

66-7,2000

8) Komine M, Rao LS, Kaneko T, Tomic-Canic M, Tamaki K, Freedberg IM, Blumenberg M. Onflammatory versus proliferative processes in epidermis. Tumor necrosis factor alpha induces K6b keratin synthesis through a transcriptomal, Bilimemgm M. Infra versus proliferative process in epidermis. Tumore necrosis factor alpha induces K6b keratin synthesis through a transcriptional complex containining NFkappa B and C/EBP beta . J Biol Chem. 275:32077-88, 2000

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

遺伝子改変モデル動物を用いたアレルギー病態の解析と
治療への応用に関する研究

分担研究者 鳥山 一

東京医科歯科大学大学院感染分子制御学 教授

研究要旨 抗原刺激によってB細胞が抗原特異的 IgE を産生し、血中 IgE 値が高まると、マスト細胞上の高親和性 IgE 受容体 FcεRI に抗原特異的 IgE が結合して FcεRI 発現上昇が誘導され、その結果マスト細胞は新たな抗原特異性を獲得することを明らかにした。さらに抗原特異的 IgE が結合した FcεRI は半減期が非常に延長するため、たとえ血中 IgE 値が急速に低下しても、マスト細胞の抗原特異性は一定期間保持されることを明らかにした。すなわち、マスト細胞はリンパ球とは異なり、IgE 結合による FcεRI 発現上昇誘導機構により抗原特異性ならびに記憶を獲得していることが判明した。さらに FcεRI の α鎖が FcεRI の安定化と不安定化のスイッチを担っていることを示唆する結果を得、FcεRI α鎖をターゲットとした新規アレルギー薬の可能性を示した。また、高 IgE 血症状態において、たった1回のアレルゲン投与によって即時型と遅延型反応にひきつづき超遅延型の非常に強い皮膚炎症が惹起されることを明らかにし、高 IgE 血症が即時型アレルギー反応のみならずアレルギー炎症反応の慢性化にも重要な役割を果たしている可能性を示した。

A.研究目的

高 IgE 血症を呈するアレルギー患者ではマスト細胞や好塩基球の細胞表面における高親和性 IgE 受容体 FcεRI の発現が亢進し、その結果それらの細胞からのケミカルメディエーターの放出が増強することが報告されており、IgE による FcεRI の発現亢

進がアレルギーの増悪要因のひとつになっている。我々が作製したアレルゲン特異的 IgE トランスジェニックにおいてもマスト細胞上の FcεRI 発現の著明な亢進が認められ、アレルギー患者の病態を反映していると考えられる。前年度の研究における解析から、IgE 結合による FcεRI の発

現亢進は、FcεRI の蛋白合成や細胞表面への輸送の促進の結果ではなく、IgE 結合した FcεRI の安定化とそれによる細胞表面での FcεRI の蓄積によってひき起こされることが明らかとなった。本研究では遺伝子改変マウスを用いて、高 IgE 血症にともなうアレルギー病態の解析ならびに IgE による FcεRI の発現亢進メカニズムの解明を進め、新規アレルギー治療薬の開発に応用することを目的とする。

B. 研究方法

正常マウス (C57BL/6、BALB/c) あるいは抗体産生能をまったくもたないマウス (μ m ノックアウトマウス) に 300 μ g の TNP 特異的 IgE (a アロタイプまたは b アロタイプ) を静注し、その後時間をおいて血清中の IgE ならびに腹腔マスト細胞表面の FcεRI の発現量をそれぞれ ELISA とフローサイトメトリーにて測定した。一方、腹腔内に TNP 特異的 IgE を投与した後一定時間後に、抗 IgE 抗体あるいは抗原 TNP-BSA を静注し、直腸温をモニターすることで全身性アレルギー反応を計測した。また、TNP 特異的 IgE トランスジェニックマウスならびに TNP 特異的 IgE で感作した正常マウスの耳介に TNP-OVA を皮内注射し、その後時間を追って耳介皮

膚の腫脹を測定するとともに病理学的診断をおこなった。

C. 研究結果

正常マウスにおいても腹腔マスト細胞上に発現する FcεRI の 80%以上は IgE が結合しているが、IgE (抗原特異的) 投与によってマスト細胞上の FcεRI の発現が著しく上昇し、その結果マスト細胞があらたな抗原特異性を獲得することが明らかとなった。さらにこのようにいったん獲得された抗原特異性は血中 IgE 値が急速に低下したのちも、また他の抗原特異性をもつ IgE が血中に大量に出現した後も、1ヶ月以上保持され、抗原チャレンジによってアレルギー反応を誘発できることが判明した。

TNP 特異的 IgE トランスジェニックマウスならびに TNP 特異的 IgE で感作した正常マウスの耳介に TNP-OVA を皮内注射したところ、典型的な即時型反応 (0.5h) と遅延型反応 (5-10h) にひきつづき 2-3 日後から著明な皮膚腫脹が出現し、100 μ g の TNP-OVA 投与では1ヶ月以上持続した。病理学的検査ではリンパ球、好酸球、好中球の著明な浸潤と表皮の角化が認められた。この第3相の皮膚腫脹は OVA 投与では観察されず、正常マウスへの TNP-OVA 投与でも観察されなかった。

