皮膚器官培養系を用いた化学物質の刺激性、抗原性の検討

東京医科歯科大学　医学部皮膚科

横　関　博　雄

In order to predict the contact allergens or irritants in various chemicals, we analyzed mRNA of cytokines expressed in epidermis by stimulation of various chemicals in a human skin organ culture systems. After painting haptens,primary irritants or vehicle control on human skin specimens sliced to 1 mm thickness and cut into approximately 5×5 mm blocks, the pieces were cultured in serum-free medium. After separating epidermis from dermis, total mRNA was extracted and mRNA of cytokines was assessed by the reverse transcriptase-plymerase chain reaction. Only haptens but not irritants induced IL-1β mRNA at 1-3 hours. TNF-α mRNA was induced 9 hours after application of haptens and 1 hour after application of primary irritants. IL-1α mRNA was not induced by either haptens or primary irritants. Thus, cytokine mRNA expression induced by haptens in epidermis from that induced by primary irritants.

These results indicate that analysis of the epidermal cytokines mRNA expression induced by chemicals in a human skin organ culture system is usuful methods to predict haptens or primary irritants from various chemicals.

1　緒　言

接触皮膚炎（contact dermatitis、CD）は、湿疹性疾患群の代表的な疾患であり皮膚科の外来患者数では最も多い疾患である。現代の進歩した化学産業は新たに多くのアレルゲンを生みだし、そのアレルゲンによる接触アレルギーが増加してきた。また戦後、生活様式が大きく異なり、シャンプー、石鹸などを多量に使用することによる刺激性皮膚炎も増加してきた。現在、このように接触皮膚炎が増加することは生体環境上大きな社会問題となっている。

化粧品や医薬部外品はその使用に関し、医師の指導を必要とせず使用方法に関しては野放し状態であるため、特に安全性を高くする必要がある。現在では９種類の安全性試験を施行するよう法的に義務づけられている[1)]。特に接触アレルギーを起こしやすいかどうかを判定する感作性試験は、接触アレルギーの予防上最も大切な試験である。

Analysis of Cytokine mRNA Expression Induced by haptens or irritants in human organ culture system

Hiroo Yokozeki, M.D.

Department of Dermatology, School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University

しかし、in vitroでの感作性試験はまだ十分に検討されていない。1986年にKimberらはハプテンで経皮感作したのちのリンパ節細胞を調整し、リンパ節細胞の^{3}H-thymidineの取り込み量を測定すること（LLNA）によりそのハプテンの抗原性を定量し得ることを報告した[2)]。一方、私たちの教室でも化学物質を結合させた表皮細胞と脾細胞を混合培養することにより化学物質の感作性を定量することに成功した[3、4)]。しかし、これらのin vitro試験はマウスを用いた系で一部ヒトにおける抗原性とは異なる結果が認められた。一方、皮膚にハプテンもしくは一時刺激物質を塗布することによりIL-1β、TNF-αなど種々のサイトカインが誘導されることが明らかにされた[5、6)]。そこで今回、ヒトの皮膚を用いて器官培養することによりハプテンと一時刺激性物質ではサイトカインのmRNAの発現パターンが異なる結果が見られたのでここに報告する[7、8)]。

2　実験方法

2．1　皮膚器官培養

厚さ１mmの正常分層植皮片を５×５mmに細切した後、種々の化学物質を表皮側に塗布、表皮側を上にしてパラフィンで被ったレンズペーパーの上に乗せ無血清培地（セルグロッサーH）で

24時間培養し経時的に皮膚を回収した[5、6]。

2．2　化学物質による刺激

皮膚器官培養時に表皮に0.1mM DNCB（ジニトロクロロベンゼン）、2.5% PPD（パラフェニレンジアミン）、10^{-6}M レチノイン酸、1％メチルサリチレート、1μg/mL superantigen（SEB）を塗布する。

2．3　RNA抽出とcDNA作成

回収した皮膚は0.5mM ammmonium thiocyanateを用いて表皮と真皮を分離する。得られた表皮シートはPBSで洗浄後、RNA zolでRNAを抽出する。RNAよりRAV reverse transcriptase（Takara Co. Ltd）を用いてcDNAを作成する。

