

## スキンケア(異常な皮膚機能\*の補正)

本症患者には様々な皮膚機能異常があり、それらが皮膚炎の発症および増悪に深く関与することが知られている。これらの皮膚機能異常の補正のために適切なスキンケアが必要である。

### 1.入浴、シャワーによる皮膚の清潔

- 汗や汚れは速やかにおとす。しかし、強くこすらない。
- 石鹸・シャンプーを使用するときは洗浄力の強いものは避ける。
- 石鹸・シャンプーは残らないように十分にすすぐ。
- 痒みを生じるほどの高い温度の湯は避ける。
- 入浴後にほてりを感じさせる沐浴剤・入浴剤は避ける。
- 患者あるいは保護者には皮膚の状態に応じた洗い方を指導する。
- 入浴後には、必要に応じて適切な外用薬を塗布する。

### 2.外用薬による皮膚の保湿・保護(付表4)

- 保湿・保護を目的とする外用薬は皮膚の乾燥防止に有用である。
- 入浴・シャワー後には必要に応じて保湿・保護を目的とする外用薬を塗布する。
- 患者ごとに使用感のよい保湿・保護を目的とする外用薬を選択する。
- 軽微な皮膚炎は保湿・保護を目的とする外用薬のみで改善することがある。

### 3.その他

- 室内を清潔にし、適温・適湿を保つ。
- 新しい肌着は使用前に水洗いする。
- 洗剤はできれば界面活性剤の含有量の少ないものを使用し、十分にすすぐ。
- 爪を短く切り、なるべく搔かないようにする。(手袋や包帯による保護が有用なことがある)

など

## \*アトピー性皮膚炎における主な皮膚機能異常

### ●水分保持能・バリア機能の低下 ●痒みの閾値の低下 ●易感染性

- 水分保持能・バリア機能の低下:アトピー性皮膚炎の皮膚では角層の天然保湿因子の減少、細胞間脂質の主な成分であるセラミドの低下がみられる。このため、角層の水分保持能、皮膚バリア機能の低下がみられ、抗原の侵入が容易な状態にある。
- 痒みの閾値の低下:アトピー性皮膚炎では知覚神経の表皮内への侵入・伸長がみられ、軽微な刺激でも痒みが生じやすい。
- 易感染性:伝染性膿痂疹、単純ヘルペス、伝染性軟弱腫など皮膚の感染症に罹患しやすい。

# 薬物療法

炎症を抑制するためには適切な薬物療法が必要である。

## 薬物療法の基本

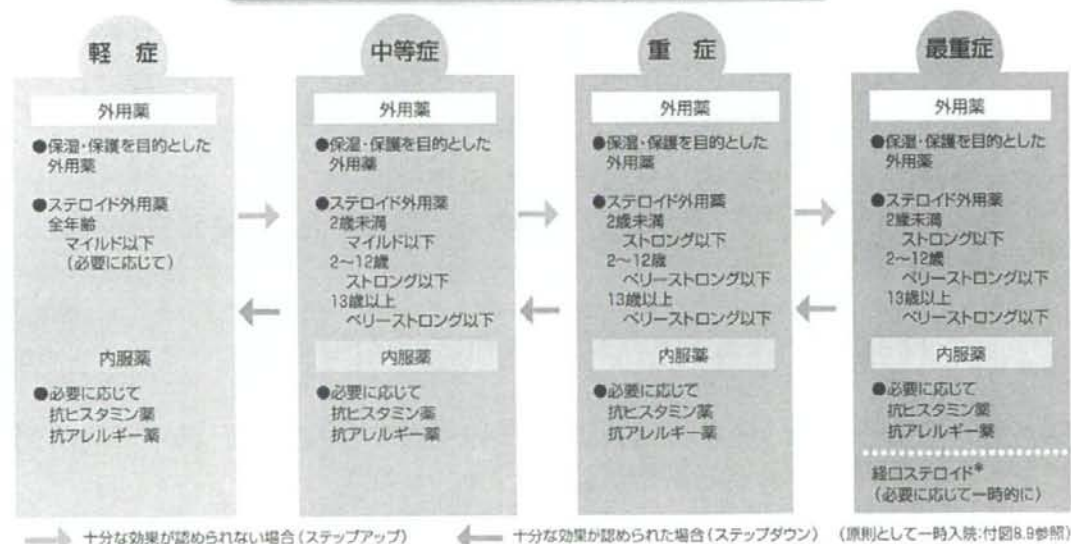
1. ステロイド外用薬の強度、剤型は重症度に加え、個々の皮疹の部位と性状および年齢に応じて選択する(付表3)。
2. ステロイド外用に際して、次の点に留意する。
  - ① 顔面にはステロイド外用薬はなるべく使用しない。用いる場合、可能な限り弱いものを短期間にとどめる。
  - ② ステロイド外用薬による毛細血管拡張や皮膚萎縮などの副作用は使用期間が長くなるにつれて起こりやすい(注1)。
  - ③ 強度と使用量をモニターする習慣をつける(注1.2)。
  - ④ 長期使用後に突然中止すると皮疹が急に増悪することがあるので、中止あるいは変更は医師の指示に従うよう指導する。
  - ⑤ 急性増悪した場合は、ステロイド外用薬を必要かつ十分な量を短期間使用する。
3. 症状の程度に応じて、適宜保湿・保護を目的とする外用薬などを使用する。
4. 必要に応じて抗ヒスタミン薬、抗アレルギー薬を使用する。
5. 1~2週間をめぐり重症度の評価を行い、治療薬の変更を検討する。
6. ステロイド外用薬などの療法で効果不十分、または副作用などでこれらが継続できない場合には、使用上の留意点を十分に確認したうえで、タクロリムス外用薬が使用可能である。

(注1) ステロイド外用薬の外用量、副作用については、西日本皮膚科61(2):196-203,1999

アレルギー・免疫8(11):1219-1225,2001(アレルギー・免疫9(5):621,2002で一部訂正)などを参照する。

(注2) ステロイド外用薬の1回の外用量のめやすとして finger tip unit があげられる。(付図1参照)

## 薬物療法の基本例



\*使用する場合には入院の上、専門医と連携を取りながら使用する。

## タクロリムス外用薬使用上の留意点

幼児から成人のアトピー性皮膚炎患者を対象に、非ステロイド系免疫抑制薬であるタクロリムス外用薬(プロトピック®軟膏)が開発され、特に顔面・頸部の皮疹に対して有用である。本剤は、ステロイド外用薬等の既存療法では効果が不十分または副作用によりこれらの投与が出来ないなど、本剤による治療がより適切と考えられる場合に使用する。使用に際しては以下の点に留意する必要がある。

