

D. 考察

AD は掻痒性の慢性湿疹を特徴とし、バリア機能の低下に伴う抗原の感作、その結果として T_H2 型の免疫反応（高 IgE、T_H2 サイトカイン、ケモカインの増加）が病態の中心として説明されてきた。今回我々が解析した *Adam17^{Sox9}* マウスの皮膚炎はヒトの AD と比較して多くの共通した特徴を有した。特に本邦ではその測定が保険適応にもなっている TARC/CCL17 が症状の悪化と共に上昇傾向を示したことは興味深く、今後このケモカインの病態への関与を解析する上で本マウスは重要となる。

また近年 AD は単純な T_H2 型のアレルギー反応だけでは説明できない知見も報告されている。特に皮膚では IL-17A、IL-22 およびその関連タンパクの発現上昇が報告されている。*Adam17^{Sox9}* マウスの皮膚では IL-17A および IL-22 を産生する T 細胞の著明な浸潤が見られた。今後これらの細胞浸潤の原因を探索することで AD 病態のさらなる理解につながる可能性がある。

また ADAM17 の欠損によりなぜ皮膚炎が誘発されるのかを解明することは今後の課題である。ADAM17 の基質には様々なものがあるが、ADAM17 の欠損により皮膚の恒常性を維持する上で必須のシグナル伝達に異常を来している可能性があり、これを明らかにしたい。

E. 結論

ADAM17 を皮膚で欠損させた *Adam17^{Sox9}* マウスは掻痒や高 IgE 血症を伴うヒトの AD に類似した皮膚炎を発症し、

免疫学的に T_H1、T_H2、T_H17、T_H22、T γ δ 17 の関与を認めた。今後本マウスは AD の病態研究にとって有用なツールとなり得ると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表（平成 25 年度）

<論文発表>

1. Hata T, Nishimoto S, Nagao K, Takahashi H, Yoshida K, Ohyama M, Yamada T, Asano K, Amagai M: Ectopic expression of epidermal antigens renders the lung a target organ in paraneoplastic pemphigus. **J Immunol** 191 (1), 83-90, 2013.
2. Kubo A, Ishizaki I, Kawasaki H, Nagao K, Ohashi Y, Amagai M: The stratum corneum comprises three layers with distinct metal-ion barrier properties. **Sci Rep** 3 1731, 2013.
3. Yoshida K, Yokouchi M, Nagao K, Ishii K, Amagai M, Kubo A: Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the stratum granulosum of human epidermis. **J Dermatol Sci** 71 (2), 89-99, 2013.

<学会発表>

1. Adachi T, Kobayashi T, Amagai M, Nagao K: Epidermotropic resident memory T cells require hair follicle-derived cytokines to reside in epidermis. **The International Investigative Dermatology 2013**, Edinburgh, Scotland, 2013. 5. 8- 11.
2. Kobayashi T, Horiuchi K, Adachi T, Kawasaki H, Amagai M, Nagao K: TACE/ADAM17 deficiency in epidermis leads to IL-17A-associated inflammation with atopic dermatitis-like phenotype. **The International Investigative Dermatology 2013**, Edinburgh, Scotland, 2013. 5. 8- 11.
3. Kubo A, Ishizaki I, Kubo A, Kawasaki H, Nagao K, Ohashi Y, Amagai M: The stratum corneum comprises three layers with distinct barrier properties to metal ions. **The International Investigative**

- Dermatology 2013**, Edinburgh, Scotland, 2013. 5. 8- 11.
4. Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Mizuno H, Yamada T, Amagai M: Filaggrin-null mice exhibit impaired stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses **ASPCR-ASDR 2013**, Sydney, Australia, 2013. 5. 17- 19.
 5. Ishizaki I, Hammond J, Kubo A, Kawasaki H, Nagao K, Ohashi Y, Amagai M, Kubo A: TOF-SIMS Imaging Unveiled the Stratum Corneum of the Skin Consisting of Three Layers with Distinct Properties. **19th International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry**, Jeju, Korea, 2013. 9. 29- 10. 4.
 6. Ishizaki I, Hammond J, Kubo A, Kawasaki H, Nagao K, Ohashi Y, Amagai M, Kubo A: TOF-SIMS

Analysis of the Barrier Properties of the Three Layers of the Stratum Corneum to Metal Ions. **15th European Conference on Applications of Surface and Interface Analysis**, Italy, 2013. 10. 13- 18.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

<特許取得>

国際出願番号:PCT/JP2009/002161

国際出願日:2009年5月15日

国際公開番号:W02009/139191

国際公開日:2009年11月19日

出願人:学校法人慶應義塾

発明者:天谷雅行、久保亮治、永尾圭介

発明の名称:アレルギー疾患モデル動物

皮膚バリア破綻モデルマウスの作成と解析

研究分担者 久保 亮治 慶應義塾大学医学部皮膚科学 専任講師

研究要旨

皮膚は、最表層を覆う頑丈な角質バリアによって空気環境から人体を守っている。角質バリアの内側には細胞と細胞の隙間をシールするタイトジャンクション (TJ) バリアが存在する。近年、角質バリアの先天性障害が、アトピー性皮膚炎の発症要因となることが明らかとなった。角質バリア不全が外来抗原の経皮侵入の増加を招き、経皮感作が次々と成立することでアトピー性皮膚炎を引き起こすというモデルが考えられている。我々はこれまでに、角質バリア障害そのものは TJ バリア機能に影響を及ぼさないが、炎症は TJ バリアを障害することを明らかにしている。一方、TJ バリアの破綻は角質形成異常を引き起こす。すなわち、一旦皮膚炎が起こると、炎症が TJ バリアを障害することで角質形成異常が引き起こされ、結果ますます経皮抗原侵入が加速するという悪循環が起こることが予想される。本研究では、表皮 TJ バリア破綻がプライマリに生じた時の病態生理を解析することにより、本仮説を検証する。炎症時に障害された TJ バリアをリストアし、バリア破綻・経皮感作・炎症という悪循環を止めることは、アトピー性皮膚炎の増悪を押さえる新たな治療のターゲットとなることが期待される。

研究協力者

佐々木貴史 慶應義塾大学医学部総合
医科学研究センター
特任講師
平野尚茂 慶應義塾大学医学部
皮膚科
共同研究員

イン1の先天性欠損症である NISCH 症候群では、魚鱗癬様の皮膚症状を呈することが報告されている。しかし、NISCH 症候群は世界で2家系のみで非常に珍しい疾患であり、その詳細な病態は不明である。また、クローディン1の KO マウスは生後1日で死亡するため、これまで TJ バリアの先天性破綻の病態は十分に解析されてこなかった。また、アトピー性皮膚炎患者の皮膚において、角質バリア破綻だけでなく TJ バリアの破綻も起こっていることが示唆されている。しかし、TJ バリア破綻がアトピー性皮膚炎の病態形成にどのような影響を与えているのか？炎症による二次的な変化なのか、TJ バリア破綻が病状の悪化を招くのか？それはどのようなメカニズムに基づくのか？未解明である。我々は、TJ バリア破綻の病態を解明するために、クローディン1のコンディショナル KO マウスを樹立し、タモキシフェン誘導性に表皮特異的にクローディン1を KO する系を構築した。本マウスを解析することにより、純粋に TJ バリア破綻を出発点とした時に皮膚に何が起こる

