

図7. 両側 ETS 後に左右差が見られた例の背部.

ETS 前 右側 ETS 後 両側 ETS 後

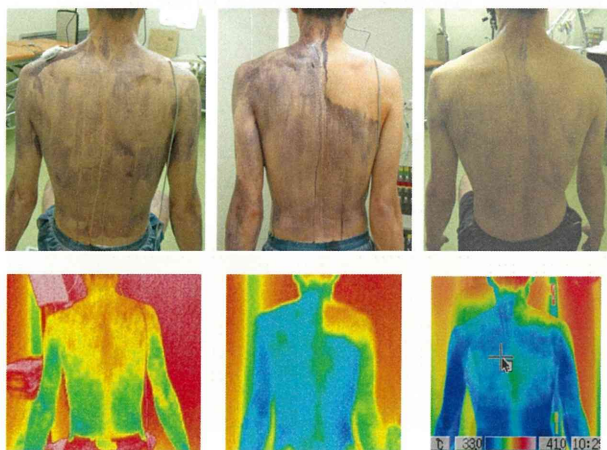
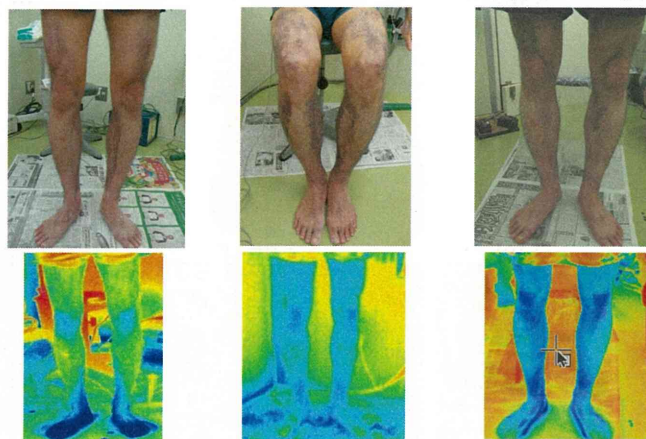


図8. 同

ETS 前 右側 ETS 後 両側 ETS 後



掌蹠多汗症の患者における発汗変化量と脳血流変化量の相関解析

研究分担者 水澤英洋 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学 教授

研究協力者 三條伸夫 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学 講師

研究協力者 藤本智子 多摩南部地域病院皮膚科 医長

研究協力者 横関博雄 東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野 教授

研究要旨 掌蹠多汗症患者と健常人において、ストレス負荷時の手掌の発汗変化量と Single Photon Emission Computed Tomography(SPECT)による前頭葉脳血流変化量を測定し、両者の相関性について単回帰解析を行った。両者の間には相関性が認められ、多汗症患者では健常人より寄与率が高く、ストレス負荷時の血流が増加していた。多汗症患者において、ストレス負荷時における前頭葉の活動性と交感神経系の関連性の強さや、前頭葉の機能亢進などが病態に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

掌蹠多汗症の病理メカニズムには、中枢神経系の関与が強いことが推測されているが、発汗や交感神経活動と大脳皮質の活動性との関連性を調べた報告はほとんどない。2009年の本研究報告書において、田中らは掌蹠多汗症患者と健常人の脳血流変化を脳血流シンチ(SPECT)にて測定し、比較解析をおこなったところ、安静時、および暗算によるストレス負荷時において多汗症患者群の前頭葉で、健常人患者群と比較して脳血流が増加していることを報告した。しかし、多汗症患者群において、ストレス負荷時には発汗量や脳血流量が増加しているものの、どちらの変化量にも統計学的有意差を認めなかった。その原因として、各個人の発汗量、および脳血流変化量のばらつきが大きく、統計学的有意差が得られなかった可能性があると考えられた。そこで、今回我々は、掌蹠多汗症患者の発汗変化量と脳血流変化量を各個人のデータで算出し、変化量間に相関関係があるかどうかを統計学的に解析した。

B. 研究方法

東京医科歯科大学皮膚科発汗異常外来を受診

し、掌蹠多汗症重症例と診断した患者7人（男2人、女5人、平均年齢17.3歳、右利き）と正常コントロール3人（女3人、平均年齢33.0歳、右利き）に対し、安静時と暗算によるストレス負荷を別々の日に行い、手掌の発汗量と、SPECTによる脳血流を測定した。各個人のデータより、ストレス負荷時のデータと安静時のデータの差（「負荷後」－「付加前」）を計算し、各変化量間における単回帰解析を行った。

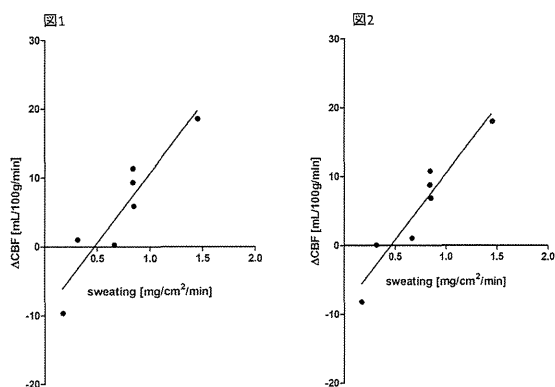
（倫理面への配慮）

被験者には本研究の主旨を説明したうえで同意を得た。本研究は東京医科歯科大学医学部倫理委員会の承認を得て倫理的配慮のもとに行った。

C. 研究結果

多汗症患者において、手掌の発汗変化量と脳血流変化量間の単回帰解析を行ったところ、右前頭葉で寄与率(決定係数)0.84、 p 値 <0.001 であり(図1)、左前頭葉で寄与率(決定係数)0.88、 p 値 <0.001 (図2)と強い相関が認められた。一方、健常人では右前頭葉で寄与率(決定係数)0.62、 p 値 <0.001 、左前頭葉で寄与率(決定係数)0.62、 p 値 <0.001 と中等度の相関関係が認められた。また、

多汗症患者において、ほとんどの患者でストレス負荷時の血流が増加していたのに対し、健常人ではストレス負荷時に血流が低下していた。



D. 考察

近年、情動変化(emotional change)時における交感神経系を介した発汗亢進と functional MRI による脳機能との関連性を解析した結果より、発汗亢進時の大脳皮質活動亢進部位として扁桃核、橋背外側、視床、側坐核、上脳皮質が、活動低下部位として眼窩回、前頭前野、楔前部などが関連していることが報告され[1]、交感神経系を介した発汗には大脳の複数の領域が興奮性、あるいは抑制性に関与することが推測されている。2009 年度の本報告書において、多汗症患者では健常者に比べて前頭葉の脳血流が増加していることが確認され、今回の解析ではそれらの患者において発汗変化量と前頭葉の脳血流変化量は相関することが確認された。同様の現象は健常人でも認められていたが、多汗症患者では発汗変化量に対する脳血流変化量の寄与率が高く、多汗症患者の血流増加の背景には、ストレス負荷時に前頭葉領域における活動変化に対する交感神経系の興奮性との関連性が健常人と比較して強固である可能性が示唆された。

ストレス負荷時の脳血流変化量が、多くの健常人で低下していたことは、Henderson らの報告[1]において、情動変化時に発汗亢進状態で前頭葉の活動が低下していた現象に一致している。多くの多汗症患者でストレス負荷時に発汗量変化が亢進していた点に関しては、これまでに報告がなく、

多汗症患者において前頭葉活動の相対的亢進が交感神経系を介した発汗亢進に影響している可能性が示唆された。

本解析は多汗症患者、健常人共に少人数での解析であり、被験者を増やした解析による確認が不可欠である。

E. 結論

ストレス負荷時の発汗変化量と脳血流変化量には相関が認められ、多汗症患者では両者の相関性が強いことと、脳血流量が増加することが交感神経系の興奮を介して発汗異常を惹き起こしている可能性が示唆された。

[雑誌]

Henderson, LA, et al, Real-time imaging of cortical areas involved in the generation of increases in skin sympathetic nerve activity when viewing emotionally charged images. *NeuroImage* 62, 30-40, 2012

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (2012/4/1～2013/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Zen Kobayashi, Miho Akaza, Yoshiyuki Numasawa, Shoichiro Ishihara, Hiroyuki Tomimitsu, Kazuo Nakamichi, Masayuki Saijo, Tomohiro Morio, Norio Shimizu, Nobuo Sanjo, Shuzo Shintani, Hidehiro Mizusawa. Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection. *Journal of the Neurological Sciences* (in press)
- 2) 三條伸夫、水澤英洋. 臨床講座 アルツハイマー病. *Pharma Tribune* 2012; 4: 19-29.

