

# 小分子化学物質によるアトピー性皮膚炎の発症と 予防についての基礎研究

岐阜薬科大学 薬理学

永井博弐

The purpose of the present study is to investigate whether or not simple chemicals are able to introduce atopic dermatitis like symptoms in mice. An another purpose of the present study is to investigate the pharmacological and immunological prevention of such symptoms. For the first purpose, we tried to make a good model for atopic dermatitis in mice by using dinitrophenylbenzene (DNFB) on the ear skin. Consequently, we have established two different kinds of models for atopic dermatitis in mice.

In the first model, mice were passively sensitized by an intravenous injection of monoclonal anti-dinitrophenol (DNP) IgE, and their ears challenged epicutaneously with dinitrofluorobenzene (DNFB) 24 h later. The cutaneous reaction estimated by ear thickness reached a peak 1 and 24 h after the antigen challenge. Histopathological studies indicate that eczematous skin lesion (24 h) in mice is similar to that in human atopic dermatitis. Prednisolone at doses of 3 to 10 mg/kg clearly inhibited the IgE-mediated cutaneous reaction.

In the second model, DNFB was painted on the mice ear five times. The thickness due to dermatitis reached a maximum 24 hr after the second, third and fourth paintings. The strong expressions of INF- $\gamma$  and IL-2 but not IL-4 and IL-5 mRNAs in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in the skin lesions indicated the participation of Th1 cells in the ear delayed type hypersensitivity reaction. Simultaneously, hapten specific IgE (sIgE) was detected in serum from the immunized mice. These results indicate that five topical applications of DNFB to the mouse ear produces eczematous dermatitis in the ear and hapten sIgE in the serum. This model shows typical atopic dermatitis symptoms in the skin and IgE production. Regarding second project, the effect of anti-IL-4 monoclonal antibody on this hapten-induced contact dermatitis and IgE antibody production are studying now. The results will be reported in near future.

## 1 目的

近年の化学工業の発展に伴いアレルギー疾患の患者が増加している。この主な原因は生活環境の変化と同時に精神衛生面の環境変化が挙げられている。アレルギー疾患発症の大きな要因は遺伝的要素と環境因子であることは多くの研究者によって指摘されている。本研究の目的は化粧品などに含まれる小分子化学物質によるアトピー様皮膚炎の発症機序と予防法について動物モデルを用いて検討することである。近年、アトピー性皮膚炎の患者数は増加の一途を辿っている。特に、成人の患者数が増加し、社会問題にもなっている。これまで、教室では種々のアレルギー疾患の発症機序

とそれらの予防法について検討を行ってきた。アトピー性皮膚炎はその中でも最も重要な課題の一つである。これまで、アレルゲンとしてはダニ抗原に代表される室内アレルゲン、食物および化粧品に含まれる小分子化合物などが知られているが、近年、我々は小分子化合物によるアトピー性皮膚炎様症状を発症するマウスモデルの作成に成功したのでそれらを用い、小分子化合物による皮膚炎の発症機序の解明を行ない、さらに予防法についての検討を行った。

## 2 実験

### 2.1 実験材料

実験動物は体重 16 ~ 21 g の 9 ~ 10 週令雌性 BALB/c 系マウスを、日本 SLC より購入して使用した。マウスは温度  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $60 \pm 5\%$  の恒温恒湿飼育室にて、自由給水下に固形飼料（ラボ MR ストック、日本農産）を用いて飼育した。抗原として 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB, Nacalai Tesque) を用いた。DNFB は、acetone



Basic studies on the onset and prevention of atopic dermatitis with simple chemicals

