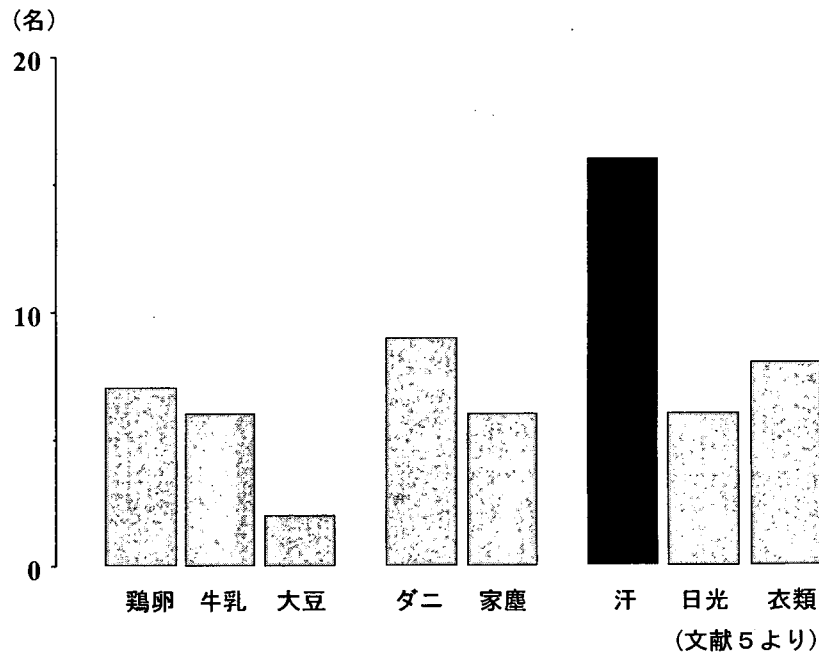


図4 アトピー性皮膚炎持続例の悪化因子

ケート調査を行なった。対象は48名であったが、「アトピー性皮膚炎の現在の悪化因子として何が考えられるか」という問いに対して、汗と答えたものが17名と最も多く、悪化因子としての汗は重要であると思われた(図4)⁵⁾。この結果から、思春期以降では、アトピー性皮膚炎の悪化因子として汗は重要であることが推測された。その他の外的刺激として、日光の刺激やダニ、ハウスダストなどのアレルゲンが指摘されている。

なぜ、汗が悪化因子となるのか、という点について、近年、汗とアトピー性皮膚炎の悪化の機序としてデンジャー (Danger) 仮説が注目されている⁶⁾。これは、自己成分の刺激因子 (Dangers) が、従来の特異的IgE抗体に依存する即時型アレルギー反応を介せず、直接的に皮膚の樹状細胞を刺激するという考えから、結果として、活性化した樹状細胞からの刺激を受けて、T細胞も活性化され、一連のアトピー性皮膚炎の悪化に関連した反応が引き起こされる(図5)⁷⁾。この刺激因子として、核蛋白のHMGB1、プリン代謝物として、尿酸、ATP、アデノシンが考えられている⁸⁾。汗の組成を考えた場合、その主要な成分は、尿酸、アンモニアなどの細胞代謝における老廃物であり、かつ、分泌後、汗は皮膚の上で濃縮化される可能性が大きいため、「汗をかいた後、皮膚が痒くなる」という患児の訴えは、納得のいくものである。さら

に言えば、前述のごとく、アトピー性皮膚炎の患者においては皮膚の透過性の亢進が考えられている。水分を喪失しやすいことは逆に透過性の亢進も推測され、汗に関連した刺激因子を、皮膚に容易に取り込んでしまう可能性も大きい。

4、まとめ

アトピー性皮膚炎では、皮膚のバリアー機能の低下により、細胞間から水分が失われやすく、かつ、化学物質やアレルゲンなどが外界から入りやすくなっているため、乾燥と外界からの刺激により皮膚の痒みが生じ、これを引っ掻くことでさらに症状の悪化、慢性化が助長される。皮膚を正常な状態で維持しようとするスキンケアは、アトピー性皮膚炎の治療にあたって重要である。次回は、アトピー性皮膚炎のスキンケアとして、実践的な皮膚の管理について述べる。

