

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：27501
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590659
 研究課題名（和文）好乾性真菌がダニ抗原誘発性アトピー性皮膚炎の発症と増悪に及ぼす影響
 研究課題名（英文）Effect of exposure to xerophilic fungi on the onset and aggravation of mite-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice.
 研究代表者
 定金 香里（SADAKANE KAORI）
 大分県立看護科学大学・看護学部・助教
 研究者番号：20322381

研究成果の概要（和文）：

寝室や居間など比較的湿度の低い場所に繁殖する好乾性真菌（カビ）、アスペルギルスがアトピー性皮膚炎を悪化させるかマウスを用いて調べた。アスペルギルスの抽出物がアトピー性皮膚炎発症部位に接触しても影響はごくわずかだったが、皮下に侵入し、真皮層にまで到達すると病態が悪化した。また、6ヶ月間、アスペルギルスの抽出物を吸入したマウスは、吸入していないマウスに比べ症状や病態が悪化した。本研究の結果から、アスペルギルスがアトピー性皮膚炎を悪化させる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated whether xerophilic fungi, *Aspergillus* aggravates mite-induced atopic dermatitis-like skin lesion in NC/Nga mice. *Aspergillus* is a kind of mold and found in a bedroom or living room. The topical application of the extract of *Aspergillus* on the lesion sites in mice was lightly affected on mite-induced atopic dermatitis. But the multiple subcutaneous injection of the extract led to increased allergic responses in subcutaneous inflammation sites. In addition, intratracheal injection of the extract for six months aggravated the atopic dermatitis in mice. Therefore, it is suggested that *Aspergillus* can be an aggravating factor for atopic dermatitis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：予防医学、室内浮遊真菌、アスペルギルス、アトピー性皮膚炎、増悪作用

1. 研究開始当初の背景

疫学研究で、カビの検出率とアトピー性皮膚炎皮膚炎の罹患率が正の相関を示すこと

から、カビがアトピー性皮膚炎の発症や増悪に関わっていることが示唆されている。しかし、カビをアレルゲンとするアトピー性皮膚

炎モデル動物はまだ確立されておらず、実験的にアトピー性皮膚炎の発症原因であると証明されていない。我々の研究グループは、真菌生体成分である β -グルカンの経口投与により、卵白アルブミン誘発性好酸球性気道炎症がより増悪することを見いだした。アトピー性皮膚炎はアレルギー性気道炎症と同じI型アレルギーであることから、アレルギーとカビを共曝露することにより、アトピー性皮膚炎の症状・病態がより強まるのではないかと考えた。本研究に先立つ研究で、好湿性真菌アルテルナリア、カンジダについて、アトピー性皮膚炎への影響を検討したところ、統計的有意差は認められなかったものの、マウスのアトピー性皮膚炎様症状やアレルギー炎症の各種パラメーターがいずれも増悪する傾向を示した。このことから、カビにはアトピー性皮膚炎を増悪する作用があることが示唆された。好湿性真菌は、風呂場や台所など湿度の高い場所を生育環境とする真菌であるが、我々が最も長時間生活する居間や寝室に多く見られる好乾性真菌がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響についてはまだ検討されていない。好乾性真菌は70%程度の湿度環境で生育し、これはアトピー性皮膚炎の発症原因と考えられているチリダニ科のダニ(ヤケヒョウヒダニ、コナヒョウヒダニ)の生育条件と同じである。我々は、日常的にダニとカビの両方に曝露されている可能性が非常に高く、アトピー体質の人にとっては、アトピー性皮膚炎を始めとするアレルギー疾患への影響が懸念される。

2. 研究の目的

本研究では、ヤケヒョウヒダニ抗原誘発性アトピー性皮膚炎モデルマウスに、経皮的、経気道的に好乾性真菌の抽出物を曝露し、アトピー性皮膚炎への影響を調べることを目的とする。好乾性真菌は浮遊性室内汚染物質で、皮膚に接触したり、口や鼻から吸入されて生体内に入っていくと考えられることから、経皮、経気道による影響を調べることとした。好乾性真菌としてアスペルギルス(コウジカビ)を用いた。アスペルギルスは、ごく普通の家庭のタタミやカーペットに生育し、ハウスダスト中にしばしば検出される。よって、ダニ抗原とともに生体に曝露されている可能性が高いと考えられる。

