

サイトカインを指標としたマウスアレルギー性
接触皮膚炎の解析と化学物質スクリーニング
への応用に関する研究

山崎俊介

1999 (平成11年)

サイトカインを指標としたマウスアレルギー性
接触皮膚炎の解析と化学物質スクリーニング
への応用に関する研究

山崎 俊介

1999

目 次

	頁
第1章 緒 言	1
第2章 アレルギー性接触皮膚炎の惹起誘発期における T 細胞と サイトカインについて	4
2-1 実験方法	4
2-1-1 実験動物	
2-1-2 接触皮膚炎の誘導	
2-1-3 抗 CD4 及び抗 CD8 モノクローナル抗体の投与	
2-1-4 RT-PCR 法	
2-1-5 ヘマトキシリン-エオジン染色 (H-E 染色) 並びに CD4 ⁺ 及び CD8 ⁺ 細胞の免疫組織化学的染色	
2-1-6 抗 IFN- γ モノクローナル抗体の投与	
2-2 成 績	10
2-2-1 耳介腫脹の経時的変化	
2-2-2 耳介部の病理組織学並びに免疫組織化学的解析	
2-2-3 抗 CD4 及び抗 CD8 抗体投与群における耳介腫脹の 経時的変化	
2-2-4 耳介部におけるサイトカイン mRNA の発現	
2-3 考 察	17
第3章 アレルギー性接触皮膚炎の感作誘導期における T 細胞と サイトカインについて	20
3-1 実験方法	20

3-1-1	実験動物	
3-1-2	接触皮膚炎の誘導	
3-1-3	RT-PCR 法	
3-1-4	Southern Hybridization 法	
3-2	成績	24
3-2-1	耳介腫脹の経時的変化	
3-2-2	耳介部における CD4 及び CD8mRNA の発現	
3-2-3	耳介部におけるサイトカイン mRNA の発現	
3-3	考察	28
第4章	アレルギー性接触皮膚炎と刺激性接触皮膚炎との サイトカンプロフィールによる比較解析	31
4-1	実験方法	31
4-1-1	実験動物	
4-1-2	接触皮膚炎の誘導	
4-1-3	RT-PCR 法	
4-1-4	Southern Hybridization 法	
4-2	成績	34
4-2-1	各被験物質塗布後の耳介腫脹の経時的変化	
4-2-2	各被験物質塗布 24 時間後における耳介部の サイトカイン mRNA 発現	
4-2-3	Southern Hybridization 法による IL-2 及び IFN- γ mRNA の検出	
4-3	考察	38

第5章	サイトカイン mRNA 発現を指標とした Phenol 系化合物の 感作性評価	40
5-1	実験方法	40
5-1-1	実験動物	
5-1-2	材料	
5-1-3	マウス接触皮膚炎の誘導	
5-1-4	RT-PCR 法	
5-2	成績	43
5-2-1	Phenol 系化合物によるマウスアレルギー性接触皮膚炎 の惹起誘発 24 時間後における耳介腫脹及びサイトカイン mRNA 発現	
5-3	考察	45
第6章	光アレルギー性接触皮膚炎の惹起誘発期における T 細胞サイトカインの mRNA 発現について	47
6-1	実験方法	47
6-1-1	実験動物	
6-1-2	光アレルギー性接触皮膚炎及びアレルギー性 接触皮膚炎の感作誘導及び惹起誘発	
6-1-3	RT-PCR 法	
6-2	成績	51
6-2-1	耳介腫脹の経時的変化	
6-2-2	耳介部局所におけるサイトカイン mRNA 発現	
6-2-3	NIH イメージによるサイトカイン mRNA の 発現強度の解析	

6-3 考 察	56
---------	----

第7章 総括および結論	60
-------------	----

7-1 総 括	60
---------	----

7-2 結 論	65
---------	----

謝 辞	67
-----	----

引用文献	68
------	----

第1章 緒言

接触皮膚炎は単純化学物質（ハプテン）により惹起される最もありふれた皮膚疾患であるが、その皮膚病変の形成に至る過程は非常に複雑である。通常接触皮膚炎は刺激性接触皮膚炎と呼ばれる非アレルギー性機序に基づくものと、アレルギー性接触皮膚炎とに分類されて考えられることが多い。前者においては、化学物質の持つ毒性ないし皮膚刺激性による直接的な作用により皮膚障害が生ずる。後者においては、化学物質がハプテンとしてランゲルハンス細胞と呼ばれる皮膚に分布する樹枝状細胞により T 細胞へ抗原提示され、感作が成立する。

遅延型過敏反応（IV型過敏症）は細胞性免疫反応により抗原再感作後 12 時間以上かかって発現してくる過敏反応の総称であり、接触性過敏反応、ツベルクリン型過敏反応及び肉芽腫形成性過敏反応の3つのタイプが存在するとされている。これら3種の遅延型過敏反応は種々の細胞組織反応を伴っており、皮膚の肥厚の程度や発現までの時間の違い等により見分けられている。その中で、アレルギー性接触皮膚炎は、接触性過敏反応に属する遅延型過敏反応の1つであり、現在、ヒト接触皮膚炎のモデルとして、また基礎的には細胞性免疫の解析モデルとして、主にマウス、モルモットを用いた解析がなされている。

近年、分子生物学の進歩に伴ない、新たなサイトカインのクローニングがあいついでなされ、その生物学的意義が明らかにされつつある。サイトカインは、種々の細胞から分泌される生理活性をもつ高分子のペプチドで、抗体のような特異性をもたないものの総称である。そして生体内で免疫、炎症、造血機構に関与し、その多くは、直接的あるいは間接的に感染や腫瘍に対する生体防御機構において重要な役割を担っている。

一方、CD4 陽性 T 細胞をそのサイトカインプロファイルにより Th1、Th2 サ

ブセットに分類するという概念がマウスにより提唱された¹⁾。この画期的な分類はヒトにおいても活用され、異論はあるものの多くの免疫学者らがこの考えをもとに研究を展開している。これらふたつの Th サブセットはお互いにインターフェロン- γ (IFN- γ) やインターロイキン(IL)-10 などをそれぞれ放出して抑制しあい、免疫応答の調和を保っている。この Th1、Th2 相互反応のバランスの不均衡をある種の免疫疾患では、その病態の基本概念としてとらえることができる。

皮膚科領域においても各種皮膚疾患（特にアレルギー性接触皮膚炎）におけるこれらのサイトカインや細胞接着分子の関与、及び反応メカニズムの解析がさかんにおこなわれている²⁻⁵⁾。そのうち、マウスを用いたアレルギー性接触皮膚炎に関する研究報告⁶⁻¹¹⁾ は数多くあるが、その中で、アレルギー性接触皮膚炎の反応時におけるサイトカインの mRNA 発現及びその動態等を指標としたメカニズム解析は、アレルギー性接触皮膚炎の反応の場の 1 つとして極めて重要な皮膚組織ではなく、多くはアレルギー性接触皮膚炎反応時における（皮膚）局所リンパ節内での解析であり、しかも惹起誘発期における解析が中心となっている。したがってアレルギー性接触皮膚炎の重要な反応の場である皮膚とリンパ節との関連性について、また、アレルギー性接触皮膚炎の反応成立機序については、なお多くの疑問点や未検索の部分が残されている。

そこで著者は化学物質による遅延型アレルギーの発症機構の解明に向けて、マウスアレルギー性接触皮膚炎の皮膚反応局所におけるサイトカインプロファイルを解析し、その特徴を明らかにするとともに、サイトカインを指標とした化学物質による感作性等に対する評価系としての有用性について検討することを目的とし、次に示す 5 つの実験を実施した。

第 1 に、代表的な感作性物質により誘発されるマウスでの、実験的アレルギー性接触皮膚炎の反応局所における T 細胞の関与と、反応局所に発現するサイ

トカインの産生パターンについての解析を行なった。第2に、アレルギー性接触皮膚炎の惹起誘発期 (elicitation phase) と同様に感作誘導期 (induction phase)での解析を数種の感作性物質を用いて比較解析した。第3に、感作性物質と刺激性物質とをサイトカイン産生パターンにより比較解析した。第4に、実際にアレルギー性接触皮膚炎発症に関与する一般的な化学物質のうち生理活性の比較的高い phenol 系化合物の感作性についてサイトカインmRNA 発現を指標に解析した。第5に原因となる光増感剤が外来性に直接皮膚に接触し、同時に作用波長域の光が照射されることにより発生する光アレルギー性接触皮膚炎について、アレルギー性接触皮膚炎と比較しながら、同様に反応局所でのサイトカイン発現パターンについて解析を試みた。

第2章 アレルギー性接触皮膚炎の惹起誘発期における T 細胞とサイトカインについて

アレルギー性接触皮膚炎は、種々の化学物質、金属等により誘発される皮膚炎であり^{1,2)}、ヒト及び動物においても皮膚科領域では重要な疾患であり、多くの化学物質についてその誘発性を検討するため実験動物を用いた安全性試験がなされている。本症の病態に関しては Asherson ら^{1,3)}を始めとし、マウスでの実験モデルにおいて多くの解析がなされている。近年、その成立機序については、化学物質の再感作に伴い皮膚のケラチノサイト、ランゲルハンス細胞等から産生されるサイトカインが、病変形成に重要であるとの報告がなされている^{2,3,7)}。しかし、それらの報告の多くはアレルギー性接触皮膚炎反応時の皮膚局所リンパ節内での解析が中心となっている。そこで本研究では、2,4-dinitrofluorobenzene(DNFB;和光純薬工業株式会社製)により誘発される、マウスでの実験的アレルギー性接触皮膚炎の惹起誘発期の反応局所における T 細胞の関与と、発現されるサイトカインの産生パターンについて解析し、その特徴を明らかにした。

2-1 実験方法

2-1-1 実験動物

近交系 BALB/c 系 SPF マウス (BALB/cAnNCrj) の雌、7 週齢を日本チャールス・リバー株式会社より購入し、実験に用いた。なお、実験期間中の飼育条件として、温度は $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度は $55 \pm 10\%$ 、固形飼料 (CE-2、日本クレア株式会社) 及び飲料水 (小田原市営水道水、自動給水装置を使用) を自由に摂取させた。

2-1-2 接触皮膚炎の誘導

Fig. 2-1 はマウスの DNFB によるアレルギー性接触皮膚炎の誘導とその評価法について示す。Day0 に DNFB の感作誘導（背部毛刈後塗布）を、Day5 に抗原による惹起誘発（両耳介部塗布）を施した。DNFB の感作濃度及び投与量については、感作誘導濃度を 0.5% とし 100 μ l を背部に塗布し、惹起誘発濃度を 0.2% とし 20 μ l を耳介部へ塗布した。また、各々の溶媒は、アセトン：オリーブ油 (4:1) とした。惹起誘発後 24 及び 48 時間の両耳介の厚さを dial tickness gauge (Peacock 社製) を用いて測定し、惹起誘発前 (0 時間) との差を耳介腫脹 (ear swelling) とし、それを平均値 \pm S.D. (10^{-3} cm) で表示した。実験動物は惹起誘発前 (0 時間)、惹起誘発 24 及び 48 時間後で各々 5 匹ずつ合計 15 匹を使用した。なお、全ての統計処理は、2 群間の差を T 検定 (T-test) により実施した。

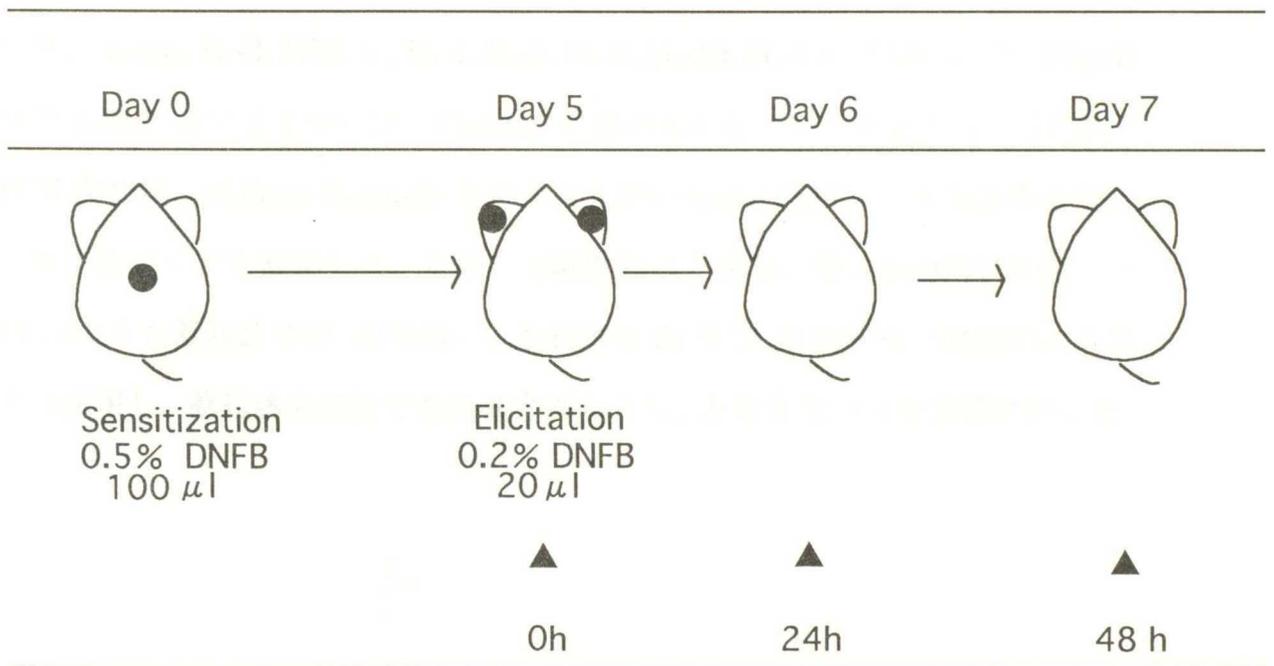


Fig. 2 - 1 Experimental System .
▲; Measurement of ear swelling

2-1-3 抗 CD4 及び抗 CD8 モノクローナル抗体の投与

抗 CD4 (clone GK 1.5)、抗 CD8 (clone YTS 169.4) 及びラットモノクローナル抗体 (IgG) を、惹起誘発 3 日前より 3 日間連続して、0.2mg/1day 静脈内投与した。また、対照群には rat-IgG を同量投与した。なお、実験動物は抗 CD4 抗体処理群、抗 CD8 抗体処理群及び対照群ともに各々 5 匹を 1 群とした。

2-1-4 RT-PCR 法

Reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR)法は Fig. 2-2 に示すとおりである。惹起誘発前 (0 時間)、24 及び 48 時間後の左耳介部を採取し、4M guanidine thiocyanate buffer を 1.0ml 加えて組織をホモジナイズ後、常法に従い total RNA を抽出し、続いて RNA 2 μ g を鋳型として、M-MLV-revers transcriptase (Gibco BRL)を用いて cDNA を合成した。PCR は、94°C 1 分、60°C 2 分、72°C 3 分の条件下で、25cycle 増幅を行なった。PCR に使用した β -actin、IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-1 β 、TNF- α 、IL-12(p35 及び p40)の各プライマーは、Clontec 社製のものを用いた(Fig.2-3)。得られた PCR 産物は、etidium bromide を加えた 1.5% agarose gel にて電気泳動を行い、出現するバンドを確認した。なお、実験動物は、接触皮膚炎誘導時に使用した 15 匹のうち惹起誘発前 (0 時間)、惹起誘発 24 及び 48 時間後と経時的に 5 匹ずつ使用し、惹起誘発部位である耳介部のうち、左耳介部のみを実験に供した。

Fig. 2-2 RT-PCR Method.

RNA isolation from Skins

Ear were placed in 1.0 ml 4M guanidium isothiocyanate buffer

↓

Homogenized

↓

Phenol/Chloroform extraction

↓

Isopropanol precipitation

↓

EtOH precipitation

↓

Total RNA

cDNA synthesize

cDNA was synthesized from RNA pellet resolved in DEPC water by a 1 hr incubation at 43°C with AMV reverse transcriptase and poly-dT priming, and used for PCR amplification

PCR amplification

Use 2 μ l cDNA for PCR

↓

The PCR mixture contained 10mM Tris-HCl(pH9.0), 50mM KCl, 2.5mM MgCl₂, 2mM dNTP, 1 μ M 5' and 3' end primers, 2.5 μ Taq polymerase to a final volume to 25 μ l

↓

PCR was performed in a DNA thermal cycler for 25cycles : 1min denaturation at 94°C, 2min annealing at 60 °C, and 3min extension at 72°C

↓

An aliquot of PCR product was electrophoresed on 1.5% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining

Fig. 2 - 2 RT-PCR Method.

PRODUCT	SEQUENCE		SIZE(bp)
β -actin	5'primer 3'primer	5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3' 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'	349
IL-1 β	5'primer 3'primer	5'-TCA TGG GAT GAT GAT GAT AAC CTG CT-3' 5'-CCC ATA CTT TAG GAA GAC ACG GAT T-3'	502
IL-2	5'primer 3'primer	5'-ATG TAC AGC ATG CAG CTC GCA TC-3' 5'-GGC TTG TTG AGA TGA TGC TTT GAC A-3'	502
IL-4	5'primer 3'primer	5'-ATG GGT CTC AAC CCC CAG CTA GT-3' 5'- GCT CTT TAG GCT TTC CAG GAA GTC-3'	399
IL-5	5'primer 3'primer	5'-ATG AGA AGG ATG CTT CTG CAC TGG A-3' 5'-GTC ACC ATG GAG CAG CTC AGC C-3'	424
IL-6	5'primer 3'primer	5'-ATG AAG TTC CTC TCT GCA AGA GAC T-3' 5'-CAC TAG GTT TGC CGA GTA GAT CTC-3'	638
IL-10	5'primer 3'primer	5'-ACC TGG TAG AAG TGA TGC CCC AGG CA-3' 5'-CTA TGC AGT TGA TGA AGA TGT CAA A-3'	237
IL-12 (p35)	5'primer 3'primer	5'-GCA AGA GAC ACA GTC CTG GG-3' 5'-CTG CAT CAG CTC ATC GAT GG-3'	618
IL-12 (p40)	5'primer 3'primer	5'-CAG AAG CTA ACC ATC TCC TGG TTT G-3' 5'-TCC GGA GTA ATT TGG TGC TTC ACA C-3'	396
IFN- γ	5'primer 3'primer	5'-TGA ACG CTA CAC ACT GCA TCT TGG-3' 5'-CGA CTC CTT TTC CGC TTC CTG AG-3'	460
CD4	5'primer 3'primer	5'-TGT GCC GAG CCA TCT CTC TTA GG-3' 5'-GCA CTG AGA GTG TCA TGC CGA AC-3'	615
CD8	5'primer 3'primer	5'-ATG CAG CCA TGG CTC TGG CTG G-3' 5'-GCA TGT CAG GCC CTT CTG GGT C-3'	513
TNF α	5'primer 3'primer	5'-GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C-3' 5'-ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G-3'	310

Fig. 2 - 3 PCR PRIMERS SEQUENCES.

