

# 実験的スギ花粉感作犬に対する 経皮曝露試験 -経表皮水分蒸散量(TEWL)の測定

○荒井延明      安田隼也      百田 豊  
安田英巳      原 康      多川政弘

スペクトラム ラボ ジャパン 株式会社

日本獣医生命科学大学 獣医学部獣医保健看護臨床部門

安田獣医科医院

日本獣医生命科学大学獣医学部獣医外科学教室

ありがとうございます。

## 背景と目的

- スギ花粉症の克服のために、皮下投与型より患者の負担が少なく、高い安全性と有効性が期待できる舌下ペプチド免疫療法の確立が望まれている。
- スギ花粉単独に感作されたイヌの自然発生例は極めて稀であり、実験系として、ビーグル犬を用いた単独感作モデルを作成する必要があった。
- ペプチド免疫療法による効果発現機序の解明に備える過程として、犬の経皮感作モデルを作成し、皮内反応よりも自然に近い経皮曝露での皮疹部の客観的評価を行うことを目的とした。

人のスギ花粉症の克服のために、皮下投与型より患者の負担が少なく、高い安全性と有効性が期待できる舌下免疫療法の実験系が確立されています。

スギ花粉単独に感作されたイヌの自然発生例は極めて稀であり、実験系として、ビーグル犬を用いた単独感作モデルを作成する必要があります。

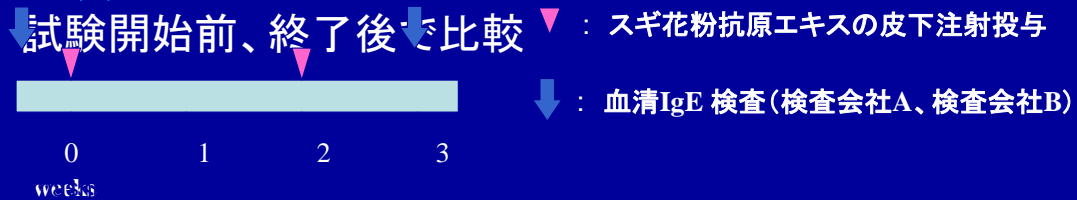
スギ花粉ペプチド投与の免疫療法による効果発現メカニズムの解明に備える過程として、犬の経皮感作モデルを作成し、皮内反応よりも自然に近い経皮曝露での皮疹部の客観的評価を行うことを目的としました。

## 材料と方法: スギ花粉単独感作実験犬

- 供試犬: 健常ビーグル犬3頭(避妊雌1頭、去勢雄2頭)  
2歳8ヵ月~3歳4ヵ月
- 標準化ニホンスギ抗原(CAPg) 0.1ml  
(200JAU/mlアジュバント含まず)  
過去の報告\*に従い、2週間おきに2回 皮下注射
- スギ花粉抗原特異的血清IgE値を測定