(1)好乾性真菌の皮膚バリア破綻時におけるアトピー性皮膚炎への影響

皮膚バリアは、外界の物質が生体内に侵入するのを防ぐ非特異的防御として働く。アトピー性皮膚炎患者の場合、この皮膚バリア機能が、正常なヒトよりも弱いことが知られている。そこで、破綻した皮膚バリアから真皮層に侵入したアスペルギルスがどのような

影響を及ぼすかを調べる目的で、人為的に皮下真皮層にアスペルギルス抽出物を投与し、アトピー性皮膚炎への影響を検討した。

(2)好乾性真菌の皮膚接触によるアトピー性皮膚炎への影響

アスペルギルスは室内浮遊真菌であるため、皮膚に接触する可能性が考えられる。そこでその状態を模して、アスペルギルス抽出物をアトピー性皮膚炎発症部位に塗布し、その影響について検討することを目的とした。モデルマウスにダニ抗原を用いてアトピー性皮膚炎を発症させた後、アスペルギルス抽出物をアトピー性皮膚炎の患部に塗布し、症状や病態について解析した。

(3)好乾性真菌を長期吸入したときのアトピー性皮膚炎への影響

好乾性真菌は、ヒトが日常的に生活する空間で生育するカビであることから、長期にわたってカビを吸入している可能性が高い。そこで、アスペルギルス長期経気道曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響を検討することを目的とした。アスペルギルス抽出物を6ヶ月間、マウスに気管内投与し、好乾性真菌を長期吸入したモデルマウスに、アトピー性皮膚炎を発症させた。

3. 研究の方法

(1)好乾性真菌の皮膚バリア破綻時におけるアトピー性皮膚炎への影響

NC/Nga 雄性マウス(6週齢)を1) control群、2) Asp0.5群、3) Der p群、4) Der p + Asp 0.05 (DA 0.05)群、5) Der p + Asp 0.5 (DA 0.5)群の5群に分けた。実験スケジュールを図1に示す。3)~5)群にはアトピー性皮膚炎を誘発するために、5 μ g/bodyのヤケヒョウヒダニ抗原(Der p)を生理食塩水に溶解し、マウス右耳皮下に2~3日おきに8回、投与した。2)群、5)群には、アスペルギルス抽出物(Asp)を0.5 μ g/bodyとし、抗原と共に8回、皮下投与した。4)群には同様に0.05 μ g/bodyを投与した。1)群は溶媒の生理食塩水のみを投与した。皮下投与の24時間後に耳介表面を観察し、乾燥・紅斑、浮腫、かひ・びらん形成の状態をスコア化し、その合計を皮膚症状スコアとした。最終抗原投与の翌日に屠殺し、耳介組織を採取、半数を病理像の解析に、半数を炎症性タンパクの発現解析に用いた。心臓から採取した血清を用い、抗体産生量を測定した。

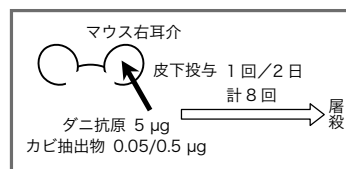


図1. 実験スケジュール

(2)好乾性真菌の皮膚接触によるアトピー性皮膚炎への影響

実験スケジュールを図2に示す。NC/Nga雄性マウス(6週齢)を1) vehicle群、2) Asp群、3) Der p群、4) Der p + Asp群の4群に分け、3)群、4)群には、Der pを5 µg/body、右耳介皮下に最初の8回は2~3日毎に、その後は週に2回ずつ6回投与した。1)群、2)群には溶媒の生理食塩水を同様に皮下投与した。Der pを8回投与した5日後から2)群、4)群に、Asp(10 µg/ear)を3~4日毎に6回、耳介背側に塗布した。1)、3)群には同様に溶媒の生理食塩水を塗布した。抗原投与の24時間後に耳介表面の状態を観察しスコア化した。最終抗原投与の翌日に屠殺し、耳介組織を採取、病理像の解析および炎症性タンパクの発現解析に用いた。また、血清を抗体産生量に供した。

