

G. 研究発表

1. 論文発表

(執筆中)

2. 学会発表

- 1) Sakamoto T, Miyake M, Kimura R, Morii S, Ito K. Exaggerated neurogenic and allergic inflammation in the skin of rats treated with systemically administered indomethacin. American Academy of Allergy Asthma & Immunology Annual Meeting, San Diego 2007, 2, 23-27.
- 2) Morii S, Kondo F, Ikai Y, Miyake M, Futamura K, Ito K, Sakamoto T. Tacrolimus hydrate ointment inhibits skin plasma extravasation induced by topically applied *m*-xylene but not capsaicin in rat. American Academy of Allergy Asthma & Immunology Annual Meeting, San Diego 2007, 2, 23-27.
- 3) 坂本龍雄、三宅美緒、森井志歩、木村量子、広瀬 泉、二村昌樹、伊藤浩明
ミニシンポジウム「アトピー性皮膚炎」
ラット皮膚へのホルマリン塗布は内因性タキキニンによる皮膚血漿漏出反応を増強する
第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2006. 11. 2-4.
- 4) 三宅美緒、坂本龍雄、森井志歩、木村量子、広瀬 泉、二村昌樹、伊藤浩明
ミニシンポジウム「アトピー性皮膚炎」
ラット皮膚へのホルマリン塗布は内因性タキキニンによる皮膚血漿漏出反応を増強する—その機序の解明
第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2006. 11. 2-4.

5) 坂本龍雄、三宅美緒、森井志歩、木村量子、広瀬 泉、二村昌樹、伊藤浩明、森下雅史

ラット皮膚へのホルマリン塗布は皮膚知覚神経 C 線維を増生させる—薬物制御の試み
第 43 回日本小児アレルギー学会、幕張、2006.11.25-26.

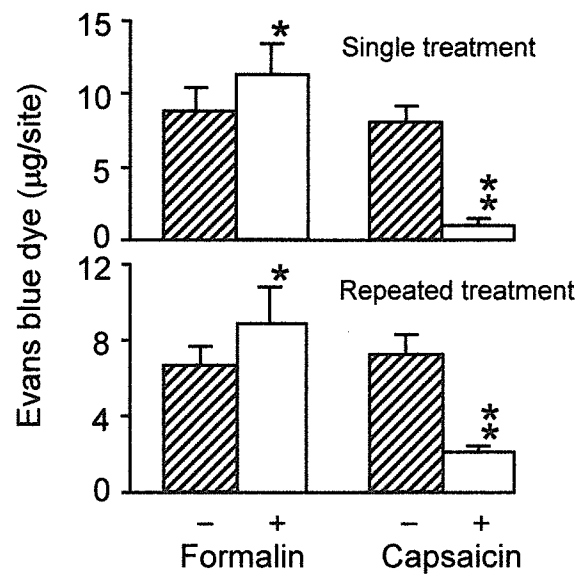
6) 森井志歩、三宅美緒、木村量子、広瀬 泉、二村昌樹、伊藤浩明、近藤文雄、猪飼誉友、坂本龍雄

タクロリムス軟膏はラット皮膚へのキシレン塗布による血漿漏出を制御するがカプサイシン塗布による血漿漏出を抑制しない
第 43 回日本小児アレルギー学会、幕張、2006.11.25-26.

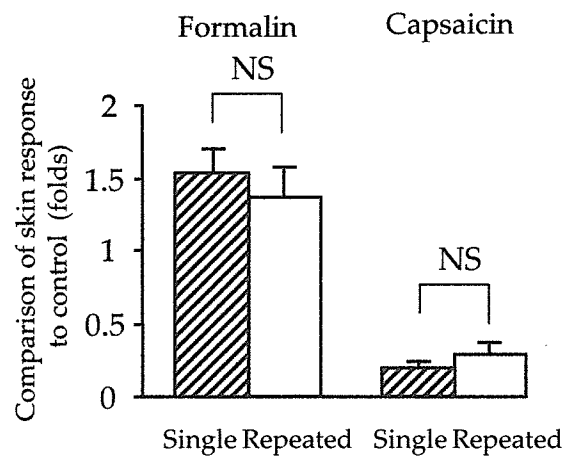
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 (なし)
2. 実用新案登録 (なし)
3. その他 (なし)

