

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790096

研究課題名（和文）ヘアレスマウスを用いたアトピー性掻痒モデルの開発

研究課題名（英文）Development of atopic dermatitis-like itch model using hairless mice

研究代表者

藤井 正徳（FUJII MASANORI）

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40434667

研究成果の概要（和文）：アトピー性皮膚炎の痒みを反映した新規動物モデルの開発を試みた。ヘアレスマウスに不飽和脂肪酸が欠乏した飼料を摂食させると、バリア機能低下を伴ったドライスキンが全身性に認められた。ドライスキンを発症したマウスにダニ抽出成分を含有した軟膏を繰り返し塗布すると、著しいひっかき行動を伴った皮膚炎を発症した。本モデルは、アトピー性皮膚炎の痒みの発症機序の解明および新規治療薬の開発に有用であると思われる。

研究成果の概要（英文）：The present study was conducted to develop a new animal model that closely reflects itch in atopic dermatitis. When hairless mice were fed a special diet deficient in unsaturated fatty acids, dry skin accompanied by reduced function of skin barrier was systemically induced. When mite extract-containing ointment was repeatedly applied to the dry skin, skin inflammation with concomitant marked scratching behavior was observed. This model could be useful for elucidating the mechanisms underlying itch in atopic dermatitis and developing novel therapeutics.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：痒み、アトピー性皮膚炎、アレルギー、ドライスキン、皮膚バリア機能低下

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎では、痒み-掻爬-炎症の悪循環が成立していることから、痒みを抑制することは患者の quality of life を向上させるのみならず、本疾患の寛解にもつながる。しかしながら、アトピー性皮膚炎の痒みの発症機構はほとんど不明であり、有効な治療薬および治療法は確立されていない。

従来、アトピー性皮膚炎の発症にはアレルギー反応に特徴付けられる免疫学的な異常が関与すると考えられてきた。一方、近年の研究から、皮膚バリア機能の低下/ドライスキンなどの皮膚生理学的な異常も重要であるという考えが定着しつつある。したがって、アトピー性皮膚炎の病態はこれらの異常が複雑に絡み合い成立するものと推察される。

2. 研究の目的

これまで研究代表者は、ヘアレスマウスにHR-AD用精製飼料という特殊飼料を摂食させるとひっかき行動の持続化を伴ったアトピー性皮膚炎類似の皮膚炎症状が発症すること、および本ひっかき行動に皮膚バリア機能低下が関与することを明らかにしてきた。そこで本研究では、ドライスキンなどの皮膚生理学的異常とアレルギー反応が関与し、臨床の病態をさらに反映した有用な掻痒モデルを開発することを目的に、特殊飼料摂食によりドライスキンを発症したマウスにダニ抗原を繰り返し暴露した場合のひっかき行動および皮膚炎症状の発現を調べた。

3. 研究の方法

(1) 実験動物および飼料

4週齢雌性HR-1系ヘアレスマウスを実験に使用した。ドライスキン症状を誘発させるため、実験1～3では、HR-AD用精製飼料（日本農産、ドライスキン症状の重症化を防ぐ目的で適宜linoleic acidを添加したものを用いた）を摂食させた。陰性対照としては普通飼料（F-2、船橋農場）を用いた。また、実験4および5では、普通精製飼料（AIN76A、Research diet）の脂質成分を水素化した脂質に置換することにより調製した各種不飽和脂肪酸欠乏飼料（A飼料、B飼料およびC飼料）を用いた。

(2) ダニ抗原含有軟膏の作製

Sasaらの方法（Jpn. J. Exp. Med., 1970）に従い繁殖したコナヒョウヒダニの凍結乾燥虫体および本ダニ虫体よりリン酸緩衝液を用いてダニ粗抽出物を得た。実験1～3では、ダニ粗抽出物を親水軟膏と混合することにより、また実験5では、ダニ虫体およびダニ粗抽出物を白色ワセリンに混合することにより、ダニ抗原含有軟膏を作製した。

