

増悪化アレルギー性皮膚炎症におけるヒスタミンの役割

平澤典保,^{*,a} 大内和雄^{a,b}

Roles of Histamine in the Exacerbated Allergic Dermatitis

Noriyasu HIRASAWA^{*,a} and Kazuo OHUCHI^{a,b}

^aGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, 6-3 Aoba Aramaki, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8578, Japan, and ^bFaculty of Pharmacy, Yasuda Women's University, 6-13-1 Yasuhigashi, Asaminami-ku, Hiroshima 731-0153, Japan

(Received August 31, 2010)

We established a novel dermatitis model in mice earlobes and analyzed the roles of histamine using specific antagonists for histamine receptors. After sensitization with picryl chloride (PiCl) by painting it on the earlobes of cyclophosphamide-treated mice, 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) was painted twice at the same site, and then allergic inflammation was induced by painting with PiCl. Histamine antagonists and cyclosporin A were administered i.v. The application of TPA shifted the PiCl-induced allergic inflammation from a delayed-type response to a biphasic response and increased the infiltration of eosinophils and mast cells at the inflammatory site. In this model, the PiCl-induced increase in the thickness of the earlobe in the immediate phase was suppressed by the histamine H₁ antagonist pyrilamine. In contrast, the increase in the swelling in the late phase and the infiltration of eosinophils were suppressed by the H₃/H₄ antagonist thioperamide. The inhibitory effect of the combined treatment with pyrilamine and thioperamide on TPA-modified contact dermatitis was as potent as that of cyclosporin A. Histamine plays significant roles in early-phase swelling *via* H₁ receptors and in late-phase swelling *via* H₃/H₄ receptors in this TPA-modified allergic dermatitis model.

Key words—allergic dermatitis; histamine H₁ receptor; histamine H₄ receptor

1. はじめに

アトピー性皮膚炎は増悪・寛解を繰り返す、痒痒のある湿疹を主病変とする慢性疾患である。本疾患は環境中の様々な抗原に対して免疫応答及び炎症反応が繰り返し生じ、徐々に増悪化していくものである。その増悪化の要因として、遺伝的要因に加えて、発汗や搔破などの物理的刺激、細菌・真菌感染、ストレスなどがある。¹⁻³⁾このような様々な要因により修飾され、増悪化されたアトピー性皮膚炎は難治性を示し、新たな治療薬、治療法の開発が望まれている。

ヒスタミンは、抗原刺激によりマスト細胞や好塩基球から放出されて、アレルギー症状の誘発に大きく関与している。さらに、様々な炎症刺激によりマ

クロファージや好中球などからも産生・放出され、^{4,5)} IgE を介した I 型アレルギーとは異なるタイプのアレルギーや非アレルギー性の慢性炎症、免疫応答においても寄与していることが明らかになってきた。⁶⁾最近、ヒスタミンの 4 番目の受容体として H₄ 受容体がクローニングされ、⁷⁾ ヒスタミンは H₄ 受容体を介して新たな機能を発現している可能性がある。H₄ 受容体は他のヒスタミン受容体の中では H₃ 受容体と最も相同性が高いが、H₃ 受容体が主に中枢の神経系に発現しているのに対し、H₄ 受容体は好酸球やマスト細胞に高発現している。⁸⁾ 実際、薬理的解析あるいは H₄ 受容体ノックアウトマウスを用いた解析から、ヒスタミンは H₄ 受容体を介してマスト細胞や好酸球の遊走を誘導する活性を持つことが明らかにされた。⁹⁻¹⁰⁾ さらに、H₁ 受容体とともに、H₄ 受容体はヒスタミンによるかゆみに関与していることも示唆された。¹¹⁾ これまでアトピー性皮膚炎の特にかゆみを抑制するために H₁ 受容体拮抗薬が用いられてきたが、かならずしも優れた治

^a東北大学大学院薬学研究科 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3), ^b安田女子大学薬学部 (〒731-0153 広島市安佐南区安東 6-13-1)

*e-mail: hirasawa@mail.pharm.tohoku.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 130 年会シンポジウム S48 で発表したものを中心に記述したものである。

