

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590543

研究課題名（和文）アレルギー性及び光アレルギー性評価の多項目代替試験法の開発

研究課題名（英文）Development of *in vitro* alternative examination for drug-induced photo-allergic reaction or drug-induced allergic reaction

研究代表者

尾藤 利憲（BITO TOSHINORI）

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50324918

研究成果の概要（和文）：職業性皮膚炎を頻繁に生じさせる物質の1つである過酸化水素の皮膚に対する毒性について、倫理委員会の承認を得、健常人の協力もとで、過酸化水素の様々な濃度、暴露時間による皮膚への影響について、人の正常皮膚を用いて検討を行った。その結果、過酸化水素の障害は、外傷などのある皮膚では正常皮膚に比較し、数倍の鋭敏さで障害が誘導されることが判明した。また、正常皮膚に障害をおこす濃度と暴露時間も判明し、適正な使用指標となるデータが得られた。同時に検討したストレス応答因子のひとつである転写因子Stat3の活性が過酸化水素で皮膚表皮角化細胞に過酸化水素暴露早期から誘導されることも示すことができ、ストレスに対する早期応答因子として働いていることが示唆された。上記については日本研究皮膚科学会誌であるJournal of Dermatological Scienceに掲載された。また、ケトプロフェンなどの光感作物質について光アレルギー性の評価についてはTHP-1リンパ球を用いて*in vitro*での反応性を評価し、部分的には有用であるが、適正濃度や刺激時間などについてはさらなる改善が必要である旨を第28回産業医科大学学会総会で発表した。

研究成果の概要（英文）：We investigated the concentration and exposure time of H₂O₂ necessary for the development of skin damage in healthy volunteers with immunohistochemistry for signal transducer and activator of transcription3 (Stat3). The International Labour Office has warned that contact of concentrated hydrogen peroxide (H₂O₂) with skin or mucosa can cause severe inflammatory changes. When the skin is exposed to 35% H₂O₂, erythema, purpura, and even subcutaneous emphysema may occur, as documented in several case reports. It remains unknown how much concentration of H₂O₂ and how long exposure to it evokes skin changes. Stat3 response to outer stress rescues the damaged cells from apoptosis, as Stat3 activation through oxidative stress has been observed in human lymphocytes. However, there has been no data on Stat3 and oxidative stress in human skin. Here we investigated the concentration and exposure time of H₂O₂ necessary for the development of skin damage in healthy volunteers with immunohistochemistry for Stat3. Our study also demonstrated that Stat3 activation is a good hallmark for H₂O₂ damage. We have recently demonstrated that H₂O₂ directly phosphorylates Stat3 protein without mediating membrane receptors or cytokines in human epidermal keratinocytes and fibroblasts. The observation seen in this study is consistent with those *in vitro* data. Thus, Stat3 activation precedes the clinical and histological changes in the H₂O₂-exposed skin, and phospho-Stat3 protein disappeared when the cells were seriously damaged as seen in 10 or 30 min-exposure to 30% H₂O₂. We published this data on the Journal of Dermatological Science. In addition, we have evaluated the allergenicity and photo-allergenicity of ketoprofen, which is known as a photo-sensitizing agent, by using THP-1 lymphocytes *in vitro* assay, and have demonstrated the partial usefulness for the evaluation of toxicity and allergenicity of the materials. The data were presented at 28th annual meeting of University of Occupational and Environmental Health.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：アレルギー、光アレルギー、表皮細胞

1. 研究開始当初の背景

未知の物質や新たに実用化された化学物質を人体に使用する際は、毒性もしくはアレルギー性を有し得るかという問題が常につきまとう。毒性に関しては既に生体外の様々な評価方法が確立されているが、一方、アレルギー性を生体外で評価することは非常に困難であり、人体もしくは代替動物を使用した検査が必要とされるため、なんらかの犠牲を伴わざるを得ない。

2. 研究の目的

本研究は、生体を使用することなく物質のアレルギー性さらには光アレルギー性を評価できる試験法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