2. 学会発表

- 1) Nobuo Sanjo, Maya Ohara, Katsuya Satoh, Tsuyoshi Hamaguchi, Yosikazu Nakamura,

- Tetsuyuki Kitamoto, Masahito Yamada, Hidehiro Mizusawa. Cerebrospinal fluid findings in genetic prion disease in Japan and their association with clinical features. Prion 2012, Amsterdam, Netherland, 2012 May 9-12
- 2) Kenji Sakai, Tsuyoshi Hamaguchi, Moeko Noguchi-Shinohara, Ichiro Nozaki, Takeshi Sato, Ichiro Takumi, Nobuo Sanjo, Yoshikazu Nakamura, Tetsuyuki Kitamoto, Nobuhito Saito, Hidehiro Mizusawa, Masahito Yamada. Prion protein propagation in dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease. Prion 2012, Amsterdam, Netherland, 2012 May 9-12
- 3) 三條伸夫、テムチナ、堀匠、水澤英洋. 全長型 presenilin 1 の小胞体膜上における dual functions. 第 53 回日本神経学会学術集会、東京、2012 年 5 月 24 日
- 4) 古木 美紗子、三條 伸夫、石川 欽也、横田 隆徳、水澤 英洋. 肥厚性硬膜炎 5 症例の臨床的検討. 第 53 回日本神経学会学術集会、東京、2012 年 5 月 23 日
- 5) 尾崎心、三條伸夫、石川欽也、池田篤平、服部高明、加藤 剛、横田隆徳、大川淳、山田正仁、水澤英洋. 表層シデローシス (superficial siderosis) に対する治療法の検討. 第 53 回日本神経学会学術集会、東京、2012 年 5 月 23 日
- 6) 堀匠、三條伸夫、水澤英洋. 日本人の軽度認知機能障害患者における視覚性再生検査の特徴. 第 53 回日本神経学会学術集会、東京、2012 年 5 月 23 日
- 7) 能勢裕里江、三條伸夫、小林大輔、古木美紗子、阿部圭輔、石橋哲、関口輝彦、大久保卓哉、横田隆徳、大野喜久郎、江石義信、水澤英洋. Tumefactive MS における病理所見を基にした画像所見上の特徴. 第 53 回日本神経学会学術集会、東京、2012 年 5 月 24 日
- 8) 馬嶋貴正、三條伸夫、横田徳隆、水澤英洋. 若年発症の多発性硬化症 5 例の脳委縮と神経心理検査の関連. 第 53 回日本神経学会学術集会、東京、2012 年 5 月 24 日
- 9) Temuqina, Nobuo Sanjo, Takumi Hori, Paul E. Fraser, Hidehiro Mizusawa. Pattern of Amyloid β Production by Mouse Embryonic Fibroblasts Overexpressing PSEN1 with I143T Mutation. Alzheimer's Association International Conference 2012, Vancouver, Canada, Jul 14-19
- 10) 三條伸夫、テムチナ、日熊麻耶、Paul Fraser、水澤英洋. An effect of PSEN1 with I143T mutation on amyloid beta production. 第 31 回日本認知症学会総会、筑波、10 月 27 日 (26-28), 2012 年
- 11) 赤座実穂、沼沢祥行、小林禪、石原正一郎、富満弘之、新谷周三、三條伸夫、水澤英洋. mefloquine 治療を試みるも無効であった進行性多巣性白質脳症の 1 例. 第 17 回日本神経感染症学会総会学術集会. 京都, 10 月 19 日, 2012 年
- 12) 三浦富之、大久保卓哉、一條真彦、三條伸夫、横田隆徳、水澤英洋. 健常成人に発症したヒトヘルペスウイルス 7 神経根脊髄炎の 1 例. 第 17 回日本神経感染症学会総会学術集会. 京都, 10 月 19 日, 2012 年
- 13) 岩澤絵梨, 大久保卓哉, 叶内匡, 富満弘之, 三條伸夫, 横田隆徳, 水澤英洋. uromitexan 膀胱灌流併用 cyclophosphamide 大量静注療法で長期寛解中の多巣性運動ニューロパチーの重症例. 第 30 回 日本神経治療学会総会. 北九州, 11 月 29 日, 2012 年
- 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

皮膚・汗腺におけるアクアポリン蛋白発現と制御解析

分担研究者 佐々木 成 東京医科歯科大学大学院腎臓内科学分野 教授
研究協力者 内田 信一 東京医科歯科大学大学院腎臓内科学分野 准教授
井上梨紗子 東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野 大学院生

研究要旨 アクアポリン(以下 AQP)は水を選択的に通す膜蛋白で、浸透圧勾配により 1 秒間に億を超える水分子が通過するが、これはアクアポリンを持たない脂質 2 重膜の 100 倍程度の水透過能となる。よって AQP は、素早い水の透過を必要とする細胞、上皮、および臓器で活躍している可能性があり、実際腎臓での水の出納調節は集合尿細管における AQP2 が担っており、その異常は腎性尿崩症を引き起こす。過去の報告書において、我々は、(1) ヒト皮膚汗腺における AQP5 の詳細な局在を示し、(2) マウス汗腺において、発汗時と発汗乏時における AQP5 に局在差があることを示し、(3) 極性をもたせることができる MDCK (Madin-Darby canine kidney) cell line を用いて AQP5 を安定発現させ、Ca²⁺刺激で cytoplasm から apical に細胞内移動することを示した。今回はこれらのデータを補完するデータを示す。発汗時 AQP5 は汗腺分泌部において、細胞質から管腔膜に trafficking (移動) することを通して原汗産生に重要な役割を果たしていると考えられる。AQP5 は発汗調節薬の標的として有望な候補と考える。

(1) マウス paw 汗腺の AQP5 の細胞内局在

A. 研究目的

過去の研究報告書で、マウス paw 汗腺の免疫蛍光染色を用いて AQP5 が発汗刺激により non-apical 領域から apical 膜に一部 trafficking することを示した。乏汗時でも発汗時でもマウス paw 汗腺における AQP5 の局在は、ヒトの汗腺の AQP5 の局在とは異なっているように見えた。そこで AQP5 の細胞内局在について検討した。

B. 研究方法

発汗乏時マウス paw を採取し、パラフィン組織標本を作成。AQP5 と basolateral marker である Na⁺/K⁺ATPase の抗体を用いて二重染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

Basolateral marker である Na⁺/K⁺ATPase (図1 緑) は、マウス汗腺分泌部コイル断面の基底膜側から

細胞境界部領域にスリガラス様に、一部 dot 状にみとめた。Merge 像では、AQP5 とほぼ重なっていた。その辺縁核側/内腔側でわずかに AQP5 単独の領域も存在するように思われた。

