

## アトピー性皮膚炎における汗アレルギーの解析と有効性の高いスキンケア方法の開発

研究分担者 秀 道広 広島大学大学院医歯薬保健学研究院皮膚科学

## 研究要旨

アトピー性皮膚炎患者の多くは汗に対する即時型アレルギーを有しており、皮疹及び痒痒のコントロールには発汗対策が重要である。我々は、タンニン酸に汗抗原不活化作用を見出し、スキンケア製剤に配合しその有効性を検討してきた。今回タンニン酸配合入浴剤を作製し、その効果を検討した。15 歳以上のアトピー性皮膚炎患者を対象にタンニン酸配合入浴剤および配合しない入浴剤をクロスオーバーで使用する二重盲検試験を行い、痒痒に対する効果を評価した。その結果、夜間、午前、午後の痒痒はタンニン酸配合入浴剤で改善し、配合しない入浴剤では改善しなかった。

## A. 研究目的

アトピー性皮膚炎の治療では、ステロイド外用薬を中心とした薬物療法とともに悪化因子対策とスキンケアの指導が重要である。

我々はこれまでアトピー性皮膚炎に対する悪化因子である汗に注目し、アトピー性皮膚炎患者の 7～8 割に汗抗原に対する即時型アレルギーが見られることを報告してきた。そのため、アトピー性皮膚炎患者の汗に対するスキンケアは極めて重要であるが、実際には汗をかきすぎない、洗い流すなどの対策しか行われていないのが現状である。

我々は、ヒトへの使用を前提にして天然物の中から精製汗抗原のヒスタミン遊離能を失活する物質を探索し、さらに費用、調剤しやすさなどの点を考慮した結果、タンニン酸に優れた実用的な可能性のあることを見出した。そこで、これを患者自身が簡便に実施可能なスキンケア対策に利用するため、タンニン酸を配合したスキンケア製剤を試作し、その臨床的有用性を検討している。

2007 年度に「タンニン酸入り上がり湯およびスプレー」製剤を用い、オープントライアル試験を 17 名のアトピー性皮膚炎患者を対象に実施した。さらに、2008 年度は「タンニン酸スプレー」製剤を用いダブルブラインド試験を 18 名に実施した。昨年度は、「タンニン酸入浴剤」製剤のオープントライアル試験を 15 名のアトピー性皮膚炎患者を対象に実施し

た。何れの試験結果でも、臨床症状で有意な結果があり、自覚症状では顕著な改善効果があった。

今回、「タンニン酸入浴剤」の効果を検証するために「タンニン酸を配合しない入浴剤」との、クロスオーバー使用試験を二重盲検で実施した。

## B. 研究方法

広島大学皮膚科外来を受診しているアトピー性皮膚炎患者を対象に「タンニン酸配合入浴剤」および「配合しない入浴剤」を各々 2 週間ずつ使用した場合の痒痒に対する効果を二重盲検試験により検証した。

## 1) 対象

症状が安定し、1 ヶ月以上投薬が変更されていない 15 歳以上のアトピー性皮膚炎患者を対象とした。

## 2) 方法

「入浴剤」は、通常のご家庭用浴槽のお湯（約 150～200L）に 1 包（40g）を投入し、よくかき混ぜる。お湯の温度は温め（約 39～40℃）にし、入浴時間は約 5～10 分間を目安に、原則毎日使用することとした。入浴の方法や身体を洗う方法は特に規定しないが、身体を洗った後には必ず、入浴を行うこととした。それぞれの入浴剤は 2 週間ずつ使用し、前半及び後半の使用期間の間には 1 週間の wash out 期間をおいた。

自覚症状の評価は前半使用前、後半使用前に行った。医師による観察は開始日、および使用終了後（5 週間後）の診察日に行い、臨床症状を評価した（図

1)。

### 3) 自覚症状の評価

主要評価項目を入浴剤使用前後の癢痒とし、それぞれ夜間、午前、午後に分け、VAS (Visual analogue scale) で評価した。また日常生活の中で痒みを感じた場面をアンケートにより調査した。

### 4) 臨床症状の評価

患者の来院時の「潮紅(紅斑)、丘疹、苔癬化、落屑、湿潤」の症状をそれぞれ、「0:なし、1:軽微、2:軽度、3:中等度、4:高度」の5段階に分け、その合計スコアで評価した。

### 5) 安全性評価

試験期間中に身体の異常を感じた、あるいは痒みが強くなった等、異常が現れた場合は有害事象として取り扱い、症状の種類、程度、因果関係について判定した。

## C. 研究結果

### 1) 患者背景

対象となったアトピー性皮膚炎症例は 23 例であったが、1 例は経過中に使用試験とは関連がない疾患の発症があり試験を中止した。そのため 22 例で解析を行った。男女別では男性 7 例、女性 15 例で、年齢は平均 32.6 歳であった。アトピー性皮膚炎の重症度は軽症 3 例、中等症 9 例、重症 10 例であった。なお使用試験は 7 月から 9 月の間に行った。

### 2) 自覚症状の評価 (図 2, 3, 4)

夜間、午前、午後いずれのシーンでも「タンニン酸配合入浴剤」使用後に VAS 値は有意に低下していた。一方「タンニン酸を配合しない入浴剤」使用後には VAS 値の低下は見られなかった。

### 3) かゆみのシーン度数分布 (図 5)

痒みを強く感じた場面の比較では「汗をかいているとき」、「入浴後」、「イライラしているとき」の状況下でかゆみを感じるが多かったが「タンニン酸配合入浴剤」使用後と「タンニン酸を配合しない入浴剤」使用後に大きな変化はなかった。

### 4) 臨床症状の評価 (図 6)

使用試験前後で臨床症状の評価を行った。症状スコアが低下した症例は 16 例、不変であった例は 5 例、悪化した症例は 1 例であった。図 5 に示すように試験後はスコアが有意に低下していた。

### 5) 有害事象

試験中、入浴剤に起因した有害事象はなかった。

## D. 考察

今回、精製汗抗原を不活化するタンニン酸を配合した入浴剤を作成し、その有用性を検討した。

昨年行った「タンニン酸配合入浴剤」のオープン試験では、4 週間使用し、夜間、午前、午後の癢痒は使用前と比較し、有意に改善した。また臨床症状も使用前後で有意に改善した。今回さらにその効果を検証するために「タンニン酸を配合しない入浴剤」を作成し、クロスオーバーで使用する二重盲検試験を行った。

夜間、午前、午後いずれのシーンでも「タンニン酸配合入浴剤」の使用により癢痒は有意に改善した。一方「タンニン酸を配合しない入浴剤」では癢痒の改善はなかった。以上の結果は入浴により体表面に付着したタンニン酸が皮膚表面に留まり、癢痒を軽減させた可能性を示唆するものであった。

これまで我々は、アトピー性皮膚炎患者を対象として「タンニン酸配合スプレーおよび湯上り剤」や「タンニン酸配合エアゾールスプレー」の有効性を報告してきた。今回、有効性が確認された「タンニン酸配合入浴剤」は、入浴を利用し、日常生活でさらに簡便に使用することができる。

アトピー性皮膚炎患者の夏季あるいは発汗時の癢痒は、コントロールに難渋する症状のひとつである。日々の入浴時に「入浴剤」を利用すれば夜間のみならず日中の癢痒が改善することが示された。さらに日中、一時的に癢痒が増強した時にはタンニン酸配合エアゾールスプレー等のスキンケア製剤を使用することで、夏季の癢痒の大幅な改善が期待できる。

## E. 結論

タンニン酸配合入浴剤はアトピー性皮膚炎の夜間の癢痒のみでなく日中の癢痒の改善に有効であった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

1. 論文発表

なし

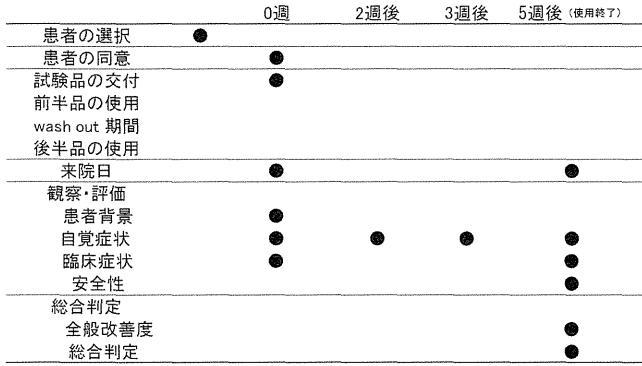


図 1：試験スケジュール

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- 1. 特許所得 該当なし
- 2. 実用新案登録 該当なし

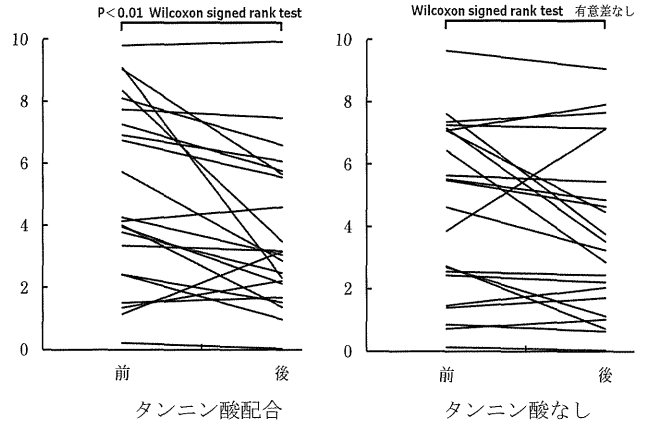


図 2：入浴剤使用前後の痒痒(夜間)

