

20000765

以降 P.195-200は「嗅覚識別検査のためのアンケート調査および嗅覚識別検査の手順と回答方法の説明について」ですが、無断転載ならびに複写禁止のため非公開とします。

Ⅲ. 微量化学物質による呼吸器系障害・

アレルギーとの因果関係の解明をめざした研究

[1] 微量化学物質の免疫系への影響について

[2] シックハウス症候群の病態におけるアレルギー反応の関与

国立相模原病院臨床研究センター	秋山	一男
	三田	晴久
	斉藤	博士
	森	晶夫
	安枝	浩
	斉藤	明美
	山下	義仁
	東	憲孝
	谷口	正実
	前田	裕二
	長谷川	真紀
国立医薬品食品衛生研究所	高鳥	浩介
国立感染症研究所	阪口	雅弘

—シックハウス症候群の病態解明、診断治療法に関する研究—
「微量化学物質による呼吸器系障害・アレルギーとの因果関係の解明をめざした研究」

平成12年度研究

- [1] 微量化学物質の免疫系への影響について
- [2] シックハウス症候群の病態におけるアレルギー反応の関与

分担研究者 秋山一男（国立相模原病院臨床研究センター 部長）

研究協力者 三田晴久、斉藤博士、森 晶夫、安枝 浩、斉藤明美、山下義仁、東 憲孝、谷口正実、前田裕二、長谷川真紀（国立相模原病院臨床研究センター）、高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所）、阪口雅弘（国立感染症研究所）

研究要旨

[1] シックハウス症候群の原因物質の一つと考えられているホルムアルデヒド(FA)のヒト免疫系への影響を、ヒト好塩基球からのヒスタミン遊離能、好酸球の遊走能、T_Hリンパ球からのサイトカイン遊離能を指標とした *in vitro* の系で検討した。FAはヒト好塩基球からのヒスタミンの自然遊離を引き起こし、抗原刺激によるヒスタミン遊離は抑制した。好酸球遊走はFAの低～中濃度では影響が見られず僅かに高濃度で抑制された。またCCR3とEotaxinとの結合への影響も軽度の亢進は見られたものの濃度依存性がなく非特異的効果と思われた。FAのT細胞からのサイトカイン産生への影響ではIL-4、IL-5ともベル型の産生亢進が認められた。

[2] シックハウス症候群の病態におけるアレルギー学的因子の関与を検索する目的で、今年度はまず対照群としてのシックハウス症候群症状を示さないアレルギー疾患患者について住環境中の主要アレルゲン量を測定した。

1) 寝具中のダニ抗原 (Der 1) 量は家塵中に比べて有意に高値であった。2) 寝具中のネコ抗原 (Fel d 1) 量、イヌ抗原 (Can f 1) 量は現在飼育中の患者宅において有意 (Fel d 1: $p < 0.01 \sim 0.001$, Can f 1: $p < 0.01 \sim 0.05$) に高値を示した。3) 家塵中と寝具中でのペット抗原量は相関したが、ダニ抗原量は相関しなかった。4) 真菌では、好乾菌は家塵中には検出率が高かったが、寝具中には検出されなかった。5) 寝具中のDer 1量とIgE抗体価、ヒスタミン遊離反応におけるsensitivity、reactivityとの間には有意な相関は認められなかった。

A. 研究目的

いわゆるシックハウス症候群については、その発症機序はもとより、定義・診断基準もまだ確立していない。住宅やオフィスビルの新材から室内環境中へ放出される化学物質に対する過敏症であろうと漠然と考えられている。しかし、その病態がいわゆる化学物質過敏症 (multiple chemical sensitivity; MCS) と同一なのか、また微量化学物質等がハプテンあるいはアジュバントとして関わるアレルギー免疫反応なのか、さらにはそれらに対する何らかの中毒反応なのか等々不明の点が多い。本研究では微量化学物質による呼吸器系障害・アレルギーとの因果関係の解明をめざした基礎・臨床研究とともにシックハウス症候群患者におけるアレルギー学的背景因子を検索及び患者の住環境中の主要アレルゲン量を測定し、非シックハウス症候群患者と比較検討することで、シックハウス症候群の病態におけるアレルギー反応の関与の可能性を検討する。

本年度は、[1] ヒト細胞を用いた *in vitro* の系での微量化学物質の免疫系への影響、[2] シックハウス症候群患者の対照群としてのシックハウス症候群様症状を呈さないアレルギー疾患患者宅の家塵中のアレルゲン量の測定、を行った。

B. 研究方法

[1] ヒト細胞を用いた *in vitro* の系での微量化学物質の免疫系への影響

1) ヒト末梢白血球からのヒスタミン遊離に及ぼすホルムアルデヒド(FA)の影響
末梢白血球とFA溶液をtyrode緩衝液(0.1%にヒト血清アルブミン添加)中で3分間インキュベートした後anti-IgEを添加しさらに45分間インキュベートし、上清中に遊離されたヒスタミンを測定した。FA溶液は関東化学社製の試薬(36～38%水溶液)から次のように調整した。原液を生理食塩水で10倍に希釈したものを1.23M、3700ppm(細胞浮遊液にこの1/10量を加

えたので、最終濃度はこの1/10になる)とし、最終濃度37ppmから0.037ppmまでの濃度のFAを使用した。

2) Eotaxinで惹起された好酸球の遊走に及ぼすホルムアルデヒド(FA)の影響

喘息患者末梢血から精製した好酸球を各種濃度のFA共存、もしくは非共存下で至適濃度のEotaxin、RANTES(いずれも100ng/ml)に向けて遊走させ、FAの遊走への影響を検討した。好酸球遊走はFalk等の方法に準じ、48-wells micro chemotaxis chamber、5 μ mのpore sizeを有するpolycarbonate filterを使用して測定した。また、CCR3へのEotaxin bindingにFAが及ぼす影響を持つかをFlow cytometerを用いて検討した。

3) ヒトThリンパ球クローンによるサイトカイン産生に及ぼすホルムアルデヒド(FA)の影響

ダニ抗原(Der f 2)に特異的なヒトTh cloneを用い、固相化抗CD3抗体及び可溶性抗CD28抗体で48時間刺激した後の上清中のIL-4、IL-5をELISA法で測定した。この系にFA溶液を0.037~37ppmの範囲で添加することによるIL-4、IL-5産生への影響を検討した。

[2] シックハウス症候群患者の対照群としてのシックハウス症候群様症状を呈さないアレルギー疾患患者(成人喘息患者)について住環境中のアレルゲン量の測定

1) 対象：国立相模原病院アレルギー科を受診中の成人気管支喘息患者の家庭内環境中のアレルゲン量を測定する。

2) 測定アレルゲン及び測定方法：

ダニ：Der p 1、Der f 1をサンドイッチELISA法で測定(μ g/g dust)

ペット：ネコアレルゲン(Fel d 1)及びイヌアレルゲン(Can f 1)をサンドイッチELISA法で測定(μ g/g dust)

真菌：PDA培地、M40Y培地、SABOURAUD培地、DIXON培地によりそれぞれ一般菌、好乾菌、放線菌、好脂菌を培養

3) 検体採取法

ア) 自宅家塵：各患者宅で使用している電気掃除機を用いて収集したフロアの塵を宅急便で袋ごと送ってもらう。掃除の部屋は特定しない。

イ) 寝具の塵：患者使用中の敷き布団から上記家塵採取10日間の時期の最後の1日(返送の当日か前日)