D. 考察

マスト細胞上の FcεRI は IgE に対して高親和性をもつため、たとえ血中 IgE 値が低くとも大部分の FcεRI はすでに IgE により占拠されており、このままでは新規につくられた抗原特異的 IgE が結合する余地はほとんどない。しかし、抗原特異的 IgE が結合することによって FcεRI 発現上昇が誘導され、その結果マスト細胞はあらたな抗原特異性を獲得する。さらに抗原特異的 IgE が結合した FcεRI は半減期が非常に延長するため、たとえ血中 IgE 値が急速に低下しても、マスト細胞の抗原特異性は一定期間保持される。すなわち、マスト細胞はリンパ球とは異なる方法で記憶を獲得していると考えられる。これは寄生虫などの病原体に対する生体防御の観点からするとおおきな利点であると考えられるが、アレルギー疾患という状況下では反対に増悪要因となりおおきな欠点となる。逆に言えば、この IgE による FcεRI の発現亢進を薬物により抑制することができれば、大変大きな治療効果が期待できる。我々はすでに FcεRI の α 鎖が FcεRI の安定化と不安定化のスイッチを担っていることを示唆する結果を得ており、FcεRI α 鎖をターゲットとした新規アレルギー薬の可

能性に注目している。また、高 IgE 血症状態において、たった 1 回のアレルギー投与によって即時型と遅延型反応にひきつづき超遅延型の非常に強い皮膚炎症が惹起されたことから、高 IgE 血症が即時型アレルギー反応のみならずアレルギー炎症反応の慢性化にも重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

E. 結論

IgE 結合による FcεRI 発現上昇誘導機構により、マスト細胞が抗原特異性ならびに短期記憶を獲得することを明らかにし、FcεRI α 鎖をターゲットとした新規アレルギー薬の可能性を示した。高 IgE 血症がアレルギー炎症反応の慢性化に強く関与していることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kubo, S., Matsuoka, K., Taya, C., Kitamura, F., Takai, T., Yonekawa, H. and Karasuyama, H.: 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. *J. Immunol.* 167: 3427-34, 2001.
- 2) Kubo, S., Matsuoka, K., Taya, C., Kitamura, F., Yonekawa, H. and

Karasuyama, H.: IgE stabilizes its high affinity receptor (FcεRI) on mast cells in vitro and ex vivo: The mechanism of IgE-mediated FcεRI up-regulation and its physiological meaning. In *Activating and inhibitory immunoglobulin-like receptors*. Eds. Cooper M.D., Takai, T, Ravetch, J.V. Springer-Verlag Tokyo, pp183-188, 2001.

- 3) 久保秀一、松岡邦枝、鳥山一：高IgE血症とモデルマウス、アレルギー科 11: 541-547, 2001

2. 学会発表

- 1) Kubo S, Matsuoka, K, Taya, C., Kitamura, F., Yonckawa, H., and Karasuyama, H.: Rapid and drastic upregulation of high affinity IgE receptor on mast cells is induced by IgE through stabilization and accumulation of the receptor. 11th International Congress of Immunology. July.22-27.2001. Stockholm, Sweden
- 2) 久保秀一、遠藤順治、松岡邦枝、多屋長治、鳥山一、吉澤靖之、米川博通：IgE トランスジェニックマウスによる喘息モデルの作成とIgEの喘息発症と慢性化における役割の解明、第51回日本アレルギー学会総会 2001.10.29-31. 福岡
- 3) 松岡邦枝、久保秀一、多屋長治、

佐藤英一郎、平原一樹、白石明朗、米川博通、鳥山一：抗原特異的IgEによって誘発される超遅発性皮膚反応の解析、第31回日本免疫学会総会・学術集会 2001. 12.11-13. 大阪

- 4) 久保秀一、遠藤順治、松岡邦枝、多屋長治、鳥山一、吉澤靖之、米川博通：IgE トランスジェニックマウスを用いたIgE依存性喘息反応およびαβT細胞とγδT細胞の役割の解析、第31回日本免疫学会総会・学術集会 2001. 12.11-13. 大阪
- 5) 小原夕紀、田辺香子、松岡邦枝、松田浩珍、鳥山一、米川博通：ヒトアトピー性皮膚炎モデルマウス(NC/Nga)の多因子連鎖解析、第24回日本分子生物学会年会、2001年12月、横浜

G. 知的財産権の出願・登録の状況

1. 米国特許：Patent No. 6,118,044
"Transgenic animal allergy models and methods for their use"
2. 欧州出願 98309340.2-2105
"Transgenic animal allergy models and methods for their use"
3. 平成9年11月14日特許願
特願平 9-313989号
発明の名称「トランスジェニック動物」
4. 平成10年11月13日国内優先出願
特願平 10-323340号

小児アトピー性皮膚炎の発症に関わる因子および発症
予測・予防に関する実験的・文献的解析

分担研究者 眞弓光文 福井医科大学医学部小児科 教授
研究協力者 大嶋勇成 福井医科大学医学部小児科 助手

研究要旨 本研究は、小児アトピー性皮膚炎（atopic dermatitis、以下 AD と略す）発症の危険因子を同定し、その発症予測の方法を確立することで、AD のみならず小児期のアトピー性疾患発症の効率的予防法を開発することを目的とする。臍帯血 CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生能とその後のアトピー性疾患発症との関連を解析し、AD を発症した群ではアトピー性疾患を発症しなかった群に比べ IL-13 産生能が亢進していたことを明らかにした。臍帯血 CD4 陽性 T 細胞の IL-13 産生能と両親のアトピー性疾患家族歴を組み合わせることにより、特異性 84%、感度 55% で AD 発症予測が可能であった。また、AD 発症の危険因子を過去の文献報告から同定し、メタアナリシスが可能なものは解析を実施して、AD 発症予測の感度を向上させる目的で、今年度はまず Medline による文献検索を実施し、現在までに 100 件の文献を選定した。

A. 研究目的

小児アトピー性皮膚炎（atopic dermatitis、以下 AD と略す）はアレルギーマーチの初発症状であり、気管支喘息発症の危険因子でもある。従って、AD 発症の危険因子を同定し、その発症の予測方法を確立することは、AD を含めた小児期アレルギー性疾患の予防対策を講じる上で重要と考えられる。本研究は、乳幼児における AD 発症危険因子・予測因子を、実験的手法および現在までに報告された文献を検索することで明らかにする。

