

今後は、急性増悪期にあるAD患児での酸化ストレスの程度とそれがAD治療に対する反応性に与える影響について検討する予定である。

E. 結論

小児のAD患者においては酸化ストレスが増強し、内因性NO産生が低下していることが示された。以上のことから、酸化ストレスを特異的に抑制するレドックス制御薬剤によるAD治療の有用性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ueno H, Matsuda S, Katamura K, Mayumi M, Koyasu S: ZAP-70 is required for calcium mobilization but is dispensable for mitogen-activated protein kinase (MAPK) superfamily activation induced via CD2 in human T cells. *Eur. J. Immunol.* 30: 78-86, 2000.
- 2) Tsukahara H, Hiraoka M, Kobata R, Hata I, Ohshima Y, Jiang M, Noiri E, Mayumi M: Increased oxidative stress in rats with chronic nitric oxide depletion: measurement of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion. *Redox Rep.* 5: 23-28, 2000.
- 3) Nishimura M, Tsukahara H, Hiraoka M, Ohshima Y, Osaka Y, Tanizawa A, Mayumi M: Systemic inflammatory response syndrome and acute renal failure in *Hemophilus influenzae* septic meningitis. *Am. J. Nephrol.* 20: 206-211, 2000.
- 4) Tsukahara H, Noiri E, Jiang M, Hiraoka M, Mayumi M: Role of nitric oxide in human pulmonary microvascular endothelial adhesion. *Life Sci.* 67: 1-11, 2000.
- 5) Tsukahara H, Jiang M, Kobata R, Osaka Y, Hiraoka M, Mayumi M: Endogenous nitric oxide formation in term and preterm newborns. *J. Dev. Nephrol.* 8: 15-19, 2000.
- 6) Tsukahara H, Haruta T, Ono N, Kobata R, Fukumoto Y, Hiraoka M, Mayumi M: Oxidative stress in childhood meningitis: measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine concentration in cerebrospinal fluid. *Redox Rep.* 5: 295-298, 2000.
- 7) Omata N, Tsukahara H, Ito S, Ohshima Y, Yasutomi M, Yamada A, Hiraoka M, Nambu M, Deguchi Y, Mayumi M: Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis. *Life Sci.* 2001 (in press).
- 8) Hata I, Shigematsu Y, Ohshima Y, Tsukahara H, Fujisawa K, Hiraoka M, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J, Kotsuji F, Sudo M, Mayumi M: Involvement of thioredoxin in the regulation of growth hormone secretion in rat pituitary cell cultures. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 2001 (in press).
- 9) 藤沢和郎、大嶋勇成、眞弓光文: 母親が使用した塩化リゾチーム外用剤により卵白アレルギー反応を呈した乳児例. *アレルギーの臨床* 258: 68-70, 2000.
- 10) 眞弓光文: 小児アトピー性皮膚炎の免疫学的機序. 特集 小児のアトピー性皮膚炎. *小児科診療* 63: 7-11, 2000.
- 11) 大嶋勇成、眞弓光文: 食物アレルギーの免疫療法の展望. 特集食物アレルギー 2000. *小児科臨床* 53: 617-621, 2000.
- 12) 大嶋勇成、眞弓光文: DC と OX40/OX40L. *Surgery Frontier* 7: 191-194, 2000.
- 13) 大嶋勇成、眞弓光文: アレルギー性疾患の発症前診断: 出生前診断の必要性和可能性. 特集 小児気管支喘息のライフスタイル. *喘息* 13: 21-26, 2000.
- 14) 眞弓光文: 食物アレルギーとアトピー性疾患. *兵庫県医師会医学雑誌* 43: 16-19, 2000.
- 15) 眞弓光文: アトピー性疾患. 特集 小児における現代病の対策と治療. *医薬ジャーナル* 36: 3338-3341, 2000.

2. 学会発表

- 1) Mayumi M, Ohshima Y, Tsukahara H, Hiraoka M, Nakamura H, Yodoi J, Ito S, Katamura K, Matsuo Y: Reduction of intramolecular disulfide bonds of ovomucoid and ovalbumin by thioredoxin modulates their digestibility and allergenicity. 17th International Congress of Allergology and Clinical Immunology, Sydney, Australia, 2000.
- 2) 眞弓光文: 小児アレルギー疾患の病態と発症予測・予防の可能性. 第34回群馬小児喘息研究会, 群馬, 2000.
- 3) 眞弓光文: 小児アトピー性疾患の病態と治療. 第17回新潟小児免疫・アレルギー研究会, 新潟, 2000.
- 4) 古川 漸、眞弓光文: 全身性炎症性疾患の免疫・アレルギー学的側面. 第37回日本小児アレルギー学会, 群馬, 2000.
- 5) 柳原行義、眞弓光文: IgEをめぐる基礎と臨床. 第50回日本アレルギー学会総会, 横浜, 2000.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 研究協力者

塚原宏一 福井医科大学医学部小児科
大嶋勇成 福井医科大学医学部小児科

アトピー性皮膚炎とストレスに関する研究

分担研究者 瀧川雅浩 浜松医科大学皮膚科教授

研究要旨 精神的なストレスがアトピー性皮膚炎を悪化させることはよく知られている。繰り返してストレスを受けた患者では不安が生じ、さらに自律神経系の不均衡を招き、湿疹が悪化するのであろう。本研究ではアトピー性皮膚炎患者52人について、発疹の状態と状態・特性不安度 (State-Trait Anxiety Index : STAI) との関係調べた。発疹の客観的な重症度として血清 LDH 値、IgE 値、末梢血好酸球数を検討した。痒みは visual analog scale (VAS) で評価した。患者では正常人に比べ STAI は有意に高い値を示し、かつ特性不安値と状態不安値は正に相関した。血清 LDH 値は状態不安とのみ相関した。血中好酸球数は STAI とは相関しなかった。血清 IgE 値は特性不安と相関する傾向がみられた。VAS は状態不安と相関していた。これらの結果はアトピー性皮膚炎の治療における心理的なアプローチの重要性を示唆するものである。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎の増加・悪化の大きな原因としてストレスが古くから指摘されている。たとえば、学校や職場での人間関係、親子の葛藤、生活環境の変化、不規則な生活など精神的、肉体的なストレスで発疹の増悪、痒みの増強が認められるケースが多い。このような家庭内、職場でのストレスは都市化、核家族化など複雑な社会環境を反映して増加しており、ストレスでアトピー性皮膚炎が悪化する患者が増えている。近年では、阪神大震災後の調査によれば、被災地では約4割の患者に、また被災地周辺の地区では3割の患者に症状の悪化が認められた。これに対し、被災地から離れた地区では殆どアトピー性皮膚炎の悪化がみられなかった。地震による被災および災害がこちらにも及ぶかもしれないという不安がストレスとなって症状の悪化を招いたと考えられる。

アトピー性皮膚炎の診断基準の一つでもある痒みの本態については、不明な点がおおい。ヒスタミンなど末梢性の起痒物質のみならず中枢性の痒みもそのベースにあると考えられている。何故ストレスが痒みを増強するかは良く分かっていないが、おそらく、ストレスが脳辺縁系の活動を亢進し、エンドルフィンやエンケファリンといった脳内起痒物質のレベルの異常を引き起こし、痒みが強くなるのであろう。

一方、ストレス反応として神経内分泌系の反応性が低下することが知られており、ストレス伝達物質の分布や量の面からアトピー性皮膚炎患者におけるストレスの影響を捉えようとする試みがある。たとえば、皮膚部において神経ペプチドが高濃度に存在したり、神経ペプチドを含む神経線維が増加しており、ストレスによるアトピー性皮膚炎の悪化を分子レベルで裏付けるものと思われる。

不安状態とは、個人が脅威と感じる不快な経験であり、ストレスが繰り返し加わると生じる。このようにして生じた強い不安そのものがさらにストレスとなり、いわゆる psychosomatic vicious cycle が生まれる。Spielberger は不安を状態不安(State Anxiety ;SA)と特性不安(Trait Anxiety ;TA)に分け、State-Trait Anxiety Index(STAI)として客観的に不安を簡便に評価した。我々はアトピー性皮膚炎患者の様々な症状や血清学的パラメーターと STAI との相関を調べ、ストレスに基づく異常なアレルギー反応を実態として把握し、あわせて本疾患におけるストレス対策の重要性を検討した。

