

NC/Nga マウスにおけるアトピー性皮膚炎様皮疹の誘発

—皮膚バリア機能低下の影響—

¹⁾順天堂大学医学部皮膚科学講座, ²⁾順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター,
³⁾順天堂大学医学部附属伊豆長岡病院皮膚科, ⁴⁾日本大学医学部先進医学総合研究センター

海野哲史¹⁾²⁾³⁾ 須藤 一¹⁾²⁾ 吉池高志²⁾³⁾
 小川秀興¹⁾²⁾ 羅 智靖²⁾⁴⁾

今回我々は specific pathogen free 環境下において, NC/Nga マウスの皮膚を 3 種類の試薬 (sodium-dodecylsulfate, エタノール, アセトン・エーテル混合液) にて処理した後, アトピー性皮膚炎の発症・増悪に重要なアレルゲンであるヒトヒョウヒダニ抗原を塗布して, NC/Nga マウスのアトピー性皮膚炎様皮疹誘導に関するバリア機能低下の影響について検討した. その結果, バリア機能低下処理のみを行ったすべての群では, 明らかな皮膚炎は発症せず, 血漿 IgE 値も上昇しなかった. 一方, バリア機能の低下処理後にダニ抗原を塗布した群では, 臨床的かつ組織学的に明らかな皮膚炎を発症し, 血漿 IgE 値も上昇した. また試薬の種類, 濃度により皮膚炎の程度には差を認めた. 以上の結果より NC/Nga マウスは, バリア機能低下処理後の抗原塗布に対して過敏に反応し, 高 IgE 血症を伴った皮膚炎を発症させることができることが明らかになり, 抗原によるアトピー性皮膚炎様皮疹の発症におけるバリア機能の重要性が示唆された.

Key words : atopic dermatitis — NC/Nga mice — skin barrier

はじめに

NC/Nga マウス (以下 NC マウス) はアトピー性皮膚炎のマウスモデルとして注目され^{1) - 6)}, 現在様々な検討が行われている^{7) - 14)}. しかし, 従来の報告では皮膚炎の発症の頻度は 70~90% であり 100% とはならない⁶⁾. このように NC マウスの皮膚炎発症にばらつきがあることは, NC マウスを皮膚炎症状の検討に利用する上で大きな欠点となる. 発症率がばらつく原因としては, 皮膚炎を発症させる要因がいまだ完全に特定されていないことや, 免疫・アレルギー異常が多因子的に病態に関与し, 皮膚炎症状を発症するためと考えられる. そこで我々は NC マウスにおいて種々の検討を行う上で, 確実に皮膚炎を発症する系が必要であ

ると考えた.

ヒトのアトピー性皮膚炎の大きな要因として免疫・アレルギーの異常¹⁵⁾と皮膚のバリア機能の異常^{16) - 18)}があることから今回我々は, 従来のピクリルクロライドなどのハプテンを用いた人工抗原による皮膚炎の誘導系⁴⁾⁵⁾とは異なり, 皮膚の重要な機能であるバリア機能を数種類の薬剤 (界面活性剤と有機溶媒) を用いて低下させた後, ヒトのアトピー性皮膚炎において重要な発症因子のひとつであると考えられているヒョウヒダニ抗原を用いて NC マウスにアトピー性皮膚炎様の皮疹を誘導するという, よりヒトのアトピー性皮膚炎の病態に即した皮膚炎誘導を行い, 同時にバリア機能の皮膚炎誘導に及ぼす影響も検討した

Received : July 2, 2001

Accepted : November 1, 2001

Abbreviations : **Dp** *Dermatophagoides pteronyssinus* ; **LPS** lipopolysaccharide ; **ELISA** enzyme-linked immunosorbent assay ; **SDS** sodiumdodecylsulfate ; **SPF** specific pathogen free ; **TEWL** trans-epidermal water loss

材料及び方法

A. 実験材料

1. マウス

実験群として 7 週齢, 雌の NC/Nga マウス (日本チャールズ・リバー, 横浜), また対照群として 7 週齢,

雌のBALB/c マウス（日本エスエルシー，静岡）を5匹ずつ用いた。

2. 飼育環境

飼育室は，specific pathogen free (SPF)，温度 $23 \pm 1.5^\circ\text{C}$ ，湿度 $60 \pm 10\%$ ，照明 12 h on/12 h off で管理し，滅菌おが屑をひいたケージ内で滅菌飼料を用いて，1 ケージにつき 5 匹ずつ飼育した。

3. 試薬

a) ヤケヒョウヒダニ (*Dermatophagoides pteronyssinus*: Dp) 全虫体抽出物水溶液 (Dp 抗原液)

Arlian らの方法^{19) - 21)}に基づきヤケヒョウヒダニ (Dp) より全虫体抽出物水溶液を作成した。すなわち Dp 全虫体 (埼玉県立衛生研究所高岡正敏先生より供与) 10 g をディープフリーザー (-80°C) にて凍結・殺虫し，無水エチルエーテル 10 ml で脱脂後よく乾燥させ，超音波破碎器 (SUNIFIER 250, BRANSON, CT) を用いて物理的に破壊した後，滅菌精製水を Dp 全虫体：滅菌精製水 = 1 : 5 (wt/vol) の割合で加えてよく攪拌し，その後 $1.5 \times 10^3\text{g}$ ，10 min， 4°C にて遠心分離し，得られた上清をポアサイズ $0.8 \mu\text{m}$ のフィルター (Miller-PF, 日本ミリポア，東京) を用いて濾過し，Dp 全虫体抽出物水溶液 (以下 Dp 抗原液) を得た。最終タンパク質濃度は，吸光度計にて 280 nm 時，OD 値が 13 となるよう滅菌精製水を加えて調節し，BCA Protein Assay Kit (No. 23225, PIERCE, IL) を用いて，albumin 換算で 4.5 mg/ml とした。また Dp 抗原液中の lipopolysaccharide (LPS) 含有量はリムルス ES-II シングルテストワコー (和光純薬工業，大阪) にて測定し， $15.89 \pm 3.16 \text{ endotoxin Unit/ml}$ であった。Dp 抗原液は -20°C にて凍結保存，用時解凍し実験に供した。

b) 界面活性剤及び有機溶媒

角層のバリア機能を低下させるために，以下①～③の試薬 (バリア機能低下用試薬) を作成し，実験に供した。

① sodiumdodecylsulfate (SDS) 水溶液

2% (wt/vol) (以下 2% SDS) と 4% (wt/vol) (以下 4% SDS) 溶液を滅菌精製水を用いて調整した。

② 70% エタノール水溶液

エチルアルコールを滅菌精製水を用いて濃度 70% に調整した (以下エタノール)。

③ アセトン・エーテル (= 1 : 1) 混合液

アセトン溶液，ジエチルエーテル溶液を 1 : 1 (vol/vol) に混和し，アセトン・エーテル混合液 (以下アセ

トン・エーテル) を調整した。

B. 方法

1. 実験期間

8 週間とした。

2. 実験群

実験群は以下のごとく，各バリア機能低下用試薬 (①，②，③) のみを塗布する 5 群と，各バリア機能低下用試薬 (①，②，③) を塗布した後に Dp 抗原液を塗布する 5 群の全 10 群に分類した。