B. 研究方法

(1) 臍帯血 CD4 陽性細胞の分化能の解析による AD 発症危険因子・予測因子の検討

臍帯血より CD4 陽性 T 細胞を分離し、IL-12 非存在下と存在下で抗 CD3 抗体と B7 transfectant により刺激し、培養上清中の IL-13、IFN- γ 濃度を測定した。臍帯血ドナーである新生児は、生後 12 ヶ月まで AD、喘息、食物アレルギーによる蕁麻疹の発症に関して追跡調査を行った。結果は AD を発症した群とアトピー性疾患を発症しなかった群に分け、サイトカイ

ン産生能と両親のアトピー性疾患家族歴の有無、性別を独立変数として、ロジスティック回帰分析を行った。

臍帯血の採取およびアトピー性疾患発症の追跡調査は母親からインフォームドコンセントを取った上で実施した。

(2) 文献検索に基づく AD 発症危険因子・予測因子の検討

平成 13 年 11 月末までに Medline に登録された文献を対象に、AD の発症予知に関係する文献を検索した。

(方法 1) “atopic dermatitis” と “atopy” をキーワードとして検索を行ない、“prediction” または “risk factor” をキーワードとして文献の絞り込みを行った。抽出された論文タイトルを確認し、AD もしくは AD を含めたアトピー性疾患の発症の危険因子を扱っているものを抽出した。

(方法 2) ISI 社の journal citation reports のインパクト・ファクター情報により、一般医学、アレルギー学、小児科学、皮膚科学の各分野において上位を占める 23 雑誌を選択し、“atopic dermatitis” をキーワードとして絞り込み、論文タイトルから AD 発症に関する論文を抽出した。

上記 2 つの方法により抽出された文献から重複したものを除き、メタアナリシスに使用可能なものを選択した。

C. 結果

(1) 臍帯血 CD 4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生能による AD 発症の予測

臍帯血を採取した新生児のうち、90 名が 1 年間の追跡調査が可能であった。このうち 57 名が湿疹症状を経験しており、31 名に AD の発症が認められた。AD 以外のアトピー性疾患発症者は 8 名で、51 名がアトピー性疾

患を発症しなかった。

アトピー性疾患を発症した群 ($p<0.01$) と AD を発症した群 ($p<0.05$) は、アトピー性疾患を発症しなかった群に比べ IL-12 非存在下での IL-13 産生が有意に低値を示した。IL-12 存在下ではアトピー性疾患を発症した群はアトピー性疾患を発症しなかった群に比べ IL-13 産生が有意に低値を示したが ($p<0.05$)、AD 群では有意な差を認めなかった。IFN- γ 産生能に関しては、IL-12 の存在の有無に関わらず非発症群との有意な差を認めなかった。

湿疹病変の持続期間とサイトカイン産生能との関係を見ると、2 ヶ月以上湿疹が持続した児は 2 ヶ月未満で湿疹が消失した児に比べ IL-13 産生能が有意に高値を示した ($p<0.01$)。

AD 発症群とアトピー性疾患非発症群のロジスティック回帰分析による結果、IL-12 非存在下での IL-13 産生能と両親のアトピー性疾患家族歴陽性がそれぞれ Odd 比 1.25 (95%CI 1.02~1.52) と 3.15 (1.08~9.16) で危険因子として同定された。また、IL-12 非存在下での IL-13 産生能による発症予測は特異性 82%、感度 39% だった。IL-12 非存在下での IL-13 産生能にアトピー性疾患家族歴を予測因子として用いた場合には、特異性 84%、感度 55% であった。

(2) AD 発症危険因子同定のための文献検索

方法 1, 2 により、“atopic dermatitis” または “atopy” をキーワードとして選択された 13,514 編の論文から、発症危険因子・予測因子に関する記述のあるもの 958 編の論文につき、重複した文献、総説、コメントのみのもを除外し、残った論文について抄録を検討して、AD の発症危険因子に関する論文として価値のあると考え

られる 100 の論文を最終的に抽出した。今後、これらの論文の内容の妥当性を詳細に検討し、AD の発症危険因子・予測因子を文献学的に解析する予定である。

D. 考察

アトピー性疾患の病態形成には Th2 優位の反応が重要と言われている。しかし、臍帯血 CD4 陽性 T 細胞の IL-13 産生能を Th2 反応の指標として AD の発症予測を行った場合に予測の感度が低いのは、AD の発症が単に Th2 細胞によって説明される単純な病態でなく、文献上報告されている様な環境因子も含めた様々な要因が関与していることが考えられる。

近年、小児における AD 有症率の増加が問題となっている。過去の我々の調査により、小児における AD 患者の 90%以上は乳幼児期に発症する。従って、AD の発症を予防することにより小児の AD 患者を減少させるという最終目標を達成するためには、乳幼児における AD の発症危険因子・予知因子をより一層明らかにすることが極めて重要である。

