

実験的皮膚炎における酵素組織化学的研究

— I. DNCB 皮膚炎における酵素活性の経時的変動について —

加 藤 友 衛*

(昭和48年3月2日受付)

要 旨

1. 1% DNCB アセトン溶液をモルモット項背部皮膚に塗布し, primary irritant dermatitis を作製し, 起炎後9日目までの呼吸・解糖系酵素の活性の経時的変動を組織化学的に追求した。
2. 病理組織学的には, 6時間目に表皮・真皮間に裂隙を認め, 1日目に表皮下水疱となり, 真皮浅層に白血球・リンパ球よりなる細胞浸潤を認めた。3日目以後では表皮下水疱はみられず, 4日目をピークとする表皮肥厚をみ, 7~9日ではほぼ起炎前と同様の所見となった。
3. 組織化学的には, 各酵素 (G 6 PDH, LDH, GDH, SDH, Cyt. O., NADH- および NADPH-diaphorase) とともに多少の時間的ずれはあるにしても, 起炎9時間目より活性の減弱を認め, 1日目に最低となり, 2日目より増強しはじめ, 3~6日目にピークに達し, 起炎前より増強した活性を示し, 6~9日目で起炎前と同等の活性に戻るといふ所見を得た。
4. また, Warburg 検圧計を用い, スライスレベルでの呼吸の経時的変動をみると, 酵素活性の消長とほぼ同様のパターンを得た。

Keywords: primary irritant dermatitis, DNCB 皮膚炎, 酵素活性

略語一覧: Cyt. O.: cytochrome oxidase DNCB: 2:4-dinitro-1-chlorobenzene
GDH: glutamate dehydrogenase G 6 PDH: glucose-6-phosphate
dehydrogenase HE: hematoxylin-eosin LDH: lactate dehydrogenase
NAD: nicotinamide adenine dinucleotide NADP: nicotinamide adenine
dinucleotide phosphate NBT: nitro-blue tetrazolium chloride
PID: primary irritant dermatitis PMS: phenazine methosulfate
SDH: succinate dehydrogenase

はじめに

炎症に関しては, 古来, 数多くの研究がなされてきているが, その背景にある病理的, 免疫生物学的, 生物化学的要素は多岐にわたっており, きわめて複雑である。言うまでもなく, 炎症はひとつの動的過程である。したがって, 静的なより多くの点をとらえ, これをつなぎ,

より動的な合理的な過程を表出する必要がある。

さて, 数多くの皮膚疾患のうち, その過半を占めるものは湿疹・皮膚炎をはじめとする炎症性皮膚疾患であり, これらのメカニズムに対するアプローチの一法として実験的皮膚炎が古くから用いられて来ている。皮膚炎作製の際の起炎物質として, DNCB はクロトン油などとならんで好んで用いられている。しかし, DNCB に

* 千葉大学医学部皮膚科

TOMOE KATOH: Enzyme histochemical studies on the experimental dermatitis. I. Histochemical studies on DNCB dermatitis of the guinea pig skin
Department of Dermatology, School of Medicine, Chiba University, Chiba.
Received for publication, March 6, 1973.

よる PID は文献的に散見される¹⁾²⁾が、酵素組織化学的検討に至ってはほとんどなされていない。

上述のごとく、炎症のメカニズムはきわめて複雑であるが、炎症を対象として実験を行なう際には、その全体像を動的にとらえることが困難である以上、炎症のどの面を指標にするかということが問題であり、また、炎症の history が必要となる。とくに、抗炎症剤の作用を検索するにはきちんとしたモデル炎症がなければならない。そこで著者は、DNGB 皮膚炎を作製し、その組織学的、酵素組織化学的変動を経時的に観察した。

対象とした酵素は、呼吸解糖系のうちから、hexose monophosphate shunt の入口にある G 6 PDH (EC 1.1.1.49)、また、Embden-Meyerhof pathway のうちから (LDH) (EC 1.1.1.27)、TCA cycle のうちから (SDH) (EC 1.3.99.1)、また、glutamate と α -ketoglutarate との間の (GDH) (EC 1.4.1.2)、さらに electron transport system のうちから (Cyt. O.) (EC 1.9.3.1)、加えて NADH-diaphorase (EC 1.6.99.3)、NADPH-diaphorase (EC 1.6.99.1) である。