a) バリア機能低下用試薬 (①，②，③) のみ塗布する群 (以下 a) バリア機能のみ低下群)

a-1) 4% SDS のみを塗布する群

(以下 4% SDS 群)

a-2) 2% SDS のみを塗布する群

(以下 2% SDS 群)

a-3) 70% エタノールのみを塗布する群

(以下エタノール群)

a-4) アセトン・エーテルのみを塗布する群

(以下アセトン・エーテル群)

a-5) 滅菌精製水のみを塗布する群

(以下精製水群)

b) バリア機能低下用試薬 (①，②，③) 及び Dp 抗原液を塗布する群 (以下 b) バリア機能低下 + Dp 抗原液群)

b-1) 4% SDS 及び Dp 抗原液を塗布する群

(以下 4% SDS + Dp 抗原液群)

b-2) 2% SDS 及び Dp 抗原液を塗布する群

(以下 2% SDS + Dp 抗原液群)

b-3) 70% エタノール及び Dp 抗原液を塗布する群

(以下エタノール + Dp 抗原液群)

b-4) アセトン・エーテル及び Dp 抗原液を塗布する塗布群

(以下アセトン・エーテル + Dp 抗原液群)

b-5) Dp 抗原液のみを塗布する群

(以下 Dp 抗原液群)

3. 実験開始前処置

以下の各実験を施行する際，各マウスにはジエチルエーテル及びハロセンの 2 種類の麻酔薬を投与し，余分な苦痛を与えないよう留意した。実験開始前にマウス用バリカンを用い，背部全面を丁寧に毛刈りした。また実験開始後にも必要に応じて皮膚に刺激を与えないように注意して毛刈りを行った。

4. バリア機能低下用試薬 (①，②，③) 及び Dp 抗原液塗布操作

a) バリア機能のみ低下群はマウス背部の毛刈りし

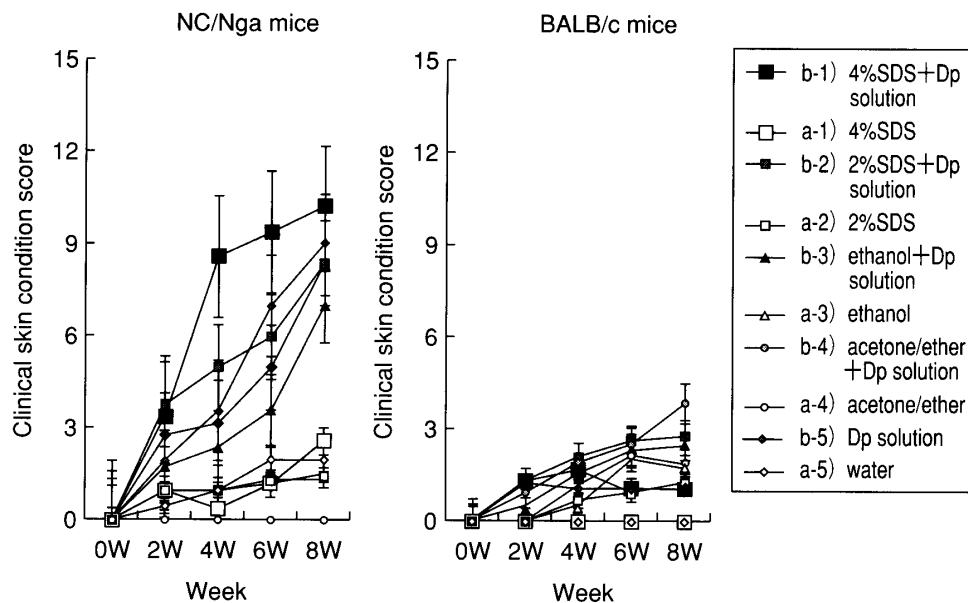


Fig. 1. Changes of clinical skin condition score.

NC/Nga mice: the mice coated with the barrier destroying solution and the extracted solution of mite developed severe dermatitis (clinical skin condition score of 7-10.2 points). But the mice coated only with the barrier destroying solution showed weak skin lesion. BALB/c mice, which are employed as control, showed weak skin lesion (clinical skin condition score of 0-3.8 points).

た部分全面にピペットマンを用いバリア機能低下用試薬 (①, ②, ③) 150 μ l を滴下し, 乾燥させる操作を連日行った. b) バリア機能低下 + Dp 抗原液群にはバリア機能低下用試薬 (①, ②, ③) を塗布・乾燥させた後, さらに Dp 抗原液 150 μ l をピペットマンで滴下し細菌培養用の棒で塗り込む操作を追加した.

5. 皮膚症状の重症度判定

皮膚症状のスコアリングには Leung らの clinical skin condition score²²⁾ (以下重症度スコア) を使用し, 実験開始前及び実験開始後 2 週間ごとに皮膚症状のスコアリングを行った. 0 = 無症状, 1~3 = 軽微, 4~6 = 軽症, 7~9 = 中等症, 10~12 = 重症, 13~15 = 最重症と定義した.

6. 血液検査所見

実験開始前及び実験開始後 2 週間ごとに 0.1% ヘパリン水溶液にて処理したパスツールピペットを用いて採血を行った. 血液は採血後 2 時間以内に血漿を分離し, -20°C にて保存, 用時解凍し測定に供した.

i) 血漿 IgE 値の測定

ラット抗マウス IgE モノクローナル抗体 (No. 77-1, 興和, 名古屋) を用い, サンドイッチ ELISA 法にて血漿 IgE 値を測定した.

ii) 好酸球数の測定

血液 10 μ l をヒンケルマン氏液で 10 倍に希釈し, Neubauer 血球計算板を用いて, 顕微鏡下に血中好酸球数を計測した.

7. 皮膚組織像

皮膚組織像を検討するため, 実験開始後 2 週間目, 4 週間目, 8 週間目に 3 mm パンチバイオブシーを用いて皮膚生検を行った. 採取した皮膚は 20% ホルマリン緩衝液 (pH 7.4) にて固定した後, パラフィンプロックを作製, 3 μ m に薄切し, 以下の染色を行った.

i) ヘマトキシリン・エオジン重染色 (以下 HE 染色)

HE 染色にて各マウスの皮膚病理組織像を検討した.

ii) ロングトルイジンブルー染色 (以下 LTB 染色)

肥満細胞同定のため LTB 染色を行った. LTB 染色については long toluidin blue 液 (0.5% toluidin blue in 0.5 N-HCl: pH 0.5, Merck, Darmstadt) を用いて, 各検体を 20 時間浸漬染色した後, 定法に従い標本作製, 顕微鏡下に肥満細胞数の測定を行った. 肥満細胞数は光学顕微鏡で 0.2 mm² の範囲を 3 視野測定して, 0.1 mm² あたりの数を算出した.

