

化学物質負荷試験の標準化について

分担研究者 長谷川 眞紀(国立病院機構相模原病院統括診療部長)

研究協力者 大友 守(国立病院機構相模原病院臨床研究センター)

研究要旨

シックハウス症候群は、多彩な訴えに対する客観的な所見に乏しく、診断に難渋することの多い疾患である。診断の決め手となる手段として化学物質負荷試験があるが、オープン試験では心因が除外出来ない。そこで我々は患者に実薬負荷かプラシーボ負荷か分からないようにしてシングル・ブラインド試験を試みた。4例のうち2例で実薬負荷においてのみ症状誘発を見、より確実にシックハウス症候群・化学物質過敏症と診断することができた。

A. 研究目的

シックハウス症候群の確実な診断手段としてのシングル・ブラインド負荷試験の方法を確立し、評価する。

B. 研究方法

実薬負荷、プラシーボ負荷試験は日を変えて2日間にわたって実施した。2日間とも負荷装置を同じように稼働させ、患者に実薬、あるいはプラシーボであるかできるだけ分からないように注意した。実薬負荷試験は、今回はホルムアルデヒドを用い、居住環境指針値の半分の濃度から開始した。負荷ブース内に安定した化学物質濃度が達成されてから少なくとも10分負荷を行い、症状の誘発の有無を観察し、症状が誘発されない場合居住環境指針値の濃度で同じように実施した。プラシーボ負荷試験は負荷装置を稼働させるのみで実際には化学物質を負荷ブース内に入れず、実薬負荷と

同じ時間観察した。患者には負荷ブース内で2分おきに症状の有無、脈拍数、経皮的酸素飽和度を記録してもらった。

C. 研究結果

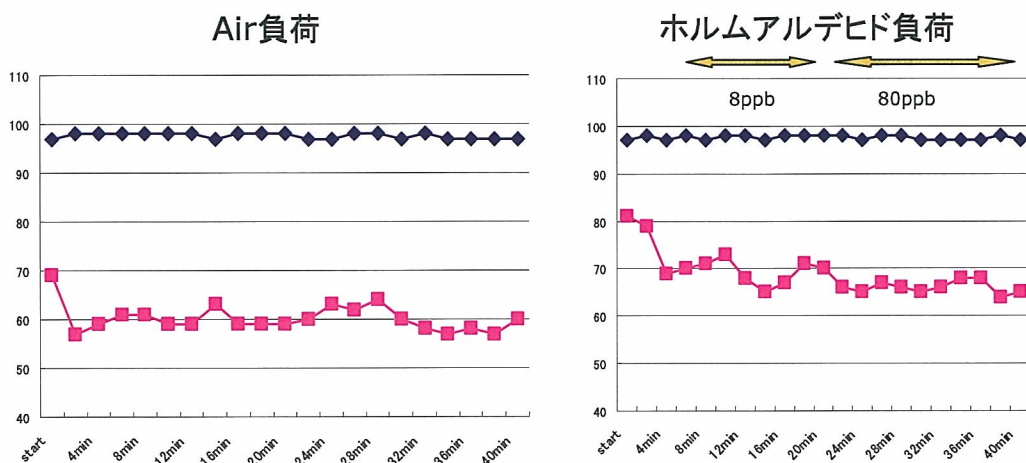
4例にシングル・ブラインド負荷試験を行いそのうち2例に明らかに実薬負荷試験のみで症状誘発をみた。負荷試験例を図に示す。

D. E. 考察・結論

心因をできるだけ除外するため負荷試験はできるだけブラインドであることが望ましい。シングル・ブラインドであっても十分な結果が得られる可能性があることを我々の結果は示している。