2-1-5 病理組織学的検索並びに、CD4⁺T 細胞及び CD8⁺T 細胞の免疫組織化学的染色

マウスの耳介部を惹起誘発前 (0 時間) 及び、惹起誘発後に経時的に採取し、**optimum cutting temperature compound** で包埋し、クリオスタットにて 5 μ m の凍結切片を作成した。その後、常法に従って H-E 染色並びに、凍結切片上で抗 CD4 モノクロナール抗体 (clone 012AP)、抗 CD8 モノクロナール抗体 (clone 169AP) を各々反応させ、ストレプトアビジン-ビオジン法 (LSAB キット、DAKO 社製) により陽性細胞を確認した。なお、実験動物は RT-PCR 法による解析で使した動物と同一であり、その際、右耳介部を実験に供した。

1-1-6 抗 IFN- γ ラットモノクロナール抗体の投与

抗 IFN- γ ラットモノクロナール抗体 (clone R4-6A2) を、DNFB による惹起誘発 2 時間前及び惹起誘発 6 時間後に 1mg/0.2ml 静脈内投与した。また、対照群には rat-IgG を同量投与した。なお、実験動物は抗 IFN- γ 抗体処理群及び対照群ともに各々 5 匹を 1 群とした。

2-2 成績

2-2-1 耳介腫脹の経時的变化

0.5%DNFB をマウス背部皮膚に感作誘導し、5 日目に 0.2%DNFB を両耳介部に惹起誘発を行い、経時的に耳介腫脹を測定した (Fig. 2-4)。その結果、耳介腫脹は惹起 24 時間後にピークとなり、48 時間後においても継続していた。

2-2-2 耳介部の病理組織学並びに免疫組織化学的解析

H-E 染色による病理組織学的検索 (Fig. 2-4) では、DNFB 惹起誘発直前に採取した耳介部の組織には、著変を認めなかった。惹起誘発 24 時間後においては、角質の剥離、表皮の肥厚、表皮の細胞間浮腫が顕著であり、真皮においては一部好中球も認められるが、リンパ球を中心とした円形細胞浸潤が顕著であった。惹起誘発 48 時間後においては、表皮は壊死し、真皮においてはリンパ球を主体とした円形細胞浸潤が惹起誘発 24 時間後よりも顕著となった。抗 CD4 抗体 (Fig.2-5) 及び抗 CD8 抗体 (Fig.2-6) を用いた免疫組織化学的染色を行った結果、DNFB による惹起誘発直前に採取した耳介部組織では、CD4⁺細胞、CD8⁺細胞はほとんど認められなかった。惹起誘発 24 時間後においては、真皮上層から中層に CD4⁺T 細胞が認められ、深いところでは筋層内にも存在しており、CD8⁺T 細胞は真皮上層に瀰慢性に認められた。惹起誘発 48 時間後においては、CD4⁺T 細胞はさらに顕著に認められ、CD8⁺T 細胞は真皮上層から中層に認められた (また、各組織像において皮脂腺や毛胞部等に偽陽性反応も認められた)。

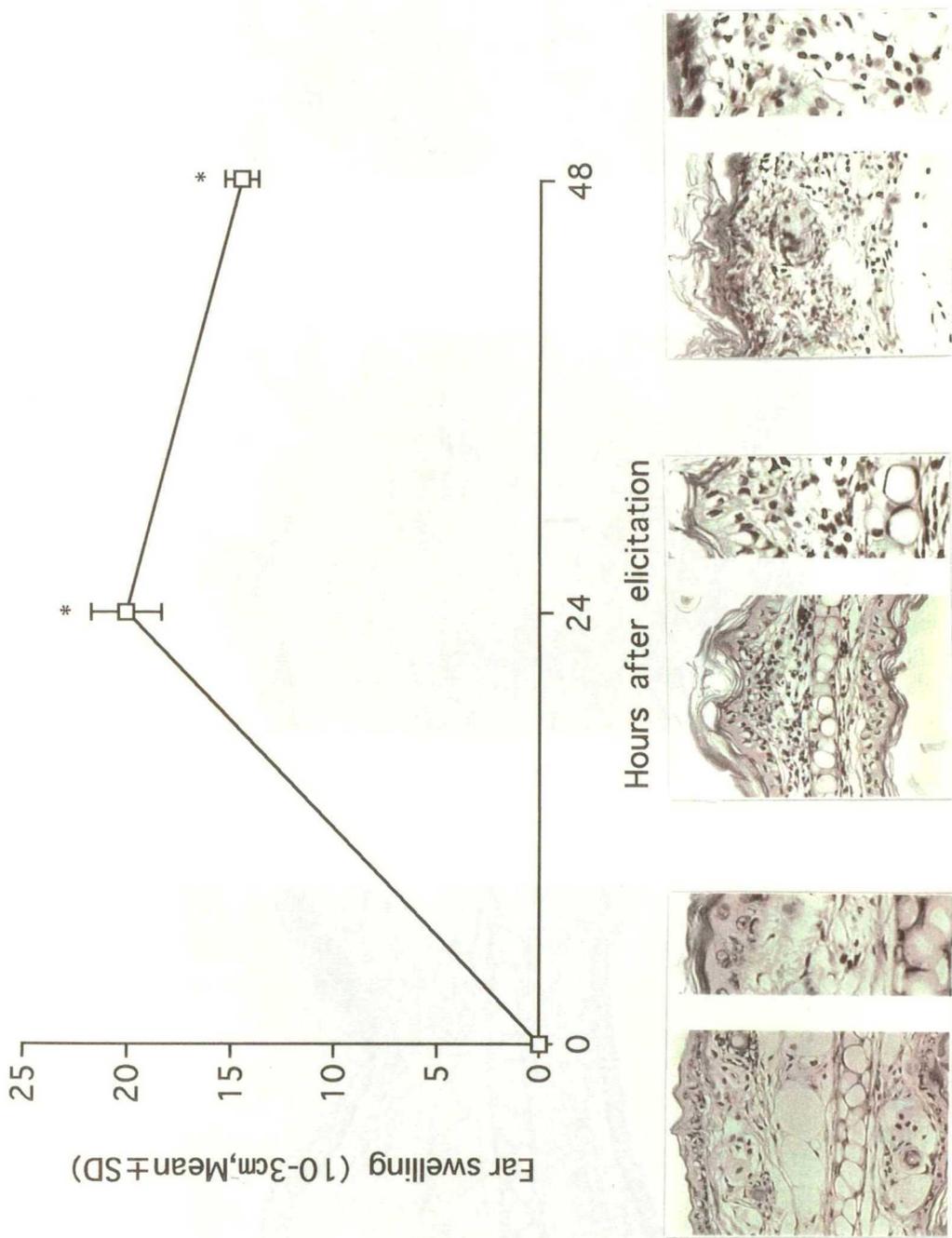
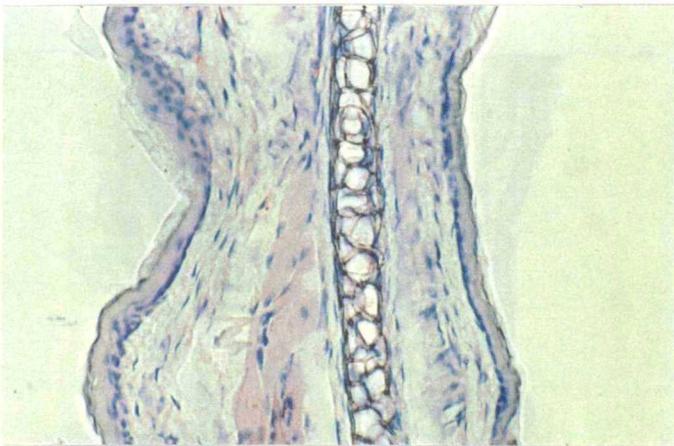


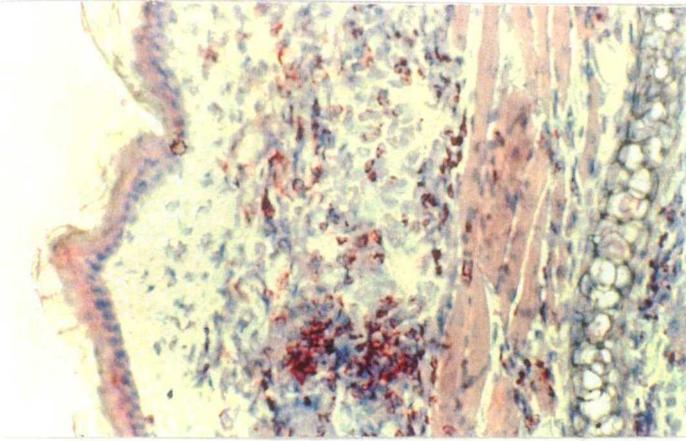
Fig. 2 - 4 Ear swelling response induced by DNFB.

The statistically significant ear swellings were noted in sensitized mice as compared with no treatment.

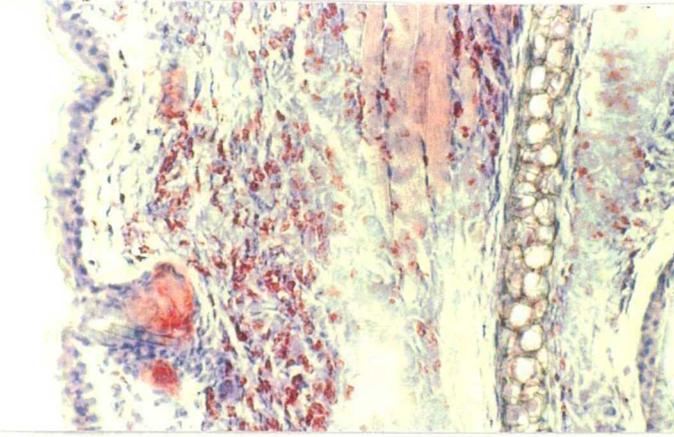
* : $P < 0.001$



0 h

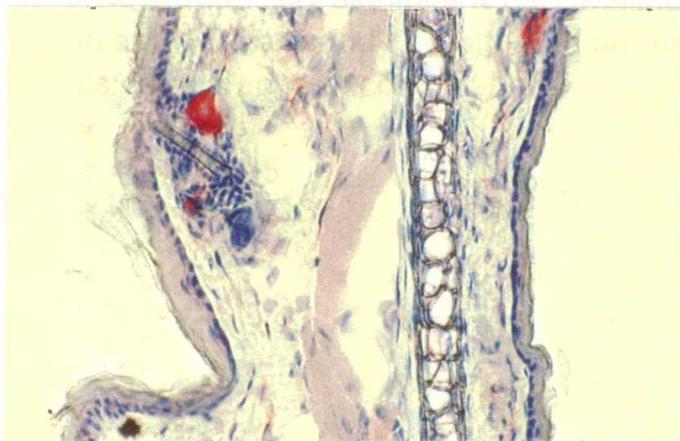


24 h

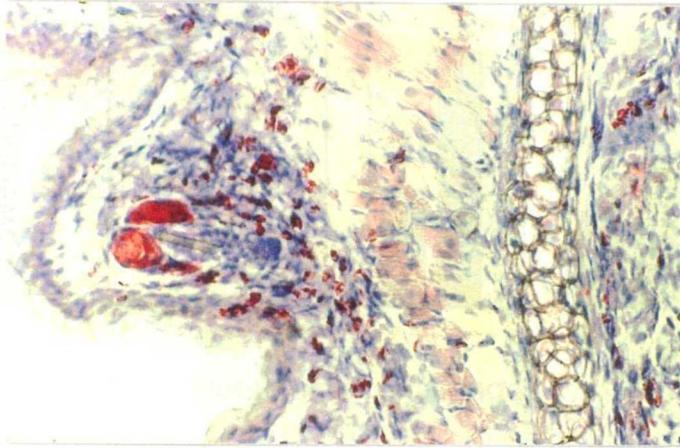


48 h

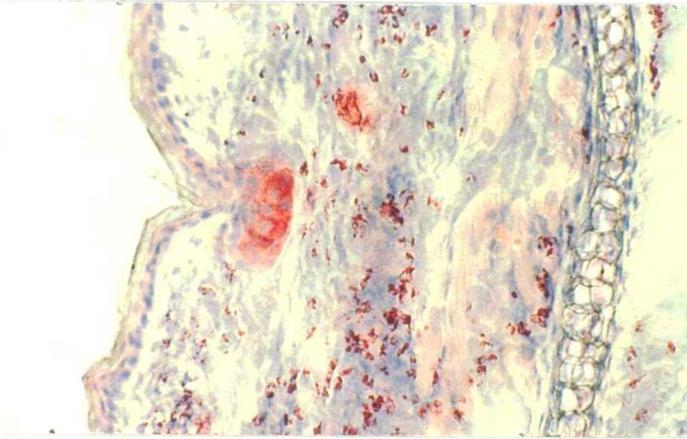
**Fig. 2 - 5 The reactive lymph node stained with L3/T4 (CD4).
(x 100)**



0 h



24 h



48 h

**Fig. 2 - 6 The reactive lymph node stained with Ly-2 (CD8a).
(x100)**

2-2-3 抗 CD4 及び抗 CD8 抗体投与群における耳介腫脹の経時的変化

抗 CD4 及び抗 CD8 抗体を投与した結果、投与群は対照群に比べて耳介腫脹が抑制された (Fig. 2-7)。

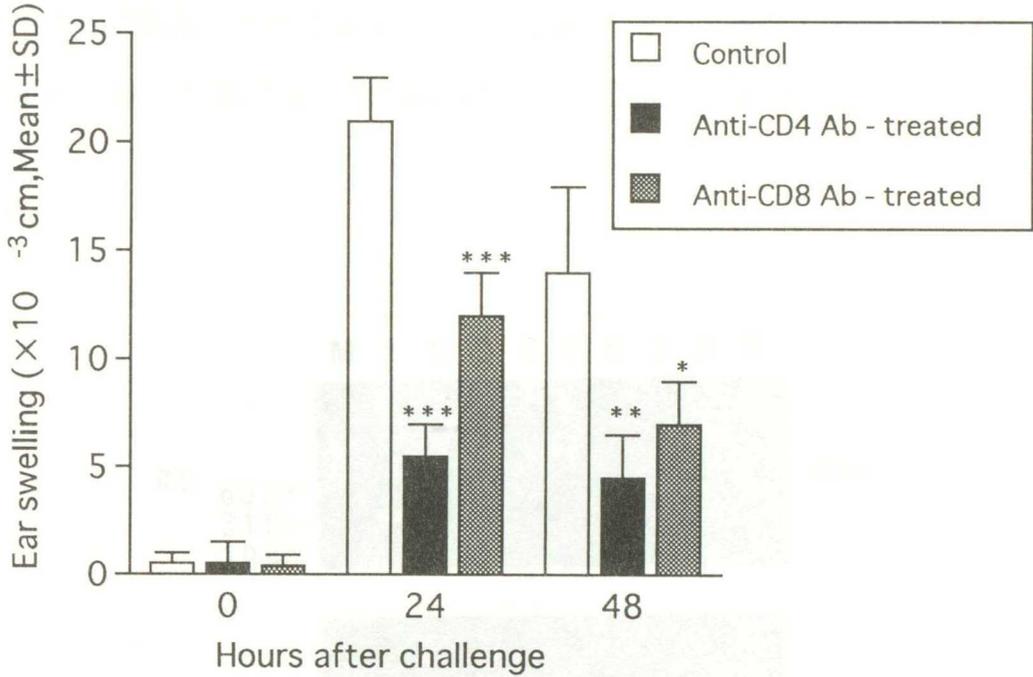


Fig. 2 - 7 Effect of antibody (Ab) treatment on allergic contact dermatitis .

The statistically significant ear swellings were noted in anti-CD4 antibody or anti-CD8 antibody treated mice as compared with control.

- * : P<0.1
- ** : P<0.05
- *** : P<0.001

Fig. 2-8 Expression of mRNA in the ear after challenge with DNCB. Lane 1, β-actin; 2, IL-2; 3, IL-4; 4, IL-5; 5, IL-6; 6, IL-7; 7, IL-8; 8, IL-9; 9, IL-10; 10, IL-12.

2-2-4 耳介部におけるサイトカイン mRNA の発現

惹起誘発直前 (0 時間) ではいずれもサイトカイン mRNA の発現は認められなかった。惹起誘発 24 時間後の耳介腫脹を伴う炎症反応局所において、IFN- γ 、IL-6、IL-1 β の mRNA の発現が認められた。惹起誘発 48 時間後の反応局所では、24 時間後に認められた IFN- γ 、IL-6 及び IL-1 β に加え、IL-2、IL-4 及び TNF- α の mRNA の発現が認められた (Fig. 2-8)。また、惹起誘発 24 及び 48 時間後において IL-12p35 の mRNA の発現が認められた (Fig. 2-9)。

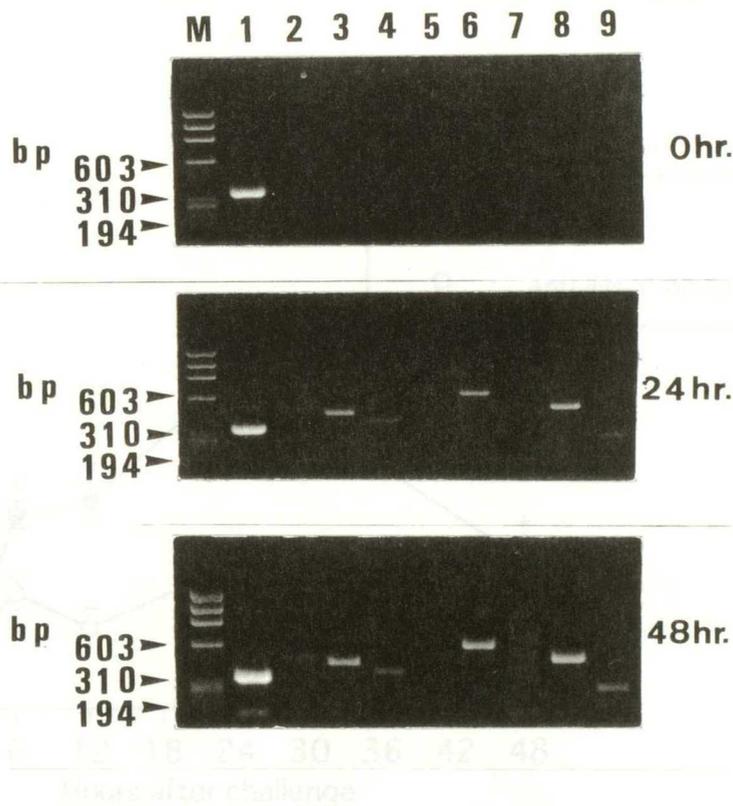


Fig. 2 - 8 Cytokine mRNA expression in the ear after elicitation.

M, Marker; Lane1, β -actin; 2, IL-2; 3, IFN- γ ;
4, IL-4; 5, IL-5; 6, IL-6; 7, IL-10; 8, IL-1 β ;
9, TNF- α

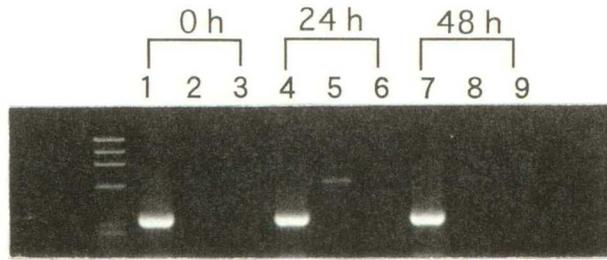


Fig. 2 - 9 IL-12 mRNA expression in the ear after elicitation.

Lanes 1,4,7 : β actin
 Lanes 2,5,8 : IL-12 p35
 Lanes 3,6,9 : IL-12 p40

2-2-5 抗IFN- γ 抗体投与群における耳介腫脹の経時的変化

抗IFN- γ 抗体投与群は、対照群と比較して耳介腫脹が顕著に抑制された (Fig. 2-10)。

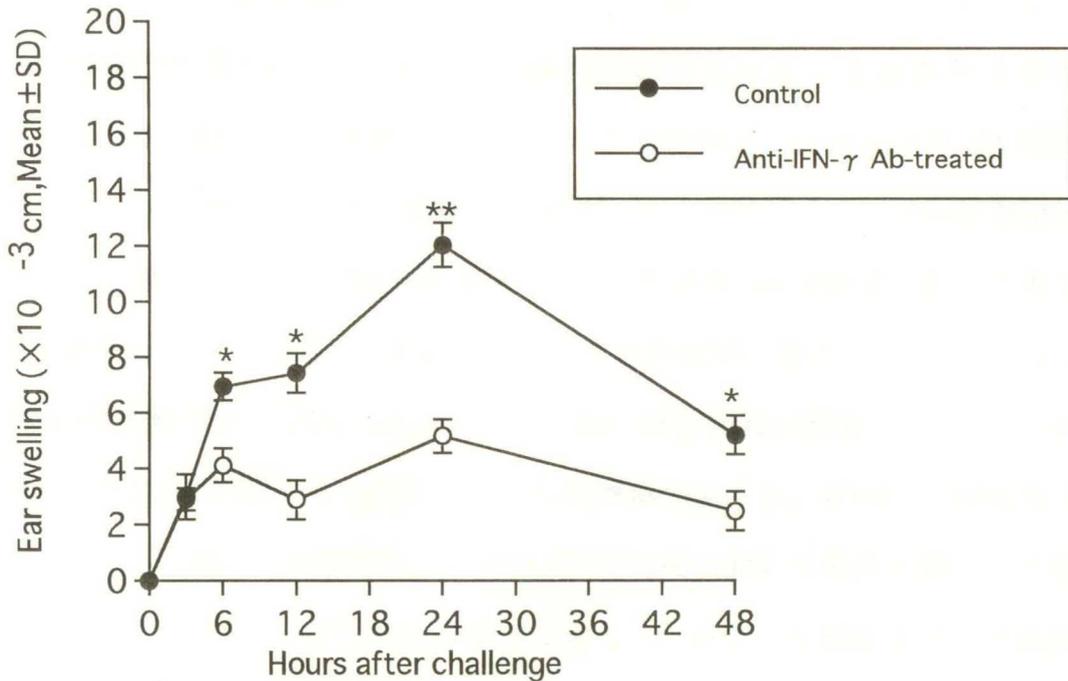


Fig. 2 - 10 Effect of antibody(Ab) treatment on allergic contact dermatitis.

