

2003年4月～2004年2月の間に測定したものはMCS患者の自宅：12家屋、学校：2小学校、新築住宅：6家屋、健常者：2家屋であり（表3）、現在、全体的な解析作業を行っている。

#### D. 考察

我々の研究チームは平成12年度から厚生労働科学研究補助金「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」（主任研究者：石川 哲・北里研究所病院臨床環境医学センター長）研究班の分担研究班としてSHSの症例収集と、アレルギー性喘息との関連について研究をしてきた。その研究結果のまとめは下記のとおりである。

①小児の外来、及び一般フィールドの気管支喘息患者とMCS患者の相似性はアレルギー学的、室内環境、身体症状などの面では認められなかった。②ホルマリン特異的IgEは喘息患者、MCS患者ともすべてスコア0で有用性はなかった。③MCS患者は訴えが多臓器にわたって多彩であり、成人のアレルギー疾患患者とも異なり、自律神経失調症、慢性疲労症候群等との同異、鑑別を要する。④カプサイシン吸入試験による咳閾値の測定はMCSの診断に有用である。⑤室内VOCs値は全般的に低値であり、発症後の時間経過、住まい方や測定した季節を勘案する必要がある。発症早期の治療介入は有効なケースがあった。⑥医療チーム（アレルギー科、呼吸器科、心療内科、小児科、耳鼻咽喉科、皮膚科、眼科）、建築・設計分野、マスコミ、行政といった各領域が連携した体制を組まなければMCS患者が満足できるようなよりよい対応は困難である。

この研究チームで、その後も症例数を増やして検討した。とくに2003年に入り、家屋内のVOCs測定が軌道に乗り、VOCs高値の場合の住まい方の指導も行える体制が整ってきている。

初年度の結果では、（1）過去3年の研究の中でも大きな収穫となったカプサイシン吸入試験は、その有用性がさらに確認できた。（2）受診した時点でのVOCs測定では異常値を発見することは難しく、MCS様症状発現早期の測定が重要で、その環境改善もしくは環境からの離脱が必要である。そのための情報発信体制を作ることが急務である。（3）学校でのSHSの存在が最近、にわかにはクローズアップされたために学童の受診が増えている。そして、この

グループは、アレルギー素因を有するケースが多い傾向にあり、従来の中高年層に多いSHSとは背景を異にしている可能性がある、等が主なものであった。今後2年間で、以上のことを確認していく予定である。

#### E. 結論

SHSの患者集積が進み、56例となった。そのうち2003年初診者は14例であった。VOCs測定では多くは正常値を示したが、職場や新築マンションで明らかな異常値を示した症例も存在し、環境からの離脱で症状は軽快した。最近では小児の受診例が増えており、これらの患者群ではアトピー素因を有するものが多かった。

カプサイシン吸入試験の有用性がさらに確認された。

#### F、G、H.

なし

表1. MCS症例一覧

No.	MCS	年齢	性別	初診年月	主治医	症状	合併症	総点	RAST陽性(クラス2以上)	RAST (ホルマリン)
1	Y	62	F	H11.10	岸川	息苦しさ、臭いに過敏、頭痛、嘔吐		340.5	HD, ダニ	0
2	Y	39	M	H11.11	岸川, 横田, 西岡	息苦しさ、嘔気、頭痛	喘息	335	HD, ダニ, スギ	0
3	Y	41	M	H11.11	岸川	鼻汁、目のちらつき、倦怠感、肩凝り、目のかゆみ、熱		414	HD, ダニ, カモガヤ, アワ	0
4	Y	25	F	H12.1	岸川	咳、鼻汁、息苦しさ、目のかゆみ	メニエール, AR, 結膜炎	34	8種類なし	0
5	Y	65	F	H12.2	岸川	口涙、皮膚の乾燥、目のかゆみ				
6	Y	43	F	H12.5	岸川	咽頭痛、頭痛、肩凝り、倦怠感、抜け毛	自律神経失調症?		無	0
7	Y	58	F	H12.7	庄岡, 岸川	頭痛、眩暈、目のかゆみ	接触性皮膚炎?	126	11種類なし	0
8	Y	46	F	H12.7	岸川	頭痛、倦怠感、顔充血、倦怠感、抜け毛、咳、耳鳴り、血痰		134	HD, ダニ, スギ, カモガヤ	0
9	Y	27	M	H12.9	岸川	頭痛、顔充血		163	スギ, ヒノキ, カモガヤ	0
10	Y	29	F	H12.9	岸川	嘔吐、頭痛、顔充血			無	陽性 (パッチテスト)
11	Y	2	F	H12.9	寺尾	結膜充血、とびひ		8.4	9種類なし	0
12	Y	55	M	H12.12	西岡	後頭部のしびれ、慢性疼痛、全身倦怠感、頭痛、握力低下、記憶障害、産後	前立腺肥大症	7.8	無	0
13	Y	49	F	H12.11	西岡	倦怠感、多動脈、頭痛、鼻詰まり、息苦しい	左外耳道炎、クインケ浮腫	11	7種類なし	0
14	Y	44	M	H12.8	西岡	頭痛、咽頭痛、腎臓痛、うつ傾向	ホリープ	27	8種類なし	0
15	Y	49	F	H13.6	西岡	顔のヒリヒリ感、舌燥のしびれ、頭痛、頭痛、皮膚掻き	静脈炎、顔面神経炎、高血圧	0.6	6種類なし	0
16	Y	41	F	H13.3	岸川	イライラ、臭いに過敏、頭痛、不眠	うつ状態、スギ花粉症	87	HD, ダニ, スギ	0
17	Y	54	F	H12.12	西岡	多動脈、頭痛、咳、息苦しい	手足麻痺、中脳性顔面運動障害	11	4種類なし	0
18	Y	84	F	H12.11	寺尾	めまい、嘔吐			無	0
19	Y	24	F	H13.8	西岡	疲れ、下痢、動悸、部屋に居る、むくみ		121	ダニ、猫	0
20	Y	21	M	H13.10	西岡, 寺尾	股間がむずかしい、咳き	股間白癬、喘息	217	HD, ダニ, 猫	0
21	Y	30	M	H12.4	岸川	全身倦怠、耳鼻咽喉痛、四肢痛、耳管狭窄、鼻水、咳き、熱	慢性炎症性腸病、咽頭炎、耳管狭窄	141	HD, ダニ, スギ	0
22	Y	35	F	H13.7	西岡	咳き、動悸、失神、発熱、咽頭痛	自律神経失調症	132	無	0
23	Y	46	F	H13.10	西岡	喉痛、口内痛、頭痛、ひりひり、咳	更年期障害	22	9種類なし	0
24	Y	71	F	H13.10	横田, 西岡	咳き、喉痛、頭痛、胸痛、頭痛、不眠	HT, 心肝疾患	32	6種類なし	0
25	Y	20	F	H4.11	小田嶋	発疹、喘息発作気味、ふらつき、蕁麻疹	AD, 喘息	1457	HD, ダニ, アルト, スギ, 猫, 犬	0
26	Y	82	M	H13.11	西岡	しびれ、頭痛、左(ひじ、肘)痛、臭いに過敏、しゃっくり、息苦しい、頭痛、気分が悪い、熱っぽい		39	無	0
27	Y	21	F	H13.11	岸川	臭いに過敏、しゃっくり、息苦しい、頭痛、気分が悪い、熱っぽい		45	無	0
28	Y	48	M	H14.1	西岡	臭いに過敏、ひりひり、頭痛		18	無	0
29	Y	59	F	H14.1	岸川, 横田	不眠			無	0
30	Y	6	F	H14.1	西岡	咳き、息苦しさ		624	ダニ	0