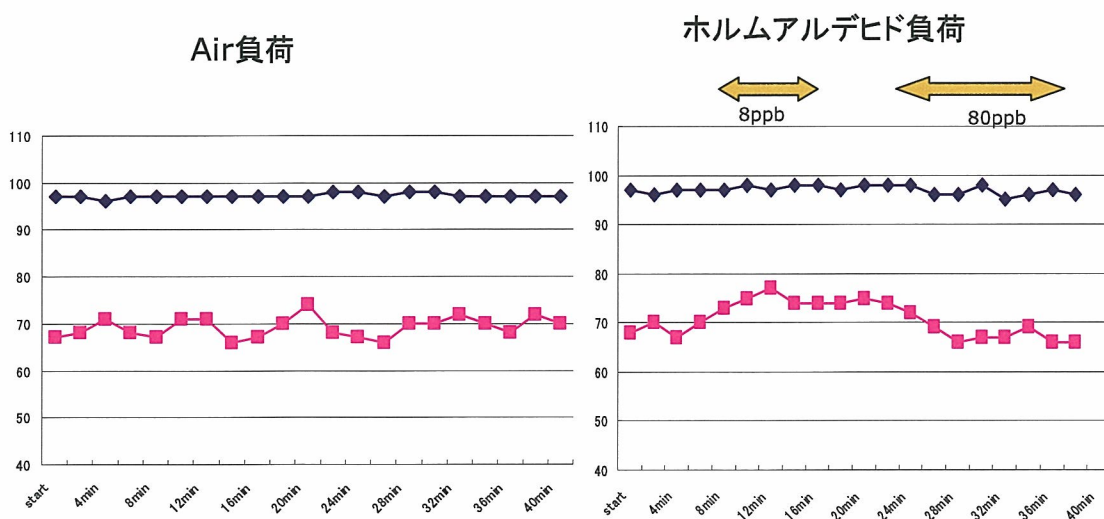
F・G・H 健康危険情報、研究発表、知的財産の出願、登録状況 なし

症例呈示 1 S.K. 55y.o. F



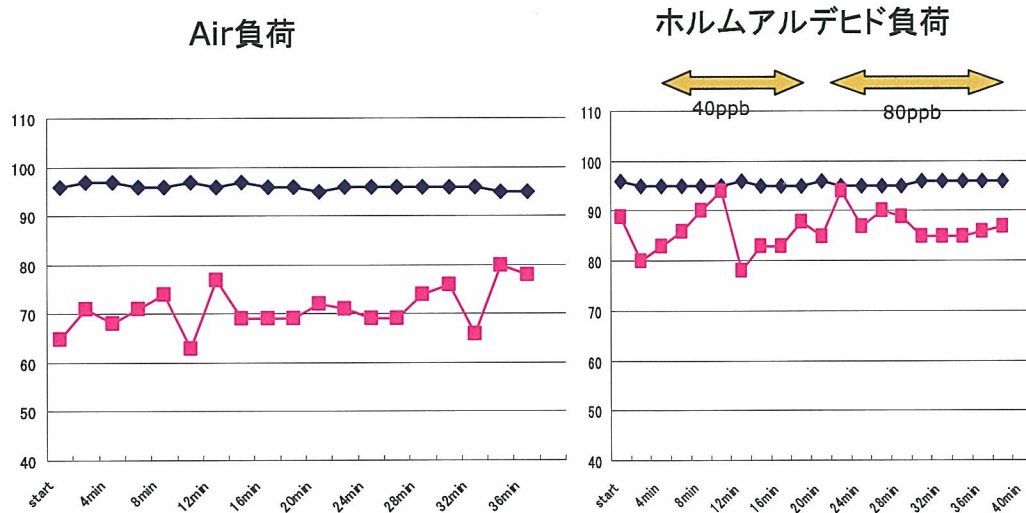
判定: 化学物質負荷でもair負荷でも同じ症状(頭痛、動悸)が出ており、
陰性

症例呈示 2 H.T. 39y.o. M



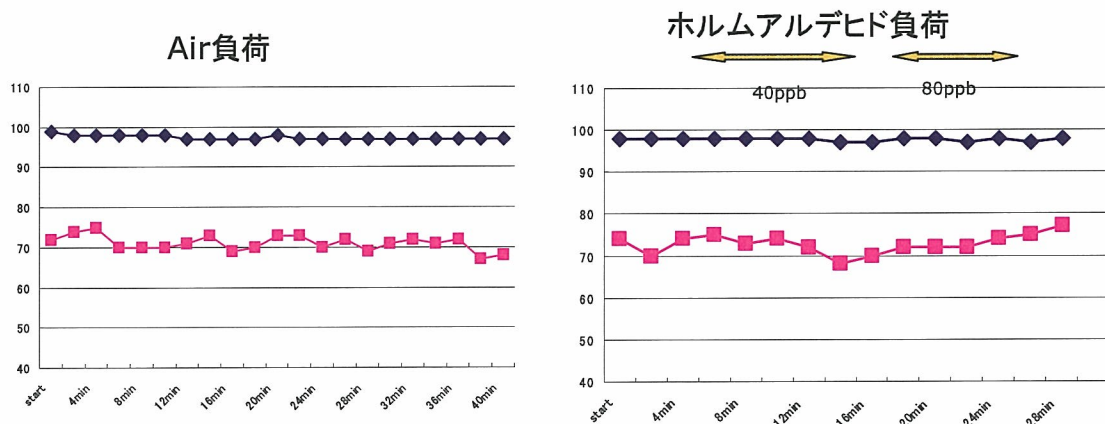
判定: air負荷では症状は誘発されず、ホルムアルデヒド負荷によって、鼻の奥の
違和感、頭痛、思考力低下、耳鳴り、粘膜刺激、胸部圧迫感などが誘発され
陽性

症例呈示 3 O.A. 33y.o. M



判定: air負荷においてもホルムアルデヒド負荷においても症状は誘発されず
陰性

症例呈示 4 T.J. 22.y.o. M



判定: air負荷では症状は誘発されず、ホルムアルデヒド負荷で、粘膜刺激、頭痛
が誘発され、負荷が続けられなかった。
陽性

ホルムアルデヒドの鼻粘膜への影響

分担研究者： 岡本 美孝 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 教授
研究協力者： 茶菌 英明 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助手
久満 美奈子 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 医員

研究要旨

シックハウス症候群の主要な原因物質の一つであるホルムアルデヒドの鼻粘膜を介したヒト生体への影響を明らかにするために、医学部での解剖実習を行った医学部実習生、病院医療従事者ボランティア、シックハウス症候群が疑われるボランティアを対象として、脳機能の客観的評価として知られる functional MRI (f-MRI) を用いて低濃度のホルムアルデヒドの吸入による脳血流変化を検討した。その結果、本検査法の一定の感度と特異性が確認されたが、客観的診断法としての確立に向け、また病態の研究に向けてさらに検討を重ねる必要性が確認された。

A. 研究目的

シックハウス症候群の原因物質のひとつであるホルムアルデヒドのヒト生体への影響を明らかにするため、高濃度のホルムアルデヒドに曝露される医学部実習生を対象にこれまで検討を行ってきた。その結果、解剖実習中に約 15%の医学生に一過性のシックハウス様症状の出現がみられたが、血中総 IgE、ホルムアルデヒド特異的 IgE 産生、主要アレルゲンに対する特異的 IgE 産生への影響は見られなかった。また、アレルギー性鼻炎合併者を中心に、嗅覚障害、鼻粘膜ヒスタミン過敏性亢進が認められたが、シックハウス様症状との関連は明確ではなく、他の評価法の必要性が示された。そこで、脳機能の客観的評価として知られる functional MRI (f-MRI) を用いて、ホルムアルデヒド吸入の生体への影響について検討を行った。

B. 研究方法

千葉大学医学部学生ボランティア 49 名、千葉大学医学部附属病院従事者のボランティア 20 名、シックハウス症候群が疑われる一般のボランティア 4 名を対象として、低濃度ホルムアルデヒド (0.04ppm)、および臭素を酸素と共に鼻カヌラで鼻腔に送り込み、その前後に MRI 画像を撮影した。データの解析にあたっては、非特異的反応、特に開

始後の不安定要素を除くため、クロスコリレーション法を用いて脳賦活部を解析した。

倫理面への配慮

研究計画は千葉大学医学部倫理委員会へ申請し、許可を得た。実際の検査では参加ボランティアに研究の目的、方法について十分説明し、文書による同意を得た。

C. 研究結果

医学部学生 49 名では 13 名に f-MRI にて陽性反応が認められ、シックハウス症候群の有無との関連を検討すると、検査の感度は 69%、特異度は 89%であった。医療従事者 20 名では 7 名に f-MRI にて陽性反応が認められ、シックハウス様症状をもつ方は 2 名で、感度は 50%、特異度は 67%であった。シックハウス症候群が疑われる 4 名の方では、2 名に f-MRI で陽性反応がみられた。

D. 考察

本検査法の感度と特異性がある程度確認されたが、客観的な評価法として可能かどうかはさらに検討症例を増やして詳細な検査を行う必要があると考えられる。

そこで今後は、(1) f-MRI 検査を用いたホルムアルデヒド鼻内刺激による脳血流変化との検討を継続し、検査の感度、特異性の向上、(2) 口呼吸、知覚神経ブロックなどによるホルムアルデヒド誘発脳血流変化への影響を検討、(3) ホルムアルデヒド曝露によるヒト鼻粘膜組織上の各種免疫、炎症メディエーターの変化の解明、(4) シックハウス症候群の患者の呼気中の化学物質の解析、について検討を進めていく。

E. 結論

低濃度ホルムアルデヒド吸入による f-MRI による脳血流量評価法は客観的診断法として期待されるが、より詳細な検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

鳥居新平、平山耕一郎、秋山和夫、池澤善郎、内尾英一、岡本美孝、小倉英郎、高橋清、西間三馨. シックハウス症候群と未分類の多種化学物質過敏症の分離の試み. アレルギー 55:1515-1530.2006.

