

研究分担者 佐伯秀久 東京大学医学部皮膚科講師

研究要旨 2002～2004 年度の厚生労働省研究班(古江班)において、2003 年までに発表された国内外の論文を基に、アトピー性皮膚炎(AD)に対するタクロリムス外用療法の有効性と安全性を評価した。今回は、2004～2008 年に発表された論文を基に再評価を行った。タクロリムスと AD とをキーワードにして、医学中央雑誌による検索を行うと 299 件がヒットし、臨床効果に関する原著論文は 11 件あった。tacrolimus と atopic dermatitis とをキーワードにして、PubMed による検索を行うと 254 件がヒットし、Systematic review が 1 件、Meta-analysis が 4 件、臨床効果に関する原著論文が 46 件あった。現在までに得られた臨床知見から、タクロリムス外用薬の AD における短期および長期の有効性は十分に証明されている。本剤を既存の外用薬と比較した場合、0.1%タクロリムス軟膏はストロング・クラスのステロイド外用薬とほぼ同等の効果を示すことが実証されている。タクロリムス外用薬の安全性に関しては、有害事象として一過性の灼熱感がほぼ全ての研究結果により示されているものの、3 年以上の長期投与試験の結果からも重篤な全身性有害事象はなく、安全性に大きな問題はないものと考えられる。さらに、皮膚癌やリンパ腫の発生病リスクの問題に関しても、タクロリムス軟膏外用を行っても自然発生率を超えるものではないとの報告がみられるようになってきた。AD に対するタクロリムス外用薬の有効性および安全性は、過去の科学的妥当性のある質の高い臨床試験の結果から十分に証明されており、エビデンスのレベルは 1、勧告のグレードは A に相当する。また、AD の疾患感受性遺伝子に関する研究に関しては、当施設においてもヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得た。現在、AD 患者 55 名の調査・サンプル採取が終了したが、今後も積極的に AD 患者からサンプル採取を進めていく。

研究協力者

常深祐一郎 東京大学医学部皮膚科助教
加藤 豊章 東京大学医学部皮膚科
柴田 彩 東京大学医学部皮膚科

どうかを調べるため、全国からの人口流入地域である東京地域においても、同様にアトピー性皮膚炎患者から血液サンプルを集めて疾患感受性遺伝子の解析をし、石垣スタディの結果と比較・検討することにした。

A. 研究目的

(1) アトピー性皮膚炎の疾患感受性遺伝子に関する研究はわが国でも行われており、IgE 産生能や気道過敏性に関する候補遺伝子や、最近では皮膚表皮の角化に関与するフィラグリン遺伝子の点突然変異などが報告されつつあるが、未だ疾患を包括的に説明する決定的なものはない。より正確な候補遺伝子の探索のためには、ある地域に生活する集団を全体として解析するコホート解析を用いる必要がある。

九州大学皮膚科では、沖縄県石垣島の乳幼児の集団検診と採血による血液データの解析を行っており、アトピー疾患関連遺伝子の解明も併せて行っている。今までに様々な臨床的アトピー関連因子や、いくつかの疾患感受性候補遺伝子が挙がってきている。また最近、日本人が SNP タイピングにより大きく Ryukyu と Hondo クラスターの 2 つに分けられることが判明した。石垣島のコホート群における血液検査、遺伝子研究などで得られた成果が、日本人に広く応用可能であるか

(2) 平成 14～16 年度(2002～2004 年度)の厚生労働省研究班(古江班)「アトピー性皮膚炎の既存治療法の EBM による評価と有用な治療法の普及」のなかで、タクロリムス外用療法を担当し、2003 年までに発表された国内外の論文を基に、アトピー性皮膚炎(AD)に対するタクロリムス外用療法の有効性と安全性を評価した。そこで今回は、2004 年以降に発表された論文を基に、より長期の使用におけるタクロリムス外用療法の AD に対する有効性と安全性を再評価した。

B. 研究方法

(1) まず、東京大学の倫理審査委員会に本研究の倫理審査を申請する。承認を受けた後、東京大学附属病院皮膚科を通院中のアトピー性皮膚炎患者 100～200 名を目標に、文書で本研究に対して同意を得た患者から血液検体、アンケート票(「医師調査票」と ISSAC13-14 を元に作成

した「患者アンケート票」を回収し解析する。血液検体は理化学研究所に送付し、遺伝子解析を行う。

(2) タクロリムス (tacrolimus) と AD (atopic dermatitis) とをキーワードにして、PubMed (Medline) (2004-2008) および医学中央雑誌 (2004-2008) による検索を行い、臨床効果に関する論文を渉猟し内容を検討した。

C. 研究結果

(1) 本研究 (受付番号: 2138、研究課題: アトピー疾患関連遺伝子に関する疫学的研究) は、平成 20 年 7 月 29 日付けで東京大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得た。また平成 21 年 1 月 9 日現在、アトピー性皮膚炎患者 55 名の調査・サンプル採取が終了した。

(2) タクロリムスとアトピー性皮膚炎 (AD) とをキーワードにして、医学中央雑誌 (2004-2008) による検索を行うと 299 件がヒットし、臨床効果に関する原著論文は 11 件あった。このなかには、多施設での小児 AD に対する 2 年以上の長期観察試験が含まれていた。また、tacrolimus と atopic dermatitis とをキーワードにして、PubMed (Medline) (2004-2008) による検索を行うと 254 件がヒットし、Systematic review が 1 件¹⁾、Meta-analysis が 4 件、臨床効果に関する原著論文が 46 件あった。このなかには、有用性に関する欧米での大規模な多施設共同試験が 6 件、欧米以外の国ごとの多施設共同試験が 4 件、他剤との比較試験 (ステロイド外用薬、ピメクロリムス外用薬など) が 10 件、寛解維持療法に関するものが 2 件、AD の眼瞼炎に対する効果に関するものが 3 件、安全性に関するもの (血中濃度、皮膚癌・リンパ腫発生リスク、感染症に関するもの) が 10 件含まれていた。

<参考文献>

1) Garside R, et al: Health Technol Assess 9: 1-230, 2005.

D. 考察

(1) 当科におけるサンプル採取はやや遅れているので、今後も院内での掲示など、より積極的な働きかけを通じて研究を進めていく必要がある。

また、当科での既存サンプルを用いた遺伝子解析研究も併せて行った。アトピー性皮膚炎 (基

本的に Th2 優位の疾患) 患者 160 名、尋常性乾癬 (Th1 あるいは Th17 優位な疾患) 患者 153 名、健常人 103 名より得られたサンプルを用い、IL-18 遺伝子 (Th1 および Th2 の両方に関与) および IL-17 遺伝子 (Th17 に関与) の多型 (SNP) 解析をした。IL-18 遺伝子の -137G/C SNP は尋常性乾癬では有意差が認められたが ($p < 0.05$)、アトピー性皮膚炎では有意差はみられなかった。また、IL-17F 遺伝子の 7488T/C SNP は、尋常性乾癬でもアトピー性皮膚炎でも有意差は認められなかった。

(2) 現在までに得られた臨床知見から、タクロリムス外用薬の AD における短期および長期の有効性は十分に証明されており、さらに本剤を既存の外用薬と比較した場合、0.1% タクロリムス軟膏はミディアム・クラスのステロイド外用薬やピメクロリムス・クリームより効果が高く²⁾、ストロング・クラスのステロイド外用薬とほぼ同等の効果を示すことが実証されている。0.03% タクロリムス軟膏の強さに関しては論文がまだ少ないが、ウィーク・クラスのステロイド外用薬より効果が高く³⁾、ピメクロリムス・クリームとほぼ同等の効果を示すとの報告がみられている。他方、タクロリムス外用薬の安全性に関しては、有害事象として一過性の灼熱感がほぼ全ての研究結果により示されているものの、3 年以上の長期投与試験の結果からも重篤な全身性有害事象はなく、安全性に大きな問題はないものと考えられる⁴⁾。さらに、皮膚癌やリンパ腫の発生リスクの問題に関しても、タクロリムス軟膏外用を行っても自然発生率を超えるものではないとの報告がみられるようになってきた^{5,6)}。また、タクロリムスの使用方法に関しては、寛解導入療法のみならず、寛解維持療法としての使い方が欧米のガイドラインで提唱されているが、寛解導入後、週に 2-3 回のタクロリムス外用を続けることで、症状の再燃を有意に抑えられるとの報告が最近みられている^{7,8)}。

<参考文献>

2) Fleischer AB Jr, et al: J Dermatolog Treat 18: 151-7, 2007.

3) Reitamo S, et al: Br J Dermatol 150: 554-62, 2004.

4) Hanifin JM, et al: J Am Acad Dermatol 53: S186-94, 2005.

5) Margolis DJ, et al: Dermatology 214: 289-95, 2007.

6) Arellano FM, et al: J Invest Dermatol 127: 808-16, 2007.

7) Wollenberg A, et al: Allergy 63: 742-50, 2008.

8) Breneman D, et al: J Am Acad Dermatol 58: 990-9, 2008.

