

. 構成員名簿

平成22年度 免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業
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

構成員名簿

	氏名	職名	所属	所属施設の所在地
代表	斎藤 博久	副研究所長	国立成育医療研究センター	〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1
分担	大矢 幸弘	医長	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	〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1
分担	新関 寛徳	医長	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	〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1
分担	坂本なほ子	室長	国立成育医療研究センター 研 究所 成育疫学研究室 室長	〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1
分担	左合 治彦	部長	国立成育医療研究センター 周 産期診療部 部長	〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1
分担	松本 健治	室長	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 室長	〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1
分担	片山 一郎	教授	大阪大学大学院医学系研究科情 報統合医学皮膚科学	〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2
分担	木戸 博	教授	徳島大学疾患酵素学研究センタ ー	〒770-8504 徳島県徳島市蔵本町3-18-15
分担	竹森 利忠	グループデ ィレクター	理化学研究所 免疫・アレルギー ー科学 総合研究センター	〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22
分担	菅井 基行	教授	広島大学医歯薬保健学研究院 細菌学	〒734-8551 広島市南区霞1丁目2番3号

. 総括研究報告

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）

総括研究報告書

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

研究代表者：齋藤 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

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。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した。平成24年中に79例のリクルートができ予定参加者数である70例を達成した。中間解析53例の結果において、予想したようにproactive群のほうがreactive群よりも発症が少なかったが、70例では検出力が不足することが明らかとなった。その理由として、倫理的配慮から対照群を無治療観察群ではなく必要時塗布を許可したreactive群としたため当初の予測よりも対照群の発症率が低くなったこと、reactive群のドロップアウト率がやや高いこと、試験プロトコル違反（参加者が自主的にproactive療法を開始する）などが挙げられる。今後、中間解析の結果に基づき、本研究の仮説の検証に必要な症例数を継続してリクルートし、プロトコル遵守率を高めて、本研究を完了し我が国初のエビデンスを発信する必要がある。分担課題において多くの成果が得られたが、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の開発が特筆される。この方法を用い、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、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。

研究分担者

大矢幸弘：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：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：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：国立成育医療研究センター 周産期診療部 部長

松本健治：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 室長

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

木戸博：徳島大学疾患酵素学研究センター教授

菅井基行：広島大学医歯薬保健学研究院細菌学 教授

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：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：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：国立成育医療研究センター 周産期診療

部 医師

森田英明：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

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

A. 研究目的

国民の半数近くが罹患してい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、次世代の国民の健康にとっても国家財政にとっても重要な課題である。しかし、現在までにリスクを大幅に下げような方法は証明されていない。我々は以前に、新生児期の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が低下することなどを見いだしている。また、最近になって皮膚バリア機能の遺伝的な機能低下（フィラグリン遺伝子変異）は、アトピー性皮膚炎のみならず、食物アレルギーや喘息、花粉症のリスクも高めることが報告され、特にアレルギーマーチの進展において経皮感作の重要性が注目されている。そこで本研究事業において、新生児期からのスキンケアがその後のアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患や種々のアレルギー特異的IgE抗体の獲得を予防できるかどうか検討した。さらに、この介入試験を裏付ける基礎検討あるいはパイロット研究などについて分担研究者別に実施した。

B. 研究方法

【介入試験】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2歳児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を無作為ランダム化介入試験により検討した。具体的には無作為化オープン並行群間試験により、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（P群）と必要時(reactive)に実施する群(R群)において、乳児湿疹、アトピー性皮膚炎の発症率を比較した。さらに、経表皮水分蒸散量（TEWL;transepidermal water loss）、角質水分量、皮膚黄色ブドウ球菌を測定した。さらに、2歳時において特異的IgE抗体などを測定する計画である。また、フィラグリン遺伝子変異について解析し、層別解析を実施する予定である。P群とR群の指導については、新生児に対するスキンケア指導の内容が各施設で異なることから、年間1500例以上の出産がある国立成育医療研究センターでのみ実施した。

大阪大学においては、平成20年度より、同様なスキンケアのアトピー性皮膚炎発症予防に対する効果について検討を開始していたので、国立成育医療研究センターでの介入試験のパイロット研究として、追跡調査を行った。

【高感度IgE抗体測定法開発】徳島大学において高密度抗原蛋白質の固定化が可能なdiamond-like carbon (DLC)-chipに抗原蛋白質を搭載した測定システムを作成した。このシステムをもちい乳幼児や臍帯血からの微量検体を用いた網羅的な抗原特異的IgE, IgA, IgG4の高感度測定系を確立した。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。

【皮膚黄色ブドウ球菌解析】アトピー性皮膚炎患者では高率に黄色ブドウ球菌が皮膚に常在していることが知られている。そこで、黄色ブドウ球菌とアトピー性皮膚炎発症の関連を調べるため、介入試験参加新生児の両頬部より採取したサンプル

ルを培養し、生えたコロニーをPCR法やmultiplex-PCR法にて解析し、さらにパルスフィールドゲル電気泳動後のバンドパターンによる系統解析により遺伝子型を同定した。

【皮膚バリアに関する動物実験】経皮感作のメカニズムを調べるため、ヘアレスマウスや各種遺伝子欠損マウスに希釈石鹼、1%SDS液、V8 protease、アレルゲンなどを塗布することにより、皮膚のバリア機能やアレルゲン感作能、皮膚感作の特徴等について検討した。

(倫理面への配慮)

スキンケアについての介入試験については国立成育医療研究センター倫理審査委員会の審査を受け、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

(UMIN000004544)した。なお、非介入群と介入群による比較検討を予定していたが、委員会の指摘を受け、事前に予防的スキンケアを実施するP群と湿疹出現時のみに実施するR群の比較において検討することになった。