D. 考察

ヒトだけでなく、マウス汗腺においても、基底膜は鋸歯状に入り組んでおり (Kurosumi K et al. *Arch Histol Jpn.* 31(3):455-75, 1970)、basolateral 膜に局在する分子を免疫染色した場合、一見細胞質が染色されたのかと思われるようなスリガラス様の領域をみとめる。今回我々が得た Na⁺/K⁺ATPase の結果は、basolateral に局在する NKCC1 の免疫染色の報告 (Nejsum LN et al. *Am J Physiol Cell Physiol.* 289(2):C333-40, 2005) における figure と類似していた。

Merge 像を観察すると、AQP5 は apical 膜に主に局在するが、basolateral にも、basolateral よりやや内腔側すなわち細胞質と考えられる領域にも局在して

いた。核 (図1では類円形に抜けている領域)が大きく、basolateral膜が鋸歯状に細胞質側に入り組んでいるため、細胞質、特に核より基底膜側の細胞質は乏しいと考えられた。

この結果を踏まえて、過去の研究報告書で報告した、発汗時マウスpaw汗腺のAQP5免疫染色のfigureで、わずかにnon-apical領域にみとめた淡いAQP5染色は、basolateral膜におけるAQP5を反映していると考えた。

(2) ヒトAQP5蛋白の細胞内trafficking (細胞免疫染色)

A.研究目的

過去の報告書で、ヒトAQP5蛋白を発現させたMDCK cell line安定株において、Calcium ionophore添加5分後にapical membrane fractionのAQP5蛋白量が2.1倍に増加し、30分後にcontrolと同じレベルになったことを、biotinylation assayを用いて示した。これを細胞免疫染色法でも確認した。

B.研究方法

同細胞を培養し、薬剤を希釈した培養液で置換し (最終濃度10 μM M calcium ionophore A23187)、0分後、5分後、30分後にすみやかに4% パラフォルムアルデヒドで固定、triton X-100処理後、1% BSAでblocking、AQP5抗体とDAPIで免疫染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

C.研究結果

Apical membraneレベルの断面 (図2, 上段)と核レベルの断面 (図2, 下段)を示す。5分後、apical membraneレベルにおけるAQP5量が増加し、30分後は0分時の状態に戻った。

D.考察

細胞免疫染色法を用いた検討でも、biotinylation assayで得られた結果と矛盾ない結果、細胞内カルシウム濃度上昇で、apical membraneへヒトAQP5がtraffickingすることが示された。

(3) ヒトAQP5蛋白の細胞内trafficking (thapsigargin)

A.研究目的

Calcium ionophoreとは異なる細胞内Ca²⁺濃度上昇作用のある薬剤でも、Calcium ionophoreと同じ結果が得られるかを検証した。

B.研究方法

前述の細胞を培養し、薬剤を希釈した培養液で置換し (最終濃度20 μM M thapsigargin)、5分後、30分後にapical およびbasolateral membrane fractionをbiotinylationにより分画し、AQP5量の変化をWestern blot法で確認した。

C.研究結果

Thapsigargin 添加 5 分後に apical membrane fraction の AQP5 量は増加し、30 分後 control と同じレベルになった。Basolateral membrane fraction の AQP5 量は 5 分後も 30 分後も変化はなかった。

D.考察

細胞内 Ca²⁺濃度上昇により、短時間でヒトAQP5 は細胞質から apical membrane に trafficking することが thapsigargin を用いても示された。ヒト発汗時に AQP5 は細胞質から apical 膜へに trafficking し、その機能を果たす——水透過性を高めると推測される。

E. 結論

発汗時 AQP5 は、汗腺分泌部において、細胞内Ca²⁺濃度上昇により細胞質から管腔膜にtrafficking (移動)することを通して apical 膜の水透過性を亢進させ、原汗産生に重要な役割を果たしていると考えられる。今回の検討ではこれを補足する結果を得た。AQP5 は発汗調節薬の標的として有望な候補と考える。

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A minor role of WNK3 in regulating phosphorylation of renal NKCC2 and NCC co-transporters in vivo. Oi K, Sohara E, Rai T, Misawa M, Chiga M, Alessi DR, Sasaki S, Uchida S. *Biol Open*. 2012 Feb 15;1(2):120-7.
- 2) Type II diabetes mellitus is a risk factor for heart failure in pre-dialysis patients. Kuwahara M, Ishigami J, Shikuma S, Akita W, Mori Y, Asai T, Tsukamoto Y, Adachi S, Noda Y, Rai T, Uchida S, Sasaki S. *Ther Apher Dial*. 2012 Dec;16(6):541-7.
- 3) Hereditary nephrogenic diabetes insipidus in Japanese patients: analysis of 78 families and report of 22 new mutations in AVPR2 and AQP2. Sasaki S, Chiga M, Kikuchi E, Rai T, Uchida S. *Clin Exp Nephrol*. 2012 Nov 14.
- 4) WNK-OSR1/SPAK-NCC signal cascade has circadian rhythm dependent on aldosterone. Susa K, Sohara E, Isobe K, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Nov 2;427(4):743-7.
- 5) Does a β 2-adrenergic receptor-WNK4-Na-Cl co-transporter signal cascade exist in the in vivo kidney? Uchida S, Chiga M, Sohara E, Rai T, Sasaki S. *Nat Med*. 2012 Sep;18(9):1324-5; author reply 1325-7.
- 6) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway activates the WNK-OSR1/SPAK-NCC phosphorylation cascade in hyperinsulinemic db/db mice. Nishida H, Sohara E, Nomura N, Chiga M, Alessi DR, Rai T, Sasaki S, Uchida S. *Hypertension*. 2012 Oct;60(4):981-90.
- 7) Accumulation of autofluorescent storage material in brain is accelerated by ischemia in chloride channel 3 gene-deficient mice. Ohtaki H, Ohara K, Song D, Miyamoto K, Tsumuraya T, Yofu S, Dohi K, Tanabe S, Sasaki S, Uchida S, Matsunaga M, Shioda S. *J Neurosci Res*. 2012 Nov;90(11):2163-72.
- 8) Phosphorylation of Na-Cl cotransporter by OSR1 and SPAK kinases regulates its ubiquitination. Hossain Khan MZ, Sohara E, Ohta A, Chiga M, Inoue Y, Isobe K, Wakabayashi M, Oi K, Rai T, Sasaki S, Uchida S. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Aug 24;425(2):456-61.
- 9) Effect of heterozygous deletion of WNK1 on the WNK-OSR1/ SPAK-NCC/NKCC1/NKCC2 signal cascade in the kidney and blood vessels. Susa K, Kita S, Iwamoto T, Yang SS, Lin SH, Ohta A, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Alessi DR, Uchida S. *Clin Exp Nephrol*. 2012 Aug;16(4):530-8.
- 10) Severe hyperparathyroidism in a pre-dialysis chronic kidney disease patient treated with a very low protein diet. Ohta E, Akazawa M, Noda Y, Mandai S, Naito S, Ohta A, Sohara E, Okado T, Rai T, Uchida S, Sasaki S. *J Bone Miner Metab*. 2012 Mar;30(2):238-42.

