

## 実験的皮膚炎における酵素組織化学的研究

### — II. 外用コルチコステロイドの酵素活性におよぼす影響 —

加藤 友 衛\*

(昭和48年10月20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作製した primary irritant dermatitis を用い、呼吸・解糖系酵素 (G6PDH, LDH, SDH, GDH, MDH, cytochrome oxidase, NADH- および NADPH-diaphorase) の活性に対する外用コルチコステロイドの影響を酵素組織化学的に追求した。

2. DNCB 皮膚炎において、その経過中、酵素活性が最低となる24時間目では、DNCB 塗布後ただちにステロイド軟膏を外用した群の G6PDH, LDH, SDH, MDH, NADH- および NADPH-diaphorase 活性の低下は、ステロイド非塗布群に比しわずかであった。

3. また、Warburg 検圧計を用いた、スライスレベルでの呼吸に対するステロイドの影響も酵素活性に対する影響と同様であった。

4. ステロイドは、酵素活性に対し、正常化の方向へ作用している。

**Keywords:** DNCB 皮膚炎, 外用コルチコステロイド, 抗炎症作用, 酵素活性, 呼吸・解糖系酵素

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

#### はじめに

皮膚科領域におけるコルチコステロイドの外用は、1952年 Sulzberger ら<sup>1)</sup>の compound F の使用に始まったが、外用療法は全身投与のさいにみられる種々の好ましからざる副作用を招かないことから、以来、halo-steroid を主体とする数多くの合成コルチコステロイド剤が開発され、現在では皮膚疾患治療において画期的な

成果を挙げ得るようになった。

外用療法においては、コルチコステロイドの種々の薬理作用のうち、もっぱら、抗炎症作用が期待されるわけであるが、この抗炎症作用の機序については未だ解明されておらず、不明の点が多い。これは、ステロイドの抗炎症作用の機序検索に種々の困難な問題をかかえていることにもよるが、そのひとつとして、systemic activity と local activity に明らかな相異が認められることが

\* 千葉大学医学部皮膚科学教室

Tomoe KatoH: Enzyme Histochemical Studies on the Experimental Dermatitis. II. The Effect of Topically Applied Corticosteroid on the Enzyme Activities.

Department of Dermatology, School of Medicine, Chiba University, Chiba.

Received for publication, October 20, 1973.

挙げられる。たとえば, progesterone や corticosterone などの  $11\beta$ -,  $17\alpha$ -,  $21$ -hydroxy group をもたないステロイド (systemic には抗炎症作用はない) も局所的には抗炎症作用が認められている<sup>2)</sup>。この local anti-inflammatory activity は皮膚科学的見地から, まさに重要な問題であると言えよう。

さて, コルチコステロイドの抗炎症作用のひとつとして, エネルギー生成系に対する作用があげられている。著者は, 実験的皮膚炎, すなわち, DNCB による primary irritant dermatitis を用い, 外用コルチコステロイドの皮膚炎における酵素活性におよぼす影響について酵素組織化学的に検討した。以下, “DNCB 皮膚炎” は primary irritant dermatitis の意味で用いた。

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 G6PDH (EC 1.1.1.49), Embden-Meyerhof pathway のうちから LDH (1.1.1.27), TCA cycle のうちから SDH (EC 1.3.99.1), MDH (EC 1.1.1.37), また, glutamate と  $\alpha$ -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

primary irritant dermatitis 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  $3 \times 4$  cm の皮面に, 約 0.2 ml の 1% DNCB アセトン溶液を塗布, 余剰溶液はスポンジにて吸収した。

#### 2. 実験方法

DNCB 塗布後 24 時間目, DNCB 塗布後直ちにステロイド軟膏外用し 24 時間目に採取した切片および対照 (正常) の 3 群とし, 各群とも 4 検体ずつモルモットを使用した。各群より採取した皮片は直ちに冷アセトン・ドライアイスにより急速凍結し, cryostat (Lipshaw 製 Model 1600) を用い厚さ  $10 \mu$  の被検切片を作製した。なお, ステロイド軟膏としては 0.025% fluocinolone acetonide (基剤は親水軟膏) を使用した。