実験材料および方法

1. 実験的皮膚炎の作製

PID の作製には、24 時間前に抜毛した体重 250~350 g のモルモット項背部の 3×4 cm の皮面に、約 0.2 ml の 1% DNGB アセトン溶液を塗布、余剰溶液はスポンジにて吸収した。以下、本文中の“DNGB 皮膚炎”は PID をさす。なお、それぞれにつき同一切片を 4 匹から作製した。

2. 実験方法

DNGB 溶液塗布後、6、9 時間目、1、2、3、4、5、6、7、および 9 日目に該部皮片を採取、直ちに冷アセトン・ドライアイスにより急速凍結し、cryostat (Lipshaw 製 Model 1600) を用い厚さ 10 μ の被検切片を作製した。

3. 染色方法

G 6 PDH は Barka-Anderson 法³⁾ (ただし glucose は 0.1 M とした)、LDH および GDH は Barka-Anderson 法³⁾、SDH は Nachlas, Walker et Seligman 法⁴⁾ に PMS を最終濃度で 2.5 mg% になるよう添加した⁵⁾。Cyt. O. は Burstone 法^{6)~8)} (基質は cytochrome C を最終濃度で 10 mg% となるよう添加、また coupler としては 1-hydroxy-2-naphthoic acid を用いた)、

NADH- および NADPH-diaphorase は Barka-Anderson 法³⁾によった。なお、それぞれにつき対照染色を行なった。

なお、試薬のうち主要なもののみを列挙すると、NAD、NADH、NADP、NADPH、G 6 P は Boehringer 社製、NBT は和光純薬製、p-aminodiphenylamine は小宗化学薬品製、PMS は Sigma 社製を使用した。

4. 生化学的検討

上述の炎症皮膚スライスを用い Warburg 検圧計 (萱垣製) により呼吸の変動を経時的に追求した。基質としてはコハク酸を使用し、Griesemer の系⁹⁾を用いた。

実験結果

1. 肉眼的所見

6~9 時間目では、ごくわずかの紅斑、1~2 日目は紅斑浮腫性の変化、3 日目は紅斑落屑性、4 日目に浸潤をふれ、5~6 日目に浸潤は著明となり、7~9 日目には軽度の紅斑のみとなった。

2. 病理組織学的所見

HE 染色、6 時間目に、一部に表皮・真皮間の裂隙をみる。1 日目、表皮下水疱をみ、真皮浅層に白血球・リンパ球よりなる細胞浸潤が著明。2 日目、表皮下水疱のほか、真皮浅層に白血球・リンパ球・組織球よりなる細胞浸潤。3 日目、表皮下水疱なく、軽度の過角化、表皮肥厚、spongiosis があり、また、真皮浅層の細胞浸潤はリンパ球と組織球。4 日目、表皮肥厚のほか、顆粒層の肥厚が著明。真皮浅層の浸潤細胞に好酸球が混在。5~6 日目の所見は 4 日目のそれに比し、組織球が増加。7~9 日目は表皮肥厚、真皮の細胞浸潤はそれぞれ軽度であった。

3. 酵素組織化学的所見

酵素活性の強弱の表現方法としては、一、土、十、廿、卅、卍を用い、それぞれ 4 検体の平均を表示した。

G 6 PDH: 起炎 6 時間目では脂腺腺部の活性がわずかに低下、9 時間目には活性の低下は全域にみられ、1 日目にはほとんど消失。2 日目は起炎前とほぼ同等の活性を示し、5~6 日目には起炎前より活性は増強し、7 日目以後は起炎前とほぼ同等の活性に戻った (表 1)。