文 献

- 1) Shahidullah M, Raffle EJ, Rimmer AR, Frain-Bell W. Transepidermal water loss in patients with dermatitis. Br J Dermatol 81:722-30,1969
- 2) Leung DY, Atopic dermatitis: the skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic diseases, J Allergy Clin Immunol 96:302-318,1995

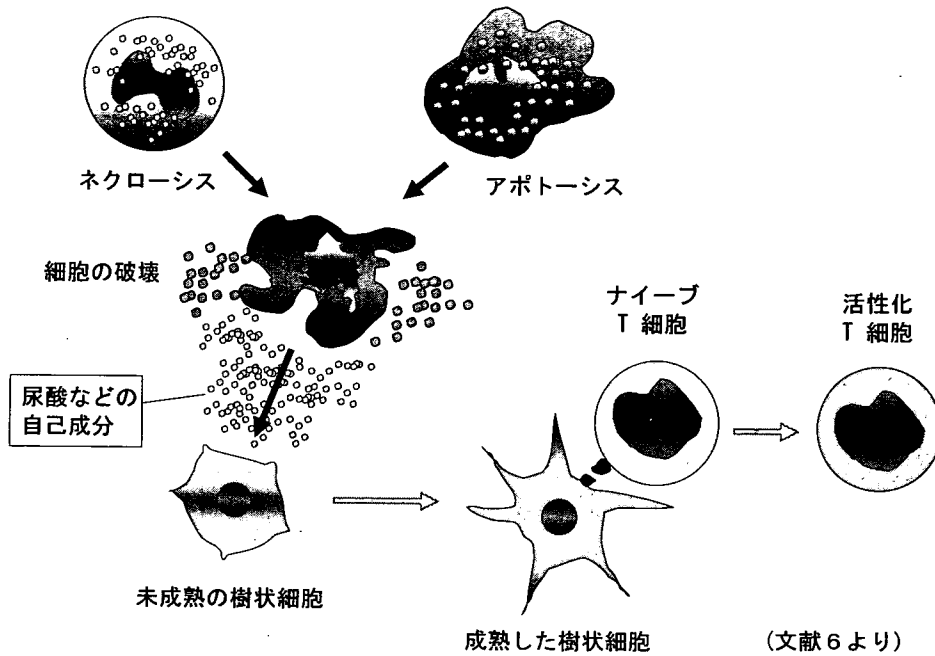


図 5 Danger 仮説と尿酸

- 3) アトピー性皮膚炎ガイドライン 2005、平成 8 年度厚生省長期慢性疾患総合研究事業、アレルギー総合研究および平成 9-16 年厚生労働科学研究
- 4) 古江増隆、吉川邦彦、秀 道広、竹原和彦、日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎治療ガイドライン 2004 改訂版、日皮会誌、114:135-142, 2004
- 5) 望月博之、森川昭廣、アトピー性皮膚炎における小学校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、13:174-179, 2005
- 6) Jerome KR, Corey L, The danger within. *New Engl J Med* 350: 411-412, 2004
- 7) Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425: 516-521, 2003
- 8) 菅野雅元、劉 蘭々、高路 修、茂久田翔、山本昇壮、菅野理恵子、組織障害とアレルギー：Danger 仮説と自然・獲得免疫系、日本小児アレルギー学会誌 19:184-8, 2005

A novel polymorphism, E254K, in the 5-lipoxygenase gene associated with bronchial asthma

CHUNYING BAI, EIKO MATSUI, HIDENORI OHNISHI, KAORI KIMATA, KIMIKO KASAHARA, HIDEO KANEKO, ZENICHIRO KATO, TOSHIYUKI FUKAO and NAOMI KONDO

Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Gifu University, Gifu, Japan

Received September 24, 2007; Accepted November 13, 2007

Abstract. Cysteinyl-leukotrienes are important pro-inflammatory mediators in bronchial asthma (BA) and are derived from arachidonic acid by the action of 5-lipoxygenase. We identified a novel polymorphism, c.760 G>A (E254K), in exon 6 of the 5-lipoxygenase gene (*5-LO*). This substitution was detected in 11 out of 180 patients with BA, but not in any of the 150 non-allergic subjects. The frequency of c.760 G>A showed a significant difference between BA and non-allergic subjects ($P=0.0007$). The c.760 G>A polymorphism existed at the surface edge of the C-terminal catalytic domain, and the E-to-K substitution changed the charge of the side chain from negative to positive. Thus, our results suggest that E254K in the *5-LO* might be associated with BA.

