

I. アトピー性皮膚炎の診療ガイドライン

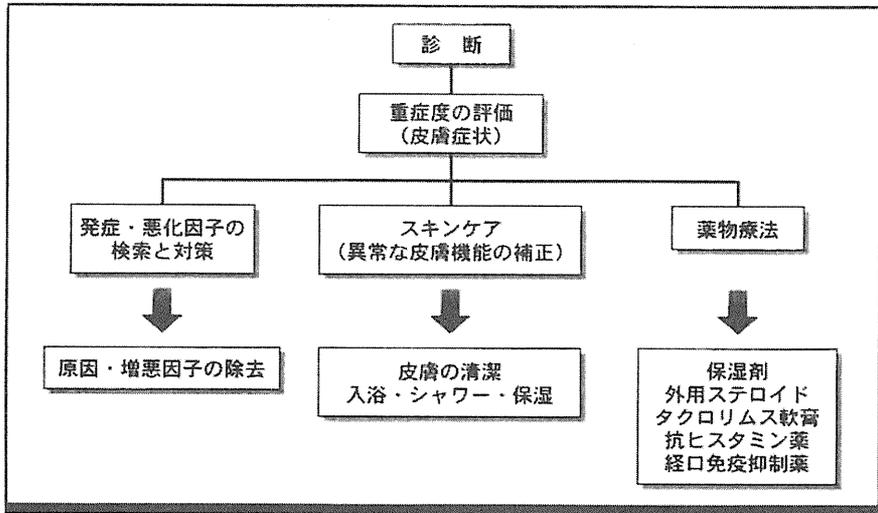


図1 アトピー性皮膚炎治療ガイドラインの概要

治療は3つの柱からなる。

(厚生労働科学研究班ガイドライン 2008, 日本アレルギー学会ガイドライン 2010 より)

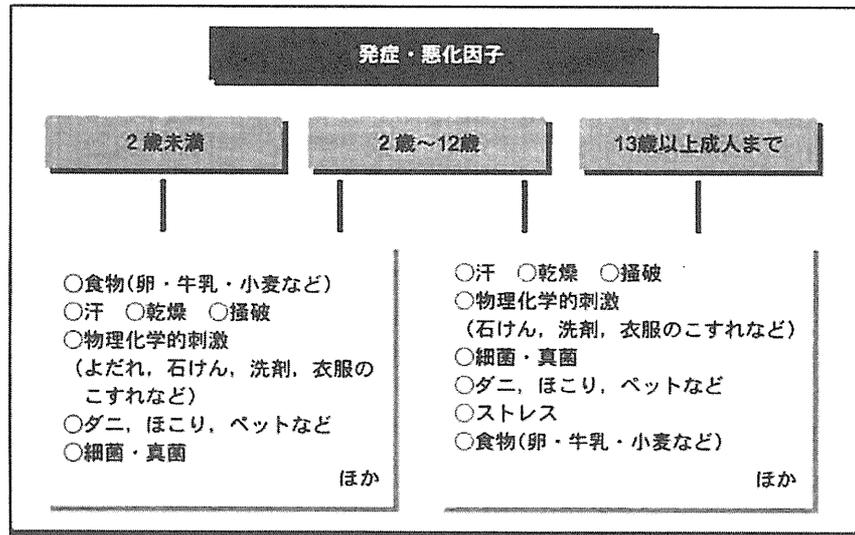


図2 アトピー性皮膚炎の悪化因子

患者によって発症・悪化因子は異なるので、個々の患者においてそれらを十分確認してから除去対策を行う。

(日本アレルギー学会ガイドライン 2010 より)

揮しその副作用を最小限に抑制するためには、1～2週間に一度受診し、症状の程度を評価・確認してその症状に応じた治療薬・治療法に変更する。治療中、症状に異常な変化が見られたり、基本治療に従って1カ月間程度治療しても改善が見られない場合は、より専門性の高い医療施設へ紹介することを考慮する。重症・最重症例には、入院治療が有効である。

I. アトピー性皮膚炎のスキンケア

アトピー性皮膚炎では、年齢より皮膚が乾燥しやすくなり、また黄色ブドウ球菌の皮膚への定着が症状の悪化に影響を及ぼすために、スキンケアが重要となる。

1. 乾燥皮膚(ドライスキン)

アトピー性皮膚炎患者の皮膚は、一般に病変部だけでなく正常に見える皮膚も、水分の不感蒸泄(経皮的水分喪失 [TWL; transepidermal water loss])が多く、皮膚はそれだけ乾燥しやすく、そのため皮膚角層の水分保持量が低くなり、ドライスキン状態にある。最近、尋常性魚鱗癬で指摘されているフィラグリンの異常と同じ変異がアトピー性皮膚炎患者にも認められ、バリア障害の原因として注目されている。皮膚乾燥の指標とされている角質水分保持量の低下は、TWLの亢進の原因とされる先のフィラグリンやセラミドのほか、角層中に存在する自然保湿因子(natural moisturizing factor; NMF)の減少によるとされている。

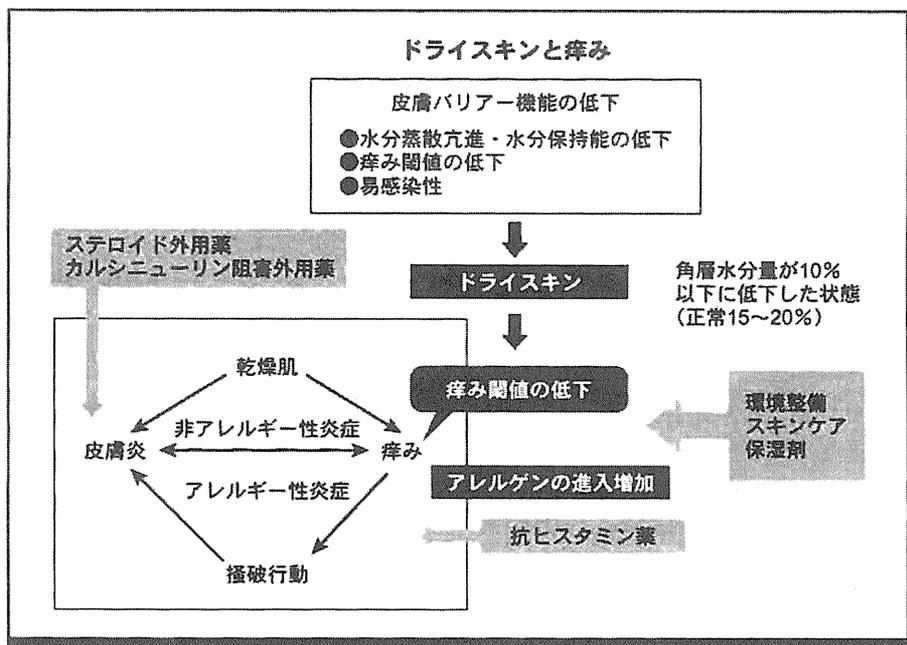


図3 ドライスキンと痒み：治療の作用点

ドライスキンは皮膚の過敏性を亢進させ、皮膚炎の悪化の原因となる。

(筆者作成)

TWL (transepidermal water loss; 経皮的水分喪失)

NMF (natural moisturizing factor; 自然保湿因子)

る。皮膚の水バリア機能や水分保持能が障害され、アレルゲンや刺激物の経皮侵入が容易となってアレルギー反応や刺激反応が起きやすくなり、痒みの閾値が低下して痒くなりやすいと考えられている。図3はドライスキンと痒みの関連性と治療の作用点を示したものである。

2. 黄色ブドウ球菌叢

アトピー性皮膚炎では、掻破痕・びらん・痂皮などがある湿潤性病変だけでなく、角層の水分量や水バリア機能が低下したドライスキンを含む乾燥性皮膚病変においても、健常者に比べ顕著に皮膚の黄色ブドウ球菌叢が増加している。

3. スキンケアの要点

1) ドライスキンに対するスキンケア

ドライスキンに対するスキンケアの要点は、低下している皮膚の保湿性を補うために保湿性の高い親水性軟膏や吸水性軟膏を外用することである。保湿性の高い外用剤としては、尿素製剤、ヘパリン類似物質製剤、水溶性コラーゲン製剤、乳酸ナトリウム製剤、エラスチン加水分解物製剤などがある。抗炎症作用がないので、炎症を伴う例ではステロイド外用薬などを併用する。ヘパリン類似物質含有軟膏やその他の保湿剤はいずれも高い水分保持能を持ち、刺激性が低く、亀裂があっても使用できる利点がある。

2) 傷害された皮膚に対するスキンケア

傷害された皮膚のバリア機能を補充・補強または代償するためには、皮膚に対して保護作用がある油脂性軟膏(狭義の軟膏)を外用する。局方白色ワセリン、精製ワセリン、10%亜鉛華軟膏、ジメチルイソプロピルアズレン含有軟膏などがある。皮膚表面に生じてきた代謝水の蒸散を防ぎ、保湿効果が期待できる。

3) 皮膚の清潔とスキンケア

アトピー性皮膚炎の病変部からは高頻度に黄色

ブドウ球菌が検出されるが、通常は薬物による抗菌的処置を要しない。安易な薬物による抗菌処置や消毒は、耐性菌の誘導や薬物による接触感作など不都合が生じやすい。通常は皮膚の清潔には入浴・シャワーを励行し、必要に応じて適切な保湿・保護剤あるいは抗炎症性外用薬を使用する。

4) 家庭でできるスキンケアの実際

① 入浴やシャワーはスキンケアの基本

皮膚の黄色ブドウ球菌叢が果たす役割が明らかになる中で、入浴やシャワーの効用が見直されている。事実、学童児の小学校におけるシャワー効果が望月、片山らにより報告されている。