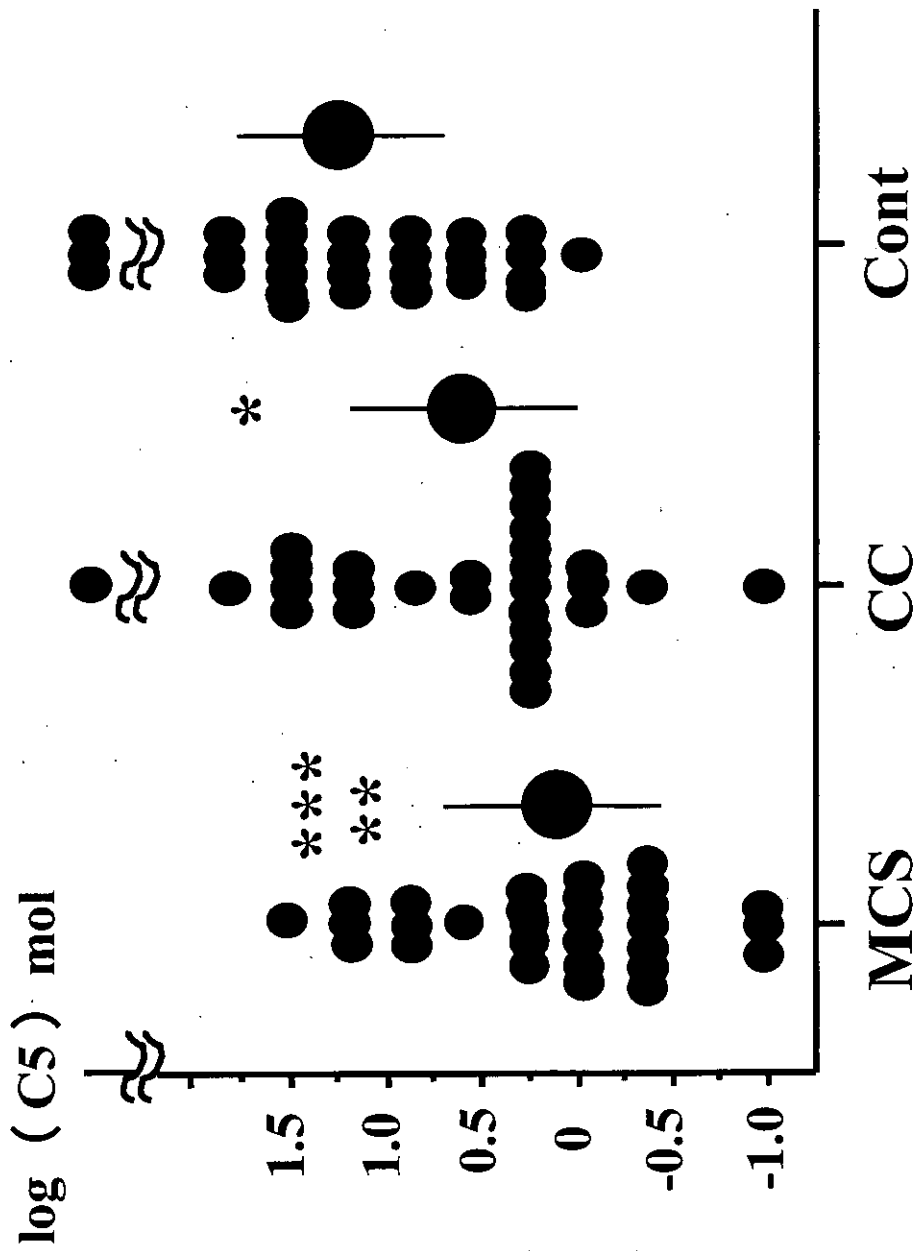
表1. MCS症例一覧

31	Y	76	M	H14.2				頭痛、頭痛		20	無
32	Y	33	F	H14.9				頭痛、頭痛、臭いに過敏		29	スギ
33	Y	4	M	H14.2	西岡	既い		身苦しさ、咳、鼻水	気管支炎	9	5種類なし
34	Y	55	F	H14.9	西岡			頭痛、倦怠、くしゃみ、嗅覚の低下		193	スギ
35	Y	53	F	H14.5	西岡	既い		湿疹、下痢		83	スギ
36	Y	62	M	H14.6	西岡			頭痛、湿疹		94	4種類なし
37	Y	37	F	H14.7	西岡			頭痛		119	ダニ
38	Y	49	F	H14.11	西岡	既い		不眠、下痢、結膜のただれ、鼻が痛い		128	1種類なし
39	Y	24	F	H14.12	西岡			臭いに過敏、湿疹、皮膚のかゆみ		2259	ダニ、スギ、猫、犬、小麦
40	Y	32	M	H14.12	西岡			鼻水、鼻づまり、吐き気、頭痛、喉の痛み、臭いに過敏		1077	スギ、カモガヤ
41	Y	29	F	H14.12	下田			頭痛、吐き気、手が震える、臭いに敏感		88	ダニ
42	Y	33	F	H14.10	西岡、横田	既い		臭かしい、口に物がたまる、不眠、喉の痛み、吐き気、食欲不振、めまい、臭いに敏感		1812	ダニ
43	Y	4	M	H15.1.20				鼻水、鼻づまり、臭かしい、嘔吐	気管支喘息	165	ダニ
44	Y	16	F	H15.2.17	下田	既い		広範囲の湿疹・腫れ	アトピー性皮膚炎	2517	HD、ダニ、カンジダ、スギ、ひのき、犬、猫、アスペルギルス、ビティロスポリウム
45	Y	32	F	H15.4.22		既い		上下肢の疼痛、全身の倦怠感、微熱、咳		11	7種類なし
46	Y	9	M	H15.5.20	西岡			気分不良、鼻血	肝機能障害	775	ダニ、猫、スギ
47	Y	63	F	H15.5.21	西岡			口唇のしびれ、足先が冷たい、臭かしい、めまい、臭いに敏感	鼻前庭湿疹	16	6種類なし
48	Y	34	M	H15.6.2	下田			めまい、胸のむかつき、舌根の異常、眼の充血、頭痛、微熱、臭いに敏感	アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、過敏性大腸炎		キンレン、ホルムアルデヒドに過敏性がある
49	Y	21	F	H15.6.4	西岡	既い		頭痛、不眠、味、臭いに敏感	アレルギー性鼻炎	28	5種類なし
50	Y	18	F	H15.6.4	西岡			頭痛、不眠、微熱	アレルギー性鼻炎	134	ダニ
51	Y	41	M	H15.7.9	西岡、横田			頭痛、慢性疲労、臭いに敏感		134	ダニ、スギ
52	Y	36	F	H15.10.15	西岡	既い		頭痛、嘔吐、咽頭痛、臭いに敏感、臭かしい		7.2	4種類なし
53	Y	8	F	H15.10.21				咳、臭いに敏感	嘔吐症、肺炎、胃腸炎	59	HD、ダニ、アルテルナリア
54	Y	9	F	H15.11.4	西岡			鼻水、鼻詰まり、吐き気、眼の充血、臭かしい	アレルギー性鼻炎、副鼻腔炎、気管支喘息	37	HD、ダニ、そば、卵白、ミルク
55	Y	86	F	H15.12.17		既い		多形紅斑、自汗、虚汗	自律神経失調症、肝機能低下	45	5種類なし
56	Y	51	F	H15.12.17				肺・皮膚がヒリヒリする、臭かしい		280	5種類なし
57											
		39=AVE	F=39人(70%)					頭痛23人(41%)		293=AVE	無30人(54%)
		21=SD	M=17人(30%)					臭いに過敏15人(27%)		563=SD	有26人(46%)
		86=MAX						臭さしざ14人(25%)		2517=MAX	HD11人(20%)
		2=MIN						頭痛9人(16%)		0.6=MIN	ダニ21人(38%)
								不眠7人(13%)		91=MIN	スギ14人(25%)

**Table 2 Characteristics of subjects**

<b>Group</b>	<b>MCS</b>	<b>CC</b>	<b>Cont</b>	<b>p</b>
<b>N(M/F)</b>	<b>29(9/20)</b>	<b>29(10/19)</b>	<b>29(14/15)</b>	<b>ns</b>
<b>Age</b>	<b>37.6 ± 18.7</b>	<b>46.4 ± 15.9</b>	<b>37.9 ± 9.5</b>	<b>ns</b>
<b>%FVC</b>	<b>93.4 ± 14.2</b>	<b>95.8 ± 11.1</b>	<b>98.2 ± 11.1</b>	<b>ns</b>
<b>FEV1.0/FVC%</b>	<b>87.0 ± 8.4</b>	<b>87.9 ± 7.5</b>	<b>86.6 ± 5.6</b>	<b>ns</b>

