

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23日現在

機関番号：33916
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591233
 研究課題名(和文) 網羅的遺伝子解析による接触皮膚炎の診断バイオマーカー探索と診断技術の確立
 研究課題名(英文) Searching for allergic contact dermatitis biomarker through microarray and proteomic analyses to establish diagnostic technique
 研究代表者 矢上 晶子
 (YAGAMI AKIKO)
 藤田保健衛生大学・医学部・准教授
 研究者番号：90367699

研究成果の概要(和文)：*para*-phenylenediamineによるアレルギー性接触皮膚炎患者6名を対象とし、患者からの同意取得後、血液、毛根組織、頬粘膜を採取し、RNA stabilizer(RNALater®)等を使用しTotal RNAを抽出した。最終的に、マイクロアレイおよびプロテオミクス解析を実施したがコントロール群との顕著な差はみられず、バイオマーカーを同定できなかった。しかし、これまで本方法により染毛剤によるアレルギー性接触皮膚炎のバイオマーカーを探索した報告はなく検討しえたことは意義深いと考える。

研究成果の概要(英文)：Six patients with allergic contact dermatitis due to *para*-phenylenediamine were studied. With the consent from these patients, blood, hair root tissue and buccal mucosa samples were taken to extract total RNA using reagents such as RNA stabilizer (RNAlater®). Microarray and Proteomic analyses, which were conducted finally, found no significant difference from control group, and specific biomarker was not identified. However, we believe this study meaningful in that above mentioned methods were tried, for the first time, to detect biomarker of allergic contact dermatitis due to hair dye.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：アレルギー性接触皮膚炎

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：診断バイオマーカー、染毛剤、*para*-phenylenediamine

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性接触皮膚炎とは、接触抗原の暴露によってその抗原に対する免疫記憶が成立している個体に、同じ抗原が再暴露され

たときに、その免疫記憶が活性化(リコール反応)し引き起こされる免疫反応による皮膚の組織障害である。ウルシ、桜草、菊などの植物、ニッケル、クロムなどの金属等、世の

中に存在するあらゆる物質（分子量 1000 以下）が抗原（ハプテン）となりうる。表皮から侵入した化合物は組織間質に存在するキャリアタンパク質と結合し、ハプテン化抗原として抗原提示細胞である樹状細胞に取り込まれ、所属リンパ節に移動してリンパ球への抗原提示を行い、同一化合物の再接触時に抗原特異的 CD4 陽性及び CD8 陽性細胞による炎症を惹起する(Kimber I, et al. Contact Dermatitis.46(1):1-5, 2002)。

現在行われている接触皮膚炎誘導活性の評価は、*in vitro* では local lymph node assay(LLNA)を含む動物モデル、ヒト末梢血によるリンパ球幼弱化試験が、*in vivo* では患者へのパッチテスト（抗原を背部に貼布する）が一般的に行われている。しかしながら、2009 年には化粧品動物実験禁止が実施されるなど、今後動物試験は推奨されない傾向にあり、またリンパ球幼弱化試験は特異度が低い。パッチテストは感度、特異度共に高く有用であるため我々も積極的に行ってきたが、人的労力と費用が莫大であり非常に専門的な診断技術が必要である。そこで代替ないし補完的 *in vitro* 試験法の構築が望まれるが、その科学的基盤は未だ確立されておらず、化学物質診断に有用なバイオマーカーの探索と、接触皮膚炎のメカニズム解明による理論的背景の確立が望まれる。

日本人は黒髪であるため、ほとんどの国民がある年齢に達すると染毛剤を使用する。しかしながら染毛剤の成分である *para*-phenylene diamine（以下 PPD）は本疾患における代表的なアレルゲンであることが以前から知られている。PPD に感作された患者の多くは再接触により重篤な湿疹病変が誘発され入院管理が必要となる場合もある。また、美容師および美容学校の学生に

おいては、就業中または実習中に PPD に感作された結果、職業の変更を余儀なくされることも少なくない。現在では PPD を含まない染毛剤も開発・発売されているが依然として新規の罹患患者は後を絶たない。このような現状を踏まえ、これまでも PPD に対するバイオマーカーの探索がいくつかの研究で行われてきたが未だ実用化には至っていない (Szameit S et al. Clinical Chemistry 54: 525-533, 2008)。

アレルギー性接触皮膚炎において罹患頻度が高い抗原は金属や樹脂などさまざまな抗原が挙げられるが、上記の背景や我々の豊富な臨床経験を踏まえ、より早期に同定し実用化しなければならないバイオマーカーは PPD であると考え今回の研究を計画した。

