

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）

分担研究報告書

適切なスキンケア、薬物治療方法の確立とアトピー性皮膚炎の発症・増悪予防、自己管理に関する研究

分担研究項目：スキンケアによる乳児湿疹・アトピー性皮膚炎予防に関する研究

研究代表者：斎藤 博久 独立行政法人 国立成育医療研究センター 副研究所長

分担研究者：

松本健治 (独) 国立成育医療研究センター 研究所 免疫アレルギー研究部 部長

大矢 幸弘 (独) 国立成育医療研究センター 生体防御系内科部 アレルギー科 医長

新関 寛徳 (独) 国立成育医療研究センター 感覚器・形態外科部 皮膚科 医長

坂本なほ子 (独) 国立成育医療研究センター 研究所 成育疫学研究室 室長

左合 治彦 (独) 国立成育医療研究センター 周産期センター センター長

竹森 利忠 理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター グループディレクター

研究協力者：

堀向 健太 (独) 国立成育医療研究センター 生体防御系内科部 アレルギー科 医師

野崎 誠 (独) 国立成育医療研究センター 感覚器・形態外科部 皮膚科 医員

本村健一郎 (独) 国立成育医療研究センター 周産期センター レジデント

徳永秀美 (独) 国立成育医療研究センター 薬剤部

青木智子 (独) 国立成育医療研究センター 6 西病棟看護師

西海真理 (独) 国立成育医療研究センター 医療連携室 看護師

早瀬和子 (独) 国立成育医療研究センター 生体防御系内科部 アレルギー科

濱口真奈 (独) 国立成育医療研究センター 生体防御系内科部 アレルギー科

石川文彦 理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター ヒト疾患モデル研究ユニット  
ユニットリーダー

研究要旨：アトピー性皮膚炎(AD)は掻痒や慢性・反復性経過を特徴とし、掻痒による生活の質（quality of life；QOL）の低下が著しいが、有効な発症予防法はない。AD患者の皮膚局所においては抗原感作が経皮的にも行われる可能性が高く、湿疹の悪化がアレルギー疾患の引き金になりうることを示唆されている。そこで、湿疹がまだ出現していない生後1週未満の新生児期から24週間、スキンケアを予防的（proactive）に行う群と、必要時（reactive）に行う群において、AD予防として有効かどうかを検討する。今年度は、70例のリクルートを行う予定であったが、震災などで東京周辺から離れる家族が多かったことなど各種要因により、2012/2/28現在で50例の同意を得るにとどまっている。しかし、そのうち35名は2011年10月以降に同意が得られており、今後のリクルート強化により当初の予定を達成できると考えている。

## A. 研究目的

近年、アトピー性皮膚炎の患者の数は、増加してきており社会問題化している。「日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎治療ガイドライン 2009 改訂版」では、治療の基本方針として生理学的機能異常に対しては保湿剤外用などのスキンケアが推奨されているものの、特に乳幼児のアトピー性皮膚炎においてはエビデンスの不足からそれぞれの医療機関・医師により実際の治療および指導にばらつきを生じているのが現状である。

アレルギー疾患の有効な発症予防法を開発することは喫緊の重要な課題であるが、リスクを大幅に下げような方法は存在しない。我々は以前に、生後 1 カ月時の乳児湿疹がアレルギー疾患発症に先行すること (Matsumoto K, et al. *Int Arch Allergy Immunol* 2005)、および予防的なアトピー性皮膚炎治療により血清 IgE が低下することなど(Fukuie T, et al. *Br J Dermatol*, 2010)を見いだしている。そこで本研究では、アトピー性皮膚炎の既往のある母胎から出産する新生児を対象として、アトピー性皮膚炎・乳児湿疹の発症、および生後 12 週以降におけるアレルギー特異的 IgE 抗体の獲得とアレルギー疾患発症の予防を到達目標に設定し、皮膚バリア機能補助剤を使用したスキンケアの予防効果が無作為ランダム化介入試験により検討する。

本研究と同様に、国立成育医療研究センターにおいて実施している出生コホート調査参加者のうちアレルギー疾患発症高リスク者を対象とする免疫ヒト化マウスによるアレルギー疾患モデルの樹立に関する研究（理化学研究）と連携し、効率的に研究を実施する。アレルギー特異的 IgE 抗体の測定は、徳島大学で開発したアレルギー診断タンパクチップをもちいた

特異 IgE 抗体測定にをもちいる。

## B. 方法

無作為化オープン並行群間試験で実施する。生後 1 週未満の健康な新生児を対象とし、24 週間、スキンケアを予防的 (proactive) に実施する群と必要時 (reactive) に実施する群において、乳児湿疹、アトピー性皮膚炎の発症率を比較する。このとき、フィラグリンの遺伝子変異の有無について検討し、層別化して検定する。さらに、TEWL (transepidermal water loss)、角質水分量、皮膚黄色ブドウ球菌および 2 歳時の特異的 IgE 抗体などを測定する。これら主要評価項目および副次評価項目を含む内容は UMIN 臨床試験登録システムに前登録 (UMIN-CTR: R000005429 スキンケアによる乳児湿疹・アトピー性皮膚炎予防に関する研究) した。

## C. 結果

2010 年 11 月より症例登録を開始し、本年度中に予定対象者数全員 70 名の試験参加登録を完了する予定であったが、東日本大震災に続く原発事故の問題などで東京周辺から離れる家族が多く正常分娩の入院数の減少が続いていたこと、あらたに登録が開始された出生コホート研究との来院スケジュール重複、スキンケアが有効であるとの噂により試験に参加せず独自にスキンケアを実施するケースなど予期しない事態が続き、試験参加登録が遅れた。しかし、入院数の回復してきた 2011 年 10 月より、他の研究との調整を行い、さらに妊娠初期より積極的に参加呼びかけを行った結果、2012/2 現在で 50 名より参加同意が得られており、そのうち 35 例はリクルート強化後の同意取得である。今後、このリクルート強化を継続して行う。現在、32 週までの観察期間を終えた児 12

名のうち、副作用は1例も起きていない。70例中35例が32週の観察期間を終えた時点で、当初の予定通り中間解析を行う予定である。

#### D. 考察

我々は以前に新生児を対象とした前向きコホート研究から、生後1カ月時に乳児湿疹がアレルギーマーチに先行することを見いだしている(Matsumoto K, et al, *Int Arch Allergy Immunol* 2005;37:S69)。また、ADの治療によって、血清IgEが低下することを示した(Fukuie T, et al. *Br J Dermatol*, 2010 Jun 10 Epub)。アトピー性皮膚炎患者皮膚局所においては抗原感作が経皮的にも行われる可能性が高い(Lack G. et al, *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121:1331)ということも教科書的な概念となりつつあり、湿疹の悪化がアレルギー疾患の引き金になりうることが示唆されている。実際に、皮膚バリア機能に関連する *filagrin* 変異により、ADを高率に発症する (Fleckman P. et al, *Exp Dermatol*. 2002 ;11(4):327-36)ことは、皮膚バリア機能を良好に保つことが重要であることを示している。また、ADでは、皮疹部のみならず無疹部においても、角質細胞間脂質のひとつであるセラミド量が低下しておりバリア機能が低下していると報告されており (Imokawa G, et al. *J Invest Dermatol*. 1991 ;96:523-6)、乾燥肌に保湿剤を7週間使用することによって皮膚のバリア機能が改善することを示した報告がある