**MCS: multiple chemical sensitivity, CC: chronic cough, Cont: control**



**Fig. 1** The log of the capsaicin concentration causing five or more coughs (C5) were  $0.166 \pm 0.654$  in MCS,  $0.611 \pm 0.691$  in CC, and  $1.120 \pm 0.612$  in Cont, respectively. \* $p < 0.03$ , \*\*  $p < 0.0001$  compared to Cont, \*\*\*  $p < 0.05$  compared to CC. MCS: multiple chemical sensitivity, CC: chronic cough, Cont: control

表3 VOCs測定をした建物の概要

No.	住所	竣工日	測定日	測定個数		備考
				HCHO	BTX	
1	福岡市	平成14年1月	平成15年4月22～23日	6	6	MCS
2	福岡市	平成15年3月	平成15年6月5～6日	8	8	MCS
3	福岡市	平成15年6月	平成15年6月23～24日	5	5	新築住宅
4	長崎県	平成8年頃	平成15年7月4～5日	7	7	MCS
5	熊本県	平成2年2月	平成15年8月4～5日	5	5	MCS
6	熊本県	平成15年1月	平成15年8月4～5日	18	18	健常者
7	熊本県	平成15年7月	平成15年8月4～5日	10	10	健常者
8	熊本県	平成14年6月	平成15年8月5～6日	3	3	MCS
9	福岡市	平成10年2月	平成15年9月9～10日	4	4	MCS
10	福岡市	平成15年6月	平成15年9月18～19日	11	11	MCS
11	太宰府市	平成15年9月	平成15年9月18～19日	6	6	新築住宅
12	佐賀県	平成15年10月	平成15年10月22～23日	6	6	新築住宅
13	福岡市	昭和34年頃	平成15年10月30～31日	10	10	小学校
14	福岡市	平成元年頃	平成15年10月30～31日	4	4	MCS
15	福岡市	不明	平成15年11月11～12日	11	11	小学校
16	福岡市	昭和56年頃	平成15年11月11～12日	6	6	MCS
17	太宰府市	平成15年12月	平成15年12月25～26日	6	6	新築住宅
18	太宰府市	平成15年12月	平成15年12月25～26日	5	5	新築住宅

19	筑紫郡	平成15年12月	平成15年12月25～26日	6	6	新築住宅
20	福岡市	平成6年4月	平成16年1月14～15日	5	5	MCS
21	中間市	平成15年8月	平成16年1月27～28日	3	3	MCS
22	福岡市	平成6年頃	平成16年2月9～10日	6	6	MCS

厚生労働科学研究補助金（がん予防等健康科学総合研究事業）  
分担研究報告書

シックハウス症候群の疾患概念に関する臨床的・基礎医学的研究

—免疫学的機序と神経生理学的機序の関わりについての基礎的研究—

分担研究者 永井 博弐（岐阜薬科大学 薬理学教室 教授）

**研究要旨** 本研究では、マウス皮膚炎モデルを用いて、ホルムアルデヒド(FA)反復塗布による皮膚症状への影響を 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) と比較検討した。すなわち、マウスの耳介の表裏に 0.15%の DNFB あるいは 1-10%の FA を週 1 回、計 5 回反復塗布し反応を惹起した。その結果、FA 塗布群では、塗布濃度に依存した耳介腫脹の増大が観察された。特に 2 回目の塗布 1 時間後では一過性の著しい腫脹が観察された。一方、3 回目の塗布以降は即時型の顕著な腫脹は見られなくなったが、塗布回数が増加に従い、1 および 2 4 時間後をピークとする 2 相性の反応が認められた。また、5%および 10%塗布群では、4 回目の塗布以降で血清中総 IgE 値の有意な上昇が観察された。以上のように、FA の反復塗布によって皮膚過敏反応が認められ、塗布回数に依存して皮膚反応の増大ならびに IgE 値の上昇が認められた。

研究協力者

稲垣直樹（岐阜薬科大学薬理学教室・助教授）

田中宏幸（岐阜薬科大学薬理学教室・助手）

A. 研究目的

シックハウス症候群は、室内のアルデヒド類やその他の揮発性有機化合物に曝露されることにより、多臓器にわたって臨床症状が発現されると考えられている機序不明の病態である。症状も多彩であり、アレルギー様症状、自律神経症状、皮膚症状などが出現することが示されている。病因に関しては、病原微生物、アレルギーおよび揮発性有機化合物などが考えられているが、このうち室内の揮発性有機化合物が重要とされている。特に、ホルムアルデヒド(FA)は、建材、塗料、衣料品、紙など広範に使用されており、日常的に接触・曝露される機会が多いと考えられる。しかし、接触による皮膚症状の程度・閾値ならびに機序に関しては不明である。

一方、教室ではこれまでに 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)を用いてマウス抗原反復塗布による皮膚炎モデルを作成し、その発症機序に関して種々の検討を行ってきた。本モデルでは、ハプテン抗原として

DNFB によりマウスが感作され、反復塗布により 24 時間後をピークとする遅発型過敏反応から 1 および 24 時間後をピークとする 2 相性皮膚反応が認められる点が特徴である。また、いわゆる Th1 優位な接触性過敏反応が、ハプテン抗原の反復塗布により Th2 優位な反応へとシフトする点もその特徴として挙げられる。これらの知見から、FA も DNFB と同様にハプテン抗原として機能する可能性が考えられるが、詳細は不明である。

そこで本研究では、マウスの両耳介に FA を反復塗布した際の耳介皮膚反応を観察し、その影響を DNFB 塗布マウスと比較検討した。

B. 方法

実験は、当教室のマウス DNFB 皮膚炎モデルのプロトコールに従って行った。すなわち、雄性 BALB/c マウスの両耳介の表裏に 1、2、5 および 10%の FA あるいは 0.15%の DNFB を週 1 回、計 5 回反復塗布し反応を惹起した。各物質塗布前後の種々の時間に、炎症反応の評価として耳介の厚みを測定した。また、各物質塗布 24 時間後に、血清を採取し、総 IgE 抗体量ならびに抗 dinitrophenyl (DNP)-IgE 抗体を ELISA にて測定した。

なお、本実験における実験動物の取り扱いなら



びに実験方法に関しては、本学バイオセーフティ委員会承認を受け、その規約を遵守した。

#### C. 結果

対照の DNFB 塗布群では、塗布回数に依存して塗布 24 時間後の耳介腫脹の増大が観察された。特に、5 回目の抗原塗布後には 1 時間および 24 時間後をピークとする 2 相性の皮膚反応が観察された。また、3 回目の DNFB 塗布 24 時間後から、総 IgE 抗体ならびに抗原特異的 IgE 抗体の有意な上昇が観察された。

一方、FA 塗布群では、塗布濃度に依存した耳介腫脹の増大が観察された。特に、1 および 2 回目の塗布 1 時間後では、一過性の著しい腫脹が観察された。これに対し、3 回目の塗布以降では、このような即時型の顕著な腫脹は観察されなかったが、塗布回数に従って 1 および 24 時間後をピークとする 2 相性の皮膚反応が観察された。また、5% および 10% 塗布群では、4 回目の塗布 24 時間後において、血清中総 IgE 値の有意な上昇が観察された。そこで、FA 塗布群ならびに vehicle 塗布群において、血清中総 IgE 値と耳介腫脹との相関性を検討したところ、高い相関係数が得られた( $r=0.749$ )。

また、FA 塗布群では、1 および 2 回目の塗布直後から、興奮性行動が観察されたが、5 回目の抗原塗布後では、このような行動変化は観察されなかった。

#### D. 考察

本研究では、シックハウス症候群の原因物質の一つであると考えられている FA による接触性皮膚炎を解析した。その結果、これまでに教室で検討してきたハプテン抗原である DNFB とは異なり、FA の塗布により即時性の顕著な耳介腫脹が観察され、この変化は興奮性行動変化と関連していることが示唆された。一方、3 回目の塗布以降では、2 回目までに観察された塗布直後の一過性の腫脹は観察されず、DNFB の反復塗布同様、回数に依存した腫脹の増大が観察され、特に 4 および 5 回目の塗布では 1 および 24 時間後をピークとする 2 相性の皮膚反応が観察された。従って、FA も DNFB と同様にハプテン抗原として皮膚の腫脹に関与していると思われる。

