

また、ホルムアルデヒド吸入やサブスタンスP静注による気道反応の加齢差(幼若く成熟)が著しいことから、C線維からのタキキニン遊離能やNK1受容体活性にも加齢差があると推測される。

## 【研究2】

### 研究目的

成熟ラットモデルを用いてホルムアルデヒド吸入曝露が気道神経原性炎症に影響を及ぼすか否かを検討する。

### 研究方法

Wistar 雄性ラット(8週齢:SPF)に超音波ネブライザーを用いて、曝露チャンバー内で1%ホルマリンを30分間曝露した。対照群には、同様の方法で0.4%メタノールを含む生理食塩水を曝露した。1週間後、全身麻酔(チトゾール腹腔内投与)、人工換気を施行し、NEP阻害薬であるホスホラミドン(2.5mg/kg)を投与したのちカプサイシン(75 $\mu$ g/kg)を静脈内投与した。10分後に下部気管を摘出し、エバンスブルー法にて血漿漏出を測定した。次に、吸入曝露28時間後と1週間後に下部気管を摘出し、ホルマリン固定・パラフィン包埋処理後にヘマトキシリン・エオジン染色を行った。また、蛍光免疫染色法により、サブスタンスP抗体とTRPV1抗体を用いてC線維の分布・分枝を、NK1受容体抗体を用いてNK1受容体の発現を観察した。また、NGFとBDNF抗体を用いて、下部気管の神経栄養因子の発現を同様の方法で観察した。

### 研究結果

■カプサイシン静注による下部気管における血漿漏出(図6):気道上皮傷害によるNEP活性の低下を考慮し、NEP阻害薬であるホスホラミドンを両群に投与し、カプサイシン静注による下部気管血漿漏出を測定した。ホルマリン(1%)吸入曝露群では0.4%メタノールを含む生理食塩水吸入曝露群と比較して、下部気管の血漿漏出が有意に増強した。

■組織学的変化(図7):ホルマリン(1%)吸入曝露による下部気管の経時的組織変化をヘマトキシリン・エオジン染色により検討した。28時間後では、気道上皮直下の粘膜固有層に好中球とリンパ球の浸潤が観察され、さらに、気道上皮内への好中球の流入を認めた。7日後では、28時間後と比較して気道上皮や粘膜固有層への炎症細胞の浸潤は減少した。しかし、気道上皮の有意な剥脱が認められた。

■知覚神経C線維の分布(図8):一次抗体としてサブスタンスPおよびTRPV1抗体を用い、蛍光発色した線維をC線維と評価した。上段が下部気管のサブスタンスPの発現を検出したものであるが、ホルマリン(1%)吸入曝露7日後では、C線維が気道上皮内とその直下に幅広く、より濃密に分布していた。下段に示したTRPV1抗体で検出したC線維も同様の所見が観察された。

■タキキニンNK1受容体の分布(図9):下部気管のタキキニンNK1受容体の発現を蛍光免疫染色法により観察した。NK1受容体は、ホルマリン(1%)吸入曝露前より気道粘膜固有層の血管内皮細胞に観察された。ホルマリン吸入曝露後、時間経過とともに著しい発現の増強を認めた。

■神経栄養因子の発現(図 10):下部気管におけるニューロトロフィン(NGF・BDNF)の発現を蛍光免疫組織学的に検討した。ホルマリン(1%)吸入前の下部気管では発現は認められなかったが、吸入 28 時間後には NGF・BDNF とともに気道上皮基底細胞において発現が増強した。しかし、7日後には吸入前と同様のレベルに減少した。

### 結論

ホルマリン吸入 1 週間後に、NEP 阻害薬のホスホラミドンを前投与したにもかかわらずカプサイシンによる気管の血漿漏出が増強された。ホルマリン吸入 1 週間後の HE 染色像で気管上皮剥離が観察されたが、気道上皮に分布していた NEP が剥脱し、気道上皮の NEP 活性を低下させた可能性が考えられる。NEP は神経ペプチドを細断し、不活性化する酵素であり、神経原性炎症を強力に抑制している。したがって、ホルマリン吸入による NEP 活性の低下は神経原性血漿漏出を増強させるはずである。本研究ではこうした NEP 活性の変化を打ち消す目的で NEP 阻害薬のホスホラミドンを前投与して実験を行った。

ホルマリン吸入により気管の知覚神経 C 線維の分布と血管内皮細胞のタキキニン NK1 受容体の発現増強がみられた。好中球やリンパ球浸潤が認められたが、これらの炎症細胞や気道上皮細胞・線維芽細胞などの構成細胞から NGF などの種々のメディエーターが放出され、C 線維や NK1 受容体の発現が増強したと推測できる。これらの反応が、ホルマリン吸入による気管の神経原性血漿漏出の増強を引き起こす重要な因子と考えられる。

### 図1～10の説明

図1 幼若(2 週齢)および成熟ラット(8 週齢)におけるホルムアルデヒド吸入後のラット気道血漿漏出。全身麻酔・人工換気下で、気管カニューラからホルムアルデヒドガス(1.5-45ppm)を 10 分間吸入させ、気管下部における血漿漏出をエバンスブルー法にて測定した。\*  $P < 0.05$  v.s. 室内空気(Dunnett's test). <sup>†</sup> $P < 0.01$  幼若 v.s. 成熟(Welch's test).

図2 幼若(2週齢)および成熟(8週齢)におけるサブスタンス P 静注後のラット気道血漿漏出。全身麻酔・人工換気下で、サブスタンス P (0.5-100nmol/kg)を静注した。10 分後に気道血漿漏出をエバンスブルー法にて測定した。\*  $P < 0.05$  v.s. 生理食塩水(Dunnett's test). <sup>†</sup> $P < 0.01$  幼若 v.s. 成熟(Welch's test).