B. 研究方法

浜松医科大学皮膚科外来および入院の軽症一中等症の成人アトピー性皮膚炎患者 (18 歳以上) を対象とした。患者には本研究の目的を十分説明し、研究協力の

同意が得られた。内訳は総数 52 名(平均年齢 24.3±7.1 歳)、男性 20 名(24.5±8.4 歳)、女性 32 名(24.1±6.3 歳)であった。発疹の重症度のパラメーターとして血清 IgE 値、血清 LDH 値および末梢血好酸球数を検索した。かゆみの程度は visual analog scale(VAS)で調べ、0 (まったくかゆくない) から 100 (夜も眠れないぐらいかゆい) であらわした。血清 LDH 値 (正常値、150-200) は 263.4±84.9IU/ml、末梢血好酸球数 (正常値、0-500) は 943.2±732.0/ml、血清 IgE 値 (正常値、250 以下) は 5818±6208IU/ml、VAS 値は 39.6±25.1 であった。不安度を客観的に評価する手段として STAI 検査を行った。各検査値、VAS 値と STAI との関連を統計的に検討し、 $p=0.05$ 以下を有意とした。

C. 研究結果

患者の SA 値および TA 値はそれぞれ 46.2±9.3, 49.3±8.5 であった。成人健常者では SA 値が平均 36.6, TA 値が平均 38.8 であり、アトピー性皮膚炎では男、女ともに健常人値より有意に高かった。これまで報告された種々の疾患における STAI と我々の結果をまとめると、神経症、十二指腸潰瘍などでは当然 STAI が高いが、アトピー性皮膚炎患者も STAI はかなり高値で、TA 値のほうが SA 値より高かった。また、TA 値と SA 値をプロットすると、両者は互いによく相関していた (Kendall 順位相関、 $p<0.0015$)。

血清 LDH 値は発疹が重症なほど高く、客観的な指標になりうる事が知られている。LDH 値は TA 値と相関がみられた (Kendall 順位相関、 $p<0.035$) が、SA 値とは相関しなかった。すなわち、アトピー性皮膚炎の症状が重い患者では特性不安度が高いことが明らかとなった。もう一つの重症度の指標である末梢血好酸球数は TA あるいは SA 値とは相関しなかった。おそらく、血清 LDH 値上昇と好酸球数増加は異なった重症化プロセスを反映するのであろう。

血清 IgE 値については、TA 値と相関する傾向を認めた ($p=0.08$)。さらに、TA 高値 ($50<$) 群は低値 ($50>$) 群にくらべ、IgE レベルが有意に高かった (Mann-Whitney 検定、 $p<0.05$)。一方、患者を IgE 高値 (10000 IU/ml 以上) 群、低値 (1000 IU/ml 以下) 群とに分けてプロットしてみると、IgE 値が高い患者では TA が高いにもかかわらず SA は低いという傾向がみられた。通常、ストレス状況下 (皮膚悪化時) は、特性不安度

および状態不安度がともに高くなるが、IgE 高値群アトピー性皮膚炎患者の特異な不安状態は、他疾患患者でみられるストレスに対する精神的反応とは異質であることを示唆している。

かゆみの客観的評価法である VAS 値と不安度については、TA 値とは相関は認めないものの、SA 値とは $p=0.074$ で相関する傾向を認めた。

皮膚の増悪時と軽快時での各パラメーターについて検討した。増悪時は LDH 値 265.9±83.3、VAS 値 39.6±24.6 であり、軽快時には LDH 値 208.2±53.8、VAS 値 19.5±14.4 と減少していた。一方、STAI の検討では、SA 値は入院前 45.3±9.2 が退院時 42.5±7.8 へ、また TA 値は入院前 49.7 ±9.1 が退院時に 46.4±10.5 へといずれも低下していた。すなわち、皮膚の改善とともに不安状態も軽減していることが判明した。

D. 考察

これまでの報告にみられるように、今回の検討でも、アトピー性皮膚炎患者では STAI が高く、不安状態にあることがわかった。皮膚症状を反映する血清 LDH 値や VAS がそれぞれ特性不安、状態不安と相関すること、皮膚炎の状態が改善するにつれ、不安状態も軽減することは不安状態と重症度の強い関連を裏付けるものである。血清 IgE 値が特性不安に相関する理由は不明である。一つの可能性として、アトピー性皮膚炎患者では、生来的な素因としてストレスに異常に反応するため、いわゆる神経系・内分泌系・免疫系というトライアングルが影響をうけ、IgE 抗体産生が亢進するのかもしれない。強いかゆみと状態不安度が相関することは、パーソナリティ (高い特性不安) →搔痒・掻破→症状悪化→心理的反応 (高い状態不安) という過程を考えれば、容易に推測できる。このことから、アトピー性皮膚炎の発疹、痒みが不安状態と関連しているものと考えられる。すなわち、本来特性不安の高いアレルギー素因のある患者では様々なストレスにより、容易にアトピー性皮膚炎の悪化を招く。その結果生じた痒みは状態不安を強く引き起こし、結果として患者では STAI が高値となり、さらなる発疹の悪化を招く。

アトピー性皮膚炎の重症度と不安状態との間の相関については、意見が分かれている。奥野らは成人アトピー性皮膚炎患者について、症状、STAI、CES デブ

レッション・スケール、State-Trait Anger Expression Scale、YG 性格検査をおこなっている。その結果、患者では健康人に比べ、また、掻痒・掻破の強い患者は弱い人と比べ、不安が高く、こういった患者のパーソナリティが掻痒・掻破を強くおこし、症状、心理反応に悪影響を与えていることを明らかにしている。一方、Ginsburg らは重症度と不安状態の間には相関が見られないとしている。また、Linnet らはアトピー性皮膚炎では正常成人に比べて、不安度が高く、Dermatology Life Quality(DLQ)が低いと報告している。患者群では重症度(SCORAD)と DLQ 値、DLQ 値と STAI との間に正の相関がみられるが、重症度と STAI の間には相関はなかった。おそらく、患者の選択や重症度の判定法の違いによりこのような相反する結果がでたのであろう。

アトピー性皮膚炎と情緒障害との関係は古くから知られている。ストレスがおおい母親は児の面倒をみず、乱暴に扱うため、児と母親との間の精神的に安定した結びつきがみられない。成人の場合でも、精神発達異常は個人の性格や母親への強い依存などと深く関係している。このような児や成人では強い情緒障害・強い不安、怒りや敵意感情の不適切処理、抑鬱的・神経症的、自我防衛的、情緒性に乏しいのため、ストレスによりアトピー性皮膚炎の悪化が容易におきる。とくに、不快な出来事(ストレッサー)を処理するための努力(コーピング)として掻破行動が強くおき、さらなる症状の悪化を招くと言う悪循環をくりかえす。

神経・内分泌系と免疫系のクロストークにより、生体のホメオスターシスは維持されている。この二つのシステムを結びつける言語として、サイトカイン、ホルモン、神経ペプチド、神経伝達物質、カルシウム、サイクリックヌクレオチド、プロテインキナーゼなどの分子がある。このホメオスターシスに破綻が起きた場合、自己免疫疾患、神経変性疾患、感染症、精神的ストレス、アレルギー疾患などの病態がみられる。アトピー性皮膚炎の発疹はアレルギー特異的Th 2細胞好酸球の浸潤を主としたアレルギー反応である。ストレスは、末梢神経からサブスタンスPを遊離させたり組織のホルモンやサイトカインのレベルを変調させることにより、炎症の程度を左右する。たとえば、サブスタンスPはマスト細胞からヒスタミンなどの化学伝達物質の遊離を促進し、Th細胞のサイトカイン分泌プロフィールに影響をおよぼす。またストレス関連ホ

ルモンが血管内皮細胞の接着分子発現パターンを変化させ白血球の皮膚からの遊走を阻止し、炎症が増強する可能性がある。

E. 結論

このように、不安とそれにともなうストレスは中枢性のみならず末梢性にも様々なストレス関連分子の遊離をうながして、生体のホメオスターシスを混乱し、アレルギー炎症の悪化と掻痒の増強をもたらす。このような意味で、メンタルケアはアトピー性皮膚炎治療の大きな柱となる。ストレス緩和の基本は医師・患者間の信頼関係をうちたて、患者が安心して治療に専念できる環境をつくることである。アトピー性皮膚炎をもつことの負担とストレスとについて患者あるいはその家族とつっこんで話をし、感情移入してくれる医療従事者も必要である。そのような作業がうまくゆけば、患者が持っている様々な不安を軽減でき、アトピー性皮膚炎の精神面からの治療も成功しよう。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 大島昭博：アトピー性皮膚炎のサイトカイン療法。アレルギー科 8(3): 205-210, 1999.
- 2) 戸倉新樹：アトピー性皮膚炎とスーパー抗原。宮地良樹 他(編)皮膚科診療プラクティス 文光堂 36-37, 1999.
- 3) 戸倉新樹：Tリンパ球に作用するアトピー性皮膚炎の治療薬。日本炎症学会誌 19(2): 101-105, 1999.
- 4) 戸倉新樹：アトピー性皮膚炎 一最近の話題一。大宮市医師会報 515, 190-192, 1999.