LDH: 活性は 9 時間目から低下、1 日目の表皮ではほぼ消失、毛囊系にわずかにみとめられるのみ。2 日目は表皮にわずかの活性をみ、3 日目は表皮・毛囊とも中

表 1. DNCB 皮膚炎の G 6 PDH 活性

	正 常	6 時 間 目	9 時 間 目	1 日 目	2 日 目	3 日 目	4 日 目	5 日 目	6 日 目	7 日 目	9 日 目
有棘層上	+	+	-	-	+	+	+	++	++	+	+
有棘層下	+	+	±	-	+	+	+	++	++	+	+
基底層	+	+	±	±	+	+	+	++	++	+	+
外毛根鞘	+	+	±	±	+	+	+	++	++	+	+
内毛根鞘	+	+	±	±	+	+	+	++	++	+	+
毛乳頭	+	+	±	±	+	+	+	++	++	+	+
脂腺腺部	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

表 2. DNCB 皮膚炎の LDH 活性

	正 常	6 時 間 目	9 時 間 目	1 日 目	2 日 目	3 日 目	4 日 目	5 日 目	6 日 目	7 日 目	9 日 目
有棘層上	卅	卅	+	-	+	++	卅	卅	卅	卅	卅
有棘層下	卅	卅	+	-	+	++	卅	卅	卅	卅	卅
基底層	卅	卅	+	-	+	++	卅	卅	卅	卅	卅
外毛根鞘	卅	卅	+	++	++	++	卅	卅	卅	卅	卅
内毛根鞘	卅	卅	+	++	++	++	卅	卅	卅	卅	卅
毛乳頭	卅	卅	+	++	++	++	卅	卅	卅	卅	卅
脂腺腺部	卅	卅	+	++	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

表 3. DNCB 皮膚炎の GDH 活性

	正 常	6 時 間 目	9 時 間 目	1 日 目	2 日 目	3 日 目	4 日 目	5 日 目	6 日 目	7 日 目	9 日 目
有棘層上	+	+	±	-	±	+	+	+	+	+	+
有棘層下	+	+	±	-	±	+	+	+	+	+	+
基底層	+	+	±	±	±	+	+	+	+	+	+
外毛根鞘	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
内毛根鞘	+	+	+	±	-	+	+	+	+	+	+
毛乳頭	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+
脂腺腺部	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+

等度の活性。4日目以後は起炎前とほぼ同等の活性(表2)。

GDH: 9時間目に表皮の活性はきわめてわずか。1日目にほぼ消失, 毛乳頭・脂腺腺部にわずかに残存。2日目に表皮にわずかの活性をみる。3日目以後は起炎前とほぼ同等の活性(表3)。