図3 幼若(2 週齢)および成熟ラット(8 週齢)における、ホルムアルデヒド吸入後のラット気道血漿漏出における Neutral endopeptidase (NEP) 阻害薬であるホスホラミドン(2.5 mg/kg i.v.)前投与の効果。ホスホラミドンまたはその希釈液(生理食塩水)を投与し、ホルムアルデヒドを吸入して気道血漿漏出をエバンスブルー法にて測定した。

図4 幼若および成熟ラットの下部気管における知覚神経C線維の分布。FITC を標識したサブスタンスPおよびTRPV1 抗体を用いて幼若および成熟ラットの下部気管の知覚神経 C 線維を検出した。

図5 幼若および成熟ラットの下部気管におけるタキキニンNK1受容体の分布。FITC を

標識したNK1受容体抗体を用いて、幼若および成熟ラットの下部気管のNK1受容体を検出した。下段の図で上皮直下の線状に見られる染色部分は、1次抗体に含まれる非特異抗体による染色像を示している。

図6 ホルマリン(1%)吸入曝露1週間後のカプサイシン静注による気道血漿漏出の変化。成熟ラットにホルマリンを30分間単回曝露し、1週間後に下部気管のカプサイシンによる血漿漏出をエバンスブルー法で測定した。

図7 ホルマリン(1%)吸入曝露後のラット気管の組織変化。ホルマリンを30分間単回曝露し、28時間後と1週間後に成熟ラットの下部気管を採取してヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

図8 ホルマリン(1%)吸入曝露後のラット気管における知覚神経C線維の分布。ホルマリンを30分間単回曝露し、1週間後にラットの下部気管を採取し、蛍光免疫染色法を用いて、FITCを標識したサブスタンスPおよびTRPV1抗体で知覚神経C線維を検出した。

図9 ホルマリン(1%)吸入曝露後のラット気管におけるタキキニンNK1受容体の分布。ホルマリンを30分間単回曝露し、28時間後と1週間後にラットの下部気管を採取し、蛍光免疫染色法を用いて、FITCを標識したNK1受容体抗体でNK1受容体を検出した。下段の図で上皮直下の線状に見られる染色部分は、nonspecificな染色像を示している。

図10 ホルマリン(1%)吸入曝露後のラット気管における神経栄養因子NGFおよび

BDNFの分布。ホルマリンを30分間単回曝露し、28時間後と1週間後にラットの下部気管を採取し、蛍光免疫染色法を用いて、FITCを標識したNGFおよびBDNF抗体でNGFとBDNFの産生細胞を検出した。

## 健康危険情報(なし)

## 研究発表

1. 論文発表(なし)
2. 学会発表
  - 1) 武田将典、木村量子、大島美穂子、三宅美緒、二村昌樹、伊藤浩明、坂本龍雄  
気道の神経原性炎症における加齢変化-動物モデルを用いた基礎研究(第44回日本小児アレルギー学会総会、名古屋、2007.12.8-9)
  - 2) 武田将典、三宅美緒、木村量子、大島美穂子、二村昌樹、伊藤浩明、坂本龍雄  
ホルムアルデヒド吸入曝露はラット気道の神経原性炎症を増強する(第53回東海小児アレルギー談話会、名古屋、2008.2.8)
  - 3) 武田将典、三宅美緒、木村量子、大島美穂子、二村昌樹、伊藤浩明、坂本龍雄  
ホルムアルデヒド吸入曝露はラット気道の神経原性炎症を増強する(第20回日本アレルギー学会春季臨床大会 2008.6.12-14(発表予定))

## 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)

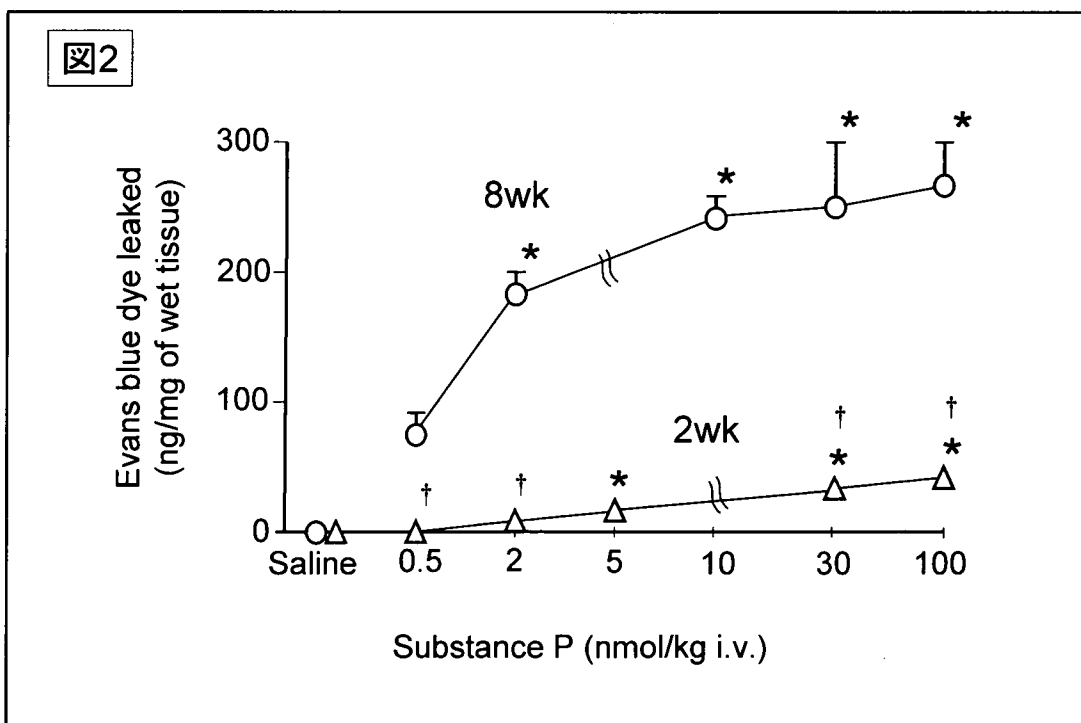
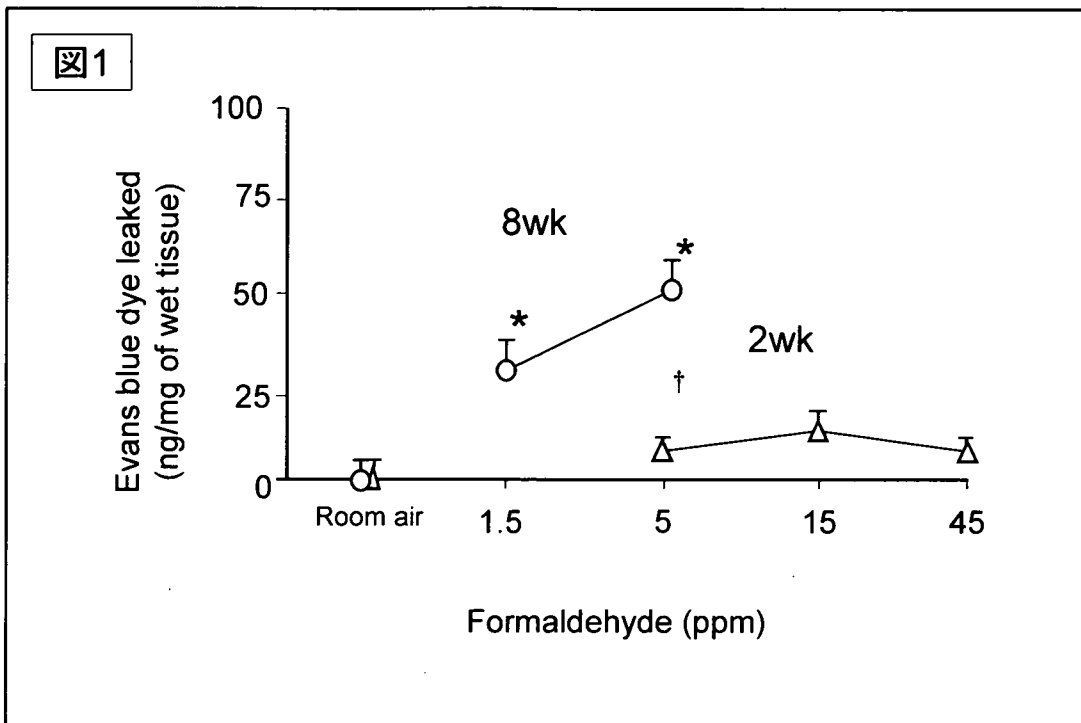