A. 研究目的

皮膚の表面は重層上皮細胞のシートで覆われており、その最表層は頑丈な角質バリアによって覆われ、空気環境から我々の身体は守られている。角質バリアの内側には細胞と細胞の隙間をシールするタイトジャンクション (TJ) バリアが存在する。近年、角質バリアの先天性障害が、アトピー疾患の発症要因となることが明らかとなった。角質バリアの不全が外来抗原の経皮侵入の増加を招き、経皮感作が亢進することでアトピー疾患が引き起こされる、というモデルが考えられている。一方、TJ バリアとアトピー性疾患の関わりについてはまだ不明な点が多く残されている。TJ の主要構成蛋白クローデ

かを解析し、アトピー性皮膚炎の病態形成における TJ バリア破綻の生理的意義を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

マウスクローニン 1 遺伝子の転写開始点を含む exon1 を loxP により挟む形でコンディショナル KO ベクターを構築し、ES 細胞でターゲティングを行うことで、クローニン 1 flox マウスを得る。

K5-cre マウス、または K14-creERT マウスと交配することにより、表皮特異的にクローニン 1 を KO したマウス (K5-cre, claudin-1 flox/flox)、タモキシフェン誘導性に表皮特異的にクローニン 1 を KO できるマウス (K14-creERT, claudin-1 flox/flox) を得る。

C. 研究結果

表皮特異的にクローニン 1 を KO したマウスは、全身で KO したマウスと同様に、生後急速に体重減少を来し、生後 1 日以内に死亡した。クローニン 1 は表皮と胆管に発現しており、NISCH 症候群では魚鱗癬と硬化性胆管炎を来す。この結果は、クローニン 1KO マウスの死因が肝臓でのクローニン 1 欠損によるものではなく、皮膚でのクローニン 1 欠損によるものであることを示している。現在、成体マウスにおいてタモキシフェン誘導性にクローニン 1 欠損を誘導し、その表現型の解析を進めている。

D. 考察

皮膚表皮の TJ バリアが、マウス個体の生存に必須であることが示された。なぜ同じクローニン 1 の欠損症のヒトは生き残りマウスは死ぬのかは不明であるが、成体マウスでクローニン 1 欠損を誘導してもマウスが死なないことから、新生児マウスは体重が少ないために皮膚表面からの水分蒸散の亢進に耐えられない可能性が考えられた。

E. 結論

今回作成した、タモキシフェン誘導性に表皮特異的にクローニン 1 を KO できるマウスは、表皮 TJ バリア破綻を出発点とする皮膚病態の解析において有用なモデルと考えられ、今後更なる解析を進める。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 25 年度)

<論文発表> (*corresponding author)

1. Yoshida K, Yokouchi M, Nagao K, Ishii K, Amagai M, *Kubo A. Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the stratum granulosum of human epidermis. *J Dermatol Sci*. 71 (2), 89-99, 2013.
2. *Kubo A, Shiohama A, Sasaki T, Nakabayashi K, Kawasaki H, Atsugi T, Sato S, Shimizu A, Mikami S, Tanizaki H, Uchiyama M, Maeda T, Ito T, Sakabe J, Heike T, Okuyama T, Kosaki iR, Kosaki K, Kudoh J, Hata K, Umezawa A, Tokura Y, Ishiko A, Niizeki H, Kabashima K, Mitsuhashi Y, Amagai M: Mutations in SERPINB7, encoding a member of the serine protease inhibitor superfamily, cause nagashima-type palmoplantar keratosis. *Am J Hum Genet* 93 (5), 945-956, 2013.
3. Sasaki T, Shiohama A, Kubo A, Kawasaki H, Ishida-Yamamoto A, Yamada T, Hachiya T, Shimizu A, Okano H, Kudoh J, Amagai M. A homozygous nonsense mutation in the gene for Tmem79, a component for lamellar granule secretory system, produces spontaneous dermatitis in matted mice. *J Allergy Clin Immunol*. 132 (5), 1111-1120, 2013.
4. *Kubo A, Ishizaki I, Kubo A, Kawasaki H, Nagao K, Ohashi Y, Amagai M. The stratum corneum comprises three layers with distinct metal-ion barrier properties. *Sci Rep* 3:1731, 2013.