Hiroichi Nagai

Department of Pharmacology, Gifu Pharmaceutical University

(Nacalai Tesque) : olive oil (東海製薬) = 3 : 1 (v/v) 溶液に0.15%となるように溶解した。抗体は Monoclonal mouse anti-DNP IgE 抗体 (MMCE) を用いた。MMCE は、DNP 化ブタ回虫抽出物で免疫した Balb/c 系マウス脾細胞から樹立したマウス IgE 抗体産生細胞株 (EC1) を培養して作製し上清を回収して MMCE とした。MMCE は -80℃ で凍結保存し、実験には培養上清をそのまま使用した。MMCE 中の力価は、ラット 48hr heterologous passive cutaneous anaphylaxis を用い 1 : 512-1024 であった。また、enzyme linked immunosorbent assay によって測定した IgE の濃度は、2914.52ng/mL であった。

## 2.2 実験方法

IgE 依存性二相性皮膚反応は Sakurai ら<sup>1)</sup>の方法に従い惹起した。すなわち、雌性 Balb/c 系マウスに MMCE 1 mL を静脈内注射して受動的に感作し、24 時間後に 25mL の DNFB をマウス両耳殻の表裏に塗布して反応を惹起した。反応惹起後、種々の時間にダイヤルシクネスゲージ (Peacock ; 尾崎製作所、東京) を用いて両耳殻の厚さを測定した。成績は、反応惹起直前と反応惹起後の耳殻の厚さの差で示した。

抗原反復塗布の実験はマウスの両耳介の表裏に 0.15% DNFB を 25mL 宛、1 週間に 1 回の割合で 5 回塗布して反応を惹起した。

## 2.3 統計学的解析

成績は平均値 ± 標準誤差で示した。有意差検定は、Dunnet multiple range test あるいは Student's t-test および Aspin-Welch によって行った。

## 3 成績および考察

これまでにマウスを用いた二種類の in vivo モデルの作成にほぼ成功した。in vivo モデルでは dinitrofluorobenzene (DNFB) を抗原としてそれに対応するモノクローナル IgE 抗体を用いて生じる遅発型皮膚炎、および前述の DNFB を抗原として皮膚に反復塗布すると当初、遅延型接触性皮膚炎

の症状を示したのち、やがて血清 IgE 値の上昇を伴う皮膚炎が発症し、その組織像、サイトカイン発現パターンおよび治療薬の薬効から両モデルともアトピー性皮膚炎の類似モデルであると考えられた。

これらのモデルを用いて発症に関与する炎症細胞および組織細胞の役割をサイトカイン、リピッドメディエーターを中心に検討し、それぞれの発症における役割を明らかにした。

### 1) DNFB による二相性皮膚反応

図 1 に各系統のマウスにおける二相性皮膚反応の成績を示す。ddY、ICR および Balb/c 系マウスでは反応後 1 及び 24 時間にピークを示す二相性の反応がみられる。肥満細胞欠損マウスである WBB6F1-W/W<sup>v</sup> マウスでは即時相の反応はみられないが、遅発相の反応がみられた。また、T cell 欠損マウスの Balb/c-nu/nu マウスでは Balb/c+/+ 正常マウスと変わらない二相性皮膚反応がみられた。更に、本二相性皮膚反応は IL-1 および TNF に対するモノクローナル抗体により抑制されるが、IL-5 に対する抗体によっては影響されなかった (図 2)。しかし、抗炎症薬のプレドニゾロンは用量依存的に本反応を抑制した (図 3)。図 4 にその際の組織写真を示す (図 4)。すなわち、抗原である DNFB の塗布により正常部位 (A) に比べ、好中球を中心とする多くの炎症性細胞の浸潤がみられ、表皮の肥厚が観察される (B)。さらに、血管の著明な拡張がみられた。これに対し、プレドニゾロン投与群では炎症性細胞の浸潤や表皮の肥厚は少なく、組織学的にも明らかに炎症反応は抑制された。これらのことから、本モデルは低分子化合物とそれに対応する抗体により生じるアレルギー性皮膚炎であり、低分子化合物による皮膚炎症の発症と予防の研究に有用であるものと思われた。