2. 学会発表

- 1) 橋爪秀夫：アトピー性皮膚炎とクエン酸タンドスピロンの効果。第63回東京支部総会，東京，1999.
- 2) 橋爪秀夫，瀧川雅浩：STAIによる不安度とアトピー性皮膚炎活動性パラメータとの関連。第50回日本アレルギー学会，横浜，1999.

G. 知的所有権の取得状況

なし

ストレスによるアトピー性皮膚炎の増悪機序の検討
— サブスタンスPによる線維芽細胞からのエオタキシンの誘導とその抑制機序の解析 —

分担研究者 片山 一朗 長崎大学医学部皮膚科教授

研究要旨 皮膚科領域で問題となっているアトピー性皮膚炎においては皮膚炎の増悪因子としては皮膚バリアー機能の障害やIgE抗体の過剰産生などの免疫異常に加えストレスや発汗異常などの神経内分泌的な調節異常がその発症、伸展に大きな関与をしている可能性が報告されている。最近、免疫システムと神経内分泌系が深く関与していることは明らかになりつつあるが、どのような調節機構により互いに増強、制御され、皮膚炎発症に関与しているかは不明の点が多い。我々は最近非神経細胞である皮膚の表皮ケラチノサイトがAutocrineにサブスタンスPを産生することを報告している。サブスタンスPは通常物理的、精神神経的な刺激、特にストレスにより神経終末から分泌され、皮膚肥満細胞よりのケミカルメディエーターの遊離、炎症細胞の遊走サイトカインの作用増強など多様な生物活性を持っている。また、エオタキシンはケモカインの中で強力な好酸球遊走因子であり、皮膚の線維芽細胞より多量に遊離されることが報告されている。今回、我々はアトピー性皮膚炎におけるストレスとTh2リンパ球性の炎症との関係を明らかにするため、皮膚線維芽細胞を培養し、IL-4, サブスタンスP, ヒスタミン等を用いて刺激し、そのエオタキシンの誘導と産生機構に関して分析したので、報告させて頂く。

A. 研究目的

我々は既にサブスタンスPが皮膚の角化細胞、線維芽細胞よりも遊離されることを報告している。サブスタンスPは通常様々な刺激により神経終末から分泌され、皮膚肥満細胞よりのケミカルメディエーターの遊離、炎症細胞の遊走、サイトカインの作用増強など多様な生物活性を示すが、アトピー性皮膚炎などのアレルギー性皮膚炎症における神経内分泌的な側面からの増幅因子として重要な役割を果たしていると考えられる。アトピー性皮膚炎患者においては皮膚角化細胞と線維芽細胞もサイトカインの刺激によるケモカインの産生を介して皮膚局所の炎症の増悪に深く関与していると考えられる。今回皮膚線維芽細胞よりのエオタキシン産生に対するサブスタンスPの増強効果の機序を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

ヒト線維芽細胞を培養し、サブスタンスP、ヒスタミン、IL-4にて刺激し、その上清中のエオタキシン蛋白をELISA法にて測定した。

同時に細胞も回収し、エオタキシンmRNAの発現をRT-PCRにて検討した。

C. 研究結果

上記の細胞におけるエオタキシン産生をELISAにて解析した結果、IL-4, サブスタンスP, ヒスタミンのそれぞれ単独刺激後、各々有意なエオタキシン産生が見られた。さらに、IL-4にサブスタンスP、ヒスタミンを添加する事によってエオタキシン産生が増強することとエオタキシン蛋白産生と一致するエオタキシンmRNA発現の増強パターンも確認できた。なお、その

増強の機序を分析するため、IL-4の受容体の変化をRT-PCRにて解析した結果、サブスタンスP、ヒスタミンによるエオタキシンmRNA発現の増強に伴い、IL-4の受容体の増強も認められ、これらの刺激は線維芽細胞のIL-4受容体の発現率を増強することによりIL-4依存性のエオタキシン産生を増強すると考えられた。

D. 考察

アトピー性皮膚炎の増悪因子は多様であり、非アレルギー性、アレルギー性機序の炎症と皮膚バリアー機能異常などが考えられているが、その本態は不明である。しかし最近、ストレスなどの精神的な要素が注目されつつある。われわれはストレスなどによって神経終末からのみ遊離されると考えられるサブスタンスPが非神経組織（表皮細胞）からも遊離されることを報告している。このことより、神経のみならず非神経細胞からも遊離されると考えられるサブスタンスPとアレルギー炎症に深く関与しているヒスタミンの、Th2炎症の重要なメディエーターであるエオタキシン産生に対する影響を検討した。エオタキシンはケモカインの中で最も強力に好酸球を遊走する因子である。さらに、エオタキシンの産生は線維芽細胞からTh2サイトカインであるIL-4刺激によって誘導されることが報告されている。この研究では、末梢より遊離されるサブスタンスPとヒスタミンが線維芽細胞からのエオタキシン産生に及ぼす影響と、IL-4のエオタキシン産生に対する増強効果を検討した。結果をまとめてみると、サブスタンスPとヒスタミンは各々線維芽細胞より刺激後経時的にエオタキシンを誘導したこと、その産生はサブスタンスPとヒスタミンの特異的な受容体拮抗剤により抑制されたこととさらに、サブスタンスPとヒスタミンはIL-4誘導性のエオタキシン産生を増強したことである。この結果よりアレルギー炎症の重要なメディエーターであるサブスタンスPとヒスタミンは、皮膚線維芽細胞よりエオタキシンを産生すると共に、IL-4誘導性のエオタキシン産生を増強することが認められた。このことはサブスタンスPがTh2性アレルギー炎症を増幅することを示し、アトピー性皮膚炎などのアレルギー性皮膚炎症における神経内分泌的な側面からの増幅因子として重要

な役割を果たしていると考えられた。

E. 結語

サブスタンスPとヒスタミンは、ヒト皮膚線維芽細胞よりエオタキシンを誘導すると共に、IL-4誘導性のエオタキシンの産生を増強した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Bae SJ, Matsunaga Y, Tanaka Y, Katayama I: Autocrine induction of substance P-mRNA and-peptide in cultured normal human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999; 263: 327-333

2. 学会発表

- 1) Bae SangJae, 浜崎洋一郎、片山一朗：グリココルチコイドによる培養人ケラチノサイトよりのサブスタンスPの誘導－皮膚における神経内分泌、免疫系のサーキット－。第4回皮膚病研究・治療フォーラム，札幌，2000
- 2) □ 祥宰、松永義孝、田中洋一、片山一朗：ワークショップ3皮膚の生物学2．皮膚における非神経細胞からのサブスタンスPの産生とその調節機構．第99日本皮膚科学会総会・学術大会，仙台，2000

G. 知的所有権の所得状況

なし

研究協力者

Bae SangJae	長崎大皮膚科
天満美輪	長崎大皮膚科
松永義孝	長崎大皮膚科
濱崎洋一郎	長崎大皮膚科
竹中 基	長崎大皮膚科

分担研究報告書

アトピー性皮膚炎患者の皮膚病変部の T 細胞レセプターの検討

分担研究者 相馬良直 聖マリアンナ医科大学 皮膚科学教室助教授

研究要旨 我々は RT/PCR-SSCP 法を用いてアトピー性皮膚炎（以下 AD）患者の皮膚病変にオリゴクローナルな T 細胞の集積が存在することを報告した。AD 患者よりの末梢単核球分画を精製ヤケヒョウヒダニ（*Dermatophagoides pteronyssinus*）（以下 Dp）抗原で刺激することにより AD 患者皮膚病変に認めたものと同じの T 細胞クローンの誘導があるか RT/PCR-SSCP 法を用いて比較検討した。AD 患者 6 名中 4 名にて一部の TCR の V β 領域ファミリーにおいて両検体間で同一の泳動度を示すバンドが存在した。これらの RT/PCR-SSCP により見いだされた Dp 添加培養 PBMC と皮膚病変部の共通のバンドは CDR3 が同一の DNA シーケンスを有していた。以上より Dp 特異的 T 細胞クローンが AD 皮膚病変部に存在することが示された。