(Buraczewska I, et al. *Br J Dermatol*.2007 ; 156:492-8)。

まだキーオープン前のため中間解析結果を示すことができないが、全体的にアトピー性皮

膚炎の発症は少なく、いずれの方法でもスキンケアの有効性を示しているような印象を受ける。今後、上記のような観察研究における「乳児湿疹がアレルギー疾患発症に先行すること、および予防的なアトピー性皮膚炎治療により血清IgEが低下すること」という結果より得られた「スキンケアがアトピー性皮膚炎やアレルギー感作に有効かもしれない」という仮説を検証していく。

#### E. 結論

本研究は、皮膚バリア機能補助剤による新生児期からの介入がアトピー性皮膚炎の発症、ひいてはアレルギー感作を予防する効果があるかどうかを検討する独創的かつ実現性が高い介入試験であり、この成果はアレルギー疾患の発症予防という点で広く社会に還元でき、また医療費の削減にも繋がる可能性と次世代の国民に対する大きな貢献が期待できる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Itoh S, Kimura N, Axtell RC, Velotta JB, Gong Y, Wang X, Kajiwara N, Nambu A, Shimura E, Adachi H, Iwakura Y, Saito H, Okumura K, Sudo K, Steinman L, Robbins RC, Nakae S, Fischbein MP. Interleukin-17 accelerates allograft rejection by suppressing regulatory T cell expansion. *Circulation*. 2011 Sep 13;124(11 Suppl):S187-96.

Noguchi E, Sakamoto H, Hirota T, Ochiai K, Imoto Y, Sakashita M, Kurosaka F, Akasawa A, Yoshihara S, Kanno N, Yamada Y, Shimojo N, Kohno Y, Suzuki Y, Kang MJ, Kwon JW, Hong SJ, Inoue K, Goto Y, Yamashita F, Asada T, Hirose H, Saito I, Fujieda S, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko

- H, Nakamura Y, Nomura I, Tamari M, Arinami T, Yoshida T, Saito H, Matsumoto K. Genome-wide association study identifies HLA-DP as a susceptibility gene for pediatric asthma in Asian populations. *PLoS Genet.* 2011 Jul;7(7):e1002170.
- Matsumoto K, Fukuda S, Hashimoto N, Saito H. Human eosinophils produce and release a novel chemokine, CCL23, in vitro. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011;155 Suppl 1:34-9.
- Iikura K, Katsunuma T, Saika S, Saito S, Ichinohe S, Ida H, Saito H, Matsumoto K. Peripheral blood mononuclear cells from patients with bronchial asthma show impaired innate immune responses to rhinovirus in vitro. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011;155 Suppl 1:27-33.
- Ohta K, Bousquet PJ, Aizawa H, Akiyama K, Adachi M, Ichinose M, Ebisawa M, Tamura G, Nagai A, Nishima S, Fukuda T, Morikawa A, Okamoto Y, Kohno Y, Saito H, Takenaka H, Grouse L, Bousquet J. Prevalence and impact of rhinitis in asthma. SACRA, a cross-sectional nation-wide study in Japan. *Allergy* 2011 Oct;66(10):1287-95.
- Arae K, Oboki K, Ohno T, Hirata M, Nakae S, Taguchi H, Saito H, Nakajima T. Cimetidine enhances antigen-specific IgE and Th2 cytokine production. *Allergol Int.* 2011 Sep;60(3):339-44.
- Ohno T, Oboki K, Morita H, Kajiwara N, Arae K, Tanaka S, Ikeda M, Iikura M, Akiyama T, Inoue J, Matsumoto K, Sudo K, Azuma M, Okumura K, Kamradt T, Saito H, Nakae S. Paracrine IL-33 stimulation enhances lipopolysaccharide-mediated macrophage activation. *PLoS One.* 2011 Apr 11;6(4):e18404.
- Ebata R, Abe J, Yasukawa K, Hamada H, Higashi K, Suwazono Y, Saito H, Terai M, Kohno Y. Increased production of vascular endothelial growth factor-d and lymphangiogenesis in acute Kawasaki disease. *Circ J.* 2011 May 25;75(6):1455-62.
- Oboki K, Nakae S, Matsumoto K, Saito H. IL-33 and Airway Inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2011 Apr;3(2):81-8.
- Nomura I, Morita H, Hosokawa S, Hoshina H, Fukuie T, Watanabe M, Ohtsuka Y, Shoda T, Terada A, Takamasu T, Arai K, Ito Y, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Four distinct subtypes of non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies in neonates and infants, distinguished by their initial symptoms. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Mar;127(3):685-8.e1-8.
- Aung G, Niyonsaba F, Ushio H, Kajiwara N, Saito H, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K. Catestatin, a neuroendocrine antimicrobial peptide, induces human mast cell migration, degranulation and production of cytokines and chemokines. *Immunology.* 2011 Apr;132(4):527-39.
- Tanaka K, Miyake Y, Arakawa M, Sasaki S, Ohya Y. U-shaped association between body mass index and the prevalence of wheeze and asthma, but not eczema or rhinoconjunctivitis: the ryukyus child health study. *J Asthma.* 2011 Oct;48(8):804-10.
- Jwa SC, Arata N, Sakamoto N, Watanabe N, Aoki

H, Kurauchi-Mito A, Dongmei Q, Ohya Y, Ichihara A, Kitagawa M. Prediction of pregnancy-induced hypertension by a shift of blood pressure class according to the JSH 2009 guidelines. *Hypertens Res.* 2011 Nov;34(11):1203-8.

Futamura M, Ohya Y, Akashi M, Adachi Y, Odajima H, Akiyama K, Akasawa A. Age-related Prevalence of Allergic Diseases in Tokyo Schoolchildren. *Allergol Int.* 2011 Nov;60(4):509-15.

Okubo H, Miyake Y, Sasaki S, Tanaka K, Murakami K, Hirota Y; Osaka Maternal and Child Health Study Group. Dietary patterns during pregnancy and the risk of postpartum depression in Japan: the Osaka Maternal and Child Health Study. *Br J Nutr.* 2011 Apr;105(8):1251-7.

Jwa SC, Arata N, Sakamoto N, Watanabe N, Aoki H, Kurauchi-Mito A, Dongmei Q, Ohya Y, Ichihara A, Kitagawa M. Prediction of pregnancy-induced hypertension by a shift of blood pressure class according to the JSH 2009 guidelines. *Hypertens Res.* 2011 Nov;34(11):1203-8.

Ishida Y, Honda M, Kamibeppu K, Ozono S, Okamura J, Asami K, Maeda N, Sakamoto N, Inada H, Iwai T, Kakee N, Horibe K. Social outcomes and quality of life of childhood cancer survivors in Japan: a cross-sectional study on marriage, education, employment and health-related QOL (SF-36). *Int J Hematol.* 2011 May;93(5):633-44.

Ishida Y, Ozono S, Maeda N, Okamura J, Asami K, Iwai T, Kamibeppu K, Sakamoto N, Kakee N,

Horibe K. Medical visits of childhood cancer survivors in Japan: a cross-sectional survey. *Pediatr Int.* 2011 Jun;53(3):291-9.