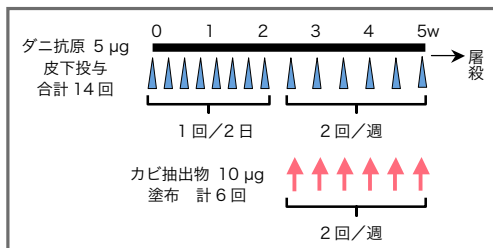


図2. 実験スケジュール

(3)好乾性真菌を長期吸入したときのアトピー性皮膚炎への影響

実験スケジュールを図3に示す。NC/Nga雄性マウス(6週齢)を1) Control群、2) Asp群、3) Der p群、4) Asp + Der p群の4群に分け、2)群、4)群には、0.3 µgのAspを3週毎に計8回、気管内投与した。その後、Der pを5 µg/body、右耳介皮下に2~3日毎に8回投与した。抗原投与の24時間後に耳介表面を観察し、乾燥・紅斑、浮腫、かひ・びらん形成の各徴候をスコア化した。最終抗原投与の翌日に屠殺し、耳介組織を採取、半数を病理像の解析に、半数を炎症性タンパクの発現解析に用いた。心臓から採取した血清を用い、抗体産生量を測定した。

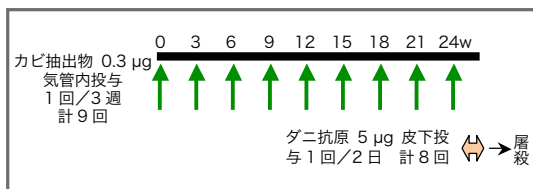


図3. 実験スケジュール

4. 研究成果

(1)好乾性真菌の皮膚バリア破綻時におけるアトピー性皮膚炎への影響

①皮膚症状の比較

4回目の観察以降、Der p群、DA 0.05群、

DA 0.5群がcontrol群に対して有意に高値を示した(p<0.01、図4)。Der p群とDA 0.05群およびDer p群とDA 0.5群間に差は見られず、Asp皮下投与によるダニ抗原誘発性アトピー性皮膚炎様症状の増悪は認められなかった。Asp 0.5群は、8、9回目の観察時に、control群に対して有意に高値を示した(p<0.05)が、アトピー性皮膚炎を誘発した3群と比較し、有意に低値を示した。従って、Asp単独での皮下投与ではアトピー性皮膚炎様症状は認められなかった。

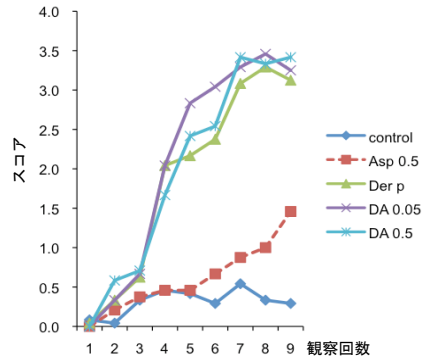


図4. 皮膚症状の経時変化

②病理学的解析

Asp、Der pを投与した群はいずれも皮下組織中の好酸球数が有意に増加していた(p<0.05)。DA 0.5群で最も多く、Der p群に対して有意な差を認めた(p<0.05、図5)。DA 0.05群もDer p群よりも高値を示す傾向が見られた。また、脱顆粒像を認めるマスト細胞像が、Asp0.5群では、Der p群と同程度だったのに対し、DA 0.05、DA 0.5群で増加する傾向がみられた(図6)。