E. 結論

(1) 大規模なアトピー性皮膚炎の疾患感受性遺伝子解析のため、当科においても引き続き、積極的にアトピー性皮膚炎患者からサンプル採取を進めていく。

(2) AD に対するタクロリムス外用薬の有効性および安全性は、過去の科学的妥当性のある質の高い臨床試験の結果から十分に証明されており、エビデンスのレベルは 1、勧告のグレードは A に相当する。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 学会発表

(1) Kato T, Tsunemi Y, Saeki H, Shibata S, Sekiya T, Nakamura K, Kakinuma T, Kagami S, Fujita H, Tada Y, Sugaya M, Tamaki K: IL-18 gene polymorphism -137 G/C is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris and not to atopic dermatitis in Japanese patients. International Investigative Dermatology 2008, Kyoto, May 14-17, 2008.

2. 論文発表

(1) 佐伯秀久:アトピー性皮膚炎の最新治療研究:アトピー性皮膚炎とタクロリムス軟膏. アレルギーの臨床 28: 1120-5, 2008.

(2) Kato T, Tsunemi Y, Saeki H, Shibata S, Sekiya T, Nakamura K, Kakinuma T, Kagami S, Fujita H, Tada M, Sugaya M, Tamaki K: IL-18 gene polymorphism -137 G/C is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris and not to atopic dermatitis in Japanese patients. J Dermatol Sci 53: 162-3, 2009.

(3) Shibata S, Saeki H, Tsunemi Y, Kato T, Nakamura K, Kakinuma T, Kagami S, Fujita H, Tada Y, Sugaya M, Tamaki K: IL-17F single nucleotide polymorphism is not associated with psoriasis and atopic dermatitis in the Japanese population. J Dermatol Sci 53: 163-5, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

皮膚の損傷治癒と神経再生

研究分担者 遠山正彌 大阪大学大学院医学系研究科教授

研究要旨

脳特異的セリンプロテアーゼとして同定された Neuropsin (Kallikrein8, Klk8) は炎症表皮の増殖と分化に AP2 α 、Keratin 10 の発現制御を通じて重要な役割を果たすことを明らかとした。

A. 研究目的

かゆみ刺激あるいは炎症刺激を負荷すると表皮が増殖しかつ表皮内での感覚神経の自由終末が sprouting を引き起こす。しかしながらその分子機序は不明な点が多い。Neuropsin (Kallikrein8, Klk8) は脳に特異的なプロテアーゼとして塩坂らにより同定された因子で学習・記憶機序にキ一的役割を果たす。一方末梢組織では Klk8 が皮膚の損傷時にケラチノサイトでの発現が急上昇することあるいはケラチノサイトの角化に関与することが示されてきた。本研究では Klk8 が炎症時の皮膚表皮の増殖、角化に関与するか否かを、また関与するとすればどのような分子機序で関与するのかを明らかとする。あるいは損傷皮膚、とりわけ表皮再生の分子機序について検討した。

B. 研究方法

Neuropsin (Kallikrein8, Klk8) ノックアウトマウス (奈良先端化学技術大学院大学塩坂貞夫教授より供与) 表皮において特異的に発現変化する因子を検索 Differential Display 法を持ち手検索した。また各因子の mRNA レベルの発現検索はリアルタイム PCR 法を、タンパクレベルでの検索には Western Blotting 法を用いた。また組織レベルでは前者には in situ hybridization 法を後者には免疫組織化学法をその同定に用いた。培養 HaCat 細胞における Klk8 ノックダウンには siRNA 法を用いた。

倫理面への配慮

動物実験においては大阪大学医学系研究科動物実験規定を順守し、動物への苦痛が最小限になるよう配慮した。またヒト組織を用いた研究は培養細胞を使用しているため倫理面での問題はない。

C. 研究結果

1. Klk8 ノックアウトマウス表皮では炎症を負荷しても表皮の肥厚はおこらない
野生型マウスに Sodium Lauryl Sulfate (SLS) を負荷すると表皮の肥厚が生じ、肥厚した表皮有棘層では Klk8 発現が著明に増強していた。一方 Klk8 ノックアウトマウスで SLS を負荷しても表の肥厚は殆ど認められなかった。

2. Klk8 が炎症時に皮膚表皮を増殖させる分子機序の解明

SLS を負荷した野生マウス表皮と SLS を負荷した Klk8 ノックアウトマウス表皮において発現に差のある因子を Differential Display 法を用いて検討した。その結果 KO マウスでは転写因子 AP2 α 発現が特異的に上昇していることを見出し、リアルタイム PCR でもこの結果を確認した。さらに AP2 α の下流に存在しケラチノサイトの分化因子である Keratin 10 の発現をリアルタイム PCR で検討したところその発現が大きく減少していた。これらの変化は SLS 塗付後でも同様であった。次いで in vitro 解析をヒトケラチノサイト (HaCat) を用いて行った。siRNA

により HaCat での K1k8 発現をノックダウンした。K1k8 ノックダウン細胞で AP2 α 、Keratin10 の発現を検討したところ、in vivo と同様の結果、すなわち AP2 α の発現上昇、Keratin 10 の発現減少、が得られた。

3. K1k8-AP2 α -Keratin 10 カスケードは同一のケラチノサイトで発現しているかについて

野生型マウス表皮での K1k8, AP2 α 、Keratin 10 発現を免疫組織化学を用いて検討した。その結果、K1k8 表皮有細胞層の表面側 2/3 のケラチノサイトに発現していた、AP2 α は基底層の細胞および有棘細胞層の基底層に近い部分の細胞に発現する。基底層に接する有棘細胞層での AP2 α の発現は表面に向かうほど弱くなり中央部あたりでは殆どみられない。一方 Keratin 10 は有棘細胞層全般に発現している。K1k8 ノックアウトマウス表皮では K1k8 の発現はみられない。AP2 α 、Keratin 10 の分布は野生型マウスと同様であるが AP2 α の発現は野生型に比し高く、Keratin 10 の発現は低い。

D. 考察

K1k8 ノックアウトマウスマウス皮膚に SLS を負荷し炎症を惹起させても表皮の肥厚・増殖が殆ど起きなかった事実は K1k8 が炎症時の表皮増殖のキー因子であることを示す。また K1k8 ノックアウトあるいは Haca1 における K1k8 ノックダウンが AP2 α の発現上昇と Keratin 10 の発現減少を誘導した事実および Keratin 10 がケラチノサイトの分化因子であるという従来の結果は炎症皮膚表皮でケラチノサイト内の K1k8 の発現が上昇し、そのことが基底細胞と基底細胞に近い有棘細胞での AP2 α の発現を減少させ、それがケラチノサイト分化因子である Keratin 10 の発現を上昇させ、ケラチノサイトの分化に関わると想定できる。また K1k8 ノックアウトマウス表皮に炎症を惹起させても

表皮の増殖が起こらなかった事実、K1k8 欠損が基底細胞の AP2 α の発現を低下させた事実は K1k8 が表皮の増殖にも関与していることを示す。

今後の課題として 1) 上皮 3 種の因子の動態がヒト乾癬症でも再現できるか、2) 炎症を負荷した K1k8 ノックアウトマウス表皮において神経線維が sprouting を引き起こしているかどうか、3) 我々は既に神経成長因子 (NGF) の受容体 p75 が炎症表皮の増殖と感覚神経の sprouting に有用な役割を果たすことを示しているので K1k8-p75 相関があるのか否かの検討などが挙げられる。

E. 結論

表皮 K1k8 発現変動により発現制御される因子の検索の研究は以下の表皮損傷時の再生機序を明らかとした。すなわち表皮損傷により有棘細胞での K1k8 発現が上昇する。K1k8 発現の上昇は基底細胞と基底細胞に接する有棘細胞での AP2 α 発現の低下をもたらし、それが有棘細胞での分化因子 Keratin 10 の発現上昇を引き起こし、結果ケラチノサイトの分化を引き起こす。有棘細胞での K1k8 発現上昇により基底細胞での AP2 α の低下が表皮の増殖にキーとしての役割を果たす。

F. 研究発表

1. 論文発表

Taniguchi et al., ;P75 plays a key role in the induction of the sprouting of sensory nerve fibers in inflamed skin. J Invest, Dermatol., 127 (2007)2062-2065

2. 学会発表

谷口 学、松崎伸介、遠山正彌. 慢性皮膚炎モデルマウスにおける表皮の肥厚及び表皮内神経線維侵入の機序における P75 の役割について第 113 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 大分 シンポジウム (招待講演) 平成 20 年 3

月 29 日 (土)

新垣 健太、谷口 学、松崎 伸介、
塩坂 貞夫、遠山 正彌. ニューロブ
シン欠損マウスの炎症皮膚で発現変動
する遺伝子の解析。第 51 回日本神経
化学会・全国学術集会 富山 平成 20 年
9 月 11 日 (木)

新垣 健太、谷口 学、松崎 伸介、
塩坂 貞夫、遠山 正彌. カリクレイ
ン 8 は転写因子 AP-2a の発現を抑制す
ることにより表皮の分化を促進させる。
第 84 回日本解剖学会近畿支部学術集会。
平成 20 年 11 月 29 日 (土)