② 石鹸やシャンプーの使用上の注意

基本的には香料などの含有成分に対する接触皮膚炎がない限り、通常は石鹸やシャンプーを使用して差し支えない。香料や合成添加物のないか少ないものが望ましい。

③ 入浴後の保湿

入浴後10分間の保持水分量を算定すると、アトピー性皮膚炎の場合、健常人より非常に低く、約10分の1しかない。油、入浴後はできるだけ早く、刺激が少なく、被覆保護や保湿によいスキンケア用の軟膏・クリームを皮膚に塗ることが大切である。

II. アトピー性皮膚炎の薬物療法

1. 外用薬

1) ステロイド薬の作用機序

ステロイドは、細胞質に存在する Heat shock protein (HSP90) と、complex を形成した受容体に結合後核内に移行してステロイド反応性の遺伝子を活性化させ、その薬理作用を発揮すると考えられている。抗炎症作用に関しては、① 狭義の抗炎症作用、② 抗アレルギー作用、③ 免疫抑制作用の3つが挙げられる。

2) ステロイド外用薬の使用法

ステロイド外用療法はアトピー性皮膚炎治療の根幹を成し、皮膚炎の性状、部位、経過、季節に応じ細かく使い分けていく必要がある。

① ステロイド外用薬の選択

ステロイド外用薬はその強さによりウィークからストロングストまでの5段階に分類されている(表1)。アトピー性皮膚炎に対しては厚生労働科学研究による治療ガイドラインが示され、皮膚症状の程度(重症度)と年齢に応じて適切なランクの

ステロイドを使用する(図4)。日本皮膚科学会からも改訂治療ガイドラインが提示され、より日常診療で使用しやすい用法が示されている。

② ステロイド外用に際しての留意点

アトピー性皮膚炎ではその重症度と部位、年齢に応じてステロイド外用薬を選択する必要がある。個体としての重症度(皮疹の範囲など)と皮疹としての重症度を考える。

a. 顔面への使用とその留意点

経皮吸収の盛んな顔面、頸部などに関しては、

表1 代表的なステロイド外用薬

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

(日本アレルギー学会ガイドライン2010より)

I. アトピー性皮膚炎の診療ガイドライン

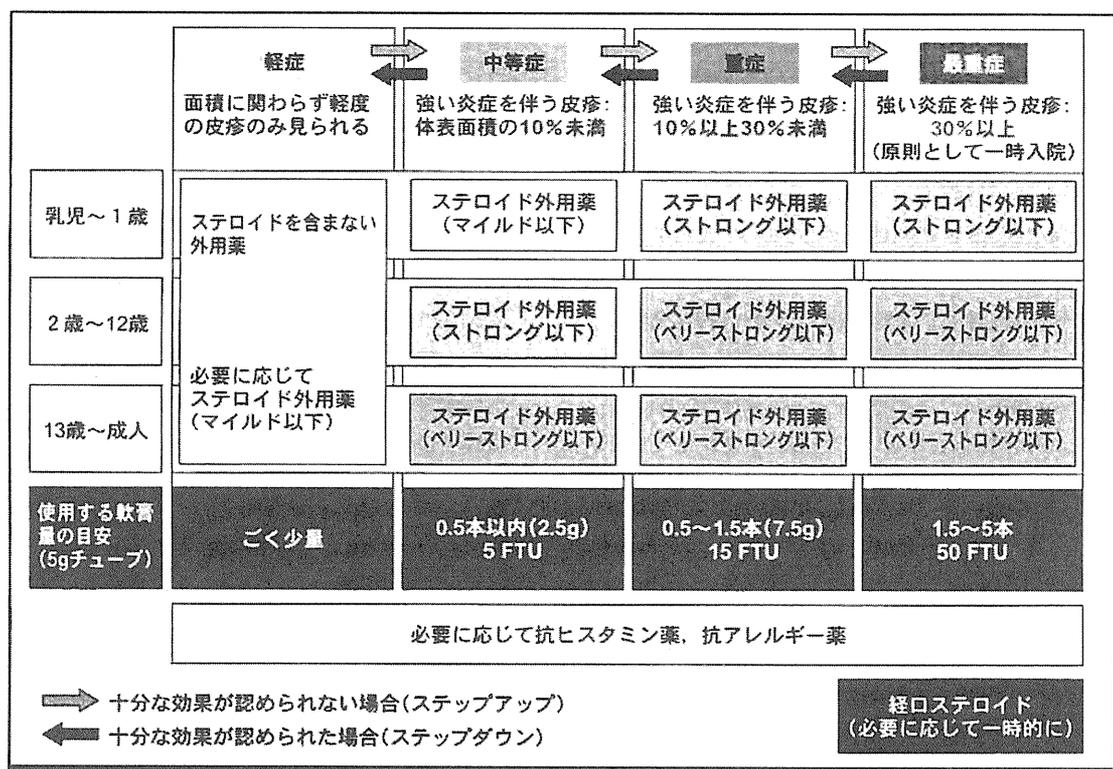


図4 薬物療法の基本例

*入院の上、専門医と連携を取りながら使用する。

FTU : finger-tip unit (0.5 g)

(日本アレルギー学会ガイドライン 2010 より)

ステロイド外用薬は慎重に使用すべきで、用いる場合にはできるだけ短期間の使用にとどめ、漸減、間歇投与、タクロリムス軟膏への変更などを考える。

b. ステロイド外用薬と副作用

ステロイドの吸収率は部位により大きく異なる。小児や老人など皮膚バリア機能の低下のある皮膚や発汗量の多い夏期などには吸収率が変化する。ステロイド薬の皮膚への直接的な副作用を表2に示す。ステロイド外用薬による治療中に副作用が見られたときには、徐々にランクダウンを行い、タクロリムス軟膏へ変更する。

表2 ステロイド外用薬による主な局所副作用

- 1 皮膚萎縮
- 2 乾皮症ないし魚鱗屑様変化
- 3 紫斑、毛細血管拡張
- 4 酒さ様皮膚炎、口囲皮膚炎
皮膚潮紅、ステロイドざ瘡
- 5 多毛
- 6 色素異常、色素脱失
Cutis linearis punctata coli
- 7 皮膚感染症の誘発と増悪
- 8 眼障害(白内障？、緑内障)
- 9 経皮吸収による全身性副作用
- 10 接触皮膚炎

(日本アレルギー学会ガイドライン 2010 より)

c. ステロイド外用薬の強度と
使用量のモニター

1日2回(朝;夕;入浴後)使用する。症状の改善度を評価して漸減し、1日1回~隔日投与にて再燃のないことを確認し、ステロイドを含まない外用剤に変更していく。乳幼児、小児では体重をもとに成人の使用量から換算した量を開始量とする。外用量の目安として finger-tip unit (FTU) が使用される。1 FTU は径5 mm のチューブから押し出される、成人の人差し指の指腹側末節部に乗る軟膏量であり、概ね0.5 gに相当する。1 FTUで成人の両手掌がカバーできる(体表面積の2%)。全身に外用した場合50 FTUで25 gとなる。英国のWilliamsは強いランクのステロイド外用薬であれば1日1回の使用でも2回と同様の効果が得られること、皮膚炎を繰り返す場合、1日1回の外用を2週間毎日続け、その後は皮膚炎の

あった部位を中心に、週末の2回外用、それ以外は保湿剤を使用することで皮膚炎の落ち着いた状態が維持出来ることを報告している(図5)。

d. ステロイド外用薬長期使用後の中止による
増悪への対応

自己判断による使用の中止は避けるよう指導する。また患者にステロイド外用薬により起こり得る副作用を説明し、皮膚症状の評価と使用量のモニターにより、その回避が可能であることを十分納得させる。

e. 急性増悪した場合の対処法

必要かつ十分量のステロイド外用薬を使用する。全身性の悪化が見られるときには短期間入院して、場合によりステロイドの全身投与を行う。感染症が疑われるときには、抗菌薬、抗ウイルス薬を適宜専門医の指導下で投与する。網膜剥離や白内障などの眼合併症はステロイド外用薬の不規

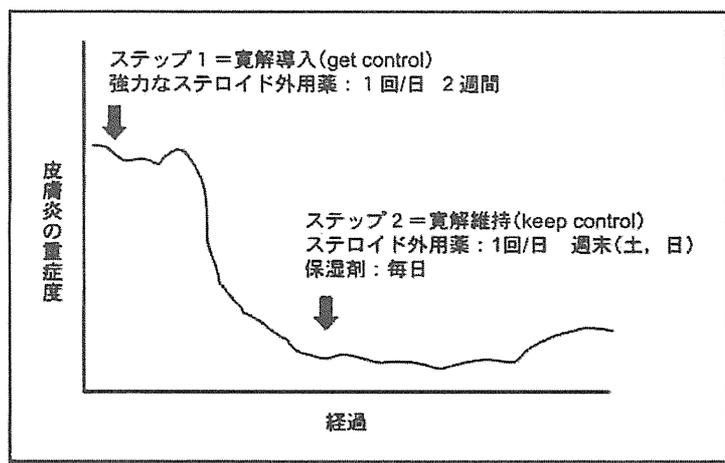


図5 中等症~重症アトピー性皮膚炎の外用療法
強力なステロイド外用薬を2週間程度使用して寛解導入を行う。その後は週2回程度の維持療法を行う。
(Williams HC : Br J Dermatol 164 : 231-33, 2011 より引用改変)

FTU (finger-tip unit)

則な使用や中止による悪化時に見られることが多い。問診で視力など眼症状は常日頃確認して、適宜、眼科医の診察を受けさせる。

f. 小児におけるステロイド外用に際しての
注意点

薬物療法の中心は抗炎症療法であり、その中心はステロイド外用薬である点は小児でも強調されるべきである。

③ 治療薬の変更

ステロイド外用薬の治療開始後1～2週間を目安として重症度の評価を行い、副作用の有無を確認しステップダウンないしステップアップを行う。

3) 免疫抑制外用薬の使用法

タクロリムス軟膏（商品名：プロトピック軟膏0.1%）は1999年に上梓され、16歳以上に使用可能な軟膏0.1%と2～15歳の軟膏0.03%小児用がある。ステロイド薬はその優れた抗炎症作用により、日常診療で広く使用されている。タクロリムス軟膏は原則的には顔面などステロイド外用薬の副作用の出やすい部位やステロイド外用薬の効果の見られない病変部に使用する。ステロイド外用薬との最も大きな違いはタクロリムス軟膏

