

# 接触性皮膚炎の研究：皮膚刺激とマクロファージ「細胞交通」の関与

静岡県立大学 薬学部微生物学教室

今 井 康 之

During the sensitization phase of contact hypersensitivity through skin, it is widely accepted that Langerhans cells pick up antigens within epidermis and then migrate to the draining lymph nodes to present antigens to recirculating T lymphocytes in association with major histocompatibility complex class II molecules. We discovered trafficking of connective-tissue macrophages from dermis to draining lymph nodes during skin sensitization as an independent phenomenon from Langerhans cell trafficking using FITC as an antigen. We could differentiate trafficking of macrophages from that of Langerhans cells using monoclonal antibodies specific for macrophage calcium-type lectin (MMGL) that is a connective-tissue specific macrophage marker. The extent of dermal macrophage migration was greatly influenced by the selection of vehicles to dissolve FITC. Using several kinds of vehicles, we observed a positive correlation between the efficiency of skin sensitization and the extent of macrophage migration. These results indicated that chemicals in the vehicles may exhibit an adjuvant activity through the induction of tissue macrophage trafficking. We directly demonstrated macrophages migration upon skin sensitization by local cell transfer experiments. Interestingly, the migration was induced by vehicle alone, such as acetone/dibutyl phthalate (AD), without FITC. These results also confirmed the critical role of vehicles with adjuvant activity.

We observed the initiation of dermal macrophage trafficking using mouse skin after epicutaneous application of AD. Thus, we immunohistochemically detected that MMGL-positive dermal macrophage density was transiently and reversibly decreased after epicutaneous application of AD. We also developed an organ culture system, in which skin fragments taken from the site of AD application were subjected to a short term organ culture. The density of MMGL-positive dermal macrophage decreased irreversibly in this system. Using the organ culture system, we discovered that AD treatment induced local production of pro-inflammatory cytokines during skin sensitization. Furthermore, we also found the activity that induces dermal macrophage exit was mediated by pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , using recombinant cytokines and antibodies against cytokines. A possibility that IL-1 $\beta$  treatment down regulates MMGL expression in macrophages has been excluded.

In conclusion, our studies revealed importance of connective tissue macrophage trafficking during skin sensitization as a mechanism of adjuvant activity of chemicals. Our *ex vivo* organ culture system using skin fragments will be useful to examine chemicals that might enhance skin sensitization.

## 1. 緒 言

接触性皮膚炎は、遅延型アレルギー反応の一種であり、化粧品に限らず生活環境にある様々な化学物質の抗原性が原因となっている場合がある。化粧品の安全性を確保する上でも、接触による抗原感作がどのようにして起こるのかを正しく理解することが重要である。また、シックハウス症候群として問題となっているアレルギーでは、複数の化学物質による感作や、ある種の化学物質がそれ自身の抗原性とは別に何らかの作用機構を通じて抗原に対する感受性を高めている可能性が推察される。すなわち、化学物質のアジュバント活性について、その実態を明らかにすると共に、作用メカニズムを解明する必要がある。

皮膚からの接触感作では、表皮に存在する抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞が経皮的に侵入した抗原を拾い上げ、自ら所属リンパ節の T 細胞領域に移動し、リンパ節に再循環してきた T 細胞に対して主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス II 分子を介して抗原提示を行い感作が成立すると一般に考えられている。リンパ節に移動したランゲルハンス細胞は、相互連結性樹状細胞とも呼ばれている。我々は、マクロファージ細胞表面に存在するカルシウム依存性レクチン (MMGL) の研究を通じて<sup>1-3, 5, 7)</sup>、この分子が表皮のランゲルハンス細胞と真皮の組織マクロファージを区別しうる、特異性の高いマーカーであることを見出してきた<sup>4)</sup>。すなわち、MMGL は、真皮の組織マクロファージに発現しているが、表皮のランゲルハンス細胞には発現していない。

我々の作製した MMGL に対するラットモノクローナル抗体を使って<sup>2, 8)</sup>、接触性感作においてランゲルハンス細胞の所属リンパ節への移動とは別に、真皮マクロファージの所属リンパ節への移動が起こることを発見した<sup>6)</sup>。本研究では、接触性感作を増強する化学物質自体が、真皮から所属リンパ節へのマクロファージの細胞交通を誘導することを明らかにしたうえで、細胞交通の誘導活性と接触性感



Involvement of Macrophage Trafficking in Contact Dermatitis during Skin Sensitization

Yasuyuki Imai

Department of Microbiology, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences

作を増強する活性との間の相関を検討した。また、該当する化学物質が皮膚局所から組織マクロファージの細胞交通を開始させる活性があるかどうかを、皮膚局所を直接観察し評価する実験系を構築して解析した<sup>9)</sup>。さらに、この過程において、炎症性サイトカインが関与することを明らかにした<sup>10)</sup>。

## 2. 実験

### 2.1 接触感作と感作成立の評価

マウス (ICR または BALB/c、雌) の上腕部の毛を刈り、溶媒に溶解した FITC (0.5%、w/v) を 80  $\mu$ L 塗布した。6 日後に、アセトン/フタル酸ジブチル (AD) に溶解した FITC 20  $\mu$ L をマウスの右の耳介外面に塗布して惹起を行い、その 24 時間後の耳介の厚さをダイヤルシクネスゲージで計測した。左耳介を対照とした。