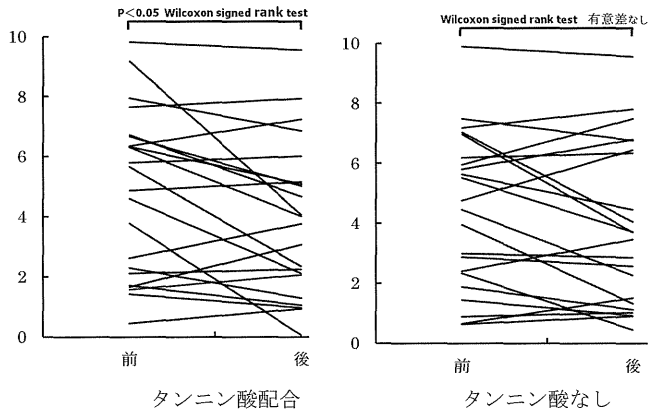


図 3：入浴剤使用前後の痒痒(午前)

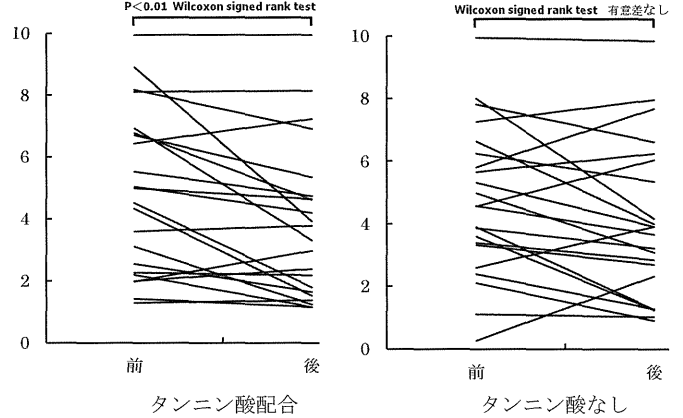


図 4：入浴剤使用前後の痒痒(午後)

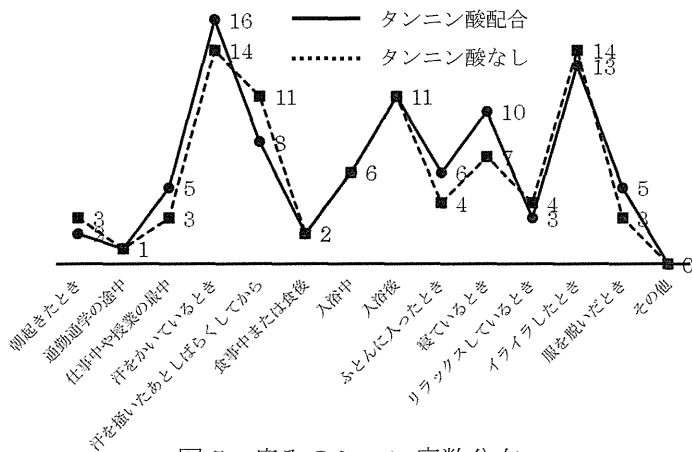


図 5：痒みのシーン度数分布

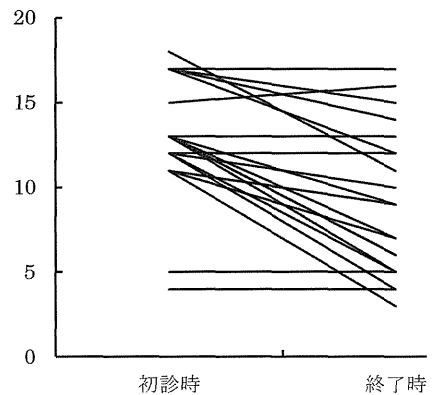


図 6：試験前後の臨床症状の変化

## アトピー性皮膚炎の疾患感受性遺伝子解析とアトピー性皮膚炎が睡眠や就労に与える影響に関する研究

分担研究者 佐伯秀久 東京慈恵会医科大学皮膚科准教授

**研究要旨** アトピー性皮膚炎 (AD) は強い痒みを伴うことが特徴であり、そのために睡眠障害を来すことがしばしばある。さらに、痒みと睡眠障害により仕事に影響が出る事例も稀ならず見受けられる。そこで、慈恵医大病院皮膚科通院中のアトピー性皮膚炎患者にアンケート調査を実施し、AD が睡眠の質や就労に与える影響を詳細に検討することにした。仕事の生産性および活動障害 (WPAI) に関する質問票のなかで、AD を対象としたもの (WPAI-AD) の日本語版の有用性を確認した後、慈恵医大病院皮膚科通院中の AD 患者にアンケート調査を実施した。WPAI には対照疾患としての乾癬患者を対象としたもの (WPAI-PSO) が既にあるので、本研究に先立ち、乾癬患者 152 名を対象に同様のアンケート調査を実施した。乾癬患者の総合的な労働生産性の障害度 (TWPI) は  $0.28 \pm 0.26$  で、乾癬の重症度スコア (PASI) と有意な正の相関が認められた。乾癬患者における日常の諸活動の障害度 (AI) は  $0.36 \pm 0.28$  で、やはり PASI と有意な正の相関を認めた。次に、WPAI-AD の日本語版の有用性が確認され、WPAI のホームページにも掲載されたので、慈恵医大病院皮膚科通院中の AD 患者 100 名に対してアンケート調査を実施した。アトピー性皮膚炎患者の TWPI は  $0.32 \pm 0.23$  で、AD の重症度スコア (SCORAD) と有意な正の相関が認められた。アトピー性皮膚炎における AI は  $0.42 \pm 0.25$  で、やはり SCORAD と有意な正の相関を認めた。今回の解析結果から、AD 患者においても、労働生産性は乾癬患者と同等もしくは若干強く障害されており、やはり重症なほど労働生産性の低下が強いことが明らかとなった。また、アトピー性皮膚炎が睡眠に与える影響の調査に関しては、現在、ピッツバーグ睡眠質問票 (PSQI) を用いた調査を実施中である。アトピー性皮膚炎患者 100 名を対象に調査を実施したところ、SCORAD と PSQI は正の有意な相関を示した。したがって、アトピー性皮膚炎患者では重症なほど睡眠も強く障害されることが示唆された。なお、AD の疾患感受性遺伝子に関する研究に関しては、東京大学医学部皮膚科では AD 患者 119 名の調査・サンプル採取が終了した。東京慈恵会医科大学皮膚科でも現在、AD 患者 60 名の調査・サンプル採取が終了した。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

石地尚興 東京慈恵会医科大学皮膚科准教授  
石氏陽三 東京慈恵会医科大学皮膚科助教  
堀田健人 東京慈恵会医科大学皮膚科  
佐藤純子 東京慈恵会医科大学皮膚科  
東福有佳里 東京慈恵会医科大学皮膚科

### A. 研究目的

(1) アトピー性皮膚炎の疾患感受性遺伝子解析では、平成 20~22 年度において、東大病院皮膚科通院中のアトピー性皮膚炎患者 119 名よりサンプル採取および背景情報を取得した。平成 23, 24 年度は、慈恵医大病院皮膚科通院中のアトピー性皮膚炎患者よりサンプル採取および背景情報を取得した後、理化学研究所に送付し、遺伝子解析を引き続き行うことにした。

(2) アトピー性皮膚炎は強い痒みを伴うこ

とが特徴であり、そのために睡眠障害を来すことがしばしばある。さらに、痒みと睡眠障害により仕事に影響が出る事例も稀ならず見受けられる。そこで、慈恵医大病院皮膚科通院中のアトピー性皮膚炎患者にアンケート調査を実施し、アトピー性皮膚炎が睡眠の質や就労に与える影響を詳細に検討することにした。

### B. 研究方法

(1) 東京慈恵会医科大学附属病院皮膚科を通過中のアトピー性皮膚炎患者 100 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) 仕事の生産性および活動障害

(Work Productivity and Activity Impairment : WPAI) に関する質問票のなかで、アトピー性皮膚炎患者を対象としたもの (WPAI-AD) の日本語版の有用性を確認した後、慈恵医大病院皮膚科通院中のアトピー性皮膚炎患者にアンケート調査を実施した。

### C. 研究結果

(1) 東京大学医学部皮膚科ではアトピー性皮膚炎患者 119 名の調査・サンプル採取が終了した。また、東京慈恵会医科大学皮膚科では、平成 24 年 1 月 19 日現在、アトピー性皮膚炎患者 60 名および対照疾患としての乾癬患者 67 名よりサンプル採取および背景情報を取得し、理化学研究所に検体を送付した。

(2) WPAI には対照疾患としての乾癬患者を対象としたもの (WPAI-PSO) が既にあるので、本研究に先立ち、乾癬患者 152 名を対象に同様のアンケート調査を実施した。乾癬患者の総合的な労働生産性の障害度 (Total Work Productivity Impairment : TWPI) は  $0.28 \pm 0.26$  で、乾癬の重症度スコア (Psoriasis Area and Severity Index : PASI) と有意な正の相関が認められた。乾癬患者における日常の諸活動の障害度 (Activity Impairment : AI) は  $0.36 \pm 0.28$  で、やはり PASI と有意な正の相関を認めた。また、 $PASI < 10$ ,  $10 \leq PASI < 20$ ,  $20 \leq PASI$  の 3 群で比較すると、PASI の高値群ほど TWPI, AI ともに値が高くなり、 $PASI < 10$  群と  $20 \leq PASI$  群の間では有意差が認められた。