A. 研究目的

AD の皮疹は臨床および組織学的に湿疹に類似し、その病変部には CD3 陽性 T 細胞の浸潤が認められるが、関連するアレルギー機序に関しては不明の点が多い。

T 細胞は、抗原提示細胞上に提示された MHC 抗原ペプチド複合体を T 細胞レセプター（以下 TCR）を介して認識する。このような認識により T 細胞内に増殖シグナルが伝達され、提示された抗原を特異的に認識する TCR を有する T 細胞クローンが増殖すると考えられる。そこで、我々はこれまで免疫反応の中心である TCR に注目して、病変部、あるいは末梢血中のリンパ球集団で集積しているクロナタイプを検出するシステム（RT/PCR-SSCP）を開発した。これを用い我々は *in vitro* で特異抗原刺激によって一定の T 細胞クロナタイプが増加してくることを観察し得た。これまで、この方法を用い AD 患者の皮膚病変にてオリゴクローナルな T 細胞の集積が認められると報告している。一方、ダニ抗原は、AD 病変形成への関与につき、

ダニ抗原の貼付試験、RAST スコアの高値、末梢血単核球よりのダニ抗原特異的 T 細胞の確立、病変部のダニ特異的 IgE の沈着などの報告がされ、発症への環境抗原として重視されている。

そこで、AD 患者の皮膚病変にてオリゴクローナルな集積を示す T 細胞がダニ抗原特異的 T 細胞と同様のクローンであるかを検討する必要がある。

AD 患者の皮膚病変にダニ抗原を特異的に認識する TCR を有する T 細胞浸潤の存在を確認することを目的に、患者よりの末梢単核球分画を Dp 抗原で刺激することにより AD 患者皮膚病変に認めたものと同じの T 細胞クローンの誘導があるか RT/PCR-SSCP 法を用いて検討する。近年、AD 患者の増加が指摘されている。治療の第一選択はステロイドホルモン外用療法であるが、不適当な使用により種々の問題が発生し、臨床の場での混乱が生じている。より特異性の高い治療法の開発の必要性が求められている現状で新たな治療法の開発が求められている。

B. 研究方法

①対象

対象疾患：満18歳以上の成人アトピー性皮膚炎 6名

②被験者の同意取得方法

実施医師は本試験開始前に試験の目的、方法、さらに、被験者が本試験に同意しない場合であっても不利益は受けないこと、同意した場合でも随時これを撤回できること、被験者の人権保護など必要な事項について被験者に充分説明し、被験者の自由意思による同意を文書で得る。なお、被験者が未成年の場合、本人および保護者の両方から同意を得る。当研究は当該施設の倫理委員会にての承認を受けている。

③試験方法

(1)皮膚検体採取

皮膚病変生検；局麻下に紅斑部より約1～2cm大の皮膚生検施行。非病変部も同様に約1～2cm大の両端を2箇所互いに離れた部分を選択。

(2)末梢単核球培養

末梢単核球分画（以下 PBMC）採取；ヘパリン加シリンジにて AD 患者末梢血 20ml 採取し、Ficoll-Conray 比重遠心法で PBMC を分離、採取。半数の PBMC を培養に用いた。残りの半数は cell stock media で-80℃にて保存。

末梢単核球培養；太田らの方法に準じ Dp 抗原または PPD を添加して PBMC 培養を行った。第14日の培養 PBMC より RNA 抽出した。

(3)Total RNA 抽出

凍結皮膚組織は 1ml の Isogen に入れ、ホモジネーターにて1分間細砕。

培養末梢単核球分画は 0.5ml の Isogen に攪拌した。その後、AGPC 法に従い total cytoplasmic RNA を抽出した。

(4)cDNA 合成

抽出 RNA 分画 5mg に reverse transcriptase と random hexamer oligonucleotide を添加し、40度2時間反応させ、抽出 RNA 分画より相補的 DNA を合成した。

(5)PCR (polymerase chain reaction)

合成した相補的 DNA を各々 V β 部分と C β 部分の primer の組み合わせにて増幅を施行。35 サイクルで Thermocycler で反応させた。

(6)SSCP 法

PCR 産生 DNA は 5% glycerol 添加非変成 5% polyacrylamide gel を用い電気泳動し、PCR 産生 DNA の三次構造の差異を検出した。

(7)TCR β 鎖の CDR3 領域の DNA シークエンス分析

5 の RT-PCR/SSCP にて認められた同一の泳動度を示した TCR β 鎖の CDR3 領域の band の DNA シークエンス分析を行った。

C. 研究成果

①成人 AD 患者の非培養 PBMC と Dp 添加培養 PBMC の RT/PCR-SSCP の比較

6名の無治療成人 AD 患者の非培養 PBMC のは RT/PCR-SSCP を行った所、バンドの形成を認めず、スメアーを呈した。しかし、これを2週間 Dp 添加培養するとバンドの形成を認めた。同様に陽性対照として PPD を2週間 Dp 添加培養するとバンドの形成を認めた。これらの2群泳動度は異なっていた。無治療成人 AD 患者6名の Dp 培養 PBMC より PCR-SSCP で得られた V β 領域ファミリーは特に一定の傾向を示さなかった。

②成人 AD 患者の Dp 添加培養 PBMC と皮膚病変部の RT/PCR-SSCP の比較

6名の無治療成人 AD 患者にて Dp 添加培養 PBMC と皮膚病変部の一箇所よりの PCR 産物である DNA を用いて RT/PCR-SSCP を行い両検体を比較した。6名中4名で一部の TCR の V β 領域ファミリーにおいて両検体間で同一の泳動度を示すバンドが存在した。これは同一の TCR の V β 領域の mRNA が存在が示唆した。無治療成人 AD 患者3名の Dp 培養 PBMC と皮膚病変部の一箇所にて同一の泳動度を示した V β 領域ファミリーは特に一定の傾向を示さなかった。

③成人 AD 患者の Dp 添加培養 PBMC と皮膚病変部の TCR β 鎖の CDR3 領域 DNA シークエンス分析

Dp 添加培養 PBMC と皮膚病変部の一箇所よりの PCR 産物で RT/PCR-SSCP により見いだされた共通のバンドより DNA を抽出し

た。これらを E.coli に組み込み増幅後、抽出して CDR 3 につきシーケンス分析を行った所、RT/PCR-SSCP により見いだされた Dp 添加培養 PBMC と皮膚病変部の共通のバンドは CDR 3 が同一の DNA シーケンスを有していた。これより Dp 特異的 T 細胞クローンが AD 皮膚病変部にあることが示された。DNA シーケンス分析にて CDR 3 のアミノ酸配列の一致も確認した。

D. 考察

AD 患者皮膚病変部にオリゴクローナルに集積している T 細胞は成人 AD 患者 PBMC を Dp 添加培養して誘導される T 細胞クローンと同一の TCR β 鎖の CDR 3 を有することが示された。これにより皮膚病変部の T 細胞は Dp 特異的であると示され、AD 患者皮膚病変部での結果 (in vivo) と AD 患者の Dp 添加培養 PBMC の結果 (in vitro) の一致を見た。また、今回認められた T 細胞レセプターを標的とした新たな治療法の開発の可能性を示唆している。

E. 結論

今回の検討で皮膚病変に集積する T 細胞クローンの一部はダニ抗原を認識していることが示された。これらのダニ抗原特異的 T 細胞が病態の形成に関与している可能性、そして AD の病因としてのダニ抗原の関与の可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H Takahama, K Masuko-Hongo, T Kato, Y Kawa, K Nishioka, M Mizoguchi : Accumulation of T cell clonotype in the skin lesions of patients with psoriasis vulgaris. J Invest dermatol, 114: 833, 2000
- 2) 相馬良直、溝口昌子 : 抗アレルギー薬・長期投与と QOL. 薬のサイエンス, 7: 97-99, 2001

- 3) T Kanbe, Y Soma, M Kashima, M Mizoguchi : Serum levels of soluble stem cell factor and soluble KIT are elevated in patients with atopic dermatitis and correlated with the disease severity. Br J Dermatol, in press

2. 学会発表

- 1) 高濱英人、窪田泰夫、加藤智啓、河陽子、溝口昌子、田中篤、西岡久壽樹 : アトピー性皮膚炎患者皮膚への抗原特異的 T 細胞クローンタイプの集積、第 21 回日本研究皮膚科学会 1996. 東京
- 2) 高濱英人、窪田泰夫、加藤智啓、河陽子、西岡久壽樹、溝口昌子 : シンポジウム、アトピー性皮膚炎・その病態と治療・アトピー性皮膚炎患者への抗原特異的 T 細胞クローンタイプの集積、第 27 回日本皮膚アレルギー学会 1997. 東京
- 3) H Takahama, Y Kawa, K Masuko-Hongo, T Kato, K Nishioka, M Mizoguchi : Accumulation of dermatophagid pteronyssinus specific T cell clones in the atopic dermatitis skin lesion. Twenty second meeting of Pacific skin research club. 1999 Taipei.