Introduction

Bronchial asthma (BA) is a multifactorial genetic disease (1). Cysteinyl-leukotrienes (cys-LTs) play an important pro-inflammatory role in both early- and late-phase asthmatic responses (2). Cys-LTs constitute a class of potent biological mediators of inflammation and anaphylaxis. 5-lipoxygenase is an essential enzyme which catalyzes the first committed steps in the biosynthetic pathway leading to the production of cys-LTs (3-6). The actions of 5-lipoxygenase result in the

sequential conversion of arachidonic acid to 5-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid (5-HPETE) and then to leukotriene (LT) A₄.

The *5-LO* is located on chromosome 10q11.2 (7). In several studies, the addition of an Sp-1 binding motif (-GGG CGG-) or the deletion of one or two Sp-1 binding motifs in the *5-LO* core promoter, has been associated with reduced gene expression (8,9). In addition, the 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) promoter gene polymorphisms (21A repeat and 18A repeat) were reported to be associated with BA (10). Recent evidence demonstrated that up-regulation of *5-LO* and FLAP mRNAs might be involved in the increased leukotriene synthesis and play an important role in the pathogenesis of BA (11).

In this study we identified single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *5-LO* and researched the relationship between SNPs in the *5-LO* and BA.

Materials and methods

Patients and non-allergic subjects. One hundred and eighty BA patients (105 males and 75 females, mean age 8.4 ± 7.6 years of age) and 150 non-allergic subjects (90 males and 60 females, mean age 9.5 ± 8.2 years of age) were studied. The diagnosis of BA was made according to the criteria of the American Thoracic Society. The non-allergic subjects were healthy and did not have a history of allergic diseases. All of the subjects were randomly selected from patients attending our hospital. Informed consent was obtained from all individuals or from their parents.

Detection of SNPs in *5-LO*. Neutrophils were collected from heparinized blood. Genomic DNA was extracted from neutrophils with a Sepagene kit (Sanko Junyaku, Tokyo, Japan). The fourteen exons of *5-LO* were amplified using the PCR technique and sequenced using an ABI 3100 DNA auto-sequencer (Applied Biosystems, CA) in certain individuals with BA ($n=16$) and certain non-allergic subjects ($n=14$). For further study, the E254K substitution was detected in all individuals with BA ($n=180$) and non-allergic subjects ($n=150$), and the other three silent polymorphisms (c.21 C>T, c.270 G>A, c.1728 A>G) were detected in 60 individuals with BA and 60 non-allergic subjects. The primer details for the PCR used in the detection of these polymorphisms are shown in Table I.

Correspondence to: Eiko Matsui, Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan
E-mail: eikom@gifu-u.ac.jp

Abbreviations: SNP, single-nucleotide polymorphism; 5-LO, 5-lipoxygenase gene; FLAP, 5-lipoxygenase-activating protein; BA, bronchial asthma; cys-LTs, cysteinyl-leukotrienes; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; EIA, enzyme immunoassay; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; 5-HPETE, 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid; ICM, Internal Coordinate Mechanics; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; c., cDNA

Key words: single-nucleotide polymorphism, 5-lipoxygenase gene, bronchial asthma, leukotrienes

Table I. Primer details for PCR used to detect 4 polymorphisms.