2. 学会発表

- 1) Hereditary Nephrogenic Diabetes Insipidus in Japanese Patients: Analysis of 73 Families Sei Sasaki, Motoko Chiga, Eriko Kikuchi, Shinichi Uchida. (ASN Kidney Week 2012. 11, Poster)
- 2) SPAK Deficiency Corrects WNK4 Mutation-Causing Pseudohypoaldosteronism II Pei-yi Chu, Sung-Sen Yang, Shinichi Uchida, Sei Sasaki, Shih-Hua P. Lin. (ASN Kidney Week 2012. 11, Poster)
- 3) Chemical Library Screening for Direct SPAK Inhibitors by a Newly Developed ELISA System Eriko Kikuchi, Takayasu Mori, Kiyoshi Isobe, Eisei Sohara, Tatemitsu Rai, Sei Sasaki, Shinichi Uchida. (ASN Kidney Week 2012. 11, Poster)
- 4) Development of Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Measurement of Urinary Total and Phosphorylated Na-Cl Cotransporter Protein Kiyoshi Isobe, Eisei Sohara, Tatemitsu Rai, Sei Sasaki, Shinichi Uchida. (ASN Kidney Week 2012. 11, Poster)

- 5) Wnk4 Deficient Mice Manifest Gitelman's Syndrome-Like Phenotype Sung-Sen Yang, Shinichi Uchida, Sei Sasaki, Shih-Hua P. Lin. (ASN Kidney Week 2012. 11, Poster)
- 6) Dietary Salt Intake and Angiotensin II Regulates WNK-SPAK-NKCC1 Phosphorylation Cascade in Mouse Aorta Moko Zeniya, Eisei Sohara, Katsuyuki Oi, Motoko Chiga, Koichiro Susa, Takayasu Mori, Tatemitsu Rai, Sei Sasaki, Shinichi Uchida. (ASN Kidney Week 2012. 11, Poster)
- 7) Phosphorylation of Na-Cl Cotransporter by OSR1 and SPAK Kinases Regulates Its Ubiquitination Muhammad Zakir Hossain Khan, Eisei Sohara, Tatemitsu Rai, Sei Sasaki, Shinichi Uchida. (ASN Kidney Week 2012. 11, Poster)
- 8) Generation and Analysis of WT-WNK4 Transgenic Mice Reveal the Physiological Role of WNK4 Takayasu Mori, Eisei Sohara, Tatemitsu Rai, Sei Sasaki, Shinichi Uchida. (ASN Kidney Week 2012. 11, Poster)
- 9) WNK4-OSR1/SPAK-NCC Signal Cascade Has Circadian Rhythm Dependent on Aldosterone Koichiro Susa, Eisei Sohara, Kiyoshi Isobe, Motoko Chiga, Tatemitsu Rai, Sei Sasaki, Shinichi Uchida. (ASN Kidney Week 2012. 11, Poster)
- 10) Impaired Trafficking of Polycystin-1 May Be a Key Mechanism of Cyst Formation in the Aquaporin-11 Knockout Mouse Yuichi Inoue, Eisei Sohara, Katsuki Kobayashi, Tatemitsu Rai, Kenichi Ishibashi, Sei Sasaki, Shinichi Uchida. (ASN Kidney Week 2012. 11, Poster)
- H.知的財産権の出願・登録状況；該当なし

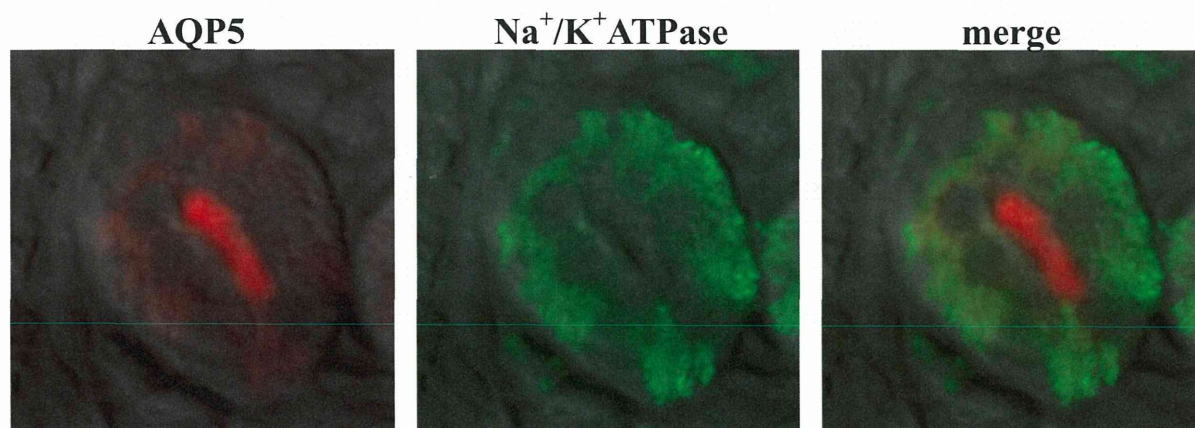


図 1: 発汗乏時マウス paw 汗腺における AQP5 の細胞内局在
AQP5(赤)、Na⁺/K⁺ATPase(緑)

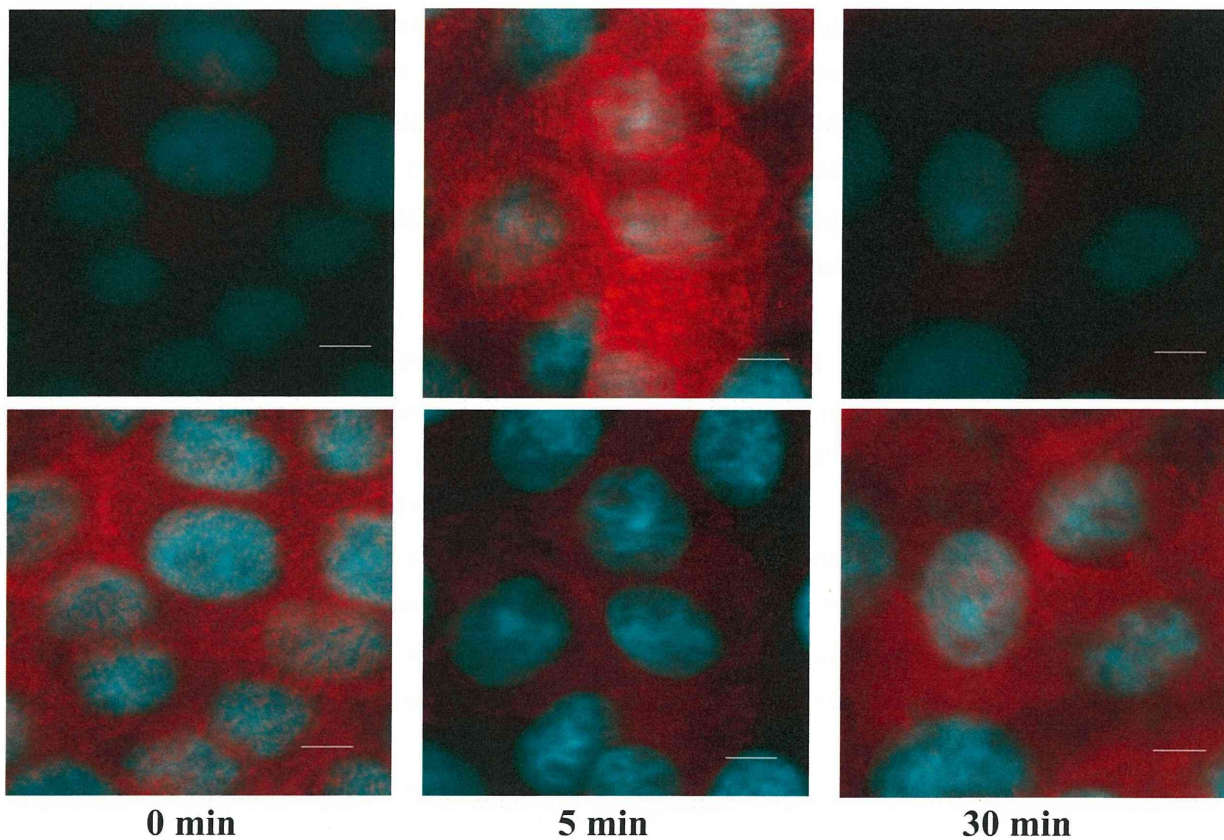


図 2: ヒト AQP5 蛋白の細胞内 trafficking 細胞免疫染色 AQP5(赤)、DAPI(青)