E. 結論

小児の AD 発症を予防するためには、発症に関わる危険因子を明らかにすることが重要である。今年度の調査研究により、乳幼児の AD 発症に臍帯血 CD4 陽性 T 細胞の IL-13 産生能の亢進が関与していることが示唆された。しかし、IL-13 産生能単独では発症予測因子としての感度が未だ不十分であり、今後、文献検索を含めたさらなる危険因子の同定とその有効な組み合わせによる予測法の確立が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 69:223-228(2001)
- 2) Ohshima Y, Yasutomi M, Omata N, Yamada A, Fujisawa K, Kasuga K, Hiraoka M, Mayumi M: Dysregulation of IL-13 production by cord blood CD4+ T cells is associated with the subsequent development of atopic disease in infants. *Pediatr Res* (in press)
- 3) Iio J, Katamura K, Ohmura K, Yasumi T, Meguro T, Ohshima Y, Nakahata T: Lipid A analogue, ONO-4007, inhibits IgE response and antigen-induced eosinophilic recruitment into airways in BALB/c mice. *Int Arch Allergy Immunol* (in press)
- 4) Yamada A, Ohshima Y, Tsukahara H, Hiraoka M, Kimura I, Kawamitsu T, Kimura K, Mayumi M: Two cases of anaphylactic reaction to gelatin induced by chloral hydrate suppository. *Pediatr Int* (in press)
- 5) Ohshima Y: Roles of dendritic cells in the pathogenesis of allergic inflammation. *Pediatric allergy and clinical immunology* 2000 (in press)
- 6) 大嶋勇成: アレルギー性炎症と樹状細胞. *日本小児アレルギー学会誌* 14: 81-86 (2001)
- 7) 眞弓光文. 食物アレルギーの最近の動向. 特集・アレルギー疾患の診断と治療—内科医のためのガ

イドライン. 内科 87(3): 525-528, 2001.

- 8) 眞弓光文. 食物アレルギーはどこまで関与しているか. 特集 アトピー性皮膚炎—最新情報. 日本医師会雑誌 126(1): 21, 2001.
- 9) 眞弓光文. 小児アトピー性皮膚炎と食物アレルギー—小児科医の立場から—. 日本皮膚アレルギー学会雑誌 9(3): 60-65, 2001.

2. 学会発表

- 1) Ohshima Y, Omata N, Yasutomi Y, Yamada A, Fujisawa K, Mayumi M: Dysregulation of IL-13 production by cord blood CD4 T cells is associated with the subsequent development of atopoid dermatitis. Experimental Biology 2001 Orland FL March 31-April 4, 2001
- 2) 安富素子、小俣合歆子、大嶋勇成、眞弓光文: 臍帯血 CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生能と IL-13 遺伝子多型との関係。第 13 日本アレルギー学会春季大会 2001/5/ 横浜
- 3) 大嶋勇成: シンポジウム アレルギーと T 細胞: 小児アレルギーと T 細胞。第 13 日本アレルギー学会春季大会 2001/5/ 横浜
- 4) 大嶋勇成: シンポジウム ヒト樹状細胞の性状と免疫細胞療法: TNF/TNFR ファミリーと樹状細胞の分化と機能。第 41 回日本リンパ網内系学会総会 2001/5/31,6/1 秋田
- 5) 塚原宏一、野入英世、江米足、大嶋勇成、平岡政弘、眞弓光文: 一酸化窒素 (NO) によるヒト肺微少血管内皮細胞接着の制御 第 10 回 Airway Club in Sendai 2001/9/7,8 仙台
- 6) 小俣合歆子、安富素子、大嶋勇成、眞弓光文: MCP-1 による樹状細胞の IL-12 産生能の変化 第 51 回日本アレルギー学会総会 2001/10/29-31 博多
- 7) 大嶋勇成: シンポジウム 免疫学的治療・発症予防の展望: 抗原提示細胞制御 第 5 回小児気道アレルギー研究会 2001.11.11 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

小児アトピー性皮膚炎の病態における酸化ストレスおよび
レドックス制御機構の関与に関する研究

分担研究者 眞弓光文 福井医科大学医学部小児科 教授
研究協力者 塚原宏一 福井医科大学医学部小児科 助手

研究要旨 小児のアトピー性皮膚炎（atopic dermatitis、以下 AD と略す）は頻度が高く、しばしば難治であり、新規の効果的な治療法の導入が望まれている。小児 AD の病態形成における酸化ストレスの役割を明らかにし、酸化ストレス制御による新しい AD 治療法を開発するために、本年度は、急性増悪期にある AD 患児におけるレドックス環境の変化を経時的に評価するとともに、レドックス制御薬剤の炎症制御機構を細胞生物学のレベルで検討した。黄色ブドウ球菌による膿痂疹を合併し皮膚病変が急性増悪した AD 患者の尿中 8-OHdG、acrolcin 排泄は正常対照に比して著明に増加していた。この排泄は患者の皮膚所見の改善と一致して低下したが、この時点でも正常レベルよりも高値を呈し、AD 患児の慢性的酸化ストレス亢進状態が急性増悪期にはさらに増強することが明らかになった。また、AD の急性増悪期においても NO 排泄の増加は認められず、患児における NO 合成酵素機能不全の存在が示唆された。一方、ヒト微小血管内皮細胞での接着分子（E-selectin、ICAM-1、VCAM-1）発現は炎症性サイトイン TNF- α 処理により著明に増加するが、それは NO 放出薬剤（spermineNONOate）、抗酸化剤（PDTC）により有意に抑制された。この結果は、接着分子発現に酸化ストレスが関与することを示すと同時に、レドックス制御薬剤の抗炎症作用を証明するものである。レドックス制御の観点からも、急性増悪因子（黄色ブドウ球菌による皮膚感染症など）の除去および酸化ストレスを特異的に制御するレドックス制御薬剤が AD 治療に有効であることが示された。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis、以下 AD と略す) は小児に多く見られるアレルギー炎症性疾患であるが、しばしば難治であり、かつ皮膚病変には多様性があり、病態形成機序には不明な点も多い。本研究の目的は、小児 AD の病態形成と炎症性疾患の基本病態とされる酸化ストレスとの関連性を明らかにし、酸化ストレス制御による新しい AD 治療法の開発を展望することである。

我々は昨年度、病状が比較的安定している小児 AD 患者において酸化ストレスが亢進し、内因性 NO 産生が低下していることを報告した。本年度は (1) 急性増悪期にある AD 患児におけるレドックス環境の変化を経時的に評価すると共に、(2) レドックス制御薬剤の炎症制御機構を細胞生物学的に検討した。