2. 学会発表

Hisamitsu K., Yonekura S., Okamoto Y.. Influence of formaldehyde on nasal mucosa of medical students in the dissection draining room. 11th Asian Research Symposium in Rhinology. Seoul, 2006.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

「シックハウス症候群の診断・治療法及び具体的方策に関する研究」

シックハウス症候群の理解をめざした皮膚粘膜病変からみた
ホルマリンによる生態影響とその成果に対する情報発信

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 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 山川有子 山川皮ふ科院長、横浜市立大学医学部非常勤講師
協力者 大砂博之 ひろクリニック院長、横浜市立大学医学部非常勤講師

研究要旨

シックハウス症候群 (SHS) は医学的に確立した単一の疾患ではないが、症状として皮膚粘膜症状が重要であり、皮膚症状からみた SHS の層別化は重要と思われる。具体的な症例を通じて、皮膚病変からみた分類層別化を通じて SHS 全体の概念を構築できればと考えている。その結果は SHS を皮膚病変から 4 ないし 5 群に層別化できると考えられた。皮膚粘膜症状を扱う機会の多い皮膚科医の中に SHS を浸透させることができれば、早期に発見し早期に対策をとることに役立つと思われる。また、皮膚病変からの考察だけでなく、SHS 全体の分類基準に照らしてどのように組み込んでゆくかも重要となってくる。加えて、これら SHS 研究の成果をわかりやすく浸透させるためのツール (ホームページの作成等) の作成も重要と考えられる。

A. 研究目的

シックハウス症候群 (SHS) は医学的に確立した単一の疾患ではなく、未だに一般医には理解しがたい疾患である。SHS は症状として皮膚粘膜症状が重要であり、皮膚症状からみた SHS の層別化は皮膚科医の中に SHS を浸透させるためには重要と思われる。具体的な症例を通じて、SHS にたいして皮膚病変からみた分類層別化を試み、その有用性を検討した。加えて、SHS 研究の成果をわかりやすく浸透させるためのツールはどのようなものがよいか検討した。

B. 材料と方法

皮膚病変から SHS を層別化しようとした研究には、岡山大皮膚科岩月教授のグループが平成 12 年・14 年にかけて厚労省の SHS 班研究でなされた研究成果がある。それらをふまえて、それぞれにつき、臨床症例や動物実験でのデータを蓄積し、症例報告なり、研究報告を実施した。さらに、その成果を自施設のものにかかわらず、ホームページ等を介して広めてゆく。

皮膚症状からみたシックハウス症候群の層別化

(岩月ら、皮膚病診療、2004 一部改変)

- 第 1 群 アレルギー機序による皮膚症状を呈する群
- 第 2 群 アトピー性皮膚炎 (AD) などの既存の皮膚炎が曝露により増悪する群
- 第 3 群 原因化学物質の濃度依存的に症状を呈する群
- 第 4 群 多種化学物質に対して指針値をはるかに下回る濃度において非アレルギー機序で症状が発現する群 (狭義の多種化学物質過敏症; MCS)

C. 研究結果

各群に相当する症例を検討する。

第 1 群 アレルギー機序による皮膚症状を呈する群

これには、アナフィラキシー、蕁麻疹、接触蕁麻疹、接触皮膚炎があり、アナフィラキシーでは蕁麻疹を伴うこともそうでないこともあり、機序としては 1 型アレルギーである。接触蕁麻疹は希ではあるが、接触部位に一致して蕁麻疹が形成される。また、接触皮膚炎は接触部位に一致して皮膚炎 (湿疹) が形成され、機序としては 4 型アレルギーである。更に揮発したホルマリンが触れた部位に皮膚炎が生じる (Air borne contact dermatitis) ケースもある。

具体的アナフィラキシー症例としては、歯科治療後に 30 分ほどで全身に紅斑出現し息苦しさ、手足のしびれを自覚した。1%のホルマリン溶液を用いたプリックテストで膨疹が形成され、診断し得たと同時にプリックテストの有用性が示唆された。また、別の例として、歯科治療後に数十分した後、蕁麻疹のみ出現する例もあり、アレルギーのレベルは個体によってかなり異なる事が示唆された。この例もプリックテストで陽性反応を得た。更に、接触皮膚炎の例としては、寮の清掃作業をするようになってから手に湿疹病変が出

現し、貼付テストで陽性反応を得、4 型アレルギーにおける貼付テストの有用性が認められた。これら第 1 群に相当する群は、アレルギー疑序で起こるため、SHS の範疇からはずれるのは言うまでもないが、鑑別診断ができてはじめて診断可能になるため、アナフィラキシーや蕁麻疹、接触皮膚炎に精通した皮膚科医が診断することが望ましい。

第 2 群 AD などの既存の皮膚炎が曝露により増悪する群

解剖実習前後の医学生を対象にした研究では、AD をもった学生の皮膚症状の出現頻度は、アトピー素因をもった学生全体のそれに比べ 2 倍であった。しかも、実習前後でのパッチテストでは新たに陽性化する例はなかったことより、既存の皮膚炎が悪化したのはアレルギー機序ではないことが示唆された。また、自験の AD 症例では、新築のマンションに移って生活するたびに AD の悪化がみられ、台所の FA 濃度が 0.8ppm であることや貼付テストは陰性であったことより、アレルギー機序を介さない AD の悪化と考えられた (図 1)。加えて、AD モデル動物である DS-Nh マウスを使って FA 曝露で皮膚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 曝露で 2 ヶ月後に非暴露群に比して有意な皮膚スコアの上昇が認められた。従って、FA は既存の皮膚炎の増悪因子となる事が示唆された。

第 3 群 原因化学物質の濃度依存的に症状を呈する群

これは FA の中毒症状ともとれる群であるが、このような例では、FA 曝露から遠ざかると症状が消える傾向が強い。しかも症状発現の種類や重症度に個人差はあるが、大多数の健常人がある濃度以上の原因化学物質の曝露で自覚する症状と考えられる。しかし SHS にも濃度依存的な要素もあり基準値の 10 分の 1 で症状がでるようでは SHS

を疑わざるを得ない。従って、前者を純粋な3群として、後者を4群に入れ新たに4aとし、症状発現のきっかけが、転居、増改築により、自宅内の特定の場所で症状が出現し、問題のあった場所から離れると症状がなくなるか軽くなるという、いわゆるSHSの定義に当てはまる群としたい。自覚的皮膚症状としては、チクチク、ピリピリ、赤くなる、痒くなる、赤くなる、かさかさ、ぷくつとふくれるなどがあるが、特異的なものはない。また、他覚的皮膚症状としては、皮脂欠乏（ドライスキン）、刺激性皮膚炎（皮膚刺激感）、皮膚そう痒、紅斑、湿疹皮膚炎、蕁麻疹（明らかに膨疹といえる例は少ない）などがみられ、露出部（顔、手）に症状が強い傾向があるなどのもも、科学的な皮疹の観察や皮膚テストでは診断がつかない。

第4群

4a群：大多数の人はほとんど気にならないか一過性の症状にとどまる程度の濃度であっても(0.08ppm?)種々の症状を呈し、生活に支障をきたすような群(狭義のSHS)

4b群：多種化学物質に対して指針値をはるかに下回る濃度において非アレルギー機序で症状が発現する群 これは狭義のいわゆる多種化学物質過敏症(MCS)と言うべき群である。SHSとオーバーラップし、ある意味でSHSの延長線上に位置し、FA、キシレン、トルエンにとどまらず、他種類の化学物質に反応しより重篤な病態と捉えることができる。診断には負荷テストが有用である。ほとんどの皮膚症状は科学的皮疹の観察や皮膚テストでは診断し得ない非特異的な皮疹と現時点では言わざるを得ない。

以上皮膚症状からFA関連の病態を分類すると図2のようになる。あくまで、皮膚症状を理解するためのものであり、皮膚科医の中でSHSの概念を広めるには有用と思われる。

SHSの概念や研究成果を自施設のものにかか

わらず、ホームページ等を介して広めてゆく。これには、有益で洗練された、できれば科学的に証明されたものを公開したいと考えているが、本年度は必要性を投げかけただけにすぎなかった。