次に、WPAI-AD の日本語版の有用性が確認され、WPAI のホームページにも掲載されたので、慈恵医大病院皮膚科通院中のアトピー性皮膚炎患者 100 名に対してアンケート調査を実施した。アトピー性皮膚炎患者の TWPI は  $0.32 \pm 0.23$  で、アトピー性皮膚炎の重症度スコア (SCORing of Atopic Dermatitis : SCORAD) と有意な正の相関が認められた。アトピー性皮膚炎における AI は  $0.42 \pm 0.25$  で、やはり SCORAD と有意な正の相関を認めた。また、 $SCORAD < 20$ ,  $20 \leq SCORAD < 40$ ,  $40 \leq SCORAD$  の 3 群で比較すると、SCORAD の高値群ほど TWPI, AI ともに値が高くなり  $SCORAD < 20$  群と  $40 \leq SCORAD$  群の間で有意差が認められた。

### 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。

(2) 乾癬は炎症性角化症に属する Th1/Th17 有意の皮膚疾患で、Th2 有意であるアトピー性皮膚炎の対照疾患として比較されることが多い。今回の解析結果から、乾癬患者では重症なほど労働生産性が低下していることが確かめられた。また、アトピー性皮膚炎患者においても、労働生産性は乾癬患者と同等もしくは若干強く障害されており、やはり重症なほど労働生産性の低下が強いことが明らかとなった。なお、アトピー性皮膚炎が睡眠に与える影響の調査に関しては、現在、ピッツバーグ睡眠質問票 (Pittsburg Sleep Quality Index: PSQI) を用いた調査を実施中である。アトピー性皮膚炎患者 100 名を対象に調査を実施したところ、SCORAD と PSQI は正の有意な相関を示した。したがって、アトピー性皮膚炎患者では重症なほど睡眠も強く障害されることが示唆された。

### 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) アトピー性皮膚炎患者において労働生産性は乾癬患者と同等もしくは若干強く障害されており、重症なほど労働生産性の低下が強いことが明らかとなった。

### F. 健康危惧情報 なし

### G. 研究発表

#### 1. 学会発表

(1) 佐伯秀久：教育講演：アトピー性皮膚炎診療ガイドラインのポイント．第 111 回日本皮膚科学会総会、京都、2012 年 6 月 1-3 日

#### 2. 論文発表

(1) Takeuchi S, Saeki H, Tokunaga S, Sugaya M, Ohmatsu H, Tsunemi Y, Torii H, Nakamura K, Kawakami T, Soma Y, Gyotoku E, Hide M, Sasaki R, Ohya Y, Kido M, Furue M: A randomized,

open-labeled, multicenter trial of topical tacrolimus for treatment of pruritus in patients with atopic dermatitis. *Ann Dermatol* 24: 144-50, 2012.

(2) Chang W-C, Lee C-H, Hirota T, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Ebe K, Saeki H, Takeuchi S, Furue M, Chen W-C, Juo S-H, Chiu Y-C, Hong C-H, Yu H-S, Chang W-P, Nakamura Y, Tamari M: ORAI1 genetic polymorphisms in the patients with atopic dermatitis in the Japanese and Taiwanese population. *PLoS ONE* 7(1): e29387, 2012.

(3) Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Tanaka S, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Noguchi E, Sakamoto T, Hizawa N, Ebe K, Saeki H, Sasaki S, Ebihara T, Amagai M, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M: Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nature Genet* 44: 1222-6, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

## アトピー性皮膚炎のかゆみと相関する生理活性物質の同定 及び日常生活におけるかゆみ対策の気づきと実践

研究分担者 菅谷 誠 東京大学大学院医学系研究科 皮膚科学 准教授

### 研究要旨

アトピー性皮膚炎のかゆみと相関する生理活性物質を同定するため、8週の間隔をあけて血清を採取し、同時にかゆみに対するアンケート調査を行った。アトピー性皮膚炎のかゆみと相関する血清中生理活性物質としてTARCが、逆相関する物質としてI-TACが候補になりうると考えられた。

またアトピー性皮膚炎患者のかゆみに関するアンケートでは、発汗、ストレス、引っかく行為がかゆみに関係すると認識している患者が多く、概ね理解が良好であった。しかし今回の参加者はアトピー性皮膚炎の勉強に積極的な患者が多く、今後はより多くの患者に講演会参加を勧めていく予定である。

### A. 研究目的

本研究の最初の目的は、アトピー性皮膚炎のかゆみと相関する生理活性物質を同定し、治療に役立てることである。かゆみは自覚的な症状であり、異なる患者のかゆみを客観的に評価、比較することは難しい。昨年同様に外来通院中の同一患者において、複数回血清を採取し、同時にかゆみの自己評価を行うことにした。

また日常生活におけるかゆみ対策の知識を患者に浸透させるため、かゆみに関する講演会を行うことにした。同時にアンケート調査を行い、かゆみと関係する行為の認識や対処法について患者の意識を確認した。

### B. 研究方法

当科アトピー外来に通院中の患者のうち、8週の間隔をあけて血清を採取し、同時に日中、夜間のかゆみに対するアンケート調査を行った。昨年と合わせて、かゆみの自己評価に変化のあった10名の血清を用い、QIAGEN社

の Human Common Chemokines Multi-Analyte ELISArray Kit を使用して IL-8, MCP-1, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IP-10, I-TAC, MIG, Eotaxin, TARC, MDC, GRO $\alpha$ を測定した。ケモカイン同士の相関の有無はスピアマンの順位相関を用いて検定した。

また日常生活におけるかゆみ対策の気づきと実践のため、アトピー性皮膚炎患者を対象にかゆみに関する講演会を行い、同時にアンケート調査を行った。

(倫理面への配慮)

患者血清を用いる本研究は、東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会の承認を得ている。人権擁護には十分配慮し、採血時には患者より書面にてインフォームド・コンセントを得ている。

### C. 研究結果

10名の患者で1人あたり2検体、計20検体のケモカイン濃度を解析した。MIP-1 $\alpha$ と

MIP-1 $\beta$ , TARCとMDCの間に強い相関があり、過去の報告と合致していた。興味深いことに、IFN- $\gamma$ で誘導されるIP-10, I-TAC, MIGと好酸球の遊走、活性化に重要なeotaxinの4者間に強い相関を認めた。また好中球の遊走に重要なGRO $\alpha$ は、MIP-1 $\alpha$ , IP-10, MIG, eotaxinと相関を認めた。かゆみの自己評価に関しては、かゆみの変化とTARC濃度の変化には正の相関があり、I-TAC濃度の変化は負の相関があった。

アトピー性皮膚炎患者のかゆみに関するアンケートでは、発汗、ストレス、引っかく行為がかゆみに関係すると認識している患者が多かった。一方、入浴方法がかゆみに関係しているという意識は乏しかった。また、かゆみを感じたら薬を塗るように指導されている患者が多かった。実際には、掻いてしまっていることが多いようである。抗ヒスタミン薬を継続して内服することが、かゆみのコントロールに重要であることは認識されていた。

#### D. 考察

アトピー性皮膚炎患者の血清検体に対して複数のケモカインを同時に測定することにより、ケモカイン同士の相関をみることができた。MIP-1 $\alpha$ とMIP-1 $\beta$ やIP-10, I-TAC, MIG間の相関は予想通りであったが、好酸球遊走因子であるeotaxinがTh1ケモカインと強い相関を示すことが分かったのは興味深かった。かゆみに関しては、アトピー性皮膚炎の病勢を最も鋭敏に反映するTARCが関与している可能性が考えられた。

アトピー性皮膚炎患者のかゆみに関するアンケートでは、かゆみと関係する行為の認識や対処法については概ね理解が良好であった。

しかし今回の参加者はアトピー性皮膚炎の勉強に積極的な患者が多く、今後はより多くの患者に講演会参加を勧めていく予定である。

#### E. 結論

血清中のかゆみと相関する生理活性物質としてTARCが、逆相関する物質としてI-TACが候補になりうると考えられた。日常生活におけるかゆみ対策の知識を患者に浸透させるため、今後も患者向け講演会を行っていく予定である。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

TARC and I-TAC are sensitive markers reflecting pruritus in atopic dermatitis

##### 2. 学会発表

第37回日本研究皮膚科学会学術大会・総会（2012年12月7日～9日）にてPruritus in atopic dermatitis is positively correlated with serum TARC levels and negatively correlated with serum I-TAC levelsという演題で発表。

#### 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。



## マウスモデルを用いた掻痒発現機序の解析と治療戦略の構築

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

タデアイ *Poligonum tinctorium* はタデ科の一年生草本で、indigo を含み、藍染の染料として用いられる。古来、藍染の肌着は冷え性、肌荒れ、あせもなどに効果があるとされ、防虫効果も知られてきた。近年、抗菌効果、抗アレルギー効果などが示唆されているが、詳細な検討は実施されていない。histamine に対して感受性の高い ICR マウスに、IgE を用いて passive cutaneous anaphylaxis (PCA) を誘発すると、血管透過性亢進とともに高頻度の搔破行動が観察される。また、2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) を反復塗布して誘発する BALB/c マウス耳殻の皮膚炎では、顕著な炎症が誘発されるとともに、高頻度の搔破行動が認められる。そこで、タデアイの抗アレルギー作用、特に掻痒に対する効果を検討することを目的に、マウス皮膚炎モデルを用いて検討を行った。検討には、タデアイとともに、藍染に用いられるマルバアイ (タデアイの変種) およびリュウキュウアイ (*Strobilanthes cusia*, キツネノマゴ科) を用いた。

(1) 3 種のアイの熱水抽出物および methanol 抽出物を作製し、外用によって皮膚炎モデルに及ぼす影響を検討した。タデアイ熱水抽出物は明らかな抑制作用を示さなかったが、methanol 抽出物は両モデルの皮膚炎、搔破行動を有意に抑制した。マルバアイ熱水抽出物は DNFB による皮膚炎および搔破行動を抑制したが、methanol 抽出物には搔破行動抑制作用は認められなかった。リュウキュウアイ抽出物は DNFB による皮膚炎および搔破行動を抑制した。(2) タデアイ methanol 抽出物の抑制効果が最も顕著であったため、タデアイから熱水および methanol 抽出物を再度調製し、それぞれを分画して効果を検討した。熱水抽出物の主要な 10% ethanol 溶出画分には抑制作用は認められなかったが、methanol 抽出物の画分 12、13 および 16 は搔破行動抑制作用を示した。(3) TLC および <sup>1</sup>H-NMR による予備的な解析により、画分 13 には kaempferol および 6-methoxykaempferol を含む 10 数種のフェノール成分が、また、画分 16 には 2 種の低極性フェノール成分が含まれることが確認された。