Usui N, Kitano Y, Okuyama H, Saito M, Masumoto K, Morikawa N, Takayasu H, Nakamura T, Hayashi S, Kawataki M, Ishikawa H, Nose K, Inamura N, Sago H. Prenatal risk stratification for isolated congenital diaphragmatic hernia: results of a Japanese multicenter study. *J Pediatr Surg.* 2011 Oct;46(10):1873-80.

Takahashi H, Watanabe N, Sugibayashi R, Aoki H, Egawa M, Sasaki A, Tsukahara Y, Kubo T, Sago H. Increased rate of cesarean section in primiparous women aged 40 years or more: a single-center study in Japan. *Arch Gynecol Obstet.* 2011 Oct 5. [Epub ahead of print]

Horiya M, Hisano M, Iwasaki Y, Hanaoka M, Watanabe N, Ito Y, Kojima J, Sago H, Murashima A, Kato T, Yamaguchi K. Efficacy of double vaccination with the 2009 pandemic influenza A (H1N1) vaccine during pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2011 Oct;118(4):887-94.

Ishii K, Saito M, Nakata M, Takahashi Y, Hayashi S, Murakoshi T, Murotsuki J, Kawamoto H, Sago H. Ultrasound prognostic factors after laser surgery for twin-twin transfusion syndrome to predict survival at 6 months. *Prenat Diagn.* 2011 Nov;31(11):1097-100.

Takahashi H, Takahashi S, Tsukamoto K, Ito Y, Nakamura T, Hayashi S, Sago H. Persistent pulmonary hypertension of the newborn in twin-twin transfusion syndrome following

fetoscopic laser surgery. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011 Aug 10. [Epub ahead of print]

Watanabe N, Suzuki T, Ogawa K, Kubo T, Sago H. Five-year study assessing the feasibility and safety of autologous blood transfusion in pregnant Japanese women. *J Obstet Gynaecol Res.* 2011 Jul 27. [Epub ahead of print]

Oishi Y, Watanabe N, Ozawa N, Sago H. Acquisition of anti-Diego b antibodies possibly resulting from fetomaternal hemorrhage during pregnancy. *J Obstet Gynaecol Res.* 2011 Nov;37(11):1764-6.

Hanaoka M, Hayashi S, Saito M, Morita M, Sago H. Decrease in High Human Chorionic Gonadotropin in Twin-Twin Transfusion Syndrome following Fetoscopic Laser Surgery. *Fetal Diagn Ther.* 2011;30(3):189-93.

Sasaki A, Sawai H, Masuzaki H, Hirahara F, Sago H. Low prevalence of genetic prenatal diagnosis in Japan. *Prenat Diagn.* 2011 Oct;31(10):1007-9.

Isojima S, Hisano M, Suzuki T, Sago H, Murashima A, Yamaguchi K. Early plasmapheresis followed by high-dose  $\gamma$ -globulin treatment saved a severely Rho-incompatible pregnancy. *J Clin Apher.* 2011;26(4):216-8.

Sasaki A, Hayashi S, Oi R, Anami A, Hanaoka M, Miyazaki O, Matsuoka K, Sago H. A fetus diagnosed with Casamassima-Morton-Nance syndrome with de novo del(8)(p23.1). *Prenat Diagn.* 2011 Apr;31(4):407-9.

Okuyama H, Kitano Y, Saito M, Usui N, Morikawa N, Masumoto K, Takayasu H, Nakamura T, Ishikawa H, Kawataki M, Hayashi S, Inamura N, Nose K, Sago H.: The Japanese experience with prenatally diagnosed congenital diaphragmatic hernia based on a multi-institutional review. *Pediatr Surg Int.* 2011 Apr;27(4):373-8.

Kitano Y, Okuyama H, Saito M, Usui N, Morikawa N, Masumoto K, Takayasu H, Nakamura T, Ishikawa H, Kawataki M, Hayashi S, Inamura N, Nose K, Sago H.: Reevaluation of Stomach Position as a Simple Prognostic Factor in Fetal Left Congenital Diaphragmatic Hernia: A Multicenter Survey in Japan. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2010 Nov 23. [Epub ahead of print]

Ishii K, Murakoshi T, Hayashi S, Saito , Sago H, Takahashi Y, Sumie M, Nakata M, Matsushita M, Shinno T, Naruse H, Torii Y : Ultrasound and Doppler predictors of mortality in monochorionic twins with selective intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011; 37: 22-26

Usui N, Kitano Y, Okuyama H, Saito M, Morikawa N, Takayasu H, Nakamura T, Hayashi S, Kawatani M, Ishikawa H, Nose K, Inamura N, Masumoto K, Sago H.: Reliability of the lung to thorax transverse area ratio as a predictive parameter in fetuses with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int.* 2011;27(1):39-45

Fujii H, Ato M, Takahashi Y, Otake K, Hashimoto S, Kaji T, Tsunetsugu-Yokota Y, Fujita M, Adachi A, Nakayama T, Taniguchi M, Koyasu S, Takemori T. HIV-1 Nef impairs multiple T-cell functions in

antigen-specific immune response in mice. Int Immunol. 2011 Jul;23(7):433-41.

Takagi S, Saito Y, Hijikata A, Tanaka S, Watanabe T, Hasegawa T, Mochizuki S, Kunisawa J, Kiyono H, Koseki H, Ohara O, Saito T, Taniguchi S, Shultz LD, Ishikawa F. Membrane-bound human SCF/KL promotes in vivo human hematopoietic engraftment and myeloid differentiation. Blood. 2012 Jan 25. [Epub ahead of print] doi: 10.1182/blood-2011-05-353201

## 2. 学会発表

Saito H. Invited Lecture: The mast cell and basophil transcriptome. EMBRN/COST International Mast Cell and Basophil Meeting. Southampton, UK (Andrew F Walls). Nov. 23-25, 2011.

Saito H. Intorduction. Breakfast Symposium: "Milk Induced Disorders". 22th World Allergy Organization Congress. Cancun, Mexico (Richard F. Lockey). Dec.4-8, 2011.

Saito H. Pros. Debate Sympisium: "Are Basophils Important in Allergy?". 22th World Allergy Organization Congress. Cancun, Mexico (Richard F. Lockey). Dec.4-8, 2011.