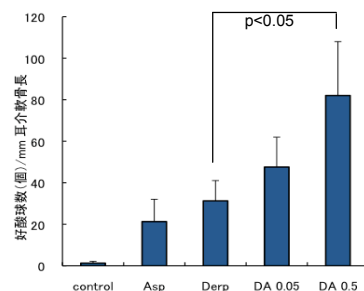


図5. 好酸球数

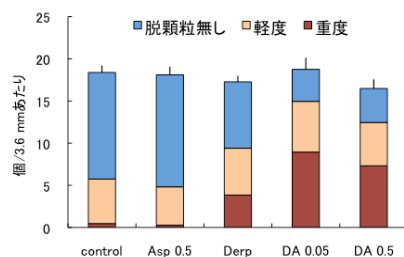


図6. マスト細胞

③血中抗体産生の比較

総IgE抗体量は、Asp 0.5、Der p、DA 0.05、DA 0.5群ともcontrol群に対して有意に高値

を示した ($p < 0.01$)。DA 0.05、DA 0.5 群は、Der p 群に対して高値を示した。抗原特異的 IgG₁ 抗体価は、Asp 併用による影響はみられなかった。

④組織中サイトカイン産生の比較

Th1 系サイトカインの IFN- γ 産生量が、DA 0.05、DA0.5 群で Der p 群よりも低値を示し、Th2 系サイトカイン (IL-13) では、DA 0.5 群が Der p 群よりもやや高値を示した。炎症細胞遊走・活性化因子 (eotaxin、IL-2、MCP-3、RANTES) では、Der p と Asp 併用による影響はみられなかった。

⑤まとめ

皮膚バリア機能破綻を模した条件下で、アトピー性皮膚炎への影響評価を行った。抗原と Asp を共曝露した群では、皮膚症状スコアの上昇は認められなかったものの、総 IgE 抗体産生の増加傾向、皮下組織中の好酸球浸潤やマスト細胞の脱顆粒の増強が認められた。また、Th1 系サイトカイン産生の低下が増強されていた。以上のことから、皮膚バリア破綻により、カビが真皮層まで侵入すると、Th1 反応の抑制により、Th2 反応が亢進し、I 型アレルギー (IgE 増加、炎症細胞の活性化) が強まることがわかった。なお、Asp 単独でも若干、スコアの上昇は見られたが Der p 群より有意に低いスコア値であった。

(2)好乾性真菌の皮膚接触によるアトピー性皮膚炎への影響

①皮膚症状の比較

Asp+Der p 群のスコアは、Asp 塗布前まで Der p 群と同等であった。しかし、Asp 塗布後も上昇を示さなかった (図 7)。すなわち、Asp を塗布による症状の増悪が認められなかった。一方、Asp 塗布単独のスコアは、vehicle 群レベルで、アトピー性皮膚炎様症状は認められなかった。

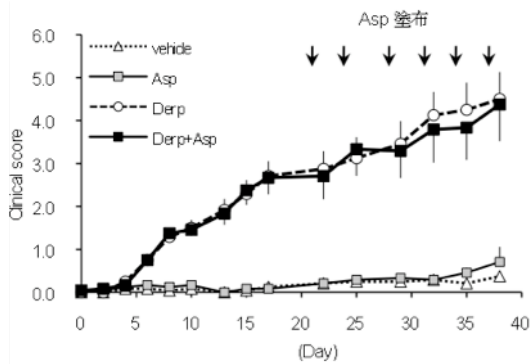


図 7. 皮膚症状の経時変化

②病理学的解析

Asp+Der p 群の皮下組織中の脱顆粒を示すマスト細胞数が Der p 群と比較して増加する傾向はなく、好酸球数もほぼ同程度であった。

③血中抗体産生の比較

総 IgE 抗体産生では、Asp+Der p 群は Der p 群に対し低値を示した。抗原特異的 IgG₁ 抗体価は Der p 群とほぼ同じ値を示した。

④組織中サイトカイン産生の比較

I 型アレルギーの増悪に関連しているサイトカイン (IL-13、eotaxin) では、Derp+Asp 群は Der p 群よりも高値を示し、Th2 細胞の働きを抑制する Th1 サイトカイン (IFN- γ 、TNF- α) では低値を示したが、いずれも顕著な変化では無かった。