### 2.2 接触感作における溶媒の効果

感作時に FITC を溶解した溶媒は、以下の通りである。AD: アセトン/フタル酸ジブチル (1:1)、AO: アセトン/オリーブオイル (4:1)、EtOAc: 酢酸エチル、EtOH: エタノール、DMF: ジメチルホルムアミド、DMSO: ジメチルスルホキシド、SDS: 30% ラウリル硫酸ナトリウム水溶液。惹起には、すべて AD を用いた。

### 2.3 MMGL 陽性組織マクロファージの免疫組織化学的検出

リンパ節および皮膚の凍結切片を作製し、アセトン固定後、MMGL に対するラットモノクローナル抗体 LOM-14 を用いて、免疫組織染色を行なった<sup>3, 4)</sup>。

### 2.4 皮膚からの MMGL 陽性マクロファージの分離・精製と蛍光トレーサー標識

マウス皮膚 (腹部、背部、前後肢) の毛を刈ったのち細切し (1 辺 2 mm 程度)、コラゲナーゼ消化によって皮膚細胞を単離した。MMGL に対するラットモノクローナル抗体 LOM-8.7 を反応させた後、抗ラット IgG の結合したマグネチックビーズを反応させ、抗体の結合した細胞をマグネチックセルソーターを用いて回収した。MMGL 上の別の抗原決定基に対する抗体 LOM-14 を用いて評価した結果、皮膚細胞浮遊液中に 2~3% 程度含まれる MMGL 陽性細胞が 90% 以上にまで濃縮精製されることが分かった。精製した皮膚由来の MMGL 陽性マクロファージを、蛍光トレーサー CMTMR で標識した。

### 2.5 マクロファージ細胞交通の検出<sup>6)</sup>

CMTMR 標識した BALB/c マウスの皮膚由来 MMGL 陽性マクロファージを BALB/c マウスの前肢に皮内移

植した (10<sup>6</sup> 個 / 20  $\mu$ L)。16 時間後、移植部位の皮膚に FITC / AD または AD のみを塗布した。さらに 24 時間後に所属リンパ節である上腕 (brachial) リンパ節を採取して凍結切片を作製し、トレーサー陽性細胞を赤色蛍光にて検出するとともに、抗原である FITC を緑色蛍光、細胞の同定をモノクローナル抗体 LOM-14 / Cy5 標識抗ラット IgG による深赤色蛍光によって、3 重標識蛍光を検出可能なレーザー共焦点顕微鏡にて解析した。

### 2.6 皮膚小片の器官培養<sup>9, 10)</sup>

マウス皮膚の小片 (1 cm  $\times$  1 cm) を直径 1  $\mu$ m の小孔のあるポリエチレンテレフタレート膜上に、表皮側を上にして設置した (図 1)。これを、細胞培養用の 6 穴プレートに置き、無血清培地 ASF104 (味の素) を加え、皮膚小片が液相と気相の界面に来るように培養液の量を調整した。5% CO<sub>2</sub> / 95% 空気 の条件で CO<sub>2</sub> インキュベーターを用いて 37°C で培養した。また、マウス皮膚小片を 24 時間培養し、培養上清を調製した。培養上清中の IL-1  $\beta$  量を ELISA で測定した (R&D Systems)。組換え型マウス IL-1  $\alpha$ 、IL-1  $\beta$ 、TNF- $\alpha$  およびハムスター抗マウス IL-1  $\alpha$ 、抗マウス IL-1  $\beta$ 、抗マウス TNF- $\alpha$  を Genzyme より購入し、皮膚器官培養系で用いた。

## 3 結果および考察

### 3.1 FITC を用いた接触性皮膚炎モデルの評価

接触性皮膚炎の実験モデルにおいては、いかなる溶媒を用いて動物を感作するかが実験の成否をわける重要なポイントであることが従来より指摘されていた。FITC を抗原として用いたマウス接触性皮膚炎のモデルにおいては、アセトン/フタル酸ジブチル (1:1) を溶媒として用いるのが最適であることが報告されている。まず、この実験モデルにおいて、FITC 自身が抗原性を担っており、溶媒として用いた AD が抗原として相加的に働いてはいないことを確認するため、感作時および惹起時に AD に溶解した FITC、もしくは AD を単独でマウス皮膚に塗布し、耳介を用いた常法にしたがって遅延型過敏症の発症を観察した (図 2)。その結果、感作時および惹起時に FITC が存

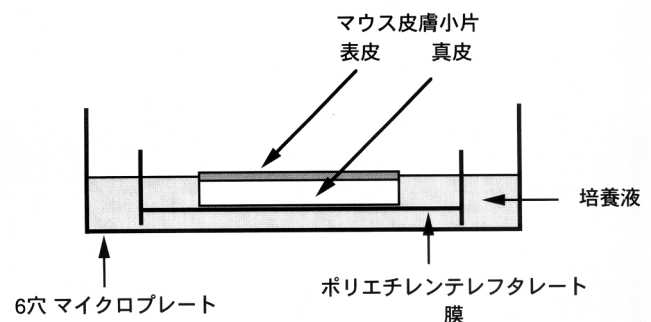


図1 皮膚小片の器官培養法

在しているときにのみ、有意な耳介の膨らみが観測された。FITCの抗原性が確認され、ADの抗原としての貢献度は低いことが示された。

### 3.2 感作時に用いた溶媒中の化学物質の感作成立におよぼす影響

次に、抗原FITCを溶解する溶媒を変えて感作を行い、感作における溶媒の効果を比較検討した。なお、耳介における惹起時の溶媒としては、ADを用いた。免疫系がどの程度強く感作されるのかは、感作に用いた溶媒によって違うことが示された（図3）。従来から知られていたように、