図3

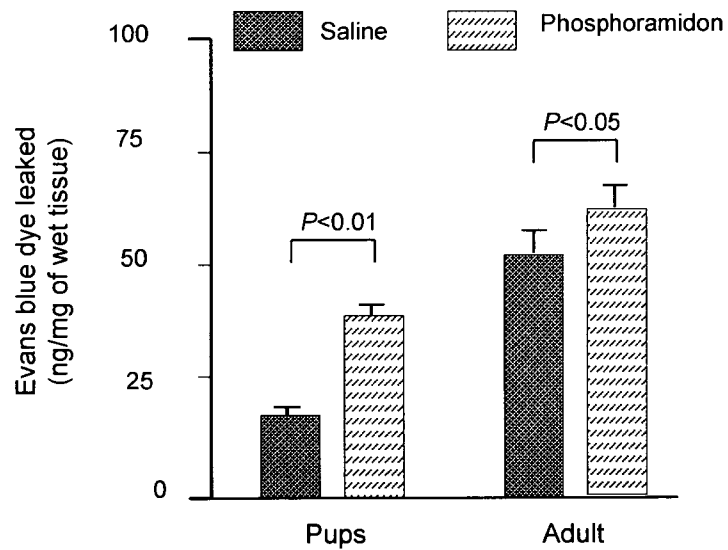
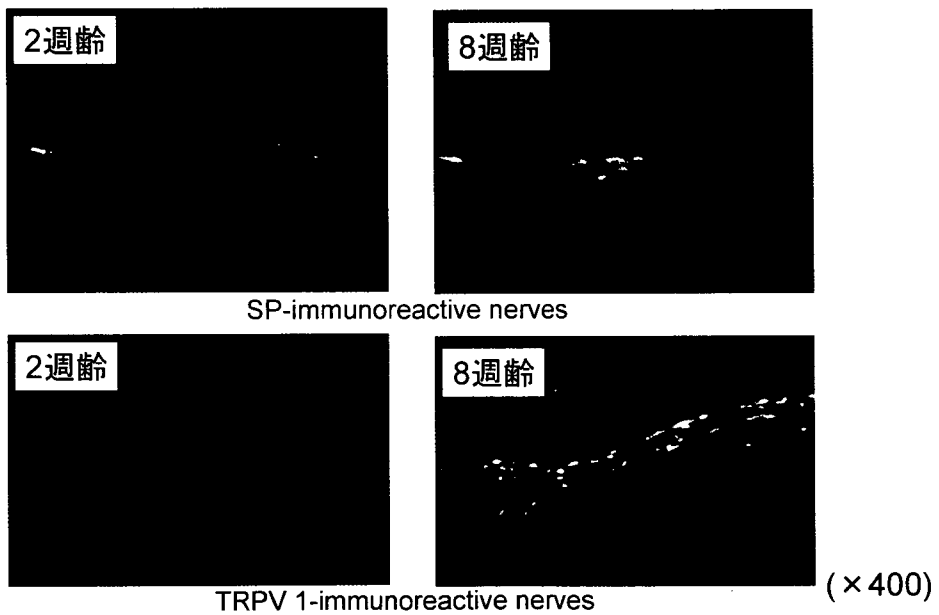