得られた成績から、タデアイ methanol 抽出物の画分中には、外用によってマウス搔破行動を抑制する物質を含有するものがあり、有効成分の同定が期待できると思われる。

## A. 研究目的

掻痒はアトピー性皮膚炎患者の重要な訴えであり、誘発される搔破行動は皮膚症状を増悪する最も重要な因子である。したがって、掻痒あるいは搔破行動を抑制する手法あるいは薬物を開発することは患者 QOL の改善に極めて有用である。

藍染の衣服はある種の皮膚疾患に有用であることが示唆されており、古来、藍染の肌着が冷え性、肌荒れ、あせもなどに効果があることが知られてきた。近年、抗菌効果、抗アレルギー効果なども示唆されており、アトピー性皮膚炎治療への応用を意図した検討も実施されている。藍染の肌着を着用することで皮膚炎症状が軽減されれば、患者 QOL の改善に大きく寄与することが期待できる。

ICR マウスに IgE 依存性 passive cutaneous

anaphylaxis (PCA) を誘発すると、血管透過性亢進と共に高頻度の搔破行動が誘発される。また、BALB/c マウスに 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) を反復塗布することにより、高頻度の搔破行動を伴う皮膚炎が誘発される。

そこで、藍染衣類の皮膚炎軽減効果を検討する前段階として、藍染に用いられる植物であるタデアイ *Poligonum tinctorium* (タデ科)、マルバアイ (タデアイの変種)、リュウキュウアイ *Strobilanthes cusia* (キツネノマゴ科) の乾燥葉から熱水抽出物および methanol 抽出物を調製し、マウス皮膚炎モデルにおける搔破行動に及ぼす影響を検討した。

## B. 研究方法

PCA の誘発: 雄性 ICR マウスの頸背部を除毛

し、希釈した抗 dinitrophenyl (DNP) モノクローナル IgE 20  $\mu$ l を皮内注射して受動感作した。24 時間後、0.1 mg/ml の DNP 化したウシ血清アルブミンを含む 0.5% Evans blue 生理食塩水溶液 0.25 ml を静脈内注射して反応を誘発した。反応誘発から 1 時間、搔破行動を観察し、観察終了後に反応部位に漏出した色素を抽出して定量した。アイ抽出物は 50% あるいは 100% ethanol に溶解し、反応誘発 1 時間前に単回、反応部位に塗布した。

DNFB 反復塗布による皮膚炎： 雄性 BALB/c マウスの腹腔内に DNP 化したブタ回虫抽出物 10  $\mu$ g および alum 1 mg を含有する生理食塩水 0.2 ml を注射して免疫し、2 週間後から隔日に 5 回、両耳殻の表裏に 0.15% DNFB acetone 溶液 100  $\mu$ l を塗布した。さらに 2 週間後、同様に DNFB acetone 溶液を塗布して皮膚炎を誘発した。誘発から 2 時間、搔破行動を観察し、6 時間後および 24 時間後に耳殻の厚さを測定した。アイ抽出物は 50% あるいは 100% ethanol に溶解し、誘発日までの 10 日間、1 日 1 回、耳殻へ塗布した。なお、誘発日には誘発 1 時間前に塗布した。

アイ熱水抽出物および methanol 抽出物は定法に従って調製した。また、タデアイ熱水抽出物および methanol 抽出物の画分は、HP20 カラムに添加した抽出物を濃度の異なる ethanol で溶出して調製した。

#### (倫理面への配慮)

動物を使用する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、実験計画を委員会に提出して審査、承認を受けて実施した。

### C. 研究結果

#### (1) 3 種のアイ抽出物の検討

3 種のアイから熱水抽出物および methanol 抽出物を調製し、マウス皮膚炎に及ぼす影響を検討した。タデアイ熱水抽出物は PCA による血管透過性亢進を軽度抑制したが、搔破行動、および DNFB による皮膚炎および搔破行動には影響を及ぼさなかった。一方、methanol 抽出物は両モデルの皮膚炎、搔破行動を有意に抑制した。マルバアイ熱水抽出物は PCA による血管透過性亢進、DNFB による皮膚炎および搔破行動を抑制したが、methanol 抽出物には搔破行動抑制作用は認められなかった。PCA による血管透過性亢進を軽度抑制し、DNFB による耳殻腫脹を抑制した。リュウキュウアイ熱水および methanol 抽出物は PCA による搔破行動を軽度抑制し、DNFB による皮膚炎および搔破行動を抑制した。

3 種のアイ抽出物の PCA に及ぼす影響を再度、同時に比較検討した。熱水抽出物ではリュウキュウアイのみが搔破行動を抑制したが、いずれも血管透過性亢

進を抑制しなかった。methanol 抽出物では、タデアイおよびマルバアイが搔破行動を抑制したが、いずれの抽出物も血管透過性亢進には影響を及ぼさなかった。

#### (2) タデアイ抽出物画分の検討

3 種のアイ抽出物の検討の結果から、タデアイ methanol 抽出物の搔破行動抑制効果が最も再現性が高く、顕著であると考えられた。そこで、タデアイから熱水抽出物および methanol 抽出物を再度調製し、それぞれを HP20 カラムを用いて分画し、皮膚炎に及ぼす影響を検討した。

PCA に対して明らかな抑制作用を示さなかった熱水抽出物および大部分の成分が分画された 10% ethanol 溶出画分は、いずれも PCA による搔破行動および血管透過性亢進に影響を及ぼさなかった。

methanol 抽出物の画分中、60% ethanol および 80% ethanol で溶出した画分 (画分 13 および 16) は PCA による搔破行動を明らかに抑制し、50% ethanol 溶出画分 (画分 12) も抑制する傾向を示した。いずれの画分も血管透過性亢進に対しては明らかな抑制作用を示さなかった。また、これらの 3 画分は DNFB 反復塗布による皮膚炎に伴う搔破行動を明らかに抑制した。

#### (3) 含有成分の予備的解析

タデアイ methanol 抽出物の画分中、明らかな搔破行動抑制作用を示した画分 13 および 16 について、TLC および  $^1\text{H-NMR}$  を用いて含有成分について予備的に検討した。画分 13 には kaempferol および 6-methoxykaempferol を含む 10 数種のフェノール成分が含有されること、また、画分 16 には 2 種の低極性フェノール成分が含まれることが確認された。

### D. 考察

藍染の衣類 (肌着) を使用することによってある種の皮膚疾患に好影響があることは古くから認識されていたと考えられ、アトピー性皮膚炎に対する効果も期待できるとの考え方がある。このような考えに基づき、タデアイから抗菌成分が同定されており、アトピー性皮膚炎に対する効果も検討されている。

今回の検討において、藍染およびタデアイに注目した背景には、アクセサリーに対する皮膚炎が藍染の衣類を利用するようになって軽減したとの経験談、古くからの経験に基づくと考えられる情報などがあるが、科学的な根拠が示されているものはほとんどない。しかし、古来、藍染の肌着がある種の皮膚疾患に好影響を及ぼすことが認識されてきたことから、アトピー性皮膚炎に対する有効性が期待できると考えられる。そこで、藍染衣類の皮膚炎軽減効果を検討する前段階として、藍染に用いられる植物の抗アレルギー作用の有無を検討した。

藍染には indigo を含有する数種の植物が用いられるが、タデアイ、マルバアイおよびリュウキュウアイの 3 種を選び、乾燥した葉部から熱水抽出物および methanol 抽出物を調製し、マウスの皮膚炎および搔破

行動に及ぼす影響を検討した。

ICR マウスは histamine に対して搔破行動を発現し、PCA を誘発すると血管透過性亢進とともに高頻度の搔破行動が認められる。血管透過性亢進、搔破行動のいずれも肥満細胞に由来する histamine が主要な役割を演じると推定される。一方、DNFB を反復塗布した BALB/c マウスにおいても高頻度の搔破行動が認められるが、誘発に関わるメディエーターについては明らかではない。なお、BALB/c マウスは histamine に対して搔破行動をほとんど発現しない。

3 種のアイから調製した熱水抽出物および methanol 抽出物の搔破行動抑制効果を比較した結果、期待したように、いずれの植物もマウスの搔破行動を抑制する成分を含有する可能性が示されたが、タデアイ methanol 抽出物が再現性よく搔破行動を抑制するとともに、皮膚炎に対しても抑制効果を発揮することが確認できた。そこで、有効成分の同定に向け、再度、タデアイから熱水抽出物および methanol 抽出物を調製し、それぞれから HP20 カラムを用いて分画を行った。熱水抽出物および極性の高い成分が含まれる主要画分 (10% ethanol 溶出画分) は PCA による搔破行動に影響を及ぼさなかった。一方、methanol 抽出物から分画した画分 12、13 および 16 は、皮膚炎に対する抑制は明らかではないが、PCA および DNFB 塗布による搔破行動を明らかに抑制した。したがって、タデアイ methanol 抽出物にはマウス搔破行動を抑制する成分が含まれると考えられる。

有効性が確認されたタデアイ methanol 抽出物の画分 13 および 16 について、TLC および <sup>1</sup>H-NMR を用いて予備的な成分の検討を行った結果、画分 13 には kaempferol および 6-methoxykaempferol を含む 10 数種のフェノール成分が含有されること、また、画分 16 には 2 種の低極性フェノール成分が含まれることが確認された。今後はこれらの画分に含まれる成分を同定し、搔破行動抑制効果を検証したい。

なお、藍染の衣類の効果に関しては、アイの成分が直接関与する可能性は小さいと考えられる。藍染衣類の抗アレルギー作用についての検討も開始したい。

#### E. 結論

藍染衣類の抗アレルギー作用を確認することを目的に、染色に用いられる植物である 3 種のアイの抽出物のマウス皮膚炎に及ぼす影響を検討した。その結果、タデアイ methanol 抽出物中にマウス搔破行動を抑制す

る成分が含有されていることを確認した。これらの成分を同定することにより、搔痒治療への応用の道が開ける可能性が期待できると思われる。なお、成分同定後には、特許取得についても検討する。今後は、藍染衣類の抗アレルギー作用についての検討も開始したい。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Shah MM et al., *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 Induces CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells and Suppresses Allergic Contact Dermatitis. *Biol Pharm Bull* 35: 612-616, 2012.