The statistically significant ear swellings were noted in anti IFN- γ antibody treated mice as compared with control. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.001$

2-3 考 察

アレルギー性接触皮膚炎は動物を用いて比較的容易に起こすことが可能なことより、近年その研究が急速に進み、ランゲルハンス細胞の役割、遺伝支配、T細胞の抗原認識機構などが明らかになりつつある。しかし、その反応成立機序については、明解な説明のなされていないのが現状である。近年の免疫学、分子生物学の進歩に伴い、新たなサイトカインのクローニングが次々となされている。皮膚科領域においても、従来では解析することが困難であった複雑な反応局所での病的反応も、サイトカンや細胞接着分子等の解析が進展するにつれ、解明されつつある¹⁴⁻¹⁶⁾。

本研究で、著者は、Nakano¹⁷⁾により報告された感作性物質のうち、DNFBを用いたマウスでのアレルギー性接触皮膚炎の実験系で、反応局所でのT細胞とサイトカインの病変形成における関与について検討した。マウスにおけるアレルギー性接触皮膚炎はDNFBにより感作誘導(背部塗布)と惹起誘発(耳介部塗布)を行い、経時的に耳介腫脹を測定した。耳介腫脹反応は惹起誘発24時間後に最大となり、48時間後まで継続しており、その反応パターンは遅延型過敏症のそれと一致した。病理組織学的検索では、惹起誘発24時間後において表皮の肥厚、真皮においてはリンパ球を中心とした細胞浸潤が認められた。さらに、惹起誘発48時間後では真皮におけるリンパ球の細胞浸潤が顕著となった。免疫組織化学的染色を行なった結果、これら浸潤細胞のうち、CD4⁺T細胞及びCD8⁺T細胞の浸潤は、惹起誘発24及び48時間後において真皮上層から中層に認められた。さらに、抗CD4及び抗CD8モノクローナル抗体をマウスに投与し、耳介腫脹を測定したところ、両者において著しい反応抑制が認められた。抗CD8抗体投与群においても抑制反応が認められたが、抗CD4抗体投与群がより顕著に抑制された。よって、アレルギー性接触皮膚炎の反応成立にはCD4⁺T細胞はもとよりCD8⁺T細胞の関与も重要であると考えられた。

Stephen ら¹⁸⁾ はアレルギー性接触皮膚炎について各種抗体処理マウスを用いて検討した結果、L3/T4a (CD4⁺) 細胞がアレルギー性接触皮膚炎の反応成立に極めて重要であることを報告しており、アレルギー性接触皮膚炎は末梢 T 細胞集団のうち、MHC クラス II 拘束性である CD4⁺T 細胞に極めて依存性の高い免疫応答であることが示された。そこで皮膚病変局所において、主に CD4⁺T 細胞より産生されるサイトカインを RT-PCR 法にて解析を行なった。マウスの惹起誘発直前での反応局所においては、いずれのサイトカイン mRNA 発現も認められなかった。しかし、病変形成に伴って IL-2 及び IFN- γ といった Th1 型サイトカイン、IL-4 及び IL-6 といった Th2 型サイトカイン、IL-1 β 及び TNF- α といったモノサイト系の炎症性サイトカイン (モノカイン) の mRNA 発現が認められた。これらに加えて、IL-12p35 の発現も病変形成に伴って認められた。IL-12 はヘルパー T 細胞から Th1 細胞へ機能的分化を促進し、Th1 細胞を活性化し、IFN- γ 産生の増強誘導が認められるとの報告¹⁹⁾ がある。そこで、アレルギー性接触皮膚炎反応局所で産生される IFN- γ の役割を、抗 IFN- γ 抗体により中和させることによる耳介腫脹への関与について検討した結果、対照群に比べて反応の顕著な抑制が認められた。IFN- γ は、T リンパ球のうち Th1 亜集団により産生されるサイトカインであること¹⁾、さらにはマウスでの IFN- γ 及び IL-2 産生 T 細胞クローンの移入によりアレルギー性接触皮膚炎が成立するとの報告²⁰⁾ からも、アレルギー性接触皮膚炎は Th1 優位な反応であるといえ、反応成立には Th1 型サイトカインのうち、特に IFN- γ の皮膚組織内における発現が極めて重要であることが確認された。一方、Hatao ら²¹⁾ による modified local lymph node assay では、感作性物質投与後、所属リンパ節より IL-2 を特異的に検出している。また、Asada ら²²⁾ は TNCB による接触過敏反応の惹起誘発期における反応局所において IFN- γ 及び IL-4 mRNA の発現が著明に増加することを確認しており、これらの実験的事実は本実験結果と一致する。

アレルギー性接触皮膚炎反応成立の際、生体側で重要であるのはアレルギー性接触皮膚炎に関与する細胞（抗原提示細胞及びTリンパ球）とアレルギー性接触皮膚炎が演じられる場（皮膚及びリンパ節）であると考えられる。したがって、アレルギー性接触皮膚炎反応時のリンパ節内におけるサイトカインの動態についての解析結果に、今回のような反応局所より発現するサイトカインについての解析、及びそれらを産生するT細胞を同定し整理することは、アレルギー性接触皮膚炎反応時の反応局所における免疫応答及び皮膚とリンパ節との関連性を追求する際に極めて重要であると思われる。

本解析により、アレルギー性接触皮膚炎の惹起誘発期の反応局所においてはTh1型サイトカインmRNA発現が優位であること、また、特にIFN- γ の皮膚組織内におけるmRNA発現が重要であり、CD4⁺T細胞のみならずCD8⁺T細胞の関与が必要であることが示された。

第3章 アレルギー性接触皮膚炎の感作誘導期における T 細胞とサイトカインについて

第2章において、アレルギー性接触皮膚炎の反応成立には、惹起誘発期の反応局所において、T細胞の中でもCD4⁺T細胞及びCD8⁺T細胞の関与がともに必要であり、また、Th1型サイトカイン（特にIFN- γ ）のmRNA発現が重要であることを明らかにした。現在までのアレルギー性接触皮膚炎についての研究は、アレルギー性接触皮膚炎の惹起誘発期についてなされたものが多く、感作誘導期についての検索、特に炎症反応成立時に重要な化学伝達物質の1つであるT細胞性サイトカイン類の動態についての解析は少ない。そこで本章では、代表的な感作性物質のうち、DNFB及びpicryl chloride(PCL;和光純薬工業株式会社製)の感作誘導の有無により認められる反応、すなわち感作誘導期と惹起誘発期とを比較解析し、各々の相違点を明確にすることを目的として検討を行った。比較解析は、反応局所におけるサイトカインの産生をmRNAを指標として行なった。

3-1 実験方法

3-1-1 実験動物

近交系BALB/c系SPFマウス(BALB/cAnNCrj)の雌、7週齢を日本チャールス・リバー株式会社より購入し、実験に用いた。なお、実験期間中の飼育条件として、温度は22 \pm 2 $^{\circ}$ C、湿度は55 \pm 10%、固形飼料(CE-2、日本クレア株式会社)及び飲料水(小田原市営水道水、自動給水装置を使用)を自由に摂取させた。

3-1-2 接触皮膚炎の誘導

Fig.3-1 はマウスのDNFB及びPCLによる接触皮膚炎の誘導法の実験計画

を示す。Day 0 に PCL、また Day 1 に DNFB の感作誘導（背部刈毛後塗布）を各々施し、Day 6 に抗原による惹起誘発（両耳介部塗布）を施した感作マウスを感作誘発群（惹起誘発群）とし、Day 6 に惹起誘発のみを施した未感作マウスを各々の1回塗布群（感作誘導群）とした。

感作濃度及び投与量については、感作誘導濃度を DNFB は 0.5%、PCL は 7.0%の各々を 100 μ l ずつ背部に塗布し、惹起誘発濃度を DNFB は 0.2%、PCL は 0.5%の各々を 20 μ l ずつ耳介部へ塗布した。また、各々の溶媒は、アセトン：オリブ油（4:1）とした。惹起誘発 3、6、12、24 及び 48 時間後の両耳介の厚さを dial thickness gauge を用いて測定し、惹起誘発前（0 時間）との差を耳介腫脹（ear swelling）とし、それを平均値 \pm S.D.（ 10^{-3} cm）で表示した。実験動物は各時間毎に惹起誘発群及び感作誘導群ともに 5 匹ずつ合計 60 匹を使用した。なお、全ての統計処理は、2 群間の差を T 検定（T-test）により実施した。

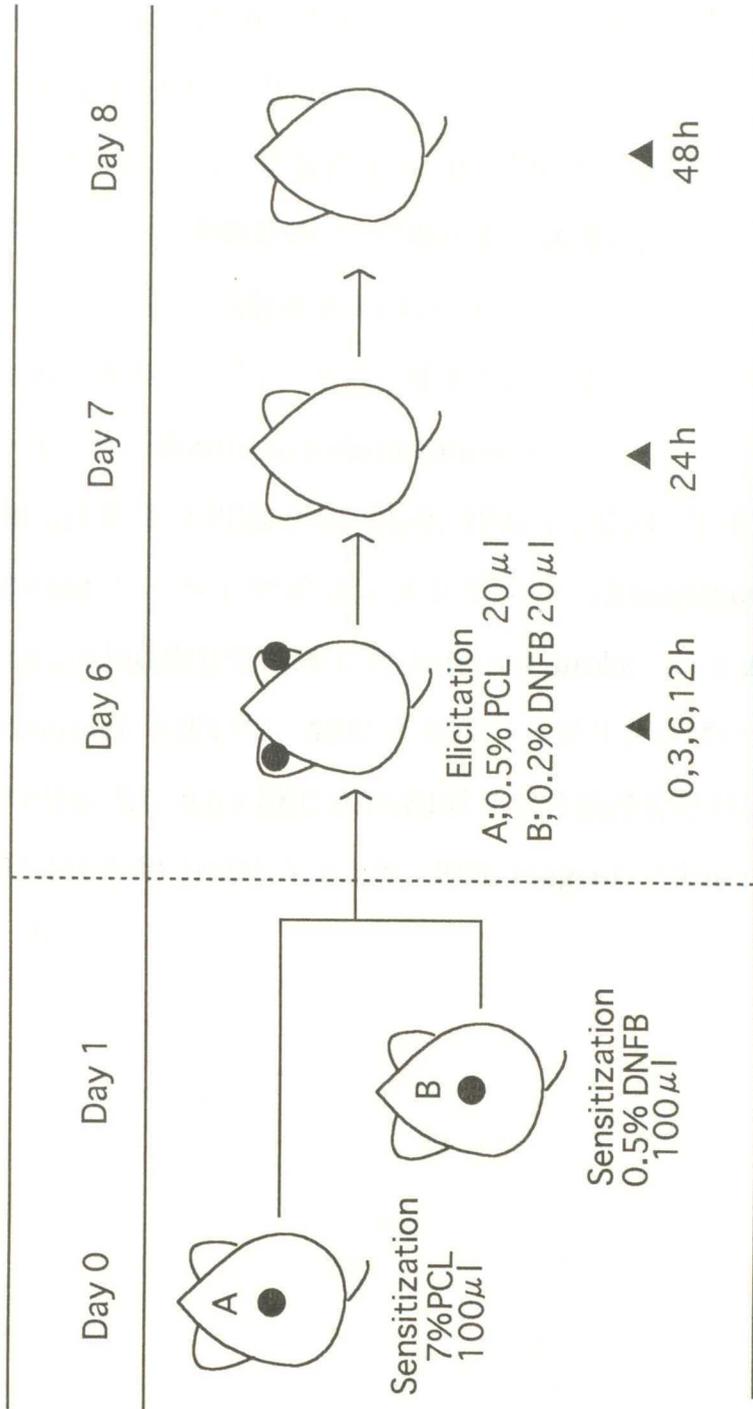


Fig. 3 - 1 Experimental System.

A; Challenged or primed mice by PCL
 B; Challenged or primed mice by DNFB
 ▲; Measurement of ear swelling

3-1-3 RT-PCR法

方法は Fig.2-2 に示すとおりである。解析したサイトカインは、 β -actin、IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-1 β 及び TNF- α であり、また、T 細胞マーカーである CD4 及び CD8 についても合わせて検討した(Fig.2-3)。

被験材料として、惹起誘発前 (0 時間) 及び惹起誘発後 24 時間の耳介部組織を用いた。なお実験動物は、接触皮膚炎誘導時に使用した 60 匹のうち、惹起誘発前 (0 時間)、惹起誘発 24 時間後の各々において、惹起誘発群及び感作誘導群ともに 5 匹ずつ合計 20 匹を使用し、左耳介部のみを実験に供した。

3-1-4 Southern hybridization 法

電気泳動後の PCR 産物 (IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-6) は、0.5N NaOH HybrondTM-N : ナイロンメンブレン (Amersham 社製) に転写した。digoxigenin(DIG)で標識した internal probe (1 μ g of a 30-mer oligonucleotide) を用いて、50°C 3 時間ハイブリダイゼーションを行い、2 \times SSC-0.1%SDS 及び 0.5 \times SSC-0.1%SDS により洗浄を行ない、POD 標識抗 DIG 抗体を室温で 30 分反応させた後、ECL reagent (Amersham 社製) を用いて観察した。

3-2 成績

3-2-1 耳介腫脹の経時的変化

DNFB 及び PCL による惹起誘発群及び感作誘導群の反応惹起後における耳介腫脹を測定した(Fig.3-2)。その結果、DNFB においては、12 時間後に感作誘導群(未感作群)及び惹起誘発群(感作群)のいずれにも同程度の弱い耳介腫脹がみられ、両者には有意差は認められなかった。感作誘導群においては、12 時間以降、耳介腫脹は徐々に減少していくのに対し、惹起誘発群では 12 時間以降より耳介腫脹は増し、24 時間後には最も強い腫脹となり、48 時間後には腫脹は減少していった。PCL においては、6 時間後に、感作誘導群と惹起誘発群ともに耳介腫脹のピークがみられ、感作誘導群においては 12 時間以降、耳介腫脹は徐々に減少していくのに対し、惹起誘発群では 24 時間後に 2 回目の耳介腫脹のピークが認められた。

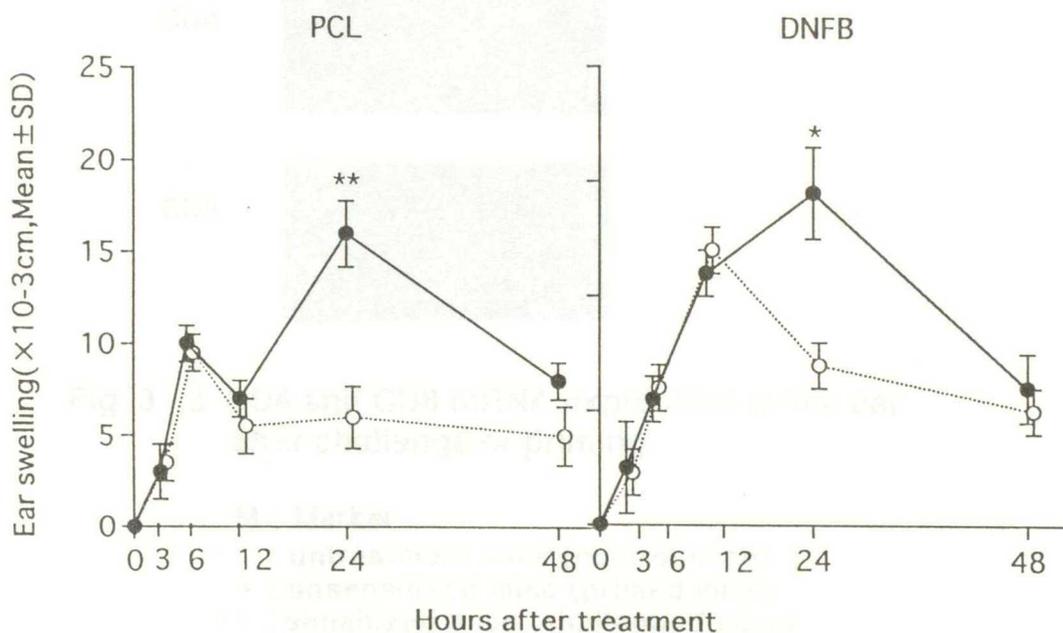


Fig. 3 - 2 Ear swelling response induced by PCL and DNFB.

○ ; sensitized mice (challenged mice)

● ; unsensitized mice (primed mice)

The statistically significant ear swellings were noted in sensitized mice as compared with unsensitized mice.

* : P<0.05 , ** : P<0.001

3-2-2 耳介部における CD4 及び CD8 mRNA の発現

惹起誘発 (0 時間) では、いずれもハウスキーピング遺伝子である β -actin mRNA のみ発現し、CD4 及び CD8 の mRNA 発現は認められなかった。惹起誘発 24 時間後の反応局所においては、DNFB 及び PCL とともに感作誘導の有無に関わらず、CD4 及び CD8 の mRNA の発現が認められた (Fig.3-3)。

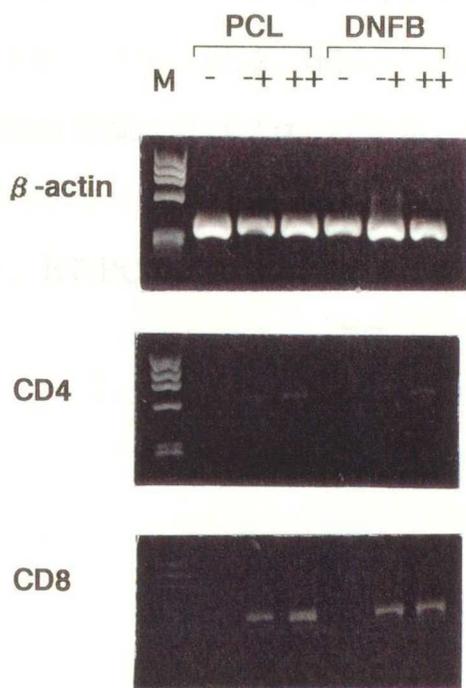


Fig. 3 - 3 CD4 and CD8 mRNA expression in the ear after challenge or priming.

- M ; Marker
- ; untreatment mice (control mice)
- + ; unsensitized mice (primed mice)
- ++ ; sensitized mice (challenged mice)

3-2-3 耳介部におけるサイトカイン mRNA の発現

惹起誘発前 (0 時間) では、いずれもハウスキーピング遺伝子である β -actin mRNA のみ発現し、サイトカインの発現は認められなかった。惹起誘発 24 時間後の反応局所においては、DNFB 及び PCL とともに感作誘導の有無に関わらず、IL-2 及び IFN- γ の mRNA の発現が共通に認められた。また、DNFB では IL-6、IL-1 β 及び TNF- α の mRNA の発現が両群とも共通に認められた。PCL では、惹起誘発群においてのみ IL-6、IL-1 β 及び TNF- α の mRNA の発現が認められた (Fig.3-4)。なお、IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5 及び IL-6 については、RT-PCR 後に、DIG 標識オリゴプローブを用いた Southern hybridization を行なった結果、各々のサイトカインの発現強度は増加したが、発現するサイトカインについては、RT-PCR 後における結果と変化は認められなかった。



Fig. 3-4 Cytokines mRNA expression in the ear after challenge or priming.
M: Marker
0h (control mice)
24h (primed mice)
24h (challenged mice)
RT-PCR products for IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5 and β -actin were transferred to nylon membranes and hybridized with DIG-labeled oligonucleotide probes.

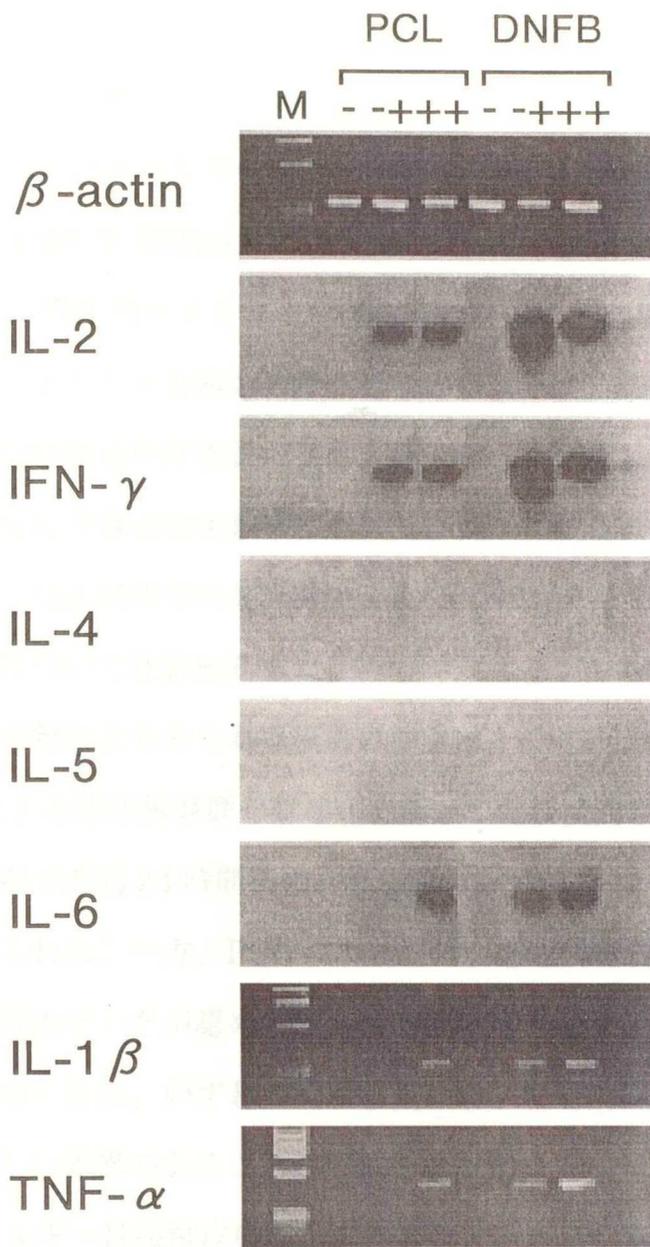


Fig. 3 - 4 Cytokines mRNA expression in the ear after challenge or priming.

M ; Marker

- ; untreated mice (control mice)

- +; unsensitized mice (primed mice)

++; sensitized mice (challenged mice)

PCR products for IL-2,IFN- γ ,IL-4,IL-5,and IL-6 cDNA were transferred to nylon membranes and hybridized to an internal digoxigenin-labeled probe.

