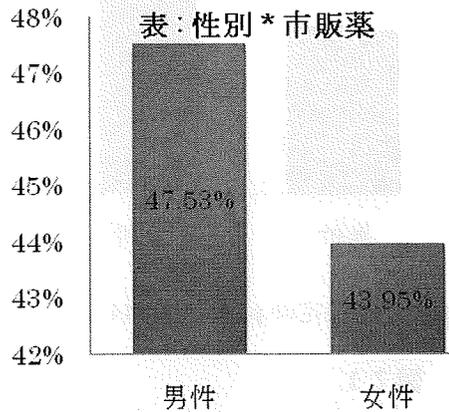


問6：「かゆみ」が強いときの対策をどうしていますか？

図63：性別との関連性

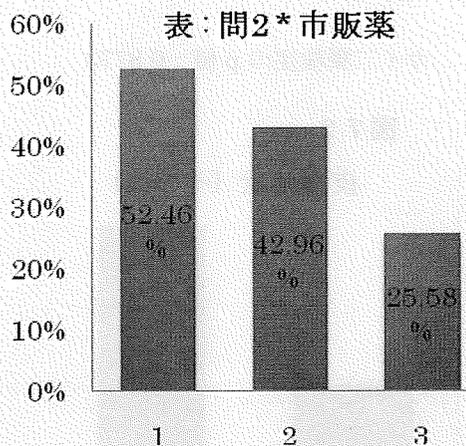


カイ二乗検定の p 値：0.1308

問2との関連性

- 1: がまんできる、たまに不快になる
- 2: どうにか耐えられる、しばしば不快になる
- 3: 耐え難い「かゆみ」で、いつも不快であり、夜眠れない

図64

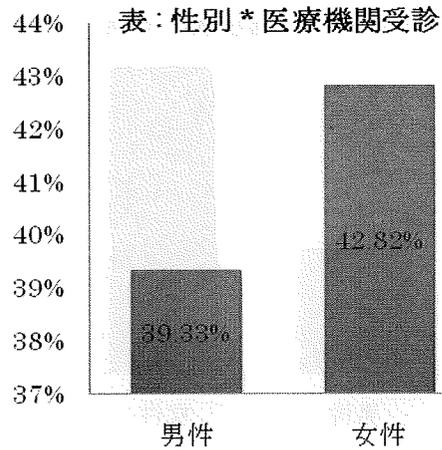


カイ二乗検定の p 値：<.0001

症状が出たとき、市販薬を選択することについては男女の差はなかった。ただ、市販薬は問2の症状が1と2の半数の者が用いることが多く、3のような症状に至ると1/4であった。

(図58-59)

図65：性別との関連性



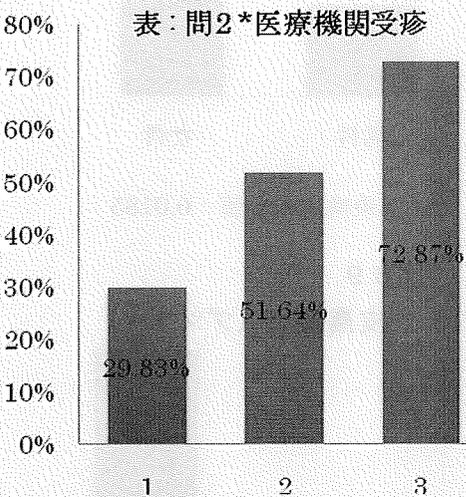
カイ二乗検定の p 値：0.1341

問2との関連性

- 1: がまんできる、たまに不快になる
- 2: どうにか耐えられる、しばしば不快になる
- 3: 耐え難い「かゆみ」で、いつも不快であり、夜眠れない

3の耐え難いかゆみになると、当然の結果であるが医療機関を受診していた(図66)。

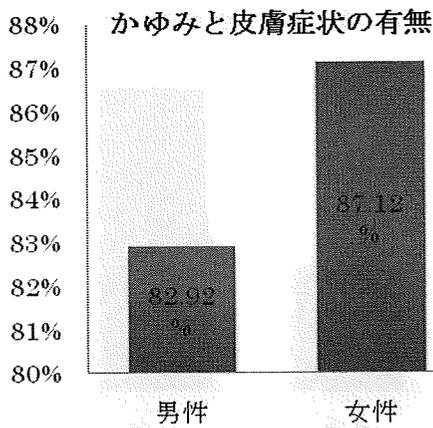
図66



カイ二乗検定の p 値：<.0001

問7：「かゆみ」とともに赤み、ブツブツ、水ぶくれ、膿などの皮膚の症状がありますか？

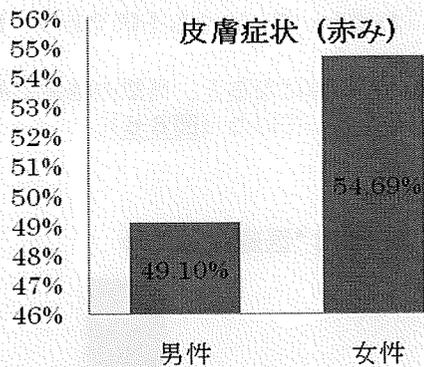
図 6 7



カイ二乗検定の p 値 : 0.0132

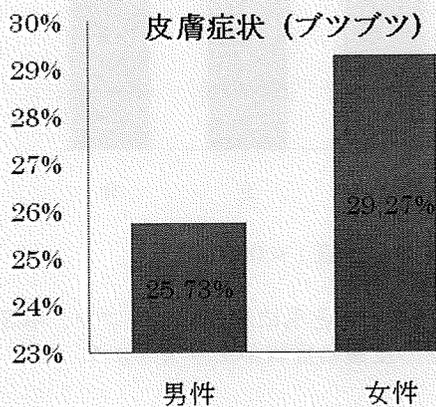
女性の方が男性に比して皮膚症状の出現者が有意に多かった (p<0.05)。(図 6 7)

図 6 8



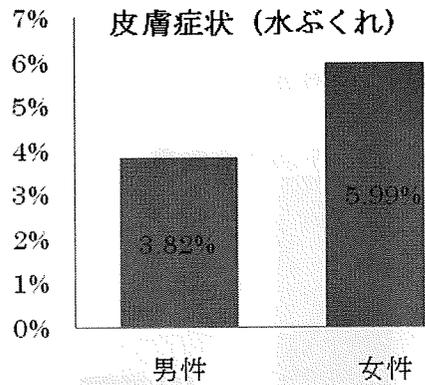
カイ二乗検定の p 値 : 0.0185

図 6 9



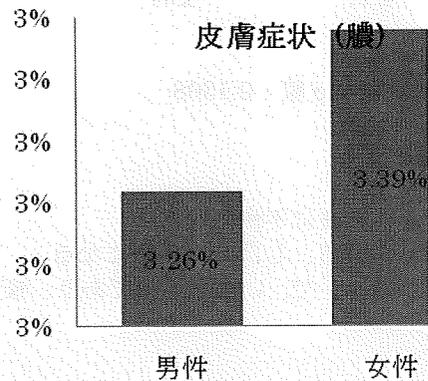
カイ二乗検定の p 値 : 0.0953

図 7 0



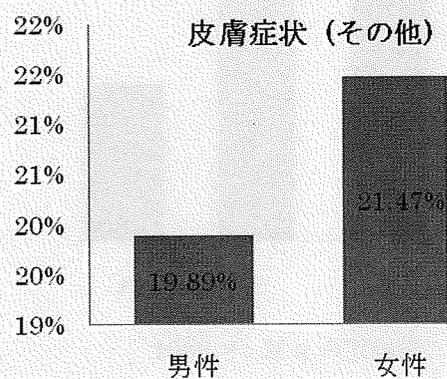
カイ二乗検定の p 値 : 0.0344

図 7 1



カイ二乗検定の p 値 : 0.8773

図 7 2

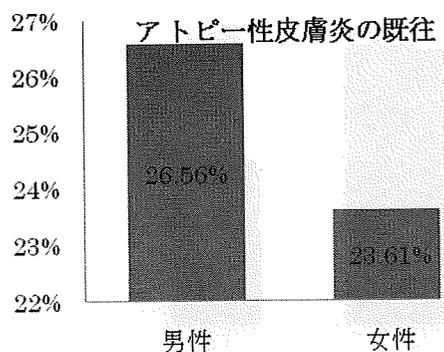


カイ二乗検定の p 値 : 0.4108

合併する皮膚症状としては、「赤み」が最も多かった (図 6 8 - 7 2)。

問 8 : 現在もしくは以前に次のような病気といわれたことはありますか?