1



2



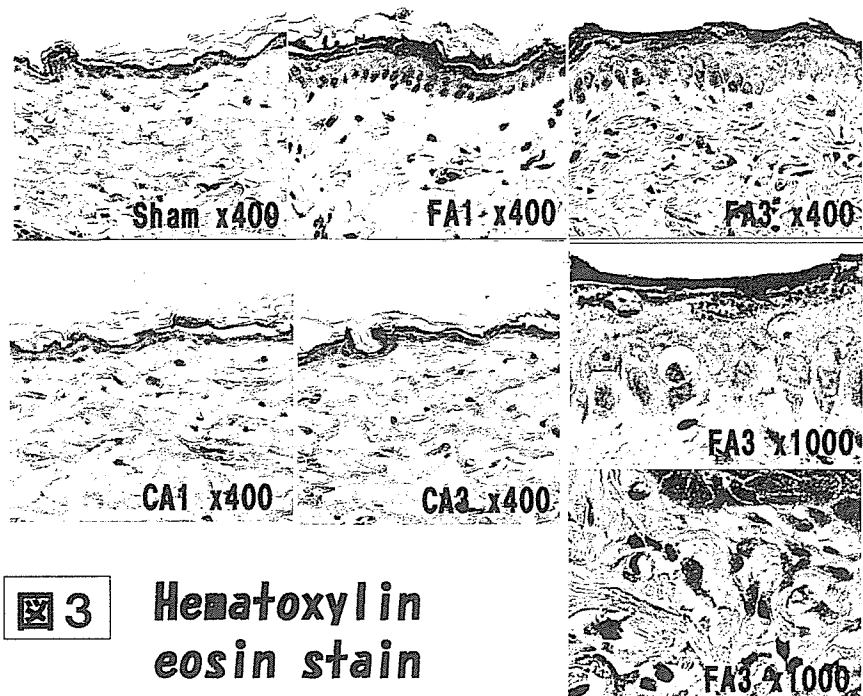
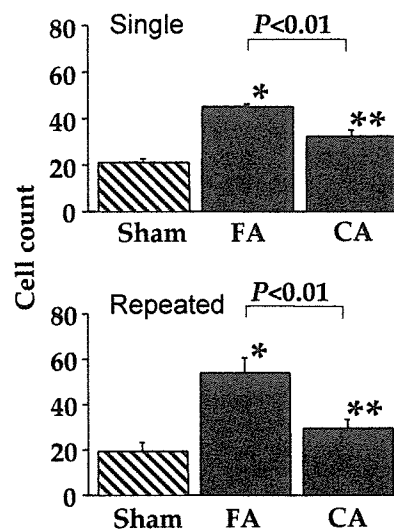
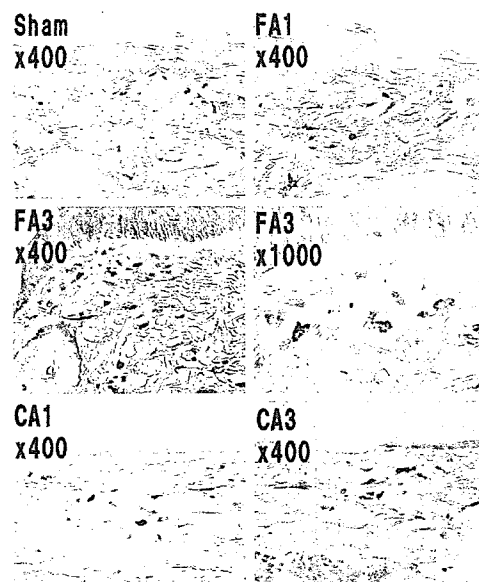


