

図3：自覚的皮膚症状

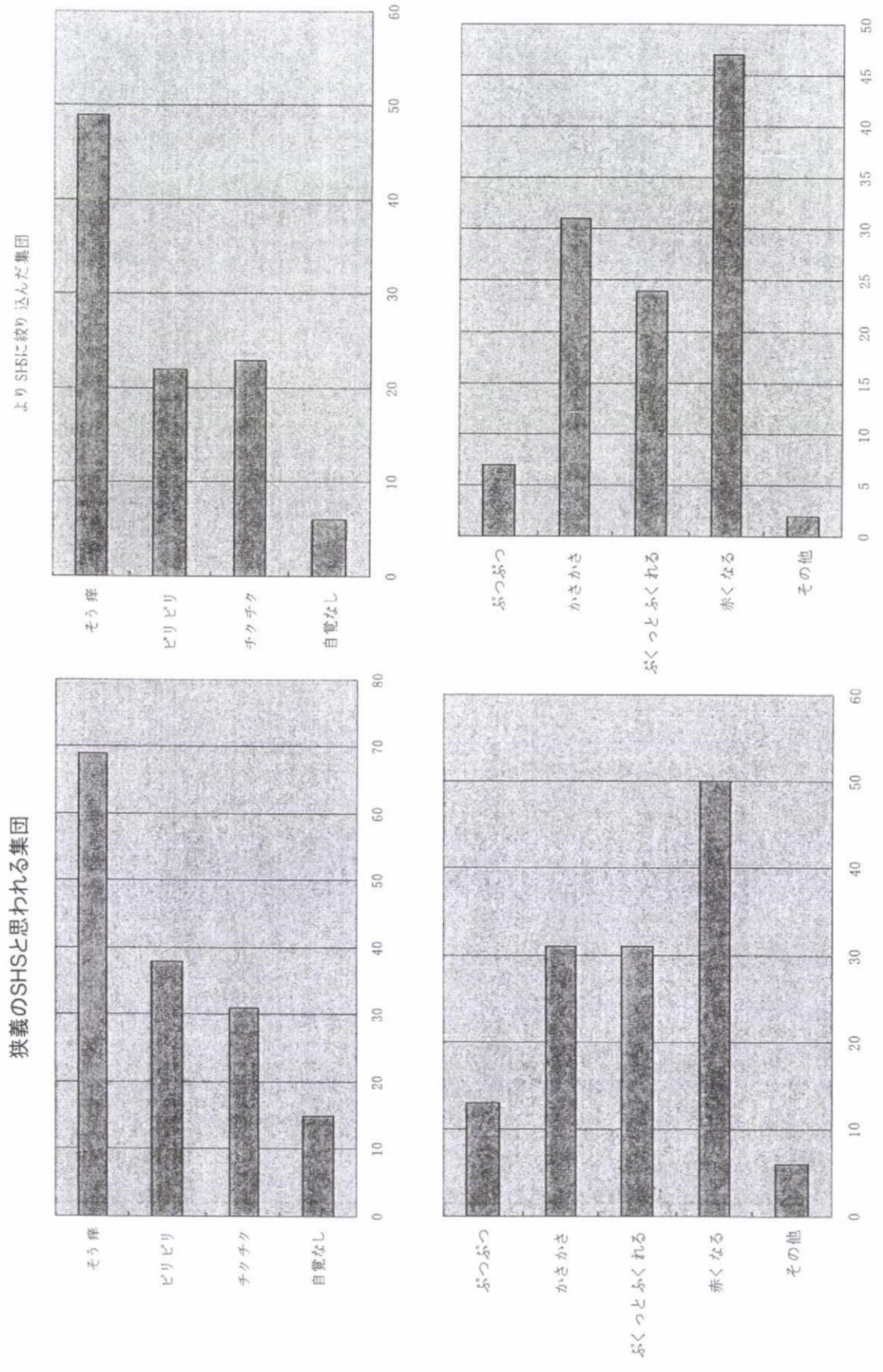


図4: 皮膚科受診の有無、受診時の診断名の診断

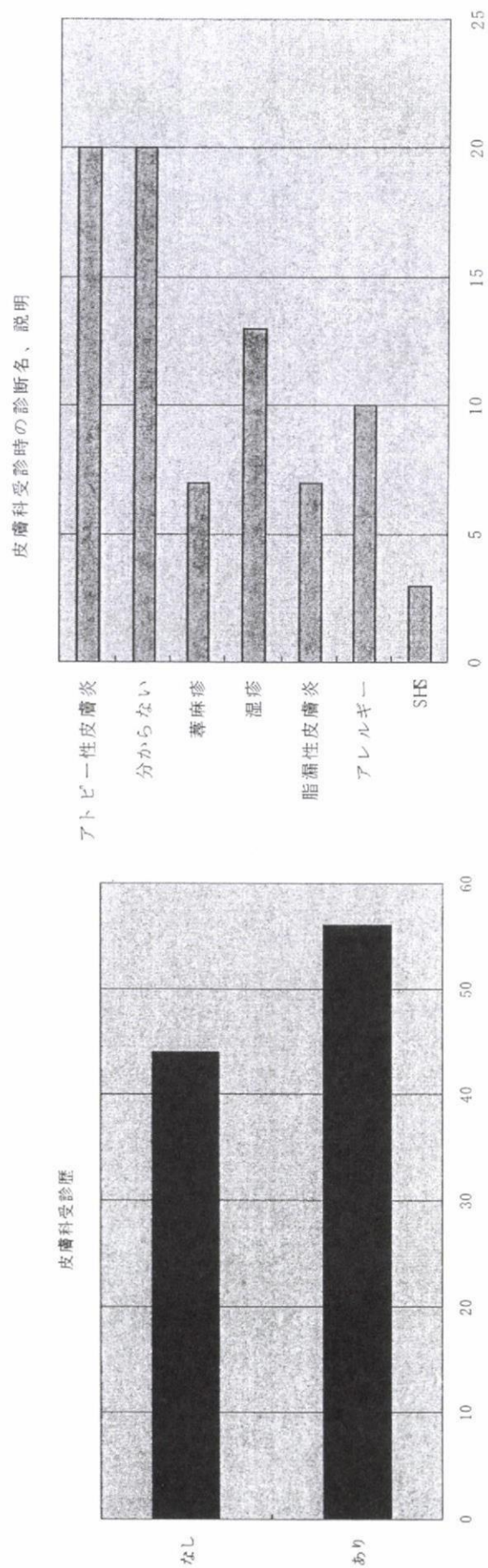
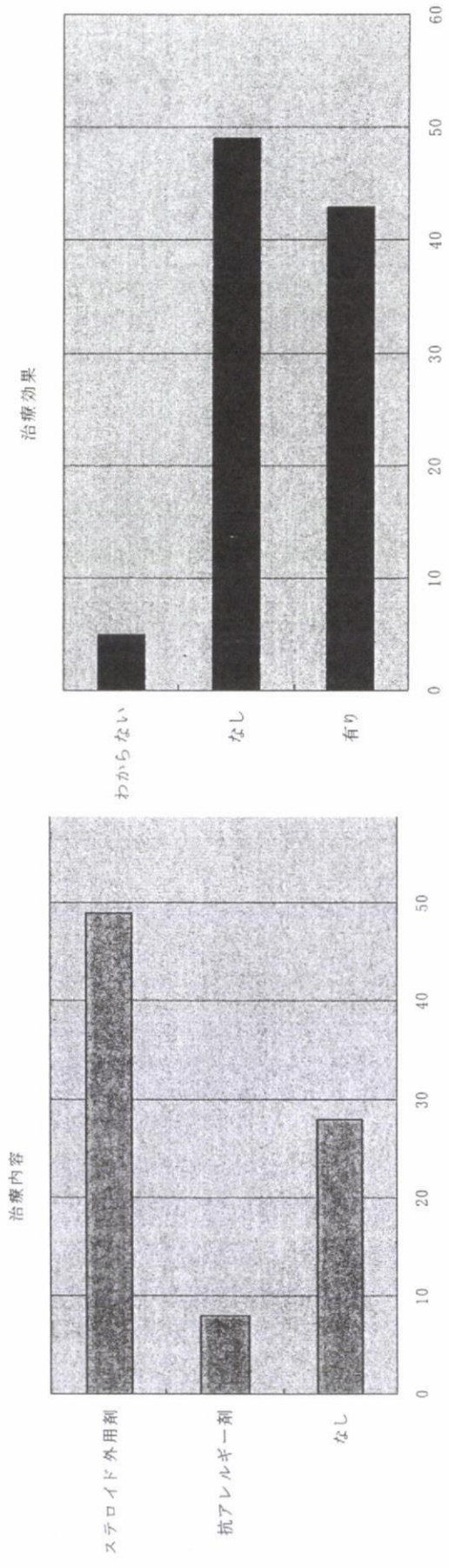