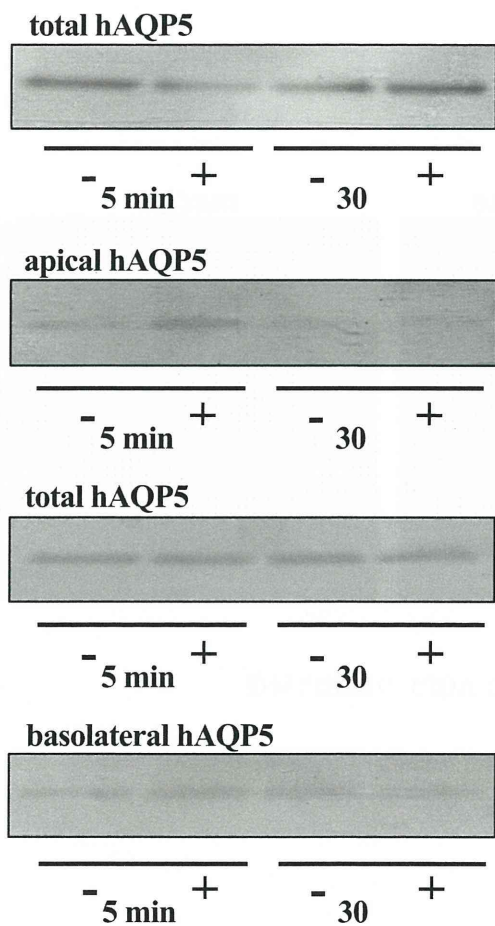


図 3: 20 μ M thapsigargin を添加し biotinylation 施行
5 分後、30 分後の apical および basolateral membrane fraction

遺伝性発汗異常症の遺伝子変異解析

研究分担者 中野 創 弘前大学大学院医学研究科皮膚科学講座 准教授

研究要旨 原発性局所多汗症（PPH）は基礎疾患なしに、手、足、腋窩、顔などの局所発汗過剰を認める疾患である。本症の一部は遺伝性であることが分かっているが、原因遺伝子は未だに同定されていない。発汗に関与するタンパク分子が全て原因として候補になりえると考えられる。今回の研究では、原因遺伝子の同定を目的として、家族性の発症が明らかな家系例を 15 家系収集した。そのうち 13 家系は優性遺伝性、2 家系は劣性遺伝性と考えられた。現在、11 家系についてエクソーム解析を行い、原因遺伝子の同定を進めている。また、発汗異常を示す遺伝性疾患である無汗性外胚葉形成異常症、先天性無痛無汗症および遺伝性掌蹠角化症の遺伝子変異検索を行い、おのこの原因遺伝子に変異を同定した。遺伝性発汗異常症の遺伝子変異を分析し、その変異が発汗関連タンパク分子にどのような影響を与えているかを解析することによって、発汗異常のより詳細なメカニズムが明らかになり、今後の根本的治療実現への戦略上、極めて有力な情報が得られると思われる。

A. 研究目的

原発性局所多汗症（PPH）は基礎疾患がないものの、手、足、腋窩、顔などの局所発汗過剰を認める原因不明の疾患である。症例の 40%前後で家族性の発症が認められ、家系分析からは常染色体優性遺伝性疾患であると考えられている。近年、本邦において複数の家系から得られたゲノム DNA を用いて連鎖解析を行った結果、一部の家系では原因遺伝子座が第 14 番染色体の q11.2-q13 に局在していることが判明したが、原因遺伝子そのものは未だに明らかにされていない。発汗に関与する全てのタンパク分子が、その機能低下あるいは亢進を来すことによって、原因として候補になりえると考えられる。一方、発汗を調整する最も重要な組織であるエクリン汗腺において、アクアポリン 5（AQP-5）が水分子の輸送に必須の役割を担っていることが最近明らかになり、PPH の原因遺伝子として有力な候補になると推測された。そこで昨年度、孤発例と考えられる PPH において、AQP-5 遺伝子変異検索を行ったが、変異は同定されなかった。今年度は、原因遺伝子同定のために

PPH 家系を収集し、エクソーム解析を行うとともに、発汗異常を示す遺伝性疾患の遺伝子変異検索を行い、発汗に関与する遺伝子にどのような変化が生じているのかを解析した。

B. 研究方法

PPH 家系例収集においては田中らの原発性局所多汗症診療ガイドラインに従い症例を選択した。遺伝性が明らかな 15 家系のうち、11 家系を選択し、発症者 18 人と健常者 2 人の末梢血白血球由来ゲノム DNA を用いてエクソーム解析を行う。遺伝性発汗異常症である無/低汗性外胚葉形成異常症（A/HED）、先天性無痛無汗症（CIPA）、Dyskeratosis congenita（DC）、Papillon-Lefevre 症候群（PLS）および Richiner-Hanhard 症候群（RHS）の家系例については、それぞれ発端者及びその家族から末梢血白血球由来 DNA を採取し、原因遺伝子のタンパク質コード領域とその近傍の塩基配列を決定した。症例の遺伝学的解析にあたって、倫理面ではヘルシンキ宣言、政府および関連学会が制定した遺伝子解析研究に関するガイドライン

等を順守した。また、研究実施施設における倫理委員会の承認も得た。

C. 結果

1) PPH 家系例を 17 家系収集した (愛知医科大学皮膚科、弘前大学皮膚科症例)。そのうち 15 家系が家族歴を有し、そのうち 13 家系は優性遺伝性、2 家系は劣性遺伝性と考えられた。

2) 日本人 A/HED1 家系例 (大阪大学皮膚科症例) について、原因遺伝子であることが明らかになっている *EDARADD* 遺伝子の配列を調べたところ、新規の 1 塩基挿入変異を同定した。さらに別の日本人 A/HED 家系 1 例 (大分大学小児科症例) について *EDA* 遺伝子の配列を決定したところ、発端者とその母にナンセンス変異を同定した。

3) CIPA の日本人 1 家系例について、原因遺伝子として同定されている *NTRK1* 遺伝子の配列を調べたところ、スプライシング異常を来たす変異 1 つと早期停止コドンを生じる 1 塩基欠失変異 1 つを同定した。

D. 考察

今回収集した PPH の 17 家系は、うち 15 家系が遺伝性と考えられ、従来の報告よりも多い。これまでの本症の原因遺伝子検索において、唯一遺伝子座が明らかにされた報告によると、本疾患 11 家系中 3 家系にのみ原因遺伝子座が第 14 番染色体 q11.2-q13 に局在されたが、最近の報告によるとその他の遺伝性発汗異常症、ADE、CIPA、PLS および RHS の家系例についてそれぞれ、*EDA1* 遺伝子および *NTRK1* 遺伝子に変異を同定した。*EDA* 遺伝子は X 染色体上に位置するため、大部分は男子に発症するが、同じ変異を有する母親の眉毛と睫毛が低形成であり、部分的に発症している点が特徴的である。

E. 結論

PPH は遺伝的に不均一な疾患であると考えられ、原因遺伝子を同定するためには家系をできるだけ数多く収集する必要がある。また、遺伝性発汗異

常症は非常にまれなものが多く、必ずしも臨床症状のみで確定診断を得られないことがしばしば経験される。そのため遺伝子変異検索を行って、診断を確定することが重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sayyahfar S, Chavoshzadeh Z, Khaledi M, Madadi F, Yeganeh M, Sawamura D, Nakano H, Rezaei N. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis mimicking palmoplantarkeratoderma. *Pediatr Dermatol*, 2012 [Epub ahead of print].