に採取する。(採取法)専用掃除機を貸与

敷き布団：敷き布団の体と触れる面の全面を掃除機で2分間集塵する。各部位で一部よりテープ法で真菌培養用検体を採取する。

4) 建築様式、家屋構造、屋内生活環境調査

対象患者さんへのアンケート調査により、各患者宅の建築様式、家屋構造、屋内生活環境等についての資料を得る。

(倫理面への配慮)

実験に用いた患者さんの血液採取及び家塵・寝具塵採取にあたっては、本研究の趣旨を説明し承諾を得て実施した。

C. 研究結果

[1] ヒト細胞を用いたin vitroの系での微量化学物質の免疫系への影響

1) ヒト末梢白血球からのヒスタミン遊離に及ぼすホルムアルデヒド(FA)の影響

ア) 37ppmのFAでインキュベートした細胞は反応後でもviabilityは99%以上であった。

イ) 37ppmのFAを加えてもtyrode緩衝液のpHには変化はみられなかった。

ウ) いずれの症例においても、anti-IgE(0.01~5 μ g/ml)あるいはダニアレルゲンの単独刺激で用量依存的なヒスタミン遊離がみられた。(図1)

エ) 刺激薬を加えない場合の自然遊離率はFA濃度に依存して増加した。(図2)

オ) 3.7ppmと37ppmの濃度では、FAが含まれていない場合と比べて統計的に有意なヒスタミン遊離の増加がみられた。(図3)

カ) anti-IgE(0.1 μ g/ml)あるいはダニ(0.1 μ g/ml)でのヒスタミン遊離に対するFAの影響(0.037~37ppm)を検討したところFAはIC50約10ppmで用量依存的にヒスタミン遊離を抑制した。(図4)

2) Eotaxinで惹起された好酸球の遊送に及ぼすホルムアルデヒド(FA)の影響

ア) 高濃度(10 μ M以上)のFAの共存によってのみEotaxin、RANTESによる好酸球遊走が阻害された。(図5、6)

イ) Eotaxinは好酸球上に特異的に発現しているCC chemokine receptor, CCR3との結合を介して遊走を惹起するが、FAが存在しない場合(medium)は20%の

Eotxin が好酸球に結合したが、FA 存在下では少し結合が増加する傾向がみられた。しかし、濃度依存性は認められず非特異的な効果と思われた。(図 7)

3) ヒト Th リンパ球クローンによるサイトカイン産生に及ぼすホルムアルデヒド(FA)の影響

ア) IL-5 産生能への影響: IL-5 産生は FA0.037ppm から 37ppm の範囲では 0.37ppm を頂点としたベル型の産生増強効果がみられた。(図 8)

イ) IL-4 産生能への影響: IL-4 産生は FA0.037ppm から 3.7ppm の範囲で濃度依存的に産生増強効果がみられた。(図 8)

[2] シックハウス症候群患者の対照群としてのシックハウス症候群様症状を呈さないアレルギー疾患患者(成人喘息患者)について住環境中のアレルゲン量の測定

(1) 成人喘息患者宅の家塵および寝具の塵中のダニ抗原(Der p 1, Der f 1)量、ペット抗原(Fel d 1, Can f 1)抗原量、真菌培養成績

ア) 寝具中のダニ抗原(Der 1)量は $17.7 \mu\text{g/g dust}$ で家塵中の $7.58 \mu\text{g/g dust}$ に比べて有意($p < 0.01$)に高値であった。(図 9)

イ) 寝具中のネコ抗原(Fel d 1)量、イヌ抗原(Can f 1)量は現在飼育中の患者 $139 \mu\text{g}$ 、 $3.9 \mu\text{g/g dust}$ 、過去に飼育していた患者 $0.51 \mu\text{g}$ 、 0.56g/g dust 、飼育歴のない患者 $0.24 \mu\text{g}$ 、 $0.42 \mu\text{g/g dust}$ であり、現在飼育中の患者宅において有意($\text{Fel d 1: } p < 0.01 \sim 0.001$ 、 $\text{Can f 1: } p < 0.01 \sim 0.05$)に高値を示した。(図 10)

ウ) 家塵中と寝具中でのペット抗原量は相関したが、ダニ抗原量は相関しなかった。

エ) 真菌培養の結果では、好乾菌(*Aspergillus restrictus*, *Wallemia*)は家塵中には検出率が高かったが、寝具中には検出できなかった。(図 11)

オ) 発作患者宅と安定患者宅での家塵中、寝具中のダニ抗原量、ペット抗原量、検出真菌の種類には有意な差は認められなかった。

カ) 患者寝具中の Der 1 量と IgE 抗体価、ヒスタミン遊離反応における sensitivity、reactivity との間には有意な相関は認められなかった。(図 12)

(2) 建築様式、生活様式と真菌数、ダニ抗原量の検討

ア) 建築構造: 一般真菌数は、鉄骨系プレハブ > 木造

板張り($p < 0.05$)、好乾菌数は、木造板張り > 鉄筋コンクリート($p < 0.01$)、木造モルタル > 鉄筋コンクリート($p < 0.05$)であり、鉄筋コンクリート構造の住宅では一般、好乾菌とも少なかった。ダニ抗原量は建築構造による差は認められなかった。(図 13)

イ) 建築後年数: 建築後年数が高くなるにつれて真菌数、ダニ抗原量とも増加する傾向があるも有意ではなかった。

ウ) ジュウタンの有無: ジュウタン有りの住宅では、好乾菌数($p < 0.05$)、Der 1 量($p < 0.05$)はジュウタン無し住宅よりも有意に高値を示したが、一般真菌数では差がなかった。(図 14)

エ) 掃除回数: Der 1 量は掃除機をかける回数が、週に一度以下($12.2 \mu\text{g/g dust}$) > 2~3日に一度($5.86 \mu\text{g/g dust}$) > 毎日($12.2 \mu\text{g/g dust}$)の順に多く、好乾菌も同様の傾向であった。(図 15)

オ) 空気清浄器の有無: 空気清浄器を有する家庭は 4 例のみであったが、好乾菌数は有意に低く、一般真菌数、ダニ抗原量も空気清浄器の無い家庭よりも低い傾向がみられた。

D. 考察と E. 結論

[1] ヒト細胞を用いた in vitro の系での微量化学物質の免疫系への影響

FA はヒト好塩基球からのヒスタミンの自然遊離を引き起こし、抗原刺激によるヒスタミン遊離は抑制した。0.037ppm でも自然遊離が生じる例もみられたが、IC50 の 10ppm は「空気中濃度において 30 分なら耐えられる(流涙を引き起こす)」濃度であるという。また最近報告された解剖実習時の濃度(最高濃度で 1.5ppm, アレルギー 2001;50:21-28)と比べてもはるかに高い濃度であった。FA の好酸球遊走への影響は低~中濃度では影響が見られず僅かに高濃度で抑制されたが、用いた chemoattractant の濃度は至適濃度であったために微妙な影響が見られなかった可能性がある。また CCR3 と Eotaxin との結合への影響も軽度の亢進は見られたものの濃度依存性がなく非特異的効果と思われた。FA の T 細胞からのサイトカイン産生への影響では IL-4、IL-5 とともにベル型の産生亢進が認められた。今年度はまだ preliminary な検討でもありまだ検討例数が少なくさらなる検討例数の増加により FA が免疫細胞に及ぼす明確な影響を解明する必要がある。今後は