2．4　Polymerase chain reaction（PCR）解析

RT-PCRはIL-1α、IL-1β、TNF-α，β-actin、ICAM-1、VCAM-1のprimerを用いて表皮シートより抽出し作成したcDNAにて施行後半定量を行い比較検討した。

3　結　果

RT-PCR法が半定量性があることを明らかにするためにRT-PCRのcycles数とその結果得られたバンドの強さをデンシトメーターで測定した。その結果、図1に見られるように各種のサイトカインのRT-PCRのcycle数とODとの間に比例関係が認められた。次にRT-PCRを施行したcDNAの量とその結果得られたバンドのODに比例関係が見られることを図2に示している。以上、今回のRT-PCR法で半定量性があることが明らかにされた。

3．1　IL-1α発現レベルの比較検討

各種の化学物質を塗布後24時間培養した後のIL-1αの発現レベルを図3に示した。縦軸にIL-1αとβactinの発現の比率を表示している。IL-1αは化学物質による刺激のない状態で発現しており各種の化学物質の刺激後1時間後に強く発現している。しかし、化学物質による刺激後のIL-1αの発現レベルとコントロールの間では差が認められなかった[8]。

3．2　IL-1βのmRNA発現レベルの比較検討

各種の化学物質を塗布後24時間培養した後のIL-1βの発現レベルを図4に示した。縦軸にIL-1βとβactinのRNAの発現の比率を表示している。IL-1βのmRNA発現量はDNCBで刺激した時は3時間後に、PPDで刺激した時は1時間後にピークがみられる。しかし、MS、RAなどの刺激因子では特に発現のピークは認められなかった[8]。

3．3　TNF-αのmRNA発現レベルの比較検討

各種の化学物質を塗布後24時間培養した後のTNF-αのRNA発現レベルを図5に示した。DNCB、PPDなどのハプテンでは培養後9時間後にピークが見られMS、RAなどの刺激因子では培養後1時間後にピークが認められた。この結果は刺激因子が直接表皮に作用しTNF-αを誘導するという報告に一致する。また、ハプテンを塗布後9時間してTNF-αが発現する結果は、ハプテンによりIL-1β発現が誘導されIL-1βにより間接的にTNF-αが誘導されたと考えられた[8]。

3．4　superantigen（SEB）刺激によるサイトカインの動態

皮膚器官培養時に1μg/mLSEBを加え経時的に皮膚を回収してその表皮シートよりRNAを抽出しIL-1α、IL-1β、TNF-α、ICAM-1、VCAM-1のmRNA発現レベルをRT-PCR法で解析した。その結果図6に示されるようにIL-1αは3～6時間後にピークがみられIL-1βは3時間後にmRNAの発現が見られた後持続的に発現していた。TNF-αは1時間後より持続的