Primer	Sequence	Amplified product size	Annealing temp (°C)
c.21 C>T FP	5'CGCCATGCCCTCCTACAC3'	150 bp	56
c.21 C>T RP	5'CCACGCTCGAAGTCGTTGTA3'		
c.270 G>A FP	5'GTGCCACAGCAGCATACT3'	401 bp	55
c.270 G>A RP	5'CCTGCACAGCAGTGTCATTC3'		
c.760 G>A (E254K) FP	5'CCTGGTAGAGCGGGTCATGAATC3'	179 bp	62
c.760 G>A (E254K) RP	5'ACCTCCTGCTCCAAGGGGAGCT3'		
c.1728 A>G FP	5'GAAAGAGGATGGACGGACTG3'	295 bp	55
c.1728 A>G RP	5'CTCGTTTTCTGGAACTGGC3'		

FP, forward primer; RP, reverse primer.

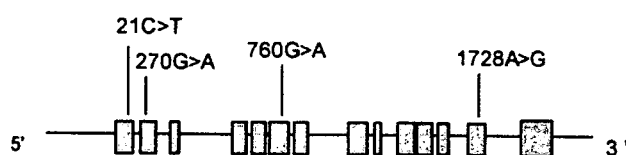


Figure 1. Gene structure and polymorphisms investigated in the 5-LO. The positions marked were found in polymorphisms in the Japanese population.

Measurement of urinary LTE4. Urine samples from 14 non-allergic subjects and 16 individuals with BA (13 without E254K and 3 with E254K), were stored at -80°C , and analyzed within 1 month of collection. The urinary creatinine level was determined by a creatinine test kit (Pure Auto S CRE-L, Daiichi-kagaku, Tokyo, Japan). Urinary LTE4 concentrations determined by EIA were corrected for recovery of [^3H]-LTE4. The urinary LTE4 level was expressed as pg/mg of creatinine.

Measurement of LTB4 production from neutrophils. Neutrophils were collected from heparinized blood in 14 non-allergic subjects and 16 individuals with BA (13 without E254K and 3 with E254K), and 2×10^6 cells/ml were cultured in an RPMI-1640 medium with 15% fetal calf serum, after stimulation with $1 \mu\text{M}$ ionomycin. At 0, 15 and 30 min after adding ionomycin, we aspirated 1 ml of the culture medium and stored it at -80°C for the measurement of LTB4. We used the LTB4 Immunoassay (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) to quantify the LTB4 concentration in a supernatant from the cultured ionomycin-stimulation neutrophils (12). The samples were applied to the C18 reverse-phase column, and were measured by ELISA.

Relative expression of 5-lipoxygenase mRNA. PBMCs were isolated from the heparinized blood of the 14 non-allergic subjects and 16 individuals with BA (13 without E254K and 3 with E254K) by gradient centrifugation in Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and stored at -80°C for the extraction of mRNA. We quantified the relative expression of 5-lipoxygenase mRNA by real-time PCR. The real-time

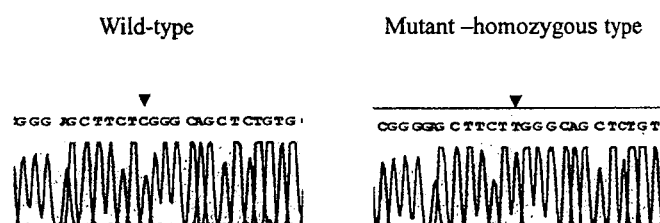


Figure 2. Big Dye terminator DNA sequence data of E254K in the reverse chain of 5-LO. The data of a patient with E254 (wild-type) are shown on the left and the data of a patient with K254 (mutant-homozygous type) are shown on the right.

PCR was carried out with a Light Cycler instrument (Roche, Mannheim, Germany) by using the Light Cycler SYBR-Green I RNA Master Kit (Roche). Each PCR cycle included denaturation at 95°C for 10 sec, primers annealing at 57°C for 10 sec, and a final extension at 72°C for 8 sec. The cDNA was amplified using the following primers: sense primer 5'actgg aacacggcaaaaac3' in exon 3 and anti-sense primer 5'tcac ggggtaaactcctgtg3' in exon 4. The size of the PCR product was 96 bp and the intron size between these two primers was $>26 \text{ kb}$ (7). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the internal control for real-time quantitative PCR and we analyzed the relative expression of 5-lipoxygenase mRNA by the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method (13).