2) 中野創. 皮膚科セミナリウム 1. 遺伝子診断と皮膚疾患. 日皮会誌 122 巻 8 号 p2057-63, 2012.

2. 学会発表

1) 滝吉典子、松崎康司、赤坂英二郎、中野創、澤村大輔. TAT 遺伝子変異を同定した Richner-Hanhart 症候群の一例. 第 75 回日本皮膚科学会東京支部学術大会. 2012 年 2 月 18 日、東京.

2) 松浦大輔、落合豊子、中野創、澤村大輔、楡井和重、森山光彦. 遺伝子検査で最終診断した Papillon-Lefèvre 症候群. 第 75 回日本皮膚科学会東京支部学術大会. 2012 年 2 月 18 日、東京.

3) Takiyoshi N, Matsuura D, Umekoji A, Furuichi M, Shimizu T, Fukui T, Nakano H, Sawamura D, Ochiai T. Papillon-Lefèvre syndrome; total loss of cathepsin C activity may be required for disease expression. The 42nd Annual European society for Dermatological Research Meeting, Venice, Italy. 19-22 September, 2012.

4) Takiyoshi N, Matsuura D, Umekoji A, Kato A, Furuichi M, Shimizu T, Fukui T, Mitsuhashi Y, Nakano H, Sawamura D, Ochiai T. Papillon-Lefèvre syndrome; five novel mutations of CTSC and functional analyses of a single nucleotide polymorphism. The 37th Annual

Japanese society for Dermatological Research Meeting, Naha, Japan. 7-9 December, 2012.

3. 著書

- 1) Nakano H, Nakajima K. Papillon-Lefèvre syndrome. In: The color atlas of disorders of keratinization, 2nd ed. (ed. By Ogawa H et al.), p113-4, Kyowa Kikaku, LTD, Tokyo, 2012.
- 2) Nakano H, Umegaki N, Tamai K. Vörner type palmoplantarkeratoderma. In: The Color Atlas of Disorders of Keratinization, 2nd ed. (ed. By Ogawa H et al.), p108-9, Kyowa Kikaku, LTD, Tokyo, 2012.

G. 知的財産の出願・登録状況

なし。

原発性手掌多汗症に対する二重盲検下での塩化アルミニウム外用剤の有効性の検討の報告

研究分担者 藤本智子 多摩南部地域病院皮膚科 医長

研究代表者 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 教授

研究要旨 原発性手掌多汗症の中等症から重症(発汗量 $\geq 0.5\text{mg}/\text{cm}^2/\text{min}$)の患者 90 例を対象に、20%塩化アルミニウム液・50%塩化アルミニウム液・プラセボの3群に無作為割付し、1日1~2回8週間の単純塗布を二重盲検下で行った。評価項目として発汗量・HDSS(Hyperhidrosis disease severity scale)・DLQI(Dermatology life quality index)を用い他覚的、自覚的な症状改善度を測定し治療経過中に診察と患者日誌を用いて副作用を集計した。結果、治療8週後の50%濃度群がプラセボ群と比較して統計学的に有意な($p < 0.05$)発汗量減少を認めた。HDSS, DLQIについては塩化アルミニウム液の外用群は2週間後から有意な($p < 0.001$)改善を認めたが、プラセボ群もHDSSでは4週間後から改善を認め($p < 0.05$)、DLQIでは2週間後から有意な改善を認めた($p < 0.01$)。以上の結果から原発性手掌多汗症に対する塩化アルミニウム液の外用療法の有効性を認めた。

A. 研究目的

原発性局所多汗症は手掌・足底・腋窩・顔面という限局した部位から両側性に過剰な発汗を認める疾患である。本邦における有病率は手掌で約5.3%、腋窩で約5.7%、足底で約2.7%であり、これは米国と比較し約2倍と高い傾向にある。また、発症年齢の平均は13~19歳の青年層であり社会的な活動範囲が広く生産性がある年代の罹患率が高いことが特徴と言える。治療の第1選択である塩化アルミニウム液は有効性が広く認められているが、ランダム化比較試験による検討はなく、この治療の有効性と安全性に関する証拠(エビデンス)を検証することを目的とした。

B. 研究方法

2011年8月から2012年1月に、東京医科歯科大学・愛知医科大学皮膚科の2施設に来院した原発性局所多汗症患者で、発汗量が $0.5\text{mg}/\text{cm}^2/\text{min}$ 以上かつ手掌発汗の重症度がHyperhidrosis Disease Severity Scale (HDSS 基準) (表1)において2(発汗は我慢できるが、日常生活に時々支障がある)以上と診断された15歳以上65歳未満の患者

で同意を得られたものを対象とした。

(研究デザイン)

ランダム化比較試験 (randomized control trial : RCT) とし、試験薬 (プラセボ, 20%塩化アルミニウム液, 50%塩化アルミニウム液) がそれぞれ1:2:2の比率になるように無作為に割付けた。有効性及び安全性の評価は二重盲検下で実施した。(被検部位・用法・容量・観察評価日)

両手掌を外用部位とし、両手を石けんあるいは洗浄剤で洗い乾燥させた後1日1~2回(朝食後及び就寝前)、左右の手掌に研究薬を1回1mL単純塗布とした。医師の診察と評価日を研究薬の投与開始日、投与後4週後、8週後とし患者の発汗量を測定した。また、被験者に患者日誌を渡し研究薬の外用状況の毎日記録を指示、研究終了後に日誌を回収し研究薬の投与開始日、投与開始2, 4, 6, 8週後に過去1週間におけるHDSS及びDLQIを評価した(表2)。

(安全性評価)

臨床検査項目・血中アルミニウム濃度:開始日、投与開始8週後(あるいは中止時)に、表4に示す血液生化学的検査、血液学的検査を実施した(表3)。

(有害事象) 臨床研究期間を通じて発現した有害事象の内容, 重症度 (3 段階にて評価), 発現日, 処置, 転帰 (経過, 転帰日) 及び研究薬との因果関係 (2 段階にて評価) を調査し検討した(表 4). (倫理面への配慮)

今回の検討は東京医科歯科大学治験等審査委員会(IRB)(平成 23 年度)と愛知医科大学医学部倫理委員会(11-014)の承認後、全ての患者に研究主旨を説明し書面で同意を得て行われた。

C. 研究結果

1) 登録患者 (表 5)

条件を満たした患者 90 例(男性 26 例, 女性 64 例, 平均年齢 27.3 ± 10.6 歳(16~65 歳))が本研究に登録した。各外用群の内訳は, 研究開始時プラセボ群(n=17), 20%塩化アルミニウム液群(n=36), 50%塩化アルミニウム液群(n=37)であったが, 4 週間後にはプラセボ群(n=15), 20%塩化アルミニウム液群(n=36), 50%塩化アルミニウム液群(n=36), 8 週間後にはプラセボ群(n=13), 20%塩化アルミニウム液群(n=36), 50%塩化アルミニウム液群(n=36)と, 途中 5 例が脱落しそのうち 4 例がプラセボ群であった。以下の結果は研究を終了した計 85 例のデータを使用した。

2) 有効性評価

① 発汗量

各群の開始時の発汗量に有意差は認めなかった(プラセボ群 1.084 ± 0.532 mg/cm²/min, 20%液剤群 1.268 ± 0.570 mg/cm²/min, 50%液剤群 1.155 ± 0.496 mg/cm²/min)。

a. 群内比較 :