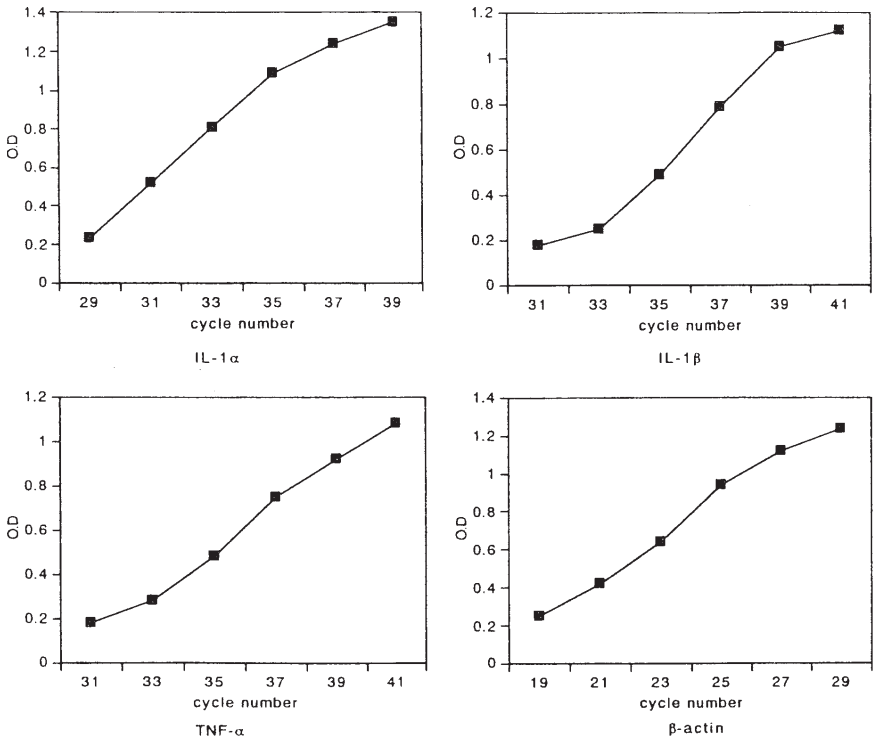

図1　RT－PCR 法を施行した cycle 数と得られたバンドの OD の関連性

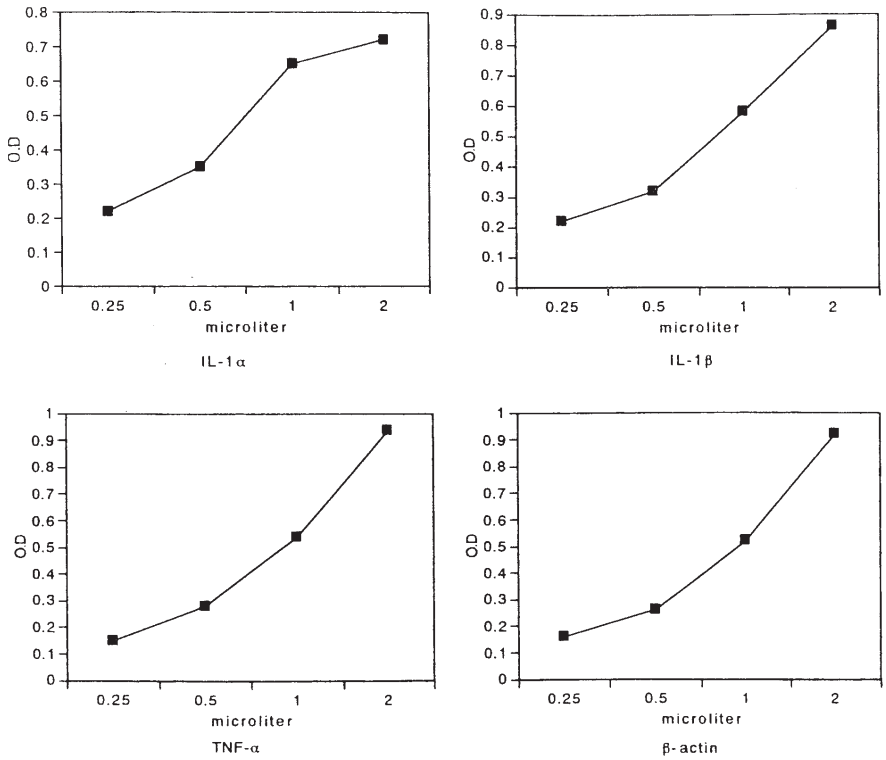

図2　RT-PCR 法を施行した cDNA の と得られたバンドの OD の関連性

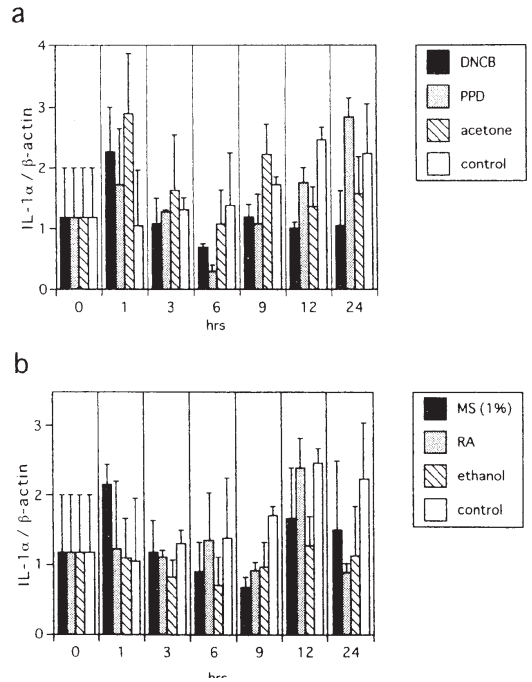

図３　各種の化学物質の存在下での表皮における IL－１α の mRNA の発現

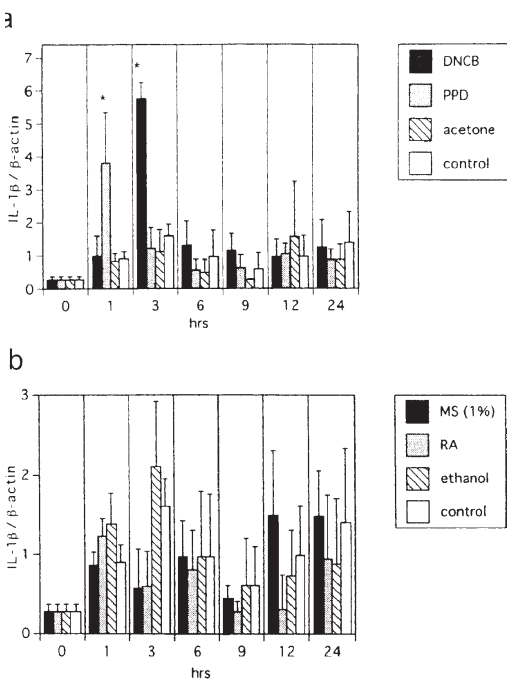

図４　各種の化学物質の存在下での表皮における IL－１β の mRNA の発現

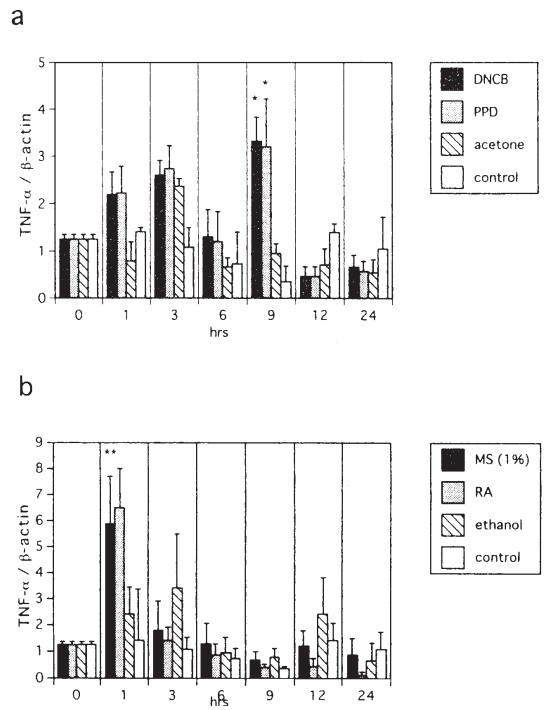

図５　各種の化学物質の存在下での表皮における TNF－α の mRNA の発現

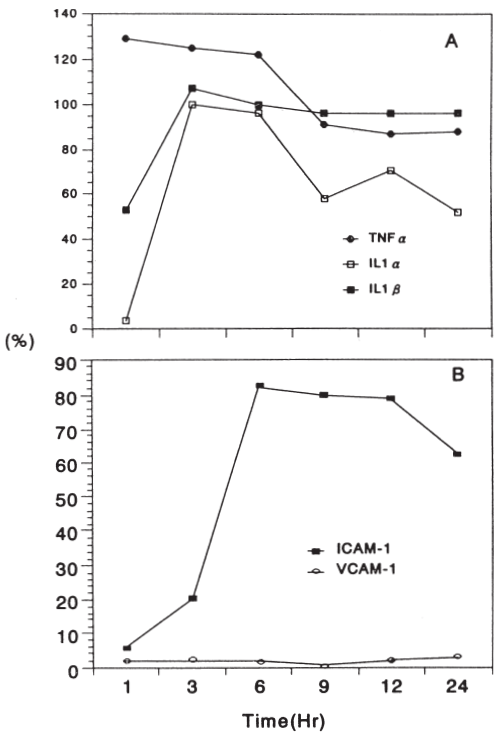

図６　スーパー抗原（ＳＥＢ）存在下での IL－１α、IL－１β、TNF－α、ICAM－１、VCAM－１の mRNA の発現レベル

に発現している。また、接着因子であるICAM-1は6～12時間後にピークが見られた。この結果ブドウ球菌由来のスーパー抗原によりIL-1α、IL-1β、TNF-αなどのサイトカインが産生されその相互作用によりICAM-1の発現が誘導されることが明らかにされた[7]。

4 総 括

化学物質の抗原性、刺激性をIn vitroでの試験法で判定することは非常に困難なことである。Kimberらはマウスの耳介に化学物質を塗布後そのリンパ節細胞の増殖能により抗原性を判定するLLNA法を開発したが一時刺激物質のSDSとハプテンとの鑑別が不可能であった。