#### 3. 染色方法

第 I 報<sup>3)</sup>と同様, G6PDH は Barka-Anderson 法 (ただし glucose は 0.1 M とした), LDH, GDH および MDH は Barka-Anderson 法, SDH は Nachlas, Walker et Seligman 法に PMS を最終濃度で 2.5mg% になるよう添加した。Cyt. O. は Burstone 法 (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, G6P は Boeringer 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

DNCB 塗布後, 直ちにステロイド軟膏を塗布し 24 時間経過せる群, 同時間経過せるステロイド軟膏を塗布し

表 1. DNCB 皮膚炎における外用ステロイドの酵素活性に対する影響

		有 棘 層 上	有 棘 層 下	基 底 層	外 毛 根 鞘	内 毛 根 鞘	毛 乳 頭	脂 腺 部
G6PDH	①	+	+	+	++	++	++	++
	②	+	±	±	±	±	±	±
	③	-	-	-	-	-	-	+
LDH	①	++	++	++	++	++	++	++
	②	+	+	+	+	+	+	++
	③	-	-	-	++	++	++	++
GDH	①	+	+	+	+	+	++	+
	②	±	±	±	±	±	±	±
	③	±	±	±	+	+	+	+
SDH	①	+	+	++	++	+	+	+
	②	+	+	+	+	+	+	+
	③	-	-	-	++	++	++	++
MDH	①	++	++	++	++	++	++	++
	②	++	++	++	++	++	+	++
	③	+	+	+	+	+	+	++
Cyt. O.	①	+	+	+	++	++	++	±
	②	-	-	-	±	±	±	++
	③	-	-	-	+	+	+	++
NADH diaph.	①	++	++	++	++	++	++	±
	②	++	++	++	++	++	+	±
	③	-	-	+	++	++	+	±
NADPH diaph.	①	++	++	++	++	++	++	±
	②	++	++	++	+	++	+	±
	③	-	-	±	++	++	++	±

①: 対照 (正常), ②: DNCB 皮膚炎にステロイド外用, ③: DNCB 皮膚炎

ない DNCB 皮膚炎群と比較した。採取切片を Warburg 検圧計(萱垣製)により呼吸の変動を検討した。第 I 報<sup>3)</sup>と同様に、基質としてはコハク酸を使用し、Griesemer の系を用いた。ステロイド軟膏としては、0.025% fluocinolone acetonide cream を使用した。

実験結果

1. 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、卅、卍、卍を用い、それぞれ4検体の平均を表示した(表1)。

G 6 PDH: 表皮および毛嚢系においては、起炎後 24 時間目の DNCB 皮膚炎群の酵素活性は消失しているのに対し、DNCB 塗布後ステロイド軟膏を外用した群では、わずかながら酵素活性が認められた。脂腺腺部では、ステロイド塗布群の活性は対照とほぼ同等であった。

LDH: 表皮では、DNCB 皮膚炎群の酵素活性が消失していたのに対し、ステロイド塗布群では対照に近い

活性を示した。

GDH: 表皮では、ステロイド塗布群は DNCB 皮膚炎群と同等の活性を示した。毛嚢系では、DNCB 皮膚炎群は対照とほぼ同等の活性を示したのに対し、ステロイド塗布群は、わずかながら活性の減弱がみられた。

SDH: 表皮では、DNCB 皮膚炎群においては、酵素活性は消失していたが、ステロイド塗布群では対照とほぼ同等の活性を示した。

MDH: 表皮・毛嚢系で、DNCB 皮膚炎群の酵素活性は減弱、ステロイド塗布群では対照とほぼ同等の活性を示した。

Cyt. O.: 表皮では、ステロイド塗布の影響はみとめられなかったが、毛嚢系では、DNCB 皮膚炎群の酵素活性は低下し、ステロイド塗布群の活性はさらに低下していた。