の分子量が大きく、正常の皮膚からは吸収されにくいことが挙げられる。外用は原則的には1日1回入浴後に行うが、最大1日2回までとする（表3）。寛解維持療法としての使い方が欧米のガイドラインで提唱されている。寛解導入後、週に2～3回のタクロリムス軟膏外用を続けることで、症状の再燃を有意に抑えられる（proactive療法）との報告があるが、使用期間、使用量、適応部位などと長期使用の安全性の問題点などに対する検討や本邦での患者を対象とした評価が必要である。使用上の注意として、外用開始時、灼熱感などの刺激の見られることと、皮膚の局所感染症を悪化させる可能性が挙げられている。前者は使用開始数日で消失することが多いが、その少量を試験的に使用するなどの指導が必要である。保湿剤を先に外用する、ステロイド外用薬を短期間併用することで対処可能である。後者は基本的に皮膚感染症やびらん、潰瘍面に使用できないという制約があるので、医師の指示に従って使用する必要がある。腎障害、妊娠中、魚鱗癬様紅皮症（Netherton症候群など）、2歳以下の乳幼児（現時点）、光線療法中の患者には安全性の点より使用できな

表3 タクロリムス軟膏の効能・効果と注意点

ステロイド外用剤等の既存療法では効果が不十分、又は副作用によりこれらの投与ができないなど、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。

2～5歳	(20 kg 以下)	1g/回
6～12歳	(20～50 kg)	2～4g/回
13歳以上	(50 kg 以上)	5g/回
1日2回まで		

小児用 (2～15歳)	0.03%
成人用 (16歳以上)	0.1%

添付文書、ガイダンスに従い慎重に使用する。

(日本アレルギー学会ガイドライン2010より)

い。なお、発売元よりタクロリムス軟膏の使用に関して、いくつかの注意事項が示されており、本薬剤を使用するときには患者に説明し、承諾を得た上で使用する。

2. 内服薬

1) 抗ヒスタミン薬・抗アレルギー薬

① 薬理作用・作用機序

a. 抗ヒスタミン薬

主な薬理作用はヒスタミンによる皮膚の毛細血管からの血漿成分の透過性亢進、血管拡張、痒みに対する拮抗作用である。個々の患者によって効果に差が見られることは日常経験されることから、ある薬剤を2週間程度使用して効果がないようであれば別の薬剤に変更して個々の患者に適した薬剤を探すことも必要である。また増量することの有用性も蕁麻疹などでは報告がある。

b. 痒みに対する治療

痒みの多くは表皮真皮境界部に存在するC神経

線維終末が刺激されることにより生じる。C線維にはヒスタミンH₁受容体があり、ヒスタミンによっても活性化される。

② 副作用

a. 中枢神経作用

抗ヒスタミン薬は脳の血液脳関門を通過するため、眠気、集中力の低下、倦怠感となって現れ、また大量に服用した場合には、興奮状態を引き起こすこともある。第二世代の抗ヒスタミン薬は血液脳関門を通過しにくいいため眠気や中枢神経作用が少ないという特徴がある。鎮静作用を評価する上で眠気とインペアド・パフォーマンス（作業能率が低下した状態）を区別すべきである。有意にインペアド・パフォーマンスが発生するのはH₁受容体占拠率が50～60%であるとされている、谷内らはH₁受容体占拠率が50%以上を鎮静性、50～20%を軽度鎮静性、20%以下を非鎮静性の三群にわけたことを提唱している。ほとんど

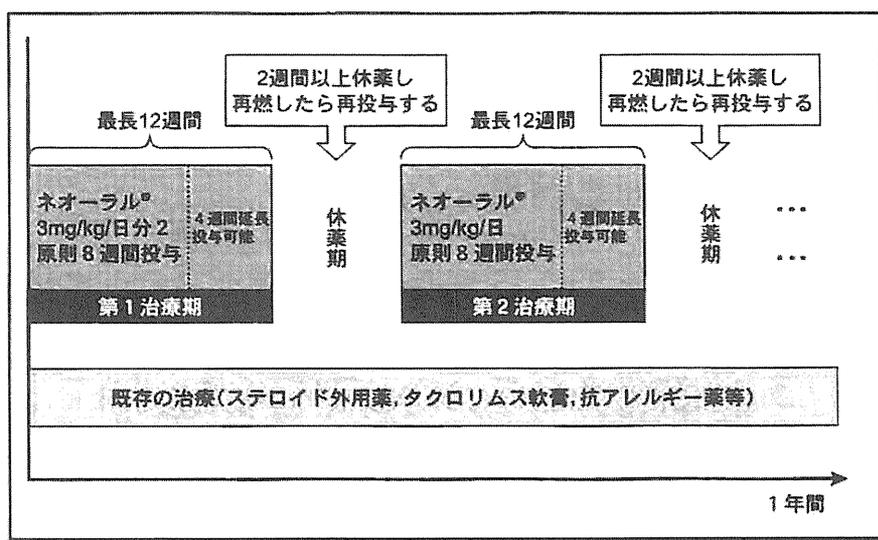


図6 シクロスポリンの間歇投与方法

図の如くネオール®を使用する。8週をめぐりに休薬する。その後は再燃すれば適宜使用する。(筆者作成)

I. アトピー性皮膚炎の診療ガイドライン

の抗ヒスタミン薬、抗ヒスタミン作用を有する抗アレルギー薬には自動車の運転、危険な作業に対する注意として「危険を伴う機械の操作には従事させないように注意すること」という記載が添付文書にあるが、ロラタジン、フェキソフェナジン塩酸塩にはその記載はない。エピナスチン塩酸塩、エバスタチン、ベポタスチンベシル酸塩では「危険を伴う機械を操作する際には注意させること」となっている。

b. 抗コリン作用

抗コリン作用により、口渇、粘膜乾燥感、尿閉などを生ずることがある。緑内障、(前立腺肥大など) 下部尿路閉塞性疾患のある患者には禁忌である。

特に高齢者には注意が必要である。

c. 消化器症状

嘔気、嘔吐、下痢、腹痛などの症状を生ずることがある。

d. 催奇形性

一般に抗ヒスタミン薬は胎盤を通過し、胎児の血液脳関門も通過する。妊婦に対する安全性が知られている薬剤はクロルフェニラミン、クレマスチンで、妊娠中の第一選択となる。

e. 肝機能障害者に対する使用

抗アレルギー薬の多くは肝臓で代謝され、尿中に排泄される。しかし実際には抗アレルギー薬による薬剤性肝障害の発生頻度は低い。添付文書上

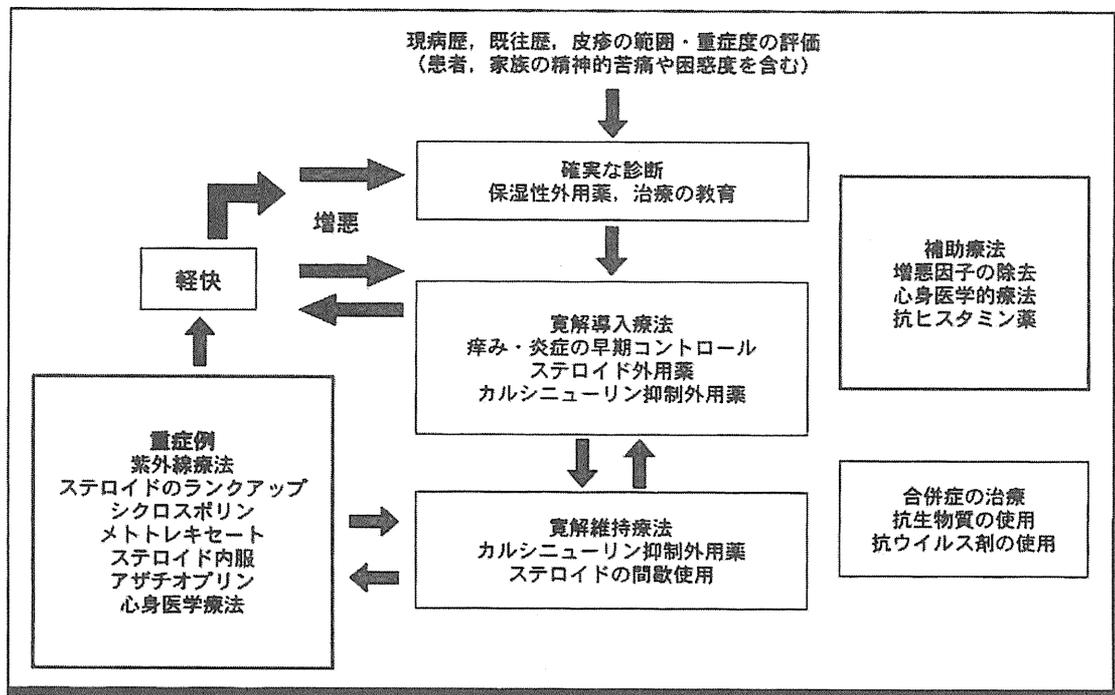


図7 欧米でのアトピー性皮膚炎治療ガイドライン

アルゴリズムにより治療を行う。重症例は本邦で使用されない薬剤も記載されている。

(文献5より引用改変)

MAO (モノアミン酸化酵素)

で、肝臓で代謝を受けにくい抗アレルギー薬としてはフェキソフェナジン塩酸塩とベポタスチンベシル酸塩などがあり、肝機能障害のある患者には推奨される。

f. 腎機能障害者に対する使用

腎障害患者ではしばしば痒みを伴い、抗アレルギー薬の適応となる。肝臓で主に分解される薬物(アゼラスチン塩酸塩、エバスタチン、エメダスチンフマル酸塩など)や糞便中に排泄される薬剤(フェキソフェナジン塩酸塩)が推奨される。

g. 薬剤相互作用

アルコール、睡眠薬、向精神薬などと併用すると、過度の鎮静、めまい、倦怠感、脱力などが現れることがある。モノアミン酸化酵素(MAO)阻害薬との併用ではカテコールアミンの作用が増強されて頭痛、不整脈、高血圧などが出現することがある。抗アレルギー薬では抗ヒスタミン薬にみられるこのような相互作用は少ない。

