

皮膚中の LTB<sub>4</sub> 及び PGE<sub>2</sub> を定量する実験では、SP 注射の 5 分後に注射部位の皮膚 (直径 2 cm) を切取り、10 μM インドメタシンと 10 μM zileuton を含有した氷冷エタノール中に直ちに入れた。この試料をホモジナイズ、遠心 (3,000 rpm, 5 分間) 後、その上清 2 ml を氷冷 0.1 M 酢酸で希釈して、BondEelute C2 カラムにかけた。LTB<sub>4</sub> と PGE<sub>2</sub> を 3 ml 酢酸エチルで溶出した。これを乾燥後、残留物を 150 μl の 0.01 M 炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 10.0) 中に懸濁し、5 分間超音波処理後、測定用緩衝液で希釈した。試料中の LTB<sub>4</sub> と PGE<sub>2</sub> を、各々の酵素免疫アッセイキットを用いて定量した。

NC 系マウスは、specific pathogen free (SPF) 環境下で繁殖・飼育した。4 週齢で離乳後、SPF 環境下で飼育を継続する群と、飼育条件を通常環境 (皮膚炎が見られるマウスを飼育している環境) に変更する群とに分けた。マウスの皮膚症状と吻側背部から頭部の後肢による掻き動作を 1 週間毎に観察した。皮膚症状は、スコア 0 (正常) からスコア 5 (頭部と吻側背部のほとんどの毛が抜け、目に重度の掻破痕あるいは眼球の損傷がある) まで 6 段階に分類した。

### C. 研究成果

ICR 系マウスの吻側背部に SP (100 nmol/site) を皮内注射すると、明らかな掻き動作を惹起した。掻き動作の回数は、SP 注射直後の 10 分間に最も多く、20 分間でほぼ治まった。糖質コルチコイドのデキサメタゾンとベタメタゾンを 0.3–3 mg/kg の用量で SP (100 nmol/site) 処置の 1 時間前に経口投与すると、SP の痒み関連反応惹起作用を有意に抑制した。また、ホスホリパーゼ A2 阻害薬 AACOCF<sub>3</sub> (10–100 nmol/site) を SP と一緒に皮内注射すると、SP の痒み関連反応惹起作用を用量依存的に抑制した。

シクロオキシゲナーゼ阻害薬のインドメタシン (1–10 mg/kg) 及びジクロフェナクナトリウム (3, 10 mg/kg) を SP (100 nmol/site) 処置の 30 分前に経口投与したが、SP の痒み関連反応惹起作用を抑制せず、調べた最高用量 (10 mg/kg) ではむしろ SP の作用を増大する傾向が認められた。プロスタノイド EP<sub>1</sub> 受容体を遮断する ONO-NT-012 (10–100 mg/kg) は SP の痒み関連反応惹起作用を抑制しなかった。

5-リポキシゲナーゼ阻害薬 zileuton (10–100 mg/kg) を SP (100 nmol/site) 処置の 30 分前に経口投与すると、SP の痒み関連反応惹起作用を用量依存的に抑制した。LTB<sub>4</sub> 受容体遮断薬 ONO-4057 (10–100 mg/kg) の 30 分前処置が SP の痒み関連反応惹起作用を用量

依存的に抑制したが、ペプチド・ロイコトリエン拮抗薬 ONO-1078 (10–100 mg/kg) の前処置は SP の作用を抑制しなかった。

無処置のマウスの皮膚中 LTB<sub>4</sub> 濃度は、 $2.2 \pm 0.3$  pg/mg tissue ( $n=6$ ) であったが、SP (100 nmol/site) の皮内注射の 5 分後には  $6.5 \pm 0.9$  pg/mg tissue ( $n=6$ ) と 3.0 倍に増加した。AACOCF<sub>3</sub> (100 nmol/site, 同時皮内注射) 及びデキサメタゾン (3 mg/kg, 1 時間前経口投与)、zileuton (100 mg/kg, 1 時間前経口投与)、L-668,169 (50 nmol/site, 同時皮内注射) が、SP の皮膚内 LTB<sub>4</sub> 濃度増加作用をほぼ消失させた。インドメタシン (10 mg/kg, 30 分前経口投与) は、SP の皮膚内 LTB<sub>4</sub> 濃度増加作用を抑制しなかった。