NADH-diaphorase: 表皮では、DNCB 皮膚炎群の活性は減弱、ステロイド塗布群では、対照とほぼ同様の活性であった。毛嚢系では、三群間に差は認められなかった(図1, 2)。

NADPH-diaphorase: 毛嚢系では、三群間に差はみとめられなかったが、表皮では、DNCB 皮膚炎群の活性がほぼ消失したのに対し、ステロイド塗布群では、対照とほぼ同様の活性を保った。

小括: 酵素組織化学的検索において、ステロイド塗布

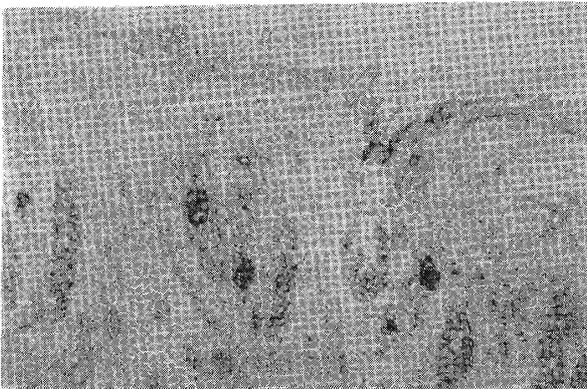
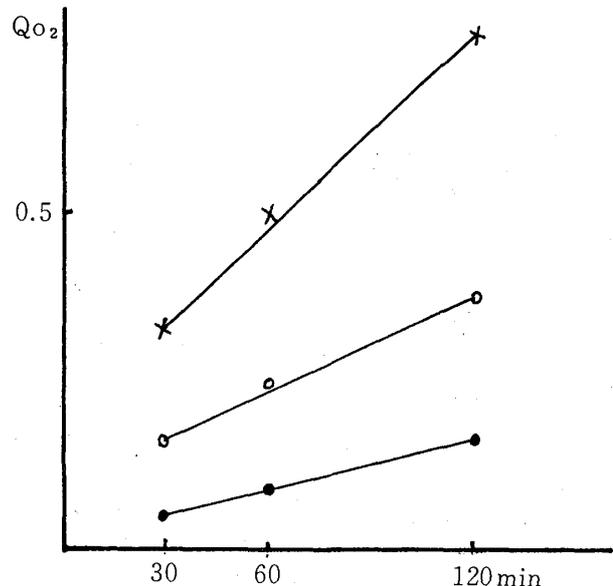


図 1. DNCB 皮膚炎における NADH-diaphorase 活性(24時間目): 有棘層(一), 基底層(+), 内外毛根鞘(卍), 脂腺腺部(卍)の活性をみる。



図 2. 図 1 にステロイド軟膏外用したもの: 表皮, 内外毛根鞘とも(卍), 脂腺腺部(卍)の活性をみる。図 1 に比し表皮の活性低下はみられない。



X—X : Normal  
o—o : DNCB + Steroid(topical)  
●—● : DNCB

図 3. ステロイドの呼吸に対する影響(スライスレベル)

群の G6PDH, LDH, SDH, MDH, NADH-diaphorase および NADPH-diaphorase 活性は, ステロイド非塗布群 (DNCB 皮膚炎群) に比し, その低下は著しくなかった。GDH および Cyt. O. 活性については, ステロイドによる影響はほとんど認められなかった。

## 2. 生化学的所見

スライスレベルでの呼吸に対するステロイドの影響は, 図3に示したごとく, 24時間後では, DNCB 皮膚炎群においては対照に比して著明に呼吸の低下をみるが, ステロイド塗布群では, 呼吸の低下は著明ではなく, より正常に近い値を示した。

## 考 察

コルチコステロイドの抗炎症作用機序には不明の点が多いが, systemic anti-inflammatory activity と local anti-inflammatory activity に差のあることはすでに報告されており, したがって, 抗炎症作用の検索には, 両者を分けて行なうべきである。