図3 Hematoxylin
eosin stain

図4 Toluidine blue stain

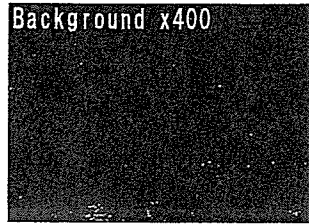
ホルマリン、カプサイシン塗布による
ラット皮膚への肥満細胞の浸潤



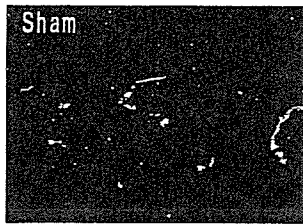
SP-FITC

5

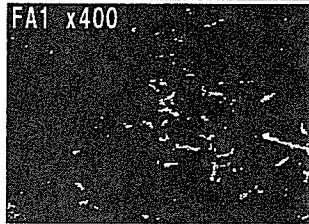
Background x400



Sham



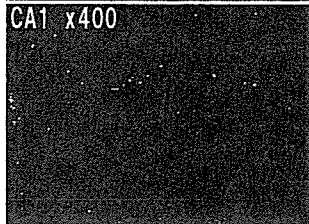
FA1 x400



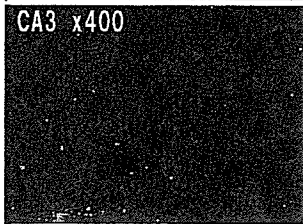
FA3 x400



CA1 x400



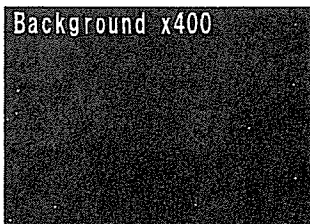
