

の長期経過を追ってもシックハウス症候群の発症は明らかではなかった。解剖実習生の調査ではホルムアルデヒド曝露による嗅覚障害や鼻粘膜ヒスタミン過敏性亢進がアレルギー性鼻炎合併者で多く認められたが、アレルギー性鼻炎がシックハウス症候群発症の危険因子となるかについては積極的に支持するものではなかった。

E. 結論

高い濃度のホルムアルデヒドに曝露される人体解剖実習生の調査から、実習中に 15% にシックハウス症候群を疑う症状発現がみられたが、実習後は早期に全員消失していた。ホルムアルデヒド特異的 IgE 値も含め、血清中 IgE 値に及ぼす影響は認められなかった。アレルギー性鼻炎合併者を中心に嗅覚低下、鼻粘膜ヒスタミン過敏性亢進を認めるものがみられたが、多くは一過性であり、実習中の症状発現との関連も認めなかった。Functional MRI 検査はシックハウス症候群の客観的評価に有用性が期待される。アレルギー性鼻炎はシックハウス症候群の発症の危険因子につながるかどうかは明らかではなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

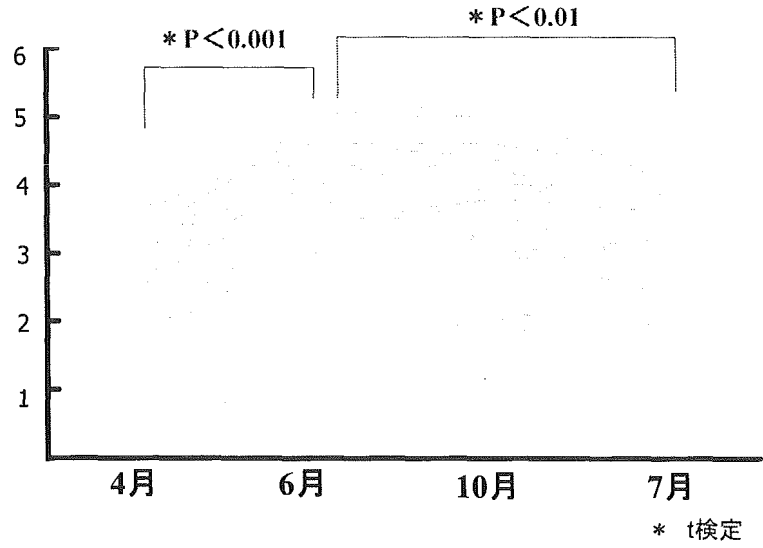
第43回日本鼻科学会総会(平成16年9月, 東京)ホルムアルデヒドのヒト鼻粘膜に及ぼす影響についての検討. 久満美奈子, 茶藪英明, 堀口茂俊, 岡本美孝, 森 千里, 松野義晴 他.

第55回日本アレルギー学会総会(平成17年10月, 盛岡)ホルムアルデヒド曝露が鼻粘膜過敏性に及ぼす影響について. 久満美奈子, 茶藪英明, 堀口茂俊, 岡本美孝, 森千里, 松野義晴.

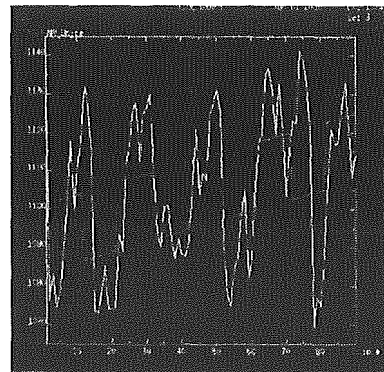
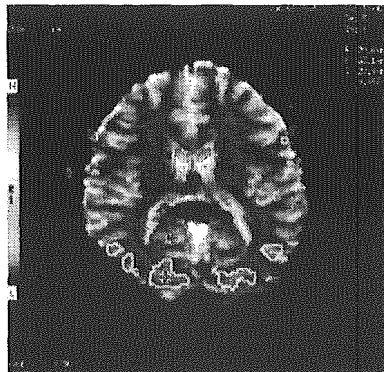
G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

認知閾値の変化



functional MRI (0.3%FA)



厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）

総合研究報告書

「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」

接触過敏反応やアトピー性皮膚炎モデルマウスに対するホルムアルデヒドの影響やアンケート調査から得られたホルムアルデヒドの皮膚病変への影響について

分担研究者 池澤善郎 横浜市立大学大学院医学研究科環境免疫病態皮膚科学教授
協力者 高橋一夫 横浜市立大学大学院医学研究科環境免疫病態皮膚科学準教授
協力者 山川有子 横浜市立大学市民総合医療センター皮膚科準教授
協力者 吉岡直也 横浜市立大学大学院医学研究科環境免疫病態皮膚科学大学院生
協力者 内田敬久 横浜市立大学大学院医学研究科環境免疫病態皮膚科学大学院生
協力者 大砂博之 ひろクリニック院長、横浜市立大学非常勤講師

研究要旨

平成12年度～14年度の厚労省健康科学総合研究事業「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（石川 哲班）」で岩月ら（岡山大）はシックハウス症候群（SHS）に関連した皮膚症状の病態を4群に層別化した。今回はそのうちの第2群のアトピー性皮膚炎（AD）などの既存の皮膚炎がホルムアルデヒド（FA）暴露により増悪する群をとりあげ、FAがADに影響を与えるか否かをマウスモデルを用いて検討した。まずADモデル動物であるDS-Nhマウスを使ってFA暴露で皮疹の悪化がみられるかどうか検討したところ、0.1～0.3ppmのFA暴露で2ヶ月後に非暴露群に比して有意な皮疹スコアの上昇が認められた。また、C57BL/6マウスにTNCBを塗布し感作・惹起する接触過敏（CHS）反応を誘導する系で惹起前にFAを反復塗布しその影響を解析したところ、FA処置はCHS反応を増強しこれは所属リンパ節での樹状細胞の活性化を介したものであることが示唆された。以上のことからFA暴露がヒトのADの増悪に関与することがモデルマウスの系で示唆された。

また、SHSを含めた化学物質過敏症（CS）にアレルギー疾患の合併が多いことが報告されているが、その逆のAD患者中にSHSの合併がどの程度存在するかをアンケート調査をもとに調べたところ、ADにおけるSHSの有病率は約5%程度であることが見いだされた。その多くの患者がホルムアルデヒド等の暴露でAD皮疹の悪化を経験し、同時に頭痛、微熱、全身倦怠感といった体調不良を訴えていた。すなわち、FA暴露が皮疹の増悪因子であることが示されたと共に、AD診療の際、体調不良を訴えている場合、SHSの合併を考慮すべき重要性が判明した。