米国EPAで行われている研究のように細胞浮遊液をFAを含む大気に暴露する方法がより現実的で理想的な実験法と考えられるので一考を要する。今回の検討はFAのみの非シックハウス症候群患者あるいはT cell cloneを用いた検討であり、今後は他の化学物質、VOC (Volatile Organic Compounds 揮発性有機化合物)を用いた検討、さらにはシックハウス症候群患者さんからの各種細胞と非シックハウス症候群患者さん、健康人との比較検討も必要であり、それによりシックハウス症候群の病態解明に少しでも近づくことが期待される。また、次年度は動物実験による気道系へのFA等の影響の検討を加えて実施する予定である。

[2] シックハウス症候群患者の対照群としてのシックハウス症候群様症状を呈さないアレルギー疾患患者(成人喘息患者)について住環境中のアレルゲン量の測定

我々の施設(国立相模原病院)は我が国で最も多数例の成人気管支喘息患者を診療している施設の1つであり、軽症から重症、難治性まで幅広い層の患者群を診療の対象としている。

我々はこれまでに気管支喘息を始めとするアレルギー疾患の研究を特にアレルゲンの面から研究してきた。われわれは環境中のダニ group 1 アレルゲン (Der p 1/Der f 1)、group 2 アレルゲン (Der p 2/Der f 2) 量の定量法を確立し家庭環境調査においてすでに多くの検討結果を有している。また住宅屋内環境中の真菌のアレルゲン性についてもすでに報告してきた。今回はこれまでに積み上げてきた生物関連アレルゲン定量法を用いて住宅屋内環境中の多種類のアレルゲン量を測定し、成人喘息との関連を検討することは、①成人喘息で初の試みであること、②同一試料を用いた多種類のアレルゲンについての検討であること、等を特色とする研究である。

アレルギー疾患と関連の深い代表的な室内空気汚染物質はダニに起因するもの、ペットに起因するもの、花粉、真菌、ホルムアルデヒド、VOC等の化学物質などさまざまなものがあり、室内での分布状況は発生源や形状により大きく異なる。花粉症の原因となるスギ、ヒノキ、ブタクサ、カモガヤ等の花粉は粒径が数十 μm と大きく、室内に侵入したものは数分で床に沈

降する。ダニに起因するものは2 μm 以上を中心に分布し、歩行やフタンの移動などで飛散したものは30分ほどで床に沈降するが生活行動により再飛散する。VOC等のガス状の物質は室温により揮発量が変動し、新築後徐々に減衰しながらも一定期間常時存在する。今回はシックハウス症候群患者の対照群としてのシックハウス症候群様症状を呈さない成人喘息患者の住環境におけるアレルゲン量を測定した。これらアレルゲン及びアレルギー疾患発症、増悪に関連するであろう環境中の種々物質を測定し、シックハウス症候群患者及び一般アレルギー患者、健康人とで比較検討することでシックハウス症候群の発症病態解明の一助となることが期待される。当初の目標としては、本年度中にシックハウス症候群患者宅の家塵、寝具塵中のアレルゲン調査を実施する予定であったが、患者選択のための診断基準等について疫学調査班による調査票を使用していたが、疫学班での調査票作成が次年度にずれ込んだため、本年度には患者群についての調査ができなかった。次年度には是非実際のシックハウス症候群の患者群についての調査を実施し、対照群と比較検討する予定である。

