

新しいミコフェノール酸外用剤のモルモットにおける DNFB 誘発接触性アレルギー皮膚炎に及ぼす効果

東海林洋子・福村 正・工藤敏隆・柳川 明・嶋田甚五郎・水島 裕*

Effect of topical preparation of mycophenolic acid on experimental allergic contact dermatitis of guinea-pigs induced by DNFB

We newly prepared topical formulation for the mycophenolic acid in this study. Our preparation was effective enough to reduce the experimental allergic contact dermatitis induced by DNFB. Evaluation of efficacy of mycophenolic acid cream was performed as visual estimation on skin reaction and observation of tissues under the light microscope at 1, 2, or 3 days after the treatment. Skin damages of guinea-pigs treated with mycophenolic acid topical preparation were significantly improved compared to the group treated with vehicle only. This effect was continued up to 3 days. The degree of efficacy was better than betamethazone, especially in the early stage of treatment. Light microscope observation also supported these results. And it suggested that effect of mycophenolic acid cream would reach to dermis and epidermis layer. This novel topical preparation of mycophenolic acid could be promising regime for the treatment of psoriasis and atopic dermatitis.

Yoko Shoji・Tadashi Fukumura・
Toshitaka Kudo・Akira Yanagawa・
Jingoro Shimada・Yutaka Mizushima*
**key words : mycophenolic acid, psoriasis,
allergic contact dermatitis**

乾癬の病因はいまだ完全には解明されたわけではないが、T細胞を介するケラチノサイトの異常増殖がその主体と考えられている。T細胞の活性化につづいて表皮あるいは真皮層への浸潤が乾癬皮膚病変の引きがねとなると考えられている^{1,2)}。したがって、T細胞を含めた免疫担当細胞を効果的に抑える抑制剤が乾癬の治療には有効であろうと推測できる。cyclosporin (CysA)²⁾は主

にCD₄陽性細胞をターゲットにその lymphokine の産生と抑制を抑える免疫抑制剤であるが、すでに乾癬の治療に用いられ、すぐれた治療効果を上げている^{3,4)}。

しかし、全身への毒性、特に腎毒性は深刻であり、投与に当っては十分な注意が必要である。こうした薬剤の副作用を回避する最善策としては、投与ルートを変更することが一つの方法と思われるが、概してCysAのように分子量の大きい化合物の皮膚からの吸収はわるく、顕著な成功例は認められていない。

一方、mycophenolic acid (MA) は、ユニークな薬理活性を持つ erythromycin 系抗生剤で、その発見は1896年と1世紀も前であるものの⁵⁾、近年、抗菌作用⁶⁾、抗ウイルス作用⁷⁾、抗癌作用⁸⁾、免疫抑制作用⁹⁾などさまざまな薬理作用が報告されている。MA自体は免疫機構が詳細に調べられる以前に発見されたものだが、そのユニークな薬理作用が最近見直されている。MAを乾癬の臨床治療に最初に用いたのは1970年代であり、治療薬として有望と思われる効果が得られた^{10,11)}。しかし、これは全身投与の結果であり、経口投与されたMAの約90%は肝臓でグルクロン酸抱合を受け活性を失ってしまう¹²⁾。そのため、臨床効果を上げるために投与量の増大を招き、投与量に応じて副作用が発現してくるといった問題が提起された。

そこで本剤の first pass effect と薬理学的に局所投与でも薬理作用を発揮させうる可能性を考慮し、外用剤を作成し、その効果をモルモットの接触性アレルギー皮膚炎にて検討した。

方 法

(1) 実験動物

雌性 Hartley 系モルモット (200~300 g) を日本医科学動物資材研究所から購入。飼育は通常の条

* Department of Clinical Pharmacology, Institute of Medical Science, St. Marianna University School of Medicine 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター

件下に行った。実験には1群8～9匹を用いた。

(2) MA 外用剤(MATP)の作成

MA は種々の溶媒に難溶性の薬剤であり、約70種の溶媒にて溶解性を検討した。なかでも比較的溶解力の強いモノステアリン POE(5)グリセリル(TMGS-5, 日光ケミカル)を含む、油脂性基剤に良く練り込み用いた。なお、この検討に用いたMATPは5%濃度の物を使用した。