さて, この局所抗炎症作用機序については, たとえば, McKenzie ら<sup>4),5)</sup>による血管収縮作用, Berliner ら<sup>6),7)</sup>の線維芽細胞抑制, Fry ら<sup>8)</sup>による表皮の mitotic activity の抑制, Weismann<sup>9)</sup>によるライソゾーム膜の安定化などさまざまな方法により, 臨床的マクロレベル, 細胞レベル, 生化学的レベルなどでの検索が数多く報告されているが, in vivo と in vitro では差があり, また, 異なったレベルでの検索を同一に論ずることは危険である。ここでは, 核酸合成の促進<sup>10),11)</sup>などに関する文献はさておき, 呼吸解糖系に関する報告について若干の考察を試みると, Whitehouse<sup>12)</sup>は, 非ステロイド系抗炎症剤, たとえば, サリチル酸, アセトフェノン, フルフェナミン酸, フェニールブタゾン, インドメサシン, アミノピリン, クロロキンなどは, いずれも uncoupler として抗炎症作用を発揮するが, ステロイドはこれらとは異なり, uncoupling 方式ではないとしている。すなわち, uncoupler としてではなく, NADH 酸化抑制や ATPase 活性促進によるエネルギー産生抑制がステロイドの作用であろうと述べている。これをやや近い意味で, Yielding ら<sup>13)</sup>は, NADH-脱水素酵素に対するアロステリックな阻害による抑制を報告している。いずれにしても, ATP 産生の効率が良い TCA サイクルや電子伝達系に対してステロイドが抑制的に作用していることは抗炎症効果を考えるにあたりきわめて意義深いことである。ついで, これらとは別の立場, すなわち, 細胞内可溶性蛋白分画に存在する解糖系に対する報告も散見で

き, Glenn ら<sup>2)</sup>は granuloma pouch assay を用い解糖系の抑制, Overell ら<sup>14)</sup>はマウス耳皮膚を用いて糖利用の抑制があると述べている。また, 田辺<sup>15)</sup>は, 皮膚スライスレベルでの嫌気性解糖および糖利用に対し抑制的に働いたと報告している。

一方, 組織化学的方法により, GDH, MDH, LDH に対するグルココルチコイドの抑制を Hashimoto ら<sup>16)</sup>は報告している。すなわち, 切片をステロイド溶液にあらかじめ浸漬してから染色したもの, あるいはステロイドの前注射, ステロイドクリームを塗布した皮膚で, 乾癬皮膚, 正常皮膚ともに抑制がみられたとしている。

組織化学的検索は, いわば, slice level での実験に似ており, homogenate level あるいは subcellular level よりは一段と tissue level に近いものである。著者は, 臨床的応用に最も近い型で, すなわち, ステロイド軟膏塗布により実験的皮膚炎に対する影響を検討した結果, 正常時より酵素活性の増強している光線皮膚炎においては, 施行した個々の酵素については問題はあるにしても, multienzyme system としての呼吸解糖系に対してステロイドが抑制的に作用することはすでに報告した<sup>17)</sup>。一方, DNCB 皮膚炎においては, ステロイド塗布群では非塗布群より酵素活性が強く, より正常時の活性に近かった。これは, Warburg 検圧計によるスライスレベルでの呼吸についても同様の所見が得られているが, ステロイドが, 炎症による組織の反応をより低くおさえ, 合目的に働いているものと解される。これを光線皮膚炎のさいの結果と比較検討するに, ステロイドの酵素活性に対する作用は, primary action ではなく, secondary action であり, 酵素活性に対し, 正常化の方向へ作用しているものと考えられる。

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9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

The effects of topically applied corticosteroid on the enzyme activities of the primary irritant dermatitis of guinea pig inflamed with 1% DNCB in acetone were studied using histochem-

ical techniques for the demonstration of G6PDH, LDH, SDH, MDH, GDH, cytochrome oxidase and NADH- and NADPH-diaphorase activity. A 0.025% fluocinolone acetonide cream was massaged into the lesions immediately after application of the DNCB. As for the activities of G6PDH, LDH, SDH, MDH, NADH- and NADPH-diaphorase, biopsy specimens taken after 24 hours showed a slight degree of reduction. On the other hand, biopsy specimens taken from the DNCB dermatitis at 24 hours showed a great deal of reduction of enzyme activities. With Warburg's manometer, respiration of the skin slices revealed the similar response corresponding to the activities of enzymes. This may supplement the mechanism of local anti-inflammatory activities of corticosteroid.

