

サイトカインを指標とした接触皮膚炎の解析 (第3報¹⁾)

—Phenol 系化合物の感作性及び感作交差反応—

山崎俊介,* 鈴木恵子, 池本 毅, 柿島 博

鐘紡株式会社化粧品研究所

Analysis of Contact Dermatitis by Cytokines. III.¹⁾—Sensitization and Crossreaction of Phenolic Compounds—

Shunsuke YAMAZAKI,* Keiko SUZUKI, Takeshi IKEMOTO,
and Hiroshi KAKISHIMA

Kanebo, Ltd., Cosmetics Laboratory, 3-28, 5-chome, Kotobuki-cho,
Odawara-shi, Kanagawa 250-0002, Japan

(Received March 5, 1998)

We examined sensitization and crossreaction by the guinea pig maximization test (GPMT) with phenolic compounds. Skin specimens were collected from earlobes of BALB/c mice on 24 h after elicitation phase of contact hypersensitivity reaction (CHR) with phenolic compounds. The expression of cytokines of skin specimens was examined by the reverse transcriptase/polymerase chain reaction (RT-PCR) method. Consequently, phenolic compounds which showed positive reaction in GPMT expressed IL-2 and IFN- γ on 24 h after elicitation, and some phenolic compounds showed marked crossreaction. Therefore, it was found that on several phenolic compounds, dimerization of these compounds from monomer to dimer decrease sensitization.

Key words—phenolic compound; cytokine; contact hypersensitivity reaction; crossreaction

緒

言

丁香油 (clove buds oil) やニクズク油 (nutmeg oil) は香辛料として広く用いられている。また、化粧品においても石鹸、シャンプーなどの香料成分として用いられることが多い。しかしながら、化粧品皮膚炎のみならず頭部湿疹や被覆部の湿疹においてまれならず強陽性反応の出現をみると報告もある。また、皮膚科領域においては美白促進効果、抗菌作用などの様々な利用価値があると考えられている。これらの精油の主成分である eugenol や isoeugenol などの phenol 系化合物の感作性については、既に幾つかの報告²⁻⁵⁾ がなされている。一方、phenol 系化合物には光や熱などにより自動酸化を受け、重合体となるものがあることも知られている⁶⁾ が、それらの感作性についての検討はあまりなされていない。そこで我々は広範囲で使用されている phenol 系化合物として eugenol 及び isoeugenol を取り上げ、それらの二量体を含め感作性の有無及び強弱を、Magnusson and Kligman の guinea pigs maximization test (GPMT)⁷⁾ 及びマウスを用いたサイトカイン mRNA レベル¹⁾ により解析した。また、それぞれの化合物間での感作交差反応についても合わせて実施し、その反応メカニズムについて若干の知見を得たので報告する。

実験の部

1. 実験動物 マウスは BALB/cAnNCrj 系 (雌, 7 週齢), モルモットはハートレー系 (雌, 6 週齢) を用いた.

2. 材料 Eugenol (高砂香料工業株式会社製) 及び isoeugenol (和光純薬工業株式会社製) は, 減圧蒸留することにより精製した後に各試験に用いた. また, それぞれの二量体は, 精製した eugenol 及び isoeugenol をペルオキシダーゼを用いて二量化した後にカラム精製することにより得た (Fig. 1).⁸⁻¹⁰⁾ また, それぞれの純度は GC もしくは HPLC 分析により, 98% 以上であることを確認した.