A. 研究目的

私たちは化学物質に大きな恩恵を受けてきた。しかし、生物の適応能力をはるかに上回るスピー

ドで身のまわりに化学物質が蔓延し、その結果として様々な影響が出はじめていると考えられる。昨今のアレルギー疾患の急増・重症化にとってこ

れら化学物質が環境因子として大変重要ではないかとの作業仮説を立て、アレルギー疾患特にアトピー性皮膚炎と化学物質との関連を検討してきた。この様にグローバルな視点をもちつつ、一つ一つの化学物質や個々の病態に目を向けることが重要ではないかと思われるが、この3年間で我々は、アトピー性皮膚炎（AD）モデルマウスや接触過敏反応（DTH）に対するホルムアルデヒド（FA）の増悪因子としての重要性について検討し、また臨床医の立場から、アンケート調査をもとにAD患者におけるシックハウス症候群（SHS）の有病率を検討し、さらに診断における留意点を考察した。

B. 材料と方法

FA 曝露実験

- ・動物：8週令のDS-Nh マウス（AD発症モデルマウス），雌
- ・FA 曝露：陰圧換気されたチャンバー内にマウスをいたれたケージと共にFA液の入った瓶を一緒において飼育した。検知管式気体測定器とFA用検知管を用いてチャンバー内のFA濃度を測定したところ0.10～0.30 ppmであった。
- ・皮膚炎の誘発：
2,4,6-trinitrochlorobenzene (TNCB) を使用した。FA 曝露 28 日後に 5% TNCB 溶液を腹部に感作した。さらに 7 日経過した後、1% TNCB 溶液を後頸部に 3 回/週で繰り返し塗布した。
- ・皮疹の評価（皮疹スコア）：DS-Nh マウスの顔面と体表面にあるドライスキン、発赤、糜爛を 0～3 point でスコア化しそれらを合計した。（最大 18 points）
- ・コントロール：対照としてFAの曝露を行わずに同様のプロトコールでTNCB塗布を行った。非曝露群の飼育環境中のFA濃度を数回測定したがいずれも検出限界（0.05 ppm）以下であった。

FA の接触曝露実験（図 1）

- ・動物：6週令のC57BL/6雌マウス
- ・接触過敏反応の誘導とFA接触曝露：2%TNCBで腹部に感作し、その1週間後に0.5%TNCBで耳介にチャレンジした。
5%FAを感作前、あるいはチャレンジ前に5日間同側耳介に塗布し、0.5%TNCBで耳介にチャレンジした後、耳介腫脹反応を経時的に測定した。
- ・リンパ球サブセットおよびサイトカイン産生能の検討：TNCBでチャレンジ24時間後に屠殺し、所属リンパ節を取り出し、細胞浮遊液を調整後、細胞表面マーカー（Pc5-CD4、FITC-CD8、PE-CD25、Pc5-CD3、FITC-NK1.1、PE-CD4、Pc5-CD11c、FITC-CD86、PE-CD80、抗Class II抗体）でラベルしFACSを用いて解析した。またサイトカイン産生能を解析するため、同じ細胞浮遊液を用いて5μg/mLのConAあるいはLPSで48時間刺激後、その培養上清を用いて各種サイトカインをELISA法で測定した。さらに同様な処置をして調整された細胞浮遊液をMACSでCD11c陽性細胞を回収し活性化マーカーの発現やLPS刺激によるサイトカイン産生能をELISA法にて測定した。

アレルギー性皮膚疾患（主にアトピー性皮膚炎）に対するアンケート調査

対象：横浜市立大学付属病院皮膚科外来および横浜市立大学付属市民総合医療センター皮膚科外来に通院しているアレルギー関連疾患患者約400名からアンケート調査や問診等でSHSを含めた化学物質過敏症（CS）が合併しているかもしれないと考えられた患者（新築・改築後の家や職場で粘膜の刺激感や皮疹の悪化を経験したなど）を抽出し、臨床愁訴、検査所見に特徴がないか検討した。

検討検査項目：血算、一般生化学、IgE、特異的IgE抗体、NK活性、

C. 研究結果

1. DS-Nh マウスへの FA 暴露による皮疹の影響
TNCB 感作後、30 日頃まではむしろ FA 非暴露群で皮疹の悪化が認められた。時間の経過と共に徐々に逆転し FA 暴露群で皮疹の悪化がみられ、50 日を過ぎた頃から FA 暴露群と非暴露群での皮膚症状に差が認められた (H15-16 年度)。

2. TNCB による DTH への FA の影響

4 群に分けて実験を進めた (FA 未処置、感作前に FA 塗布、惹起前に FA 塗布、感作前・惹起前共に FA 塗布)。図 1-A では、実測した耳介腫脹反応を示し、図 1-B では腫脹反応測定開始日の耳介の厚さを 0 とし、その後の腫脹反応の変化を示している。図 1-B にみるように、腫脹反応の変化がチャレンジ前に FA を塗布した時に顕著であることが判明した。従って、主な実験はチャレンジ前に FA を塗布することで行われた。

3. FA を接触曝露した際の所属リンパ節でのリンパ球サブセットおよびサイトカイン産生能

各種リンパ球の表面マーカーを用いて FACS で解析したが FA 接触曝露群とコントロール群で、有意差を認めなかった。次に ConA/LPS 刺激後のサイトカイン産生 (IFN- γ 、TNF- α 、IL-4) では LPS 刺激下での IFN- γ 産生が FA 暴露群で有意に上昇していた。FA の樹状細胞 (DC) への影響が考えられたため、前述の細胞浮遊液を MACS で CD11c 陽性細胞を Positive selection して MHC class II、CD80、CD86 といった表面マーカーを用いて FACS 解析した。図 2 に示すように MHC Class II^{high} の細胞が多く認められ、活性化した樹状細胞が増加していることが明らかとなった。次に、CD11c 陽性細胞を LPS 添加で培養した際の上清でサイトカイン産生能をみたところ曝露群では IFN- γ 、TNF- α が有意に上昇していた。(図 3)

4. アンケート調査

アレルギー関連疾患患者約 400 名において SHS を含めた CS を疑える症例の割合は 21 名で 5%程度であった。内訳は AD17 名、アスピリン不耐症 3 名、蕁麻疹 1 例であった。これら 21 名の愁訴としては皮膚疾患を有する患者を対象としたため、皮疹の悪化を訴えた人が 85%であったが、続いて眼・鼻粘膜症状を訴える傾向が強く、頭痛・倦怠感・微熱といった体調不良の訴えが比較的多く認められた。また、以前よりおおいに敏感、最近におおいに敏感になったを含めると 70%の人がおおいに敏感と訴えた (図 4)。