3-3 考 察

第2章ではアレルギー性接触皮膚炎(惹起誘発期)の反応成立には、 $CD4^+$ T細胞及び $CD8^+$ T細胞が共に皮膚炎の反応局所に浸潤し、これらの細胞等から産生されるTh1型サイトカイン(特にIFN- γ)の反応局所でのmRNA発現が極めて重要であることを確認した。そこで本章では、Nakano¹⁷⁾により報告された代表的な接触感作性物質のうち、DNFB及びPCLを用いるマウスでのアレルギー性接触皮膚炎の実験系において、同一の物質による感作誘導の有無によりみられる反応局所での耳介腫脹、及びT細胞とサイトカインの病変形成に及ぼす影響について比較解析した。マウスによるアレルギー性接触皮膚炎の、感作誘導の有無によりみられる反応の強さは、耳介部の腫脹を指標としたDNFBとPCLによる感作誘導群と惹起誘発群とで比較検討した。DNFBにおいては、惹起誘発群で惹起24時間後に、感作誘導群で惹起12時間後に最も強い耳介腫脹が認められた。一方、PCLにおいては、惹起誘発群で惹起6及び24時間後に耳介腫脹のピークが認められ、感作誘導群では惹起6時間後に耳介腫脹のピークが認められた。いずれの被験物質においても両群には耳介腫脹の反応パターンに著しい差異のあることが明確となった。

アレルギー性接触皮膚炎が感作誘導を前提とする遅延型過敏症であるとの報告²³⁾からも、今回得られた惹起誘発群の結果は一致するものであった。次に、アレルギー性接触皮膚炎の反応成立におけるT細胞の関与について検討するため、DNFB及びPCLによる感作誘導群及び惹起誘発群において、 $CD4$ 及び $CD8$ mRNAの反応局所での発現について検討した。反応局所においては、DNFB及びPCLともに感作誘導の有無に関わらず、 $CD4$ 及び $CD8$ mRNAの発現が両者ともに認められた。この成績は、第2章で報告した免疫組織化学的検索の結果ともよく相関するものであり、アレルギー性接触皮膚炎の感作誘導過程の反応局所においてもT細胞群の関与があるものと推察される。DNFB及びPCL

による感作誘導群及び惹起誘発群の反応局所にて産生されるサイトカインについての比較解析を行った。惹起誘発 24 時間後における反応局所では、DNFB 及び PCL とも感作誘導の有無に関わらず、両群ともヘルパーT 細胞由来のサイトカインのうち、Th1 型サイトカインである IFN- γ 、IL-2 の mRNA が共通して顕著に発現しており、なお、ケラチノサイトあるいはマクロファージ由来であると考えられているモノサイト系サイトカイン (モノカイン) のうち IL-1 β 及び TNF- α の mRNA 発現も同時に認められる傾向にあった。

また、惹起誘発 12 時間後においては DNFB の惹起誘発群においてのみ IL-1 β 、TNF- α の mRNA 発現が認められた。IL-4 及び IL-10 等の Th2 型サイトカイン類の発現が同時に認められることもあり得るが^{24,25)}、アレルギー性接触皮膚炎を始めとする遅延型過敏症の反応局所におけるサイトカインプロファイルは、IFN- γ 及び IL-2 を主体とした Th1 dominant であり、アレルギー性接触皮膚炎は Th1 易誘導性な反応系であると考えられた。なお、今回使用したような強感作性物質では感作誘導を施さない耳介部への 1 回塗布のみでも、感作誘導後、惹起誘発を施す一般的な感作誘発を行なったものと、サイトカインの遺伝子発現において同様な結果が得られた。

宮崎²⁶⁾ はアレルギー性接触皮膚炎の感作誘導期において、皮膚局所リンパ節内に Thy-1 弱陽性細胞群が出現し、アレルギー性接触皮膚炎の感作成立に重要な役割を果たすことを報告している。Knight ら²⁷⁾ は感作誘導 24 時間後の皮膚局所リンパ節より樹枝状細胞 (dendritic cell:DC) を分離し、この DC を同系マウスに細胞移入することによりアレルギー性接触皮膚炎を誘導しうることを証明している。また、森田ら²⁸⁾ 及び宮崎ら²⁹⁾ はアレルギー性接触皮膚炎の感作誘導期において、皮膚局所リンパ節あるいは腸間膜リンパ節内における L3T4⁺細胞が IL-2 receptor を発現し、増殖反応をおこしていることを確認している。一方、Alexander らはアレルギー性接触皮膚炎の感作誘導期において表

皮膚での IL-1 β mRNA 発現が比較的早期に増加することを報告している³⁰⁾。以上の研究報告及び今回の解析結果より、アレルギー性接触皮膚炎の成立過程（惹起誘発後）において反応局所で、主として活性化 CD4⁺T 細胞等から分泌されてくると考えられる惹起誘発時に重要なサイトカイン類は、アレルギー性接触皮膚炎の誘導過程の時点ですでに反応局所での記憶 CD4⁺T 細胞等からも分泌されることが想定され、アレルギー性接触皮膚炎の反応成立の際に重要な役割を果たしているものと考えられた。

分泌されるサイトカイン類の発現量あるいは発現由来については不明な点も多く、今後の検討課題となるが、反応局所でのサイトカイン産生パターンは抗原（ないし、感作）物質の物性、濃度あるいは感作方法等に支配されるものと考えられる。

本解析は強感作原のみで確認された現象であるため中等度以下の感作原についての解析もさらに必要となる。しかし、マウスの耳介部へ化学物質を 1 回感作 (priming) した後、耳介部局所でのサイトカインプロファイルを指標に感作性を予測する方法は特異性が高いと考えられ、種々の化学物質についての刺激性と感作性とを識別する際に有効な方法であることが示唆された。

本解析により、アレルギー性接触皮膚炎の感作誘導期の反応局所においては惹起誘発期と同様に Th1 型サイトカイン mRNA 発現が優位であること、また、CD4⁺T 細胞及び CD8⁺T 細胞の両細胞の関与が認められた。

第4章 アレルギー性接触皮膚炎と刺激性接触皮膚炎とのサイトカインプロファイルによる比較解析

接触皮膚炎は外来刺激物（接触原）が作用した部位に一致して出現する温疹反応であり、温疹反応発症のメカニズムの差から、刺激性接触皮膚炎とアレルギー性接触皮膚炎とに大別される。刺激性接触皮膚炎は過剰の外来性刺激物質が皮膚に作用してケラチノサイトが障害され、ケラチノサイトから放出される各種のライソソーム酵素等が働き炎症反応を起こす。

一方、アレルギー性接触皮膚炎はIV型の遅延型過敏症に属する接触アレルギー機序を介して温疹反応を起こす。その際、皮膚に接触する刺激物は、免疫学的にハプテンで、表皮を通過する途中で表皮細胞の膜蛋白と結合し、免疫原性をもつ。この結合物を、ランゲルハンス細胞、あるいはマクロファージが捕獲し、抗原情報を胸腺由来リンパ球（T リンパ球）に伝達する。抗原情報を受け取ったT リンパ球は、分化・増殖を行い、接触アレルギーを発現するエフェクターT リンパ球が産生され、接触アレルギーの感作が成立する。感作が成立した個体に、再度同一ハプテンが作用すると、エフェクターT リンパ球は、リンフォカインと呼ばれる炎症のメディエーターを放出し、温疹反応を引き起こす。このように発症メカニズムの相違は明らかであるが、接触皮膚炎の臨床所見あるいはパッチテスト等の陽性反応について、刺激性と感作性を鑑別することは必ずしも容易ではない。特に、皮膚外用薬や化粧品等を開発する際、安全性面において両者の反応を鑑別することは極めて重要であり、より簡便で再現性の高いスクリーニング法の開発が望まれている。

そこで、本章では代表的な感作性物質及び刺激性物質を各々3種類ずつ用い、第2章及び第3章で明らかにした反応局所でのサイトカイン mRNA 発現を指標とし、それらの反応形態の相違について比較解析を行い、そのアレルギー性

接触皮膚炎のスクリーニング法としての可能性を検討した。

4-1 実験方法

4-1-1 実験動物

近交系 BALB/c 系 SPF マウス (BALB/cAnNCrj) の雌、7 週齢を日本チャールス・リバー株式会社より購入し、実験に用いた。なお、実験期間中の飼育条件として、温度は $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度は $55 \pm 10\%$ 、固形飼料 (CE-2、日本クレア株式会社) 及び飲料水 (小田原市営水道水、自動給水装置を使用) を自由に摂取させた。

4-1-2 接触皮膚炎の誘導

マウスの両耳介部に被験物質を 1 回塗布した時間を 0 時間とし、その後 3、6、12、24 及び 48 時間の両耳介部の厚さを dial thickness gauge を用いて測定し、1 回塗布直後(0 時間)との差を耳介腫脹 (ear swelling) とし、それを平均値 \pm S.D. (10^{-3} cm) で表示した。被験物質、濃度及び投与量は、感作性物質である DNFB は 0.1、0.2、0.4%、PCL は 0.1、0.5、1%、Oxazolone(OX;和光純薬工業株式会社製)は 0.1、0.2、0.4%とし、刺激性物質である塩化ベンザルコニウム(BC;和光純薬工業株式会社製)は 5、10、20%、ラウリル硫酸ナトリウム(SLS;和光純薬工業株式会社製)は 1、5、10%、ミリスチン酸イソプロピル(IPM;和光純薬工業株式会社製)は 25、50、100%の各々を $20 \mu\text{l}$ ずつ両耳介部に塗布した。また、溶媒については感作性物質はアセトン：オリーブ油 (4:1) とし、刺激性物質は蒸留水とした。実験動物は各被験物質とも 6 匹ずつ、合計 36 匹を使用した。なお、全ての統計処理は、2 群間の差を T 検定 (T-test) により実施した。

4-1-3 RT-PCR法

方法は Fig.2-2 に示すとおりである。解析したサイトカインは、 β -actin、IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-1 β 及び TNF- α である (Fig.2-3)。なお、解析

に使用した実験動物数は、被験物質塗布 24 時間後に 3 匹ずつ合計 18 匹であり、その際、左耳介部のみを実験に供した。

4-1-4 Southern hybridization 法

電気泳動後の PCR 産物のうち、IL-2 及び IFN- γ について、DIG 標識オリゴプローブを用いた Southern hybridization (方法は第 3 章の 3-1-4) を施した。

4-2 成績

4-2-1 各被験物質塗布後の耳介腫脹の経時的变化

各被験物質塗布後における耳介腫脹を経時的に測定した(Fig. 4-1)。

各々の被験物質とも濃度依存的な耳介腫脹は認められたが、感作性物質と刺激性物質との間には、その耳介腫脹の反応パターンに一定の傾向は認められなかった。

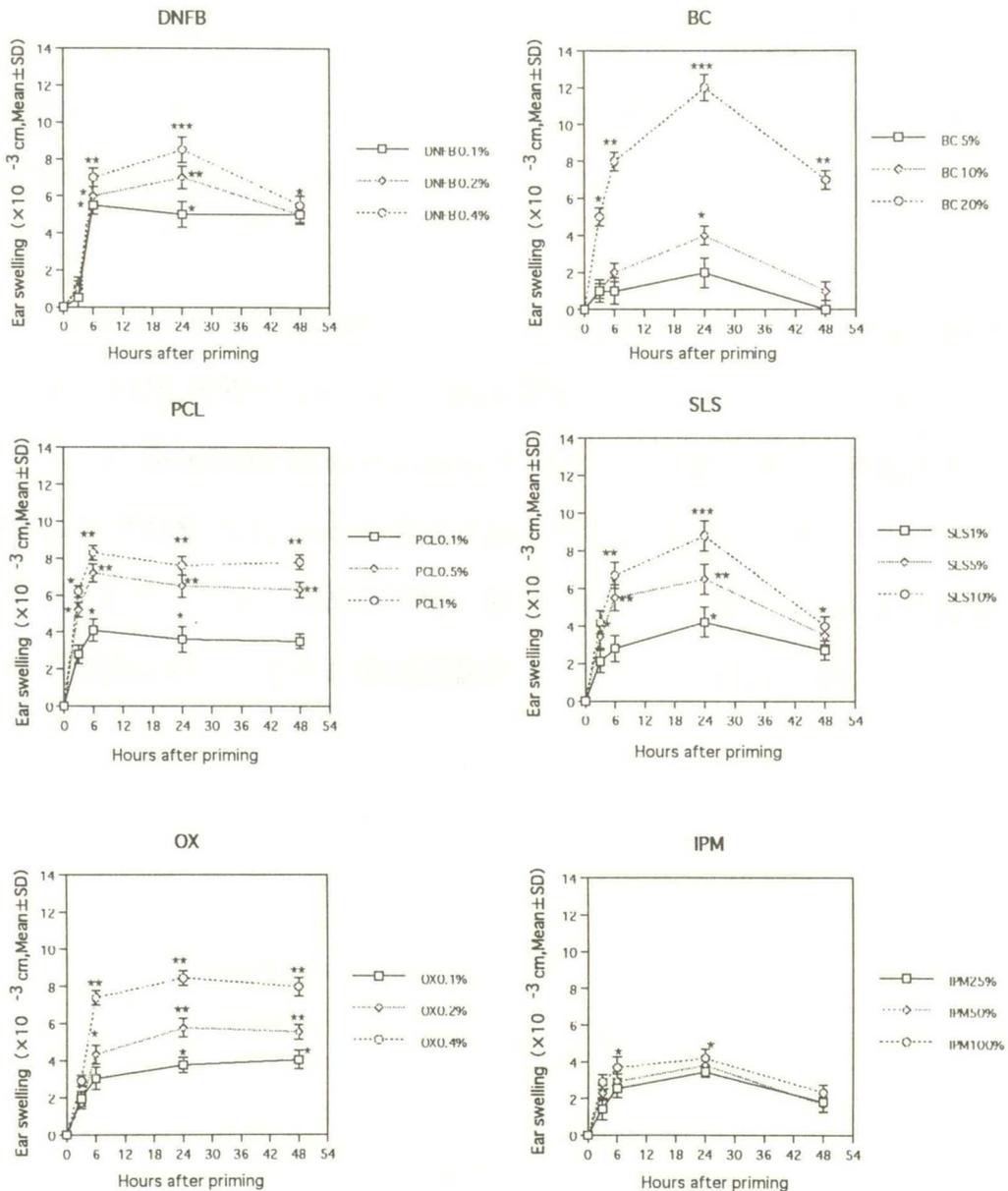


Fig. 4-1 Ear swelling response priming by chemical substances.

The statistically significant ear swellings were noted in primed mice as compared with no treatment. *: $P < 0.1$, **: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$

4-2-2 各被験物質塗布 24 時間後における耳介部のサイトカイン mRNA 発現

各被験物質塗布 24 時間後の耳介部における各種サイトカインの発現を、mRNA レベルにて解析した(Table 4-1)。感作性物質である DNFB、PCL 及び OX では、何れの濃度においても IL-2 及び IFN- γ の mRNA の発現が共通して顕著に認められた。さらに DNFB では IL-1 β 及び TNF α 、PCL では IL-4 及び IL-1 β 、OX では IL-6、IL-1 β 及び TNF α の mRNA の発現も認められた。一方、刺激性物質と考えられている BC、SLS 及び IPM では、IL-1 β 及び TNF α の mRNA の発現が顕著に認められ、SLS のみ弱いながら IL-4 の発現が認められた。

4-2-3 Southern hybridization 法による IL-2 及び IFN- γ mRNA の検出

電気泳動後の PCR 産物のうち、IL-2 及び IFN- γ について、DIG 標識オリゴプローブを用いた Southern hybridization を行なった結果、感作性物質である DNFB、PCL 及び OX では、何れの濃度においても IL-2 及び IFN- γ の mRNA が共通に検出された。一方、刺激性物質と考えられている BC、SLS 及び IPM では、何れの物質においてもその検出は認められなかった(Fig. 4-2)。



Table 4 - 1 Cytokine mRNA expression in the ear after priming .

	DNFB			PCL			Oxazolone			Benzo chloride			SLS			IPM			
	0.1%	0.2%	0.4%	0.1%	0.5%	1.0%	0.1%	0.2%	0.4%	5.0%	10.0%	20.0%	1.0%	5.0%	10.0%	25.0%	50.0%	100%	
β -actin	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
IL-2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
IFN- γ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
IL-4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
IL-5	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
IL-6	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
IL-1 β	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
TNF- α	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

● : Detection of cytokine mRNA expression , ○ : No detection of cytokine mRNA expression

The priming concentration was used at DNFB in 0.1%,0.2%,0.4%, PCL in 0.1%,0.5%,1.0%, Oxazolone in 0.1%,0.2%,0.4%, Benzo chloride in 5.0%,10.0%,20.0%,SLS in 1.0%,5.0%,10.0%, IPM in 25.0%,50.0%,100%

4-3 考 察

アレルギー性接触皮膚炎は、細胞性免疫反応が関与する遅延型またはIV型アレルギーである。化学物質の場合、一般的にハプテンとして働き、皮膚のキャリアー蛋白質と結合し、免疫反応を誘発する完全抗原を形成する。この反応がパッチテスト等により実験的に惹起可能であれば、理論上、12時間以内に接触部位に炎症反応が出現し、24~72時間でピークに達し、その後徐々にやわらいでゆくと考えられる。しかしながら実際、臨床的には刺激性物質による反応と肉眼的反応が明確に区別できるわけではない。アレルギー性接触皮膚炎と刺激性接触皮膚炎とを区別するはっきりした臨床的鑑別点はほとんどなく、基本的には皮膚の肉眼像は同様である。

本章では、従来から皮膚を感作し、再感作により強い接触型過敏反応を惹起するとして報告されているDNFB、PCL及びOXを感作性物質とし、一次的な刺激反応（炎症反応）のみを誘導すると考えられているBC、SLS及びIPMを刺激性物質として、これらの物質間で炎症反応に相違があるかどうかを比較解析した。感作性物質は感作成立後、再感作時に炎症反応が増強することが知られているが、第3章での強感作性物質においては感作誘導期と惹起誘発期とでのサイトカイン mRNA 発現が同等な解析結果として得られていることをもとに、本実験では刺激性物質との相違を明確にすることを考慮にいれ、全て感作は1回とし、耳介部に化学物質を塗布する条件とした。その結果、いずれの物質も耳介部に炎症反応を起こし、反応の強弱は用量依存的であり、反応のパターンから両物質間の相違を認めなかった。

炎症反応の形成にはサイトカイン発現が重要であるとの報告³¹⁾から、炎症性サイトカインのうちIL-1 β 、TNF- α 及びIL-6、さらにアレルギー性接触皮膚炎と密接な関連を持ちT細胞等から産生されると考えられるIL-2及びIFN- γ について、反応局所においてmRNAレベルにて解析した。その結果、反応局

所では、IL-1 β 及び TNF- α の mRNA 発現がいずれの物質においても認められたが、また、3 種の感作性物質(DNFB,PCL,OX)においてのみ IL-2 及び IFN- γ の mRNA 発現が認められ、明らかに刺激性物質 (BC,SLS,IPM) により誘導されるサイトカイン mRNA 発現の差が認められた。

これらのことから、反応局所においては、感作性物質は Th1 リンパ球を主体とした免疫応答反応を誘導するのに対し、刺激性物質は主として TNF- α などの産生による好中球を主体とした刺激性反応にとどまるものと推測された。

Hoefakker らはヒト感作性物質及び刺激性物質によるパッチテスト陽性反応部位の生検における局所的なサイトカインの発現を免疫組織化学的に検索した結果、感作原と刺激性物質ともに IL-1 α 、TNF- α 、IL-2 及び IFN- γ の発現が認められたため、パッチテストの評価時によるアレルギー性接触皮膚炎と刺激性接触皮膚炎とを鑑別することは困難であることを報告している³²⁾。この結果は本研究結果と一致しないが、これについてはヒトと動物との感受性による差や被験物質が濃度により、刺激性と感作性との両者の性状を持ち備えている可能性なども考えられるが、RT-PCR 法と免疫組織化学的解析による手法の差によることも考えられるため、単純に比較することはできないと思われる。

本実験では強感作性物質及び強刺激性物質を用いたが、今後、中等度以下の物質の解析もさらに必要となるが、マウスの耳介部へ化学物質を塗布後、サイトカインプロファイルを指標に接触感作性を予測する方法は再現性が良好であり、短期間で実施することが可能である。よって、未知の物質の感作性と刺激性とを比較解析する際に有効な方法 (両者の反応を鑑別する際のスクリーニング法)の1つになり得ると考える。

本解析結果から、感作性物質と刺激性物質とを識別する際に、皮膚反応局所における Th1 型サイトカイン (IL-2、IFN- γ 等) mRNA 発現の重要性が示唆された。

第5章 サイトカインmRNA発現を指標とした Phenol 系化合物の感作性評価

Phenol 系化合物についての毒性学的研究は数多くの報告がある³³⁻³⁵⁾。また、感作性についての報告も、Barratt ら³⁶⁾を始め幾つかあるが、いずれも単量体あるいはそれらの修飾化合物に関してがほとんどであり、それらの自動酸化により生成する化合物等を含めた報告はほとんど見当たらない。そこで本章では、実際の香粧品原料のうち、比較的生理活性が高く、利用価値のある代表的な原料の1つである phenol 系化合物のうち eugenol 及び iso-eugenol を中心に、6種類の化合物の感作性について検討した。

感作性の評価は第2章～第4章までに示した皮膚反応局所におけるサイトカインmRNAを指標とした解析法を用い、化学物質による感作性に対する評価系としての有用性について検討した。