3. マウス CHR 誘導法 Fig. 2 はマウスの phenol 系化合物による CHR の誘導法 (含感作交差性試験法) についての実験計画を示す. Day 0 に各化合物感作誘導 (背部刈毛後塗布) を, day 5 に抗原による惹起 (両耳介部塗布) を施した. 各化合物の感作濃度及び投与量は, 誘

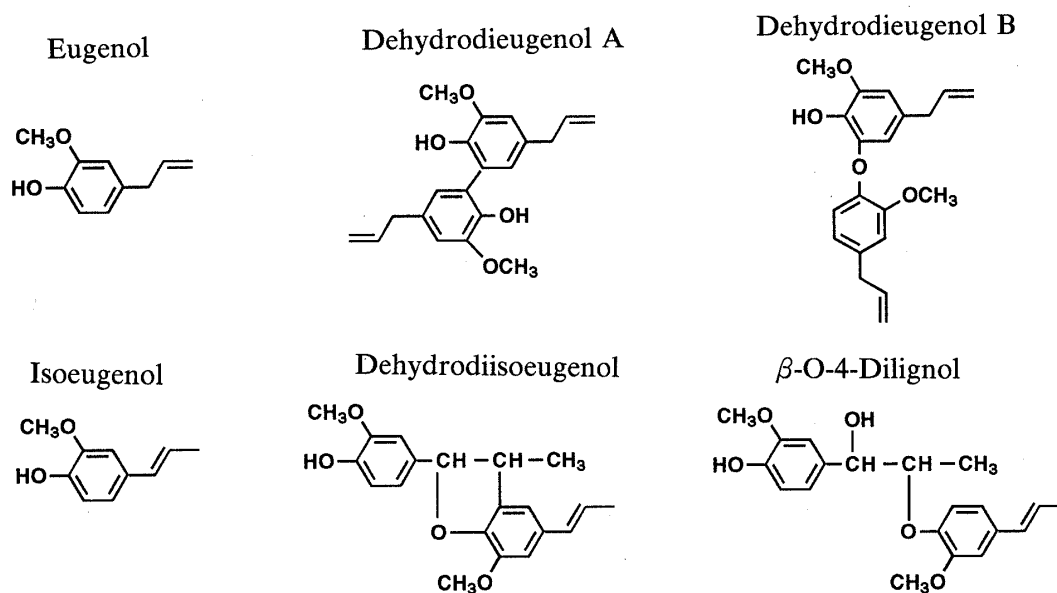


Fig. 1. Phenolic Compounds

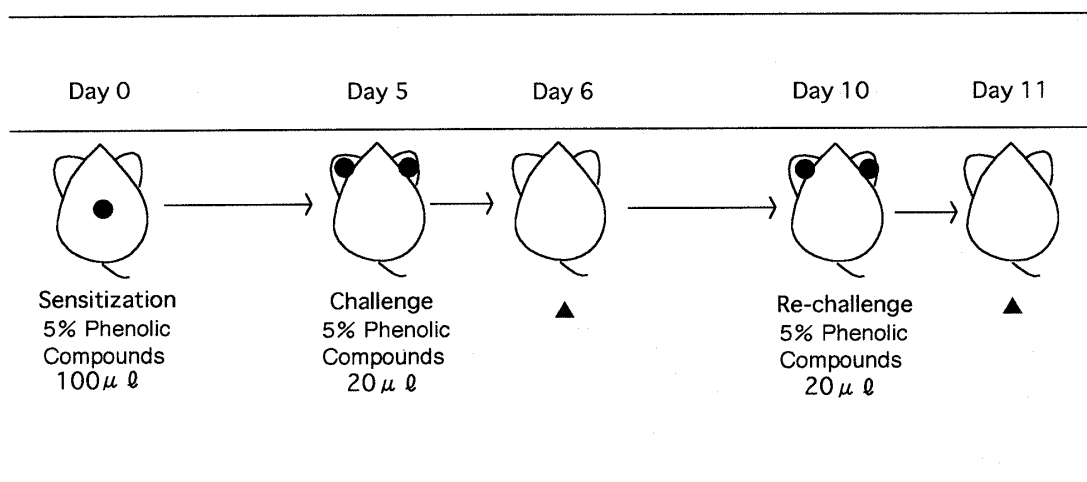


Fig. 2. Experimental System

▲, Measurement of ear swelling and sampling of ear; ●, painting of phenolic compounds.