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業）

分担研究報告書

アトピー性皮膚炎の治療薬としての抗酸化剤（CX-659S）

接触皮膚炎に対する in vivo 効果と表皮ランゲルハンス細胞への作用について

分担研究者 古賀哲也

研究協力者 内博史 陳其潔 古江増隆

九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野

研究要旨 ステロイド剤、免疫抑制剤以外のアトピー性皮膚炎の外用治療薬として、強い抗酸化作用を有する抗酸化剤(CX-659S)に注目し、その塗布による in vivo 効果をマウスやモルモットの接触皮膚炎モデルで、in vitro 効果をランゲルハンス細胞に及ぼす影響を観察することで、それぞれ解析した。CX-659S の塗布によりピクリルクロライドあるいはオキサゾロンによるマウス接触皮膚炎の耳介腫脹、炎症性細胞浸潤、局所における IL-1 β と TNF- α の mRNA 発現が、塗布量依存的に抑制された。また、CX-659S の塗布によりモルモット接触皮膚炎の紅斑や浮腫も塗布量依存的に抑制された。CX-659S は in vitro 培養によりヒトおよびマウス表皮シートのランゲルハンス細胞の細胞内 IL-1 β 産生を抑制し、マウス表皮ランゲルハンス細胞の CD80, CD86 の発現を抑制した。このように、強い抗酸化作用を有する CX-659S は、塗布により接触皮膚炎を抑制し、また表皮ランゲルハンス細胞の細胞内 IL-1 β の産生を抑制した。CX-659S はアトピー性皮膚炎などの外用治療薬に用いられると考えられた。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎はさまざまな接触抗原、環境抗原、刺激性物質の外的刺激に応じて生ずる生体反応で、その病態形成には浸潤してくる免疫担当細胞はもちろんのこと、ランゲルハンス細胞、表皮角化細胞、線維芽細胞、肥満細胞など皮膚に局在する種々の細胞が総合的に複雑に関与することが明らかになりつつある。このような観点からアトピー性皮膚炎の外用治療薬を考えた場合、ランゲルハンス細胞や表皮角化細胞をターゲットにした治療薬が想定可能である。

アトピー性皮膚炎の治療では主に免疫担

当細胞をターゲットにした治療薬としてステロイド軟膏、免疫抑制剤軟膏が用いられ、急性の病変には優れた効果をあげている。表皮角化細胞をターゲットにした治療薬として保湿性外用薬が用いられるが、その治療効果は少なく、慢性再発性の病変に対しても、ステロイド軟膏や免疫抑制剤軟膏が長期に多用され、副作用の発現を考慮すると、作用を異にする治療薬の開発が望まれる。

ところで、アトピー性皮膚炎の病態における免疫担当細胞の集積や活性化、また表皮角化細胞やランゲルハンス細胞の機能発現には、サイトカインや接着分子が重要な役割を

演じている。最近、オキシダントが細胞内情報伝達や遺伝子の転写因子の活性化などに関与し、サイトカイン産生や接着分子発現といった炎症の病態を調節していることが示されている。このように、オキシダントは直接的あるいは間接的にアトピー性皮膚炎の病態の中心的なメディエーターとして病態に関与している可能性がある。

そこで、ステロイド剤、免疫抑制剤以外のアトピー性皮膚炎の外用治療薬として、強い抗酸化作用を有する抗酸化剤(CX-659S)に注目し、その塗布による *in vivo* 効果をマウスやモルモットの接触皮膚炎モデルで、*in vitro* 効果をランゲルハンス細胞に及ぼす影響を観察することで、それぞれ解析した。

B. 研究方法

1、動物:ICRマウスは日本 Clea 社より、ハートレイモルモットは日本 SLC 社より、C3H/HeNマウスは日本 Charles River 社より、それぞれ購入した。

2、試薬: CX-659S は Sumika Fine Chemicals 社から供与された。ピクリルクロライドと DNCB は東京化成工業より、オキサゾロンは Aldrich Chemical 社より、それぞれ購入した。ポリクローナルラビット抗ヒト IL-1 β 抗体、ポリクローナル抗マウス IL-1 β 抗体は、PharMingen 社より購入した。

3、ICRマウスをハプテン(7%ピクリルクロライド、0.5%オキサゾロン)で感作し、7日目に惹起後(1%ピクリルクロライド、0.5%オキサゾロン)、種々の量(0.01-1.0 mg/ear)の CX-659S を塗布し、その接触皮膚炎惹起相に対する効果を耳介腫脹(24時間後)、耳介の組織学的所見(24時間後)、耳介局所におけるサイトカイン mRNA 発現(2時間後)を示標にして検討した。

4、モルモットを 39%DNCB で感作し、

14日目に 0.5%DNCB で惹起後、種々の量(0.03-1.0 mg/site)の CX-659S を塗布し、その接触皮膚炎惹起相に対する効果を24, 48, 72時間後に紅斑や浮腫を示標にして検討した。

5、ヒトおよび DNFB 前処置 C3H/HeNマウスより表皮シートを作成し、種々の濃度(10 μ M-1mM)の CX-659S と 24時間培養後に、さらに 10 μ M モネンシンを加えて24時間培養し、ランゲルハンス細胞の細胞内 IL-1 β 産生への影響を confocal laser microscopy を用いて免疫組織化学的に検討した。

6、C3H/HeNマウス表皮より細胞浮遊液を作成し、種々の濃度(10 μ M-1mM)の CX-659S と 72時間培養し、ランゲルハンス細胞の活性化の指標である CD80, CD86, CD40, CD54, MHC class IIなどの表面分子の発現への影響をフローサイトメトリーで検討した。

7、動物実験では動物福祉の観点において十分に配慮した。また、人権および利益の保護の取り扱いについて十分に配慮した。

C. 研究結果

1、ピクリルクロライドあるいはオキサゾロンによるマウス接触皮膚炎の耳介腫脹(24時間後)が、CX-659S の塗布により塗布量依存的に抑制され、特に 0.1 mg/ear 以上の塗布で有意に抑制された。また組織学的にも24時間後の耳介の浮腫や炎症性細胞浸潤が塗布量依存的に抑制され、特に 0.1 mg/ear 以上の塗布で有意に抑制された。さらに RT-PCR 法にて、ハプテン惹起 2時間後には耳介局所における IL-1 β と TNF- α の mRNA 発現が有意に増加しているが、CX-659S の塗布により IL-1 β と TNF- α の mRNA 発現も塗布量依存的に抑制された。

2、モルモットの DNCB 接触皮膚炎の紅

斑や浮腫(24 時間後)が、CX-659S の塗布により塗布量依存的に抑制され、特に 0.1 mg/site 以上の塗布で有意に抑制された。

3、CX-659S は 1mM の濃度で、in vitro 培養によりヒトおよびマウス表皮シートのランゲルハンス細胞の細胞内 IL-1 β 産生を抑制した。一方、CD1a および Ia の発現は抑制しなかった。

4、CX-659S は in vitro 培養によりマウス表皮ランゲルハンス細胞の CD80, CD86 の発現を抑制した。一方、CD40 および CD54 の発現は抑制しなかった。

D. 考察

アトピー性皮膚炎は慢性再発性の湿疹性病変を主症状とする皮膚疾患であり、その背景には遺伝的な体質、様々な環境因子、精神的要因などが複雑に絡み合った多因子疾患である。本症の発症や病勢の推移はこれらの種々の要因に大きく左右されるために治療法も多面的総合的な、かなり個人差を考慮した治療法が必要となる。現在のところ、治療の目標は、” 症状を抑え、寛解の維持、急性増悪の予防、QOL の改善 ” であり、治療法は画一的なものではなく、原因アレルゲン、重症度、患者の年齢・社会的条件、合併症などを考慮して選択して行うことになる。今後将来、患者が医療から解放されるような新しい治療薬の開発（サイトカイン療法、神経ペプチドをターゲットにした治療薬、ランゲルハンス細胞や表皮角化細胞をターゲットにした治療薬、化学伝達物質の遊離抑制剤、化学伝達物質の受容体拮抗剤、ペプチド免疫療法、DNA ワクチンなどの特異的減感作療法、Th1-Th2 バランス異常を是正する治療薬など）が強く望まれている。