また、私たちの教室で開発した化学物質を結合した表皮細胞とTリンパ球をマクロファージの存在下で培養し抗原特異的T細胞が誘導できるかどうかで抗原性を判定するIn vitro sensitization testでもニッケルなどの抗原が判定できない[3、4]などまだ抗原性試験として用いるには感度が不十分であると考えられた。今回、ヒトの皮膚を用いた器官培養法では表皮よりDNCB,PPDなどのハプテンでは1～3時間後の早期にIL-1βのmRNAが発現し9時間後にTNF-αのmRNAが発現した。一方、一時刺激性物質では表皮からIL-1βのmRNAの発現はみられず1時間後にTNF-αのmRNA発現が見られた。スーパー抗原では早期よりすべてのサイトカインのmRNAの発現が見られた。このように塗布した物質がハプテンか刺激物質かにより表皮細胞内のサイトカインのmRNA発現時期が異なることが明らかになった。この特性を利用して各物質の抗原性、刺激性を評価できる可能性が示唆された。しかし、2種類のハプテンと一時刺激物質しか検討しておらずニッケル、コバルト、クロム、ホルマリン、ウルシなどの典型的な接触アレルゲンを検出できるか、刺激物質、抗原性の低い物質をアレルゲンと鑑別しうるかさらに検討する必要がある。

なお以上の業績はJ Dermatol：25,421-428：1998で報告した。

文 献

1）昭和62年6月18日付、厚生省薬務局審査第2課、事務連絡。

2）Kimber I , Weisenberger C : A murine local lymph nodes assay for the identification of contact allergens. Assay development and results of an initial validation study, Arch Toxicol. 63 : 274-282, 1989

3）Yokozeki H, Katayama I, Nishioka K : Experimental study for the development of an in vitro test for contact allergens I, Int Arch Allergy Immunol, 106 : 394-400, 1995

4）Arimura M, Yokozeki H, Katayama I et al. :Experimental study for the development of an in vitro test for contact allergens II, Int Arch Allergy Immunol, 115 : 228-234, 1998

5）Enk AE, Katz SI : Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity, Pro Natl Acad Sci, 89 : 1398-1402, 1992

6）Barker JNWN, Sarma V, Dixit V et al .:Keratinocytes as initiators of inflammation, 337 : 211-214,1991

7）Matsunaga T, Katayama I, Yokozeki H et al.: Superantigen-induced cytokine expression in organ-cultured human skin, J Dermatol Sci, 11 :104-110,1996

8）Matsunaga T, Katayama I, Yokozeki H et al.: Epidermal cytokine mRNA expression induced by hapten differ from that induced by primary irritant in human skin organ cultur system, I dermatol, 25 : 421-428, 1998