G. 知的財産権の出願登録状況
なし

マウスモデルを用いた掻痒発現機序の解析と天然物を対象とした掻痒抑制物質の探索

研究分担者 稲垣 直樹 岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室 教授

研究協力者 田中 宏幸 岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室 准教授

研究協力者 山下 弘高 岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室 助教

研究要旨

NC/Nga マウスの耳殻にダニ (*Dermatophagoides farinae*) 排泄物から調製した抽出物 (FAG) を反復塗布し、高頻度の掻破行動を伴う皮膚炎の誘発を試みた。10 mg/ml の FAG 溶液を週 2 回、計 9 回、4 週間にわたって繰り返し塗布することによって高頻度の掻破行動を伴う顕著な耳殻腫脹が誘発された。耳殻組織では顕著な表皮の肥厚、真皮の腫脹、炎症性細胞の浸潤が認められ、肥満細胞の増多、多数の好酸球の浸潤が確認された。また、耳殻では IL-4、IFN- γ 、TARC および IP-10 mRNA 発現の増大が認められたが、頸部リンパ節では IL-4 mRNA 発現の増強と IFN- γ mRNA 発現の減弱が認められた。dexamethasone および tacrolimus の 2 週間の外用投与は耳殻の腫脹を顕著に抑制し、2 週間後には掻破行動も有意に抑制した。FAG はダニ虫体抽出物 (tBAG、鳥居) に比し、約 2 倍の大量の Der f 1 を含んでいたが、Der f 2 含量は相対的に少なく、また、tBAG の場合とほぼ同等であった。FAG 反復塗布によって誘発する皮膚炎モデルは、dexamethasone が掻破行動抑制作用を示すことから、dinitrofluorobenzene 反復塗布によって誘発する皮膚炎モデルとは特性の異なるアトピー性皮膚炎モデルとして有用であると思われる。

A. 研究目的

掻痒はアトピー性皮膚炎のもっとも重要な症状であり、誘発される掻破行動は皮膚症状を増悪し、患者 QOL を著しく損なうのみならず、特徴的な皮膚病変の形成に関わる。したがって、掻痒および誘発される掻破行動を制御することはアトピー性皮膚炎治療において極めて重要である。これまでに、ハブテン反復塗布による、高頻度の掻破行動を伴うマウス皮膚炎モデルを確立し、tacrolimus の掻破行動抑制機序を解析してきた。dexamethasone はハブテン反復塗布による皮膚炎を強く抑制するが、掻破行動には抑制作用を示さない。一方、ダニ抗原はアトピー性皮膚炎の発症に関わるとされるため、ダニ *Dermatophagoides farinae* の虫体抽出物 (tBAG、鳥居) を NC/Nga マウス耳殻へ反復塗布して皮膚炎モデルの作製を試みてきた。NC/Nga マウスへの tBAG の週 1 回の反復塗布は血中 IgE レベルの上昇を伴う Th2 優位な皮膚炎を誘発したが、掻破行動はほとんど観察されなかった。本研究では、ハブテン反復塗布による皮膚炎と特性を異にするアトピー性皮膚炎モデルを確立するため、新たに *D. farinae* の排泄物から抽出物 (FAG) を調製し、これを用いて高頻度の掻破行動を伴うマウス皮膚炎モデルの確立を試みた。

B. 研究方法

D. farinae (アース製薬より分与) を培養し、培地中に蓄積した排泄物から可溶性成分を抽出、濃縮して FAG を調製した。タンパク濃度を測定し、抗原濃度はタンパクの濃度として示した。また、虫体抽出物 (BAG) も調製した。比較のために鳥居薬品製の虫体抽出物 (tBAG) も使用した。

NC/Nga マウスの両耳殻にダニ抗原の PBS 溶液を週 2 回、計 9 回塗布して皮膚炎を誘発した。3 回目の抗原溶液塗布までは、塗布 1 時間前にテープストリッピングを行った (図 1)。



図 1. 皮膚炎誘発のプロトコール

抗原溶液塗布の前後に耳殻の厚さを測定して耳殻腫脹を評価した。抗原溶液塗布の前日に採血し、血中総 IgE の推移を観察した。掻破行動は抗原溶液塗布直後の 1 時間観察した。最終回の塗布後に耳殻、頸部リンパ節を採取し、組織標本の作製、mRNA 発現の検討を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験はすべて岐阜薬科大学における動物実験の実施に関する規程にしたがい、承認を受けて実施した。

C. 研究結果

10 mg/ml の FAg の反復塗布により、3 回目の塗布後から耳殻腫脹が誘発された。腫脹は極めて強く、ピークは各塗布の 24 あるいは 48 時間後に認められ、5 回の塗布によって腫脹は最大レベルに達した。1 mg/ml の FAg 溶液塗布の場合には 5 回目の塗布後から腫脹が出現したが、7 回目以降の塗布による腫脹の強度は 10 mg/ml 溶液塗布の場合とほぼ同等であった。9 回の塗布終了後には、耳殻腫脹は徐々に軽減した (図 2)。

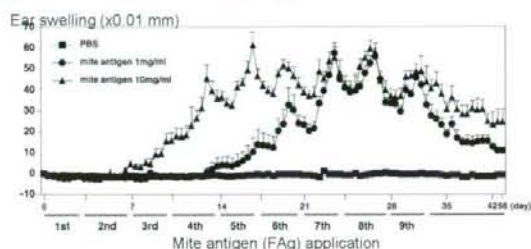


図 2. 耳殻腫脹の経時変化

10 mg/ml の FAg の 4 回目の塗布後から有意な搔破行動の増加が認められ、9 回目の塗布後 1 時間には約 500 回の搔破行動が観察された。1 mg/ml 溶液の塗布では顕著な搔破行動の増加は認められなかった (図 3)。

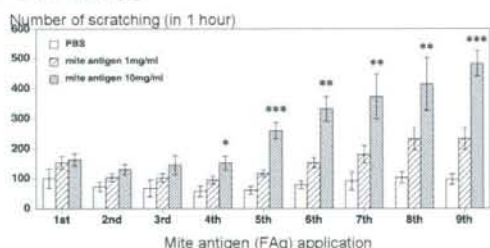


図 3. 搔破行動の変化

10 mg/ml の FAg 溶液の 5 回目の塗布時から血中総 IgE 値の上昇が認められ、1 mg/ml 溶液塗布の場合には 7 回目の塗布時から血中総 IgE 値の上昇傾向が認められた。

FAg を反復塗布した耳殻組織では顕著な表皮の肥厚、真皮の腫脹、炎症細胞の浸潤が観察され、肥満細胞の増多、多数の好酸球の浸潤が確認された。また、耳殻組織では IL-4、IFN- γ 、TARC および IP-10 mRNA 発現の増強が認められた。一方、頸部リンパ節では抗原溶液の反復塗布によって IL-4 mRNA 発現が増強し、IFN- γ mRNA 発現は減弱し

た。

5 回目の抗原溶液塗布日から最終塗布日までの 2 週間、dexamethasone および tacrolimus のエタノール溶液を耳殻へ塗布して影響を検討した。両薬物は耳殻腫脹を強く抑制し (図 4)、また、9 回目の抗原溶液塗布による搔破行動を有意に抑制した (図 5)。さらに、血中総 IgE の上昇に対しても抑制する傾向を示した

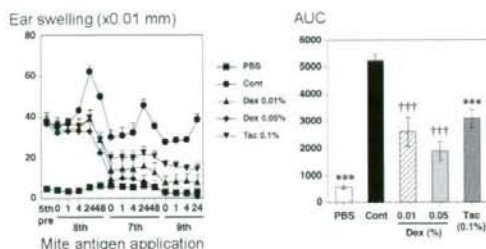


図 4. 耳殻腫脹に対する影響

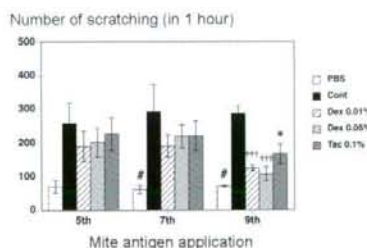


図 5. 搔破行動に及ぼす影響

BAG および tBAG の反復塗布による皮膚炎を FAg 反復塗布による皮膚炎と比較した。図 6 に示すように、FAg は強い耳殻腫脹を誘発したが、BAG による腫脹は軽度であり、tBAG (Torii BAG) による反応はさらに軽微であった。また、FAg の反復塗布によって高頻度の搔破行動が誘発されたが、BAG および tBAG (Torii BAG) による搔破行動の誘発はわずかであった (図 7)。

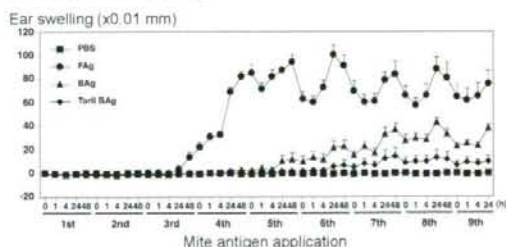


図 6. FAg、BAG および tBAG によって誘発される皮膚炎の比較

FAg は tBAG に比し、約 2 倍の大量の Der f 1 を含んでいたが、Der f 2 含量は相対的に少なく、また、tBAG の場合とほぼ同等であった。