Saito H. Invited Lecture: Barrier tissue-derived molecules and allergic diseases. UK-Japan Workshop on Personalised Medicine. British Embassy Tokyo, Japan. Feb. 13-16, 2012.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

斎藤博久

WO2005/028667 ヒト肥満細胞で発現するG蛋白質共役型受容体を標的とした薬剤およびそのスクリーニング方法

WO2004/005509 アレルギー性疾患の検査方法、および治療のための薬剤

WO2004/003198 アレルギー性疾患の検査方法、および治療のための薬剤

特許公開 2010-207200 アトピー素因判定マーカー、アレルギー性皮膚疾患素因判定マーカー及びそれらの使用方法

特許公開 2010-004853 制御性T細胞の製造方法

特許公開 2009-014524 アレルギー疾患推定マーカー及び治療効果判定マーカー、並びに、それらの利用方法

竹森利忠ほか

WO2004/110139 ヒト由来免疫担当細胞の製造方法

特許公開 2010-110254 共通サイトカイン受容体 $\gamma$ 鎖遺伝子ノックアウトブタ

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

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）

分担研究報告書

適切なスキンケア、薬物治療方法の確立とアトピー性皮膚炎の発症・増悪予防、自己管理に関する研究

分担研究項目：アトピー性皮膚炎の発症・増悪予防に関する基礎検討

研究代表者：松本 健治 独立行政法人 国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー研究部 アレルギー研究室 室長

研究協力者：森田 英明 （独）国立成育医療研究センター 研究所 免疫アレルギー研究部 医師 共同研究員

研究要旨：食物抗原に対するアレルギー感作の成立には食物抗原の経皮的な曝露が重要である可能性が示唆されているが、なぜ皮膚から浸入した抗原が Th2 型の免疫応答を誘導するかについては不明な点が多く残されている。本年度は、私たちはアトピー性皮膚炎の皮膚に常在する黄色ブドウ球菌が産生する V8 protease の皮膚への曝露が、アレルギーのマーチにおいて極めて重要な役割を果たす、経皮的なダニ抗原曝露による IgE 抗体産生に与える影響について、Balb/c マウスを用いて検討した。その結果、不活性化した V8 protease を添加した場合に比して、active な V8 protease の添加によってダニ抗原に対する IgE 産生は増強されることが明らかとなった。このことは、アレルギーマーチに重要な意義を持つダニ抗原に対する感作においても、ブドウ球菌が重要な役割を演じる可能性を示唆しており、今後、詳細にその機序を検討する必要があると考えられた。

#### A. 研究目的

近年の疫学研究から、食物抗原に対するアレルギー感作の成立には、食物抗原の経皮的な曝露が重要である可能性が示唆されている。食物抗原やダニ抗原に対するアレルギー感作の成立はその後のアトピー性皮膚炎の治療や QOL、アレルギーのマーチに大きく影響する問題である。特にダニ抗原に対する感作はその後の気道アレルギーの発症に直接繋がる極めて重要な意義を持っている。しかし、これまでに、なぜ皮膚から浸入した抗原が Th2 型の免疫応答を誘導するかについては不明な点が多く残されていた。私たちは昨年度、アトピー性皮膚炎の皮膚に常在し、皮膚炎の重症度に強く関連す

る黄色ブドウ球菌の関与に着目し、黄色ブドウ球菌由来の皮膚のバリア傷害分子である V8 protease が食物抗原に対するマウス経皮感作を増強する事を見いだした。本年度はアレルギーのマーチに大きく影響するダニ抗原に対する経皮的なアレルギー感作について検討した。

#### B. 方法

1. Balb/c マウスの体幹皮膚を剃毛し、種々の濃度の V8 protease を前塗布した皮膚にダニ抗原を週 3 回塗布する操作を 3 回行った。
2. 3 回目の経皮曝露後に採血を行い、血清 IgE 抗体価を ELISA にて測定し、添加した V8 protease がダニ抗原に対する IgE 産生に与える



影響について検討した。

### C. 結果

不活性化した V8 protease を添加した場合に比して、active な V8 protease の添加によって IgE 産生が容量依存性に増強された。

### D. 考察

1. ダニ抗原に対する経皮的な感作の成立についても、黄色ブドウ球菌由来の protease が促進的に作用する事が明らかとなった。

2. この経路の阻害はアレルギーマーチの発症予防に繋がる可能性があり、今後更に詳細にその機序を検討する必要があると考えられた。

### E. 結論

皮膚からのダニ抗原侵入に対する免疫応答においても黄色ブドウ球菌由来の protease が Th2 促進的に作用する。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Okayama Y, Kashiwakura J, Sasaki-Sakamoto T, Matsumoto K, Hashimoto N, Ohmori K, Saito H, Ra C. Omalizumab inhibits acceleration of FcεRI-mediated responsiveness of immature human mast cells by IgE. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2012 In Press

Kojima R, Matsuda A, Nomura I, Matsubara O, Nonoyama S, Ohya Y, Saito H, Matsumoto M. Salivary cortisol response to stress in young children with atopic dermatitis. *Pediatr Dermatol* 2012 In press

Kashiwakura J, Ando T, Matsumoto K, Kimura M, Kitaura J, Matho MH, Zajonc DM, Ozeki T, Ra C,

MacDonald SM, Siraganian RP, Broide DH, Kawakami Y, Kawakami T. Proinflammatory role of histamine-releasing factor in asthma and allergy. *J Clin Invest* 2012 Jan 3;122(1):218-28.

Morita H, Arae K, Ohno T, Kajiwarra N, Oboki K, Matsuda A, Suto H, Okumura K, Sudo K, Takahashi T, Matsumoto K, Nakae S. ST2 requires Th2-, but not Th17-, type airway inflammation in epicutaneously antigen-sensitized mice. *Allergol Int* 2012 Feb 25. [Epub ahead of print] doi:10.2332/allergolint.11-OA-0379

Noguchi E, Sakamoto H, Hirota T, Ochiai K, Imoto Y, Sakashita M, Kurosaka F, Akasawa A, Yoshihara S, Kanno N, Yamada Y, Shimojo N, Kohno Y, Suzuki Y, Kang MJ, Kwon JW, Hong SJ, Inoue K, Goto Y, Yamashita F, Asada T, Hirose H, Saito I, Fujieda S, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Nakamura Y, Nomura I, Tamari M, Arinami T, Yoshida T, Saito H, Matsumoto K. Genome-wide association study identifies HLA-DP as a susceptibility gene for pediatric asthma in Asian populations. *PLoS Genet.* 2011 Jul;7(7):e1002170.

Matsumoto K, Fukuda S, Hashimoto N, Saito H. Human eosinophils produce and release a novel chemokine, CCL23, in vitro. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011;155 Suppl 1:34-9.

Iikura K, Katsunuma T, Saika S, Saito S, Ichinohe S, Ida H, Saito H, Matsumoto K. Peripheral blood mononuclear cells from patients with bronchial asthma show impaired innate immune responses to rhinovirus in vitro. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011;155 Suppl 1:27-33.

Oboki K, Nakae S, Matsumoto K, Saito H. IL-33 and Airway Inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2011 Apr;3(2):81-8.

Nomura I, Morita H, Hosokawa S, Hoshina H, Fukuie T, Watanabe M, Ohtsuka Y, Shoda T, Terada A, Takamasu T, Arai K, Ito Y, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Four distinct subtypes of non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies in neonates and infants, distinguished by their initial symptoms. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Mar;127(3):685-8.e1-8.

Yamada Y, Nishi A, Ebara Y, Kato M, Yamamoto H, Morita H, Nomura I, Matsumoto K, Hirato J, Hatakeyama SI, Suzuki N, Hayashi Y. Eosinophilic gastrointestinal disorders in infants: a Japanese case series. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011; 155 Suppl 1:40-5.