図5: 治療内容、治療効果



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

研究分担者

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る。今年度は、眼症状を有する臨床例について、その病態のアレルギー性炎症パラメーターとして、涙液 IgE および ECP(eosinophil cationic protein)濃度の測定を行って、検討した。対象は、眼粘膜刺激症状を含む複数の症状が、特定の建物内で出現するシックハウス(SHS)症例で、13例(男:女=2:11)、平均年齢±SDは47.8±11.2歳であった。疾患対照は通年性アレルギー性結膜炎(PAC)16例(男:女=7:9、平均年齢±SD=48.5±13.5歳)であった。涙液総IgE定性検査は免疫クロマトグラフィー法であるアレルウォッチ®涙液IgE(日立化成)を行い、涙液ECP値は濾紙に採取した涙液から、AlaSTAT microplate ECPキット(Diagnostic Products Corporation, USA)で測定した。発症早期の臨床重症度はSHS、PAC間に差はなかったが、経過後の軽症化はSHSが早かった。涙液総IgE陽性率はSHSがPACより有意に低かった。涙液ECP濃度は、day7およびday14において、SHSがPACより有意に低値であった。血清総IgE値、末梢血好酸球では症状との関連した変動はいずれでも見られなかった。これらの結果から、涙液総IgEと涙液ECPについては、これまでの研究と同様に、SHSはアレルギー性眼疾患とは異なる病態に基づくことが示唆され、症状発現時に全身アレルギー性パラメータの変動も少ないことが示された。

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り、われわれは今まで、SHSの眼病変は臨床的には軽度のアレルギー性病変の特徴を有し、アレルギー性結膜疾患(ACD)と比較して、結膜病変は軽度で、角膜病変が強い傾向があること、小児例は成人例より重症な傾向が見られること、涙液サイトカインではIL-4の有意な上昇が見られたこと、結膜炎細胞では、マスト細胞、好酸球、好中球が正常より有意に増加があったこと、局所ケモカインおよび細胞外マトリックスについて、涙液ケモカインEotaxin-1および-2濃度の有意な上昇が見られ、特にEotaxin-1はACDよりも高い傾向が見られたことなどを報告した。その一方で、末梢血におけるTh1/Th2比は正常と変化が見られず、結膜CD4陽性細胞はTh1、Th2のいずれもACDより有意に少なく、涙液MMP-1および-9、TIMP、活性化MMP-1および-9濃度の上昇が見られないことも報告した。これらから、SHSの眼病変は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、アレルギー性炎症単独で説明できるものではないと考えられた。しかし、そのメカニズムには不明な点が多かつ

た。そのため、今年にはさらに、SHS眼合併症例の涙液総IgEを解析し、同時にSHS眼合併症例の涙液eosinophil cationic protein(ECP)濃度を測定して、疾患対照の通年性アレルギー性結膜炎(PAC)と比較した。これらのパラメータを臨床所見、臨床経過と比較対象して、SHSの眼合併症例における病態生理を解明することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

1. 対象および方法

対象は、SHS13例(男:女=2:11)で、相澤斑、秋山斑診断基準により診断されたもので、眼症状を有する症例である。平均年齢±SD=47.8±11.2歳で、SHS症状出現場所の内訳は、自宅が9例、職場が4例であった。またアレルギー性結膜疾患は、PAC16例(男:女=7:9)で、平均年齢±SD=48.5±13.5歳であり、両群間に年齢差はなかった。涙液総IgE定性検査は「アレルウォッチ®涙液IgE」(日立化成)を用いた。これは免疫クロマトグラフィー法で、涙液を採取した濾紙上でIgEの存在を判定するものである。検査時間は約12分を要する。結果は陽性と陰性と判断された。涙液ECP値の測定には、涙液分泌検査用のShirmer試験紙に涙液を採取し、ディーブフリ

ーザ内で凍結保存をした。解凍後、0.5M NaCl+0.1% Tween20 添加 PBS で抽出し、ECP 溶出液とした。AlaSTAT microplate ECP キット(Diagnostic Products Corporation, USA)で測定した。これは ELISA 法の定量検査であり、測定範囲は 3.3~180 μ g/L であった。

評価方法としては、既報に準じて、臨床重症度評価を行い、上述の涙液総 IgE 検査、涙液採取(ECP 用)さらに血液採取を、無症状時、発症直後(当日ないし 1 日後)、発症 3~4 日後、発症 7 日後および発症 14 日後に実施した。

C. 結果

1. 臨床重症度

Day3-4 までは SHS の眼症状の重症度がやや高かったが、Day7 以降は AC の方が高い傾向が見られ、SHS が暴露後速やかに症状が軽快する傾向が見られた。なお、臨床重症度はいずれの時点でも、両群間に有意な差は見られなかった(図 1)。

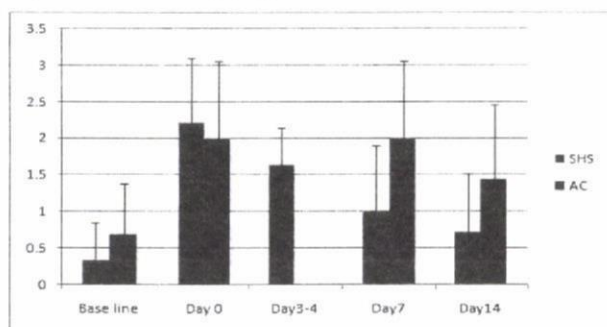


図 1. SHS と AC の臨床重症度比較

2. 涙液総 IgE 陽性率

SHS は発症前には涙液中に IgE は陰性だが、day0 には 31%が陽性となった。Day3-4 までは 18%陽性であったが、それ以後は陽性例はなく、臨床重症と同じように、速やかにアレルギー炎症が消退する傾向が見られた。一方、AC では症状出現前にも 31%の症例で涙液中 IgE が陽性で、経過を通して高い水準が続いていた。

	Base line	Day 0	Day 3-4	Day 7	Day 14
SHS	0/13 0%	4/13 31%	2/11 18%	0/10 0%	0/11 0%
AC	5/16 31%	11/16 69%		8/16 50%	4/14 29%

表 1. 涙液総 IgE 陽性率の比較

P<0.05:base line, P<0.01:day0 および day7

両群間には base line, day0, day7 の時点で有意差があり、AC の方が高かった。しかし、涙液中 IgE が陽性であったということは、SHS の眼炎症がアレルギー性であったことを示唆するものであった(表 1)。

3. 涙液 ECP

流涙 ECP 濃度は base line では AC が高く、day0 では逆に SHS が高かったが、有意なものではなかった。Day7 と 14 では SHS の涙液 ECP が著しく低下し、AC の方が有意に高値であった(図 2)。

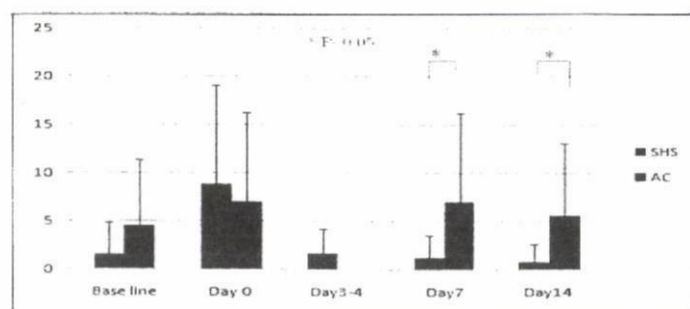


図 2. 涙液 ECP 濃度の比較

4. 血清総 IgE 値

Base line, day0 までは SHS が高い傾向が見られた。Day7 以降は差は縮小していた(図 3)。両群間にいずれの時点でも有意な差は認められなかった。