### 2) DNFB 反復塗布によるアレルギー性皮膚炎

DNFB を一週に一回、マウスの耳殻に塗布すると接触性皮膚炎による炎症反応が観察される (図 5)。またこの時血清中には DNP に対する特異的

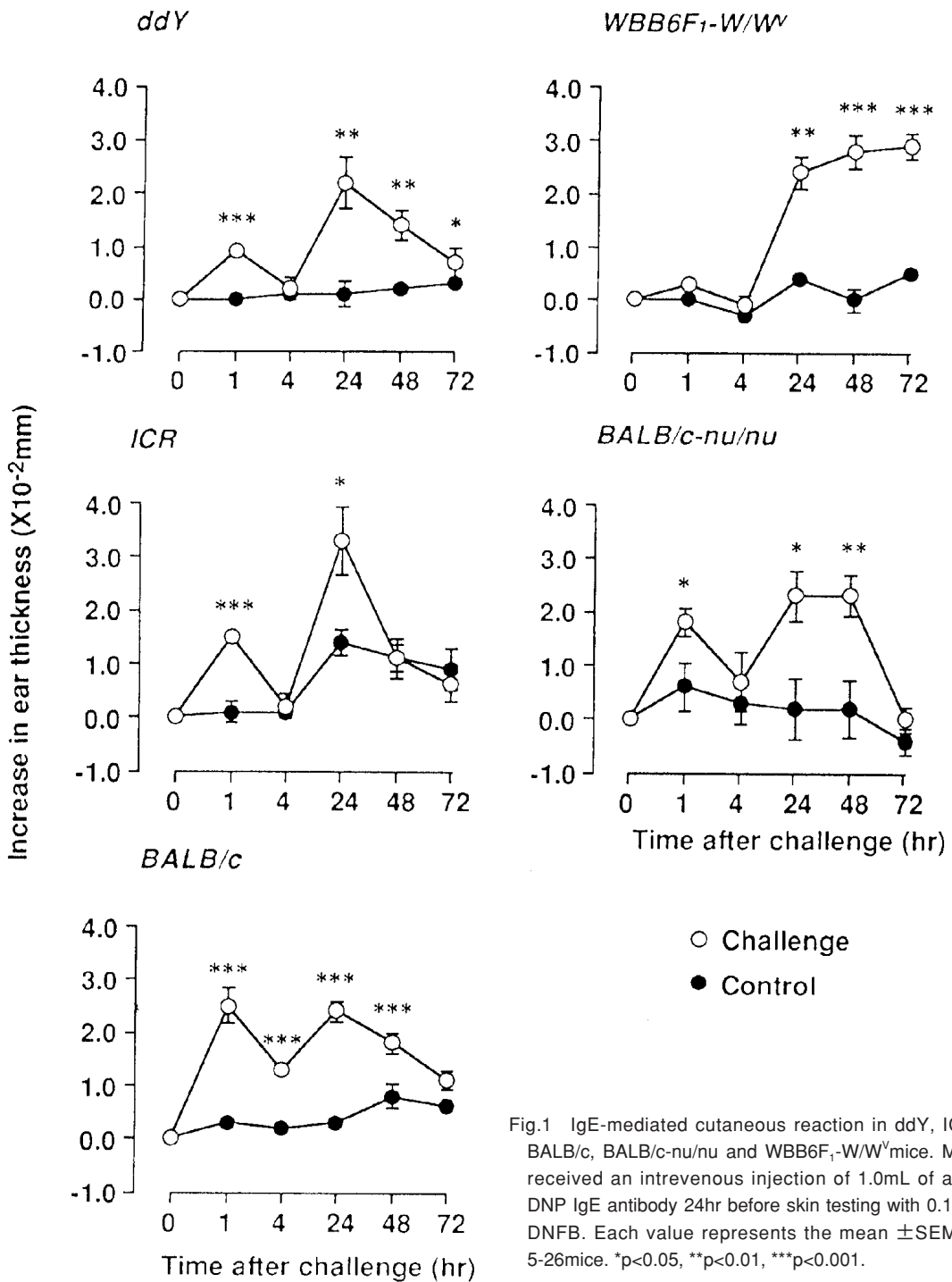


Fig.1 IgE-mediated cutaneous reaction in ddY, ICR, BALB/c, BALB/c-nu/nu and WBB6F1-W/W<sup>V</sup> mice. Mice received an intravenous injection of 1.0mL of anti-DNP IgE antibody 24hr before skin testing with 0.15% DNFB. Each value represents the mean  $\pm$  SEM of 5-26mice. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