SDH (図1~3): 6~9時間目の活性は全般に起炎前とほぼ同程度。1日目, 表皮に活性はほとんどなく, 毛嚢では真皮深層から浅層に近づくにしたがって活性減



図 1. 正常モルモットにおける SDH 活性: 有棘層に (+), 基底層, 内外毛根鞘に (++)、毛乳頭, 脂腺腺部に (+) の活性をみる。

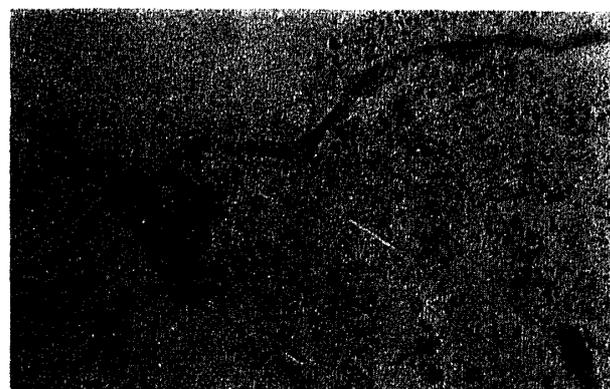


図 2. DNCB 皮膚炎における SDH 活性(1日目): 有棘層, 基底層 (-~±), 内外毛根鞘, 毛乳頭, 脂腺腺部に (++) の活性をみる。

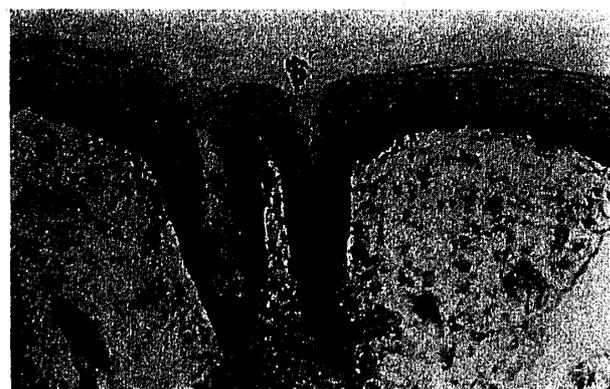


図 3. DNCB 皮膚炎における SDH 活性(4日目): 有棘層 (+~++)、基底層, 内外毛根鞘, 毛乳頭 (卅), 脂腺腺部 (++) の活性をみる。

弱。2日目, 表皮に弱い活性をみ, 3日目, 正常時とほぼ同程度の活性を示し, 基底層型のパターンが認められた。4~5日目には, 全般的に起炎前以上の活性を呈した。7~9日目には起炎前とほぼ同等の活性(表4)。

Cyt. O.: 6~9時間目には表皮・毛嚢系とも活性は

表 4. DNCB 皮膚炎の SDH 活性

	正 常	6 時 間 目	9 時 間 目	1 日 目	2 日 目	3 日 目	4 日 目	5 日 目	6 日 目	7 日 目	9 日 目
有棘層上	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
有棘層下	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
基底層	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+
外毛根鞘	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
内毛根鞘	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
毛乳頭	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
脂腺腺部	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表 5. DNCB 皮膚炎の Cyt. O. 活性

	正 常	6 時 間 目	9 時 間 目	1 日 目	2 日 目	3 日 目	4 日 目	5 日 目	6 日 目	7 日 目	9 日 目
有棘層上	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
有棘層下	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
基底層	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
外毛根鞘	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
内毛根鞘	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
毛乳頭	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
脂腺腺部	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表 6. DNCB 皮膚炎の NADH-diaphorase 活性

	正 常	6 時 間 目	9 時 間 目	1 日 目	2 日 目	3 日 目	4 日 目	5 日 目	6 日 目	7 日 目	9 日 目
有棘層上	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
有棘層下	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
基底層	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+
外毛根鞘	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
内毛根鞘	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
毛乳頭	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
脂腺腺部	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

変らず、1日目には表皮の活性は消失、毛嚢系にわずかにみられた。2~3日目に表皮の活性は回復しはじめ、4~5日目には起炎前より強い活性を示した。6日目以後は起炎前とほぼ同等の活性を示した(表5)。

NADH-diaphorase: 9時間目から脂腺腺部の活性が低下、1日目には表皮の活性はほとんど消失。2日目には起炎前とほぼ同等の活性を示し、3~6日目は起炎前より強い活性を示した。7日目以後は起炎前とほぼ同等の活性であった(表6)。

表 7. DNCB 皮膚炎の NADPH-diaphorase 活性

	正 常	6 時 間 目	9 時 間 目	1 日 目	2 日 目	3 日 目	4 日 目	5 日 目	6 日 目	7 日 目	9 日 目
有棘層上	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
有棘層下	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
基底層	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+
外毛根鞘	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
内毛根鞘	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
毛乳頭	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
脂腺腺部	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

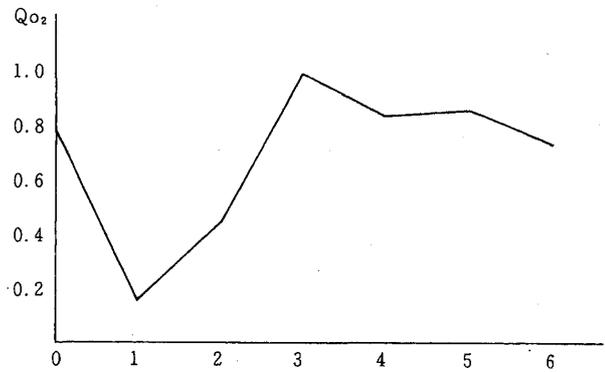


図 4. Warburg 検圧計による DNCB 皮膚炎の酸素消費量の経時変化 (横軸は起炎後の日数)