1. 本剤の使用は、アトピー性皮膚炎の治療法に精通している医師の下で行う。
2. 0.1%は16歳以上、0.03%は2歳以上15歳以下を対象とする。妊婦・授乳婦には使用しない。
3. 添付文書の塗布量を厳守する。[成人には1日1～2回、1回の塗布量は5gまで。小児には1日1～2回、1回塗布量は、2～5歳(体重20kg未満)1gまで、6～12歳(体重20kg以上50kg未満)2～4gまで、13歳以上(体重50kg以上)5gまで。]
4. 潰瘍、明らかに局面を形成しているびらん、粘膜など皮膚以外の部分、外陰部には使用しない。
5. 他の外用薬との混合は薬剤の安定性、吸収性に影響を及ぼす可能性があるので行わない。
6. 密封法および重層法での本剤の使用経験はなく、主薬の血中への移行が促進される可能性もあり安全性は確立されていないので、塗布方法は単純塗布に限定する。
7. 重症の皮疹もしくは塗布面積が広範囲にわたる場合には、腎機能に注意する。
8. 本剤使用時は日光への曝露を最小限にとどめ、日焼けランプ・紫外線ランプは使用しない。また、PUVA療法等の紫外線療法を行わないこと。
9. 皮膚感染症を伴うアトピー性皮膚炎患者には使用しないことを原則とする。
10. 使用に際しては、以下の副作用に留意する。また、あらかじめ患者及び代諾者に十分に説明し、理解したことを確認した上で使用する。

皮膚刺激感、皮膚感染症、ざ瘡、皮膚以外の感染症、腎障害、発がんリスク。

添付文書、ガイドンス(臨床皮膚科57(13):1217-1234,2003)を基に留意点をまとめた。この他、添付文書およびガイドンスに従って慎重に使用する。

## 経過中の注意事項

1. アトピー性皮膚炎は、伝染性膿痂疹、カポジ水痘様発疹症、伝染性軟属腫などの感染症を合併しやすいため、これらの早期発見に努め、速やかに適切な処置を行う。
2. 眼病変(特に白内障、網膜剥離など)の合併に注意する。眼を強くこする、あるいは叩くなどの外傷性要因は眼病変の発生・悪化につながる可能性があるので留意する。
3. 外用薬により接触皮膚炎をおこす可能性もあるので、症状が遷延・悪化する場合は注意する。
4. このガイドラインは一般的なめやすであり、個々の患者によってはこの限りではない。
5. このガイドラインに従って1か月程度治療しても皮疹の改善がみられない場合は、専門の医師または施設への紹介を考慮する。(特に付図10～15のような皮疹に関しては早めの紹介もあり得る)

## 付表1.アトピー性皮膚炎の定義・診断基準(日本皮膚科学会)

### アトピー性皮膚炎の定義(概念)

「アトピー性皮膚炎は、増悪・寛解を繰り返す、痒痒のある湿疹を主病変とする疾患であり、患者の多くはアトピー素因を持つ。」

アトピー素因:①家族歴・既往歴(気管支喘息、アレルギー性鼻炎・結膜炎、アトピー性皮膚炎のうちのいずれか、あるいは複数の疾患)、または②IgE抗体を産生し易い素因。

### アトピー性皮膚炎の診断基準

#### 1. 痒痒

#### 2. 特徴的皮疹と分布

①皮疹は湿疹病変 ●急性病変:紅斑、湿潤性紅斑、丘疹、漿液性丘疹、鱗屑、痂皮

●慢性病変:浸潤性紅斑・苔癬化病変、痒疹、鱗屑、痂皮

②分布 ●左右対側性

好発部位:前額、眼囲、口囲・口唇、耳介周囲、頸部、四肢関節部、体幹

●参考となる年齢による特徴

乳児期:頭、顔にはじまりしばしば体幹、四肢に下降。

幼小児期:頸部、四肢関節部の病変。

思春期・成人期:上半身(顔、頸、胸、背)に皮疹が強い傾向。

#### 3. 慢性・反復性経過(しばしば新旧の皮疹が混在する)

乳児では2ヵ月以上、その他では6ヵ月以上を慢性とする。

上記1、2、および3の項目を満たすものを、症状の軽重を問わずアトピー性皮膚炎と診断する。そのほかは急性あるいは慢性の湿疹とし、年齢や経過を参考にして診断する。

### 除外すべき診断

- 接触皮膚炎 ●脂漏性皮膚炎 ●単純性痒疹 ●疥癬 ●汗疹 ●魚鱗癬
- 皮脂欠乏性湿疹 ●手湿疹(アトピー性皮膚炎以外の手湿疹を除外するため)
- 皮膚リンパ腫 ●乾癬 ●免疫不全による疾患 ●膠原病(SLE、皮膚筋炎)
- ネザートン症候群

### 診断の参考項目

- 家族歴(気管支喘息、アレルギー性鼻炎・結膜炎、アトピー性皮膚炎)
- 合併症(気管支喘息、アレルギー性鼻炎・結膜炎)
- 毛孔一致性の丘疹による鳥肌様皮膚 ●血清IgE値の上昇

### 臨床型(幼小児期以降)

- 四肢屈側型 ●四肢伸側型 ●小児乾燥型 ●頭・頸・上胸・背型 ●痒疹型 ●全身型
- これらが混在する症例も多い

### 重要な合併症

- 眼症状(白内障、網膜剥離など):とくに顔面の重症例
- カポジ水痘様発疹症 ●伝染性軟弱腫 ●伝染性膿痂疹

(日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎診療ガイドライン、日皮会誌118(3):325-342、2008より)

## 付表2.アトピー性皮膚炎の診断の手引き(厚生省心身障害研究)

### I.アトピー性皮膚炎とは

アトピー性皮膚炎とは、主としてアトピー素因のあるものにも生じる、慢性に経過する皮膚の湿疹病変である。このため、本症の診断に当たっては、いまだ慢性経過の完成をみていない乳児の場合を考慮し、年齢に対する配慮が必要である。

注)アトピー素因とは気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎の病歴または家族歴を持つものをいう。

