

アトピー性皮膚炎患者における黄色ブドウ球菌 (protein A欠損株) に対する液性免疫動態

岩 坪 秀 樹 河 島 尚 志 篠 本 雅 人
柏 木 保 代 武 隈 孝 治
東京医科大学小児科

key words : アトピー性皮膚炎, 黄色ブドウ球菌, IgE, IgG subclass

要 旨

アトピー性皮膚炎患者における黄色ブドウ球菌の感作状況を知るためprotein A欠損株を用いて, 菌抽出物に対する特異的IgEを測定した. さらに患者での液性免疫動態を知るため特異的IgG, IgG1, IgG2抗体, IgG subclassを測定し, 臨床像と比較検討した. 197例 (4ヶ月から59歳) 中59例 (29.4%) に特異的IgE抗体が検出された. 陽性者は生後7ヶ月以降に認められ, 加齢とともに陽性率は上昇していた. 陽性率は有意に重症例に高かった. 特異的IgE抗体は総IgEとは相関していなかった. 特異IgG1, IgG2抗体は特異IgE抗体陽性者ほど高く, 重症度とも相関しなかった. 測定した範囲では好中球殺菌能および貪食能は全例正常であった.

アトピー性皮膚炎患者では黄色ブドウ球菌に容易に感作されやすく, 特異IgG1, IgG2抗体は全身感染の防御に関連すると推察された.

はじめに

アトピー性皮膚炎 (以下AD) の皮膚感染巣からは高率に黄色ブドウ球菌 (以下黄ブ菌) が分離されることが知られている^{1,2)}. またAD患者の皮膚面は湿潤していることや, 擦過傷が多いことから, 皮膚感染巣から容易に菌の感作を受けやすいことが推測される. 今回, 小児のAD患者における黄ブ菌に対する感作状況を知る目的で, 黄ブ菌に対する特異的IgEを測定した. 黄ブ菌は非特異的に抗体を吸着するため, 非特異的吸着をおこさないprotein A欠損株を用いた. また, AD患者ではしばしば皮膚の黄ブ菌による感染が重症化の一因となっている. このためIgG subclass, 黄ブ菌特異的IgG, IgG1, IgG2抗体ならびに好中球機能を検索し, ADにおける黄ブ菌に対する易感染性を検討した.

対象および方法

1. 対象患者

4カ月から59歳までの東京医科大学小児科ならびに皮膚科で加療を受けている197例 (男102例, 女95例) のAD患者を対象とした. ADの内訳は軽症70例, 中等症69例, 重症58例である. ADの重症度の評価は吉田らの報告にしたがった³⁾.

2. 黄ブ菌特異IgE抗体の測定

ファルマシア社 (スウェーデン) 製のディスクを用い, 黄色ブドウ球菌特異的IgE抗体をRAST法により測定した⁴⁾. ディスクには非特異的吸着をおこさないprotein Aの欠損株であるWood46株の細胞蛋白を結合してあるものを用いた.

3. 黄ブ菌に対する特異的IgG, IgG1, IgG2抗体の測定

黄ブ菌に対する特異的IgG, IgG1, IgG2抗体の測定は同様にprotein A欠損株であるWood46株をブイヨンで増やし, 柴田らの方法⁵⁾ でドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate : SDS) で膜可溶性蛋白を精

Abbreviations : AD ; アトピー性皮膚炎, ELISA ; Enzyme-linked immunosorbent assay, RAST ; Radioimmunosorbent assay, 黄ブ菌 ; 黄色ブドウ球菌

製し、ELISA法で測定した。蛋白濃度をLowry法で測定し、抗IgG抗体測定時には50 μ g/ml、抗IgG1ならびにIgG2抗体測定時には10 μ g/mlに調節し、96穴U型のマイクロプレート（住友ベークライト）に1ウェル当たり100 μ lを4°C一晩固相化し、牛血清アルブミンで室温1時間postcoating後、血清を100倍に希釈して室温1時間反応させた。洗浄後IgG抗体測定時にはペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG (Fab')₂ヤギ血清（カペル社）を100倍に、IgG1、IgG2抗体測定には、一次抗体に抗ヒトIgG1、IgG2羊血清（ダコ社）を1000倍にして反応後さらに二次抗体にペルオキシダーゼ標識抗羊IgG 兎血清（カペル社）を1000倍にして、それぞれ室温1時間反応させた後、ついでcolormetricに反応させ450

nmで吸光度をMR580 MICROELISA AUTOREADER（Dynatech社）で測定した。測定には同一検体を階段希釈し、吸光度を測定し、標準曲線を作製しlinearityを確認した。抗ヒトIgG1、IgG2羊血清（ダコ社）はそれぞれ他のIgG subclassと反応しないことが確かめられている抗体を用いた。