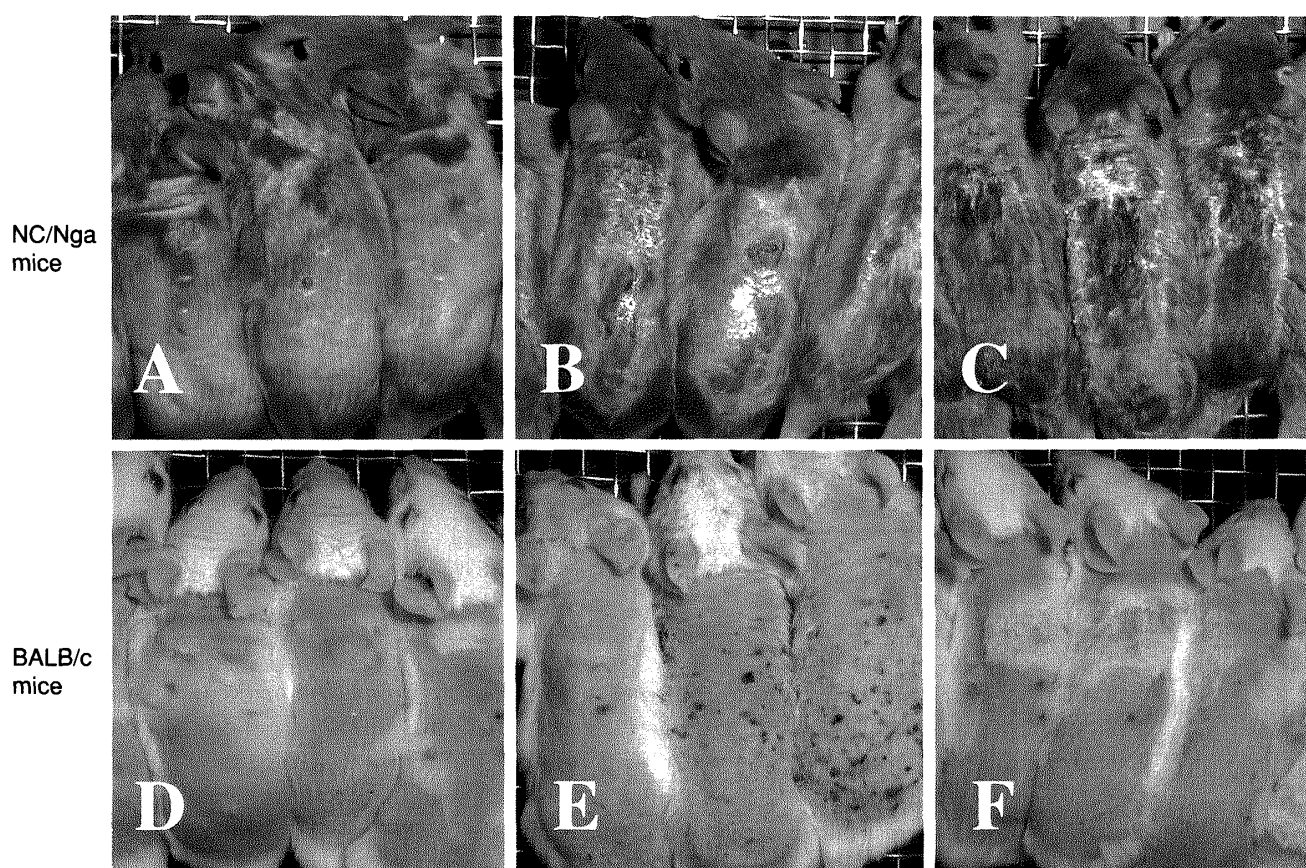


Fig. 2. Skin condition (after 8 weeks).

- A : NC/Nga mice, a-1) 4% SDS : Slight erythema with slight scale on the back. Wound of the back caused by biopsy.
 B : NC/Nga mice, b-5) Dp solution : Erythema with scale, crust and lichenification on the back.
 C : NC/Nga mice, b-1) 4% SDS + Dp solution : Severe erythema with scale, crust and lichenification or erosion caused by scrape on the back.
 D : BALB/c mice, a-1) 4% SDS : no skin lesion
 E : BALB/c mice, b-5) Dp solution : Slight erythema on the back. Wound of the back caused by biting each other.
 F : BALB/c mice, b-1) 4% SDS + Dp solution : Slight erythema on the back.

8. 統計学的検討

Wilcoxon の符号順位検定 (ノンパラメトリック検定) により有意差を評価した. 統計解析用ソフトには Stat View (SAS, NC) を用いた.

結 果

A. 皮膚症状

実験開始前には実験群 (NC マウス), 対照群 (BALB/c マウス) のいずれのマウスも皮膚炎症状を示さず, 重症度スコアは 0 であった (Fig. 1). 塗布 8 週目で NC

マウスの a) バリア機能のみ低下群で重症度スコアは $1 \pm 0.0 \sim 3.8 \pm 3.5$ と軽微であったが b) バリア機能低下 + Dp 抗原液群では重症度スコアは $7 \pm 2.8 \sim 10.6 \pm 1.8$ と中等症～重症の皮膚炎を発症した (Fig. 1, Fig. 2). 平均重症度スコアは, b-1) 4% SDS + Dp 抗原液塗布群で 10.6 ± 1.8 と, 最も強く皮膚炎を発症した (Fig. 1, Fig. 2). また, b-2) ～ b-5) の各 b) バリア機能低下 + Dp 抗原液群もそれぞれ重症度スコアは $7 \pm 2.8 \sim 8.4 \pm 2.0$ と中等症の皮膚炎を発症し, その症状の強さは b-4), b-2), b-5), b-3) の順であった.