導濃度を 5% とし 100 μ l ずつ背部に塗布し、惹起濃度を 5% とし 20 μ l ずつ耳介部へ塗布した (誘導及び惹起濃度は各被験物質とも刺激性を生じない (刺激性の有無は確認済み) 最高無刺激濃度として、5% を設定した)。また各々の溶媒は、オリブ油とした。惹起後 24 時間の両耳介の厚さを dial thickness gauge (Peacock 製) を用いて測定し、惹起前 (0 時間) の値との差を耳介腫脹 (ear swelling) とし、それを 10^{-3} cm (平均値 \pm S.D.) で表示した。

なお、実験動物は各化合物で 3 匹ずつ計 18 匹を実験に供した。

4. GPMT によるモルモット CHR 誘導法 Fig. 3 はモルモットの phenol 系化合物による CHR の誘導法 (含感作交差性試験法) についての実験計画を示す。GPMT は Magnusson and Kligman の試験方法⁷⁾ に準じて実施した。すなわち、モルモットの肩甲骨上を 4 \times 6 cm の広さに刈毛し、① 0.05 ml のフロイントの完全アジュバントのみ、② 0.05 ml の被験物質のみ、③ 0.05 ml のフロイントの完全アジュバントと被験物質の等量混合物を順番に左右一列ずつ皮内注射した。皮内注射 1 週間目に同部位の毛を刈り、10% ラウリル硫酸ナトリウム (ワセリン基剤) を塗布し、被験物質を 2 \times 4 cm の濾紙に広げ、閉鎖貼布を 48 時間行った。閉鎖貼布後 2 週間目に腹側部の毛を 5 \times 5 cm の広さに刈り、2 \times 2 cm の濾紙に被験物質を塗布し、24 時間閉塞貼布した。除去後 24 時間目に判定基準に従って判定した。各化合物の感作誘導及び惹起の濃度はマウスの CHR と同様に、いずれも 5% とし、溶媒はすべてオリブ油を用いた。

なお、実験動物は各化合物で 10 匹ずつ計 60 匹を実験に供した。

5. Phenol 系化合物の感作交差性試験 Eugenol 及び isoeugenol による感作誘導及び惹起を上記の各々の接触皮膚炎の誘導法に従い同様に実施した。さらにマウスでは感作惹起 5 日後に (Fig. 2)、モルモットでは感作惹起 7 日後に (Fig. 3) 各々、今回合成した 6 種類の化合物との感作交差性を解析する目的で再惹起を施した。再惹起はいずれも惹起時と同濃度 (5%) で同部位に実施した。なお、実験動物はマウスは各群 3 匹ずつ計 18 匹、モルモットは各群 10 匹ずつ計 60 匹を各々実験に供した。

6. RT-PCR 法 マウスの実験系において、いずれも惹起 24 時後 (感作交差反応では再惹起 24 時間後) の耳介部を採取し、4 M guanidine thiocyanate buffer を 1.0 ml 加えて組織 (耳介皮膚全層) をホモジナイズ後、常法に従い RNA を抽出し、続いて RNA 2 μ g を鋳型として調製し、M-MLV-revers transcriptase (GIBCO BRL) を用いて cDNA を合成した。PCR は、94 $^{\circ}$ C, 1 分, 60 $^{\circ}$ C, 2 分, 72 $^{\circ}$ C, 3 分の条件下で、25 cycle 増幅を行った。PCR に使用した β -actin, IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5 及び IL-6 の各プライマーは、Clontec 社製のものをを用いた。得られた PCR 産物は、etidum bromide を加えた 1.5% agarose gel にて電気泳動を行い、出現するバンドを確認した。

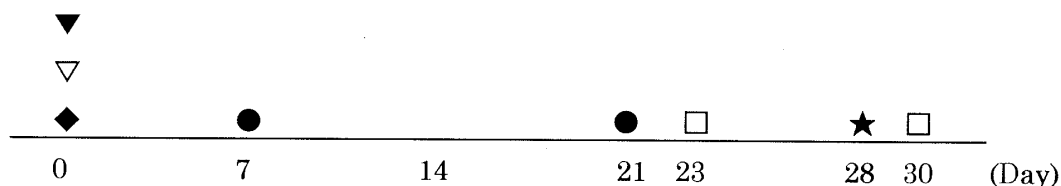


Fig. 3. Sensitization Schedule (Guinea Pig Maximization Test)

▼, FCA intradermal injection; ▽, sample intradermal injection; ◆, sample-FCA emulsion intradermal injection; ●, 24 h occlusive patch test; □, observation; ★, 24 h occlusive patch test (re-challenge).