4. IgG subclass測定

IgG subclass測定はすでに報告されているHayashibaraの報告によりサンドイッチELISA法にてduplicateを行い、健康正常児の各年齢ごとの平均値-2SD以下を低値例とした⁶⁾。

Table 1. Comparison of clinical severity of atopic dermatitis with IgE RAST score to *Staphylococcus aureus* (Wood 46 strain)

severity	number of patients	RAST score		
		0	1	2 or 3
mild AD	70	53 (75.7%)	6 (8.5%)	11 (15.7%)
moderate	69	47 (68.1%)	5 (6.2%)	17 (24.6%)
severe	58	21 (35.7%)	6 (10.3%)	31 (53.4%)
total	197	121 (61.4%)	17 (8.6%)	59 (29.4%)

There were statistical differences of the severity of atopic dermatitis between each group ($p < 0.05$).

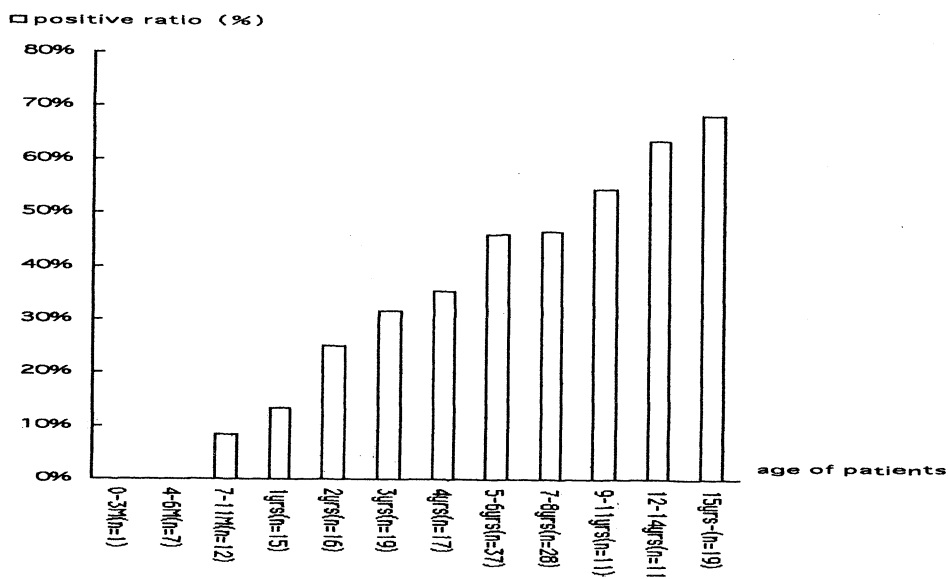


Figure 1. Positive ratio of RAST against *Staphylococcus aureus* (Wood 46) in patients with atopic dermatitis

5. 好中球機能

好中球機能はフローサイトメトリーにより多賀らの方法により貪食能と殺菌能を測定した⁷⁾。

結 果

1. AD患者における黄ブ菌RAST陽性率と重症度との比較 (表 1)

197例中59例 (29.4%) と高率にscore2以上の陽性者を認めた。重症度との比較では軽症では70例中11例 (15.7%), 中等症69例中17例 (24.6%), 重症例58例中31例 (53.4%) と重症ほど高率にscore2以上の陽性を認め、 χ^2 検定で0.01%以下の確率で重症度に相関していた。

2. 各年齢ごとのAD患者における黄ブ菌RAST陽性率 (図 1)

各年齢ごとの黄ブ菌RAST陽性率を検索したところ、生後7カ月より陽性者を認め加齢とともに、陽性

率は上昇し、17歳以上では70%が陽性であった。また総IgE値との相関は認めなかった。

3. AD患者における黄ブ菌特異的IgG, IgG1, IgG2抗体 (表 2)

表 2 に重症度別の特異的IgG, IgG1, IgG2抗体を示した。黄ブ菌特異的IgGは重症度と相関していなかった。また図 2 に測定した81例の黄ブ菌特異的IgG, IgG1, IgG2抗体のELISA吸光度のRAST score別の平均値と標準偏差を示した。一方黄ブ菌特異的IgG1, IgG2はRAST高値例ほど χ^2 検定で0.05%以下の確率で有意に高値を示していた。