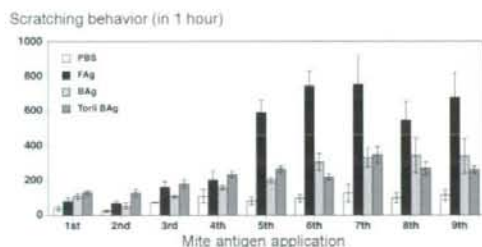


図 7. FAg、BAg および tBAg によって誘発される搔破行動の比較

FAg の SDS-PAGE による解析では、Der f 1 および Der f 2 のバンドの他に、およそ 120 kDa の位置に濃いバンドが確認された。

予備的な検討により、FAg には大量の LPS が含まれることを確認した。そこで、FAg 中に大量に含まれる LPS の皮膚炎に及ぼす影響を確認するため、LPS の大部分を除去した FAg を反復塗布して皮膚炎を誘発した。図 8 に示すように、LPS を除去した場合には耳殻腫脹は、LPS を除去しない FAg に比し、むしろ若干増強された。

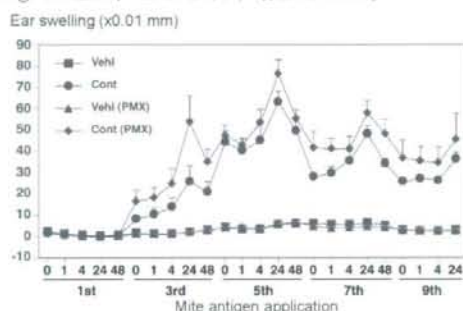


図 8. FAg 中の LPS の耳殻腫脹に及ぼす影響。LPS は polymixin B カラムで除去した。

D. 考察

NC/Nga マウスはヒョウヒダニアレルゲンに対して強い皮膚反応を発現し、しばしば皮膚炎モデルの作製に用いられてきたが、ダニ抗原反復塗布によって高頻度の搔破行動が誘発されるモデルはほとんど知られていない。本年度の検討によってダニ排泄物抽出物 FAg を用いることにより、抗頻度の搔破行動を伴う、極めて強い耳殻腫脹を誘発するモデルを確立することができた。本モデルではリンパ節において Th2 優位なバランスが形成され、血中 IgE も上昇する。また、dexamethasone が搔破行動を抑制することから、ハブテン反復塗布による皮膚炎モデルとは異なり、アレルギー性炎症に伴って搔破行動が出現するものと推定される。本モデルは掻痒の基礎検討に用いることができるアトピー性皮膚炎

モデルとして有用であると思われる。

一方、FAg 中には鳥居薬品製の虫体抽出物 tBAg にはほとんど認められない成分が検出される。強い皮膚炎ならびに搔破行動の誘発にこの成分が関与するか否かは不明であり、さらに解析することが必要である。

E. 結論

新たに調製したダニ抗原を用い、高頻度の搔破行動を伴う強度の皮膚炎を発症するマウスモデルを確立した。本モデルはアトピー性皮膚炎の病態および掻痒の解析に有用であると思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1 件 投稿中

2. 学会発表

稲垣直樹, マウス皮膚炎モデルの確立と医薬開発への応用. 第 81 回 日本薬理学会年会, シンポジウム, 3 月 19 日, 横浜. (J Pharmacol Sci 106, suppl 1, 41 p, 2008)

宮本義浩, 他. ダニ抗原反復塗布によるマウスアトピー性皮膚炎モデルの作成. 第 54 回 日本薬学会東海支部大会, 7 月 5 日, 名古屋. (要旨集 p. 43, 2008)

加藤秀雄, 他. DNFB と不による搔破行動に対するカルシニューリン阻害薬の単回処置の効果. 第 18 回国際痒みシンポジウム, 10 月 25 日, 東京. (要旨集 p. 7, 2008)

宮本義浩, 他. ダニ抗原反復塗布によるマウスアトピー性皮膚炎モデルの作成. 第 58 回 日本アレルギー学会秋季学術大会, 11 月 27 日, 東京. (アレルギー 57, 1402, 2008)

加藤秀雄, 他. マウスアレルギー性皮膚炎に及ぼす抗アレルギー薬 loratadine の影響. 第 58 回 日本アレルギー学会秋季学術大会, 11 月 28 日, 東京. (アレルギー 57, 1493, 2008)

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

特になし

アトピー性皮膚炎の既存治療におけるステロイド外用薬と環境アレルゲン除去のEBMの評価及び行動療法とタクロリムス軟膏による痒み制御に関する臨床研究

研究分担者 大矢 幸弘 国立成育医療センター第一専門診療部アレルギー科医長

研究要旨

アトピー性皮膚炎の標準治療薬であるステロイド外用薬に関するEvidenceについて2004年以降の文献を網羅的に検索した。その結果、短期的な効果に優れ、長期寛解維持には週2回の塗布で副腎抑制や皮膚萎縮といった副作用を回避しつつ再発防止に役立つことが示された。抗生剤の併用は皮膚感染症の予防には若干役立つが特に治療効果はない。患者の訴える有害事象はステロイド外用薬よりもタクロリムス軟膏に多い傾向があり、むしろ使用感はステロイドが優れている。今後はステロイド外用薬とタクロリムス軟膏の特性を考慮した使い分けが課題となろう。また、習慣性掻破行動を有する患者への行動療法の応用も今後検討されるべきと思われる。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎の治療はステロイド外用薬とタクロリムスのようなカルシニューリン抑制外用薬が第一選択薬であり、それぞれの効果や副作用についてはかなり知られるようになってきたが、それらの適切な使用方法についてはまだ十分に普及しているとは言えない。エビデンスに基づいたステロイド外用薬の使用法とはどのようなものか、また同時に指導されることの多い環境整備やタクロリムス軟膏の使用法や効果など、さらにアドヒアランスを向上させ痒みを制御するための行動療法に関して、臨床現場に還元できるエビデンスの発見を目指して、多面的に研究をすすめる。

B. 研究方法

今年度はステロイド外用薬のEBM評価に関しては、本研究班が2003年に発表したエビデンス集に収録されていない文献を中心に網羅的な検索を行った。使用したデータベースやEMBASE、MIDLINE及び医学中央雑誌で、2004年から2008年までに収録された文献を対象とした。EMBASE、PubMed(Medline)では'atopic dermatitis'と'steroid'をキーワードにして検索を行い、'controlled study' OR 'comparative study'や'humans'でlimitsをかけて得られた文献について検討した。医学中央雑誌では'glucocorticoids' AND '皮膚炎・アトピー性'の検索式に、'メタアナリシス、ランダム化比較試験、準ランダム化比較試験、比較研究、診療ガイドライン'の限定を加えて検索した文献を検討した。タクロリムス軟膏による痒みの制御に関する臨床研究では7名の患者のエントリーを行い、現在追加患者を募集中である。

行動療法に関する臨床研究では、2007年度(2008年3月まで)に入院したアトピー性皮膚炎患者に関する習慣性掻破行動に関する後方視的解析を行った。

C. 研究結果

検索式でヒットしたのはEMBASE&MIDLINEが301件で、タイトルやアブストラクトの内容を検討し、カルシニューリンインヒビターを中心とするものなど本研究の目的に合致しないものを除去した結果、41件の文献が残った。医学中央雑誌では8件ヒットしたが、タクロリムスを除くと1件だけ残った。それらを全て取り寄せて検討した結果、二次論文であることが判明したり、さらに引用文献を取り寄せて検討する必要が生じたものもあり、最終的に本研究の趣旨に合う論文は以下の28編であった。

I ステロイド外用薬の効果と安全性に関する研究

1. Matheson R et al. J Drug Dermatol 2008;3: 266-271.
2. Herbert AA et al. J Am Acad Dermatol 2008; 59: 334-40.
3. Kimball AB et al. J Am Acad Dermatol 2008; 59: 448-54.
4. Hebert AA et al. J Drug Dermatol 2007; 2: 175-181.
5. Eichenfield LE et al. J Am Acad Dermatol. 2006; 54: 715-7.
6. Breneman D et al. J Drug Dermatol 2005;3:330-336.
7. Fowler JF et al. Cutis 2005;75:125-131.

II ステロイド外用薬の1日の塗布回数に関する研究

8. Green C et al. Br J Dermatol 2005; 152: 130-141.
9. Green C et al. HTA 2004; 8: vol 47.
10. Williams HC et al. Arch Dermatol 2004;140:1151-2.

III ステロイド外用薬にウェットラップ法を併用した効果

11. Berth-Jones J et al. BMJ 2003; 326: 1367-1362.
12. Foelster-Holst R et al. Dermatology 2006;212: 66-69.
13. Hindley D et al. Arch Dis Child 2006; 91:164-168.
14. Devillers ACA et al. Br J Dermatol 2006; 154: 579-585.