Table 1. Ear Swelling Data

Chemicals	Mean \pm S.D. of ear swelling on 24 h (10^{-3} cm)
Eugenol	2.31 ± 0.107
Dehydrodieugenol A	1.98 ± 0.029
Dehydrodieugenol B	14.13 ± 0.335
Isoeugenol	12.37 ± 0.311
Dehydrodiisoeugenol	3.19 ± 0.179
β -O-4-Dilignol	1.75 ± 0.072

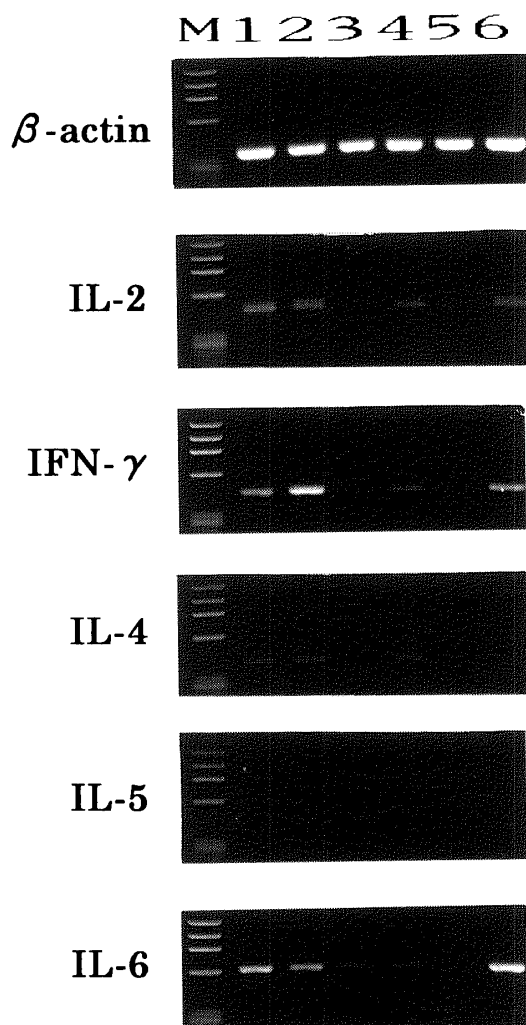


Fig. 4. Cytokines mRNA Expression in the Ear after Challenge

M, Marker; Lane 1, isoeugenol; 2, dehydrodiisoeugenol; 3, β -O-4-dilignol; 4, eugenol; 5, dehydrodieugenol A; 6, dehydrodieugenol B.

た。Dehydrodieugenol A 及び β -O-4-dilignol は I ランク (weak) であり、反応は陰性であった。

3. Phenol 系化合物の感作交差反応 Table 3 に phenol 系化合物のうち、eugenol 及び isoeugenol の単量体/二量体間による各々の (再惹起 24 時間後の耳介腫脹率及び感作陽性反応率を指標とした) 感作交差反応により比較解析を行ったまとめの結果を示す。Table 3 に示すとおり、感作交差反応が強くなるものほど IL-2 及び IFN- γ の mRNA 発現が顕著となり、IL-4 の発