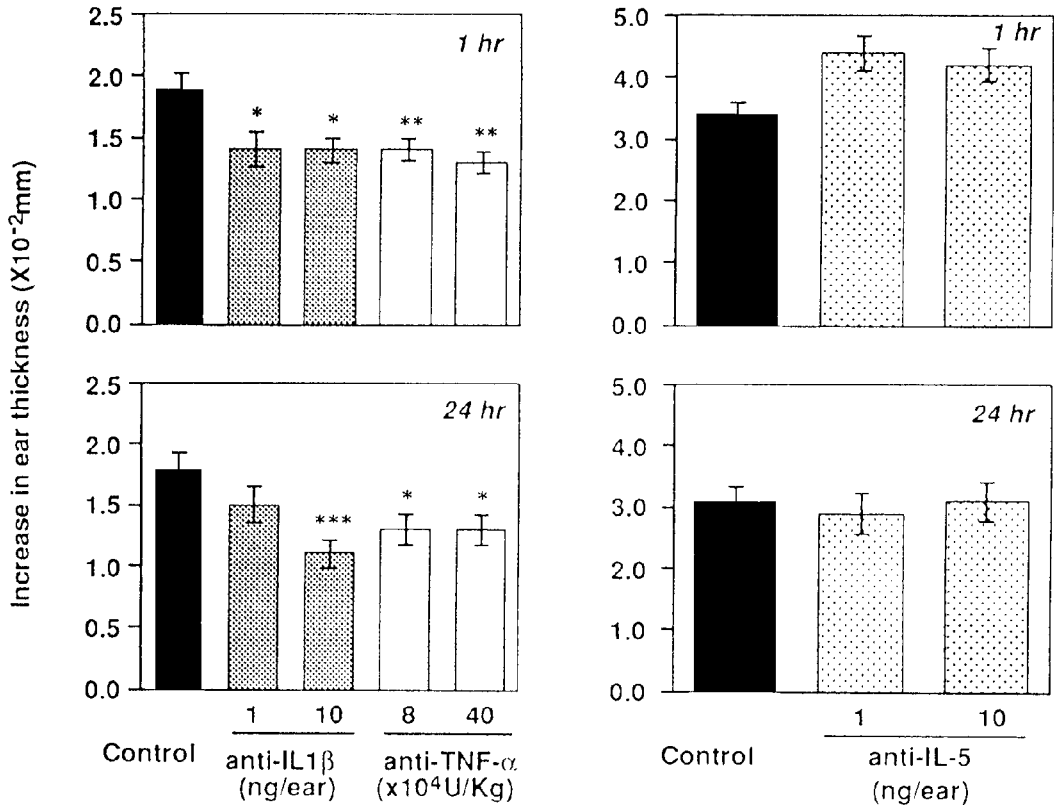


Fig.2 Effects of anti-IL-1 $\beta$ , anti-TNF- $\alpha$  and anti-IL-5 on IgE-mediated cutaneous reaction in BALB/c mice. Anti-IL-1 $\beta$  and anti-IL-5 were given intradermally and anti-TNF- $\alpha$  was intravenously 10min before antigen challenge. Each value represents the mean  $\pm$  SEM of 5-8 mice. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