Yamada Y et al., Inhibition of mouse allergic dermatitis by an extract from a mushroom, *Ganoderma lucidum*. (submitted).

##### 2. 学会発表

金森佑太, 他: ダニ抗原誘発マウスアトピー性皮膚炎モデルにおける遺伝子発現の検討. 第 58 回日本薬学会東海支部大会, 静岡, 2012.7.7.

山内丈史, 他: ICR マウスの特徴を有するヘアレスマウスの基礎的研究. 第 22 回 国際痒みシンポジウム, 東京, 2012.10.6.

稲垣直樹: ダニ抗原曝露によって誘発する NC/Nga マウス皮膚炎に伴う搔破行動の特徴. 第 22 回 国際痒みシンポジウム, 東京, 2012.10.6.

稲垣直樹: ケラチノサイトが産生する液性因子. 第 62 回 日本アレルギー学会秋季学術大会, 大阪, 2012.11.29.-12.1.

#### 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

特になし

## 小児アトピー性皮膚炎に対する proactive 治療に関する研究

研究分担者 大矢幸弘 (独)国立成育医療研究センター 生体防御系内科部 アレルギー科医長  
研究協力者 樺島重憲 (独)国立成育医療研究センター 生体防御系内科部 アレルギー科  
中里純子 同上  
世間瀬基樹 同上  
山本貴和子 同上  
成田雅美 同上

### 研究要旨

平成22年度までの研究では、ステロイド外用薬の長期間欠塗布 (proactive療法) の有効性と安全性につき報告した。平成23年度は、①アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis: AD) の乳児にproactive療法を施すことにより、食物アレルギー (food allergy: FA) の発症が抑制されるか、②ADの乳児に、乳児期早期より抗原蛋白を摂取させることでFAの発症が抑制されるかの2点について検討を行うため、乳児AD患者を対象とするランダム化二重盲検介入研究を立案した。具体的には、生後4-5ヶ月のAD乳児に加熱卵粉末またはプラセボを摂取させ、1歳時点での卵アレルギーの有無を調べるもので、ADの治療法 (proactive療法またはreactive療法) の影響をあわせて調べる。本年度、研究の遂行に必要とされる試験用食品の製造プロセス開発をまず行った。研究に使用する加熱卵粉末の流動性が不良であるため、充填量の精度を確保しつつ、必要な数の分包品 (2~3万包/年) を製造することが困難であった。そこで、ブドウ糖を添加物として加え、粉末の流動性を改善することで、必要数の試験用食品の製造が可能となった。以上の検討の後、参加者のリクルートを開始し、これまでに13名を登録し、試験用食品の摂取を問題なく進めている。これと並行して、当科において加療しているAD乳児において、治療・介入の開始時期とFA発症の関連について臨床的検討を行った。その結果、早期からの治療・介入が良好な予後に結びつく可能性が示された。これより、FA発症予防の観点から、AD治療や抗原蛋白摂取の適切な開始時期 (ウィンドウ) が存在する可能性を指摘した。

### A. 研究目的

#### 1. PETIT研究

アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis: AD) は、慢性的に皮膚炎を繰り返し、患者のQOL (quality of life) を著しく損なう。ステロイド外用薬の長期間欠塗布 (proactive療法) は、ADを寛解状態に導入・維持することが可能で、その有効性と安全性についてすでに報告済みである (平成20~22年度厚生労働省研究班: 古江班)。また、Du Toitらによるピーナッツアレルギーの有病率に関する観察研究を皮切りに、乳児期における抗原蛋白の早期摂取開始が食物アレルギーを減少させるとの報告が近年相次いでいる。平成23年度には、ADの乳児で即時型食物アレルギー (food allergy: FA) が高率に合併することに着目し、①ADの乳児にproactive療法を施すことにより、FAの発症が抑制されるか ②ADの乳児に、乳児期早期より抗原蛋白を摂取させることでFAの発症が抑制されるか、

の2点について検討を行うランダム化二重盲検介入研究を立案した。これは、二重暴露仮説として知られる、食物抗原による経皮感作と経腸免疫寛容とがFAの発症に関与する、との仮説に基づいたものである。本研究は、PETIT (Prevention of Egg allergy with Tiny amount InTake) 研究と称している。

具体的には、特に基礎疾患のない、ADのある生後4-5ヶ月の乳児をリクルートし、ランダム割り付けを行う。介入群 (卵蛋白群: 100例) には、生後6ヶ月から1歳まで鶏卵蛋白の連日摂取を指示する。対照群 (プラセボ群: 100例) には、同様にしてプラセボの連日摂取を指示する。両群とも、1歳まで卵成分を含む食品の摂取を制限する。介入期間の湿疹の治療については、proactive治療または、reactive治療 (保湿によるスキンケアを基本とし、湿疹の悪化時のみスポット的にステロイド外用薬を使用する従来の治療) のいずれかを選択する。以上の介入の後、1歳で食物負荷試験を実施し、卵

アレルギーの有無を調べる (図1)。なお、湿疹の治療方針については、患児の保護者の意向も考慮する必要がありランダム割り付けが困難であるため、サブグループ解析を行って、その影響を調べることとする。介入期間中の皮膚の状態は、SCORAD およびPOEM (Patient-Oriented Eczema Measure)、血清TARCを参考に評価する。

本年度は、この介入研究を実施するために必要な、被検者に摂取させる試験用食品の開発を行い、これを用いた介入研究に着手し・進行させた。

## 2. 臨床比較検討

当科において加療している乳児AD患者において、①proactive療法によって皮膚バリア機能を回復させ、経皮感作を防止する、②抗原蛋白の早期摂取によって経口免疫寛容を誘導する、という2つのアプローチによって乳児のFA発症予防を試みた。その中で、典型的と思われる経過を示した入院症例2例に関し、比較検討を行ったので報告する。

## B. 研究方法

### 1. PETIT 研究

研究に使用する加熱卵粉末は、スチーム加熱した全卵をスプレードライ法により粉末化したもので、粉末重量の約 50%の卵蛋白を含有する。この加熱卵粉末とカボチャ粉末を混合して、被検者に連日摂取させる試験用食品を作製する。試験用食品は、衛生面を考慮して、1日に摂取する分量ずつ分包充填する必要があると考えられた。しかしながら、加熱卵粉末は流動性が不良で、充填量の精度を確保しつつ、必要な数の分包品 (2~3 万包/年) を製造することが困難であった。そこで、加熱卵粉末の水分量調整、添加物による粉末の性状改善を実施することにより、試験用食品の開発を

行った。

## 2. 臨床比較検討

### 症例 1 (早期介入例)

SCORAD 65、低蛋白血症を伴う重症 AD で、生後 3 ヶ月に当科を受診し、入院加療となった。初診時、牛乳特異的血清 IgE は高値を示しており、牛乳蛋白による感作がみられた。入院後、proactive療法により、皮膚炎は速やかに寛解した。その後、保湿を中心としたスキンケアを徹底し、経皮感作の防止に努めた。さらに、入院前に人工乳を摂取した経験があったところから、入院後も人工乳の摂取を継続させることとした。

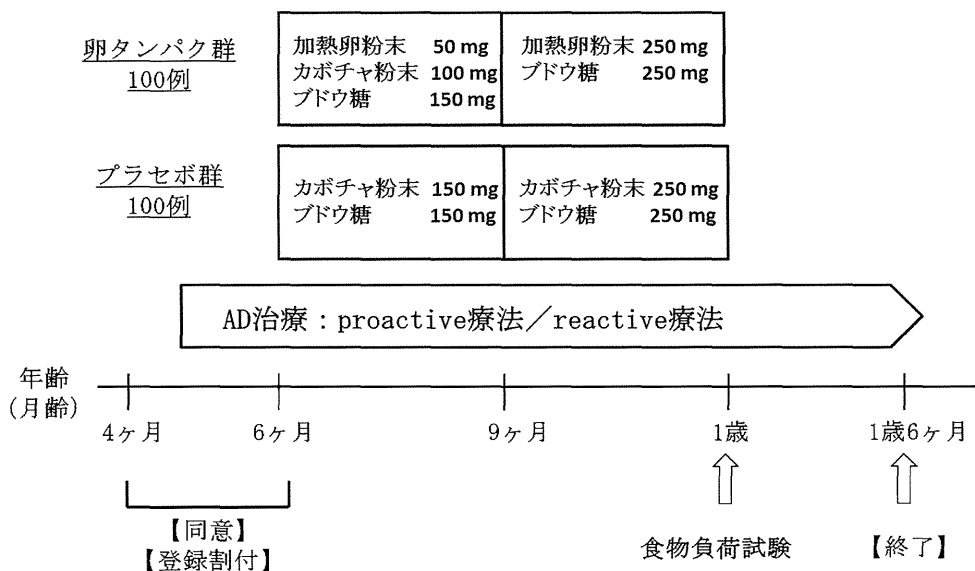
### 症例 2 (介入遅延例)