### II.アトピー性皮膚炎の主要病変

#### 1.乳児について

- 顔面皮膚または頭部皮膚を中心とした紅斑または丘疹がある。耳切れが見られることが多い。
- 患部皮膚に掻破痕がある。

注)紅斑:赤い発疹 丘疹:盛り上がった発疹 掻は痕:掻き傷の痕

#### 2.幼児・学童について

- 頸部皮膚または腋窩、肘窩もしくは膝窩の皮膚を中心とした紅斑、丘疹または苔癬化病変がある。耳切れが見られることが多い。
- 乾燥性皮膚や枇糠様落屑を伴う毛孔一致性角化性丘疹がある。
- 患部皮膚に掻破痕がある。

注)苔癬化:つまむと硬い、きめの粗い皮膚 枇糠様落屑:米ぬか様の皮膚の断片

### III.アトピー性皮膚炎の診断基準

#### 1.乳児について

II-1に示す病変のうちa、bの双方を満たし、[別表]に示す皮膚疾患を単独に罹患した場合を除外したものをアトピー性皮膚炎とする。

#### 2.幼児・学童について

II-2に示す病変のうちaあるいはb、およびcの双方、並びに下記のイ、ロ)の条件を満たし、[別表]に示す皮膚疾患を単独に罹患した場合を除外したものをアトピー性皮膚炎とする。

イ)皮膚に痒みがある。

ロ)慢性(発症後6か月以上)の経過をとっている。

[別表]以下に示す皮膚疾患を単独に罹患した場合はアトピー性皮膚炎から除外する。

- 1) おむつかぶれ
- 2) あせも
- 3) 伝染性膿痂疹(とびひ)
- 4) 接触皮膚炎(かぶれ)
- 5) 皮膚カンジダ症
- 6) 乳児脂漏性皮膚炎
- 7) 尋常性魚鱗癬(さめはだ)
- 8) 疥癬
- 9) 虫刺され
- 10) 毛孔性苔癬

### 付表3. 主なステロイド外用薬の臨床効果分類の1例

薬効	一般名	代表的な製品名
I群 ストロングスト	プロピオン酸クロベタゾール 酪酸ジフロラゾン	デルモベート ジフラルール、ダイアコート
II群 ベリーストロン	フランカルボン酸モメタゾン 酪酸プロピオン酸ベタメタゾン フルオシノニド ジプロピオン酸ベタメタゾン ジフルプレドナート アムシノニド 吉草酸ジフルコルトロン 酪酸プロピオン酸ヒドロコルチゾン	フルメタ アンテベート トプシム、シマロン リンデロンDP マイザー ビスダーム ネリゾナ、テクスメテン バンデル
III群 ストロン	プロピオン酸デプロドン プロピオン酸デキサメタゾン 吉草酸デキサメタゾン ハルシノニド 吉草酸ベタメタゾン プロピオン酸ベクロメタゾン フルオシノロンアセトニド	エクラー メサデルム ボアラ、ザルックス アドコルチン リンデロンV、ベトネベート プロパデルム フルコート
IV群 マイルド	吉草酸酪酸プレドニゾロン トリアムシノロンアセトニド プロピオン酸アルクロメタゾン 酪酸クロベタゾン 酪酸ヒドロコルチゾン	リドメックス レダコート、ケナコルトA アルメタ キンダベート ロコイド
V群 ウィーク	プレドニゾロン	プレドニゾロン

### 付表4. 保湿・保護を目的とする主な外用薬（医薬品）

一般名	代表的な製品名
ワセリン 亜鉛華軟膏 親水軟膏 尿素含有製剤	白色ワセリン、プロベト
へパリン類似物質製剤	ウレバール軟膏、ウレバールローション、ケラチナミン軟膏 バスタロン軟膏、バスタロン20軟膏、バスタロンソフトクリーム バスタロン20ソフトクリーム、バスタロン10ローション ヒルドイド、ヒルドイドソフト、ヒルドイドローション

付図1

ステロイド外用薬の外用量のめやす: finger tip unit (FTU)