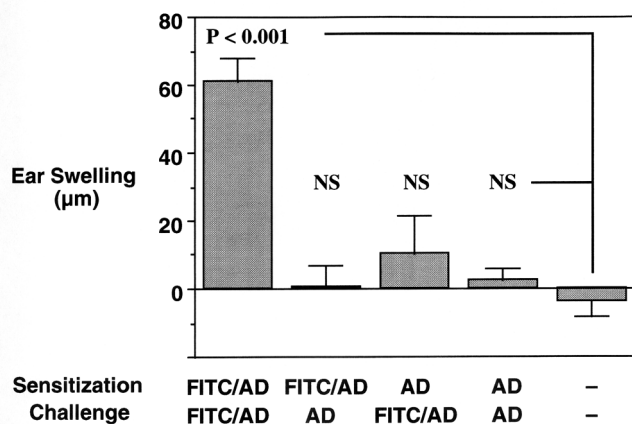


図2 フルオレッセイン（FITC）を抗原として用いたマウス接触皮膚炎モデル。FITCの溶媒としてアセトン／フタル酸ジブチル（AD）を用いている。耳介における遅延型過敏症応答には、感作／惹起ともFITCが必要であり、AD単独では抗原として有効ではない。

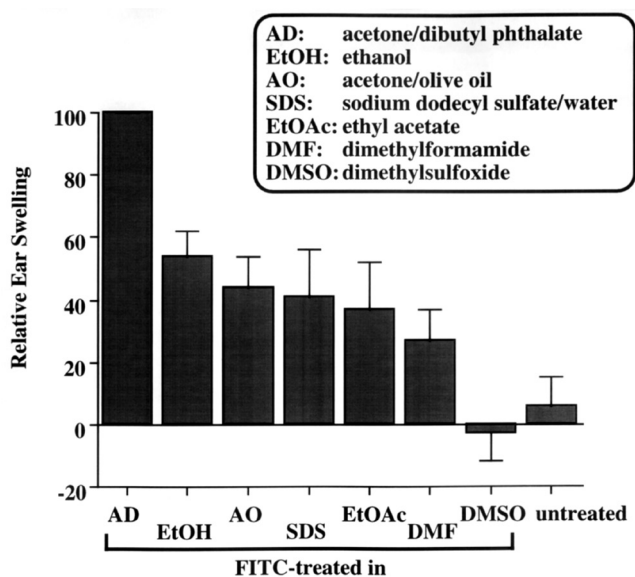


図3 FITCを抗原としたマウス接触皮膚炎モデルにおける溶媒の効果。FITCを様々な溶媒（横軸）に溶解しマウスを感作した。ADに溶解したFITCを耳介に塗布して惹起後、耳介の膨らみを測定した。ADで感作した場合の応答を100として標準化した。

ADが最も有効な溶媒であり、他方DMSOを用いた場合全く感作が成立しなかった。

### 3.3 所属リンパ節におけるMMGL陽性マクロファージの増加

FITCを抗原として経皮的感作に用いる一つの利点は、抗原としてランゲルハンス細胞に取り込まれたFITCを蛍光で容易に追跡できる点である。実際、マウス上腕部にFITCを塗布した24時間後、上腕リンパ節の凍結切片を作製して蛍光顕微鏡下観察すると、リンパ節のT細胞領域にFITCを取り込んだ細胞が観察された。

一方、上腕リンパ節の凍結切片を経時的に作製し、MMGLに対するモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的に検出すると、感作後24時間をピークとして一過性にリンパ節内でMMGL陽性細胞数の増加が観察された。ランゲルハンス細胞は、表皮においてMMGL陰性であるため、この増加したMMGL陽性細胞はランゲルハンス細胞由来ではなく、真皮の組織マクロファージ由来ではないかと考えられたが（この証明は、3.5項参照）、これを支持する別の実験結果として、FITCを保有する細胞のうちMMGL陽性である割合が10%未満に過ぎなかったことがあげられる。このことは、表皮からリンパ節に抗原を運んできた抗原提示細胞（ランゲルハンス細胞／相互連結性樹状細胞）とは独立に、真皮から組織マクロファージの細胞交通が存在することを示唆する。さらに、MMGL陽性細胞の増加がFITCを溶解していないAD単独で起こることがわかった。したがって、この過程は、抗原であるFITCのランゲルハンス細胞への取り込みやプロセッシングとは別の現象としてとらえることが出来る。