5-1 実験方法

5-1-1 実験動物

近交系 BALB/c 系 SPF マウス (BALB/cAnNCrj) の雌、7週齢を日本チャールス・リバー株式会社より購入し、実験に用いた。なお、実験期間中の飼育条件として、温度は $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度は $55 \pm 10\%$ 、固形飼料 (CE-2、日本クレア株式会社) 及び飲料水 (小田原市営水道水、自動給水装置を使用) を自由に摂取させた。

5-1-2 材料

eugenol (高砂香料工業株式会社製) 及び iso-eugenol (和光純薬工業株式会社製) は、減圧蒸留することにより精製した後に各試験に用いた。また、それぞれの二量体は、精製した eugenol 及び iso-eugenol をペルオキシダーゼを

用いて二量化した後にカラム精製することにより得た³⁷⁻³⁹⁾ (Fig. 5-1)。また、それぞれの純度はGCもしくはHPLC分析により、98%以上であることを確認した。

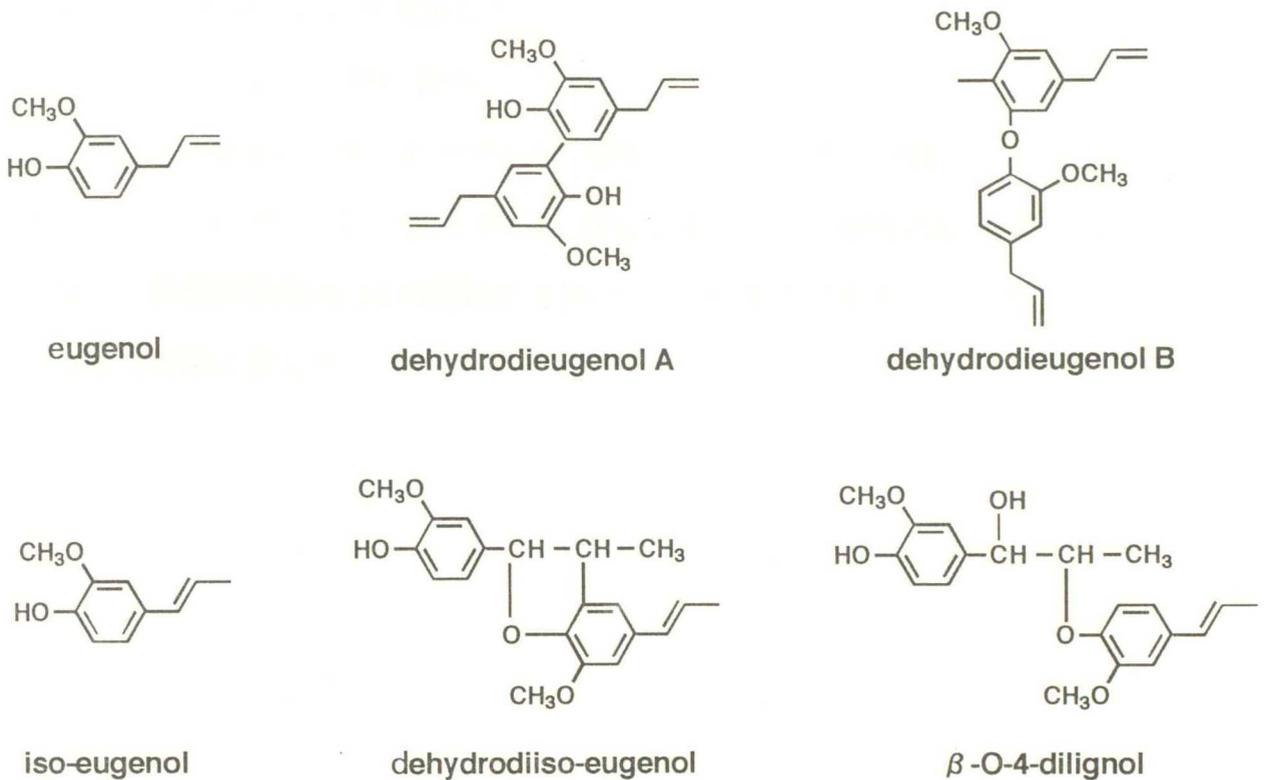


Fig. 5 - 1 Phenolic Compounds.

5-1-3 マウス接触皮膚炎の誘導

マウスの phenol 系化合物によるアレルギー性接触皮膚炎の誘導法は、Fig.2-1 と同様な方法にて実施した。各化合物の感作濃度及び投与量は、感作誘導濃度を 5%とし 100 μ l ずつ背部に塗布し、惹起誘発濃度を 5%とし 20 μ l ずつ耳介部へ塗布した (感作誘導及び惹起誘発濃度は各被験物質とも刺激性を生じない(刺激性の有無は確認済み)最高無刺激濃度として、5%を設定した)。また各々の

溶媒は、オリーブ油とした。惹起誘発 24 時間後の両耳介の厚さを dial tickness gauge を用いて測定し、惹起誘発前 (0 時間) の値との差を耳介腫脹(ear swelling)とし、それを平均値±S.D. (10^{-3} cm) で表示した。実験動物は各化合物で 3 匹ずつ計 18 匹を実験に供した。なお、全ての統計処理は、2 群間の差を T 検定 (T-test) により実施した。

5-1-4 RT-PCR法

方法は Fig.2-2 に示すとおりである。解析したサイトカインは、 β -actin、IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5 及び IL-6 である (Fig.2-3)。なお、解析に使用した実験動物数は、被験物質塗布 24 時間後に 3 匹ずつ合計 18 匹であり、その際、左耳介部のみを実験に供した。

5-2 成績

5-2-1 Phenol 系化合物によるマウスアレルギー性接触皮膚炎の惹起誘発 24 時間後における耳介腫脹及びサイトカイン mRNA 発現

Table 5-1 に phenol 系化合物によるアレルギー性接触皮膚炎の惹起誘発 24 時間後のマウスの耳介腫脹(ear swelling)の結果を示す。dehydrodieugenol B 及び iso-eugenol において著しい耳介腫脹反応が観察された。また、eugenol 及び dehydrodiiso-eugenol においては軽度な耳介腫脹反応が認められた。その他はいずれも耳介腫脹反応はほとんど認められなかった。Fig. 5-2 は phenol 系化合物によるアレルギー性接触皮膚炎の惹起誘発 24 時間後の、マウス耳介部におけるサイトカイン mRNA レベルでの解析結果を示した。Th1 型サイトカインである IL-2 及び IFN- γ は、eugenol、dehydrodieugenol B、iso-eugenol 及び dehydrodiiso-eugenol に顕著に認められた。Th2 型サイトカインのうち、IL-4 は eugenol、iso-eugenol、及び dehydrodiiso-eugenol において軽微に認められた。IL-5 はいずれの化合物においても発現は認められなかったが、IL-6 は dehydrodieugenol A 以外の化合物で発現が認められた。

Table 5 - 1 Ear Swelling Data.

Chemicals	Ear swelling on 24h after challenge , Mean \pm S.D. (10^{-3} cm)
eugenol	2. 8 1 \pm 0. 1 4 3 *
dehydrodieugenolA	1. 3 8 \pm 0. 0 5 2
dehydrodieugenolB	1 4. 1 3 \pm 0. 3 3 5 **
isoeugenol	1 2. 3 7 \pm 0. 3 1 1 **
dehydrodiisoeugenol	3. 2 4 \pm 0. 1 7 2 *
β -O-4-dilignol	1. 2 5 \pm 0. 0 6 4

The statistically significant ear swellings were noted in sensitized mice as compared with no treatment.
* : $P < 0.1$, ** : $P < 0.001$

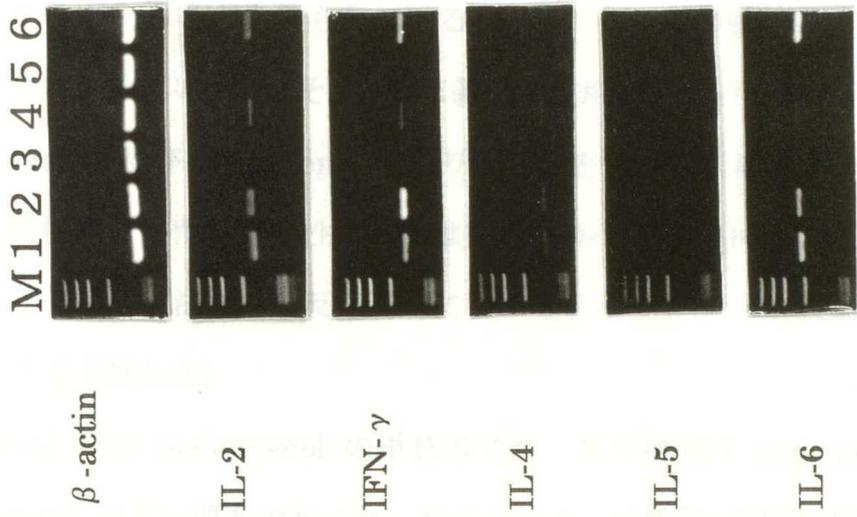


Fig.5 – 2 Cytokine mRNA Expression in the Ear after Challenge.

M, Marker; Lane 1, isoeugenol; 2, dehydrodiisoeugenol; 3, β -O-4-dilignol; 4, eugenol; 5, dehydrodieugenol A; 6, dehydrodieugenol B

5-3 考察

丁香油(*clove buds oil*)やニクズク油(*nutmeg oil*)は香辛料として広く用いられ、また、化粧品においても石鹸、シャンプーなどの香料成分として用いられることが多い。しかしながら、化粧品皮膚炎のみならず頭部湿疹や被覆部の湿疹において、まれならず感作性の強陽性反応の出現をみるとの報告もある。また、皮膚科領域においては美白促進効果、抗菌作用などの様々な利用価値があると考えられている。これらの精油の主成分である *eugenol* や *iso-eugenol* などの *phenol* 系化合物の感作性については、既に幾つかの報告⁴⁰⁻⁴³⁾ がなされている。一方、*phenol* 系化合物には光や熱などにより自動酸化を受け、重合体となるものがあることも知られている⁴⁴⁾ が、それらの感作性についての検討はあまりなされていない。そこで、広範囲で使用されている *phenol* 系化合物として *eugenol* 及び *iso-eugenol* を取り上げ、それらの二量体を含め感作性についての解析を行った。感作性の評価は第2章から第4章において検討した感作性スクリーニング法である反応局所におけるサイトカイン mRNA を指標とした解析にて実施した。

eugenol 及び *iso-eugenol* の単量体では、耳介腫脹は *eugenol* と比較して *iso-eugenol* の方が顕著であった。サイトカイン mRNA 発現の解析においてはどちらの化合物も Th1 細胞由来の IL-2 及び IFN- γ の mRNA 発現を認め、その傾向は *iso-eugenol* においてより顕著であった。すなわち、*eugenol* 及び *iso-eugenol* は、強弱はあるもののいずれも感作性を有する結果となった。一方、*eugenol* 及び *iso-eugenol* の各々の二量体については、*dehydro dieugenol B* 及び *dehydrodiiso-eugenol* において軽度から強度の耳介腫脹が認められ、Th1 細胞の mRNA 発現も認められた。しかしながら、それぞれの構造異性体である *dehydrodieugenol A* 及び β -O-4-dilignol においては耳介腫脹はほとんど認められず、Th1 細胞の mRNA 発現はいずれも認められなかった。

また、耳介腫脹が顕著なものほど IL-2 及び IFN- γ といった Th1 細胞由来のサイトカイン mRNA 発現が顕著に認められた。さらに、耳介腫脹が軽度なものにおいても同様な mRNA 発現が認められることから、Th1 細胞の mRNA 発現を指標とした本スクリーニング法は、被験物質の感作性の有無を予測する際の高感度なスクリーニング法の 1 つになり得ることが示唆された。

通常、試薬類として市販されている eugenol 及び iso-eugenol の中には変色しているものが多いことから、既に自動酸化を受けた重合体を含んでいる可能性が高いと推測される。本実験において、dehydrodieugenol B 及び iso-eugenol が強い感作原であることが推察され、dehydrodieugenol A 及び β -O-4-dilignol は感作性は極めて低いことが確認された。また、単量体で顕著な耳介腫脹を有する phenol 系化合物も、二量化 (biphenyl 誘導体化等) することにより耳介腫脹が低下するものもあった。このように本来強感作原と考えられている eugenol 及び iso-eugenol は、自動酸化により生成する二量体の構造の相違において、各々の感作性が著しく異なるという興味深い知見が得られた。

数種の phenol 系化合物の感作性についての解析を実施した結果、アレルギー性接触皮膚炎による耳介腫脹が強度な被験物質に限らず軽度な被験物質においても効率良く、Th1 型サイトカイン (IL-2、IFN- γ 等) の mRNA を検出することが可能であることが示された。今後、さらに種々の化学物質について同様な検討を行なう必要はあるが、サイトカインを指標とした本スクリーニング法は、化学物質の感作性の検出に向けて、簡便にして高感度なスクリーニング法として発展することも期待される。

第6章 光アレルギー性接触皮膚炎の惹起誘発期における T 細胞 サイトカインの mRNA 発現について

光アレルギー性接触皮膚炎はアレルギー性接触皮膚炎と同様に、主に CD4⁺ T 細胞を介する遅延型過敏症であると考えられており、T 細胞及び各種サイトカインの関与についての研究が、マウスを用いた実験系で行われている⁴⁵⁻⁴⁷⁾。しかし、マウスを用いた光アレルギー性接触皮膚炎に関する研究報告の多くは、アレルギー性接触皮膚炎と同様に局所リンパ節内や脾細胞等における解析が中心となっている⁴⁸⁾。そこで本章では、第2章から第5章まで検討した解析法を活用し、光アレルギー性接触皮膚炎の反応の場として極めて重要な皮膚組織に着目し、BALB/c マウスを用いて、3,3',4',5-tetrachlorosalicylanilide(TCSA; 関東化学株式会社製)により光惹起された光アレルギー性接触皮膚炎の、反応局所におけるサイトカイン mRNA の発現パターンについての解析を行った。さらに DNFB 感作によるアレルギー性接触皮膚炎の解析結果との比較も合わせて実施した。

6-1 実験方法

6-1-1 実験動物

近交系 BALB/c 系 SPF マウス (BALB/cAnNCrj) の雌、7 週齢を日本チャールス・リバー株式会社より購入し、実験に用いた。なお、実験期間中の飼育条件として、温度は $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度は $55 \pm 10\%$ 、固形飼料 (CE-2、日本クレア株式会社) 及び飲料水 (小田原市営水道水、自動給水装置を使用) を自由に摂取させた。

6-1-2 光アレルギー性接触皮膚炎及びアレルギー性接触皮膚炎の感作誘導及び惹起誘発

Fig. 6-1 に実験プロトコールを示す。I 群には TCSA による光アレルギー性接触皮膚炎の感作誘導及び惹起誘発を行なった。Day 0 及び 1 に光感作誘導として TCSA を剃毛背部に塗布し、UVA 照射($12\text{J}/\text{cm}^2$ at 365 nm)した。Day 5 に光惹起誘発として TCSA を耳介部に塗布し、UVA 照射($12\text{J}/\text{cm}^2$ at 365 nm)した。紫外線照射は、東芝 FL20S-BLB ランプ(波長 320~400nm) 24 本を装着した紫外線照射装置(東芝医療用品(株)製 N-DMR 型)を用いて、約 40 cm の距離から 4 mm 厚さのガラスを通して実施した。II 群では、TCSA 塗布を行わず UVA 照射の影響(光ブランク)を観察した。

III 群では TCSA によるアレルギー性接触皮膚炎の感作誘導及び惹起誘発を行なった。Day 0 に TCSA を剃毛背部に塗布(感作誘導)し、Day 5 に惹起誘発として TCSA を耳介部に塗布した。なお、DNFB によるアレルギー性接触皮膚炎もこれと同様に実施した。

感作及び光感作の各々の濃度及び投与量は、TCSA については感作誘導濃度を 1%、投与量は $100\ \mu\text{l}$ とし、惹起誘発濃度は 0.1%、投与量は $40\ \mu\text{l}$ とした。DNFB については感作誘導濃度を 0.5%、投与量は $100\ \mu\text{l}$ とし、惹起誘発濃度は 0.2%、投与量は $40\ \mu\text{l}$ とした。また、各々の被験物質に使用した溶媒は、アセトン：オリブ油 (4:1) とした。耳介の厚さは(光)惹起誘発直後(光ブランクは Day 5 の UVA 照射直後)すなわち、0 時間、(光)惹起誘発 6、12、24、48 及び 72 時間後に dial thickness gauge を用いて測定した。(光)惹起誘発直後(0 時間)とそれぞれの値との差を耳介腫脹 (ear swelling) とし、それを平均値 \pm S.D. (10^{-3} cm) で表示した。実験動物は(光)惹起誘発 0、6、12、24、48 及び 72 時間後で各々 3 匹ずつ各群 18 匹、合計 72 匹を使用した。なお、全ての統計処理は、2 群間の差を T 検定 (T-test) により実施した。

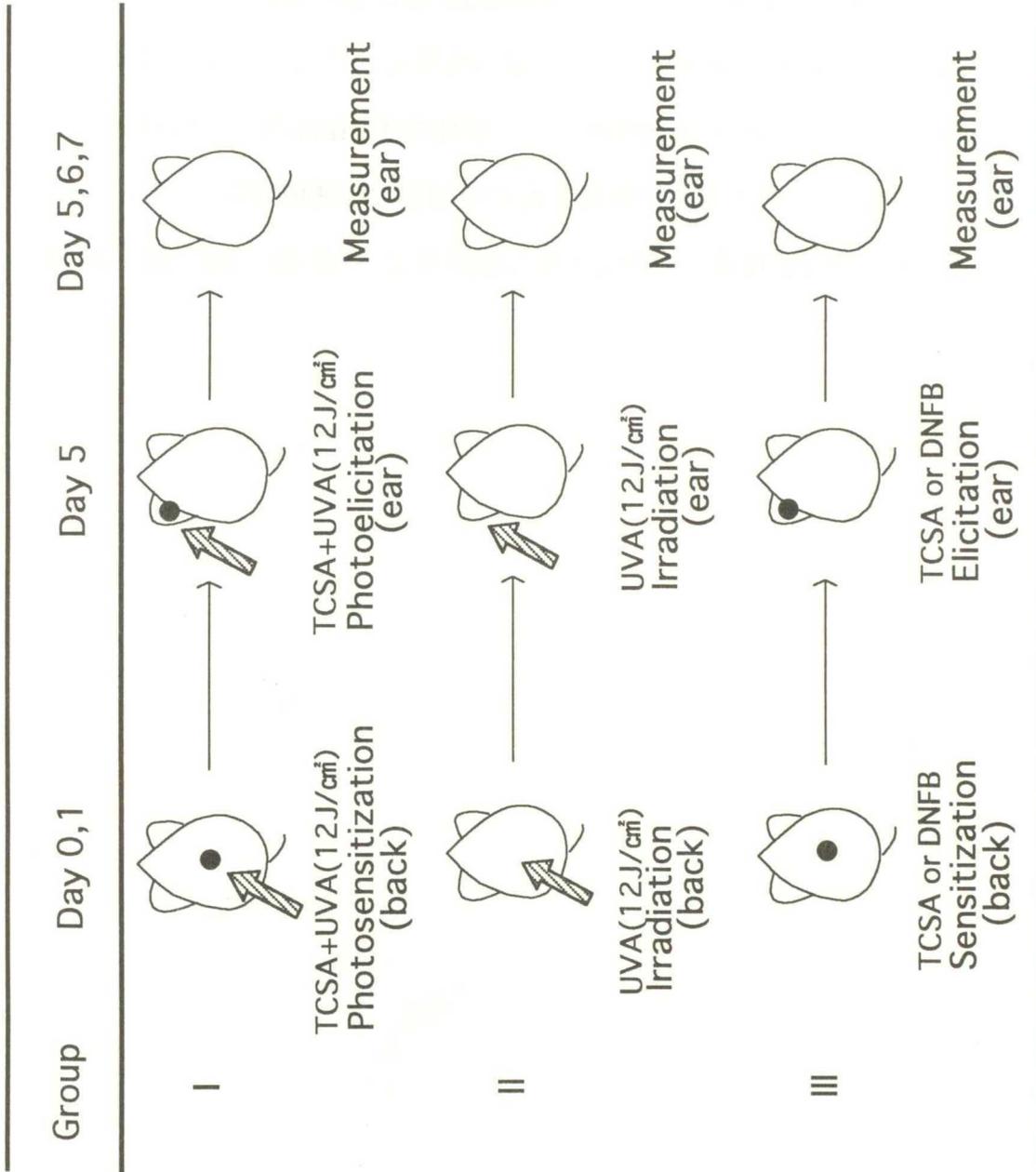


Fig. 6 - 1 Experimental System.

● : TCSA or DNFB painting ↗ : UVA irradiation

6-1-3 RT-PCR法

方法は Fig.2-2 に示すとおりである。解析したサイトカインは、 β -actin、IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-6 及び IL-10 である (Fig.2-3)。いずれの群も(光)惹起誘発 0、6、12、24、48 及び 72 時間後の耳介部を採取し実験に供した。なお、電気泳動によるバンドのシグナル強度のピーク面積を画像解析(NIH イメージ)により算出し、 β -actin を内標準とした相対比を求め、mRNA の発現を定量化した。また、実験動物は、各接触皮膚炎誘導時に使用した 72 匹のうち惹起誘発 0、6、12、24、48 及び 72 時間後に各々3匹ずつ各群 15 匹、合計 60 匹を使用した。



Fig. 5-2 Ear swelling response after treatment. The statistically significant ear swelling response to UV treatment was significantly reduced by the addition of IL-2 or IL-10.