無処置のマウスの皮膚中 PGE<sub>2</sub> 濃度は、 $5.3 \pm 2.0$  pg/mg tissue ( $n=6$ ) であったが、SP (100 nmol/site) の皮内注射の 5 分後には  $14.3 \pm 1.2$  pg/mg tissue ( $n=6$ ) と 2.7 倍に増加した。AACOCF<sub>3</sub> (100 nmol/site)、デキサメタゾン (3 mg/kg)、インドメタシン (10 mg/kg) 及び L-668,169 (50 nmol/site) が、SP の PGE<sub>2</sub> 増加作用をほぼ消失したが、zileuton (100 mg/kg) は影響を及ぼさなかった。

LTB<sub>4</sub> は、0.001–0.03 nmol/site の範囲で用量依存的に掻き動作を惹起した。LTB<sub>4</sub> の用量が 0.1 nmol/site 以上では、反って掻き動作惹起作用が減弱し、3 nmol/site 以上ではほとんど掻き動作惹起作用が見られなかった。LTB<sub>4</sub> (0.03 nmol/site) の掻き動作惹起作用は、ONO-4057 (0.003–0.03 nmol/site) の同時皮内注射で用量依存的に抑制された。ロイコトリエン D<sub>4</sub> (0.01–0.3 nmol/site) 及び PGE<sub>2</sub> (0.003–300 nmol/site) は掻き動作を惹起しなかった。なお、デキサメタゾン (3 mg/kg, 1 時間前経口投与) は、LTB<sub>4</sub> (0.03 nmol/site) の掻き動作惹起作用を抑制しなかった。

NC マウスを SPF 環境下に繁殖・飼育し、4 週齢で通常環境に移動すると、移動後 6 週目から明らかな掻き動作の増加が認められた ( $n=12$ )。通常環境への移動後 8–16 週目までの間は、平均掻き動作数に変動はあるものの、30 分間当りの掻き回数は 40–100 回と高い値を示した。一方、SPF 環境下で継続的に飼育した群では、少なくとも 20 週齢まで 30 分間当りの掻き動作数が数~20 回の間であった ( $n=8$ )。通常環境へ移動後した群の皮膚症状は、移動後 4 週目から毛並みの悪化や顔と耳に掻破痕などが観察されるようになり、8 週目にかけて更に悪化したが、その後少なくとも 16 週目までは平均スコアが 2.5 で耳あるいは目に明らかな損傷が見られるほどまでには皮膚症状が悪化することはなかった。SPF 環境下で飼育した群で

は、局所の一時的脱毛や喧嘩によると思われる傷が見られることがあったが、通常環境下での飼育群で観察されたような毛並みの悪化や掻破痕は見られなかった。

#### D. 考察

糖質コルチコイドのデキサメタゾンとベタメタゾンをSPの皮内注射の1時間前に単回経口投与すると、SPにより惹起される痒み関連反応を抑制した。この成績から、糖質コルチコイドに、急性の抗痒痒作用があることが示唆される。SPにより惹起される痒み関連反応は、SP注射後1-3分で起こり、20分でほぼ消失する急性の反応である。したがって、糖質コルチコイドには、抗炎症作用及び免疫抑制作用とは異なる機序で抗痒痒作用を発現すると推測された。糖質コルチコイドは、多様な薬理作用を有するが、その一つにホスホリパーゼA2の阻害によるアラキドン酸産生の抑制作用がある。糖質コルチコイド以外にホスホリパーゼA2を阻害する薬物としてAACOCF3をSPと一緒に皮内注射したところ、SPの痒み関連反応惹起作用を用量依存的に抑制した。以上の成績から、アラキドン酸カスケード系がSPの起痒作用に関与することが明らかになった。糖質コルチコイドのSP誘発痒み関連反応に対する抑制作用にホスホリパーゼA2活性阻害によるアラキドン酸カスケード系の抑制が関与すると考えられる。