C. 研究結果

【介入試験】研究計画立案当初、P群20%以下、R群47%以上のアトピー性皮膚炎発症を仮定して各群35名の登録を開始した。東日本大震災の影響を受け、当初の予定よりも登録が遅れたが、ほぼ計画通りの被験者の同意を得ることができた。しかし、研究計画書に従い中間解析をした結果、2012年11月の時点でP群24%、R群43%の発症率であり、各群108例が必要と判明した(現在、89名より参加同意を得た)。計画を達成するためには1,2年間研究期間を延長する必要が生じた。なお、これまでの登録例で試験試料によると考えられる副作用は1例も起きていない。

その他、現状では有意差は検出されていないものの、経表皮水分蒸散量(TEWL)が予測因子となる可能性が示唆された。卵白など多種の特異的IgEやIgG4などに関しても、検討を進めている。

さらに57例中6例(10.5%)において日本人で同定されているフィラゲリン遺伝子変異8種が判明した。

大阪大学におけるパイロット研究において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。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。

【高感度IgE抗体測定法開発】DLC アレルゲンchipを使用することで、微量検体による患者負担の軽減、アレルゲン特異的IgE、IgA、IgG、IgG4測定の幅広い測定域を確保して、高感度化が実現された。特に感度不足のために標準的な測定方法であるImmunoCAPでは測定できなかった臍帯血のIgEや、アレルギー疾患の治療経過により変動するIgG4、IgAの検出も可能であった。介入試験において生後12週よりも32週の方が卵白特異的IgE抗体が高値を示す傾向が認められた。

【皮膚黄色ブドウ球菌解析】黄色ブドウ球菌が検出された被験者は、2012年12月時点で78人中31人(約40%)であった。このうち、出生時から検出されたのは4人(約13%)であった。各被験者の各週齢の株は、病原因子関連遺伝子の保有パターン及びPFGEバンドパターンの結果から、ほぼ同一ゲノタイプと考えられた。

【皮膚バリアに関する動物実験】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種類の石鹼すべてにおいて、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鹼において低下がみられた。皮膚感作によりアレルゲン

誘導による喘息様病態を誘導することが確認された。このときに、通常の腹腔感作と異なり、IL-25やIL-33の存在が重要であることをあきらかにした。

D. 考察

【介入試験】予防的に保湿剤を使用したP群ではアトピー性皮膚炎、乳児湿疹の発症が少ない傾向が得られた（ $P=0.19$ ）。しかし中間解析の結果、当初の予想数と比較し、アトピー性皮膚炎発症率には著しい違いはないものの、当初予定していた2倍以上の被験者数が必要であることが判明した。

【高感度IgE抗体測定法開発】【介入試験】における調査においても有用性が示唆されるデータを得ることができた。

【皮膚黄色ブドウ球菌解析】介入試験において、比較的高率に黄色ブドウ球菌が検出された。被験者皮膚に黄色ブドウ球菌が検出された場合、同一ゲノタイプの株が居続ける事が示唆された。

【皮膚バリアに関する動物実験】石鹸の使用は皮膚バリア機能を障害し、また界面活性剤成分のSDSが炎症を促進させることより、適切な使用、洗浄法の指導が重要と考えられた。皮膚感作における免疫学的な特徴をあきらかにした。

E. 結論

当初予定の被験者からの同意は得られたが、倫理的な配慮により非介入群ではなくR群を対照とし、さらにR群においてプロトコールが守られず脱落する例が多いためか、中間解析において当初計画の2倍以上の症例数が必要であることが判明した。

アレルギー特異的免疫療法により、花粉症などの症状改善が期待できることから、食物や花粉、ダニなどのアレルギーを乳児期から投与し、免疫寛容を誘導することでアレルギー疾患発症を予防する試みが行われているが、未だ有効であるとの報告はなく、ときに感作発症を誘発する危険性も

払拭されていない。

アレルギーは腸管などの健全な組織から侵入するとアレルギー反応を抑制する細胞が増殖するのに対し、炎症をおこした皮膚などの病的な組織から侵入するとアレルギー反応を増強する細胞が増殖すると推測されている。本研究事業における介入試験では、アレルギー反応を抑制する細胞の増殖が期待できる免疫療法とは逆に、スキンケアによりアレルギー反応を増強する細胞の増殖を阻止し、その間に健康な組織からの自然なアレルギー侵入によるアレルギー反応を抑制する細胞の増殖を期待している。

幸いなことに、本研究事業では予想通り、副作用は全く生じておらず、この点については予防的免疫療法より遙かに期待できる。

慢性の経過を示すことが診断基準の一つであるアトピー性皮膚炎の発症判定は非常に困難であり、各研究間で統一した基準を設けることが必要である。経過の短い乳児期の湿疹の診断に関しては英国UK Working Partyの基準が標準となっている。そこで、われわれはこの基準を作成した英国のグループと協議し、同等の診断基準で、同様な方法により介入試験をスタートさせている。このことにより、エビデンスレベルの高い成果が期待できる。

倫理的な配慮により、当初よりも結果が遅れているが、傾向としては仮説通りの成果が得られている。もし、この仮説が証明され新生児期からのスキンケアが有効であることが証明された場合、次世代の国民のアレルギー疾患を激減できることが期待される。今後も継続すべき研究であると思われる。

本研究事業の主目的はランダム化比較による臨床試験介入試験である。しかしながら、アレルギー疾患の予防という関心の高い課題であるため、また、そのような情報は容易に得ることができるため、R群（仮説としては発症例が多いと予想される）において予想よりも多くの脱落例があった。

このような経験を踏まえて、徐々にプロトコルを改善し、3年目で、ようやく安定したデータが得られるようになったと思われる。本研究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、また将来的な医療費の削減にも繋がる可能性もあり、何らかの方法により継続していきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kamemura N, Tada H, Shimojo N, Morita Y, Kohno Y, Ichioka T, Suzuki K, Kubota K, Hiyoshi M, Kido H. Intrauterine sensitization of allergen-specific IgE analyzed by a highly sensitive new allergen microarray. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Jul;130(1):113-21.