B. 研究方法

(1) 黄色ブドウ球菌による膿痂疹を合併し、皮膚病変が増悪したために入院加療を要した AD 患児 10 名 (M/F=3/7、年齢=0.7~6.9 歳、CRP=<0.3~1.3 mg/dL) を対象とした。急性期 (入院当日) および回復期 (入院 7~9 日目) に尿を採取し、尿中 8-OHdG (酸化核酸傷害の指標)、acrolein (酸化脂質傷害の指標)、NOx⁻ (内因性 NO 産生の指標) 濃度 (対 Cr 比) を測定し、年齢を一致させたアレルギー性疾患を有しない健常児の平均値からの変移 (SD score) を計算した。

(2) ヒト微小血管内皮細胞の細胞膜

上での接着分子 (E-selectin、ICAM-1、VCAM-1) 発現に及ぼす炎症性サイトイン TNF- α (10 ng/mL) の作用とそれに対する NO 放出薬剤 (spermineNONOate、1 mM)、抗酸化剤 (PDTC、0.1 mM) の効果を、蛋白発現 (flow cytometry、4 時間後) と mRNA 発現 (RT-PCR、2 時間後) の両面から検討した。

C. 研究結果

(1) 皮膚病変が急性に増悪した小児 AD 患者では、入院当日の尿中 8-OHdG、acrolein 排泄が正常対照に比して著明に増加していた。それらは抗菌薬投与などの治療による皮膚所見の改善と一致して低下した。一方、尿中 NOx⁻ 排泄については有意な増加を呈さなかった (入院当日: 8-OHdG=3.6 \pm 3.8、acrolein=2.8 \pm 2.3、NOx⁻=0.2 \pm 1.2、入院 7~9 日目: 8-OHdG=1.0 \pm 1.8、acrolein=0.6 \pm 1.1、NOx⁻=-0.2 \pm 0.8 (各 SD score を平均 \pm SD で表示した))。

(2) ヒト微小血管内皮細胞での接着分子発現は TNF- α 刺激により蛋白レベルと mRNA レベルの両面で著明に増加した。spermineNONOate はこれらの反応すべてを有意に抑制した。また、PDTC は E-selectin の蛋白レベルでの発現を除く他のすべての接着分子の発現を有意に抑制した。

D. 考察

O₂⁻、NO、ONOO⁻ (O₂⁻+NO \rightarrow ONOO⁻)、OH などの活性酸素種、活性窒素種は酸化ストレスの主要な mediator として多様な経路で生体に影響を及ぼすが、健常状態では過剰の活性種は抗酸化酵素あるいは抗酸化物質により捕捉される (“レドックス制御” と称される)。生体内の抗酸化

システムで制御しきれない過剰の酸化ストレスが生じた場合に、組織障害や細胞死が惹起される。

AD では局所に浸潤した T 細胞、マクロファージ、好酸球や微小血管内皮細胞、ケラチノサイトなどから産生される炎症性サイトカイン、活性酸素種、活性窒素種、組織障害性蛋白が皮膚病変形成に大きな役割を果たすと考えられる。このような環境下にある皮疹部の微小血管内皮細胞上には E-selectin、ICAM-1、VCAM-1 などの接着分子の発現が増加し、炎症細胞浸潤が促進される。また、AD 患者の循環白血球は活性化状態にあり O_2^- 産生も亢進していると報告されている。このような変化は炎症の“vicious circle”を形成し、酸化ストレスを増強させ、AD を遷延・悪化させる要因になると推定される。

AD 患者の 95%以上で皮膚に黄色ブドウ球菌が常在菌として存在し、過半数の患者でスーパー抗原産生ブドウ球菌が検出されると報告されている。スーパー抗原は T 細胞を抗原非特異的に活性化したり、スーパー抗原特異的 IgE 抗体を介して I 型アレルギーを起こすことなどにより、AD を悪化させる。

今回の研究においては、黄色ブドウ球菌による膿痂疹を合併し皮膚病変が急性増悪した患者の尿中 8-OHdG、acrolein 排泄が正常対照に比して著明に（患者の病状安定期での上昇率以上に）増加していた。さらに、それらの排泄が患者の皮膚所見の改善と一致して低下したが、この時点でも正常レベルよりも高値を呈していた。以上の結果は、AD 患児の慢性的酸化ストレス亢進状態が急性増悪期にさらに増強することを示すものである。

このような変化は AD 患者のレドックス環境をさらに酸化サイドに変移させると推定される。また、AD の急性増悪期においても内因性 NO 産生の亢進は認められなかった。これは昨年度の研究結果と矛盾せず、AD 患児における NO 合成酵素機能不全の存在が示唆される。

AD 局所においては微小血管内皮細胞上の接着分子発現増加が炎症細胞の浸潤をもたらし、それが皮膚病変を悪化させる。NO 放出薬剤や抗酸化剤が TNF- α により誘導された接着分子発現を抑制した今回の実験結果は、接着分子発現に酸化ストレスが関与することを示唆するとともに、レドックス制御薬剤の抗炎症作用を証明するものである。最近、構成型 NO 合成酵素由来の NO の抗酸化因子としての重要性が注目されている。AD 患児においては NO 合成酵素機能不全が酸化ストレスの亢進と皮膚微小血管内皮細胞での接着分子発現増加に寄与している可能性が示された。

E. 結 論

レドックス制御の観点からも AD 治療においては急性増悪因子（黄色ブドウ球菌による皮膚感染症など）の除去が有効であることが支持された。さらに、酸化ストレスを制御するレドックス制御薬剤による AD 治療の有効性が臨床医学的、細胞生物学的に示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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* 69: 223-228, 2001.

2) 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* 281: E269-E274, 2001.

3) Tsukahara H, Sekine K, Uchiyama M, Miura M, Nakazato M, Date Y, Tsuneczawa W, Kotsuji F, Nishida K, Hiraoka M, Mayumi M. Uroguanylin level in umbilical cord blood. *Pediatr Int* 43: 267-269, 2001.