本研究を遂行することにより、臨床症状的確に反映したバイオマーカーが同定され実用化されれば、一般の染毛剤使用者のみならず、職業的にも PPD によるアレルギー性接触皮膚炎の診断が容易になり、さらに、PPD に感受性が高いなどの遺伝的背景と関連性のある遺伝子を同定できれば感作を未然に防ぐことが可能となる。

さらに、予防医学的な面から本研究成果を実用化するためには、より多くの対象者から侵襲が少ない方法でサンプルを収集する必要がある。そこで、本研究では、血液サンプルと同時に毛髪、頬粘膜を採取しそれらの結果を比較検討することにより、安全・簡便かつ一定の結果が得られる臨床評価システムを確立する。

バイオマーカーを同定し、より安全で簡便

なサンプル収集方法を用いた臨床評価システムの確立を目指す本プロジェクトは予防医学の一端をも担うに値する画期的な研究課題となりうる。

2. 研究の目的

PPD によるアレルギー接触皮膚炎におけるバイオマーカーの同定および、より侵襲の少ないアレルギー性接触皮膚炎の臨床評価システムを確立する。

3. 研究の方法

パッチテストで PPD によるアレルギー性接触皮膚炎と確定診断した患者から同意を得たうえで各サンプル（末梢血、毛髪、頬粘膜）を採取する。それらのサンプルから Total RNA を抽出しマイクロアレイ法により遺伝子発現を解析する。同時に末梢血サンプルを用いた二次元電気泳動法、および、蛍光ディフレンシャル二次元電気泳動を基盤とするプロテオミクス法によりタンパク質発現を解析する。

(1) 患者抽出

(1) - 1.パッチテストの方法：背部（傍脊椎部）の皮膚病変のない皮膚に抗原を閉鎖貼布する。48 時間後にパッチテストユニットを除去し、絆創膏による圧迫刺激の影響がなくなる約 1 時間後に 48 時間後判定を行う。以降、72 時間後、さらに 1 週間後判定を行う。1-2.判定基準：国際接触皮膚炎研究会の判定基準に基づき＋以上の場合を陽性反応と判定する。パッチテストにより PPD によるアレルギー接触皮膚炎が確定診断された患者から血液、毛髪、頬粘膜を採取する。

(2) サンプルの収集・処理

(2) - 1. 採血方法：PPD によるアレルギー

性接触皮膚炎患者からへパリン採血（約 12.5ml）を行う。

血液処理は、事前に 1 分間遠心した Lymphoprep Tube に同等量の生理食塩水で希釈した新鮮血液を注入する。さらに同等量の生理食塩水を加える。室温で 800g20 分間遠心分離する。遠心分離後、単核球のフラクションをパスツールピペットで採取する。また、新鮮血液を RNA 解析目的に PAXgene Blood RNA Tube に採取する。

(2) - 2. 毛髪採取方法：患者毛髪を毛根組織も含め静かに 5 本抜き、毛根部 1cm 程を RNA stabilizer (RNAlater®)1ml に浸す。これらを遠心した後に RNeasy® mini kit の Buffer RLT を加え、mixer にて組織破碎を促進する。QIA shredder® column を用いて homogenization した後に RNeasy® minikit のプロトコールに従って Total RNA を抽出する。RNase free water にて elution した後に V-360 で陰圧遠心にて濃縮し、濃度測定する。Agilent2100 Bioanalyser®にて Quality を確認する。

(2) - 3. 頬粘膜採取：滅菌済み綿棒で患者の頬粘膜を左右各 5 回擦り細胞を採取し、綿棒の先を RNA stabilizer (RNAlater®)1ml に浸す。以降は 2-2 と同じ。

(3) マイクロアレイ法による遺伝子発現解析

(3) - 1.マイクロアレイ実験（cRNA ラベリング、ハイブリダイゼーション、発色とスキャン）：GeneChip One-Cycle Target Labeling Kit を用いて Total RNA からビオチン標識 cDNA を作製し、fragment した後 GeneChip Probe Array(Human U 133 Plus 2.0) に 45°C16 時間ハイブリダイズさせる。その後、Probe Array を Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450 を用いて染色し、Affymetrix GeneChip Scanner 3600

7G でスキャンし、Affymetrix GeneChip Operating Software (GCOS)によりデータの出力を行う。

(3) - 2. マイクロアレイデータ解析：解析用ソフトウェア GeneSpring GX を用いてマイクロアレイデータ解析を行う。(当該研究に関わる研究費用 GeneChip HGU133Plus2.0、One-cycle Target Labeling and Control Reagent GeneChip)

(4) 末梢血サンプルを用いた二次元電気泳動法 (以下 2D-PAGE)、及び蛍光ディフアレンシャル二次元電気泳動 (以下 2D-DIGE) を基盤とするプロテオミクス解析