結 果

1. Phenol 系化合物によるマウス CHR の感作惹起 24 時間後における耳介腫脹, サイトカイン mRNA 発現 Table 1 に phenol 系化合物による感作惹起 24 時間後のマウスの耳介腫脹 (ear swelling) の結果を示す。Dehydrodieugenol B 及び isoeugenol において著しい耳介腫脹反応が観察されたが、その他はいずれも微弱な反応であった。Fig. 4 は phenol 系化合物による感作惹起 24 時間後の、マウス耳介部におけるサイトカイン mRNA レベルでの解析結果を示した。Th1 細胞由来のサイトカインである IL-2 及び IFN- γ は eugenol, dehydrodieugenol B, isoeugenol 及び dehydrodiisoeugenol に顕著に認められた。Th2 細胞由来のサイトカインのうち、IL-4 は eugenol, isoeugenol, 及び dehydrodiisoeugenol において軽微に認められた。IL-5 はいずれの化合物においても発現は認められなかったが、IL-6 は dehydrodieugenol A 以外の化合物で発現が認められた。

2. Phenol 系化合物による感作惹起 24 時間後における GPMT 結果 モルモットによる GPMT は Magnusson and Kligman の判定基準に従って判定し、その結果を Table 2 に示した。Dehydrodieugenol B 及び isoeugenol は共に V ランク (extreme), dehydrodiisoeugenol は III (moderate), eugenol は II ランク (mild) であっ

Table 2. GPMT Data

Chemicals	Sensitization rate (%)	Grade	Classification
Eugenol	20	II	Mild
Dehydrodieugenol A	0	I	Weak
Dehydrodieugenol B	100	V	Extreme
Isoeugenol	100	V	Extreme
Dehydrodiisoeugenol	50	III	Moderate
β -O-4-Dilignol	0	I	Weak

現も軽微ではあるが同時に認められる傾向にあった。一方、感作交差反応が微弱なもの（特に GPMT による感作交差性が 0% のもの）については IL-2 又は IFN- γ の mRNA 発現は認められなかった。

考 察

Phenol 系化合物についての毒性学的研究は数多くの報告がある。¹¹⁻¹³⁾ また、感作性及び感作交差反応についての報告も、Barratt らを始めとしていくつかあるが、¹⁴⁾ いずれも単量体あるいはそれらの修飾化合物に関してがほとんどであり、それらの自動酸化により生成する化合物等を含めた報告はほとんど見当たらない。

そこで我々は、phenol 系化合物のうち eugenol 及び isoeugenol を中心に、6 種類の化合物の感作性及び感作交差反応についての解析を行った。感作性の評価法は *in vivo* 試験である GPMT と、著者らで開発した感作性スクリーニング法のうち、サイトカインを指標としたマウス CHR の皮膚反応局所における解析にて実施した。Eugenol 及び isoeugenol の単量体では、GPMT では eugenol と比較して isoeugenol の方が陽性反応率が高く、耳介腫脹も顕著であった。サイトカイン解析においてはどちらの化合物も Th1 細胞由来の IL-2 及び IFN- γ の mRNA 発現を認め、その傾向は isoeugenol においてより顕著であった。すなわち、eugenol 及び isoeugenol は、強弱はあるもののいずれも感作性を有する結果となった。一方、eugenol 及び isoeugenol の各々の二量体については、dehydrodieugenol B 及び dehydrodiisoeugenol において顕著な感作性及び耳介腫脹が認められ、Th1 細胞の mRNA 発現も顕著であった。しかしながら、それぞれの構造異性体である dehydrodieugenol A 及び β -O-4-dilignol においては感作性及び耳介腫脹はいずれも弱く、Th1 細胞の mRNA 発現もほとんど認められなかった。

また、耳介腫脹が著しく、GPMT で感作性の強度なものほど IL-2 及び IFN- γ といった Th1 細胞由来のサイトカイン mRNA 発現が顕著に認められたが、軽度なものにおいても反応強度は若干弱まるが、同様な mRNA 発現が認められることから、Th1 細胞の mRNA 発現を指標とした本スクリーニング法は被験物質の感作性の有無を予測する際の高感度なスクリーニング法の 1 つになり得ると思われる。