SCORAD 72、体重増加不良を伴う重症 AD で、生後 11 ヶ月に当科を受診し、入院加療となった。入院前、保護者の自己判断により牛乳を含む複数の食品除去が行われていた。牛乳特異的血清 IgE は高値を示しており、牛乳蛋白による感作がみられた。症例 1 と同様、proactive療法により皮膚炎は速やかに寛解し、その後スキンケアを徹底した。

## C. 研究結果

### 1. PETIT 研究

検討の結果、卵およびカボチャ粉末と等量のブドウ糖粉末を添加すると、分包充填機により精度よく分包・充填できることが明らかとなった。これを受け、実際に乳児が無理なく摂取できる粉末量も考慮し、試験用食品は、図 1 に示すような量の混合粉末を 1 日量とした。この検討により、必要量の試験用食品の製造が可能となった。これを受けてリクルートを開始し、これまでに 13 名を登録した。試験用食品の摂取は順調に進み、問題なく研究が進行している。



※ 介入期間中は、卵成分を含む食物の摂取を制限

図 1 PETIT 研究のプロトコル

## 2. 臨床比較検討

症例 1、2 ともに、全身状態の悪化を伴う重症 AD 乳児であった。生後 3 ヶ月の早期から介入を開始した症例 1 では、治療に伴って血清 TARC、牛乳特異 IgE ともに速やかに低下し、問題なく人工乳の摂取を継続することができた (図 2a)。一方、生後 11 ヶ月より介入を開始した症例 2 では、TARC は低下したものの、牛乳特異 IgE は容易に低下せず、経口食物負荷試験において 0.1 ml の牛乳で陽性となり、牛乳アレルギーを発症していることが確認された (図 2b)。すなわち、proactive 療法は介入時期に関わらず皮膚炎の治療に有効であったが、介入の時期が遅れた症例では、食品抗原への感作を減じて FA の発症を防ぐことができなかった。

ここでは、典型的な 2 症例について報告したが、乳児 AD 患者においては、介入の時期が遅れるほど FA の発症防止が困難となる一般的傾向が、臨床的に見られている。

(倫理的配慮) 本研究では、FA 発症の高リスク群である乳児 AD 患者に、早期より抗原蛋白の摂取をすすめている。このため研究遂行に当たっては、初回の摂取量を少量とする、症状発現時には適切な対応ができる体制を整えて摂取させる、といった安全面の配慮をしている。PETIT 研究については、当センターの倫理委員会で承認を受け実施している。

## D. 考察

PETIT 研究において開発した試験用食品は、摂取すべき加熱卵粉末が、精度よく 1 日量ずつアルミ分包されており、清潔な状態で保管することが

できる。本研究では、卵アレルギーの発症予防目的に用いているが、卵アレルギーの治療を目的とする経口免疫療法に利用するなどの応用も可能と考えられた。

臨床比較検討において示唆されたとおり、AD 乳児において、皮膚炎を鎮静化させて経皮感作を防止しても、介入の時期が遅れると FA の発症防止が困難となる傾向がある。Koplin らは、観察研究を行い、生後 6 ヶ月までに卵摂取を開始した群では、それ以降に摂取を開始した群と比較して卵アレルギーが有意に少ないと報告している。これらは、AD 乳児への早期介入の必要性を示唆するものであるが、特に、経口免疫寛容誘導の観点からは、生後 6 ヶ月頃までが有効な介入時期(ウィンドウ)であることを推測させる。今後これらに関し、前方視介入研究である PETIT 研究において、高いエビデンスレベルのデータを出していくことを目指す。

## E. 結論

乳児 AD 患者を対象とする卵アレルギー発症予防研究 (PETIT 研究) を実施するために必要な試験用食品の開発を行い、実際のリクルートを開始し、研究を進めている。これと並行して、当科において治療している乳児 AD 患者を対象とした臨床検討を行い、FA 発症予防のためのウィンドウが存在する可能性を指摘した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表(学会発表)

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

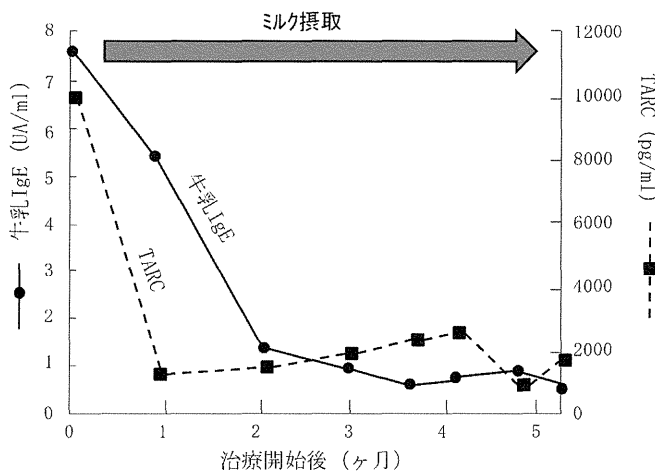


図 2 a 症例 1 (早期介入例) の経過

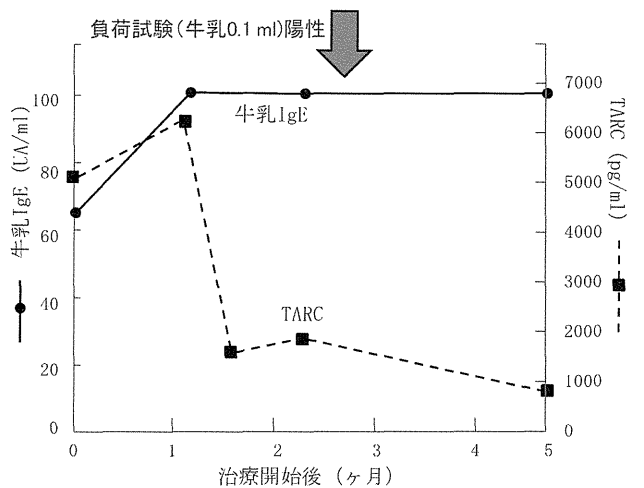


図 2 b 症例 2 (介入遅延例) の経過

## ケラチノサイトから産生される炎症性サイトカインと AA 代謝産物の役割についての研究

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 山本 修一 佐賀大学医学部小児科学 講師  
 研究協力者 谷口 一登 佐賀大学医学部地域医療支援学 助教

## 研究要旨

IL-1 ファミリーに属するサイトカインである IL-33 は、アトピー性皮膚炎(AD)のケラチノサイトで発現が亢進していることが報告されている。IL-33 のレセプター ST2 はいろいろな炎症細胞に発現していることから、ケラチノサイトが発現する IL-33 は AD などのアレルギー性皮膚病変の病態に関与している可能性がある。ヒト培養ケラチノサイト KERTr において IL-33 は恒常的に発現していたが、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ は IL-33 mRNA 発現を有意に増強した。免疫染色において IL-33 蛋白は細胞核に局在しており、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ により細胞質での発現も誘導された。そこで C57BL/6 マウスにおいて oxazolone によるアレルギー性接触性皮膚炎モデルを作成し、この皮膚炎における IL-33、IFN- $\gamma$ および TNF- $\alpha$ の役割について検討した。Oxazolone により表皮は肥厚し、ケラチノサイトに IL-33 の強い発現を認めた。これに対し anti-IL-33 抗体、anti-IFN- $\gamma$ 抗体および anti-TNF- $\alpha$ 抗体をそれぞれ注射した皮膚では、表皮の肥厚のみならず IL-33 の発現も抑制された。以上より oxazolone 誘発皮膚炎モデルの病態における IL-33 の関与が確認されると同時に、IFN- $\gamma$ と TNF- $\alpha$ は表皮ケラチノサイトに IL-33 を誘導することにより皮膚炎の病態に関与しているものと考えられた。アレルギー性接触性皮膚炎において IL-33 は新たな治療ターゲットとなる可能性があると思われる。

## A. 研究目的

IL-1 ファミリーに属するサイトカインの一つ IL-33 は、気管支喘息の気道上皮、関節リウマチの滑膜、アトピー性皮膚炎(AD)や乾癬のケラチノサイト、潰瘍性大腸炎の腸上皮などで発現が亢進している。IL-33 のレセプター ST2 は Th2 細胞、好酸球、好塩基球、肥満細胞に発現していることから、ケラチノサイトが発現する IL-33 は AD などのアレルギー性皮膚病変の病態に関与していると考えられる。我々は昨年までの研究で、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ が培養ケラチノサイトに IL-33 mRNA 発現を誘導することを見出した。本研究の目的は、実際のアレルギー性皮膚病変の病態における IL-33 の役割および IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ との関連を明らかにすることである。

## B. 研究方法

まず、ヒト培養ケラチノサイト KERTr を IFN- $\gamma$ または TNF- $\alpha$ とともに培養し、IL-33 蛋白の発現を免疫染色で検討した。  
次に C57BL/6 マウスを用い oxazolone (oxa.) によるアレルギー性接触性皮膚炎モデルを作成した。

day 0 に 5% oxa. を腹壁に、day 5 から 2 日おきに 5 回、0.1% oxa. を耳介に反復塗布した。以下の 6 グループにおいて耳介の腫脹を比較し、day 15 にその病理組織像を免疫染色にて検討した。