2) その他の内服薬

① ステロイド内服薬

長期のステロイド薬内服には種々の重篤な副作用があることから、長期投与することは避けねばならない。通常成人でプレドニゾン10~15mg/日を抗ヒスタミン薬、抗アレルギー薬と併用し、できる限り数日以内で投与を中止すべきである。小児のアトピー性皮膚炎にはその副作用を考慮して一般的に推奨できない。

② 免疫抑制薬

2008年10月よりわが国においても、シクロスポリン(ネオオーラル®)のアトピー性皮膚炎に対

する適応が追加された。シクロスポリンの適応となるのは既存の治療に抵抗性のある16歳以上の患者で、3カ月以内に休薬することが使用指針により求められている(図6)。詳細は、別途制定された「アトピー性皮膚炎治療におけるネオオーラルの使用指針」を参照すること。通常、3~5mg/kg/日を1日2回に分けて服用する。副作用として腎毒性、振戦、高血圧に注意を要する。一定期間、重症例に限って使用される薬剤である。尋常性乾癬の場合と同様に、幾つかの副作用について定期的な検査が必要である。

参考：欧米の治療アルゴリズムを図7にしめす。

読むべき文献

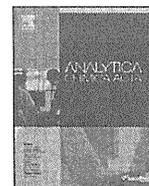
- 1) 日本皮膚科学会：アトピー性皮膚炎診療ガイドライン。日本皮膚科学会雑誌 119：1515-1534, 2009.
- 2) Bieber T: Atopic dermatitis. N Engl J Med 358: 1483-1494. 2008.
- 3) アトピー性皮膚炎診療ガイドライン 2009(片山一朗, 河野陽一 監修)。協和企画。2009.
- 4) 日本アレルギー学会：アレルギー疾患診断・治療ガイドライン 2010(西岡三穂 監修)。協和企画。2010.
- 5) ICCAD II Faculty. International Consensus Conference on Atopic Dermatitis II (ICCAD II): clinical update and current treatment strategies. Br J Dermatol 148 Suppl 63: 3-10, 2003.
- 6) Darsow U et al: ETFAD/EADV eczema task force 2009 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis. J Eur Acad Dermatol Venereol 24 (3): 317-328. 2010.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca



Allergen diagnosis microarray with high-density immobilization capacity using diamond-like carbon-coated chips for profiling allergen-specific IgE and other immunoglobulins

Koichi Suzuki^a, Mineyoshi Hiyoshi^a, Hitomi Tada^a, Miwa Bando^a, Takao Ichioka^b,
Norio Kamemura^a, Hiroshi Kido^{a,*}

^a Division of Enzyme Chemistry, Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima, Tokushima 770-8503, Japan

^b Pediatrics, Health Insurance Naruto Hospital, Tokushima 772-8503, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 February 2011
Received in revised form 1 August 2011
Accepted 23 August 2011
Available online xxx

Keywords:

Allergen
Diamond-like carbon
Immunoassay
Microarray technology

ABSTRACT

The diagnosis of antibody-mediated allergic disorders is based on clinical findings, skin prick tests and detection of allergen-specific IgE in serum. Here, we present a new microarray technique of high-density antigen immobilization using carboxylated arms on the surface of a diamond-like carbon (DLC)-coated chip. High immobilization capacity of antigen on DLC chip at $(0.94\text{--}7.82) \times 10^9$ molecules mm^{-2} allowed the analysis of allergen-specific immunoglobulins against not only purified proteins but also natural allergen extracts with wide assay dynamic range. The higher sensitivity of the allergen-specific IgE detection on DLC chip was observed for comparison with the UniCAP system: the DLC chip allowed lowering the limit of dilution rate in UniCAP system to further dilution at 4–8-fold. High correlations ($\rho > 0.9\text{--}0.85$) of allergen-specific IgE values determined by the DLC chip and UniCAP were found in most of 20 different allergens tested. The DLC chip was useful to determine allergen-induced antibodies of IgA, IgG, IgG1, and IgG4 in sera, apart from IgE, as well as secretory IgA in saliva against the same series of allergens on the chip in a minimal amount (1–2 μL) of sample.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The diagnosis of type I allergy is based on clinical presentation, skin prick tests, histamine release tests, and serological analysis of total and allergen-specific immunoglobulin (Ig)E [1]. Skin prick tests can sometimes cause discomfort, risk anaphylaxis [2] and increased sensitivity to allergens [3]. As safer and more quantitative alternative, measurement of allergen-specific IgE in serum by a solid-phase immunoassay, such as the UniCAP (FEIA) system (Phadia AB) [4,5], is widely used worldwide. In recent years, new technologies of protein microarray-based sandwich immunoassay and related immunoassays have been developed for rapid, high sensitivity and multiple allergen determinations using small amounts of serum, such as the immuno solid-phase allergen chip (ISAC), immunoblot allergen screening panel and the ADVIA Centaur microbead systems [6–9]. Compared with the high immobilization doses ($\sim 35 \mu\text{g}$) of antigens on a sponge-like matrix column unit of the UniCAP system [10–13], one limitation of the microarray is the low doses of immobilized antigens, which some-

times results in detection failure of some allergens particularly in natural allergen extracts.

To improve the microarray by increasing the dose of immobilized antigens, we designed the high-density DNA solidification technique of the carboxylated diamond like carbon (DLC) chip [14] for the allergen microarray technique. The covalently bound oligonucleotide to the carboxylated DLC chip was approximately 42 pmol ($\sim 2.5 \times 10^{13}$ molecules) per 9 mm^2 of the chip surface, the highest density DNA chip reported [14]. By using the carboxylated DLC chip, we achieved high-density allergen immobilization and improved the analysis of allergen-specific immunoglobulins against purified proteins and natural allergen extracts with wide assay dynamic range. The new technique also achieved highly reproducible measurement using small amounts of sera and saliva with high sensitivity.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Carboxylated DLC film [14] coated glass slide (Gene slide) was purchased from Toyo Kohan Co. (Tokyo, Japan). Natural allergens were from Allergon (Ångelholm, Sweden) and purified allergens,

* Corresponding author. Tel.: +81 88 633 7423; fax: +81 88 633 7425.
E-mail address: kido@ier.tokushima-u.ac.jp (H. Kido).

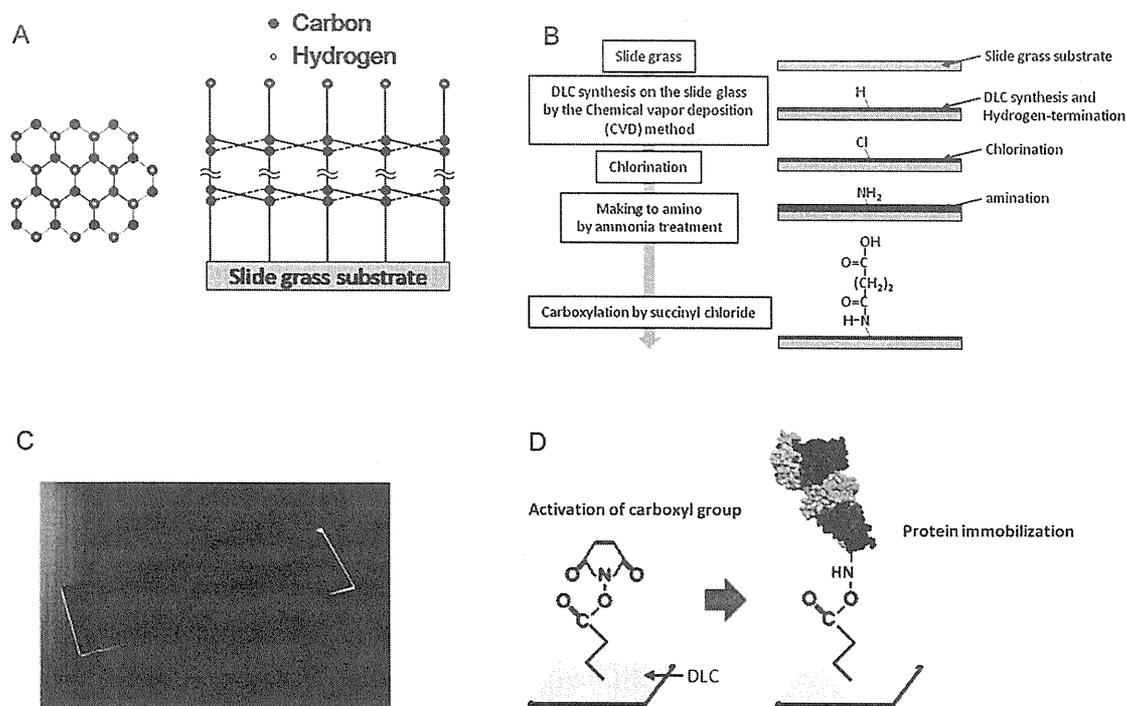


Fig. 1. Schematic illustration of the DLC chip, carboxylation and antigen immobilization. (A) Schematic arrangement of carbon and hydrogen on the DLC chip. (B) Chemical treatment processes for DLC surface carboxylation. (C) The DLC slide. (D) Antigen immobilization processes on the DLC chip.

such as ovomucoid, ovalbumin, conalbumin, α -casein, β -casein, and β -lactalbumin, were from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Human IgE serum (75/502), IgG, IgA and IgM serum (67/086) were from the National Institute for Biological Standards and Control (Hertfordshire, England). All other chemicals were obtained from Sigma–Aldrich and Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan).