治療 4 週後では 3 群とも有意差($p < 0.05$)をもって発汗量が低下した (プラセボ群 0.621 ± 0.471 mg/cm²/min , 20%群 0.528 ± 0.477 mg/cm²/min , 50%群 0.422 ± 0.383 mg/cm²/min)が, 8 週間後においては 20%と 50%液剤群両者においてのみ, 治療前と比較すると半分以下の発汗量の有意な低下を認めた(20%液剤群 0.549 ± 0.535 mg/cm²/min, 50%液剤群 0.378 ± 0.327

mg/cm²/min)。一方で 8 週間後のプラセボ群は治療前後での改善はみられなかった (0.822 ± 0.481 mg/cm²/min , $p = 0.204$)。 (図 1 左)

b. 群間比較 :

治療前後の発汗量の減少量の比較検討を加えた。4 週間後では 20%液剤群 (-0.740 ± 0.633 mg/cm²/min) > 50%液剤群 (-0.733 ± 0.564 mg/cm²/min) > プラセボ群 (-0.462 ± 0.385 mg/cm²/min) の順に減少がみられたが有意差は認められなかった。しかし, 8 週間後において 50%液剤群 (-0.803 ± 0.468 mg/cm²/min) > 20%液剤群 (-0.719 ± 0.776 mg/cm²/min) > プラセボ群 (-0.262 ± 0.702 mg/cm²/min) の順に減少がみられ, 50%液剤群とプラセボ群の間に $p < 0.05$ の有意差を持って治療効果がみられた。 (図 1 右)

c. 重症度別発汗量推移

発汗量が $0.5 \sim 1.0$ mg/cm²/min の中等症群と, 発汗量が 1.0 mg/cm²/min 以上の重症群で発汗量の治療効果を比較したところ, 治療後の発汗量は塩化アルミニウム外用群で有意な減少を認めた。 (図 2)

② HDSS

各群の開始時の HDSS に有意差は認めなかった(プラセボ群 2.86 ± 0.77 , 20%液剤群 2.81 ± 0.71 , 50%液剤群 2.77 ± 0.90)。

a. 群内比較 :

治療開始時から 2 週間以降で 20%液剤群と 50%液剤群に $p < 0.001$ の有意差をもって改善が継続してみられた。一方でプラセボ群では 4 週目以降で $p < 0.05$ の改善がみられた。 (図 3 左)

b. 群間比較

治療 2, 4 週間後に 50%液剤群とプラセボ群に $p < 0.05$ の有意差をもって改善があったが, 6 週間以降では各群に有意差はなかった。 (図 3 右)

③ DLQI

各群の開始時の DLQI に有意差は認めなかった (プラセボ群 8.31±5.30, 20%液剤群 8.83±4.50, 50%液剤群 8.75±5.51).

a. 群内比較 :

DLQI については, 20%, 50%液剤群は 2 週間以降で $p < 0.01$, 4 週間以降で $p < 0.001$ の有意差をもって改善がみられた. 一方でプラセボ群も 2 週間目で $p < 0.05$, 4 週間以降では $p < 0.01$ の有意差をもって改善がみられた (図 4 左).

b. 群間比較

各群における有意差は認められなかった (図 4 右).

④ 安全性

a. 血液検査, 血液生化学的検査 : 治療前と治療 8 週間後において有害事象は認めなかった.

b. 血中塩化アルミニウム濃度 (基準値 : 10 $\mu\text{g/l}$ 以下) : 治療前後ともに基準値を超える有害事象は認めなかった.

c. 局所副作用 : 外用部位に認められた症状として, 乾燥症状や皮膚のそう痒感, 過角化といった刺激皮膚炎の症状がみられた. その程度は軽症, 中等症に留まり, 日常生活を送れないほどの重症な副作用は認めなかった.

また塩化アルミニウム液群は濃度依存性に副作用がみられたが, プラセボ群にも 15.4% に軽症の皮膚炎がみられた. プラセボ群(なし : 84.6%, 軽症 : 15.4%, 中等症 : 0%), 20%液剤群(なし : 41.7%, 軽症 : 47.2%, 中等症 : 11.1%), 50%液剤群(なし : 33.3%, 軽症 : 41.7%, 中等症 : 25%) (図 5)

D. 考察

今までに塩化アルミニウム溶液の有効性を二重盲試験で検証した報告はない. 今回, 群間比較では 8 週間後に 50%液剤群がプラセボ群と統計学的な有意差を持って発汗量が減少し, その有効性が再度証明されたものとなった.

その中でプラセボ群における 4 週間後の発汗量

が有意に低下した理由についてはまずこの疾患が‘精神的発汗’であり, 加療している心理的要素がプラセボ効果として働くこと. 二つ目として今回の試験中に計 3 回行われる発汗量の測定条件は同じであり発汗には‘慣れ’の機序が働くこと. 三つ目として, 使用した試験薬の基剤は無水アルコールが使用されており, 角質へのダメージが発汗量に影響した可能性, 四つ目にはプラセボ群の試験脱落者が 4 人(全体の 24%)と多く発汗量データが追跡できなかった要因も考えられた. しかし, プラセボ群で 4 週間後に一旦減少した発汗量も 8 週間後には有意差が見られなかったことから, 長期的にはプラセボ外用は無効であると考えた.

次に重症度別の治療効果では中等症群, 重症群ともに 8 週間の治療終了時には発汗の平均値が約 0.5 $\text{mg/cm}^2/\text{min}$ であることについては, 高濃度群で治療途中から患者の外用回数が減少傾向にあること (図省略) を加味すると, 日常生活で困らない程度の発汗量 ($< 0.5 \text{ mg/cm}^2/\text{min}$) に達すると患者自身が外用回数を減らして治療を自己調節していることが関与していると考えた. 臨床例では 20%治療薬で無効だった症例がその後 50%治療薬に濃度を上げることで軽快する例が多く存在し, 今後さらに症例数を増やすか無効例に対する再投与といったプロトコールなども検討する必要があると考えた.

次に患者の QOL については, 全ての治療群の治療経過で HDSS、DLQI スコアの改善がみられた. 発汗量の改善した塩化アルミニウム液群だけでなく, プラセボ群にも有意な改善を認めたことは治療の効果が乏しくても加療行為自体に何らかの満足感が得られていることを表していると考えられたが, 一方でプラセボ群で非常に脱落者が多く(約 24%), 脱落したデータを合わせると実際のプラセボ群の満足度は低くなることが予想された.

次に, 有害事象に関しては過去に外用療法で血中アルミニウム濃度をはじめとした血液データの報告はない. 以前よりアルミニウム(Al)とアルツハイマー病(AD)の因果関係が論じられており, 塩化アルミニウム外用でもその可能性が患者の不安

の一つであった。塩化アルミニウムの作用機序は皮膚の角層内汗管に沈着するとされており、血中に成分が移行する可能性は低いと考えられていたが、今回の研究で血中のアルミニウム濃度の上昇はみられず他の血液学的データにも問題がないことを確認できたことは外用薬の安全性を支持する有用な結果であった。

最後に、副作用については外用した局所の刺激皮膚炎が塩化アルミニウム濃度依存性にみられた。一方プラセボ群でも軽度の刺激皮膚炎が15.4%に認められたことから、製剤の基剤として用いた無水エタノール自体の副作用が混在していることは自明である。塩化アルミニウムが水に溶解しにくく、製剤作成時にエタノールで溶解されていることがその背景にあるが、中等度の副作用の軽減のために今後は塩化アルミニウム溶液の至適濃度や、基剤の選択をしていく必要があると考えた。

E. 結論

手掌多汗症患者に対する、20%・50%塩化アルミニウム液の外用療法の有効性が示された。また、塩化アルミニウムの有害事象としては、接触部位の刺激皮膚炎以外には特に副作用は認められなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 藤本智子、横関博雄 掌蹠多汗症：塩化アルミニウムのコツ MB Derma 190:100-105, 2012
- 2) Tanaka T, Satoh T, Tanaka A, Yokozeki H
Congenital insensitivity to pain with anhidrosis: a case with preserved itch sensation to histamine and partial pain sensation. Br J Dermatol.