NADPH-diaphorase: 9時間目から表皮の活性が低下、1日目にはほぼ消失。毛嚢系の活性はほとんど不変。2日目は起炎前とほぼ同等の活性。3~6日目は表皮・毛嚢系とも起炎前より増強。7日目以後は起炎前とほぼ同等の活性であった(表7)。

4. 生化学的所見

スライスレベルでの呼吸の経時的変動は、起炎後まず低下し、1日目に最低となり、以後次第に上昇、3日目にピークを示し、6日目に起炎前の値に戻った(図4)。なお、それぞれ、3匹のモルモットから6検体を使用した平均値である。

考 察

PID を起こしうる DNCB の最低濃度は、アセトン溶液で 0.12%¹⁰⁾~0.1% 以上¹¹⁾ともいわれているが、Nilzén¹²⁾は 1% DNCB アセトン溶液で 100% の、0.2% アセトン溶液で 20% のモルモットに PID をみている。実際には、2~5% の olive oil¹³⁾、1% アセトン溶液²⁾が

用いられている。著者は、50, 30, 10, 5 および 1% アセトン溶液で予備実験を行なったが、5% 以上ではいずれも壊死性炎を呈し酵素活性はまったく消失、生化学的、組織化学的検索の材料としては不適當であった。

HE 染色による経時的变化について Hunziker²⁾ は、14 および 24 時間目に表皮下水疱、真皮の白血球およびリンパ球よりなる細胞浸潤を認めているが、観察は 24 時間で終わっている。Jadassohn ら¹³⁾ は 6 時間目に表皮下水疱を認めている。

Hall ら¹¹⁾ は、10, 5, 1 および 0.1% アセトン溶液をモルモットに塗布、LDH および SDH 活性は 10% 以下の濃度では 12 時間では不変としている。これに対して、著者の実験では、9 時間目には減少しているものが多く (GDH, G 6 PDH, LDH, NADPH-diaphorase), 1 日目に活性はいずれも最低となり、表皮ではほとんど消失している。しかし、毛嚢系ではある程度活性が残っているものが多く (G 6 PDH はほぼ消失, NADH- および NADPH-diaphorase では不変), 脂腺腺部ではほぼ不変のものもあった (SDH, GDH および NADPH-diaphorase)。2~3 日目には、各酵素の活性に多少のずれはあるにしても回復・増強し、4~5 日目にピークに達し起炎前のそれを越える活性を示し、以後漸減し正常範囲に戻るといふ所見を得た。これは Warburg 検圧計による呼吸の変動ともわずかのずれはあるにしても、ほぼ一致した経過を示した。

皮膚においても、他臓器と同様に TCA cycle⁹⁾, Warburg-Dickens pathway¹⁴⁾, Embden-Meyerhof-Parnas pathway¹⁵⁾, 電子伝達系¹⁶⁾ の存在はすでに確認されており、炎症時には高エネルギーを要し、代謝が亢進すると考えられ、そのひとつとして、組織の解糖・呼吸の促進がいわれている。著者の実験では、起炎後、酵素活性が一度減弱してから再び増強するという 2 相性を示し、単に代謝が亢進するだけではないことを示した。これは細胞の可溶性蛋白分画に属する酵素 (G 6 PDH および LDH) においても、ミトコンドリア内の酵素群 (GDH, SDH, Cyt. O., NADH- および NADPH-diaphorase) においても同様の消長が認められるが、その変動において上記二群の酵素間になんらかの異同を認めることは本実験からは困難である。施行した個々の酵素活性の変動については、時間的に多少のずれは認められたが、特別な意義づけを行なうことは現段階では危険であろう。いずれにしても、各酵素ともその消長においてほぼ一致したパターンを認め得た。