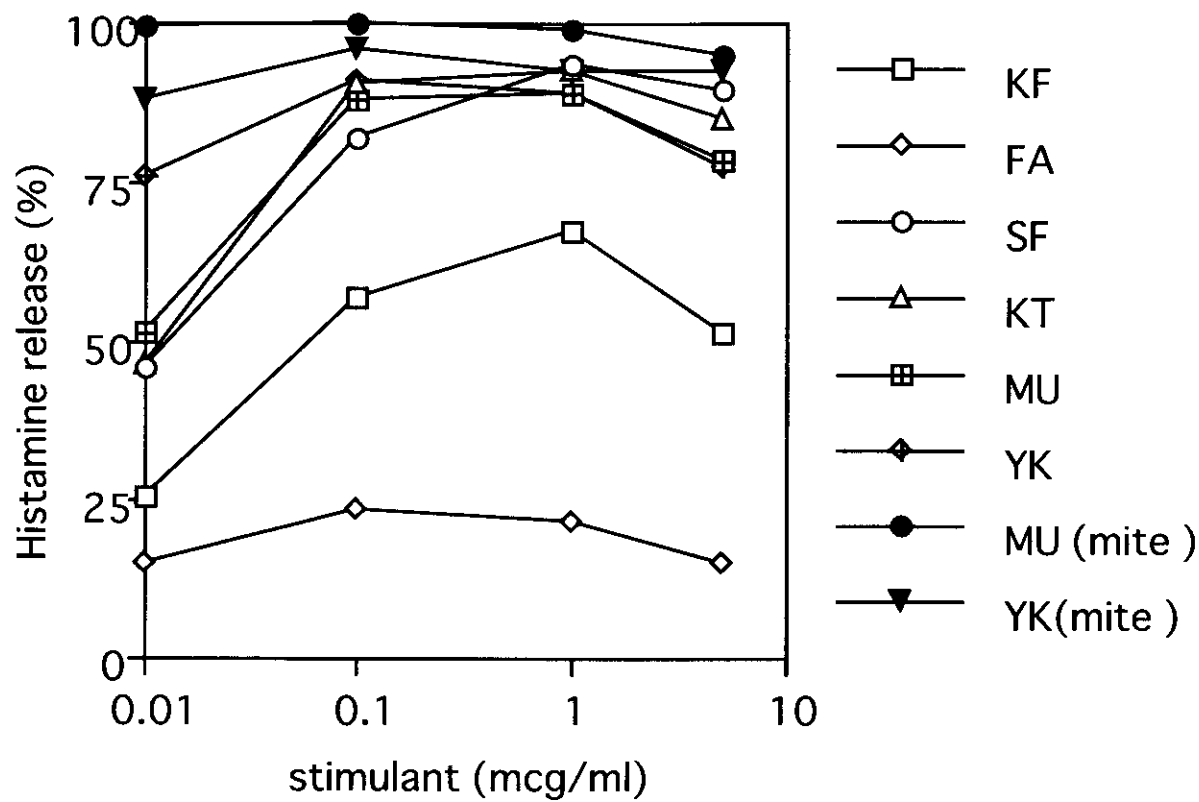


図1 ヒト末梢血好塩基球からの抗-IgE(open symbol)、ダニアレルゲン (closed symbol)によるヒスタミン遊離反応

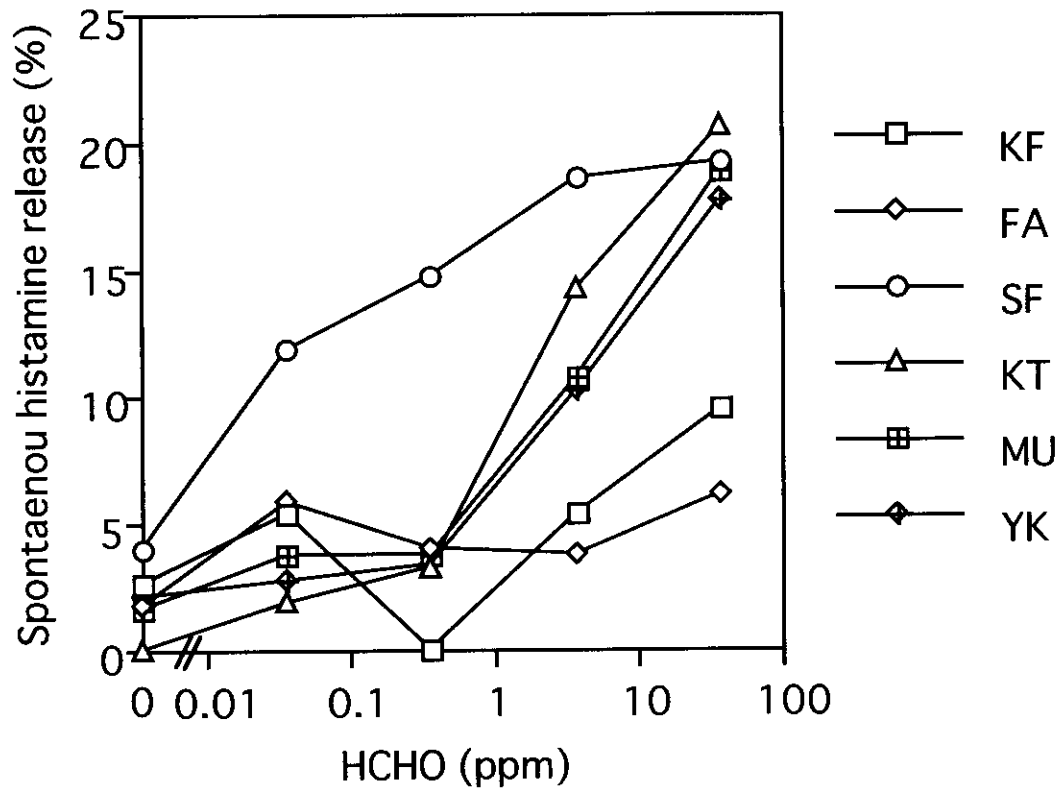


図2 ヒト末梢血好塩基球からの無刺激ヒスタミン遊離に及ぼすホルムアルデヒド(FA)の影響 (6名の個別データ)