<学会発表>

1. Kubo A, Ishizaki I, Kubo A, Kawasaki

- H, Nagao K, Ohashi Y, Amagai M: The stratum corneum comprises three layers with distinct barrier properties to metal ions. **The International Investigative Dermatology 2013**, Edinburgh, Scotland, 2013. 5. 8- 11.
2. Sasaki T, Shiohama A, Kubo A, Kawasaki H, Ishida-Yamamoto A, Yamada T, Hachiya T, Shimizu A, Okano H, Kudoh J, Amagai M: A homozygous nonsense mutation of gene for *Mattrin*, a component of lamellar granule secretory system, produces spontaneous dermatitis in mice. **The International Investigative Dermatology 2013**, Edinburgh, Scotland, 2013. 5. 8- 11.
 3. Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Mizuno H, Yamada T, Amagai M: Filaggrin-null mice exhibit impaired stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses. **ASPCR-ASDR 2013**, Sydney, Australia, 2013. 5. 17- 19.
 4. Kubo A: Molecular Barriology of the Stratum Corneum and Epidermal Tight Junctions. **Molecular Mechanisms Regulating Skin Homeostasis 2013**, Koln, Germany, 2013. 9. 23- 25.
 5. Ishizaki I, Hammond J, Kubo A, Kawasaki H, Nagao K, Ohashi Y, Amagai M, Kubo A: TOF-SIMS imaging unveiled the stratum corneum of the skin consisting of three layers with distinct properties. **19th International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry**, Jeju, Korea, 2013. 9. 29- 10. 4.
 6. Ishizaki I, Hammond J, Kubo A, Kawasaki H, Nagao K, Ohashi Y, Amagai M, Kubo A: TOF-SIMS analysis of the barrier properties of the three layers of the stratum corneum to metal ions. **15th European Conference on Applications of Surface and Interface Analysis**, Italy, 2013. 10. 13- 18.
 7. Kubo A: The three musketeers of the epidermal barrier. **4th Pan Asian Pacific Skin Barrier Research Annual Symposium**, Seoul, Korea, 2013. 10. 15.
 8. Kawasaki H, Kubo A, Hirano T, Amagai M: Exacerbation of the skin barrier function of filaggrin-null mice in dry environment. **42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology**, Chiba, Japan, 2013. 12. 11- 13.
 9. Sasaki T, Shionama A, Kawasaki H, Kubo A, Yamada T, Okano H, Amagai M: A homozygous nonsense mutation in *Matted*, a novel skin barrier gene associated with lamellar granule secretory system, causes spontaneous dermatitis in mice. **42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology**, Chiba, Japan, 2013. 12. 11- 13.
 10. 横内麻里子, 川崎洋, 久保亮治, 天谷雅行. バリア障害モデルマウスにおけるタイトジャンクションバリア機能についての検討. **第 19 回分子皮膚フォーラム**, 東京, 2013.4.12.
 11. 久保亮治. 皮膚タイトジャンクションバリアから見た皮膚疾患の病態と病理. **第 102 回日本病理学会総会**, 札幌, 2013.6.7.
 12. 久保亮治. バリア異常からみたアトピー性皮膚炎の病態と治療. **第 112 回日本皮膚科学会総会**, 横浜, 2013.6.15.
 13. 久保亮治. 角質層バリアと皮膚免疫. **第 29 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会**, 甲府, 2013.8.9.
 14. 久保亮治. アトピー性皮膚炎と皮膚バリア. **第 77 回日本皮膚科学会東京支部**, 東京, 2014.2.15.
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
- <特許取得>
 《国内特許》
 出願番号:特許出願 2012-4752
 出願日:2012年3月5日
 公開番号:特許公開 2013-179920
 公開日:2013年9月12日
 出願人:学校法人慶應義塾

発明者:天谷雅行、佐々木貴史、塩濱愛子、
工藤純、久保亮治
発明の名称:自然発症皮膚炎の新規原因
因子及び皮膚疾患モデル動物

《国際特許》

国際出願番号:PCT/JP2009/002161

国際出願日:2009年5月15日

国際公開番号:W02009/139191

国際公開日:2009年11月19日

出願人:学校法人慶應義塾

発明者:天谷雅行、久保亮治、永尾圭介

発明の名称:アレルギー疾患モデル動物

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

アトピー由来黄色ブドウ球菌の皮膚定着能に関する研究

研究分担者 菅井 基行 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 細菌学 教授

研究要旨

私どもは、アトピー性皮膚炎の増悪化に起因する黄色ブドウ球菌感染の意義を明らかにするために、これまでに種々の臨床検体から分離された菌株の皮膚付着性及び固着性の比較解析から、AD由来株はFLG-KO新生児マウス皮膚に持続的に定着することを明らかにした。今回、長期感染時の病理解析を行うため、WT及びFLG-KOヘアレス成獣マウスを用いて、角層剥離及び表皮全層障害皮膚でのAD株とnon-AD株とで比較した。その結果、AD株は角層剥離及び表皮全層障害皮膚において病理組織像からnon-AD株よりも炎症所見の顕著な持続が認められた。これらの結果は、アトピー性皮膚炎患者から分離される黄色ブドウ球菌の病理学的意義を明らかにする糸口になる可能性が考えられた。

研究協力者

久恒 順三 広島大学大学院
医歯薬保健学研究院
細菌学 助教
小島 太郎 広島大学大学院
医歯薬保健学研究院
細菌学 大学院生

A. 研究目的

黄色ブドウ球菌はヒトと共生する病原細菌の代表であり、極めて多様な病原性を示すことで知られている。皮膚は黄色ブドウ球菌のレザバーとされているが、健常人皮膚からの黄色ブドウ球菌検出率は極めて低い。一方、アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis, AD) 患者患部皮膚の大多数から黄色ブドウ球菌が検出される。しかしながら、ADの発症・増悪化における本菌感染の位置付けは不確定である。本研究の最終目標はADの病態形成における黄色ブドウ球菌感染の役割を明らかにすることである。今回、AD由来株の長期感染時での病理解析を行なうために、FLG-KOヘアレス成獣マウスを用いて、テープストリッピングによる角層剥離皮膚、または表皮全層障害させた皮膚に感染させて、AD由来株とnon-AD由来株で病理組織を比較解析した。

B. 研究方法

角層剥離皮膚マウス感染実験：8週齢FLG-KO/HR-1マウス背部にテープストリッピング法により角層を除去し、AD由来株TF3378及びnon-AD由来株MS23143の菌液を塗布して3及び7日後の肉眼的所見、並びに、HE染色像にて解析した。表皮全層障害皮膚マウス感染実験：8週齢FLG-KO/HR-1マウス背部にサンドペーパーによりスクラッチし、同様に菌液を塗布して3及び7日後の肉眼的所見、並びに、HE染色像にて解析した。

C. 研究結果

まず、これまでの付着/固着実験で用いたFLG-KO/B6マウスがFLG-KO/HR-1ヘアレスマウスに変わったので、付着/固着解析の再現性実験を行った。その結果、AD由来株とnon-AD由来株におけるFKO及びWTマウス皮膚での付着能は、有意な差はなかった。AD由来株とnon-AD由来株のそれぞれのマウス固着菌数の比は、AD由来株でFKOマウスに有意に固着し、固着実験でも再現性がある事を確認できた。したがって、付着/固着実験の結果よりヘアレスFKO, WTマウスでも同様の結果が得られることが確認できた。

AD 患者の皮膚は角質層が脆弱であり、掻痒行動が多いので、角質層が剥がれやすい。そこで、粘着テープによる角質剥離法を用いて角質が除去された皮膚を再現し、病変部位への AD 由来株と non-AD 由来株による感染実験を行った。皮膚の創傷治癒により 7 日後には各疾患由来株で病変部位は治癒していくが、肉眼所見において AD 由来株は明らかに FLG-KO マウスの病変部位の治癒が遅く、また、病理組織像よりリンパ球の浸潤や上皮の肥厚化が認められた。non-AD 由来株も未処理と比較すると炎症が残存していたが、程度は低く AD 由来株と non-AD 由来株の病変部サイズで有意な差があった。

続いて、重度 AD 患者の皮膚は過度の掻痒行動により、角質層だけでなく表皮全体が障害される。サンドペーパーを用いて表皮を傷害した状態で同様の実験を行うと、肉眼的所見では AD 由来株と non-AD 由来株では有意な違いは認められなかった。しかし、病理組織像では、FLG-KO マウスにおいて AD 由来株感染では non-AD 由来株より明らかなリンパ球の浸潤がみられ、炎症の持続が示唆された。