D. 考察

SHSの相澤班の相澤らが提唱した、広義のSHSの分類基準は次のようである。すなわち、

- 1型 中毒症状（農薬など）
- 2型 化学物質曝露の可能性が大きい（新築、改築、改修後）
- 3型 化学物質曝露は考えにくい（心理的要因）
- 4型 アレルギー疾患や他の疾患が出現（喘息、皮膚炎）である。

これと私たちの提案である分類と照らしてみると、大方次のようになる。1型は第3群に、2型は4aに、3型は該当なく、4型は1群と2群を区別なく一括りにしているか、2群のみを意味しているのかもしれない。いずれにしても、皮膚粘膜症状が重要なため、皮膚病変を切り口とした分類案を考慮した方が良いように考える。更なる検討が必要である。

E. 結語

SHSの概念を整理したり、診断基準作成の助けになるようにと皮膚病変からSHSの病態を分類した。一般内科医・皮膚科医が理解し運用できるよう分類基準が作成されることが望まれる。

E. 研究発表

1. 学会発表
なし
2. 論文発表

高橋一夫：環境化学物質とアトピー性皮膚炎、皮膚の科学 5 24-28 2006.

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、症例(29歳女、アトピー性皮膚炎)

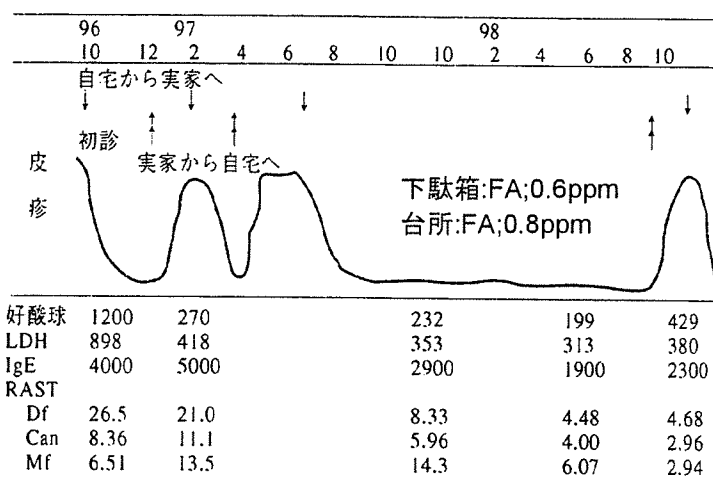


図2、皮膚症状からみたシックハウス症候群の層別化

- 第1群 アレルギー機序による皮膚症状を呈する群 (プリックテスト、貼付テストが陽性)
- 第2群 既存の皮膚炎が曝露により増悪する群 (貼付テストが陰性)
- 第3群 原因化学物質の濃度依存的に症状を呈する群 (一種の中毒症状、特異疹なし)
- 第4a群 大多数の人はほとんど気にならないか一過性の症状にとどまる程度の濃度であっても(0.08ppm?)種々の症状を呈し、生活に支障をきたすような群 (狭義のSHS)
- 第4b群 多種化学物質に対して指針値をはるかに下回る濃度において非アレルギー機序で症状が発現する群(狭義の多種化学物質過敏症;MCS)

シックハウス症候群の眼病変に関する臨床的・アレルギー学的解析

分担研究者 内尾英一 福岡大学医学部教授

研究要旨

シックハウス症候群(SHS)において、眼刺激感、流涙などの眼症状は主要な症状であり、動物においても、観察、評価が比較的容易にできる所見である。本年度はラット動物モデルにおいて、眼症状が出現する揮発性有機化合物の閾値濃度や感作方法による違い、また予防点眼の時期とその有効性などを解析した。Lewis ラットを用い、ホルムアルデヒド濃度を変化させて、曝露実験用装置内に全身曝露した。前感作(完全フロイントアジュバント(CFA))の有無についても検討した。予防点眼治療には、プラノプロフェン点眼薬を用いた。観察はラットの眼引っ掻き行動数を計測した。ラットはホルムアルデヒド 0.16ppm 以上の曝露により明らかな眼引っ掻き行動数の増加が見られた。CFA 前感作はホルムアルデヒド誘発眼刺激反応に影響を与えなかった。ホルムアルデヒド誘発眼引っ掻き行動はヒスタミン点眼誘発よりも反応は少なかった。ホルムアルデヒド 1.6ppm および 3.2ppm の高濃度短時間前曝露により、0.32ppm 以上の曝露の際に有意な眼引っ掻き行動数の増加が見られたが、プラノプロフェン点眼による予防作用は見られなかった。今回の結果により、SHS の重要な原因物質とされるホルムアルデヒドによる、SHS 眼症状の実験モデルが再現され、ラットにおける症状発現の閾値が求められた。眼症状以外の諸症状やより詳細な解析を他動物モデルなどを用いて今後もさらに検討していく必要がある。

A. 研究目的

眼症状はシックハウス症候群(SHS)の粘膜刺激症状の代表的なもののひとつであるが、今まで眼合併症の動物を用いた臨床的な解析は十分に行われていなかった。動物において、流涙、眼引っ掻き行動などは外形的にも観察、評価が容易にできる所見である。ラットは小動物であるが、ある程度の臨床所見や行動を観察することが可能である。今回は、ラットにおいて眼症状の出現する揮発性有機化合物(VOCs)の中からホルムアルデヒドの閾値濃度や予防点眼の時期などをラットを用いた実験モデルによって解析した。

B. 研究方法

1. 対象及び方法

動物は Lewis rat 雄で 8~9 週齢のものを用いた。合計 78 匹であった。揮発性有機化合物としては、ホルムアルデヒドを濃度 0~6.4ppm で使用した。曝露実験用装置は全身曝露方式有機溶剤曝露 chamber(SIS-G 型, 柴田科学)を使用した。前感作は、完全フロイントアジュバント(CFA; *Mycobacterium tuberculosis* 2.5mg/ml 含有)をラッ

ト hind footpad に皮下注射することによって実施した。ホルムアルデヒド曝露 15 日前に前感作をした。陽性対照として、ヒスタミン点眼を行ったが、ヒスタミン二塩酸塩(Sigma)を生理食塩水希釈し、10 μ mol/5ml に調製した。また、予防点眼治療には、プラノプロフェン(ニフラン®)点眼薬を用い、4 回/日点眼した。観察項目は眼引っ掻き行動数(/分)であり、ケージ外から観察して行った。以下に、上記の共通条件をもとにした各実験の方法を述べる。

2. 実験 1

ホルマリン濃度を、0, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.48, 0.64, 0.8ppm と変化させ、各群 6 匹ずつとした。前感作の有無で CFA(+)群, CFA(-)群とに分け、さらに Control 群はホルムアルデヒド吸引なしである。同時に、陽性対照実験として、ヒスタミン点眼のみを行った。