5. 臨床検査結果

アンケート調査により抽出した 21 名の臨床検査成績を AD 患者全体のそれと比較検討した。その結果、有意な差は見出せなかった。しかし、同時に施行した NK 細胞活性を測定した 5 例においてその活性が低下している傾向がみられた。すなわち

22.2 \pm 7.9 (SHS の合併があった AD 5 例)

27.2 \pm 12.2 (コントロールとして AD130 例) であった。

D. 考察

動物実験から得られた成果をまとめると 2 つあげられる。一つには FA 吸入曝露がアトピー性皮膚炎発症モデルである DS-Nh マウスの皮疹を重症化させることが判明したことであり、2 つ目には C57BL/6 マウスに TNCB で作った DTH 反応が FA 塗布曝露によって増強され、それが FA による樹状細胞の活性化を介したものであると示唆されたことである。このことはアトピー性皮膚炎が FA 曝露により悪化・増悪するという臨床的観察を実験的に支持したものと考えられる。

また、臨床的な立場からアンケート調査結果を解析した。これまで SHS の患者ではアレルギー疾

患の合併が高率にみられると報告されてきた（ばらつきが大きい30-70%と報告されている）。しかし、アレルギー疾患患者からSHSの合併がどの程度あるのかとの報告はほとんどない。今回の調査から、主にAD患者では5%程度にSHSの合併がみられる事が判明した。この数値は予想より少ないものであったが、SHSとは言えないがFA等のおいのするところで皮疹が悪化した経験をもった患者はもう少し多いように思われた。

SHSを合併したAD患者の愁訴は、皮疹の悪化が85%と最も多かった。これは皮膚科外来での調査だから当然といえなくもないが、FA暴露によりADが悪化するという臨床的な事実を反映していると思われる。皮疹以外の症状としては眼・鼻粘膜の刺激症状と微熱、全身倦怠感、頭痛といった身体の不調を呈するものであった。このことと、ADの中の5%はSHSを合併する事を考慮すれば、AD診療で不定愁訴的な訴えをする患者に対してはSHS合併を念頭に置いて診療する必要性を示していると考えられる。

シックハウス症候群を扱う本研究班では話題の中心がFAであるが、一方で化学物質過敏症という疾患概念も存在する。両者は個々に特徴を有しつつも相当オーバーラップし、明確に線が引けない症例も多い。いずれにしてもFAをはじめとした化学物質による健康被害を生じている患者の存在は明白であり、FAに限らずさらにより広く環境化学物質と生体との係わりを検討する学問領域に発展することも必要なのかもしれない。そのことは、昨今話題になっている地球温暖化の様な環境問題への考察と根本的にはつながっているものと思われる。是非ともグローバルな視点で

FA問題を追及していきたいと考えている。

E. 結語

FA曝露がヒトのADの増悪に関与することがモデルマウスの系と臨床上のアンケート調査から示唆された。FAのADへの関与を通じてシックハウス症候群の病態の一側面が判明することが望まれる。

E. 研究発表

1. 学会発表

Yoshioka N, Nakazawa M, Takahashi K, Hirasawa T, Minami M, Ikezawa Z: The effect of Formaldehyde exposure on exacerbation of atopic dermatitis. The Eighth China-Japan Joint Meeting of Dermatology, Konmei, 2004.11

高橋一夫、吉岡直也、中澤正年、平沢勉、南睦久、池澤善郎：接触過敏反応やアトピー性皮膚炎モデルマウスに対するホルムアルデヒドの影響について。日皮研究地方会。東京、2004.12

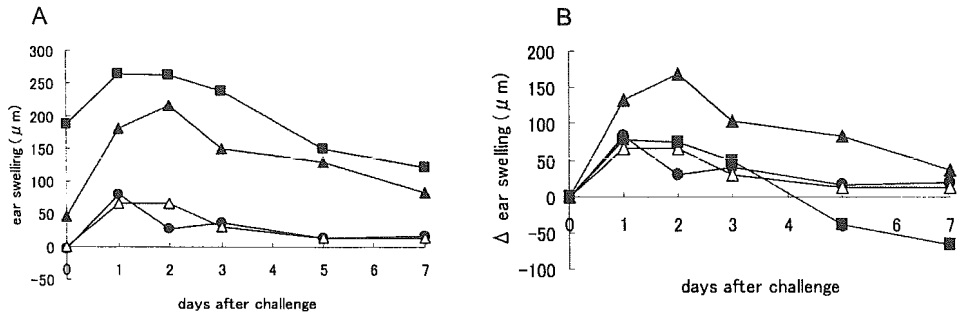
2. 論文発表

Yoshioka N, Nakazawa M, Takahashi K, Hirasawa T, Minami M, Ikezawa Z: The effect of Formaldehyde exposure on mouse models of atopic dermatitis. (原著投稿準備中)

F. 知的所有権の出願・登録状況

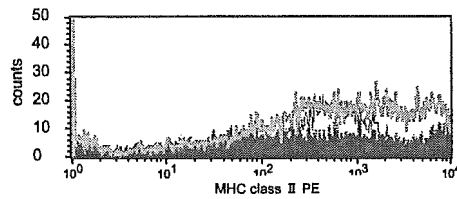
なし

図1、TNCBによるDTHへのホルムアルデヒド(FA)の影響



	●	△	▲	■
TNCB sensitization	+	+	+	+
TNCB challenge	+	+	+	+
FA before sensitization	-	+	-	+
FA before challenge	-	-	+	+