Homology structural model of 5-lipoxygenase E254 and K254. An initial homology model structure of 5-lipoxygenase was made by a FUGUE (<http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/~fugue/>) server. Coral 8R-lipoxygenase (2fnq) was selected as the most homologous template of 5-lipoxygenase from the Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb). The target-template identity rate is 39%. On the basis of this initial structural model, we optimized the structure and performed energy minimization using Internal Coordinate Mechanics (ICM) Pro version 3.3 (MolSoft). Furthermore, we generated the mutational form of this structure using the same software package. The validity of these structural models was evaluated by Ramachandran plot. The surface electrostatic potentials of these wild and mutant structures were calculated using Molmol software.

Table II. Allele and genotype frequencies of 5-LO silent SNPs.

	Non-allergic subjects (n=60)	Bronchial asthma patients (n=60)	P-value
Allele frequency			
c.21 C>T			
C	108 (0.9)	110 (0.917)	0.824
T	12 (0.1)	10 (0.083)	
c.270 G>A			
G	115 (0.958)	119 (0.992)	0.213
A	5 (0.042)	1 (0.008)	
c.1728 A>G			
A	113 (0.942)	116 (0.967)	0.539
G	7 (0.058)	4 (0.033)	
Genotype frequency			
c.21 C>T			
CC	48 (0.8)	52 (0.867)	0.463
CT	12 (0.2)	6 (0.100)	
TT	0	2 (0.033)	
c.270 G>A			
GG	55 (0.917)	59 (0.983)	0.207
GA	5 (0.083)	1 (0.017)	
AA	0	0	
c.1728 A>G			
AA	53 (0.883)	56 (0.933)	0.529
AG	7 (0.117)	4 (0.067)	
GG	0	0	

Table III. Allele and genotype frequencies of 5-LO missense SNP.

	Non-allergic subjects (n=150)	Bronchial asthma patients (n=180)	P-value
Allele frequency			
c.760 G>A			
G	300 (1)	348 (0.967)	0.0007
A	0	12 (0.033)	
Genotype frequency			
GG	150 (1)	169 (0.9400)	0.0170
GA	0	10 (0.0560)	
AA	0	1 (0.0056)	

Statistical analyses. Allele and genotype frequencies were calculated for each locus and tested for Hardy-Weinberg equilibrium. Distribution of the genotype of E254K in the 5-LO was analyzed by Fisher's exact test. Probability (P) values <0.05 were considered statistically significant. The significance of difference was analyzed by the two-sample t-test.

Results

Polymorphisms in the 5-LO. We identified 4 SNPs in the 5-LO in individuals with BA (Fig. 1). Three SNPs were silent polymorphisms: c.21 C>T (exon 1), c.270 G>A (exon 2) and c.1728 A>G (exon 13). There were no differences in the

frequencies of the three SNPs between individuals with BA and non-allergic subjects (Table II).

One SNP was a missense polymorphism c.760 G>A, and the amino acid at 254 changed from Glu (E) to Lys (K) (Fig. 2). We determined the prevalence of c.760 G>A (E254K) in the 5-LO of individuals with BA and non-allergic subjects. This SNP was found in 11 (0.061) out of the 180 individuals with BA. One was homozygous AA and 10 were heterozygous GA (2 out of the 10 were brother and sister). The mutant allele frequency was 0.033 in 180 individuals with BA. However, the mutant allele could not be detected in any of the 150 non-allergic subjects (Table III). There was a significant difference in the E254K frequency between

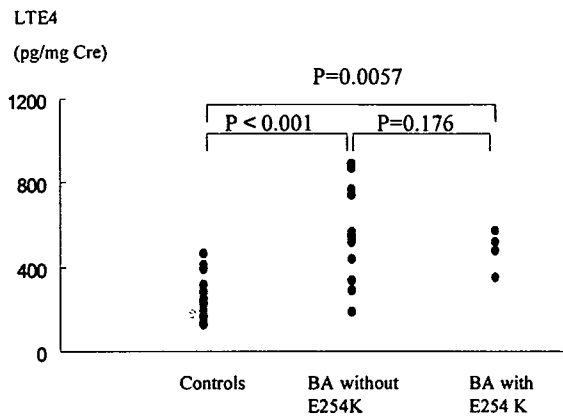


Figure 3. Urinary LTE4 production in individuals with bronchial asthma (BA) without E254K (n=13) and with E254K (n=3), and non-allergic subjects (n=14). The difference between individuals with bronchial asthma and non-allergic subjects was tested using a two-sample t-test. The urinary LTE4 productions were significantly higher in individuals with BA (without or with E254K) than in non-allergic subjects ($P<0.05$). The red mark is the mean level.