CX-659S は強い抗酸化作用を有する抗酸化剤であり、CX-659S の塗布により、ピクリルクロライドあるいはオキサゾロンによ

るマウスの接触皮膚炎が抑制されることが、耳介腫脹(24 時間後)、耳介の組織学的所見(24 時間後)、耳介局所におけるサイトカイン mRNA 発現(2 時間後)を示標にした実験にて、判明した。また、CX-659S の塗布により、モルモットの DNCB 接触皮膚炎が抑制されることも判明した。このことより、ヒトにおいても、CX-659S は外用により、種々の抗原に対する接触皮膚炎を抑制する可能性が考えられる。

アトピー性皮膚炎の病変部を組織学的検討すると、CD4 陽性 T 細胞を中心とした真皮内の単核球浸潤などの所見が認められ、接触皮膚炎や湿疹反応の組織像と区別しがたい。また、Th1/Th2 のバランス概念が導入されたことによって、アトピー性皮膚炎の病態を Th1/Th2 のバランス異常で解析されるようになった。Th1 細胞と Th2 細胞は互いに抑制的に働く細胞群であるが、Th2 細胞は IL-4 や IL-5 などのサイトカインを産生することによって、IgE の産生を亢進させ、好酸球の増殖を促す。Th1 細胞は IFN- γ や IL-2 などのサイトカインを産生することによって接触皮膚炎などの遅延型過敏反応に関与している。アトピー性皮膚炎患者の皮膚炎病巣部や末梢血中では、Th2 細胞が Th1 細胞よりも、優位をしめることが報告されている。一方、急性期の病変部では、Th2 細胞が優位をしめるが、慢性期の病変では、Th1 細胞がかなり関与するのではないかとの報告も見られる。このように、アトピー性皮膚炎の発症には、Th1 細胞の活性化（接触皮膚炎）も、ある程度は関与していると考えられる。したがって、塗布により接触皮膚炎を抑制できる CX-659S は、アトピー性皮膚炎の外用治療薬として用いる可能性が考えられた。

表皮内にはランゲルハンス細胞と呼ばれる強力な抗原提示細胞が存在し、アトピー性皮膚炎の苔癬化病巣では、その細胞数の増加

認め、また、ランゲルハンス細胞より産生される IL-1 β が皮疹発現に重要な役割を果たしていると考えられる。今回、我々は、CX-659S の塗布により接触皮膚炎の局所における IL-1 β と TNF- α の mRNA 発現が抑制され、また、CX-659S は in vitro 培養によりランゲルハンス細胞の細胞内 IL-1 β の産生を抑制することを confocal laser microscopy を用いて明らかにした。この抑制作用は CX-659S がランゲルハンス細胞の活性化を直接抑制したのか、表皮角化細胞の GM-CSF などのサイトカイン産生抑制を介して間接的に生じたものか、今後明らかにせねばならない。今後、CX-659S の塗布による表皮角化細胞、ランゲルハンス細胞、T 細胞への影響をさらに明らかにすることによって、表皮角化細胞やランゲルハンス細胞などの皮膚を構成する細胞をターゲットとした外用治療薬の開発の基礎が固まると考えている。

E. 結語

抗酸化剤(CX-659S)は、塗布により接触皮膚炎を抑制し、また表皮ランゲルハンス細胞の細胞内 IL-1 β の産生を抑制した。CX-659S はアトピー性皮膚炎の外用治療薬に用いられると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 古江増隆, 力久 航, 山本昇壮: アトピー性皮膚炎に対するステロイド外用薬の使用状況—多施設調査における解析—. 西日皮膚 61: 196-203, 1999.
- 2) Furue M, Koga T, Yamashita N: Soluble E-selectin and eosinophil cationic protein are distinct serum markers that differentially represent clinical features of atopic dermatitis.

Brit J Dermatol 140: 67-72, 1999.

- 3) 古江増隆, 寺尾 浩, 古賀哲也: 思春期・成人期アトピー性皮膚炎の疫学的解析. 皮膚 42: 36-40, 2000.
- 4) 古賀哲也, 古江増隆: アトピー性皮膚炎の病理と病因. 小児内科 32: 993-997, 2000.
- 5) 古賀哲也, 古江増隆: 妊婦におけるアトピー性皮膚炎治療の実際. 臨床と研究 77:1679-1682, 2000.
- 6) Goto Y, Inoue Y, Tsuchida M, Isobe M, Ueno T, Uchi H, Furue M, Hayashi H. Suppressive effect of topically applied CX-659S, a novel diaminouracil derivative, on the contact hypersensitivity reaction in various animal models. Int Arch Allergy Immunol, in press.

2. 学会発表

- 1) Furue M: New approach to treatment of dermatitis by modulating keratinocyte-Langerhans cell interaction. The 26th Annual Meeting of the Chinese Dermatological Society. Taipei, 2000.
- 2) Koga T, Kohda F, Furue M: Histamine and skin allergic disease. International Sendai Histamine Symposium. Sendai, 2000.
- 3) Uchi H, Koga T, Goto Y, Hayashi H, Furue M: The immunosuppressive effects of an antioxidant, CX-659S, on Langerhans cells. The 9th European Academy of Dermatology and Venereology. Geneva, 2000.
- 4) 古江増隆: アトピー性皮膚炎治療の現況と今後の治療. 第 63 回日本皮膚科学会東京支部学術大会. 東京, 2000.

G. 知的所有権の取得状況

なし

アトピー性皮膚炎の動物モデルにおけるタイプ1/タイプ2 T細胞の動態

分担研究者 塩原哲夫 杏林大学医学部皮膚科教授

研究要旨 本研究の目的は、アトピー性皮膚炎(AD)の動物モデルを樹立し、それを用いて病態確立に至る機序と、それに対する有効な治療法を確立することにある。マウスに TNCB を繰り返し塗布することにより、局所皮膚には AD に極めて類似したタイプ2サイトカイン優位の環境が確立される。このサイトカイン環境は、タイプ1細胞の減少によるのではなく、タイプ2細胞の増加と、タイプ1細胞を活性化させる樹状細胞の減少によりもたらされることが示唆された。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎(AD)の病態解明の手段としてばかりでなく、新しい治療法の確立という点においても動物モデルは極めて有用である。我々はハプテンの連続塗布により、局所皮膚及びリンパ節が極めて AD に類似した病態を呈するようになることを報告し、これを AD の動物モデルとして解析を加えてきた。すなわちハプテンの塗布を繰り返すにつれ、局所皮膚におけるハプテン特異的免疫反応は、遅延型過敏反応から即時型+遅発型反応へとシフトし、それとともに局所のサイトカインパターンも、タイプ1からタイプ2にシフトすることを明らかにした。本研究では、このように全体としてタイプ2反応にシフトした局所リンパ節において、実際にタイプ1及びタイプ2サイトカイン産生細胞の動態がどのようになっているかを明らかにしようと考えた。

B. 研究方法

BALB/c マウスを TNCB にて感作後、耳介に TNCB を2日間隔で24日間繰り返し塗布することにより慢性モデルを樹立する。感作7日後の急性期リンパ節(タイプ1優位)と、感作24日後の慢性期リンパ節(タイプ2優位)細胞におけるサイトカイン産生細胞を、フローサイトメトリーを用いた細胞内サイトカイン測定法により検討した。

C. 研究結果

1. PMA+ionomycin にて4時間刺激後の、CD4⁺, CD8⁺T細胞分画における IFN- γ , IL-2, IL-4 などのサイトカインの産生を検討したところ、急性期、慢性期とも IL-2 や IL-4 は主に CD4⁺T細胞に、IFN- γ 産生は CD8⁺T細胞分画にそれぞれ認められた。
2. 慢性期リンパ節細胞からの IFN- γ 産生は *in vitro*, *in vivo* とも著明に低下しているため、IFN- γ 産生 CD8⁺T細胞の著明な低下が予想されたが、意外なことにその頻度は急性期と差が認められなかった。一方、IL-4 産生細胞は慢性期において CD4⁺, $\gamma\delta$ ⁺, NK 細胞分画で各々増加が認められた。とくに CD4⁺T細胞分画では急性期に比べ3倍以上の増加が認められた。
3. 慢性期リンパ節中の CD11c⁺樹状細胞について検討したところ、IL-12 産生 CD11c⁺細胞数は急性期に比べ明らかに減少していることが明らかになった。