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*. 2012 Jun;61(2):265-73.

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, Körner 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*. 2012 Oct 1;189(7):3641-52.

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 Th2. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Feb;131(2):590-592

2. 学会発表

大矢幸弘. 教育セミナー「アレルギー発症予防へのチャレンジ～スキンケアを日常診療において役立つ～」日本小児科学会総会 2012年4月22日

Ohya Y, Narita M, Futamura M, Sakamoto N, Saito H. Immediate type food allergy at twelve months old does not associated with timing of introduction of weaning diet but associated with episodes of eczema and gastroenteritis. 67th Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, San Francisco, USA. Mar 18-22, 2011.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

特許登録 特許第4660756号 木戸博：ダイヤモンドチップへの蛋白質/ペプチドの固定化方法 2011

特許第4568841号 木戸博（1番/3名）アレルギー疾患の判定方法及びアレルギー疾患の判定キット 2010

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）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

・ 分担研究報告

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：齋藤 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

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

成田 雅美 （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

森田久美子 （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 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

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、実証された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ている可能性が高く、湿疹の悪化がアレルギー疾患の引き金になりうることが示唆されている。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した。平成24年中に79例のリクルートができ予定参加者数である70例を達成した。中間解析53例の結果において、予想したようにproactive群のほうがreactive群よりも発症が少なかったが、70例では検出力が不足することが明らかとなった。その理由として、倫理的配慮から対照群を無治療観察群ではなく必要時塗布を許可したreactive群としたため当初の予測よりも対照群の発症率が低くなったこと、reactive群のドロップアウト率がやや高いこと、試験プロトコール違反（参加者が自主的にproactive療法を開始する）などが挙げられる。今後、中間解析の結果に基づき、本研究の仮説の検証に必要な症例数を継続してリクルートし、プロトコール遵守率を高めて、本研究を完了し我が国初のエビデンスを発信する必要がある。

A．研究目的

20世紀後半の経済成長や生活環境の激変に伴い、我が国のアトピー性皮膚炎の患者数は急増した。また、日常生活に支障を来す重症患者も増加し、医療不信とステロイド忌避の現象が相まって社会問題化した。日本皮膚科学会および日本アレルギー学会がガイドラインを作成し混乱に終止符を打つ努力を行った結果、少しずつ混乱が収束しつつあるが、アトピー性皮膚炎の発症を予防する方法はまだ実証された水準のものはない。

「日本アレルギー学会アトピー性皮膚炎診療ガイドライン2012」では、アトピー性皮膚炎を発症した患者に対しては、治療の基本方針として生理学的機能異常に対する保湿剤外用などのスキンケアが推奨されているが、未発症の乳幼児に対する発症予防効果は謳われていない。

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、これまで国外で行われた各種抗原を除去する方法はいずれも発症予防に失敗しており、現時点では、ランダム化比較試験で実証された予防法は存在しない。ある種の乳酸菌を妊娠中と授乳中に母親に児のアトピー性皮膚炎の発症率を低減したとの報告はあるが、北欧の一国に限られ豪州での追試はネガティブであり、まだ結論が出ていない。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2歳児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有無をア

ウトカム評価とし、皮膚バリア機能補正のために保湿剤を使用したスキンケアのアレルギー疾患予防効果についてランダム化介入試験を実施した。

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してきた。アレルギー特異的IgE抗体の測定は、徳島大学で開発したDLCチップを用いた。

B．方法

研究デザインは無作為化オープン並行群間試験で、生後1週未満の健康な新生児を対象とし、24週間以上、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、フィラゲ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的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: UMIN000004544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。

（倫理面への配慮）

乳児湿疹、アトピー性皮膚炎の発症時、診断時には速やかに加療を開始する。また、試験試料によると思われる有害事象が出現した場合は、即座に試験試料の使用を中止し、治療を行う。本研究は国立成育医療研究センター倫理委員会

の承認を得て実施された。

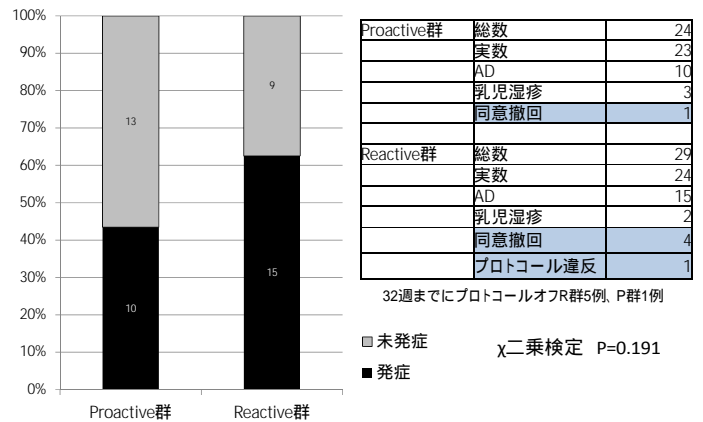
C . 結果

2010年11月より症例登録を開始した。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たこと、新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年末までに、89名より参加同意を得た。すでにその多くは出生し、出産後の母体、児の体調不良などでリクルート基準に達しなかった児を除く79例がランダム化登録を完了し、当初のリクルート予定数を突破した。

研究開始当初より、半数を超えた時点での中間解析を行った上で症例数の調整を行う計画となっていたため、2012/11月末時点で32週までの観察期間を終えた47例と、32週に達する前にすでにアトピー性皮膚炎発症などでプロトコルオフとなった6例の、計53例において、中間解析を行った。