ヒト表皮角化細胞を用いた系を確立し、物質の毒性、光毒性及びアレルギー性の惹起についてスクリーニング的に実験系が働くことを検討する。物質の毒性とアレルギー性を効率よく区別するために、表皮角化細胞の2つの変化を捉えることを目的とする。第1に、表皮角化細胞が表出する danger signal を利用する。Signal の強度により毒性、光毒性とアレルギー性の違いを明らかにし、ネクローシスではなくアポトーシスを捉える。第2に、アレルギー反応において重要である抗原提示の過程を評価する。

1. HaCaT 細胞のカルプロテクチン表出誘導試験

通常のアレルギー性物質の場合、HaCaT 細胞の培養系に被検物質を 4 倍の希釈系列で添加し、4 時間培養する。光アレルギー性物質の場合は、被検物質を 4 倍の希釈系列で添加し、1 時間暗所でインキュベーションしたのちに、UVA 1 J/cm² 照射する。培養液に再浮遊させ、4 時間培養する。細胞を回収し RNA を抽出

し real-time PCR を行う。同時に培養細胞に対して抗カルプロテクチン抗体で免疫組織学的染色を行う。

2. サイトカイン・ケモカイン産生誘導試験 (ケモカインはプレリミナリな検討として行う)

- 1) HaCaT 細胞と被検物質とのインキュベーション：通常のアレルギー性物質の場合、HaCaT 細胞の培養系に被検物質を 4 倍の希釈系列で添加し、24 時間培養する。光アレルギー性物質の場合は、THP-1 細胞を PBS に浮遊させ、被検物質を 4 倍の希釈系列で添加し、1 時間暗所でインキュベーションしたのちに、UVA 1 J/cm² 照射する。培養液に再浮遊させ、24 時間培養する。
- 2) ELISA 解析：培養上清を回収し、ELISA 法にて IL-1・、TNF-・、GM-CSF、MDC、TARC の濃度を測定する。

3. HaCaT 細胞のアポトーシス誘導試験

- 1) 被検物質とのインキュベーション：HaCaT 細胞を PBS 中で被検物質 (10⁻⁴~10⁻⁷ M) とインキュベーションする。光アレルギー物質はその後、UVA 4J/cm²照射する。
- 2) フローサイトメトリ解析：トリプシン/EDTAで浮遊させた細胞を洗浄後、7-AADとAnnexin-5で染色後、フローサイトメトリ解析する。Annexin-V陽性、7-AAD陰性分面をアポトーシスとし、7-AAD陽性分面をネクローシスとする。

4. THP-1 細胞の共刺激分子発現誘導試験

- 1) THP-1 細胞と被検物質とのインキュ

バージョン: 通常のアレルギー性物質の場合, THP-1 細胞の培養系に被検物質を 2 倍の希釈系列で添加し, 24 時間培養する。光アレルギー性物質の場合は, THP-1 細胞を PBS に浮遊させ, 被検物質を 2 倍の希釈系列で添加し, 1 時間暗所でインキュベーションしたのちに, UVA 1 J/cm² 照射する。培養液に再浮遊させ, 24 時間培養する。

- 2) フローサイトメトリ解析: 処理した THP-1 細胞を, 抗 CD54 抗体あるいは抗 CD86 抗体と抗 HLA-DR 抗体で 3 重染色し, mean fluorescence intensity (MFI) を解析する

ELISA 解析: 上記 2-1) と同様に培養した上清を回収し, ELISA 法にて IL-12, I-10 の濃度を測定する。

4. 研究成果

(1) 職業性皮膚損傷を頻繁に引き起こす過酸化水素の皮膚障害の時間と濃度の関係について、ヒト皮膚を用いて組織障害、また組織障害の早期マーカーとして Stat3 活性を調査し、肉眼的障害が生じる以前に、Stat3 の早期活性化が生じ、皮膚は損傷を受けている事を発見し、過酸化水素の適切な曝露濃度と時間について報告した (文献①)。