本研究では、FA 特異的 IgE 値を測定していないため、FA による耳介腫脹に IgE 依存性の反応がどの程度関与しているかは不明である

が、少なくとも 2 相性の耳介腫脹が観察された 4 および 5 回目の塗布 24 時間後の血清では総 IgE 値の上昇が認められたため、関連性はあるように思われる。

また、本研究では、耳介組織・所属リンパ組織ならびに中枢組織をそれぞれ凍結保存した。今後、組織学的検討・耳介組織ならびに所属リンパ組織におけるサイトカイン発現変動・中枢における遺伝子変動などを行う予定であり、これらの実験を通じて得られた知見をもとに、FA による皮膚症状誘発の機序を解析する予定である。

#### E. 結論

FA の反復塗布によって、特に即時型皮膚過敏反応が認められ、曝露回数に依存して皮膚反応の増大ならびに総 IgE 値の上昇が認められた。

#### F. 健康危惧情報

特になし。

#### G. 研究発表

特になし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

## ホルムアルデヒドによる知覚神経刺激及び神経原性炎症におけるパニロイド受容体（VR1）の役割

### —動物モデルを用いた検討

分担研究者 坂本龍雄（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学）

研究協力者 二村昌樹（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学）

木村量子（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学）

白崎英明（札幌医科大学耳鼻咽喉科）

**研究要旨** ホルムアルデヒドによる知覚神経刺激及び神経原性炎症におけるパニロイド受容体（VR1）の役割を動物モデルを用いて検討した。研究の第一段階として、VR1 受容体拮抗薬であるカプサゼピンを用いた *in vivo* モデルを確立するため、ラットの腹部皮膚へのカプサイシン塗布によって惹起される血管透過性亢進に及ぼすカプサゼピンの抑制効果を検討した。その結果、（1）ラットの腹部皮膚にカプサイシンエタノール溶液を塗布すると、濃度依存性に血管透過性亢進が引き起こされた（2）カプサゼピンを前塗布することで、この皮膚反応が濃度依存性に抑制されることから、VR1 がこの反応に介在していることが明らかとなった、（3）カプサゼピンを全身投与してもこの皮膚反応が抑制されなかったことから、アゴニスト様反応を引き起こさない量のカプサゼピンの全身投与では、皮膚への薬剤到達が十分ではない可能性が考えられた。カプサゼピンの局所投与方法を用いれば、この薬剤のホルムアルデヒド塗布による血管透過性亢進に対する抑制効果を検討することが可能と思われる。

#### A 研究背景・目的

眼・鼻・喉部の刺激感や皮膚搔痒感はシックハウス症候群（SHS）の代表的な症状であり、これらの症状はホルムアルデヒドなどの室内空気汚染物質が眼・気道粘膜や皮膚などを直接刺激して引き起こされると考えられる。その機序のひとつに、侵害受容性一次求心性線維である無髄性の C 線維が刺激されタキキニンと呼ばれる一群のペプチド性神経伝達物質が放出され、痛みや搔痒などの刺激症状とともに慢性の炎症（神経原性炎症）を引き起こすことが知られている。

ホルムアルデヒドやカプサイシンは C 線維を選択的に刺激する物質であるが、このうちカプサイシンは C 線維上に分布するパニロイド受容体（VR1）を介して C 線維を刺激することが分かっ

ている。近年、VR1 遺伝子がクローニングされ、この受容体が 6 回膜貫通型の非選択性陽イオンチャンネルであることが明らかとなった。また、カプサイシン刺激だけでなく、43℃以上の熱によっても活性化されること、さらには、細胞外側からのプロトンに反応することも証明されている（閾値は pH 6.0、EC<sub>50</sub> は約 pH 5.4）。このほかにも VR1 はブラジキニン、5-リポキシゲナーゼ代謝産物、ヒスタミン、アナンダマイドなどの生体内物質によっても活性化される。

ホルムアルデヒドによる C 線維刺激の機序は明らかではないが、VR1 が関与するとすると次のような可能性が想定される。

- （1）ホルムアルデヒドがカプサイシンの如く VR1 を直接刺激する。

- (2) ホルムアルデヒドがブラジキニンのような生体内 VR1 活性化物質を産生・遊離し、これらの物質を介して VR1 を刺激する。
- (3) ホルムアルデヒドが C 線維終末部周辺を酸性化し、プロトンを介して VR1 を刺激する。
- (4) ホルムアルデヒドの反復・慢性曝露により神経原性炎症が惹起された場合、慢性炎症に伴う組織の酸性化 (<pH 6) により VR1 が活性化される。

ホルムアルデヒドによる C 線維刺激及び神経原性炎症における VR1 の役割を薬理的に証明するためには、VR1 拮抗薬を用いてその効果を評価する方法が有用である。しかし、VR1 拮抗薬の代表であるカプサゼピンは VR1 に対する親和性が低く、投与量を増加させると中毒様・アゴニスト様反応が出現しやすい。また、水溶性でないため、DMSO やエタノールに溶解し、Tween 80 などの界面活性剤を含む水溶液で希釈して用いるが、皮内や粘膜面に局所投与すると C 線維を刺激する可能性があるため、*in vivo* の実験に用いることが難しい。我々もカプサゼピンエタノール (100%) 溶解液を Tween 80 と水がそれぞれ 1:1:8 になるように溶解し、気管内吸入や皮内注射を試みたが、生理的食塩水に比較して有意な血漿漏出が引き起こされた。

ホルムアルデヒドによる C 線維刺激及び神経原性炎症における VR1 の役割を解明する第一歩として、「カプサゼピンがカプサイシンの反応を抑制する *in vivo* のモデル」の作成を試みた。なお、次年度にこのモデルにホルムアルデヒド刺激を導入する予定である。

## B 研究方法

実験 1. カプサイシン塗布による皮膚血管透過性亢進における濃度依存性の検討

体重 250~350g の Wistar 雄性ラットにチアミラールを腹腔内投与し、全身麻酔下で腹部皮膚を剃毛した。エバンスブルー染色液 (20 mg/kg、1 ml/匹) を尾静脈から静注し、同一ラットの腹部にエタノール (100%) 及びカプサイシンエタノール溶液 (0.4、2、10、50 mM) を 20 µl ずつ滴下し、直径 2 cm の円内に引きのばした。20 分後に灌流死させ、カプサイシンまたはエタノールを塗布した皮膚片 (直径 2 cm) を採取し、2 ml のホルママイド溶液に浸透させてエバンスブルーを抽出した (37 °C、48 時間)。抽出液の 620 nm の吸光度を測定し、この値を皮膚組織に漏出したエバンスブルー量とした。

実験 2. カプサイシン塗布による皮膚血管透過性亢進に及ぼすバニロイド受容体拮抗薬カプサゼピン局所投与の効果

実験 1 と同様のラットを用い、同様に全身麻酔・剃毛を行った。エバンスブルー染色液 (20 mg/kg、1ml/匹) を静注後、エタノール (100%) 及びカプサゼピンエタノール溶解液 (2.5、7.5、22.5 mM) を 20 ml ずつ腹部に滴下し、直径 2 cm の円内にすばやく引きのばした。続いて 3 分後に 10 mM のカプサイシンエタノール溶液をこの上に重層塗布し、20 分後に灌流死させ、皮膚片を採取した。組織中のエバンスブルー量を実験 1 と同様の方法で測定した。

実験 3. カプサイシン塗布による皮膚血管透過性亢進に及ぼすカプサゼピン全身投与の効果

実験 1 と同様のラットを用い、同様に全身麻酔・剃毛を行った。エタノール (100%) またはエタノールに溶解したカプサゼピン (0.01、0.1、1 mg/ml) と Tween 80 と生理的食塩水がそれぞれ 1:1:8 となるように混合溶解し、尾静脈より静注した (1 ml/匹)。続いてエバンスブルー溶液 (20 mg/ml、1ml/匹) を同じルートから投与した。同