会社A: Spectrum Lab、Arizona,U.S.A. 酵素免疫アッセイ法

会社B: 動物アレルギー検査株式会社 蛍光免疫アッセイ法



本研究では、日本獣医生命科学大学で飼育されている健常ビーグル犬3頭(避妊雌1頭、去勢雄2頭)を用いました。年齢は2歳8ヵ月から3歳4ヵ月でした。

全ての実験は、本学に設置された動物実験委員会により規定された日本獣医生命科学大学動物実験規程に従って行われました。

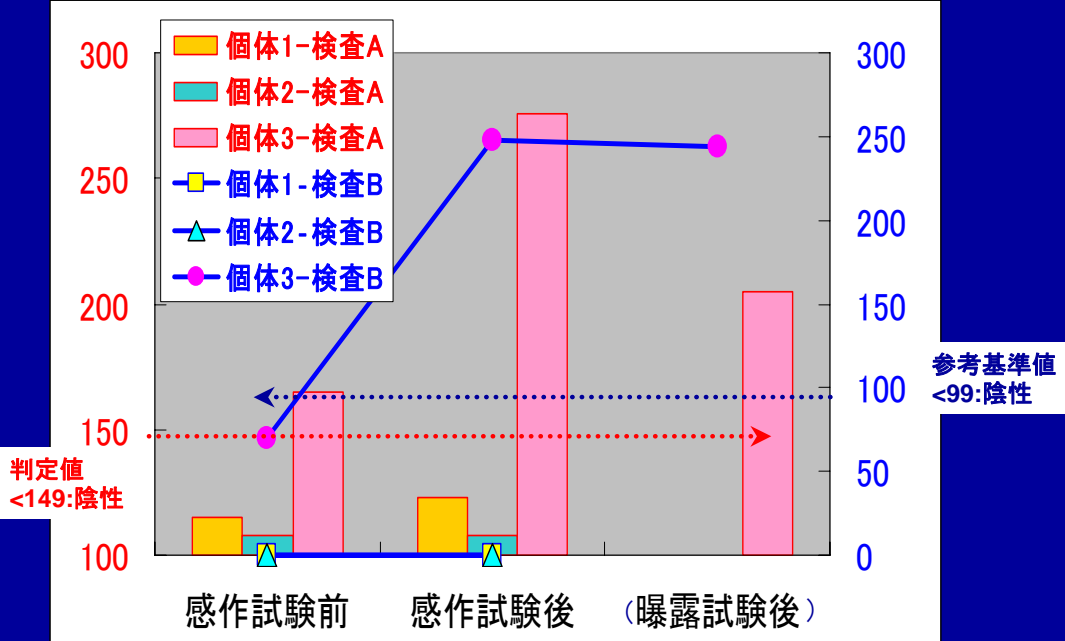
スギ花粉単独感作実験犬の作成のために過去の報告に従い、標準化ニホンスギ抗原0.1mlを2週間おきに2回、皮下注射することで実験的にスギ花粉への感作を試みました。

感作成立の有無を確認するため、スギ花粉抗原特異的血清IgE値の測定を会社A、会社Bの2社に依頼し試験開始前、終了後で比較しました。

# 感作試験前後の 血中IgE濃度の変化

IgE値(%)  
検査会社A

IgE値(ng/ml)  
検査会社B



グラフに感作試験前後の検査A,B社における血中IgE濃度の変化を示します。  
赤文字・棒グラフがA社、青文字・プロット-線グラフがB社の結果です。  
3頭のビーグル犬のうち、個体3だけがスギ花粉の経皮感作試験後に  
2社ともに高い血中IgE濃度を示しました。  
この結果から個体3をスギ花粉単独感作モデル犬として、  
曝露部位のTEWLを測定評価することとしました。

個体3については曝露試験後もIgE濃度を測定しましたが  
2社ともに高い値が維持されていました。

## 対象と方法

- 実験的にスギ花粉への感作が成立した  
ビーグル犬1頭(個体No.3)  
非感作ビーグル犬2頭(個体No.1,2) に対して  
スギ花粉エキス(「トリイ」2000JAU/ml)の  
10倍生理食塩水希釈液塗布による経皮抗原曝露  
試験を1週間に3回実施した。(対照:生理食塩水)
- 被毛の処理にはバリカンを使用し、角質層を除去  
するためにテープストリップを20回連続で行った\*。



実験的にスギ花粉への感作が成立したビーグル犬1頭および  
非感作ビーグル犬2頭を用い、スギ花粉エキスの  
10倍生理食塩水・希釈液を塗布することによる経皮抗原曝露試験を  
1週間に3回実施しました。

同様にコントロール部位には生理食塩水を塗布しました。  
塗布部位は左右背側上部としました。

被毛の処理には0.3mmのバリカンを使用し、  
角質層を除去するため、過去の報告に従って  
テープストリップを20回連続で行いました。

Shimada, K. et al.: Increased transepidermal water loss and decreased  
ceramide content in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic  
dermatitis. *Vet. Dermatol.*, **20**, 541-546, 2009.

## TEWLの測定

- 測定環境: 気温 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $56 \pm 4\%$
- 供試犬の体側胸部
- TEWLの測定は各箇所を5回測定
  - 各曝露後の皮膚症状を観察し、ポータブル水分蒸散計(VapoMeter®)を使用し、曝露部位のTEWLを各部位5回ずつ計測した。
- 計測値は平均値  $\pm$  標準偏差にて算出し、一元配置分散分析(ANOVA)およびTukey-Kramer 法による多重解析を行った。
- 有意水準5%をもって、有意差ありと判定した。

TEWL測定は、測定環境を気温 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $56 \pm 4\%$ に調整し、測定開始30分以上前から供試犬を環境に馴化させてから実施しました。