稿を終るにあたり、ご指導、ご校閲を賜った竹

内勝名誉教授、岡本昭二教授に心からの謝意を表するとともに、ご協力いただいた田辺義次講師に感謝します。

本論文の要旨は第 10 回日本組織細胞化学会総会にて報告した。

本論文は審査学位論文である。

SUMMARY

Enzyme histochemical studies were performed on the primary irritant dermatitis of guinea pig inflamed with 1% DNCB in acetone, using techniques for the demonstration of G 6 PDH, LDH, SDH, GDH, cytochrome oxidase and NADH- and NADPH-diaphorase activity. The first histological response to DNCB was the formation of a slight lacuna between the epidermis and the dermis at 6 hours, followed by the subepidermal bullae and prominent cell infiltration composed of leucocytes and lymphocytes at 24 hours. Beyond 3 days subepidermal bullae were not present. Marked acanthosis peaked at 4 days. At 7 and 9 days the epidermis and the dermis looked normal. In the various course of the time, although each activity of enzyme showed some time lag, essentially similar patterns of enzyme activity could be demonstrated. They began to reduce at 9 hours and showed the lowest level at 24 hours. Then, at 2 days activities of enzymes began to enhance and peaked at 3 to 6 days. At 6 to 9 days the intensity of reaction looked normal. With Warburg's manometer, respiration of the skin slices revealed the similar changes corresponding to the activities of enzymes.

文 献

- 1) Fisher, J. P. and Cooke, R. A.: Experimental toxic and allergic contact dermatitis, *J. Allergy*, 29, 411-428, 1958.
- 2) Hunziker, N.: Experimental studies on guinea pig's eczema—Their significance in human eczema, 7-13, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1969.

- 3) Barka, T. and Anderson, P. J.: Histochemistry, theory, practice, and bibliography, 312-318, Hoeber Medical Division, Harper and Row, Pub. Inc. New York, Evanston, and London, 1963.
 - 4) Nachlas, M. M., Tsou, K. C., de Souza, E., Chang, C. S. and Seligman, A. M.: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole, *J. Histochem. Cytochem.*, 5, 420-436, 1957.
 - 5) 小川和朗: 酵素組織化学, 武内忠男, 清水信夫, 小川和朗編集, 朝倉書店, 東京, 1967, pp. 100-102.
 - 6) Burstone, M. S.: New histochemical techniques for the demonstration of tissue oxidase (cytochrome oxidase), *J. Histochem. Cytochem.*, 7, 112-122, 1959.
 - 7) Burstone, M. S.: Histochemical demonstration of cytochrome oxidase with new amine reagents, *J. Histochem. Cytochem.*, 8, 63-70, 1960.
 - 8) Burstone, M. S.: Modification of histochemical techniques for the demonstration of cytochrome oxidase, *J. Histochem. Cytochem.*, 9, 59-65, 1961.
 - 9) Griesemer, R. D. and Gould, E.: A method for the study of the intermediary carbohydrate metabolism of epidermis, I. Oxidation of acids of the citric acid cycle, *J. Invest. Derm.*, 22, 299-315, 1954.
 - 10) 渡辺 進: DNCB 皮膚結合物による海狸感作実験, *皮紀要*, 62, 81-95, 1967.
 - 11) Hall, J. H., Smith, J. G. and Burnett, S. C.: The lysosome in contact dermatitis; A histochemical study, *J. Invest. Derm.*, 49, 590-594, 1967.
 - 12) Nilzén, A.: Some aspects of epidermal testing of guinea-pigs sensitized and not sensitized to 2, 4-dinitrochlorobenzene, *Acta Derm-Venerol.*, 32-Supp., 29, 231-239, 1952.
 - 13) Jadassohn, W., Bujard, E. and Brun, R.: The experimental eczema of the guinea-pig nipple, *J. Invest. Derm.*, 24, 247-253, 1955.
 - 14) Freinkel, R. K.: Metabolism of glucose-C-14 by human skin in vitro, *J. Invest. Derm.*, 34, 37-42, 1960.
 - 15) Bernstein, I. A. and Sweet, D.: Glycolytic activity in extracts of young rat skin, *Arch. Biochem. Biophys.*, 80, 35-45, 1959.
 - 16) Griesemer, R. D. and Gould, E.: A method for the study of the intermediary carbohydrate metabolism of epidermis, II. Assay for succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase, *J. Invest. Derm.*, 25, 383-389, 1955.
-