1-1



1-2

1 FTUは成人の人指し指のDIP関節から遠位端までの指腹側に口径5mmのチューブから押し出した軟膏の量で、おおよそ0.5gに相当する(1-1)。この量で成人の両手掌分の面積を塗ることができる(1-2)。

## 軽度の皮疹

付図2

顔面:軽度落屑、紅斑



付図3

軀幹:軽度落屑、乾燥性皮膚



付図4

下肢:軽度落屑、紅斑、  
一部に軽度の苔癬化を含む



## 強い炎症を伴う皮疹

付図5

顔面:明らかな紅斑、落屑、  
明らかな浸潤



付図6

軀幹:明らかな紅斑と苔癬化



付図7

下肢:明らかな紅斑、  
丘疹、掻破痕、苔癬化



## 入院を要するような症例

付図8-1

上肢: 著明な落屑、紅斑、  
掻破痕



付図9-1

頸部～前胸部: 著明な紅斑、  
落屑、びらん、掻破痕



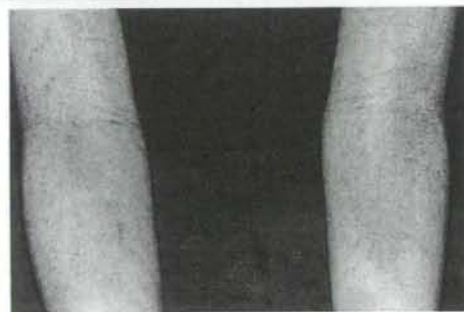
付図8-2

軀幹: 著明な落屑、紅斑、  
掻破痕および苔癬化



付図9-2

上肢: 著明な紅斑、落屑、  
びらん、掻破痕および苔癬化



付図8-3

下肢: 著明な落屑、紅斑、  
掻破痕および苔癬化



付図9-3

下肢: 著明な紅斑、落屑、  
びらん、掻破痕および苔癬化





## 専門医への紹介を要するような皮疹

付図10

乳児軀幹、上肢:著明な紅斑、  
落屑、掻破痕



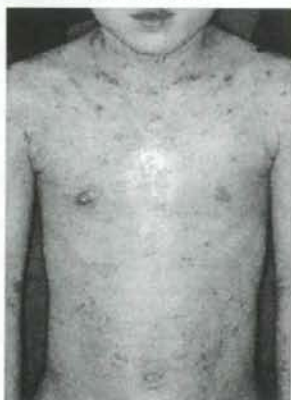
付図13

成人項部:痒疹



付図11

小児軀幹:著明な紅斑、  
掻破痕、びらん



付図14

成人下腿:著明な苔癬化、  
掻破痕



付図12

小児膝窩:紅斑、掻破痕  
および著明な苔癬化



付図15

成人下肢:著明な掻破痕を  
伴う丘疹



## アトピー性皮膚炎治療ガイドライン2008 作成協力者

### 監修

河野 陽一 千葉大学大学院医学研究院小児病態学教授

山本 昇壯 広島大学名誉教授（前アトピー性皮膚炎治療ガイドライン作成責任者）

### 研究協力者

青木 敏之 あおきクリニック・かゆみ研究所院長

秋山 一男 独立行政法人国立病院機構相模原病院副院長

池澤 善郎 横浜市立大学大学院医学研究科環境免疫病態皮膚科学教授

占部 和敬 独立行政法人国立病院機構九州医療センター皮膚科医長

小田嶋 博 独立行政法人国立病院機構福岡病院統括診療部長

片山 一朗 大阪大学大学院情報統合医学講座皮膚科学教授

久保 千春 九州大学病院病院長

高路 修 こうろ皮ふ科院長

近藤 直実 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学教授

佐伯 秀久 東京大学大学院医学系研究科・医学部皮膚科学講師

下条 直樹 千葉大学大学院医学研究院小児病態学准教授

末廣 豊 大阪府済生会中津病院小児科、免疫・アレルギーセンター部長

高橋 清 独立行政法人国立病院機構南岡山医療センター院長

田中 洋一 タナカクリニックひふ科・アレルギー科院長

玉置 邦彦 東京大学大学院医学系研究科・医学部皮膚科学教授

富板美奈子 千葉大学大学院医学研究院小児病態学助教

永倉 俊和 用賀アレルギークリニック院長

古川 漸 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野教授

眞弓 光文 福井大学理事・副学長

望月 博之 群馬大学大学院医学系研究科小児科学准教授

山下 直美 武蔵野大学薬学部・薬学研究所薬物療法学教授

（五十音順）

アトピー性皮膚炎治療ガイドラインは、厚生労働科学研究費補助金を得て行った  
研究成果としてとりまとめられたものである。

また、本ガイドラインの内容については研究班の総意を反映したものであり、  
厚生労働省の見解や政策を示したものではない。

アトピー性皮膚炎治療ガイドライン  
1999年/初 版発行  
2001年/第2版発行  
2002年/第3版発行  
2005年/第4版発行  
2008年/第5版発行

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
佐伯秀久	アトピー性皮膚炎の疫学	玉置邦彦編	最新皮膚科学大系	中山書店	東京	2008	140-4

### 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
Matsukuma E, et al.	Development of fluorescence-linked immunosorbent assay for high throughput screening of interferon-gamma	Allergol Int	55	49-54	2006
Saeki H, et al.	Prevalence of atopic dermatitis determined by clinical examination in Japanese adults	J Dermatol	33	817 - 819	2006
望月博之, 森川昭廣	アトピー性皮膚炎の学童におけるシャワー浴の効果	日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会誌	4(3)	10-16	2006
望月博之, 森川昭廣	シャワー浴の効果は?	Q&A でわかるアレルギー疾患	2(4)	332 - 334	2006
池澤善郎	アトピー性皮膚炎の予知と予防は可能か	小児科	48(1)	37-43	2007
佐伯秀久	成人アトピー性皮膚炎	アレルギー・免疫	14(5)	596 - 600	2007
Saeki H, et al.	Community validation of the U.K. diagnostic criteria for atopic dermatitis in Japanese elementary schoolchildren	J Dermatol Sci	47	227 - 231	2007
富板美奈子 河野陽一	最新の治療ガイドライン アトピー性皮膚炎	臨床と研究	85(2)	177 - 181	2008
富板美奈子 河野陽一	アトピー性皮膚炎の最近の疫学	アレルギーの臨床	28(13)	1109 - 15	2008

Suzuki H, et al	A quantitative and relative increase in intestinal Bacteroides in allergic infants in rural Japan	Asian Journal of Allergy and Immunology	26	113 - 119	2008
鈴木修一ほか	乳児期の黄色ブドウ球菌の皮膚定着とアトピー性皮膚炎の発症	日本小児アレルギー学会誌	23(1)	56-61	2009
下条直樹	母乳とアレルギー	母子保健情報	57	80-86	2008
Mochizuki H, et al.	Effects of skin care with shower therapy on children with atopic dermatitis in elementary schools	Pediatr Dermatol	26(2)	223 - 225	2009
Mochizuki H, et al.	Evaluation of out-in skin transparency using colorimeter and food dye in patients with atopic dermatitis.	Br J Dermatol	In press		2009

## アレルギー・アトピー性皮膚疾患

## アトピー性皮膚炎の疫学

## 小児アトピー性皮膚炎の疫学

## ● 日本における疫学調査の状況

アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis ; AD) は一般に乳幼児・小児期に発症し、加齢とともにその患者数は減少し、一部の患者が成人型アトピー性皮膚炎に移行すると考えられている。森田は2001年(平成13年)に、過去10年間の国内での専門医の診察に基づくアトピー性皮膚炎の有症率\* 調査に関する文献14件を解析している<sup>1)</sup>。年齢別の有症率は、乳児で6~32%、幼児で5~27%、学童で5~15%、大学生で5~9%と報告者により幅がみられるが、全体的には加齢とともに有症率は減少する傾向がみられている。

男女比に関しては、楠目は生後12か月までにアトピー性皮膚炎と診断された365例のうち、男児が217例(59.5%)、女児が148例(40.5%)と男児に多かったと報告している<sup>2)</sup>。また、竹中らは長崎大学新入生のアトピー性皮膚炎有症率を経年的に調査している。1995年以降の有症率は、男性が4.2~8.2%、女性が6.0~10.0%で、2002年までは有意に女性の有症率が男性に比べて高かったと報告している<sup>3)</sup>。なお、男女の有症率に関しては差がみられないという報告も多く、調査対象年齢によっても傾向は異なるようである。

同一地域内での有症率の経時的変化を調べたものとして、上田による調査がある<sup>4)</sup>。1981年の3歳から15歳までのアトピー性皮膚炎有症率は2.8%であったが、その後は階段状に増加し、1992年では6.6%になった。1992年以降は頭打ちの傾向があり、1999年有症率は6.6%であったと報告している。上田はアトピー性皮膚炎の有症率の地域差についても報告している<sup>4)</sup>。愛知県名古屋(人口215万)、小牧市(人口13万)、鳳来町(人口1.5万)での有症率を比較したところ、ほぼ例年、名古屋市が小牧市や鳳来町に比べて有症率が高かった。