CA3 x400



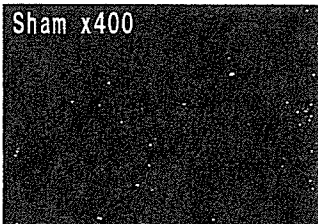
NGF-FITC

6

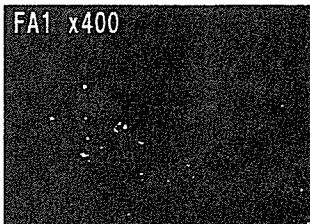
Background x400



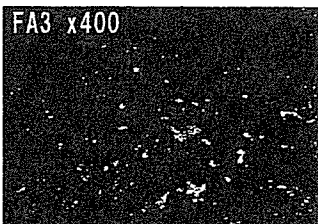
Sham x400



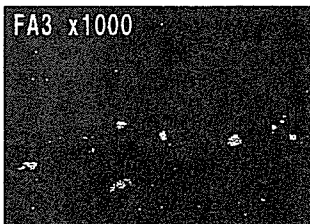
FA1 x400



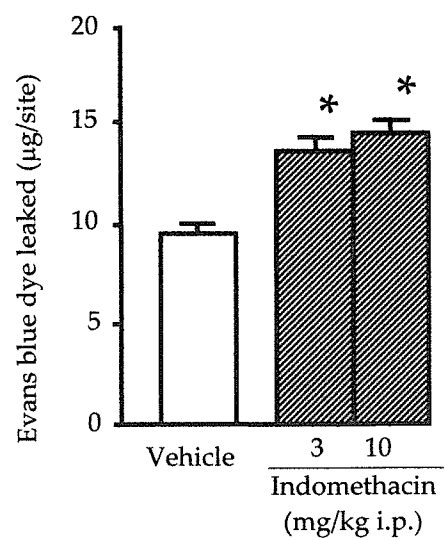
FA3 x400



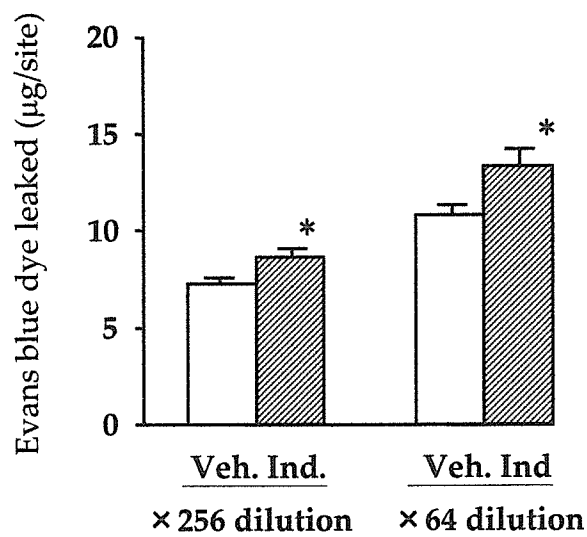
FA3 x1000

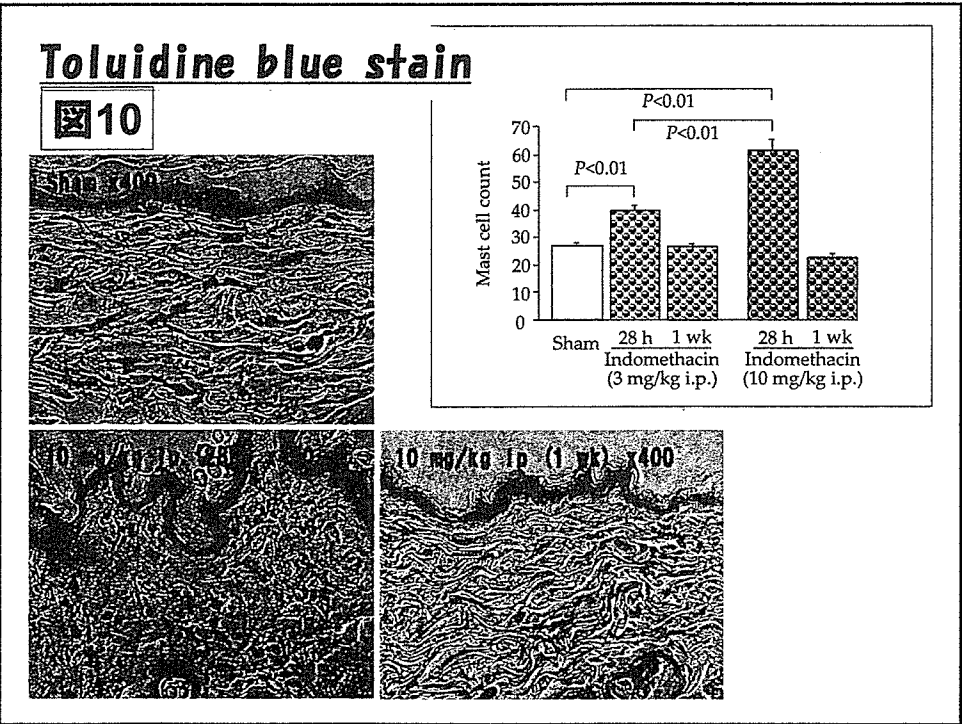
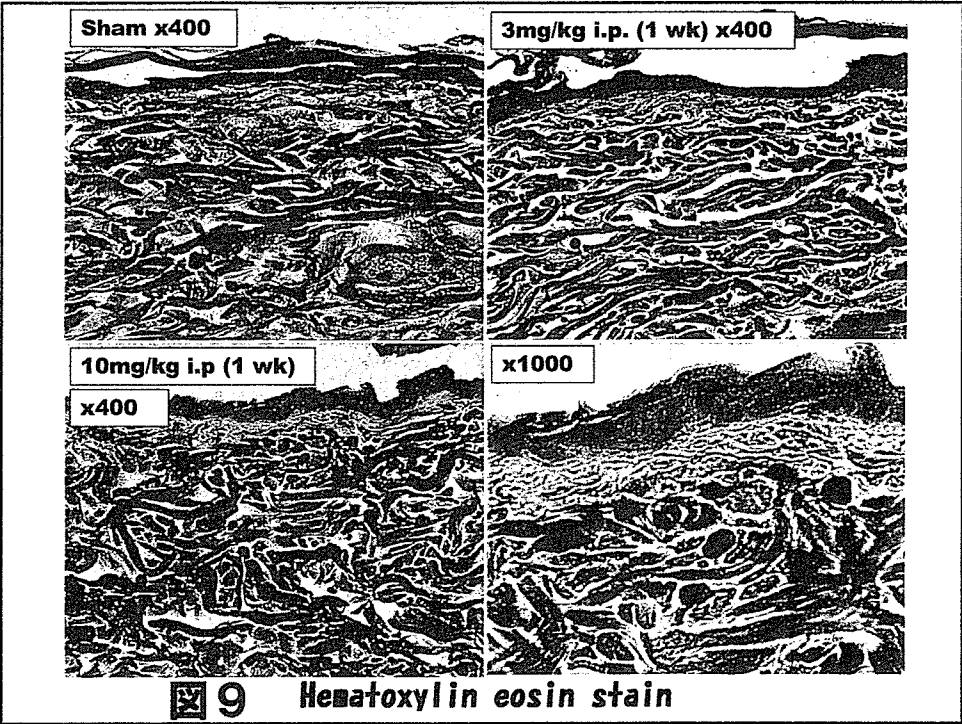