そこで、シクロオキシゲナーゼ系と5-リポキシゲナーゼ系の関与について比較検討した。シクロオキシゲナーゼ阻害薬である非ステロイド性抗炎症薬インドメタシンとジクロフェナクナトリウムは、SPの痒み関連反応惹起作用を抑制しなかった。調べた最高用量(10 mg/kg)のインドメタシンは、SPの皮内注射による皮膚内PGE2濃度上昇作用を完全に抑制したにも拘わらずSPの痒み関連反応惹起作用を抑制しなかったことから、PGE2を含むシクロオキシゲナーゼ系の代謝産物がSPの起痒作用に関与する可能性は低いと考えられる。EP1受容体遮断作用を有するONO-NT-012がSPの痒み関連反応惹起作用を抑制しなかったこともこの考えと矛盾しない。

LTB4の皮内注射がマウスに掻き動作を惹起した。この用量反応曲線がベル型を示した理由は不明であるが、最大効果を示した用量が0.03 nmol/siteであり、この用量の効果は、SP及びヒスタミン、セロトニンの100 nmol/siteの効果にほぼ匹敵するものであった。LTB4(0.03 nmol/site)の掻き動作惹起作用は、ONO-4057(0.003-0.03 nmol/site)の同時皮内注射で用量依

存的に抑制されたことから、LTB4が皮膚内のLTB4受容体を介して掻き動作を惹起したと考えられる。したがって、LTB4は強力な痒み内因性因子の一つである可能性が高い。

LTB4受容体遮断薬ONO-4057と5-リポキシゲナーゼ阻害薬がSPの痒み関連反応惹起作用を用量依存的に抑制し、ペプチド・ロイコトリエン拮抗薬はSPの作用を抑制しなかったことから、SPの作用発現にLTB4産生が関与することが強く示唆される。以上の成績を勘案すると、糖質コルチコイドが、LTB4の掻き動作惹起作用を抑制せず、SPの痒み関連反応惹起作用と皮膚内LTB4産生作用を共に抑制した成績から、糖質コルチコイドの抗痒痒作用がLTB4産生の抑制により発現したと考えられる。

NCマウスは、SPF環境下で繁殖・飼育すると少なくとも20週齢まで掻き動作の増加が見られなかったが、飼育環境を通常環境へ変えることにより6週後から掻き動作の増加が見られた。この成績は、NCマウスにみられる高頻度の掻き動作がアレルギー反応の結果であるとの考えを支持する。皮膚症状は、通常環境へ移動後4週目より悪化がみられ、掻き動作より僅かに早く起こるようである。しかし、8-16週目の間は皮膚症状スコアの平均が約2.5で安定し、より週齢の高いマウスで観察された耳や目の欠損などの重篤な皮膚症状は観察されなかったことから、アトピー皮膚炎の発症初期の状態に対応するのかもしれない。

#### E. 結論

第一の研究テーマに関しては、LTB4が強力な痒みの内因性因子であることと、糖質コルチコイドの鎮痒作用の少なくとも一部にLTB4産生抑制作用が関与する可能性を明らかにした。アトピー性皮膚炎の痒みにLTB4がどの程度関与するか明らかにすることが今後の課題として残されているが、LTB4の産生酵素とLTB4受容体が新たな鎮痒薬開発の重要なターゲットとなる可能性が期待される。