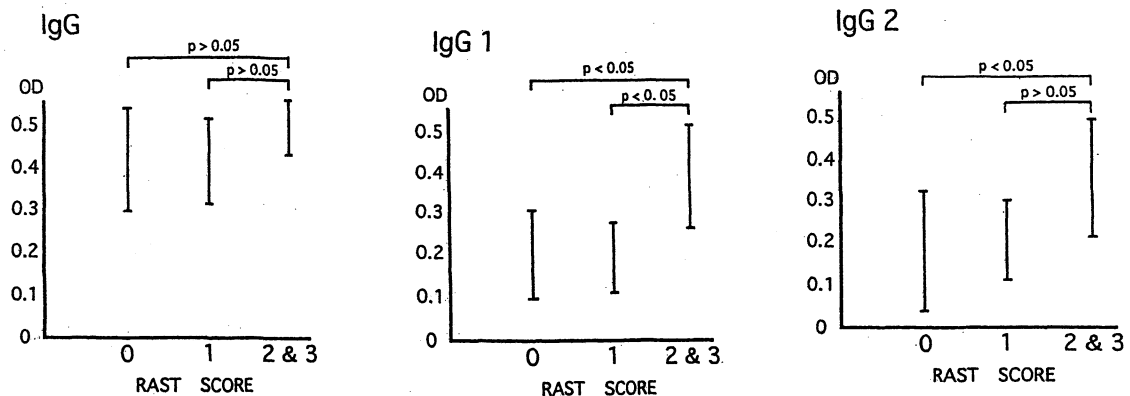
4. IgG subclass との比較 (表 3)

197例中88例でIgG subclassを測定し、7例でIgG subclassの内いずれかのIgG subclassが低値 (年齢別の正常範囲の平均値-2SD以下) を認めた。これらの黄ブ菌特異的IgG1, IgG2とそれぞれの低値のIgG

Table 2. Comparison of clinical severity of atopic dermatitis with specific IgG, IgG and IgG2 to *Staphylococcus aureus* (Wood 46 strain)

severity	number of patients	OD (mean $\pm$ S.D.)		
		IgG	IgG1	IgG2
mild	41	0.378 $\pm$ 0.113	0.175 $\pm$ 0.102	0.171 $\pm$ 0.150
moderate	28	0.394 $\pm$ 0.121	0.210 $\pm$ 0.115	0.184 $\pm$ 0.129
severe	19	0.414 $\pm$ 0.112	0.228 $\pm$ 0.152	0.203 $\pm$ 0.169

There was no statistical difference between each group.



There were statistical differences in IgG1 and IgG2 between the negatives and positives of RAST.

Figure 2. RAST score, specific IgG, IgG1 and IgG2 against *Staphylococcus aureus* in patients with atopic dermatitis

Table 3. RAST score, specific IgG, IgG1 and IgG2 to *Staphylococcus aureus* in patients with low values in IgG subclass

case	age	低値を示した RAST		anti- <i>St.aureus</i> antibodies (OD)		
		IgG subclass	score	IgG	IgG1	IgG2
1	3 y	IgG1	0	0.415	0.104	0.052
2	4 y	IgG2	0	0.393	0.110	0.108
3	1 y	IgG3	0	0.376	0.200	0.228
4	2 y	IgG3	0	0.370	0.138	0.148
5	3 y	IgG3	0	0.158	0.033	0.043
6	6 m	IgG4	0	N.D	N.D	N.D
7	7 y	IgG4	0	0.470	0.205	0.244

N.D ; not done

subclassを表2に示した。IgG1 subclassが低値であるのに、黄ブ菌特異的IgG1, IgG2が検出されるもの(症例1), IgG2が低値であるのに、黄ブ菌特異IgG1, IgG2が検出されるもの(症例2), IgG3 subclass低値で, IgG1, IgG2正常であるのに黄ブ菌に対する特異的IgG1, IgG2低値を示すもの(症例5)が認められた。