IV長期寛解維持のための予防的治療に関する研究

11. Berth-Jones J et.al. *BMJ* 2003; 326: 1367-1362.
15. Peserico A et.al *Br J Dermatol* 2008; 158: 801-807.
Vステロイドに他の薬剤を併用・混合したものとステロイド単剤との比較研究
16. Gong JQ et.al. *Br J Dermatol* 2006; 155: 680-687.
17. Schuttelaar MLA et.al. *J EADV* 2008; 22: 1076-1082.
VI天然成分の保湿剤の効果を唱った外用薬からステロイド外用薬を除去した外用薬との比較
18. Pellanda C et.al. *Dermatology* 2005; 211: 338-340.
VIIステロイド外用薬の副腎機能抑制およびその他の副作用に関する研究
19. Schlessinger J et.al. *Arch Dermatol* 2006; 142: 1568-1572.
20. Hebert AA et.al. *J Pediatr* 2006; 149: 378-82.
21. Eichenfield LF et.al. *Pediatric Dermatology* 2007; 24: 289-295.
25. Bieber T et.al. *Allergy* 2007; 62: 184-189.
26. Josefine G et.al. *Pediatric Dermatol* 2008; 25: 269-270.

VIIIその他の研究

27. Craig N et.al. *International J Dermatol* 2004; 43: 215-219.
28. Conde JF et.al. *Cutis* 2008; 81: 435-441.
これらの文献の内容を下記に要約した。
I ステロイド外用薬の効果と安全性に関する研究
7編のRCTが該当した。Hydrocortisone butyrate (HB) 0.1% cream と次の3種類のクリーム fluticasone propionate (FP) 0.05% cream, prednicarbate (PC) 0.1% cream, mometasone furoate (MF) 0.1% cream のうち1種類との左右比較試験では、毎日2回連続2週間使用後の肌のなめらかさと保湿感においてHBが勝るとの結果であった。Clobetasol propionate 0.05% lotion とその基材またはclobetasol propionate cream とのRCTで、Clobetasol propionate 0.05% lotionが他の2剤よりも2週間後の皮膚状態が有意に改善し、中止後の悪化までの期間も最も長かった。Fluticasone propionate lotion 0.05%を使用した2つのRCTのまとめを発表した論文では皮膚状態の2週間後の有意な改善と4週間後までの安全性と有効性について記述している。4群のステロイド外用薬であるdesonide hydrogel 0.05% と基剤との4週間のRCTではITT解析が行われ、皮膚状態の有意な改善が認められ、1例が毛細血管の拡張をみとめ、対照群の3例が皮膚状態の悪化や刺激感で中断した。Clobetasol propionate emulsionの第II相および第三相RCTが発表され、2週間の連続使用にて可逆性の視床下垂体副腎系の抑制を一部に認めたが、その他の副作用は有意ではなく、基剤よりも有意な皮膚状態の改善が得られた。Desonide foam 0.05%の第2相および第3相試験が発表され、4週後に4%の患者に軽度の可逆性の視床下垂体副

腎系の抑制を認めたが、その他の有害事象はプラセボ基剤の方が多かった。Hydrocortisone butyrate 0.1% lotion のRCTでは生後3ヶ月の乳児から18歳までの軽症または中等症の小児284人が対象で、4週間連日2回塗布の結果、基剤よりも有意な皮膚状態の改善を示し、有害事象は基剤の方が多かった。

IIステロイド外用薬の1日の塗布回数に関する研究

論文の主目的ではないが、Fluticasone propionate 0.05% cream またはfluticasone propionate 0.005% ointmentを中等症から重症の患者を1日1回塗布群と1日2回塗布群とに分け(2X2設計4群)4週間後に寛解状態に入った率に差がなかったというデータが示されており、第三者がその意義を指摘している。2005年に発表された統合的レビューでは一部例外はあるものの多くの強めのステロイド外用薬には1日1回塗布と複数回塗布とに治療効果の有意な差は認められなかったとしている。

IIIステロイド外用薬にウェットラップ法を併用した効果

Prednicarbatを用いて腕もしくは脚にステロイド単独塗布とウェットラップ併用とで左右比較を行い、48-72時間後の皮疹の改善に有意さがあつたと報告している。一方、ウェットラップを4週間使用したRCTでは効果に差はなく、むしろウェットラップ群に皮膚感染症の副作用が多かったとしている。同年出版された簡易な統合的レビューでは、ウェットラップの推奨グレードはCと低いが、悪化時の短期的使用にはよいかもしれないとのことである。

IV長期寛解維持のための予防的治療に関する研究

前述したBerth-Jonesの論文の主目的がこれであるが、Fluticasone propionate 0.05% cream またはfluticasone propionate 0.005% ointmentを中等症から重症の患者を1日1回塗布群と1日2回塗布群とに分け(2X2=計4群)4週間後に寛解状態に入ったあと、週2回ステロイドを塗布する群と基剤塗布群とにランダム割り付けをして16週間フォローした結果週2回Fluticasoneの塗布群が有意に再発が少なかったことを示している。Methylprednisolone aceponate cream を使用した研究では、中等症から重症の患者を寛解期に導入したあと、週2回塗布する群と保湿剤のみにした群とを比較し、前者が後者の3.5倍再発が少なかったとしている。

Vステロイドに他の薬剤を併用・混合したものとステロイド単剤との比較研究

Hydrocortisone butyrate とmupirocinを毎朝塗布する群とhydrocortisone butyrateとmupirocinの基剤を毎朝塗布する群のRCTでは1週間後の皮疹の改善は前者が若干よかったが2週後と4週後には差がなかった。Tetracyclineをtriamcinolone acetonideに加えた群とtriamcinolone acetonide単剤塗布群のRCTでは、寛解導入期2週間、維持期6週間を通じて皮疹の改善効果に差はなかった。ただし、皮膚感染症などの有害事象は前者の方が少なかった。

VI天然成分の保湿剤の効果を唱った外用薬からステロイド外用薬を除去した外用薬との比較

天然の植物成分からなる外用薬から弱いステロイドであるtriamcinoloneが検出され、その外用薬の治療効果が天然成分によるものか、添加されたtriamcinoloneによるものかをRCTにて検証した論文が発表され、1週後、2週後、4週後の評価を経て植物成分には全く治療効果がなく、triamcinoloneによる効果であることを証明した。

VIIステロイド外用薬の副腎機能抑制およびその他の副作用に関する研究

生後3ヶ月から18歳までの小児を年齢群別に4群のコホート集団に分け0.1% flucocinonide cream 0.1% を2週間塗布し、副作用を調べたところ、1日1回塗布群では副腎抑制はなく、1日2回塗布群で6歳未満の31名中3名に生じた。生後3ヶ月から6歳までの中等症から重症の小児を対象に fluticasone propionate 0.05% lotionを1日2回4週間使用し副作用と調べた研究では、全員副腎抑制や皮膚萎縮などの副作用は認められなかったとしている。Desonide hydrogel 0.05% を生後6ヶ月から6歳までの小児40名4週間使用した研究では、副腎抑制は認められなかった。Methylprednisolone aceponate 0.1% ointment使用群とtacrolimus 0.03%使用群との3週間に及ぶRCTでは前者の方が皮疹スコアや痒みおよび睡眠の改善がよく、有害事象も生じなかったが、後者には4.4%に認められたとしている。Mometasone furoate およびtacrolimusを2週間使用したあとに施行した皮膚ブリックテストではアレルギーによる膨疹を抑制したとの報告があった。

VIIIその他の研究

ステロイド外用薬とタクロリムスの患者満足度に関する研究が報告されており、hydrocortisone butyrate 0.1% と Tacrolimus 0.1%の比較では、1日2回塗布2週間後の評価は前者の方をより多くの患者が好むという結果であった。Clocortolone pivalate 0.1% creamを使用したアドヒアランスの研究では、最初の1週間のアドヒアランスはよく効果も著しいが、その後アドヒアランスが低下すること、また、自己評価によるアドヒアランスは電子追跡で客観的に測定されたアドヒアランスよりも高く申告されることなどが明らかとなった。

行動療法に関する臨床研究で解析の対象となったのは2007年4月から2008年3月までに国立成育医療センターアレルギー科に入院した95名のアトピー性皮膚炎患者のうち習慣性掻破行動が認められた19名である。年齢は生後4ヶ月から16歳までで、全員にオペラント条件付けが認められ、11歳と16歳にはレスポナント条件付けが認められた。19名全員がステロイド外用薬またはタクロリムスによる外用治療を受け、同時に行動療法を施行して習慣性掻破行動を消去した。

D. 考察

ステロイド外用剤の有効性に関する文献では、純粋な新薬の開発研究はほとんどなく、従来から使用されている薬剤について新たな剤型を開発し、その効果を検討したものが多かった。ただ、ローション