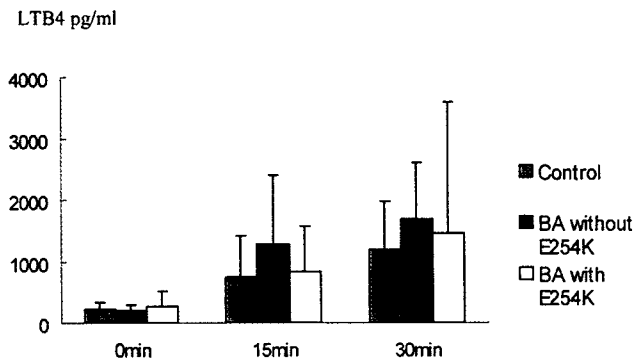


Figure 4. LTB4 production of ionomycin stimulation in neutrophils from individuals with bronchial asthma (BA) without E254K (n=13) and with E254K (n=3), and non-allergic subjects (n=14). The significance of difference between groups of LTB4 was tested using a two-sample t-test. We detected no difference in LTB4 production in resting neutrophils from individuals with BA compared to non-allergic subjects. The mean level of LTB4 showed a tendency to increase more in individuals with BA (without or with E254K) than in non-allergic subjects after stimulation by ionomycin at 15 and 30 min, but there were no significant differences ($P>0.05$).

individuals with BA and non-allergic subjects (Fisher's exact test, $P=0.0007$).

Associations of E254K with urinary LTE4 or LTB4 production in neutrophils. To examine the functional effects of c.760 G>A (E254K) in the 5-LO, we measured the urinary LTE4 levels in individuals with BA (without or with E254K) and non-allergic subjects. The urinary LTE4 levels were significantly higher in individuals with BA (without or with E254K) than in non-allergic subjects ($P<0.05$). However, the mean level of urinary LTE4 concentrations showed a tendency to decrease in individuals with BA and with E254K compared to those with BA but without E254K, although there was no significant difference (Fig. 3).

Furthermore, we measured the LTB4 concentrations in neutrophils isolated from individuals with BA (without or with E254K) and non-allergic subjects before and after

5-LO mRNA expression

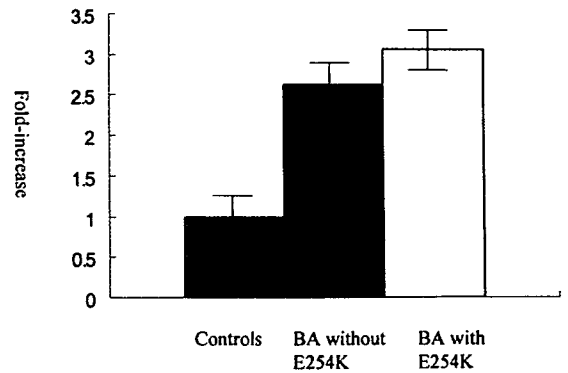


Figure 5. Relative expression of 5-lipoxygenase mRNA in individuals with bronchial asthma (BA) without E254K (n=13) and with E254K (n=3) and non-allergic subjects (n=14). The Y-axis on the left indicates the fold-increase compared to the mRNA expression in non-allergic subjects shown by the open bars. The relative expression of 5-lipoxygenase mRNA in individuals with BA but without E254K increased 2.6-fold above that in non-allergic subjects; in individuals with BA and with E254K it increased 3.1-fold above that in non-allergic subjects.

stimulation by ionomycin. There were no differences in LTB4 production in resting neutrophils from individuals with BA compared to non-allergic subjects. The mean level of LTB4 concentration showed a tendency to increase in individuals with BA (without or with E254K) compared to non-allergic subjects after stimulation by ionomycin at 15 and 30 min (Fig. 4). The mean level of LTB4 concentrations in neutrophils showed a tendency to decrease in individuals with BA and with E254K compared to those with BA but without E254K, although there was no significant difference ($P>0.05$).