一方, BALB/c マウスでは a), b) いずれの群においても重症度スコアは $0 \sim 3.3 \pm 1.3$ と無症状～軽症で

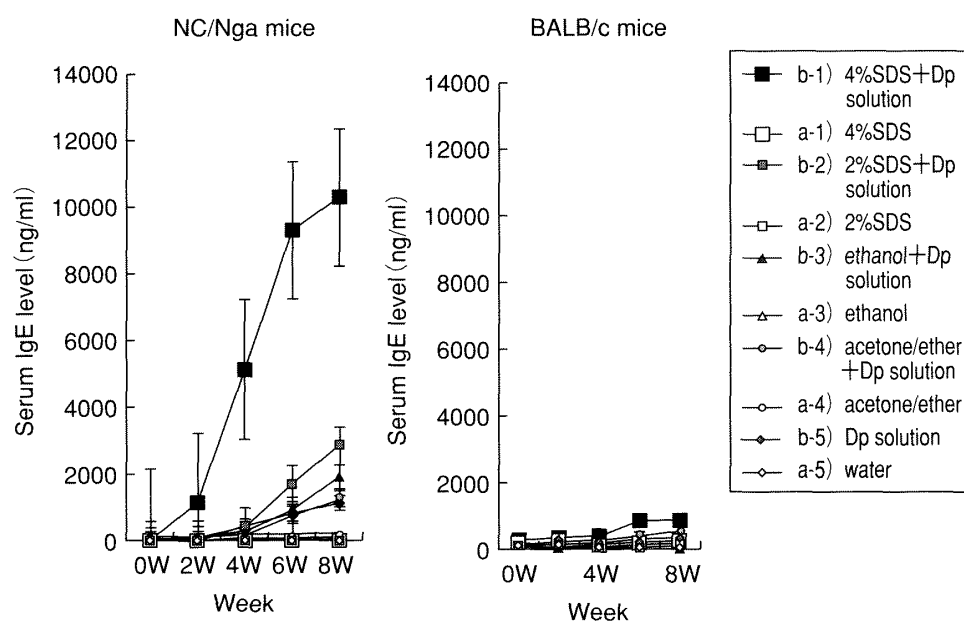


Fig. 3. Changes of serum IgE.

NC/Nga mice coated the barrier destroying solution and the Dp solution marked elevation of plasma IgE level ($p < 0.05$), whereas mice coated only with the barrier destroying solution marked no elevation of plasma IgE level. BALB/c mice coated the barrier destroying solution and the Dp solution showed slight elevation of plasma IgE level ($p < 0.05$), whereas mice coated only with the barrier destroying solution marked no elevation of plasma IgE level.

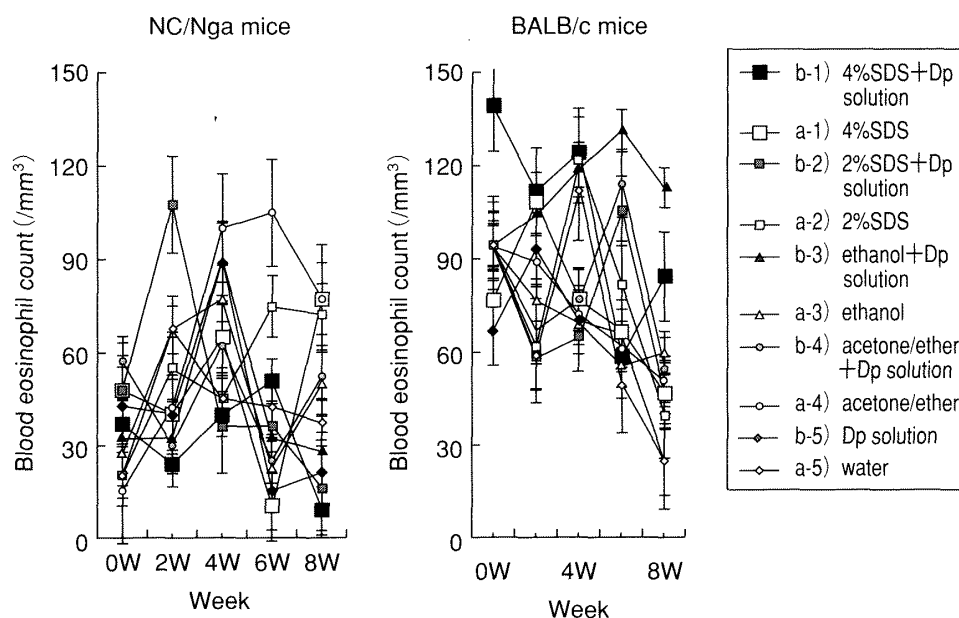


Fig. 4. Changes of Blood eosinophil count.

All mice showed no elevation of Blood eosinophil count.

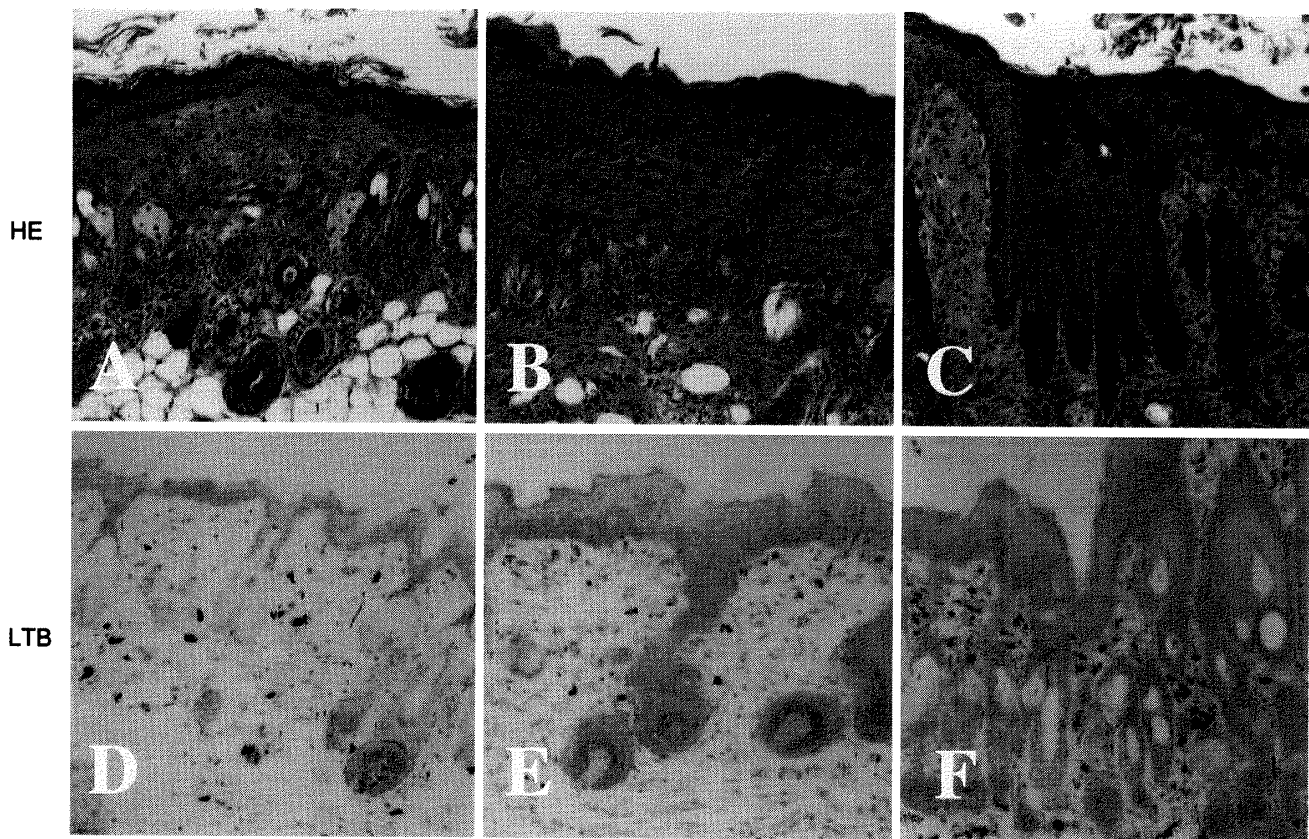


Fig. 5. Histopathological change of NC/Nga mice skin.