通常、試薬類として市販されている eugenol 及び isoeugenol の中には、変色しているものが多いことから、既に自動酸化を受けた重合体を含んでいる可能性が高いと推測される。本実験結果において、dehydrodieugenol B 及び isoeugenol が強い感作原であることが推察された。一方で dehydrodieugenol A 及び β -O-4-dilignol は感作性は極めて低いことが確認された。このように本来強感作原と考えられている eugenol 及び isoeugenol は、自動酸化により生成する二量体の構造の相違において、各々の感作性が著しく異なることが確認されたことは興味深い知見である。

Table 3. Crosschallenge Results

Challenge chemical	Eugenol		Dehydrodieugenol A		Dehydrodieugenol B		Isoeugenol		Dehydrodieugenol		β -O-4-Dilignol	
	E	IsoE	E	IsoE	E	IsoE	E	IsoE	E	IsoE	E	IsoE
Sensitizing chemical	40	10	0	60	80	100	20	30	0	10	0	10
Crossreaction rate (%)	3.54	1.84	1.63	9.17	10.29	13.72	1.95	2.68	1.92	2.27	1.92	2.27
Mean \pm S.D. of ear swelling on 24 h (10^{-3} cm)	± 0.215	± 0.092	± 0.071	± 0.241	± 0.217	± 0.352	± 0.139	± 0.103	± 0.052	± 0.025	± 0.052	± 0.025
β -actin	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
IL-2	●	○	○	●	●	●	●	●	○	●	○	●
IFN- γ	●	●	○	●	●	●	●	●	○	●	○	○
IL-4	●	○	○	●	●	●	○	○	○	○	○	○
IL-5	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
IL-6	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●

E, Eugenol sensitization; IsoE, Isoeugenol sensitization; ●, positive reaction of cytokines mRNA; ○, negative reaction of cytokines mRNA.

また、phenol 系化合物間の感作交差反応については、eugenol 及び isoeugenol (いずれも単量体) との交差性のみについての解析を実施した。その結果、各化合物間で交差性に顕著な差が認められた。Eugenol 及び isoeugenol 間では、Barratt らの報告と同様に交差性は低かった。一方、交差性の高いものとしては、dehydrodieugenol B と eugenol あるいは isoeugenol とが挙げられる。Phenol 系化合物の一般的な反応メカニズムには、①orthoquinone の生成をへて反応する the poisonivy mechanism (poisonivy メカニズム)、②メソメリズム (メソメリー) のラジカルが炭素原子を 2 原子付加させることによって起きる the benzylic radical mechanism (ベンゼン性メカニズム)、③phenol の水酸基から水素原子の脱水素化によって起きる the phenolic radical mechanism (phenol 性メカニズム) の 3 つが確認されている。¹⁴⁾ ①は反応性を持った求電子体の発生によるもので、②及び③は、フリーラジカル中間体の形成である。Eugenol は phenol 性メカニズムによる反応ルートが、isoeugenol は poisonivy メカニズムによる反応ルートが主であると考えられている。¹⁴⁾ このことから eugenol と isoeugenol との交差反応の欠損は、両者が異なったルートにより主に反応していることを示唆している。Dehydrodieugenol B 及び dehydrodiisoeugenol は eugenol あるいは isoeugenol との交差性が高かった。その理由としては、dehydrodieugenol B 及び dehydrodiisoeugenol は phenol 性メカニズム及び poisonivy メカニズムの両者の反応メカニズムを兼ね備えていることが推察され、何れかのルートにより主に反応することが示唆される。一方、dehydrodieugenol A 及び β -O-4-dilignol はともに eugenol あるいは isoeugenol との交差性が欠損している。これは、dehydrodieugenol A 及び β -O-4-dilignol はともに単独では感作性が低いということ (Table 1 及び 2 を参照)、また、eugenol あるいは isoeugenol とは異なったルート (例えばベンゼン性ルート等) を主体として反応することが示唆される。今回は phenol 系化合物の一部についてのみの解析ではあるが、eugenol 及び isoeugenol とそれらの二量体間での感作交差性においては複雑な反応ルート及び免疫応答反応などにより感作交差反応が起こっているものと考えられ、求電子体/電子供与体の相互作用の理論のみから感作メカニズムを解釈することは困難であると思われる。