D. 考察

角質層のバリア障害を亢進させた成獣 WT と FKO マウスに AD 由来株及び non-AD 由来株を感染させた場合、AD 由来株を感染させた FKO マウスでは、時間経過による創傷治癒が顕著に遅延することが示唆された。また、表層全体を除去した場合は AD 由来株、non-AD 由来株ともに同じ病原性を発揮するが、角質層を除去した場合は AD 由来株の方が non-AD 由来株よりも有意に病原性を発揮すると考えられた。

E. 結論

AD 由来株は、バリア機能が脆弱になった皮膚に固着(定着)し続けることができ、角質層の喪失によって non-AD 由来株より強力に炎症を惹起できる。すなわち、AD 由来株は角質バリア機能が破綻した患者

に皮膚炎を起こすという極めて合目的な挙動をとる事が動物実験から推察される。

今回の結果は Atopy 性皮膚炎患者から分離される黄色ブドウ球菌の病理学的意義を明らかにする糸口になる可能性があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 25 年度)

<論文発表>

1. Hisatsune J, Hirakawa H, Yamaguchi T, Fudaba Y, Oshima K, Hattori M, Kato F, Kayama S, Sugai M: Emergence of Staphylococcus aureus carrying multiple drug resistance genes on a plasmid encoding exfoliative toxin B. **Antimicrob Agents Chemother** 57 (12), 6131-6140, 2013.
2. Kayama S, Shigemoto N, Kuwahara R, Ishino T, Imon K, Onodera M, Yokozaki M, Ohge H, Sugai M: The first case of septicemia caused by imipenem-susceptible, meropenem-resistant Klebsiella pneumoniae. **Ann Lab Med** 33 (5), 383-385, 2013.
3. Kobayashi K, Hayashi I, Kouda S, Kato F, Fujiwara T, Kayama S, Hirakawa H, Itaha H, Ohge H, Gotoh N, Usui T, Matsubara A, Sugai M: Identification and characterization of a novel aac(6')-Iag associated with the blaIMP-1-integron in a multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa. **PLoS One** 8 (8), e70557, 2013.

<学会発表>

1. 岩本優子, 久恒順三, 加藤文紀, 香西克之, 菅井基行: 黄色ブドウ球菌の表皮剥脱毒素ETA遺伝子プロモーター領域の解析. 第7回細菌学若手コロッセウム, 広島県三原市, 2013. 8. 7-9.
2. 久恒順三, 萩谷英大, 塩田澄子, 菅井基行: 全身播種したCA-MRSA感染症

由来株の解析. 第66回日本細菌学会
中国四国支部総会, 広島県呉市, 2013.
10. 12.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予
定を含む)

なし

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

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

研究分担者 斎藤博久 (独) 国立成育医療研究センター 副研究所長
研究分担者 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
研究分担者 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
研究分担者 木戸 博 徳島大学疾患酵素学研究センター・酵素分子化学部門 特任教授
研究分担者 菅井基行 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 細菌学 教授

研究要旨

アトピー性皮膚炎(AD)は慢性・反復性経過を特徴とする掻痒のある湿疹 (Eczema) で、生活の質 (quality of life ; QOL) の低下をもたらす。また近年は、経皮感作による食物アレルギーの獲得の可能性も示唆されており、離乳食が開始される乳児期のアトピー性皮膚炎の発症予防の可能性が期待されている。そこで、今回我々は皮疹がまだ出現していない生後1週未満のAD発症のハイリスク児を、新生児期から全身のスキンケアを予防的に行う群 (Proactive群) と必要時に局所のみに行う群 (Reactive-control群) に分け、8か月時点でのEczemaの発症率を比較し、予防的なスキンケアがAD発症予防に有効かを検討した。2010年11月から2013年11月まで当院で出産予定の家族を対象にチラシやポスターで研究参加者を募った。参加希望者のうち、エントリー基準を満たし文書での同意が得られた児をエントリーした。途中2012年11月に53例の時点で中間解析を実施し、当初の予定参加者 (70例) では検出力が不足すると判断し、さらに1年間エントリーを継続した。2013年11月にエントリー数が118例になったところで再度中間解析を行ったところ、研究を終了していた99例 (Proactive 51例、Reactive-control 48例) を対象とした解析で、Proactive群では51例中19例がinfantile eczema(IE)を発症していたのに対し、Reactive-control群では48例中28例が発症しており、Proactive群で有意に発症が少ないことが分かった。(p =0.018) そのため、両群の有効性に差があると判断し、2013年11月30日をもって新規のエントリーを中止した。

研究協力者：

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	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
北沢 博	同上	徳永秀美	(独) 国立成育医療研究センター 薬剤部
堀向健太	同上	青木智子	(独) 国立成育医療研究センター 6 西病棟 看護師
成田雅美	同上	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
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	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
吉田和恵	同上	丸田明子	(独) 国立成育医療研究センター 感覚器・形態外科部 皮膚科
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		
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		

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、我が国を含め先進国のアトピー性皮膚炎患者数は増加してきた。「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」や「日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎診療ガイドライン」に、「(アトピー性皮膚炎の)炎症に対してはステロイド外用薬やタクロリムス軟膏による外用療法を主とし、生理学的機能異常に対しては保湿・保護剤外用などを含むスキンケアを行い、痒痒に対しては抗ヒスタミン薬、抗アレルギー薬の内服を補助療法として併用し、悪化因子を可能な限り除去することを治療の基本とするコンセンサスが確立されている」と記載されている。しかし、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ものはないのが現状である。特に近年、食物アレルギーの発症に経皮感作が関与しているとする報告もあり(Lack G. et al, J Allergy Clin Immunol. 2008;121:1331)、乳児期のアトピー性皮膚炎の発症予防が、食物アレルギーも含むアレルギー性疾患の予防にも重要である可能性が考えられている。

アトピー性皮膚炎患者は皮膚バリア機能障害を有する疾患であり、皮膚バリアを補填する治療(保湿剤塗布)が寛解維持に有効であることが報告されているが(Wiren K. et.al, Eur AcaDermatol Venereol. 2009 ;23:1267-72)、発症前から皮膚バリア機能を補填するスキンケア(全身への Proactive な保湿剤塗布)を行うことでアトピー性皮膚炎の発症を予防できるかはわかっていない。そこで今回我々はアトピー性皮膚炎発症のハイリスク児(両親どちらか、または同胞にアトピー性皮膚炎の既往がある)を対象に、予防的なスキンケア(全身への Proactive な保湿剤塗布)を新生児期から行うことでアトピー性皮膚炎の発症を抑制できるか否かを、生後8か月時点でのアトピー性皮膚炎の発症率をアウトカムとして検討した。