図2、FA暴露による樹状細胞の変化



	■	—	□
TNCB	-	+	+
FA	-	-	+

図3、FA暴露による樹状細胞のサイトカイン産生能に対する影響

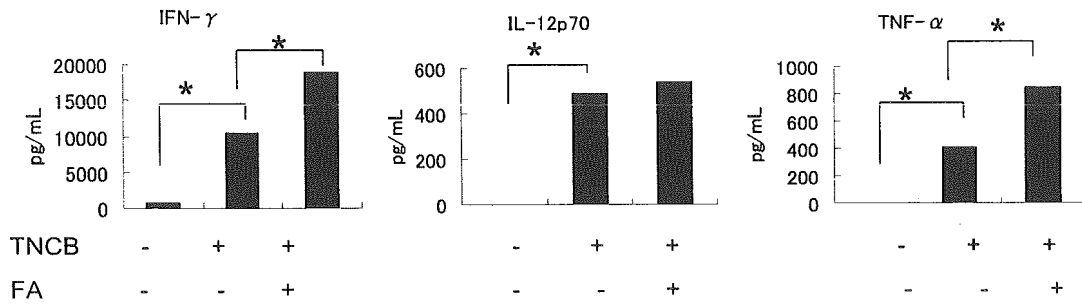
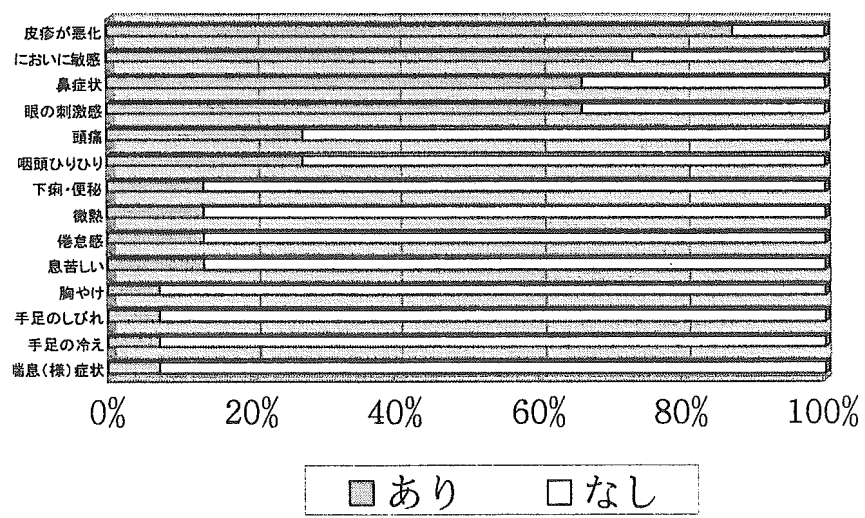


図4、愁訴の結果



厚生労働科学研究補助金（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 博式（岐阜薬科大学 臨床薬理学研究室 教授）

研究要旨：本研究では、シックハウス症候群の発症および病態形成における免疫学的ならびに神経生理学的機序の関与について、ホルムアルデヒドを代表とする揮発性有機化合物(VOCs)を用いてマウスの気道系への影響および皮膚に及ぼす影響を検討した。気道系の反応については、マウスをデシケータ内に入れ、1あるいは3 ppmのホルムアルデヒド(FA)を2時間、あるいは1日2時間7日間曝露し、それぞれ2時間後にアセチルコリンによる気道収縮反応を測定した。その結果、いずれの場合にも気道反応性の亢進は認められなかった。また、気管支肺胞洗浄液中の細胞数ならびに細胞分画についても無処置マウスと差は認められなかった。皮膚に及ぼす影響については、FAのマウス皮膚反応への影響を検討した結果、FA(1-10%)の反復塗布により耳介腫脹が生じることを明らかにした。また、その他のVOCsの影響をトルエンならびにキシレンを用いて同様に検討したところ、これらのVOCsの塗布によっても腫脹は観察されたが、その程度はいずれもFAに比し非常に弱く、皮膚反応惹起においても非常に高濃度の曝露が必要であることが明らかとなった。次いで、FAにおいて観察された皮膚反応の機序を明らかにする目的で、5回目のFA塗布24時間後の耳介および頸部リンパ節におけるmRNA発現を検討した。その結果、耳介ではIL-4の、神経成長因子であるBDNFおよびNT-3ならびにカプサイシンの受容体であるバニロイド受容体-1(VR-1)の発現亢進が、頸部リンパ節ではIL-4の発現亢進がそれぞれ観察された。そこで、VR-1ならびにBDNFおよびNT-3の意義を検討する目的で、VR-1受容体拮抗薬のcapsazepineならびにNGF低親和性受容体p75遺伝子欠損マウスを用いて検討した。その結果、capsazepineはFA(5%)による耳介腫脹に対し、高用量において抑制傾向を示した。また、NGF低親和性受容体p75遺伝子欠損マウスを用いた検討では、野生型マウスに比し耳介腫脹の有意な低下が観察された。一方、FAの高濃度塗布群では塗布直後から興奮様行動が観察されたため、FA塗布後、全脳を摘出し、DNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、FAの濃度依存的に発現が亢進する遺伝子としてフェロモン関連遺伝子を含む約20種類の、発現が低下する遺伝子として2種類の遺伝子がそれぞれ同定された。以上の成績より、FAはトルエンあるいはキシレンに比し、皮膚反応の惹起において、より重要なVOCsであることが明らかとなった。また、IL-4を介したTh2反応ならびにVR-1および神経栄養因子などを介した神経原性炎症が本皮膚反応に関与していることが示唆された。

研究協力者

稲垣直樹（岐阜薬科大学薬理学教室・教授）

田中宏幸（岐阜薬科大学薬理学教室・講師）

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、アレルゲンおよび揮発性有機化合物(VOCs)などが考えられているが、このうち室内のVOCs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、これまでに教室では、卵白アルブミン曝露によるマウス喘息モデルを用いて気道反応性亢進あるいは気道炎症の発症機序を検討してきた。また、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の特徴である。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、シックハウス症候群の主症状のうち喘息様症状ならびに皮膚症状の発症機序を解明する目的で、マウス気道あるいは皮膚にFAを曝露し、その影響を検討した。また、FAによる腫脹反応が観察された皮膚反応については、他の代表的なVOCsであるトルエンならびにキシレンを用いて比較検討した。

B. 方法

1. FA 吸入曝露

0.1%FAをデシケータ内に滴下し、検知管を用いて経時的にFA濃度および二酸化炭素濃度を測定した。条件設定後、マウスにFA(1ppmおよび3ppm)を2時間曝露させ、その2時間後にアセチルコリンに対する気道反応性ならびに気管支肺胞洗浄液(BALF)中の炎症性細胞数を計数した。また、反復曝露実験では、1日2時間の曝露を1週間行った。

2. FA 塗布曝露

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、

雌性BALB/cマウスの両耳介の表裏に1、2、5および10%のFA、5、10、50および100%のトルエンあるいはキシレン、0.15%のDNFBをそれぞれ週1回、計5回反復塗布し反応を惹起した。溶媒は、いずれの場合もアセトンとして検討した。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。

3. 血清中総IgE値の測定

皮膚反復塗布モデルにおいて、各物質塗布24時間後に血清を採取し、総IgE抗体量をELISAにて測定した。

4. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)法によるmRNA発現

トルエンならびにキシレンに比し、より低濃度から顕著な皮膚腫脹反応が観察されたFAについては、最終FA曝露24時間後に耳介および頸部リンパ節における各種機能分子のmRNA発現をRT-PCRにより検討した。

5. DNA マイクロアレイによる全脳における網羅的遺伝子発現解析

FA群では、高濃度塗布群において塗布直後から興奮様行動が観察されたため、5回目のFA塗布後、全脳を摘出し、DNAマイクロアレイ(Ace Gene Mouse Oligo Chip 30K、日立)による遺伝子発現解析を行った。なお、変動遺伝子としては、溶媒群に比し1%FA群で2倍以上発現が変動し、かつ、1%FA群に比し10%FA群で2倍以上発現が変動したものを検索した。