竹中らは2003年(平成15年)度に、長崎県長与町で乳幼児、小学校から高校での健診時にアトピー性皮膚炎の診断、重症度の判定を行っている<sup>5)</sup>。小学生から高校生の有症率は男子9.5%、女子9.1%で、合計9.3%であった。小学校1年生から高校3年生までは順に、12.3%、14.1%、8.8%、8.8%、10.2%、10.6%、6.3%、8.2%、6.4%、4.4%、7.4%、8.8%であった。重症度では、軽症例が89.0%、中等症例が11.0%であった。また、乳幼児の有症率は、0歳児4.7%、1歳児15.1%、2歳児18.0%、3歳児12.9%、4歳児16.5%、5歳児19.6%であった<sup>5)</sup>。

## ● 全国規模の疫学調査の状況

アトピー性皮膚炎の有症率に関しては、医師が直接健診に参加して調査した報告は少ない。過去10年間にわたって調べた文献14件のうち、全国調査は1報告のみであり、他は地区に限定されたものであった<sup>1)</sup>。そこで筆者らは、2000~2002年(平成12~14年)度厚生労働科学研究「アトピー性皮膚炎の患者数の実態及び発症・悪化に及ぼす環境因子の調査に関する研究」(班長:山本昇壯)の一環として、アトピー性皮膚炎の患者数の実態をより正確に把握することを目的に、保健所および小学校健診による全国規模の有症率調査を実施した<sup>6,7)</sup>。

北海道、東北、関東、中部、近畿、中国、四国、九州それぞれの地区に拠点施設を設け、上記8地区の保健所および小学校において、有症率調査のための専門医による健診を実施した。健診予定総人数は統計学的に1歳半児および3歳児各5,600人、小学1年生および6年生各11,200人、総計33,600人と設定した。一部の地区では、4か月児(乳児)および大学生の有症率調査も行った。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」に基づいて行い<sup>8)</sup>、重症度は厚生労働科学研究による治療ガイドラインに沿って、軽症、中等症、重症、最重症の4段階で評価した(表1)<sup>9)</sup>。

年齢別有症率を図1に示す<sup>10)</sup>。健診による

\*本稿においては、アトピー性皮膚炎の有症率と有病率は同一とみなし、有症率に統一した。

有症率は全国平均で4か月児12.8% (351/2,744), 1歳半児9.8% (631/6,424), 3歳児13.2% (906/6,868), 小学1年生11.8% (1,479/12,489), 小学6年生10.6% (1,185/11,230), 大学生8.2% (684/8,317)であった。年齢および地区別の有症率を表2に示す<sup>6)</sup>。年齢による有症率の推移は各地区によって異なる傾向がみられた。すなわち、幼児期よりも学童期の有症率が低い地区(北海道, 東北, 四国), 高い地区(関東, 近畿), あまり変化がみられない地区(中部, 中国, 九州)など、一定の傾向はみられなかった。なお、この調査では学童期の有症率において、男児と女児間で有意差はみられなかった。

アトピー性皮膚炎症例の重症度別割合を表3に示す<sup>6)</sup>。中等症以上の割合を年齢別で見ると、1歳6か月児15.7%, 3歳児15.0%, 小学1年生24.1%, 小学6年生28.5%, 大学生27.4%であった。この結果からみると、幼児期よりも学童期において概して症状が悪化する傾向がみられる。また、重症以上の占める割合を小学1年生から大学生にかけて年齢別で見ると、小学1年生で1.7%, 小学6年生で2.2%, 大学生で5.5%と年齢が上がるにつれて上昇する傾向が認められた。なお、学童期において男児と女児間で重症度の割合に明らかな差はみられなかった。

## ●世界中の有症率の状況

アトピー性皮膚炎の有症率を世界的な規模で

調べたものとして、ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) による疫学調査がある<sup>11)</sup>。これはアンケート調査であるが、56か国を対象にした大規模なものである(表4)。6~7歳の児童では90都市、256,410人を対象に、また13~14歳の児童では153都市、458,623人を対象に調査されている。6~7歳では有症率はイランの1.1%からスウェー

表1 アトピー性皮膚炎の重症度の目安

軽症:面積にかかわらず、軽度の皮疹のみみられる。
中等症:強い炎症を伴う皮疹が体表面積の10%未満にみられる。
重症:強い炎症を伴う皮疹が体表面積の10%以上、30%未満にみられる。
最重症:強い炎症を伴う皮疹が体表面積の30%以上にみられる。

\*軽度の皮疹:軽度の紅斑、乾燥、落屑主体の病変  
 \*\*強い炎症を伴う皮疹:紅斑、丘疹、びらん、浸潤、苔癬化などを伴う病変  
 (山本昇社, 2004<sup>6)</sup>より引用)

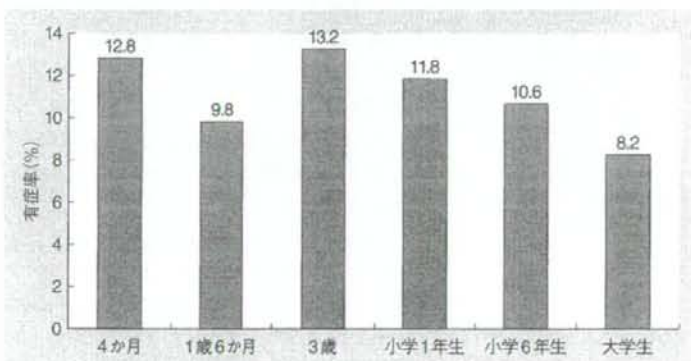


図1 アトピー性皮膚炎の年齢別有症率  
 (日本アレルギー学会アトピー性皮膚炎ガイドライン専門部会, 2006<sup>10)</sup>より改変)