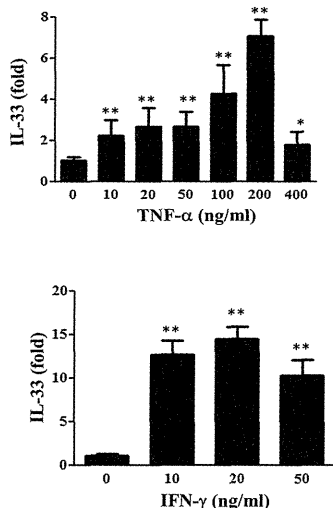
Group 1: 無感作マウス、Group 2: 感作マウス、Group 3: 感作マウスに control IgG を注射したもの、Group 4: 感作マウスに anti-IL-33 抗体を注射したもの、Group 5: 感作マウスに anti-TNF- $\alpha$  抗体を注射したもの、Group 6: 感作マウスに anti-IFN- $\gamma$  抗体を注射したもの。これらの抗体は day 9 に感作マウスの耳介にそれぞれ注射した。

## C. 研究結果

1) ヒト培養ケラチノサイトにおける IL-33 蛋白発現  
KERTr を IFN- $\gamma$  または TNF- $\alpha$  とともに培養すると、それぞれ濃度依存性に IL-33 mRNA 発現が増強した (図1)。免疫染色において、無刺激の KERTr では恒常的な IL-33 蛋白発現を認めたが、その発現は細胞核に局在していた。一方、IFN- $\gamma$  または TNF- $\alpha$  とともに培養

したKERTrではIL-33蛋白発現が増強すると同時に細胞質での強い発現を認めた。

図1



2) oxazolone誘発皮膚炎モデルでの検討

Group 2 - 6はGroup 1に比べ有意に血清IgE値が高く、oxa.による感作が成立していることが確認された(図2)。

図2

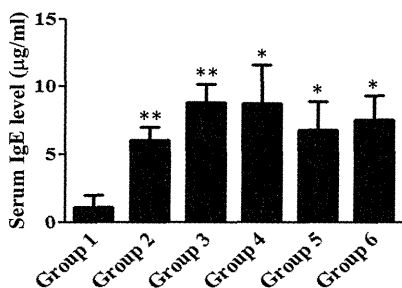
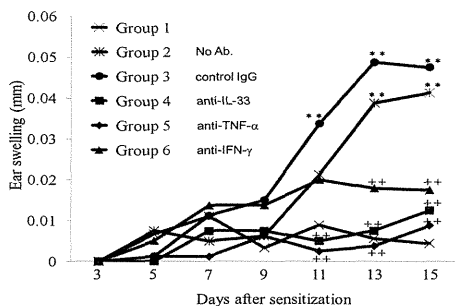


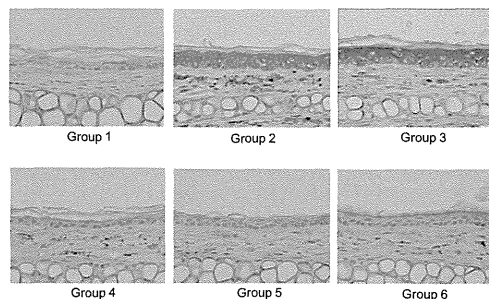
図3に耳介腫脹の経時的变化を示す。Group 2, 3においてoxa.塗布により耳介は経時的に腫脹したが、Group 4, 5, 6では耳介の腫脹が有意に抑制された。

図3



IL-33の免疫染色において、Group 4, 5, 6ではGroup 2, 3に比べ、表皮の肥厚とIL-33の発現が抑制された(図4)。

図4



D. 考察

培養ケチノサイト KERTr では細胞核におけるIL-33 蛋白の恒常的な発現を認めたが、IFN-γまたはTNF-αはIL-33 mRNA 発現を増強すると同時に、IL-33 蛋白を細胞質に移動させる作用があることが分かった。マウスにおいて anti-IL-33 は耳介の腫脹を有意に抑制したことより、IL-33 のアレルギー性皮膚病変の病態への関与が確認された。anti-TNF-α抗体、anti-IFN-γ抗体はそれぞれ、oxa.によるケチノサイトにおけるIL-33 蛋白産生を抑制すると同時に耳介の腫脹も有意に抑制した。KERTr における結果も考慮すると、TNF-αとIFN-γはケチノサイトにIL-33 産生を誘導することにより皮膚炎症を増強していると考えられる。現時点ではケチノサイトにおけるST2 の発現は確認していないが、anti-IL-33 抗体がケチノサイトにおけるIL-33 産生を抑制したことは、ケチノサイトが産生するIL-33 はそれ自身がautocrine的にIL-33 産生を誘導する可能性があることを示唆する。

E. 結論

アレルギー性皮膚炎の病態に、ケチノサイトが産生するIL-33 が関与していることが明らかになった。AD などのアレルギー性皮膚炎においてIL-33は新たな治療ターゲットとなる可能性があると考えられる。



## アトピー性皮膚炎のかゆみの発症機序と治療に関する研究 樹状細胞の病態への役割に関する研究

分担研究者 中村晃一郎（埼玉医科大学皮膚科教授）

研究協力者 滝口光次郎（埼玉医科大学皮膚科助教）

宮野恭平（埼玉医科大学皮膚科助教）

アトピー性皮膚炎(AD)には角層のバリア機能異常や Th2 サイトカインの異常が病態に関与している。表皮に存在する樹状細胞として、表皮ランゲルハンス細胞、FcεRI 陽性表皮樹状細胞などがあり、末梢血 CD34 陽性細胞、CD14 陽性単球から樹状細胞が分離される。AD の病態における樹状細胞の TARC 産生調節は完全には明らかにされていない。AD 患者の樹状細胞由来の TARC 産生は健常人に比べて顕著であり、自然免疫による影響を受けていることが示された。

### A.研究目的

アトピー性皮膚炎（AD）患者の血清中の TARC/ CCL17濃度は重症度と関連し、治療によって重症度の改善とともに減少する。AD 患者末梢血単球より採取し作成した樹状細胞を用いて、TARC産生能の調節機序を検討することによって、樹状細胞の役割を解析する。

### 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、単球を採取し、樹状細胞を作成する。培養下における樹状細胞の TARC 産生を ELISA 法にて解析する。

（倫理面への配慮）

本研究はヘルシンキ宣言を遵守して施行された。

### C.研究結果

ダニ抗原を添加刺激した場合 AD 患者の樹

状細胞の TARC 産生は、健常人に比べて有意に増加を示した。LPS 刺激によって無刺激に比べて AD 患者の樹状細胞の TARC 産生は増加を示した。また樹状細胞の TARC 産生は AD で、健常人に比較して有意に高値を示した。Semaphorin は表皮の末梢神経伸長抑制因子であり、かゆみを制御する。TARC 産生に対する Semaphorin3A による調節を検討した。Semaphorin 3A による TARC 産生の有意な抑制効果は認められなかった。

### D. 考案

AD 患者の病態には IL-18、IL-33、TARC などのサイトカインの関与が指摘されている。TARC は Th2 細胞の走化活性化に関与するサイトカインである。今回の検討で、樹状細胞の TARC 産生は LPS などの自然免疫の影響を受け、AD で増強している可能性が示された。

E. 結論

AD の皮膚への Th2 細胞浸潤に、樹状細胞由来の TARC 産生が関与する可能性があり、皮膚病変の形成に樹状細胞由来の Th2 ケモカインの関与が示された。将来的な治療の標的となる可能性が示唆された。

参考文献

Hashimoto S, Nakamura K, Oyama N, Kaneko F, Tsunemi Y, Saeki H, Tamaki K. Monocyte derived chemokine (MDC) /CCL22 reflects disease activity in patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 44(2), 93-9, 2006.

F.健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Tsunemi Y, Saeki H, Tamaki K, Sato S, Nakamura K. Cetirizine hydrochloride suppresses the CCL17 production of epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts. *Int J Dermatol.* ; 51(8): 1003-5, 2012
- ② Takeuchi S, Saeki H, Tokunaga S, Sugaya M, Ohmatsu H, Tsunemi Y, Torii H, Nakamura K, Kawakami T, Soma Y, Gytoku E, Hide M, Sasaki R, Ohya Y, Kido M, Furue M. *Ann Dermatol.* A randomized, open-label, multicenter trial of topical tacrolimus for the treatment of pruritis in patients with atopic dermatitis. 24(2):144-50. 2012.
- ③ Higashi T, Shimojo N, Suzuki S, Nakaya M, Takagi R, Hashimoto K, Nakagome K,

Nakamura K, Kohno Y, Matsushita S. Coenzyme A contained in mothers' milk is associated with the potential to induce atopic dermatitis. *Int Immunol.* 23(12): 741-9. 2011.

- ④ 中村晃一郎。樹状細胞、Langerhans 細胞。1冊でわかる皮膚アレルギー。文光堂。13-17, 2012 (02)
- ⑤ 中村晃一郎。接触皮膚炎。ステロイド外用治療はどこ効く。文光堂。146-149, 2012 (02)
- ⑥ 中村晃一郎。アトピー性皮膚炎診療ガイドライン 2012。アトピー性皮膚炎の薬物療法。監修：片山一朗、河野陽一。61-71, 2012(11)
- ⑦ 中村晃一郎。抗ヒスタミン薬の適応疾患：その他の湿疹・皮膚炎。ファーマナビゲーター 抗ヒスタミン薬編。メディカルレビュー社。138-149, 2012 (04)
- ⑧ 中村晃一郎。抗ヒスタミン薬：第1章ポジショニング・定義。(1)アトピー性皮膚炎の患者さん全員に抗ヒスタミン薬は必要か。メディカルレビュー社。2012.