2. 受容体拮抗薬ならびに遺伝子欠損マウスを用いた検討

いずれの場合も、5%FAの反復塗布による耳介腫脹反応に対する影響を観察した。すなわち、VR-1の競合的受容体拮抗薬であるcapsazepineは、FA塗布30分前に皮下投与した。また、耳介組織において発現亢進の認められたBDNFおよびNT-3の意義を、NGF低親和性受容体p75欠損マウスを用いて検討した。

なお、本実験における実験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ー委員会の承認を受け、その規約を遵守した。

C. 結果

1) FA 吸入曝露

本研究では、2時間以上の曝露した場合、デシケータ内のCO₂濃度およびNH₃濃度のコントロールが困難であるため、いずれの場合も1回2時間曝露とした。マウスを1ppmおよび3ppmの

FA に 2 時間曝露した 2 時間後では、アセチルコリンに対する気道反応性ならびに BALF 中炎症性細胞数に変化は認められなかった。また、3ppm の FA を 1 日 2 時間 1 週間曝露したマウスにおいても、気道反応性ならびに BALF 中炎症性細胞数に変化は認められなかった。

2) FA 塗布曝露

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(Fig. 1)。

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(Fig. 2)。

3) トルエンならびにキシレン塗布の影響

5、10、50 ならびに 100%のトルエンならびにキシレンをマウスの両耳介の表裏に塗布し、その影響を比較検討した。その結果、トルエンは 2 回目の塗布後 1 時間をピークとする即時性の腫脹が濃度依存的に観察され、この腫脹反応は塗布回数に依存して増大した(Fig. 3)。また、キシレンについても初回塗布 1 時間後から即時性の腫脹が濃度依存的に観察されたが、2 回目の塗布以降は腫脹の程度に差は認められなかった(Fig. 4)。

一方、これら 3 種の VOCs により皮膚反応に対する強度を比較すると FA>>キシレン>トルエンの順となり、FA が最も低濃度から皮膚腫脹反応を誘発可能であり、さらに腫脹の程度も顕著であった。

4) 血清中総 IgE 値ならびに抗原特異的 IgE 値

DNFB 反復塗布モデルでは、3 回目の塗布 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。これに対し、FA 反復塗布モデルでは、塗布濃度依存性は認められないものの、3 回目の塗布以降、血清中総 IgE 値の有意な上昇が観察された。一方、FA 特異的 IgE 抗体は、いずれのタイミングにおいても検出できなかった。

5) FA 反復塗布による耳介および頸部リン

パ節における mRNA の発現変動

最終 FA 塗布 24 時間後の耳介および頸部リンパ節における mRNA の発現を確認したところ、耳介では IL-4、brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、neurotrophin-3 (NT-3) ならびに vanilloid receptor-1 (VR-1) の mRNA 発現亢進がそれぞれ観察された(Fig. 5&6)。一方、頸部リンパ節では IL-4 mRNA の発現亢進が認められた(Fig. 5&6)。

6) VR-1 受容体拮抗薬ならびに NGF 低親和性受容体 p75 遺伝子の影響

対照マウスでは 5%FA 反復塗布により 2 回目の塗布 1 時間後から即時性の腫脹が観察され、この腫脹反応は塗布回数に依存して増大した。これに対し、VR-1 競合的拮抗薬である capsazepine は用量依存的に FA 塗布後に観察される耳介腫脹を抑制する傾向を示したが、統計学的に有意な差は認められなかった(Fig. 7)。

一方、NGF 低親和性受容体 p75 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと同様に、FA の反復塗布により塗布 1 時間後をピークとする皮膚反応が観察されたが、2 回目の塗布後から野生型マウスに比し皮膚反応の低下が観察され、4 ないし 5 回目の塗布後では野生型マウスの約 30-40%程度の腫脹が観察されるに過ぎなかった(Fig. 8)。

7) FA 反復塗布マウスの全脳における網羅的遺伝子解析

最終 FA 24 時間後の全脳における遺伝子発現プロファイルを、溶媒塗布群、FA 1%ならびに 10%群の 3 群間で比較したところ、FA の濃度依存的に 2 倍以上発現が亢進する遺伝子としてフェロモン関連遺伝子を含む約 20 種類が、発現が低下する遺伝子として 2 遺伝子がそれぞれ同定された。

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と考えられている FA による吸入曝露の影響ならびに塗布曝露の影響を免疫薬理学的に検討した。その結果、1ppm ならびに 3ppm の濃度では、単回あるいは反復曝露によってもアセチルコリンに対する気道反応性ならびに気道内炎症性細胞数に影響を及ぼさなかった。本研究では、FA 曝露 2 時間後に測定を行っていることから、曝露直後の影響を今後検討する必要があると思われる。また、現在の設備では実施は困難であるが、低濃度長期曝露の影響も今後検討する必要がある。

ると思われる。

一方、VOCsによる皮膚への影響については、まず、FAによる接触性皮膚炎についてハプテン抗原による反応と比較検討した。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減弱し、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。そこで次に、代表的な他のVOCsとして知られているトルエンおよびキシレンを用いて、FAにより生じた皮膚反応の特異性を検討した。その結果、キシレンおよびトルエン共に50%ならびに100%という高濃度ではあるものの皮膚腫脹反応を惹起しうる事が明らかとなった。しかしながら、FAとキシレンおよびトルエンとを比較すると、FAに比しキシレンおよびトルエンは皮膚反応惹起により高濃度の曝露を必要とすること、また、腫脹の程度も非常に弱いことなどから、VOCsに対する皮膚組織の反応性に大きな差があることが明らかとなった。以上の成績は、比較的低濃度のFA反復塗布によって観察された種々の表現形が、FAに特異性の高い反応であることを示唆しており、シックハウス症候群におけるFA曝露の意義を再認識させるものとして重要な知見であると思われる。今後、皮膚におけるFA特異的な反応の機序を解析するため、皮膚組織を用いたDNAアレイ解析などを行い、キシレンおよびトルエンと比較検討することにより、さらに詳細な差違を明らかにすることができると思われる。

そこで、本モデルで観察されたFA誘発皮膚反応の機序をさらに解明する目的として、耳介ならびに所属リンパ節である頸部リンパ節における各種機能分子のmRNA発現を検討した。すなわち、Th1/Th2バランス、各種神経成長因子、神経ペプチド受容体の発現をそれぞれ検討した。その結果、耳介ではTh2優位な反応が生じていること、また、VR-1およびBDNF、NT-3などのカプサイシン受容体および神経成長因