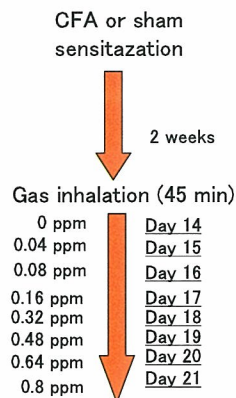


図 1. 実験 1 の投与スケジュール

実験 1 の前感作から実際の吸入スケジュールを図 1 に示した。動物は Day 14 から、1 日ずつ濃度を上げたホルムアルデヒドを 1 日 1 回、45 分吸引することを最大濃度 0.8ppm の Day 21 まで行っていった。陽性対照群では CFA もガス吸引もなく、点眼のみであった。

3. 実験 2

実験 2 では、高濃度のホルムアルデヒド吸引を Day 13 に 5 分間だけ行った。濃度は 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 ppm の各濃度で、各群 6 匹ずつで観察した。Day 14 以降の 45 分間のホルムアルデヒド吸引は実験 1 と同様に行った。

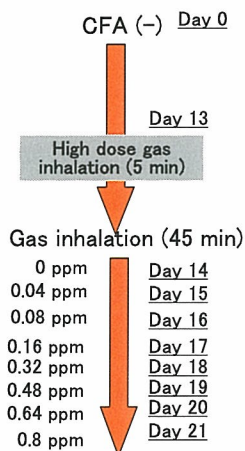


図 2. 実験 2 の投与スケジュール

4. 実験 3

実験方法は実験 1 で、CFA なしのものであるが、予防的に非ステロイド系抗炎症薬点眼治療が有効かどうかを調べるために、プラナプロフェン点眼薬を 4 日間 (Day 11-14), 7 日間 (Day 8-14), 14 日間 (Day 1-14) の 3 群 (各群 n=6) に分けて、それぞれ 1 日 4 回点眼しながら、ホルムアルデヒドを吸引させて眼引っかけ行動を観察した。投与スケジュールを図 3 に示す。

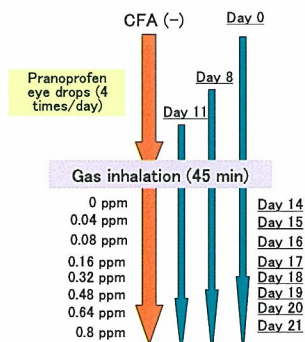


図 3. 実験 3 の投与スケジュール

C. 結果

1. 実験 1

ホルムアルデヒド吸引下のラットは、0.04ppm 以下では、眼引っかけ行動はほとんど観察されなかった。0.16ppm 以上の曝露により明らかな眼引っかけ行動数の増加が見られるようになった。非吸入群 (0ppm) と比較すると、0.08ppm 以上との間に、有意差が見られた (vs 0.08ppm で $p < 0.05$, vs 0.16ppm 以上との間に $p < 0.01$)。CFA 投与群と非投与群の間には眼引っかけ行動数の差はなく、CFA 前感作はホルムアルデヒド誘発眼刺激反応に影響を与えなかった。ヒスタミン点眼による眼引っかけ行動は平均 62 回/分と多く、ホルムアルデヒド誘発眼引っかけ行動よりも有意に多く、ホルムアルデヒドによる誘発反応はヒスタミン点眼誘発よりも少なかった。

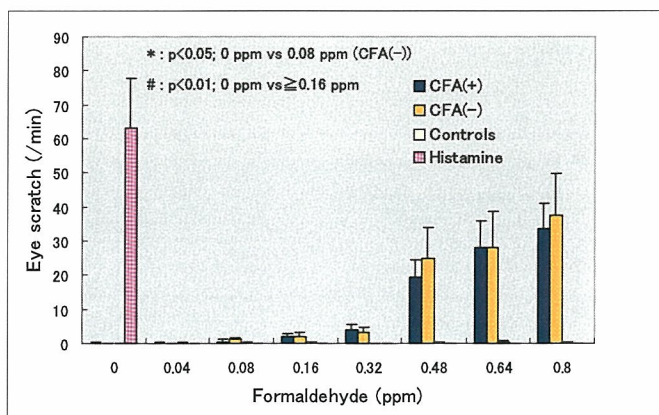


図 4. 前感作の有無およびホルムアルデヒド濃度と眼引っかけ行動 (実験 1)

2. 実験 2

ホルムアルデヒド 1.6ppm および 3.2ppm の高濃度短時間前曝露により、0.32ppm 以上の曝露の際に有意な眼引っ掻き行動数の増加が見られた。

0. 8ppm 以下の濃度の前曝露では、非曝露の場合との間に眼引っ掻き行動数の増加は認めなかった。また 6.4ppm の最大濃度の前曝露では、3.2ppm よりも、眼引っ掻き行動数は減少する傾向が見られた。

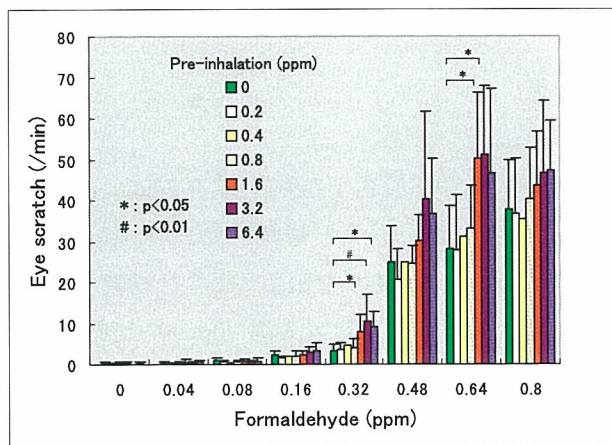


図 5 ホルムアルデヒド高濃度前曝露の有無と眼引っ掻き行動 (実験 2)

3. 実験 3

ガス吸入前からの予防と吸入期間中の治療目的でプラナプロフェン点眼治療を行って、眼引っ掻き行動が、減少するかどうかを観察したが、治療期間 4, 7 および 14 日間点眼のいずれの群も眼引っ掻き行動の減少は見られなかった。

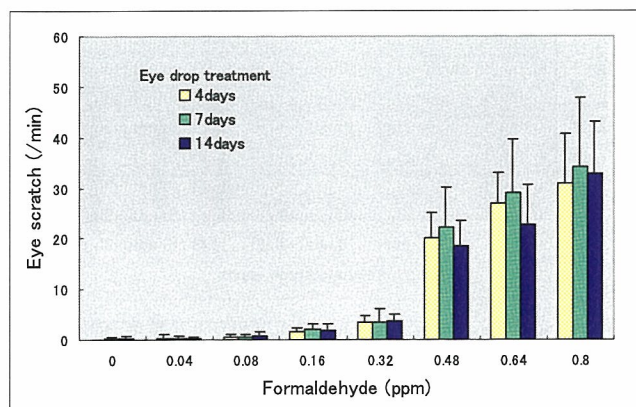


図 6. プラナプロフェン予防点眼治療による効果(実験 3)

D. 考察

SHS の病変は全身にわたって、複合的な症状が同時あるいは多発的に出現する特徴があるが、それぞれの症

状は非特異的なものがほとんどである。むしろ、それらの症状、臨床所見が出現するのが特定の建築物の中であるというのが、本疾患を特徴づける最も重要な要素である。SHS の眼症状について、筆者らはこれまでの研究を通して、アレルギー性炎症としての側面を有するものの、典型的な眼アレルギー疾患とは臨床的、アレルギー学的に異なる面があり、病態形成において、アレルギー性炎症の関与はあるが、アレルギー性炎症単独で説明できるものではないと考えられことを報告した。しかし、そのメカニズムには不明な点が多く、さらなる研究が必要と考えられていた。そこで、今回は動物実験モデルの確立と症状発現の閾値、予防点眼の可能性などについて研究した。