4) Tsukahara H. Nitric oxide modulation of endothelial barrier function. *Annual Research Reports of Renal Anemia Foundation* 125-136, 2001.

5) Noiri E, Nakao A, Uchida K, Tsukahara H, Ohno M, Fujita T, Brodsky S, Goligorsky MS. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol* 281: F948-957, 2001.

2. 学会発表

1) 塚原宏一, 大坂陽子, 平岡政弘, Jiang Mizu, 眞弓光文. NOによるレドックス制御: 慢性的 NO 合成阻害モデルにおける酸化ストレスの評価. 第 44 回日本腎臓学会学術総会, 東京, 2001 年 5 月.

2) 塚原宏一, 平岡政弘, 古畑律代, 大坂陽子, 江 米足, 細川久美子, 小辻文和, 関根恭一, 三浦雅一, 眞弓光文. 臍帯血液中における各種血管作動物質の計測. 第 36 回日本小児腎臓病学

会学術集会, 東京, 2001 年 6 月.

3) 塚原宏一, 野入英世, 江 米足, 大嶋勇成, 平岡政弘, 眞弓光文. 一酸化窒素 (NO) によるヒト肺微小血管内皮細胞接着の制御. 第 10 回 Airway Club in Sendai 研究会, 仙台, 2001 年 9 月.

4) Noiri E, Nakao A, Uchida K, Tsukahara H, Fujita T, Brodsky S, Goligorsky MS. Scavenging of peroxynitrite ameliorates lipid peroxidation and DNA damage in experimental ischemic ARF. *ASN/ISN World Congress of Nephrology*, San Francisco, 2001 年 10 月.

5) Tsukahara H, Todoroki Y, Hiraoka M, Ohshima Y, Sekine K, Miura M, Hosokawa K, Kotsuji F, Mayumi M. Hormones and autacoids in umbilical cord blood. 2nd Canada-Japan Bilateral Workshop on Human Reproduction & Reproductive Biology, Fukui, 2001 年 11 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

アトピー性皮膚炎とレプチンに関する研究

分担研究者 瀧川雅浩 浜松医科大学皮膚科 教授

研究要旨 血清レプチン値とアトピー性皮膚炎のさまざまな免疫学的パラメーターとがどう相関するかの検討をおこなった。アトピー性皮膚炎患者全体の体格(body mass index; BMI)の平均値は男性 22.83, 女性 20.69 であり、血清レプチンの平均値は男性 2426pg/ml, 女性 6631pg/ml と予想値と比較して低値を示した。

アトピー性皮膚炎重症度である SCORAD index、血清 LDH 値、総 IgE 値、好酸球数と血清レプチン値/BMI 比との関連をみたところ、SCORAD index、総 IgE 値とは相関した。アトピー性皮膚炎の病因へのレプチンの関与が示唆された。

A. 研究目的

レプチンが持つ免疫学的作用に IFN- γ 産生を増加, IL-4 産生を減少させる Th1 増強効果という T 細胞におけるサイトカイン産生の調節作用がある。Lord らは ob/ob マウスから採取した末梢血単核球において、生理的な変動内におけるレプチン濃度が増加するとともに IFN- γ 産生の増加および IL-4 産生の減少を報告している。同様にヒト末梢血 CD45RO 陽性細胞においても、レプチン添加により IFN- γ 産生増加, IL-4 の減少が確かめられている。

レプチンが T 細胞産生サイトカイ

ンの調節作用を有することにより、各種アレルギー性疾患においてレプチンが何らかの形でかかわっていることが予想される。しかし、現在までにアレルギー性疾患とレプチンとの関連性を示した報告はわれわれが調べた限りではない。代表的なアレルギー性疾患のひとつであるアトピー性皮膚炎は、その成因、悪化要因に Th1-Th2 バランスの偏りが関与していることが指摘されており、とくに急性期、増悪時においては Th2 優位といわれている。われわれはレプチンの持つ Th1 増強作用に着目し、アトピー性皮膚炎の病態にレプチン

がいかなる影響を与えているかを検討するため、アトピー性皮膚炎の重症度や重症パラメーターとレプチンとの関連を調べた。

B. 研究方法

浜松医科大学皮膚科を受診したアトピー性皮膚炎の外来および入院患者 40 名(男性 18 名 女性 22 名, 平均年齢 25.3 歳, 重症度は軽症から中等症), 初診時あるいは入院時において, SCORAD, LDH, 総 IgE 値, 好酸球数と血清レプチン濃度との関連を調べた。LDH は発疹の重症度をあらわす 1 つのパラメーターと考えた。血清レプチン濃度は体格(body mass index; BMI)と相関するために, レプチンの値のみを個々に比較することはできない。同一の値でも BMI の差があれば評価は異なるものとなるため, BMI による差を血清レプチン値/BMI の比をとることで補正した。

C. 研究結果

はじめに BMI と血清レプチン値の相関性が, アトピー性皮膚炎の患者群においても成り立つか否か検討をおこなった。アトピー性皮膚炎患者全体の BMI の平均値は男性 22.83, 女性 20.69 であった。松浦らによる日本人における血清レプチン値の回帰直線を用いて BMI から予想される血清

レプチンの平均値を算出したところ, 男性 3642pg/ml, 女性 8449pg/ml となった。しかし実測のアトピー性皮膚炎患者での平均値は男性 2426pg/ml, 女性 6631pg/ml と予想値と比較して低値を示した(図 1)。

次に BMI とレプチン値の関係をグラフに示す(図 2)。相関を示す患者群も存在するが, 男女とも回帰直線から下方にあるレプチンが低値を示す患者が多くみられた。これらの所見からレプチンとアレルギー性疾患の関わりが示唆された。