Relative expression of 5-lipoxygenase mRNA. We used the real time PCR (LightCycler 1.5 Instruments and SYBR-Green I system) to quantify the relative expression of 5-lipoxygenase mRNA in individuals with BA (without or with E254K) and non-allergic subjects. GAPDH was used as the internal control for real-time quantitative PCR and the relative expression of 5-lipoxygenase mRNA was analyzed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The relative expression of 5-lipoxygenase mRNA in individuals with BA but without E254K increased 2.6-fold above that in non-allergic subjects. In individuals with BA and with E254K the relative expression increased 3.1-fold above that in non-allergic subjects. The relative expression of 5-lipoxygenase mRNA was higher in individuals with BA and with E254K than in those with BA but without E254K (Fig. 5).

Homology structural model of 5-lipoxygenase E254 and K254. The human 5-lipoxygenase structural model consisted of the N-terminal β -barrel domain, thought to interact with lipids, and the C-terminal catalytic domain containing the active site that is the iron-binding site and the substrate-binding cleft. We found that the SNP of 5-LO, E254K, existed at the surface edge of the C-terminal catalytic domain, but this site was far from the active site of that enzyme (Fig. 6A). However, part of glutamic acid 254 and lysine 254 had side chains, which obviously are exposed to

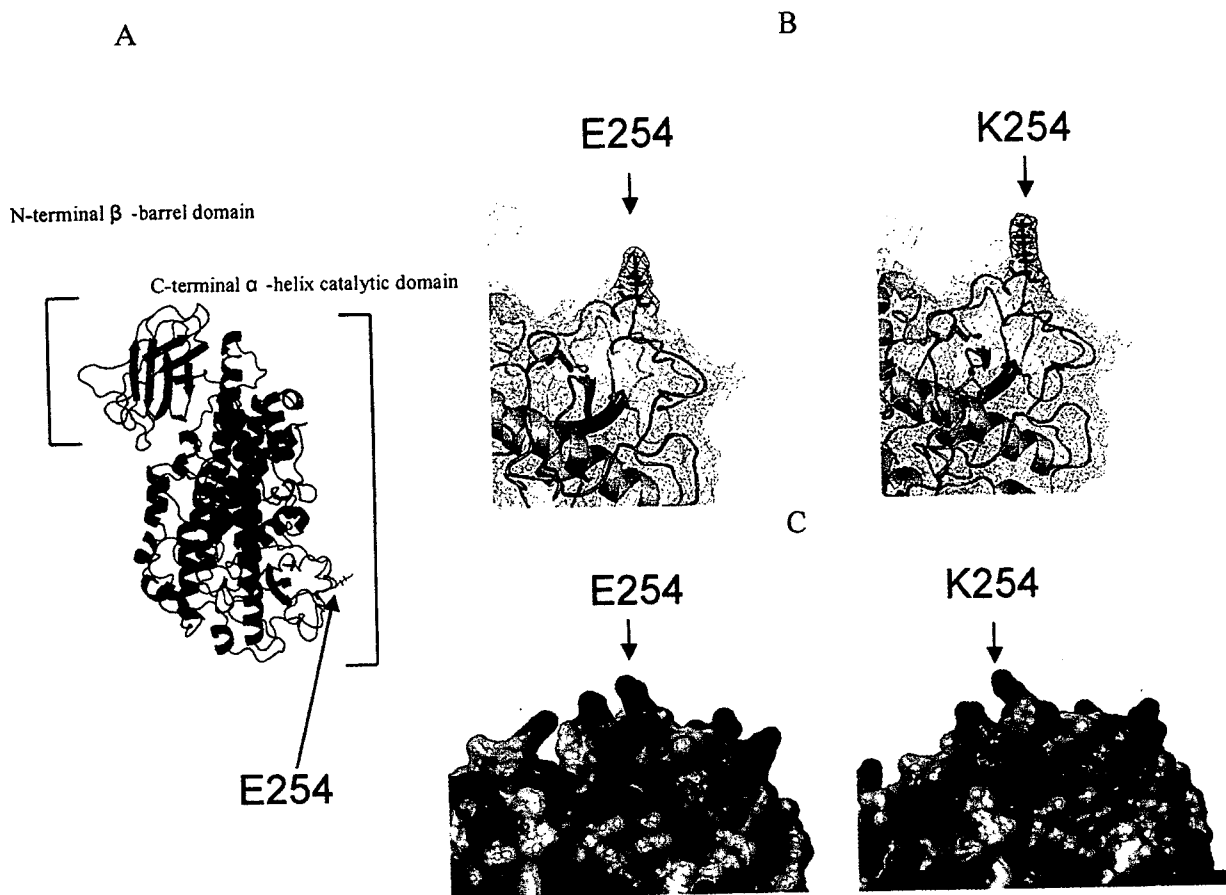


Figure 6. (A) Homology model structure of 5-lipoxygenase. The arrow indicates the part of the E254K polymorphism. (B) Comparison of the orientation of the side chains of glutamine acid 254 and lysine 254. (C) The focuses of the surface electrostatic potential of 5-lipoxygenase structures. Electrostatic potential representations of these two with red indicate areas of negative charge and blue indicate areas of positive charge. Arrows indicate the part of E254 and K254.

the solvent in these structural models (Fig. 6B), and the E-to-K substitution changed the charge of the side chain from negative to positive (Fig. 6C).

Discussion