A : a-1) 4% SDS (HE) : slight hyperkeratosis, slight acanthosis and slight inflammatory cell infiltration of dermis.

B : b-5) Dp solution (HE) : hyperkeratosis, acanthosis and inflammatory cell infiltration in dermis.

C : b-1) 4% SDS + Dp solution (HE) : severe hyperkeratosis, acanthosis and inflammatory cell infiltration in dermis.

D : a-1) 4% SDS (LTB) : no increase of mast cell.

E : b-5) Dp solution (LTB) : slight increase of mast cell in dermis and a part of mast cell showed degranulation and activation.

F : b-1) 4% SDS + Dp solution (LTB) : increase of mast cell in dermis and the mast cell showed degranulation and activation.

あった (Fig. 1, Fig. 2).

B. 血液検査所見

1. 血漿 IgE 値 (Fig. 3)

実験開始前には、すべての群において血漿 IgE 値は正常範囲内 (400 ng/ml 以下) であった。塗布 8 週目には NC マウスの a) バリア機能のみ低下群の血漿 IgE 値はいずれも正常範囲内であったが、b) バリア機能低下 + Dp 抗原液群で血漿 IgE 値は有意な上昇 ($p < 0.05$) を認めた。その数値は、b-1) 4% SDS + Dp 抗原液塗布群で 10274.4 ± 632.1 ng/ml, b-2) 2% SDS + Dp 抗原液塗布群で 2847.3 ± 3038.3 ng/ml であり、b-3) ~

b-5) の b) バリア機能低下 + Dp 抗原液群でも平均 1000 ng/ml を越える有意な上昇 ($p < 0.05$) を認め、b-3) ~ b-5) の順で高値だった。

一方、BALB/c マウスにおいては、a) バリア機能のみ低下群の血漿 IgE 値は、いずれの時期においても正常範囲内であった。b) バリア機能低下 + Dp 抗原液群では b-1) 4% SDS + Dp 抗原液群で 853.7 ± 655.6 ng/ml, b-4) アセトン・エーテル + Dp 抗原液塗布群で 502.2 ± 333.9 ng/ml と軽度上昇 ($p < 0.05$) したが、NC マウスに比べ有意に低値 ($p < 0.05$) であった。またそれ以外の群の血清 IgE 値はいずれも正常範囲内で

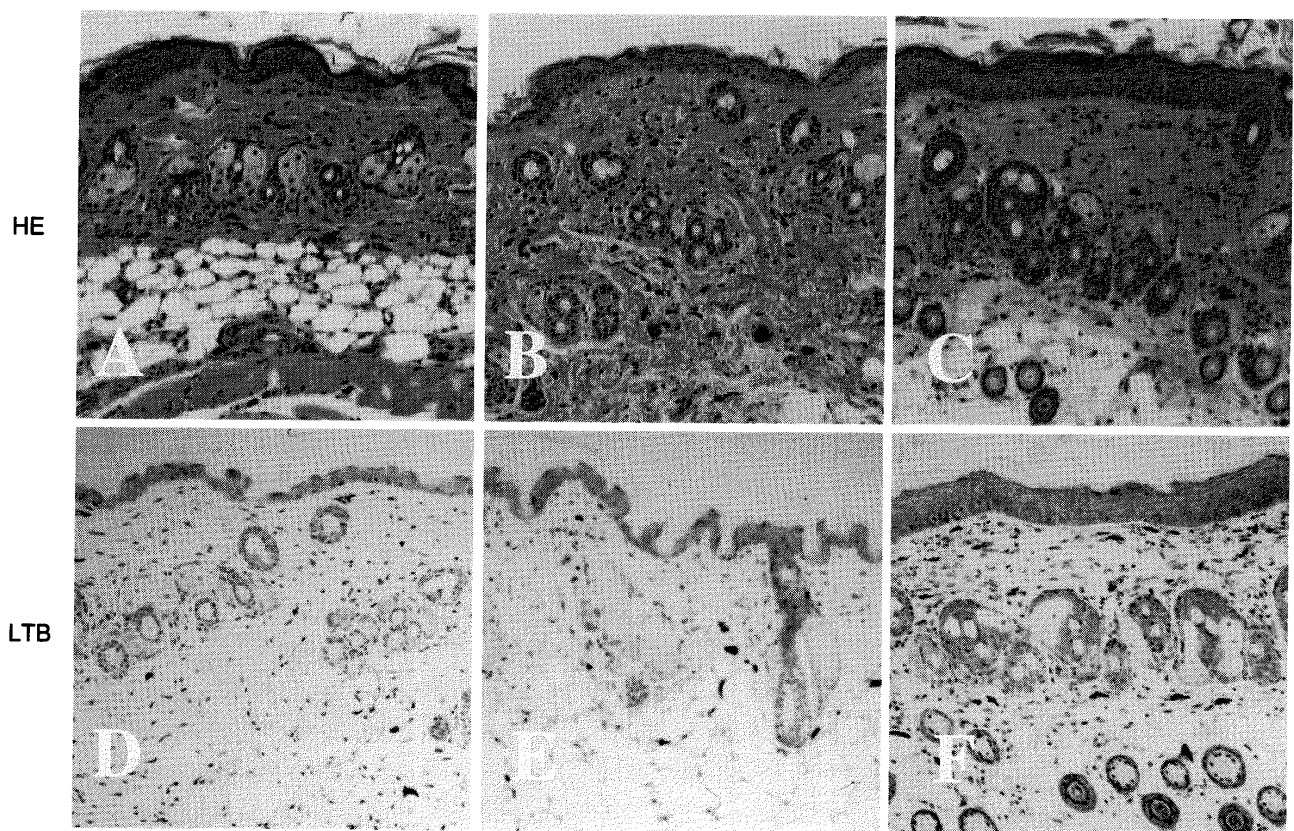


Fig. 6. Histopathological change of BALB/c mice skin.

A : a-1) 4% SDS (HE) : slight acanthosis.

B : b-5) Dp solution (HE) : slight acanthosis and slight inflammatory cell infiltration in dermis.

C : b-1) 4% SDS + Dp solution (HE) : slight hyperkeratosis, acanthosis and inflammatory cell infiltration in dermis.

D : a-1) 4% SDS (LTB) : no increase of mast cell.

E : b-5) Dp solution (LTB) : no increase of mast cell in dermis.

F : b-1) 4% SDS + Dp solution (LTB) : slight increase of mast cell in dermis.

あった (Fig. 3).

2. 末梢血好酸球数

末梢血好酸球数は NC マウス, BALB/c マウス共にいずれの群においても $9.2 \pm 3.5 \sim 168.8 \pm 141.4$ 個/ mm^3 の間で上下し, 一定の傾向を示さなかった (Fig. 4).