各曝露後の皮膚症状を観察し、ポータブル水分蒸散計を使用し、曝露部位のTEWLを各部位5回ずつ計測しました。

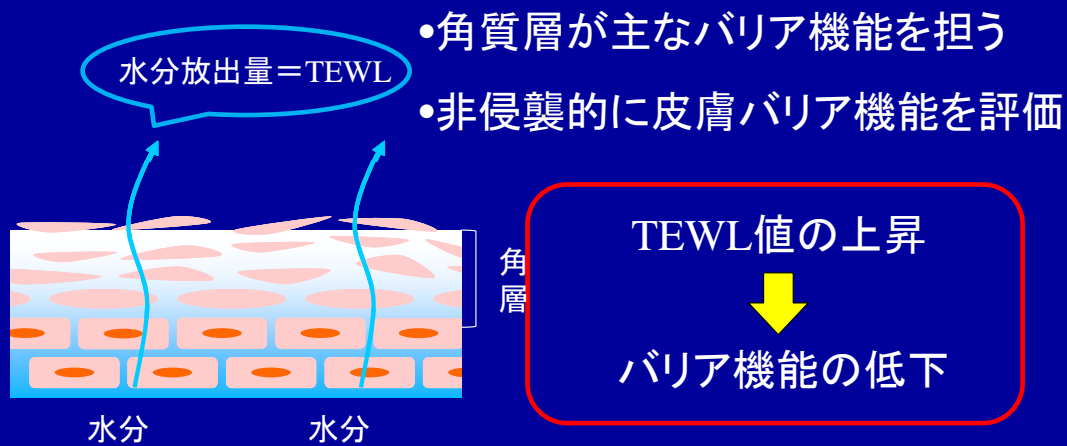
計測値は平均値  $\pm$  標準偏差にて算出し、一元配置分散分析および、チューキー・クラマー法による多重解析を行いました。

結果は、有意水準5%をもって、有意差ありと判定しました。

## 経表皮水分蒸散量とは

(t ransepidermal water loss : TEWL)

皮膚の単位面積、単位時間あたりに表皮を通過して蒸散する水分量の割合(単位:  $\text{g}/\text{m}^2 \cdot \text{hr}$ )



ここで、経表皮水分蒸散量: TEWLについて説明します。

哺乳類の皮膚は、環境中の微生物やアレルゲン等の体内への侵入を防ぐとともに、生体内部からの水分の蒸散をコントロールしています。

一般的にこの働きは皮膚バリア機能と呼ばれ、

特に表皮最外層に位置する角質層が重要な役割を担っていると考えられています。

ヒトでバリア機能を評価する方法として広く使われている

非侵襲的な方法がTEWL測定です。

TEWLとは皮膚の単位面積、単位時間あたりに表皮を通過して蒸散する水分量の割合のことで、正常であれば一定量が常に蒸散しています。

TEWLの値が上昇するということは、

角質層に何らかの損傷や異常があり、バリア機能が低下していることを示唆します。

# ポータブル水分蒸散計



- ヒトや動物の実験モデルで実績のある水分蒸散計
- VapoMeter  
( Delfin Technologies Ltd製)
- 閉鎖式タイプ
- 気流や動きの影響を受けにくい
- 測定時間が短い(10秒)

動物のTEWL測定に有用

今回TEWL測定に使用した測定器具について説明します。

TEWL測定機器には気流や動物の動きに影響を受けづらい閉鎖式タイプのVapoMeterを使用しました。

人では通常開放式タイプの物が使用されていますが、測定対象の拘束時間が長く、動物の動きや気流の影響を受けやすいため、開放式タイプは動物のTEWL測定にはあまり適していません。

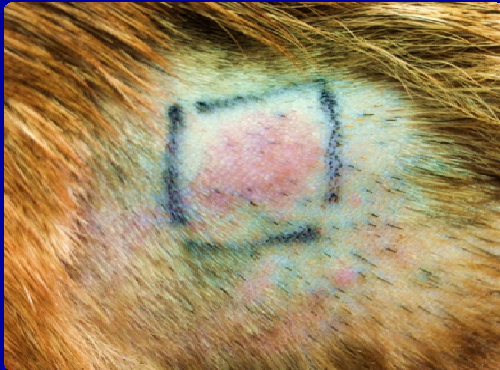
しかし、このVapoMeterはポータブル機器で、測定時間が**10秒と短い**ので、非常に簡便にTEWL測定を行うことができます。