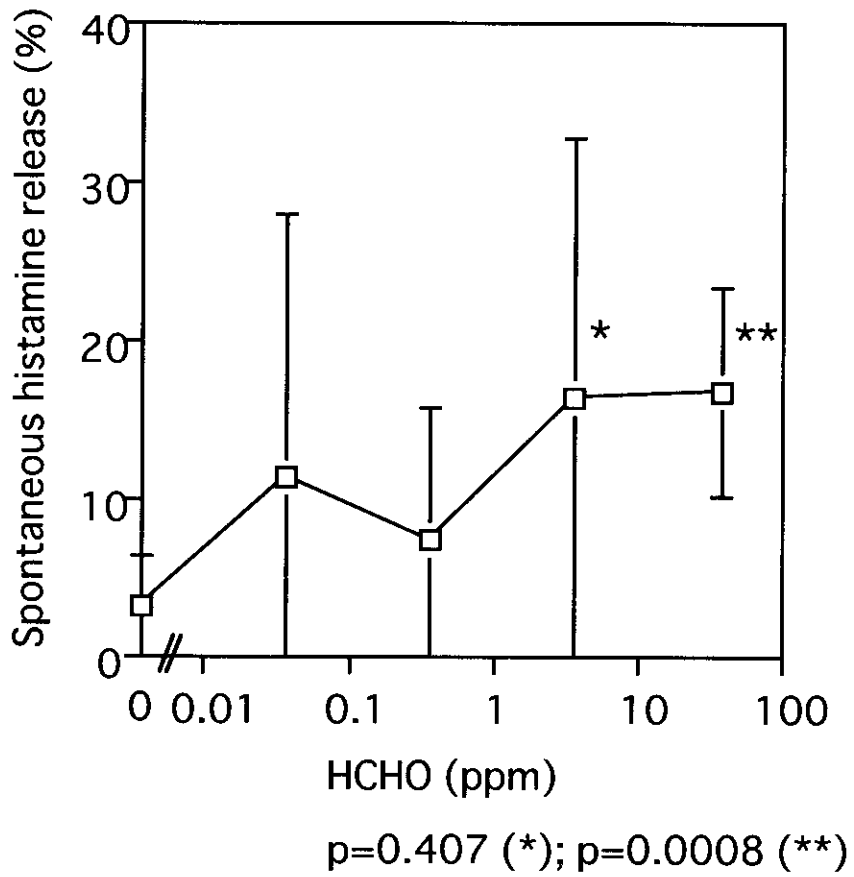


図3 ヒト末梢血好塩基球からの無刺激ヒスタミン遊離に及ぼすホルムアルデヒド(FA)の影響

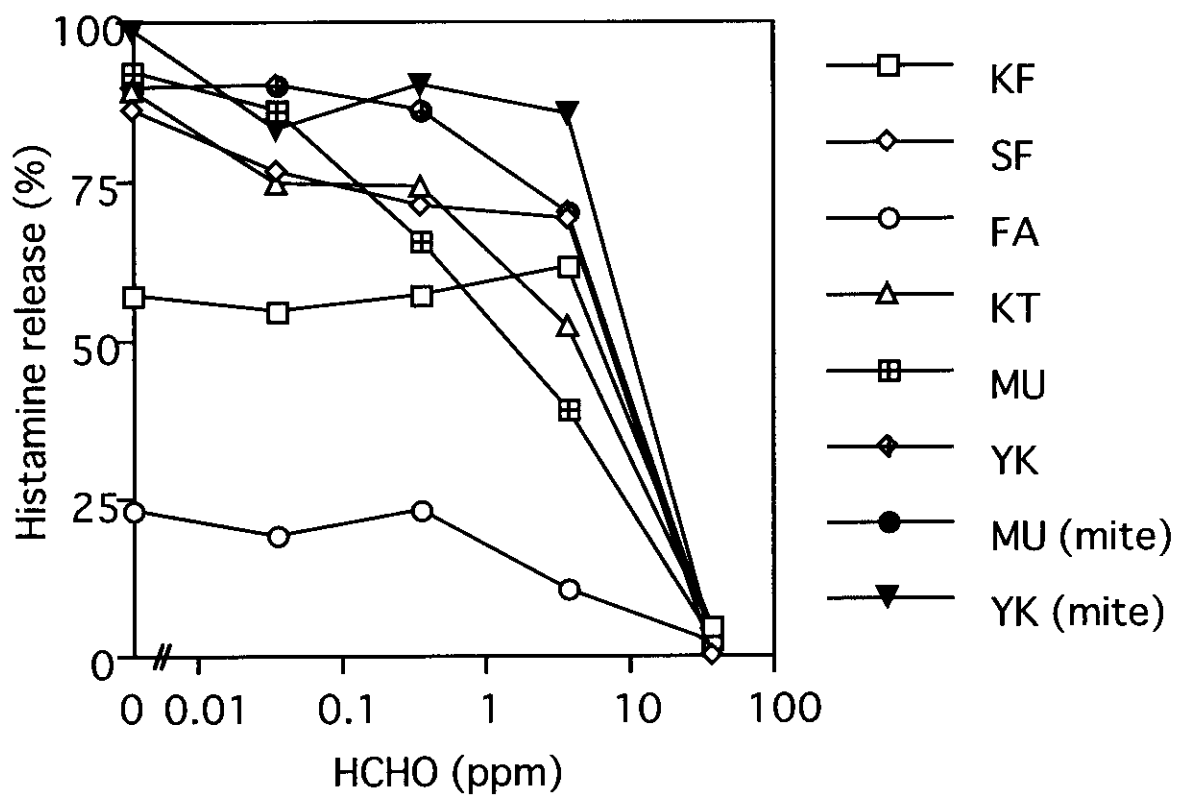


図4 ヒト末梢血好塩基球からの抗-IgE(open symbol)、ダニアレルゲン(closed symbol)によるヒスタミン遊離反応に及ぼすホルムアルデヒド (FA) の影響