(4) - 1. 2D-PAGE 実験：血液処理方法(血清)：Proteome Lab IgY-12 によりメジャー蛋白質成分とマイナー蛋白質を分離する。それぞれの画分を限外ろ過膜によって脱塩等を行い、2D-PAGE (もしくは 2D-DIGE) に供する。泳動後のゲルは Typhoon9400 によりスキャンする。

血液処理方法(血球)：Mammalian Cell Lysis キットを用いて血球から蛋白質のみを回収する。2D-CleanUP キットにより脱塩等を行い、2D-PAGE (もしくは 2D-DIGE) に供する。泳動後のゲルは Typhoon9400 によりスキャンする。また、血球が種類毎に分離できるのであれば個々での解析も行う。

(4) - 2. 画像解析：電気泳動により分離された蛋白質のスポットを専用のソフトウェアによって数値情報に変換し、それぞれの実験に適した統計処理によって疾患特有の変動パターンを抽出する。

(4) - 3. 蛋白質の同定：特に顕著な変動を示す蛋白質を選択し、LC-MS/MS による蛋白質の同定を行う。

(4) - 4. 診断用バイオマーカー候補の選定：元の血液を対象に ELISA 等の方法で検

証する。

4. 研究成果

患者収集：染毛剤によるアレルギー性接触皮膚炎が疑われた患者に対し、PPDを含む染毛剤関連抗原を用いたパッチテストを施行した。その結果、6名が国際接触皮膚炎研究班の判定基準に基づき+以上の陽性反応を呈した。全例が女性で年齢は34歳～78歳であった。いずれの患者も滲出液を伴う重篤な「かぶれ」の症状を呈していた。パッチテストでは、PPDのほか、オルソアミノフェノール、パラアミノアゾベンゼン、パラアミノフェノールに陽性反応を呈していた。これらの患者に対し、本研究の説明同意が得られた後、サンプルの採取を行った。

マイクロアレイ法による遺伝子発現解析：マイクロアレイ実験 (cRNA ラベリング、ハイブリダイゼーション、発色とスキャン) を実施したがコントロール群との差はみられなかった。

末梢血サンプルを用いた二次元電気泳動法、および、蛍光ディフアレンシャル二次元電気泳動を基盤とするプロテオミクス法によりタンパク質発現解析：

コントロール群と比較し、著明な変化は認めなかった。

多くの日本人の成人はいずれ染毛剤を使用することになり、これまで一定の利用者がアレルギー性接触皮膚炎に罹患してきた。そして、この状況は今後も続くことが予想される。今回の研究期間では、患者群にのみ検出される明確なバイオマーカーを同定することはできなかった。しかしながら、本研究におけるサンプルの採取～遺伝子解析までの実験方法を実施した研究はこれまでになく、その研究方法を確立しえたことは意義深いと考える。

今後は、可能であれば、染毛剤によるアレルギー性接触皮膚炎患者からのサンプルを収集し、検討するサンプル数を増やし、同様の検討を実施していきたい。

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 12 件)

- ① Suzuki K, Yagami A, Mtsunaga K, Allergic contact dermatitis caused by a skin-lightening agent, 5,5'-dipropylbiphenyl-2,2'-diol, Contact Dermatitis, 66(1), 2012, 51-2, 査読なし, doi: 10.1111/j.1600-0536.2011.01986.x
- ② Miura M, Isami M, Yagami A, Matsunaga K., Allergic contact cheilitis caused by ditrimethylolpropane triethylhexanoate in alipstick, Contact Dermatitis, 64(5), 2011, 301-2, 査読なし, doi: 10.1111/j.1600-0536.2011.01872.x
- ③ Yagami A, Kawai N, Kosai N, Inoue T, Suzuki K, Matsunaga K, Occupational allergic contact dermatitis due to dimethyl sulfate following sensitization from a severe acute irritant reaction to the reagent, Contact Dermatitis, 60(3), 2009, 183-4, 査読なし, doi: 10.1111/j.1600-0536.2008.01503.x
- ④ 松永佳世子, 思いもよらぬ接触皮膚炎の原因(下), 漢方研究 7月号, 通巻487号, 2012年, 31-33, 査読なし, <http://search.jamas.or.jp/index.php>
- ⑤ 鶴田京子, 松永佳世子, 湿疹・皮膚炎・じんま疹 接触皮膚炎, 小児科診療, 72(11), 2009, 1979-1985, 査読なし, <http://search.jamas.or.jp/index.php>
- ⑥ 佐野晶代, 矢上晶子, 山北高志, 中川真実子, 井上智子, 鈴木加余子, 松永佳世子, 2006年に当科で化粧品による接触皮膚炎を疑いパッチテストを行った症例のまとめ, Journal of Environmental Dermatology and Cutaneous Allergology, 3(2), 2009, 94-100, 査読なし, <http://search.jamas.or.jp/index.php>
- ⑦ 安部正通, 矢上晶子, 松永佳世子, Journal of Environmental Dermatology and Cutaneous Allergology, 3(2), 2009, 105-110, 査読なし, <http://search.jamas.or.jp/index.php>
- ⑧ 古田加奈子, 美浦麻衣子, 牧浦宗彦, 鈴