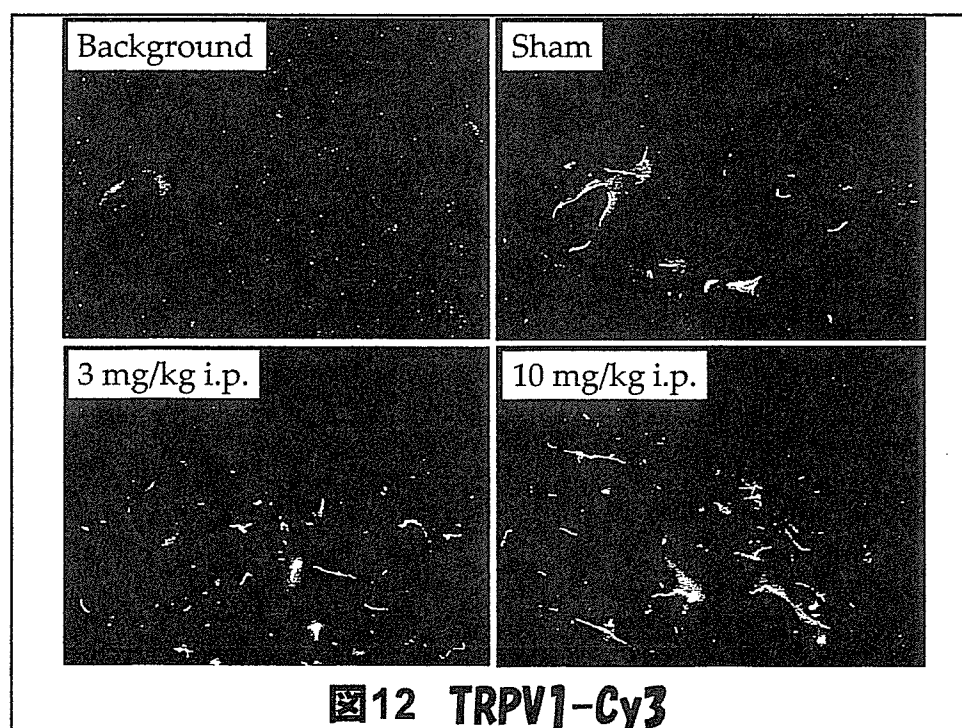
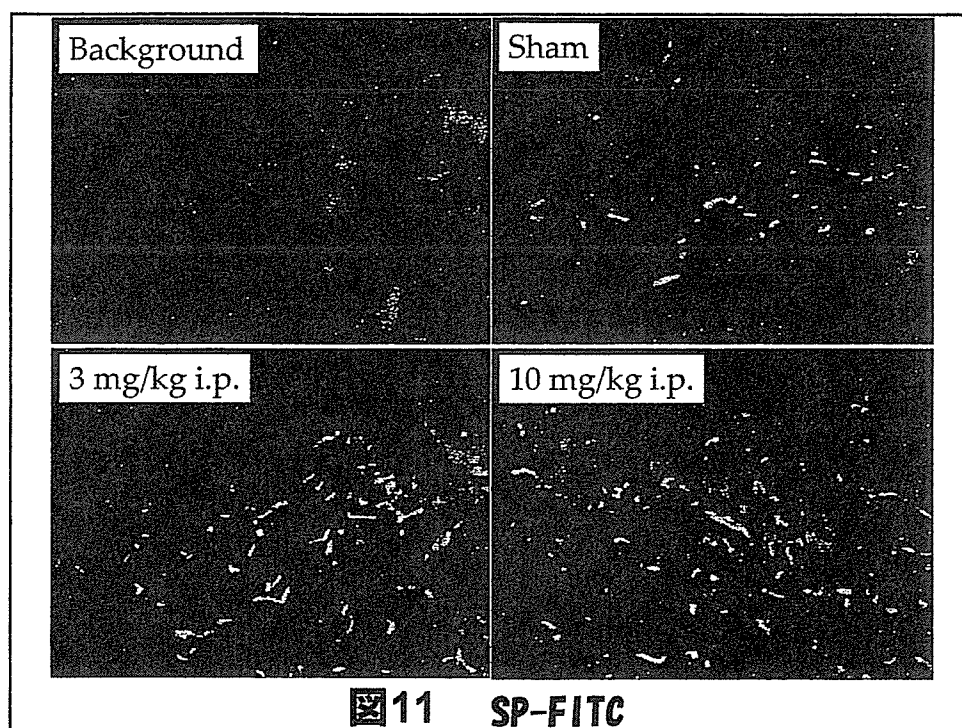
7