などの塗布しやすい剤型が開発されたことは、アドヒアランスの向上には望ましい影響を与えるものと思われる。文献28によるとアドヒアランスと皮疹の改善には当然のことであるが相関があり、経時的に悪化することを考えると今後アドヒアランスの維持という課題が慢性疾患としてアトピー性皮膚炎の治療を成功させるためには重要な課題になろう。またステロイド外用剤の使用法については、抗生剤との併用は皮膚感染症の減少を期待できるが、皮疹の改善効果はなく、長期の使用は耐性菌蔓延の懸念があり、必要時の短期使用にとどめるべきと思われる。ウェットラップ法の併用は増悪時の短期使用であれば期待できそうに思われるが長期的使用では効果よりも副作用の懸念が生ずる。また、ステロイド外用薬の1日1回塗布が2回塗布と同じ効果であるとの主張が目立ったが、Fluticasone propionateという我が国には外用薬としては導入されていない薬剤でのデータを中心に述べられており、我が国で頻用されているstrong class や very strong class の薬剤のデータは不足している。これらについての結論は長期寛解維持療法における間欠塗布法のEvidenceの集積を含め、今後も質の高いRCTsが多数発表される必要がある。また、天然成分100%であることを唱った欧州産の保湿クリームにtriamcinoloneが入っていることが判明し、その薬剤の治療効果は天然成分によるものではなく、ステロイドであることが証明されたとの報告は、ステロイドフォビアの消費者に詐欺的商法への警戒を促すものと言えよう。

行動療法による習慣性掻破行動の治療はまだ一般化しているとは言えず、患者に抑制帯をつけたり四肢をベットの縛りという人権問題に触れるような治療が一部の病院ではまだ行われている。そのような有害な治療は不要であり、今後は行動療法が標準治療の一環として組み込まれていくことが必要と思われる。ただ、効果が明らかな治療法をRCTによって実証することの倫理性が問われるため臨床研究論文としてのEvidence作りが苦慮するところではある。

E. 結論

ステロイド外用薬はアトピー性皮膚炎の治療には非常に効果的であり、数週間以内の連続使用や長期でも間欠塗布であれば副作用もほとんどなく、タクロリムスよりも患者の満足度は高い。今後はステロイド外用薬、タクロリムス軟膏、保湿剤、そして行動療法などとの組み合わせによる効率的な治療法が開発が課題となろう。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表(学会発表)

Y.Ohya et.al. Functional analysis of the habitual scratching of patients with atopic dermatitis and behavioral intervention. 5th George Raika international symposium on atopic dermatitis, Kyoto.2008

アトピー性皮膚炎の痒みと炎症の機序の解析

研究分担者 浜崎雄平 佐賀大学医学部小児科学教授
研究協力者 市丸智浩 佐賀県立病院好生館小児科部長
研究協力者 山本修一 佐賀大学医学部小児科学助教

研究要旨

研究目的: 掻痒の強いアトピー性皮膚炎の慢性期における病変部位では、Th2のみならずTh1サイトカインが存在するが、これらによるケモカイン産生制御については不明な点が多い。今回はTh1サイトカインIFN- γ の作用について好酸球性炎症に重要なケモカインCCL26産生に及ぼす影響について検討した。

方法: ヒト正常表皮角化細胞NHEKにおけるCCL26 mRNA発現を半定量的および定量的RT-PCR法で、蛋白産生をELISA法で、細胞表面の受容体の発現をFACS法およびWestern法で、細胞内シグナル分子の活性化をWestern法にて検討した。

結果: NHEK をIL-4で刺激するとCCL26を産生した。IFN- γ 単独ではCCL26産生に影響を与えなかった。IL-4とIFN- γ が同時に培養液中に存在すると、IFN- γ はIL-4で産生されるCCL26産生を濃度依存性に抑制した。一方、IFN- γ で前処置した細胞では、IL-4により誘導されるCCL26産生は増強した。IFN- γ はIL-4受容体のcomponentであるIL-4R α 鎖、IL-2R γ 鎖、IL-13R α 1鎖のmRNA発現を濃度依存性に増強した。FACS解析でも、IL-4R α およびIL-2R γ の細胞表面での発現はIFN- γ の濃度依存性に増強された。さらに、IL-4で誘導されるSTAT6のリン酸化は、IFN- γ を前処置した細胞で増強した。

考案: アトピー性皮膚炎慢性期の皮膚局所では、IFN- γ はIL-4受容体発現増強を通じて、皮膚局所の好酸球性炎症を維持または増強する作用を持つことが示唆される。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎の急性期の皮膚局所には、主にリンパ球、肥満細胞、好酸球が浸潤している。これらの炎症細胞は皮膚ケラチノサイトが産生するケモカインにより、皮膚局所に誘導されると考えられている。アトピー性皮膚炎の急性期の皮膚局所ではTh2リンパ球から産生されるTh2サイトカインが優位である。Th2サイトカインIL-4、IL-13は皮膚ケラチノサイトにeotaxin-3/CCL26産生を誘導させることが知られており、これがアトピー性皮膚炎急性期における好酸球浸潤に重要な働きをしていると考えられている。

一方、アトピー性皮膚炎慢性期の皮膚局所においては、Th1/Th2 mixed pattern となり、Th2サイトカインの重要性が減少するのに対し、IFN- γ を代表とするTh1サイトカインの重要性が増すと考えられている。IFN- γ はケラチノサイトに対しTARC/CCL17産生を誘導し、Th2リンパ球を誘導する反面、Th2サイトカインにより誘導されるCCL26産生を抑制するため、皮膚の好酸球浸潤は抑制されると考えられるが、慢性期の皮膚では依然好酸球が認められる。これらの事実は、アト

ピー性皮膚の皮膚局所におけるIFN- γ の役割をあいまいなものにしている。

そこで本研究では、皮膚ケラチノサイトからのCCL26産生に対するIFN- γ の作用およびその制御メカニズムについて検討した。

B. 研究方法

ヒト正常表皮角化細胞NHEKをもちいて検討した。未刺激のNHEKを、IL-4 (0~50 ng/ml)およびIFN- γ (0~100 ng/ml)を同時にまたは時間差をおいて添加し培養した。mRNA発現を定量的または半定量的PCR法にて、培養液中に放出された蛋白をELISA法にて検討した。細胞表面のIL-4R受容体発現はフローサイトメトリー法およびWestern法にて、STAT6のリン酸化をWestern法にて解析した。

C. 結果:

1) IFN- γ のCCL26産生に対する作用
NHEKでは3種のeotaxin (CCL11, CCL24, CCL26)のconstitutiveなmRNA発現を認めなかった。Th2サイトカインIL-4はCCL11, CCL26のmRNA発現を誘導したがCCL24発現は誘導しなかった。IFN- γ のこれら

otaxin mRNA 発現に対する作用は認めなかったが、IL-4 で誘導される CCL26 mRNA 発現を濃度依存性に抑制した (図 1)。

2) IL-4 により誘導される CCL26 に対する IFN- γ 前処置の効果

次に NHEK を図 2 のように IFN- γ で前処置後 IL-4 で刺激した時の CCL26 mRNA 発現および産生について検討した。NHEK を 24 時間 IFN- γ で刺激後 NHEK を PBS で

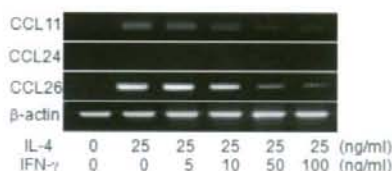


図 1

洗いさらに 24 時間培養した。この細胞を IL-4 で刺激したところ、IFN- γ で刺激しなかった細胞に比べ CCL26 mRNA 発現および産生は有意に増強した。

3) IFN- γ の IL-4 受容体発現に及ぼす影響

IL-4R には 2 種類の、すなわち type 1 IL-4R

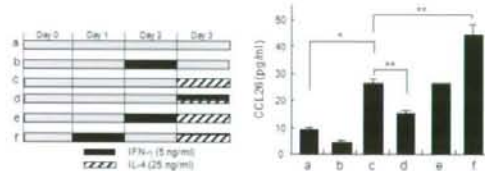


図 2

と type 2 IL-4R が存在する。type 1 IL-4R は IL-4R α 鎖と IL-2R γ 鎖の heterodimer である。Type 2 IL-4R は IL-4R α 鎖と IL-13R α 1 鎖で構成される。IFN- γ はこれらすべての component の mRNA 発現を濃度依存性に増強した。同時に decoy receptor として知られる IL-13R α 2 の mRNA 発現も増強した (図 3)。FACS 解析では、IL-4R α 鎖と IL-13R α 1 鎖ともに NHEK 細胞表面での分

子発現の増強が確認された (図 4)。Western 法でもこれらの蛋白発現増強を確認した。

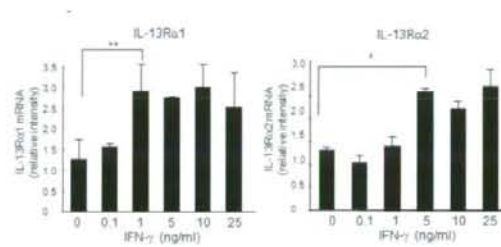
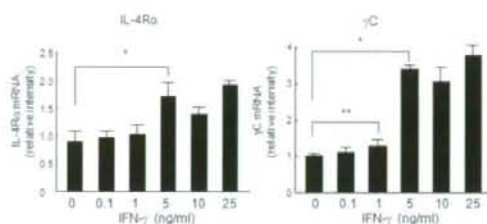
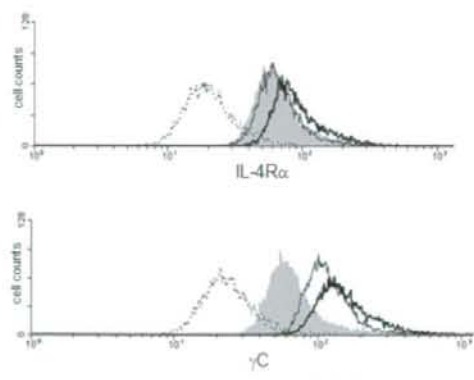