第二の研究テーマに関しては、NCマウスをアトピー性皮膚炎の痒みの動物モデルとして利用できる可能性を明らかにした。今回の繁殖・飼育条件のNCマウスを用いることにより、アトピー性皮膚炎の痒みの発症過程と発症初期の痒みの抑制法の研究が可能と考えられる。

# 重症成人アトピー性皮膚炎の治療方法の確立と評価に関する研究

分担研究者 溝口 昌子

聖マリアンナ医科大学皮膚科主任教授

## 研究要旨

重症成人アトピー性皮膚炎に対するステロイド外用以外の治療法として、顔面皮疹に対するシクロスポリン外用と色素沈着に対する Q スウィッチルビーレーザー照射の有効性を検討した。両治療とも有効であり、治療の選択肢となりうると考える。

## A 研究目的

コントロールの難しい成人重症アトピー性皮膚炎(AD)の治療法の確立と評価が目的である。今回はステロイド外用以外での治療法を検討した。

## B 研究方法

①19人のAD患者顔面に5%シクロスポリン(CyA クリーム)を2週間外用し、治療前後で皮疹の重症度(スコアで表現の推移)、CyA血中濃度、生検皮膚病変の免疫組織学的検討を行った。

②炎症症状のない頸部のさざ波様色素沈着に対し、Q スウィッチルビーレーザーを使用し、 $6\text{J}/\text{cm}^2$ の条件で照射し、経過観察を行って非照射部位と比較した。また皮疹を生検し光顕、電顕で観察した。

## C 研究結果

①治療前後の重症度スコアは対応ある t 検定で有意の差( $p<0.01$ )で改善をみた。血中 CyA 濃度は検出限界以下であった。

免疫組織学的検討では治療前後で CD1 陽性ランゲルハンス細胞の減少および同細胞の高親和性 IgE レセプター発現抑制がみられた。

②6ヶ月の観察で Q スウィッチルビ

ーレーザー照射部位は明らかに色素沈着が改善した。組織学的に、真皮に多数のメラノファージがみられ、電顕的に基板の多層化が認められた。

## D 考察

CyA は同様の作用機序を示すタクロリムスと比較すると分子量がより大きく、同じ効果を示すのに *in vitro* でより高濃度を要することから、外用剤としての効果はやや弱いと考えられるが、今回の検討では臨床的には十分な効果を示した。血中 CyA 濃度は検出できず、副作用はなかった。AD 頸部色素沈着は炎症さえ治まれば自然消退するとの考えもあるが、Q スウィッチルビーレーザー照射により、よい早く改善をみた。色素沈着を苦しめている患者には、積極的に治療を行うべき考える。

## E 結論

重症 AD 患者にはステロイド軟膏外用以外の治療も必要であるが、顔面皮疹へのシクロスポリン外用と、頸部色素沈着部位への Q スウィッチルビーレーザー照射は応用すべき治療法と考える。

課題名 重症成人アトピー性皮膚炎の治療方法の確立と評価に関する研究  
氏名 分担研究者 溝口 昌子  
所属機関 聖マリアンナ医科大学皮膚科主任教授

## 1. はじめに

アトピー性皮膚炎(AD)は以前は子供の病気で成人例はあっても稀であったが、最近では成人例の増加とその重症化、難治性が問題となっている。皮膚科専門医ならば、軽症・中等症のADのコントロールは、ステロイド外用剤と保湿剤を駆使することにより可能であるが、問題となっているのは長期間治癒しない重症のADである。今回はステロイド外用剤以外の治療法を検討したいと考え、免疫抑制薬であるシクロスポリン外用による顔面の治療効果とQスイッチルビーレーザーによる頸部さざ波様色素沈着の治療効果を検討した。また治療前後の病変部組織を採集し、組織学的、電顕的に検討した。

## 2. シクロスポリン外用療法

免疫抑制薬の外用剤としてのADの治療に使用された報告のあるものには、シクロスポリン<sup>1)</sup>、タクロリムス<sup>2)</sup>、アスコマイシンがある。今回は聖マリアンナ医科大学難病治療研究センターで作製した5%シクロスポリンクリームを使用した。