C. 皮膚組織像

1. HE 染色

HE 染色において, NC マウスの a) バリア機能のみ低下群では軽度の表皮肥厚, 真皮内のリンパ球を主体とした細胞浸潤を認めた. また b) バリア機能低下 + Dp 抗原液群においては, a) バリア機能のみ低下群に比べ強い過角化, 表皮肥厚, 真皮内のリンパ球を主体とした細胞浸潤を認め, 上記所見は時間の経過に伴い

さらに増強した (Fig. 5).

一方, BALB/c マウスでは, a-5) 精製水群以外の各群において, 軽度の表皮肥厚および真皮内の細胞浸潤を認めた (Fig. 6). また, ダニ抗原液の塗布の有無による組織所見の大きな差異は認められなかった.

2. LTB 染色 (Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7)

LTB 染色において, NC マウスの a) バリア機能のみ低下群では肥満細胞数の増加傾向を認めなかったが, b) バリア機能低下 + Dp 抗原液群では肥満細胞数の有意な増加 ($p < 0.05$) を認め (Fig. 5, Fig. 7), その数は時間の経過に伴い増加した. 塗布 8 週目で肥満細胞数は b-1) 4% SDS + Dp 高原液塗布群では a) バリア機能のみ低下群の約 3 倍まで上昇した ($p < 0.01$) (Fig. 7).

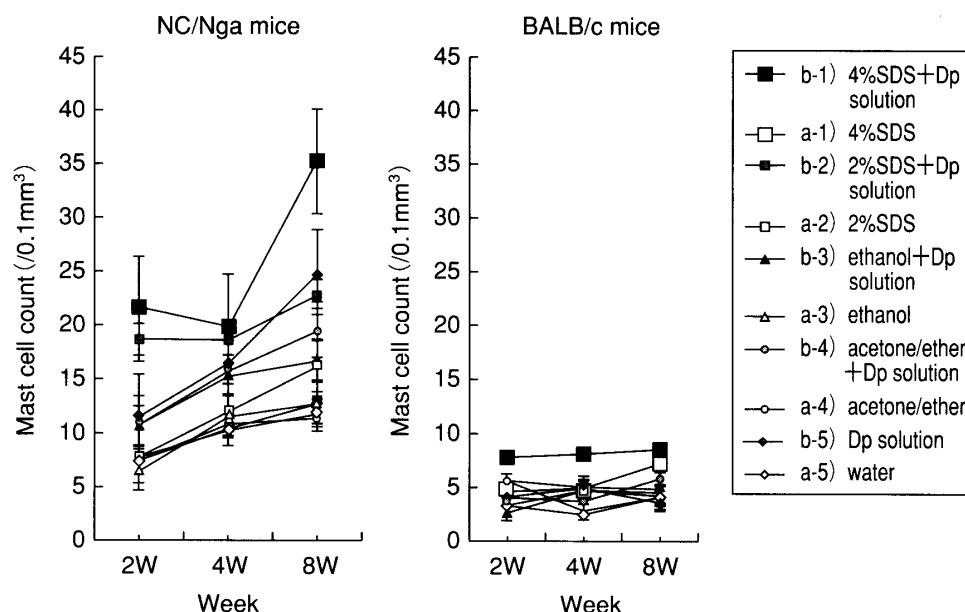


Fig. 7. Changes of mast cell count in the skin.

NC/Nga mice coated the barrier destroying solution and the Dp solution showed increase of the mast cell count ($p < 0.05$), whereas NC/Nga mice coated only with the barrier destroying solution or All of BALB/c mice showed no increase of the mast cell.

一方, BALB/c マウスではいずれの群においても肥満細胞数の増加は認められなかった (Fig. 6, Fig. 7).

考 察

アトピー性皮膚炎は皮膚のバリア機能異常^{16)~18)}や、環境抗原等に対する免疫・アレルギー反応の異常、環境因子など様々な要因が関与する多因子性の疾患であると考えられている²²⁾。中でも皮膚のバリア機能異常はアトピー性皮膚炎患者における皮膚炎発症や、症状増悪の重要な要因のひとつとして注目されている。昨近の患者数の増加は、遺伝子的なバックグラウンドから生じる免疫・アレルギー的病態が急激に変化したためとは考えにくく、バリア機能に影響を及ぼす様々な環境因子や生活習慣などが変化し、アトピー性皮膚炎の病態に影響を及ぼしていると考えた方が理解しやすい。臨床的にも、石鹸やシャンプーなどの様々な界面活性剤の過剰使用や、ナイロンタオルを用いた洗い過ぎによるバリア機能の低下が指摘されている。

NC マウスは 1957 年に近藤らにより樹立された系統で¹⁾、1997 年には松田らによりアトピー性皮膚炎のマウスモデルとして報告された²⁾。近年、さらにアレ

ルギーを起こしやすい性質を有することから、アトピー性皮膚炎のみならずアトピー疾患全般のマウスモデルとして、喘息モデルや食物アレルギーモデル等様々な方面からの検討がなされている^{7)~11)}。NC マウスにおけるアトピー性皮膚炎誘導モデルの検討は、ピクリルクロライドの塗布やダニ抗原を皮内投与する系が報告されている⁴⁾⁵⁾。しかしこれらの系は、塗布する試薬が臨床的にアトピー性皮膚炎の原因物質ではなかったり、アレルギーの感作経路が臨床に即していないなど、ヒトのアトピー性皮膚炎のモデルと考えるにはやや不適当である。そこで今回の検討では、アトピー性皮膚炎の臨床に即した実験系、すなわち臨床においても認められるように、まず皮膚の重要な機能であるバリア機能を低下させ、その後ヒトと同種の抗原を塗布することにより NC マウスに皮膚炎症状を誘導するという、よりヒトのアトピー性皮膚炎の病態に即した皮膚炎誘導モデルの作成を試み、その検討を行った。

角層のバリア機能の主体は、層板顆粒から放出されたセラミドを中心とするコレステロール・サルフェイト、遊離脂肪酸、トリグリセリドなどからなる細胞間脂質である²³⁾。角層を透過する物質は、ある程度まで濃度依存性の拡散により皮膚内に移動すると考えられ

ている。しかし、それ以外にも角層の透過しやすさには、その物質の分子量、分子の形態、溶媒あるいは角層の構成成分との親和性など種々の要素が影響する。実際に低分子のハプテンは容易に角層のバリアを通過し皮膚炎の原因となりうるが、分子量の大きいダニ抗原やハウスダストなどの環境抗原は、角層を容易には通過し得ない²³⁾。そこで本実験系においては、分子量の大きなダニ抗原が角層のバリアを通過できるように、試薬を用いてバリア機能を低下させる処理を併用した。バリア機能を低下させる試薬には、我々が日常使用している石鹸やシャンプーにも含まれている界面活性剤である SDS、又、代表的なバリア機能を低下させる試薬である 70% エタノール、アセトン・エーテル混合液を用いた。今回は皮膚炎の誘導に焦点を当てたため検討を行わなかったが、今後本実験系において transepidermal water loss (TEWL) などバリア機能の生理学的な検討も必要であると思われる。