(3) Stat3 活性が継続することは皮膚上皮性腫瘍において重要な特徴であり、その活性経路は多様に存在し、Stat3 活性の抑制が腫瘍増殖の抑制につながることを報告した (文献②)。

(3) ヒドロクロロチアジド配合剤による光線過敏型薬疹についての症例を集積し、薬剤の毒性もしくはアレルギー性について検討し、一定濃度以上ではヒドロクロロチアジドは光毒性を有すること、その濃度は個人の代謝能力に影響される可能性を示唆した。また、光毒性により生じる脱色素斑は色素細胞の能力障害によるもので色素細胞自体は致死には至っていないことを証明した (文献④)。

(4) ケトプロフェンなどの光感作物質について光アレルギー性の評価については THP-1 リンパ球を用いて in vitro での反応性を評価し、部分的には有用であるが、適正濃度や刺激時間などについては、条件によりばらつきがあるため、検査を一般化するためにはさらなる改善が必要である旨を第 28 回産業医科大学学会総会で発表した。

- (5) IgE の上昇を伴わない内因性アトピー

性皮膚炎の発症機序について、Th1 細胞の増殖が皮膚炎の発症因子として重要な役割を果たしている可能性を示した (文献⑥)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Bito T, Nishigori C. Impact of reactive oxygen species on keratinocyte signaling pathways. J Dermatol Sci. 2012;68:3-8. 査読有
- ② Kabashima-Kubo R, Nakamura M, Sakabe J, Sugita K, Hino R, Mori T, Kobayashi M, Bito T, Kabashima K, Ogasawara K, Nomura Y, Nomura T, Akiyama M, Shimizu H, Tokura Y. A group of atopic dermatitis without IgE elevation or barrier impairment shows a high Th1 frequency: possible immunological state of the intrinsic type. J Dermatol Sci. 2012;67:37-43. 査読有
- ③ Bito T, Sumita N, Ashida M, Budiyo A, Ueda M, Ichihashi M, Tokura Y, Nishigori C: Inhibition of epidermal growth factor receptor and PI3K/Akt signaling suppresses cell proliferation and survival through regulation of Stat3 activation in human cutaneous squamous cell carcinoma. J Skin Cancer, 2011, 2011:874571. 査読有
- ④ Sawada Y, Bito T, Kabashima R, Sugita K, Nakamura M, Tokura Y. Epileptic seizures and cholinergic urticaria with generalized hypohidrosis or anhidrosis. Eur J Dermatol, 2011, 21: 99-100. 査読有
- ⑤ Masuoka E, Bito T, Shimizu H, Nishigori C. Dysfunction of melanocytes in photoleukoderma following photosensitivity caused by hydrochlorothiazide. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2011;27:328-30. 査読有
- ⑥ Bito T, Izu K, Tokura Y: Evaluation of toxicity and Stat3 activation induced by hydrogen peroxide exposure to the skin in healthy individuals. J Dermatol Sci. 2010;58:157-159. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 舛岡恵律子、田中えり子、小野竜輔、清

水秀樹、尾藤利憲、岡昌宏、錦織千佳子
ヒドロクロロチアジド配合剤による光線
過敏型蕁疹の5例第40回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会、広
島、2010.12.11.

- ② 尾藤利憲、日野亮介、森智子、小林美和、
椛島健治、戸倉新樹；産業化学物質及び
薬剤のアレルギー性及び光アレルギー性
in vitro 評価、第28回産業医科大学学
会、北九州、2010.10.28.

〔図書〕（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://hifunavi.umin.jp/navitoha.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾藤 利憲 (BITO TOSHINORI)
神戸大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50324918

(2) 研究分担者

戸倉 新樹 (TOKURA YOSHIKI)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：00172156

(3) 連携研究者

日野 亮介 (HINO RYOUSUKE)
産業医科大学・医学部・講師
研究者番号：30446116