ラットの腹部にエタノール（100%）及びカプサイシンエタノール溶液（10mM）を 20  $\mu$ l ずつ滴下し、直径 2 cm の円内に塗布した。20 分後に灌流死させ、皮膚片を採取し、組織中のエバンスブルー量を実験 1 と同様の方法で測定した。

**実験 4. カプサイシン塗布による皮膚血管透過性亢進に及ぼすタキキニン NK1 受容体拮抗薬 CP-99,994 全身投与の効果**

実験 1 と同様のラットを用い、同様に全身麻酔・剃毛を行った。生理的食塩水及び生理的食塩水に溶解した CP-99,994（0.2、1、5 mg/kg）を尾静脈から静注（1 ml/匹）し、続いてエバンスブルー染色液（20 mg/kg、1 ml/匹）を同じルートから投与した。同一ラットの腹部にエタノール（100%）及びカプサイシンエタノール溶液（10 mM）を 20  $\mu$ l ずつ滴下し、直径 2 cm の円内に塗布した。20 分後に灌流死させ、皮膚片を採取し、組織中のエバンスブルー量を実験 1 と同様の方法で測定した。

統計方法—実験結果はすべて平均値 $\pm$ 標準誤差（Mean $\pm$ S.E.M.）で表記した。独立した 2 群間の有意差検定には、等分散（F 検定で評価）の場合、unpaired Student's t-test を用い、不等分散の場合は Welch's test を使用した。独立多群間の有意差は Dunnett test を用いて検定した。なお、危険率（P）が 5%未満の場合に有意差ありと評価した。

### C 研究結果

**実験 1. エタノール単独塗布後の皮膚に含まれるエバンスブルー量は、まったく無刺激の皮膚中のエバンスブルー量と有意差を認めず、エタノール単独塗布は皮膚への血漿漏出を惹起しないことが明らかになった。肉眼的所見でも、両者に皮膚の青染がまったく認められなかった。一方、カプサイシン塗布は濃度依存性に皮膚へのエバンスブルー漏出を引き起こした（図 1）。エタノール単独塗**

**布と 2 mM 以上の濃度のカプサイシン塗布間に有意差を認めることから、2 mM 以上のカプサイシン塗布は有意に皮膚血管透過性亢進を引き起こすことが証明された。**

**実験 2. コントロール（カプサイシン単独塗布）と比較して、カプサゼピン塗布群では濃度依存性に皮膚へのカプサイシン塗布によるエバンスブルー漏出が抑制された（図 2）。最大濃度のカプサゼピン塗布では 60%以上の抑制率が得られた。なお、今回使用した最大濃度のカプサゼピンの単独塗布ではエバンスブルーの有意な漏出は確認されなかった。**

**実験 3. 10  $\mu$ mol/kg のカプサゼピンを静注すると単独で皮膚血管透過性亢進を引き起こすことから、1  $\mu$ mol/kg を最大投与量としてカプサゼピンを静注した。しかし、この用量のカプサゼピンではカプサイシン塗布による皮膚へのエバンスブルー漏出に有意な影響を及ぼさなかった（図 3）。また、カプサゼピンの静注はエタノールを単独塗布した皮膚片に含まれるエバンスブルー量に影響を及ぼさなかった。**

**実験 4. CP-99,994 は、カプサイシン塗布による皮膚へのエバンスブルー漏出を用量依存性に抑制した。そして、最大用量の 5 mg/kg の CP-99,994 はカプサイシンによる皮膚反応を完全に抑制した（図 4）。また、CP-99,994 の静注はエタノールを単独塗布した皮膚片に含まれるエバンスブルー量に影響を及ぼさなかった。**

### D まとめ

- （1）ラットの腹部皮膚にカプサイシンエタノール溶液を塗布すると、濃度依存性に血管透過性亢進が引き起こされた。
- （2）この皮膚反応が CP-99,994 で完全に抑制されたことから、カプサイシン塗布により C 繊維終末部からタキキニンが遊離され、こ

れが血管内皮細胞上のタキキニン NK1 受容体を刺激して血漿漏出を引き起こしたと考えられた。

- (3) カプサゼピンを前塗布することでこの皮膚反応が濃度依存性に抑制されることから、VR1 がこの反応に介在していることが明らかとなった。
- (4) カプサゼピンを全身投与してもこの皮膚反応が抑制されなかったことから、アゴニスト様反応を引き起こさない量のカプサゼピンの全身投与では、皮膚への薬剤到達が十分ではない可能性が考えられた。
- (5) カプサゼピンの局所投与法を用いれば、この薬剤のホルムアルデヒド塗布による血管透過性亢進に対する抑制効果を検討することが可能と思われる。