我々はこの検討を行うに際して、1. SDS の濃度、2. 使用するアレルゲンの種類や濃度、3. 塗布方法、4. 試薬塗布期間について予備実験を行った (data not shown)。1. SDS の濃度は、NC マウスの背部に 1% ごとに 1%~5% の 5 段階の濃度の SDS を 8 週間塗布し、本実験同様重症度スコア²²⁾を用いて検討した。その結果、塗布 8 週目の重症度スコアは SDS の濃度に比例して増加した。1% SDS では重症度スコアは 0~1 と肉眼的に明らかな皮膚炎症状はほとんど認められず、2% SDS と 3% SDS では重症度スコアは 1~2 で、両濃度での重症度スコアには統計学的に有意な差はなかった。4% SDS では重症度スコアは 2~3 であり、肉眼的に明らかな皮膚炎を誘導する事ができた。5% SDS では重症度スコアは 3 以上と強く症状が誘発されたが、組織学的に表皮の壊死所見も認められ、皮膚炎症状に SDS の毒性による皮疹をも混じていると考えられた。以上の結果より、本実験系では軽微なバリア機能異常を起こす濃度として 2% SDS を、また確実にバリア機能異常を起こすことのできる濃度として 4% SDS の 2 種の濃度を採用した。2. 塗布するアレルゲンの種類については、NC マウスの背面に 4% SDS を塗布、乾燥後、アレルゲン・ヤケヒョウヒダニ・エキシ (鳥居薬品)、アレルゲン・ハウスダスト・エキシ (鳥居薬品)、der f 抗原 (アサヒビール) の 3 種の市販のアレルゲン及び今回の検討に用いた Dp 全虫体抽出物水溶液 (Dp 抗原液) をほぼ同一のタンパク質濃度に調整し、8 週間塗布した。その結果、ヤケヒョウヒダニ

・エキシと Dp 抗原液で臨床症状と血漿 IgE 値の有意な変化が観察された。しかし両者の皮膚炎症状には差がみられなかったため、試薬供給の点から Dp 抗原液をアレルゲンとして採用した。3. SDS の塗布方法については、カップ法の方が安定した結果が得られるものの、今回の実験対象はマウスであるためカップ法は困難と考え、洗浄・塗布法を採用した。マウスの皮膚はラットに比べ弱くより物理的刺激を受けやすいため、紅斑を出さないよう注意深く塗布操作を行うこととした。また、高濃度の SDS によるタンパク抗原の変性を考慮し、SDS と各抗原は混合せずに、SDS を塗布した後に各抗原を塗布することとした。4. 塗布期間も 32 週まで検討を行ったが、各群ともに 8 週目までには症状はほぼ完成し、以降の経過においてはあまり有意な症状の変化は認められなかったため、実験期間は 8 週とした。以上の予備実験に基づき本実験系を組み検討を行った。

その結果、NC マウスにおいて a) バリア機能のみ低下群ではいずれの群においても明らかな皮膚炎は誘導されず、血漿 IgE 値も上昇しなかった。一方、b) バリア機能低下 + Dp 抗原液群は、いずれの群においても重症度スコアは平均 7 を越え、臨床的にもまた組織学的にも明らかな皮膚炎を発症し、血漿 IgE 値も有意な上昇を認めた ($p < 0.05$)。重症度スコアにおいて、b-5) Dp 抗原液群より有意に高値となった群は、b-1) 4% SDS + Dp 抗原液群のみであった ($p < 0.05$)。b-1) 4% SDS + Dp 抗原液群は、8 週目で重症度スコアは 10.6 ± 1.8 と最も高く、血漿 IgE 値も 8 週目で 10274.4 ± 632.1 ng/ml まで上昇した。病理学的にも強い皮膚炎像を呈し、組織中の肥満細胞数も他の全ての群に比べ有意に上昇していた ($p < 0.01$)。しかし b-2) 2% SDS + Dp 抗原液群、b-3) エタノール + Dp 抗原液群、b-4) アセトン・エーテル + Dp 抗原液群と b-5) Dp 抗原液群の結果には有意な差はなかった。その理由として、2% SDS、エタノール、アセトン・エーテルによるバリア機能低下処理は、強い症状を引き起こすのに十分な量の Dp 抗原がマウス角層を通過するためには、不十分であるためと考えられた。しかし、これらの弱いバリア機能低下処理を行った群やバリア機能低下処理を併用しなかった b-5) Dp 抗原液群でも中等度の皮膚炎を誘導することができたのは、NC マウスには BALB/c マウスに比して抗原に対する強い反応性があるためと考えられた。

一方、対照群である BALB/c マウスでは b) バリア

機能低下 + Dp 抗原液群において、b-1) 4% SDS + Dp 抗原液群と b-4) アセトン・エーテル + Dp 抗原液群のみで血漿 IgE 値の有意な上昇を認めたが ($p < 0.05$)、臨床的には全ての群で重症度スコアは $0 \pm 0 \sim 3.3 \pm 1.3$ と無症状～軽度であり、NC マウスに比して有意に低かった ($p < 0.05$)。以上のことより、本実験系において、マウスに確実に皮膚炎を発症させる条件として、アトピー素因 (アレルゲンに対する易反応性や IgE 抗体を作りやすい性質) を持つ個体 (NC マウス) に十分なバリア機能の低下を起こさせ抗原を負荷することが必要であると考えられた。

今回我々は、NC マウスに種々の試薬を用いて角層のバリア機能を低下させた後、ダニ抗原を塗布することにより、ヒトのアトピー性皮膚炎様の皮疹を確実に誘導する事に成功した。この系は、アトピー性皮膚炎におけるアレルゲンの検討やバリア機能異常を解析するのに非常に有用であると考えた。