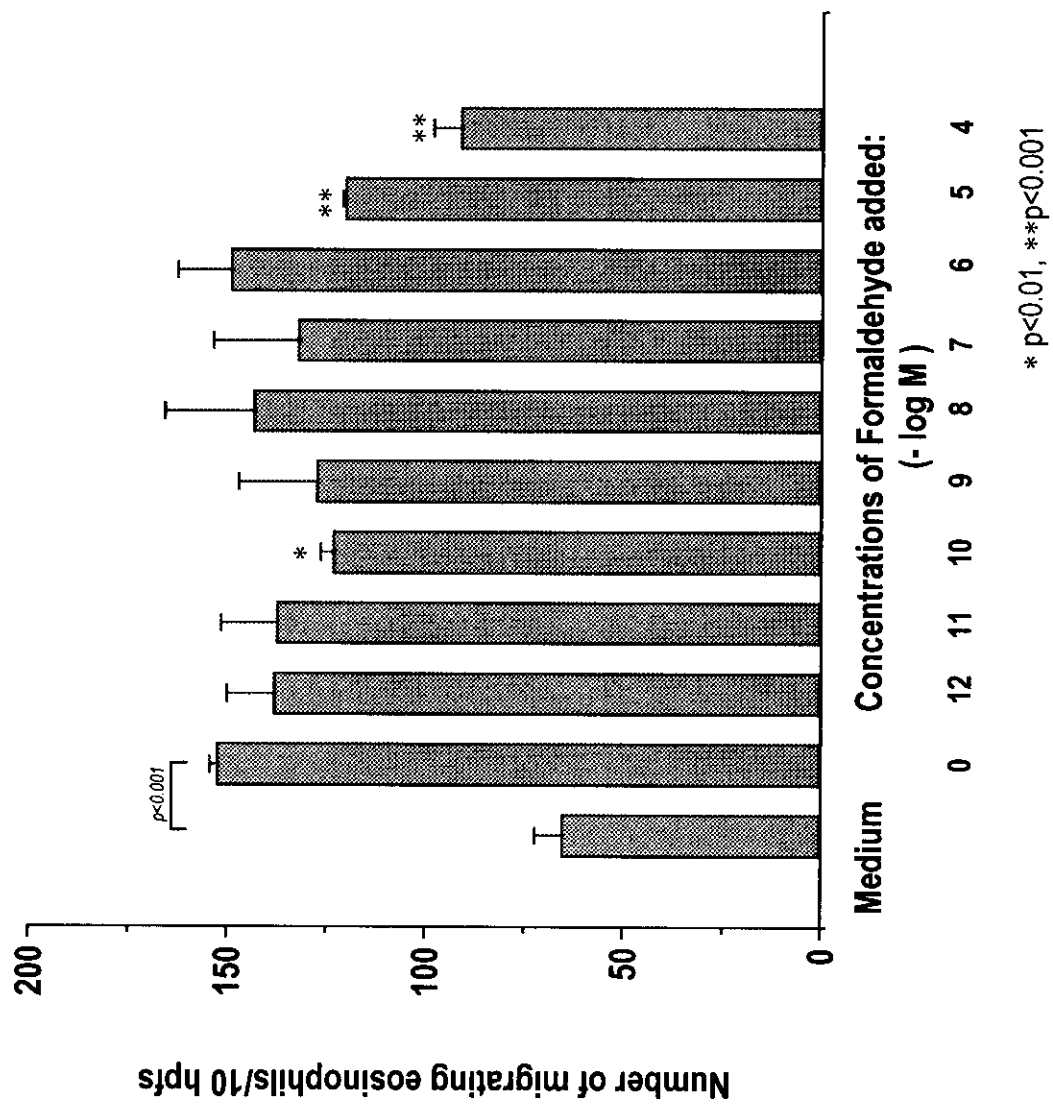


図5 Eotaxinによる好酸球遊走に及ぼすホルムアルデヒドの影響

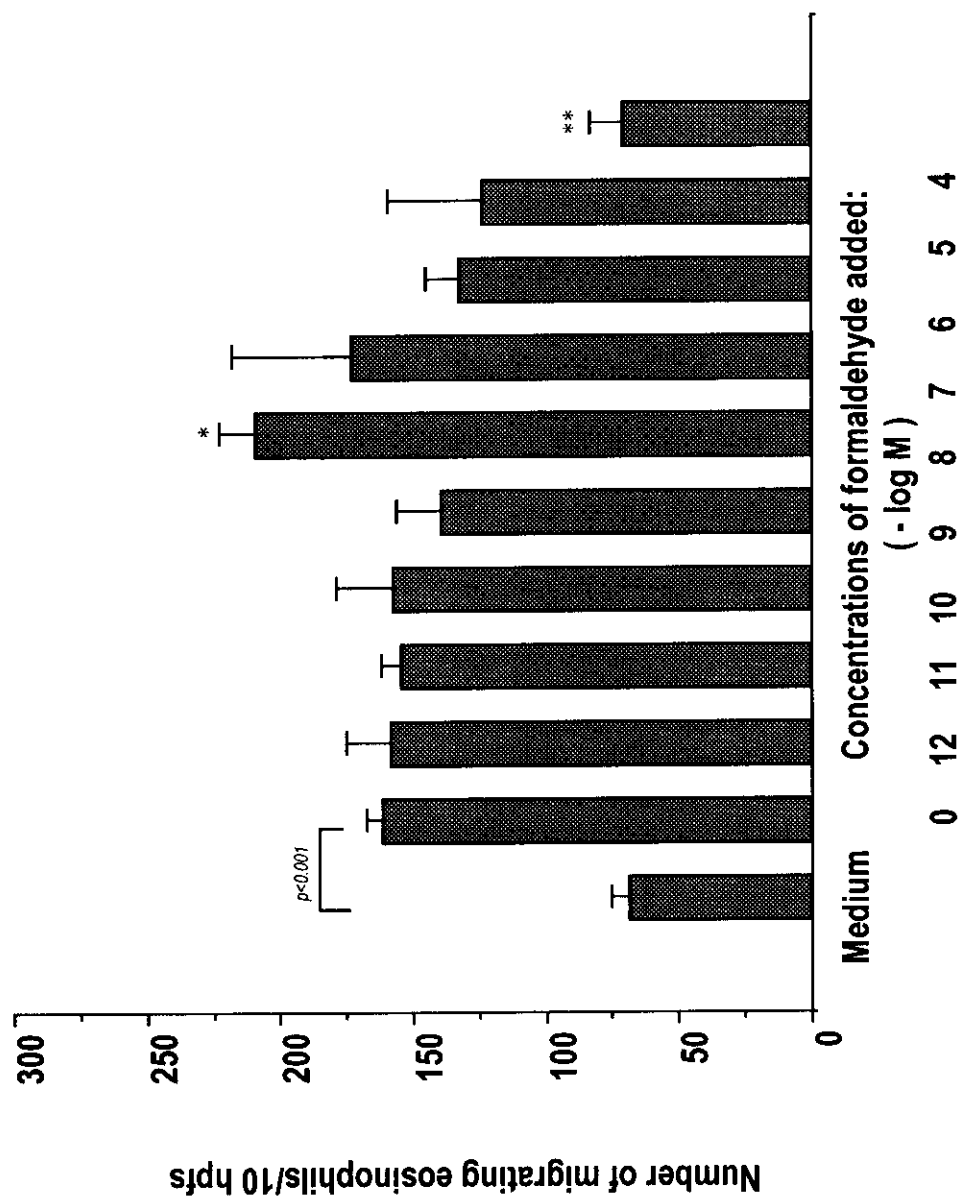
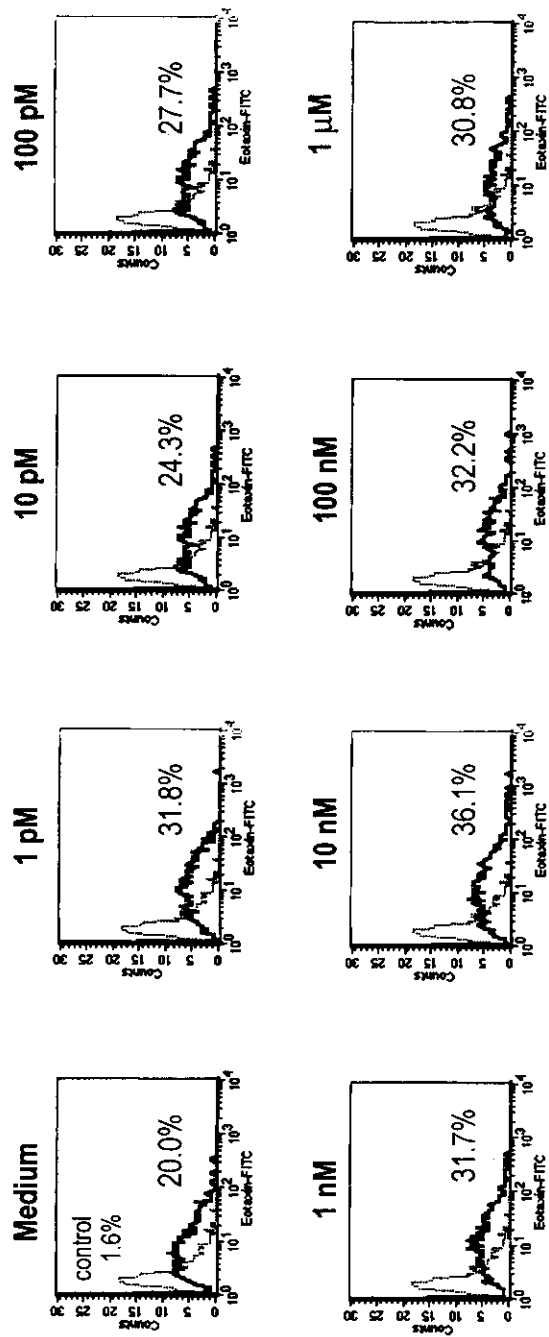