療効果をあげている訳ではなかった。しかし H_4 受容体を介したヒスタミンの作用が明らかになるにつれて、 H_4 受容体拮抗薬がアトピー性皮膚炎の増悪化に有効である可能性が指摘されるようになってきた。そこで筆者らは、接触抗原で感作した後、抗原非特異的な炎症反応を誘発することにより、増悪させたアレルギー性皮膚炎モデルにおいてヒスタミンの役割について解析した。本稿ではその結果について概説し、ヒスタミンを標的とした新たな治療法を提案する。

2. 増悪化アレルギー性皮膚炎モデル

アレルギー性皮膚炎の誘発には、一般に、それ自身には抗原性がないものの、組織中のタンパクと化学的に結合して抗原を新たに形成する物質（接触抗原）が広く用いられている。このような接触抗原による接触皮膚炎の誘発には、Th1 型の免疫応答が優位な IV 型アレルギーの関与が大きい¹²⁾が、アトピー性皮膚炎では血中 IgE レベルが高値であることが多く、リンパ球だけでなく好酸球や好中球の浸潤がみられるなど、基本的には Th2 優位な免疫反応が生じている。このようにアトピー性皮膚炎は接触皮膚炎モデルとは多くの点で異なっている。そこで、よりアトピー性皮膚炎に類似した炎症モデルにするために、接触抗原をマウス耳介に繰り返し塗布して作製する慢性皮膚炎モデルが開発された。接触抗原を繰り返し塗布することにより、免疫応答は Th1 優位から Th2 優位へと変化し、IgE 産生やマスト細胞依存的な応答も明確にみられるように変化する。^{13,14)}このようなモデルを用いて、抗原刺激後に誘発されるアレルギー性皮膚炎の病態解析は進んでいるものの、繰り返しの塗布によりどのような機序でアレルギー性皮膚炎が増悪化していくかについてはいまだ十分には解明されていない。

アトピー性皮膚炎の 1 つの特徴である好酸球浸潤に注目し、あらかじめ末梢血中の好酸球数を増多させた後、接触抗原¹⁵⁾やタンパク抗原¹⁶⁾で皮膚炎を誘発するモデルも考案されている。例えば、あらかじめシクロホスファミドを全身投与したのち接触抗原で感作することにより、末梢血好酸球の増多を伴う接触皮膚炎を誘発するモデルが考案されている。¹⁵⁾これにより、接触抗原の耳介への再暴露による炎症局所への好酸球の浸潤が顕著にみられ、耳介の浮腫反応も著しく増大することが示されている。シクロ

ホスファミドの作用は制御性 T 細胞を減少させ、¹⁶⁾ IL-4, IL-5 など Th2 サイトカインの産生を増大させた結果である¹⁷⁾と考えられている。しかしこのようなモデルでは組織マスト細胞数の増加は顕著ではなく、¹⁵⁾アトピー性皮膚炎と類似の病態を再現するためにさらに改良する必要が考えられた。

アレルギー性接触皮膚炎を誘発する接触抗原は一般に、タンパクに結合することにより抗原性を示すだけでなく、同時に起炎作用も示す。この起炎作用が抗原によるアレルギー性皮膚炎を増幅することが報告されている。¹⁸⁾そこで筆者らは、抗原非特異的な炎症反応によるアレルギー性皮膚炎の増悪化モデルを作製するため、感作後、抗原性を持たない化学物質、12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) により炎症反応を誘発した (Fig. 1).¹⁹⁾すなわち、好酸球増多を誘発するために、まずシクロホスファミドを全身投与し、その 2 日後に接触抗原として塩化ピクリル (PiCl) をマウスの耳介に塗布することにより感作した。その 5 日後及び 10 日後に TPA を同じ耳介に塗布して炎症反応を誘発し、さらに 2 日後、PiCl を耳介に再び塗布することにより、アレルギー性皮膚炎を誘発するモデルを作製した。本動物実験は国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定に則り、同環境・安全委員会動物実験専門委員会の了承を得て行った。

この増悪化アレルギー性皮膚炎モデルでは、抗原惹起後 24 時間の組織像を観察すると、TPA を塗布しなかった場合に比べて、表皮組織の肥厚、痂皮、膿疱など皮膚慢性化にみられる所見が顕著に観察された (Fig. 2).¹⁹⁾また、塩化ピクリルで感作及び炎症惹起しただけでは、惹起後 24 時間まで耳介の浮腫は持続的に緩やかに増加したが、感作及び惹起の間に 2 回 TPA を塗布して炎症反応を誘発した群においては、惹起後 30 分と 12 時間をピークとする 2 相性の反応に変化することが明らかになった (Fig.

