

〔原 著〕

成人型アトピー性皮膚炎患者のダニ抗原誘発皮疹における
好酸球浸潤の過程について

東京大学医学部皮膚科学教室

湧川基史 山田伸夫 中川秀己 玉置邦彦

アトピー性皮膚炎(AD)における好酸球浸潤の過程を明らかにするために、ヒョウヒダニ抗原特異的IgEが高値を示すAD患者に対し粗ダニ抗原を用いたパッチテストを施行し、経時的に得られた生検標本を用い、好酸球浸潤過程を経時的に観察するとともに好酸球顆粒蛋白の沈着過程について免疫組織化学的検討を行った。AD患者では9例中6例にパッチテスト陽性所見が得られたが、健康人コントロール群は7例全例が陰性であった。好酸球の浸潤は2時間後に真皮上層の血管内に見られ、6時間後には血管周囲にも目立ち始め24時間後と48時間後により著明となった。48時間後には表皮にも好酸球が浸潤し、好酸球性海綿状態の像を呈した。浸潤好酸球の大多数はBMK-13陽性で、その15～59%が活性化好酸球の指標とされるEG2に対して陽性所見を示した。BMK-13, anti-EP, EG2それぞれの陽性反応は真皮膠原線維に広がり、その範囲は時間の経過とともに拡大した。以上より、ダニ抗原の経表皮吸収に続く好酸球の活性化と細胞外遊走がADの初期の皮疹形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

Key words: atopic dermatitis — eosinophil — eosinophil granule protein —
mite allergen — patch test

緒 言

アトピー性皮膚炎(atopic dermatitis, AD)の病変部組織像は急性病変では表皮細胞間浮腫、小水疱形成を伴う表皮肥厚、表皮内の単核球の浸潤および真皮上層血管周囲のCD4陽性細胞を主体とする単核球の浸潤を特徴とし、その他好酸球の浸潤や稀に好中球を認める。慢性苔癬化病変では真皮上層の線維化と表皮の異常な肥厚を認め、真皮にはやはり単核球の浸潤の他に肥満細胞や少数の好酸球を認めることが多い。両病変とも好酸球の浸潤は通常の病理組織標本では顕著ではないが、好酸球顆粒由来化学伝達物質に対する抗体による組織染色にて真皮に明瞭な陽性反応を得ることができる¹⁾。このようにAD病変部真皮では多かれ少なかれ好酸球浸潤がみられることを特徴とするが、これらの所見は既に完成された病変組織で見ているた

め、好酸球の浸潤過程について推察するのは困難である。今回我々はこの好酸球浸潤過程をより明らかにするため、ヒョウヒダニ抗原特異的IgE抗体価の高いAD患者に対し、ダニ抗原によるパッチテストを行い経皮的に抗原を透過させ、好酸球浸潤および好酸球顆粒由来化学伝達物質に対する抗体による染色パターンを経時的に観察したので報告する。

対象と方法

1. 対象

当科に入院し、日本皮膚科学会の提唱したAD診断基準²⁾を満たす成人型AD患者で、ヤケヒョウヒダニ(DP)およびコナヒョウヒダニ(DF)に対する血清特異IgE抗体がRAST法でスコア5または6(50Ua/ml以上)と高値を示した患者9例(血清総IgE値629～25100U/ml, 男7例, 女2例, 20～28歳, 平均年齢22.8歳)およびコントロールとしてDP, DF血清特異IgEスコアが0または1(0.7Ua/ml未満)の非AD患者7例(男6例, 女1例, 21～29歳, 平均年齢26.4歳)を対象とした。

Received: April 17, 1995

Accepted: September 4, 1995

Abbreviations: AD atopic dermatitis; DF *Dermatophagoides farinae*; DP *Dermatophagoides pteronyssinus*; ECP eosinophil cationic protein; EPO eosinophil peroxidase; LPR late phase reaction; MBP major basic protein

2. 方法

1) ダニ抗原の作成

東京大学物療内科より供与をうけたコナヒョウヒダニ抗原を白色ワセリンと混和し、1%としてパッチテスト試薬とした。

2) パッチテスト

被験者背部無疹部に試薬を finn-chamber®を用いて生検時間の2時間、6時間、12時間、24時間、48時間前に貼付した。なお貼付に際しては、テープ・ストリッピングにて角層を除去した後に施行した