### 3.4 リンパ節内のMMGL陽性細胞の増加と抗原感作成立との関係

そこで、様々な溶媒を用いて感作を行なったとき、感作の成立の程度と(1)ランゲルハンス細胞の細胞交通の誘導能および(2)所属リンパ節におけるMMGL陽性マクロファージの一過的増加を比較検討した。その結果、強力に感作を成立させる溶媒（例えばAD）の場合、ランゲルハンス細胞の細胞交通の促進およびMMGL陽性細胞の増加ともに大きいことが判明した。一方、典型的にはSDSの場合であるが、FITCを提示したランゲルハンス細胞の移動は少ない場合でも、ある程度の有効な感作が成立する場合があり、この場合MMGL陽性細胞の増加が顕著に認められることが分かった。

そこで、リンパ節におけるMMGL陽性細胞の増加をリンパ節内のコンパートメントごとに整理して観察し、それをスコア化した。すなわち、(1)T細胞領域（とくに傍皮質とリンパ胞の境界）での分布、(2)皮膚から輸入リン

パ管経由で細胞やリンパ液が入ってくる辺縁洞での分布、(3)未感作の状態において最も MMGL 陽性細胞の密度が高い髄質での分布にわけて整理した。その結果、T 細胞領域で MMGL 陽性細胞の増加がみられること、および髄質で MMGL 陽性細胞の枯渇が起きていないことが有効な感作成立のための条件であることが示唆された(表1)。MMGL 陽性細胞のリンパ節内での分布のスコアの合計点と抗原で惹起した後の耳介の厚さにより評価した感作成立の程度との間には、良好な相関が認められた(図4)。このことは、所属リンパ節において MMGL 陽性細胞を増加させる溶媒中の化学物質の働きが、接触性皮膚炎の感作成立に重要な役割を担っていることを示唆している。

### 3.5 アジュバント活性のある化学物質による皮膚組織マクロファージの細胞交通の誘導：in vivo での証明

所属リンパ節において MMGL 陽性細胞が増加することが、真皮からの組織マクロファージの細胞交通によっていることを証明するために、以下の実験を行った。皮膚から MMGL 陽性細胞を単離し蛍光トレーサーで標識した後、レシピエント動物の皮内に移植し、移植部位より経皮的に感作した。感作 24 時間後に所属リンパ節の凍結切片を作製し、T 細胞領域の任意の視野における蛍光トレーサー陽性細胞の分布密度をレーザー共焦点顕微鏡を用いて計数した(図5)。FITC / AD により経皮的感作を行なうと、所属リンパ節の T 細胞領域に蛍光トレーサー陽性細胞が観察された。抗体を用いた多重染色によって蛍光トレーサー陽性細胞に MMGL が発現していることを確認した。さらに、蛍光トレーサー陽性細胞の出現は、抗原 FITC を加えずに AD のみを塗布した場合にも同様に見られたが、全く感作していない場合には認められなかった。この結果は、真皮から所属リンパ節への MMGL 陽性細胞の細胞交通が、溶媒である AD によって開始されたことを示唆している。

### 3.6 化学物質による組織マクロファージ細胞交通の開始：皮膚局所での証明

真皮の組織マクロファージは、組織中にとどまっておらず、ランゲルハンス細胞の様に移動しないと一般には信じられている。そこで、この常識に反論するためには、皮膚局所で組織マクロファージの移動が AD などの化学物質の塗布によって実際に開始されていることを示す必要がある。

まず、ICR マウスの前肢皮膚に AD を塗布後、皮膚の凍結切片を作製し、MMGL に対するモノクローナル抗体

表1 感作時に用いた様々な溶媒による感作成立の程度と所属リンパ節における MMGL 陽性細胞の皮膚からの移動との関係

| 溶媒    | MMGL 陽性細胞の所属リンパ節での分布 |     |    | Overall Index | 耳介反応の強度<br>(相対値) |
|-------|----------------------|-----|----|---------------|------------------|
|       | T細胞領域(境界)            | 辺縁洞 | 髄質 |               |                  |
| AD    | 3                    | 1   | 1  | 5             | 100              |
| EtOH  | 2                    | 0   | 0  | 2             | 54               |
| AO    | 1                    | 0   | 0  | 1             | 44               |
| SDS   | 2                    | 1   | 0  | 3             | 41               |
| EtOAc | 2                    | 0   | -1 | 1             | 37               |
| DMF   | 1                    | 1   | -2 | 0             | 27               |
| DMSO  | 0                    | 0   | -1 | -1            | -3               |

感作後の所属リンパ節内の MMGL 陽性細胞の分布を免疫組織化学的に評価し、スコア化した。

各部位におけるスコアを合計し、overall index とした。

耳介反応の強度は、抗原 FITC で惹起後の耳介の厚さを相対的に示した。

### Ear Response

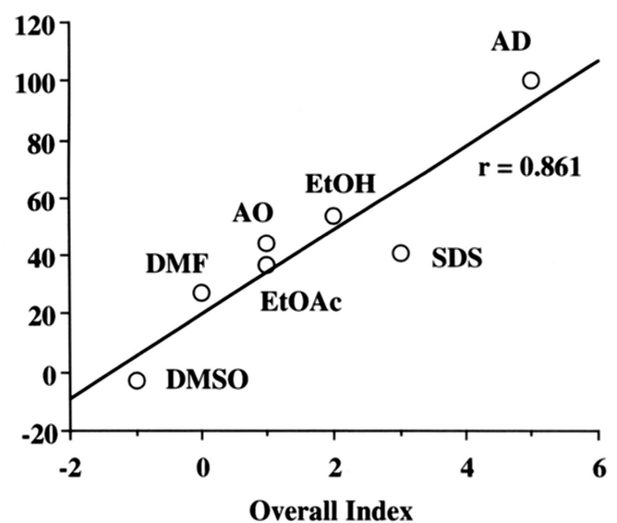


図4 感作時に用いた様々な溶媒による感作成立の程度と所属リンパ節における MMGL 陽性細胞数変動との相関性。リンパ節での MMGL 陽性細胞の存在程度をスコア化した overall index (表1 参照) を横軸にとり、耳介反応の強度(相対値)を縦軸にとって、各溶媒を用いたときの結果をプロットした。各点の近くに、感作時に用いた溶媒の種類を示した。