(3) DNFB による接触性アレルギー皮膚炎モデルの作成

雌性 Hartley 系モルモットに Aldridge らの方法¹³⁾に従い、DNFB(1-fluoro-2,4-dinitrobenzene, Nakarai Tesc)誘導の接触性アレルギー性皮膚炎を誘発させた。その作用法を簡単に述べると、cyclophosphamide(CP)を腹腔内に300 mg/kg 投与し、3日後に acetone-olive 油に溶解した10% DNFB 50 μ l をモルモットの片耳に塗布した。CP 投与8日後に前日に剃毛しておいたモルモット背部に0.1% DNFB 20 μ l を塗布し遅延型アレルギーを誘発させた。DNFB 塗布後、薬剤を塗布し、24, 48, 72時間後に皮膚反応を下記のスコアにて判定した。0 = 変化なし, 1 = ピンクの斑点, 2 = ピンク, 3 = 赤, 4 = 隆起した赤。

なお、薬剤の塗布は1回約50 μ g, 2回/日とし、患部によく擦り込んだ。

(4) 病理組織学的検討

経時的に皮膚組織を採取し、中性10%ホルマリン溶液にて固定した。パラフィン包埋後、切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。顕微鏡観察下に、①角質の増生、②表皮の肥厚、③細胞間の浮腫、④炎症性細胞の浸潤、⑤表皮内の水疱形成、の項目について0 = 変化なし, + = 軽度変化, ++ = 中等度変化, +++ = 強度変化の4段階にわけて判定した。

(5) 統計処理

統計処理は Student's t-test に従い行った。

結 果

(1) DNFB 誘導による接触性アレルギー皮膚炎に及ぼす MATP の影響

図1に DNFB 誘導による接触性アレルギー性皮膚炎に及ぼす MATP および betamethasone-gentamicin 軟膏(BG, 0.06% の betamethasone

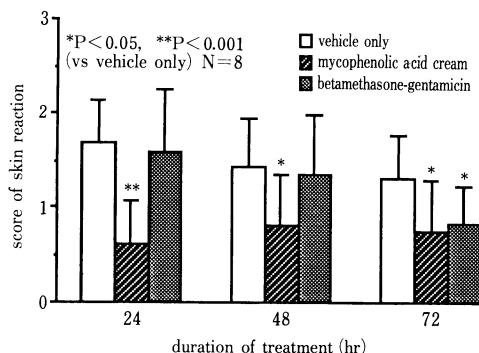


図1 Effect of mycophenolic acid topical preparation (MATP) on DNFB-induced skin reaction of guinea-pigs

Effect of MATP on DNFB-induced skin reaction of guinea-pigs were expressed as scores. Values were mean ± SD. See in the section of "Materials and Methods" for detail.

を含有)の影響を経時的に基剤と比較して示した。

基剤に比較して MATP を塗布したモルモットの24時間後の皮膚反応のスコアは有意に軽減していた($P < 0.001$)。しかも、その効果は72時間後も持続していた。速効性という点では MATP は塗布した翌日から効果がみられた。

一方、BG は24時間後、48時間後には基剤のみを塗布した群と同程度の皮膚反応スコアであったが、72時間後には MATP を塗布した群の皮膚反応スコアと同程度まで軽減した。

(2) 病理組織学的変化に及ぼす MATP の影響

MATP を塗布したモルモットの皮膚の病理組織学的変化については表1にまとめた。典型的な例として、72時間後の基剤塗布例(図2 a)と MATP 塗布例(図2 b)の病理組織像を示した。

基剤のみのコントロール例では、24時間後に表皮にリンパ球や好中球よりなる小円形細胞の浸潤を認め、一部では小水疱を形成していた。真皮でも上層に炎症性細胞の浸潤がみられた。48時間後には顕著な角質の増生や不全角化を認めた。72時間後にも角質の増生と不全角化は以前としてみられた。軽度の表皮の肥厚もみられたが、細胞間浮腫は少なかった。時間の経過とともに、急性の皮膚炎の組織学的所見がみられた。

一方、MATP を塗布して24時間後では、軽度

考 察

今回、筆者らは乾癬の治療を目的として MA の新たな外用剤を作成し、DNFB により誘発させたモルモットの接触性アレルギー皮膚炎における影響を検討した。DNFB により誘発させたモルモットの接触性アレルギー皮膚炎は免疫抑制剤の効果を判定するための一つの方法として用いられており、臨床効果と相関性があるとされている。このモデルにおいて、皮膚反応を肉眼的に観察したところ、MATP は基剤よりも有意に皮膚反応を抑制していた。