2.2. Activation of carboxylated DLC slides and fabrication of allergen microarray

Fig. 1 provides a schematic illustration of the DLC chip, the carboxylation procedure and antigen immobilization. For activation of the high-density carboxyl group on the surface of DLC film on the GeneSlide®, the slide was incubated with freshly prepared 100 mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (Dojindo Co., Kumamoto, Japan) and 20 mM N-hydroxysuccinamide in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.0, at 25 °C for 30 min (Fig. 1D). Then the slide was covered with a customized water-repellent seal (Suwashi Techno Co., Tokyo), designed to create 6 mm \times 4 mm rectangular areas representing 12 individual reaction holes (Fig. 3A). Each reaction well has a total of 108 spots capacity with no cross-contamination. Allergens were solubilized at optimal concentrations of 0.25–1.0 mg mL⁻¹ in either 20 mM phosphate buffer, pH 7.4, 20 mM Tris–HCl buffer, pH 7.5, 100 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid buffer, pH 8.0, or 100 mM N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid buffer, pH 10.0 with or without 0.05% Triton X-100 or 0.5 M NaCl; casein at 0.25 mg mL⁻¹; ovomucoid, eggwhite and soybean at 0.5 mg mL⁻¹; *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) and *Dermatophagoides farinae* (Df) at 0.75 mg mL⁻¹ and milk at 1 mg mL⁻¹. For Ig standard calibration curves, WHO human serum IgE (10–1000 IU mL⁻¹), IgG, IgA and IgM (0.024–3.12 U mL⁻¹) were used. Spotting of allergens onto DLC glass slides was performed by the pin method using OmniGrid Accent microarrayer (Genomic Solutions, Boston, MA) with pin #SMP9 (tip area = 0.074 mm²,

volume per spot = 3.3 nL), under 50 \pm 5% humidity (mean \pm SD) at room temperature. Each allergen was spotted in triplicates or tetraplicates onto the surface in each reaction well. After spotting, allergen chips were allowed to stand at 37 °C for 3 h and excess activated carboxyl group were blocked at 4 °C overnight with 0.1 M glycine and 1% bovine serum albumin (BSA) in 20 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 10% polyethylene glycol and BioUltra 6000 (Amicon). After blocking, allergen chips were rinsed twice with deionized water, dried under nitrogen flow and then stored at 4 °C until use.

2.3. Patients

Serum and/or saliva were obtained from allergic patients (112–322 patients aged 0–30 years for each allergen listed in Table 4) and healthy volunteers (20 volunteers aged 0–30 years) at the Health Insurance Naruto Hospital, Tokushima and University of Tokushima. The study was approved by the institutional Ethics Committees of The University of Tokushima and the Health Insurance Naruto Hospital. The diagnosis of type I allergy was based on case history, skin prick tests and IgE serology performed using the UniCAP system. Blood was taken for assay of serum specific Igs and stored –30 °C until use. Saliva was collected by Salivette® (SARSTEDT AG & Co. Nümbrecht, Germany) according to the protocol offered by the manufacturer and was stored –30 °C immediately after preparation until use. Allergen assay was conducted within one year after storage of the samples.

2.4. Allergen chip assay

The individual arrays in Fig. 3A were incubated with 20 μ L of 1:10 or more diluted human serum or 1:2 or more diluted saliva with dilution buffer (20 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 1% BSA, 0.3 M KCl and 0.05% Tween20) as the 1st antibody for 60 min at 37 °C. Arrays were then washed twice with TTBS (50 mM Tris–HCl,

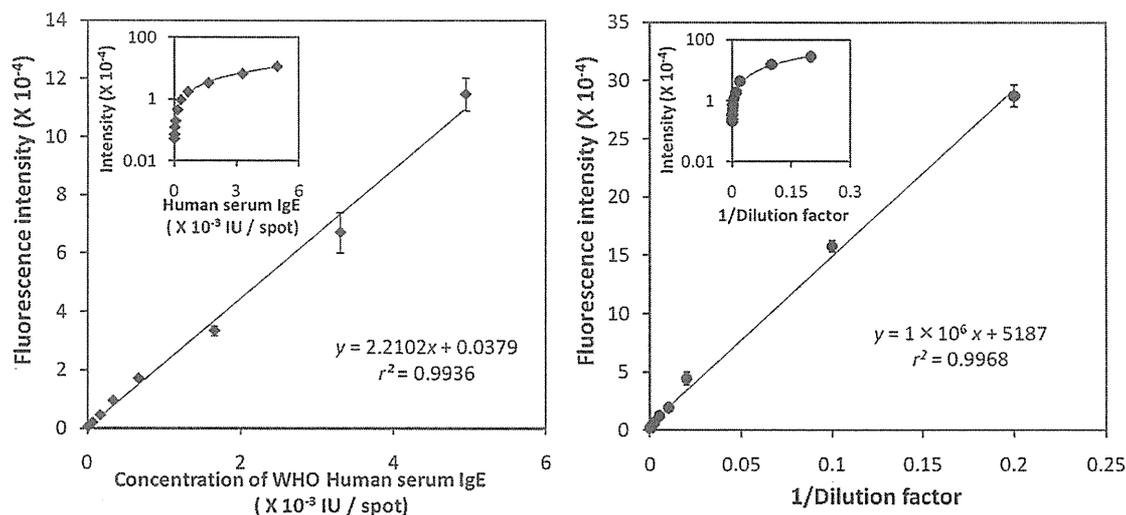


Fig. 2. (A) Immobilization linearity of proteins on the DLC chip. Eight standards with known concentrations of WHO human serum IgE (75/502) were immobilized on the DLC chip covering $(0.02\text{--}4.95) \times 10^{-3}$ IU spot $^{-1}$. Hilyte Fluor 555 labeled anti-human IgE was used for detection. Data are mean \pm SD of tetraplicate spots. The observed values were compared to the expected by linear regression analysis ($y = 2.210x + 0.037$, $r^2 = 0.993$). The inset graph presents the data in semi-logarithmic scale. (B) Linearity of detection of α -casein-specific IgE by sandwich fluorescence immunoassay. Serum of a patient with milk allergy was diluted from 1:5 to 1:9600 and the dilution recovery and the linearity of detection ranges were analyzed. Data are mean \pm SD of tetraplicate spots. $y = 1 \times 10^6 x + 5187$, $r^2 = 0.996$. The inset graph presents the data in semi-logarithmic scale.

pH 7.5, containing 150 mM NaCl and 0.05% Tween20), rinsed with deionized water and dried by centrifugation at $500 \times g$ for 3 min. A Hilyte FluorTM 555 labeled 2nd antibody against human IgE (Millipore, Bedford, MA) was adjusted to $6.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ by the dilution buffer, and $20 \mu\text{L}$ of the antibody was applied and incubated for 1 h at 25°C . After reaction, arrays were washed twice with TTBS (each 5 min), rinsed with deionized water, dried by centrifugation and then scanned. For detection of antigen-specific IgG, IgG4, IgG1 and IgA in serum and secretory IgA (S-IgA) in saliva, mouse monoclonal antibodies against each human immunoglobulin (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA) were used at $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ as the 2nd antibodies and incubated for 1 h at 37°C . The 2nd antibody (anti-human IgA antibody) was almost equally reacted with both IgA in serum and S-IgA in saliva.

2.5. Image data acquisition and data processing

Images were acquired by scanning of allergen DLC chips with a FLA-8000 scanner (Fujifilm Co., Tokyo) with an excitation wavelength of 532 nm and an emission wavelength of 570 nm under 60% impressed voltage. Images were analyzed using FLA-8000 image reader (ver. 1.2) software (Fujifilm Co.) and each spot signal in the images was calculated to numerical fluorescent intensity using Array gauge (ver. 2.10) software (Fujifilm Co.). The fluorescence intensities of each of the tetraplicates spotted allergen had to be above the overall signal cut-off value, which represented the mean $+3\text{SD}$ fluorescence signal determined for control sera from non-allergic volunteers. The difference between the mean and median values of the fluorescence intensity of each spot was less than 30%. The coefficient of variation between the fluorescence intensities of all tetraplicates was less than 13.5%.

On each allergen chip, various concentrations of IgE, IgG or IgA were spotted in tetraplicates, detected by the fluorescence-labeled anti-human IgE, IgG or IgA antibody, respectively, and the mean value of each concentration was calculated. From the cubic equation of IgE, IgG or IgA standard concentrations, the amounts of allergen-specific antibodies bound to allergen on the chips were calculated and expressed as Binding Unit (BU). The BU of IgE was reported as BUe.

2.6. Statistical analysis

The coefficient of variance (CV) was calculated as the standard deviation divided by the mean of replicates. Paired correlations were calculated by the Pearson's correlation test. Statistical analysis was performed using The Statistical Package for Social Sciences SPSS software (SPSS, Chicago, IL).

3. Results

3.1. Immobilization levels of antigens on DLC chip

We first analyzed the immobilization capacities of various antigens and proteins, such as ovalbumin, ovomucoid, conalbumin, α -casein, β -casein, α -lactalbumin, β -lactoglobulin and protein A, covalently bound on the DLC chip, using escalating doses of each fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled allergen on the carboxylated DLC chip. After immobilization reactions followed by double washing to remove the unbound antigens, we analyzed the fluorescence intensities on the chip to determine the doses of immobilized antigens. The immobilized FITC-labeled antigens tested were 2.60–38.6 pg per 0.074 mm^2 spot ($35.10\text{--}521.6 \text{ pg mm}^{-2}$) and were also expressed as number of moles per mm^2 to compare the values of immobilized antigens on ELISA plastic plate, BLACK MAX-ISORT (NUNC) (Table 1). As shown in Table 1, the numbers of

Table 1
Comparison of immobilized allergens on DLC chip and plastic ELISA plate.

	Number of molecules per mm^2		
	DLC chip	ELISA	DLC chip/ELISA ^a
Ovalbumin	2.49×10^9	3.61×10^8	6.90
Ovomucoid	1.00×10^9	1.80×10^8	5.50
Conalbumin	3.31×10^9	7.77×10^8	4.30
α -Casein	3.41×10^9	0.24×10^8	142
β -Casein	0.94×10^9	0.12×10^8	80.6
α -Lactalbumin	4.19×10^9	0.65×10^8	64.8
β -Lactoglobulin	6.59×10^9	8.33×10^8	7.90
Protein A	7.82×10^9	1.14×10^8	68.7

^a The ratio of antigen immobilization doses between DLC chip and ELISA.