図 3 ↑

図 4 ↓



D. 考察:

NHEKにおいて、IL-4はCCL26を主に誘導すると思われる。

これまでの多くの報告によると、アトピーIL-4RのシグナルはSTAT6を介する。IFN- γ で刺激したNHEKでは、IL-4刺激によるSTAT6リン酸化の増強が認められた。今回の検討では、IL-4の刺激によりNHEKは3種類のeotaxinのうちeotaxin-3/CCL26を産生し、CCL11およびCCL24を産生しなかった。アトピー性皮膚炎の炎症皮膚局所におけるサイトカインプロファイルは急性期から慢性期にいたる経過において、Th2からTh1/Th2 mixed patternへと変化するといわれている。IFN- γ はIL-4によるCCL26産生を抑制するので、アトピー性皮膚炎の慢性期において好酸球性炎症は減弱すると考えられるが、この時期にも好酸球は多数存在する。今回我々はIFN- γ があらかじめ存在すると、IL-4R発現増強を通じてIL-4によるCCL26産生を増強することを示した。これが、アトピー性皮膚炎慢性期の皮膚における好酸球浸潤の機序の一部である可能性がある。IL-4はtype 1およびtype 2 IL-4Rを介してシグナルを伝達するのに対し、IL-13はtype 2 IL-4Rのみを介する。また、IL-13R α 2鎖はIL-13R α 1のdecoy receptorとして存在する。本研究の結果は、IFN- γ はtype 1およびtype 2 IL-4Rいずれの発現も増強することを示しているが、IFN- γ はIL-13R α 2鎖の発現も同時に増強させるので、結果的にIFN- γ が存在する炎症の場でのIL-13の重要性はIL-4に比べ相対的に低下すると考えられる。これまでアトピー性皮膚炎においては、Th2サイトカインの中で特にIL-13の重要性について強調されてきた。本研究の結果はIFN- γ が存在する炎症の場、すなわち慢性期のアトピー性皮膚炎の皮膚局所におけるIL-4の重要性について示唆しているものと考えられる。

E. 研究発表

(論文発表)

1. Nishi N, Yamamoto S et al. Enhanced

CCL25 production by IL-4 through IFN- γ -induced upregulation of type 1 IL-4 receptor in keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;376:234-240

2. 浜崎雄平: 小児の食物アレルギー 今日の治療指針2008 医学書院 東京 (pp1027-1029)

(学会発表)

1. 浜崎雄平, 市丸智浩, 山本修一: 乳幼児における痒み一支援療法について 第32回日本小児皮膚科学会 東京 2008, 6.28-29

2. 浜崎雄平, 稲田由紀子, 谷口一登, 梁井啓輔, 人見会美子, 西奈津子, 辻功介, 宮崎倫子, 人見知洋, 在津正文, 室英理子, 山本修一, 小林育子, 貞包雄次郎, 市丸智浩 乳幼児アトピー性皮膚炎患児における痒みに対する支援療法についての調査. 西日本アレルギー研究会 福岡 2008. 7. 27

4. 西奈津子, 稲田由紀子, 辻功介, 宮崎倫子, 人見知洋, 在津正文, 室英理子, 稲田成安, 小林育子, 山本修一, 市丸智浩, 浜崎雄平, : 皮膚keratinocyteにおけるeotaxin3産生に対するINF γ の作用 第45回日本小児アレルギー学会 (横浜) 2008.12.13-14 児アレルギー誌 22: 669,

アトピー性皮膚炎における食物アレルギー除去療法のEBMに関する研究

研究分担者	浜崎雄平	佐賀大学医学部小児科学教授
研究協力者	市丸智浩	佐賀県立病院好生館小児科部長
研究協力者	山本修一	佐賀大学医学部小児科学助教
研究協力者	柴田瑠美子	国立病院機構福岡病院

研究要旨

研究目的: アトピー性皮膚炎(AD)における食物アレルギー除去食療法、または食事療法のrandomized controlled trial臨床研究を中心としたエビデンスの文献的な集積による評価を行う。

方法: 2004年から2008年10月に出版された文献において、英語論文をPubMed (キーワード: atopic dermatitis, elimination diet) にて、日本語論文を医中誌Web (キーワード: アトピー性皮膚炎、除去食療法または食餌療法) で検索し、RCTに基づく検討についてそのEBMを評価した。

結果: 日本語論文検索では計168件のヒットが合ったが、いずれも対象のない臨床研究によるものでRCT, non-RCTを含めた比較試験は見られなかった。PubMed検索では128件が検索された。そのうちEBM評価の対象としたものは5件である。ADに対する治療としての除去食療法の効果については1件あり、皮膚テスト陽性のアレルギー除去においてADの改善効果が認められた。ミルクアレルギーを伴うAD症例に対する食事療法に関するものは2件あり、プロバイオティクスおよび加水分解乳はAD症状を改善した。AD発症に対する食事療法に関する検討が1件あり、プロバイオティクスに発症予防効果を認めた。AD症例に対する不必要な除去食療法を指摘したものが1件あり、食物負荷試験などの必要性が述べられていた。

考案: 食物アレルギーの関与するアトピー性皮膚炎に対する除去食療法または食事療法の有効性は示唆されたが、これらの療法を施行する場合にはその対象を食物負荷試験や皮膚試験にて選別することが重要であると考えられた。

A. 研究目的

元来小児科においては、乳児のアトピー性皮膚炎と食餌抗原との関連に注目し食物アレルギー除去療法が行われていたが、そのエビデンスおよび方法の検討は不十分で、過剰な除去における栄養障害などの症例も報告されていた。一方皮膚科においてはそれに対し否定的な意見も見られていたが、近年、両科において「食物アレルギーの関与するアトピー性皮膚炎」が存在するとのコンセンサスが得られるに至った。したがって、アトピー性皮膚炎の治療および発症予防に対する、除去食療法または食事療法の有効性に対するエビデンスを検討する必要がある。

そこで本研究では、2004年以降に発行された文献について各種データベースを用い検索し、アトピー性皮膚炎に対する食物除去食療法、および食事療法のエビ

デンスについて検討した。

B. 研究方法

2004年から2008年10月に出版された文献において、英語論文をPubMed (キーワード: atopic dermatitis, elimination diet) にて、日本語論文を医中誌 Web (キーワード: アトピー性皮膚炎、除去食療法または食餌療法) で検索し、RCT に基づく検討についてそのEBMを評価した。

C. 結果:

日本語論文検索では計168件ヒットしたが、いずれも対象のない臨床研究によるものでRCT, non-RCTを含めた比較試験は見られなかった。

PubMed 検索では128件が検索された。そのうちEBM評価の対象としたものは5件である。

AD に対する治療としての除去食療法の効果については 1 件あり、2 歳以下の AD 児 123 例についての検討である(1)。皮膚テスト陽性のアレルゲン除去において AD の改善効果が認められた。皮膚テスト陰性群ではスキンケアのみで皮膚症状の改善をみた。

ミルクアレルギーを伴う AD 症例に対する食事療法に関するものは 2 件検索された。230 例の乳児を対象にした検討では(2)、1 日 2 回 4 週間の乳酸菌(Lactobacillus GG; LGG)投与にて食物抗原特異的 IgE 抗体陽性児における皮疹の改善がみられた。またミルクアレルギー疑いの乳児 77 名を対象にした加水分解乳の効果の検討では(3)、加水分解乳はアミノ酸乳に劣らず AD 症状を改善した。

AD 発症に対する食事療法に関する検討が 1 件認められた(4)。生下時から 48 カ月までの観察期間での検討であるが、アレルギー疾患の家族歴がある 206 症例を対象に、妊娠中から生後 6 カ月まで二重盲検による LGG 投与を行っている(妊娠中・授乳期は母が内服)。48 カ月時点でブラシーボに比して LGG 群の AD 発症は 56% に抑えられており、周産期の LGG 投与による AD 発症予防効果を認めた。

AD 症例に対する不必要な除去食療法を指摘したものが 1 件あり(5)、4-68 ヶ月の AD 児を対象にした検討では、ミルクの経口負荷試験での陽性率は 6.6% であり、AD 症例においてミルク除去が必要な症例は少ないと報告している。RAST 陽性率は 30% であり、RAST 値のみで判断することへの警告と食物負荷試験の必要性が述べられていた。

D. 考察:

食物アレルギーの関与するアトピー性皮膚炎に対する除去食療法または食事療法の有効性は示唆されたが、これらの療法を施行する場合にはその対象を食物負荷試験や皮膚試験にて選別することが重