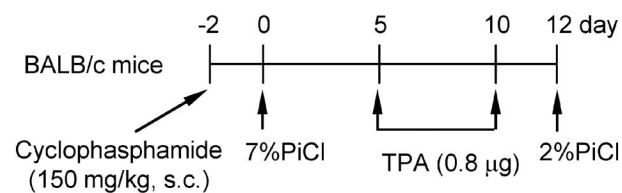


Fig. 1. Experimental Schedule

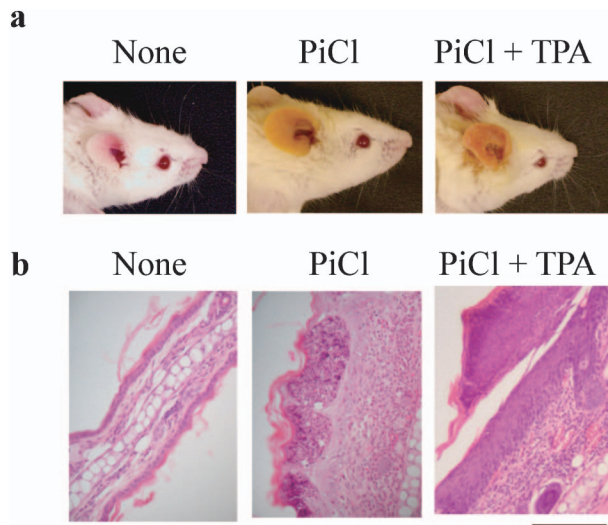


Fig. 2. TPA-modified Contact Dermatitis

Mice were treated as described in Fig. 1. Twenty four hours later, the ears were photographed (a). Then, the ear lobe tissues were excised and fixed in 10% neutral buffered formalin. The tissue sections were stained with hematoxylin and eosin (b). A scale bar represents 100 μm . The detail of the data is described in ref. 19 by Hirasawa *et al.*

3).¹⁹⁾ このように感作と惹起の間の期間に抗原非特異的炎症反応を誘発することにより、接触抗原により生じる浮腫反応は感作及び惹起のみのモデルよりも強くなること、そして接触皮膚炎ではみられなかった抗原塗布直後 (30分) のアナフィラキシー様の浮腫反応が、軽微ながらも認められたことが本モデルの第1の特徴である。さらに、シクロフォスファミドを投与することにより、末梢血中の好酸球数は増大するが、TPAを塗布してアレルギー性皮膚炎を増悪させた場合にはさらに増加し、炎症局所に浸潤した好酸球数もTPAを塗布しなかった群に比べて有意に増大した。また、末梢血中のIgEレベル及び組織中のマスト細胞数も本増悪化モデルにおいて有意に増加した (Fig. 4).¹⁹⁾ このとき、耳介組織中では、TPAを塗布しないでPiClで惹起した場合に比べて、Th2サイトカインであるIL-4のmRNAレベルが増大し、逆にTh1サイトカインであるIFN- γ のmRNAレベルが低下した¹⁹⁾ことから、TPA塗布によりTh2優位化の方向に免疫応答が変化したと考えられた。

3. 各種抗ヒスタミン薬の効果

本モデルでは、上述のように惹起後30分後と12時間をピークとする2相性の浮腫反応を示すため、それぞれの浮腫反応に対する各種抗ヒスタミン薬の効果を解析した。抗原塗布直後 (30分) の浮腫反

