

氏名(本籍)	山崎俊介(神奈川県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第379号
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 松下博治 (副査) 田淵清 (副査) 代田欣二

### 論文内容の要旨

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、皮膚科領域の温疹・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おけ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<sup>+</sup>T 細胞及び CD8<sup>+</sup>T 細胞の関与が ACD の反応成立に必要なことが示唆された。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 型サイトカインと比較して IFN- $\gamma$  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- $\gamma$  促進因子である IL-12 の発現や抗 IFN- $\gamma$  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- $\gamma$  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<sup>+</sup>T 細胞並びに CD8<sup>+</sup>

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<sup>+</sup>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- $\gamma$ 、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- $\gamma$  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- $\gamma$  などの mRNA 発現抑制と、TNF- $\alpha$  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- $\gamma$  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）とに起因する光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- $\gamma$  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。

本研究では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。

## 論文審査の結果の要旨

皮膚はその最外層に角層という物理化学的バリアーが存在するため、通常、分子量1,000以上の物質が通過してその内側の細胞層にまで到達することはない。しかし、分子量1,000以下の物質は角層を通過し、表皮、真皮の構成細胞と直接接触する。

生体はそれらの低分子物質のうち、ある種のものに対してアレルギー性接触皮膚炎という T 細胞性免疫で反応する。このアレルギー反応の分子機構には不明な点が多く、細胞レベルの発症機構の十分に解明されていない。さらに、不完全抗原である低分子化学物質が、抗原性を獲得するに至る生体内メカニズムについても不明な点が多い。

本論文では、化学物質によるアレルギー性接触皮膚炎 (ACD) の発症機構の解明を目指して、炎症反応の場である皮膚組織におけるサイトカインの発現状況とT細胞の関与を明らかにするとともに、感作性物質のアレルギー原性等についてサイトカインの mRNA を指標に検討を試みている。

はじめに、マウスでの ACD 惹起誘発期におけるT細胞の関与と皮膚反応局所に発現するサイトカインについて RT-PCR 法にて解析している。ACD の反応成立には、 $CD4^+$ T細胞および  $CD8^+$ T細胞が関与しており、産生されるサイトカイン類については、 $IFN-\gamma$  を中心とした Th 1 型サイトカインの mRNA の発現が著明であった。さらに、IL-12 の発現や抗  $IFN-\gamma$  抗体投与実験での検討結果から、本皮膚炎成立には Th 1 型サイトカインのうち特に  $IFN-\gamma$  の皮膚組織内発現の重要性を指摘している。

第2として、ACD 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について検討している。本皮膚炎感作誘導期において、 $CD4^+$ T細胞ならびに  $CD8^+$ T細胞の関与と Th1型のサイトカイン mRNA の著明な発現を認めている。すなわち、本皮膚炎の感作誘導過程での反応局所における  $CD4^+$ T細胞からのサイトカイン放出 (特に、Th1型  $IFN-\gamma$ 、IL-2等) を示唆し、ACD の感作誘導期、惹起誘発期の両反応形成過程に Th 1 型サイトカインが必要であることを示している。

第3には、ACD と刺激性接触皮膚炎における皮膚反応局所に発現するサイトカイン mRNA の比較解析を行っている。両者における感作24時間後の耳介部局所でのサイトカイン産生パターンに相違を認め、感作性物質 (DNFB など) では、IL-2および  $IFN-\gamma$  などの Th1型サイトカイン mRNA の著明な発現を認めている。一方、刺激性物質 (塩化ベンザルコニウムなど) では、これらのサイトカイン mRNA 発現は認められなかった。その結果として Th1型サイトカイン発現状況から、感作性物質と刺激性物質の識別の可能性を認めている。

第4には、ACD 発症に関与する化学物質の感作性について検討している。すなわち、6種類の感作強度の異なるフェノール系化合物を用い、サイトカイン産生パターンによる感作性評価の可能性を検討している。その結果、ACD による耳介腫脹率が強度な化学物質のみならず、軽度なものにおいても効率よく Th1型サイトカインの mRNA を検出しており、化学物質の感作性評価への可能性を示している。

第5には、光感作誘発性物質と紫外線に起因する光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 mRNA の発現パターンについて検討している。光アレルギー性接触皮膚炎の惹起誘発過程においては、反応早期より IL-4、IL-6、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、 $IFN-\gamma$  等の Th 1 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ることを認めている。

Th1と Th2のバランス面から病態をみると、光アレルギー性接触皮膚炎は、ACD と比較して、Th2易誘導的な反応系であることを認めている。

以上のように、この論文はマウスアレルギー性接触皮膚炎の皮膚組織におけるサイトカイン mRNA 発現の解析から、炎症反応局所のサイトカインプロファイルを明らかにしている。一方、皮膚反応局所におけるサイトカインの解析は、化学物質の刺激性、感作性、光感作性等の検出に簡便、高感度な手法としてその発展性が期待され化学物質のアレルギー誘発性の評価系構築への寄与も期待される。これらの成果は、獣医学の発展に貢献するところ大であり、博士 (獣医学) の学位を授与するに相応しいものと判定した。