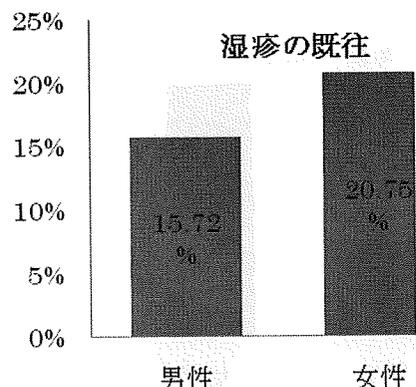
図 7 3



カイ二乗検定の p 値 : 0.1858

アトピー性皮膚炎の既往については、性差がなかった (図 7 3)。

図 7 6



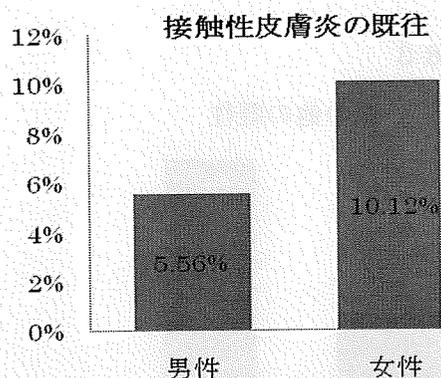
カイ二乗検定の p 値 : 0.0115

接触性皮膚炎の既往歴については、女性 > 男性 (図 7 4)

じんましの既往歴については、女性 > 男性 (図 7 5)

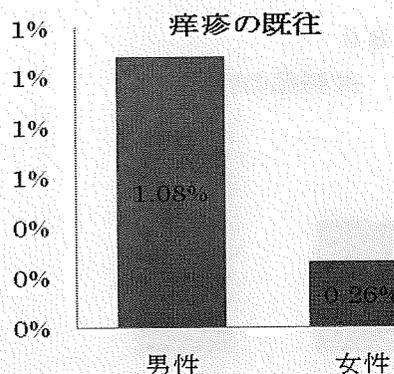
湿疹の既往歴については、女性 > 男性 (図 7 6)

図 7 4



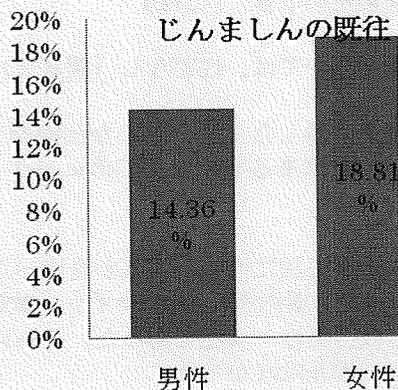
カイ二乗検定の p 値 : 0.0010

図 7 7



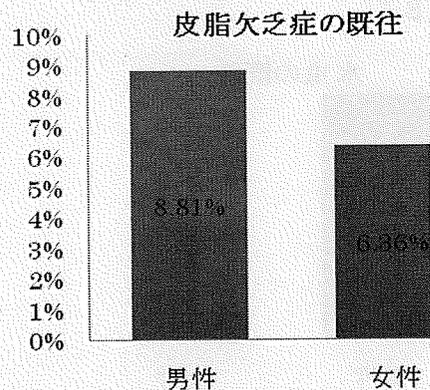
カイ二乗検定の p 値 : 0.0484

図 7 5



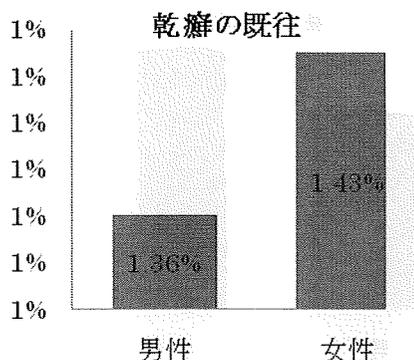
カイ二乗検定の p 値 : 0.0205

図 7 8



カイ二乗検定の p 値 : 0.0716

図 7 9



カイ二乗検定の p 値 : 0.9054

痒疹の既往歴については、男性 > 女性

(図 7 7)

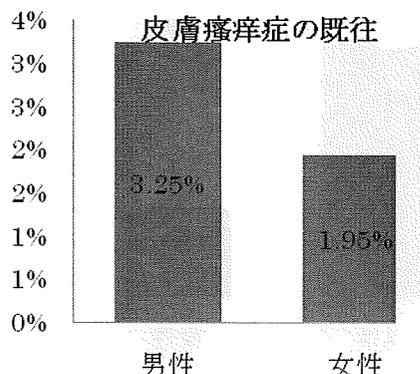
皮脂欠乏症の既往歴については、性差なし

(図 7 8)

乾癬の既往歴については、性差なし

(図 7 9)

図 8 2



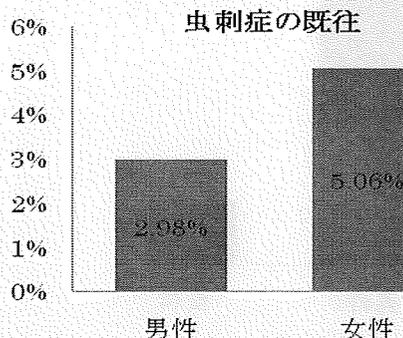
カイ二乗検定の p 値 : 0.1098

虫刺症の既往歴については、女性 > 男性 (図 8 0)

水虫の既往歴については、男性 > 女性 (図 8 1)

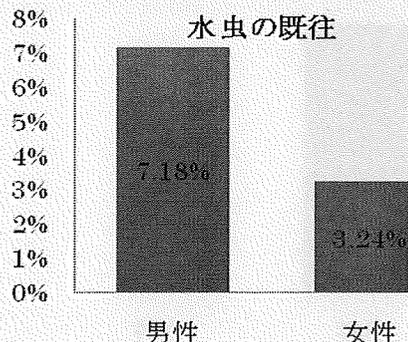
皮膚痒疹症の既往歴については、性差なし (図 8 2)

図 8 0



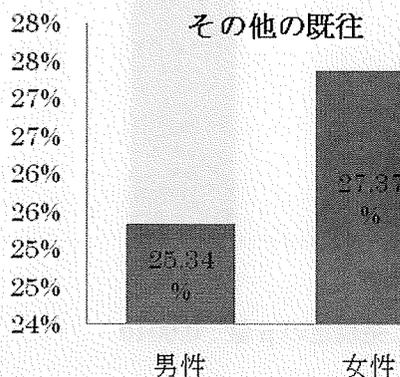
カイ二乗検定の p 値 : 0.0405

図 8 1



カイ二乗検定の p 値 : 0.0006

図 8 3



カイ二乗検定の p 値 : 0.3714

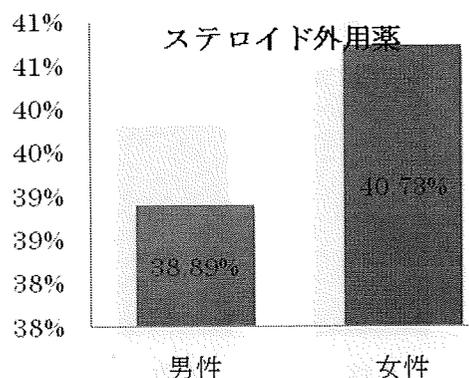
その他の既往歴については、性差なし (図 8 3)

問 9 : 医療機関を受診したとき、どんな治療を受けましたか? (あてはまるものを全てチェックしてください)

以下のように治療方法に性差があるかを調べたが、「抗ヒスタミン薬内服」「カプサイシン軟膏外用」については、男性 > 女性であった。それ以外は、治療方法に性差はなかった。

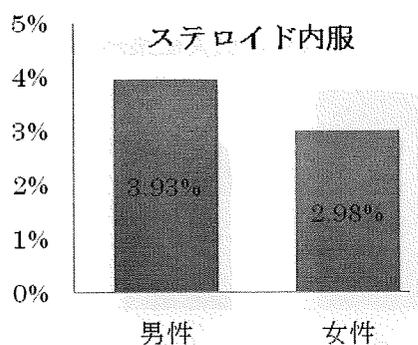
(図 8 4 - 図 9 1)