LOM-14 で免疫組織染色後、MMGL 陽性組織マクロファージの真皮内での分布を調べた。結果をヒストグラムとして整理した(図6)。AD 塗布 4 時間後より、真皮内の MMGL 陽性細胞の分布密度が減少し、8 時間後に最も低密度となった。この変化は可逆的で、24 時間後には AD を塗布する前の状態に復帰した。

次に、真皮からの MMGL 陽性細胞の減少を試験管内で再現することを試みた。すなわち、マウスの腹部皮膚に AD を塗布後、塗布した部位の皮膚を採取し、図1に示した方法によって器官培養した。経時的に皮膚サンプルの凍結切片を作製した後、MMGL 陽性細胞の密度の多い領域(>15%)の数と観察した領域の総数との比率を求めた。すなわち、MMGL 陽性細胞の分布の多い領域の出現頻度を比較したことになる(図7)。その結果、生体内(in vivo)で AD を塗布した場合、24 時間後には塗布以前

トレーサー陽性細胞密度  
(細胞数/200 × 200 μm)

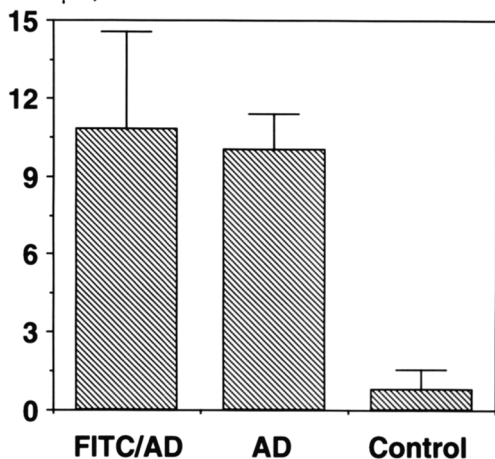


図5 経皮的感作によって誘導された真皮組織マクロファージの所属リンパ節への移動。皮膚より単離した MMGL 陽性マクロファージを蛍光トレーサーで標識し、レシピエントマウスの皮内に移植した。24 時間後、FITC/AD あるいは AD 単独を移植局所の表皮に塗布した。Control は未処置群。所属リンパ節の T 細胞領域内に出現した蛍光トレーサー陽性細胞の密度を縦軸に示した。

の頻度に復帰したが、器官培養によって生体から切り離れた皮膚組織片の場合 (ex-vivo) 分布密度は回復せずに一方的に減少した。このことは、生体内では MMGL 陽性組織マクロファージが常に血液循環によって補充されているが、宿主から切り離れた皮膚片では補充が起こらないためと解釈できる。また、AD を塗布していない皮膚片を器官培養しても、MMGL 陽性細胞の分布密度に変化がなかったことから、この変化が皮膚への AD の塗布によって誘導されたことが明かとなった。

以上の結果より、AD による皮膚への刺激によって真皮から MMGL 陽性細胞の移動が開始されることを、直接皮膚局所の観察によって明らかにすることができた。

### 3.7 化学物質による皮膚組織マクロファージ細胞交通の開始機構

AD のような化学物質が組織マクロファージの移動を開始させる機構の一端を解析した。ランゲルハンス細胞が表皮から所属リンパ節に移動する場合、局所で産生された炎症性サイトカインが関与していることが報告されている。また、ランゲルハンス細胞の所属リンパ節への移動には、ケモカイン SLC