3) 生検および標本の作製

パッチテストの結果を Table 1 に示す。判定は international contact dermatitis research group (ICDRG) のパッチテスト判定基準に従い、(+) 以上を陽性とした。AD 患者のうち、陽性所見のある患者(以下、陽性患者)は9例中6例(66.7%)で、非AD患者は全例陰性であった。陽性患者の貼付部位はすべて生検し、陽性所見のない患者3名(以下、陰性患者)については生検を行わなかった。陽性患者ではコントロールとして角層を剝離した無疹部の生検も行った。無疹部の検体を貼付0時間とし、パッチテスト部位の検体をそれぞれ2時間、6時間、12時間、24時間、48時間後の組織として分類した。検体は二分し、一方をアセトンあるいはホルマリン固定後パラフィン包埋切片を作成した。他方を OCT compound に包埋後液体窒素にて急速冷凍し、5μmの厚さで凍結切片を作成しアセトン固定後、-80°Cで保存した。

4) 染色

パラフィン包埋切片はキシレンで脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。凍結切片は陽性6例のうち5例についてABC-AP kit (Vector 社)にて好酸球顆粒由来化学伝達物質に対するモノクローナル抗体 BMK-13 (Major Basic Protein: MBP), anti-EP (Eosinophil Peroxidase: EPO), EG2 (Eosinophil Cationic Protein: ECP) (以上、ニチレイ)の酵素抗体法による免疫染色を行った後、ヘマトキシリンにて核染色を施行した。また、非特異的な組織反応をブロックするために Levamisole (125 mM, Sigma 社)を発色の段階で添加した。

5) 組織学的評価

HE 染色については各症例ごとに真皮上～中層において0.5mm² (横0.5mm×縦1mm)の範囲で比較的細胞浸潤の強い部分4カ所において好酸球数を算定して平均をとった。各好酸球顆粒に対する抗体染色所見については陽性度評価基準を作成し、各経過ごとに検討した。さらに、活性化好酸球の指標とされるEG2陽性細胞数を1mm² (横1mm×縦1mm)の範囲で算定し、MBP 陽性細胞数との比を求めることで好酸球活性化率を推測した。

結 果

1. HE 染色標本の検討

陽性患者の無疹部の真皮血管周囲性にも若干の単核球を主体とした軽度の細胞浸潤が認められたが、好酸球は認められなかった。貼付2時間後には全体的に細胞浸潤の程度に著変はないが、真皮上層の毛細血管内に好酸球が増加し、内壁に接着していると考えられる所見がみられた (Fig. 1)。貼付6時間後には、単核球だけでなく血管外に漏出した好酸球を目立つようになり、脱顆粒像と考えられる所見も認められた (Fig. 2)。貼付24時間後には浸潤好酸球の増加に加えて表皮の海綿状態と表皮内好酸球浸潤、真皮上層の浮腫も認められるようになり、その傾向は貼付48時間後にはより顕著になっていた (Fig. 3)。貼付時間と組織中の浸潤好酸球数はほぼ正の相関を示した (Fig. 4)。

2. 各好酸球顆粒蛋白の沈着 (Table 2)

貼付0時間では沈着を認めなかった。貼付部位ではMBP, EPOにおいて1例を除く4例で貼付2時間～12時間後に真皮上層の好酸球に一致して陽性所見を

Table 1 The result of patch testing to AD subjects

Case	Age/Sex	Serum IgE (mg/dl)	RAST score		Tests read after				
			DF	DP	2h	6h	12h	24h	48h
1	26M	629	6	6	+	+	ND	++	++
2	21M	18300	6	6	-	-	ND	-	-
3	20M	8520	6	6	-	-	ND	-	-
4	21F	2810	6	6	+	+	ND	++	++
5	26M	7760	6	6	?+	+	+	+	++
6	28M	14400	6	6	-	?+	ND	+	+
7	23F	1280	5	5	++	+	++	++	ND
8	20M	4870	6	6	-	?+	+	++	ND
9	20M	25100	5	5	-	-	-	?+	-

*Patch testing reactions were evaluated by the criteria of ICDRG.

⊕: positive subjects ND: not done



Fig. 1. Histological finding of 2 hours after patch testing. Note the presence of eosinophils within postcapillary venules.



Fig. 2. Histological finding of 6 hours after patch testing. Perivascular eosinophil infiltration is increased in the upper dermis.