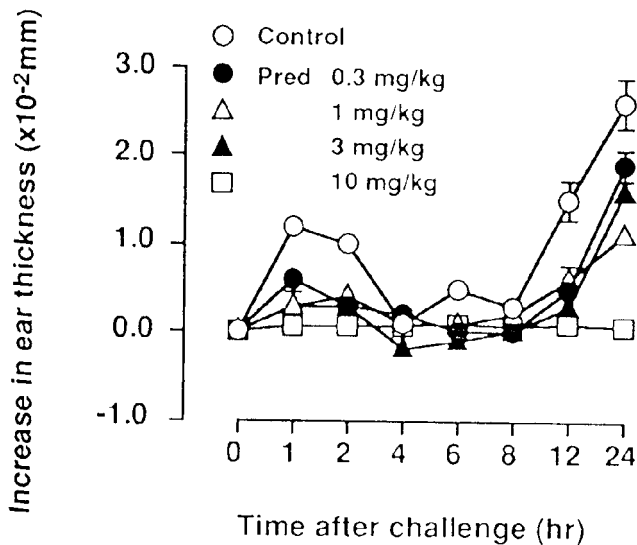


Fig.3 Effect of prednisolone on IgE-mediated cutaneous reaction in BALB/c mice. prednisolone was administered intraperitoneally 2hr before antigen challenge. Each value represents the mean  $\pm$  SEM of 8mice.

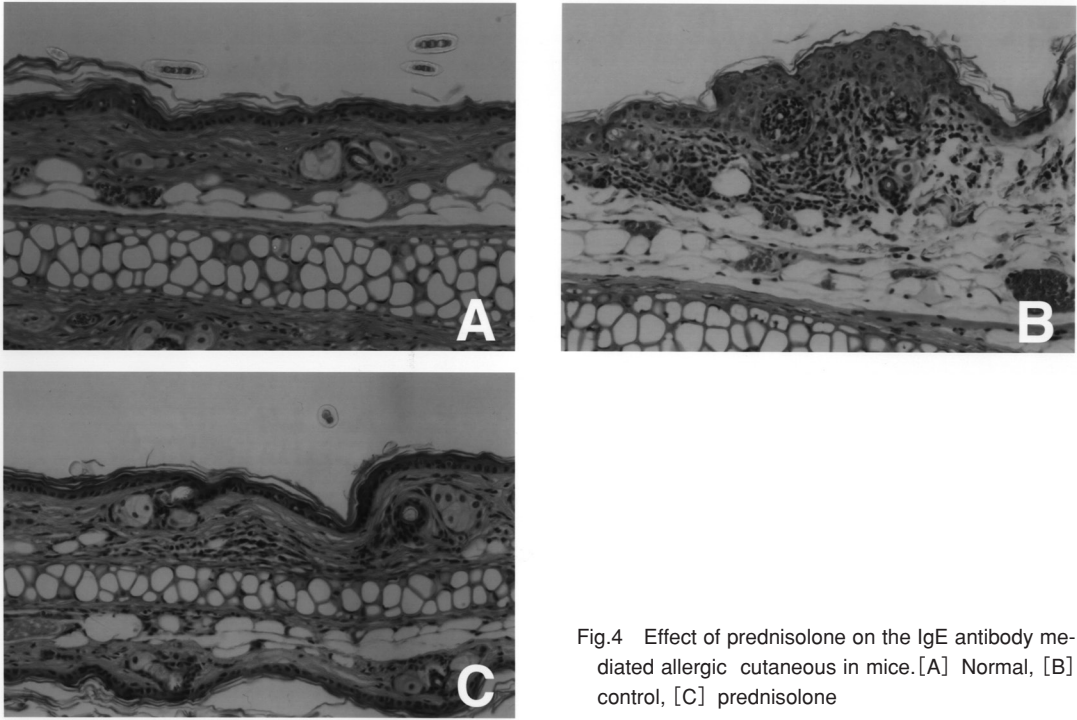


Fig.4 Effect of prednisolone on the IgE antibody mediated allergic cutaneous in mice. [A] Normal, [B] control, [C] prednisolone