Proactive群で同意撤回1例を除いた23例、Reactive群で同意撤回3例を除いた26例で検討を行った(Reactive群の同意撤回は4例であったが、そのうち1例はアトピー性皮膚炎と食物アレルギーを発症していたことが、偶然当院アレルギー外来を初診したことにより判明し、発症例数に組み入れた。)。アトピー性皮膚炎の発症をアウトカムとした χ^2 乗検定によるp値は0.19であり、今後100~200例程度に参加者が増加すると有意差が検出される可能性が示された(Fig 1)。

Fig.1. 中間解析結果(アトピー性皮膚炎AD発症率)



中間解析時点での結果に基づき、Proactive群の発症率を24%、Reactive群のそれを43%とすると仮説検証に必要なサンプルサイズは各群108例となる。この結果に基づき、参加者のリクルートを継続して行うこととした。なお、これまでの登録例で試験試料によると考えられる副作用は1例も起きていない。

さらに、本研究では、アレルギー疾患の発症予防という観点から、各種の検査を並行して行なっている。

経表皮水分蒸散量 (transepidermal water loss ; TEWL)、角質水分量、皮膚pHはセンサーを用いた非侵襲性の検査であり、新生児期から導入可能である。これらの変化がAD発症予測に貢献する可能性があり、AD発症まで定期検査に組み入れている。中間解析の時点で47例が32週まで達成しており、解析可能なデータのある32例で検討を行った。経過観察中にADを発症した場合はその加療に入り、それ以降の定期検査は施行しないことからAD発症群の例数は経過に従い減少していく。そのため、データとして有用なのは12週程度までと考えられる。現状では有意差は検出されていないが、角質水分量よりTEWLが予測因子となる可能性が示唆された。

また、アレルギー感作と防御因子の検索として、卵白、卵黄、オボムコイド、オボアルブミン、牛乳、カゼイン、ラクトアルブミン、小麦などコンポーネントを含め多種の特異的IgEやIgG4などについても、検討を進めている。新生児を対象とした研究であるため、

採血量は少量が求められるため、蛋白チップを用いた新しい検査方法であるが、従来のCAP-RASTと相関性も高いことが確認されている(Suzuki K, et al. Anal Chim Acta. 2011 ; 14;706(2):321-7. 2011.)。未発症群でも、32週の段階で、特異的IgEが高値になる例も観察され、現状ではその傾向は明らかではないが、IgG4は12週時に高値で、32週では低下する傾向が見られ、興味深い動きが見られた、今後も検討を進めていく (Fig.8-12)。

また、本研究では、先行研究でアトピー性皮膚炎の増悪因子とされる黄色ブドウ球菌や日本人で同定されているフィラグリン遺伝子変異8種 (Hirota T. et al, Nat Genet. 2012 ;7 ; 44(11): 1222-6.) の有無の検索も同時に行なっている。フィラグリンに関して、前半の登録者では全例の臍帯血が採取できなかったため、同意撤回やプロトコル違反を除いた57例の検体採取が可能であったが、そのうち6例(=10.5%)においてフィラグリン遺伝子異常が検出されている。47例目以降は、臍帯血の確保ができなかった場合に関して児の採血を新生児期に追加することでDNAサンプルを抽出する体制を構築し、検体の確保に努めた。従って、47例以降の参加者に関してはほぼ全例でフィラグリン遺伝子変異の検索を行なうことが可能と思われる。

黄色ブドウ球菌の検出に関しては、定期検査毎に頬部よりスワブ擦過にて検体を確保し、単に菌の検出のみならず、黄色ブドウ球菌の菌株の違いについても検索中である。

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)という仮説が提唱され、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フィラグリン遺伝子変異により、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)。上記のような先行研究が示す「乳児湿疹がアレルギー疾患発症に先行すること、およびProactiveなアトピー性皮膚炎治療により血清IgEが低下すること」という結果から類推される「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」という仮説を検証することを本研究は目指しており、中間解析時点では有意差はないものの、ではP群24%、R群43%の発症率が得られており、この比率が変わらなければ、今後参加者が増加することで検証が可能となる。先行研究である大阪大学皮膚科による予防研究に比べ発症率が高いが、途中リクルートを強化した時期の影響で出生季節が秋以降に多かったことなどが影響していると考えられる。

また、TEWL (transepidermal water loss)、角質水分量、皮膚pHなど非侵襲的な皮膚検査が行われており、その中でもTEWLはAD発症の予測

因子として参考にできる可能性が示唆された。新生児期のこのような検査の報告自体極めて少ないうえ、新生児期から6ヶ月以上に渡りこれらの測定をした報告はほとんどなく、これらの結果はAD予防の観点だけでなく基礎的な研究結果として重要なものとなりうると思われる。

また、抗原特異的IgE値を測定することで、乳児の抗原感作状況を調べているが、どの時期から発生するかは、胎内感作、経母乳感作、経皮感作など、その経路に関しての報告は交錯しており、いまだ明らかになっていない。未発症群でも特異的IgEが陽性になっている群もあり、経皮感作ばかりではない可能性はあるが、さらに精査検討する必要がある。

フィラグリン遺伝子変異や皮膚の黄色ブドウ球菌保持の有無などに関しても、これらの情報を組み合わせることで、AD予防に役立つ可能性がある。フィラグリン遺伝子変異に関して10.5%においてフィラグリン遺伝子異常が検出されている。先行研究とほぼ一致した率であり、今後さらに詳細な検討を実施する。

同様の研究が海外、国内でも計画されてきているが、いまだ、少数例の結果のみである

(Lowe AJ, et al. BMC Dermatol. 2012; 4;12:3.)