図 8 4



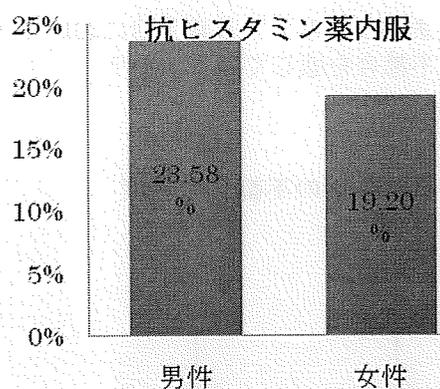
カイ二乗検定の p 値 : 0.4661

図 8 7



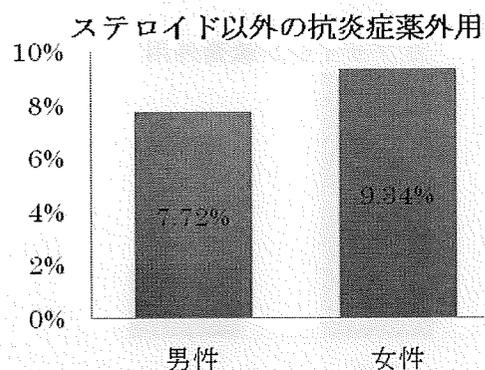
カイ二乗検定の p 値 : 0.3137

図 8 5



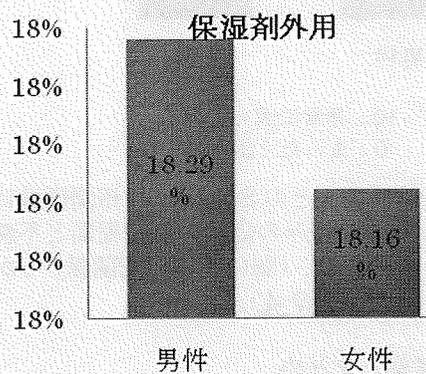
カイ二乗検定の p 値 : 0.0378

図 8 8



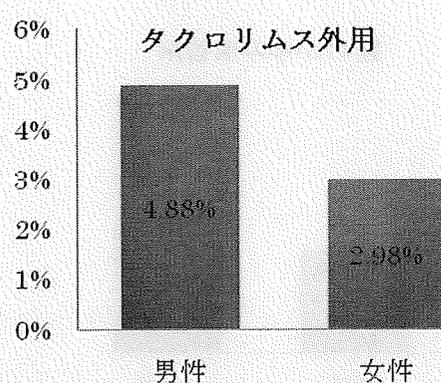
カイ二乗検定の p 値 : 0.260

図 8 6



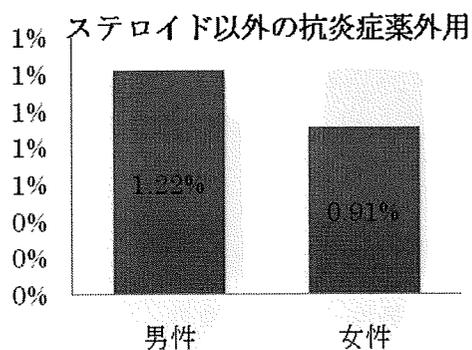
カイ二乗検定の p 値 : 0.9461

図 8 9



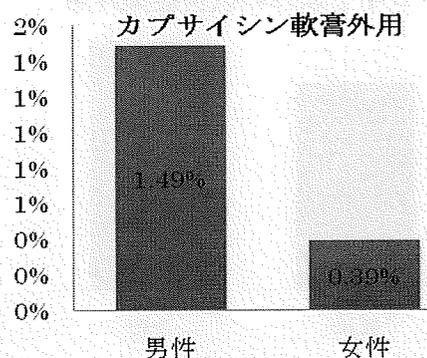
カイ二乗検定の p 値 : 0.0576

図 9 0



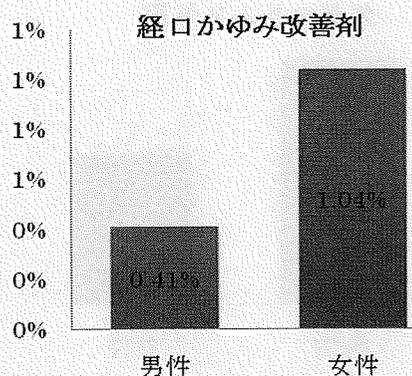
カイ二乗検定の p 値 : 0.5547

図 9 1



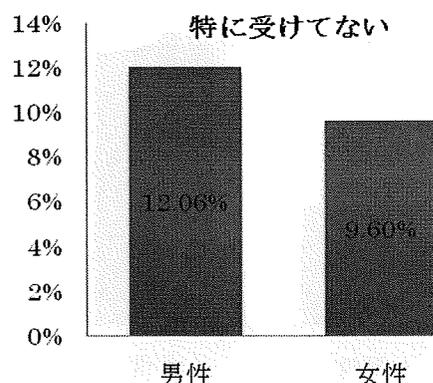
カイ二乗検定の p 値 : 0.0257

図 9 2



カイ二乗検定の p 値 : 0.1497

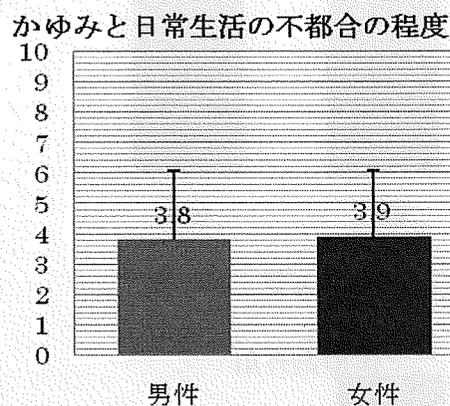
図 9 3



カイ二乗検定の p 値 : 0.1236

問 1 0 : いまのかゆみで、日常生活においてどのくらいの不都合を感じていますか？

図 9 4



値 10 : 非常に困っている
0 : まったく困っていない

問 4 の「持続時間」との Spearman 相関係数は 0.34580 となり、かゆみの症状の持続期間と不都合の度合いとの関係は、「弱い正の相関関係」しか認められなかった (図 9 4)。

D. & E. 考察とまとめ 考察

今回の調査で、かゆみの有症状者の頻度、治療方法、かゆみの態様、持続期間等の基本的な情報を得ることができた。今後の課題としては、疫学的な観点からの考察を深めるために、回答者の生活背景等を把握して、疾患との関係を見ていく必要がある。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
予定あり
2. 学会発表
予定あり

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

「かゆみ」に関するアンケートのお願い

最近、慢性的な強い「かゆみ」で悩んでおられる方が増えているといわれます。しかし、その頻度や原因などについては必ずしも明らかになっていないため、治りにくい場合も多いのが現状です。この度、全国的にこのような病気の実態を調査し、診断や治療に役立てることを目的に、アンケートをお願いすることになりました。お手数ですがご協力をお願いいたします。(お子様の場合は保護者の方がご記入ください)

厚生労働省科学研究費補助金事業

主任研究員：国立大学法人 東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 皮膚科学分野 教授 横関 博雄

「かゆみ」に関するアンケート

鉛筆か黒のボールペンで、あてはまる項目にチェック を入れてください。

性別 男 女

年齢 歳

職業

1 なかなか治らない「かゆみ」のため生活に支障をきたす(あるいは以前にきたした)ことがありますか?

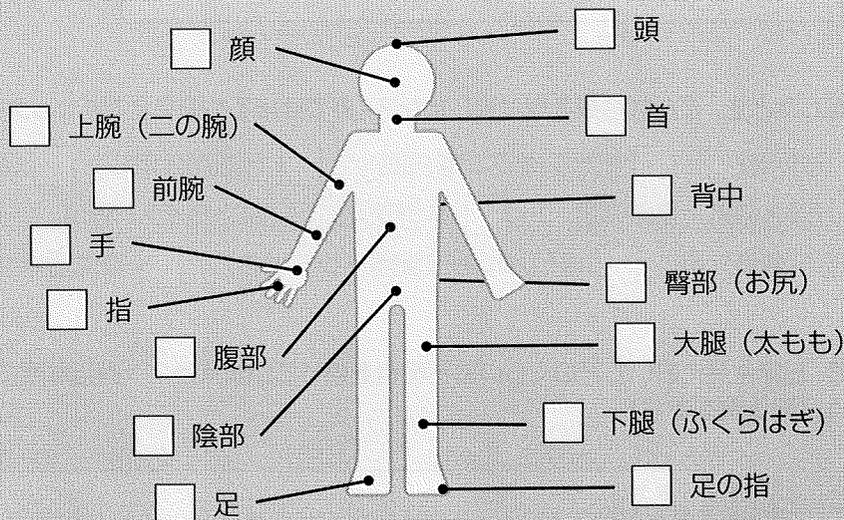
ある ない

ある、と答えた人のみ以下の質問にすすんでください。

2 「かゆみ」の程度はどれくらいですか? 近いと思われる症状をチェックしてください。

- がまんできる、たまに不快になる
- どうにか耐えられる、しばしば不快になる
- 耐え難い「かゆみ」で、いつも不快であり、夜眠れない

3 「かゆみ」が出るのは主にどの部位ですか? (あてはまる部位をいくつでも)



4 「かゆみ」の症状はどのくらい続いていますか?