ラットはさまざまな眼疾患の研究、特に感染症、ぶどう膜炎、アレルギー性結膜疾患などの炎症性眼疾患の実験に使用されているために、今回 Lewis ラットを用いたが、ホルムアルデヒド非曝露と比較して、0.08ppm で、眼引っ掻き行動の有意な上昇が見られたことは環境濃度の 0.08ppm が、動物においてもひとつの重要な指標濃度となっていることを示すものといえる。ただ、0.48ppm 以上の濃度で見られた眼引っ掻き行動数はそれ以下と比して、さらに明らかな増加が見られるために、臨床症状の発現や自覚所見の出現などを考える上では、環境濃度以上の濃度に臨床的な意義を考える必要があることが推測された。今回、ラットにおいて眼刺激感によると考えられる眼引っ掻き行動が、全身曝露条件下で見られたことはラットによって SHS の臨床所見を再現する実験モデルを作ることが可能であることを示すものと考えられる。眼以外の臓器、皮膚、耳鼻咽喉領域、呼吸器において、どのような臨床所見が生じているかについては、さらに検討して行かなくてはならないが、本モデルは実験モデルとして再現性のあるものであり、今後の応用が可能と考えられた。

CFA による前感作の有無が眼引っ掻き行動に影響を及ぼさなかったことは、免疫学的な感作を行わなくても、SHS 症状が出現しうることを示しており、既報で示したように、SHS 眼症状がアレルギー炎症によるものではない可能性を示唆する結果であった。また、ヒスタミン点眼による I 型反応によって生じた眼引っ掻き行動数よりも、ホルムアルデヒド濃度を上昇させても、ガス吸入動物における

眼引っかけ行動が少なかったことも、同様にSHSによって生じる病態が単純なアレルギー性炎症ではないことを推測させるものであった。

ホルムアルデヒド 1.6ppm 以上の高濃度短時間前曝露により、その後のホルムアルデヒド吸入時に、有意な眼引っかけ行動数の増加が見られたことは、正確な機序は不明であるが、SHSの発症が反復曝露によって、生じていくことを反映している可能性が考えられた。高濃度曝露は5分間という短時間であるが、それによってその後の同じ気体の吸飲曝露によって、増幅した反応が生じることは、通常の免疫反応によるものとしての説明が困難であり、今後詳細に検討する必要があるが、化学物質過敏症としての性格を有しているSHSの病態の理解と有効な治療法を考えていく上で重要なことと思われる。

発症の予防手段として、今回は消炎薬の中で、NSAIDに属するプラノプロフェン点眼薬による治療を行って解析したが、予防効果だけでなく、治療効果も認めることができなかった。この理由としては、プラノプロフェンの抗炎症効果自体が弱かったことが第一に考えられる。NSAIDは眼炎症疾患でしばしば用いられているが、点眼治療という眼科の特殊性などから、ステロイド薬に比較して、その消炎効果は及ばないが、ステロイド点眼薬に見られるような眼圧上昇などの副作用がないことから、比較的安全な点眼薬として使用されているものである。NSAIDよりも強力な消炎薬であるステロイド薬あるいは最近臨床応用された免疫抑制薬などを使用すれば、予防・治療効果は生じることが可能性としてあるので、今後引き続き検討していく必要があるといえる。また、ホルムアルデヒドを今回対象としたが、キシレン、トルエンなどによって同様のモデルが成立しうるかについても、検討を要すると考えられる。

E. 結論

SHSの眼病変の実験モデルとして、ホルムアルデヒドを閉鎖ケージ内に投与する全身曝露形式でラットにSHS眼症状によく類似した眼引っかけ行動を主な特徴とする実験モデルを作成することができた。症状発現の閾値濃度は0.08ppmであったが、明らかな眼引っかけ行動数の増加はそれよりも高い0.48ppmで見られた。ホルムアルデヒド 1.6ppm 以上の高濃度短時間前曝露により、その後の低濃度ホルムアルデヒド吸入時に、有意な眼引っかけ

行動数の増加を見ることができた。また、非ステロイド消炎点眼薬によってはホルムアルデヒド吸入による眼引っかけ行動への予防、治療効果はいずれも見られなかった。以上からSHS動物実験モデルとして、ホルムアルデヒド吸入による系はその病態や予防、治療を検討する上で有用なことが確認され、これを用いて、眼局所におけるSHSの病態形成メカニズムはさらに検討を要すると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

内尾英一：アレルギー性結膜炎はどのように診断するか 1)診察・診断のコツ. アレルギー・免疫 13 : 76-80, 2006

内尾英一：アレルギー性結膜疾患ガイドラインー臨床像と評価基準ー. アレルギーの臨床 26 : 594-598, 2006

内尾英一：アレルギー性結膜炎のリモデリングーサイトカインの面からー. アレルギー・免疫 13 : 1148-1153, 2006

内尾英一：アレルギー性結膜疾患診療ガイドライン. MEDICO 37 : 433-436, 2006

Fujishima H, Fukagawa K, Takano Y, Okamoto S, Nakagawa Y, Uchio E, Yokoi N, Fukushima A, Takamura E : The early efficacy of topical levocabastine in patients with allergic conjunctivitis. Allergol Int 55 : 301-303, 2006

鳥井新平 平山耕一郎, 秋山一男, 池澤善郎, 内尾英一, 岡本美隆, 小倉英郎, 高橋 清, 西間三馨 : シックハウス症候群と未分類の多種化学物質過敏症の分離の試みーシックハウス症候群の定義および症状ー. アレルギー 55 : 1515-1530, 2006

2. 学会発表

内尾英一：アレルギー科診療における眼アレルギーの病態と治療. 第22回三重県アレルギー研究会, 2006年2月, 津市

内尾英一：眼アレルギーの病態に迫る. 眼アレルギーフォーラム 21 眼アレルギー学術講演会, 2006年2月,

大阪市

内尾英一：春季カタル(重症眼アレルギー)の治療戦略. 第 19 回日本アレルギー協会東北支部秋田分会学術講演会, 2006 年 6 月, 秋田市

小沢昌彦, 山口晃生, 淵上あき, 門之園一明, 内尾英一：春季カタルに対するトリアムシロン眼板上注射の治療成績. 第 60 回日本臨床眼科学会総会, 2006 年 10 月, 京都市

内尾英一：眼アレルギーの新しい治療戦略. 第 51 回新潟臨床眼科学研究会, 2006 年 11 月, 新潟市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ホルムアルデヒド及びインドメタシンを用いたラット皮膚知覚過敏モデルの作成

(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)

(共同研究者) 三宅美緒 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 実験助手)