今回作成した MATP は、5% の MA を含有しているが、この濃度で十分な効果が認められた。また、この効果は塗布翌日から出現し 3 日後も持続して効果が認められた。対照薬剤として BG 軟膏を用いたが、3 日後にようやく MATP と同様な効果が出現した。MATP は塗布した翌日から基剤を塗布した群より有意に皮膚反応スコアが低かった(図 1)。BG 軟膏が炎症の初期段階に効果がなかったのにくらべ、MATP は初期の段階から効果を発揮した。この結果より、MATP は速効性・持続効果にすぐれているものと思われた。

また、病理組織学的にも同様な傾向が認められた。特に角質層の増生抑制効果は顕著であった。局所投与の場合、皮膚組織深部への浸透度が問題となる。表 1 ならびに図 2 に示したように、表皮、真皮上層においても、炎症反応の抑制がみられたことから、今回作成した MATP は表皮および真皮上層まで到達しているものと思われた。

経口投与された MA は、肝臓で約 90% がグルクロン酸抱合を受けて失活してしまう¹²⁾。バイオアベイラビリティがいちじるしくわるいことが、大量投与を必要としている要因となっている。MA は比較的安全性が高く、ウサギで MA 320 mg/kg/day を 1 年間経口投与しても安全性が確認されている¹⁴⁾。しかし、投与量の増加に伴い副作用も報告されている¹⁵⁾。そのため、少量で効果がみられ、安全性も高い局所投与が望まれているが、現在まで MA の局所投与剤は検討されておらず、その効果についても不明であった。

今回、筆者らは、新しい局所投与剤を作成し、接触性アレルギー皮膚炎モデルでその効果を確認した。接触性アレルギー性皮膚炎モデルで抑制効

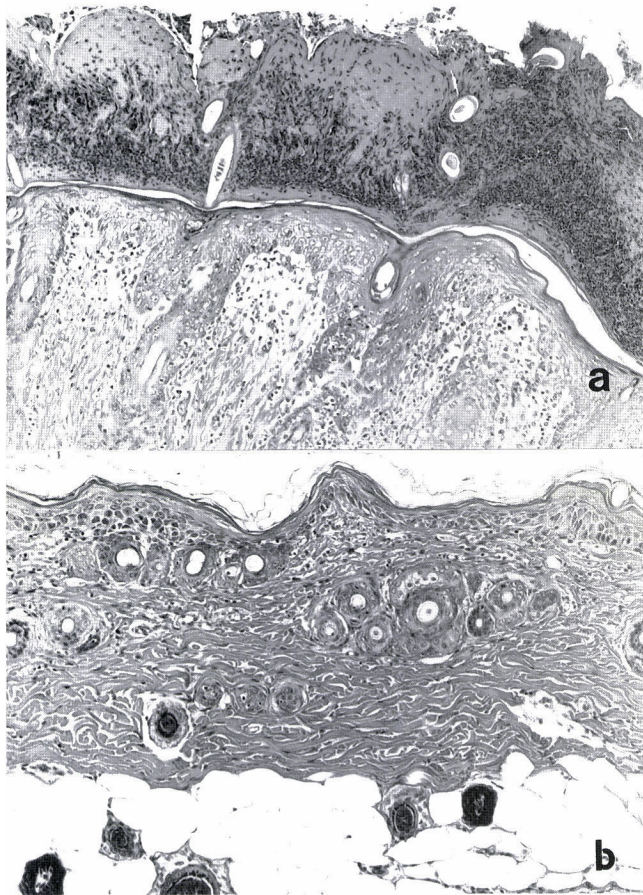


図 2 Morphological changes of skin tissues of guinea-pigs after the treatment of MATP 72 hours after the treatment of mycophenolic acid cream, tissues were removed and morphological changes were observed($\times 100$). (a) showed morphological changes of tissues treated with vehicle only. (b) showed tissues treated with MATP.

の基底細胞の膨化、細胞間浮腫がみられた。表皮内の小水疱形成、炎症性細胞の浸潤はあまりみられなかった。角質の増生は明らかに抑制されていた。48 時間後には軽度の基底細胞の膨化、細胞間浮腫、角質の増生がみられた。72 時間後には軽度の表皮の肥厚、表皮内浮腫がみられた。全体として、MATP を塗布した例では、基底細胞の膨化、細胞間浮腫、表皮の肥厚、表皮内水疱形成、炎症性細胞の浸潤は、基剤を塗布した例にくらべると、軽度であった。特に角質の増生抑制効果は BG にくらべると MATP で顕著であった。