1週間未満 1週間~1ヵ月 1ヵ月以上~半年 半年~1年以上

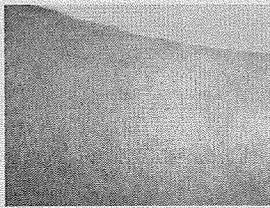
5 季節によって症状に違いがありますか？

- 春にわるくなる 夏にわるくなる 秋にわるくなる 冬にわるくなる
 季節には関係ない

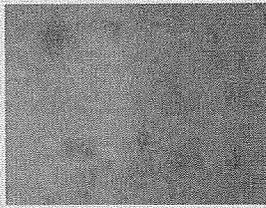
6 「かゆみ」が強いときの対策はどうしていますか？

- 市販のかゆみ止めを塗布または内服する
 医療機関を受診する： 科

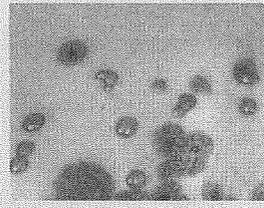
7 「かゆみ」とともに赤み、ブツブツ、水ぶくれ、膿^{うみ}などの皮膚の症状がありますか？



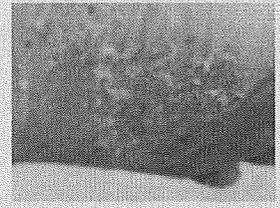
赤み



ブツブツ



水ぶくれ



膿（うみ）

- ある（ 赤み ブツブツ 水ぶくれ 膿^{うみ} ） ない
 ある、と答えた人のみ以下の質問にすすんでください。

8 現在もしくは以前に次のような病気といわれたことはありますか？

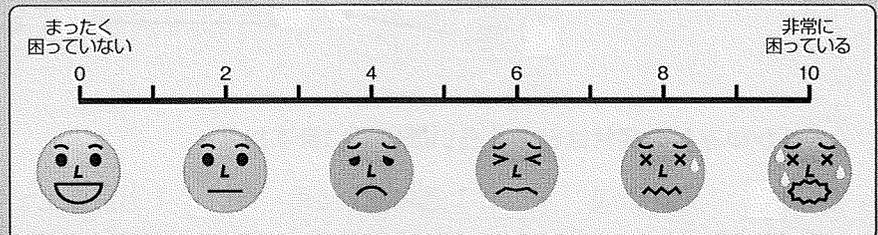
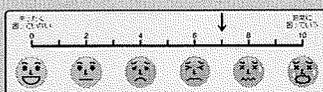
- アトピー性皮膚炎^{せいひふえん} 接触皮膚炎（かぶれ）^{せつしょくひふえん} じんましん 湿疹^{しっしん} 痒疹^{ようしん}
 皮脂欠乏症（乾皮症）^{ひしけつぼうしょう かんびしょう} 乾癬^{かんせん} 虫刺症（虫さされ）^{ちゅうししょう} 水虫^{みずむし} 皮膚癢痒症^{ひふ せうようしょう}
 その他

9 医療機関を受診したとき、どんな治療を受けましたか？（あてはまるものを全てチェックしてください）

- ステロイド外用薬 抗ヒスタミン薬内服 保湿剤外用 ステロイド内服
 ステロイド以外の抗炎症薬外用 タクロリムス（プロトピック）外用 光線療法
 カプサイシン軟膏外用 経口かゆみ改善剤（レミッチ） 特に治療は受けなかった

10 いまのかゆみで、日常生活においてどのくらいの不都合を感じていますか？ 適当な所に矢印（↓）をつけてください。（記入例を参照）

【記入例】



蚊アレルギー性掻痒反応へのセリンプロテアーゼの関与

研究分担者 安東嗣修 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 准教授

研究協力者 穂山 祐 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 大学院生

(現：カルフォルニア大学デービス校 ポスドク)

榎田晃久 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 大学院生

倉石 泰 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 教授

研究要旨

これまでに、我々は、蚊アレルギーによる痒みが抗 histamine 薬に抵抗性を示すことを示してきた。このことは、従来痒みの主要なメディエーターの一つであるとされてきた histamine 以外に新たな痒み因子の存在を示唆する。近年、抗 histamine 薬に抵抗性を示す場合が多いアトピー性皮膚炎の痒みにセリンプロテアーゼが関与していることが報告されてきた。そこで、本研究では、アレルギー性の痒みへのセリンプロテアーゼの関与を検討した。蚊唾液腺抽出物 (ESGM) を抗原として感作した蚊アレルギー性掻痒マウスモデルを用いた。セリンプロテアーゼ阻害薬 nafamostat mesilate 及び 4-(2-aminoethyl) benzensulfonyl fluoride は、皮膚のセリンプロテアーゼ活性阻害に加え、ESGM チャレンジによる痒み反応を抑制した。また、皮膚への ESGM チャレンジは、皮膚内へセリンプロテアーゼの遊離を促した。ESGM 感作マウス皮膚では、非感作健常マウス比べて、CD4 陽性 T 細胞数の増加が認められた。CD4 陽性 T 細胞中のセリンプロテアーゼの一つが granzyme であり、特に皮膚から単離した CD4 陽性 T 細胞には granzyme A の発現が認められ、感作マウス皮膚では granzyme A の発現が増加していた。Granzyme A のマウスへの皮内注射は、痒み反応を惹起した。以上の結果から、アレルギー性掻痒反応の発生に granzyme A が関与することが明らかとなった。したがって、granzyme A が新規鎮痒薬開発のターゲット分子になることが示唆される。

A. 研究目的

掻痒性皮膚疾患の痒みは、過度のストレスに加え、搔破による皮膚の損傷により皮膚炎の更なる悪化へと導き、このことが皮膚疾患治療の妨げとなっている。このような疾患の痒みは、従来痒みの治療薬として処方されてきた抗 histamine 薬が無効である場合が非常に多い。そのため、新たな痒みの発生機序の解明、並びに新規鎮痒薬の開発が望まれている。

これまでに、痒みの発生機序の解明に蚊アレルギー性掻痒マウスモデルを作出した。本モデルは、蚊唾液腺抽出物 (ESGM: Extract of the Salivary Gland of Mosquito) を抗原としてマウスを感作し、ESGM でチャレンジ (マウス吻側背部への皮内注射) することにより痒み反応 (掻き動作) を惹起させる。本モデルの

特記すべき特徴としては、このアレルギー性掻痒反応がマスト細胞非依存性で、抗 histamine 薬抵抗性である。したがって、マスト細胞—histamine 系を介さない新たな痒みの発生機序の存在が示唆されている。

ところで、近年、アトピー性皮膚炎患者の痒みにセリンプロテアーゼが関与していることが示唆されている。また、当研究室においても、アトピー性皮膚炎マウスモデルの自発的掻痒反応にセリンプロテアーゼの関与を明らかにしてきた。このような関連セリンプロテアーゼの一つにマスト細胞由来の tryptase が示唆されている。

そこで、本研究では、蚊アレルギー性掻痒反応発生にセリンプロテアーゼが関与を検討し、関連セリンプロテアーゼの同定を試みた。

B. 研究方法

1) 実験動物

実験には、雄性 ICR 系マウス（日本 SLC、静岡）を用いた。

2) 蚊唾液腺抽出物 (ESGM) の作製と感作

当研究室にて飼育した雌性ヒトスジシマ蚊の唾液腺を含む胸部よりタンパク質を抽出し、抗原 (ESGM) として用いた。

感作は、ESGM (10 µg/site) をマウス尾側背部に 1 週間に 2 回、4 週間皮内注射した。チャレンジは、マウス吻側背部に ESGM (10 µg/site) を 50 µl の容量で皮内注射した。

3) 実験試薬

Mouse granzyme A 及び 4-(2-aminoethyl) benzensulfonyl fluoride (AEBSF) は、それぞれ Sigma (St. Louis, MO, USA) 及び和光純薬工業 (大阪) より購入したものをを用いた。Nafamostat mesilate は、鳥居薬品 (東京) より供与して頂いた。Granzyme A は、マウス吻側背部に皮内注射した。また、nafamostat mesilate 及び AEBSF は、ESGM 皮内注射 30 秒前に尾静脈注射した。

4) 行動実験

行動実験の数日前にマウス吻側背部を除毛した。実験当日、行動撮影ケージ (13×9×40 cm/セル) に 1 時間放置し、馴化した。その後、ESGM をマウス吻側背部に皮内注射し、無人環境下に 8mm ビデオカメラでその後の行動を撮影した。行動評価は、ビデオの再生により、後肢による注射部位とその周辺への掻き動作数をカウントした。マウスは、1 秒間に数回掻くので、足を挙げてから降ろすまでの一連の動作を掻き動作の 1 回としてカウントした。