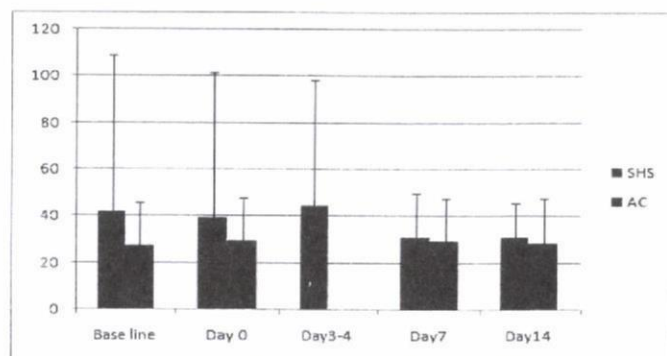


図 3. 血清総 IgE 値の比較

5. 末梢血好酸球

どの時点においても SHS の方が、AC よりも高い傾向が見られた。ただしこれらは有意な差ではなかった(図 4)。

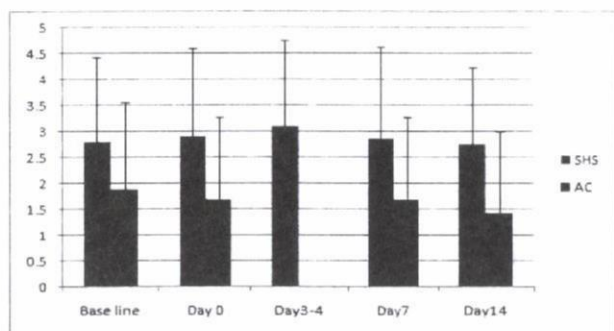


図4. 末梢血好酸球(%)の比較

6. SHS における涙液総 IgE と他のパラメータの関係

SHS では、涙液総 IgE 陽性例は 13 例中 4 例であったが、陽性群と陰性群で背景因子に差が見られるかどうかを検討した。臨床重症度は陽性群 2.75、陰性群 2.0、涙液 ECP 値は陽性群で 12.1、陰性群 7.6、血清総 IgE 値は陽性群 31.5 に対し、陰性群 42.8、末梢血好酸球は陽性群が 2.95%、陰性群で 2.9%などいずれにおいても有意な差は見られなかった。

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も多く見られる。しかし特定の建物内でそれらの症状、臨床所見が出現するというのが、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。

発症早期の臨床重症度は SHS、AC 間に差はなかったが、経過後の軽症化は SHS が早かったことと、涙液 ECP 濃度も SHS が早期に発症前の値に戻っていることは共通した結果であり、特定の建物において症状が発現し、そこから出ると軽減するという SHS の臨床的な特徴をよく反映していることが示唆された。一方、涙液総 IgE 陽性率の傾向もこれらに類似していたが、観察期間を通して、SHS が AC より有意に低いことが示されており、SHS の病態がアレルギー性疾患とは異なり、可逆性が強く見られることを示唆するものと考えられた。

眼局所のこれらのパラメータと比較して、全身のパラメータである血清総 IgE 値、末梢血好酸球については、異なる傾向を示していたのが、今回の結果の中でも注目すべき点であると考えられた。臨床症状には発症からの日数で大きな変動があり、涙液中のパラメータも変動していたが、血清総 IgE 値、末梢血好酸球には症状と関連しての変動は見られなかった。どちらの値も AC より SHS が有意ではなかったものの高値の傾向が見られ、全身疾患としては SHS の方がその特徴が強いことが示唆された。SHS の原因と推定されるホルムアルデヒドなどの有機性物質は眼表面だけでなく、鼻、口腔などを介して全身的に吸収されるものであり、眼局所すなわち結膜からの抗原による側面が強い AC とは病態が異なることが示されたといえる。SHS は慢性、反復性の病態をとるが、組織の不可逆性変化や増殖性変化といったアレルギー炎症にみられるような病態とは機序が大きく異なることが考えられ、その治療においても、即効性の薬物を主として局所と全身の両面から行うべきという方向性が示唆された。

E. 結論

SHS の眼病変においては、発症早期にはアレルギー性疾患を上回る臨床所見を呈するが、その後は速やかに消退する傾向を示し、眼局所の免疫学的パラメータも同様の経過を示すことが明らかになった。しかし、涙液中に IgE や ECP の上昇傾向が見られることから、アレルギー性炎症が関与していることは否定できず、好酸球を解する反応が病態に関与していることが考えられた。全身的にもアレルギー性疾患としての性格は見られており、治療、管理上は局所だけでなく、全身的予防・治療の必要性があることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

井上浩利, 門之園一明, 内尾英一: シックハウス症候群の眼症状の臨床的・アレルギー学的解析. 臨床眼科 62: 719-722, 2008

Uchio E, Kimura R, Migita H, Kozawa M, Kadonosono

K : Demographic aspects of allergic conjunctival diseases and evaluation of new criteria for clinical assessment of ocular allergy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 246: 291-296, 2008

内尾英一: 抗ヒスタミン薬(眼科領域). *医薬ジャーナル* 44: 133-136, 2008

内尾英一: 小児結膜アレルギーの病態とは?. Q&A でわかるアレルギー疾患 4: 460-461, 2008

2. 学会発表

井上浩利, 門之園一明, 内尾英一: シックハウス症候群における結膜炎細胞の免疫学的解析. 第 42 回日本眼炎症学会, 2008 年 7 月, 福岡市

Huang JY, Uchio E, Kadonosono K : The epidemiology and the evaluation of the new criteria for clinical assessment in allergic ocular diseases. 79th ARVO, 2008 年 4 月, 米国 Fort Lauderdale

鈴木岳人, 門之園一明, 内尾英一: 小児におけるアレルギー性結膜疾患の臨床像と疾患別比較. 第 62 回日本臨床眼科学会総会, 2008 年 10 月, 東京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ホルムアルデヒド (FA) およびリポ多糖 (LPS) 吸入曝露による
神経原性気道炎症の増幅機構構築における神経栄養因子の役割に関する研究
—動物モデルを用いた基礎研究—

研究分担者： 坂本龍雄(名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 准教授)

研究要旨 【研究1】リポ多糖(LPS)は気道炎症や気道反応性亢進を惹起・増悪させる。今回、幼若ラットを用いて LPS 吸入が気道の神経原性血漿漏出を増強させるか否かを検討した。2週齢のWistarラットに大腸菌由来LPS(0.1mg/ml)を30分間ネブライザー吸入し、7日、14日、21日後のホルムアルデヒド吸入による下部気管の神経原性血漿漏出を、エバンスブルー法にて測定した。また、蛍光免疫染色法を用いて下部気管の知覚神経 C 線維(サブスタンス P 抗体結合線維)の分布と、神経栄養因子(NGF・BDNF)の発現を観察した。LPS 吸入は、7~21日間にわたり下部気管の神経原性血漿漏出を有意に増強した。また、7日後をピークに気道上皮細胞に NGF・BDNF の発現増強が観察された。C 線維の増生は7日後から観察され、14日後がピークで、さらにその7日後も認められた。健常の幼若ラットでは成熟ラットよりも気道の神経原性血漿漏出が惹起されにくい、LPS 吸入は幼若ラットにおいても気道の神経原性血漿漏出を著しく増強し、その効果は少なくとも2週間持続した。

【研究2】成熟のWistar 雄性ラット(8週齢)にホルマリン(1%)を30分間吸入し、その1週間後にカプサイシン(75 μ g/kg)静注による下部気管への血漿漏出量を測定した。その結果、ホルマリン吸入群では有意に血漿漏出量が増大した。また、蛍光免疫染色法を用いた検討では、神経栄養因子 NGF・BDNF の発現、C 線維の分布、タキキニン NK1 受容体の発現のいずれもホルマリン吸入群で増強していた。

(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)、武田将典(同大学院生)、大島美穂子(同大学院生)、武藤太一郎(同大学院生)

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、この症候群が包含する多様な病態をひとつひとつ基礎的に解明することが必要である。本事業において、ホルムアルデヒド(FA)およびリポ多糖(LPS)の吸入曝露が、神経原性炎症の起こりやすさを規定する知覚神経 C 線維の分布、タキキニン

NK1 受容体の分布、神経栄養因子の発現などに及ぼす影響を検討した。さらに、ラット気道におけるこれらの要因の加齢差を生理学的・組織学的に検討した。

【研究1】

A.研究目的

幼若および成熟ラットを用いて、LPS 吸入曝

露後の神経原性気道血漿漏出の増強の有無を検討した。

B. 研究方法

幼若(2週齢)および成熟(8週齢)のWistar雄性ラットに、超音波ネブライザーを用いて、大腸菌由来LPS(0.1mg/ml)を曝露チャンパー内で30分間曝露した。対照群には、同様の方法で生理食塩水を曝露した。1~3週間後、全身麻酔(チトゾール腹腔内投与)と人工換気を施行し、NEP阻害薬であるホスホラミドン(2.5mg/kg)を静注した後、ホルムアルデヒドガスを吸入した。10分後に下部気管を摘出した。血漿漏出をエバンスブルー法にて測定した。次に、吸入曝露28時間後と1~3週間後に下部気管を摘出し、ホルマリン固定・パラフィン包埋標本を用いて、蛍光免疫染色法により、サブスタンスP抗体とTRPV1抗体によりC線維の分布を、また、タキキニンNK1受容体抗体を用いてタキキニンNK1受容体の分布を観察した。さらに、NGFとBDNF抗体を用いて、下部気管におけるこれらの神経栄養因子の発現を観察した。

