

Fig.7. 頬部pH

	例数						
	0w	4w	8w	12w	16w	24w	32w
Eczema発症群	19	18	12	9	2	3	
未発症群	13	13	10	13	9	13	14

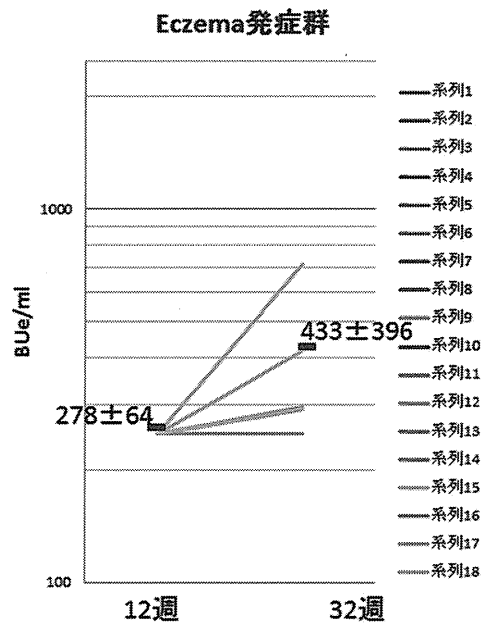
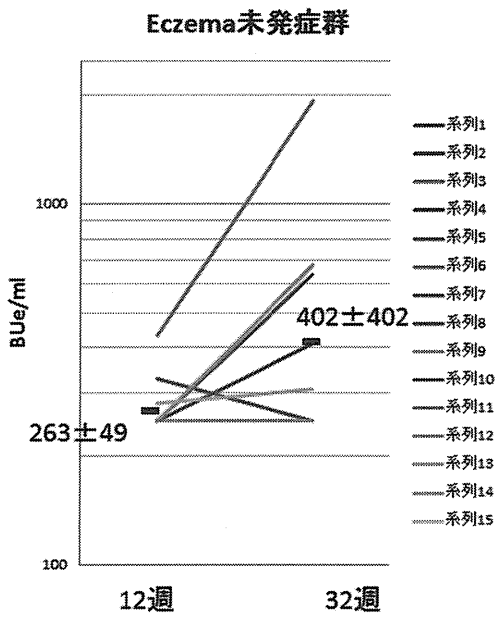