要であると考えられた。

F. 参考文献:

- 1) Norrman G et al. Significant improvement of eczema with skin care and food elimination in small children. *Acta Paediatr* 94: 1384-1388, 2005
- 2) Viljanen M et al. Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. *Allergy* 60: 494-500, 2005
- 3) Niggemann B et al. Safety and efficacy of a new extensively hydrolyzed formula for infants with cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 19: 348-354, 2008
- 4) Laitinen K et al. Evaluation of diet and growth in children with and without atopic eczema: follow-up study from birth to 4 years. *Brit J Nutr* 94:565-574, 2005
- 5) Sinagra J L et al. Unnecessary milk elimination diets in children with Atopic dermatitis. *Pediatr Dermatology* 24: 1-6, 2007

研究分担者 中村晃一郎（埼玉医科大学皮膚科教授）

研究要旨

アトピー性皮膚炎(AD)は慢性に経過する皮膚炎で、強い痒みを生じ、掻破によって皮膚炎が悪化する。これまで抗ヒスタミン薬内服4週間によって血清TRAC値が改善し皮膚炎が改善することを報告した。今年度は抗ヒスタミン薬のAD患者の樹状細胞由来のTARC産生への抑制作用について検討した。この結果、抗ヒスタミン薬は樹状細胞のTARC産生を抑制することから、抗ヒスタミン薬が、皮膚局所でのTh2細胞の皮膚への浸潤抑制に関与する可能性が示唆された。またADの標準治療はステロイド外用療法が主体であるが、さまざまな民間療法や不適切治療が存在している。さらに最近の文献的検索を行い考察した。民間療法にはエビデンスレベルの高い報告例はわずかであり、ランダム化のない報告例が多く認められた。不適切治療によって皮膚症状の悪化が認められた。このような不適切治療施行例の多くはその後医療機関において標準治療が施行され、皮膚症状が改善した。

研究協力者 橋本 学 埼玉医科大学皮膚科助教
滝口光次郎 埼玉医科大学皮膚科助教
佐々木志保 埼玉医科大学皮膚科助教

症例を文献的に検討した。民間療法、不適切治療、副作用、栄養障害に関して医学中央雑誌で検索した。

A. 研究目的

①アトピー性皮膚炎(AD)の病態は皮膚のバリア機能と免疫異常から構成され、かゆみは神経ペプチド産生やサイトカイン産生を誘導し、掻破による皮膚炎の悪化を誘導する。われわれはこれまで血清TARCがADの重症度の指標となること、ステロイドがTARC産生を抑制することを報告している。また抗ヒスタミン薬はヒスタミン受容体拮抗薬であるが、われわれは抗ヒスタミン服用による血清TARC値の減少を報告している。今回さらに炎症局所で作用する樹状細胞のサイトカインTARC産生の抑制効果について検討した。

②ADの標準治療は、ステロイド外用、原因・悪化因子の除去、スキンケアである。小学校検診でADの有病率は11.2%であり、大部分は軽症であるが、最重症や重症群などが含まれる。このような症例や軽症例における民間療法の是非が論じられるが、EBMからみた検討は少ない。これまで二重盲検比較試験を試行した民間療法について5例認め、同時に74例の不適切治療について報告した。2003~2004年以降の報告例にさらに検証を加えた。

B. 研究方法

①同意の得られたAD患者より末梢血を採取し樹状細胞を培養したのち、*in vitro*で抗ヒスタミン薬($10^{-6}M$ ~ $10^{-12}M$)によるTARC産生の抑制効果について検討した。

②ADの民間療法、不適切治療についてEBMからみて

C 結果：①抗ヒスタミン薬($10^{-6}M$ ~ $10^{-12}M$)濃度投与48時間培養によって単球由来樹状細胞のTARC産生は抑制された(表1)。

②ADの民間療法EBMに関して民間療法での検索を施行した。これらを検討すると、対照群のない研究、ランダム化のない報告が大部分であり、また症例数が少なく、試験期間の記載のないもの、併用薬の記載のないもの、試験方法の記載のないものなどレベル4のものが多く認められた。多くはコントロールを設定しない症例集積研究であるものが主体であるが、さらに民間療法の有効例を示した一例(症例)報告が多かった。いっぽう、不適切な治療による皮膚炎の悪化事例が22例認められたため、これらについて解析した。内訳は、①水に関する治療(酸性水、アルカリイオン水、よもぎ水、多飲水療法、温泉、入浴剤)②食事、除去食に関する治療(健康食品、除去食、自然食)、③内服治療、④光、空気に関する治療(オゾン療法、外気浴療法)、⑤皮膚に塗布する治療(紫雲膏・プロポリス療法、オリーブオイル油)であった。これらの症例でのステロイド外用使用に関しては記載にあったものすべてで使用を中止していた。不適切治療によって生じた症状は、皮膚症状の悪化、体重増加不良、発育不良、運動発達遅延、電解質異常、偽アルドステロン症、意識喪失、カボジ水痘様発疹症、接触皮膚炎などが認められた(表1)。重篤な症状としてオゾン療法による上矢状動脈血栓症、多飲水療法、外気療法による意識障害などが認められた。

D 考察:

②単球由来樹状細胞は真皮に存在する樹状細胞に相当するが、今回の研究で抗ヒスタミン薬が樹状細胞の TARC 産生を抑制したことは、抗ヒスタミン薬が樹状細胞の Th2 細胞への皮膚炎の浸潤・活性化を直接、抑制することによって T 細胞の関与する皮膚炎の悪化を炎症局所で抑制する可能性があることが示唆された。また抗ヒスタミン薬の持続投与などによって局所での抗ヒスタミン薬の濃度が高い状態下では、より高く TARC 産生抑制効果が生じる可能性が示唆された。

②AD における民間療法として多くの治療法が試みられているが、これらの臨床研究では対照群のない研究が多く認められ、エビデンスレベルの高い研究は少ない。AD の補助療法として確立されるために、さらにまた民間療法において高いエビデンスにもとづいた治療効果の判定が必要であると考えられた。

E 結論: 昨年度の報告で抗ヒスタミン薬の有効性について、掻痒の程度、時間、夜間のかゆみについて、有意に改善することが示されたが、今回の研究により、その機序の一つに樹状細胞の TARC 産生抑制が関与するという細胞レベルでの実験的裏づけをえることができたと考えられる。

F. 研究発表

(論文発表)

1. Kato T, Tsunemi Y, Saeki H, Shibata S, Sekiya T, Nakamura K, Kakinuma T, Kagami S, Fujita H, Tada Y, Sugaya M, Tamaki K. Interferon-18 gene polymorphism -137 G/C is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris but not with atopic dermatitis in Japanese patients. *J Dermatol Sci.* 53(2):162-3, 2009
2. Shibata S, Saeki H, Tsunemi Y, Kato T, Nakamura K, Kakinuma T, Kagami S, Fujita H, Tada Y, Sugaya M, Tamaki K. IL-17F single nucleotide polymorphism is not associated with Psoriasis vulgaris or atopic dermatitis in the Japanese population. *J Dermatol Sci.* 53(2):163-5, 2009.
3. Kagami S, Saeki H, Tsunemi Y, Nakamura K, Kuwano Y, Komine M, Nakayama T, Yoshie O, Tamaki K. CCL27-transgenic mice show enhanced contact hypersensitivity to Th2, but not Th1 stimuli. *Eur J Immunol.* 38(3):647-57, 2008.

4. Nakamura K, Tsuchida T, Tsunemi Y, Saeki H, Tamaki K. Serum thymic stromal lymphopoietin levels are not elevated in patients with atopic dermatitis. *J Dermatol.* 35(8):546-7, 2008.

(学会発表)

1. 中村晃一郎、佐々木、滝口光次郎、橋本学、土田哲也。アトピー性皮膚炎患者単球由来樹状細胞の TARC、MDC 産生に及ぼす免疫抑制薬の作用。第 58 回日本皮膚アレルギー学会秋季学術大会、2008 年 11 月 27-29 日。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図 1. 抗ヒスタミン薬の単球由来樹状細胞の TARC 産生に対する抑制作用

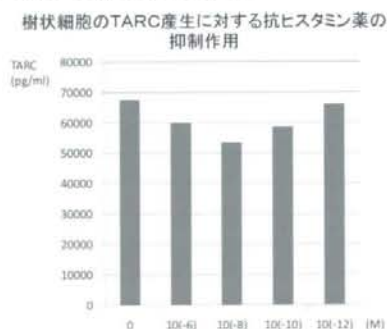


表1. 不適切治療によって生じた臨床症状

(22報告例より)

- ①皮膚のバリア機能の悪化による血漿成分滲出、低アルブミン血症。
- ②感染症(カポジ水痘様発疹症など)。
- ③投与薬剤による副作用:偽アルドステロン症、電解質異常、接触皮膚炎。
- ④栄養障害、体重増加不良、運動発達遅延。
- ⑤ステロイド外用の有無に関しては、記載のあった症例すべて(8例)でステロイド外用を中止していた。

表2. 不適切治療に対して行われた医療機関でのおもな治療内容と経過

治療内容

抗生物質、アルブミン、抗ウイルス薬、ミルク(カゼイン加水分解ミルク(MA-1)、アミノ酸乳、アレルギー用ミルク)、アレルゲン除去食、補液、ステロイド外用、スキンケア。

経過

体重増加、発育発達のcatch up、皮膚症状改善。