### 1) 方法

対象患者：1ヶ月以上ステロイド薬を外用せず、informed consentが得られたAD患者19例(男13例、女6例)、年齢は18~36歳(平均22.7歳)。  
塗布方法：顔面に5%CyAクリームを1日2回単純塗布した。

皮疹の評価：掻痒、紅斑、苔癬化を症状の程度により、0から4まで5段階にスコア化し(0：なし、1：軽微、2：軽度、3：中等度、4：高度)、スコアの合計数を改善の指標として治療前と治療14日後に効果判定した。

臨床検査成績：治療前後に血液・生化学、尿の一般的検査を行った。また、2週間後の治療終了後にRIA法でCyA血中濃度を測定した。

免疫組織学的検討：同時に前腕に同様の治療を行

った3例の患者の皮膚を治療前後に採集し、CD4、CD1、HLA-DR、AER37抗体で免疫染色を行った。

### 2) 結果

1例の増悪例を除いた18例にある程度の改善を認め、治療前に7.9あった総スコアの平均は14日後には4.4となり、対応あるt検定では有意の差( $p<0.01$ )で改善した。2例で治療後にスコアが0となり著明改善した。

臨床検査で異常を示したものはなかった。また、CyA血中濃度は全例で検出限界の20ng/ml以下であった。副作用は全例なかった。

免疫組織学的に、表皮・真皮内のCD4陽性細胞が、治療前に比べ著明に減少した。活性化T細胞の指標となるHLA-DR陽性真皮浸潤細胞は治療後著明に減少した。表皮ランゲルハンス細胞はCD1陽性、HLA-DR陽性であるが、これも軽度減少した。AER37高親和性IgEレセプター( $Fc\epsilon RI$ )に対する抗体(順天堂羅先生から供与)で、治療前は表皮(ランゲルハンス細胞)と真皮(真皮樹枝状細胞、肥満細胞など)に発現していたが、治療後は著明に減少していた。ランゲルハンス細胞は $Fc\epsilon RI$ を発現しているが、表皮ではCD1陽性のランゲルハンス細胞の減少より、 $Fc\epsilon RI$ の指標であるADR37の減少の方がより顕著で、CyAクリームによる治療の影響で $Fc\epsilon RI$ の発現が抑制された可能性がある。

### 3) 考察

今回の臨床試験では5%CyAクリームはAD顔面の皮疹に有効で、副作用はなかった。二重盲検法はおこなっていなかったが、治療後に統計学的に有意なスコアの改善をみたこと、治療後の皮疹判定でスコアが0となった症例が2例あったことから、有効性は充分あると考えられる。免疫抑制薬の外用剤で日本で治験を行い発売予定があるのは、0.1%タクロリムス軟膏である。CyAの

分子量は 1202.635 の環状ペプチドでタクロリムスは分子量 822.05 のマクロライド系化合物で、全く異なる化学構造を持つが、その免疫抑制効果は非常に類似している。後者は分子量の少ない分、またより低濃度で同様の効果が得られる分、外用薬としては有利である。0.1%タクロリムス軟膏の治療成績をみると、吉草酸ベタメタゾンとほぼ同等である。AD 急性炎症の顔面皮疹に対しては 1 週間で著効をみている。しかしながら全身に塗ると血中濃度の上昇があり、塗布開始直後にはヒリヒリ感などの刺激感を約 3 分の 2 の患者が訴えている。