Fig.8. Egg White specific IgE

N=15

N=19

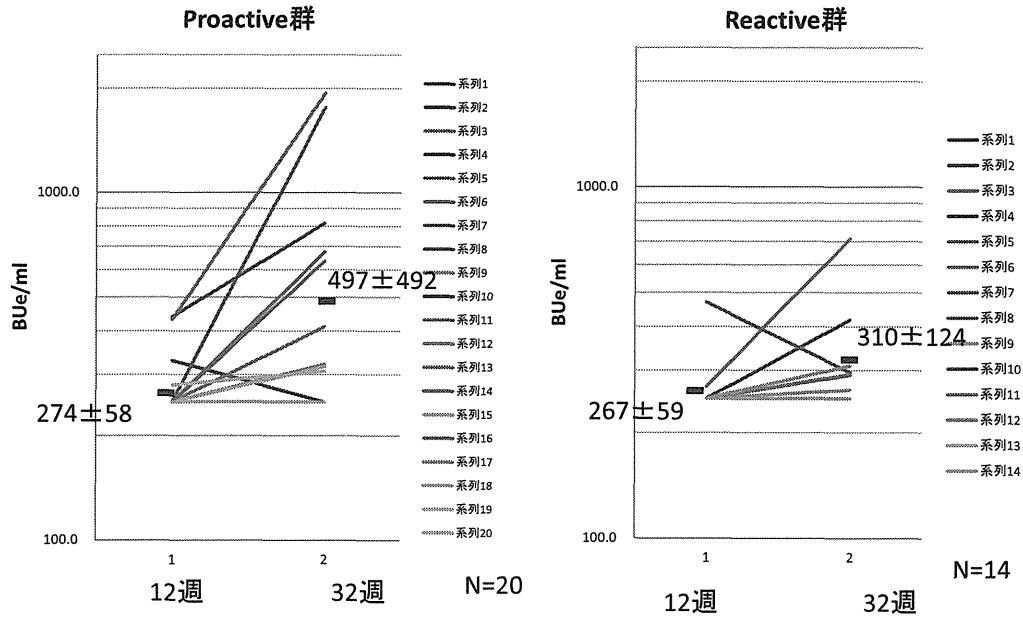


Fig.9. Egg White specific IgE

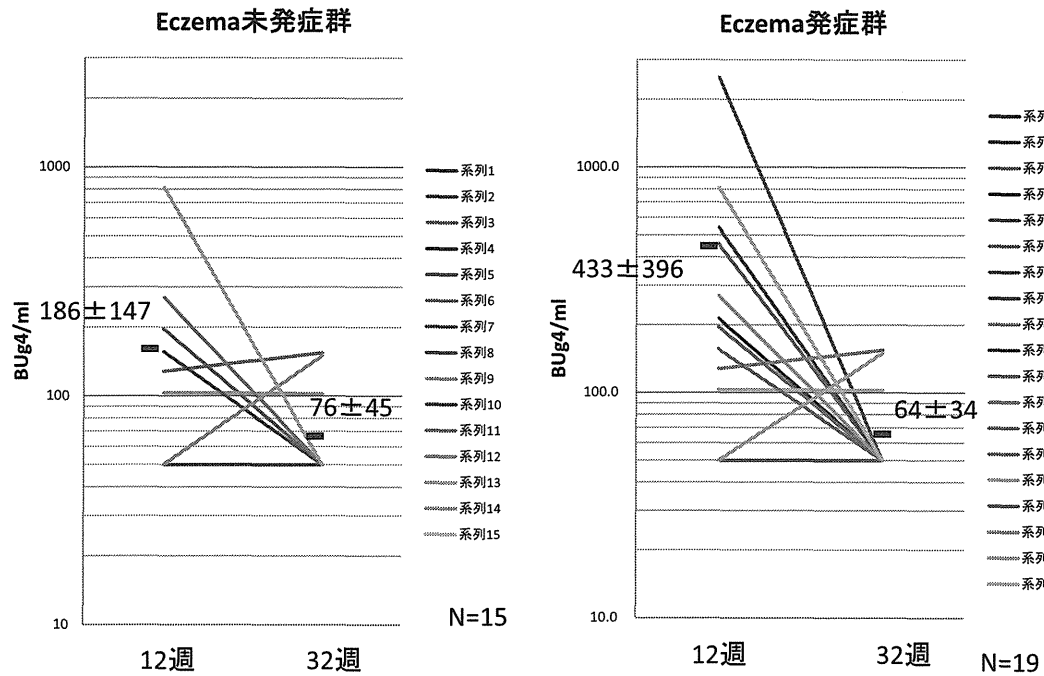


Fig.10. Egg White specific IgG4

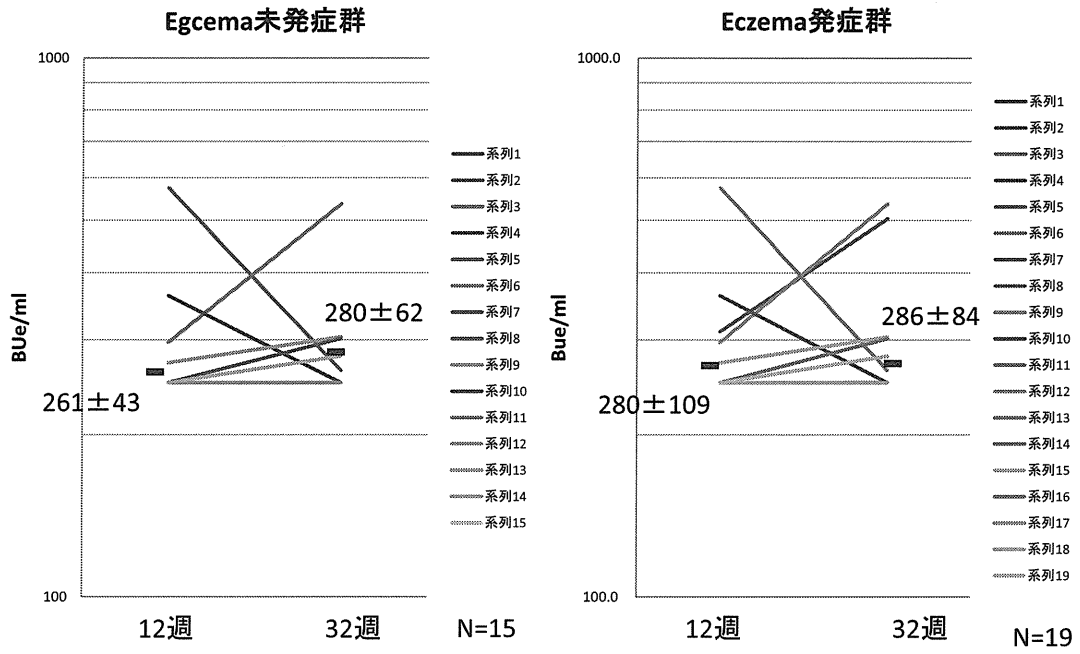


Fig.11. Milk White specific IgE

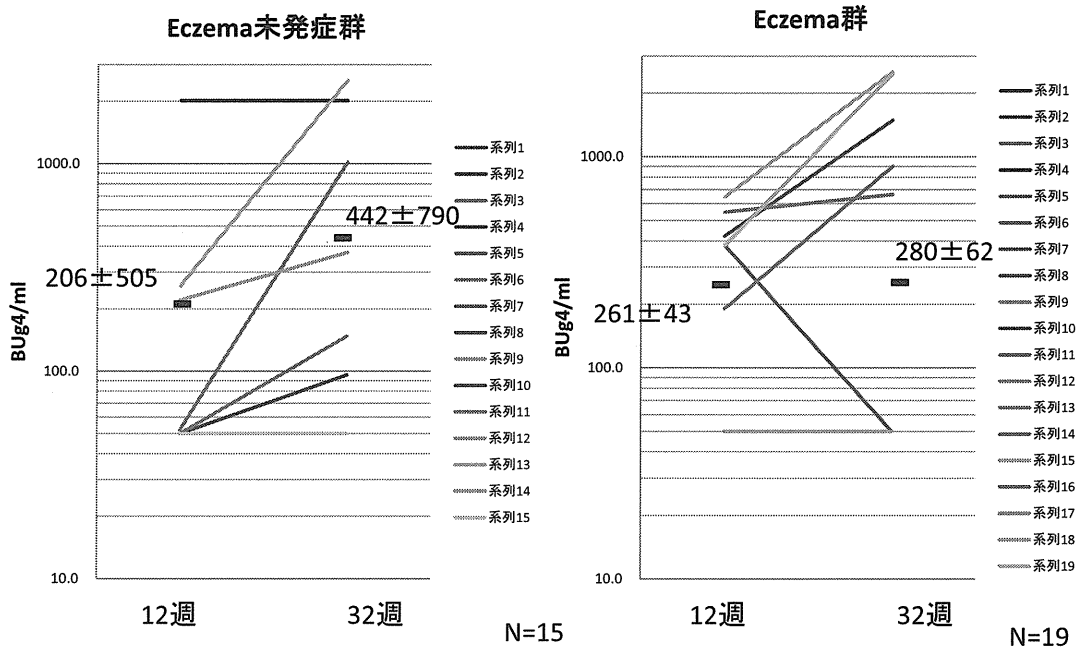


Fig.12. Milk White specific IgG4

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）

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

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
免疫アレルギー研究部 部長

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：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 に大きく影響する問題である。しかし、これまでに、なぜ皮膚から侵入した抗原が 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。今回、私たちは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相関する黄色ブドウ球菌の関与に着目し、黄色ブドウ球菌が産生する V8 protease のマウス経皮感作における影響を検討した。その結果、V8 protease は OVA と同時に皮膚に曝露させた場合に、OVA に対する IgE 抗体の産生を増強した。その機序として、protease 活性による皮膚のバリア傷害だけでなく、湿疹の惹起が関与する可能性が示唆された。今後はこの皮膚の湿疹面での食物抗原曝露が食物アレルギーの発症に関わることを想定した予防法の開発が望まれる。