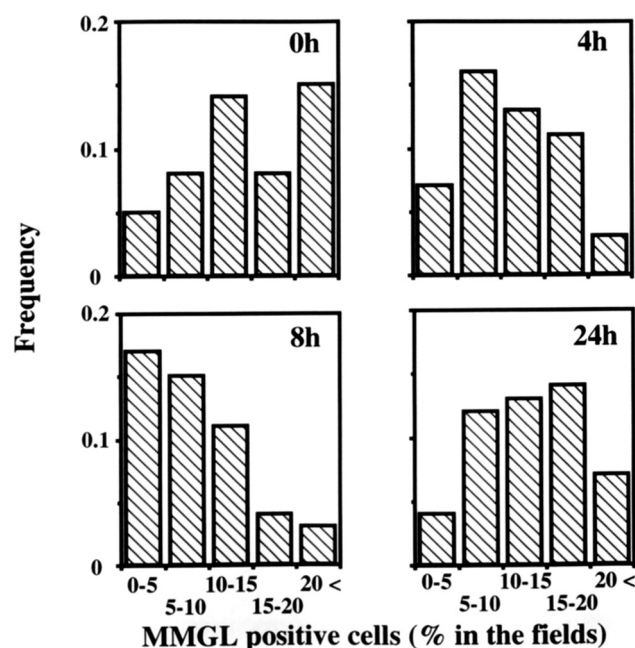


図6 マウス皮膚へのアセトン/フタル酸ジブチル (AD) 塗布後の、MMGL 陽性細胞の真皮中での密度の変化。任意の長方形 (75×95 μm) の領域内の全細胞数に対する MMGL 陽性細胞数の割合を、AD 塗布後の時間経過をおいて調べた。合計 50 領域を計測し、MMGL 陽性細胞の密度についてのヒストグラムを作製した。横軸が、MMGL 陽性細胞の密度、縦軸がその細胞密度を有する領域の出現頻度を表す。AD 塗布後 MMGL 陽性細胞の密度の多い領域 (> 15%) が減少し、24 時間後に塗布前の状態に復帰した。

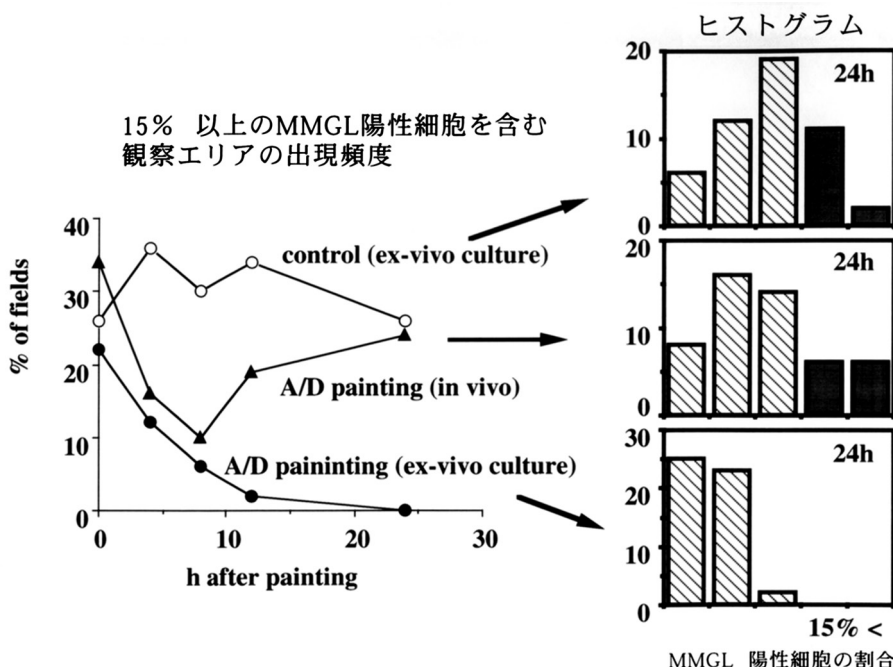


図7 マウス皮膚器官培養による MMGL 陽性細胞密度の変化。AD を塗布した 30 分後 (黒丸)、あるいは未処置 (白丸) のマウスの皮膚を図 1 の方法で器官培養した。経時的に皮膚サンプルを採取し、真皮内の MMGL 陽性細胞の分布を計測した。図 6 と同様な方法でヒストグラムを作製し、AD 塗布後 MMGL 陽性細胞の密度の多い領域 (> 15%) の出現頻度をプロットしてある。比較として、AD をマウスに塗布し、一定時間後に皮膚を採取した場合 (in vivo) を示した (黒三角)。図 7 の右側のヒストグラムは、AD 塗布 24 時間後の MMGL 陽性細胞の密度についての例である。

の関与を示した報告もある。

組織マクロファージの細胞交通の開始における可溶性因子の関与を調べるため、まず、ADを塗布したマウス皮膚を組織培養してその培養上清を回収した。未処置マウスの皮膚器官培養系にAD塗布したマウス皮膚の培養上清を添加し観察すると、培養上清の添加量に応じて真皮のMMGL陽性細胞の分布密度の低下が観察された。次に、培養上清をセントリコンフィルターを用いて分画すると、活性は分子量10,000以上の画分に保持された。このことは、活性の本体がケモカインではなく、それ以外のサイトカインであることを示唆している。さらに、ケモカイン受容体はGタンパク共役型であり百日ぜき毒素によってシグナル伝達が阻害されることが知られているが、AD塗布したマウス皮膚の器官培養系に百日ぜき毒素を共存させても、真皮のMMGL陽性細胞の分布密度の低下を阻止しなかった。

AD塗布したマウス皮膚の器官培養系に炎症性サイトカインに対する抗体を共存させて影響を調べた。抗マウスIL-1 $\alpha$ 、抗マウスIL-1 $\beta$ 抗体の共存によって、AD塗布後の真皮からのMMGL陽性細胞の減少が有意に阻害されたが、対照のハムスターIgGでは影響がなかった(図8)。また、抗マウスTNF- $\alpha$ にも同様に効果が認められた(not shown)。次に、正常マウス皮膚の器官培養で、AD塗布したマウス皮膚の培養上清中の因子の活性を調べる実験系を用いて、抗体の作用を調べた。培養上清の効果は、抗マウスIL-1 $\alpha$ 、抗マウスIL-1 $\beta$ 抗体によって解除された