Harada M, Hirota T, Jodo AI, Hitomi Y, Sakashita M, Tsunoda T, Miyagawa T, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N, Suzuki Y, Yoshihara S, Adachi M, Ebisawa M, Saito H, Matsumoto K, Nakajima T, Mathias RA, Rafaels N, Barnes KC, Himes BE, Duan QL, Tantisira KG, Weiss ST, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M. Thymic stromal lymphopoietin gene promoter

polymorphisms are associated with susceptibility to bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011; 44:787-93.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

WO03/000286 好酸球増多性疾患治療薬

特許公開 2010-207200 アトピー素因判定マーカー、アレルギー性皮膚疾患素因判定マーカー及びそれらの使用方法

特許公開 2009-014524 アレルギー疾患推定マーカー及び治療効果判定マーカー、並びに、それらの利用方法

特許公開 2007-143544 乳酸菌のスクリーニング方法

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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）

分担研究報告書

適切なスキンケア、薬物治療方法の確立とアトピー性皮膚炎の発症・増悪予防、自己管理に関する研究

分担研究項目：スキンケア外用薬のアレルギー発症予防に対する基礎的・疫学的検討

研究分担者 片山一朗 大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学皮膚科学 教授

研究協力者 室田浩之 大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学皮膚科学 助教

寺尾美香 大阪大学大学院 医学系研究科 G-COE 特任研究員

研究要旨：近年、アトピー性皮膚炎の患者の数は、増加してきており社会問題化している。この背景にはアトピービジネスに代表されるように医療機関以外での民間療法やドクターショッピングを繰り返す患者の存在が考えられ、通常のアトピー性皮膚炎に対する治療方針に疑問を感じていることが懸念される。「日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎治療ガイドライン 2009 改訂版」では、治療の基本方針として生理学的機能異常に対しては保湿剤外用などのスキンケアが推奨されているものの、特に乳幼児のアトピー性皮膚炎においてはエビデンスの不足からそれぞれの医療機関・医師により実際の治療および指導にばらつきを生じているのが現状である。本研究では乳児期早期の適切なスキンケアがその後のアレルギー疾患の発症に与える影響について検討を行う。

#### A. 研究目的

近年、アトピー性皮膚炎の患者の数は、増加してきており社会問題化している。この背景にはアトピービジネスに代表されるように医療機関以外での民間療法やドクターショッピングを繰り返す患者の存在が考えられ、通常のアトピー性皮膚炎に対する治療方針に疑問を感じていることが懸念される。「日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎治療ガイドライン 2009 改訂版」では、治療の基本方針として生理学的機能異常に対しては保湿剤外用などのスキンケアが推奨されているものの、特に乳幼児のアトピー性皮膚炎においてはエビデンスの不足からそれぞれの医療機関・医師により実際の治療および指導にばらつきを生じているのが現状である。本研究では乳児期早期の適切なスキンケアがその後のアレルギー疾患の発症に与える

影響について検討を行う。

一方で皮膚は加齢とともに委縮し、外力に対する脆弱性や創傷治癒力の低下を引き起こし、皮膚バリアの障害や皮膚炎が発症する。我々は皮膚において、細胞内コルチゾール活性化酵素である  $11\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase-1 ( $11\beta$ -HSD1) が発現していることを見出した。またマウスでは新生仔マウスに於いて  $11\beta$ -HSD1 の発現が低く、加齢とともに亢進することを見いだした。加齢に伴う皮膚委縮はステロイド性皮膚委縮と共通点が多いが、我々は  $11\beta$ -HSD1 上昇に伴う細胞内コルチゾールの上昇が、皮膚老化のみでなくバリア機能の障害と引き続く皮膚炎発症に関与している可能性を考えた。そこで、本研究では  $11\beta$ -HSD1 の皮膚バリア機能における役割について検討する。

## B. 研究方法

1. 平成20年度に行った新生児スキンケア介入試験において児が3歳になる本年度にあたり、アレルギー症状に関する追跡調査を行った。

2. 加齢に伴う11βHSD1発現の変化(マウス皮膚)、加齢に伴う角質水分蒸散量(TEWL)、角質水分保持能の変化、アトピー性皮膚炎患者皮膚における11βHSD1発現、11βHSD1発現が皮膚バリア機能に与える影響を検討した。

## C. 研究結果

1. 検討を行った児、21例(介入群12例、非介入群9例)全例を対象に郵送による追跡調査を行っている。現時点で11例(52.3%)から返答があった。その結果、介入群・非介入群でそれぞれ、アトピー性皮膚炎が各1例、食物アレルギー各3例、喘息は非介入群のみ1例発症していた。介入群では1例にアトピー性皮膚炎と喘息の合併例を認めたが、喘息は合併していなかった。非介入群では1例にアトピー性皮膚炎、食物アレルギー、喘息といったマーケティングを認めた。

2.

a) 加齢に伴う11βHSD1発現の変化(マウス皮膚)

生後4日、3週、2ヵ月、7ヵ月、10ヵ月のHos:HR-1(ヘアレスマウス)より皮膚を採取し、ウエスタンブロットにて11βHSD1の発現を調べたところ、加齢とともにその発現が上昇していた(図1)。

b) 加齢に伴う角質水分蒸散量(TEWL)、角質水分保持能の変化

上記マウス皮膚におけるTEWLと水分保持能を測定したところ、生後4日のマウスでは、TEWLが高く、水分保持能が低下しており、バリアの障害が考えられた。生後3週以降のマウスではTEWL値はいずれも低値を示した。

(図2)

c) アトピー性皮膚炎患者皮膚における11βHSD1発現

アトピー性皮膚炎患者組織における11βHSD1発現を免疫組織学的染色で検討したところ、表皮肥厚が著明な病変部において、その発現が低下していた(図3)。

d) 11βHSD1発現は皮膚バリア機能に影響を及ぼすか

1~3の結果より、アトピー性皮膚炎患者皮膚と生後4日目のマウス皮膚で共に11βHSD1発現が低下しTEWLがすることがわかった。11βHSD1発現の低下が、バリア機能、TEWLに関与する可能性を考え、11βHSD1阻害薬(500mM)をマウス皮膚に7日間外用し、TEWLを測定したところ、TEWLは11βHSD1阻害薬群で軽度上昇する傾向にはあったが有意な上昇はみられなかった。