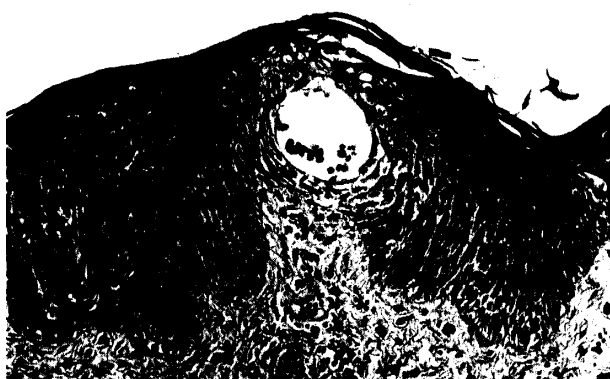


Fig. 3. Histological finding of 48 hours after patch testing. Epidermal spongiotic changes are prominent with occasional eosinophilic vesicles.

Table 2 Result of staining against the granule proteins antibodies

	case	0h	2h	6h	12h	24h	48h
BMK-13 (MBP)	1	0	0	0	ND	3	3
	5	0	0	1	2	3	3
	6	0	1	3	ND	3	3
	7	0	2	2	2	2	ND
	8	0	1	2	2	2	ND
EG2 (ECP)	1	0	0	0	ND	2	2
	5	0	0	0	1	2	2
	6	0	1	2	ND	2	2
	7	0	1	1	1	1	ND
	8	0	1	1	1	2	ND
anti-EP (EPO)	1	0	0	0	ND	3	3
	5	0	0	1	2	3	3
	6	0	1	3	ND	3	3
	7	0	3	2	3	3	ND
	8	0	1	2	2	2	ND

*Evaluation of deposition of the granule proteins.

0 : no detectable staining of eosinophils

1 : some positive cells in the upper part of the dermis

2 : a group of positive cells in the upper~middle part of the dermis

3 : diffuse deposition in the upper~middle part of the dermis

4 : diffuse deposition through the dermis

認めた。時間経過とともに陽性細胞数の増加がみられるとともに、真皮膠原線維へ陽性所見の拡大が認められた (Fig. 5)。また、表皮へ浸潤した好酸球にも陽性所見が得られた。EG2においては、BMK-13や anti-EPと同様、2~12時間後より陽性所見が認められるようになったが、表皮内の浸潤好酸球は陰性であった。BMK-13が殆んどの好酸球に陽性であるのに対し、EG2はおもに活性化された好酸球に陽性所見が得られるため、両者の陽性細胞の比を活性化の指標とした (Table 3)。その結果、活性化好酸球の割合は、好酸球浸潤が見られはじめた貼付6時間後においてすでに21~48%に達しているが、貼付48時間後においても28~59%程度であり、時間経過による活性化率の上昇は認められなかった。