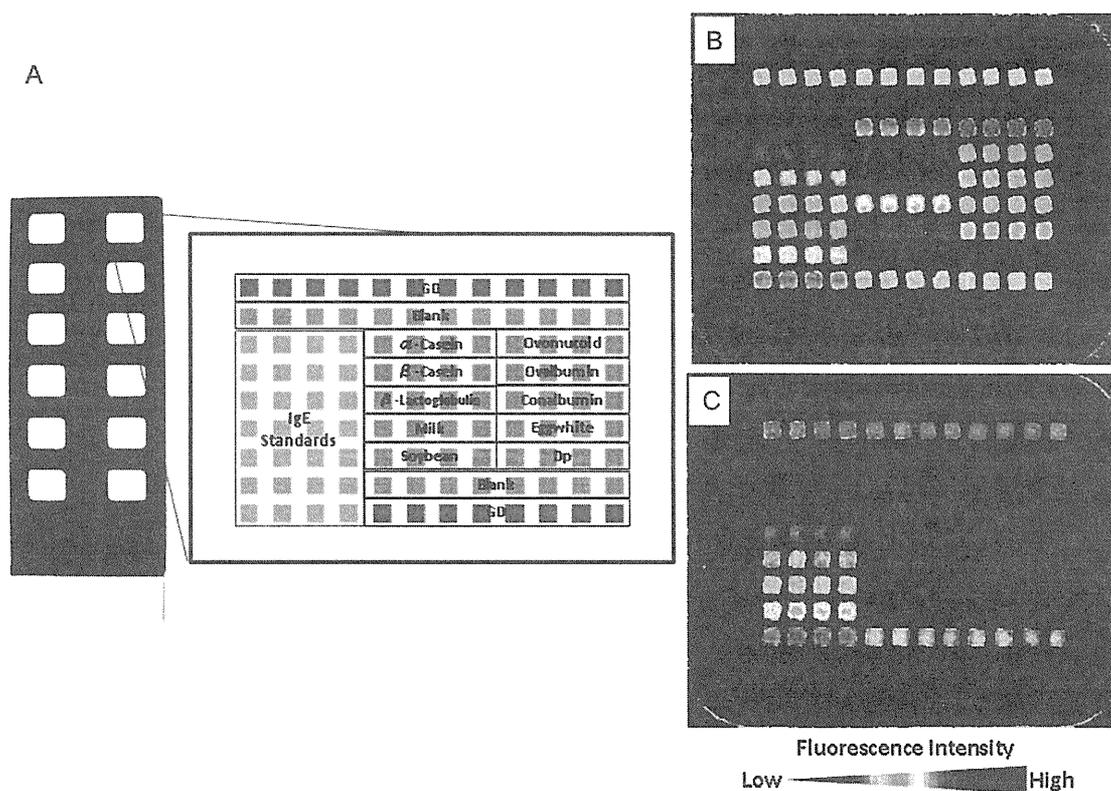


Fig. 3. IgE profiling on the DLC chip. (A) General layout of the allergens on the DLC chip. GD: guideline dot by IgE standard. Rainbow displays of fluorescence images of allergen-specific IgE binding on the DLC chip probed with serum from a patient with eggwhite and milk allergy (B), a non-allergic individual (control) (C).

immobilized antigen molecules per mm^2 on the DLC chip tested were $(0.94\text{--}7.82) \times 10^9$ molecules and were 4.30–142-fold higher than those of immobilized antigens on the plastic ELISA plate.

3.2. Sandwich immunoassay of IgE determination using DLC chip

To measure the allergen specific IgE quantitatively, various doses of WHO human serum IgE (75/502; NIBSC), corresponding to $(0.02\text{--}4.95) \times 10^{-3}$ IU per spot, were spotted in tetraplicates and visualized with $6.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ HiLyte Fluor™ 555 labeled anti-human IgE for calibration (Fig. 2A). The linear regression parameters were observed in working assay ranges between 0.02 and 4.95×10^{-3} IU spot $^{-1}$.

Linearity of allergen-specific IgE quantification and dilution recovery were analyzed (Fig. 2B). The pooled sera of 4 patients with α -casein-specific IgE were diluted 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:600, 1:1200, 1:2400, 1:4800 and 1:9600 and the antigen-specific IgE levels were analyzed on DLC-chip. The data showed a linear fit across the wide assay range from 0.2 to 0.2×10^{-3} of 1/dilution ratios.

To analyze the reproducibility of IgE determination, inter-assay precision was evaluated on five replicate microarray chips using pooled sera of allergy patients positive for allergen-specific IgE against eggwhite, ovomucoid, milk, α -casein, soybean and Dp (Table 2). Within-slide precision and batch-to-batch precision with five different batches of slides on 4 consecutive days were also analyzed. The accuracy of the numerical value was represented by the % coefficient of variation (CV: standard deviation in % of mean value). The inter-assay CV was 5.70–13.5%, within-slide CV 7.70–25.2% and batch-to-batch CV was 2.7–24.4%.

To assess the analytical sensitivity of DLC chip for the allergen-specific IgE, each serum pool [UniCAP(FEIA) class 6; $>100 \text{ UA mL}^{-1}$]

of five patients containing high levels of IgE against milk, α -casein, eggwhite or ovomucoid was tested in 11-fold geometric dilutions starting from 1:5 to 1:9600. The values obtained from the DLC chip were compared with the measurements obtained by UniCAP(FEIA) system at the same dilutions (Table 3). The DLC chip assay was more sensitive than the UniCAP system: the antigen-specific IgE detection on DLC chip allowed lowering the limit of dilution rate in UniCAP system to further dilution at 4–8-fold.

Fig. 3 shows typical allergen-specific IgE analyses on the DLC chip of a patient allergic to milk and eggs (Fig. 3B) and non-allergic person (Fig. 3C). Ten different allergens including natural allergen extracts, egg white, milk, Dp and soybean and purified allergen proteins, α -casein, β -casein, β -lactoglobulin, ovomucoid, ovalbumin and conalbumin were spotted in tetraplicates. The patient serum sample reacted strongly with α -casein, ovomucoid and milk and mildly with ovalbumin, conalbumin and egg white, but did not react with soybean, Dp, β -casein and β -lactoglobulin.

3.3. Correlation of allergen-specific IgE values determined by DLC chip system and UniCAP system

The correlation of allergen-specific IgE values determined by the DLC chip and UniCAP was analyzed in 20 different typical natural allergen extracts and purified allergen proteins (Table 4). The

Table 2
Reproducibility of DLC chip testing allergen-specific IgE against eggwhite, ovomucoid, milk, α -casein, soybean and Dp.

Reproducibility	Eggwhite	Ovomucoid	Milk	α -Casein	Soybean	Dp
Inter-assay	10.1	5.70	12.4	13.5	12.0	5.80
Within-slide	14.9	25.2	8.90	8.60	14.7	7.70
Batch-to-batch	24.4	24.4	17.8	13.7	2.70	22.3

Table 3

Comparison of assay sensitivity in detecting antigen-specific IgE against milk, α -casein, eggwhite and ovomucoid using the DLC chip system and UniCAP system.

Serum dilution ^a	DLC chip (fluorescence units)				UniCAP (PRU)			
	Milk	α -Casein	Eggwhite	Ovomucoid	Milk	α -Casein	Eggwhite	Ovomucoid
1:5	>1500	>1500	>1500	>1500	36.1	49.2	33.3	33.9
1:10	>1500	>1500	1366	1382	17.3	26.3	16.5	17.0
1:50	445.6	633.2	527.5	295.6	3.96	5.55	3.49	3.17
1:100	191.0	306.2	280.7	121.2	1.96	2.69	1.81	1.67
1:200	99.76	161.6	144.1	76.16	1.06	1.42	0.940	0.860
1:400	61.71	94.22	71.33	38.17	0.540	0.710	0.530	0.440
1:600	38.88	66.67	48.64	23.62	0.390	0.500	ND [#]	ND [#]
1:1200	21.80	41.56	25.06	12.59	ND [#]	ND [#]	ND [#]	ND [#]
1:2400	10.63	25.17	19.07	ND [*]	ND [#]	ND [#]	ND [#]	ND [#]
1:4800	ND [*]	24.44	ND [*]	ND [*]	ND [#]	ND [#]	ND [#]	ND [#]
1:9600	ND [*]	ND [*]	ND [*]	ND [*]	ND [#]	ND [#]	ND [#]	ND [#]

Individual allergens were tested by the DLC chip and UniCAP. ND^{*} of DLC chip assay: <mean + 3.5SD of control sera. ND[#] of UniCAP assay: <0.35.^a Serum was pooled from three patients allergic to milk and eggwhite.

coefficient of correlation (ρ) values ($P < 0.01$) for 14 allergens was >0.900 , 3 allergens >0.850 , 2 allergens >0.800 and one at the lowest of 0.744 of house dust. Fig. 4 shows the correlations between IgE values determined by the DLC chip system and UniCAP system for milk, cat dander, ovomucoid and α -casein. Good correlations between IgE values determined by the DLC chip and UniCAP were found for natural allergen extracts and purified allergens.