子の発現亢進が観察され、神経原性炎症が関与している可能性が推察された。

以上の結果をもとに、VR-1ならびに神経成長因子の意義を明らかにする目的で、VR-1についてはその競合的拮抗薬であるcapsazepineを用いて、神経成長因子についてはNGF低親和性受容体遺伝子欠損マウスを用いて免疫薬理学的に解析した。その結果、VR-1の競合的受容体拮抗薬は本耳介反応に対し抑制傾向を示すに過ぎなかったが、NGF低親和性受容体p75遺伝子欠損マウスを用いた検討では、野生型マウスに比し耳介腫脹の有意な低下が観察された。周知のように、神経栄養因子のうちNGF、BDNFならびにNT-3は、それぞれ高親和性受容体であるTrk A, Trk BならびにTrk Cと結合し、特異的な反応を細胞内へ伝達することが知られている。一方、上述の3種類の神経栄養因子は、高親和性受容体とは別に低親和性受容体であるp75にも結合することが知られている。高親和性受容体欠損マウスの多くは遺伝子欠損により生後まもなく死亡することが知られており、個々の意義を遺伝子欠損マウスにより解析することは困難である。また、それぞれの受容体に対する選択的な拮抗薬も入手できないことから、本研究では低親和性受容体の遺伝子欠損マウスを用いて検討した。今後、皮膚局所におけるBDNFあるいはNT-3の産生細胞などを明らかにすることにより、FA特異的に生ずる神経原性炎症の機序を明らかにすることができると思われる。

最後に、FA塗布後、興奮様行動が観察されたため、本研究では最終FA塗布24時間後に全脳を摘出し、DNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析を実施した。その結果、フェロモンに関連する3遺伝子が発現亢進遺伝子として同定され、2種の低下遺伝子もそれぞれ同定された。今後、これらの発現変動遺伝子と表現系との関連性を詳細に検討する必要があると思われる。

E. 結論

本研究では、シックハウス症候群の発症および病態形成における免疫学的ならびに神経生理学的機序の関与について、FAを代表とする揮発性有機化合物(VOCs)を用いてマウスの気道系への影響および皮膚に及ぼす影響を検討した。

気道系の反応については、マウスに1あるいは3ppmのFAを2時間あるいは1日2時間7日間曝露し、アセチルコリンによる気道収縮反応を測

定した。その結果、いずれの場合にも気道反応性の亢進は認められなかった。また、気管支肺胞洗浄液中の細胞数ならびに細胞分画についても無処置マウスと差は認められなかった。従って、本実験条件下では収縮系機能には影響を及ぼさないと考えられる。今後、より長期的な曝露実験が重要と思われる。

皮膚に及ぼす影響については、FA のマウス皮膚反応への影響を検討した結果、FA (1-10%) の反復塗布により耳介腫脹が生じることを明らかにした。また、本反応はその他の VOCs に比し、非常に強く、皮膚反応惹起においてもより低濃度の曝露によって誘発されることが明らかとなった。さらに、病態形成における機能分子の探索を行ったところ、IL-4 を介した Th2 反応ならびに VR-1 および神経栄養因子などを介した神経原性炎症が本皮膚反応に関与していることが示唆された。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

① 学会発表

1) 柴田友徳、田中宏幸、稲垣直樹、永井博式: ホルムアルデヒド (FA) 反復曝露によるマウスモデルの解析 第 54 回日本アレルギー学会総会 2004. 11. 4-6. 横浜

2) 田中宏幸、稲垣直樹、永井博式: ホルムアルデヒド反復塗布によるマウス皮膚炎モデルの解析 第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会 シンポジウム 7 シックハウス症候群の現状と展望 2005. 6. 2-4. 岡山

3) 齋藤朝香、柴田友徳、田中宏幸、稲垣直樹、永井博式: ホルムアルデヒド反復塗布によるマウスモデルの解析 第 55 回日本アレルギー学会総会 一般演題 515 2005. 10. 20-22. 盛岡

② 総説

田中宏幸、稲垣直樹、永井博式: シックハウス症候群の動物モデルの作成—神経・免疫学的機序から— アレルギーの臨床 25; 75-79; 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

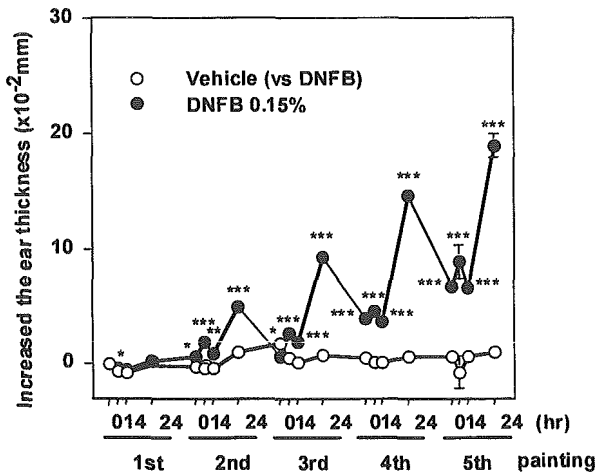


Fig. 1 Time course study for ear swelling caused by repeated painting with DNFB in BALB/c mice. N=5-7. DNFB, 2,4-dinitrofluorobenzene
*P< 0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001 (vs Vehicle)

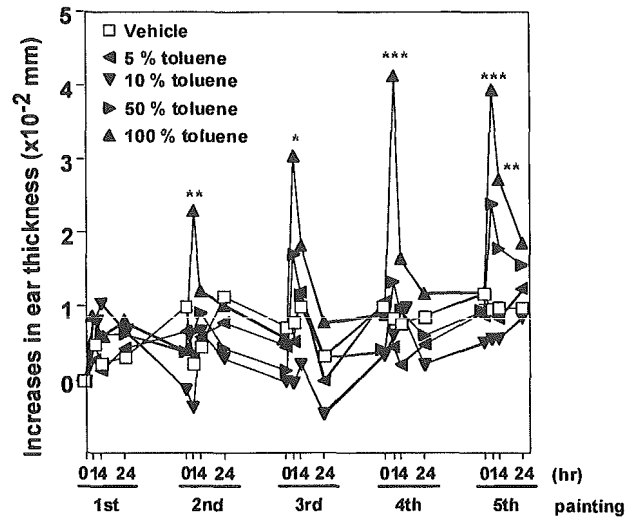


Fig. 3 Time course study for ear swelling caused by repeated painting with toluene solution in BALB/c mice. N = 6-7.
*P< 0.05, **P< 0.01, ***P<0.001 (vs Vehicle)