考 按

1. AD患者におけるダニ抗原誘発皮疹の特異性について

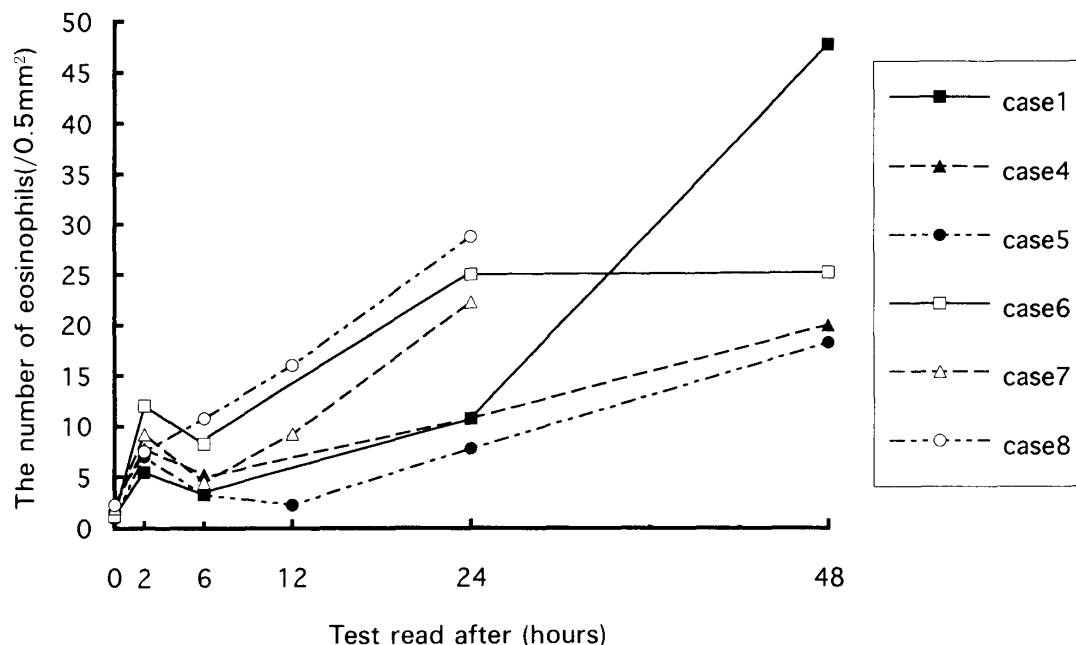


Fig. 4. The number of infiltrated eosinophils in the upper-middle dermis is correlated with the time of patch testing.

Table 3 Eosinophil activation evaluated by EG2-positive rate of eosinophils (% EG2 positive/MBP positive eosinophils)

Case	0h	2h	6h	12h	24h	48h
1	— (1/0)	— (0/0)	— (0/0)	ND	30 (24/80)	59 (59/100*)
5	— (1/0)	— (0/0)	— (0/2)	22 (7/32)	48 (48/100*)	56 (56/100*)
6	— (0/0)	29 (2/7)	21 (21/100*)	ND	29 (29/100*)	28 (28/100*)
7	— (0/2)	15 (7/47)	30 (8/27)	23 (10/43)	16 (9/57)	ND
8	— (0/0)	36 (4/11)	48 (19/40)	33 (8/24)	42 (8/19)	ND
mean ±SD	0	26.7 ± 10.7	33.0 ± 13.7	26.0 ± 6.1	33.0 ± 12.4	47.7 ± 17.1

— NS —

— NS —

— NS —

— NS —

*rough estimate NS: not significant ND: not done

AD 患者に対するダニ抗原パッチテストによる誘発皮疹の病理組織像については、1982年に Mitchell ら³⁾が報告して以来、諸家によりいくつか報告されている。Tanaka ら⁴⁾は、1990年に同様のパッチテストを行い、AD 患者20例中14例 (70%) に陽性で、DF に対する RAST 高値の AD 患者に限ると、14例中13例 (92.9%) と高い陽性率であったと報告している。また、

Bruynzeel-Koomen ら⁵⁾は、AD 患者15例と非 AD 患者10例にハウスダストによるパッチテストを行い、AD 患者12例 (80%) に陽性所見が得られたのに対し、非 AD 患者は全例で陰性であったとしている。我々の結果もこれらを支持しており、ダニパッチテストで皮疹が誘発されるには少なくともダニ抗原に対する特異 IgE 抗体の存在が不可欠であることを示すものと考え