5) 皮膚セリンプロテアーゼ活性測定

マウス皮膚から抽出したタンパク質を N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilide acetate salt と反応させ、420 nm の吸光度を測定し、評価した。

6) 皮膚灌流とセリンプロテアーゼ活性

ウレタン麻酔下、マウス吻側背部皮膚に透析チューブを挿入し、皮膚灌流を行なった。ESGM を皮内注射前後の灌流液中のセリンプロテアーゼ活性を N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilide acetate salt と反応させることによって、420 nm の吸光度を測定し、評価し

た。

7) トルイジンブルー染色

マウス皮膚凍結切片に対し、0.1%トルイジンブルーで染色し、光学顕微鏡を用いて観察した。

8) 蛍光免疫化学染色

マウス凍結切片に対し、抗 CD4 抗体 (BD Pharmigen, NJ, USA) を 4°C で反応させ、その後、Cy3 標識抗ラット IgG 抗体 (Chemicon, CA, USA) と反応させた。Cy3 のシグナルは、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

9) CD4 陽性 T 細胞の単離

皮膚から得られた細胞群を Lympholyte-M (CEDERLANE, Ontario, Canada) を用いて、リンパ球を選別し、CD4 カラム (RD systems, MN, USA) を用いて CD4 陽性 T 細胞を単離した。

10) Granzyme の発現

Granzyme の発現は、reverse transcription-polymerase chain reaction 法で Table. 1 に示すプライマーを用いて検出した。

C. 研究結果

1) ESGM 誘発アレルギー性掻痒反応へのセリンプロテアーゼ阻害薬の効果

ESGM 感作マウスへの ESGM 皮内注射は、掻き動作を惹起した。この掻き動作は、nafamostat mesilate (1-10 mg/kg) (Fig. 1a) 並びに AEBSF (10-30 mg/kg) (Fig. 1b) により用量依存的に抑制された。

2) 皮膚におけるセリンプロテアーゼ活性

感作マウス皮膚におけるセリンプロテアーゼ活性は、非感作健常マウス皮膚に比べ有意に活性の増大が観察された (Fig. 2a)。この活性は、nafamostat mesilate (10 mg/kg) 及び AEBSF (30 mg/kg) により有意に抑制された (Fig. 2b)。

3) セリンプロテアーゼの遊離

皮膚中のセリンプロテアーゼの遊離を検討するため、皮膚灌流を行なった。セリンプロテアーゼの遊離の評価は、プロテアーゼ活性を指標に行なった。非感作健常マウスへの溶媒である生理食塩水および ESGM の皮内注射では、皮膚中へのセリンプロテアーゼの遊離は認められなかった (Fig. 3)。しかしながら、ESGM 感作マウスへの ESGM の皮内注射では、注射後 5-10 分を

ピークとしてセリンプロテアーゼの遊離が認められた (Fig. 3)。

4) マウス皮膚でのマスト細胞並びに CD4 陽性 T 細胞の分布

非感作健常マウス及び感作マウス皮膚に、マスト細胞が観察されたが、その数には変化はなかった (Fig. 4a)。一方、CD4 陽性 T 細胞は、非感作健常マウス皮膚では殆ど観察されないが、感作マウス皮膚では真皮の表皮に近い領域に多く観察された (Fig. 4b)。

5) マウス皮膚での granzyme mRNA の発現

感作マウス皮膚には、granzyme A, B, C mRNA が発現していた (Fig. 5a)。特に、皮膚から単離した CD4 陽性 T 細胞には、granzyme A mRNA のみが発現していた (Fig. 5b)。また、感作マウス皮膚では、非感作マウス皮膚と比べて granzyme A mRNA の発現が増加していた (Fig. 6)。

6) Granzyme A 誘発掻き動作

健常マウスへの granzyme A (0.1-100 µg/site) の皮内注射により 10 µg/site の用量をピークとして掻き動作が生じた (Fig. 7)。

D. 考察

本研究では、蚊唾液腺抽出物 (ESGM) を抗原として感作したアレルギー性掻痒マウスを使用した。ESGM のマウス吻側背部への皮内注射によりアレルギー性の掻痒関連反応 (注射部位及びその周辺への後肢による掻き動作) が惹起された。これまでに、本モデルマウスの掻痒関連反応には、抗 histamine 薬が無効であったこと、また、マスト細胞欠損マウスでも ESGM の感作によりマスト細胞を有するコントロールマウスと同様に掻き動作が生じたことから、マスト細胞—histamine 系の関与が小さいことが明らかとなっている。そこで、本研究では、近年注目されているセリンプロテアーゼの関与を検討した。セリンプロテアーゼ阻害薬 nafamostat mesilate 及び AEBSF により皮膚中のセリンプロテアーゼの活性の阻害に加え (Fig. 2)、ESGM 誘発アレルギー性掻痒反応を抑制した (Fig. 1)。さらに、ESGM 感作マウスへの ESGM の皮内注射によりセリンプロテアーゼの遊離が観察された (Fig. 3)。以上の結果から、ESGM 誘発アレルギー性掻痒反応にセリン

プロテアーゼが関与していることが示唆される。

ヒトのアトピー性皮膚炎患者やマウスのアトピー性皮膚炎モデルによる研究から、マスト細胞から遊離されるセリンプロテアーゼである *tryptase* や *chymase* の痒み発生への関与の可能性が報告されている。蚊アレルギー性掻痒マウスの痒みへのマスト細胞関与は小さいことが既に報告している。Fig. 4a に示すように、マウス皮膚中でのマスト細胞の数は多くない。したがって、マスト細胞以外のセリンプロテアーゼ産生遊離細胞の存在が推測される。これまでに蚊アレルギー性掻痒反応への免疫抑制薬タクロリムスの有効性を見出している。そこで、タクロリムスのターゲットの一つであり、様々なアレルギー反応のキーとなる細胞である CD4 陽性 T 細胞に着目した。ESGM 非感作マウス皮膚では、CD4 陽性 T 細胞は、殆ど観察されなかったが、感作マウス皮膚では表皮基底層直下真皮に多くの CD4 陽性 T 細胞の分布が観察された (Fig. 4b)。したがって、CD4 陽性 T 細胞が、セリンプロテアーゼの産生・遊離細胞の一つであると思われる。ところで、CD4 陽性 T 細胞の皮膚内での増加の機序に関してはどうだろうか。感作のため ESGM を注射する部位は尾側背部であり、免疫染色を施した皮膚は吻側背部である。CD4 陽性 T 細胞が増殖した部位の皮膚は ESGM で刺激されていないことから、ESGM そのものが直接 CD4 陽性 T 細胞を遊走したのではないと考えられる。したがって、現時点では、感作による皮膚での CD4 陽性 T 細胞の増加の機序は不明であることから、今後、その原因を調べる必要がある。

CD4 陽性 T 細胞に発現しているセリンプロテアーゼとして、granzyme がある。マウス granzyme には、11 種類報告されているが、皮膚では granzyme A, B, C が、CD4 陽性 T 細胞には、特に granzyme A mRNA が発現していた (Fig. 5b)。感作マウス皮膚では、非感作マウス皮膚と比べ granzyme A mRNA の発現が増加していた (Fig. 6)。このことは、CD4 陽性 T 細胞数の感作マウス皮膚での増加が原因であろう (Fig. 4b)。

次に granzyme A が痒み反応を惹起するか検討した。Granzyme A をマウス吻側背部への皮内注射により掻き動作が誘発 (Fig. 7) したことから、granzyme A が起痒因子のひとつであることが明らかとなった。これまで、

我々はセリンプロテアーゼによる痒みの発生に proteinase-activated receptor (PAR) が関与することを示してきた。PAR は、PAR1~4 まで知られている。PAR3 の活性は直接マウスに痒み反応を誘発しない。PAR1 及び PAR4 の活性化により痒み反応が誘発される。この反応は、histamine を介している。一方、PAR2 の活性化においても痒み反応を誘発するが、この反応には histamine は関与していない。ESGM 誘発アレルギー性搔痒反応への histamine の関与が小さい。このことから、granzyme A 誘発の痒み発生には、PAR2 が関与しているかもしれない。皮膚では granzyme B 及び granzyme C が発現していることから、これらの痒みへの役割に加え、PAR2 を介した痒み発生机序の解明が、今後の課題の一つである。

E. 結論

抗 H₁ histamine 受容体拮抗薬抵抗性の蚊アレルギー性搔痒反応に CD4 陽性 T 細胞から遊離される granzyme A が関与することを見出した。Granzyme A の遊離並びに痒み発生机序の解析は今後の課題であるが、少なくとも granzyme A が新規鎮痒薬のターゲット分子になり得ると期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Akiyama-Nakano T., Andoh T., Enokida A., Kuraishi Y. Involvement of granzyme A in itch-associated responses of mosquito allergy in mice. (in preparation)

2. 学会発表

- 1) 安東嗣修: 動物をもちいた皮膚のかゆみ試験評価法の重要なポイント. 第4回皮膚基礎研究クラスターフォーラム. 2009. 7. 23, 東京.
- 2) 安東嗣修, 倉石 泰: 皮膚における痒みの発生机構. 第37回薬物活性シンポジウム. 2009. 10. 9-10. 仙台.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む.)