研究要旨 シックハウス症候群の診断・治療を向上させるためには、この症候群の病態解明をいっそう進める必要がある。本研究では、シックハウス症候群の病態のひとつである知覚神経刺激に対する過剰反応 (いわゆる知覚神経過敏) を有する動物モデルの作成を試みた。ラットにホルマリン塗布及びインドメタシン全身投与を行うと、皮膚の知覚神経C線維から遊離されるタキキニンによって惹起される血漿漏出が増強される (予備実験結果) が、このような神経原性炎症の増強は主に知覚神経C線維の増殖・過剰分布によって引き起こされると推定される。そこで、ホルマリン塗布及びインドメタシン腹腔内投与により皮膚の神経栄養因子 (NGF・BDNF) の産生が増加し、その結果、C線維の増生が誘導される可能性についても検討した。

Wistar ラットの腹部を剃毛し、片側にホルマリン (10%) またはカプサイシン (10 mM) を塗布し、反対側にそれぞれの溶解液を塗布した。また、別のラット群にインドメタシン (10 mg/kg) またはその溶解液を腹腔内に注射した。1週間後、全身麻酔下にエバンスブルーを静注し、剃毛したラット腹部皮膚にカプサイシン (10 mM) を塗布し、40分後に皮膚標本を採取した。皮内に漏出したエバンスブルーをホルマミドで抽出し、血漿漏出量の指標とした。次に、ホルマリン塗布またはインドメタシン腹腔内投与 28時間後または1週間後に腹部皮膚を採取し、皮膚組織中の NGF 及びサブスタンス P (C線維) を蛍光免疫染色法を用いて検出した。

ホルマリン塗布及びインドメタシン腹腔内投与のいずれにおいてもカプサイシン塗布による皮膚血漿漏出を増強した。また、いずれの刺激も28時間後の真皮層における NGF の産生増加、1週間後の真皮層のC線維の過剰分布を引き起こした。一方、カプサイシン塗布はこれらの皮膚反応を著しく減弱した。ホルマリン塗布及びインドメタシン腹腔内投与は皮膚のC線維の増生を促進し、カプサイシンによる神経原性炎症を亢進させたと考えられた。

研究目的

シックハウス症候群の診断・治療を向上させるためには、この症候群の病態解明をいっそう進める必要がある。本研究では、シックハウス症候群の病態のひとつである知覚神経刺激に対する過剰反応 (いわゆる知覚神経過敏) を有する動物モデルの作成を試みた。ラットにホルマリン塗布及びインドメタシン全身投与を行うと、皮膚の知覚神経C線維から遊離

されるタキキニンによって惹起される血漿漏出が増強される (予備実験結果) が、このような神経原性炎症の増強は主に知覚神経C線維の増殖・過剰分布によって引き起こされると推定される。そこで、ホルマリン塗布及びインドメタシン腹腔内投与により皮膚の神経栄養因子 (NGF・BDNF) の産生が増加し、その結果、C線維の増生が誘導される可能性についても検討した。

(倫理面への配慮) 以下の実験は、名古屋大学の動物実験指針に従って実施された。

【研究1】

研究目的

ラット皮膚にホルマリンを塗布すると、カプサイシンと同様、皮膚の知覚神経 C 線維を選択的に刺激し、タキキニン遊離を介した血漿漏出を引き起こす。我々はホルマリンを前塗布することにより内因性タキキニンによる皮膚血漿漏出が増強されるか否かを検討した。また、ホルマリン塗布後に皮膚を採取し、神経成長因子 (NGF) の発現と知覚神経 C 線維の分布を免疫組織学的に検討した。

研究方法

Wistar 雄性ラット (6 週齢、SPF) の腹部を剃毛し、片側にホルマリン (10%) またはカプサイシン (10 mM) を塗布し、反対側にそれぞれの溶解液を塗布した。1 週間後、全身麻酔下にエバンスブルーを静注し、カプサイシン (10 mM) を左右 1 箇所ずつ円形 (直径 15 mm) に塗布し、40 分後にその部位を採取した。皮内に漏出したエバンスブルーをホルマミドで抽出し、血漿漏出量の指標とした。さらに、ホルマリン (10%) またはカプサイシン (10 mM) 塗布を 1 週間ごとに 3 回反復した場合の効果を同様に検討した。次に、ホルマリン (10%) とカプサイシン (10 mM) を用いた最終処置 28 時間後または 1 週間後に皮膚を採取し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびトルイジンブルー染色を行った。さらに、NGF・サブスタンス P の組織中の発現を測定するため、それぞれの抗体を用いた蛍光免疫染色法を行った。各処置群の数は 5~8 匹であった。

研究結果

ホルマリン塗布は、単回・反復のいずれにおいてもカプサイシン塗布による血漿漏出を増強した。一方、カプサイシン塗布はこの皮膚反応を減弱した (図 1、2)。ホルマリン塗布により、表皮の肥厚と表皮細胞の過増殖、真皮へのマクロファージ・リンパ球・好酸球・肥満細胞の浸潤を認めた (図 3)。なお、この組織変化は反復塗布でより著明であった。一方、カプサイシン塗布は明らかな組織変化を引き起こさなかった。前処置 1 週間後のトルイジンブルー染色標本では、ホルマリン塗布・カプサイシン塗布のいずれにおいても肥満細胞の真皮層への浸潤が観察された (ホルマリン>カプサイシン、図 4)。サブスタンス P 抗体により C 線維が抽出されるが、ホルマリン塗布後、真皮層で C 線維がより密集して分布していた (反復塗布 \geq 単回塗布、図 5)。NGF はリンパ球を除く浸潤細胞と一部の線維芽細胞に発現を認めた (反復塗布>単回塗布、図 6)。一方、カプサイシン塗布部位には C 線維の分布は疎であり (図 5)、NGF の発現を認めなかった。

考察

ホルマリン塗布は皮膚の C 線維の増生を促進し、神経原性炎症の増強 (知覚過敏) を引き起こしたと考えられる。カプサイシン塗布は皮膚の知覚神経 C 線維末端部からタキキニンを遊離して急性の血漿漏出を惹起する。その後、同様の刺激を反復しても C 線維末端部のタキキニンが枯渇してしまうため、急性の血漿漏出は起こらないか著しく減弱する。ホルマリン塗布も同様の作用を皮膚の C 線維に及ぼすはずであるが、塗布 1 週間後のカプサイシン塗布に対する反応は予想に反して増強し

ていた。その理由は十分には解明できていないが、おそらくホルマリン塗布がC線維以外の皮膚の構成細胞（線維芽細胞・肥満細胞など）に作用し、NGFなどの神経栄養因子やTNF- α などの炎症性サイトカインを遊離させた可能性が考えられる。前者は直接C線維の増生を促進し、後者は構成細胞の活性化や炎症細胞の組織浸潤を惹起し、これらの細胞から神経栄養因子を遊離させたと推測される。

【研究2】

研究目的

インドメタシンをはじめとするNSAIDsは消化管粘膜に炎症を起こし、時に潰瘍性病変を引き起こす。本研究では、ラットにインドメタシンを腹腔内投与し、ホルマリン塗布と同様に内因性タキキニンによる皮膚血漿漏出の増強が得られるか否かを検討した。また、インドメタシン投与後に皮膚を採取し、神経成長因子(NGF・BDNF)の発現と知覚神経C線維の分布を免疫組織学的に検討した。