B. 方法

研究デザインは無作為化オープン並行群間試験を用いた。研究参加者の募集は当院産婦人科外来でのチラシ配布やポスター掲示

で行った。参加希望者に試験担当者より研究の説明を行い、文書での同意を取得した。出生後1週以内にエントリー基準を満たすことを再度確認できた新生児をエントリーし、スキンケアを全身に予防的に実施する群(Proactive群)と必要時に局所的に実施する群(Reactive-control群)にランダムに割り付け、各群の乳児に対して、生後4週、12週、24週、32週の外来受診時に皮膚診察と皮膚バリア機能検査(TEWL、角質水分量、表皮pHの測定)、皮膚黄色ブドウ球菌検査を行った。生後12週、32週にはさらに血液検査(TARC、各種特異的IgE抗体の測定)を実施した。32週の時点までの乳児アトピー性皮膚炎(eczema、以下、乳児AD)の両群の累積罹患率を主要評価項目とし、皮膚バリア機能の測定指標や血液検査項目は副次的評価項目として比較した。乳児ADの診断は割付をブラインドされている皮膚科専門医が行った。

皮膚黄色ブドウ球菌の培養は菅井基行らが、血液中の特異的IgE/IgG1/IgG4、唾液中のIgAは木戸博らが測定を担当した。

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: R000005429 スキンケアによる乳児湿疹・アトピー性皮膚炎予防に関する研究)した。

(倫理面への配慮)

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、乳児はアトピー性皮膚炎の発症時、診断時には速やかに加療を受けられるようにした。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、治療を行うこととした。

C. 結果

2010年11月より症例登録を開始し、2012年11月末の時点で当初の計画に従って中間解析を行った。この時点では、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ールオフとなった6例の、計53例が解析対象となった。同意撤回があったProactive群1例、Reactive

群 3 例を解析から除き、最終的に 49 例を解析対象とした。その結果、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、当初の目標症例数(両群合わせて 70 例)では、検出力が不足する見込みとなった。そこで、70 例到達後も症例登録を継続し、1 年後の 2013 年 11 月に再度 2 回目の中間解析を行った。2013 年 11 月の時点でのエントリー状況を Table1 に示す。

総エントリー数は 118 例、うち同意撤回が 7 例、乳児 AD 以外の先天性の皮膚疾患による研究参加中止が 2 例あった。解析対象は、2013 年 11 月時点で研究が終了している 99 例 (Proactive 群 51 例、Reactive-Control 群 48 例)とした。

Table1 各群のエントリー状況 単位:人

	Proactive 群	Reactive-Control 群
エントリー数	61	57
同意撤回	3	4
研究参加中止	1	1
研究参加中	6	4
研究終了 (解析対象)	51	48

解析対象 99 例の 32 週までの転帰を Table2 に示す。途中、プロトコール違反で 5 例 (Proactive 群 2 例、Reactive-Control 群 3 例)、乳児 AD 以外の皮膚疾患の発症で 3 例 (Proactive 群 3 例のみ)で計 8 例が研究から脱落した。

乳児 AD の定義は、Simpson らがパイロット研究で使用した基準(①典型的な部位に Eczema が認められる、②掻痒がある、③2 週間以上継続、①～③すべてを満たす)を採用した。(Simpson EL et al, J Am Acad Dermatol, 2010; 63: 587-593)

乳児皮膚は上記以外の皮疹(掻痒を伴わず、スキンケアのみで軽快)と定義した。乳児 AD 発症者の平均発症週数は、Proactive 群で 16 週、Reactive-Control 群で 15 週だった。乳児 AD 発症の累積罹患率をアウトカムとした両群の χ^2 乗検定による p 値は 0.018 であり、Proactive 群で有意に低かった。

Table2 解析対象の 32 週までの転帰 単位:人

	Proactive 群 (n=51)	Reactive-Control 群 (n=48)
乳児 AD*	19	28
乳児皮疹	6	7
脱落	5	3
発症なし**	21	10

両群乳児の出生時における経表皮水分蒸散量 (TEWL)、角質水分量、皮膚 pH、には有意差はなく、両群の AD 発症者における発症時のそれらの指標にも有意差はなかった。(Table3)

Table3 皮膚検査結果 (平均)

	Proactive	Reactive-Control	p-value
TEWL 出生時	8.3	8.5	0.800
TEWL 発症時	16.0	17.1	0.593
水分量 出生時	13.9	13.8	0.953
水分量 発症時	50.0	44.2	0.185
pH 出生時	5.7	5.6	0.677
pH 発症時	5.5	5.5	0.647

単位 TEWL (g/m²h)

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、菌の検出及び、黄色ブドウ球菌の菌株の違いに関して検索中である。

血液検査(IgE, IgG1, IgG4)、唾液検査 (IgA) については、現在測定・解析中である。

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(Fukuie T,

et al. *Br J Dermatol*, 2010 Jun 10 Epub)、アトピー性皮膚炎患者皮膚において経皮感作がおこる可能性があることも報告されており、湿疹の悪化がアレルギー疾患の引き金になりうることが示唆されている。一方、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: 327-36)ことも報告されており、皮膚のバリア機能を良好に保つことがアトピー性皮膚炎予防や将来の他のアレルギー疾患予防に資する可能性がある。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少なく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)、保湿剤の使用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もある (Buraczewska I, et al. *Br J Dermatol*. 2007 ; 156:492-8)。上記のような先行研究より「スキンケアによりアトピー性皮膚炎の発症を予防できるのではないか」、また同時に「スキンケアにより皮膚バリア機能が良好に保たれ、アレルギー感作も防ぐことができるのではないか」との仮説を立て、これらを検証すべく本研究を行った。

本研究は2012年11月に49例を対象に1回目の中間解析を行いその時点ではProactive群とReactive-control群の乳児ADの発症率に明らかな差は認められなかった。その後、エントリーの強化を行い、脱落者を減らすようフォロー体制を整え、1年後の2013年11月に行った2回目の解析では、解析対象99例においてProactive群の発症率は37%、Reactive-control群の発症率は58%となり、Proactive群で有意に低いことが分かった。(p= 0.018) この累積発症率は、アトピー性皮膚炎のリスクのない集団における発症率よりも高いが、先行研究におけるハイリスク群での発症率が50%程度で (Hoare CLW et al, *HTA*. 2000;4:1-191)、Simpsonらのパイロット研究での発症率が15-23%という報告に近い。

本研究で新規のエントリーを中止した時点で研究継続中だった参加者には解析結果を伝え割り付けを解除したのち、希望者にはProactive群で使用した保湿剤の提供を行った。また、乳児ADと診断された研究参加者の

うち希望者は当院皮膚科またはアレルギー科での診療を継続している。

乳児のアトピー性皮膚炎の発症と抗原感作状況の関係については、抗原特異的 IgE 値を始めとする各種抗体値を測定中である。現時点では、抗原感作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、様々な報告が交錯しており、いまだ明らかになっていない。未発症者でも特異的 IgE が陽性になっているケースもあり、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。

E. 結論

本研究により、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を予防することができる可能性が示された。

F. 健康危険情報

今回の研究において特記すべき健康器具情報は無い。

G. 研究発表 (平成 25 年度)

<論文発表>

1. 大矢幸弘: 経皮感作とアレルギー スキンケアによるアトピー性皮膚炎の発症予防. *臨床免疫・アレルギー科* 59 (5), 581-586, 2013.
2. Matsumoto K, Saito H: Epicutaneous immunity and onset of allergic diseases -per-"eczema" tous sensitization drives the allergy march. *Allergol Int* 62 (2), 291-296, 2013.
3. 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.