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。しかし、これまでに、なぜ皮膚から侵入した抗原が 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。私たちは昨年度までに、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相関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 が食物抗原やダニ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。しかし黄色ブドウ球菌がどのようなメカニズムで皮膚炎を誘導し、

その後の抗原感作につながるのかはほとんど分かっていなかった。

そこで本年度は種々のアレルギー疾患のなかで最初に発症する湿疹に着目し、黄色ブドウ球菌由来のプロテアーゼが皮膚炎（湿疹）形成にどのように関与するかについて検討した。

B. 方法

1. C57BL/6 マウスの耳介に種々の濃度の V8 protease を隔日塗布し、耳介の厚さを経時的測定し、耳介の炎症を組織学的に検討した。

C. 結果

不活性化した V8 protease を塗布した群に比して、V8 protease を塗布した群では濃度依存的に耳介の腫脹を認めることが判明した。また、組織学的な検討では、表皮の肥厚や、真皮への多核球の浸潤を認めた。

D. 考察

①黄色ブドウ球菌由来の protease に暴露されることによって、皮膚炎が生じることが明らかとなった。

②このことから、黄色ブドウ球菌を除去することにより湿疹を初めとした皮膚炎の発症を予防し、その後の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

黄色ブドウ球菌由来の protease は皮膚炎を誘導し、皮膚炎からの抗原感作を介してアトピー性皮膚炎及び、その後のアレルギー疾患の発症に関与する可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Activation of human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through FcεRI and FcγRII. Lee H, Kashiwakura J, Matsuda A, Watanabe Y, Sakamoto-Sasaki T, Matsumoto K, Hashimoto N, Saito S, Ohmori K, Nagaoka M, Tokuhashi Y, Ra C, Okayama Y. *Arthritis Rheum.* 65: 109-19, 2013.
2. Interleukin-33 in allergy. Ohno T, Morita H, Arae K, Matsumoto K, Nakae S. *Allergy.* 67: 1203-14. 2012.
3. Antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy are predominantly skewed to TH2. Morita H, Nomura I, Orihara K, Yoshida K, Akasawa A, Tachimoto H, Ohtsuka Y, Namai Y, Futamura M, Shoda T, Matsuda A, Kamemura N, Kido H, Takahashi T, Ohya Y, Saito S,

Matsumoto K. *J Allergy Clin Immunol* 2012 in Press.

4. Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F, is crucial for murine asthma. Suzukawa M, Morita H, Nambu A, Arae K, Shimura E, Shibui A, Yamaguchi S, Suzukawa K, Nakanishi W, Oboki K, Kajiwara N, Ohno T, Ishii A, Korner H, Cua DJ, Suto H, Yoshimoto T, Iwakura Y, Yamasoba T, Ohta K, Sudo K, Saito H, Okumura K, Broide DH, Matsumoto K, Nakae S. *J Immunol.* 189: 3641-3652, 2012.
5. Omalizumab inhibits acceleration of FcεpsilonRI-mediated responsiveness of immature human mast cells by immunoglobulin E. Okayama Y, Kashiwakura J, Sasaki-Sakamoto T, Matsumoto K, Hashimoto N, Ohmori K, Kawakami T, Saito H, Ra C. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 108: 188-194 e182, 2012.
6. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies: distinct differences in clinical phenotype between Western countries and Japan. Nomura I, Morita H, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. *Curr Allergy Asthma Rep.* 12: 297-303, 2012.
7. ST2 requires Th2-, but not Th17-, type airway inflammation in epicutaneously antigen-sensitized mice. Morita H, Arae K, Ohno T, Kajiwara N, Oboki K, Matsuda A, Suto H, Okumura K, Sudo K, Takahashi T, Matsumoto K, Nakae S. *Allergol Int.* 61:265-73, 2012.
8. Anti-inflammatory effects of high-dose IgG on TNF-alpha-activated human coronary artery endothelial cells. Matsuda A, Morita H, Unno H, Saito H, Matsumoto K, Hirao Y, Munechika K, Abe J. *Eur J Immunol.* 42: 2121-31, 2012.

9. Salivary cortisol response to stress in young children with atopic dermatitis. Kojima R, Matsuda A, Nomura I, Matsubara O, Nonoyama S, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. *Pediatr Dermatol.* 30: 17-22, 2013.
 10. Factors associated with steroid phobia in caregivers of children with atopic dermatitis. Kojima R, Fujiwara T, Matsuda A, Narita M, Matsubara O, Nonoyama S, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. *Pediatr Dermatol.* 30: 29-35, 2012.
 11. Histamine-releasing factor has a proinflammatory role in mouse models of asthma and allergy. Kashiwakura JC, 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. *J Clin Invest.* 122: 218-228, 2012.
 12. The role of Staphylococcal enterotoxin in atopic keratoconjunctivitis and corneal ulceration. Fujishima H, Okada N, Dogru M, Baba F, Tomita M, Abe J, Matsumoto K, Saito H. *Allergy.* 67: 799-803, 2012.
 13. Effects of diesel exhaust particles on primary cultured healthy human conjunctival epithelium. Fujishima H, Satake Y, Okada N, Kawashima S, Matsumoto K, Saito H. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 110: 39-43, 2013.
 14. The association between oxytocin and social capital. Fujiwara T, Kubzansky LD, Matsumoto K, Kawachi I. *PLoS One.* 7:e52018, 2012.
 15. Role of Interleukin-33 in innate-type immune cells in allergy. Nakae S, Morita H, Ohno T, Arae K, Matsumoto K, Saito H. *Allergology Int* 2013 In Press.
 16. Pretreatment with low-levels of FcεRI-crosslinking stimulation enhances basophil mediator release. Koketsu R, Yamaguchi M, Suzukawa M, Arai H, Nagase H, Matsumoto K, Saito H, Ra C, Yamamoto K, Ohta K. *Int Arch Allergy Immunol* 2013 In Press.
2. 学会発表
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