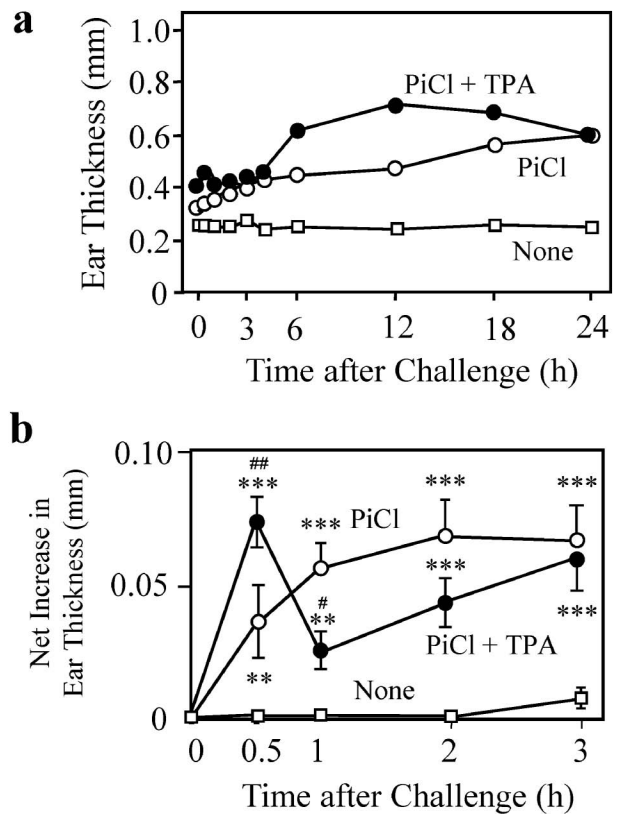


Fig. 3. Effects of TPA Application on the Time Changes in the Ear Thickness in the Mice Exposed to PiCl

Mice were treated as described in Fig. 1. (a) Ear lobe thickness was measured from 0 to 24 h after the PiCl challenge. (b) The ear thickness of the mouse before the challenge was subtracted from the data in (a) and indicated as the net increase in ear thickness. The values are the means from four mice with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance; *** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$ vs. the corresponding control group (None), # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ vs. the corresponding PiCl group. The detail of the data is described in ref. 19 by Hirasawa *et al.*

応はH₁受容体拮抗薬pyrilamineにより強く抑制されたが、H₂受容体拮抗薬cimetidine、H₃/H₄受容体拮抗薬thioperamideはほとんど抑制作用を示さなかった。免疫抑制薬cyclosporine Aはこの時期の浮腫反応を強く抑制した [Fig. 5(a)].¹⁹⁾ Cyclosporine Aはマスト細胞の脱顆粒反応を強く抑制することが明らかにされており、この抑制作用はマスト細胞脱顆粒反応を抑制した結果であると考えられる。

一方、12時間後の浮腫反応に対するこれらの抗ヒスタミン薬の効果を検討したところ、pyrilamine及びcimetidineはわずかな抑制作用を示したが、thioperamideが強い抑制作用を示した。その抑制作用はcyclosporine Aとほぼ同程度であった [Fig. 5(b)].¹⁹⁾

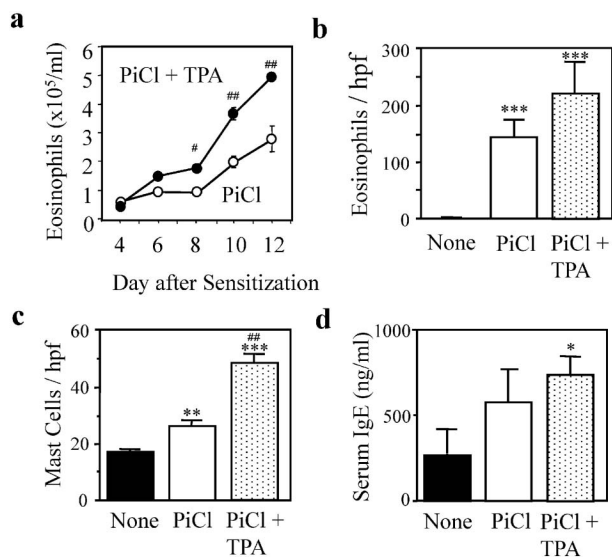


Fig. 4. Effects of TPA Application on the Number of Eosinophils and Mast Cells in the Ear Lobe Tissue and the Level of Serum IgE

(a) Blood was collected on days 4, 6, 8, 10 and 12, and the number of eosinophils in blood was determined. (b-d) On day 12, mice were challenged with a 1% (w/v) PiCl solution ("PiCl" and "PiCl+TPA" groups) or the vehicle ("None" group). Twenty-four hours later, ear lobe tissue specimens and blood were collected. The number of eosinophils (b) and mast cells (c) in the inflammatory lesion, and the level of IgE in serum (d) were determined. The values are means from three to four mice with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. None, $^{\dagger}p < 0.05$, $^{\ddagger}p < 0.01$ vs. PiCl group, and $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ vs. the corresponding group at 4 days. The detail of the data is described in ref. 19 by Hirasawa *et al.*