<学会発表>

1. 大矢幸弘:アトピー性皮膚炎の発症因子と発症予防-皮膚科と小児科はこう考える(教育セミナー). 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会, 横浜, 2013. 5. 11- 12.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 実用新案登録
2. その他
3. 特許取得
 - ①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
 - ②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

臍帯血の抗原特異的低親和性 IgE の検出と、生後の Affinity Maturation が関与する アトピー性皮膚炎の発症と、その予防

研究分担者 木戸 博 徳島大学疾患酵素学研究センター 特任教授

研究要旨

最近我々が開発した高密度に抗原を固定化したアレルゲンマイクロアレイを用いて、今年度は臍帯血と出生後の抗原特異的 IgE の定量とその性状解析を実施した。研究には、臍帯血、6ヶ月齢、14ヶ月齢乳児の血液中に測定可能な量の抗Ovomucoid IgE抗体を持つ検体を材料として用いた。その結果、臍帯血の抗原特異的 IgE 抗体は全て低親和性抗原特異的 IgE 抗体の性状を示し、ヒトFcεR1を介する肥満細胞からのヒスタミン遊離を引き起こさなかった。一方生後6-14ヶ月では、高親和性抗原特異的 IgE 抗体の性状を示し、ヒスタミン遊離シグナルが検出された。このことから、出生時の低親和性抗原特異的 IgE 抗体は、生後6-14ヶ月までに抗原刺激を受けて高親和性抗原特異的 IgE 抗体に変化することが明らかになった。このことは、生後6-14ヶ月までの抗原刺激を避けることで、アレルギー、アトピーの発症を抑制できる可能性が示唆された。

研究協力者

亀村 典夫 徳島大学
疾患酵素学研究センター
特任助教
杉本 眞弓 徳島大学病院 小児科
特任助教

研究の目標としている。

最近我々は、高密度に抗原を固定化したアレルゲンマイクロアレイの作成に成功し、抗原特異的 IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, SIgA の高感度定量法を確立した。本年度は、IgE の高感度定量法を用いることで、これまで検出することのできなかった臍帯血中の抗原特異的 IgE の検出が可能となり、抗原との Affinity 解析を実施し、乳幼児のアトピー性皮膚炎、食物アレルギーの発症と IgE の Affinity Maturation との関係性を考察した。解析の結果、抗体産生課程で最初に低親和性抗体ができてその後繰り返される抗原刺激によって Affinity Maturation が起きて、アレルギーの発症に結びつく高親和性 IgE に成熟すると推定されていたが、臍帯血中に低親和性抗原特異的 IgE 抗体が存在していることを初めて証明することに成功した。さらに、この低親和性 IgE 抗体は生後6-14ヶ月で Affinity Maturation することが判明し、乳幼児のアトピー性皮膚炎、食物アレルギーの発症との関係性を考察した。

A. 研究目的

従来のアレルギー、アトピーに対する血液検査は、血液中の抗原特異的 IgE 検査への依存度が高く、アレルギーの病状、進展状況、アレルギーの治療、さらにはアレルギーの予防を考察する上で必ずしも十分とは言えない。従来 IgE 測定法を取ってみても、測定感度が低くそのため高感度化の試みが近年なされている。またアレルギー、アトピーの発症の基盤には、IgE 以外の生体分子として体内の抗原特異的 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, SIgA、さらには抗原分子が関与していることから、これらの因子を総合して病像の理解をすることが必要である。本研究では、抗原特異的 IgE を含む様々な抗体群と抗原を高感度に定量測定して、その生理的、病態医学的解析を試みることを

B. 研究方法

我々は、シリコンあるいはガラス基板、Diamond-like carbon (DLC) 処理基板の表面を高密度にジカルボン酸、またはポリカルボン酸で化学修飾することによって、アミノ基を持つアレルゲンを高密度に共有結合で固定化する方法を開発したことから、微量の抗原特異的 IgE を高感度に検出することに成功した (Anal Chim Acta 2011; 706: 321-327)。本研究ではこれを用いて、臍帯血中の抗原特異的低親和性 IgE 抗体の検出を行った。使用した検体は、2004 年から 2005 年にかけて岐阜大学で行われた岐阜アレルギー免疫コホート研究の検体を使用した。同一乳児で臍帯血、6 ヶ月齢、14 ヶ月齢の検体がそろっている検体の中から、卵白特異的 IgE 抗体が全ての時期で検出される検体 (37 検体) の中から、さらに全ての時期で抗 Ovomucoid (OVM) IgE 抗体価が、上記検査方法で有意に検出可能な ≥ 20 Binding Unit IgE (BUE)/mL を示す 9 名の乳児検体を用いて検証した。

C. 研究結果

アレルギー、アトピーの病歴を持つ母親から生まれる子供の大半は、胎児期から抗原特異的 IgE が検出されることをこれまでに報告してきた (J Allergy Clin Immunol 2012; 130: 113-121)。一方、胎児血や臍帯血にはアレルギー反応を起こすレベルのアレルゲンが存在する事が報告されているが、胎児のアトピー、食物アレルギーの報告はない。これらの事から、臍帯血の抗原特異的 IgE がなぜアレルギーの発症に結びついていないのかを調べるため、その性状を解析した。なお今回は図 1 に示す如く、抗 OVM IgE 抗体を保有する 9 名の乳児の臍帯血、6 ヶ月齢、14 ヶ月齢検体を用いた。