Clinically similar asthma symptoms may be caused by different mechanisms (14). Chronic airway inflammation is a feature of asthma. Recently, evidence has demonstrated that leukotriene C₄, D₄ and E₄ increase in the serum, urine and exhaled breath condensate (EBC) of asthma patients (11,15). The first committed enzyme in the biosynthetic pathway leading to the production of leukotrienes is 5-lipoxygenase. The addition of an Sp-1 binding motif (-GGGCGG-) or deletion of one or two Sp-1 binding motifs in the 5-*LO* core promoter has been associated with reduced gene expression (9). We studied the polymorphisms in the 5-*LO* and attempted to clarify the relationship between the novel polymorphism (c.760 G>A) and bronchial asthma.

We found a missense SNP and three silent SNPs in the 5-*LO*. All patients who had an E254K substitution suffered from BA. There was a significant difference in the E254K frequency between individuals with BA and non-allergic subjects. Three other silent SNPs (c.21 C>T, c.270 G>A and c.1728 A>G) described previously (16), were also identified, but there were no significant differences in the frequencies between individuals with BA and non-allergic subjects.

To examine the functional effects of c.760 G>A (E254K) in the 5-*LO*, we measured the production of urinary LTE₄ and LTB₄ in neutrophils in individuals with BA (without or with E254K) and non-allergic subjects. We found that urinary LTE₄ production was significantly higher in individuals with BA (without or with E254K) than in non-allergic subjects. Furthermore, the mean level of LTB₄ production in neutrophils showed a tendency to increase in individuals with BA (without or with E254K) more than in non-allergic subjects after stimulation by ionomycin. These results support the theory that leukotrienes play an important role in BA. The relative expression of 5-lipoxygenase mRNA in individuals with BA (without or with E254K) increased 2.6- or 3.1-fold above that in non-allergic subjects. This result supports the opinion of Koshino *et al* that the up-regulation of 5-lipoxygenase mRNA might be involved in the increased leukotriene synthesis and play an important role in the pathogenesis of asthma (11). In this study, the relative expression of 5-lipoxygenase mRNA was higher in individuals with BA and with E254K than in those with BA but without E254K. As a result, the 5-*LO* pathway productions (urinary LTE₄ and LTB₄ levels in neutrophils) should be higher in individuals with BA and with E254K than in those with BA but without E254K. However, in this study, the urinary LTE₄ and LTB₄ levels in neutrophils showed a tendency to decrease in individuals with BA and with E254K compared to those with BA but without E254K. This result may be