(3) ドライスキン症状の評価

ドライスキン症状の評価は、マウスの背部皮膚における皮膚水分含有量および経皮水分蒸散量（TEWL）をそれぞれCorneometer®CM825およびTewameter®TM210を用いて測定することにより行った。

(4) 皮膚炎およびひっかき行動の評価

皮膚炎症状は、紅斑、掻爬痕、糜爛、浮腫および肥厚（実験1～3）または紅斑、落屑、擦傷、痂皮および糜爛（実験5）の5項目において症状が認められた場合を各1点とし、その合計点を算出して評価した。

マウスのひっかき行動は、各時間にマウスの行動を撮影し、後肢によるひっかき行動を測定した。

4. 研究成果

(1) HR-AD飼料によりドライスキンを発症したマウスにおけるダニ抗原暴露の影響に関する検討

① ひっかき行動および皮膚炎発現に及ぼすダニ抗原暴露の影響（実験1）

HR-AD飼料を摂食させ皮膚バリア機能低下を伴ったドライスキンを発症したマウスに、ダニ粗抽出液と親水軟膏を混合した軟膏（MO）を、7日間連日塗布し（1サイクル）、1週間のインターバルを置いて同処置を繰り返したところ（Dry skin-MO群）、4サイクル目の塗布期間中より掻爬痕を呈する個体がみられ、6サイクル目では糜爛、浮腫、肥厚も認められた（図1）。そこで、6サイクル目最終塗布直後1時間におけるひっかき行動を測定したところ、Dry skin-MO群のひっかき行動回数はドライスキン発症マウスにダニ粗抽出物の代わりに生理食塩水を混合した軟膏を処置した群（Dry skin-S0群）に比べて増加する傾向を示した。同サイクル終了2日後に皮膚炎の程度をスコア化したところ、Dry skin-MO群の皮膚炎スコアはDry skin-S0群に比して有意に増加した。一方、普通飼料（F-2）を摂食させダニ抗原を同様に暴露した群（Normal-MO群）において何ら皮膚炎症状は認められなかった。



図1 ダニ抗原含有軟膏の塗布により誘起される特徴的な皮膚炎症状

② 抗原暴露スケジュールの検討（実験2）

つづいて、様々なスケジュールの検討を行った。より早期かつ重度の症状が発現することを期待し、インターバルを置かずダニ抗原含有軟膏を連日処置したところ、実験1でみられた皮膚炎症状は全く認められなかったことから、抗原に対する感作には適当なインターバルが必要である可能性が考えられた。そこで、7日もしくは3日に一回宛、ダニ抗原を暴露したところ、実験1のスケジュールである隔週で連日塗布した群と比較して皮膚炎スコアは有意に低い値を示した。したがって、実験1のスケジュールが妥当であると考えられた。

③抗原濃度の検討（実験 3）

つぎに、ダニ粗抽出液よりタンパクを濃縮し、より高濃度のダニ抗原を含有した軟膏を用いた場合の影響を検討した。その結果、皮膚炎スコアは4サイクル目よりタンパク濃度に依存して有意に増加した。ひっかき行動を測定したところ、4および5サイクル目軟膏処置直後1時間においては、S0群に比較して有意かつ明らかなひっかき行動が観察されたが、塗布2日後の測定では差がみられなかった（図2）。