#### E 研究発表

第 16 回日本アレルギー学会春期臨床大会（前橋、2004）にて発表予定

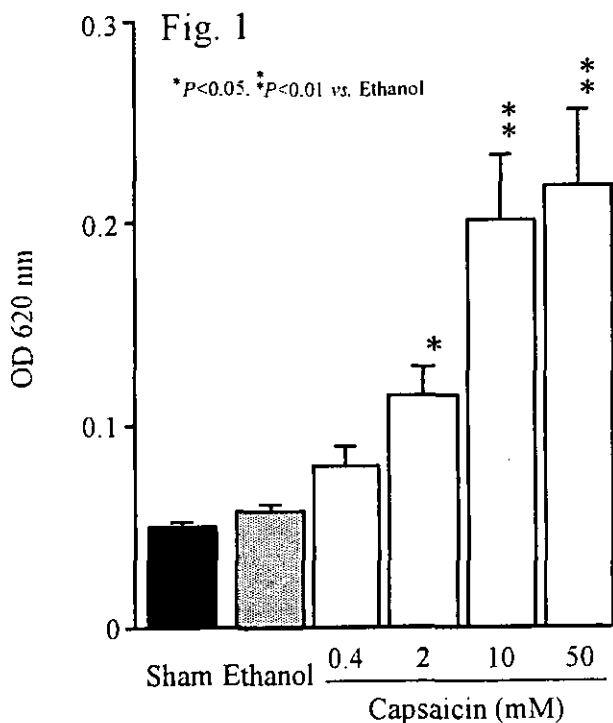


Fig. 1 : カプサイシン塗布による皮膚血管透過性亢進における濃度依存性の検討

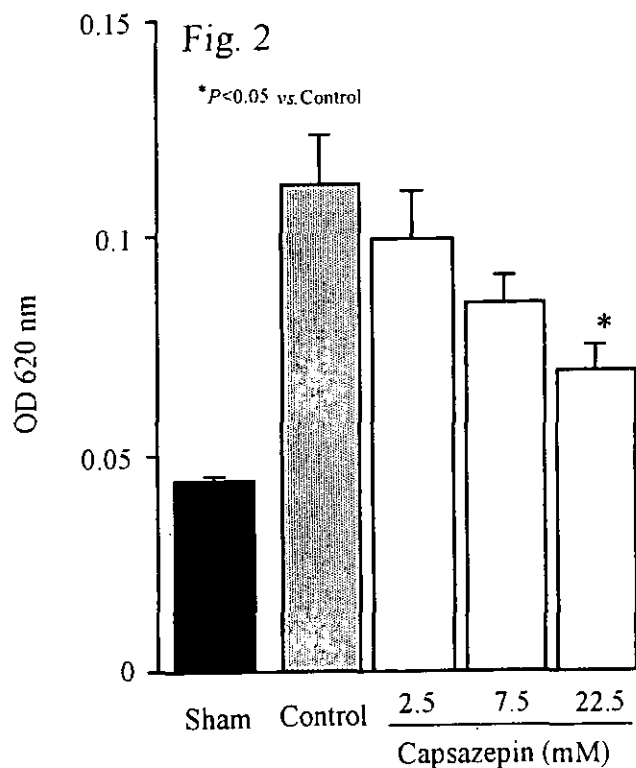


Fig. 2 : カプサイシン塗布による皮膚血管透過性亢進に及ぼすバニロイド受容体拮抗薬カプサゼピン局所投与の効果

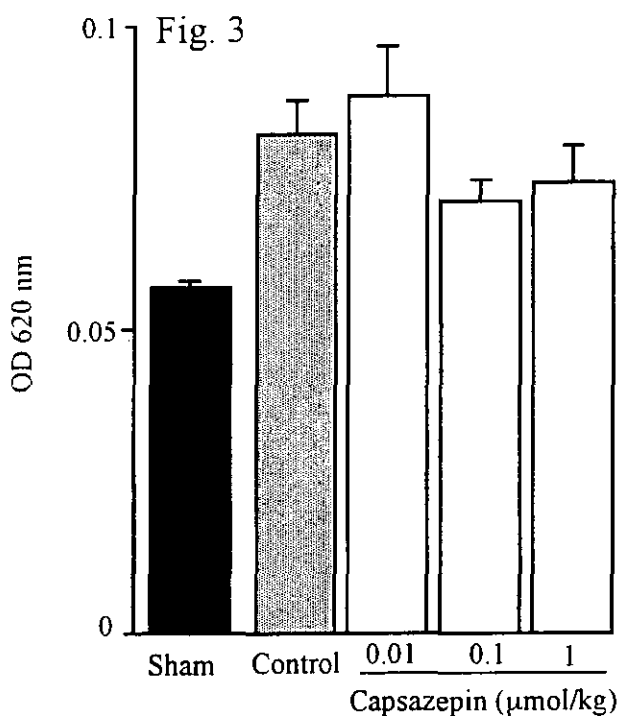


Fig. 3 : カプサイシン塗布による皮膚血管透過性亢進に及ぼすカプサゼピン全身投与の効果

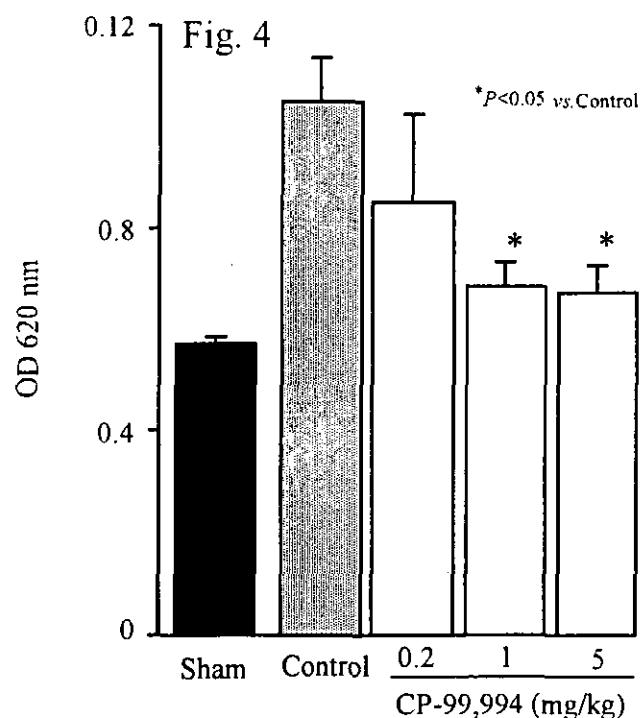


Fig. 4 : カプサイシン塗布による皮膚血管透過性亢進に及ぼすタキキニンNK1受容体拮抗薬CP-99,994全身投与の効果

ホルムアルデヒド吸入暴露がラットの気道知覚神経 C 繊維に及ぼす傷害作用について

分担研究者 坂本龍雄（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学）  
研究協力者 二村昌樹（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学）  
木村量子（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学）

**研究要旨** 我々はラットにおいてホルムアルデヒド吸入が濃度依存性に気道の血漿漏出を引き起こすこと、またホルムアルデヒドが気道粘膜上皮に分布する知覚神経 C 繊維末端を刺激し、タキキニン遊離により血管内皮上の NK1 受容体を介して血漿漏出を起こすことを報告した。今回、我々は、ホルムアルデヒドを比較的長期間吸入暴露し、内因性および外因性タキキニンによる気道の血管透過性亢進に及ぼす影響を完全麻酔・人工換気下の Wistar ラットを用いて検討した。その結果、(1)ホルムアルデヒド吸入（1、5、15 ppm）による気道への血漿漏出は吸入後 15 分間以内に引き起こされ、15 分以後の吸入では血漿漏出は惹起されなかった。(2) 30 分間のホルムアルデヒドの前吸入（1、5 ppm）により、5 ppm ホルムアルデヒドによる気道への血漿漏出が濃度依存性に抑制された、(3) カブサイシン静脈内投与後の気道への血漿漏出は、ホルムアルデヒド吸入（1、5 ppm）の前吸入により濃度依存性に抑制された、(4) サブスタンス P 静脈内投与における気道への血漿漏出は、ホルムアルデヒド吸入（1、5 ppm）の前吸入により影響されなかった。以上の結果より、ホルムアルデヒド吸入後にみられる内因性タキキニンによる気道血管透過性亢進の抑制は、ホルムアルデヒドが C 繊維末端からのタキキニン遊離機能を傷害したことによって引き起こされたと考えられるた。

**A 研究背景・目的**

ホルムアルデヒドは強力な粘膜刺激性をもち、職業性喘息やシックビル症候群への関与が指摘されている。それに加えて、一般住宅の室内にも多くの発生源（壁板、カーペット、衣服、化粧品、タバコ煙等）が存在することから、室内汚染ガスとして、我々は日常的に暴露される危険性がある。我が国でのホルムアルデヒド室内汚染の実態調査によると、新築住宅の室内空気は 0.5-1 ppm のホルムアルデヒドで汚染されているといわれている。ホルムアルデヒドはタバコ煙の主要成分のひとつであり、タバコ煙と同様、ホルムアルデヒドの慢性暴露が呼吸機能低下をもたらすという、成人を対象とした研究結果が報告されている。今回、本研究で扱った 1-15 ppm というホルムアルデ

ヒドの濃度は、タバコの副流煙中のホルムアルデヒド濃度に十分に匹敵する値であり、受動喫煙時にもこの程度のホルムアルデヒドに暴露される可能性は十分にあり得る。

以前、我々は、ラットを用いてホルムアルデヒド吸入による気道反応を検討した。その結果、(1)ホルムアルデヒドは 2-45 ppm にて気管・主気管支に濃度依存性に有意な血漿漏出を引き起こしたが、気道収縮反応は観察されなかった。(2)ホルムアルデヒド吸入による気道反応は、タキキニン NK1 受容体拮抗剤 CP-99,994 により完全に抑制されたことから、ホルムアルデヒドは気道粘膜上皮に分布する知覚神経 C 繊維末端を刺激し、タキキニンを遊離させ、そのタキキニンが血管内

皮上の NK1 受容体を刺激して血漿漏出を引き起こしたと考えられた。

こうした気道反応に関与するタキキニン<sup>1</sup>は C 繊維の細胞体で生成され、軸索を下行して C 繊維末端部に貯留されたものである。大量のカプサイシンを投与し、末端部のカプサイシンを枯渇させると一過性の「脱知覚」が引き起こされることが知られている。C 繊維末端からのタキキニン遊離は様々な内因性物質により presynaptic にコントロールされている。また、血管内皮細胞表面に発現した NK1 受容体をタキキニンが刺激すると、NK1 受容体が細胞内に取り込まれ (internalization)、その後一過性にタキキニンに対して反応しなくなる現象が知られている。これらのことから、ホルムアルデヒドを連続吸入させると、内因性または外因性タキキニンによる気道の血管透過性亢進が減弱する可能性が予想される。そこで、我々は、ラットにホルムアルデヒドを前吸入させ、ホルムアルデヒド、カプサイシン、サブスタンス P による気道血管透過性亢進に及ぼす影響を検討した。

## B 研究方法

### B-1 実験動物

実験手技は、名古屋大学医学部動物実験指針 (1989) に従って行った。また、本実験は名古屋大学医学部動物実験委員会の承認を得て行われた。6~7 週齢の Wistar 雄性ラット (SPF、体重 200~250g) を Japan SLC Inc. (浜松) から購入した。すべてのラットは、温度がコントロールされた部屋で飼われ、餌と水は常時与えられた。

### B-2 試薬

Capsaicin、Evans blue dye、formalin、formamide、substance P は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) から購入した。Ethanol は Katayama Chemical Industries (大阪) から、0.9% 生食は Otsuka Chemical Co. (東京) から、thiamylal sodium は Kyorin