5. 好中球機能

食食能, 殺菌能は調べた34例全例でどちらも50%以上で, 異常低値を示した患者はなかった。

考 察

ADでの皮膚からは高率に黄ブ菌が分離されることが知られている。Alyらは正常者の皮膚からは約5%の分離率であるのに比べ, ADの病変部からは93%, 非病変部でも76%に分離され, 菌量も多量であることを報告している¹⁾。この理由として, AD患者特有の皮膚の乾燥, 汗の高ナトリウム濃度, 皮膚構成脂質の低下, 酸性度の低下が, 他の菌に比較して, 黄ブ菌の繁殖を選択的に助けるためと推察している。一方, ADの病変部では掻爬による擦過傷などから容易に菌による感作を受けていることが示唆される。黄ブ菌の細胞壁にはprotein Aが存在し, 非特異的反応を多く認めるため, IgE抗体や皮内テストは検索できない。今回, 我々は, protein A欠損株の黄ブ菌を抗原に用い, 特異抗体の測定を行い, 197例中59例(29.4%)と高率にscore2以上の陽性者を認めた。ADでのprotein A欠損株を用いた特異的IgE抗体は1982年にAbramsomらによる報告されている⁸⁾。彼らは高IgE

症候群とAD患者にのみ特異的IgE抗体を検出し, ADのない黄ブ菌感染者では検出されないこと, また黄ブ菌感染をもたないADでも特異的IgE抗体が検出されることを示した。つまり黄ブ菌の感染の有無には関連せずに, ADでの黄ブ菌にたいする即時型アレルギーが認められることを報告した。Motalaらは1986年に同様にADで高率に特異的IgE抗体が陽性であることを示している⁴⁾。国内では多田らがAD患者で高率に特異IgE抗体が検出されることを報告している⁹⁾。多田やMontalaの報告ではこの陽性とADの重症度が関連していたと報告しており, 我々の報告と一致した。一方, これら黄ブ菌に対するIgE抗体の加齢による変化は知られていない。今回の調査から生後7ヶ月から陽性者を認め, 加齢とともに陽性率が増し, 成人では70%まで達していることが確認された。反復する抗原暴露による感作によって, 加齢とともに陽性率が高くなっていることを示していると考えられる。一般に乳幼児のADが加齢とともに治癒ないし軽快することから考えて, 黄ブ菌に対するIgE抗体陽性者は, より重症で治りにくいと考えられる。一方, 柴田らは黄ブ菌のSDS可溶性膜蛋白だけを精製した場合にはADでの特異IgE反応は陰性で, 高IgE症候群のみ陽性であったと報告し, ADでの反応は非特異的であるとしている⁵⁾。しかし我々の調査では総IgE値と黄ブ菌の特異IgE抗体価を比較検討したが相関は認めず, 非特異的反応とは考えられなかった。しかしながら, 今回の黄ブ菌特異IgE測定に用いたファルマシア製抗原は, sonicationにより膜を破壊し, 遠心により核成分と細胞壁の成分を除き精製しており, 抗原作製法の差によると考えられる。近年では黄ブ菌の各種毒素にたいする特異的IgE抗体

もAD患者で検出されることが報告されており、今後黄ブ菌の抗原を詳細にわけた抗体検索を行い、この点は明確になると考えられる。

黄ブ菌による感染症ではIgG subclassのうち、IgG1とIgG2が感染防御に働くとされている。今回特異的IgE抗体と特異的IgG1、IgG2抗体と比較検討した結果では、抗原の多少の差はあるが、IgG抗体に有意差はなく、特異的IgG1、2は重症患者の多いscore 2, 3群の方が、有意に高値を示した。このことは、AD患者の皮膚で黄ブ菌が高率に分離されるにも拘わらず、全身性黄ブ菌感染が多くないことと関連しているのかもしれない。また好中球の貪食および殺菌機能は正常であることも、これを補助するものと考えられる。

我々は以前より小児のアレルギー疾患におけるIgG subclass値について報告してきた^{10,11)}。今回測定した患者の197例中88人でIgG subclassを測定を行い、内7例で年齢別正常値の-2SD以下の値をいずれかのIgG subclassで示していた。この7例の黄ブ菌に対する特異IgE抗体は、全例陰性であった。このことはIgG subclass異常をしめすAD患者ではクラススイッチなどの機序により、黄ブ菌に対するIgE抗体は産生しにくいと考えられ、AD患者の中にこういった一群が存在することが示唆される。