木加余子, 松永佳世子, ニトリルゴム手袋による接触皮膚炎の1例, Journal of Environmental Dermatology and Cutaneous Allergology, 3(5), 2009, 443-448, 査読なし, <http://search.jamas.or.jp/index.php>

- ⑨ 安部正通, 松永佳世子, 樹脂による接触皮膚炎, Derma, 154号, 2009, 6-11, 査読なし, <http://search.jamas.or.jp/index.php>
- ⑩ 田中紅, 中川真実子, 山北高志, 松永佳世子, 藤澤隆夫, 染毛剤により脱毛をきたした接触皮膚炎の1例, 日本皮膚科学会雑誌, 121(9), 2009, 1899, 査読なし, <http://search.jamas.or.jp/index.php>
- ⑪ 矢上晶子, 松永佳世子, 日常品による接触皮膚炎, アレルギー・免疫, 16(11), 2009, 1721-1726, 査読なし, <http://search.jamas.or.jp/index.php>
- ⑫ 高山 かつおる, 横関博雄, 松永佳世子, 片山一朗, 相場節也, 伊藤正俊, 池澤善郎, 足立厚子, 戸倉新樹, 夏秋優, 古川福実, 矢上晶子, 幸野健, 乾重樹, 池澤優子, 相原道子, 接触皮膚炎ガイドライン, 日皮会誌, 11(9), 2009, 1757-1793, 査読なし, <http://search.jamas.or.jp/index.php>

[学会発表] (計 10 件)

- ① 三和拓人, グルタルアルデヒドによる接触皮膚炎の1例, 第263回日本皮膚科学会東海地方会, 2013.3.17, 大正製薬(株)名古屋支店
- ② 高橋正幸, パッチテストでヘアダイによる接触皮膚炎が明らかになった1例, 第261回日本皮膚科学会東海地方会, 2012.9.23, 大正製薬(株)名古屋支店
- ③ 松永佳世子, これだけは知っておきたい接触皮膚炎の基礎知識, 第111回日本皮膚科学会総会, 2012.6.2, 国立京都国際会館
- ④ 松永佳世子, 皮膚アレルギー茶のしずく石鹼による小麦アレルギーと化粧品による接触皮膚炎, 第9回高皮膚疾患診療懇話会, 2012.4.12, 埼玉医科大学国際医療センター
- ⑤ 松永佳世子, 思いもよらぬ接触皮膚炎の原因, 第75回日本皮膚科学会東京支部学術大会, 2012.2.18, 京王プラザホテル
- ⑥ 西村景子, 化粧品による接触皮膚炎を疑いパッチテストを行った症例2010のまとめ, 第42回日本皮膚アレルギー接触皮膚炎学会:接触皮膚炎3, 2011.7.16, 甲府富士屋ホテル

- ⑦ 西村景子, 化粧品による接触皮膚炎を疑いパッチテストを行った症例 2010 年のまとめ, 第 36 回日本化粧品学会, 2011.6.9, 有楽町朝日ホール
- ⑧ 佐野晶代, 染毛剤によるアレルギー接触皮膚炎の 1 例, 第 255 回 日本皮膚科学会東海地方会, 2011.3.13, 大正製薬(株)名古屋支店
- ⑨ 松永佳世子, 接触皮膚炎 up-to-date, 浦安皮膚臨床懇話会学術講演会, 2011.2.17, 浦安ブライトンホテル
- ⑩ 松永佳世子, 接触皮膚炎診療の新しい展開, 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 モーニングセミナー4, 2010.12.12, 広島国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢上 晶子 (YAGAMI AKIKO)
藤田保健衛生大学・医学部・准教授
研究者番号：90367699

(2) 研究分担者

斎藤 博久 (HIROHISA SAITO)
独立行政法人国立成育医療研究センター・副所長
研究者番号：40130166
松永 佳世子 (MATSUNAGA KAYOKO)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：80131192
林 宣宏 (HAYASHI NOBUHIRO)
東京工業大学・生命理工学部・准教授
研究者番号：80267955
大保木 啓介 (OBOKI KEISUKE)
独立行政法人国立成育医療研究センター・免疫アレルギー研究部・研究員
研究者番号：80415108