図4



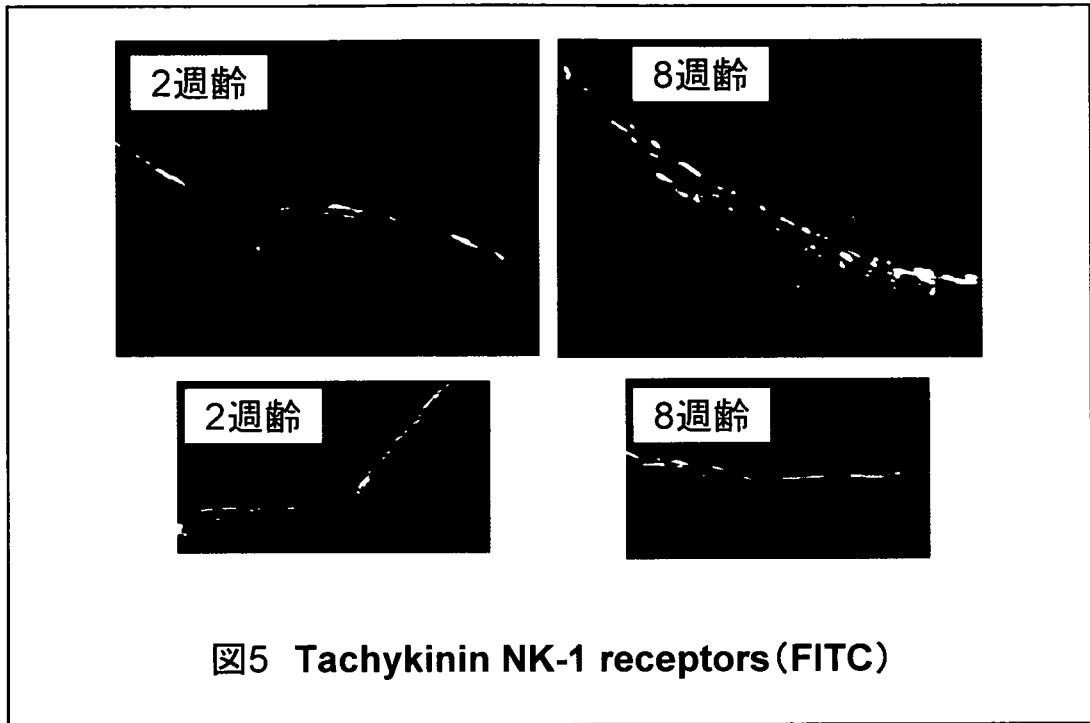


図5 Tachykinin NK-1 receptors (FITC)