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

研究分担者 (氏名) 片山一朗 (所属) 大阪大学大学院医学系研究科皮膚科

研究協力者 (氏名) 室田浩之 (所属) 大阪大学大学院医学系研究科皮膚科

(氏名) 寺尾美香 (所属) 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。「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(1)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、(2)石鹸、ステロイド外用剤が皮膚バリア機能に与える影響を検討した。

A.研究目的

(1) 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、(2) スキンケアにおける角質細胞間脂質の機能について検討する。アトピー性皮膚炎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個々の医療機関・医師での実際の外用療法やスキンケア指導に一定の指針がなく、エビデンスにも乏しいのが現状である。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昨年度に継続して検討を行う。

また日常生活での入浴習慣、石鹸の適切な指導、外用ステロイドのバリア機能への影響に関しても、エビデンスに基づいた患者指導が必要であると考ええる。

B.研究方法

1. 平成20年度に私たちは以下のような検討を行った：アトピー素因のある新生児をスキンケア介入群と非介入群を封筒法によって無作為に割付け、前者に対しては顔面には洗剤を使わず、ぬるま湯のみで洗うよう指示し、保湿剤を1日最低

1回(入浴後は必ず)顔面全体に外用するよう指示した。生後1週間以内、1ヶ月後、4ヶ月後、6ヶ月後の皮膚症状の有無を観察するとともに、経皮水分蒸散量(TEWL)、皮膚表面pHを測定すると同時に、頬部、前胸部、および下腿の細菌培養を行った。対象児のアレルギー症状に関する追跡調査を行った。

2 患者のスキンケア指導のためのアトピー性皮膚炎患者の皮膚バリア機能と発疹型の検討。患者の皮膚バリア機能を経皮水分蒸散量(TEWL)はMPA-5システム(300 probe (Courage&Khazaka electronic, GmbH社)、角層内水分量は3.5MHz Skicon-200 (IBS,Japan社)で測定し、評価した。特に肘窩部を中心とした皮膚炎の好発部位における皮疹の性状、発疹型と皮膚バリア機能の関連性を検討した。

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た(表1)。介入群の3/11、非介入群の4/10が食物アレルギーを発症していた。介

入群は6~9ヶ月、非介入群は1ヶ月~2歳で食物アレルギーを発症していた。そのほとんどが特異的IgEを測定することで小児科医が診断していた。3歳時点で介入群の食物アレルギー1例を除き、除去は継続されていた。保湿剤によるスキンケアを介入群ではほぼ全例が継続していたが、非介入群では食物アレルギー発症群でアトピー性皮膚炎症状を改善させる目的で発症後に保湿剤を開始していた。

(2) バリアの指標の一つとなる経皮水分蒸発量 (TEWL) は用いた3種類の石鹸すべてにおいて、無処置マウスや脱イオン蒸留水を塗布したマウスに比し、上昇していた。角質水分保持能もすべての石鹸において低下がみられた。ステロイド外用は SDS によるバリア機能障害を増幅したが、エタノールと差が見られず、大きな影響はあたえないと考えられた。In vitro において界面活性剤の成分である SDS は IL1 β のケラチノサイトの産生を有意に上昇させた。(図1)

D. 考察

症例数は少ないながら、新生児からの保湿剤によるスキンケア介入は児のその後のアレルギー疾患の発症率を低下させる可能性が示唆された。スキンケア介入は6ヶ月間と限られており、この期間がその後のアレルギーマーチの発症にどのくらいの影響を及ぼすかに興味もたれた。その結果、2歳時でのアトピー性皮膚炎有病率は非介入群に比し介入群で低い結果となった。

さらなる追跡調査によって食物アレルギーのアウトグロウの経過を観察する必要があると考えられた。

石鹸の使用に関しては、皮膚バリア機能を障害し、また界面活性剤成分の SDS がケラチノサイトからの IL1 β などを亢進させることより、適切な使用、洗浄法の指導が重要と考えられた。

E. 結論

スキンケアの重要性を支持する所見と思われ、今後も症例数、検討数を増やして検討していく予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Periostin Facilitates Skin Sclerosis via PI3K/Akt Dependent Mechanism in a Mouse Model of Scleroderma. Yang L, Serada S, Fujimoto M, Terao M, Kotobuki Y, Kitaba S, Matsui S, Kudo A, Naka T, Murota H, **Katayama I**. *PLoS One*. 2012;7:e41994.
- 2) Positive link between STAT3 activation and Th17 cell infiltration to the lesional skin in vitiligo vulgaris. Tanemura A, Kotobuki Y, Itoi S, Takata T, Sano S, **Katayama I**. *J Dermatol Sci*. 2012 ;67(3):207-9.
- 3) Artemin causes hypersensitivity to warm sensation, mimicking warmth-provoked pruritus in atopic dermatitis. Murota H, Izumi M, Abd El-Latif MI, Nishioka M, Terao M, Tani M, Matsui S, Sano S, **Katayama I**. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 ;130(3):671-682.e4.
- 4) Upregulation of N-acetylglucosaminyltransferase-V by heparin-binding EGF-like growth factor induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia. Kimura A, Terao M, Kato A, Hanafusa T, Murota H, **Katayama I**, Miyoshi E. *Exp Dermatol*. 2012 ;21(7):515-9
- 5) Periostin, a matricellular protein, accelerates cutaneous wound repair by activating dermal fibroblasts. Otsuka K, Kotobuki Y, Shiraishi H, Serada S, Ohta S, Tanemura A, Yang L, Fujimoto M, Arima K, Suzuki S, Murota H, Toda S, Kudo A, Conway SJ, Narisawa Y, **Katayama I**, Izuhara K, Naka T. *Exp Dermatol*. 2012;21(5):331-