D. 考察

慢性期リンパ節細胞中には、タイプ1サイトカイン産生 CD4⁺, CD8⁺T細胞は急性期と変わらぬ分布密度で存在している。しかし、IL-4 産生 CD4⁺, $\gamma\delta$ ⁺, NK 細胞の増加と、IL-12 産生樹状細胞の減少のために、全体としてのタイプ1サイトカイン産生は著明に抑制されると考えられた。

E. 結論

慢性期におけるサイトカイン反応はタイプ2に傾いているが、それはタイプ1細胞の減少のためではなく、タイプ2細胞の増加とタイプ1樹状細胞の減少のためである。これはADの病変部において認められる多数のタイプ1細胞と、全体としてのタイプ2反応へのシフトという一見矛盾した現象と、一致するものである。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Teraki Y, Hotta T, Shiohara T: Increased frequency of circulating skin-homing type-2 cells in patients with atopic dermatitis: associated with decreased frequency of circulating skin-homing type-1 cells. *J. Invest. Dermatol.* in press
2. Shiohara T, Mizukawa Y, Teraki Y: $\gamma\delta$ T cells with emphasis on their functional role in the epidermis. In: Bergstresser P, Takashima A, eds. *Chem. Immunol.* Basel, Karger, in press
3. Nakayama F, Teraki Y, Mizukawa Y, Shiohara T, Narimatsu H, et al.: Expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen regulated by a set of glycosyltransferases in human T cells: involvement of α 1.3-fucosyltransferase VII and β 1,4-galactosyltransferase I. *J. Invest. Dermatol.* 115:299-306, 2000
4. Shiohara T: Viral infections, allergy and autoimmunity: a complex, but fascinating link. *J. Dermatol. Sci.* 22:149-151, 2000
5. Kano Y, Shiohara T: Current understanding of cytomegalovirus infection in immunocompetent individuals. *J. Dermatol. Sci.* 22:196-204, 2000
6. Kano Y, Kokaji T, Shiohara T: Photo-accentuated eruption and vascular deposits of immunoglobulin A associated with hepatitis A virus infection. *Dermatology* 200:266-269, 2000
7. Kitagaki H, Teraki Y, Hayakawa J, Shiohara T, et al.: Distinct in vivo and in vitro cytokine profiles of draining lymph node cells in acute and chronic phases of contact hypersensitivity: Importance of type 2 cytokine-rich cutaneous milieu for the development of an early-type response in the chronic phase. *J. Immunol.* 163:1265-1273, 1999
8. Teraki Y, Hotta T, Shiohara T: Increased circulating skin-homing lymphocyte-associated antigen (CLA)+type 2 cytokine-producing cells, and decreased CLA+type 1 cytokine-producing cells in atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 143:373-378, 2000
9. Mizukawa Y, Shiohara T: The cytokine profile in a transient variant of angioedema with eosinophilia. *Br. J. Dermatol.* in press
10. Mizukawa Y, Shiohara T: Virus-induced immune dysregulation as a triggering factor for the development of drug rashes and autoimmune diseases: with emphasis on EB virus, human herpesvirus 6 and hepatitis C virus. *J. Dermatol. Sci.* 22:169-180, 2000
11. Mizukawa Y, Shiohara T, et al: An immunohistochemical study of β 1,4-galactosyltransferase in human skin tissue. *J. Dermatol. Sci.* 20:183-190, 1999

研究成果の刊行に関する一覧表

- 1) Yokozeki, H., Ghoreishi, M., Takayama, K., Takagawa, S., Katayama, I., Takeda, K., Akira S. and Nishioka, K.: STAT6 is essential in the induction of contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.*, 191: 995-1004, 2000
- 2) Ghoreishi, M., Yokozeki, H., Hua W.M., Nishioka, K.: Expression of 27 Kd, 65 Kd, and 72/73 Kd Heat Shock Protein in atopic dermatitis: Comparison with those in normal skin and contact dermatitis, *J. Dermatol.*, 27 (6): 370-379 (2000)
- 3) Miyazaki Y, Yokozeki H, Awad S, Igawa K, Minatohara K, Satoh T, Katayama I, Nishioka K: Glucocorticoids augment the chemically induced production and gene expression of IL-1 α through NF- κ B and AP-1 activation in murine epidermal cells. *J Invest Dermatol*, 115: 746-752 (2000)
- 4) Satoh T, Yokozeki H, Nishioka K: Pathogenic roles of eosinophils in guinea-pig contact sensitivity: regulation of dermal eosinophilia with remotely administered IL-5. *Clin Exp Immunol*, 122:300-307, (2000)
- 5) 久保秀一、松岡邦枝、烏山 一: IgEによるマスト細胞FceRIの表出制御. *臨床免疫*, 33: 654-658, 2000
- 6) 松岡邦枝、久保秀一、烏山 一: アレルギーのモデル動物. *組織培養工学*, 26: 335-340, 2000
- 7) 久保秀一、松岡邦枝、烏山 一: アトピー性皮膚炎モデル動物 -IgEトランスジェニックマウス. *アレルギー・免疫*, 7: 61-69, 2000
- 8) 久保秀一、松岡邦枝、烏山 一: IgEトランスジェニックマウスにおけるFceRIの高発現. *アレルギー科*, 10: 232-238, 2000
- 9) Kubo, S. Matsuoka, K, Taya, C, Kitamura, F, Yonekawa, H. and Karasuyama, H. IgE stabilizes its high affinity receptor (FceRI) on mast cells in vitro and ex vivo: The mechanism of IgE-mediated FceRI up-regulation and its physiological meaning. *Activating and inhibitory immunoglobulin-like receptors*. Eds. Cooper M.D., Takai, T, Ravetch, J.V. Springer-Verlag Tokyo *in press*
- 10) Kubo, S., Matsuoka, K., Taya, C., Kitamura, F., Takai, T., Yonekawa, H. and Karasuyama, H.: Rapid and drastic up-regulation of high affinity IgE receptor on mast cells is induced by IgE binding through stabilization and accumulation of the receptor on the cell surface. *submitted*.
- 11) Ueno H, Matsuda S, Katamura K, Mayumi M, Koyasu S: ZAP-70 is required for calcium mobilization but is dispensable for mitogen-activated protein kinase (MAPK) superfamily activation induced via CD2 in human T cells. *Eur. J. Immunol.* 30: 78-86, 2000.
- 12) Tsukahara H, Hiraoka M, Kobata R, Hata I, Ohshima Y, Jiang M, Noiri E, Mayumi M: Increased oxidative stress in rats with chronic nitric oxide depletion: measurement of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion. *Redox Rep.* 5: 23-28, 2000.
- 13) Nishimura M, Tsukahara H, Hiraoka M, Ohshima Y, Osaka Y, Tanizawa A, Mayumi M: Systemic inflammatory response syndrome and acute renal failure in *Hemophilus influenzae* septic meningitis. *Am. J. Nephrol.* 20: 206-211, 2000.
- 14) Tsukahara H, Noiri E, Jiang M, Hiraoka M, Mayumi M: Role of nitric oxide in human pulmonary microvascular endothelial adhesion. *Life Sci.* 67: 1-11, 2000.
- 15) Tsukahara H, Jiang M, Kobata R, Osaka Y, Hiraoka M, Mayumi M: Endogenous nitric oxide formation in term and preterm newborns. *J. Dev. Nephrol.* 8: 15-19, 2000.
- 16) Tsukahara H, Haruta T, Ono N, Kobata R, Fukumoto Y, Hiraoka M, Mayumi M: Oxidative stress in childhood meningitis: measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine concentration in cerebrospinal fluid. *Redox Rep.* 5: 295-298, 2000.
- 17) Omata N, Tsukahara H, Ito S, Ohshima Y, Yasutomi M, Yamada A, Hiraoka M, Nambu M, Deguchi Y, Mayumi M: Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis. *Life Sci.* 2001 (in press).
- 18) Hata I, Shigematsu Y, Ohshima Y, Tsukahara H, Fujisawa K, Hiraoka M, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J, Kotsuji F, Sudo M, Mayumi M: Involvement of thioredoxin in the regulation of growth hormone secretion in rat pituitary cell cultures. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 2001 (in press).