4. Thioperamide と cyclosporine A の好酸球浸潤抑制作用

Thioperamide 及び cyclosporine A の好酸球浸潤に対する効果を検討した。好酸球浸潤の指標として、惹起後 12 時間後の組織中の eosinophil peroxidase (EPO) 活性を測定した。その結果、thioperamide は EPO 活性を用量依存的に抑制し、cyclosporine A とほぼ同程度の抑制作用を示した (Fig. 6)。¹⁹⁾ したがって、ヒスタミンは H_4 受容体を介して好酸球浸潤を抑制していることが示唆された。この結果は、ヒスタミンの唯一の産生酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) ノックアウトマウスを用いて確認した。すなわち、HDC ノックアウトマウスにおいては、野生型マウスに比べて好酸球浸潤が有意に減弱した (データ未掲載)。一方、ヒスタミンはマスト細胞の浸潤を誘導する作用があることが *in vitro* の実験系で報告されているため、マスト細胞数の変化についても解析した。HDC ノックアウトマウスでは組織中のマスト細胞数の減少が報告されており、本実験においても確認された

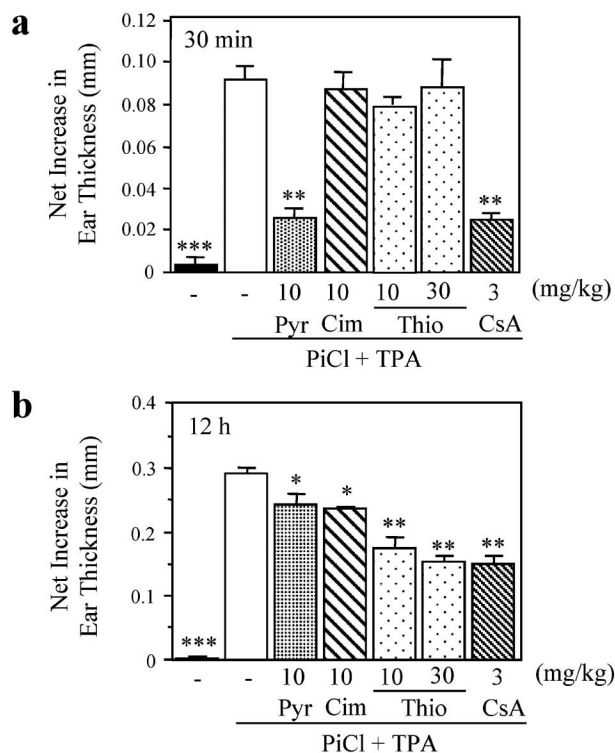


Fig. 5. Effects of Histamine Receptor Antagonists on the Ear Swelling in TPA-modified Contact Dermatitis

Mice were treated as described in Fig. 1. On day 12, mice were intravenously administered the histamine receptor antagonist pyrilamine (Pyr), cimetidine (Cim), thioperamide (Thio), the immunosuppressor cyclosporin A (CsA), or the vehicle. Thirty minutes later, mice were challenged with a 1% (w/v) PiCl solution (PiCl+TPA) or vehicle (closed column). Ear thickness was measured before, and 30 min (a) and 12 h (b) after the challenge. The ear thickness of the mouse before the challenge was subtracted from the data and indicated as net increase in ear thickness. The values are the means from four mice with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. PiCl+TPA control. The detail of the data is described in ref. 19 by Hirasawa *et al.*

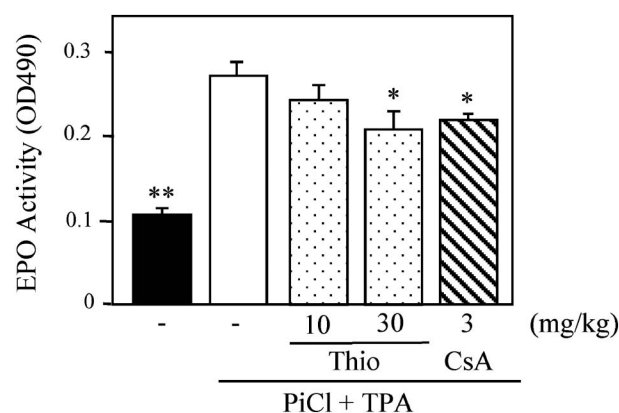


Fig. 6. Effects of Thioperamide and Cyclosporin A on the Infiltration of Eosinophils