そこで, アトピー性皮膚炎重症度である SCORAD index や重症度の客観的指標である血清 LDH 値, 総 IgE 値, 好酸球数と血清レプチン値/BMI 比との関連をみたところ, レプチン/BMI 比は LDH 値, 好酸球数とは相関がみられなかったが, SCORAD index, 総 IgE 値とは相関を示し, アトピー性皮膚炎が重症であれば血清レプチン値は低値であることが判明した(図 3, 4)。

D. 考察

アトピー性皮膚炎患者では, 痒みによるストレスの増加, 状態不安・特性不安の高値が認められる。交感神経系は各種のストレスによって亢進することから, 健常人と比較しアトピー性皮膚炎患者では交感神経系

が亢進していると思われる。アトピー性皮膚炎においてレプチン分泌が低値となる理由は明らかではないが、各種ストレスから生じる交感神経亢進状態がレプチン分泌を抑制していることが一つの可能性として想定される。また、レプチンには交感神経活性化作用があるために、分泌低下が起れば交感神経系に対するネガティブフィードバック作用が生じると考えられる。

しかし、アトピー性皮膚炎においてはこのような機構よりも、レプチン低下による Th1 抑制作用など免疫系に対する作用が一次的であり、重症化を引き起こすメカニズムが生じるのではないだろうか。

レプチンはそれ自体 Th1 を活性化し、Th2 を抑制する性質をもっている。アトピー性皮膚炎患者におけるレプチンの分泌低下は Th1 サイトカイン産生を減少させ、Th2 優位という状況を引き起こす。これによりアトピー性皮膚炎の Th1, Th2 バランスはより Th2 に傾き、総 IgE 値と好酸球数の増加をもたらす。症状が増悪すると考えられる。したがって、レプチンの低下は、Th2 細胞を Th1 によるプレッシャーから解放する意味合いをアトピー性皮膚炎の病態に付加するものと思われる。

E. 結論

レプチンは多様な生理学的作用を有しており、そのひとつである免疫調節作用は、慢性アレルギー性疾患における複雑な成因に関与している。今回、われわれはレプチンの持つ様々な作用を解析することにより、アトピー性皮膚炎とレプチンの緊密な関わりの可能性を示唆した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 川島 眞, 宮地良樹, 中川秀己, 飯塚 一, 伊藤雅章, 塩原哲夫 他: アトピー性皮膚炎の診療に対する患者の認識についてのアンケート調査 (第1報). 臨皮 55(2): 113-119, 2001.
- 2) 瀧川雅浩: アトピー性皮膚炎とサイトカインのかかわり. 炎症と免疫 9(2): 230-237, 2001.
- 3) Ohshima A., Takigawa M., Tokura Y.: CD8⁺ cell changes in psoriasis associated with roxithro-mycin-induced clinical improvement. Eur. J. Dermatol. 11(5): 410-415, 2001.
- 4) Seo N., Hayakawa S., Takigawa M., Tokura Y.: Interleukin-10 expressed at early tumor sites induces subsequent generation of CD4⁺ Tregulatory cells and systemic collapse of anti-tumour immunity. Immunol. 103: 449-457, 2001.

- 5) 松本賢太郎, 橋爪秀夫 : アトピー性皮膚炎教育入院. 臨皮55(11): 831-835, 2001.
- 6) Hata M., Tokura Y., Takigawa M.: Erythema multiforme-like eruption associated with contact dermatitis to cutting oil. *Eur. J. Dermatol.* 11(3): 247-248, 2001.
- 7) Inuzuka M., Tomita K., Tokura Y., Takigawa M.: Lupus erythematosus profundus with unusual skin manifestation: subcutaneous nodules coexisting with eyelid plaque. *J. Dermatol.* 28(8): 437-441, 2001.
- 8) Inuzuka M., Tomita K., Tokura Y., Takigawa M.: Acquired ichthyosis associated with dermatomyositis in a patient with hepatocellular carcinoma. *Br. J. Dermatol.* 144: 416-417, 2001.
- 9) Takigawa M., Tokura Y., Hashizume H., Seo N.: Percutaneous peptide immunization via corneum barrier-disrupted murine skin for experimental tumor immunoprophylaxis. *Ann. New York Acad. Sci.* 941: 139-146, 2001.
- 10) Tokura Y., Ishihara S., Tagawa S., Seo N., Ohshima K., Takigawa M.: Hypersensitivity to mosquito bites as the primary clinical manifestation of a juvenile type of Epstein-Barr virus-associated natural killer cell leukemia/lymphoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 45(4): 569-578, 2001.
- 11) Tokura Y., Rocken M., Clark R. A. F., Maurer M., Grabbe S., Haliasos E., Takigawa M., Sinha A. A.: What are the most promising strategies for the therapeutic immunomodulation of allergic diseases? *Exp. Dermatol.* 10: 128-140, 2001.
- 12) Tokura Y., Seo N., Yagi H., Takigawa M.: Photoactivational cytokine-modulatory action of 8-methoxypsoralen plus ultraviolet A in lymphocytes, monocytes, and cutaneous T cell lymphoma cells. *Ann. New York Acad. Sci.* 941: 185-193, 2001.
- 13) 橋爪秀夫 : アトピー性皮膚炎と不安. 臨皮 55(5): 163-165, 2001.
- 14) 戸倉新樹 : スーパー抗原. アトピー疾患用語ハンドブック 宮地良樹, 岡本美孝, 高村悦子 (編) メディカルレビュー社 128-129, 2001.
- 15) 戸倉新樹 : Th1, Th2. アトピー疾患用語ハンドブック 宮地良樹, 岡本美孝, 高村悦子 (編) メディカルレビュー社 189, 2001.
- 16) 戸倉新樹 : アトピー性皮膚炎での感染症の役割. 日医師会誌 126(1): 32, 2001.
- 17) 戸倉新樹 : アトピー性皮膚炎と細菌感染. アレルギーナビゲーター 82-83, 2001.