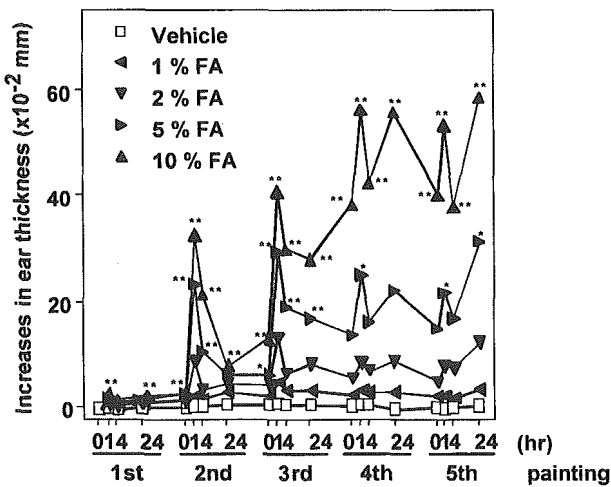


Fig. 2 Time course study for ear swelling caused by repeated painting with formaldehyde (FA) solution in BALB/c mice. N=5-7.
*P< 0.05, **P< 0.01 (vs Vehicle)

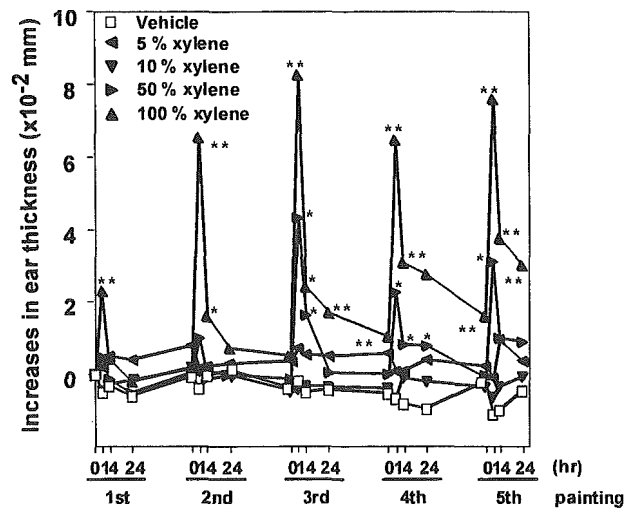


Fig. 4 Time course study for ear swelling caused by repeated painting with xylene solution in BALB/c mice. N=6-7.
*P< 0.05, **P< 0.01 (vs Vehicle)

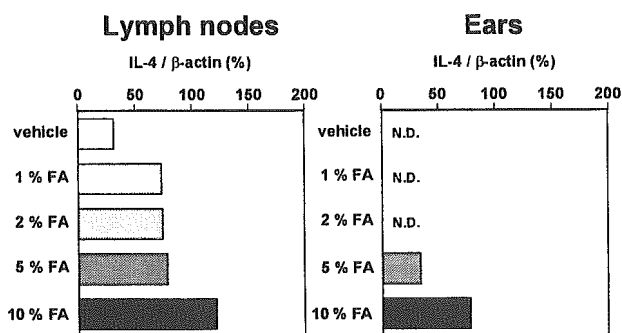


Fig. 5 Relative expression of IL-4 mRNA in the cervical lymph nodes and ears of BALB/c mice treated with formaldehyde (FA) solution. mRNA was isolated from pooled lymph nodes and ears of mice at 24 hours after the 5th painting. N.D., not detected

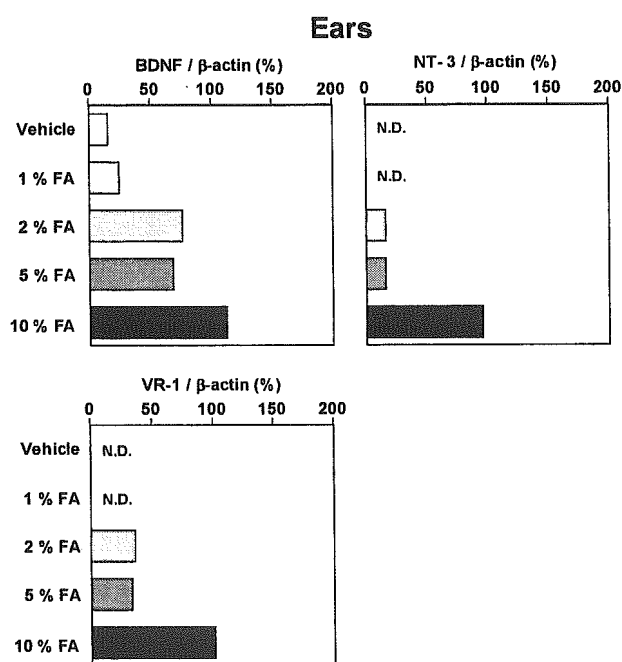


Fig. 6 Relative expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3) and vanilloid receptor-1 (VR-1) mRNA in the ears of BALB/c mice treated with formaldehyde (FA) solution. mRNA was isolated from pooled lymph nodes and ears of mice at 24 hours after the 5th painting. N.D., not detected

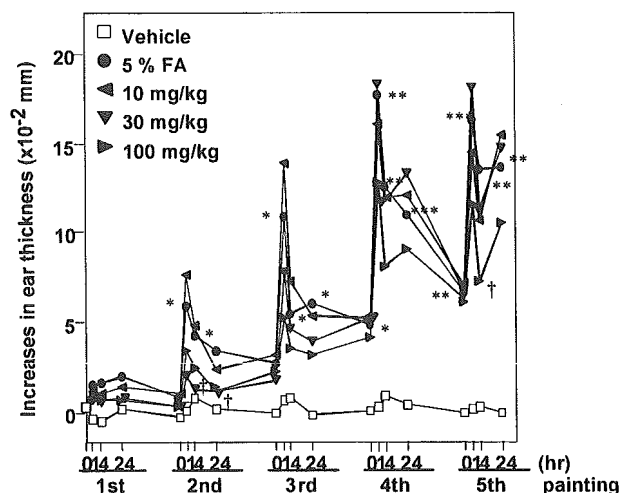


Fig. 7 Effect of a competitive vanilloid receptor 1 antagonist, capsazepine, on ear swelling caused by repeated painting with formaldehyde (FA) solution (5%) in BALB/c mice. Capsazepine was administered subcutaneously 30 minutes before each painting. N=6-7. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (vs Vehicle); †P<0.05 (vs 5% FA)