C. 研究結果

■ホルムアルデヒド吸入による下部気管における神経原性血漿漏出:幼若ラットにおいては、LPS吸入曝露後1~3週間にわたり、ホルムアルデヒド吸入による神経原性気道血漿漏出の増強が観察された(図1)。

■知覚神経C線維の分布:幼若ラットにおいては、LPS吸入曝露後1~3週間にわたり、C線維が気道上皮内とその直下により濃密に分布していた。ピークは2週間後であった(図2)。

■神経栄養因子の発現:幼若ラットにおいては、LPS吸入曝露後28時間から、気道上皮細胞のNGFとBDNFの発現が増強され、増強効果は2週間に及んだ(図3)。

■タキキニンNK1受容体の分布:幼若ラットにおいては、粘膜固有層の血管内皮細胞上のタキキニンNK1受容体の発現は、LPS吸入曝露後1~2週間にわたり増強された。ピークは2週間後であった(図4)。

■幼若ラットと成熟ラットの気道反応の比較:離乳前の幼若ラットでは成熟ラットに比べて、LPS吸入曝露後の神経原性気道血漿漏出およびその増幅機構がより強く、より長期にわたり増強された。

		28h後	7日後	14日後	21日後
ホルムアルデヒド吸入による神経原性血漿漏出の増強	成熟	+	+	±	+
	幼若	+	+	±	+
知覚神経C線維の分布	成熟	+	+	±	+
	幼若	+	+	±	+
タキキニンNK1受容体の発現	成熟	+	+	±	+
	幼若	+	+	±	+
NGF/BDNFの分布	成熟	+	+	±	+
	幼若	+	+	±	+

【研究2】

A. 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した。

B. 研究方法

Wistar雄性ラット(8週齢)に超音波ネブライザーを用いて、曝露チャンパー内で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)を静注したのちカプサイシン(75 μ 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 線維の分布を、タキキニン NK1 受容体抗体を用いてタキキニン NK1 受容体の発現を観察した。また、NGF と BDNF 抗体を用いて、下部気管のこれらの神経栄養因子の発現を同様の方法で観察した。

C. 研究結果

■カプサイシン静注による下部気管の神経原性血漿漏出 :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(図 5)。

■知覚神経 C 線維の分布: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(図 6)。

■神経栄養因子の発現:ホルマリン(1%)吸入曝露後 28 時間後、気道上皮細胞上における NGF と BDNF の発現が増強された(図 7)。

■タキキニン NK1受容体の分布:タキキニン 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、7 日後をピークに、著しい発現の増強を認めた(図 8)。

D. 健康危険情報(なし)

E. 研究発表

1. 論文発表

Futamura M, Goto S, Kimura R, Kimoto I, Miyake M, Sakamoto T. Differential effects of topically applied formalin and aromatic compounds on neurogenic-mediated microvascular leakage in rat skin. *Toxicol* 255; 100-106: 2009

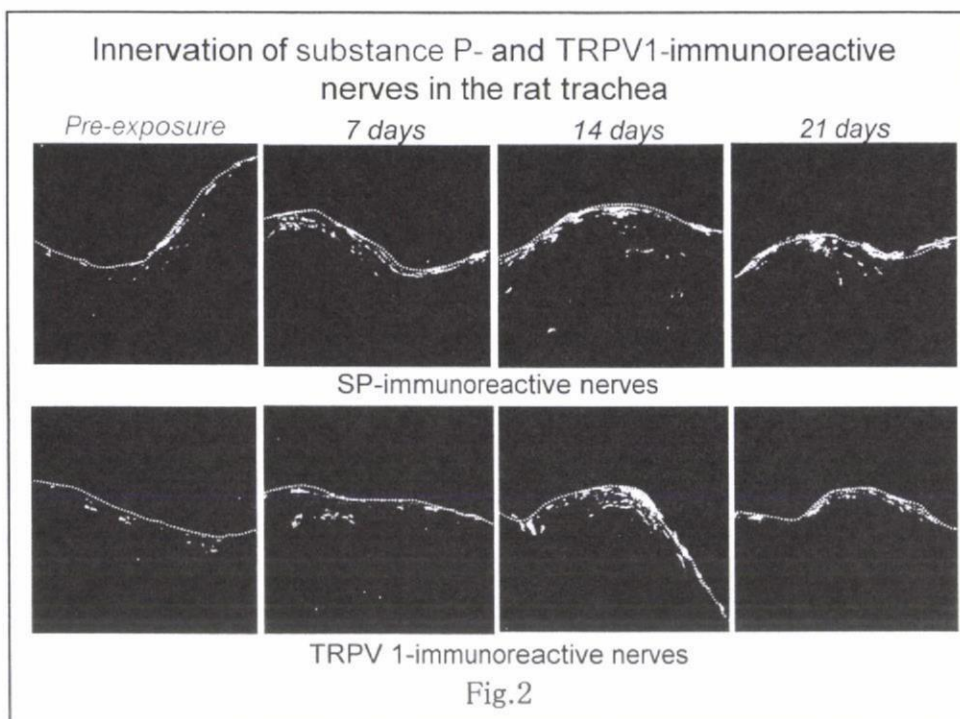
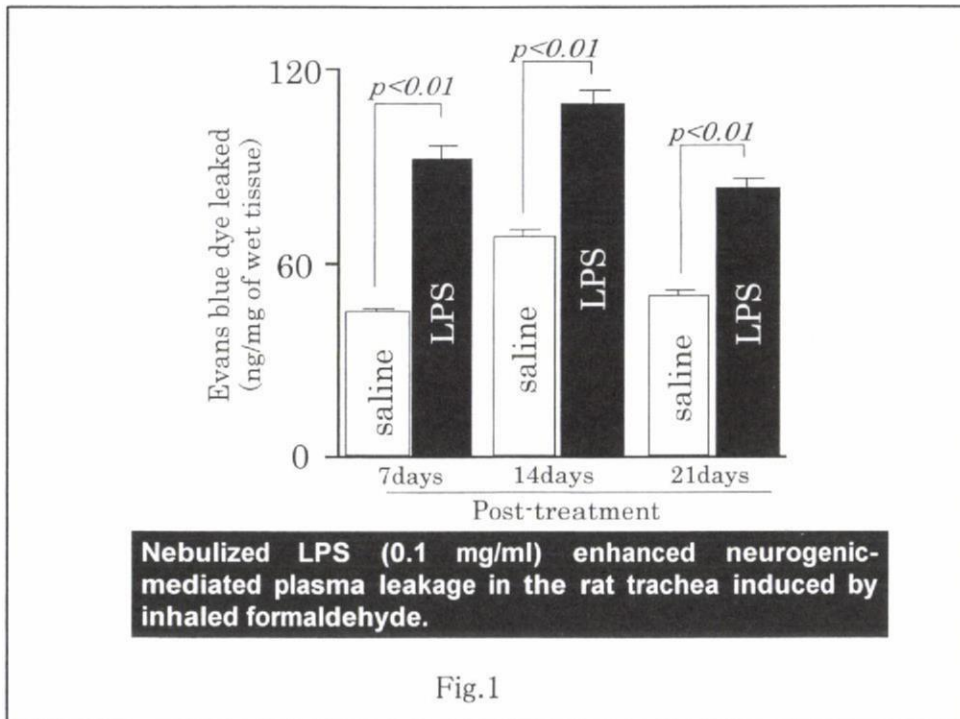
Morii S, Kondo F, Ikai Y, Miyake M, Futamura M, Ito K, Sakamoto T. Tacrolimus hydrate ointment inhibits skin plasma extravasation in rats induced by topical *m*-xylene but not capsaicin. *Eur J Pharmacol* (in press)