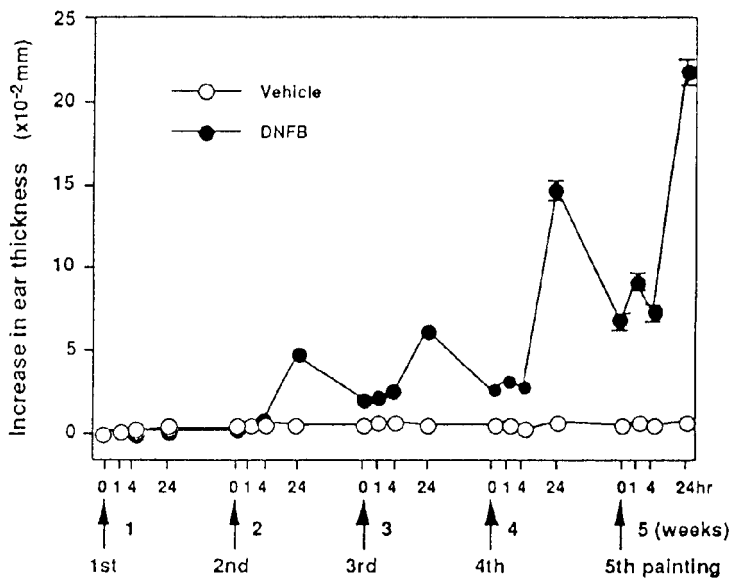


Fig.5 Ear swelling caused repeated painting of DNFB in mice. Ears of mice received atypical application of 0.15% DNFB in acetone and olive oil or vehicle once a week for 5 times. Each point indicated the mean  $\pm$  SEM of 8mice. hr: Time after each painting(hours)

IgE抗体が証明された (Table 1)。このことはこれまで、単純なハプテンでは接触によっては接触性皮膚炎のみの発症であると考えられたことが、明らかに、免疫グロブリンの産生を伴う反応が発症できることを示しており、ヒトのアトピー性皮膚炎を考える上で重要な発見であった。また、こ

の時の耳介局所およびリンパ節でのサイトカインの mRNA 発現を RT-PCR 法で測定すると耳介局所では IFN- $\gamma$  および IL-2 の mRNA の発現がみられ、Th 1 細胞の関与が示唆された (図 6)。この時、Th 2 サイトカインである IL-4 および IL-5 は耳介では証明されず、頸部リンパ節において

Table 3 Effect of repeated of DNFB on the serum immunogloblin levels

Antibody titer	sIgE(EU/ml)	tIgE(EU/ml)	tIgG( $\mu$ g/ml)	tIgM( $\mu$ g/ml)
0 week (n=7)	0	365 $\pm$ 76	117 $\pm$ 25	563 $\pm$ 78
5th painting of Vehicle (n=18)	0	173 $\pm$ 43	1456 $\pm$ 61	745 $\pm$ 70
5th painting of DNFB (n=19)	163 $\pm$ 25	4909 $\pm$ 433	1235 $\pm$ 48	571 $\pm$ 42

Mice ears were painted with the vehicle or 0.15% of DNFB once a week for 5 weeks. The titer of hapten specific IgE(sIgE), total IgE(tIgE), total IgG(tIgG) and total IgM(tIgM) in mouse serum was measured at 0 week and 4hr after the fifth painting of the vehicle or DNFB on the ear. sIgE and tIgE readings are given in ELISA units(EU)/ml compared with laboratory generated DNP-sIgE and tIgE standards. tIgG and tIgM readings given in  $\mu$ g per ml compared with respective commercial standards. The values represent the arithmetic mean  $\pm$ SEM of indicated number of mice.