## 結果：皮膚症状

- 感作犬のテープストリップを実施した抗原曝露部位に皮膚炎の症状を呈し、非感作犬は無症状であった。

感作犬(No.3)曝露部位



非感作犬(No.1)曝露部位



結果です。スライドに皮膚の症状を示します。

スギ花粉感作犬・個体No3は試験開始30分後には

テープストリップを実施した抗原曝露部位に

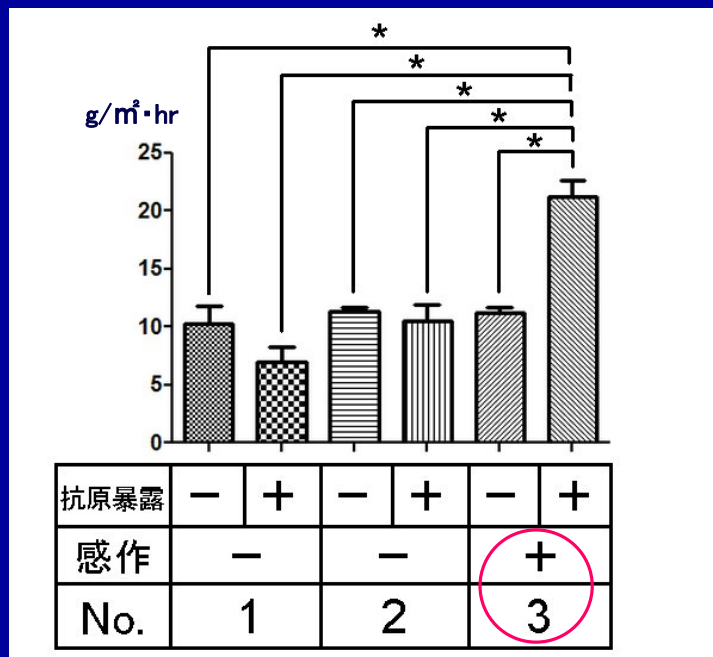
肉眼で判る程度の発赤を示し

試験終了時には曝露部位に皮膚炎の症状を呈しました。

これに対して、非感作犬は終始無症状のままでした。

写真ではマジックペンで囲った黒枠部分にテープストリップを実施しています。

## 結果: TEWL測定値



\* < 0.05 Tukey's multiple comparison test.

曝露開始から1週間後のTEWL測定値の結果です。  
 事前に各群の母分散が等しいかどうかの確認方法として  
 バートレット検定を採用し、実施しています。  
 今回の結果では、p値が0.0771と0.05より大きいので  
 等分散と考えて問題がないことがわかっています。

チューキー (Tukey) の多重解析を行い得られた、  
 スギ花粉曝露試験後のTEWL測定値の比較では  
 スギ花粉感作犬No.3の曝露部位の値が、顕著に高く  
 同感作犬の生食コントロール部位との間に有意差を認めました。  
 また、非感作犬No.1,2,2 頭の生食コントロール部位  
 および曝露部位との間にも有意差を認めました。

一方、全頭における生食コントロール部位および  
 非感作犬2頭の曝露部位との間には、有意差が認められませんでした。

## 考察 1.

- 血中IgE濃度の高いスギ花粉感作犬は、テープストリップ実施部分へのスギ花粉単独曝露により炎症反応が誘導され、TEWLが有意に高かった。
- ⇒ 抗原曝露による皮膚炎の発症には感作状況に加えて、皮膚バリアの状態が関与する可能性が示唆された。

考察です。

スギ花粉に対する血中IgE濃度の高いスギ花粉感作犬は、テープストリップの実施後スギ花粉単独曝露により炎症反応が誘導され、TEWLが有意に高かったことから、抗原曝露による皮膚炎の発症には感作状況に加えて、皮膚バリアの状態が関与する可能性が示唆されました。

## 考察 2.

- テープストリップにより皮膚バリア機能を傷害させ、抗原曝露を行うことにより、効果的で自然に近い抗原感作の維持ができることが想定された。
- TEWLの測定は皮疹の客観的評価に有用であることが、あらためて示された。

今回、皮膚バリア機能を損傷させるためにテープストリップを行いました。正常な皮膚では抗原の侵入が妨げられることを前提としました。

アトピー性皮膚炎を呈している皮膚や、バリア機能が低い皮膚では、経皮的感作が容易に行われることが報告されています。

テープストリップにより皮膚バリア機能を傷害させ、抗原曝露を行うことにより、感作犬において効果的で自然に近い経皮的抗原感作の維持ができることが想定されました。

今回の結果から、TEWLの測定は皮疹の客観的評価に有用であることがあらためて示されました。

検査は非侵襲的で、被検動物への負担も少ないことから臨床的にも有意義であると考えられました。

今後は犬のスギ花粉感作モデルをベースに、スギ花粉ペプチド投与による効果発現メカニズムへのアプローチに向けて研究を進展したいと考えております。

以上です。ありがとうございました。