本稿を終るにあたり、ダニ抗原に関する有用な示唆をいただいた埼玉県立衛生研究所課長 高岡正敏先生、興和株式会社興和総合科学研究所 中尾裕史先生、順天堂大学医学部皮膚科学講座 西村久美子先生並びに組織染色について御助言、御指導をいただいた順天堂大学医学部共同病理研究室 横溝和子先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 近藤恭司, 野沢 謙, 宮田 武, 江崎孝三郎: 日本在来マウスから育成した系統. 実験動物 **6**, 107-112, 1957.
- 2) Matsuda, H., Watanabe, N., Geba, G.P., Sperl, J., Tsudzuki, M., et al.: Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Intern. Immunol.* **9**, 461-466, 1997.
- 3) Suto, H., Matsuda, H., Mitsuishi, K., Hira, K., Uchida, T., et al.: NC/Nga mice: A mouse model for atopic dermatitis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **120** (suppl 1), 70-75, 1999.
- 4) 松田浩珍, 三橋規樹: アトピー性皮膚炎のモデルマウス-NC マウスを中心に. 免疫・Immunology Frontier **8**, 83-88, 1998.
- 5) 千葉理恵子, 松田浩珍: アトピーモデルマウス NC/Nga. 最新医学 **54**, 2382-2388, 1999.
- 6) 須藤 一, 光石幸市, 海野哲史, 松田浩珍, 羅 智靖: NC/Nga アトピーモデルマウス. 分子細胞治療 **1**, 502-509, 2000.
- 7) Koizumi, T. and Hayakawa, J.: The role of immunity on the development of the dermatitis in NC mice. *Exp. Anim* **35**, 159-163, 1986.
- 8) Tsudzuki, M., Watanabe, N., Wada, A., Nakane, Y., Horoi, J., et al.: Genetic analyses for dermatitis and IgE hyperproduction in the NC/Nga mouse. *Immunogenetics* **47**, 88-90, 1997.
- 9) Matsumoto, M., Ra.C., Kawamoto, K., Suto, H., Itakura, A., et al.: IgE hyperproduction through enhanced tyrosine phosphorylation of Janus kinase 3 in NC/Nga mice; A model for human atopic dermatitis. *Immunol.* **162**, 1056-1063, 1999.
- 10) 光石幸市, 川本恵子, 須藤 一, 平 嘉也子, 吉池高志, 他: アトピー性皮膚炎モデルマウスのマスト細胞における IL-3 及び IL-4 に対する増殖活性に関する検討. 日皮会誌 **110**, 1105-1113, 2000.
- 11) Tsukumo, Y., Andoh, T., Yamaguchi, T., Nojima, H. and Kuraishi, Y.: Involvement of nitric oxide in itch-scratch response of NC/Nga mice. 日薬理誌 **114** (suppl 1), 17-21, 1999.
- 12) Hiroi, J., Sengoku, T., Morita, K., Kishi, S., Sato, S., et al.: Effect of tacrolimus hydrate (FK 506) ointment on spontaneous dermatitis in NC/Nga mice. *Jpn. J. Pharmacol.* **76**, 175-183, 1998.
- 13) Kotani, M., Matsumoto, M., Fujita, A., Higa, S., Wang, W., et al.: Persimmon leaf extract and astragalin inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* **106**, 159-166, 2000.
- 14) Tohda, C., Sugahara, H., Kuraishi, Y. and Komatsu, K.: Inhibitory effect of Byakko-ka-ninjin-to on itch in a mouse model of atopic dermatitis. *Phytother. Res.* **14**, 192-194, 2000.
- 15) Holden C.A. and Parish W.E.: Atopic Dermatitis: Rook/Wilkinson/Ebling Textbook of Dermatology, 6th ed. (ed. by RH Champion, JL Burton, DA Burns, SM Breathnach), Blackwell Science, Oxford, pp. 681-708, 1998.
- 16) 吉池高志, 須藤 一, 川本知江, 相川洋介, 小川秀興: 角層の透過性とその臨床. 皮膚病診療 **15**, 661-667, 1993.
- 17) Imokawa, G., Abe, A., Jin, K., Higaki, Y., Kawashima, M., et al.: Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **96**, 523-526, 1991.
- 18) 川島 真: アトピー性皮膚炎と表皮脂質代謝異常. 日皮会誌 **105**, 1684-1686, 1995.
- 19) Morgan M.S., Arlian L.G., Barnes, K.C. and Fernandez-Caldas, E.: Characterization of the al-

- lergens of the house dust mite *Euroglyphus maynei*. *J. Allergy Clin. Immunol.* **100**, 222-228, 1997.
- 20) Arlian L.G., Bernstein I.L., Geis, D.P., Vyszynski-Moher D.L., Gallagher, J.S., et al. : Investigation of culture mediumfree house dust mites. III. Antigens and allergens of body and fecal extract of *Dermatophagoides farinae*. *J. Allergy Clin. Immunol.* **79**, 457-466, 1987.
- 21) Arlian, L.G., Bernstein, I.L., Vyszynski-Moher, D.L. and Gallagher, J.S. : Investigation of culturemedium-free house dust mites. IV. Cross antigenicity and allergenicity between the house dust mites, *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus*. *J. Allergy Clin. Immunol.* **79**, 467-476, 1987.
- 22) Leung D.Y.M., Hirsch R.L., Schneider L., Moody C., Takaoka R., et al. : Thymopentin therapy reduces the clinical severity of atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **85**, 927-933, 1990.
- 23) 田上八郎：皮膚のバリアとしての角層. 日皮会誌 **108**, 713-727, 1998.

INDUCTION OF ATOPIC DERMATITIS-LIKE SKIN LESION IN NC/Nga MICE
—The Influence of the Skin Barrier Destroying Solution to the Induction of Dermatitis—

Tetsushi Unno¹⁾²⁾³⁾, Hajime Suto¹⁾²⁾, Takashi Yoshiike²⁾³⁾,
Hideoki Ogawa¹⁾²⁾ and Chisei Ra²⁾⁴⁾

¹⁾Department of Dermatology, Juntendo University School Medicine

²⁾Atopy (Allergy) Research Center, Juntendo University School of Medicine

³⁾Department of Dermatology, Juntendo Izu-Nagaoka Hospital

⁴⁾Department of Molecular Cell Immunology and Allergology, Nihon University School of Medicine

NC/Nga mouse is well known as a mouse model for atopic dermatitis. In general, when NC/Nga mouse are raised under specific pathogen free (SPF) conditions no skin lesions are detected, but when under non-filtrated (conventional) condition, atopic dermatitis like skin lesions appear spontaneously. However, this dermatitis develops in 70~90% of mice (not 100%), which makes it difficult to perform reproducible experiments every time.

This study was performed under SPF conditions, using the four solutions (2% SDS, 4% SDS, ethanol, acetone/ether) to destroy the skin barrier function, and thereafter, applying the extracted solution of mite : *Dermatophagoides pteronyssinus*, which is a very popular antigen in pathogenesis of human atopic dermatitis. The extracted solution of mite was applied repeatedly on the NC/Nga mice with a pretreatment of barrier destroying solution and after 8 weeks the mice developed severe dermatitis (clinical skin condition score of 7-10.2 points) with marked elevation of plasma IgE level, whereas mice coated only with the barrier destroying solution showed weak skin lesion with no elevation of plasma IgE level. BALB/c mice, which are employed as control, showed weak skin lesion (clinical skin condition score of 0-3.8 points) and slight elevation of plasma IgE level after repeated application of the extracted solution of mite with a pretreatment of the barrier destroying solution, whereas mice coated only with the barrier destroying solution showed weak skin lesion and the no elevation of plasma IgE level was observed.

In this study, using several solutions to disturb the skin barrier function before applying the antigen, we have found a suitable condition and types of solutions in inducing dermatitis in NC/Nga mice.