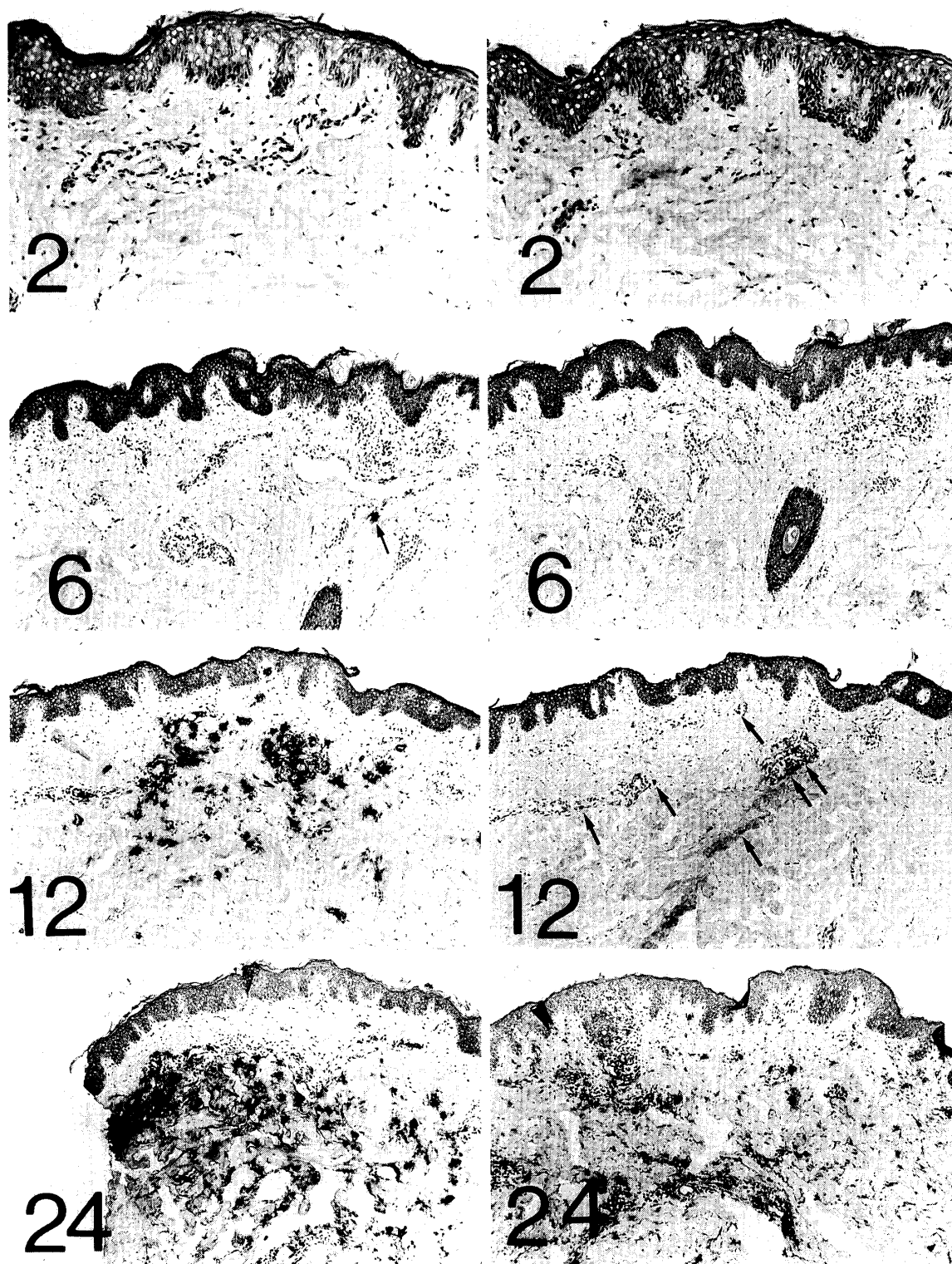


Fig. 5. Immunohistochemical findings of eosinophil granule proteins.
BMK-13 and EG2 positive reactions were scattered throughout connective tissue and their areas were time-dependently increased. (left: BMK-13, right: EG2)

られる。

パッチテスト誘発皮疹については、ストリッピング

による角質剥離を行わないと誘発されにくいことから
一次刺激によるものではないかと疑問視する意見もあ

るが、AD 患者、とくに RAST 高値の AD 患者に陽性率が高く、非 AD 患者ではほとんどが陰性であることや、パッチテスト誘発皮疹より得られた T cell clone が AD 皮疹にみられる IL-4, IL-5 といった Th2 細胞のサイトカイン分泌パターンを示していること⁶⁾から、ダニ抗原に過敏性を示す AD 患者に特徴的な反応と考えられる。逆に、テープストリッピングによって皮疹が誘発されやすいという事実は、角層がダニなどのアレルゲンが侵入する際のバリアとして重要な役割を果たしていることを示すものである。

2. ダニ抗原誘発皮疹の病理組織学的所見について

今回の誘発皮疹では、好酸球は貼付 2 時間後には血管内皮に接着し、一部は既に血管外への遊走を認めた。以後、時間経過とともに血管外遊走が著明となり、貼付 48 時間後まで好酸球浸潤と顆粒蛋白の陽性度は増強した。

今回の誘発皮疹の組織所見自体は基本的には AD の急性又は慢性病変の組織像とは異なるとともに、皮内にアレルゲンを投与した際にみられる LPR とも異なる。LPR では好中球、好酸球、マクロファージなどが局所に出現する⁷⁾とされているが、今回の我々の検討や既報告データ⁸⁾においてもパッチテスト誘発皮疹において好中球の浸潤は殆んど認められず、好酸球の血管外漏出と表皮の好酸球性海綿状態が顕著であった。