6-2 成績

6-2-1 耳介腫脹の経時的变化

Fig. 6-2 にマウスの TCSA による(光)アレルギー性接触皮膚炎、DNFB によるアレルギー性接触皮膚炎及び UVA 照射による耳介腫脹の経時的な変化を示す。

TCSA による光アレルギー性接触皮膚炎では、光惹起誘発 24 時間後に耳介腫脹がピークとなり、その後 72 時間後まで腫脹は継続した。一方、DNFB によるアレルギー性接触皮膚炎においても、惹起誘発 24 時間後に耳介腫脹はピークとなるが、その後 72 時間においては減弱していった。TCSA によるアレルギー性接触皮膚炎及び光ブランクにおいては、いずれも有意な耳介腫脹は認められなかった。

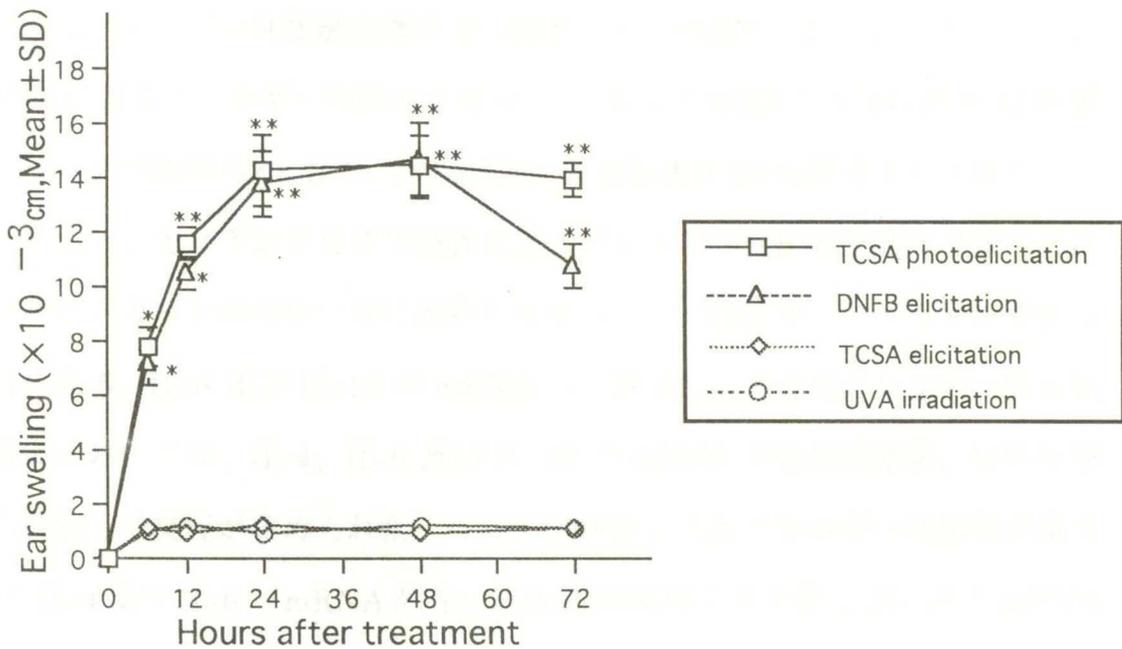


Fig. 6 - 2 Ear swelling responses after treatment.

The statistically significant ear swellings were noted in treatment mice as compared with no treatment.

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.001$

6-2-2 耳介部局所におけるサイトカイン mRNA 発現

TCSA による光アレルギー性接触皮膚炎では主に IL-4、IL-6 及び IL-10 の mRNA 発現が顕著に認められ、IL-2 及び IFN- γ の mRNA 発現も微弱ながら認められた。また、DNFB によるアレルギー性接触皮膚炎では IL-2 及び IFN- γ の mRNA 発現が顕著に認められ、IL-4、IL-6 及び IL-10 の mRNA 発現も認められた(Fig. 6-3)。一方、TCSA によるアレルギー性接触皮膚炎及び光ブランクでは IL-2、IFN- γ 及び IL-6 の mRNA 発現は認められるものの、その発現強度は微弱なものであった(Fig. 6-4)。

6-2-3 NIH イメージによるサイトカイン mRNA の発現強度の解析

Fig. 6-5 に各々の反応による各種サイトカイン mRNA の発現強度の経時的変化を示す。Th1 型サイトカインである IL-2 及び IFN- γ の mRNA は、TCSA による光アレルギー性接触皮膚炎では顕著な変化は認められなかった。一方、DNFB によるアレルギー性接触皮膚炎では、IL-2 の mRNA は惹起誘発 12 時間後にピークが認められ、IFN- γ の mRNA は惹起誘発 24 時間後より上昇していた。また、光ブランク及び TCSA によるアレルギー性接触皮膚炎では、これらのサイトカインの変動は特に認められなかった。Th2 型サイトカインである IL-4、IL-5、IL-6 及び IL-10 の mRNA は、TCSA による光アレルギー性接触皮膚炎においては、IL-4、IL-6 及び IL-10 の mRNA が惹起誘発後、反応早期から持続して発現が認められた。一方、DNFB によるアレルギー性接触皮膚炎では、IL-4 及び IL-6 の mRNA が惹起誘発 24 時間後より上昇し、IL-10 の mRNA は、惹起誘発 12 時間後に発現ピークが認められた。

また、IL-5 の mRNA はいずれの実験群においてもその発現は認められなかった。光ブランク及び TCSA によるアレルギー性接触皮膚炎では、いずれのサイトカイン mRNA の発現及び変動は特に認められなかった。

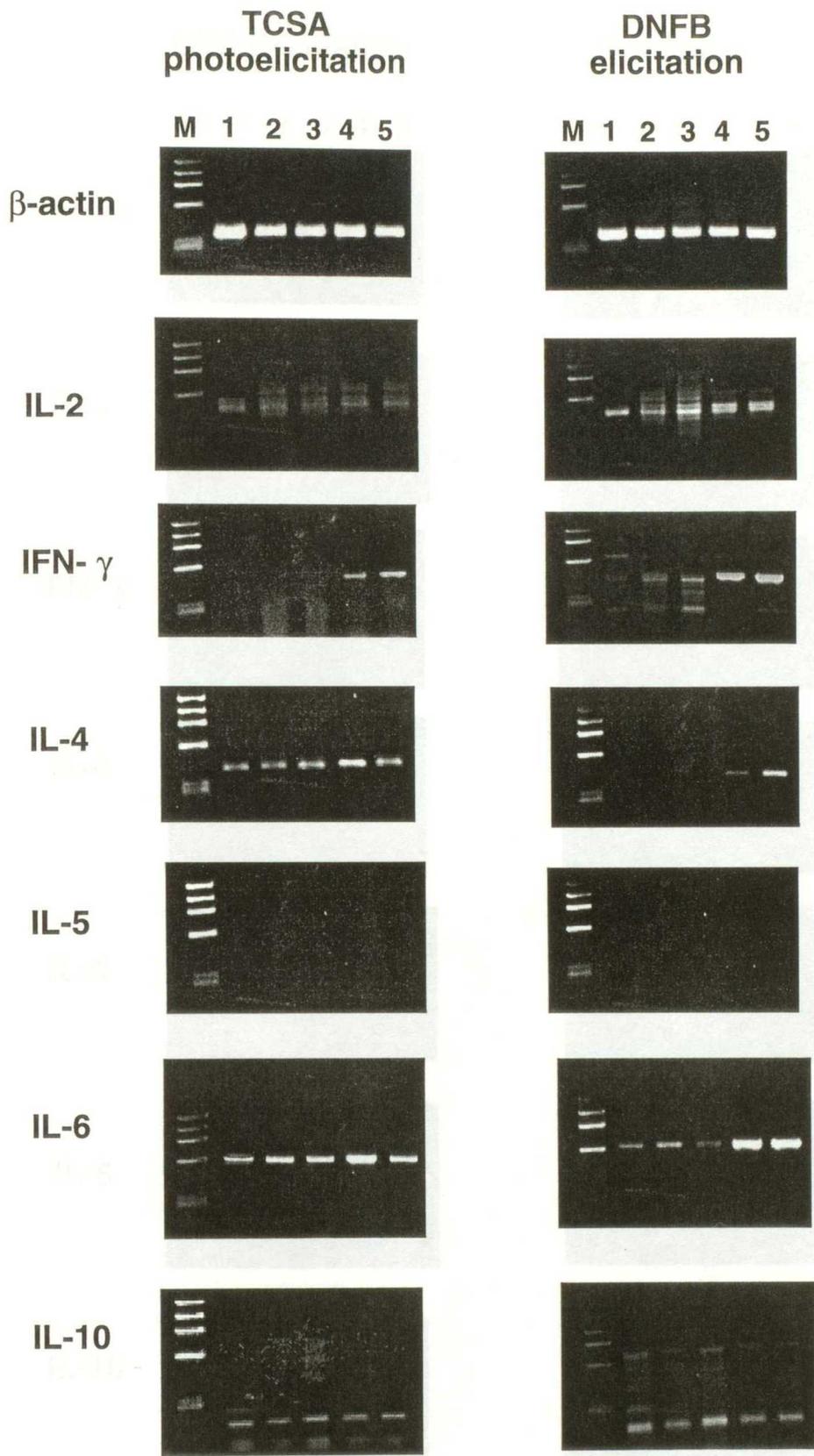


Fig. 6 - 3 Cytokine mRNA expression in the ear after treatment.

M, marker; Lane1, 0h; 2, 6h; 3, 12h; 4, 24h; 5, 48h

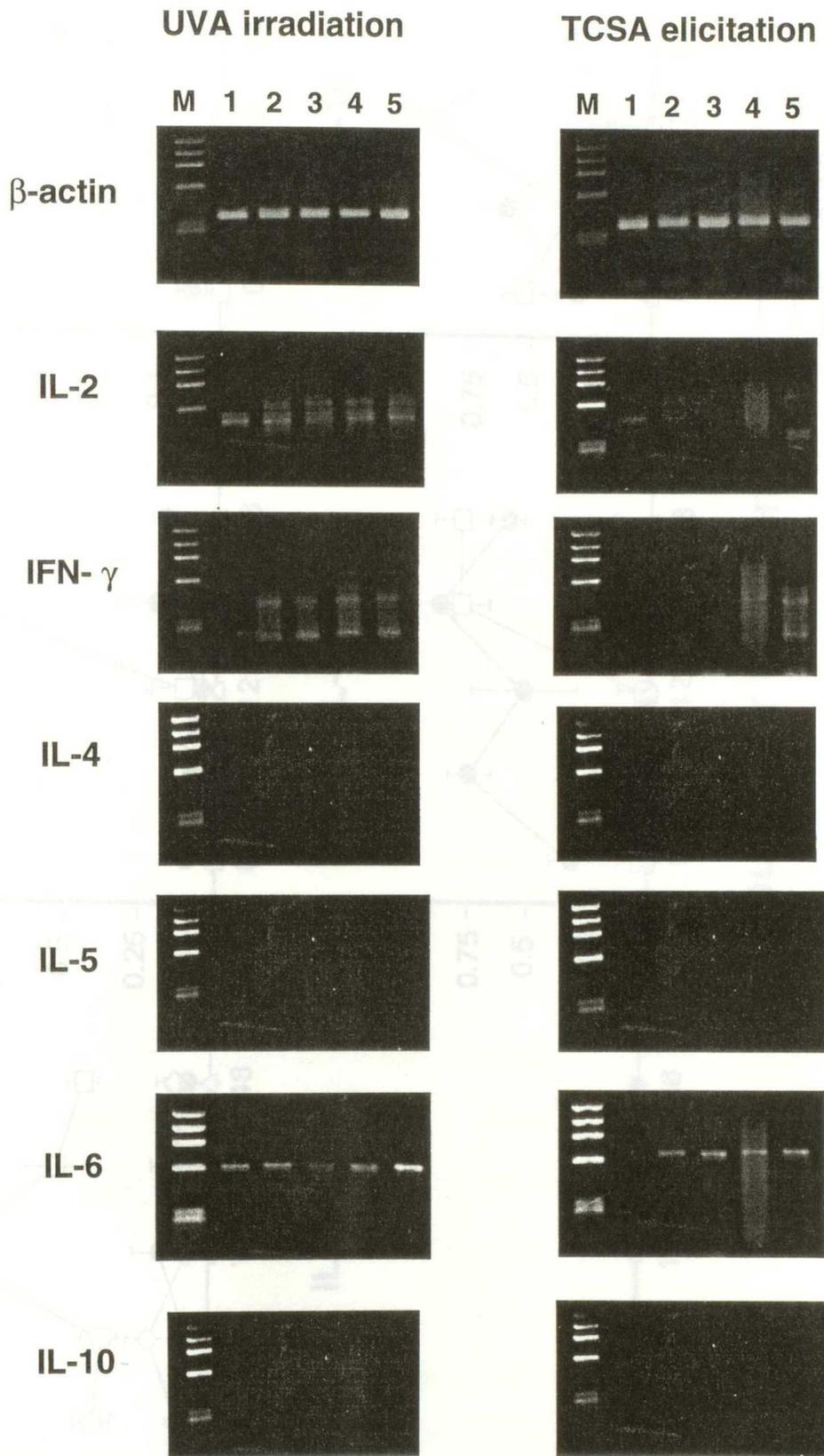
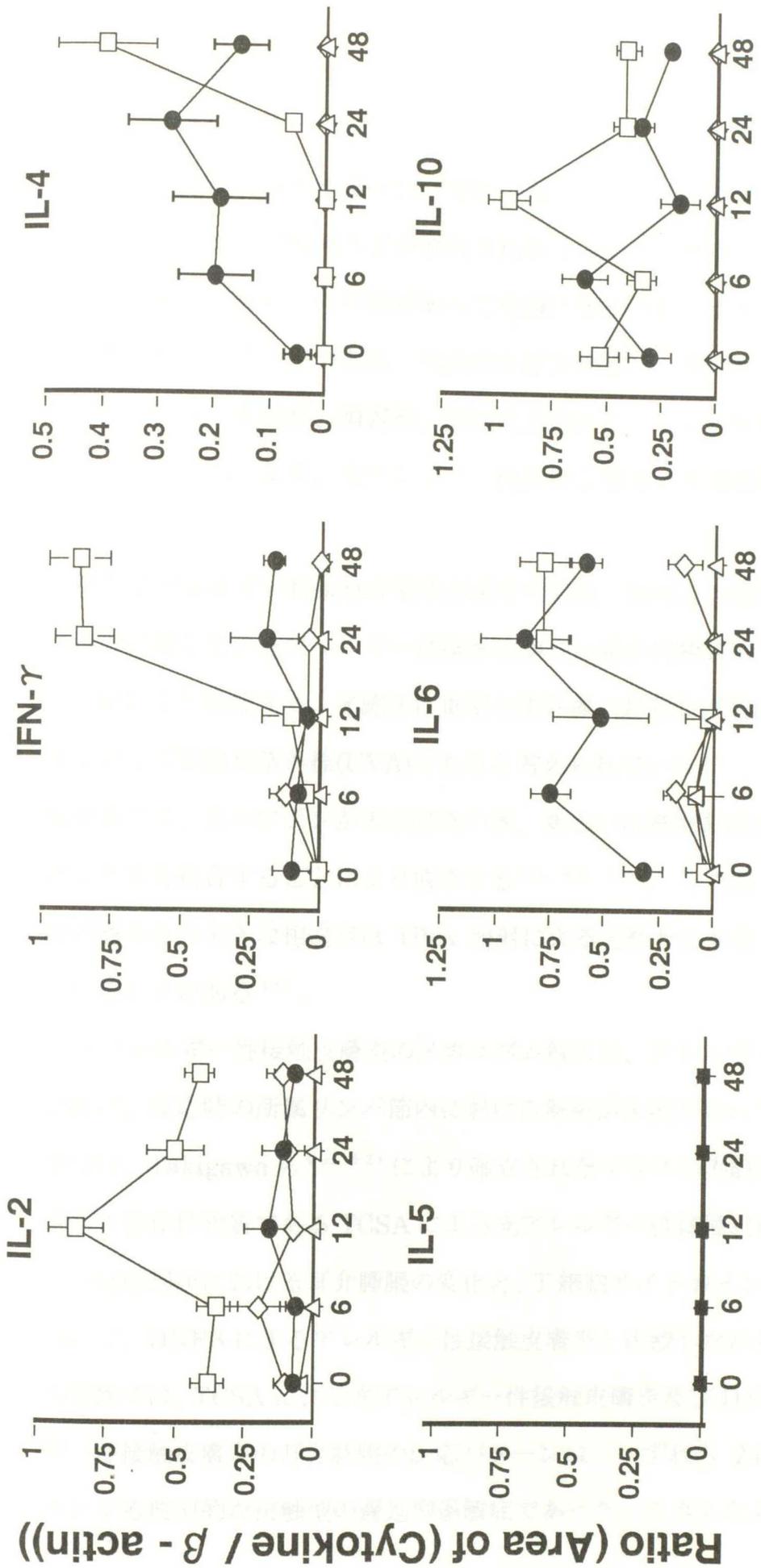


Fig. 6 - 4 Cytokine mRNA expression in the ear after treatment .
M, Marker; Lane1, 0h; 2, 6h; 3, 12h; 4, 24h; 5, 48h



Hours after treatment



Fig. 6 - 5 Changes in cytokine mRNA expression in the ear after treatment.

6-3 考 察

光アレルギー性接触皮膚炎は、原因となる光増感剤が外来性に直接皮膚に接触し、同時に作用波長域の光が照射されることにより発症する。その原因となる光増感剤は、何らかの目的があつて皮膚に塗布されることも、また非意図的に皮膚に付着することもある。代表的な原因物質に、皮膚疾患の外用薬、サンスクリーン剤、化粧品、消毒剤、植物などがある。その発症機序は、免疫機序を介するか否かにより、光アレルギー性接触皮膚炎と光毒性反応の2つに大別される。

通常のアレルギー性接触皮膚炎が感作性物質（抗原）の塗布のみによって起こるのに対して、光アレルギー性接触皮膚炎は感作性物質の塗布に加え紫外線の照射により発症する。光感作に重要な紫外線のおもな作用波長は、2、3の例外を除けば長波長紫外線(UVA)であると考えられている⁴⁹⁾。光アレルギー性接触皮膚炎は、光ハプテンが表皮細胞の膜、あるいは細胞質蛋白に UVA の働きにより共有結合することにより成立する^{45, 46, 50)}。その際、アレルギー性接触皮膚炎との大きな相違点は UVA 照射による光結合に伴なって活性酸素が関与することである⁵¹⁾。

光アレルギー性接触皮膚炎のメカニズム解析は、アレルギー性接触皮膚炎と同様に、反応時の所属リンパ節内における解析が主流となっている。そこで本章では、Takigawa ら^{49, 52)}により確立されたマウスの実験系を用いて、代表的な光感作性物質である TCSA による光アレルギー性接触皮膚炎を誘発させ、その反応局所における耳介腫脹の変化と、T 細胞サイトカイン mRNA の発現について、DNFB によるアレルギー性接触皮膚炎と比較しながら検討した。今回の実験では、TCSA による光アレルギー性接触皮膚炎及び DNFB によるアレルギー性接触皮膚炎の耳介腫脹の反応パターンは、いずれも 24~48 時間をピークとする典型的な接触型の遅延型過敏症であった。こうした耳介腫脹の変化を

もとに、各惹起誘発後の反応局所におけるサイトカイン産生パターンについて検討した。

Th2 型サイトカインである IL-4、IL-6 及び IL-10 の mRNA 発現は、TCSA による光アレルギー性接触皮膚炎では反応早期である 6 時間後より顕著に認められるのに対して、DNFB によるアレルギー性接触皮膚炎では、耳介腫脹のピーク時である 24~48 時間後(IL-4 及び IL-6)あるいは 12 時間後(IL-10)に認められた。一方、Th1 型サイトカインである IL-2 及び IFN- γ の mRNA 発現は光アレルギー性接触皮膚炎と比較して、アレルギー性接触皮膚炎において顕著であり、IL-2 では 12 時間後、IFN- γ では 24 時間後以降にピークとなった。すなわちアレルギー性接触皮膚炎では Th1 型サイトカインが耳介腫脹ピーク時と一致して、あるいはそれより先取りして発現し、遅れて Th2 型サイトカインの代表の 1 つである IL-4 が出現してくると考えられた。一方、光アレルギー性接触皮膚炎では Th1 型サイトカインの発現は比較的弱く、Th2 型サイトカインは早期より発現した。

光アレルギー性接触皮膚炎はアレルギー性接触皮膚炎と同様に CD4⁺T 細胞が介在する免疫応答反応である^{46, 49)}が、光アレルギー性接触皮膚炎には実験的に明らかな抑制回路が存在し⁵³⁻⁵⁵⁾、CD4 陽性で抗原提示細胞上のクラス II 分子 I-E の拘束を受けるサブレッサーT 細胞が担っている⁵⁵⁾。マウスの CD4⁺T 細胞は、そのサイトカインプロファイルにより Th1 と Th2 に分けられ¹⁾、ヘルパーT 細胞、サブレッサーT 細胞はそれぞれ Th1、Th2 であることが示されつつある。光アレルギー性接触皮膚炎も Th1/Th2 バランスによりその反応強弱が決定するものと考えられた。