- 19) 藤沢和郎、大嶋勇成、眞弓光文: 母親が使用した塩化リゾチーム外用剤により卵白アレルギー反応を呈した乳児例. アレルギーの臨床 258: 68-70, 2000.
- 20) 眞弓光文: 小児アトピー性皮膚炎の免疫学的機序. 特集 小児のアトピー性皮膚炎. 小児科診療 63: 7-11, 2000.
- 21) 大嶋勇成、眞弓光文: 食物アレルギーの免疫療法の展望. 特集食物アレルギー 2000. 小児科臨床 53: 617-621, 2000.
- 22) 大嶋勇成、眞弓光文: DC と OX40/OX40L. Surgery Frontier 7: 191-194, 2000.
- 23) 大嶋勇成、眞弓光文: アレルギー性疾患の発症前診断: 出生前診断の必要性と可能性. 特集 小児気管支喘息のライフスタイル. 喘息 13: 21-26, 2000.
- 24) 眞弓光文: 食物アレルギーとアトピー性疾患. 兵庫県医師会医学雑誌 43: 16-19, 2000.
- 25) 眞弓光文: アトピー性疾患. 特集 小児における現代病の対策と治療. 医薬ジャーナル 36: 3338-3341, 2000
- 26) 大島昭博: アトピー性皮膚炎のサイトカイン療法. アレルギー科 8(3): 205-210, 1999.
- 27) 戸倉新樹: アトピー性皮膚炎とスーパー抗原. 宮地良樹 他 (編) 皮膚科診療プラクティス 文光堂 36-37, 1999.
- 28) 戸倉新樹: Tリンパ球に作用するアトピー性皮膚炎の治療薬. 日本炎症学会誌 19(2): 101-105, 1999.
- 29) 戸倉新樹: アトピー性皮膚炎 —最近の話題—. 大宮市医師会報 515, 190-192, 1999.
- 30) Bae SJ, Matsunaga Y, Tanaka Y, Katayama I: Autocrine induction of substance P-mRNA and-peptide in cultured normal human keratinocytes. Biochem Biophys Res Commun, 1999: 263: 327-333
- 31) H Takahama, K Masuko-Hongo, T Kato, Y Kawa, K Nishioka, M Mizoguchi: Accumulation of T cell cloneotype in the skin lesions of patients with psoriasis vulgaris. J Invest dermatol, 114: 833, 2000
- 32) 相馬良直、溝口昌子: 抗アレルギー薬・長期投与とQOL. 薬のサイエンス, 7: 97-99, 2001
- 33) T Kanbe, Y Soma, M Kashima, M Mizoguchi: Serum levels of soluble stem cell factor and soluble KIT are elevated in patients with atopic dermatitis and correlated with the disease severity. Br J Dermatol, in press
- 34) 古江増隆, 力久 航, 山本昇壮: アトピー性皮膚炎に対するステロイド外用薬の使用状況—多施設調査における解析—. 西日皮膚 61: 196-203, 1999.
- 35) Furue M, Koga T, Yamashita N: Soluble E-selectin and eosinophil cationic protein are distinct serum markers that differentially represent clinical features of atopic dermatitis. Brit J Dermatol 140: 67-72, 1999.
- 36) 古江増隆, 寺尾 浩, 古賀哲也: 思春期・成人期アトピー性皮膚炎の疫学的解析. 皮膚 42: 36-40, 2000.
- 37) 古賀哲也, 古江増隆: アトピー性皮膚炎の病理と病因. 小児内科 32: 993-997, 2000.
- 38) 古賀哲也, 古江増隆: 妊婦におけるアトピー性皮膚炎治療の実際. 臨床と研究 77:1679-1682, 2000.
- 39) Goto Y, Inoue Y, Tsuchida M, Isobe M, Ueno T, Uchi H, Furue M, Hayashi H. Suppressive effect of topically applied CX-659S, a novel diaminouracil derivative, on the contact hypersensitivity reaction in various animal models. Int Arch Allergy Immunol, in press.
- 40) Teraki Y, Hotta T, Shiohara T: Increased frequency of circulating skin-homing type-2 cells in patients with atopic dermatitis: associated with decreased frequency of circulating skin-homing type-1 cells. J. Invest. Dermatol. in press
- 41) Shiohara T, Mizukawa Y, Teraki Y: gd T cells with emphasis on their functional role in the epidermis. In: Bergstresser P, Takashima A, eds. Chem. Immunol. Basel, Karger, in press
- 42) Nakayama F, Teraki Y, Mizukawa Y, Shiohara T, Narimatsu H, et al.: Expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen regulated by a set of glycosyltransferases in human T cells: involvement of α 1.3-fucosyltransferase VII and b1.4-galactosyltransferase I. J. Invest. Dermatol. 115:299-306, 2000
- 43) Shiohara T: Viral infections, allergy and autoimmunity: a complex, but fascinating link. J. Dermatol. Sci. 22: 149-151, 2000
- 44) Kano Y, Shiohara T: Current understanding of cytomegalovirus infection in immunocompetent individuals. J. Dermatol. Sci. 22:196-204, 2000
- 45) Kano Y, Kokaji T, Shiohara T: Photo-accentuated eruption and vascular deposits of immunoglobulin A associ-

ated with hepatitis A virus infection. *Dermatology* 200:266-269, 2000

- 46) Kitagaki H, Teraki Y, Hayakawa J, Shiohara T, et al.: Distinct in vivo and in vitro cytokine profiles of draining lymph node cells in acute and chronic phases of contact hypersensitivity: Importance of type 2 cytokine-rich cutaneous milieu for the development of an early-type response in the chronic phase. *J. Immunol.* 163:1265-1273, 1999
- 47) Teraki Y, Hotta T, Shiohara T: Increased circulating skin-homing lymphocyte-associated antigen (CLA)+type 2 cytokine-producing cells, and decreased CLA+type 1 cytokine-producing cells in atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 143:373-378, 2000
- 48) Mizukawa Y, Shiohara T: The cytokine profile in a transient variant of angioedema with eosinophilia. *Br. J. Dermatol.* in press
- 49) Mizukawa Y, Shiohara T: Virus-induced immune dysregulation as a triggering factor for the development of drug rashes and autoimmune diseases: with emphasis on EB virus, human herpesvirus 6 and hepatitis C virus. *J. Dermatol. Sci.* 22:169-180, 2000
- 50) Mizukawa Y, Shiohara T, et al: An immunohistochemical study of b1,4-galactosyl-transferase in human skin tissue. *J. Dermatol. Sci.* 20:183-190, 1999
- 51) Wakugawa M, Nakamura K, Hino H, Toyama K, Hattori N, Okochi H, Yamada H, Nakajima H, Hirai K, Tamaki K, Furue M, :Elevated levels of eotaxin and IL-5 in blister fluid of bullous pemphigoid;correlation with tissue eosinophilia. *Brit J Dermatol.* 143:1021-5, 2000
- 52) Nakamura K, Imakado S, Takizawa M, Adachi M, Sugaya M, Wakugawa M, Asahina A, Tamaki K: Exacerbation of pustulosis palmaris et plantaris after topical application of metals accompanied by elevated levels of leukotriene B4 in pustules. *J Am Acad Dermatol.* 42 :1021-5, 2000
- 53) Tada Y, Asahina A, Nakamura K, Tomura M, Fujiwara H, Tamaki K: Granulocyte/macrophage colony stimulating factor inhibits IL-12 production of mouse Langerhans cells. *J Immunol.* 164:5113-9, 2000
- 54) Sugaya M, Watanabe T, Nakamura K, Tamaki K: Serum IL-15 is not elevated in patients with CTCL. *Acta Dermato Venereol.* 80:455, 2000
- 55) Tada Y, Asahina A, Nakamura K, Miyazono K, Fujiwara H, Tamaki K: Transforming growth factor- β upregulates CD40-engaged IL-12 production of mouse Langerhans cells. *Eur J Immunol.* 31:294-300, 2001
- 56) Asahina A, Tada Y, Nakamura K, Tamaki K: Colchicine and griseofulvin inhibit VCAM-1 expression on human vascular endothelial cells. — evicence for the association of VCAM-1 expression with microtubles. *J Dermatol Sci.* 25:1-9, 2001
- 57) Watanabe T, Nakamura K, Wakugawa M, Kato A, Nagai Y, Shioda T, Iwamoto A, Tamaki K: Antibodies to molluscum contagiosum virus in the general population and susceptible patients. *Arch Dermatol.* 136:1518-22, 2001
- 58) Wakugawa M, Nakamura K, Tamaki K: Evaluation of mite allergen-induced Th1 and Th2 cytokine secretion of peripheral blood mononuclear cells from atopic dermatitis patients; association between IL-13 and mite specific IgE levels. *J Dermatol Sci.* 25:116-126, 2001