2. 学会発表

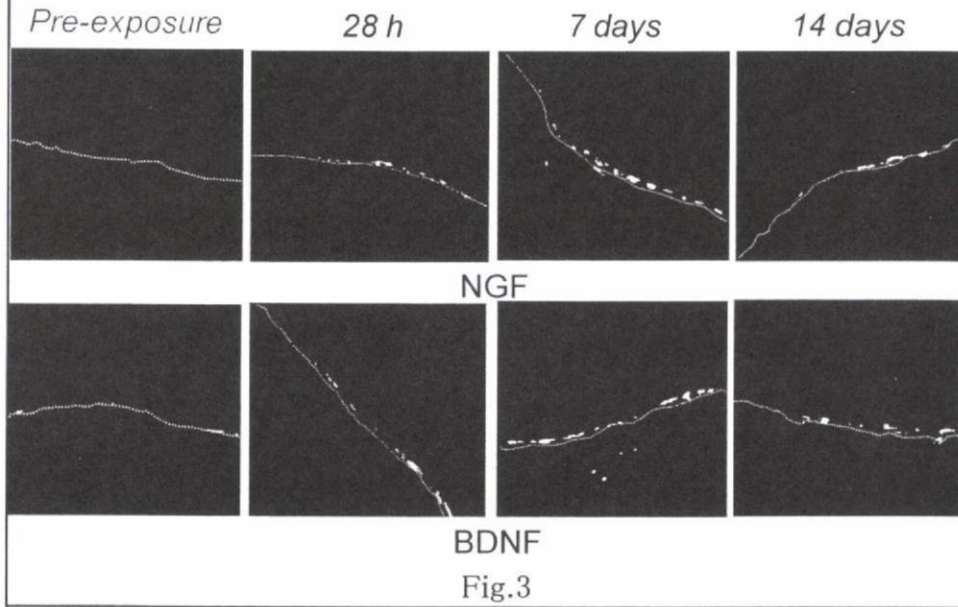
- 1) 第 44 回日本小児アレルギー学会総会、名古屋、2007.12.8-9
- 2) 第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会 東京、2008.6.12-14
- 3) 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京、2008.11.27-29

F. 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)



Immunohistochemical localization of NGF and BDNF in the trachea of rats 2 weeks of age collected 28 h, and 7 and 14 days after exposure to aerosolized LPS.



Immunohistochemical localization of tachykinin NK1 receptors in the rat trachea collected 7, 14 and 21 days after exposure to aerosolized LPS

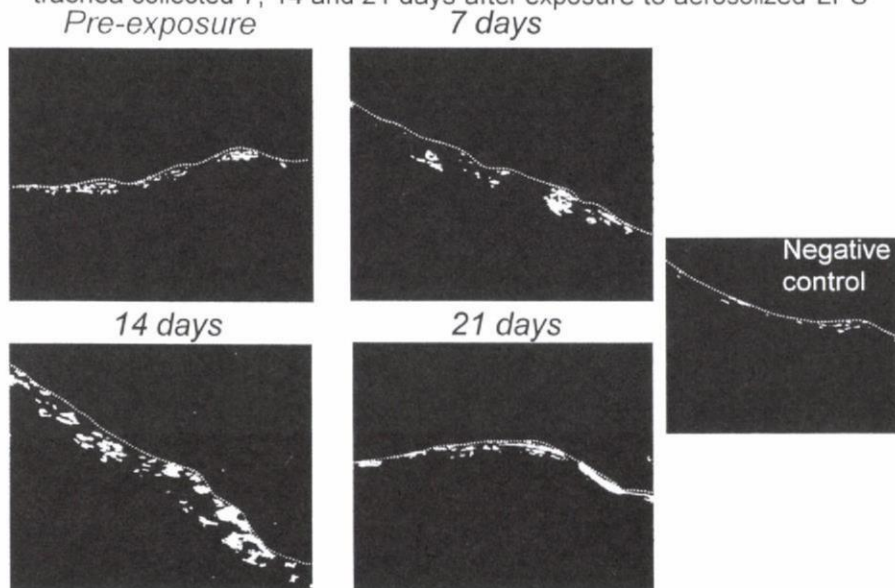
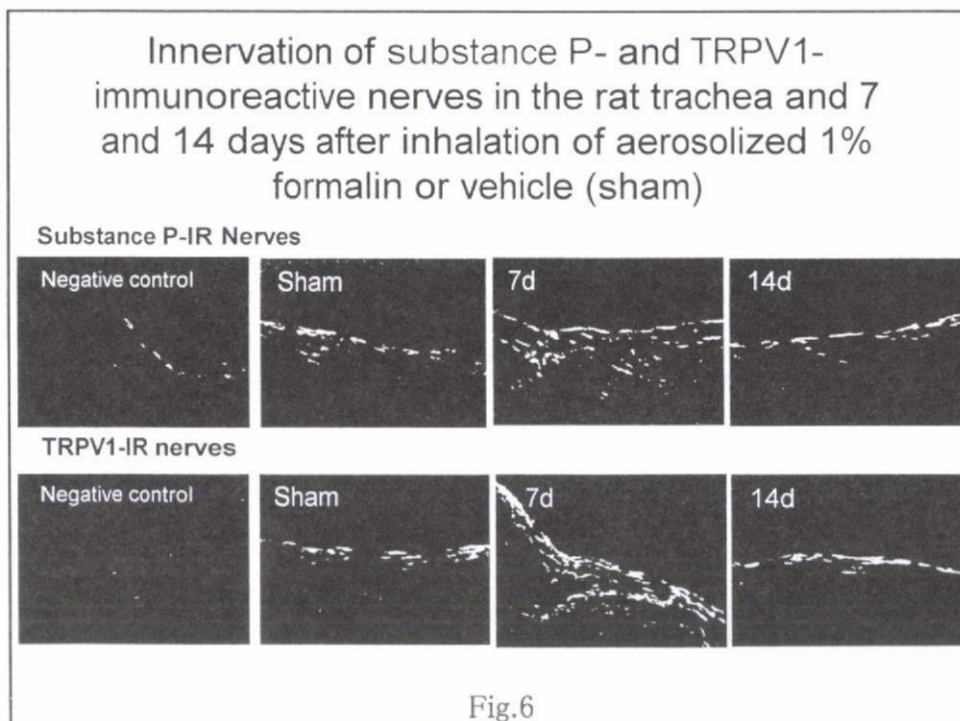
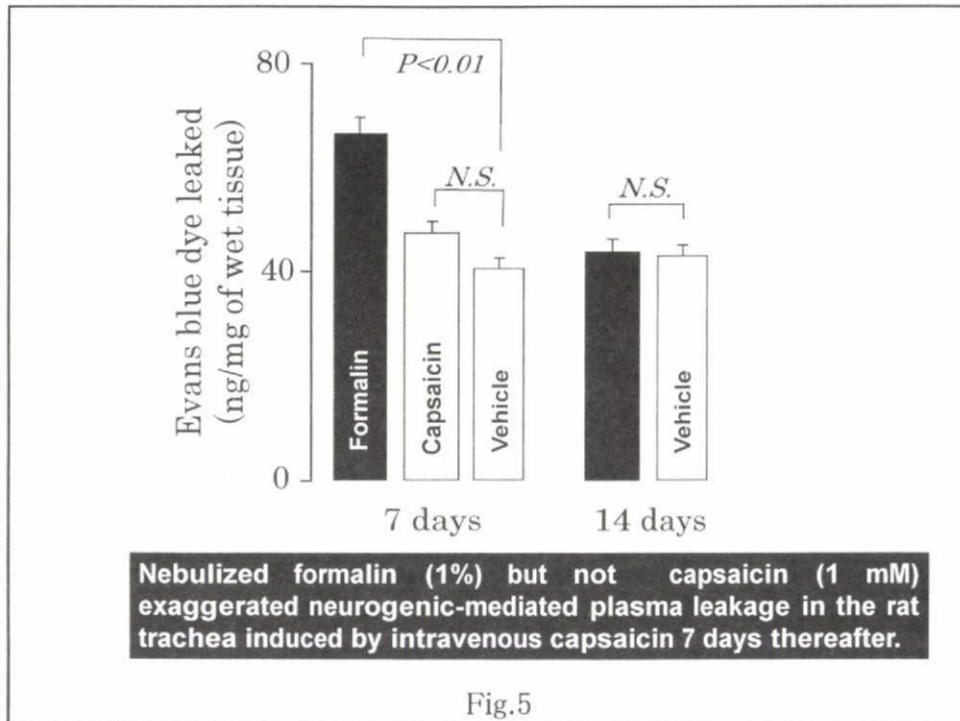
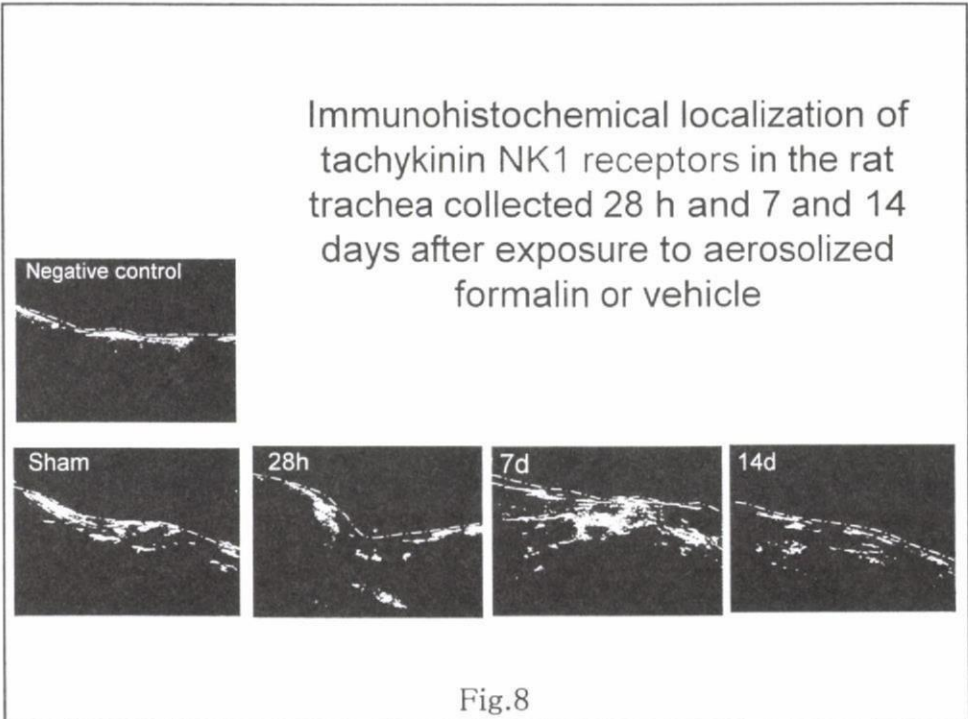
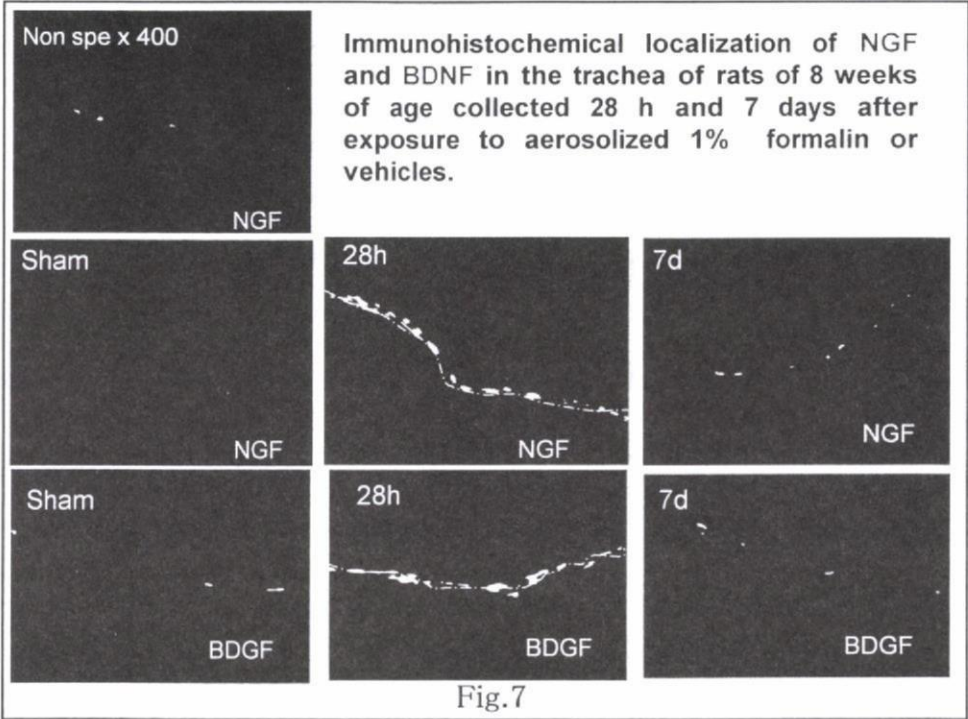