Pharmaceutical Co. (東京) から、4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole は Wako Pure Chemical Industries (大阪) から購入した。Capsaicin は 30mg/ml となるように ethanol に溶解し、ethanol、Tween 80、0.9% 生食の比率が 1:1:8 となるように混合し、溶解した。Evans blue dye (以下 EBD と略す) は 0.9% 生食で溶解させ、5  $\mu$  m Millipore filter (Millipore Products Division, Bedford, MA) を通した。Thiamylal は 0.9% 生食で 10 mg/ml に希釈して用いた。

### B-3 気道内圧の測定

ラットを thiamylal (100 mg/kg) の腹腔内投与にて全身麻酔した。麻酔のレベルを維持するために、必要に応じて thiamylal (50 mg/kg) を追加投与した。気管切開を行い、喉頭下部に気管カニューラ (長径 8 mm、内径 1.3 mm) を挿入した。左頸動脈にポリエチレンカテーテルを挿入し、圧トランスデューサー (TP-400T、Nihon Kohden、東京) に接続して平均動脈圧 (BP) を測定した。また、右頸静脈にもカテーテルを挿入し、薬液の投与ルートとした。ラットを仰臥位にし、1 回換気量を 8 ml/kg、呼吸回数を毎分 90 回に設定した従量式人工呼吸器 (KN-55、Natume、東京) に接続した。圧トランスデューサー (TP-400T、Nihon Kohden) を、気管カニューラ接続部に近接した呼気ルートに接続し、この圧を気道内圧 (PIP) として測定した。トランスデューサーからの PIP と BP のシグナルを、アンプ (AP-601G、Nihon Kohden) により増幅し、2 チャンネルレコーダー (RTA-1100、Nihon Kohden) により記録した。

### B-4 気道組織への血漿漏出の測定

血管透過性亢進の指標として、血中 albumin と結合した EBD の組織中の漏出量を測定した。なお、気道において、EBD の血管外漏出量は放射線同位元素で標識した albumin の血管外漏出とよ



く相関することが既に証明されている。全身麻酔下に開胸し、左心室から大動脈へカニューラを挿入し、120 mmHg の圧をかけ 100-150 ml の 0.9%生食で灌流した。血液を含む灌流液は右心房の切開部から放出させた。肺循環は 20 ml の 0.9%生食を用いて、同圧で灌流を施行した。肺を摘出し、結合組織と肺実質を取り除き、気管下部と主気管支を採取した。湿重量を測定し、1ml の formamide に浸し、37℃、48 時間で EBD を抽出した。分光光度計 (Model 450、Bio-Rad、東京) を用いて 620 nm の吸光度を測定した。EBD の組織中の含有量は、EBD 0.1-10  $\mu$ g/ml の標準曲線より算出し、ng/mg (湿重量) で表現した。

#### B-5 Formaldehyde 発生装置

標準ガス発生装置であるパーミエーター (Permeater Model PD-IB、Gastec、綾瀬) を使用し、13% methanol を含む 37% formalin から一定の濃度の formaldehyde を発生させた。1、5、15 ppm formaldehyde を発生させるため、formalin (3ml) をそれぞれ D-10、D-20、D-30 規格の拡散チューブ内に注入し、パーミエーター内の恒温室 (50℃) に入れた。パーミエーターに取り込む室内空気の流量を、1、5 ppm に対しては 1.3 l/min、15 ppm に対しては 1.1 l/min に調節した。これらの条件は、4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole 法を用いて formaldehyde 濃度を計測して決定した。パーミエーターのガス取り出し口を人工呼吸器の空気取り入れ口に接続して formaldehyde を吸気回路内に送りこんだ。気管カニューラ部での formaldehyde ガス温度は約 20℃で、室内の温度とほぼ同じであった。

#### B-6 プロトコール

##### B-6-1 Formaldehyde 吸入による気道血管透過性亢進の時間的变化

ラットを 11 群 (n = 4-6) に分類した。4 群は

EBD 投与後すぐに formaldehyde (1、5、15 ppm) あるいは室内空気を 15 分吸入させ、気管・主気管支を採取した。6 群は formaldehyde 吸入 (1、5、15 ppm) 開始 15 分または 30 分後に EBD を投与し、同じ濃度の formaldehyde 吸入を 15 分間続けた後に気管・主気管支を採取した。残る 1 群は EBD を静注した後、capsaicin (100 mg/kg) を筋注し、20 分後に気管・主気管支を採取した。

##### B-6-2 Formaldehyde 吸入後の formaldehyde、capsaicin 及び substance P の気道血管透過性亢進作用に及ぼす影響

ラットを 9 群 (n = 5-8) に分け、1、5 ppm の formaldehyde または室内空気を 30 分間吸入させ、EBD を投与後すぐに formaldehyde (5 ppm) の吸入、capsaicin (0.75 mg/kg i.v.) を静注し、それぞれ 15 分後、10 分後に検体を採取した。また、5 ppm formaldehyde を 30 分間吸入させ、EBD を投与し、substance P (50  $\mu$ g/kg) を静注し、10 分後に検体を採取した。残る 3 群は室内空気を吸入させ、EBD を投与後、5 ppm の formaldehyde 吸入または capsaicin、substance P の投与を行った。

#### B-7 統計分析

測定結果は、平均値±標準誤差で表記した。独立した 2 群間の有意差検定のため、まず F 検定で等分散の検定を行い、等分散と評価された場合は unpaired Student's t test (two-tailed) を使用し、不等分散の場合は Welch's test (two-tailed) を使用した。独立した多群間の有意差検定には、One-way analysis of variance (ANOVA) と Bonferroni/Dunn test を用いた。危険率 (P) が 5%未満の場合を統計学的有意とした。

## C 研究結果

### C-1 ホルムアルデヒド吸入による気道血管透過性亢進の時間的変化

暴露後の 15 分間では、ホルムアルデヒド (1、5、15 ppm) は、室内空気と比較し、気管・主気管支において有意な気道への血漿漏出を引き起こした (図 1)。また、主気管支においては、ホルムアルデヒドによる濃度依存性の血漿漏出が観察された。また、ホルムアルデヒドと 100 mg/kg のカプサイシン筋注の気道への血漿漏出量を比較すると、ホルムアルデヒドによる気道反応はいずれも有意に低値であった。

ホルムアルデヒドによる気道への血漿漏出は少なくとも吸入開始 15 分以内に終了し、それ以降の吸入では有意な血漿漏出は観察されなかった (図 1)。

### C-2 ホルムアルデヒド吸入後のホルムアルデヒド、カプサイシン及びサブスタンス P の気道血管透過性亢進作用に及ぼす影響

室内空気を前吸入させたホルムアルデヒド吸入 (5 ppm、15 分) 群では、気管・主気管支とも sham 群と比較し有意な気道への血漿漏出がみられた (図 2)。ホルムアルデヒド (1 ppm) を前吸入させた群では気道反応は影響を受けなかったが、ホルムアルデヒド (5 ppm) を前吸入させた群では、気道への血漿漏出は完全に抑制された (図 2)。

カプサイシン (0.75 mg/kg) を投与した場合、室内空気の前吸入では有意に気道への血漿漏出がみられたが、ホルムアルデヒドの前吸入を行うと、気管では濃度依存性に血漿漏出が抑制され、ホルムアルデヒド 5 ppm では完全にこの反応は抑制された (図 3)。一方、主気管支での気道反応は、5 ppm ホルムアルデヒド前吸入で部分的に抑制された (図 3)。