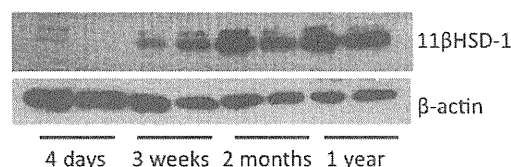


図1: マウスの生後の皮膚での11βHSD1発現推移。Western blottingにて確認。生後4日から1年までを観察した。

## TEWL

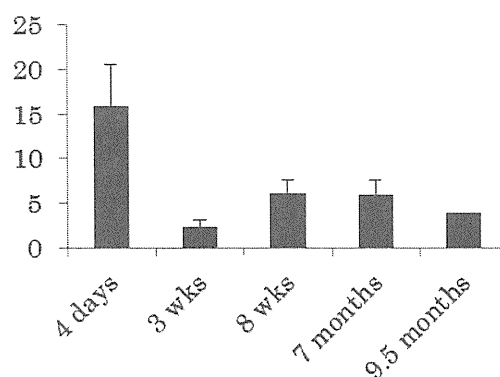


図2：マウスの生後の TEWL の推移。生後4日から9.5ヶ月までを観察した。

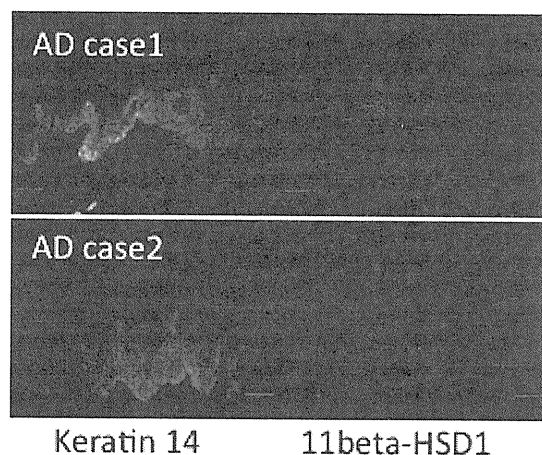


図3：アトピー性皮膚炎における 11βHSD1 の染色結果。Case1 は表皮肥厚の乏しいもの。Case2 は表皮肥厚著名な症例。

#### D. 考察

1. 現時点で集積された結果からはスキンケア介入群・非介入群の間に大きな違いは確認できていないが、非介入群でみられた喘息を含むアレルギーマーチングの生じた症例は、介入群では認められなかったことから、スキンケア介入の効果ではないかと期待された。今後も引き続きデータの集積を行っていく。

2. 今回のプロトコールにおいては 11βHSD1 と TEWL の関与は明らかにはできなかった。しかし加齢に伴う皮膚バリア機能に 11βHSD1 が何らかの形で貢献している可能性が示唆された。

#### E. 結論

小児から成人にかけて、皮膚バリア機能のホメオスタシスを維持する機構も経年的に変化する可能性が示唆された。小児期で収束したアトピー性皮膚炎が成人でアウトグローするメカニズムに 11βHSD1 発現の変調が関与するかもしれない。

#### F. 研究発表

(英文論文)

1: Kitaba S, **Murota H**, Terao M, Azukizawa H, Terabe F, Shima Y, Fujimoto M, Tanaka T, Naka T, Kishimoto T, **Katayama I**: Blockade of interleukin-6 receptor alleviates disease in mouse model of scleroderma. *Am J Pathol.* 2012; 180:165-76.

2: Itoi S, Tanemura A, Nishioka M, Sakimoto K, Iimuro E, **Katayama I**: Evaluation of the clinical safety and efficacy of a newly developed 308-nm excimer lamp for vitiligo vulgaris. *J Dermatol.* 2011 Nov.12 [in press]

3: Hayashi H, Kohno T, Yasui K, **Murota H**, Kimura T, Duncan GS, Nakashima T, Yamamoto K, **Katayama I**, Ma Y, Chua KJ, Suematsu T, Shimokawa I, Akira S, Kubo Y, Mak TW, Matsuyama T: Characterization of dsRNA-induced pancreatitis model reveals the regulatory role of IFN regulatory factor 2 (Irf2) in trypsinogen5 gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Oct 31. [in press]

4: Yamamoto T, **Katayama I**: Vascular changes in bleomycin-induced scleroderma. *Int J Rheumatol.* 2011 Oct 19. [in press]

5: Hanafusa T, Tamai K, Umegaki N, Yamaguchi Y, Fukuda S, Nishikawa Y, Yaegashi N, Okuyama R, McGrath JA, **Katayama I**: The course of pregnancy and childbirth in three mothers with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Clin Exp Dermatol.* 2011 Oct 18. [in press]

6: Hanafusa T, Azukizawa H, Kitaba S, **Murota H**, Umegaki N, **Terao M**, Sano S, Nakagiri T, Okumura M, **Katayama I**: Diminished regulatory T cells in cutaneous lesions of thymoma-associated multi-organ autoimmunity: a newly described paraneoplastic autoimmune disorder

with fatal clinical course. *Clin Exp Immunol*. 2011;166(2):164-70. [in press]

7: Ogata A, Umegaki N, Katayama I, Kumanogoh A, Tanaka T: Psoriatic arthritis in two patients with an inadequate response to treatment with tocilizumab. *Joint Bone Spine*. 2011 Sep 29. [in press]

8: Terao M, Murota H, Kimura A, Kato A, Ishikawa A, Igawa K, Miyoshi E, Katayama I: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-1 is a novel regulator of skin homeostasis and a candidate target for promoting tissue repair. *PLoS One*. 2011;6(9):e25039

9: Murota H, Katayama I. Assessment of antihistamines in the treatment of skin allergies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2011 ;11(5):428-37.

10: Nishioka M, Tani M, Murota H, Katayama I: Eosinophilic pyoderma gangrenosum with pulmonary and oral lesions preceded by eosinophilic pneumonia: Unrecognized syndromic manifestations? *Eur J Dermatol*. 2011; 21(4):631-2.

11: Terao M, Ishikawa A, Nakahara S, Kimura A, Kato A, Moriwaki K, Kamada Y, Murota H, Taniguchi N, Katayama I, Miyoshi E: Enhanced Epithelial-Mesenchymal Transition-like Phenotype in N-Acetylglucosaminyltransferase V Transgenic Mouse Skin Promotes Wound Healing. *J Biol Chem*. 2011 Aug 12;286(32):28303-11.

12: Murakami Y, Wataya-Kaneda M, Terao M, Azukizawa H, Murota H, Nakata Y, Katayama I: Peculiar distribution of tumorous xanthomas in an adult case of erdheim-chester disease complicated by atopic dermatitis. *Case Rep Dermatol*. 2011 May;3(2):107-12.

13: Murakami Y, Matsui S, Kijima A, Kitaba S, Murota H, Katayama I: Cedar pollen aggravates atopic dermatitis in childhood monozygotic twin patients with allergic rhino conjunctivitis. *Allergol Int*. 2011 Sep;60(3):397-400.

14: Kitaba S, Matsui S, Iimuro E, Nishioka M, Kijima A, Umegaki N, Murota H, Katayama I: Four Cases of Atopic Dermatitis Complicated by Sjögren's Syndrome: Link between Dry Skin and Autoimmune Anhidrosis. *Allergol Int*. 2011 Sep;60(3):387-91.

15: Murota H, Katayama I: Lichen aureus responding to topical tacrolimus treatment. *J Dermatol*. 2011 Aug;38(8):823-5.

16: Terao M, Nishida K, Murota H, Katayama I: Clinical effect of tocoretinate on lichen and macular amyloidosis. *J Dermatol*. 2011 Feb;38(2):179-84.

17: Arase N, Wataya-Kaneda M, Oiso N, Tanemura A, Kawada A, Suzuki T, Katayama I: Repigmentation of leukoderma in a piebald patient associated with a novel c-KIT gene mutation, G592E, of the tyrosine kinase domain. *J Dermatol Sci*. 2011;64(2):147-9.

18: Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Nakamura A, Matsumoto S, Katayama I: A topical combination of rapamycin and tacrolimus for the treatment of angiofibroma due to tuberous sclerosis complex (TSC): a pilot study of nine Japanese patients with TSC of different disease severity. *Br J Dermatol*. 2011 Oct;165(4):912-6.