Mice were treated as described in Fig. 1. On day 12, mice were intravenously administered thioperamide (Thio), cyclosporin A (CsA), or the vehicle. Thirty minutes later, mice were challenged with 20 ml of a 1% (w/v) PiCl solution (PiCl+TPA) or the vehicle (closed column) by painting on the right ear lobe. The ear lobe tissues were excised 12 h after the challenge, and the EPO activity was determined. The values are the means from four mice with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. PiCl+TPA control. The detail of the data is described in ref. 19 by Hirasawa *et al.*

が、増悪型アレルギー性皮膚炎症を誘発した場合には、マスト細胞数の増加が認められ、その増加分は野生型マウスにおける増加分とほぼ一致した（データ未掲載）。したがって、増悪化アレルギー性皮膚炎の誘発に伴って生じたマスト細胞数の増加にはヒスタミン以外の因子が関与していることが示唆された。

5. Pyrilamine と thioperamide の併用効果

免疫抑制薬 cyclosporine A や tacrolimus はアトピー性皮膚炎に著効を示すが、免疫抑制作用も強く、易感染性などの副作用も強い。その作用は、IL-2 の産生抑制を介した免疫応答の抑制や上述のようにマスト細胞の脱顆粒反応抑制作用により発現すると考えられているが、その詳細は明らかではない。cyclosporine A は抗原惹起直後の浮腫反応、及び12時間後の浮腫反応、及び好酸球浸潤をいずれも抑制したが、それぞれ pyrilamine 及び thioperamide が同程度の抑制作用を示した。そこで、両者を併用することにより、cyclosporine A と同程度の抑制作用を発現するかどうか解析した。Figure 7 に示したように、pyrilamine と thioperamide の併用により、抗原惹起直後から12時間まで cyclosporine A と同様に持続的な抑制作用を示し、H₁ 受容体拮抗薬と H₄ 受容体拮抗薬の併用が有効であることが明らかになった。¹⁹⁾

Cyclosporine A が抗原惹起直後のマスト細胞の脱顆粒反応、並びにその後のヒスタミンの放出を抑制しているかどうかは今後解析していく予定である。

6. おわりに

抗原非特異的刺激によって、接触抗原によるアレルギー性皮膚炎は、Th2 反応の優位化によって増悪化することが明らかになった。Th2 の優位化は IgE の産生、マスト細胞の増加を誘導し、I 型アレルギーや好酸球浸潤を伴う病態へと変化させたと考えられる。このような病態においては、接触皮膚炎に比べて、ヒスタミンの放出が増大し、その病態形成における関与が増大したと考えられ、抗原惹起後の浮腫反応に対する抗ヒスタミン薬の効果がより明確にあらわれたものと考えられる。ヒスタミン H₄ 受容体拮抗薬が発見され、その作用が明らかにされるにつれ、H₄ 受容体拮抗薬がアレルギー性皮膚炎に対して有効である可能性が示唆されてきた。これまで、ヒスタミンが炎症局所に存在し、病態に寄与しているこ

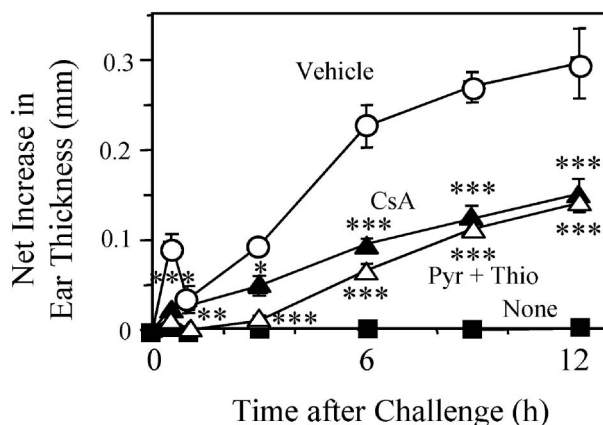


Fig. 7. Effects of Combined Treatment of Pyrilamine with Thioperamide on the Ear Thickness

Mice were treated as described in Fig. 1. On day 12, mice were intravenously administered pyrilamine (10 mg/kg) and thioperamide (30 mg/kg) (Pyr+Thio), cyclosporin A (3 mg/kg) (CsA), or the vehicle (Vehicle). Thirty minutes later, mice were challenged with 20 ml of a 1% (w/v) PiCl solution ("Pyr+Thio" and "CsA" groups) or the vehicle ("None" group) by painting on the right ear lobe. Ear thickness was measured at the indicated time after the challenge. The ear thickness of the mouse before the challenge was subtracted from the data and indicated as the net increase in ear thickness. The values are the means from four mice with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. PiCl+TPA control (Vehicle) at the corresponding time point. The detail of the data is described in ref. 19 by Hirasawa *et al.*