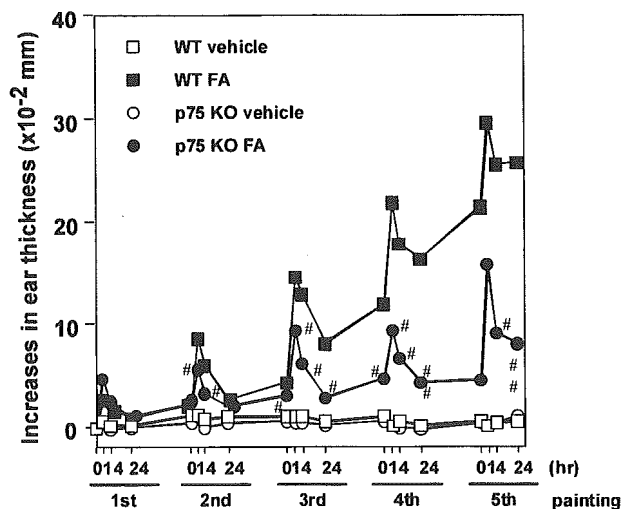


Fig. 8 Effect of gene deficiency of a low affinity receptor for nerve growth factor (p75) on ear swelling caused by repeated painting with formaldehyde (FA) solution (5%) in 129 S4/Sv mice. N=4-8. KO, knockout; WT, wild-type #P<0.05, ##P<0.01 (vs WT FA)

厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）
総合研究報告書

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

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 助教授）
研究協力者 白崎英明（札幌医科大学耳鼻咽喉科 講師）
二村昌樹（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 大学院生）
木村量子（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 大学院生）
森井志歩（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 大学院生）

研究要旨

①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線維末端を刺激し、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、30分間のホルムアルデヒドの前吸入により、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。一方、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線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ると考えられた。

②種々の揮発性有機化合物（VOCs）をラットの腹部皮膚に塗布し、皮膚の血管透過性亢進に及ぼす影響を検討した。芳香族類（キシレン、トルエン、スチレン、ベンゼン、エチルベンゼン）を塗布すると血漿漏出が惹起された。一方、脂肪族類（ヘキサン、ヘプタン、シクロヘキサン）やカルボニル化合物のアセトン、そしてエーテル類のジエチルエーテルでは血漿漏出は引き起こされなかった。

③ラットの腹部皮膚へのキシレン塗布による急性反応終息後に神経原性皮膚血漿漏出が亢進することが明らかとなった。この実験モデルを用いて、知覚神経の過敏反応を抑制することによる止痒機序が報告されているタクロリムス軟膏が、キシレン塗布による神経原性皮膚血漿漏出反応の増強効果を抑制するかどうかを検討した。タクロリムス軟膏塗布はこの皮膚反応を抑制した。また、タクロリムス軟膏塗布はキシレン塗布による急性の皮膚血漿漏出を抑制したが、対照として用いたカプサイシン塗布による皮膚反応では抑制効果がみられなかった。

④我々は、すでにヒト鼻粘膜の上皮細胞に蛋白レベルでカプサイシンの受容体であるパニロイドレセプター（VR1）が発現していることを確認しているが、今回その機能を調べるために、上気道と下気道の上皮培養細胞を用いて *in vitro* で実験を行った。ヒト鼻粘膜および気管支上皮培養細胞にカプサイシン刺激を行うとIL-6の産生がmRNAレベルとタンパクレベルで確認された。この反応はVR1の受容体拮抗剤であるカプサゼピンにより抑制された。神経原性炎症の惹起物質であるカプサイシンは神経を介さないうで、直接気道上皮細胞に作用している機構が存在することが明らかとなった。

シックハウス症候群の疾患概念を明らかにするためにはその病態が解明される必要がある。動物モデルを用いた基礎研究を進めるため、知覚神経C線維上にあつて、カプサイシン刺激の受容体となるパニロイド受容体（VR1）研究の第一人者である白崎英明氏と、3名の大学院生を研究協力者に加えた。

研究1：ホルムアルデヒド吸入暴露がラットの気道知覚神経C線維に及ぼす傷害作用について

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 線維末端を刺激し、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は C 線維の細胞体で生成され、軸索を下行して C 線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 線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 μ 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°C、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 μ 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°C) 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°C 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 μ 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变化

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 µg/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線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。

研究2：揮発性有機化合物塗布がラット皮膚の血管透過性に及ぼす影響—動物モデルを用いた検討

A 研究背景・目的

皮膚の刺激感や搔痒感はシックハウス症候群の代表的な症状である。室内環境中の揮発性有機化合物（以下、VOCs）はシックハウス症候群の原因物質のひとつであることから、VOCsがこれらの皮膚症状を引き起こす可能性が予想される。しかし、VOCsの皮膚に及ぼす影響はほとんど解明されておらず、まずは基礎的研究が求められている。そこで、ラット腹部皮膚に種々のVOCsを塗布した場合の急性反応-血漿漏出の有無を調べた。

B 研究方法

実験1. VOCs塗布後の皮膚血管透過性亢進における濃度依存性の検討

7週齢のWistar雄性ラットにジエチルエーテルを吸入させ、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）を尾静脈から投与し、腹部皮膚にエタノール（100%）を塗布後、ホルマリン溶液（37%）、キシレン（×1）、トルエン（×1）、スチレン（×1）、ベンゼン（×1）、エチルベンゼン（×1）、ヘキサン（×1）、ヘプタン（×1）、シクロヘキサン（×1）、アセトン（×1）、ジエチルエーテル（×1）を20 μlずつ滴下し、直径1.5 cmの円内に引きのばした。40分後に灌流死させ、直径2 cmの皮膚片を採取し、ホルマミド溶液に浸透させてエバンスブルーを抽出した（37℃、48時間）。抽出液の620 nmの吸光度を測定し、エバンスブルー量を算出した。また、コントロールとして、エタノールに溶解したカプサイシン（0.4 mM～50 mM）の皮膚反応を同様に観察した。

実験2. VOCs塗布による皮膚血管透過性亢進に及

ぼすパニロイド受容体（VR1）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、1 ml/匹）を静注後、エタノール（100%）とカプサゼピンエタノール溶解液（22.5 mM、50 mM）を20 μlずつ腹部に滴下し、直径1.5 cmの円内にすばやく引きのばした。続いて3分後に10 mMのカプサイシン溶液、ホルマリン、キシレン、トルエンを重層塗布し、40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. VOCs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及びヒスタミンH1受容体拮抗薬ケトチフェン全身投与の効果

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。生理的食塩水及び生理的食塩水に溶解したCP-99,994（1.5 mg/kg、5 mg/kg）またはケトチフェン（3 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%）、カプサイシン溶解、ホルマリン、キシレン、トルエンを20 μlずつ滴下し、直径1.5 cmの円内に塗布した。40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±標準誤差（Mean±S.E.M.）で表記した。独立した2群間の有