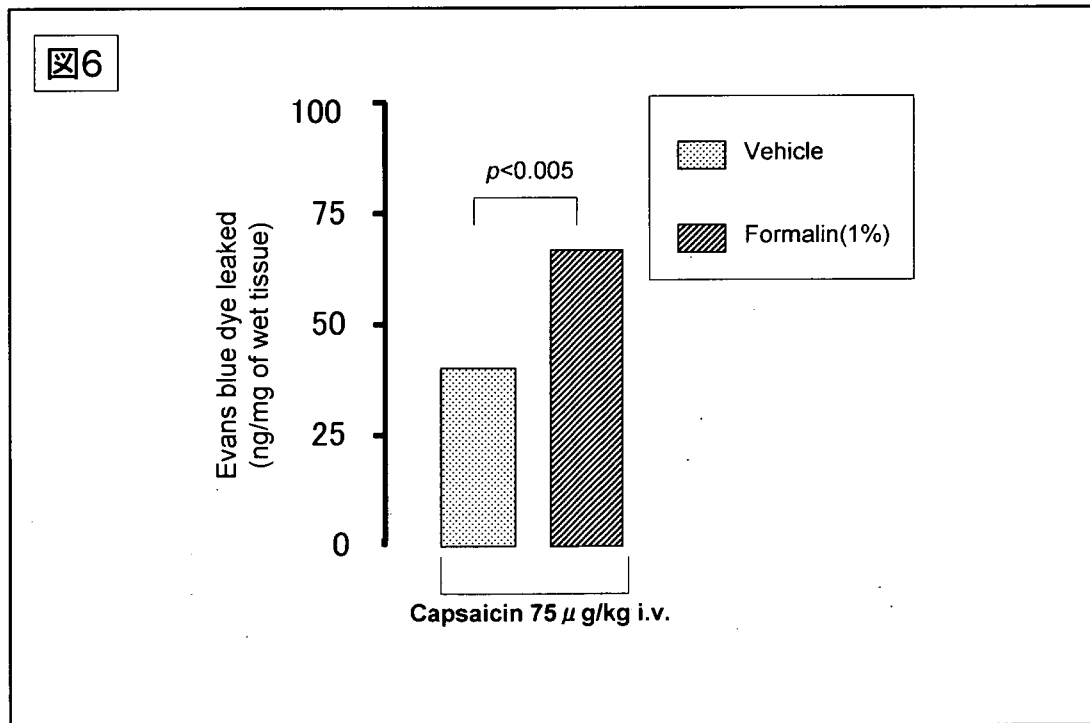


図7

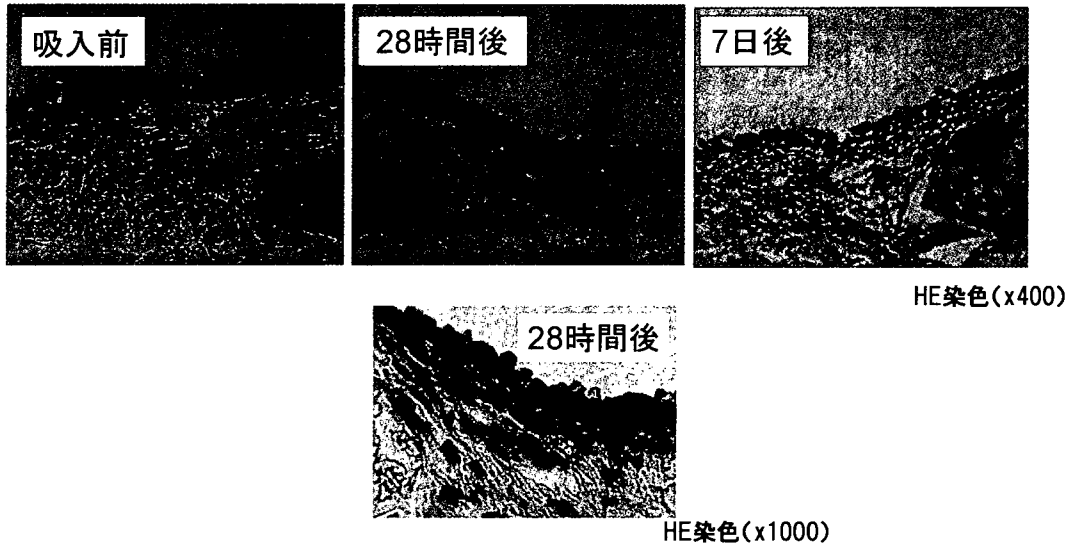
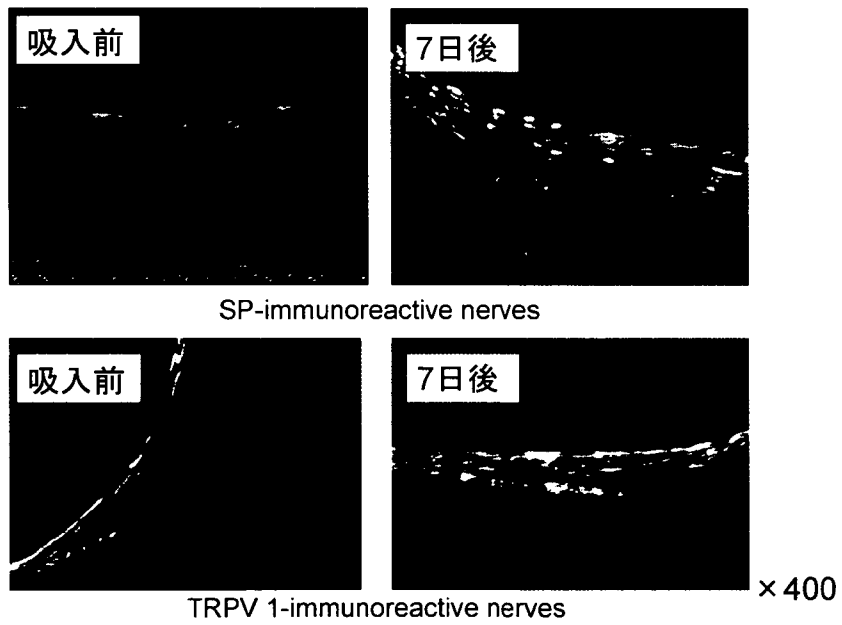
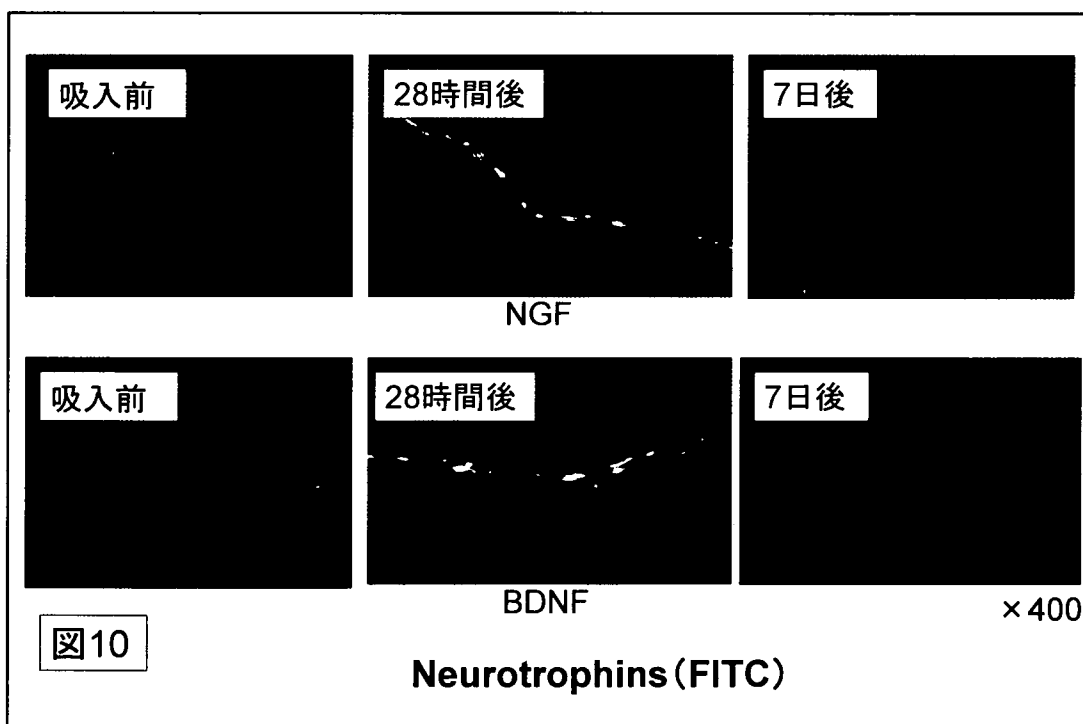
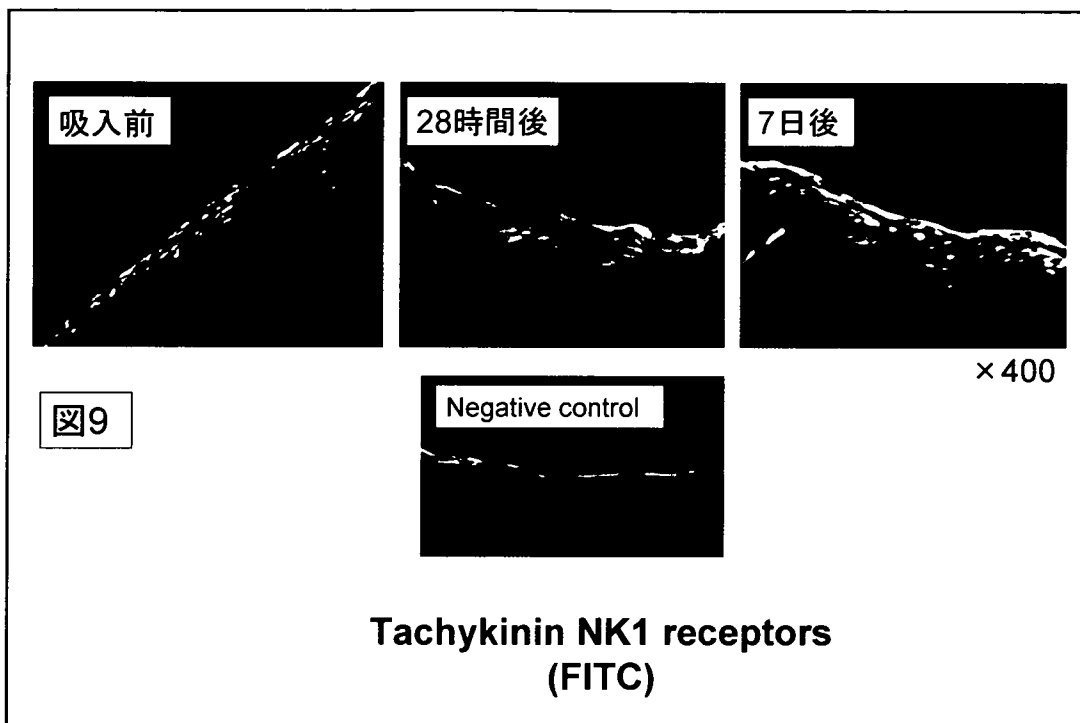