166(4);888-91,2012.

2. 学会発表

- 1) 藤本智子 教育講演 EL21-3 汗：生理と病態の全て 3. 多汗症の診療ガイドラインと外用療法 第111回日本皮膚科学会総会 2012.6. 1-3 京都
- 2) 藤本智子・佐藤貴浩・横関博雄 P52-7 特発性後天性全身性無汗症に関する全国疫学調査の報告 第111回日本皮膚科学会総会 2012.6. 1-3 京都
- 3) 藤本智子・井上梨紗子・横関博雄・伊東慶子・大嶋雄一郎・柳下武士・玉田康彦 原発性手掌多汗症に対する二重盲試験下での塩化アルミニウム外用剤の有効性の検討 第76回日本皮膚科学会東部支部学術大会 2012. 9.29-30 札幌

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

表 5 登録患者の推移

	開始日	4 週後	8 週後
プラセボ群(名)	17	15	13
20%塩化アルミニウム液群(名)	36	36	36
50%塩化アルミニウム液群(名)	37	36	36
全症例数(名)	90	87	85

図1 有効性評価（発汗量）

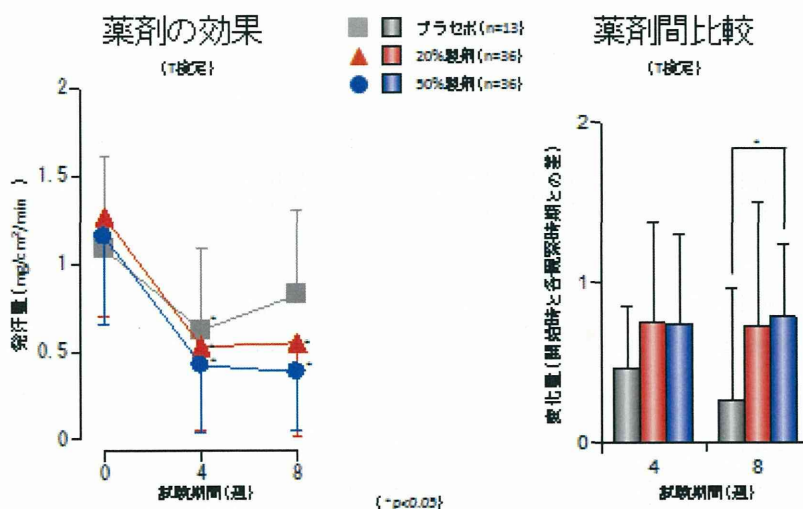


図2 発汗量（重症度別）

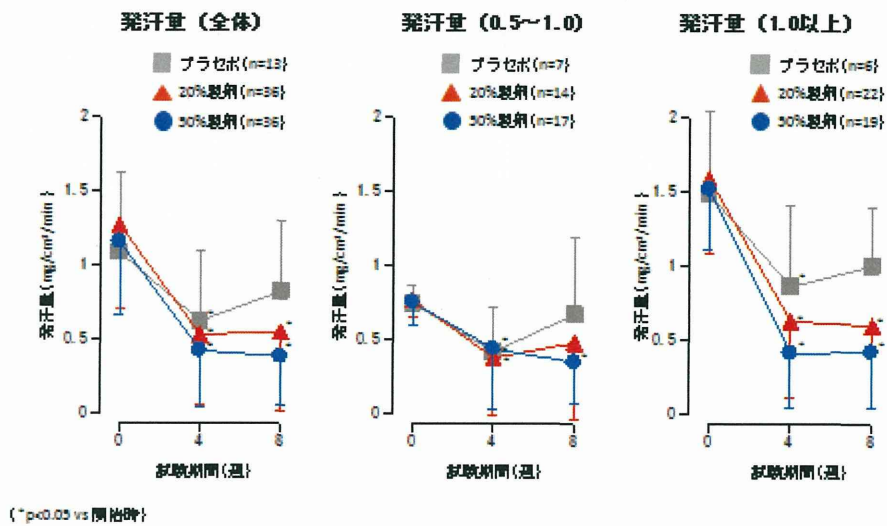


図3 有効性評価（HDSS）

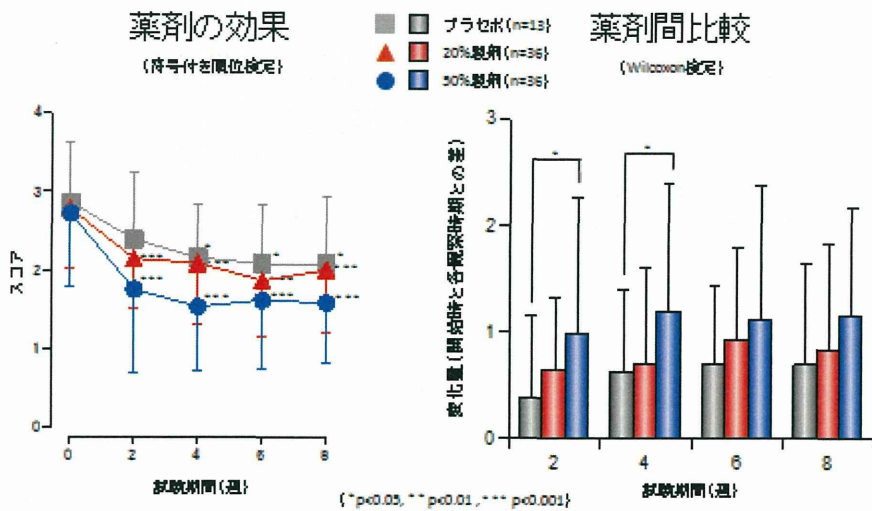


図4 有効性評価 (DLQI)

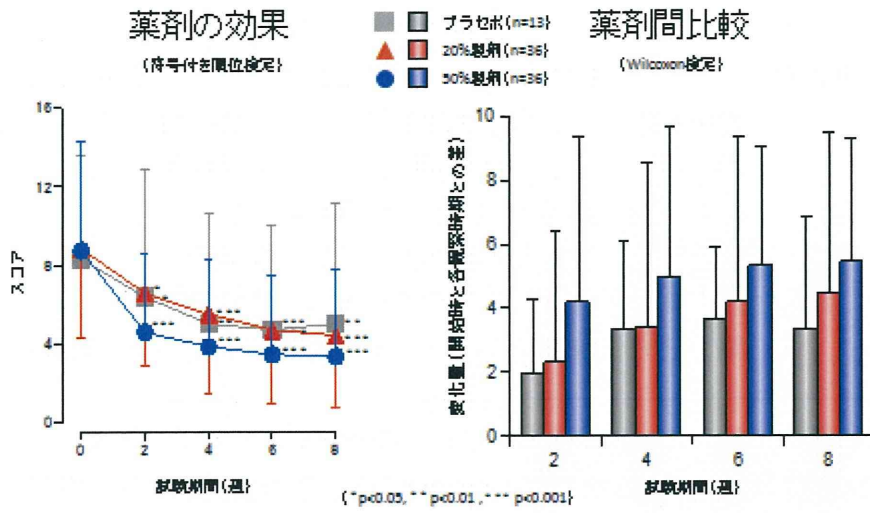


図5 安全性 (副作用)

投与群別の副作用の発現状況