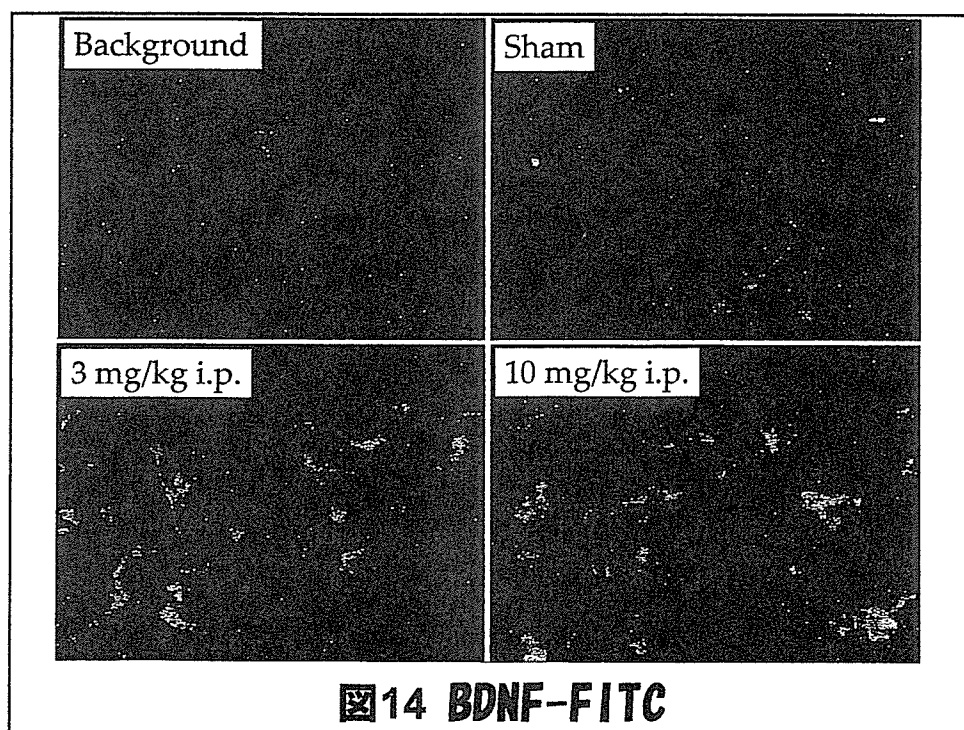
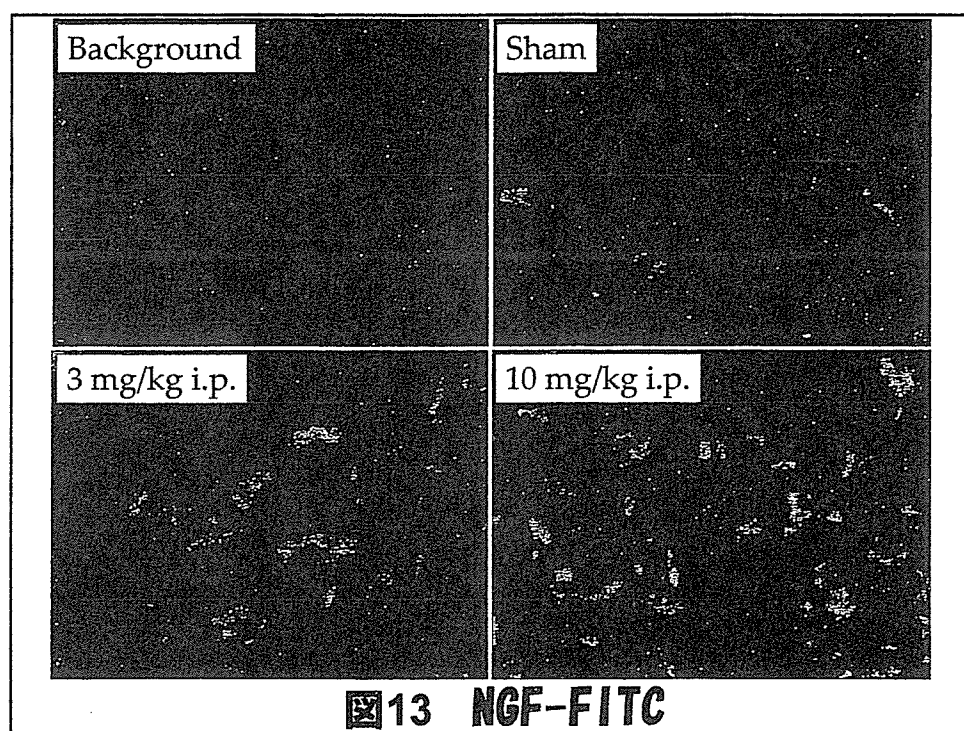