(Lavender T, et al. BMC Pediatr. 2011; 13;11:35)。

その理由として、リクルートの困難さや同意撤回率の高さなどが指摘されており、新生児を対象とした試験の困難さが伺える。本研究においても、実施の継続には様々な困難に直面しているが、各科、各方面からの協力により、諸外国の研究より遅れることなく研究が進行できているうえ、研究内容は多岐にわたっている。

当初、P群20%以下、R群47%以上のアトピー性皮膚炎発症を仮定して各群35名を登録したが、研究計画書に従い53例にて中間解析をした結果、現時点で、各群108例が必要と判明した。当初対照として設定を想定していた“無治療観察群”を倫理審査委員会の意見を取り入れて修正し、ある程度

の試験試料の塗布を許可した“reactive群”を対照としたことは、検出率が低下した一因と思われる。また、reactive群のドロップアウト率がproactive群に比べるとやや高いこと、試験プロトコルに対するコンプライアンスの問題が挙げられる。reactive群が毎日試験試料を塗布している場合があったり、proactive群の洗浄方法や塗布法に関して問題があれば、その差は小さくなる可能性がある。プロトコル遵守に関して、さらなるチェックアップ体制を構築し、実行開始したところである。

E . 結論

本研究は、保湿剤による皮膚バリア機能補正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介入試験である。検証された有効な発症予防法が存在しないなか、本研究が計画通りに貫徹されれば、アレルギー疾患の発症予防の一翼を担う方法を発見した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。

G . 研究発表

1. 論文発表

Fukuie T, Nomura I, Horimukai K, Manki A, Masuko I, Futamura M, Narita M, Ohzeki T, Matsumoto K, Saito H, Proactive treatment appears to decrease serum immunoglobulin-E levels in patients with severe atopic dermatitis. Ohya Y. Br J Dermatol. 163: 1127-1129, 2010

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. 127: 685-688 e681-688, 2011

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. Antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy are predominantly skewed to TH2. J Allergy Clin Immunol 131: 590-592, 2013.

2. 学会発表

大矢幸弘. 教育セミナー「アレルギー発症予防へのチャレンジ～スキンケアを日常診療において役立てる～」日本小児科学会総会 2012年4月22日

Ohya Y. Recent paradigm shift in the prevention and treatment for atopic disease. Korean Pediatric Society Invited Lecture Oct 19th, 2012. Gangwan-do, Korea.

Ohya Y, Narita M, Futamura M, Sakamoto N, Saito H. Immediate type food allergy at twelve months old does not associated with timing of introduction of weaning diet but associated with episodes of eczema and gastroenteritis. 67th Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, San Francisco, USA. Mar 18-22, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）
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

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。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 Maus 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抗体の産生を増強することが明らかとなった。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、湿疹の惹起を介してい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。

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、特に黄色ブドウ球菌が産生するV8 proteaseが、OVAと同時に皮膚に

曝露させた場合に、OVAに対するIgE抗体産生与える影響を検討した（初年度および2年目）。

最終年度にはV8 proteaseがアレルギー感作を誘導する機序の解明の一環として、V8 proteaseが湿疹や皮膚炎症の惹起をした。

B．方法

1．Balb/cマウスの体幹皮膚を剃毛し、10 mg/ml のOvalbumin（OVA）抗原に種々の濃度のV8 proteaseを添加して72時間貼付し、1週間あける、という操作を3回行った。

2．3回目の経皮曝露後にOVA抗原に対する血清IgE抗体をELISAにて測定し、添加したV8 proteaseが経皮曝露したOVAに対するIgE産生に与える影響について検討した。

3．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

1 . 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OVAに対するIgE産生は増強された。

2 . IgE産生に対するV8 proteaseの影響はBell shapeな容量反応性を示し、50 mg/mlのV8 protease添加時に最もIgE産生が増強された。

3 . 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 . 食物抗原に対する経皮的な感作の成立には、黄色ブドウ球菌由来のproteaseが促進的に作用する可能性が明らかとなった。

2 . 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。この経路の阻害は食物アレルギー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

皮膚からの食物抗原侵入には黄色ブドウ球菌由来のproteaseが促進的に作用する。また、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 T_H2. 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* 131: 590-592, 2013.