しかし、今回の結果から eugenol 及び isoeugenol はいずれも各々の二量体 (構造異性体) との間で感作交差反応が顕著に認められる傾向にあった。このように感作交差反応を解析することにより、感作性反応と化学物質との構造活性相関がより明確になるものと思われる。今後は、他の phenol 系化合物 (mono and diphenol 類等) 間での感作交差性についての解析、また化学物質の化学構造あるいは立体構造と感作誘発能との相関性について解析していく予定である。また、感作交差反応の高いものほど、Th1 細胞の発現頻度が高くなる傾向にあり、これらの結果も我々の感作性スクリーニング法による解析結果と符合した。

数種の phenol 系化合物の感作性及び感作交差反応についての解析を実施したところ、単量体で顕著な感作性を有する phenol 系化合物も、ある特定の二量体においては (あるいは二量化することにより) 感作性が低下する傾向にあること、phenol 系化合物間では複雑な反応ルートにより感作交差反応が生ずること、また、マウス CHR において耳介腫脹が著しく、GPMT で感作性及び感作交差反応の反応率の高いものほど Th1 細胞の発現頻度が顕著になることが示唆された。

食生活等の変化に伴い、アトピー肌、敏感肌といった様々な過敏症の増加傾向にある現代社会において今後ますます低刺激性、低感作性の原料を使用した安全性の高い製品が求められる傾向にある。したがって、今回のような、本来、強感作原と考えられている既存原料でも合成法の工夫によっては感作性 (刺激性も含む) を低下させることができ、様々な生理活性を生か

し、安全性の高い（例えば香粧品等の）原料として、製品に使用していくことが可能になると思われる。

引 用 文 献

- 1) 山崎俊介, 桑原裕史, 柿島 博, 薬誌, **117**, 155—161 (1997); *idem, ibid.*, **117**, 162—166 (1997).
- 2) 安田仁子, 関根万里, 海野俊雄, 伊東正俊, 長村洋三, 浦山 功, 香粧会誌, **11**, 259—262 (1987).
- 3) 関根万里, 海野俊雄, 日皮会誌, **98**, 513—519 (1988).
- 4) 長村洋三, 浦山 功, 竹内吉男, 伊東正俊, 野上哲則, 石原 勝, 日皮会誌, **91**, 1502—1514 (1981).
- 5) 海野俊雄, 関根万里, 権丙 浩, 竹内吉男, 伊東正俊, 長村洋三, 石原 勝, 浦山 功, 皮膚, **27**, 592—596 (1985).
- 6) 呉地伝夫, 衛生化学, **13**, 191—196 (1967).
- 7) Magnusson B., Kligman A. M., *J. Invest. Dermatol.*, **52**, 268—276 (1969).
- 8) 中野準三, “リグニンの化学—基礎と応用.” ユニ広報株式会社, 東京, 1979, pp. 420—422.
- 9) Taira J., Ikemoto T., Yoneya T., Hagi A., Murakami A., Makino K., *Free Rad. Res. Comms.*, **16**, 197—204 (1991).
- 10) Ludemann H.-D., Nimz H., *Die Makromolekulare Chemie*, **175**, 2393—2407 (1974).
- 11) Thompson D. C., Constantin-Teodoshi D., Moldeus P., *Chem. Biol. Interactions*, **77**, 137—147 (1991).
- 12) Mizutani T., Satoh K., Nomura H., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **73**, 87—95 (1991).
- 13) Thompson D., Norbeck K., Olsson L. I., Constantin-Teodoshi D., Jolanda Van der Zee, Moldeus P., *J. Biol. Chem.*, **264**, 1016—1021 (1989).
- 14) Barratt M. D., Basketter D. A., *Contact Dermatitis*, **27**, 98—104 (1992).