#### 文 献

- 1) Sulzberger, M. B. and Witten, V. H.: The effect of topically applied compound F in selected dermatoses, *J. Invest. Derm.*, 19, 101-102, 1952.
- 2) Glenn, E. M., Miller, W. I. and Schlagel, C. A.: Metabolic effects of adrenocortical steroids in vivo and in vitro: Relationship to anti-inflammatory effects., *Recent Prog. in Horm. Res.*, 19, 107-199, 1963.
- 3) 加藤友衛: 実験的皮膚炎における酵素組織化学的研究—1. DNCB 皮膚炎における酵素活性の経時的変動について, *千葉医学会誌*, 49, 253-258, 1973.
- 4) McKenzie, A. W. and Stoughton, R. B.: Method for comparing percutaneous absorption of steroids., *Arch. Derm.*, 86, 608-610, 1962.
- 5) McKenzie, A. W.: Percutaneous absorption of steroids., *Arch. Derm.* 86, 611-614, 1962.
- 6) Berliner, D. L. and Ruhmann, A. G.: Influence of steroids on fibroblast. I. An in vitro fibroblast assay for corticosteroids., *J. Invest. Derm.*, 49, 117-122, 1967.
- 7) Ruhmann, A. G. and Berliner, D. L.: Influence of steroids on fibroblast. II. The fibroblast as an assay system for topical anti-inflammatory potency of corticosteroids., *J. Invest. Derm.*, 49, 123-130, 1967.
- 8) Fry, L. and McMinn, R. M. H.: The action of chemotherapeutic agents on psoriatic epidermis., *Brit. J. Derm.*, 80, 373-383, 1968.
- 9) Weissmann, G. and Thomas, L.: The effects of corticosteroids upon connective tissue and lysosomes., *Recent Prog. in Horm. Res.*, 10, 215-245, 1964.
- 10) Greengard, O., Weber, G. and Singhal, R. L.: Glycogen deposition in the liver induced by cortisone: Dependence on enzyme synthesis., *Science*, 141, 160-161, 1963.
- 11) Weber, G. and Singhal, R. L.: Early increase in glyconeogenic enzymes induced by triamcinolone or diabetes., *Federation Proc.*, 23, 356, 1964.
- 12) Whitehouse, M. W.: Properties of anti-inflammatory drugs., *Progress in Drug Res.*, 8, 323-429, 1965.
- 13) Yielding, K. L. and Tomkins, G. M.: Studies on the interaction of steroid hormones with glutamic dehydrogenase., *Recent Prog. in Horm. Res.*, 18, 467-489, 1962.
- 14) Overell, B. G., Condon, S. E. and Petrow, V.: The effect of hormones and their analogues upon the uptake of glucose by mouse skin in vitro., *J. Pharm. Pharmacol.*, 12, 150-153, 1959.
- 15) 田辺義次: 皮膚 G-6-P 代謝酵素群に対する in vitro でのコルチコステロイド作用, *日皮会誌*, 78, 338-346, 1968.
- 16) Hashimoto, K., Tye, M. J. and Lever, W. F.: Inhibition of the activities of glutamic, malic and lactic dehydrogenases by glucocorticoids in normal and psoriatic epidermis., *J. Invest. Derm.*, 42, 61-66, 1964.
- 17) Takenouchi, K., Aso, K., Tanabe, Y. and Katoh, T.: On the effects of topically applied corticosteroid. —Histochemical Investigation (1)., *Proc. Jap. Histochem. Ass. The seventh and eighth annual general meeting*, pp. 77-78, The Japanese Histochemical Association, 1967.