- 6) Severe dermatitis with loss of epidermal Langerhans cells in human and mouse zinc deficiency. Kawamura T, Ogawa Y, Nakamura Y, Nakamizo S, Ohta Y, Nakano H, Kabashima K, **Katayama I**, Koizumi S, Kodama T, Nakao A, Shimada S. *J Clin Invest*. 2012;122(2):722-32.
- 7) Dysregulation of melanocyte function by Th17-related cytokines: significance of Th17 cell infiltration in autoimmune vitiligo vulgaris. Kotobuki Y, Tanemura A, Yang L, Itoi S, Wataya-Kaneda M, Murota H, Fujimoto M, Serada S, Naka T, **Katayama I**. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012;25(2):219-30.
- 8) A novel application of topical rapamycin formulation, an inhibitor of mTOR, for patients with hypomelanotic macules in tuberous sclerosis complex. Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Nakamura A, Matsumoto S, **Katayama I**. *Arch Dermatol*. 2012;148(1):138-9.
- 9) Characterization of dsRNA-induced pancreatitis model reveals the regulatory role of IFN regulatory factor 2 (Irf2) in trypsinogen5 gene transcription. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(46):18766-71.
- 10) Diminished regulatory T cells in cutaneous lesions of thymoma-associated multi-organ autoimmunity: a newly described paraneoplastic autoimmune disorder with fatal clinical course. Hanafusa T, Azukizawa H, Kitaba S, Murota H, Umegaki N, Terao M, Sano S, Nakagiri T, Okumura M, **Katayama I**. *Clin Exp Immunol*. 2011;166(2):164-70.
- (日本語論文)
- 1) 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 30 (1)：1-7,2011
- 2) 片山一朗：アトピー性皮膚炎の病因．日本医師会雑誌, 140 (5)：978-982,2011
- 3) 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, 140 (5)：945-958,2011
- 4) 片山一朗：アレルギー性皮膚炎と診療ガイドライン．アレルギー, 40：2011
- 5) 片山一朗：中毒疹・紅斑の考え方と治療の進め方．日本臨床皮膚科医会雑誌, 28(5)：2011
- 6) 片山一朗：中毒疹・紅斑の考え方と治療の進め方．Asahi Medical 40(11):2011
- 7) 片山一朗：序～「アトピー性皮膚炎の病態と治療 アップデート」特集にあたって.アレルギー免疫, 18 (10)：9.2011
- 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, 18 (10)：10-20.2011
- 9) 片山一朗：神経原性炎症の増幅のメカニズムとアトピー性皮膚炎, アレルギーと神経ペプチド, 日本医学館, 7,12,2011
- 10) 片山一朗：皮膚バリア機能とアレルギー.アレルギーと神経ペプチド.日本医学館, 7,28-31,2011
- 11) 片山一朗：皮膚科からみた総合アレルギー医.アレルギー免疫, 医薬ジャーナル社, 18 (7) 34-41.2011
- 2.学会発表
- 1) 片山一朗、生体の恒常性とアレルギー．第24回アレルギー学会春季臨床大会、2012, 5
- 2) 北場俊、室田浩之、高橋 彩、松井佐起、片山一朗．乳児期早期のスキンケアによるアトピー性皮膚炎発症予防効果の検討．第24回アレルギー学会春季臨床大会、2012, 5
- 3) 楊 伶俐、室田浩之、仲 哲治、片山一朗 リモデリングの新たな視点 アレルギー疾患と組織リモデリング ペリオスチンの新たな役割 第2

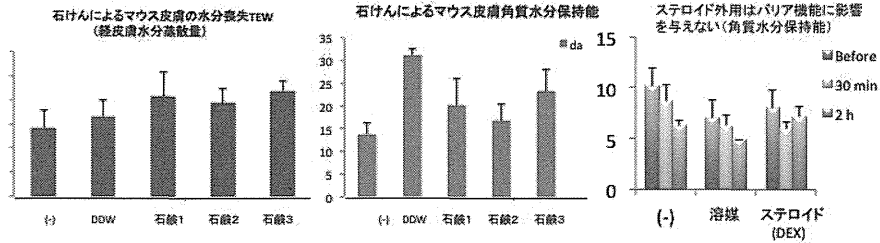


図1:石けんの使用皮膚のバリアを障害する。シャワーや入浴後のスキンケアが重要である

表1: 新生児スキンケア介入、3歳時の追跡調査結果

番号	性別	体重(g)	栄養	FA発症	診断科	方法	内容	3歳時点	保湿剤使用継続
1	male	3198	BM						+
2	female	2614	BM:PF=1:1	9ヶ月	アレルギー科	IgE	卵、乳、小麦、大豆、ピーナツ	消退	+
3	female	2986	BM						+
4	female	2240	BM						+
5	介入群	male 2882	BM:PF=1:1	6ヶ月	小児科	IgE	卵、小麦、バナナ	小麦除去中	+
6	介入群	female 2216	BM+PF						+
7	介入群	male 3330	BM	8ヶ月	小児科	IgE	小麦、卵、乳	3歳で消除解除	+
8	female	3250	BM						+
9	male	2510	BM						+
10	male	2566	BM						+
11	female	2638	BM:PF=9:1						+
12	female	2486	BM	7ヶ月	小児科アレルギー科	IgE	小麦、乳、卵、乳	小麦、卵、乳除去中	-
13	female	3174	BM						-
14	female	3258	BM	6ヶ月	小児科アレルギー科	IgE負荷テスト	卵、小麦、乳、大豆、ピーナツ、エビ、バナナ	エビ、バナナ除去中	+
15	非介入群	male 2494	BM:PF(MA-1)=1:1						-
16	非介入群	female 2754	BM	1ヶ月	小児科	簡易血液検査	卵、乳、小麦、大豆、ピーナツ、エビ	鶏卵、乳製品除去中	+
17	female	3124	BM						-
18	female	3416	BM						-
19	male	2916	BM						-
20	female	2406	PF						-
21	male	3244	BM:PF=1:1	2歳時	皮膚科	IgE	ピーナツ	ピーナツ除去中	+