8









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

－揮発性有機化合物の反復塗布によるマウス皮膚に及ぼす影響－

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 これまでに教室では、シックハウス症候群の発症ならびに病態形成の機序の解明を目的とし、ホルムアルデヒド(FA)のマウス皮膚反応への影響を検討した結果、FA (2-10%) 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、本反応はその他のキシレンやトルエンなどの 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 反応ならびにバニロイド受容体である TRPV1 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。そこで本年度は、5 回目の FA 塗布 24 時間後の耳介組織において、昨年度までに RT-PCR 法により mRNA の発現増強が観察された TRPV1 および種々の神経栄養因子の mRNA 発現変動を、より定量的の高い real time PCR 法を用いて再現性を検討した。一方、昨年度、治療的観点から TRPV1 受容体拮抗薬の capsazepine の影響について検討を行った結果、統計学的な有意差はないものの抑制傾向が認められた。そこで本年度も引き続き、その薬効評価を行った。すなわち、マウスの耳介の表裏に 1%あるいは 5%の FA (溶媒: アセトン) を週 1 回、計 5 回反復塗布し反応を惹起した。その結果、5 回目の FA 塗布 24 時間後に組織を採取し、real time PCR 法により、NGF、BDNF、NT-3 ならびに TRPV1 の mRNA 発現を検討したところ、NT-3 を除く遺伝子については FA の濃度に依存して発現の増強が認められた。一方、5%の FA 反復塗布によって誘発される耳介腫脹に及ぼす capsazepine の影響を検討したところ、今回の検討においても抑制傾向が観察された。以上の成績より、FA によって誘発される耳介腫脹の病態形成には、一部の神経栄養因子ならびにバニロイド受容体に関与している可能性が改めて示唆された。

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・助教授)

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ことが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。

昨年までの 3 年間に、シックハウス症候群の免疫学的機序と神経生理学的機序の関わりについて検討するため、マウスの両耳介に FA を反復塗布した際の皮膚反応を観察した。その結果、FA (2-10%) 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に加え、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。さらに、本皮膚反応の機序を解明する目的で、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RT-PCRにより定性的に検討した。その結果、耳介では Th2 優位な反応が生じており、加えて BDNF、NT-3 ならびに TRPV1 などの発現亢進が認められることから、神経原性炎症が本皮膚反応に関与している可能性が推察された。

さらに、本反応で認められた様々な表現系が、他の多くの VOCs で共通に観察されるか否か、について検討を行った。その結果、マウス耳介へのトルエンあるいはキシレン塗布群においても 50 および 100%の濃度で耳介腫脹が観察されたが、これらの VOCs による皮膚反応はいずれも FA 塗布による腫脹に比し非常に弱く、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、実際に発現亢進の認められた上述の機能分子の FA 誘発皮膚反応における意義についても検討を行った。すなわち、dimethylsulfoxide などを溶媒として TRPV1 受容体拮抗薬 capsazepine の本耳介腫脹に及ぼす影響を検討したところ抑制傾向が観察された。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。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り、その腫脹反応には TRPV1 ならびに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。

そこで本研究では、昨年までの検討に引き続き、FA 誘発耳介腫脹反応における神経原性炎症の病態解明ならびに治療標的の探索を目的とし、これまでに RT-PCR 法による検討において mRNA の発現亢進が認められた機能分子について、real time PCR 法を用いて定量的に解析した。また、昨年度の検討において抑制傾向が観察された capsazepine についても、溶媒を変更し、再度、その影響を検討した。

B. 方法

1. VOCs 塗布暴露および耳介組織における mRNA 発現

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 および 5%の

FA を週 1 回、計 5 回反復塗布し反応を惹起した。FA 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。最終 FA 塗布 24 時間後に、耳介組織を採取し、real time PCR 法により、NGF、BDNF、NT-3 および TRPV1 mRNA 発現を定量的に検討した。

2. TRPV1 受容体拮抗薬を用いた検討

TRPV1 受容体拮抗薬 capsazepine の本耳介腫脹に及ぼす影響を検討した。すなわち、capsazepine は、0.5%CMC-Na-PBS 溶液に懸濁し、FA 塗布 30 分前に皮下投与し、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。