19: Kiyohara E, Tamai K, Katayama I, Kaneda Y: The combination of chemotherapy with HVJ-E containing Rad51 siRNA elicited diverse anti-tumor effects and synergistically suppressed melanoma. *Gene Ther*. 2011 Sep 8. doi: 10.1038/gt. [Epub ahead of print]

- 20: Hanafusa T, Igawa K, Azukizawa H, **Katayama I**: Acute generalized exanthematous pustulosis induced by topical diphenhydramine. *Eur J Dermatol*. 2011 Aug 20. [Epub ahead of print]
- 21: **Murota H**, **Katayama I**: Assessment of antihistamines in the treatment of skin allergies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2011 Oct;11(5):428-37.
- 22: Hanafusa T, Igawa K, Takagawa S, Yahara H, Harada J, Tani M, Sawada Y, **Katayama I**: Erythroderma as a paraneoplastic cutaneous disorder in systemic anaplastic large cell lymphoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011 Jun 25. doi: [Epub ahead of print]
- 23: **Terao M**, Matsui S, **Katayama I**: Two cases of refractory discoid lupus erythematosus successfully treated with topical tocoretinate. *Dermatol Online J*. 2011 Apr 15;17(4):15.
- 24: Azukizawa H, Döhler A, Kanazawa N, Nayak A, Lipp M, Malissen B, Autenrieth I, **Katayama I**, Riemann M, Weih F, Berberich-Siebelt F, Lutz MB: Steady state migratory RelB+ langerin+ dermal dendritic cells mediate peripheral induction of antigen-specific CD4+ CD25+Foxp3 + regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2011 May;41(5):1420-34.
- 25: Tamai K, Yamazaki T, Chino T, Ishii M, Otsuru S, Kikuchi Y, Iinuma S, Saga K, Nimura K, Shimbo T, Umegaki N, **Katayama I**, Miyazaki J, Takeda J, McGrath JA, Uitto J, Kaneda Y: PDGFRalpha-positive cells in bone marrow are mobilized by high mobility group box 1 (HMGB1) to regenerate injured epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 19;108(16):6609-14.
- 26: Namiki T, Tanemura A, Valencia JC, Coelho SG, Passeron T, Kawaguchi M, Vieira WD, Ishikawa M, Nishijima W, Izumo T, Kaneko Y, **Katayama I**, Yamaguchi Y, Yin L, Polley EC, Liu H, Kawakami Y, Eishi Y, Takahashi E, Yokozeki H, Hearing VJ: AMP kinase-related kinase NUAK2 affects tumor growth, migration, and clinical outcome of human melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Apr 19;108(16):6597-602.
- 27: Umegaki N, Nakano H, Tamai K, Mitsuhashi Y, Akasaka E, Sawamura D, **Katayama I**: Vörner type palmoplantar keratoderma: novel KRT9 mutation associated with knuckle pad-like lesions and recurrent mutation causing digital mutilation. *Br J Dermatol*. 2011 Jul;165(1):199-201.
- 28: Nakagawa Y, Takamatsu H, Okuno T, Kang S, Nojima S, Kimura T, Kataoka TR, Ikawa M, Toyofuku T, **Katayama I**, Kumanogoh A: Identification of semaphorin 4B as a negative regulator of basophil-mediated immune responses. *J Immunol*. 2011 Mar 1;186(5):2881-8.
- 29: **Katayama I**, Kohno Y, Akiyama K, Ikezawa Z, Kondo N, Tamaki K, Kouro O: Japanese guideline for atopic dermatitis. Japanese Society of Allergology. 2011 Mar; 60(2):205-20
- (日本語論文)
1. **室田浩之**, 北場俊, **片山一朗**他: 大阪大学関連施設を中心としたアトピー性皮膚炎患者の生活習慣実態調査研究 *J Environ Dermatol Cutan Allergol*. 5:103-114, 2011.
  2. 田村忠史, **室田浩之**, **片山一朗**: オロパタジンによる痒みと表皮内神経線維の伸長の制御アレルギーと神経ペプチド 7:32-36, 2011
  3. 北場俊, **室田浩之**, 熊ノ郷卓之, 他. 【アレルギー疾患と睡眠障害】 臨床医学からのアプローチ 蕁麻疹・アトピー性皮膚炎と睡眠障害. アレルギー免疫 18 : 230-235, 2011.
  4. **片山一朗**: 包括的カユミ対策をスキンケアはアレルギーマーチを阻止できるか? 日本小児皮膚科学会雑誌. 2011; 30 (1) : 1-7

5. 片山一朗: アトピー性皮膚炎の病因. 日本医師会雑誌. 2011; 140 (5) : 978-82
6. 片山一朗: アトピー性皮膚炎の診断と治療. 日本医師会雑誌. 2011; 140 (5) : 945-58
7. 片山一朗, 古江増隆, 川島眞, 他: アトピー性皮膚炎患者における前向きアンケート調査 (第2報) 臨床皮膚科. 2011; 65 (1) : 83-92
8. 片山一朗: アトピー性皮膚炎の診療ガイドライン. アレルギー免疫. 2011; 18 (10) : 10-20



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）

分担研究報告書

適切なスキンケア、薬物治療方法の確立とアトピー性皮膚炎の発症・増悪予防、自己管理に関する研究

分担研究項目：微量試料による特異的 IgE 抗体価測定方法の開発

研究代表者：木戸 博 徳島大学疾患酵素学研究センター 教授

研究要旨：微量資料による抗原特異的 IgE, IgA, IgG, IgG4 抗体価の高感度測定方法を開発した。diamond-like carbon-基板に高密度に抗原を共有結合で固定化することで、高感度化と検体の微量化を達成した。この方法を用い、出生時のアレルギー状態を臍帯血と新生児血を用い、さらに乳幼児の腸管粘膜免疫系を便を用いて検討した。臍帯血の抗原特異的 IgE, IgA, IgG, IgG4 のアレルギープロファイリングと抗体価を母子間で比較した結果、臍帯血の抗原特異的 IgE は胎児由来であることが明確に示され、新生児は抗原特異的 IgE を持つてアレルギー発症の準備状態にあることが判明した。一方生後アレルギーの体内移行抑制系としての腸管分泌型 IgA の測定が、便のプロテアーゼ活性を抑制することで正確に測定する方法が確立された。

#### A. 研究目的

アトピー性皮膚炎の発症・増悪は抗原物質が経皮膚、経口的に体内侵入することによって起こる。「適切なスキンケア、薬物治療方法の確立とアトピー性皮膚炎の発症・増悪予防、自己管理に関する研究」において、治療と予防のマーカーを検索するために粘膜免疫系（唾液、腸管粘液中の抗体）と全身免疫系（血液中の抗体）の IgE, IgA, IgG, IgG4、分泌型 IgA を微量定量解析する手法を確立する。この手法を用いて出生時期からのアトピーの予防、治療、予後マーカーを検索しその意義を明らかにする。

#### B. 研究方法

従来のアレルギー診断は血清中の抗原特異的 IgE 解析が主体で、粘膜免疫系（唾液、腸管粘液）の抗体価の測定、特に IgE 以外の抗原特異的抗体 (IgA, IgG4) の測定は未だ一般に実施されていない。また、これまで IgE 測定に使用されてきた