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業
【免疫・アレルギー疾患等予防・治療研究事業】）
分担研究報告書

微量資料によるアレルゲン特異的 IgE 抗体価測定方法の開発

研究分担者 木戸 博（徳島大学疾患酵素学研究センター応用酵素疾患代謝研究部門教授）
研究協力者 亀村 典生（徳島大学疾患酵素学研究センター応用酵素疾患代謝研究部門助教）
多田 仁美（徳島大学疾患酵素学研究センター応用酵素疾患代謝研究部門研究員）

研究要旨

従来、血液の抗原特異的 IgE 測定に使用されてきた ImmunoCAP は、1 項目の測定に必要とする検体量が多く患者の採血負担の大きいこと、測定感度が低く臍帯血の抗原特異的 IgE の検出ができないこと、測定域が狭いこと等が問題となっていた。これらの問題を解決するために平成 22 年度に続いて、アレルゲンを高濃度にマイクロアレイ上に固定化できる Diamond-Like Carbon (DLC) アレルゲン chip を使用することで検討した。その結果、数マイクロリッターの微量血清で 30 アレルゲンに対する IgE 抗体価を一度に測定でき、ImmunoCAP に比べて約 7-10 倍の高感度化が達成され、従来測定困難とされていた臍帯血のアレルゲン特異的 IgE 抗体価が測定可能となった。また、幅広い測定域で定量性が確保されることから、従来測定限界を超える検体を希釈再検していた問題が解消できた。

A. 研究目的

生後 1 ヶ月時の乳児湿疹がアレルギー疾患の発症に先行するとのエビデンスから、予防的なアトピー性皮膚炎の治療に関する研究が展開されている。アレルギーは抗原異物に対する生体の過剰な抗体反応の結果であることから、アレルギーの発症と治癒に関連する血液中のアレルゲン特異的 IgE, IgA, IgG, IgG4 レベルのモニターが重要である。特に臍帯血を含めて、乳幼児の抗体測定の場合、現行法の ImmuniCAP、MSAT33 の測定方法は、①測定に必要とする血液量が多く、乳幼児に負担となること、②測定域が狭く低濃度（感度不足）と高濃度の測定が困難である等の問題点が挙げられる。本年度の研究では、臍帯血や乳幼児の血液を対象に、上記の諸問題点を克服した低侵襲性・高感度アレルゲン特異的 IgE, IgA, IgG, IgG4 の測定方法を確立しその有用性を検証する。

B. 研究方法

これまでに報告されている蛋白 chip の中で、最も高密度に抗原を固定化して高感度化と幅広い定量域を実現した Diamond-Like Carbon (DLC)-chip に、約 30 種類のアレルゲンを搭載した DLC アレルゲン chip を開発して、本プロジェクトで用いた。この方法の採用により、IgE 測定で UniCAP に比べ測定感度をアレルゲンの種類による違いはあるものの、約 7-10 倍に上げることができた。これによりランセット等で耳朶や踵から採取した 20-100 μ L の微量血液で、抗原特異的 IgE, IgA, IgG, IgG4 のすべての定量測定と、アレルゲン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）

本研究は、徳島大学医学部倫理委員会の承認を得た上で、対象者には研究内容を説明し、同意を得

た上で実施した。

C. 研究結果

これまで多用されてきた ImmunoCAP は、1 アレルゲンの測定に必要とする血清量が 50 マイクロリッターと多く、新生児や乳幼児の検査では過度な負担となる。また乳幼児のアトピーや食物アレルギーの予防のために、臍帯血のアレルゲン特異的 IgE 抗体価を調査する必要があると考えているが、ImmunoCAP の測定限界 0.35 Ua では臍帯血の抗原特異的 IgE の検出ができない。さらに測定限界上限の 100 Ua 以上(多くは 70 Ua 以上) の検体を、希釈測定しても測定値に整合性が出ない検体が多発することから、高濃度領域での定量性に信頼性が持てないこと等、測定域の狭さが問題となっている。IgE 測定以外でも、アレルギーの治癒と共に徐々に増加する IgG4、IgA の定量が、検出感度不足で早期に検出できないこと等の問題挙げられる。

これらの各問題を、Diamond-Like Carbon (DLC) アレルゲン chip を使用して検証した。その結果、今回問題点として挙げられた全ての問題が、解決できる可能性が示された。DLC チップは、ガラス表面を DLC 処理し、2.5 Å 間隔にカルボキシル基を配置することで高密度に蛋白質を固定化できるデバイスである。高密度にアレルゲンを固定化することで、微量検体、高感度測定、幅広い測定領域、多項目の同時測定、等が実現された。

高感度測定が可能になったことにより、従来 ImmunoCAP では測定できなかった臍帯血の抗原特異的 IgE の測定が可能となり、出生時のアレルギー準備状態が正確に把握され、アレルギー、アトピーへの進展を予防するための方法が、具体的なデータを基に考えることが可能となった。

また搭載している 30 アレルゲンに対する反応性を一度に見るアレルゲンプロファイルのパターンが得られ、アレルギー疾患の詳細なモニターが可能となった。DLC アレルゲン chip は、上記の血液検体以外に、様々な体液、例えば唾液、涙液、腸管分泌液等

でも抗原特異的 IgA の測定が可能であることが示された。

D. 考察

従来感度不足のために ImmunoCAP では測定できなかった臍帯血の IgE や、アレルギーの治癒と共に増加する IgG4、IgA の早期検出において、DLC アレルゲン chip を使用した測定が最適の検出法と考察した。さらに詳細なアレルゲンパターンプロファイリングが可能となった。

E. 結論

DLC アレルゲン chip は、微量の血液で、臍帯血を含む血液中の抗原特異的 IgE が高感度でしかも幅広い測定域で可能なことが証明され、アレルギーの発症と治癒過程のモニターに最適であると推定された。IgE 以外にも IgA、IgG、IgG4 の高感度定量が可能で、血液以外の様々な体液、例えば唾液、涙液、腸管分泌液等でも測定が可能であることが示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* 130(1): 113-121. 2012.
2. 鈴木宏一、亀村典生、多田仁美、窪田賢司、澤淵貴子、木戸博、低侵襲性高感度マルチ抗原アレルギー診断チップの開発、アレルギーの臨床 32(430):553-557, 2012
3. 木戸博、亀村典生、多田仁美、日吉峰麗、唾液を用いたアレルギー診断の新技术と今後の展望、*BIO INDUSTRY* 29(10):42-47, 2012.
4. Morita H, Nomura I, Orihara K, Yoshida K, Akasawa A, Tachimoto H, Ohtsuka Y, Namai Y, Futamura M,

Shoda T, Matsuda A, Kamemura N, Kido H, Takahashi T, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy are predominantly skewed to T(H)2. J Allergy Clin Immunol 2013, in press.