一方、IgG subclass のレベルでみると、黄ブ菌特異IgG1、IgG2と総IgG1、IgG2は平行していなかった。IgG subclass 欠損や低値例の易感染性について報告されているが¹²⁾、易感染性患児については個々の抗原に対するIgG subclassと臨床像を詳細に検討することでIgG subclass欠損例はさらに症例数が増加するものとする。

稿を終えるにあたり、御校閲を賜りました星加明徳教授に深謝致します。

参考文献

- 1) Aly R, Maibach HI, Shinfield HR : Microbial flora of atopic dermatitis. Arch. Dermatol. 113, 780-2, 1977.
- 2) Hoeger PH, Lerz W, Boutornnier A, Fournie JM : Staphylococcal skin colonization in children with atopic dermatitis: prevalence, persistence and transmission of toxigenic and nontoxigenic strains. J. Inf. Dis. 165, 1064-8, 1992.
- 3) 吉田彦太郎 ; アトピー性皮膚炎と好酸球, 好塩基球. 皮膚科Mookの1, 59-78, 1985.
- 4) Motala C., Potter PC, Weinberg EG., Malherbe D and Hughes J : Anti- *Staphylococcus aureus* - specific IgE in atopic dermatitis. J. Allergy Clin. Immunol. 78, 583-9, 1986.
- 5) 柴田留美子, 角田 茂, 吉田信之, 宮崎澄雄, 合屋長英, 西間三馨 : 高IgE症候群における黄色ブドウ球菌特異IgE抗体. 医学のあゆみ 125, 641-643, 1983.
- 6) Hayashibara, H., Tanimoto, K., Nagata, I., Harada, Y. and Shiraki, K. : Normal levels of IgG subclass in childhood determined by sensitive ELISA. Acta. Paediatr. Jap. 35, 113-117, 1993.
- 7) 多賀千之, 関秀 俊, 谷口 昂 : フローサイトメトリーを用いた微量全血法による好中球機能検査. 臨床免疫 17, 490-498, 1985.
- 8) Abramson JS, Dahl MV, Walsh G, Blumenthal MN, Douglas SD and Quie PG : Antistaphylococcal IgE in patients with atopic dermatitis. J. A. Aca. Dermatol. 7, 105-110, 1982.
- 9) 多田譲治, 戸井洋一郎, 鳥越利加子, 秋山尚範, 荒田次郎. アトピー性皮膚炎における黄色ブドウ球菌特異的IgE抗体と黄色ブドウ球菌由来物質による貼付試験. 日皮会誌 104(10), 1241-8, 1994.
- 10) 柏木保代, 島崎哲弥, 河島尚志, 千葉友幸, 武隈孝治, 星加明徳 : アレルギー患児におけるIgG subclass値に関する研究. 日本小児アレルギー学会誌 9(2), 101-6, 1995.
- 11) 柏木保代, 河島尚志, 武隈孝治, 篠本雅人, 袁麗萍, 島崎哲弥, 千葉友幸, : アレルギー患児におけるIgG subclass値に関する研究第2報気管支喘息患児におけるIgG subclass (IgG2, IgG3) 値の年令の推移. 日本小児アレルギー学会誌 10(1), 32-36. 1996.
- 12) 崎山幸雄 : IgGサブクラス欠乏と易感染性. 日本臨床免疫学会誌 21(4), 145-149, 1998.

The specific IgE, IgG, IgG1 and IgG2 levels against *Staphylococcus aureus*
(Wood 46 strain) in patients with atopic dermatitis

Hideki Iwatsubo, Hisashi Kawashima, Masato Sasamoto, Yasuyo Kashiwagi, Kouji Takekuma
Department of Pediatrics, Tokyo Medical University

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is often isolated from infected skin of patients with atopic dermatitis (AD). We examined the specific IgE, IgG, IgG1 and IgG2 serum levels against *S. aureus* to clarify the sensitization and the roles of the specific IgG antibodies against *S. aureus* in patients with AD. The antigen was purified from Wood 46 strain, defective of protein A. Fifty nine (29.4%) of 197 patients with AD were positive for specific IgE. The levels of IgG1 and IgG2 against *S. aureus* of the positives for IgE were much higher than those of the negatives. Patients with AD are supposed to be easily sensitized by *S. aureus*. It was suspected that IgG (IgG1 and IgG2) has a supportive role to prevent generalized infections with *S. aureus* in patients with AD.