なし

Table 1. マウス granzyme サブタイプ検出のためのプライマー

name	Sense primer sequence	Anti-sense primer sequence
GAPDH	5'-ccaaggagacacggtgttc-3'	5'-tactccttgaggccacgt-3'
Gzm A	5'-tggaggagacacggtgttc-3'	5'-gaggagctgactattgaa-3'
Gzm B	5'-agagagcaaggacaactc-3'	5'-ctgcttcacattgacattg-3'
Gzm C	5'-agataatcgaggcaatgag-3'	5'-cacctgatcctctgtactg-3'
Gzm D	5'-cctacatggcattcgttatg-3'	5'-gtgcacaacctagtgaag-3'
Gzm E	5'-ccttgcctcctcctaactg-3'	5'-cgggcagatgctttagtgc-3'
Gzm F	5'-gcttctggttcaagactac-3'	5'-agactctggaccgattgac-3'
Gzm G	5'-tggatcgaaggaagaag-3'	5'-gagcctgacttttttggg-3'
Gzm K	5'-tccattctcagactcag-3'	5'-gcgatgccacattatagcc-3'

Gzm: granzyme

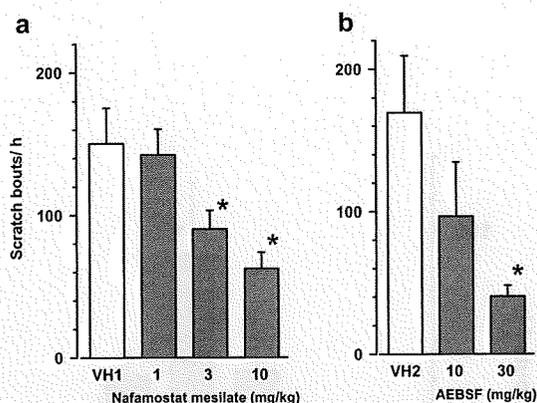


Fig. 1. 蚊アレルギー性掻痒反応への nafamostat mesilate 及び 4-(2-aminoethyl) benzensulfonyl fluoride (AEBSF) の効果

(a) Nafamostat mesilate の用量依存的に蚊アレルギー性掻痒反応が抑制された。* $p < 0.05$

(b) AEBSF の用量依存的に蚊アレルギー性掻痒反応が抑制された。* $p < 0.05$

VH1: 0.5% glucose, VH2: saline

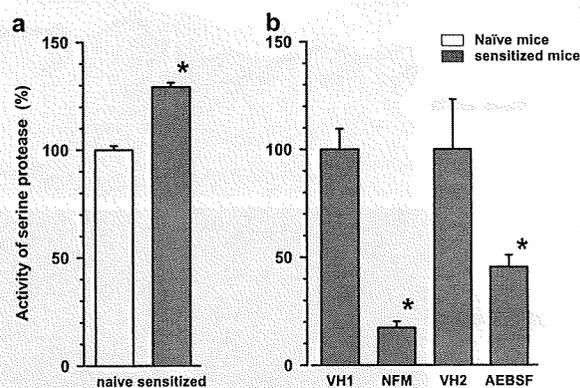


Fig. 2. 感作 (sensitized) 及び非感作健常 (naive) マウス皮膚でのセリンプロテアーゼ活性並びにセリンプロテアーゼ活性阻害薬の効果

(a) 感作マウス皮膚では、非感作マウス皮膚と比べて有意にセリンプロテアーゼ活性が増加した。

* $p < 0.05$

(b) Nafamostat mesilate (NFM: 10 mg/kg) 及び 4-(2-Aminoethyl) benzensulfonyl fluoride (AEBSF: 30 mg/kg) により感作マウス皮膚でのセリンプロテアーゼ活性が抑制された。* $p < 0.05$

VH1: 0.5% glucose, VH2: saline

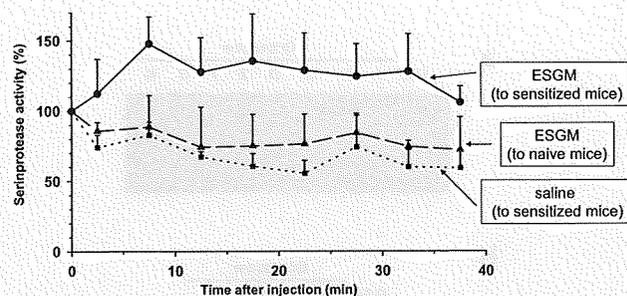


Fig. 3. 感作 (sensitized) 及び非感作健常 (naive) マウス皮膚灌流によるセリンプロテアーゼの遊離
感作マウスへの ESGM の皮内注射によりセリンプロテアーゼの遊離が認められた (●)。一方、感作マウスへの生理食塩水 (■) 及び非感作マウスへの ESGM (▲) の皮内注射では、セリンプロテアーゼの遊離は認められなかった。

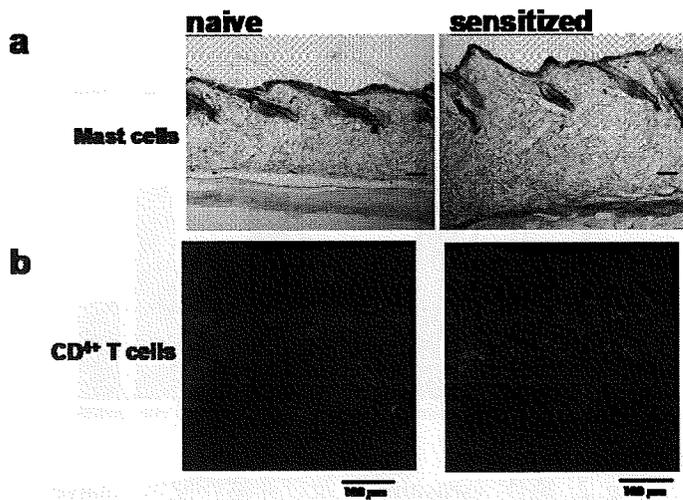


Fig. 4. 感作 (sensitized) 及び非感作健全 (naive) マウス皮膚におけるマスト細胞及びCD4陽性T細胞の分布

(a) トルイジンブルーによるマスト細胞では、感作及び非感作マウス皮膚では、マスト細胞数及び分布に変化はなかった。

(b) 抗CD4抗体を用いた免疫染色では、感作マウス皮膚で、CD4陽性T細胞数の増加顕著に観察された。

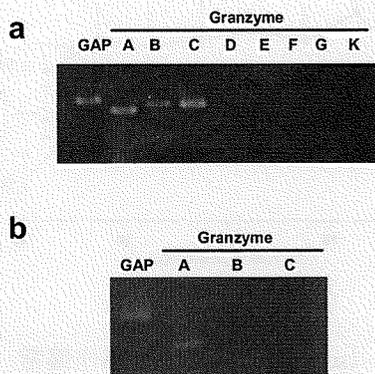


Fig. 5. 感作マウス皮膚及びCD4陽性T細胞における granzyme mRNA の発現

(a) 感作マウス皮膚では、granzyme A, B, C mRNA が発現していた。

(b) 感作マウス皮膚から単離したCD4陽性T細胞では、granzyme A mRNA が発現していた。

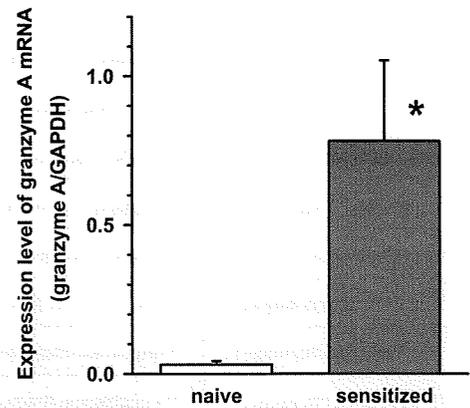


Fig. 6. 感作 (sensitized) 及び非感作健全 (naive) マウス皮膚における granzyme A mRNA の発現
非感作健全 (naive) マウス皮膚と比べて、感作マウス皮膚で granzyme A mRNA の発現が増加していた。
* $p < 0.05$