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

## アトピー性皮膚炎の疾患感受性遺伝子解析

研究分担者 玉利 真由美 理化学研究所ゲノム医科学研究センター・呼吸器疾患研究チーム  
チームリーダー

研究協力者 広田 朝光 理化学研究所ゲノム医科学研究センター・呼吸器疾患研究チーム  
研究員

## 研究要旨

本研究は遺伝子多型解析を用いてアトピー性皮膚炎関連遺伝子群を同定し、病態の科学的な解明を通してより良い予防法、治療法を確立することを目的とする。今回、我々はゲノムワイド関連解析の手法を用いてアトピー性皮膚炎の発症に関連するゲノム領域の同定を行った。ゲノムワイド水準 ( $P < 5 \times 10^{-8}$ ) を満たす8つの新規疾患関連領域を同定した。またヨーロッパ、中国の集団で報告された既報の7領域との関連についても再現性を確認した。

## A. 研究目的

アトピー性皮膚炎は、かゆみを伴う慢性湿疹の症状が特徴の病気で、患者の多くは遺伝的なアトピー体質を持つ。近年、信頼性の高いゲノムワイド関連解析 (Genome-wide association study, GWAS) の手法が確立され、様々な疾患において遺伝要因の解明が急速に進んでいる。本研究はこの手法を用いアトピー性皮膚炎の病態に関連する遺伝要因を同定し、痒みとアレルギー炎症の機序を科学的に解明し、新しい治療法の開発へ向けてエビデンスを提示していくことを目的とする。

## B. 研究方法

アトピー性皮膚炎患者1472名、非アトピー性皮膚炎患者7971名についてIllumina Human OmniExpress Chipを用いGWASを行なった。Hardy-Weinberg 平衡(コントロール集団において $P < 10^{-6}$ )、タイピング成功率 $\geq 0.99$ 、minor allele frequency  $\geq 0.01$ の条件にてタイピング結果のQuality controlを行い、Cochrane-Armitage trend testにより計606,164SNPsについて関連解析を行なった。GWASの結果、 $P < 10^{-4}$ の関連の強さを示したSNPsについては各領域においてTag SNPsを選出し独立に収集した集団(ケース1856名、コントロール7021名)について検証研究を行なった。検証研究の疾患群の一部として本研究班で収集したサンプルを用いた。検証研究のタイピングはTaqMan法およびInvader法を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は三省合同「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠して行い、当該実施機関の倫理委員会の承認を受けたうえで研究を行っている。

## C. 研究結果

GWASの結果、 $\lambda_{GC} = 1.031$ であり、population stratificationにより偽陽性の結果が得られる確率は低いと考えられた。GWASにより3つの領域がゲノムワイド水準を満たす関連 ( $P < 5 \times 10^{-8}$ ) を示し、さらに計98個のSNPsが $P < 1 \times 10^{-4}$ を示した。87個のTag SNPs ( $r^2 \geq 0.8$ ) を選出し、検証研究を行ない、メタ解析を行なったところ、最終的に8カ所の新規の疾患関連領域が同定された。

IL1RL1-IL18R1-IL18RAP ( $P = 8.36 \times 10^{-18}$ )、HLA領域 ( $P = 8.38 \times 10^{-20}$ )、OR10A3-NLRP10 ( $P = 1.54 \times 10^{-22}$ )、GLB1 ( $P = 2.77 \times 10^{-16}$ )、CCDC80 ( $P = 1.56 \times 10^{-19}$ )、CARD11 ( $P = 7.83 \times 10^{-9}$ )、ZNF365 ( $P = 5.85 \times 10^{-20}$ )、CYP24A1-PFDN4 ( $P = 1.65 \times 10^{-8}$ )。近年、ヨーロッパ、中国の大規模なGWASにより報告された7つの領域、FLG、C11orf30、TMEM232-SLC25A46、TNFRSF6B-ZGPAT、OVOL1、ACTL9、KIF3A-IL13、についても日本人の集団のGWASの結果で検証を行なったところ、全ての領域においてアトピー性皮膚炎との関連の再現性が確認された。

## D. 考察

これらの8カ所のゲノム領域には、皮膚バリア機能に関わる遺伝子 (CCDC80)、炎症反応関連 (IL1RL1-IL18R1-IL18RAP)、自然免疫-獲得免疫関連 (NLRP10)、制御性T細胞関連 (EGR2) やビタミンD代謝関連 (CYP24A1) 遺伝子など、現在アレルギー炎症との関連が注目されている遺伝子群が数多く含まれていた。HLA領域には感染、炎症に関連する遺伝子群が多数含まれているが、今回初めてGWASによりアトピー性皮膚炎とHLA領域との関連が示された。IL1RL1-IL18R1-IL18RAP、HLA、C11orf30、KIF3A-IL13を含む4つの領域は、気管支喘息のGWASにより疾患関連領域としてすでに報告されており、これらの領域にはアトピー性皮膚炎と気管支喘息に共通する遺伝要因が含まれることが示唆された。

## E. 結論

日本人のアトピー性皮膚炎感受性に関連する8つの新規の疾患関連ゲノム領域を同定した (Nature genetics 44:1222-1226, 2012)。これまでヨーロッパのGWAS、メタ解析および中国のGWASで同定された7つの関連領域についても、日本人の集団で再現性の検証を行い関連が認められた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kinose D, Ogawa E, Hirota T, Ito I, Kudo M, Haruna A, Marumo S, Hoshino Y, Muro S, Hirai T, Sakai H, Date H, Tamari M, Mishima M. A NOD2 gene polymorphism is associated with the prevalence and severity of chronic obstructive pulmonary disease in a Japanese population. *Respirology*. 2012;17:164-171.

Hirota T, Saeki H, Tomita K, Tanaka S, Ebe K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Ezaki H, Takeuchi S, Furue M, Kamatani N, Nakamura Y, Kubo M, Tamari M. Variants of C-C motif Chemokine 22 (CCL22) are associated with susceptibility to Atopic Dermatitis: Case-Control Studies. *PLoS One* 2011;6:e26987.

Chang WC, Lee CH, Hirota T, Wang LF, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Ebe K, Saeki H, Takeuchi S, Furue M, Chen WC, Chiu YC, Chang WP, Hong CH, His E, Hank Juo SH, Yu HS, Nakamura Y, Tamari M. ORAI1 genetic polymorphisms associated with the susceptibility of atopic dermatitis in Japanese and Taiwanese populations. *PLoS One* 2012;7:e29387.

Himes BE, Jiang X, Hu R, Wu AC, Lasky-Su JA, Klanderman BJ, Ziniti J, Senter-Sylvia J, Lima JJ, Irvin CG, Peters SP, Meyers DA, Bleecker ER, Kubo M, Tamari M, Nakamura Y, Szeffler SJ, Lemanske RF Jr, Zeiger RS, Strunk RC, Martinez FD, Hanrahan JP, Koppelman GH, Postma DS, Nieuwenhuis MA, Vonk JM, Panettieri RA Jr, Markezich A, Israel E, Carey VJ, Tantisira KG, Litonjua AA, Lu Q, Weiss ST. Genome-wide association analysis in asthma subjects identifies SPATS2L as a novel bronchodilator response gene. *PLoS Genet*. 2012 ;8:e1002824.

Yamaide F, Undarmaa S, Mashimo Y, Shimojo N, Arima T, Morita Y, Hirota T, Fujita K, Miyatake A, Doi S, Sato K, Suzuki S, Nishimuta T, Watanabe H, Hoshioka A, Tomiita M, Yamaide A, Watanabe M, Okamoto Y, Kohno Y, Tamari M, Hata A, Suzuki Y. Association Study of Matrix Metalloproteinase-12 Gene Polymorphisms and Asthma in a Japanese Population. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;160:287-296.

Kumasaka N, Aoki M, Okada Y, Takahashi A, Ozaki K, Murohara T, Hirota T, Tamari M, Tanaka T, Nakamura Y, Kamatani N, Kubo M. Haplotypes with Copy Number

and Single Nucleotide Polymorphisms in CYP2A6 Locus Are Associated with Smoking Quantity in a Japanese Population. *PLoS One*. 2012;7:e44507.

Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Tanaka S, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Noguchi E, Sakamoto T, Hizawa N, Ebe K, Saeki H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M. Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet*. 2012;44:1222-1226.

Tomita K, Sakashita M, Hirota T, Tanaka S, Masuyama K, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Hizawa N, Kubo M, Nakamura Y, Tamari M. Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. *Allergy*. 2013;68:92-100.

Iijima H, Kaneko Y, Yamada H, Yatagai Y, Masuko H, Sakamoto T, Naito T, Hirota T, Tamari M, Konno S, Nishimura M, Noguchi E, Hizawa N. A distinct sensitization pattern associated with asthma and the thymic stromal lymphopoietin genotype. *Allergol Int*. 2013 in press.

田中翔太, 富田かおり, 広田朝光, 玉利真由美: 特集, 呼吸器病学 TOPICS 2012 2. アレルギー・免疫・炎症. 呼吸器疾患と自然免疫, 16:34-36, 2012.

広田朝光, 富田かおり, 田中翔太, 玉利真由美: 遺伝・ゲノム学 日本人成人気管支喘息のゲノムワイド関連解析. 医学のあゆみ, 240:535-537, 2012.

玉利真由美, 広田朝光: 遺伝子解析から考えるアレルギー疾患の治療戦略—アレルギー疾患は克服できるか? . 日本医事新報, 4592:81-85, 2012.

広田朝光, 田中翔太, 玉利真由美: 解説(基礎) GWASによる疾患遺伝子の解明. 呼吸, 31(7):605-611, 2012.

玉利真由美, 田中翔太, 広田朝光: 特集 多遺伝子疾患 呼吸器疾患のゲノムワイド関連解析. *BioClinica*, 27(11):1044-1048, 2012.

### 2. 学会発表

アレルギー疾患のゲノムワイド関連解析. 第85回日本薬理学会年会, シンポジウム, アレルギー疾患の分子機構の新展開, 2012, 京都. 玉利真由美