3.4. Determination of allergen-specific IgA, IgG, IgG1 and IgG4 in serum and S-IgA in saliva by sandwich immunoassay

Allergen-specific IgA, IgG, IgG1 and IgG4 levels in serum and S-IgA levels in saliva were also analyzed on the DLC chip by the same method except dilution of the initial sample at 10–50-fold, because allergen-specific IgA, IgG, IgG1 and IgG4 levels in serum

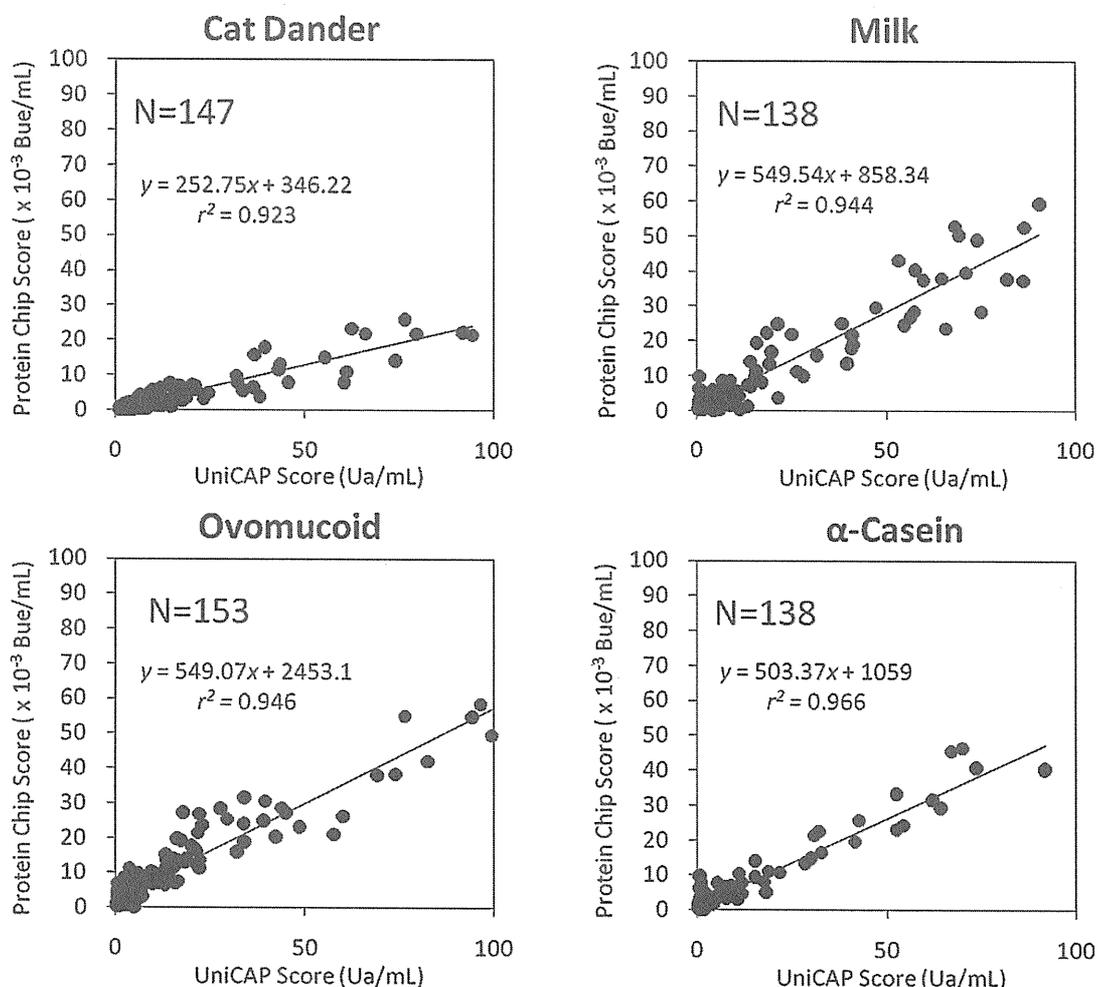


Fig. 4. Correlation of IgE reactivities on the DLC chip with the results obtained by UniCAP system. The reactivity profiles of individual IgE in sera of 147 patients with cat dander allergy, 138 patients with milk allergy, 153 ovomucoid patients and 138 patients with casein allergy were determined by the multi-allergen DLC chip system and UniCAP system. The results were tested by linear regression analysis. Bue: binding unit of IgE. Ua: Arbitrary Unit.

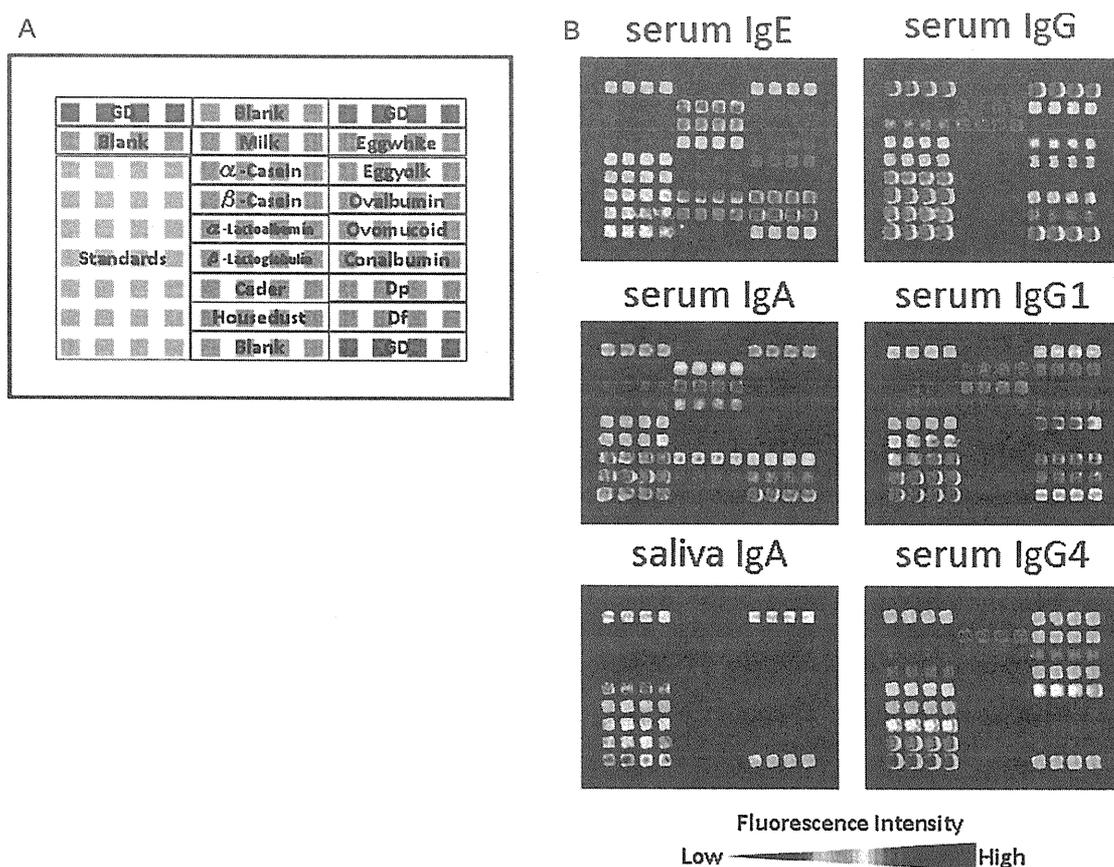


Fig. 5. Detection of antigen-specific serum IgE, IgG, IgG1, IgG4 and IgA levels and saliva S-IgA levels profiling using DLC chip. (A) Layout of the allergen DLC chip. Dp: *Dermatophagoides pteronyssinus*; Df: *Dermatophagoides farinae*. (B) Rainbow displays of fluorescence intensities for IgE, IgG, IgG1, IgG4 and IgA reactivities of an array probed using serum sample and with S-IgA reactivities of an array probed using saliva sample from a patient of mite and milk allergy.

and S-IgA levels in saliva are higher than allergen-specific IgE levels. Fig. 5 shows the allergen-specific immunoglobulin binding patterns for IgA, IgG, IgG1 and IgG4 in serum and S-IgA in saliva from one allergy patient. Different levels of immunoglobulin bindings were observed among IgE, IgG, IgG1, IgG4 and IgA in serum and S-IgA in saliva from the same patient, although the allergen recognition patterns were similar among them.

Table 4
Correlation of IgE reactivities between DLC chip and UniCAP on various allergens.

	Number of samples	Correlation (ρ)
Ovomucoid	153	0.944
Eggwhite	311	0.822
Egg yolk	197	0.938
α -Casein	138	0.966
β -Lactoglobulin	106	0.965
Milk	138	0.946
Wheat	156	0.874
Rice	133	0.864
Backwheat	161	0.959
Soybean	165	0.947
Peanut	187	0.905
Shrimp	142	0.967
Crab	112	0.974
Salmon	119	0.925
Tuna	126	0.937
House dust	264	0.744
Cat dander	147	0.923
Japanese cedar	322	0.870
Sweet vernal grass	160	0.823
Orchard grass	153	0.930

4. Discussion

Despite the success of DNA microarrays, protein chip technology is more challenging than DNA technology and is developing in recent years to immobilize proteins in an active state at high densities and in minimal non-specific protein adsorption/absorption on chip [15]. To achieve specific and stronger protein attachment, several groups have created reactive surface on glass that can covalently cross-link to proteins, such as aldehyde-activated surface [16], epoxy-activated surface [17], gold-coated silicon [18] and polydimethylsiloxane nanowell [17]. To attach proteins to a solid substrate, a bifunctional silane cross-linker is used to form a self-assembled monolayer, which has one functional group that reacts with the hydroxyl groups on glass surface, and another free one that can either directly react with primary amine groups of proteins and DNAs. We present here a new surface chemistry of carboxylated arms on the surface of a DLC-coated chip, which covalently cross-link protein at high density. To compare maximal coupling capacity among microarrays, amount of oligonucleotide binding provides useful information. Immobilized amount of oligonucleotide on the carboxylated DLC chip was approximately 42 pmol ($\sim 2.5 \times 10^{13}$ molecules) per 9 mm² of the chip surface [14], about 9.3-fold higher than the oligonucleotides immobilized via disulfide bonds onto a glass support [19] and polydimethylsiloxane nanowell [17].