図8







## 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 博弼 (岐阜薬科大学 学長)

**研究要旨** これまでに分担研究者らは、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 (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。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、昨年度に引き続き、より定量性の高い real time RT-PCR 法を用いて病態形成への関与が予想される機能分子に関して、その発現変動を解析した。一方、治療的観点から NGF 低親和性受容体 p75<sup>NTR</sup> の意義をその遺伝子欠損マウスを用いて、また、NGF の高親和性受容体である trkA の tyrosine kinase 阻害薬の影響をそれぞれ検討した。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 時間後では、代表的なサイトカインである interleukin-4 (IL-4) および interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、神経栄養因子である nerve growth factor (NGF)、brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、neurotrophin-3 (NT-3) ならびに glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)、侵害刺激の受容体である transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) の mRNA 発現が FA の濃度に依存して亢進しており、その発現強度は IL-4  $\gg$  NGF  $\gg$  BDNF、GDNF、TRPV1  $>$  NT-3、IFN- $\gamma$  の順であった。これに対し、p75 KO マウスにおいて、FA 反復塗布によって誘発される耳介腫脹は有意に減弱した。また、trkA の tyrosine kinase 阻害薬である AG879 および K252a は、いずれも FA 反復塗布による耳介腫脹を有意に抑制した。以上の成績より、FA 反復塗布によって誘発される皮膚炎には T helper type 2 優位な免疫反応が関与している事が考えられる。また、本反応には NGF 等の神経栄養因子ならびに TRPV1 を介した神経原性炎症が関与している可能性が推察された。

### 研究協力者

稲垣直樹 (岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学教室・教授)・田中宏幸 (岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学教室・准教授)

### A. 研究目的

シックハウス症候群は、昨年度の本研究班および相澤班との合意により、広義として「在室者の健康を維持するという観点から問題のある建物内において見られる健康障害の総称」と定義された。また、本年度の両班の合同検討会において、狭義としては「建物内環境における化学物質の関与が想定される、皮膚・粘膜症状や、頭痛・倦怠感などの多彩な非特異的症状群で、明らかな中毒・アレルギーなど、病因や病態が医学的に解明されているものを除く」とされた。これにより、疾患定義・概念については従来の定義に比し非常に分かりやすくなり、また、化学物質過敏症などの関連疾患との区別も容易に

なりつつある。一方、その病因に関しては、病原微生物、アレルゲンおよび揮発性有機化合物(VOCs)などが様々な要因が考えられているが、未だ不明である。このうち、室内の VOCs が重要とされている。特に、代表的な VOCs であるホルムアルデヒド(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。

分担研究者らは、昨年度まで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。

そこで本年度は、昨年度の RT-PCR 法を用いた耳介組織における mRNA 発現の検討に引き続き、FA 誘発耳介腫脹反応の病態解明ならびに治療標的の探索を目的とし、real time RT-PCR 法を用いて耳介組織における種々の機能分子の発現を定量的に解析した。また、昨年度の検討において、少数例で実施した NGF 低親和性受容体 p75<sup>NTR</sup> 遺伝子欠損 (KO)マウスを用いて、再度、その影響を検討した。さらに、本反応における NGF の意義をさらに詳細に検討する目的で、NGF 高親和性受容体 trkA の tyrosine kinase 阻害薬である AG879 および K252a の影響を併せて検討した。

## B. 方法

### 1. VOCs 塗布暴露および耳介組織における mRNA 発現 (図 1)

実験は、当研究室のマウス 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 RT-PCR 法により、代表的なサイトカインである interleukin-4 (IL-4) および interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、神経栄養因子である nerve growth factor (NGF)、brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、neurotrophin-3 (NT-3) ならびに glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)、侵害刺激の受容体である transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)の mRNA 発現を定量的に検討した。

### 2. p75<sup>NTR</sup> KO マウスを用いた検討

NGF 低親和性受容体である p75<sup>NTR</sup> KO マウス (129Sv 系マウス : Jackson Laboratory, USA)を用いて、神経栄養因子 (NGF、BDNF および NT-3)

の意義を検討した。

### 3. trkA の tyrosine kinase 阻害薬の影響 (図 1)

NGF 高親和性受容体 trkA の tyrosine kinase 阻害薬である AG879 および K252a の影響を併せて検討した。すなわち、AG879 および K252a は、エタノールに溶解し、FA の塗布前日から、連日 5 日間、FA の塗布日は FA 塗布 1 時間前にマウスの両耳介の表裏に 25  $\mu$ L ずつ、計 100  $\mu$ L を塗布した。

(倫理面への配慮)

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 (図 2)

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 RT-PCR を用いて、昨年度の検討結果から変動が認められる可能性のある IL-4、IFN- $\gamma$ 、NGF、BDNF、NT-3、GDNF および TRPV1 の mRNA 発現を定量的に解析した。その結果、いずれの mRNA 発現も FA の濃度に依存して亢進しており、その発現強度は IL-4  $\gg$  NGF  $\gg$  BDNF、GDNF、TRPV1  $>$  NT-3、IFN- $\gamma$ の順であった。

### 2. p75<sup>NTR</sup> KO マウスを用いた検討

p75<sup>NTR</sup> KO マウスでは、野生型 (129Sv) マウスにおいて認められた FA 誘発耳介腫脹の有意な減弱が観察された。

### 3. trkA の tyrosine kinase 阻害薬の影響 (図 3)

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、trkA の tyrosine kinase 阻害薬は FA 塗布後に観察される耳介腫脹を有意に抑制した。

## 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 Th1/Th2 サイトカイン、神経栄養因子ならびに TRPV1 受容体の mRNA 発現変動を real time RT-PCR 法を用いて定量的に解析した。また、p75<sup>NTR</sup> 遺伝子欠損(KO)マウスを用いて、神経栄養因子の意義を検討した。さらに、本反応における NGF の意義をさらに詳細に検討する目的で、NGF 高親和性受容体 trkA の tyrosine kinase 阻害薬である AG879 および K252a の影響を併せて検討した。

その結果、本モデルでは炎症局所において、IFN- $\gamma$  の mRNA 発現亢進に比し、IL-4 の mRNA 発現亢進が顕著であった。周知のように、IL-4 はナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞から Th2 細胞への分化誘導および B 細胞における immunoglobulin E (IgE) 抗体のクラススイッチ誘導などに関与しており、Th2 反応において中心的な役割を演じるサイトカインである。一方、IFN- $\gamma$  は Th1 細胞から産生される代表的なサイトカインであり、マクロファージの活性化を介して炎症反応を惹起する。したがって、FA 反復塗布により誘発される皮膚炎には Th2 優位な免疫反応が関与していることが推察される。