表2 アトピー性皮膚炎の年齢別・地区別有症率

	4か月	1歳6か月	3歳	小学1年生	小学6年生	大学生
北海道	19.6% (札幌)	13.1% (札幌)	15.2% (札幌)	11.8% (旭川)	10.1% (旭川)	—
東北 (岩手)	—	13.9	19.2	7.5	7.4	—
関東	6.9 (千葉)	7.8 (千葉)	9.1 (千葉)	10.5 (東京)	12.7 (東京)	12.7% (東京大学)
中部 (岐阜)	11.5	8.1	11.8	13.2	11.7	—
近畿 (大阪)	6.4	6.5	6.7	14.5	12.8	6.6 (近畿大学)
中国 (広島)	11.6	8.1	10.9	11.2	11.4	9.1 (広島大学)
四国 (高知)	19.5	16.2	17.7	8.5	7.0	—
九州 (福岡)	18.4	10.1	21.3	15.4	14.5	—
全国平均	12.8%	9.8%	13.2%	11.8%	10.6%	8.2%

(山本昇社, 2003<sup>6)</sup>より改変)

表3 アトピー性皮膚炎症例の年齢別重症度

	1歳6か月	3歳	小学1年生	小学6年生	大学生
軽症	84.3%	85.0%	75.9%	71.6%	72.7%
中等症	12.4	11.8	22.4	26.3	21.9
重症	2.5	2.3	1.4	1.9	4.2
最重症	0.8	0.9	0.3	0.3	1.3

(山本昇社, 2003<sup>6)</sup>より引用)

表4 世界中のアトピー性皮膚炎有症率

地域	国	6~7歳	13~14歳	地域	国	6~7歳	13~14歳
東・東南アジア	日本	16.9%	10.5%	中南米	アルゼンチン	7.5%	7.3%
	中国		1.2		ブラジル	7.3	5.3
	香港	3.9	2.7		チリ	10.9	8.8
	マレーシア	8.5	8.0		コスタリカ	8.7	7.2
	フィリピン	5.1	5.2		メキシコ	4.9	4.4
	シンガポール	2.8	7.4		パラグアイ		10.8
	韓国	8.8	3.8		パナマ	7.9	7.8
	台湾	3.5	1.4		ペルー		8.2
	タイ	11.9	8.2		ウルグアイ	8.6	7.2
	合計	8.2	4.6		合計	8.5	7.2
南アジア	インド	2.7%	3.8%	西欧	オーストリア	6.4%	5.2%
	インドネシア		1.2		ベルギー	7.7	6.7
	合計	2.7	3.6		フランス	8.8	10.0
西アジア (含地中海地方)	イラン	1.1%	2.6%		ドイツ	6.8	6.9
	クウェート		8.3		ギリシャ	4.1	3.1
	レバノン		4.7		イタリア	5.8	5.7
	マルタ	4.2	7.7		ポルトガル	9.6	4.4
	モロッコ		8.7		アイルランド		13.6
	オマーン	4.2	4.7		スペイン	3.3	4.4
	パキスタン		9.6	イギリス	13.0	15.8	
	合計	2.9	6.5		合計	6.1	8.8
オセアニア	オーストラリア	10.9%	9.7%	北欧・東欧	アルバニア	2.5%	0.8%
	ニュージーランド	14.7	12.7		エストニア	9.8	5.7
	合計	13.3	11.5		フィンランド		15.6
アフリカ	エチオピア		11.4%		グルジア	4.6	2.5
	ケニア		10.4		ラトビア	8.0	4.9
	ナイジェリア		17.7		ポーランド	6.3	5.4
	南アフリカ		8.3		ルーマニア		6.3
	アルジェリア		5.2		ロシア		3.0
	合計		10.9		スウェーデン	18.4	14.5
北米	カナダ	8.5%	9.4%	ウズベキスタン		3.0	
	アメリカ		8.5	合計	7.6	7.5	
	合計	8.5	9.1	全体	総計	7.3%	7.4%

(Williams Hら, 1999<sup>11)</sup>より改変)

デンの18.4%の範囲にあり、全体では7.3%であった。13~14歳では有症率はアルバニアの0.8%からナイジェリアの17.7%の範囲にあり、全体では7.4%であった。概して、オセアニアや北欧では有症率が高く、アジアや東欧では有症率が低いことがわかる。興味深いことに、中国からアジアを経て東地中海地方から東欧に至るまで、有症率の低い地域が帯状に存在している。また、有症率が高い国はスウェーデン、フィンランド、イギリス、日本、オーストラリア、ニュージーランドなどの先進国に多いことがわかる。

## 成人アトピー性皮膚炎の疫学

近年、成人のアトピー性皮膚炎が増加傾向にあるといわれているが、成人アトピー性皮膚炎に関する疫学調査はまだ少なく<sup>12-17)</sup>、実態が正確には把握できていないのが現状である。また、

これらの調査の多くは病院や診療所での患者調査か<sup>12,13)</sup>、質問票を用いた調査であり<sup>13,14,16)</sup>、成人を対象とした健診でアトピー性皮膚炎の有症率を調査した報告はきわめて少ない<sup>15,17)</sup>。

## ● 健診以外の疫学調査

木村らは1994年に、青森県立中央病院皮膚科新患者における最近27年間のアトピー性皮膚炎の統計調査を報告している<sup>12)</sup>、1966年から1992年までの総アトピー性皮膚炎患者数は5,611人で、男性2,719人、女性2,892人であった。外来新患者に対するアトピー性皮膚炎患者の頻度は3.52%で、男性1.71%、女性1.81%であった。どの年代でも3~5歳のアトピー性皮膚炎患者の頻度が最も高かったが、8歳以上のアトピー性皮膚炎は、年代が新しいほど(最近になるにつれ)多くなってきていた。また、1970年代後半ごろより、およそ5年たつごとに患者の頻度の増加の著しい年齢

も上昇し、乳幼児から学童へ、さらには思春期へと移り、1990年代では成人型アトピー性皮膚炎患者の頻度の増加が著明であった<sup>12)</sup>。

吉川らは1996年に、大阪府成人アトピー性皮膚炎調査結果を報告している<sup>13)</sup>。この調査のなかで、1994年8～10月の3か月間に、大阪府内と一部の大阪府外の医療機関を受診した、あるいは協力の申し出があった患者の会が把握した16歳以上のアトピー性皮膚炎患者のうち、豊中市在住の患者については全症例(軽症、中等症、重症)を対象にアンケートによる実態調査を行った。豊中市の患者(783人)の年齢分布は、16歳から21歳までは横ばいで、その後は年齢とともに漸減した。16歳以上のアトピー性皮膚炎患者報告数が、同じ年齢の人口に対して占める割合は、男性で0.23%、女性で0.24%であった。また、男女別、年齢別に割合をみると、女性は16～24歳で高く0.8%であったが、加齢とともに急速に減少した。一方、男性は16～19歳で0.8%と女性と同じ値を示したが、加齢とともに女性を下回り、35歳以上になって女性と同じレベルに達した。最初に症状が現れた時期は小学生以前が最も多くて45%を占め、次が小学生時代の20%であったが、16歳以上も23%を占めていた<sup>13)</sup>。