図6 RANTESによる好酸球遊走に及ぼすホルムアルデヒドの影響



Fluorescence intensity

図7 好酸球へのEotaxin結合に及ぼすホルムアルデヒドの影響

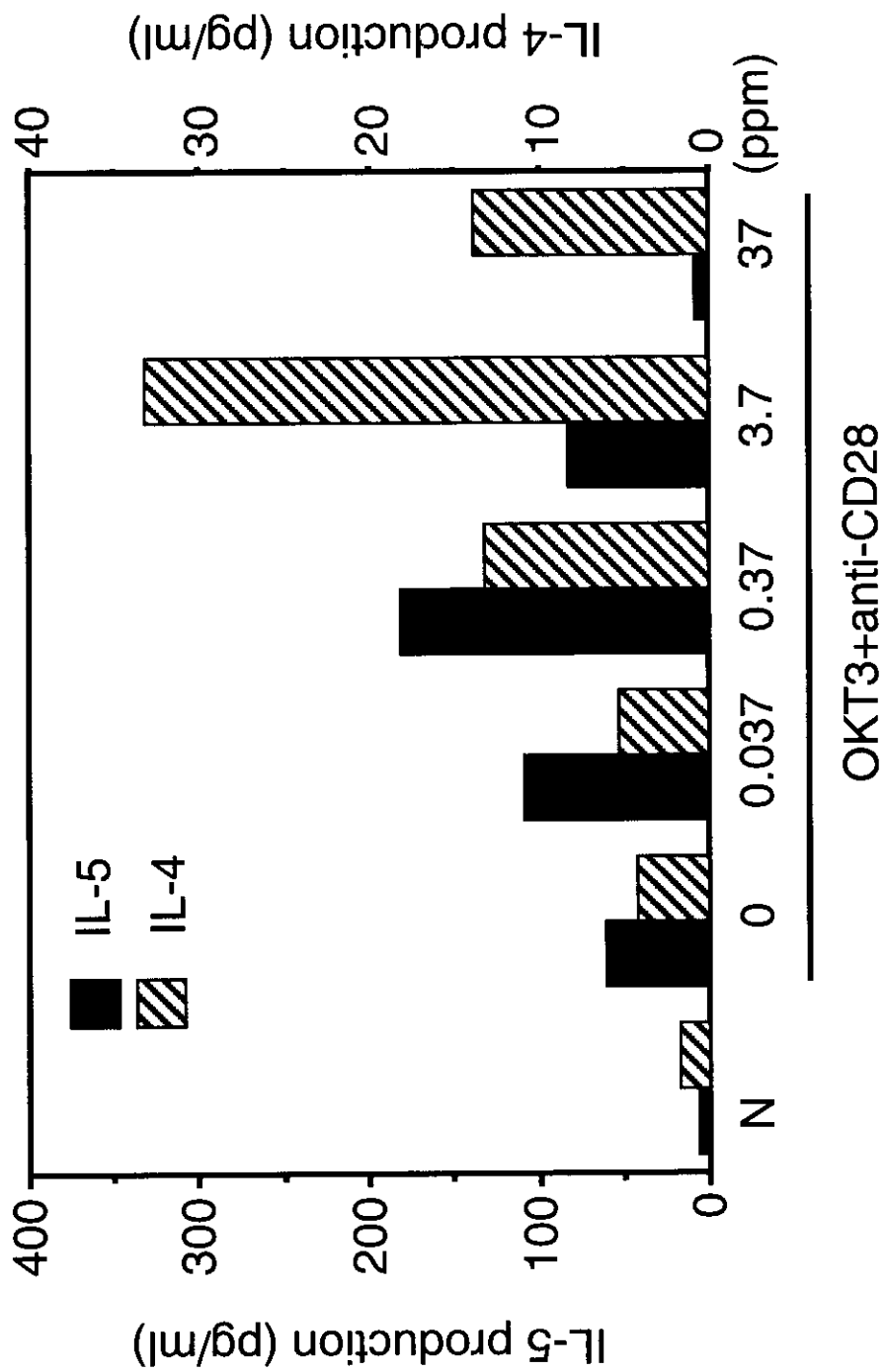


図8 ヒトT細胞クローンによるIL-4及びIL-5産生に及ぼすホルムアルデヒドの影響

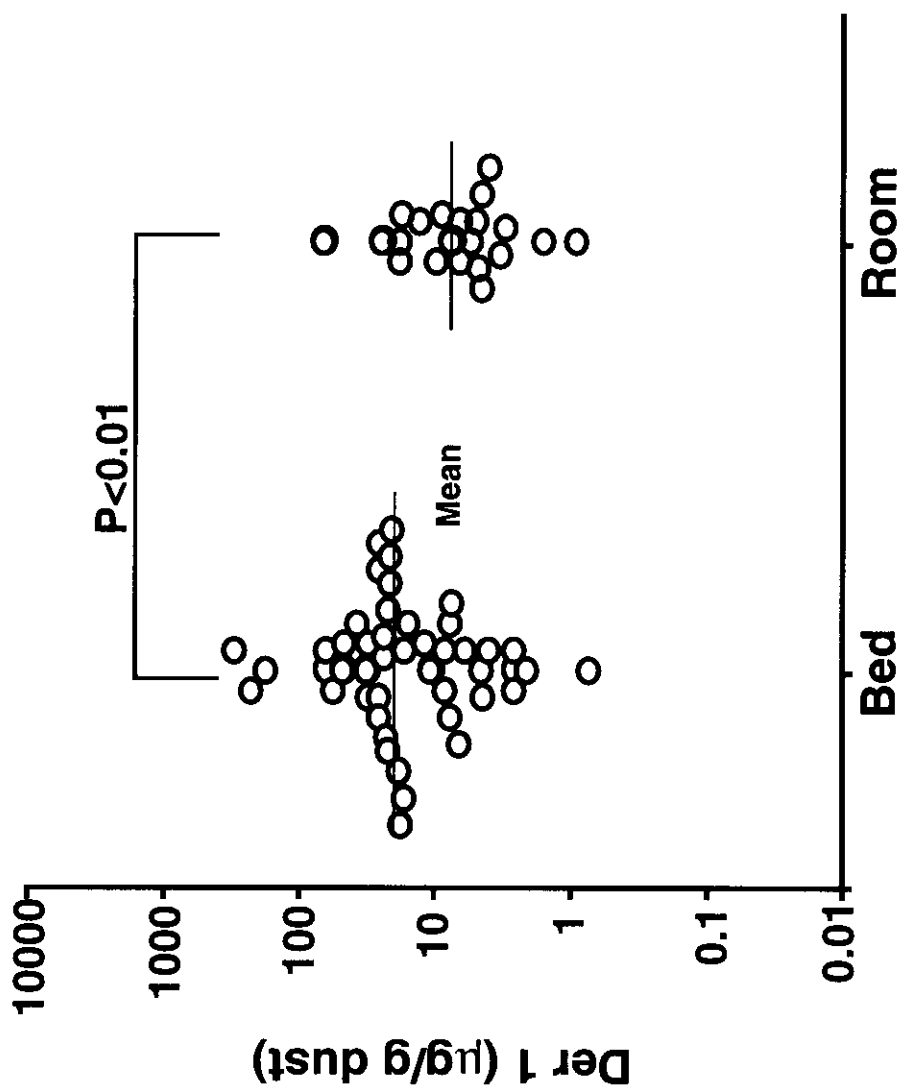
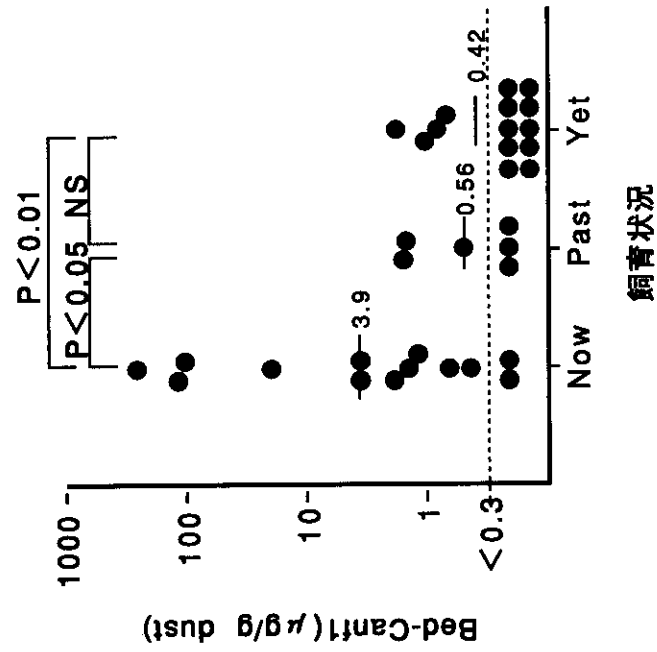
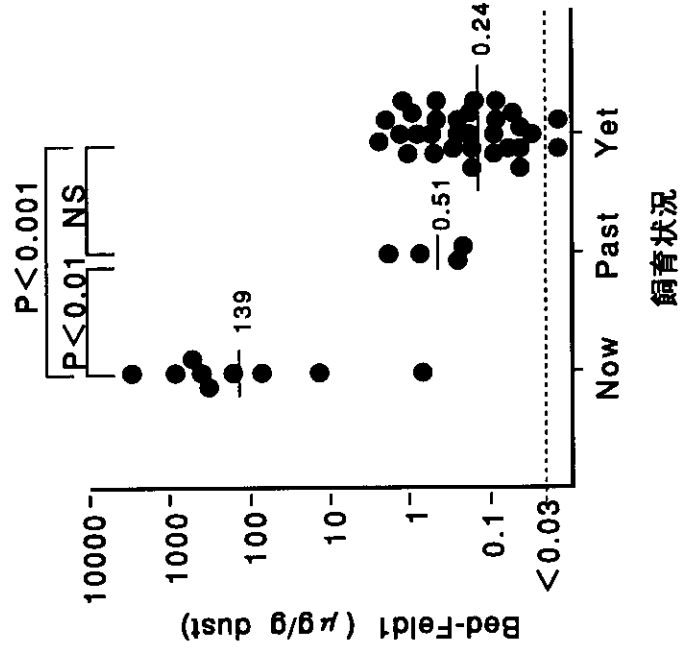