5. 木戸博、多田仁美、亀村典生、窪田賢司、鈴木宏一、Diamond-Like Carbon を用いた新規高感度アレルギーマイクロアレイの多項目抗原特異的 IgE 測定、20(1): 56-62, 2013.

2. 学会発表

1. 亀村典生、多田仁美、河野陽一、下条直樹、森田慶紀、鈴木宏一、窪田賢司、中瀬博、木戸博、食物抗原、吸入抗原の胎内感作の調査研究:高感度 DLC チップによる IgE, IgA, IgG4, IgG 動態、第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会、平成 24 年 5 月 12, 13 日 (大阪国際会議場)

2. 亀村典生、多田仁美、下条直樹、森田慶紀、河野陽一、鈴木宏一、窪田賢司、木戸博、母体から胎児へのアレルギー輸送経路の解明、第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会、平成 24 年 11 月 29, 30 日 (大阪国際会議場)
3. 窪田賢司、亀村典生、森田英明、松本健治、大矢幸弘、多田仁美、鈴木宏一、木戸博、高感度 DLC アレルギーチップを用いた便中の抗原特異的 sIgA 測定法の検討、第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会、平成 24 年 11 月 29, 30 日 (大阪国際会議場)

A. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表
平成 24 年度(2012)

<雑誌>

研究代表者：斎藤博久、分担研究者：松本健治、大矢幸弘

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kojima R, Matsuda A, Nomura I, Matsubara O, Nonoyama S, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K	Salivary cortisol response to stress in young children with atopic dermatitis	Pediatr Dermatol	30(1)	17-22	2013
Kojima R, Fujiwara T, Matsuda A, Narita M, Matsubara O, Nonoyama S, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K	Factors associated with steroid phobia in caregivers of children with atopic dermatitis	Pediatr Dermatol	30(1)	29-35	2013
Fujishima H, Satake Y, Okada N, Kawashima S, Matsumoto K, Saito H	Effects of diesel exhaust particles on primary cultured healthy human conjunctival epithelium	Ann Allergy Asthma Immunol	110(1)	39-43	2013
Suzukawa M, Morita H, Nambu A, Arae K, Shimura E, Shibui A, Yamaguchi S, Suzukawa K, Nakanishi W, Oboki K, Kajiwara N, Ohno T, Ishii A, Korner H, Cua DJ, Suto H, Yoshimoto T, Iwakura Y, Yamasoba T, Ohta K, Sudo K, Saito H, Okumura K, Broide DH, Matsumoto K, Nakae S	Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F, is crucial for murine asthma	J Immunol	189(7)	3641-3652	2012
Okayama Y, Kashiwakura J, Sasaki-Sakamoto T, Matsumoto K, Hashimoto N, Ohmori K, Kawakami T, Saito H, Ra C	Omalizumab inhibits acceleration of FcepsilonRI-mediated responsiveness of immature human mast cells by immunoglobulin E	Ann Allergy Asthma Immunol	108(3)	188-194 e182	2012
Nomura I, Morita H, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K	Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies: distinct differences in clinical	Curr Allergy Asthma Rep	12(4)	297-303	2012

	phenotype between Western countries and Japan				
Morita H, Nomura I, Orihara K, Yoshida K, Akasawa A, Tachimoto H, Ohtsuka Y, Namai Y, Futamura M, Shoda T, Matsuda A, Kamemura N, Kido H, Takahashi T, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K	Antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy are predominantly skewed to T(H)2	J Allergy Clin Immunol	131(2)	590-592	2013
Morita H, Arae K, Ohno T, Kajiwara 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	61(2)	265-273	2012
Matsuda A, Morita H, Unno H, Saito H, Matsumoto K, Hirao Y, Munechika K, Abe J	Anti-inflammatory effects of high-dose IgG on TNF-alpha-activated human coronary artery endothelial cells	Eur J Immunol	42(8)	2121-2131	2012
Kashiwakura JC, 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	Histamine-releasing factor has a proinflammatory role in mouse models of asthma and allergy	J Clin Invest	122(1)	218-228	2012
Fujishima H, Okada N, Dogru M, Baba F, Tomita M, Abe J, Matsumoto K, Saito H	The role of Staphylococcal enterotoxin in atopic keratoconjunctivitis and corneal ulceration	Allergy	67(6)	799-803	2012
Fujiwara T, Kubzansky LD, Matsumoto K, Kawachi I	The association between oxytocin and social capital.	PLoS One	7	e52018	2012

分担研究者：片山一朗

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
-------	---------	------	----	-----	-----

Kijima A, et al.	Abnormal axon reflex-mediated sweating correlates with high state of anxiety in atopic dermatitis.	Allergol Int.	61	469-473	2012
Murota H et al.	Artemin causes hypersensitivity to warm sensation, mimicking warmth-provoked pruritus in atopic dermatitis.	J Allergy Clin Immunol	130	671-682	2012
Terao M et al.	11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase-1 is a novel regulator of skin homeostasis and a candidate target for promoting tissue repair.	PLoS One	6	E25039	2011
片山一朗	生体の恒常性とアレルギー	アレルギー	61	1643-1648	2012