Mutoらは2003年に、U. K. Working Party's Diagnostic Criteria<sup>14)</sup>という質問票(日本語版)を用いて、日本人の成人集団(30歳以上)におけるアトピー性皮膚炎の有症率を調べ、報告している<sup>14)</sup>。1997年9月から1998年8月までのあいだに、虎の門病院の職員健診に参加した職員およびその家族のうち、30歳以上の10,762人(男性8,076人、女性2,686人)に対して質問票を配布し回答を得た。その結果、有症率は全体で2.9%であった。また、男女別では男性2.8%、女性3.1%であったが、有意差は認められなかった。年齢別では、30歳代が3.5%、40歳代が3.1%、50歳代が2.6%、60歳以上が2.6%であったが、どちらの性においても年齢別で有意差は認められなかった<sup>14)</sup>。

Dotterudらは1999年に、ロシア北方の大気汚染のひどい地区で学童の親(3,368人)を対象に質問票による調査を行い、成人アトピー性皮膚炎の有症率を報告している<sup>15)</sup>。累積としての有症率(今までにアトピー性皮膚炎になったことのある割合)は、男性5.3%、女性6.5%で、全体で5.9%であった。

表5 成人アトピー性皮膚炎(AD)有症率

年齢	AD患者(人)			参加者(人)			有症率(%)		
	男性	女性	合計	男性	女性	合計	男性	女性	合計
20歳代	10	29	39	176	221	397	5.7	13.1	9.8
30歳代	38	41	79	552	355	907	6.9	11.5	8.7
40歳代	10	7	17	226	164	390	4.4	4.3	4.4
50～60歳代	4	7	11	266	163	429	1.5	4.3	2.6
合計	62	84	146	1,220	903	2,123	5.1	9.3	6.9

(Saeki H 等, 2006<sup>17)</sup>より改変)

表6 成人アトピー性皮膚炎(AD)重症度

年齢	性別	AD患者				
		AD患者	軽症	中等症	重症	最重症
年齢	20歳代	39人	76.9%	17.9%	2.6%	2.6%
	30歳代	79	72.2	21.5	5.1	1.3
	40歳代	17	82.4	17.6	0.0	0.0
	50～60歳代	11	100.0	0.0	0.0	0.0
性別	男性	62人	75.8%	21.0%	3.2%	0.0%
	女性	84	77.4	16.7	3.6	2.4
	合計	146人	76.7%	18.5%	3.4%	1.4%

(Saeki H 等, 2006<sup>17)</sup>より改変)

## ●健診による疫学調査

日本において皮膚科医の健診による成人アトピー性皮膚炎の疫学調査は行われてこなかった。そこで、筆者らは2003～2005年(平成15～17年)度の厚生労働科学研究「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)のなかで、成人アトピー性皮膚炎有症率を調べるために、東京大学職員を対象に健診による有症率調査を実施した<sup>17)</sup>。

2004年(平成16年)9月に実施された東京大学職員健診に皮膚科医が参加して、東京大学職員のうち、2,123人(男性1,220人、女性903人)に対して皮膚科健診を実施し、アトピー性皮膚炎の有症率および重症度を調査した。アトピー性皮膚炎の診断は日本皮膚科学会が定めた診断基準に基づいて行い<sup>18)</sup>、重症度は厚生労働科学研究による治療ガイドラインに沿って評価した(表1)<sup>9)</sup>。参加者は20～69歳、平均年齢は38.8±10.4歳(男性39.6±10.5歳、女性37.7±10.4歳)で、有症率は全体で6.9%であった。年齢別有症率は、20歳代が9.8%、30歳代が8.7%、40歳代が4.4%、50～60歳代が2.6%だった。(表5)。30歳代の有症率は40歳代の有症率より有意に高かった( $p < 0.0001$ )。男女別有症率は、男性が5.1%、女性が9.3%と女性に有意に高く( $p < 0.001$ )、特に20歳代、30歳代の女性で高かった(表5)。重症度は全体で軽症が76.7%、中等症が



18.5%, 重症が3.4%, 最重症が1.4%であった(表6)。40歳代以上では重症や最重症の症例はなく, また男性で最重症の症例はみられなかった。

Plunkettらは1999年にオーストラリアのメルボルンで, 20~94歳の成人1,457人(男性670人, 女性787人)を対象に皮膚科医による健診を行い, アトピー性皮膚炎の有症率を調査した<sup>15)</sup>。有症率は全体で6.9%であり, 男性が5.7%, 女性が8.1%と女性に高い傾向がみられた。また, 男女ともに年齢が上がるにつれて有症率が下がる傾向がみられた(男性では20歳代が10%, 30歳代が8%, 40歳代が7%, 50歳代が3%, 60歳代が2%, 女性では20歳代が22%, 30歳代が13%, 40歳代が7%, 50歳代が7%, 60歳代が2%)。重症度別分類では軽症, 中等症, 重症の3つに分類されているが, 全体で軽症が82.8%, 中等症が14.6%, 重症が2.6%であった。

今までに行われた成人アトピー性皮膚炎疫学

調査で, 有症率や頻度に関きみられるのは, 調査対象や調査方法の違いによると思われる。日本とオーストラリアで行われた皮膚科医の健診による疫学調査の結果を比較すると, 以下の4点で似た傾向を示しており, 興味深い<sup>15,17)</sup>。

- ① 全体での成人アトピー性皮膚炎の有症率は約7%である。
- ② 女性のほうが男性より有症率が高い。
- ③ 加齢とともに有症率が下がる。
- ④ 成人アトピー性皮膚炎の約8割は軽症である。

この2つのデータは症例数も少なく, 地区も限定されており一般化はできないが, アトピー性皮膚炎は小児や思春期のみならず, 20歳代, 30歳代の若い成人においても頻度の高い皮膚疾患である可能性が示唆される。今後はさまざまな地域や職場で, 健診による成人アトピー性皮膚炎の疫学調査が進んでいくことが望まれる。(佐伯秀久)