図9 気管支喘息患者の寝具塵と室内塵中のDer 1量



ネコの飼育状況と寝具塵中のFel d 1量

イヌの飼育状況と寝具塵中のCan f 1量

図10

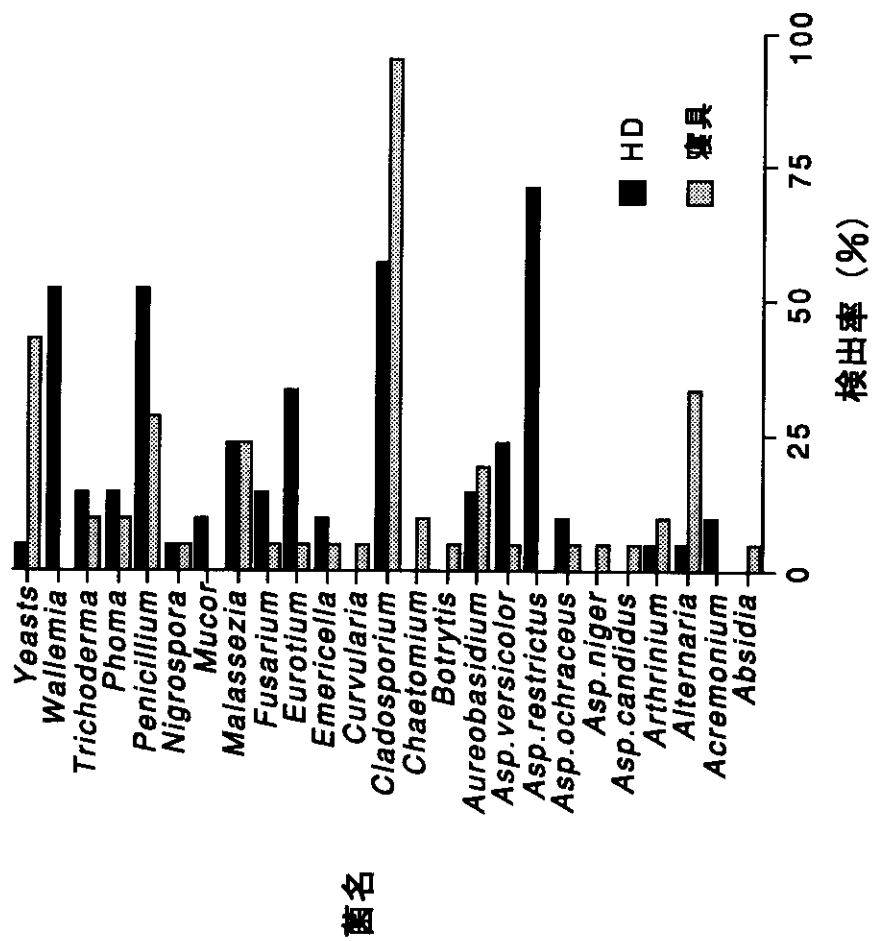


図 1 1 HDと寝具の真菌相

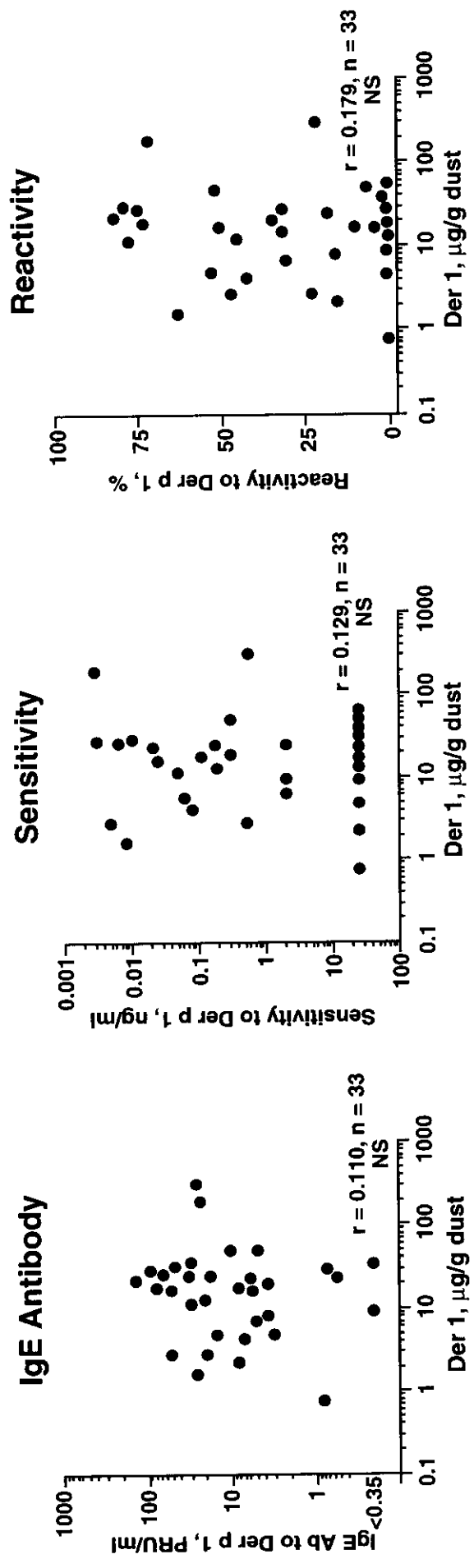


図12 寝具中のダニアレルゲン量とDer p 1に対する IgE抗体価, ヒスタミン遊離反応における Sensitivity, Reactivity の関係

図 1 3 建築構造とカビ、ダニ抗原量

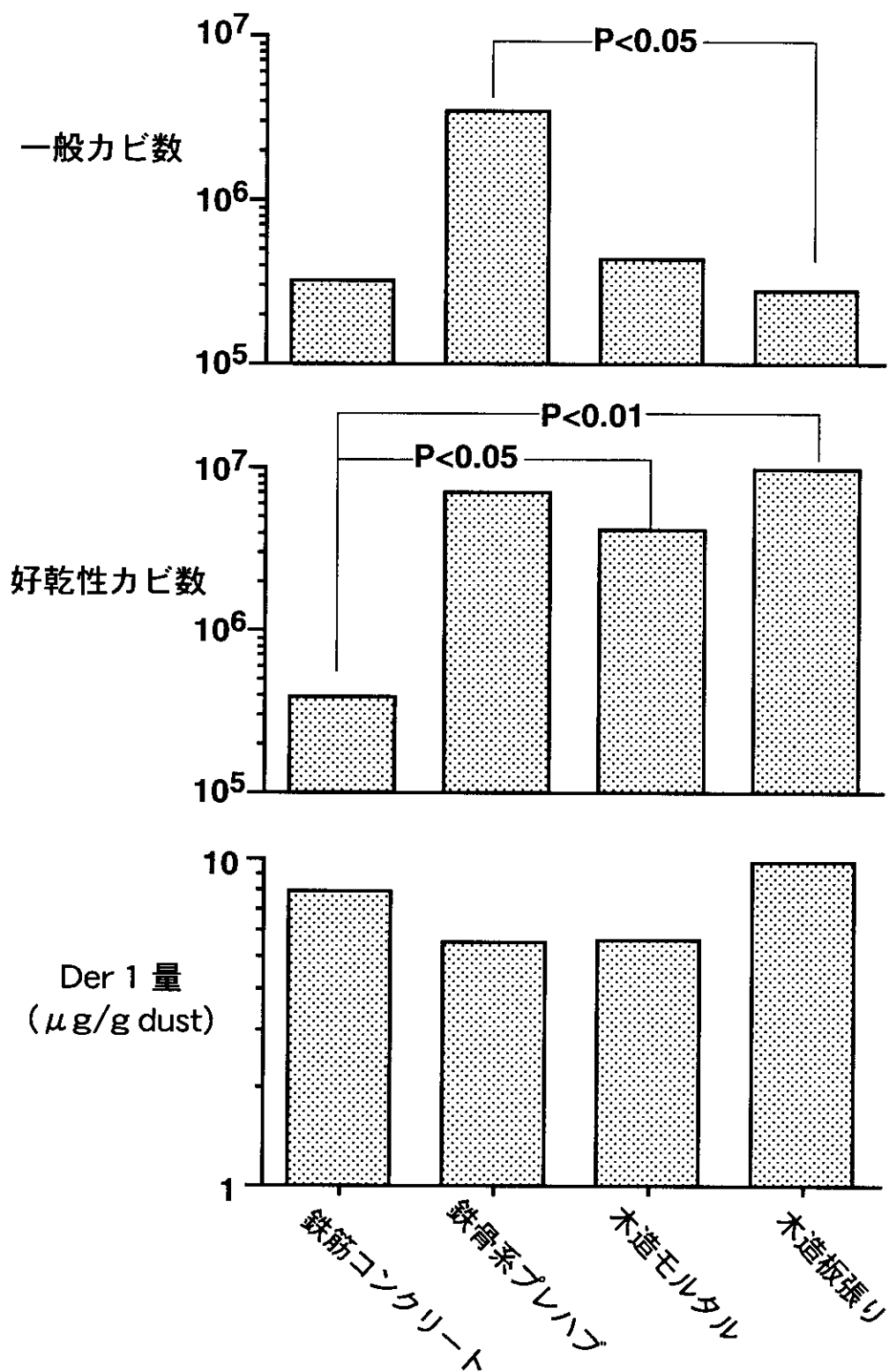


図14 じゅうたんとかび、ダニ抗原量