CyA クリームでは二重盲検法はしていないが治療成績からは 0.1%タクロリムスより効果は劣ると考える。しかしながら血中濃度が上昇しないこと、刺激感がないことなどから、成人 AD の顔面や、小児 AD には充分使用可能である。今回他部位へも併用した症例もあるが、血中濃度は上昇していなく、全身的な副作用も生じにくいと考える。また内服で生じる副作用の多毛は外用でも懸念されるが、本薬を約 6 ヶ月間使用した症例でも多毛は生じていない。治験報告によればタクロリムス軟膏では長期間使用しても、ステロイド長期外用の副作用である皮膚の委縮や血管拡張は生じていない。ステロイド外用薬と交互に使用すれば、両薬の副作用を軽減することができる。ステロイド外用薬は現在多種のものが発売され使用されている。強さも最強から弱まで 5 段階に分かれている。免疫抑制剤の外用薬もタクロリムス軟膏 1 剤だけでなく、やや効果が劣っても刺激感のない CyA 外用薬も使用できる方が AD の治療選択肢が広がり、重症患者のコントロールも可能となることが期待される。

### 3. Q スウィッチルビーレーザーによる頸部さざ波様色素沈着の治療

重症成人 AD 患者の頸部さざ波様色素沈着は dirty neck とも言われ、他人にみえる部位だけに思春期の患者の治したいという希望は強い。組織学的に検索を行うと共に、Q スウィッチルビーレーザー治療を行い、治療せずに経過を観察した部位と比較した。

#### 1) 方法

頸部にさざ波様色素沈着があり、炎症がほぼ鎮静化している患者を対象とした。本色素沈着は炎症さえなくなれば自然に消退していくとの報告があるのでレーザー療法施行部位と非施行部位に分けて経過を観察した。

組織学的・電顕的検討：informed consent の得られた患者より組織片を採集し、二分して一方を 10%ホル

マリン固定後パラフィン切片を作製した。もう一方を電顕的観察のためにグルテアルデヒド・オスミウム二重固定後脱水、エボン包埋し、超薄切片作製後、ウラニウム鉛二重染色をした。

Q スウィッチルビーレーザー照射：6J/cm<sup>2</sup> の条件で照射した。1 ヶ月毎に色素の消退、レーザー照射による炎症後の色素沈着などを観察した。

#### 2) 結果

光顕的・電顕的所見：病変部基底層のメラニン色素は正常部基底層とほとんど差がなかった。真皮には多数のメラノファージと少数のリンパ球がみられた。電顕的には、基板の多層化と、真皮メラノファージがみられた。表皮メラノサイトには異常はなかった。

レーザー照射：一部再燃もみられたが、ほとんど照射部位でも 5 ヶ月後の現在治療前より著明な改善をみた。非照射部位も少しは色素沈着の程度は軽くなかったが、照射部位の方がすぐれていることは明らかであった。

#### 5) 考察

今回、色素沈着を光顕、電顕的に観察したが、著明なマクロファージと基板の多層化が、目立った。この所見は先天性疾患である Colo-Engman 症候群の頸部網目状色素沈着の所見とよく似ている。組織学的所見だけでなく AD と本症候群は色素沈着の紋様もよく似ている。AD のさざ波様の紋様も単に皮膚の解剖学的構造に関連して、メラニン色素が沈着しやすい部位と、しがたい部位があるために生じたものと考えられる。

真皮の深い位置のメラノファージを破壊するためには真皮まで到達する Q スウィッチルビーレーザーによる治療が適している。まだ症例数は少ないが、今回でその有効性が示された。思春期の患者の頸部の色素沈着を自然治癒するからと長期間放置するのは、美容的にも問題がある。本治療は自然治癒を待つよりはるかに短期間で有効であった。

#### 4. 結論

重症 AD 患者にはステロイド軟膏外用以外に治療も必要であるが、顔面皮疹へのシクロスポリン外用と、頸部色素沈着部位への Q スウィッチルビーレーザー照射は応用すべき治療法と言える。

1) Mizoguchi M et al: Cyclosporin ointment for psoriasis and atopic dermatitis. Lancet 339: 1120, 1992.

2) Nakagawa H et al: Tacrolimus ointment for atopic dermatitis. Lancet 344: 833, 1994.