By using carboxylated DLC chip technology, we developed a protein microarray for determination of allergen-specific immunoglobulins against immobilized multi-allergen using a minimal amount of sera and saliva (1–2 μ L) in a single test. The DLC chip

has the capacity of 108 spots per 24 mm² of single chip window. A special feature of the carboxylated DLC chip is the high allergen immobilization capacity (~2.60–38.6 pg spot⁻¹) with stable covalent binding, and the levels of immobilized allergens were higher at 4.30–142-fold than the values on the ELISA plastic plate in all allergens tested (Table 1).

This high immobilization capacity of antigens on the DLC chip is advantageous for determination of allergen-specific antibodies: (1) Wide dynamic range for measurement of antigen-specific IgE as shown in Fig. 2. Although the antigen-specific IgE levels are several magnitudes lower than the antigen-specific IgG and IgA levels in serum, the good dilution recovery in Fig. 2B suggests that there was no obvious interference of IgE binding to antigens by the other abundant immunoglobulins. (2) Improved detection sensitivity of antigen-specific IgE in the DLC chip system compared with the sensitivity of the UniCAP system (Table 3). The antigen-specific IgE in the sera could be detected by the DLC chip even by further 4–8-fold dilution of the limit of dilution in UniCAP system. (3) The DCL chip was a useful tool to determine allergen-specific immunoglobulins against not only purified proteins but also natural allergen extracts with good correlation to the UniCAP system (Table 4). Many of the microarrays reported so far are useful for determination of the allergen-specific IgE against recombinant proteins, purified proteins and peptides, but not for natural allergen extracts [7,20,21], probably because of the limitation of immobilized antigen levels on microarrays.

Another advantage of the DLC chip is the determination of allergen-specific IgA, IgG, IgG1 and IgG4 in serum and S-IgA in saliva (other than IgE in serum) by using a series of the same or similar DLC chip system. It is possible that the allergen recognition patterns and the levels of antigen-specific IgE, IgA, IgG and IgG4 in serum and S-IgA in saliva against each allergen might change during the course of allergy progression and regression. The DLC chip is a useful tool for monitoring these values and might be also helpful in the clinical setting.

Determination of allergen-specific immunoglobulins on the DLC chip was highly reproducible (Table 2) and the inter-assay, within-slide and batch-to-batch CV values were ranged between 2.70 and 25.4, although the CV values of batch-to-batch and within-slide for some natural extracts were slightly higher, probably because of the inaccuracy of microarray spotting. This problem might be overcome by improvement of spotting conditions, particularly the strict regulation of humidity and temperature during spotting.

In the present allergen DLC chip, we used sandwich immunoassay with fluorescently labeled antibodies for detection. The high immobilization capacity of proteins on the DLC chip might be advantageous for other detection methods in protein microarray experiments, such as enzyme-linked immunosorbent assay [22], radio isotope-labeled analyte assay [16], surface plasmon resonance assay [23], electro-chemical assay by conductivity measurement [24,25] and mass spectrometry assay [26,27].

5. Conclusions

The present study showed that the DLC chip microarray system with high immobilization capacity allows the analysis of

antigen-specific immunoglobulins against both natural allergen extracts and purified allergen proteins with wide assay dynamic range. The higher sensitivity of the DLC system was observed for comparison with the UniCAP system. Simultaneous measurement of the levels of antigen-specific IgE and other immunoglobulin parameters, such as IgA, IgG1, IgG4 and IgG in serum and S-IgA in saliva against multiple allergens might be useful for the diagnosis and immunotherapy monitoring of Type I allergy.

Acknowledgments

This work was supported, in part, by Grant-in-Aid 18659293, 21659245 and 19659253 from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan and by supporting program for creating university ventures from Japan Science and Technology Agency.

References

- [1] A.B. Kay, L. Barata, Q. Mengs, S.R. Durham, S. Ying, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113 (1997) 196–199.
- [2] G. Liccardi, G. D'Amato, G.W. Canonica, A. Salzillo, A. Piccolo, G. Passalacqua, J. *Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 16 (2006) 75–78.
- [3] B. Jahn-Schmid, C. Harwanegg, R. Hiller, B. Bohle, C. Ebner, O. Scheiner, M.W. Mueller, *Clin. Exp. Allergy* 33 (2003) 1443–1449.
- [4] P.W. Ewan, D. Coote, *Allergy* 45 (1990) 22–29.
- [5] A. Leimgruber, B. Mosimann, M. Claeys, M. Seppey, Y. Jaccard, V. Aubert, R. Peitrequin, M-P. Nisoli, A. Pecoud, *Clin. Exp. Allergy* 21 (1991) 127–131.
- [6] B. Jahn-Schmid, C. Harwanegg, R. Hiller, B. Bohle, C. Ebner, O. Scheiner, M.W. Mueller, *Clin. Exp. Allergy* 33 (2003) 1443–1449.
- [7] K. Deinhofer, H. Sevcik, N. Balic, C. Harwanegg, R. Hiller, H. Rumpold, M.W. Mueller, *Methods* 32 (2004) 249–254.
- [8] A.B. Petersen, P. Gudmann, P. Milvang-Grønager, R. Mørkeberg, S. Bøgestrand, A. Linneberg, N. Johansen, *Clin. Biochem.* 37 (2004) 882–892.
- [9] I. Herzum, N. Blümer, W. Kersten, H. Renz, *Clin. Chem. Lab. Med.* 43 (2005) 963–966.
- [10] L. Wide, H. Bennich, S.G.O. Johansson, *Lancet* ii (1967) 1105–1107.
- [11] S.G.O. Johansson, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4 (2004) 89–95.
- [12] L. Yman, in: D. Wild (Ed.), *The Immunoassay Handbook*, Nature Publishing Group, London, UK, 2001, pp. 664–680.
- [13] D. Wild, in: D.G. Wild (Ed.), *The Immunoassay Handbook*, Elsevier, London, Amsterdam, New York, 2005, pp. 358–361.
- [14] K. Takahashi, M. Tange, O. Takai, H. Okamura, *Diamond Relat. Mater.* 12 (2003) 572–576.
- [15] H. Zu, M. Snyder, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7 (2003) 55–63.
- [16] G. MacBeath, S.L. Schreiber, *Science* 289 (2000) 1760–1763.
- [17] H. Zhu, J.F. Klemic, S. Chang, P. Bertone, A. Casamayor, K.G. Klemic, D. Smith, M. Gerstein, M.A. Reed, M. Snyder, *Nat. Genet.* 26 (2000) 283–289.
- [18] C. Bieri, O.P. Ernst, S. Heyse, K.P. Hofmann, H. Vogel, *Nat. Biotechnol.* 17 (1999) 8105–8110.
- [19] Y-H. Rogers, P. Jiang-Baucom, Z.-J. Huang, V. Bogdanov, S. Anderson, M.T. Boyce-Jacino, *Anal. Biochem.* 266 (1999) 23–30.
- [20] M. Cretich, G.D. Carlo, R. Longhi, C. Gotti, N. Spinella, S. Coffa, C. Galati, L. Renna, M. Chiari, *Anal. Chem.* 81 (2009) 5197–5203.
- [21] K.A. Vigh-Conrad, D.F. Conald, D. Preuss, *PLoS ONE* 5 (2010) 1–11 (e10174).
- [22] T.O. Joos, M. Schrenk, P. Hopfl, K. Kroger, U. Chowdhury, D. Stoll, D. Schorner, M. Durr, K. Herick, S. Rupp, K. Sohn, H. Hämmerle, *Electrophoresis* 21 (2000) 2641–2650.
- [23] J.M. McDonnell, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 572–577.
- [24] M. Pohanka, O. Pavliš, P. Skládal, *Talanta* 71 (2007) 981–985.
- [25] H. Ogi, T. Yanagida, M. Hirao, M. Nishiyama, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 4819–4822.
- [26] P.M. Lizardi, X. Huang, Z. Zhu, P. Bray-Ward, D.C. Thomas, D.C. Ward, *Nat. Genet.* 19 (1998) 225–232.
- [27] W. Liu, S. Liu, H. Li, F. Song, Z. Liu, S. Liu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (2011) 973–978.

23 **ABSTRACT**

24 **Background:** To design rational allergy prevention program, it is important to determine
25 whether allergic sensitization starts *in utero* under maternal immune system.

26 **Objective:** To investigate the origin of allergen-specific IgE in cord blood (CB) and
27 maternofetal transfer of immunoglobulins.

28 **Method:** Food and inhalant allergen-specific IgE, IgA, IgG and IgG4 in CB and maternal
29 blood (MB) from 92 paired neonates and mothers were measured using a novel allergen
30 microarray of diamond-like-carbon (DLC)-coated chip, with high-sensitivity detection of
31 allergen-specific antibodies and allergen profiles.

32 **Results:** The levels of allergen-specific IgE antibodies against food and inhalant allergens
33 and allergen profiles were identical in CB and newborn blood but the levels and profiles,
34 specifically against inhalant allergens, were different from those in MB. Allergen-specific
35 IgA was below the detection levels in CB despite clear detection in MB. Therefore
36 contamination with MB in CB was excluded based on the extremely low IgA levels in CB
37 and the obvious mismatch of the allergen-specific IgE and IgA profiles between CB and MB.
38 However, the levels of allergen-specific IgG and IgG4 and their allergen-profiles were almost
39 identical in MB and CB.

40 **Conclusion:** Allergen-specific IgE and IgA levels and their allergen profiles analyzed by the
41 DLC allergen chip indicate that IgE antibodies in CB are of fetal origin. Food-allergen
42 specific IgE were detected more often than inhalant-allergen specific IgE in CB, the reason of
43 which remaining unclarified.

44

45 **Key words:** Prenatal, allergen-specific IgE, IgA, IgG and IgG4, sensitization, cord blood,
46 allergen chip

47

48 *Abbreviations used*

49 CB: Cord blood

50 MB: Maternal blood

51 DLC: Diamond-like-carbon

52 NB: Neonatal blood

53 Df: *Dermatophagoides farinae*

54 Dp: *Dermatophagoides pteronyssinus*

55 BU: Binding Unit

56 ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

57 Std: Standard

58 NA: Not available