1. 臍帯血、6 ヶ月齢、14 ヶ月齢検体における抗 OVM IgE 抗体の OVM との結合親和性の測定

図 2 に示すように、OVM を搭載したアレ

ルゲンチップへの抗-OVM 特異的 IgE の結合反応を競合阻害する OVM の阻害濃度のパターンから、臍帯血の OVM 特異的 IgE は 6 ヶ月、14 ヶ月血に比べて競合阻害感度が低いことが判明した。50%結合阻害を示す OVM の濃度は、臍帯血の 3.1 ± 0.8 nM に比べて 6 ヶ月、14 ヶ月血ではそれぞれ 0.9 ± 0.2 nM、 0.9 ± 0.3 nM と有意 ($P < 0.01$) に低値を示した。このことは、臍帯血の抗-OVM 特異的 IgE 抗体は、6 ヶ月、14 ヶ月血に比べて低親和性で生後高親和性に変化していることが示された。さらに、これまで低親和性 IgG の証明に使用されてきた蛋白質変性剤の diethylamine (DEA) (10-40 mM) の添加実験でも、図 3 に示すように臍帯血の IgE は 6 ヶ月、14 ヶ月血の IgE に比べて DEA 処理による OVM への結合力の低下が著しく、この実験でも臍帯血 IgE は DEA に対して脆弱であると共に、OVM への低親和性が確認された。具体的には、検体の希釈系列で得られる最大結合値の 50%を示す検体希釈倍率において、臍帯血の抗-OVM 特異的 IgE 抗体は、10, 20, 40 mM の DEA 存在下における最大結合値の 50%を示す希釈倍率は、6 ヶ月、14 ヶ月血に比べて有意 ($P < 0.01$) に増大しており、DEA によって結合親和性が影響の受けやすい脆弱な検体であることが判明した。

2. OVM と抗 OVM IgE 抗体存在下におけるヒスタミン遊離シグナルの検証

Fc ϵ R1 を介する肥満細胞のヒスタミン遊離シグナルは、Rat Basophilic Leukemia (RBL) 細胞で再現されている。この RBL 細胞にヒトの Fc ϵ R1 を導入し、ヒスタミン遊離シグナル伝達系にルシフェラーゼレポーターを組み込んだ肥満細胞類似した測定系 (RS-ATL8) を使用して、臍帯血、6 ヶ月齢、14 ヶ月齢乳児の抗-OVM 特異的 IgE 抗体のシグナル伝達系を検証した。OVM との低結合親和性を示した臍帯血の抗-OVM 特異的 IgE 抗体は、1 pM、10 pM、100 pM、1 nM、10 nM の OVM 抗原をチャレンジしてもルシフェラーゼレポーターは活性化しなかった。一方、6 ヶ月、14 ヶ月血

の OVM 特異的 IgE 抗体の場合は、1 pM、10 pM、100 pM の OVM 抗原のチャレンジで、抗原濃度に依存したルシフェラーゼの増加が観察された。100 pM、1nM、10 nM の OVM 抗原間では、ルシフェラーゼ活性に変化は無く、プラトーに達していると判定した。

以上の結果から、臍帯血は低親和性抗原特異的 IgE のために肥満細胞でのアレルギー反応は抑制されているが、生後 6 ヶ月から 14 ヶ月までの間に繰り返される抗原感作によって、OVM 特異的 IgE 抗体は Affinity Maturation を起こしてアレルギー、アトピーを引き起こす可能性が推定された。

D. 考察

本研究によって、これまで理論的には低親和性抗原特異的 IgE の存在が提唱されていたが、ヒトの臍帯血 IgE で初めてその存在が証明された。この IgE は抗原との親和性が低く、肥満細胞の Fc ϵ R1 に結合してもヒスタミン遊離シグナル伝達を引き起こさないことが判明した。このことは、胎児血や臍帯血にはアレルギー反応を起こすレベルのアレルゲンが存在するにもかかわらず、胎児にアトピー、食物アレルギーがないのは、胎児血や臍帯血の抗原特異的 IgE が低親和性のためと推定された。

一方 6 ヶ月、14 ヶ月齢乳児血の高親和性 OVM 特異的 IgE 抗体は、Hyper Mutation による Affinity Maturation の結果と考えられ、これらの抗体を持つ乳児のアトピー、食物アレルギーの発症に関与していると推測された。低親和性抗体から高親和性抗体への変化は、繰り返される抗原刺激による Hyper Mutation の結果であることから、生後 6 ヶ月までの間の抗原刺激を避けることでアレルギー、アトピーの発症を抑制できる可能性が示唆される。抗原刺激では、消化酵素による消化を受けない抗原が最も強い抗原刺激性のあることから、抗原の経皮感作が Hyper Mutation の有力なきっかけになる

と推定された。

E. 結論

臍帯血の抗原特異的 IgE 抗体は、低親和性抗原特異的 IgE 抗体で、肥満細胞からのスタミン遊離を引き起こさない。しかし、生後 6 - 14 ヶ月までの間に、低親和性 IgE 抗体は高親和性 IgE に成熟することが推定された。このことから、生後 6 - 14 ヶ月までの抗原刺激を低下させることでアレルギー、アトピーの発症を抑制できる可能性を示唆した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（平成 25 年度）

<論文発表>

1. 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.
2. Kamemura N, Kawamoto N, Nakamura R, Teshima R, Fukao T, Kido H: Low-affinity allergen-specific IgE in cord blood and affinity maturation after birth. **J Allergy Clin Immunol** 133 (3), 904-905, 2014.

<学会発表>

1. 亀村典生, 川本典生, 深尾敏幸, 近藤直実, 鈴木宏一, 窪田賢司, 木戸博: 出生から生後14ヶ月までの食物抗原特異的抗体価の変動についての検討. **第25回日本アレルギー学会春季臨床大会**, 横浜, 2013. 5. 11-12.
2. 品原和加子, 澤淵貴子, 亀村典生, 窪田賢司, 鈴木宏一, 木戸博: カルボキシル化DLC抗体チップを用いたアレルゲン性食物抗原の高感度定量測定. **第25**

回日本アレルギー学会春季臨床大会、
横浜、2013. 5. 11- 12.

3. 木戸博、亀村典生、多田仁美、品原和加子、鈴木宏一、窪田賢司: アレルギーの診断、発症、寛解の病態評価に必要な血液と粘膜の抗原量の新規高感度定量測定. **第25回日本アレルギー学会春季臨床大会**、横浜、2013. 5. 11- 12.
4. 窪田賢司、亀村典生、多田仁美、鈴木宏一、大矢幸弘、森田英明、市岡隆男、木戸博: 患者の採血負担を最小限にした低侵襲性高感度DLCマルチアレルギーチップの有用性. **第25回日本アレルギー学会春季臨床大会**、横浜、2013. 5. 11- 12.
5. 品原和加子、亀村典生、多田仁美、鈴木宏一、窪田賢司、木戸博: アレルギー診断・発症・寛解の病態評価に必要な血中アレルギー量の新規高感度定量測定法. **第63回日本アレルギー学会秋季学術大会**、東京、2013. 11. 28- 30.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