一方、これまでに当研究室では、ハプテン抗原である 2, 4-dinitrofluorobenzene (DNFB) の反復塗布によって 2 回目の塗布以降に、塗布 24 時間後をピークとする遅延型過敏反応が誘発され、3 回目から 5 回目の DNFB 塗布後には、塗布 1 時間後をピークとする即時相も誘発され、2 相性反応を示すことを明らかにしている。本モデルでは、5 回目の塗布後の耳介では Th2 サイトカイン mRNA の発現誘導は認められないが、3 回目の抗原塗布 24 時間後以降に血清中抗原特異的 IgE 値の上昇がみられることから、DNFB 反復塗布による 2 相性の反応には、IgE 抗体・肥満細胞による即時型反応ならびに Th1 反応による遅延型の皮膚反応の両者が関与している可能性が考えられる。しかし、当研究室において FA 反復塗布モデルを用い、血清中 FA 特異的 IgE 値の測定を行ったが、いずれのタイミングにおいても、FA 特異的 IgE は検出されなかった。したがって、活性化電流の増強が報告されており、TRPV1 を介した神経ペプチドの遊離が亢進することも認められている。したがって、NGF ならびに GDNF の発現亢進による TRPV1 の発現亢進・機能増強を介し、より多くの神経ペプチドが遊離され、神経原性炎症が増悪する可能性が考えられる。TRPV1 が本皮膚炎の増悪に重要な役割を担っている可能性が推察されるが、詳細は不明であり、今後、TRPV1 遺伝子欠損マウスなどを用いたさらなる検討が必要である。

本研究では、ニューロトロフィンの中で最も mRNA 発現亢進の顕著であった NGF の高親和性受容体である trkA について検討を行った。ニューロ

て、本モデルにおいては、IgE 抗体が 4 回目以降の塗布による即時性反応に関与している可能性は低いと思われる。一般に、ハプテン抗原の種類の違いによって、得られる反応性および表現型が異なることが報告されている。すなわち、fluorescein isothiocyanate (FITC) の塗布によって誘発された耳介腫脹は、IL-4 ならびに IL-5 中和抗体の投与によって抑制されることが報告されていることから、FITC は、Th2 誘導性のハプテン抗原であり、前述のように DNFB は、Th1 誘導性のハプテン抗原であるとされている。したがって、今後、FA が Th2 誘導性のハプテン抗原であるか否かについても、より詳細な検討が必要と思われる。

本研究では、耳介局所において NGF 等のニューロトロフィンの mRNA 発現亢進が認められ、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。周知のように、アトピー性皮膚炎あるいは喘息等のアレルギー性炎症部位において、ニューロトロフィンの発現が上昇することが知られている。今後、p75 遺伝子欠損マウスにおける各種機能分子の発現変動を解析することにより、Th2 反応、ニューロトロフィンならびに TRPV1 の相互の関連性を明らかにすることができると思われる。従って、FA 反復塗布による皮膚炎にも神経原性炎症が関与していることが推察される。

さらに、各種神経栄養因子に加え、侵害刺激の受容体である TRPV1 の mRNA 発現亢進が認められた。TRPV1 は SP や CGRP などの神経ペプチドと共発現しており、TRPV1 の活性化により感覚神経終末で CGRP や SP が放出され、神経原性炎症が惹起される可能性が示唆されている。これまでに、NGF が受容体に結合することによって、その下流シグナルの一つである Src キナーゼを活性化し、TRPV1 の細胞膜表面への発現を亢進することが認められている。また、NGF もしくは GDNF により、TRPV1 リガンドによる活

トロフィンは特異的な高親和性受容体である trk ファミリーに作用することで、神経突起の伸長や神経分化の促進など、種々の神経栄養作用を示す。trk ファミリーの KO マウスはいずれも神経系などに障害が認められ、生後 1 日~数ヶ月で死亡することが明らかになっており、研究ツールとして利用できないことから、trk の tyrosine kinase 阻害剤を用いて検討を行った。NGF が trkA に結合すると、内在性チロシンキナーゼ活性が上昇し、細胞内領域のチロシン残基が自己リン酸化されることにより、細胞内シグナル伝達を開始される。このシグナルは、

Ras/MAP キナーゼ経路、ホスファチジルイノシトール三リン酸キナーゼ経路、ホスホリパーゼ C $\gamma$ -1 (phospholipase C $\gamma$ -1: PLC $\gamma$ -1) 経路の活性化につながる、3 方向のシグナル経路により伝達される。今回用いた tyrosine kinase 阻害剤である AG-879 は、NGF によって誘導されるチロシン残基のリン酸化および PLC $\gamma$ -1 のリン酸化を阻害する。また、K252a は種々のプロテインキナーゼを阻害することが報告されている。すなわち、trk ファミリーに加え、カルモジュリンキナーゼ、プロテインキナーゼ (protein kinase: PK) A ならびに PKC を阻害する。これら 2 種類の tyrosine kinase 阻害剤を用いて検討を行った結果、両薬物は FA 反復塗布によって誘発される耳介腫脹を有意に抑制した。従って、NGF 自身が FA 誘発耳介腫脹反応に重要な役割を演じていることが明らかとなり、表皮のケラチノサイトや炎症性細胞などから放出された NGF が、trkA を介し、知覚神経の伸長ならびに知覚過敏を誘発することにより、神経原性炎症を増悪させている可能性が考えられる。また、FA による直接的な刺激だけでなく、NGF による肥満細胞のヒスタミン含量の増加ならびに脱顆粒亢進によって放出された多量のヒスタミンによって、より強度な血管拡張ならびに C 線維の刺激が起こり、さらなる神経原性炎症が誘発される可能性が推察される。

#### E. 結論

FA 反復塗布によって誘発される皮膚炎には Th2 優位な免疫反応が関与している事が考えられる。また、本反応には NGF 等の神経栄養因子ならびに TRPV1 を介した神経原性炎症が関与している可能性が推察された。