サブスタンス P (50  $\mu$ g/kg) による気道への血

漿漏出では、ホルムアルデヒド (5 ppm) の前吸入による気道反応の減弱は観察されなかった (図 4)。

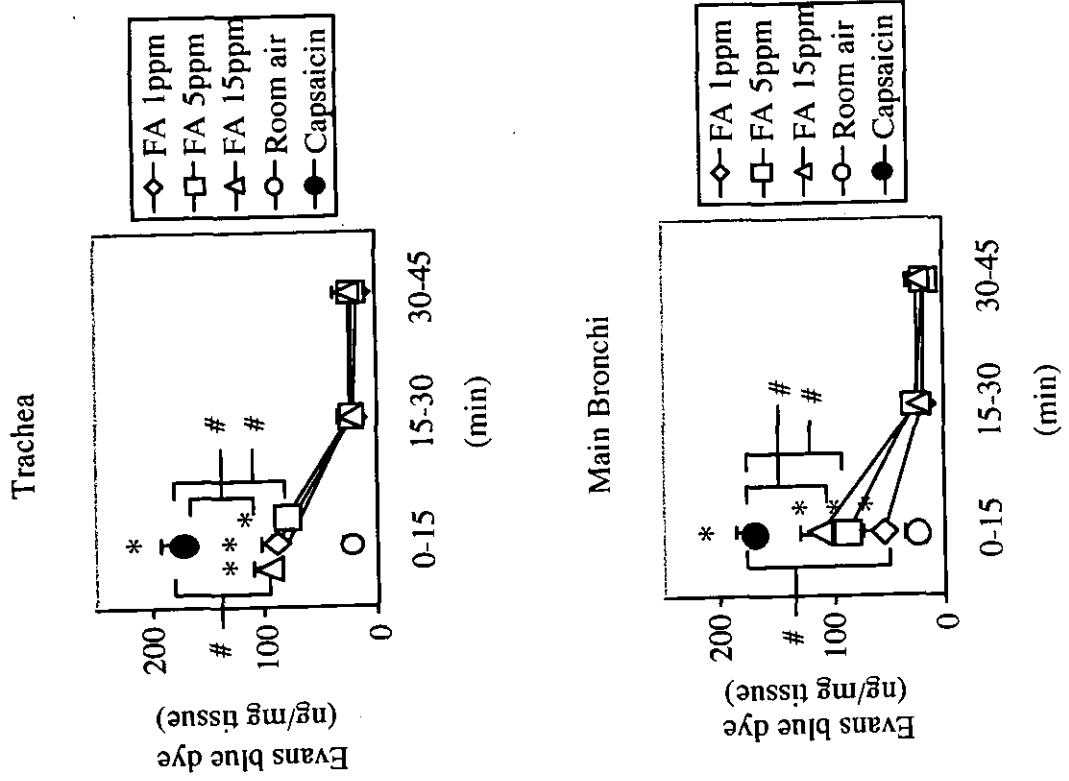
### D まとめ

- (1) ホルムアルデヒド吸入による気道血漿漏出は少なくとも吸入開始 15 分以内に終了した。
- (2) ホルムアルデヒド吸入により引き起こされる気道への血漿漏出が、大量のカプサイシン筋注による反応よりも有意に低かったことから、ホルムアルデヒド吸入刺激が知覚神経末端からのタキキニン遊離を部分的に引き起こしたと考えられた。
- (3) しかし、15 分以後のホルムアルデヒドの追加吸入は有意な気道の血漿漏出を引き起こさなかった。
- (4) 30 分間のホルムアルデヒド吸入 (1、5 ppm) は、ホルムアルデヒドやカプサイシン投与による内因性タキキニンによる気道への血漿漏出を濃度依存性に抑制した。
- (5) このホルムアルデヒドの前吸入は、サブスタンス P 静注による外因性タキキニンによる気道への血漿漏出に影響を及ぼさなかった。したがって、NK1 受容体の internalization による不応期の誘導の可能性は否定的であった。
- (6) 以上のことから、ホルムアルデヒド吸入が知覚神経 C 繊維末端からのタキキニン遊離機構を傷害した可能性が考えられた。

### E 研究発表

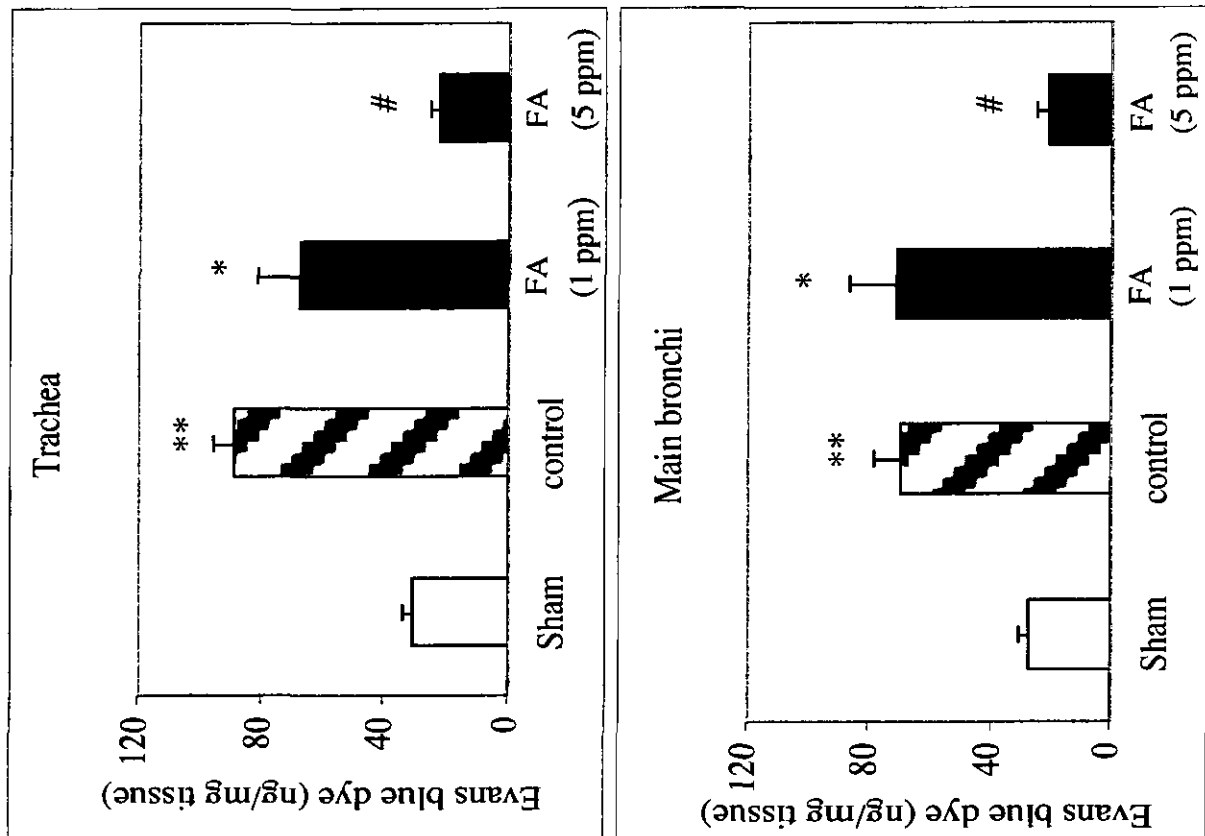
Asia-Pacific アレルギー大会 (東京、2004) 及び第 17 回日本アレルギー学会秋期臨床大会 (横浜、2004) にて発表予定。

Figure 1



Time course of extravasation of Evans blue dye in the trachea and main bronchi induced by an inhalation of formaldehyde (FA; 1,5 or 15 ppm) in rats. The leakage of the dye for 15 min (left), between 15 and 30 min (middle), and between 30 and 45 min (right) after the start of formaldehyde inhalation. Values are the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 4-6) \*  $P < 0.01$  vs. room air-exposed group, analyzed by the unpaired Student's *t* test or Welch's test. #  $P < 0.05$  vs. capsaicin-treated group, analyzed by the unpaired Student's *t* test or Welch's test.

Figure 2



Effect of formaldehyde (FA; 1 or 5 ppm, 30 min) on Evans blue dye extravasation in the trachea (upper panel) and main bronchi (lower panel) induced by an inhalation of formaldehyde (5 ppm, 15 min) in rats. Open bar: room air-pretreated, room air-exposed group (sham, n = 5). Shaded bars: room air-pretreated, formaldehyde-exposed group (control, n = 8). Solid bars: formaldehyde-pretreated, formaldehyde-exposed group (n = 5, 6). Values are the mean  $\pm$  S.E.M. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. sham, analyzed by the unpaired Student's *t* test or Welch's test. #  $P < 0.05$  vs. control, analyzed by the Bonferroni/Dunn test.