Katayama ら⁸⁾は、ダニ抗原のスクラッチテストでは表皮に湿疹反応のみられない LPR に近い組織像を示し、パッチテストでは湿疹型の組織像を示すと報告している。さらに Mudde ら⁹⁾は、AD 患者におけるハウスダスト抗原の抗原提示能が IgE を細胞表面に結合したランゲルハンス細胞に認められることを報告していることから、経表皮的に抗原が吸収され、FcεRI を発現している表皮ランゲルハンス細胞を介した T 細胞への抗原提示の過程が AD の皮疹形成に重要な役割を演じていると考えている。今回検討した誘発皮疹においては、抗原提示されて活性化した T 細胞、あるいは肥満細胞や好酸球自身から放出された IL-5 によって好酸球の分化増殖が促進し、表皮内へ侵入して好酸球性海綿状態が形成されたことが予想される。実際の AD の皮疹においても同様の機序による好酸球性海綿状態をきたし、慢性化すると表皮細胞から産生される IL-6 や TGF- α などのサイトカインや肥満細胞からのヒスタミンなどが作用して表皮肥厚などの AD 皮疹に特徴的な組織像が形成されることが推測され

る。

3. 各種好酸球性顆粒蛋白陽性所見と好酸球の活性化について

MBP は、好酸球特異蛋白の crystalloid core の大部分を占める蛋白で、寄生虫殺傷作用、組織・細胞障害作用の他、ヒスタミン遊離作用¹⁰⁾、過敏性亢進作用¹¹⁾があるとされている。BMK-13 抗体は Moqbel ら¹²⁾が作成した MBP に対する特異抗体で、好酸球の活性化に関係なく気管支喘息患者末梢血好酸球の 99% に陽性となる。また、ECP は好酸球顆粒の matrix に存在し、寄生虫殺傷作用、殺菌作用の他、ヒスタミン遊離刺激作用¹³⁾などがある。EG2 抗体は Tai ら¹⁴⁾が作成した ECP に対する特異抗体で、活性化好酸球の上清にてマウスを免疫して作成した抗体である。従って活性好酸球における陽性率が 75% と高いのに対し、非活性化好酸球においては 15% と低い¹²⁾。我々はこの特性を利用して、EG2 陽性細胞数と BMK-13 陽性細胞数の比をとることで組織における好酸球活性化比率を検討した。その結果、貼付時間による活性化率の有意な上昇は認められず、組織に浸潤した活性型好酸球は浸潤した組織中で活性化されるのではなく血管内ですでに好酸球遊走因子により活性化されていることが推測される。なお、表皮に浸潤した好酸球は BMK-13 陽性で EG2 陰性であったことから組織学的には活性化されていないと思われるが、これは Bruynzeel-Koomen らの報告⁵⁾と一致した所見であった。表皮内の好酸球が活性化されていない理由の 1 つとして、活性化好酸球は VLA-4 をはじめとする種々の接着分子を発現しており、それらとファイブロネクチン等の細胞外基質との接着が起こるために表皮内に浸潤することができないことが考えられる。その他、表皮内に浸潤するために必要な遊走因子に対する反応性が活性化好酸球では低下していることなども考えられるが、それを裏付けるデータは現在のところない。

4. 好酸球の血管外遊走に関与する血管内皮細胞への細胞間接着分子発現と好酸球遊走因子について

今回検討した好酸球の局所への浸潤には、血管内皮細胞上における細胞間接着分子の発現や種々の細胞における好酸球遊走因子の産生が重要な役割を演じていることが推察される。白血球の血管内皮細胞への接着とそれに引き続く血管外遊出、局所浸潤にはこれらの細胞と血管内皮細胞のいずれか、あるいは両者が活性化されることが必要である。アレルギー性炎症においては好酸球の浸潤が著明で、好中球の浸潤が殆ん

どみられないことから、好中球の遊走に関与していないといわれる VCAM-1 の発現の増強が推測されている¹⁵⁾が、in vitro における実験で、好酸球が IL-5 によって活性化された場合、VCAM-1 が血管内皮細胞に発現していなくても Mac-1-ICAM-1 経路を介した好酸球浸潤が起こる¹⁶⁾というデータもある。実際のアレルギー性炎症の場合における接着分子発現についても複数のデータが散見されるが、現在のところ、報告者によって結果が大きく異なっており、さらなるデータの集積が必要と思われる。