Fig.4





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

研究分担者 田中 宏幸 (岐阜薬科大学 機能分子大講座 薬理学研究室 准教授)

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てきた結果、FA (2・10%) の反復塗布により耳介腫脹反応が生じることを見出した。また、FA 塗布後の耳介において interleukin-4 (IL-4) および nerve growth factor (NGF) をはじめとする神経栄養因子ならびに侵害刺激の受容体である transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) の mRNA 発現亢進が認められたことから、FA 誘発皮膚炎には Th2 優位な免疫反応および神経栄養因子、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。そこで本年度は FA 誘発皮膚炎における Th2 サイトカインおよび TRPV1 の機能的意義を明らかにすべく IL-4、IL-13 ならびに TRPV1 それぞれの遺伝子欠損 (KO) マウスに FA を塗布し、生じた皮膚炎の程度をそれぞれの野生型 (WT) マウスと比較した。すなわち、それぞれの KO マウスおよび WT マウスの耳介の表裏に 5 %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、WT マウスに比し、いずれの KO マウスにおいても耳介腫脹反応の減弱が認められた。さらに、TRPV1 KO マウスにおいては WT マウスに比し、耳介中の NGF、サブスタンス P の受容体である neurokinin-1 (NK-1) ならびにニューロキニン A の受容体である neurokinin-2 (NK-2) の mRNA 発現の減弱が認められた。以上の成績から、FA 反復塗布による皮膚炎には Th2 サイトカインおよび TRPV1 が重要な役割を果たしていることが示唆された。また、本研究ではシックハウス症候群の治療的観点からステロイド薬ならびに免疫抑制薬であるブレドニゾロンおよび FK506 が FA 反復塗布による皮膚炎に及ぼす影響についても併せて検討を行った。その結果、ブレドニゾロンおよび FK506 の経口投与は、FA 反復塗布による耳介腫脹反応を用量依存的かつ有意に抑制した。さらに FK506 投与群では vehicle のみを投与した群に比し、NGF および TRPV1 の mRNA 発現の減弱が認められた。以上の成績から、免疫抑制薬は FA によって引き起こされた皮膚炎の治療に有効であり、特に FK506 に関しては、NGF や TRPV1 を介した神経原性炎症を抑制することで薬効を発揮す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 機能分子大講座 薬理学研究室 教授)・臼田春樹 (岐阜大学大学院 連合創薬医療情報研究科 博士後期課程 1 年)・遠藤拓未 (岐阜薬科大学大学院 薬学研究科 修士 1 年)

A. 研究目的

シックハウス症候群の症状は多臓器にわたる不定愁訴を特徴とする。その中には頭痛・めまいなどの自律神経症状や、においがつらいなどの知覚過敏症状など神経系への影響を示唆する症状が少なくない。シックハウス症候群の主要な原因のひとつとして揮発性有機化合物 (VOCs) がよ

く知られており、中でもホルムアルデヒド (FA) は、建材、塗料、衣料品、紙など広範に使用されていることから、日常的に接触・曝露される機会が多いと考えられる。また、一般に化学物質の曝露は皮膚、気道および中枢神経系などに多彩な症状を引き起こすと考えられており、神経原性炎症を引き起こす可能性も推察されている。FA は皮膚や粘膜に対する刺激性を有し、独特のにおいを発することなどから、シックハウス症候群の病態形成にも関与していることが示唆されてきた。しかし、FA がシックハウス症候群を引き起こす機序はもとより、接触による皮膚症状の程度・閾値ならびに機序に関しても未だ不明である。

分担研究者らは、VOCs が皮膚へ曝露された際の影響を明らかにするため、これまでに BALB/c

マウスの両耳介に FA を反復塗布した際に生じる皮膚反応について検討を行ってきた。その結果、2 回目の FA (2・10%) 塗布により塗布 1 時間後をピークとする一過性の腫脹が観察され、3 回目の塗布以降では、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。これらの反応は、FA の塗布濃度に依存した増大が認められた。また、FA の最終塗布 24 時間後の耳介において、Th2 サイトカインである IL-4、NGF をはじめとする神経栄養因子および多モード侵害受容体として知られる TRPV1 の mRNA 発現の亢進が認められたことから、FA 反復塗布による皮膚炎には Th2 免疫応答および神経原性炎症が関与していることが推察された。