#### F. 研究発表

##### 学会発表

- 1) 田中宏幸、稲垣直樹、永井博式: 揮発性有機化合物の反復塗布によるマウス皮膚炎モデルの解析 第 57 回日本アレルギー学会総会 シンポジウム 7 2007. 6. 11. 横浜
- 2) 下内鮎美、田中宏幸、齋藤朝香、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 57 回日本アレルギー学会総会 一般演題 95 2007. 11. 1. 横浜

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

Experimental Protocol

Animals: 8 weeks old female BALB/c mice

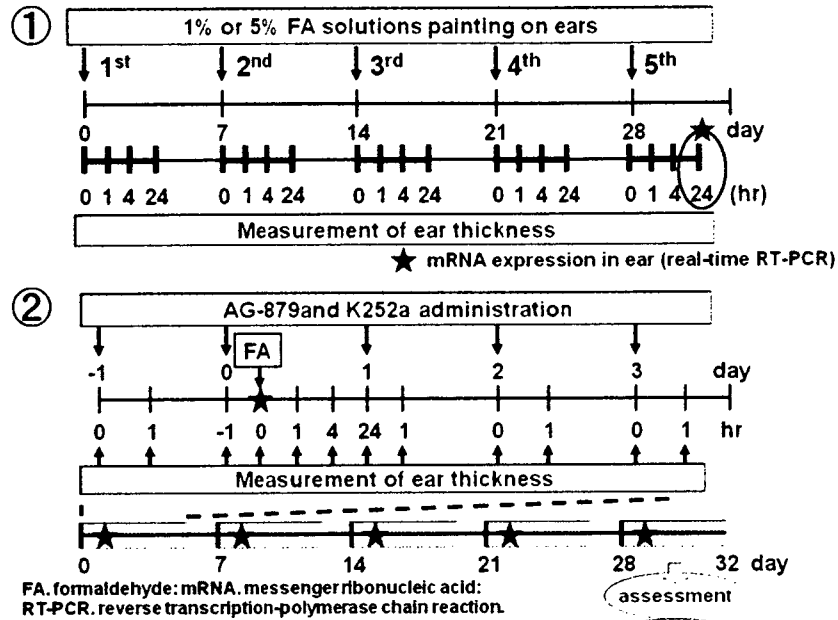


図1 実験プロトコール

Real time RT-PCR 実験①ならびに NGF 高親和性受容体 trkA の tyrosine kinase 阻害薬の影響②を検討した際のスケジュール

mRNA 発現用の組織標本は5回目の FA 塗布 24 時間後に採取した。AG879 および K252a はエタノールに溶解し、FA の塗布前日から連日 5 日間、FA の塗布日は FA 塗布 1 時間前にマウスの両耳介の表裏に 25  $\mu$ L ずつ、計 100  $\mu$ L を塗布した。

① mRNA expression

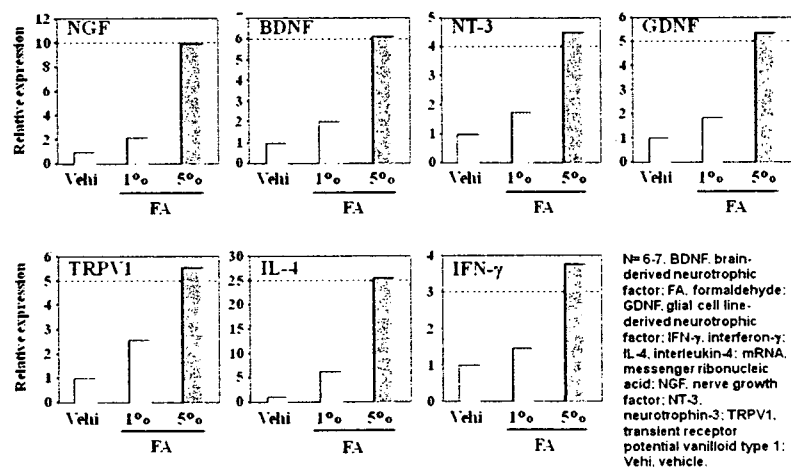
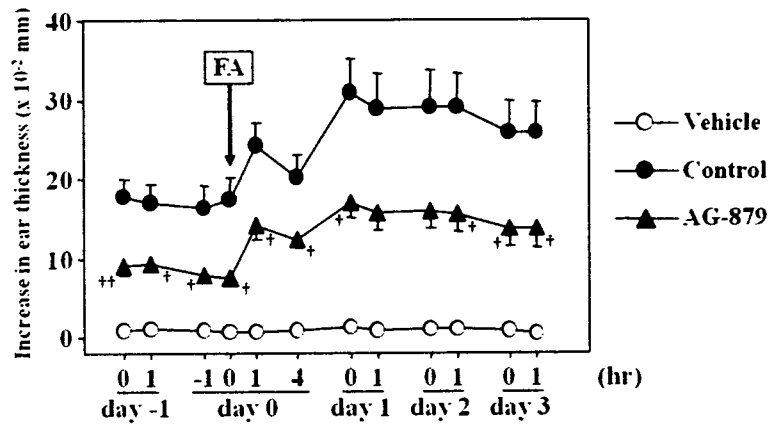


図2 5回目の FA 塗布 24 時間後の耳介における mRNA 発現

Real time RT-PCR 法により、vehicle 群の発現を1とした際の発現強度を示す。発現強度は IL-4  $\gg$  NGF  $\gg$  BDNF、GDNF、TRPV1  $>$  NT-3、IFN- $\gamma$  の順であった。

② Effect of AG-879 (A specific trkA tyrosine kinase inhibitor)



N= 8-9. FA, formaldehyde.  
 + p<0.05 (vs Control). ++ P<0.01 (vs Control).

図3 TrkA tyrosine kinase 阻害薬 AG-879 の FA 誘発耳介浮腫反応に及ぼす影響  
 図は5回目の FA 塗布前日から3日後までの耳介腫脹の成績を示す。TrkA の tyrosine kinase 阻害薬は FA 塗布後に観察される耳介腫脹を有意に抑制した。

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	458-460

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
秋山一男	解説 室内環境におけるアレルギー疾患の現状—真菌アレルギーを中心に—	室内環境	10	11-16	2007
木村五郎、岡田千春、宗田良、高橋 清	シックハウス症候群	総合臨床	56	1845-1847	2007
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—シックハウス症候群の定義および症状—	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—負荷テストの現状と問題点	臨床免疫・アレルギー科	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