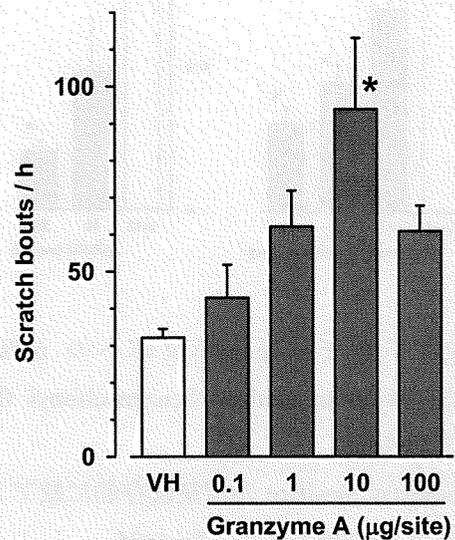


Fig. 7. マウスにおける granzyme A 誘発搔き動作
マウス granzyme A の皮内注射により搔き動作が惹起された。
* $p < 0.05$

VH: saline

好酸球性膿疱性毛包炎におけるプロスタノイドの痒みの解析

研究分担者 梶島健治 京都大学医学研究科皮膚科学 准教授

研究協力者 戸倉新樹 産業医科大学皮膚科 教授

研究要旨

好酸球性膿疱性毛包炎(eosinophilic pustular folliculitis; EPF)は、毛包周囲に無菌性の好酸球浸潤を認めるそう痒の強い皮膚疾患の一つである。治療薬の一つにインドメタシンが挙げられるが、実際にEPF患者における治療として、indomethacinが有効であることが明らかとなった。また、EPFの皮疹部では、PG合成酵素の中でも特にPGD合成酵素の発現が著明に増加し、好酸球と合致していた。一方、好酸球は、PGD2やeotaxinに化学遊走を示し、PGD2とeotaxinの両者に対して相加効果を示し、また、PGD2で好酸球を前処理すると、eotaxinへの遊走作用が強まったことより、EPFに認められるPGD2はEPFの遷延化に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

プロスタグランジン(PG)E2やPGD2をはじめとするプロスタノイドファミリーは脂質生体膜に由来するアラキドン酸代謝物である。プロスタノイドの合成を阻害する非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)は、一般に痒みに向こうであることから脂質メディエーターの痒みにおける重要性は着目されなかった。ところが近年になり、各脂質メディエーター受容体の選択的作動薬の開発や遺伝子欠損マウスの作成により脂質メディエーターの新たな役割が明らかになりつつある。また、好酸球性膿疱性毛包炎(eosinophilic pustular folliculitis; EPF)は非常にそう痒の強い疾患であるが、indomethacinが有効であることが知られる。そこで、プロスタノイドのEPFの病態形成における役割の解明を本研究の目的とする。さらに、好酸球のそう痒形成における役割の解明にも本研究を発展させたい。

B. 研究方法

EPF患者にいかなる治療が有効であるかを検証するために、外来患者20名の治療を検証した。さらに、EPF患者の組織をPGD、PGEなどのプロスタノイド合成酵素で免疫染色した。さらに末梢血中の好酸球サブセットを分離し、トランスウェルアッセイにより化学遊走能を検証した。

(倫理面への配慮)

皮膚免疫染色は、インフォームドコンセントを得たうえで、皮膚生検検体の残りをを用いて解析した。末梢血中好酸球サブセットの採取には京大倫理委員会に承諾を得たプロトコールに則り施行した。

C. 研究結果

1. EPF患者に対する治療とその効果の検証においては、indomethacinの内服の著明な効果が認められた(図1)。その他、シクロスポリン内服も有効であった。一方、タクロリムス軟膏やインドメタシン外用は一部の患者において有効であった。
2. EPF患者のPG各合成酵素の免疫染色において、PGD合成酵素の発現が強く認められた(図2)。また、好酸球自体にPGD合成酵素の発現が認められた(図2)。
3. 好酸球のPGD2やeotaxinへの化学遊走能は、ともに認められた。また、PGD2とeotaxinの両者をlower chamberに添加すると相加効果が見られた(図3)。

D. 考察

EPFの患者にindomethacinやシクロスポリンの内服の有効性が示された。シクロスポリンはTh2を抑制し、IL-31などの痒みを誘発するサイトカインを阻害したり、IL-5を抑制して好酸球の増殖を制御するところに作用していることが示唆される。一方、indomethacinは想定される作用機序として、好酸球などが産生するPGD2が好酸球の更なる集積や活性化を誘導してEPFの病態形成や遷延化に作用していることが示唆される。また、痒みとの関連については、好酸球の産生するECPや活性酸素が関与している可能性や、PGD2が直接あるいは間接的に痒みに関与している可能性が残されているが、現時点ではその詳細は不明であり、今後の検討課題である。

E. 結論

EPF患者における治療として、indomethacinが有効であることが明らかとなった。また、EPFの皮疹

部では、PG 合成酵素の中でも特に PGD 合成酵素の発現が著明に増加し、好酸球と合致していた。一方、好酸球は、PGD2 や eotaxin に化学遊走を示し、PGD2 と eotaxin の両者に対して相加効果を示し、また、PGD2 で好酸球を前処理すると、eotaxin への遊走作用が強まったことより、EPF に認められる PGD2 は EPF の遷延化に関与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表 (*; corresponding author)

1) 原著論文

1. Tomura M, Honda T, (他 10 名), Kabashima K*.

Activated regulatory T cells are major T cell type emigrating from sensitized skin. *J Clin Invest* (in press)

2. Honda T, Nakajima S, Egawa G, Ogasawara K, Malissen B, Miyachi Y, Kabashima K*. 2009. Prostaglandin E(2)-EP(3) signaling suppresses skin inflammation in murine contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* (in press)

3. Moniaga CS, Egawa G, (他 12 名), Kabashima K* Flaky tail mouse as a possible model of atopic dermatitis. *Am J Pathol* (in press)

4. Fukamachi, S., Kabashima, K., Sugita, K., Kobayashi, M., and Tokura, Y. 2009. Therapeutic effectiveness of various treatments for eosinophilic pustular folliculitis. *Acta Derm Venereol* 89:155-159.

5. Onoue, A., Kabashima, K., Kobayashi, M., Mori, T., and Tokura, Y. 2009. Induction of eosinophil- and Th2-attracting epidermal chemokines and cutaneous late-phase reaction in tape-stripped skin. *Exp Dermatol* (in press)

6. Nishio, D., Nakashima, D., Mori, T., Kabashima, K., and Tokura, Y. 2009. Induction of eosinophil-infiltrating drug photoallergy in mice. *J Dermatol Sci* 55:34-39.

2) 総説論文

Kambe N, Longley BJ, Miyachi Y, Kabashima K. 2010. KIT masters mast cells in Kids, too. *J Invest Dermatol* 130, 648-650

2. 学会発表

1. What's new in immunology of metal allergy K Kabashima (17th International Contact Dermatitis Symposium 2009)

2. K Kabashima (symposist). Actin cytoskeleton formation through mDia1 is essential for DC-T cell interaction and T cell motility in the lymph nodes. **The 39th annual meeting of the Japanese Society for Immunology**, Dec 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当せず

図 1 : EPF 患者における各薬剤の効果のまとめ

Drug	Number of patients successfully treated*
Systemic administration	
Indomethacin	11/11 (100%)
Loxoprofen	2/4 (50%)
Cyclosporine	6/6 (100%)
Topical application	
Indomethacin	3/5 (60%)
Tacrolimus	3/7 (43%)

図 2 : EPF 組織の HE 像 (左) と PGD 合成酵素の免疫染色 (右)