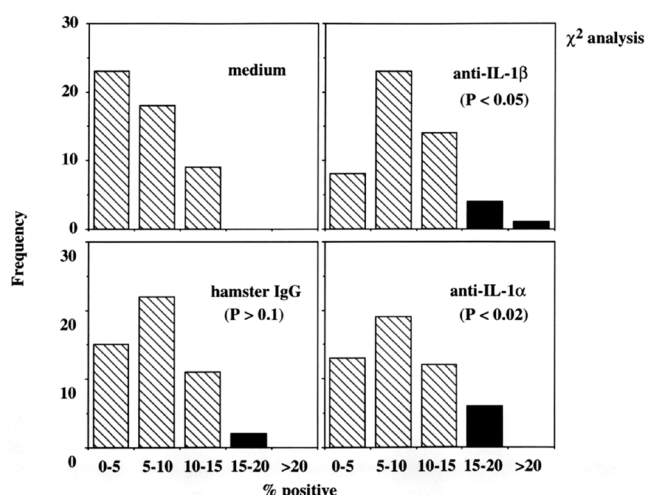


図8 AD塗布マウス皮膚器官培養における抗サイトカイン抗体の効果。ADを塗布したマウスの皮膚を器官培養する時に100 $\mu$ g/mLの抗体を共存させた。24時間後のMMGL陽性細胞の真皮中での密度を図7と同様に求めヒストグラムを作製した。横軸が、MMGL陽性細胞の密度、縦軸がその細胞密度を有する領域の出現頻度を表す。AD塗布後MMGL陽性細胞の密度の多い領域(>15%)が減少するが(medium)、IL-1 $\beta$ やIL-1 $\alpha$ に対する抗体を共存させるとその減少が抑制された。対照のハムスターIgGには効果がなかった。

(図9)。また、抗マウスTNF- $\alpha$ にも同様に効果が認められた(not shown)。さらに、組換え型サイトカインの効果調べた。マウスIL-1 $\alpha$ 、マウスIL-1 $\beta$ 、マウスTNF- $\alpha$ は、正常マウス皮膚の器官培養系において、真皮からのMMGL陽性細胞の減少を誘導した(図10)。

次に、AD塗布マウス皮膚の培養上清に、実際にサイトカインが含まれているかどうかを調べた。ELISAによって、AD塗布したマウス皮膚の培養上清中にIL-1 $\beta$ が検出された(表2)。さらに、ADを塗布した皮膚におけるIL-1 $\beta$ の産生細胞を免疫組織学的に調べると、表皮のランゲルハンス細胞が主要な産生細胞であることがわかった。

これらの観察結果は、ADの塗布によって皮膚局所でIL

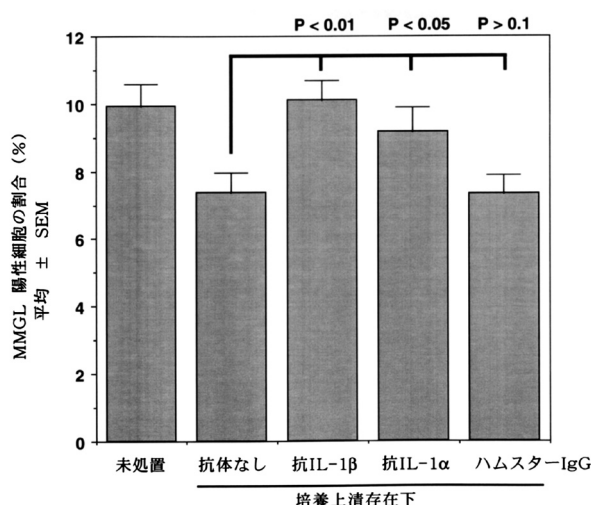


図9 正常マウス皮膚器官培養におけるAD塗布マウス培養上清の効果と、抗体による中和。AD塗布したマウス皮膚を培養し培養上清を作製した。正常マウス皮膚を器官培養する際に培養上清を添加するとともに、サイトカインに対する抗体も共存させた。縦軸に、器官培養24時間後の皮膚片の真皮におけるMMGL陽性細胞の細胞密度の平均値を示した。培養上清添加によって減少したMMGL陽性細胞密度がIL-1 $\beta$ やIL-1 $\alpha$ に対する抗体によって回復したが、対照のハムスターIgGには効果がなかった。

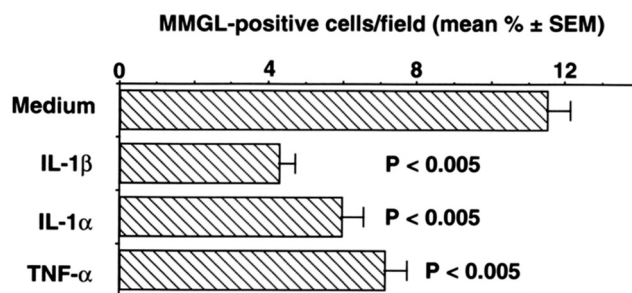


図10 正常マウス皮膚器官培養における炎症性サイトカインの効果。縦軸に、器官培養24時間後の皮膚片の真皮におけるMMGL陽性細胞の細胞密度の平均値を示した。マウスIL-1 $\beta$ 、IL-1 $\alpha$ およびTNF- $\alpha$ は、正常マウス皮膚片の真皮中のMMGL陽性細胞密度を減少させた。