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 FcεRI-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.
 17. Eosinophilic gastrointestinal disorders in infants: a Japanese case series. Yamada Y, Nishi A, Ebara Y, Kato M, Yamamoto H, Morita H, Nomura I, Matsumoto K, Hirato J, Hatakeyama SI, Suzuki N, Hayashi Y. *Int Arch Allergy Immunol.* 155 Suppl 1: 40-45, 2011
 18. Paracrine IL-33 stimulation enhances lipopolysaccharide-mediated macrophage activation. 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. *PLoS ONE.* 6: e18404, 2011
 19. IL-33 and airway inflammation. Oboki K, Nakae S, Matsumoto K, Saito H. *Allergy Asthma Immunol Res.* 3: 81-88, 2011
 20. Four distinct subtypes of non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies in neonates and infants, distinguished by their initial symptoms. 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. *J Allergy Clin Immunol.* 127: 685-688 e681-688, 2011
 21. Genome-wide association study identifies HLA-DP as a susceptibility gene for pediatric asthma in Asian populations. 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. *PLoS Genet.* 7: e1002170, 2011
22. Human eosinophils produce and release a novel chemokine, CCL23, in vitro. Matsumoto K, Fukuda S, Hashimoto N, Saito H. *Int Arch Allergy Immunol.* 155 Suppl 1: 34-39, 2011
23. Peripheral blood mononuclear cells from patients with bronchial asthma show impaired innate immune responses to rhinovirus in vitro. Iikura K, Katsunuma T, Saika S, Saito S, Ichinohe S, Ida H, Saito H, Matsumoto K. *Int Arch Allergy Immunol.* 155 Suppl 1: 27-33, 2011
24. Analysis of cell characterization using cell surface markers in the dermis. Hasebe Y, Hasegawa S, Hashimoto N, Toyoda M, Matsumoto K, Umezawa A, Yagami A, Matsunaga K, Mizutani H, Nakata S, Akamatsu H. *J Dermatol Sci.* 62: 98-106, 2011
25. Thymic stromal lymphopoietin gene promoter polymorphisms are associated with susceptibility to bronchial asthma. 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. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 44: 787-793, 2011
26. Effect of Th1/Th2 cytokine pretreatment on RSV-induced gene expression in airway epithelial cells. Yamada Y, Matsumoto K, Hashimoto N, Saikusa M, Homma T, Yoshihara S, Saito H. *Int Arch Allergy Immunol.* 154: 185-194, 2010
27. IL-33 mediates inflammatory responses in human lung tissue cells. Yagami A, Orihara K, Morita H, Futamura K, Hashimoto N, Matsumoto K, Saito H, Matsuda A. *J Immunol.* 185: 5743-5750, 2010
28. Pathogenic role of CXCR7 in rheumatoid arthritis. Watanabe K, Penfold ME, Matsuda A, Ohyanagi N, Kaneko K, Miyabe Y, Matsumoto K, Schall TJ, Miyasaka N, Nanki T. *Arthritis Rheum.* 62: 3211-3220, 2010
29. IQGAP1 and vimentin are key regulator genes in naturally occurring hepatotumorigenesis induced by oxidative stress. Tsubota A, Matsumoto K, Mogushi K, Nariai K, Namiki Y, Hoshina S, Hano H, Tanaka H, Saito H, Tada N. *Carcinogenesis.* 31: 504-511, 2010
30. Defining cell identity by comprehensive gene expression profiling. Toyoda M, Hamatani T, Okada H, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A. *Curr Med Chem.* 17: 3245-3252, 2010
31. Overexpression of LEDGF/DFS70 induces IL-6 via p38 activation in HaCaT cells, similar to that seen in the psoriatic condition. Takeichi T, Sugiura K, Muro Y, Matsumoto K, Ogawa Y, Futamura K, Kaminuma O, Hashimoto N, Shimoyama Y, Saito H, Tomita Y. *J Invest Dermatol.* 130: 2760-2767, 2010
32. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H, Ishii A, Nambu A, Abe T, Kiyonari H, Matsumoto K, Sudo K, Okumura K, Saito H, Nakae S. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 18581-18586, 2010
33. Intradiscal transplantation of synovial mesenchymal stem cells prevents intervertebral disc degeneration through suppression of matrix metalloproteinase-related genes in nucleus pulposus cells in rabbits. Miyamoto T, Muneta T, Tabuchi T, Matsumoto K, Saito H, Tsuji K, Sekiya I. *Arthritis Res Ther.* 12: R206, 2010

34. Analysis of signal transduction pathways involved in anti-CD30 mAb-induced human eosinophil apoptosis. Matsumoto K, Terakawa M, Fukuda S, Saito H. *Int Arch Allergy Immunol.* 152 Suppl 1: 2-8, 2010
35. Cells of extraembryonic mesodermal origin confer human dystrophin in the Mdx model of duchenne muscular dystrophy. Kawamichi Y, Cui CH, Toyoda M, Makino H, Horie A, Takahashi Y, Matsumoto K, Saito H, Ohta H, Saito K, Umezawa A. *J Cell Physiol.* 223: 695-702, 2010
36. β_2 -adrenoceptor agonists enhance cytokine-induced release of thymic stromal lymphopoietin by lung tissue cells. Futamura K, Orihara K, Hashimoto N, Morita H, Fukuda S, Sagara H, Matsumoto K, Tomita Y, Saito H, Matsuda A. *Int Arch Allergy Immunol.* 152: 353-361, 2010
37. Proactive treatment appears to decrease serum immunoglobulin-E levels in patients with severe atopic dermatitis. Fukuie T, Nomura I, Horimukai K, Manki A, Masuko I, Futamura M, Narita M, Ohzeki T, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y. *Br J Dermatol.* 163: 1127-1129, 2010
38. Identification of a polyI:C-inducible membrane protein that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. Ebihara T, Azuma M, Oshiumi H, Kasamatsu J, Iwabuchi K, Matsumoto K, Saito H, Taniguchi T, Matsumoto M, Seya T. *J Exp Med.* 207: 2675-2687, 2010
- 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した。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3歳児までの調査を行った。

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 β hydroxysteroid dehydrogenase-1 (11 β -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 β -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 β -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 β -HSD1の皮膚バリア機能、入浴習慣、石鹸の使用といった生活習慣における皮膚のホメオスタシスへの関与を生化学的な手法によって検証した。

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浄料を使わず、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 加齢に伴う11 β HSD1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11 β HSD1発現、11 β HSD1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) a) 加齢に伴う11 β HSD1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11 β HSD1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。

c) アトピー性皮膚炎患者皮膚における11 β HSD1発現
アトピー性皮膚炎患者組織における11 β HSD1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2)。

d) 11 β HSD1発現は皮膚バリア機能に影響を及ぼすか?