そこで本年度は、Th2 サイトカインである IL-4 または IL-13、侵害受容体である TRPV1 のいずれかの遺伝子を欠損 (KO) させたマウスを用いて、FA 反復塗布による皮膚炎における Th2 サイトカインおよび TRPV1 の機能的意義について検討を行った。また、シックハウス症候群の治療的側面から、種々のステロイド薬ならびに免疫抑制薬を用いた検討も併せて行った。

B. 方法

1. 各種 KO マウスを用いた検討

TRPV1 KO マウス (C57BL/6 系マウス: 自然科学研究機構岡崎バイオサイエンスセンター細胞生理部門の富永真琴教授より供与)、IL-4 KO マウス (BALB/c 系マウス: Jackson Laboratory, USA)、IL-13 KO マウス (BALB/c 系マウス: MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK の Andrew N.J Mckenzie 博士より供与) およびそれぞれの野生型 (WT) マウス両耳介の表裏に 5 % FA を週に 1 回計 5 回反復塗布し、生じた耳介腫脹反応の程度を各 KO マウスとそれぞれの WT マウスで比較した。TRPV1 KO マウスについては、最終塗布最終 FA 塗布 24 時間後に耳介組織を採取し、real time RT-PCR 法により各種機能因子の mRNA 発現の解析を行った。

2. FA 反復塗布マウス皮膚炎に及ぼすステロイド薬ならびに免疫抑制薬の影響の検討

ステロイド薬である prednisolone (1 mg/kg、5 mg/kg) および免疫抑制薬である FK506 (1 mg/kg、3 mg/kg) はそれぞれ精製水に溶解また

は CMC-Na-PBS 溶液に懸濁した。それぞれの薬物は FA 塗布 1 時間前に経口投与し、FA 反復塗布による耳介腫脹に対する影響を検討した。FK506 については最終 FA 塗布 24 時間後に耳介組織を採取し、real time RT-PCR 法により各種機能因子の mRNA 発現を解析した。

(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「動物実験の実施に関する規定」(平成 20 年 5 月 20 日制定) を遵守して実験を行った。また、遺伝子改変動物を用いた実験に関しては、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. 各種 KO マウスを用いた検討 (図 1 および 2)

a) IL-4 KO マウスおよび IL-13 KO マウスにおける耳介腫脹反応

IL-4 KO および IL-13 KO マウスの WT (BALB/c) 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た。さらに、3 回目以降の塗布では即時性の腫脹に加え、塗布後 24 時間をピークとする 2 相性の皮膚反応が観察された。一方、IL-4 KO マウスおよび IL-13 KO マウスでは、それぞれの WT マウスに比し、2 回目以降の塗布 1 時間後および 3 ~ 5 回目の塗布 24 時間後の耳介腫脹の有意な減弱または減弱傾向が認められた。

b) TRPV1 KO マウスにおける耳介腫脹反応

WT (C57BL/6) 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た。さらに、3 回目以降の塗布では即時性の腫脹に加え、塗布後 24 時間をピークとする 2 相性の皮膚反応が観察された。一方、WT マウスに比し、TRPV1 KO マウスでは、2 回目以降の塗布 1 時間後および 3 ~ 5 回目の塗布 24 時間後の耳介腫脹の有意な減弱または減弱傾向が認められた。耳介における mRNA 発現の解析では、WT マウス、TRPV1KO マウスいずれにおいても FA 塗布による IL-4 および IFN- γ の mRNA 発現の亢進が認められたが、両マウス間でこれらの mRNA の発現強度に差は認められなかった。一方、WT マウスの FA 塗布群に比し、TRPV1 KO マウスの

FA 塗布群では、NGF、サブスタンス P のレセプターである NK-1 およびニューロキニン A のレセプターである NK-2 の mRNA 発現の減弱が認められた。

2. FA 反復塗布マウス皮膚炎に及ぼすステロイド薬ならびに免疫抑制薬の影響の検討 (図 3 および 4)

Prednisolone および FK506 の vehicle 投与群では 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、3 回目以降の塗布では即時性の腫脹に加え、塗布 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。これに対し、prednisolone 投与群では vehicle 投与群に比し、3 回目以降の FA 塗布 1 時間後ならびに 24 時間後の耳介腫脹を用量依存的かつ有意に抑制あるいは抑制する傾向を示した。一方、FK506 投与群ではコントロール群に比し、3 回目以降の FA 塗布 1 時間後および 24 時間後の耳介腫脹の減弱または減弱傾向が認められた。この検討では、3 回目の FA 塗布における FK506 による耳介腫脹の抑制が用量依存的であったのに対して、4 回目および 5 回目の FA 塗布では、1 mg/kg、3 mg/kg いずれの用量でもほぼ同等の腫脹の減弱が認められた。さらに、耳介中の mRNA 発現の解析を行ったところ、vehicle 投与群に比し、FK506 投与群では NGF および TRPV1 の mRNA 発現の減弱ならびに IL-4 の mRNA 発現の増強が観察された。

D. 考察

本研究では FA 反復塗布によって誘発されるマウス耳介腫脹反応における Th2 サイトカインおよび侵害受容体 TRPV1 の機能的意義について検討を行った。また、治療的観点から FA 塗布によって生じる皮膚炎に対するステロイド薬ならびに免疫抑制薬の効果を検討した。

その結果、WT マウスに比し、IL-4 KO マウスおよび IL-13 KO マウスにおいて耳介腫脹反応の減弱が認められたことから、FA 反復塗布による皮膚炎には Th2 サイトカインが関与していることが示唆された。Th2 サイトカインはアレルギー性喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患に関与することから、本研究においても FA によって誘発される皮膚炎にはアレルギー反応が

関与している可能性が推察される。実際に、ヒトでは FA の長期曝露によって感作が成立することが報告されており、FA がハプテン抗原としてアレルギー性接触性皮膚炎や鼻粘膜の刺激症状を引き起こす可能性も推察されている。しかし、本検討において FA がハプテンとして機能したのか否かについては不明であるため、今後、FA 塗布が免疫細胞の分化や機能に及ぼす影響などについて検討を行う必要があると思われる。

一方、TRPV1 KO マウスでは WT マウスに比し、耳介腫脹反応の減弱が認められたことから、TRPV1 が FA 反復塗布による皮膚炎に重要な役割を果たしていることが示された。TRPV1 は知覚神経の C 線維に分布しており、活性化をうけると感覚神経終末からサブスタンス P や CGRP などの神経ペプチドが放出され、それらによる神経原性炎症を起こす可能性が示唆されている。本反応において TRPV1 が FA によって直接活性化されるか否かは不明であるが、FA 刺激によってアラキドン酸代謝物などの内因性 TRPV1 リガンドが放出され、それらが TRPV1 を活性化して神経原性炎症が生じた可能性が考えうる。また、FA 反復塗布を行った TRPV1 KO マウスでは、WT マウスに比し、NGF、NF- κ B および NK-2 の mRNA 発現の減弱が認められたことから、本反応では TRPV1 が神経栄養因子や神経ペプチドレセプターの発現に影響を及ぼす可能性が推察される。既に NGF が受容体への結合を介し TRPV1 の細胞表面への発現を亢進すること、NGF が知覚神経における神経ペプチドの発現を増加させることがそれぞれ報告されていることから、本モデルにおいても TRPV1 を介した神経原性炎症が誘発されることより、種々の炎症メディエーターが産生され、それらによるケラチノサイトの活性化を介して放出された NGF がさらに TRPV1 を活性化するという炎症のサイクルが存在する可能性が考えられる。しかし、TRPV1 が神経栄養因子の発現に及ぼす影響については知見が乏しく不明な点が多い。従って、神経栄養因子と TRPV1 との相互作用については、前述の p75 KO マウスにおける FA 皮膚炎モデルの解析をはじめとして、今後、より詳細に検討を行う必要がある。

本研究ではシックハウス症候群の治療的観点から、ステロイド薬である prednisolone および免疫抑制薬である FK506 の FA 反復塗布による皮膚炎に及ぼす影響を検討した。その結果、いずれの薬物も FA による耳介腫脹反応を用量依存的かつ有意に抑制したことから、これらの免疫抑制剤が FA によって誘発される皮膚炎に有効である