好酸球遊走因子の関与について、我々は今回の誘発皮疹を用い、RT-PCR 法を用いて経時的に IL-4、IL-5 の mRNA の発現が増強していることを確認している¹⁷⁾。遊走活性を有するメディエーターとして PAF、LTB₄、IL-5 などが考えられるが、このうち、PAF、LTB₄ は好酸球だけでなく、好中球の遊走活性も有していることがわかっており¹⁸⁾¹⁹⁾、好中球浸潤の認められていない今回の誘発皮疹では好酸球のみを特異的に誘導する IL-5 の関与が最も考えられる。

結 語

成人型 AD 患者 9 例、コントロール 7 例にダニ抗原によるパッチテストを行い、誘発された皮疹を病理組織学的に検討し、各種好酸球顆粒蛋白に対するモノクローナル抗体による免疫染色を行った。

1) パッチテストにて、DF、DP 特異 IgE 抗体に高値を示す AD 患者 9 例中 6 例 (66.7%) に陽性を示し、コントロール 7 例は全例陰性であった。

2) 誘発皮疹において貼付 2 時間後には血管外への好酸球浸潤がみられ、時間の経過に伴って増加を示し、貼付時間と浸潤好酸球数には正の相関を認めた。

3) 好酸球顆粒蛋白 (MBP, EPO, ECP) は、貼付 2～12 時間後より陽性細胞がみられるようになり、以後著明な細胞外沈着が認められた。活性化好酸球の指標とされる ECP 陽性細胞は、MBP 陽性細胞の 15～59% で、時間経過による活性化率の有意な上昇は認められなかった。

顆粒蛋白と AD の皮疹形成との関連性は未だ明確ではないが、喘息などのアレルギー疾患では好酸球数と組織障害の程度は病勢に相関する²⁰⁾といわれており、AD の皮疹形成にも好酸球浸潤が重要であることが予想されるが、今回の我々の実験において抗原刺激

による好酸球の活性化に続く血管内皮細胞からの遊出と局所への浸潤、さらに好酸球の脱顆粒による組織への顆粒蛋白の沈着という過程が AD における皮疹形成の 1 つの重要な経路であることが推察された。

標本作成にご助力くださいました現東京大学輸血部の早川雅之氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Leiferman, K.M., Ackerman, S.J., Sampson, H. A., Haugen, H.S., Venencie, P.Y., et al.: Dermal deposition of eosinophil-granule major basic protein in atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* **313**, 282-285, 1985.
- 2) 日本皮膚科学会学術委員会「アトピー性皮膚炎ワーキンググループ」: アトピー性皮膚炎の定義・診断基準. 日皮会誌 **104**, 176-177, 1994.
- 3) Mitchell, E.B., Crow, J., Chapman, M.D., Jouhal, S.S., Pope, F.M., et al.: Basophils in allergen-induced patch test sites in atopic dermatitis. *Lancet* **1**, 127-130, 1982.
- 4) Tanaka, Y., Tanaka, M., Anan, S. and Yoshida, H.: Immunohistochemical studies on dust mite antigen in positive reaction site of patch test. *Acta Derm. Venereol.* **144**(Suppl), 93-96, 1989.
- 5) Bruynzeel-Koomen, C.A.F.M., van Wichen, D. F., Spry, C.J.F., Venge, P. and Bruynzeel, P.L. B.: Active participation of eosinophils in patch test reactions to inhalant allergens in patients with atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* **118**, 229-238, 1988.
- 6) van Reijssen, F.C., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., Kalthoff, F.S., Maggi, E., Romagnani, S., et al.: Skin-derived aeroallergen-specific T-cell clones of Th2 phenotype in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **90**, 184-192, 1992.
- 7) Solley, G.O., Gleich, G.J., Jordon, R.E. and Schroeter, A.L.: The late phase of the immediate wheal and flare skin reaction. Its dependence upon IgE antibodies. *J. Clin. Invest.* **58**, 408-420, 1976.
- 8) Katayama, I., Matsunaga, T., Yokozeki, H. and Nishioka, K.: Immuno-histochemical analysis of patch test reaction induced by mite antigen in atopic dermatitis. *Environmental Dermatol-ogy* **1**, 22-26, 1994.
- 9) Mudde, G.C., van Reijssen, F.C., Boland, G.J., de