とが想定されながらも、H₁ 受容体拮抗薬の効果は満足するものではなかった。アレルギー性皮膚炎の進展において、ヒスタミンはその時々で異なる受容体を介した作用を発現している可能性が示唆されてきている。例えば筆者らはヒスタミンが慢性炎症においても産生され、H₂ 受容体を介して血管新生に関与していることも明らかにしている。²⁰⁾ このように、アレルギー性疾患には H₁ 受容体拮抗薬を単独で使用するのではなく、その病態に合わせて、H₄ 受容体拮抗薬あるいは H₂ 受容体拮抗薬を併用して用いることにより、治療効果を増大させることが可能であると考えられる。

REFERENCES

- 1) Hanifin J. M., *Clin. Rev. Allergy*, **4**, 43-65 (1986).
- 2) Hashizume H., Takigawa M., *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, **6**, 335-339 (2006).
- 3) Lin Y. T., Wang C. T., Chiang B. L., *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **33**, 167-177 (2007).
- 4) Shiraishi M., Hirasawa N., Kobayashi Y., Oikawa S., Murakami A., Ohuchi K., *Br. J. Pharmacol.*, **129**, 515-524 (2000).

- 5) Shiraishi M., Hirasawa N., Oikawa S., Kobayashi Y., Ohuchi K., *Immunology*, **99**, 600–606 (2000).
- 6) Jutel M., Blaser K., Akdis C. A., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **137**, 82–92 (2005).
- 7) Nguyen T., Shapiro D. A., George S. R., Setola V., Lee D. K., Cheng R., Rauser L., Lee S. P., Lynch K.R., Roth B. L., O' Dowd B. F., *Mol. Pharmacol.*, **59**, 427–433 (2001).
- 8) Daugherty B. L., *Br. J. Pharmacol.*, **142**, 5–7 (2004).
- 9) Hofstra C. L., Desai P. J., Thurmond R. L., Fung-Leung W.-P., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **305**, 1212–1221 (2003).
- 10) Ling P., Ngo K., Nguyen S., Thurmond R. L., Edward J. P., Karlsson L., Fung-Leung W.-P., *Br. J. Pharmacol.*, **142**, 161–171 (2004).
- 11) Bell J. K., McQueen D. S., Rees J. L., *Br. J. Pharmacol.*, **14**, 374–380 (2004).
- 12) Kitagaki H., Ono N., Hayakawa K., Kitazawa T., Watanabe K., Shiohara T., *J. Immunol.*, **159**, 2484–2491 (1995).
- 13) Kitagaki H., Fujisawa S., Watanabe K., Hayakawa K., Shiohara T., *J. Invest. Dermatol.*, **105**, 749–755 (1995).
- 14) Harada D., Takada C., Tsukumo Y., Takaba K., Manabe H., *J. Dermatol. Sci.*, **37**, 159–167 (2005).
- 15) Satoh T., Chen Q. J., Sasaki G., Yokozeki H., Katayama I., Nishioka K., *Eur. J. Immunol.*, **27**, 85–91 (1997).
- 16) Kootiratrakarn T., Fujimura T., Sano K., Okuyama R., Aiba S., Tagami H., Terui T., *Eur. J. Immunol.*, **35**, 3277–3286 (2005).
- 17) Ikezawa Y., Nakazawa M., Tamura C., Takahashi K., Minami M., Ikezawa Z., *J. Dermatol. Sci.*, **39**, 105–112 (2005).
- 18) Grabbe S., Steinert M., Mahnke K., Schwartz A., Luger T. A., Schwarz T., *J. Clin. Invest.*, **98**, 1158–1164 (1996).
- 19) Hirasawa N., Ohsawa Y., Katoh G., Shibata K., Ishihara K., Seyama T., Tamura S., Hong J., Ohuchi K., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **148**, 279–288 (2009).
- 20) Ghosh A. K., Hirasawa N., Ohtsu H., Watanabe T., Ohuchi K., *J. Exp. Med.*, **195**, 973–982 (2002).