以上の結果より、アトピー性皮膚炎に11 β HSD1発現が影響を与える事が推察された。11 β HSD1発現の低下が、バリア機能、TEWLに關与する可能性を考え、11 β HSD1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11 β HSD1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。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種類の石鹼すべてにおいて、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鹼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3)

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。石鹼の使用に関しては、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

アトピー素因を有する児は乳児時期から保湿剤のスキンケアを行うことで、皮膚のバリア機能が保持される。アトピー性皮膚炎発症予防効果はさらなる情

報の集積が必要である。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を示した。皮膚はストレス刺激に応じて活性型コルチゾールを産生する能力を有しており、11βHSD1を介した皮膚自身の恒常性保持能力が存在する。11βHSD1は皮膚恒常性維持能力を評価するマーカーの一つとなりうる。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

1) Yang L, Serada S, Fujimoto M, Terao M, Kotobuki Y, Kitaba S, Matsui S, Kudo A, Naka T, **Murota H**, **Katayama I** Periostin Facilitates Skin Sclerosis via PI3K/Akt Dependent Mechanism in a Mouse Model of Scleroderma. **PLoS One**. 2012;7:e41994.

2) Tanemura A, Kotobuki Y, Itoi S, Takata T, Sano S, **Katayama I**. Positive link between STAT3 activation and Th17 cell infiltration to the lesional skin in vitiligo vulgaris. **J Dermatol Sci**. 2012 ;67(3):207-9.

3) **Murota H**, Izumi M, Abd El-Latif MI, Nishioka M, Terao M, Tani M, Matsui S, Sano S, **Katayama I**. Artemin causes hypersensitivity to warm sensation, mimicking warmth-provoked pruritus in atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol**. 2012 ;130(3):671-682.e4.

4) Kimura A, Terao M, Kato A, Hanafusa T, **Murota H**, **Katayama I**, Miyoshi E. Upregulation of N-acetylglucosaminyltransferase-V by heparin-binding EGF-like growth factor induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia. **Exp Dermatol**. 2012 ;21(7):515-9

5) Ontsuka 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. Periostin, a matricellular protein, accelerates cutaneous wound repair by activating dermal fibroblasts.

Exp Dermatol. 2012;21(5):331-

6) Kawamura T, Ogawa Y, Nakamura Y, Nakamizo S, Ohta Y, Nakano H, Kabashima K, **Katayama I**, Koizumi S, Kodama T, Nakao A, Shimada S. Severe dermatitis with loss of epidermal Langerhans cells in human and mouse zinc deficiency. **J Clin Invest**. 2012;122(2):722-32.

7) Kotobuki Y, Tanemura A, Yang L, Itoi S, Wataya-Kaneda M, Murota H, Fujimoto M, Serada S, Naka T, **Katayama I**. Dysregulation of melanocyte function by Th17-related cytokines: significance of Th17 cell infiltration in autoimmune vitiligo vulgaris. **Pigment Cell Melanoma Res**. 2012;25(2):219-30.

8) Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Nakamura A, Matsumoto S, **Katayama I**. A novel application of topical rapamycin formulation, an inhibitor of mTOR, for patients with hypomelanotic macules in tuberous sclerosis complex. **Arch Dermatol**. 2012 ;148(1):138-9.

9) 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;108(46):18766-71.

10) 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.

11) 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.

12) 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]

13) 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]

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

15) 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]

16) 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]

17) 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]

18) **Terao M**, **Murota H**, Kimura A, Kato A, Ishikawa A, Igawa K, Miyoshi E, **Katayama I**:

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-1 is a novel regulator of skin homeostasis and a candidate target for promoting tissue repair. *PLoS One.* 2011;6(9):e25039

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

20) 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.

21) **Terao M**, Ishikawa A, Nakahara S, Kimura A, Kato A, Moriawaki 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.

22) 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.

23) 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.

24) 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.

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

26) **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.

27) 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.

28) 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.
- 29) 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]
- 30) 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]
- 31) **Murota H**, **Katayama I**: Assessment of antihistamines in the treatment of skin allergies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2011 Oct;11(5):428-37.
- 32) 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]
- 33) **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.
- 34) 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.
- 35) Tamai K, Yamazaki T, Chino T, Ishii M, Otsuru S, Kikuchi Y, Inuma 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 Apr 19;108(16):6609-14.
- 36) 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 NUA2 affects tumor growth, migration, and clinical outcome of human melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Apr 19;108(16):6597-602.
- 37) Umegaki N, Nakano H, Tamai K, Mitsunashi 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.
- 38) 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.
- 39) **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)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

11) **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.

12) 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

13) 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.

14) **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

15) **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

16)**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

17) **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

18) **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

H.知的財産権の出願・登録状況

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24回アレルギー学会春季臨床大会、2012、5.
なし

表 1 : 新生児スキンケア介入、3歳時の追跡調査

	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、魚卵、ロキソニン	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歳で酒除去解除	+
8	介入群 female	3250	BM						+
9	介入群 male	2510	BM						+
10	介入群 male	2566	BM						+
11	介入群 female	2638	BM:PF=9:1						+
12	非介入群 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	非介入群 female	3174	BM						-
14	非介入群 female	3258	BM	6ヶ月	小児科アレルギー科	IgE、負荷テスト	卵、牛乳、小麦、大豆、魚卵、鶏卵、バナナ、エビ	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	鶏卵、乳、そば、さけ、エビ、バナナ、小麦	鶏卵、乳製品除去中	+
17	非介入群 female	3124	BM						-
18	非介入群 female	3416	BM						-
19	非介入群 male	2916	BM						-
20	非介入群 female	2406	PF						-
21	介入群 male	3244	BM:PF=1:1	2歳時	皮膚科	IgE	ピーナツ	ピーナツ除去中	+