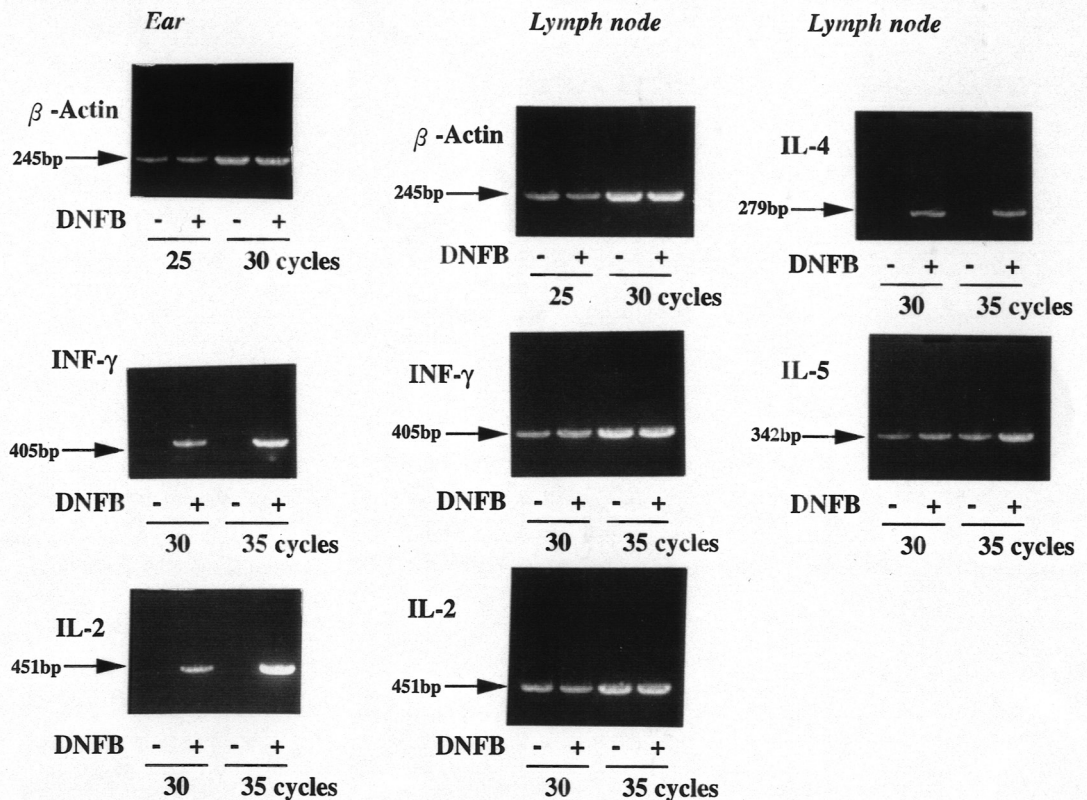


Fig.6 Expression of cytokine mRNA in the ears and cervical lymph nodes of mice treated with DNFB. Ears of mice received a topical application of 0.15% DNFB in acetone and olive oil or vehicle once a week for 5 times. The expression of IFN-  $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5 and  $\beta$ -actin mRNAs were examined using RT-PCR.

その発現あるいは発現増強がみられた。更にこのことはリンパ節でのIgE産生を示唆する germline C $\epsilon$  および productive C $\epsilon$  の mRNA が証明されたことから確かめられた。以上のような多くの基