## 文献

- 1) 森田栄伸. アトピー性皮膚炎患者数の実態, 原因・悪化因子に関する資料の解析・整理. 平成13年度厚生科学研究費補助金 免疫・アレルギー等研究事業研究報告書 第2分冊. 2002. p.184-6.
- 2) 楠目和代. 愛媛県松山市近郊における乳児のアトピー性皮膚炎—とくに出生季節別の頻度について. アレルギー 2000; 49: 1087-92.
- 3) 竹中 基, 片山一朗. 長崎大学新入生健診におけるアトピー性皮膚炎の検討—1995年~2002年のまとめ. 臨床と薬物治療 2004; 23: 92-6.
- 4) 上田 宏. アトピー性皮膚炎の疫学. 小児内科 2000; 32: 986-92.
- 5) 竹中 基, 堀内保宏, 松永義孝, ほか. 長崎県下におけるアトピー性皮膚炎の疫学調査. 皮膚の科学 2004; 3 (増4): 13-8.
- 6) 山本昇壯. アトピー性皮膚炎の患者数の実態及び発症・悪化に及ぼす環境因子の調査に関する研究. 平成14年度厚生労働科学研究費補助金 免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業研究報告書 第1分冊. 2003. p.71-7.
- 7) Saeki H, Iizuka H, Akasaka T, et al. Prevalence of atopic dermatitis in Japanese elementary school-children. Br J Dermatol 2005; 152: 110-4.
- 8) 日本皮膚科学会. アトピー性皮膚炎の定義・診断基準. 日皮会誌 1994; 104: 1210.
- 9) 山本昇壯. アトピー性皮膚炎の治療ガイドライン. アレルギー科 2004; 17: 555-63.
- 10) 日本アレルギー学会アトピー性皮膚炎ガイドライン専門部会. アトピー性皮膚炎の疫学. 山本昇壯, 河野陽一, 編. アトピー性皮膚炎診療ガイドライン2006. 東京: 協和企画; 2006. p.7-13.
- 11) Williams H, Robertson C, Stewart A, 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.
- 12) 木村有子, 高木順之, 福士 暁. 青森県立中央病院皮膚科新患患者における最近27年間のアトピー性皮膚炎の統計調査. 青森県立中央病院医誌 1994; 39: 123-9.
- 13) 吉川邦彦, 青木敏之, 手塚 正, ほか. 大阪府成人アトピー性皮膚炎調査結果報告書. 皮膚 1996; 38 (増17): 1-70.
- 14) Muto T, Hsieh SD, Sakurai Y, et al. Prevalence of atopic dermatitis in Japanese adults. Br J Dermatol 2003; 148: 117-21.
- 15) Plunkett A, Merlin K, Gill D, et al. The frequency of common nonmalignant skin conditions in adults in central Victoria, Australia. Int J Dermatol 1999; 38: 901-8.
- 16) Dotterud LK, Falk ES. Atopic disease among adults in Northern Russia, an area with heavy air pollution. Acta Derm Venereol 1999; 79: 448-50.
- 17) Saeki H, Tsunemi Y, Fujita H, et al. Prevalence of atopic dermatitis determined by clinical examination in Japanese adults. J Dermatol 2006; 33: 817-9.
- 18) Williams HC, Burney PGJ, Pembroke AC, et al. The U.K. Working Party's Diagnostic Criteria for Atopic Dermatitis. III. Independent hospital validation. Br J Dermatol 1994; 131: 406-16.

# 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 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>

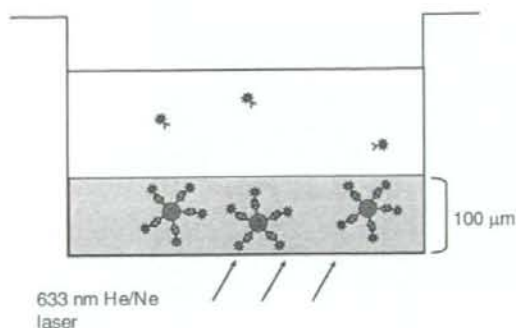
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is an established immunoassay used to quantify various cytokines. Conventional ELISA, which is not readily amenable for screening large numbers of samples in drug screenings, requires many processes and large quantities of antibody. For drug discovery and development, 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<sup>6</sup> beads/ml) at 4°C.

### PREPARATION OF RECOMBINANT hIL-18 PROTEIN

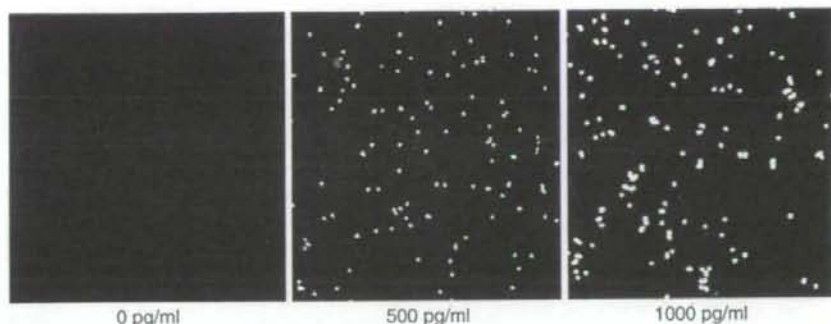
We used recombinant wild-type hIL-18 for the inhibition assay. Expression and purification were carried out as described previously with minor modifications.<sup>10-12</sup> The concentration of purified hIL-18 protein was estimated using the absorbance constant (6160) for hIL-18.

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

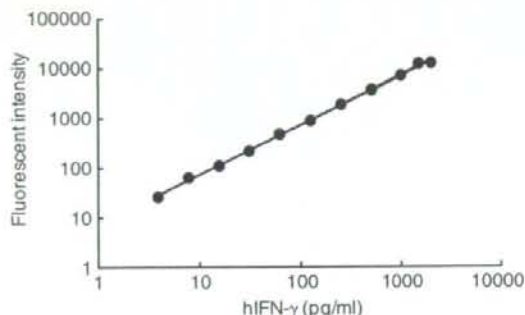
hIL-18 inhibition assay based on hIFN- $\gamma$  induction was carried out as previously described.<sup>13,14</sup> Briefly, human myelomonocytic KG-1 cells (ATCC CCL246) were grown in a culture medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, L-glutamine (2 mmol/L), 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<sup>6</sup> 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  $\pm$  2.1 and that of the wells, which have 3.9 pg/ml of the minimum IFN- $\gamma$  is 77.2  $\pm$  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,