研究方法

Wistar雄性ラット(6週齢・SPF)にインドメタシン(3 mg/kg、10 mg/kg)またはその溶解液を1mlずつ腹腔内注射した。1週間後、全身麻酔下にエバンスブルーを静注し、カプサイシン(10 mM)を左右1箇所ずつ円形(直径15 mm)に塗布し、40分後にその部位を採取した。皮膚に漏出したエバンスブルー量を測定し、これを血漿漏出の指標とした。次に、最終処置28時間後と1週間後に腹部皮膚を採取し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびトルイジンブルー染色を行った。さらに、サブスタンスP・TRPV1・NGF・BDNFの組織中の発現を蛍光免疫染色法を用いて検討した。

研究結果

インドメタシンを全身投与すると、3 mg/kg・10 mg/kgのいずれにおいてもカプサイシン塗布による血漿漏出を増強した(図7)。また、ラットのオボアルブミン特異IgE抗体を用いたPCA反応を有意に増加した(図8)。組織学的検討では、インドメタシンは表皮の肥厚などのリモデリングは惹起しなかったが、真皮層へのマクロファージ・リンパ球・好中球・好酸球の浸潤をわずかであるが引き起こした(図9)。また、全身投与28時間後に肥満細胞の真皮層への浸潤を認めしたが、1週間後には無処置群と同レベルにまで減少した(図10)。サブスタンスP抗体によりC線維が抽出されるが、主に真皮層でこれらの神経線維がより密集して分布していた(図11)。また、TRPV1抗体で同様にC線維の分布を観察したが、サブスタンスP抗体を用いた場合と同様の結果が得られた(図12)。NGFとBDNFの発現は全身投与28時間後の皮膚線維芽細胞に認められた(図13、14)。しかし、これらの栄養因子の発現は1週間後の組織標本では観察されなかった。

考察

インドメタシンを全身投与すると皮膚の線維芽細胞からNGF・BDNFが産生・遊離され、その結果、C線維の過剰分布を生じると考えられた。また、由来は不明であるが、炎症性メディエーターを産生し、わずかではあるが、単核球・好中球・好酸球の浸潤を引き起こしたと推測される。インドメタシン全身投与は1週間後にPCA反応の増強をもたらしたが、この時点では浸潤肥満細胞は消退しており、個々の肥満細胞が活性化されていた可能性

が考えられる。本研究では、インドメタシンは皮膚の神経原性炎症とともに、アレルギー性炎症を増悪させる可能性が示唆された。

今後の研究計画

1) ホルマリンや他の VOCs が皮膚の構成細胞に作用して神経栄養因子を遊離し、知覚神経 C 線維のリモデリングを介した神経過敏を引き起こす機序(主に関与するケミカルメディエーターやサイトカイン)を解明し、その抑制方法を検討する。

2) インドメタシンをはじめとする COX 阻害薬が皮膚の神経過敏を引き起こす機序(主に関与するケミカルメディエーターやサイトカイン)を解明し、その抑制方法を検討する。また、気道をはじめとする他臓器への影響も検討する。

3) シックハウス症候群で皮膚症状のある患者で、今回の動物モデルで示された皮膚の知覚過敏と C 線維の過剰分布が存在するかどうかを検討する。

図 1-14 の説明

図 1 : ラットの腹部皮膚にホルマリン (10%) またはカプサイシン (10 mM) を塗布し、カプサイシン塗布 (10 mM) による皮膚血漿漏出反応が 1 週間後にどのように修飾されるのかを観察した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ v.s control

図 2 : ラットの腹部皮膚へのホルマリン (10%) またはカプサイシン (10 mM) 塗布がカプサイシン塗布 (10 mM) による皮膚血漿漏出反応に及ぼす影響 - 単回塗布と反復塗布の比較検討。反復塗布をしても、単回塗布と比べ効果に有意差を認めなかった。

図 3 : ホルマリン (10%) またはカプサイシン (10 mM) をラットの腹部皮膚に単回または反復塗布し、1 週間後に皮膚標本を採取して Hematoxylin eosin 染色で組織変化を観察した。

図 4 : ホルマリン (10%) またはカプサイシン (10 mM) をラットの腹部皮膚に単回または反復塗布し、1 週間後に皮膚標本を採取して Toluidine blue 染色で皮膚組織中の肥満細胞の分布を観察した。右図は一定の広さの視野における肥満細胞数を示したものであるが、ホルマリンもカプサイシンも単回、反復塗布にかかわらず肥満細胞数が増加した (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ v.s sham)。しかし、この反応はホルマリン塗布でより著明であった。

図 5 : ホルマリン (10%) またはカプサイシン (10 mM) をラットの腹部皮膚に単回または反復塗布し、1 週間後に採取した皮膚標本を用いて FITC を標識したサブスタンス P 抗体で皮膚組織中の知覚神経 C 線維を検出した。

図 6 : ホルマリン (10%) またはカプサイシン (10 mM) をラットの腹部皮膚に単回または反復塗布し、28 時間後に採取した皮膚標本を用いて FITC を標識した NGF 抗体で NGF

産生細胞を検出した。

図 7：ラットにインドメタシン (3 mg/kg、10 mg/kg) またはその溶解液を腹腔内投与し、カプサイシン塗布 (10 mM) による皮膚血漿漏出反応が 1 週間後にどのように修飾されるのかを観察した。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ v.s vehicle

図 8：ラットにインドメタシン (3 mg/kg、10 mg/kg) またはその溶解液を腹腔内投与し、ラット由来オボアルブミン特異 IgE 抗体 (64 倍希釈、256 倍希釈) を用いた PCA 反応が、1 週間後にどのように修飾されるのかを検討した。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ v.s vehicle

図 9：ラットにインドメタシン (3 mg/kg、10 mg/kg) またはその溶解液を腹腔内投与し、1 週間後に採取した皮膚標本を用いて Hematoxylin eosin 染色で組織変化を観察した。

図 10：ラットにインドメタシン (3 mg/kg、10 mg/kg) またはその溶解液を腹腔内投与し、28 時間後と 1 週間後に採取した皮膚標本を用いて Toluidine blue 染色で組織中の肥満細胞の分布を観察した。右図は一定の視野における肥満細胞数を示したものであるが、インドメタシン前処置の 28 時間後に肥満細胞数は増加し、1 週間後には sham と同レベルにまで減少した。

図 11：ラットにインドメタシン (3 mg/kg、10 mg/kg) またはその溶解液を腹腔内投与し、1 週間後に採取した皮膚標本を用いて FITC を標識したサブスタン P 抗体で皮膚組織中

の知覚神経 C 線維を検出した。

図 12：ラットにインドメタシン (3 mg/kg、10 mg/kg) またはその溶解液を腹腔内投与し、1 週間後に採取した皮膚標本を用いて FITC を標識した TRPV1 抗体で皮膚組織中の知覚神経 C 線維を検出した。

図 13：ラットにインドメタシン (3 mg/kg、10 mg/kg) またはその溶解液を腹腔内投与し、28 時間後に採取した皮膚標本を用いて FITC を標識した NGF 抗体で皮膚組織中の NGF 産生細胞を検出した。

図 14：ラットにインドメタシン (3 mg/kg、10 mg/kg) またはその溶解液を腹腔内投与し、28 時間後に採取した皮膚標本を用いて FITC を標識した BDNF 抗体で皮膚組織中の BDNF 産生細胞を検出した。

F. 健康危険情報 (なし)