- Gast, G.C., Bruijnzeel, P.L.B., et al.: Allergen presentation by epidermal Langerhans' cells from patients with atopic dermatitis is mediated by IgE. *Immunology* **69**, 335-341, 1990.
- 10) O'Donnell, M.C., Ackerman, S.J., Gleich, G.J. and Thomas, L.L.: Activation of basophil and mast cell histamin release by eosinophilic granule major basic protein. *J. Exp. Med.* **157**, 1981-1991, 1983.
 - 11) Flavahan, N.A., Slifman, N.R., Gleich, G.J. and Vanhoutte, P.M.: Human eosinophil major basic protein causes hyperreactivity of respiratory smooth muscle. Role of the epithelium. *Am. Rev. Respir. Dis.* **138**, 685-688, 1988.
 - 12) Moqbel, R., Barkans, J., Bradley, B.L., Durham, S.R. and Kay, A.B.: Application of monoclonal antibodies against major basic protein (BMK-13) and eosinophil cationic protein (EG1 and EG2) for quantifying eosinophils in bronchial biopsies from atopic asthma. *Clin. Exp. Allergy* **22**, 265-273, 1992.
 - 13) Zheultin, L.M., Ackerman, S.J., Gleich, G.J. and Thomas, L.L.: Stimulation of basophil and rat mast cell histamine release by eosinophil granule-derived cationic proteins. *J. Immunol.* **133**, 2180-2185, 1984.
 - 14) Tai, P.C., Spry, C.J.F., Peterson, C., Venge, P. and Olsson, I.: Monoclonal antibodies distinguish between storage and secreted forms of eosinophil cationic protein. *Nature* **309**, 182-184, 1984.
 - 15) Dorbina, A., Menegazzi, R., Carlos, T.M., Nar-don, E., Cramer, R., et al.: Mechanisms of eosinophil adherence to cultured vascular endothelial cells; eosinophils bind to the cytokine-induced endothelial ligand vascular cell adhesion molecule-1 via the very late activation antigen-4 integrin receptor. *J. Clin. Invest.* **88**, 20-26, 1991.
 - 16) Ebisawa, M., Liu, M.C., Yamada, T., Kato, M., Lichtenstein, L.M., et al.: Eosinophil trans-endothelial migration induced by cytokines. II. Potentiation of eosinophil transendothelial migration by eosinophil-active cytokines. *J. Immunol.* **152**, 4590-4596, 1994.
 - 17) Yamada, N., Wakugawa, M., Kuwata, S. and Nakawaga, H.: Chronological in situ cytokine expression in mite-allergen induced dermatitis in atopic subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* (in press)
 - 18) Hanahan, D.J.: Platelet-activating factor; a biologically active phosphoglyceride. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 483-509, 1986.
 - 19) de Jong, E.M., van Erp, P.E., van Vlijmen I.M. and van de Kerkhof, P.C.: The inter-relation between inflammation and epidermal proliferation in normal skin following epicutaneous application of leukotriene-B₄-an immunohistochemical study. *Clin. Exp. Dermatol.* **17**, 413-420, 1992.
 - 20) Frigas, E. and Gleich, G.J.: The eosinophil and the pathophysiology of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **77**, 527-537, 1986.

CHRONOLOGICAL ANALYSIS OF EOSINOPHIL INFILTRATION IN MITE-ALLERGEN INDUCED DERMATITIS IN ATOPIC PATIENTS

Motoshi Wakugawa, Nobuo Yamada, Hidemi Nakagawa and Kunihiro Tamaki

Department of Dermatology, Faculty of Medicine, University of Tokyo

To elucidate the active process of eosinophil infiltration in atopic dermatitis (AD), we performed patch testing using crude mite allergens on normal-appearing skin in adult AD patients with high levels of mite-specific IgE antibodies and analyzed positive reaction sites chronologically by histological and immunohistological methods. Positive reactions were observed in 6 out of 9 AD patients (66.7%), whereas none of 7 non-AD control subjects showed positive reactions. Skin biopsies were obtained from positive reaction sites at 2, 6, 12, 24 and 48 hours after allergen challenge. Eosinophils were seen within postcapillary venules at 2 hours, followed by increased perivascular eosinophil infiltration at 6 hours which peaked at 24 and 48 hours. Epidermal eosinophilic spongiosis was also observed at 48 hours. The majority of infiltrating eosinophils showed positive reactions for BMK-13 and 15-59% of them were EG2 positive activated eosinophils. BMK-13, EG2 and anti-EP positive reactions were scattered throughout connective tissue and their areas were time-dependently increased.

These findings suggest that eosinophil transmigration and activation play an important role in initiating early AD lesions induced by transepidermal mite allergen permeation.