UniCAP や MAST33 は感度が低く、測定に必要な検体量が比較的多く多抗原に対する抗体測定には適していない。上記の問題点を解決する方法が最近我々によって確立され報告された (Analytica Chimica Acta, 706; 321-327, 2011)。この方法は、diamond-like carbon (DLC)-chip に抗原蛋白質を搭載した chip で、これまでに報告されている蛋白 chip の中でも最も高密度に抗原を固定化し、高感度化と幅広い測定レンジを実現した画期的な chip である。この方法により IgE 測定で UniCAP に比べ測定感度を 7-10 倍に上げることができた。さらに抗原特異的 IgE の他に、IgA, IgG, IgG4 の定量測定と、抗原のパターンプロファイリングが可能となった。

（倫理面への配慮）患者検体の測定については、徳島大学の病院倫理委員会の審査を受け、承認を得て行った。

#### C. 研究結果

新生児のアトピーが胎内感作によって発症するか否かに関して、臍帯血のIgEが胎児に由来するか母体血の混入によるものか、相反する論文が数多く報告され未だ結論を得ていなかった。その主要な理由として、従来はTotal IgEで論じられていることが多く、抗原特異的IgEは測定法感度の問題から詳細なデータが得られていなかったことが挙げられる。今回開発した高感度(DLC)-chipを用いることで、この問題への明確な回答が得られた。即ち、母体血のアレルゲンプロファイルのパターンと胎児由来の臍帯血のアレルゲンプロファイルのパターンに明確な違いがあることから、IgE抗体の母子移行の可能性は無く、胎児は胎内感作を受けてIgEを産生していることが明確となった。特に体内移行率の高い食物抗原は、母子移行するIgGと結合して胎盤を介して胎内に移行する可能性があり、胎児のIgEは胎内移行した抗原に反応して産生されたと推定された。以上の結果は、J. Allergy Clin. Immunol. に採択された。この研究過程で、検討した92例の臍帯血全例において、Phadia社のUniCAPでは抗原特異的IgEが検出されなかったが、アレルゲンDLCチップでは測定が可能であった。さらにUniCAPとDLCチップで得た双方の相関は、比較的低濃度のIgEにおいては良い相関が得られたが、UniCAPの値が特に高い数値を示す場合には、UniCAPとDLCチップ間の相関関係が崩れ、UniCAPにおいて希釈倍率から想定される理論値と大きく外れて高い値を示すことが判明した。即ちUniCAPによる測定は、測定上限値が比較的低く、限界を超えると非特異的吸着性が増すなどの理由による測定値の見かけ上の増加が示唆された。一方生後のアレルゲンの体内移行を抑制する防御系として、腸管内の抗原特異的分泌型IgAの定量が重要である。そこで便中の大腸菌由来のプロテアーゼ活性を抑制して、腸管粘膜が分泌する抗原特異的IgA, IgE, IgG抗体の測定を可能にする

方法を確立して、現在腸管粘膜免疫系の調査を開始している。

#### D. 考察

抗原特異的各種抗体の高感度測定によりアレルゲンの胎内感作が証明されたことから、アレルゲンの胎内移行を抑制的に制御する母体管理や、生後のアレルゲンの体内移行を制御する粘膜免疫系のデータ解析を実施して、出生時からのアトピーの予防、治療、予後マーカーの指標になるか、今後判定したい。今回の研究において、非特異的IgE値の高いと言われている臍帯血では、UniCAPによる抗原特異的IgE測定の感度が極めて低く、通常は測定が困難であるが、DLCチップによる方法では正確な測定が可能であることが判明した。さらにIgE, IgA, IgG, IgG4, IgG1のDLCチップによるアレルゲンプロファイリングは、アレルギー状態の推移の観察に極めて有効であることが示唆された。なお、臍帯血において、食物抗原に対するIgEは比較的高頻度に検出されるが、花粉、ダニ、ハウスダストなどの吸入抗原に対しては検出頻度が低く、欧米での報告とは様子を異にする。今後その理由を明らかにするため、臍帯血中の各抗原の量を定量する。

#### E. 結論

臍帯血の抗原特異的IgE, IgA, IgG, IgG4のアレルゲンプロファイリングと抗体価を母子間で比較した結果、臍帯血の抗原特異的IgEは胎児由来であることが明確に示された。このことから新生児は抗原特異的IgEを持つため、アレルギー発症の準備状態ができていると言えるが、その中でアレルギーが発症しているケースは極めて稀と推定される。従って出生直後から測定によって想定されたアレルゲンにさらされないようにケアすることで、アレルギーの発症を防ぐ可能性を示唆している。通常生後6ヶ月まで抗原特異的IgE

は減少することが報告されていることから、母体を經由した胎内抗原感作で生じた IgE 抗体は、母体からの独立で抗原にさらされなくすることが可能となる。生後抗原特異的 IgE, IgA, IgG, IgG4 アレルゲンプロファイリングを経過観察することで、作用機所に根ざしたアトピーの予防方法の開発研究や、粘膜免疫防御系を用いた治療方法の開発研究の可能性が推定された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

Suzuki K, Hiyoshi M, Tada H, Bando M, Ichioka T, Kamemura N and Kido H. Allergen diagnosis microarray with high-density immobilization capacity using diamond-like carbon-coated chips for profiling allergen-specific IgE and other immunoglobulins. *Analytica Chimica Acta* 706: 321-327, 2011.

Kamemura N, Tada H, Shimojo N, Morita Y, Kohno Y, Ichioka T, Suzuki K, Kubota K, Hiyoshi M and Kido H. Intrauterine sensitization of allergen-specific IgE analyzed by a highly-sensitive new allergen microarray. *J Allergy Clin Immunol* 2012, in press.

##### 学会発表

亀村典生、多田仁美、河野 陽一、下条直樹、森田慶紀、市岡隆男、鈴木宏一、窪 田賢司、木戸博、臍帯血のアレルゲン特異抗体の検出と各種抗体の母子移行評価 第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会平成 23 年 5 月 14 日発表 (幕張メッセ)

窪田賢司、亀村典生、多田仁美、鈴木宏一、森田英明、大矢幸弘、市岡隆男、木 戸博、高感度マ

ルチアレルゲン蛋白チップの開発、第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会平成 23 年 5 月 14 日発表 (幕張メッセ)

亀村典生、多田仁美、河野陽一、下条直樹、森田慶紀、市岡隆男、鈴木宏一、窪 田賢司、木戸博、臍帯血のアレルゲン特異抗体の高感度検出と各種抗体母子移行の評価、第 8 4 回日本生化学会大会 平成 23 年 9 月 24 日発表 (国立京都国際会館)

亀村典生、多田仁美、森田英明、大矢幸弘、市岡隆男、中村善久、鈴木宏一、窪田 賢司、木戸博、多種類抗体対応・高感度マルチアレルゲン蛋白チップ開発、第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会、平成 23 年 11 月 12 日発表(グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール)

窪田賢司、亀村典生、多田仁美、鈴木宏一、森田英明、大矢幸弘、市岡隆男、木戸博、臍帯血や乳幼児の微量血液検体を用い高感度マルチアレルゲン蛋白チップの開発と実施例、第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会、平成 23 年 11 月 12 日発表(グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

特許取得 1. 特許第 4660756 号 ダイヤモンドチップへの蛋白質/ペプチドの固定化方法 (登録日、平成 23 年 1 月 14 日)

実用新案登録 なし

#### IV. 研究成果の刊行に関する一覧表