表2 マウス皮膚片培養上清中に検出された IL-1 $\beta$ 

| AD 塗布の方法      | 皮膚器官培養上清中のIL-1 $\beta$ 濃度<br>ng/ml |
|---------------|------------------------------------|
| 未処置           | 0 $\pm$ 0                          |
| マウスに塗布後、皮膚片採取 | 4.5 $\pm$ 2.9                      |
| 採取した皮膚片に塗布    | 0 $\pm$ 0.3                        |

-1 などの炎症性サイトカインが産生され、その作用によって MMGL 陽性マクロファージの移動が開始されることを強く示唆しているが、AD がマクロファージの MMGL 分子の発現自体を細胞レベルで下方調節している可能性を完全には否定できていない。そこで、マウス皮膚から MMGL 陽性細胞を単離し IL-1  $\beta$  存在下で培養した後、細胞を界面活性剤で可溶化した。可溶化した膜タンパク質を電気泳動しウエスタンブロッティングを行った後、mAb LOM-14 を反応させて MMGL を検出した。その結果、IL-1  $\beta$  は、42kDa の MMGL の発現量に細胞レベルでなんら影響を与えないことがわかった。

#### 4. 総 括

皮膚を介した感作において、ランゲルハンス細胞の移動とは別に、真皮内の組織マクロファージが所属リンパ節に移動することを、組織マクロファージ特異的な細胞表面マーカーを用いて明らかにした。この現象は、抗原である FITC を溶解した溶媒中の化学物質によって誘導されることが分かった。また、マクロファージの移動を誘起する能力の高い化学物質は、FITC による抗原感作を強めるアジュバントとして働くことを見出した。皮膚から単離した組織マクロファージを蛍光トレーサーで標識し、細胞移植実験によって細胞が実際に移動することを証明した。さらに、皮膚局所の観察および皮膚片の器官培養によって、溶媒中の化学物質が真皮からマクロファージの移動を開始させることを直接明らかにした。また、マクロファージ移動の開始過程で IL-1 をはじめとした炎症性サイトカインが関与していることを発見した。

本研究により、真皮をはじめとする結合組織性マクロファージの細胞交通が、抗原感作の局面で重要な役割を果たしていることが明かとなり、化学物質のアジュバント作用の発現メカニズムとして重要であると考えている。また、試験管内の皮膚器官培養系は、化学物質アレルギーを誘発あるいは補助する恐れのある化学物質の検索に有用と思われる。

#### (引用文献)

- 1) Imai, Y. and Irimura, T. Quantitative measurement of carbohydrate binding activity of mouse macrophage lectin. *J. Immunol. Methods*, **171**: 23-31, 1994.
- 2) Kimura, T., Imai, Y. and Irimura, T. Calcium-dependent conformation of a mouse macrophage calcium-type lectin. Carbohydrate binding activity is stabilized by an antibody specific for a calcium-dependent epitope. *J. Biol. Chem.*, **270**: 16056-16062, 1995.
- 3) Imai, Y., Akimoto, Y., Mizuochi, S., Kimura, T., Hirano, H. and Irimura, T. Restricted expression of galactose/N-acetylgalactosamine-specific macrophage C-type lectin to connective tissue and to metastatic lesions in mouse lung. *Immunology*, **86**: 591-598, 1995.
- 4) Mizuochi, S., Akimoto, Y., Imai, Y., Hirano, H. and Irimura, T. Unique tissue distribution of a mouse macrophage C-type lectin. *Glycobiology*, **7**: 137-146, 1997.
- 5) Hosoi, T., Imai, Y. and Irimura, T. Coordinated binding of sugar, calcium, and antibody to macrophage C-type lectin. *Glycobiology*, **8**: 791-798, 1998.
- 6) Sato, K., Imai, Y. and Irimura, T. Contribution of dermal macrophage trafficking in the sensitization phase of contact hypersensitivity. *J. Immunol.*, **161**: 6835-6844, 1998.
- 7) Akimoto, Y., Imai, Y., Hirabayashi, J., Kasai, K. and Hirano, H. "Histochemistry and Cytochemistry of Endogenous Animal Lectins" *Progress in Histochem. Cytochem.*, vol. **33**, number 1, Gustav Fischer Verlag, pp. 1-92, 1998.
- 8) Kimura, T., Hosoi, T., Yamamoto, K., Suzuki, N., Imai, Y. and Irimura, T. Epitope mapping of monoclonal antibodies specific for a macrophage lectin: a calcium-dependent epitope is in the carbohydrate recognition domain. *Molec. Immun.* **37**: 151-160, 2000.
- 9) Chun, K-H., Imai, Y., Higashi, N. and Irimura, T. Migration of dermal cells expressing a macrophage C-type lectin during the sensitization phase of delayed-type hypersensitivity. *J. Leukocyte Biol.* **68**: 471-478, 2000.
- 10) Chun, K-H., Imai, Y., Higashi, N. Irimura, T. Involvement of cytokines in the skin-to-lymph node trafficking of cells of the monocyte-macrophage lineage expressing a C-type lectin. *Int. Immunol.* **12**: 1695-1703, 2000.