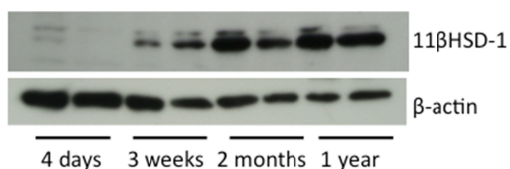


図 1 : マウスの生後の皮膚での11βHSD1発現推移。Western blottingにて確認。生後4日から1年までを観察した。

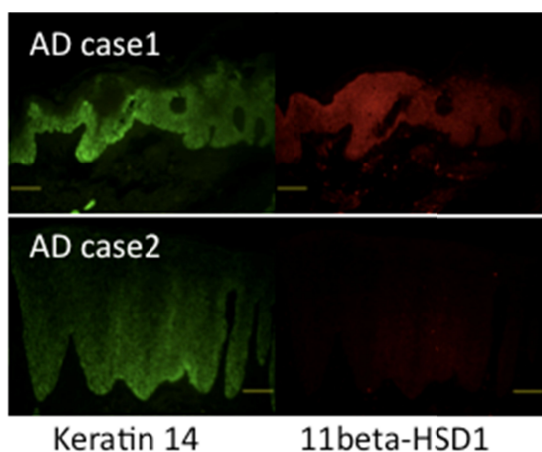
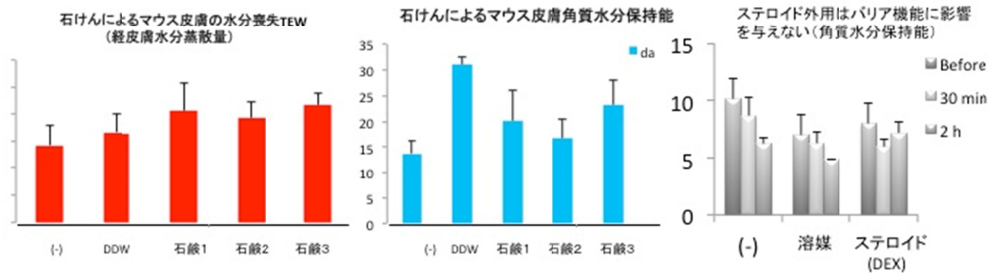


図 2 : アトピー性皮膚炎における11βHSD1の染色結果。Case1は表皮肥厚の乏しいもの。Case2は表皮肥厚著名な症例。

図3：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



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、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を使用することで解決できることが明らかとなった。具体的には、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。以上より、微量採血による患者負担の軽減化、臍帯血から成人に至る検体を一元的に測定管理できることから、アレルギー疾患のモニター、治療過程の詳細な追跡が可能となった。

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療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、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、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、その有用性を患児で検証する。

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。本プロジェクトでは、この
DLCチップ
によるアレルゲン特異的IgE測定方法の開発を検証した。

(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マイクロリットルと多く、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測定以外にも、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、図1に示すようにガラス表面を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、現状では世界で最も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¹⁾。

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の測定が図2に示すように可能となり、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²⁾。

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ることから、乳児湿疹からアレルギー疾患への変化をモニターしたり、治癒過程をモニターすることが可能となった。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⁵⁾。

D. 考察

DLC アレルゲンchipを使用することで、微量検体による患者負担の軽減、アレルゲン特異的IgE、IgA、IgG、IgG4測定の幅広い測定域を確保して、高感度化が実現された。特に感度不足のために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、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り、アレルギー疾患推移のモニター、治癒過程のモニターが可能となった。

E. 結論

DLC アレルゲンchipは、20-100 μLの微量の血液で、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

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, 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_H2. J Allergy Clin Immunol 2013 Feb;131(2):590-592.

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

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 84 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た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)

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)

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ゲン輸送経路の解明、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)

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 アレルゲン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)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

特許第4660756号 ダイヤモンドチップへの蛋白

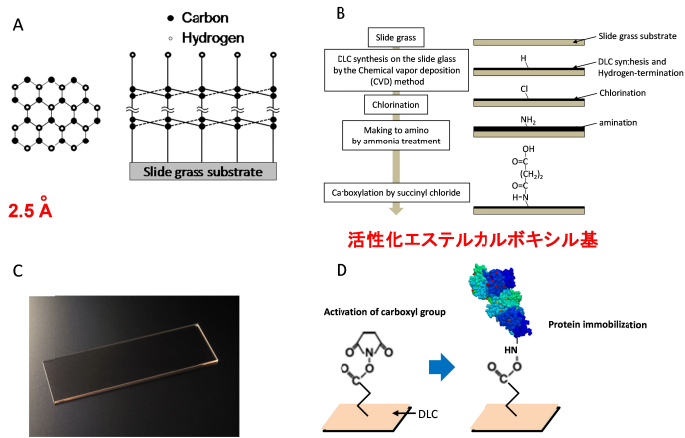


図1 . DLCチップによる高感度測定の概要

質/ペプチドの固定化方法 (登録日、平成23年1月14日)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

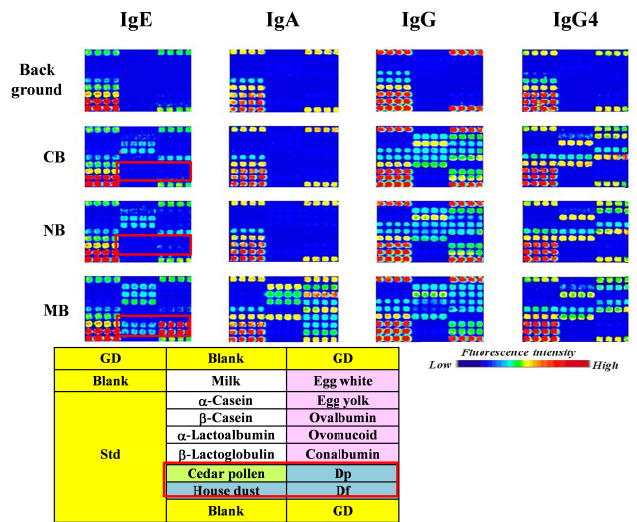


図2 . DLC-Chipによる臍帯血、新生児血、母体血中の各種抗原に対する抗原特異的抗体の検出