今回の解析結果より、光アレルギー性接触皮膚炎の反応局所では、IL-4 及び IL-10 を始めとする Th2 型サイトカインの mRNA 発現が早期より顕著に認められ、一方、アレルギー性接触皮膚炎の反応局所では、IL-2 及び IFN- γ といっ

た、Th1 型サイトカインの mRNA 発現が耳介腫脹にほぼ一致して認められた。両過敏症とも反応の促進には Th1 が関わっていると考えられるが、光アレルギー性接触皮膚炎は抑制回路を担う Th2 が誘導され易い反応系であると推測される。一方、アレルギー性接触皮膚炎は促進回路を担う Th1 に比べ、抑制性 Th2 が誘導されにくい過敏症であると推測される。しかし、アレルギー性接触皮膚炎において、遅れて 24~48 時間後から産生される IL-4 や 12 時間後に亢進する IL-10 は、アレルギー性接触皮膚炎の反応収束の為に寄与し、結局は Th2 も誘導されるのかもしれない。

Asada ら²²⁾は trinitrochlorobenzene(TNCB)によるアレルギー性接触皮膚炎の表皮及び真皮において、IL-4 の mRNA 発現が顕著に認められることを報告しており、これは TNCB が DNFB より Th2 をより誘導し易い物質であることを示唆している。また、感作部位を UVB 前照射したマウスにおける TCSEA による光アレルギー性接触皮膚炎は、脾細胞より IL-4 及び IL-10 を産生する Th2 cell line を作成し易い^{47, 56)}。このことは TCSEA による光アレルギー性接触皮膚炎では Th2 が易誘導性であることを示唆しており、本実験結果と符合する。

今回は促進回路を担う Th1 が比較的容易に誘導され、そのために光アレルギー性接触皮膚炎高応答性を示すハプロタイプ d の BALB/c についてのみ解析を行った。しかし、抑制回路を担う Th2 が容易に誘導され、光アレルギー性接触皮膚炎低応答を示す k ハプロタイプのマウス⁵⁵⁾についても同様な解析が必要になると思われる。k ハプロタイプマウスを使用することにより、光アレルギー性接触皮膚炎の反応局所における Th1/Th2 バランスがより明確になるかもしれない。いずれにしろ、反応局所における解析結果は、光アレルギー性接触皮膚炎の惹起誘発時における、皮膚とリンパ節での T リンパ球ポピュレーションの関連性を追求する意味からも、極めて重要であると思われる。今回は TCSEA

についてのみの実験データであるため、他の光感作性物質を用いた同様な解析が必要となるが、サイトカインプロファイルを指標とした光感作性を予測する方法は特異性が高いと考えられ、各種化学物質の光感作能を反応局所にて解析する際に、また、感作性と光感作性とを比較解析する際に有効な方法であると考ええる。

本解析により、アレルギー性接触皮膚炎は促進回路を担う **Th1** 細胞が誘導され易い反応系 (**Th1** 易誘導性) であるのに対し、光アレルギー性接触皮膚炎は抑制回路を担う **Th2** 細胞が誘導され易い反応系 (**Th2** 易誘導性) であることが示唆された。

第7章 総括および結論

7-1 総括

皮膚は、環境からの種々の物質の影響に曝され第一線の反応をする組織である。そのような反応として皮膚炎や微生物感染、さらには皮膚腫瘍など、炎症や免疫に関与する免疫担当細胞だけでなく、皮膚を構成する細胞自体も種々のサイトカインを産生分泌することが確かめられてきた。サイトカインとは、生体の細胞により産生、分泌され、細胞間の情報の伝達を司りつつ、免疫応答、炎症、細胞増殖、分化、造血など、さまざまな生体の機構を制御しているペプチドや糖蛋白からなる情報伝達分子の総称である。その特徴として、異なった作用を発揮する多様性と、一方いくつかのサイトカインが同じ機能を示す重複性が挙げられる。現在まで多数、それぞれ異なった名前で報告されている。そのなかで、Mosman ら¹⁾が CD4⁺T 細胞クローンが分泌するサイトカインの種類によって2種類の亜集団に分類することが可能であることを報告して以来、各々が産生するサイトカインが、異なる免疫反応を制御することから、免疫反応制御の上で注目されつつある。すなわち、Th1 亜集団は IL-2、IFN- γ を分泌して細胞障害性 T 細胞の活性化や遅延型過敏症等の細胞性免疫反応を、Th2 亜集団は IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 等を分泌して抗体産生、特に IgE や IgG の一部のサブクラス抗体の産生を刺激する。その際、Th1 細胞から産生される IL-2、IFN- γ 、TNF- β は細胞性免疫を増強し、体液性免疫（抗体産生）を抑制する。これとは反対に、Th2 細胞から産生される IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 は体液性免疫を増強し、細胞性免疫反応を抑制する。すなわち、Th1/Th2 細胞は相互に抑制しあう関係にある。

現在では、Th1/Th2 細胞のサイトカインバランスの崩れが種々の免疫性疾患の原因となっていると考えられはじめている。例えば、アトピー性皮膚炎患者

の炎症局所に浸潤している CD4⁺T 細胞からは IL-4 や IL-5 などの Th2 型サイトカインが産生されている⁵⁷⁾。アトピー性皮膚炎病変部に浸潤している T 細胞、気管支喘息患者の肺胞洗浄液中に含まれる T 細胞はいずれも主として Th2 細胞であることが明らかとなっている。このように、アトピー性皮膚炎患者では Th1 細胞に比べて Th2 細胞が優位であり、Th2 細胞から産生されるサイトカインが病態形成に重要な役割を果たしていることが理解できる。以上のように、Th1/Th2 細胞の分化を制御する機構を明らかにすることは、アレルギー性疾患をはじめとした種々の免疫性疾患の発症機序を理解し、治療法を考える上で非常に重要なことである。

皮膚科領域の湿疹・皮膚炎のうち、アレルギー性接触皮膚炎(ACD)は単純化学物質により惹起される最も一般的な接触皮膚炎の1つである。また、ACDは動物を用いて比較的容易に誘導することが可能なことより、免疫学的あるいは分子生物学的解析手段等を用い、その発症機構の解析がさかんに行われている²⁻⁵⁾。しかし、今日までの ACD の解析の多くは惹起誘発時の(皮膚)所属リンパ節内あるいは脾細胞内における解析が主流であり、しかも惹起誘発期における解析が多い。したがって ACD の重要な反応の場である皮膚とリンパ節との関連性について、また、ACD の反応成立機序について、なお多くの疑問点や未検索の部分が残されていると思われる。近年、サイトカインネットワークの生体内免疫分子機構の解明に伴い、各種アレルギー疾患とサイトカインとの関わりが注目されつつある。

著者は化学物質による遅延型アレルギーの発症機構の解明に向けて、マウス ACD の皮膚反応局所におけるサイトカインプロファイルを解析し、その特徴を明らかにするとともに、サイトカインを指標とした化学物質による感作性等に対する評価系としての有用性について検討することを目的に、次に示す5つの解析を試みた。

第2章では代表的な感作誘発性物質のうち DNFB を用い誘発されるマウスでの、実験的 ACD の惹起誘発期の反応局所におけるT細胞の関与と、反応局所より発現されるサイトカインの産生パターンについて解析した。ACD の惹起誘発期における耳介腫脹の反応パターンは惹起誘発 24 時間後に最大となり、典型的な遅延型過敏症であった。病理学的解析では皮膚病変形成に伴ってリンパ球の浸潤が顕著となり、T 細胞群のうち CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞の両細胞の関与が ACD の反応成立に必要であると示唆された。また、これらの細胞群より産生されるサイトカイン類について RT-PCR 法にて解析した。その結果、IL-4 を中心とした Th2 型サイトカインに比べ IFN- γ を中心とした Th1 型サイトカインの mRNA 発現が顕著に認められる傾向にあった。さらに IFN- γ 産生の促進因子の1つである IL-12 の発現(特に IL-12p35)も認められ、また、抗 IFN- γ 抗体処理マウスを用いた解析では ACD の反応抑制(耳介腫脹率の低下)が顕著に認められた。IL-12 は抗原提示を受けたナイーブヘルパーT 細胞を Th1 細胞への分化に誘導し、またナチュラルキラー(NK)細胞に作用し IFN- γ 産生を刺激することがわかっている⁵⁸⁾。さらに、IL-12 受容体を介したシグナル伝達において制御されている転写因子 STAT4 のノックアウトマウスにおいて Th1 細胞への分化が抑制されることも報告されている^{59, 60)}。したがって、ナイーブヘルパーT 細胞を Th1 細胞へと分化させるのに必要な代表的なサイトカインである IL-12 の産生に伴い、Th1 細胞の分化が促進し、Th1 細胞より IFN- γ や IL-2 等の mRNA 発現が認められたと考えられる。また、IFN- γ の産生に伴い、Th2 細胞への分化を誘導するサイトカインである IL-4 の産生がやや抑制されたと考えられる。以上のことから、ACD は Th1 易誘導性な反応系であるといえ、反応成立(惹起誘発期)には Th1 型サイトカインのうち、特に IFN- γ の皮膚組織内における mRNA 発現が重要な役割を果たしているといえる。

第3章では ACD の惹起誘発期と同様に感作誘導期における解析、すなわち感作誘導の有無によりみられる反応について2種類の感作性物質を用いて比較解析をおこなった。マウス CD4⁺T細胞は主に細胞性免疫の調節に関与している Th1 細胞と、主に液性免疫に関与している Th2 細胞とに分類される。一方、これまで CD8⁺T細胞は IFN- γ をはじめ、Th1 様のサイトカイン産生を示すと考えられていたが、最近 *in vivo*、*in vitro*において CD8⁺T細胞が Th2 型のサイトカインである IL-4、IL-5 の産生能を獲得しうることが報告された⁶⁾¹⁾。この報告は CD8⁺T細胞もサイトカインを産出することによって免疫反応の調節に重要な役割を担っている可能性を示唆するものである。そこで ACD に対する CD4⁺T細胞及び CD8⁺T細胞の関与について解析した結果、両細胞の mRNA 発現が感作誘導期及び惹起誘発期のいずれにおいても認められた。また、この結果は第2章の免疫組織化学的解析データとも一致した。これらのことより両細胞が ACD の感作誘導期及び惹起誘発期の両反応形成過程において深く関与していることが示された。次にこれらの細胞から産生されるサイトカインについて解析した結果、ACD の反応成立過程（惹起誘発後）の反応局所において、主として活性化 CD4⁺T細胞から分泌されてくると考えられる惹起誘発時に必要なサイトカイン類（特に IFN- γ 、IL-2 等の Th1 型サイトカイン）は、ACD の誘導過程ですでに反応局所における主に記憶 CD4⁺T細胞からも分泌されることが推定された。分泌されるサイトカインの発現由来については不明であるが、CD4⁺T細胞のみならず CD8⁺T細胞からの Th1 型サイトカインの産生も考えられる。以上のことから、ACD の感作誘導期及び惹起誘発期の両反応形成過程において Th1 型サイトカインが必要であると示唆された。

第4章では ACD と刺激性接触皮膚炎とを反応局所より発現するサイトカインの産生パターンにより比較解析した。各々の炎症反応局所では、感作性物質は Th1 リンパ球を主体とした免疫応答反応を誘導するのに対し、刺激性物質は

主として TNF- α などの産生により好中球を主体とした刺激性反応にとどまるものと推察された。刺激性接触皮膚炎では、皮膚に作用した化学物質の毒性が低い場合には、皮膚で中和され、蕁麻疹反応に移行することはないが、毒性が許容量を超えた場合、表皮細胞を刺激、時には破壊して、サイトカインや蛋白分解酵素などを放出し ACD と同様に蕁麻疹反応を形成することが報告されている⁶²⁾。また、サイトカイン mRNA 発現により感作性物質と刺激性物質とを比較解析した報告^{32, 63)} も幾つかある。これらの報告の中には本実験結果と一致しないデータも認められるが被験物質、被験物質濃度、試験系あるいは解析方法等に相違が認められるため単純に比較することは困難であると思われる。いずれにせよ本解析結果から刺激性接触皮膚炎は ACD と比べ反応成立の際に T 細胞の関与が比較的弱い傾向にあると示唆された。よって、中等度以上の感作性物質及び刺激性物質とを識別する際には反応局所において IL-2 や IFN- γ 等の Th1 型サイトカインの mRNA 発現の有無が重要であると考えられる。

第 5 章では Phenol 系化合物を被験材料として、サイトカイン mRNA 発現を指標とした ACD の感作性評価への可能性について検討した。その結果、本解析により、ACD による耳介腫脹率が強度な物質に限らず、軽度な物質においても効率良く、Th1 型サイトカイン (Th1 細胞) の mRNA が検出されており感作性評価としての可能性が示唆された。

第 6 章では光感作性誘発物質の塗布と紫外線の照射によって起こる遅延型過敏症の一つである光アレルギー性接触皮膚炎 (PACD) の反応局所におけるサイトカイン mRNA の発現パターンについて ACD の解析結果と比較しながら検討した。その結果、PACD の惹起誘発過程においては早期より IL-4、IL-6 および IL-10 等の Th2 型サイトカインの顕著な発現が認められるのに対し、IL-2 および IFN- γ 等の Th1 型サイトカインは ACD と比較してその発現は極めて軽度であった。これは Th2 細胞への分化を誘導するサイトカインである IL-4 の産生

に伴い、Th2 細胞が活性化され Th1 細胞の抑制因子である IL-4 及び IL-10 の産生促進が生じた結果であると考えられる。しかし、PACD も反応経過に伴って Th1 細胞の産生が認められることから ACD と同様に反応促進の際には Th1 が関わっていると考えられる。いずれにせよ、本解析結果を Th1/Th2 バランスから病態把握するならば、PACD は促進回路を担う Th1 に比べ、抑制性 Th2 が誘導され易い反応系であると推測され Th2 易誘導性な過敏症であることが示唆された。一方、ACD は促進回路を担う Th1 に比べ、抑制性 Th2 が誘導されにくい過敏症であることが示唆された。

本研究で示された、サイトカインを指標としたマウス ACD の反応局所における解析は ACD の免疫応答また、皮膚と免疫担当細胞（リンパ節、脾細胞等）との関連性等を追求する際に有用な解析方法になり得ると考える。また、今後、未知の化学物質の刺激性、感作性、光感作性等の検出に向けて、簡便にして高感度なスクリーニング法（化学物質によるアレルギー原性の評価系）として発展することも期待される。

7-2 結 論

1. アレルギー性接触皮膚炎(ACD)の惹起誘発期では、CD4⁺T 細胞のみならず CD8⁺T 細胞の組織内浸潤が必要であり、反応局所より産生されるサイトカインのうち、Th1 型サイトカイン(特に IFN γ)の mRNA 発現が極めて重要であることが示唆された。よって、ACD は Th1 易誘導性な反応系であるといえる。
2. 強感作性物質を用いた ACD の感作誘導期および惹起誘発期では、何れも反応局所において Th1 型サイトカイン(IL-2,IFN- γ)の mRNA 発現が顕著に認められた。よって、強感作性物質では 1 回感作 (priminng) でも Th1 細胞を指標に、感作性を予測することも可能である。

3. 強感作性物質と強刺激性物質は反応局所より発現する Th1 型サイトカイン (IL-2, IFN- γ) を指標とし鑑別することが可能である。
4. 軽度から強度の感作性を有する数種の Phenol 系化合物について mRNA レベルにて解析した結果、強弱はあるものの何れの物質も Th1 型サイトカイン (IL-2, IFN- γ) の mRNA 発現が認められた。よって、本解析は感作性を予測する際の高感度なスクリーニング法になり得る。
5. サイトカイン mRNA 発現を指標に光アレルギー性接触皮膚炎 (PACD) と ACD を比較解析した結果、反応局所において PACD は ACD に比べ、Th2 型サイトカインの mRNA 発現が顕著であった。よって、PACD は Th2 易誘導性な反応系であるといえる。

謝 辞

本論文の作成にあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました麻布大学獣医学部生理学第1研究室 松下博治教授、同大学同学部微生物学第1研究室 田淵清教授、同大学生物科学総合研究所 代田欣二教授に謹んで感謝致します。

本研究の遂行にあたり、懇切なる御指導を賜りました北里大学理学部分子発生学研究室 (故)寺田英司助教授、同大学医学部皮膚科学教室 西山茂夫名誉教授、同大学同学部同教室 勝岡憲生教授、同大学同学部同教室 増澤幹男助教授、同大学同学部同教室 藤村響男博士に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり貴重な御助言を頂きました浜松医科大学医学部皮膚科学教室 戸倉新樹講師に厚く感謝致します。

本研究を行うに際し、幅広い御援助と御協力を頂きました北里大学医学部皮膚科学教室ならびに同大学理学部分子発生学研究室の諸先生方に厚く感謝致します。

最後に、本研究を進めるにあたり、種々、御協力して頂きました鐘紡株式会社化粧品研究所の皆様、特に安全性・分析グループの鈴木恵子氏に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Mosmann T R, Coffman R L : Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties, *Ann Rev Immunol* , 7 : 145-173, 1989.
2. Alexander H E, Vincent L A, Mark C U, Stephen I K : An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 β in the initiation of primary immune responses in skin, *J Immunol*, 150 : 3698-3704, 1993.
3. Nishioka K : Mechanism of allergic contact dermatitis, *Environ Dermatol*, 2 : 163-169, 1995.
4. 片山一郎 : アレルギー性接触皮膚炎, *医学のあゆみ*, 180 : 56-60, 1997.
5. 片山一郎 : 接触過敏症, *日皮会誌*, 101 : 1620-1622, 1991.
6. 堀 美佳 : マウス接触過敏反応における二相性反応の研究, *皮膚*, 35(15), 96-106, 1993.
7. Nishioka K : Allergic contact dermatitis, *Int J Dermatol*, 24 : 1-8, 1985.
8. Morita H, Kuramoto M, Minami S, Natsuaki M, Sagami S : Study of the kinetics of Ia antigen positive dendritic cells in mice contact hypersensitivity reaction, *Inserum*, 172 : 397-404, 1988.
9. 山下紀子, 夏秋 優 : マウス接触過敏反応における局所の再燃反応抗原特異的抑制に関する研究, *皮膚*, 35(15) : 59-60, 1993.
10. Morita H, Kuramoto M, Oishi M, Yu M, Yamagata M, Sagami S : L3T4-positive cells in the lymph nodes during induction phase of contact hypersensitivity reaction of mice : flow cytometric analysis, *Arch Dermatol Res*, 279 : 491-494, 1987.
11. Natsuaki M, Higasa M, Sagami S, Shinka S : IL-1 and PGE₂

- production by the regional lymph node cells from DNFB-sensitized mice, *J Dermatol* 16 : 111-115, 1989.
- 1 2. Martien L K, Eddy A W, Frank E M Stiekema, Anke M B C Tiggelman, Jan D B : Th1 lymphokine production profiles of nickelspecific CD4⁺T-lymphocyte clones from nickel contact allergic and non-allergic individuals, *J Invest Dermatol* , 98 : 59-63, 1992.
 - 1 3. Asherson G L, Ptak W : Contact and delayed hypersensitivity in the mouse . I . Active sensitization and passive transfer, *Immunology*, 15 : 405-416, 1968.
 - 1 4. Pierre F P, Georges E G, Conrad H, Pierre V : Tumor necrosis factor is a critical mediator in hapten-induced irritant and contact hypersensitivity reactions, *J Exp Med* ,173: : 673-679, 1991.
 - 1 5. Scheynius A, Camp R L, Pure E : Reduced contact sensitivity reactions in mice treated with monoclonal antibodies to leukocyte function-associated molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1, *J Immunol*, 150 : 655-663, 1993.
 - 1 6. 塩原哲夫 : 皮膚に発現する細胞接着分子, *皮膚臨床*, 35 : 1343-1356, 1993.
 - 1 7. Nakano Y : Antigenic competition in the induction of contact sensitivity in mice, *Immunology*, 33 : 167-178, 1977.
 - 1 8. Stephen D M, Mark K J : In vivo effects of G K (Anti-L3T4a) monoclonal antibody on induction and expression of delayed-type hypersensitivity, *Cell Immunol*, 92 : 414-426, 1985.
 - 1 9. Jacobson N G, Szabo S J, Weber-Nordt R M, Zhong Z, Schreiber R D, Darnell J E, Jr., Murphy K M : Interleukin 12 signaling in T helper

- type 1(Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription(Stat)3 and Stat4, *J Exp Med* 181 : 1755-1762, 1995.
- 2 0 . Cher D J, Mosmann T M : Two types of murine helper T cell clone. II . Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones, *J Immunol* 138 : 3688-3694, 1987.
- 2 1 . Hatao M, Hariya T, Katamura Y, Shinobu K : A modification of the local lymph node assay for contact allergenicity screening : measurement of interleukin-2 as an alternative to radioisotope-dependent proliferation assay, *Toxicology* 98 :15-22, 1995.
- 2 2 . Asada H, Jay Linton, Stephen I K : Cytokine gene expression during the elicitation phase of contact sensitivity : Regulation by endogenous IL-4, *J InvestDermatol*, 108 : 406-411, 1997.
- 2 3 . 夏秋 優, 山下紀子, 日笠 穰, 相模成一郎 : BALB/c マウスにおける DNFB 接触過敏症について, *皮膚*, 31(2), 172-176, 1989.
- 2 4 . Kondo S, Pastore S, Shivji G M, Mckenzie R C, Sauder D N : Characterization of epidermal cytokine profiles in sensitization and elicitation phases of allergic contact dermatitis as well as irritant contact dermatitis in mouse skin, *Lymphokine and Cytokine Res*, 13 : 367-375, 1994.
- 2 5 . Koga T, Fujimura T, Imayama S, Katuoka K, Toshitani S, Hori Y : The expression of Th1 and Th2 type cytokines in a lesion of allergic contact dermatitis, *Contact Dermatitis*, 35 : 105-106, 1996.
- 2 6 . 宮崎孝夫 : マウス接触過敏反応の感作誘導期における皮膚所属リンパ節細胞のフローサイトメトリーによる解析, *皮膚*, 32 : 715-721, 1990.