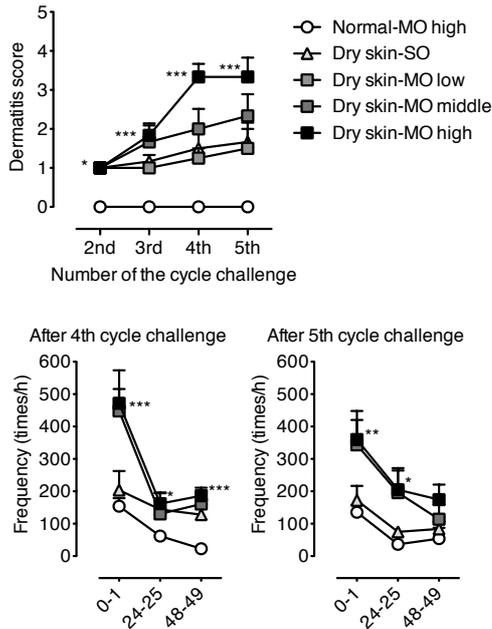


図2 高濃度のダニ抗原含有軟膏を塗布した際の皮膚炎スコア（上段）およびひっかき行動の（下段）の変動

以上から、ドライスキンを発症したマウスにダニ抗原を暴露することにより、掻爬痕を伴った皮膚炎が認められ、ひっかき行動も抗原暴露処置直後で有意に増加することが示された一方で、ひっかき行動の増加は速やかに収束した。HR-AD 飼料の長期間の摂食によりドライスキンが進行性に重症化し、衰弱する個体もみられ、これがひっかき行動が持続的に観察されない原因の一つと考えられた。

(2) 不飽和脂肪酸欠乏飼料により軽度のドライスキンを発症したマウスにおけるダニ抗原暴露の影響に関する検討

①ドライスキン誘発に関する検討（実験4）
そこで次に上記の問題を解決するため、ドライスキン症状を軽度で長期間コントロールできる飼料を検討した。以前の研究で、HR-AD 飼料によるドライスキンが必須脂肪酸である linoleic acid の欠乏によることを明らか

にしていたため、普通精製飼料として繁用される AIN76A 飼料の脂質成分を水素化した脂質に置換することで必須脂肪酸を含む不飽和脂肪酸 (UFA) を欠乏させた3種の飼料 (A-C 飼料、それぞれ炭水化物成分の組成がそれぞれ異なる) を調製し、それらを摂食させた場合のドライスキン症状の程度を調べた。

その結果、B 飼料および C 飼料を摂食させると、HR-AD 飼料を摂食させた場合とほぼ同程度に水分含有量の低下および TEWL の増加がみられ、重症のドライスキンが発症したが、A 飼料を摂食させた場合では軽度のドライスキンが長期間にわたり認められた（図3）。

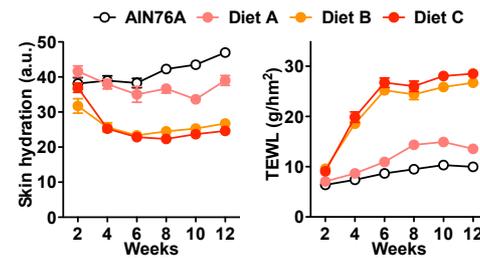


図3 各種不飽和脂肪酸欠乏飼料を摂食させた場合のドライスキン症状

よって以降の実験では、A 飼料を摂食させ軽度のドライスキンを発症したマウスを用いてダニ抗原暴露の影響を再検討した。

②ひっかき行動および皮膚炎発現に及ぼすダニ抗原暴露の影響（実験5）

A 飼料摂食により軽度のドライスキンを発症したマウスに実験1とほぼ同様の条件でダニ抗原を暴露したが、ひっかき行動および皮膚炎は全く認められなかった。

図3に示すごとく、皮膚バリア機能障害の程度が比較的軽度であるため、作用する抗原量が不十分であったと考え、抗原量を2.5倍および25倍に増加して検討したが、明らかなひっかき行動の発現は認められなかった。

しかしながら、既にダニ抗原を暴露した動物を用いて抗原暴露中止後8週間のインターバルを置いて再度ダニ抗原を暴露したところ、無数の掻爬痕を伴った皮膚炎が認められた（図4）。ひっかき行動を測定したところ、1時間の計測において20分にも及ぶ（回数で評価すると1000回/h程度）著明なひっかき行動が、抗原暴露期間中のみならず暴露中止後においても数週間にわたり再現性よく認められた（図5）。また、皮膚炎スコアはひっかき行動の推移と時間的に一致していた（図5）。一方、普通飼料 (AIN76A) を摂食させた正常マウスにダニ抗原を同様に暴露した場合には、ひっかき行動はほとんどみられず、皮膚病変も何ら認められなかった（図4および5）。