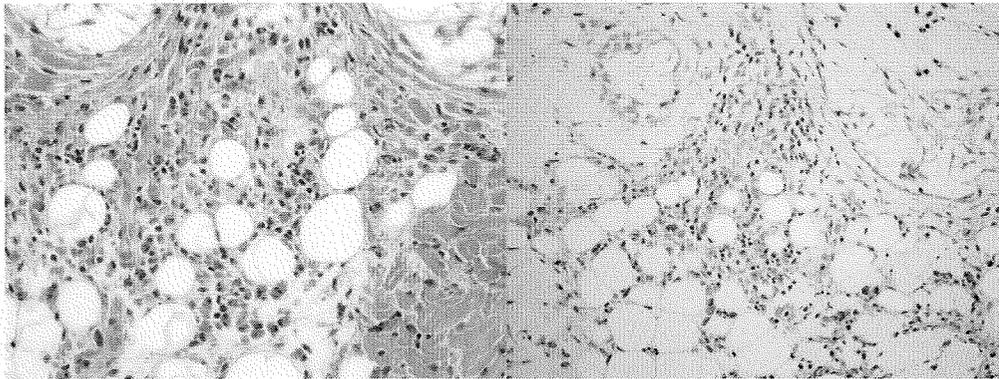
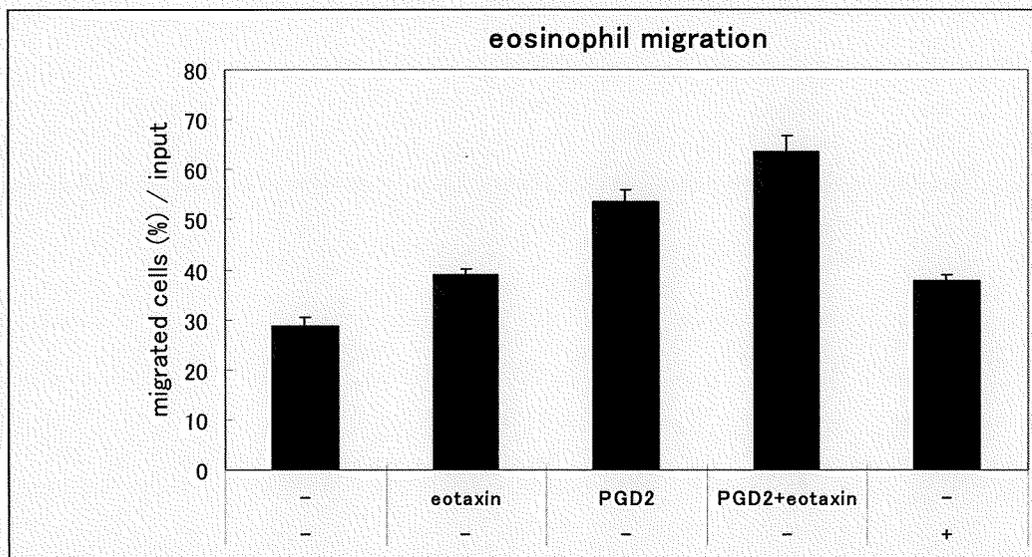


図 3 : 好酸球の PGD2, eotaxin, PGD2+eotaxin へのケモタキシス



痒疹およびその他のアレルギー性皮膚疾患における好塩基球浸潤と活性化状態の検討

研究分担者 佐藤貴浩 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野 准教授

研究協力者 伊藤勇一 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野 大学院生

研究協力者 横関博雄 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野 教授

研究要旨

アレルギー性炎症における好塩基球の役割の重要性が近年注目されている。今回種々の皮膚疾患における好塩基球浸潤と活性化の有無を検討した。痒疹、持続時間の長い蕁麻疹、アトピー性皮膚炎、水疱性類天疱瘡、好酸球性膿疱性毛包炎、アナフィラクトイド紫斑などにおいて病変部への好塩基球浸潤が確認された。尋常性天疱瘡、乾癬、強皮症、全身性エリテマトーデス、腫瘍性病変にはみられなかった。また痒疹や蕁麻疹患者末梢血の好塩基球における CD203C 発現は上昇しており活性化状態にあることがわかった。

A. 研究目的

好塩基球は末梢血白血球の1%以下にすぎない細胞であり、長い間アレルギー疾患における意義は不明であった。しかし最近になってIgE依存性の慢性皮膚炎症の成立に必須な細胞であること、そしてTh2型サイトカインの主たる産生源として獲得免疫のみならず自然免疫においても重要な役割を果たしていることが明らかになっている。好塩基球は一般的な染色ではその存在を確認することが困難であったため、皮膚疾患の病巣にどの程度浸潤しているのか、そしてどの程度の活性化をうけているのか全く明らかにされていない。今回の研究目的はIgE依存性慢性皮膚炎反応と病態の類似性が示唆される難治性の蕁麻疹や痒疹、そしてその他種々の皮膚疾患における好塩基球の動態を検討することである。

B. 研究方法

18種類の皮膚疾患（127例）の生検皮膚を用いて好塩基球浸潤の有無とその程度を免疫組織学的に検討した。好塩基球特異抗体として抗basogranulin抗体（BB1抗体）を使用した。また

一部の疾患については末梢血好塩基球のCD203C発現をフローサイトメトリー法で測定し、活性化状態を評価した。

本研究は東京医科歯科大学倫理委員会の承認をえて行ったものである。

C. 研究結果

皮膚病変に好塩基球浸潤が高頻度に確認できた疾患は、痒疹、水疱性類天疱瘡、アトピー性皮膚炎、持続時間の長い蕁麻疹、蕁麻疹、好酸球性膿疱性毛包炎、アナフィラクトイド紫斑などであった。痒疹、持続時間の長い蕁麻疹、水疱性類天疱瘡、好酸球性膿疱性毛包炎、アナフィラクトイド紫斑では好塩基球浸潤の密度が高い傾向にあった。一方、アトピー性皮膚炎では浸潤好塩基球数は比較的少なかった。しかしながらダニ抗原でパッチテストを行った遅発反応部位では顕著な好塩基球浸潤を確認できた。尋常性乾癬、尋常性天疱瘡、強皮症、全身性エリテマトーデス、および腫瘍性病変周囲に好塩基球浸潤がみられることは稀であった。次に患者末梢血好塩基球をフローサイトメトリー

法で検討したところ、痒疹や皮膚症状発症中の蕁麻疹患者において健常人より高いレベルのCD203C発現が観察された。アトピー性皮膚炎や尋常性乾癬では有意な活性化はみられなかった。

D. 考察

これまで皮膚疾患病変部における好塩基球の存在を検討した報告は極めて少なく、その分布や程度を解析したものは本報告が国内外を含めて初めてである。アトピー性皮膚炎病変部に好塩基球が存在する可能性については古くからいわれてきていたが、今回その事実を確認するとともに、その他多くのアレルギー性皮膚疾患において好塩基球が浸潤していることが明らかになった。IgE依存性慢性皮膚炎反応と痒疹反応とは病態が類似している可能性があることから、前者の反応成立に必須といわれる好塩基球が痒疹病変部に多く認められた点は興味深い。また好塩基球が痒疹治療の標的となる可能性も示唆する結果といえる。さらに水疱性類天疱瘡や好酸球性膿疱性毛包炎、アナフィラクトイド紫斑などで顕著に好塩基球浸潤がみられたことは予測できなかった結果であり、病態にどのようなかかわっているのか今後検討していく価値があると思われる。

E. 結論

好塩基球は痒疹含めて種々の皮膚疾患において活性化状態にあり、そして病変部に浸潤している。これらの疾患の一部においては好塩基球が有効な治療の標的となりうる可能性がある。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1 論文発表

- 1) Yahara H, Satoh T, Miyagishi C, Yokozeki H: Increased expression of CRTH2 on

eosinophils in allergic skin diseases. J Eur Acad Dermatol Venereol 24: 75-76, 2010.

- 2) Shimura C, Satoh T, Igawa K, Aritake K, Urade Y, Nakamura M, Yokozeki H. Dendritic cells express hematopoietic prostaglandin D synthase and function as a source of prostaglandin D2 in the skin. Am J Pathol 176: 227-237, 2010.

- 3) Satoh T, Shimura C, Miyagishi C, Yokozeki H. Indomethacin-induced reduction of CRTH2 in eosinophilic pustular folliculitis (Ofuji's disease): A proposed mechanism of action. Acta Derm Venereol 90: 18-22, 2010.

2 学会発表

- 1) Yamamoto Y, Satoh T, Otani S, Hirai H, Narumiya S, Yokozeki H, Nakamura M: Deficiency of PGD2 receptors, DP and CRTH2, enhances contact hypersensitivity. The 9th World Congress on Inflammation, Tokyo, 2009/07/07

- 2) Saeki K, Satoh T, Yokozeki H. Essential roles of $\alpha(1,3)$ fucosyltransferases for selectin-dependent initial recruitment of basophils in chronic allergic inflammation. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Hakata 2009/12/05

- 3) Yamamoto Y, Satoh T, Otani S, Nakamura M, Yokozeki H. Deficiency of PGD2 signals enhances contact hypersensitivity via promoting Th17 and/or Th1 immunity. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Hakata 2009/12/05

- 4) Kanai Y, Satoh T, Igawa K, Yokozeki H. Dysregulated expression of Tim-3 on Th1 and Th17 cells from patients with psoriasis.