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) 耳介組織における mRNA 発現

1 および 5%の FA をマウスの両耳介の表裏に週 1 回宛 5 週間、計 5 回塗布することにより、FA の濃度に依存した耳介腫脹反応が観察された。最終 FA 塗布 24 時間後に耳介組織を採取し、real time PCR 法により NGF、BDNF、NT-3 および TRPV1 の mRNA 発現を定量的に解析した結果、NT-3 を除く mRNA 発現の著明な亢進が観察された。

2) TRPV1 受容体拮抗薬の影響

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、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、前年度の検討と同様に統計学的に有意な差は認められなかった。

D. 考察

本研究では、FA 誘発耳介腫脹反応における神経原性炎症の病態解明ならびに治療標的の探索を目的とし、耳介組織における神経栄養因子ならびに TRPV1 受容体の mRNA 発現変動を real time PCR 法を用いて定量的に解析した。また、capsazepine の影響を検討した。その結果、これまでの RT-PCR による定性的な mRNA 発現の解析結果とほぼ同様に、NGF、BDNF などの神経

栄養因子ならびに TRPV1 受容体の mRNA 発現の FA 濃度依存的な亢進が認められた。一般に、NGF などの神経栄養因子は非常に粘着性を有することから、組織中でタンパクとして定量することは困難であることが知られている。従って、本研究で得られた real time PCR による mRNA 発現の定量は、本病態形成の解明に重要な知見を与えられると思われる。上述のように、本モデルにおける耳介腫脹反応は、NGF、BDNF ならびに NT-3 の共通の低親和性受容体である p75 遺伝子欠損マウスにおいて著しい減弱が認められている。今後、p75 遺伝子欠損マウスにおけるこれらの機能分子の発現変動を解析する必要があると思われる。また、神経栄養因子の高親和性受容体である TrkA、TrkB ならびに TrkC の tyrosine kinase 阻害薬などの影響についても検討する必要があると思われる。

昨年度は、本モデルで観察された皮膚反応の機序をさらに解明するため、TRPV1 の競合的受容体拮抗薬の本耳介反応に及ぼす影響を検討した結果、抑制傾向を示すに過ぎなかった。その原因として、薬物調整時の溶媒に問題があった可能性が推察された。そこで、本年度は 0.5%CMC-Na-PBS 溶液に均一になるように懸濁し、その影響を検討した。しかしながら、本検討においても capsazepine は、FA 誘発耳介腫脹反応に対し抑制傾向を示すに過ぎなかった。以上の成績より、FA の反復塗布により炎症局所において TRPV1 受容体の発現は増加している可能性が高いものの、腫脹反応自体には大きな役割を有さない可能性が推察された。この点に関しては、今後、TRPV1 遺伝子欠損マウスなどを用いて、より詳細に解析する必要があると思われる。

E. 結論

FA によって誘発されるマウス皮膚腫脹反応の病態形成には、炎症局所において産生される NGF および BDNF などの神経栄養因子ならびに TRPV1 受容体などが関与している可能性が改めて示唆された。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

①学会発表

東 明香、齋藤朝香、田中宏幸、稲垣直樹、永井博式：ホルムアルデヒド(FA)反復塗布マウス皮膚炎モデルの解析 第 56 回日本アレルギー学会総会 一般演題 11 2006. 11. 2. 東京

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発症－マウス皮膚炎モデル－ 臨床免疫・アレルギー科 46; 188-192; 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
木村五郎 高橋 清	シックハウス症候群	宮本昭正	臨床アレルギー学 改訂第3版	南江堂	東京	2007	印刷中

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
鳥居新平、平山耕一郎、 秋山一男、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
石田卓、須貝高、田中隆一、 桜井誠、関口博史	ホルムアルデヒド・BTXの揮 発による室内空気汚染 そ の7	福岡大学工学集報	75	63-95	2006
木村五郎	シックハウス症候群の診断ー 負荷テストの現状と問題点	臨床免疫・アレルギー ー科	46	170-174	2006
木村五郎	シックハウス症候群最新情報 (第1回)	食べもの通信	428	25	2006
木村五郎	シックハウス症候群最新情報 (第2回)	食べもの通信	429	24	2006
木村五郎	シックハウス症候群最新情報 (第3回)	食べもの通信	430	24	2006
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
田中宏幸、稲垣直樹、 永井博弐	シックハウス症候群の発症 ーマウス皮膚炎モデルー	臨床免疫・アレルギー ー科	46	188-192	2006