分担研究者：木戸博

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	Anal Chim Acta	706(2)	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	130(1)	113-121	2012
鈴木宏一、亀村典生、多田仁美、窪田賢司、澤淵貴子、木戸博	低侵襲性高感度マルチ抗原アレルギー診断チップの開発	アレルギーの臨床	32(430)	553-557	2012
木戸博、亀村典生、多田仁美、日吉峰麗	唾液を用いたアレルギー診断の新技术と今後の展望	BIO INDUSTRY	29(10)	42-47	2012
Morita H, Nomura I, Orihara K, Yoshida K, Akasawa A, Tachimoto H, Ohtsuka Y,	Antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy are	J Allergy Clin Immunol	131(2)	590-592	2013

Namai Y, Futamura M, Shoda T, Matsuda A, Kamemura N, Kido H, Takahashi T, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K.	predominantly skewed to T(H)2.				
木戸博、多田仁美、亀村典 生、窪田賢司、鈴木宏一	Diamond-Like Carbon を用いた 新規高感度アレルゲンマイク ロアレイの多項目抗原特異的 IgE 測定	アレルギー・免 疫	20(1)	56-62	2013

V. 研究成果の刊行物・別刷
(主なもの)

11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase-1 Is a Novel Regulator of Skin Homeostasis and a Candidate Target for Promoting Tissue Repair

Mika Terao^{1*}, Hiroyuki Murota¹, Akihiro Kimura¹, Arisa Kato¹, Akiko Ishikawa¹, Ken Igawa¹, Eiji Miyoshi², Ichiro Katayama¹

1 Department of Dermatology, Graduate School of Medicine, Osaka University, Suita, Osaka, Japan, **2** Department of Molecular Biochemistry and Clinical Investigation, Osaka University, Suita, Osaka, Japan

Abstract

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11 β -HSD1) catalyzes the interconversion of cortisone and cortisol within the endoplasmic reticulum. 11 β -HSD1 is expressed widely, most notably in the liver, adipose tissue, and central nervous system. It has been studied intensely over the last 10 years because its activity is reported to be increased in visceral adipose tissue of obese people. Epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts also express 11 β -HSD1. However, the function of the enzymatic activity 11 β -HSD1 in skin is not known. We found that 11 β -HSD1 was expressed in human and murine epidermis, and this expression increased as keratinocytes differentiate. The expression of 11 β -HSD1 by normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) was increased by starvation or calcium-induced differentiation *in vitro*. A selective inhibitor of 11 β -HSD1 promoted proliferation of NHEKs and normal human dermal fibroblasts, but did not alter the differentiation of NHEKs. Topical application of selective 11 β -HSD1 inhibitor to the dorsal skin of hairless mice caused proliferation of keratinocytes. Taken together, these data suggest that 11 β -HSD1 is involved in tissue remodeling of the skin. This hypothesis was further supported by the observation that topical application of the selective 11 β -HSD1 inhibitor enhanced cutaneous wound healing in C57BL/6 mice and *ob/ob* mice. Collectively, we conclude that 11 β -HSD1 is negatively regulating the proliferation of keratinocytes and fibroblasts, and cutaneous wound healing. Hence, 11 β -HSD1 might maintain skin homeostasis by regulating the proliferation of keratinocytes and dermal fibroblasts. Thus 11 β -HSD1 is a novel candidate target for the design of skin disease treatments.

Citation: Terao M, Murota H, Kimura A, Kato A, Ishikawa A, et al. (2011) 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase-1 Is a Novel Regulator of Skin Homeostasis and a Candidate Target for Promoting Tissue Repair. PLoS ONE 6(9): e25039. doi:10.1371/journal.pone.0025039

Editor: Marian Ludgate, Cardiff University, United Kingdom

Received: March 29, 2011; **Accepted:** August 26, 2011; **Published:** September 20, 2011

Copyright: © 2011 Terao et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research(C) No. 21591464 from the Japan Society for the Promotion of Science. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. No additional external funding received for this study.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mterao@derma.med.osaka-u.ac.jp

‡ Current address: Department of Dermatology, Graduate School of Medicine, Osaka University, Suita, Osaka, Japan

Introduction

The endogenous steroid hormone glucocorticoid (GC) is released in response to various stressors such as physical injury and psychological stress. It regulates biological processes including growth, development, metabolism, and behavior [1,2]. In mammalian cells, it induces diverse responses including differentiation, proliferation, and apoptosis [3].

GC is the most effective anti-inflammatory drug for treating acute and chronic inflammatory diseases, and has been used for more than half a century. The major anti-inflammatory mechanism of GC is the repression of inflammatory gene transcription factors such as nuclear factor κ B and activator protein-1 [1,4]. Topical application of GC ointment is one of the most common treatments for inflammatory dermatitis, and its mechanism is thought to be its anti-inflammatory effects on keratinocytes and skin infiltrating inflammatory cells. In addition to its strong anti-inflammatory effects, GC also influences keratinocyte biology in other ways. Microarray analyses have revealed that dexamethasone, a synthetic

glucocorticoid, regulates genes associated with differentiation, metabolism, and inflammation in keratinocytes [5].

Cortisol is the endogenous GC in humans. The enzyme 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) is known to catalyze the interconversion between hormonally active cortisol and inactive cortisone in cells [6,7,8]. The two iso-enzymes of 11 β -HSD both reside in the endoplasmic reticulum membrane [9]. The 11 β -HSD1 isoform, which catalyzes the conversion of cortisone to cortisol, is widely expressed at the highest levels in the liver, lung, adipose tissue, ovary, and central nervous system. The 11 β -HSD2 isoform, which catalyzes the conversion of cortisol to cortisone, is highly expressed in the distal nephron, colon, sweat glands, and placenta. Because 11 β -HSD1 activity is reported to be elevated in the visceral adipose tissue of obese people, it has been studied intensely over the last 10 years [10,11,12]. Targeted overexpression of 11 β -HSD1 in adipose tissue in mice has been found to model metabolic syndrome [13,14].

Recently, 11 β -HSD1 was found to be expressed in epidermal keratinocytes, dermal fibroblasts, and outer hair follicle root sheath