礎検討から本反応の発症は図7に示すような機序が想定された。

すなわち、小分子化合物によるアレルギー性皮膚炎の報告は大半が接触性皮膚炎についてであ

# Characteristics of the model

## Repeated antigen application-induced ear swelling and IgE production

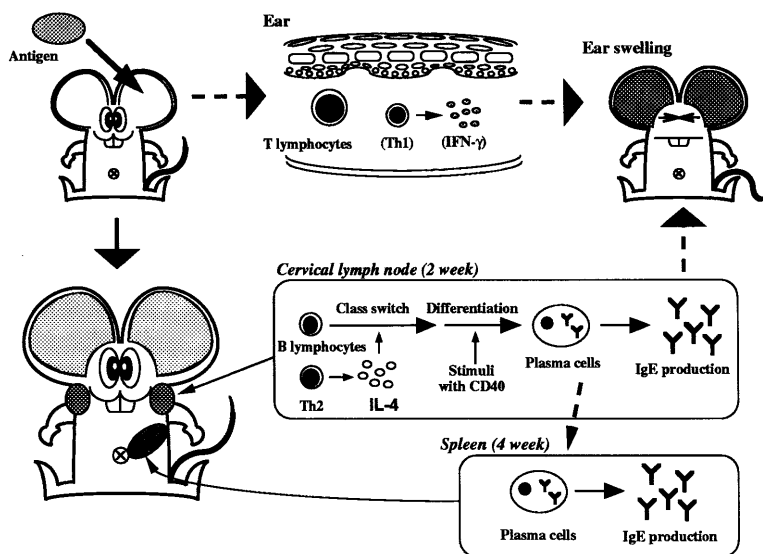


Fig.7 DNFB 塗布によるアレルギー性皮膚炎モデルの発症機序

る。抗原を経皮的に塗布することによる感作では、これまでほとんど皮膚での単核球の浸潤を主体にした組織学的判定により検討してきた。また、最近免疫学の進歩により、T細胞のうち helper T細胞は、その機能の違いから Th 1細胞と Th 2細胞に分類されることが明らかになった。接触性皮膚炎の発症は Th 1細胞が反応性細胞であることも次第に明らかにされてきた。さらに、Th 2細胞は液性抗体産生に必要な細胞としてとらえられている。しかし、小分子化合物による免疫反応についての解析はほとんど行なわれていない。今回の我々のモデルは小分子化合物を皮膚に反復塗布すると皮膚では接触性皮膚炎に類似の症状を呈しながら Th 1細胞活性化が起き、次第に全身のリンパ系組織で Th 2細胞が活性化されて免疫グロブリン、特に IgE 抗体の産生が始まることを明らかにしたものである。従って、多くの点でヒトのアトピー性皮膚炎と類似しており、小分子化合物によるアトピー性皮膚炎モデルとして有用であるものと思われる。

以上、本研究ではこれまであまり解析されな

った小分子化合物によるアトピー性皮膚炎様症状の発症についての研究に有用なモデル系を確立でき、今後、系統的にその発症機序と予防についての免疫薬理学的な検討を行う予定である。

### 参考文献

- 1) Sakurai T, Inagaki N and Nagai H; The effect of anti-tumor necrosis factor (TNF)-a monoclonal antibody on allergic cutaneous late phase reaction in mice. Life Science, 54, PL291-295, 1994
- 2) Nagai H, Sakurai T, Inagaki N et al.; An immunopharmacological study of biphasic allergic skin reaction in mice, Biol Pharm Bull 18, 239-245, 1995
- 3) Nagai H, Sakurai T, Abe T et al.; TNF-a participates in an IgE-mediated cutaneous reaction in mast cell deficient, WBB6F1-W/Wv mice. Inflamm Res 45, 136-140, 1996
- 4) Inagaki N, Tsunematu M, Sakurai T et al.; Effect of prednisolone on IgE dependent biphasic cutaneous reaction in Balb/c mice. Gen. Pharmac. 28, 93-97, 1997
- 5) Nagai H, Matsuo A, Hiyama H et al.; Immunoglobulin E production in mice by means of contact sensitization with a simple chemical hapten, J. Allergy Clin. Immunol, in press, 1997
- 6) Nagai H, Hiyama H, Matsuo A et al.; FK-506 and cyclosporin A potentiate the IgE antibody production by contact sensitization with hapten in mice J. Pharmacol. Exper. Ther. 283, 321-327 (1997)