ことが示された。また、FK506 投与群では vehicle 投与群に比し、FA 塗布後の耳介における NGF および TRPV1 の mRNA 発現の減弱が認められた。FK506 が免疫抑制作用を発揮する機序として T 細胞のシグナル伝達分子であるカルシニューリンを阻害することがよく知られているが、近年の報告によると、アトピー様皮膚炎を自然発症した NC/Ng マウスに FK506 を塗布することにより、病変部表皮への神経線維の浸潤が抑制されることが示されている。臨床においても、アトピー性皮膚炎の患者への FK506 製剤の塗布により無疹部および皮疹部の NGF タンパク発現が減弱することが報告されていることから、FK506 は免疫細胞だけでなく神経細胞にも影響を及ぼすことが考えられる。従って、本反応において FK506 は NGF や TRPV1 の発現を抑制することで、これらの分子を介した神経原性炎症を抑制することが推察される。

E. 結論

FA 反復塗布によって誘発される皮膚炎には Th2 優位な免疫反応ならびに NGF 等の神経栄養因子や TRPV1 を介した神経原性炎症が関与している可能性が示唆された。また、免疫抑制剤は FA によって生じる皮膚炎に有効であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 遠藤拓未、田中宏幸、下内鮎美、白田春樹、齋藤朝香、稲垣直樹、永井博弼: ホルムアルデヒド (FA) 反復塗布誘発マウス皮膚炎モデルにおける侵害刺激受容体の影響 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 一般演題 179 2008. 11. 28. 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

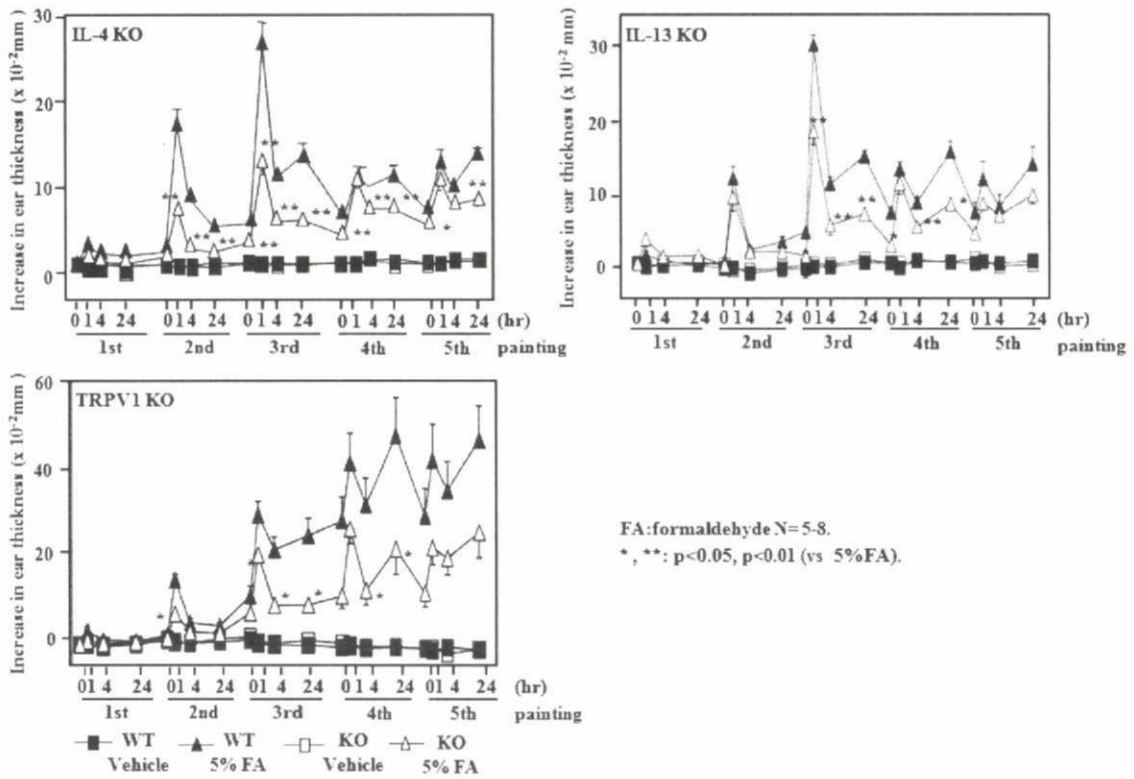


図 1 IL-4、IL-13、および TRPV1 それぞれの遺伝子欠損 (KO) マウスへの FA 反復塗布による耳介腫脹反応

5% FA を週に 1 回計 5 回塗布し、それぞれの塗布直前 (0 時間)、塗布 1、4、24 時間後に耳介の厚さを測定した。グラフは各種機能因子の遺伝子を欠損させたマウスにおける耳介腫脹反応の経時変化を示す。IL-4、IL-13 および TRPV1 いずれの KO マウスにおいても WT マウスに比し、耳介腫脹反応の減弱が認められた。

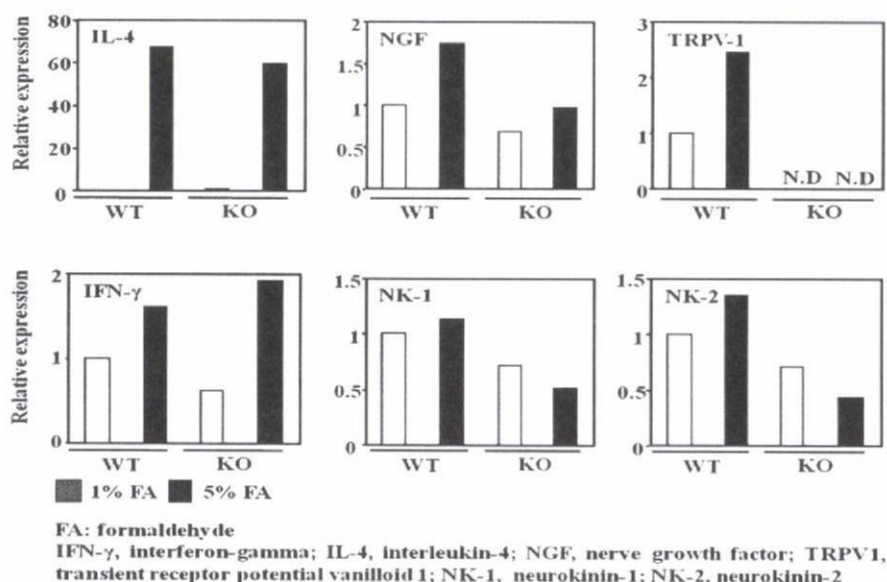


図 2 5 回目の FA 塗布 24 時間後の TRPV1 KO マウスおよび WT マウス耳介における mRNA 発現

各群 5 ないし 7 匹より調整した cDNA を等量ずつプールしたものをテンプレートとして real time RT-PCR を行った。グラフ縦軸は vehicle 群の発現を 1 とした際の発現強度を示す。TRPV1 KO マウスでは WT マウスに比し、FA 塗布後の耳介において NGF、NK-1 および NK-2 の mRNA 発現の減弱が認められた。

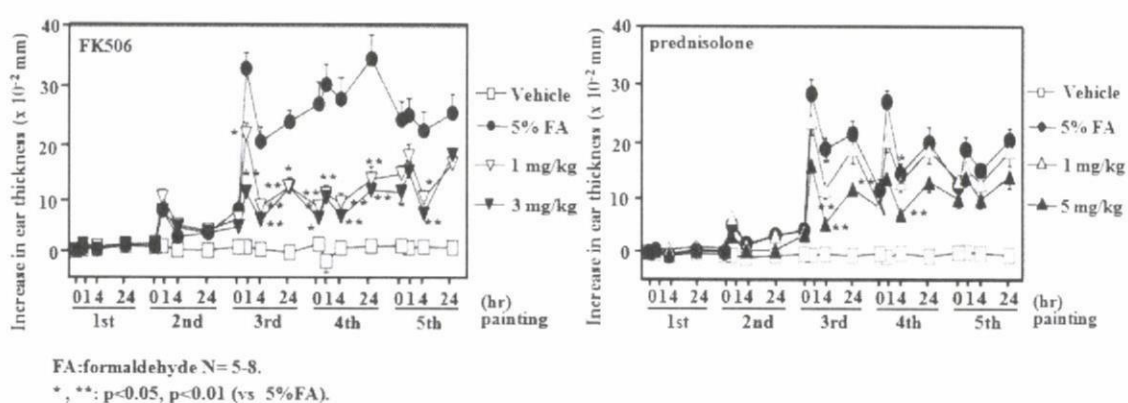


図 3 FA 反復塗布による耳介腫脹反応に及ぼす免疫抑制剤の影響
 グラフは FK506 (左) および prednisolone (右) 投与を行ったマウスとそれぞれの対照マウスにおける耳介腫脹反応の経時変化を示す。両薬物とも FA によって生じた耳介腫脹反応を用量依存的に抑制した。