<特許取得>

1. 特許第 5322240 号、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、特許権者、国立大学法人徳島大学、発明者、木戸博、多田仁美、澤淵貴子
2. 特許第 5322242 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、特許権者、国立大学法人徳島大学、発明者、木戸博、多田仁美、澤淵貴子
3. 特許第 5342997 号、アレルギー疾患の判定方法、特許権者、国立大学法人徳島大学、オリエンタル酵母工業株式会社、木戸博、鈴木宏一

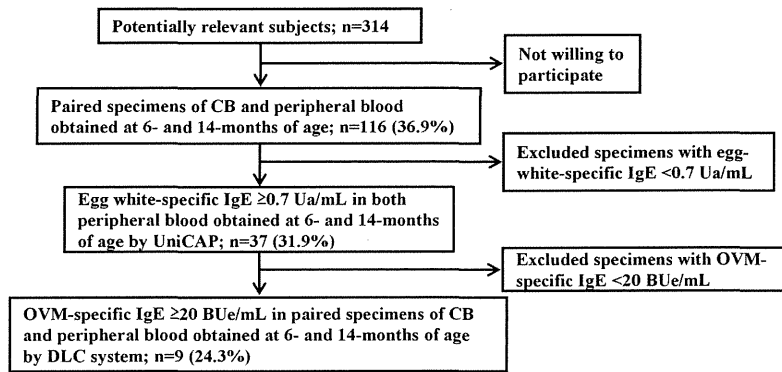


図 1、検体測定に用いた患者群。抗 OVM IgE 抗体を保有する 9 名の乳児の臍帯血、6 ヶ月齢、14 ヶ月齢検体を用いた。

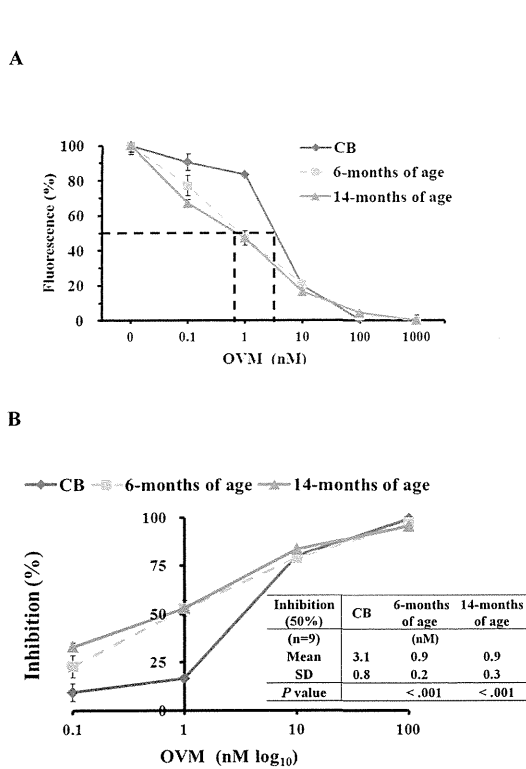


図 2、OVM 固相化基板への抗 OVM IgE 抗体の結合反応における種々の濃度の OVM による結合の競合阻害反応 (A)。各検体に対する 50% 結合阻害に要する OVM 濃度 (B)。

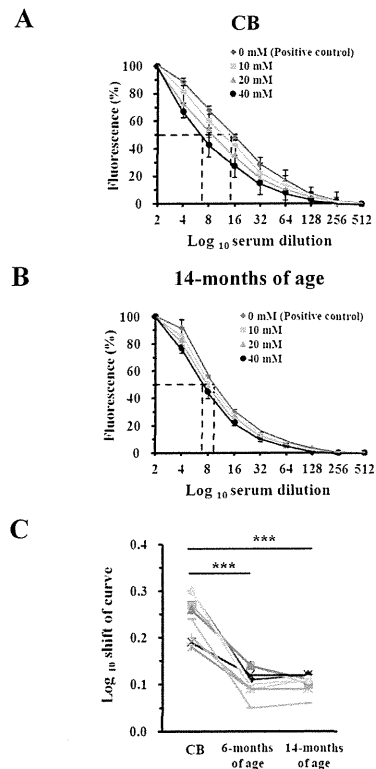


図 3、臍帯血検体 (A)、14 ヶ月齢検体 (B) の DEAE による抗 OVM IgE 抗体の OVM 固相化基板への結合阻害効果と、DEAE 存在下における臍帯血、6 ヶ月齢、14 ヶ月齢検体の 50% 結合に要する検体の希釈倍率 (C)。

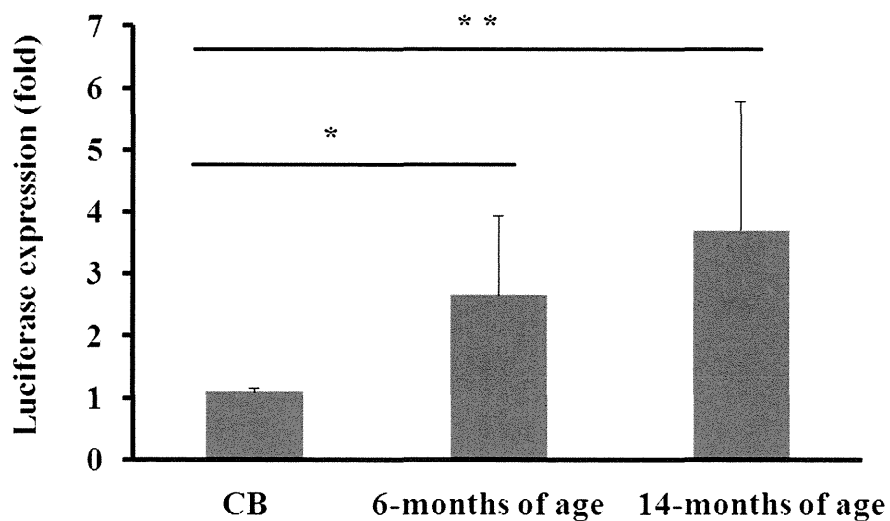


図4、臍帯血、6ヶ月齢、14ヶ月齢乳児の抗-OVM 特異的 IgE 抗体の Fc ϵ R1 を介するシグナル伝達の検証

ヒトの Fc ϵ R1 を導入し、ヒスタミン遊離シグナル伝達系としてルシフェラーゼレポーターを組み込んだ肥満細胞類似系 (RS-ATL8) を使用して、1 nM の OVM 抗原存在下に各検体のヒスタミン遊離シグナル伝達系を検証した。測定値は、OVM の無い無刺激時の値を 1 として臍帯血、6ヶ月齢、14ヶ月齢乳児の血液の値を示した。なお、各検体は抗-OVM 特異的 IgE 抗体価として 100 BUe/mL に合わせて評価した。