27. Knight C S, Krejci J, Malkovsky M, Colizzi V, Gautam A, Asherson G L : The role of dendritic cells in the initiation of immune responses to contact sensitizers, I. In Vivo exposure to antigen, *Cell Immunol* , 94 : 427-434, 1985.
28. 森田秀樹, 木原貴子, 倉本 賢, 南祥一郎, 湯 正明, 山形正治, 相模成一郎 : 接触過敏反応の感作誘導期における L3T4⁺細胞の IL2 receptor expression (I), *皮膚科紀行*, 83(2) : 197-199, 1988.
29. 宮崎孝夫, 森田秀樹, 相模成一郎 : 接触過敏反応の感作誘導期における腸間膜リンパ節内 L3T4⁺細胞の IL2 receptor expression , *皮膚科紀行*, 83(4) : 511-513, 1988.
30. Alexander HE, Stephen I K : Early events in the induction phase of contact sensitivity, *J Invest Dermatol*, 99 : 39S-41S, 1992.
31. 向田直史 : サイトカインの生物活性, *炎症性サイトカイン*, *日本臨床*, 50(8) : 32-37, 1992.
32. Hoefakker S, Caubo M, Van't Erve E H M, Roggeveen M J, Boersma W J A, Van Joost Th, Notten W R F, Claassen E : In vivo cytokine profiles in allergic and irritant contact dermatitis, *Contact Dermatitis*, 33 : 258-266, 1995.
33. Thompson D C, Constantin-Teodosi D, Moldeus P : Metabolism and cytotoxicity of eugenol in isolated rat hepatocytes , *Chem-Biol Interactions*, 77 : 137-147, 1991.
34. Mizutani T, Satoh K, Nomura H : Hepatotoxicity of eugenol and related compounds in mice depleted of glutathione : structural requirements for toxic potency, *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 73 : 87-95, 1991.

35. Thompson D C, Norbeck K, Olsson L I, Constantin-Teodoshi D, Jolanda Van der Zee, Moldeus P : Peroxidase-catalyzed Oxidation of eugenol: Formation of a cytotoxic metabolite(s), J Biol Chem, 264 : 1016-1021, 1989.
36. Barratt M D, Basketter D A : Possible origin of the skin sensitization potential of isoeugenol and related compounds, Contact Dermatitis, 27 : 98-104, 1992.
37. 中野準三 : リグニンの化学—基礎と応用, ユニ広報株式会社, 東京, pp.420-422, 1979.
38. Taira J, Ikemoto T, Yoneya T, Hagi A, Murakami A, Makino K : Essential oil phenyl propanoids useful as \cdot OH scavengers, Free Rad Res Comms, 16 : 197-204, 1991.
39. Ludemann H -D, Nimus H : ^{13}C -Kernresonanzspektren von Ligninen, 1, Die Makromolekulare Chemie, 175 : 2393-2407, 1974.
40. 安田仁子, 関根万里, 海野俊雄, 伊東正俊, 長村洋三, 浦山 功 : Phenol系化合物と蛍光合成基質の結合能, 化粧品誌, 11(3) : 259-262, 1987.
41. 関根万里, 海野俊雄 : Phenol系化合物と monodansyl cadaverine の結合能 —高速液体クロマトグラフィーによる結合試験—, 日皮会誌, 98(5) : 513-519, 1988.
42. 長村洋三, 浦山 功, 竹内吉男, 伊東正俊, 野上哲則, 石原勝 : 物質の感作予知のための *in vitro test* の試み, 日皮会誌, 91(13) : 1502-1514, 1981.
43. 海野俊雄, 関根万里, 権丙 浩, 竹内吉男, 伊東正俊, 長村洋三, 石原 勝, 浦山 巧 : フェノール系及びシンナミック系化合物とモノダンシルカダベリンの結合能, 皮膚, 27(3) : 592-596, 1985.

- 4 4 . 吳地伝夫 : 抗酸化剤に関する研究IV ブチルヒドロキシアニソール (BHA)の光分解(1), 衛生化学, 13 : 191-196, 1967.
- 4 5 . Tokura Y, Satoh T, Takigawa M : In vitro activation of immune lymph node cell proliferation by photohaptten-modified cells in murine contact photpsensitivity, Arch Dermatol Res, 283 : 203-209, 1991.
- 4 6 . Tokura Y, Takigawa M, Yamada M : Induction of contact photosensitivity to TCSA using photohaptten-modified syngeneic spleen cells, Arch Dermatol Res, 280 : 207-213, 1988.
- 4 7 . Yagi H, Tokura Y, Wakita H, Furukawa F, Takigawa M : TCRV $\beta 7^+$ Th2 cells mediate UVB-induced suppression of murine contact photosensitivity by releasing IL-10¹, J Immunol, 156 : 1824-1831, 1996.
- Tokura Y, Satoh T, Takigawa M : In vitro activation of immune lymph node cell proliferation by photohaptten-modified cells in murine contact photpsensitivity, Arch Dermatol Res, 283 : 203-209, 1991.
- 4 8 . Ulrich P, Homey B, Vohr H-W : A modified murine local lymph node assay for the differentiation of contact photoallergy from phototoxicity by analysis of cytokine expression in skin-draining lymph node cells, Toxicology, 125 : 149-168, 1998.
- 4 9 . Takigawa M, Miyachi Y : Mechanisms of contact photosensitivity in mice : I . T cell regulation of contact photosensitivity to tetrachlorosalicylanilide under the genetic restrictions of the major histocompatibility complex, J Invest Dermatol, 79 : 108-115, 1982.
- 5 0 . Kochevar I E , Harber L C : Photoreactions of 3,3',4'5-tetrachloroasalicylanilide with proteins, J Invest Dermatol, 68 : 151-156, 1977.

- 5 1 . Miyachi Y, Imamura S, Niwa Y, Tokura Y, Takigawa M: Mechanisms of contact photosensitivity in mice. VI. Oxygen intermediates are involved in contact photosensitization but not in ordinary contact sensitization, *J Invest Dermatol*, 86 : 26-28, 1986.
- 5 2 . Tokura Y, Takigawa M, Immunological mechanisms of contact photosensitivity, *Eur J Dermatol*, 3 : 87-91, 1993.
- 5 3 . Takigawa M, Miyachi Y, Toda K, Yoshioka A: Mechanisms of contact photosensitivity in mice IV. Antigen-specific suppressor T cells induced by preirradiation of photosensitizing site to UVB, *J Immunol*, 132 : 1124-1129, 1984.
- 5 4 . Tokura Y, Miyachi Y, Takigawa M, Yamada M : Ultraviolet-induced suppressor T cells and factor(s) in murine contact photosensitivity I . Biological and immunochemical characterization of factor(s) extracted from suppressor T cells, *Cell Immunol*, 110 : 305-320, 1987.
- 5 5 . Tokura Y, Satoh T, Takigawa M, Yamada M : Genetic control of contact photosensitivity to tetrachlorosalicylanilide. I . Preferential activation of suppressor T cells in low responder H-2^k mice, *J Invest Dermatol*, 94 : 471-476, 1990.
- 5 6 . Tokura Y, Wakita H, Yagi H, Nishimura K, Furukawa F, Takigawa M : Th2 suppressor cells are more susceptible to sphingosine than Th1 cells in murine contact photosensitivity, *J Invest Dermatol*, 107 : 34-40, 1996.
- 5 7 . Wierenga E A , Snoek M , de Groot G C : Evidence for compartmentalization of functional subsets CD4 T lymphocytes in atopic patients, *J Immunol*, 144 : 4651-4656, 1990.

- 5 8 . Schmitt E, Hoehn P, Huels C : T helper type 1 development of naïve CD4+T cells requires the coordinate action of interleukin-12 and interferon-gamma and is inhibited by transforming growth factor-beta, *Eur J Immunol*, 24 : 793-798, 1994.
- 5 9 . Thierfelder W E, van Deursen J M, Yamamoto K : Requirement for Stat 4 in interleukin-12 mediated responses of natural killer and T cells, *Nature*, 382 : 171-174, 1996.
- 6 0 . Kaplan M H, Sun Y -L, Hoey T : Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice, *Nature*, 382 : 174-177, 1996.
- 6 1 . 花淵志野, 八木田秀雄 : T 細胞の産生するサイトカインとサブセット (Th1/Th2, Tc1/Tc2) , *Mebio*, 14(7) : 19-29, 1997.
- 6 2 . 西岡清 : 接触皮膚炎の発症機序、最近の知見, *Environ Dermatol*, 5(1) : 18-19, 1998.
- 6 3 . Alexander H E, Stephen I K : Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity, *Proc Natl Acad Sci*, 89 : 1398-1402, 1992.

[論文要旨]

サイトカインを指標としたマウスアレルギー性
接触皮膚炎の解析と化学物質スクリーニング
への応用に関する研究

山崎 俊介

1999(平成11)年 6月

皮膚は環境からの種々の物質に曝され第一線の反応をする組織である。皮膚炎や微生物感染、皮膚腫瘍など、炎症や免疫に関与する免疫担当細胞だけでなく、皮膚を構成する細胞自体も種々のサイトカインを産生分泌することが確かめられている。サイトカインは生体の細胞により産生、分泌され細胞間の情報伝達を司りつつ、免疫応答、炎症、細胞増殖、分化、造血など、さまざまな生体の機構を制御している。

一方、皮膚科領域の湿疹・皮膚炎のうち、アレルギー性接触皮膚炎（以下、ACD）は、単純化学物質により惹起される最も一般的な遅延型アレルギーの一つである。また、ACDは動物を用いて比較的容易に誘導することが可能なことより、免疫学的あるいは分子生物学的解析手法等を用い、その発症機構の解析が行われている。しかし、ACD解析の多くは惹起誘発時における（皮膚所属）リンパ節内あるいは脾細胞内における解析が主体であり、皮膚反応局所についての解析は少ない。

この研究の目的は化学物質による遅延型アレルギーの発症機構解明に向けて、マウス ACD の皮膚反応局所におけるサイトカインプロファイルを解析し、その特徴を明らかにするとともに、サイトカインを指標とした化学物質による感作性等に対する評価系としての有用性について検討することである。

はじめに、マウスでの実験的 ACD の惹起誘発期の皮膚反応局所における T 細胞の関与と皮膚反応局所に発現するサイトカイン産生パターンについて RT-PCR 法にて解析した。DNFB (2,4-dinitro-fluorobenzene) を用いた ACD において惹起誘発期の耳介腫脹反応は惹起誘発 24 時間後に最大となった。病理学的所見では、皮膚病変形成に伴ってリンパ球の浸潤が顕著となり、T 細胞群のうち CD4⁺T 細胞及び CD8⁺T 細胞の関与が ACD の反応成立に必要であることが示唆された。また、これらの細

胞群より産生されるサイトカイン類については、IL-4を中心としたTh2型サイトカインに比較してIFN- γ を中心としたTh1型サイトカインのmRNAの発現が顕著であった。さらにIFN- γ 促進因子であるIL-12の発現や抗IFN- γ 抗体処理マウスを用いた解析結果から、ACD反応成立には、Th1型サイトカインのうち特にIFN- γ の皮膚組織内におけるmRNA発現の重要性が示唆された。

第2として、ACDの惹起誘発期と同様に感作誘導期におけるT細胞とサイトカイン産生パターンについて解析した。すなわち、感作誘導の有無による反応について比較解析した。その結果、CD4⁺T細胞ならびにCD8⁺T細胞のmRNA発現が、感作誘導期及び惹起誘発期のいずれにおいても認められた。また、この結果は免疫組織学的解析データとも一致しており、両細胞がACDの感作誘導期及び惹起誘発期の両過程に深く関与していることが示された。次に、これらの細胞から産生されるサイトカインについて解析した。その結果、ACDの反応成立過程(惹起誘発後)の皮膚反応局所において、主に活性化CD4⁺T細胞から分泌されると考えられるサイトカイン(特にIFN- γ 、IL-2等のTh1型サイトカイン)が、ACDの感作誘導期の時点ですでに皮膚反応局所に発現することを認めた。

第3として、ACDと刺激性接触皮膚炎とを皮膚反応局所に発現するサイトカイン産生パターンにより比較解析した。各炎症反応局所では、感作性物質では特に、IL-2及びIFN- γ のmRNAの顕著な発現を認め、Th1リンパ球を主体とした免疫応答を誘導するのに対し、刺激性物質ではIL-2及びIFN- γ などのmRNA発現抑制と、TNF- α などの産生により好中球を主体とした刺激性反応が示された。本解析結果から、感作性物質と刺激性物質とを識別する際に、皮膚反応局所におけるTh1型サイトカイン(IL-2やIFN- γ 等)mRNA発現の有無の重要性が示唆された。

第4として、フェノール系化合物を被験材料として、サイトカイン mRNA 発現を指標とした ACD の感作性評価への可能性について検討した。その結果、本解析により、ACDによる耳介腫脹率が強度な被験物質に限らず、軽度な被験物質においても効率良く、Th1型サイトカイン(Th1細胞)のmRNAが検出されており感作性評価法としての可能性が示唆された。

第5として、光感作誘発性物質と紫外線(特にUVA)とに起因するアレルギー性接触皮膚炎(PACD)の皮膚反応局所におけるサイトカイン mRNAの発現パターンについて検討した。PACDの惹起誘発過程においては、早期よりIL-4、IL-6及びIL-10のTh2型サイトカイン mRNAの顕著な発現が認められるのに対し、IL-2及びIFN- γ のTh1型サイトカイン mRNAはACDと比較してその発現は極めて軽度であった。Th1/Th2細胞のバランスから病態を把握をすると、ACDは促進回路を担うTh1細胞が誘導され易い反応系(Th1易誘導性)であるのに対し、PACDは、抑制回路を担うTh2細胞が誘導され易い反応系(Th2易誘導性)であることが示唆された。

本研究で示されたサイトカインを指標としたマウス ACD の反応局所における解析は ACD の免疫応答また、皮膚と免疫担当細胞(リンパ節、脾細胞等)との関連性等を追求する際に有効な解析法になり得ると考える。また、今後、未知の化学物質の刺激性、感作性、光感作性等の検出に向けて、簡便にして高感度なスクリーニング法(化学物質によるアレルギー原性の評価系)として発展することも期待される。

【Summary】

Study on Murine Allergic Contact Dermatitis with Special Referance to Local Cytokine Profile and Its Application for Screening Chemical Substances

Shunsuke Yamazaki

Recent advance in researches on cytokines enabled us to understand the mechanisms of inflammatory skin diseases. Keratinocytes can synthesize and release cytokines in their microenvironment in response to external stimuli such as ultraviolet light, chemical substances, and bacterial toxins. Cytokines released from keratinocytes affect functions of other types of cells in the skin such as mast cells, endothelial cells, and fibroblasts which can also release cytokines to contribute to various kinds of inflammatory reactions in the skin. Today, cytokine action has been extensively studied to elucidate the precise mechanism of skin disease. Contact dermatitis is one of the most common skin disease. Recently, many analyses on mechanism of contact dermatitis have been carried out on cytokines. But analysis of cytokine production patterns is performed on almost lymph node cells or spleen cells, but not on skin tissues. Therefore, there still remain several points to be clarified for understanding of the precise mechanism of contact dermatitis. So, in this study, the author analyzed cytokine mRNA expression in the local dermal tissues in chemical-induced contact dermatitis in mice.

1. Cytokines and T lymphocytes in the elicitation phase of allergic contact dermatitis

The studies on T lymphocytes involvement and kinetics of cytokine mRNA by the reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR) method in the elicitation phase of allergic contact dermatitis were performed using skin tissues collected at regular intervals from BALB/c mice sensitized with 2,4-dinitrofluorobenzene. The results obtained from these studies and inhibition of dermatitis by anti-CD4 and anti-CD8 antibodies showed that participation of T lymphocytes and infiltration of T lymphocytes at local dermal sites were found to play an important role in formation of allergic contact dermatitis. On the basis of these results, cytokines formed at the local site of allergic contact dermatitis were examined at the mRNA level. It was found that IFN- γ , IL-6 and IL-1 β were expressed 24 h after the elicitation and then IL-2, IL-4 and TNF- α 48 h after the elicitation. The detection of expression of IL-12(p35) and inhibitory effect of anti-IFN- γ antibody on allergic contact dermatitis suggested that IFN- γ among several Th1 types of cytokines is especially important for the formation of allergic contact dermatitis. Therefore, the author concluded that Th1 type cytokines, especially of IFN- γ , are essential for allergic contact dermatitis and the evaluation of these cytokines mRNA expression in the local skin tissues will be convenient method for

screening chemicals for the potential as contact allergens.

2. Cytokines and T lymphocytes in the induction phase of allergic contact dermatitis

The author examined the mechanism of onset of allergic contact dermatitis induced by several kinds of chemicals in BALB/c mice by focusing on cytokine mRNA expression. The involvement of T lymphocytes in the formation of allergic contact dermatitis was studied by the RT-PCR method using primers for CD4 and CD8 surface antigen, suggesting that both CD4⁺ and CD8⁺ cells participate in the formation of allergic contact dermatitis. On the basis of these results we analyzed cytokines produced in the reaction site (skin tissues) at the mRNA level with or without the pre-sensitization (induction) of two strong contactants (2,4-dinitrofluorobenzene , picryl chloride). Consequently, there was tendency that the expression of mRNA of Th1 types of cytokines was commonly observed around 24 h after the challenging irrespective of the pre-sensitization (induction). These data suggested that the expression of Th1 type cytokines in the local skin tissue after challenging might be indicative of the potential of the chemicals as contact allergens.

3. Analysis of cytokine profiles in allergic and irritant contact dermatitis

Both allergic contact dermatitis and irritant contact dermatitis that are caused by many environmental factors are common skin diseases. But differentiation between allergic contact dermatitis and irritant contact dermatitis is very difficult *in vivo*. So, we compared the expression of cytokine mRNA in the dermal tissue in murine experimental models of allergic contact dermatitis (2,4-dinitrofluorobenzene , picryl chloride , oxazolone) and irritant contact dermatitis (sodium lauryl sulfate , benzalkonium chloride , isopropyl myristate) . As the results, different expression of cytokine mRNA in the ear site of each dermatitis was observed at 24 h after priming. The expression of mRNA of IL-2 and IFN- γ was observed at the local site of allergic dermatitis, but not in irritant dermatitis, suggesting that marked expression of Th1 type cytokines as IL-2 or IFN- γ in the reaction sites is very important to differentiate allergic contact dermatitis from irritant contact dermatitis.

4. Evaluation of sensitizing effects of phenolic compounds by analysis of cytokine mRNA expression

In this chapter, the author evaluated sensitizing effect by

mouse ear swelling test with phenolic compounds. Skin specimens were collected from auricles of BALB/c mice on 24 h after elicitation of allergic contact dermatitis with six phenolic compounds. The expression of cytokine mRNA in the skin specimens was examined by the RT-PCR method. Phenolic compounds which caused varied intensity of ear swelling response induced expression of Th1 type cytokines (IL-2 and IFN- γ) on 24 h after elicitation. It was also found that among several phenolic compounds, dimerization of these compounds from monomer decreased sensitizing effect. These data suggested that analysis of cytokine mRNA expression in local skin tissue is highly sensitive method for screening the chemicals for their potential as contact allergens.

5. Cytokine mRNA expression in challenged skin of murine contact photosensitivity

The dynamics of expression of cytokine mRNA was examined by the RT-PCR method in the elicitation phase of photoallergic contact dermatitis. Skin specimens were collected from auricles of BALB/c mice that had been ultraviolet A (UVA)-photo-challenged with 3,3',4',5-tetrachlorosalicylanilide during 0 to 48 h after elicitation, along with samples from mice ordinarily challenged with 2,4-dinitrofluorobenzene . The levels of mRNA for IL-4, IL-6 and

IL-10 were markedly elevated in the skin sites challenged with 3,3',4',5-tetrachlorosalicylanilide plus UVA during 0 to 48 h after elicitation. On the other hand, IL-2 and IFN- γ mRNA expression was characteristically observed in allergic contact dermatitis induced by 2,4-dinitrofluorobenzene with modest expression of Th2 type cytokines. These data suggested that Th2 type cytokines are more readily inducible in photoallergic contact dermatitis by 3,3',4',5-tetrachlorosalicylanilide as compared with allergic contact dermatitis by 2,4-dinitrofluorobenzene.

Finally, this study suggested that analysis of cytokine mRNA expression in local skin tissue is a convenient and highly sensitive method for screening varied new chemicals for their potentials of irritation, sensitization, and photosensitization.