- 18) 橋爪秀夫：アトピー性皮膚炎と不安. 臨床皮膚科. 55: 163, 2001.
- 19) 松本賢太郎, 戸倉新樹, 瀧川雅浩：アトピー性皮膚炎とレプチン. アレルギー, 50: 267, 2001.
- 20) 橋爪秀夫：補助代替療法. MB Dcrma, 54: 113-118, 2001.

2. 学会発表

- 1) Ito T, Seo K, Tsujimura M, Takigawa M, Tokura Y: Barrier disruption and UVB irradiation have an opposite effect on antigen-presenting function of Langerhans cells but a synergistic effect on cytokine production by keratinocytes in mice. 62th Society for Investigative Dermatology Washington, 2001.
- 2) 橋爪秀夫：アトピー性皮膚炎：サイトカイン 神経ネットワークからみたアレルギー メンタルな面から. 第 31 回日本皮膚アレルギー学会 浜松 2001.
- 3) 橋爪秀夫：アトピー性皮膚炎患者における末梢血 DC1, DC2. 第 31 回日本皮膚アレルギー学会 浜松 2001.

G. 知的所有権の取得状況

なし

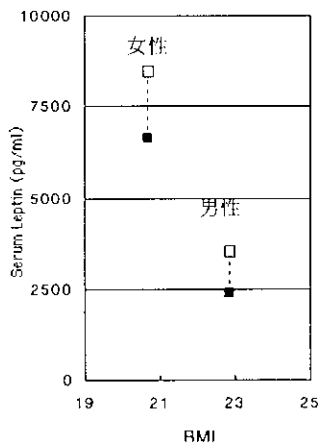


図 1

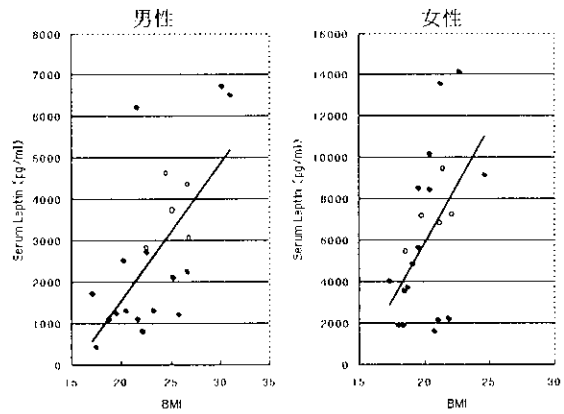


図 2

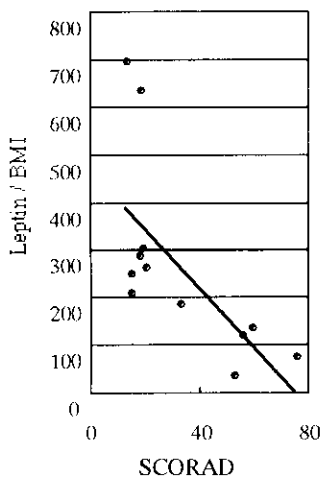


図 3

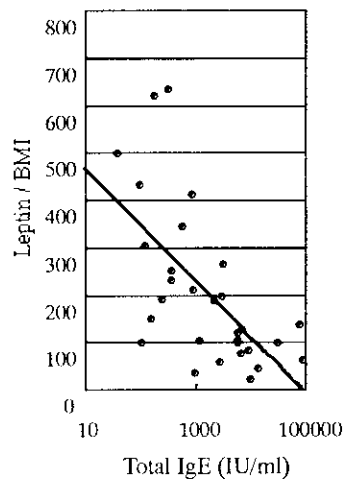


図 4

図 1. アトピー性皮膚炎患者における血清レプチンの平均値(■)と、その BMI から予想される正常人での値(□)との比較。

図 2. BMI と血清レプチン値の関係(左: 男性患者, 右: 女性患者, ○は健常人)

図 3. SCORAD index と血清レプチン/BMI 比の関係

図 4. 総 IgE 値と血清レプチン/BMI 比の関係

アトピー性皮膚炎患者線維芽細胞における
エオタキシン産生パターンとその制御

分担研究者	片山 一郎	長崎大学医学部皮膚科 教授
研究協力者	Bae sangJae	長崎大皮膚科
	小川文秀	長崎大皮膚科
	竹中 基	長崎大皮膚科
	濱崎洋一郎	長崎大皮膚科
	清水和宏	長崎大皮膚科

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、皮膚炎の増悪因子としてはストレスや神経内分泌的な調節異常がその発症や伸展に大きな関与をしている可能性が報告されているがまだ不明の点が多い。サブスタンス P (SP) 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、皮膚肥満細胞からのヒスタミン遊離、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。我々は以前、SP が神経のみならず非神経細胞である皮膚角化細胞と線維芽細胞からも遊離されることを報告した。さらに皮膚線維芽細胞において SP とアレルギーメディエーターであるヒスタミンが 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を増強することも報告した。今回、われわれはアトピー性皮膚炎患者と健常人の皮膚線維芽細胞を用いて、ストレスとの関与が考えられる SP と様々な抗原によってマスト細胞から遊離されるヒスタミンが IL4 誘導性エオタキシン産生に及ぼす影響を ELISA, RT-PCR, FACS で検討した。さらにそれぞれの線維芽細胞を初代培養から継代し、継代によるエオタキシン産生パターンを検討したので報告させていただく。

A. 研究目的

IL4 が皮膚線維芽細胞よりエオタキシン産生を誘導し、好酸球などの炎

症性細胞の遊走に深く関与していることはよく知られている。また SP は通常様々な刺激により神経終末から