表 1 Morphological changes in skin tissues of guinea-pigs after the treatment of MATP

changes in tissues	24 hours		48 hours		72 hours	
	control	drug	control	drug	control	drug
hyperkeratosis	—	—	++	—	+++	—
acanthosis	++	+	++	+	+++	+
intercellular edema	+++	+	+++	+	+++	+
infiltration of inflammatory cells	+	—	++	+	++	+
spongiotic vesicles	+	—	++	—	++	—

— : no change. + : slight change. ++ : moderate change. +++ : strong change

果があったことから、乾癬ならびにアトピー性皮膚炎疾患にも効果が期待できるものと思われた。

結 語

① MATP はモルモットの接触性アレルギー皮膚炎モデルにおいて、皮膚反応を有意に軽減した。

② ① の効果は投与翌日からみられ、3 日後も持続していた。対照に用いた BG は炎症初期には効果はなかった。

③ 病理組織学的観察より、MATP の影響は表皮、真皮にも認められ、特に角質層増生抑制効果は顕著であった。

ミコフェノール酸の原末を提供していただきました東大名誉教授の田村学造先生、特殊免疫研究所の安藤邦雄博士ならびに味の素株式会社に深謝致します。また、この研究を支援してくださいました株式会社クラレ医薬事業推進部の田能村昌久氏、市原好博氏に感謝致します。

文 献

- 1) Valdimarsson, H., Baker, B. S., Jonsdottir, I. et al. : Psoriasis : a disease of abnormal keratinocyte proliferation induced by T lymphocytes. *Immuno Today*. 7 : 256-259, 1986.
- 2) Baker, B. S., Swain, A. F., Valdimarsson, H. et al. : T cell subpopulations in the blood and skin of patients with psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 110 : 37-44, 1984.
- 3) Ellin, C. N., Gorsulowsky, D. C., Hamilton, T. A. et al. : Cyclosporin improves psoriasis in a double-blind study. *J. Am. Med. Assoc.* 256 : 3110-3116, 1986.
- 4) van Joost, T., Heule, F., Stolz, E., Beukers, R. : Short-term use of cyclosporin A in severe psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 114 : 615-620, 1986.
- 5) Gosio, B. : Ricerche batteriologiche e chimiche sulle alterazioni del mais. *Rivista Igiene Sanita Pubblica Ann.* 7 : 825-868, 1896.
- 6) Florey, H. W., Gilliver, K., Jennings, M. A., Sanders, A. G. : Mycophenolic acid. antibiotic from *Penicillium brevicompactum* Dierckx. *Lancet* I : 46-49, 1946.
- 7) Cline, J. C., Nelson, J. D., Gerzon, K., Williams, R. H., Delong, D. C. : *In vitro* antiviral activity of mycophenolic acid and its reversal by guanine-type compounds. *Applied Microbiol.* 18 : 14-20, 1969.
- 8) Carter, S. B., Franklin, T. J., Jones, D. F., Leonard, B. J., Mills, S. D., Turner, R. W., Turner, W. B. : Mycophenolic acid : an anti-cancer compound with unusual properties. *Nature* 223 : 848-850, 1968.
- 9) Allison, A. C., Almquist, S. J., Muller, C. D., Eugui, E. M. : *In vitro* immunosuppressive effects of mycophenolic acid and an ester pro-drug, RS-61443. *Transplantation Proc.* 23 : 10-14, 1991.
- 10) Jones, E. L., Epinette, W. W., Hackney, V. C., Menendez, L. : Treatment of psoriasis with oral mycophenolic acid. *J. Invest. Dermatol.* 65 : 537-542, 1975.
- 11) Marinari, R., Fleschmajer, R., Schragger, A. H., Rosenthal, A. L. : Mycophenolic acid in the treatment of psoriasis. *Arch. Dermatol.* 113 : 930-932, 1977.
- 12) Sweeney, M. J., Hoffman, D. H., Poore, G. A. : Possible in situ activation of mycophenolic acid by β -glucuronidase. *Cancer Res.* 31 : 477-478, 1971.
- 13) Aldridge, R. D., Thomson, A. W., Rankin, R., Whiting, P. H., Cunningham, C., Simpson, J. G. : Inhibition contact sensitivity reactions DNFB by topical cyclosporin application in the guinea-pig. *Clin. exp. Immunol.* 59 : 23-28, 1985.
- 14) Adams, E., Todd, G., Gibson, W. : Long-term toxicity study of mycophenolic acid in rabbits. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 34 : 509-512, 1975.
- 15) Lynch, W. S., Roenigk, H. H. : Mycophenolic acid for psoriasis. *Arch. Dermatol.* 113 : 1203-1208, 1977.