図4 正常マウスもしくは軽度ドライスキンを発症したマウスにダニ抗原を暴露した際の皮膚病変

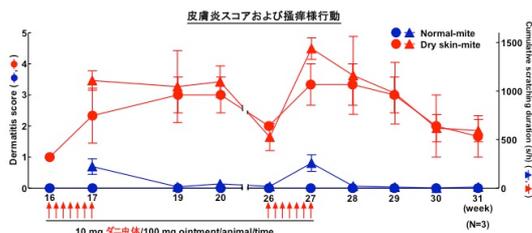


図5 正常マウスもしくは軽度ドライスキンを発症したマウスにダニ抗原を暴露した際のひっかき行動および皮膚炎スコアの変動

以上の成績から、実験条件等のさらなる検討の余地があるものの、不飽和脂肪酸欠乏飼料の摂食により軽度のドライスキンを発症したヘアレスマウスにダニ抗原を適切なスケジュールで経皮的に暴露することにより、著明なひっかき行動を長期にわたり発症するモデルの作製が可能であることが示された。本モデルは、臨床における痒み-掻爬-炎症の悪循環を一部反映したものと考えられ、アトピー性皮膚炎の痒みの発症機構の解明および新規治療薬の開発に有用であると思われる。

おわりに

本研究の遂行にあたり多くのご協力を頂きました下記(6. 研究組織(4) 研究協力者)に示す方々に深謝いたします。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

(1) Masanori Fujii, Tatsuo Shimizu, Takeshi Nakamura, Fumiko Endo, Shigekatsu Kohno, Takeshi Nabe: Inhibitory effect of chitosan-containing lotion on scratching response of hairless mice with atopic dermatitis-like dry skin. *Biol. Pharm. Bull.* 査読有 **34**, 1890-1894 (2011)

(2) 藤井 正徳、河野 茂勝、奈邊 健:

特殊飼料摂食ヘアレスマウスにおけるダニ抗原塗布による引っ掻き行動の増悪. 第19回国際痒みシンポジウム記録集、査読無、(2010) 24-26.

[学会発表] (計5件)

(1) 藤井 正徳 他: ヘアレスマウスにおける飼料誘発アトピー性皮膚炎症状の発症における飼料中 unsaturated fatty acids (UFAs) および starch の欠乏の影響. 第120回日本薬理学会近畿部会、2011年11月11日、ホテルグランヴィア京都(京都)

(2) 多留木 崇志 他: ドライスキンを発症したヘアレスマウスの掻痒様行動に及ぼす種々外因性刺激の影響. 第61回日本薬学会近畿支部総会・大会、2011年10月22日、神戸学院大学 ポートアイランドキャンパス(神戸)

(3) 島崎 裕貴 他: Starch の欠乏がヘアレスマウスにおける摂食性のアトピー性皮膚炎様ドライスキンの発症に関与する. 第84回日本薬理学会年会(東日本大震災のため、誌上開催)、2011年3月24日、パシフィコ横浜(横浜)

(4) 藤井 正徳 他: ドライスキンを発症したヘアレスマウスにおけるダニ抗原塗布によるアトピー性皮膚炎症状の増悪. 日本薬学会 第130回年会、2010年3月30日、岡山桃太郎アリーナ(岡山)

(5) 藤井 正徳 他: 特殊飼料摂食ヘアレスマウスにおけるダニ抗原塗布によるひっかき行動の増悪. 第19回国際痒みシンポジウム、2009年10月31日、千里阪急ホテル(大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 正徳 (FUJII MASANORI)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号: 40434667

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

河野 茂勝(京都薬科大学・教授(既退職))

奈邊 健(京都薬科大学・准教授)

島崎 裕貴(京都薬科大学・大学院生(既卒))

多留木 崇志(京都薬科大学・学部生(既卒))