⑤まとめ

本研究では、アトピー性皮膚炎発症部位に好乾性真菌アスペルギルスが接触した時の影響について検討した。その結果、Asp 塗布を行ったアトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚には症状の増悪がみられなかった。Der p 特異的 IgG₁ 抗体価、皮下組織中の好酸球数、マスト細胞数についても Asp 塗布による増悪はみられなかった。しかし、組織中サイトカイン産生では、Th1/Th2 バランスが、Th2 にシフトする傾向がみられた。先行研究で、好湿性真菌をアトピー性皮膚炎発症部位に塗布する験を行った時は、症状の増悪、炎症細胞浸潤の亢進等、I 型アレルギーが増強される結果を得たが、好乾性真菌は、好湿性真菌よりもその影響が弱いことが示唆された。

(3)好乾性真菌を長期吸入したときのアトピー性皮膚炎への影響

①皮膚症状の比較

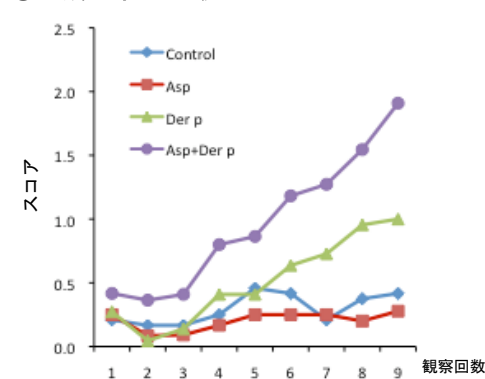


図 8. かひ・びらん形成の経時変化

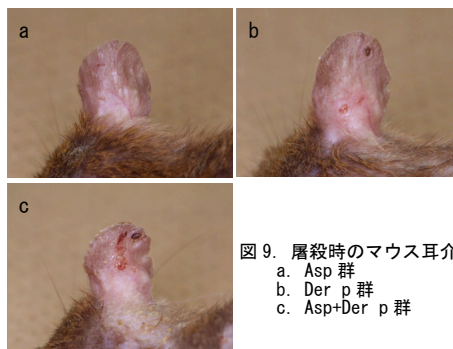


図 9. 屠殺時のマウス耳介像
a. Asp 群
b. Der p 群
c. Asp+Der p 群

Asp 気管内投与を 6 ヶ月間行った後、アトピー性皮膚炎の誘発を行った。アトピー性皮膚炎誘発期間中、症状の観察を経時的に行った。アトピー性皮膚炎様症状の徴候（かひ・びらん形成、乾燥・紅斑、浮腫）をそれぞれ比較した。Asp+Der p 群は Der p 群に対し、かひ・びらん形成において高値を示す傾向にあった（図 8、図 9）。乾燥、浮腫については、差は認められなかった。Asp 気管内投与を 6 ヶ月間行った Asp 群ではスコアの上昇はほとんどみられず、control レベルであった。

②病理学的解析

皮下組織中における好酸球、マスト細胞の浸潤の程度を調べた。Asp+Der p 群の好酸球数は Der p 群に対し、有意差は認められなかったが、高値を示す傾向にあった。また、Asp 群では重度の脱顆粒を示すマスト細胞数は Control レベルであった（図 10）。一方、アトピー性皮膚炎を誘発した 2 群では顕著に増加しており、さらに重度の脱顆粒を示すマスト細胞が Asp+Der p 群で Der p 群に対して、有意に高値を示した（ $p<0.001$ ）。

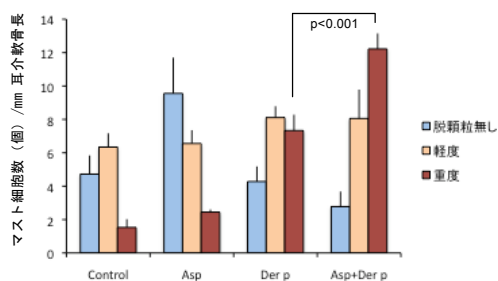


図 10. マスト細胞数

③血中抗体産生の比較

Asp 気管内投与後、眼窩静脈叢から採取した血清と、抗原投与後心採血した血清中の総 IgE 値をそれぞれ測定し、その差から総 IgE 抗体の増加量を算出した。その結果、Der p 群よりも Asp+Der p 群の方がより増加する傾向を示した（図 11）。Der p 特異的 IgG₁ 抗体価は、Asp+Der p 群で Der p 群に対しやや低値を示した。Asp 特異的 IgG₁ 抗体価は、4 群間において有意な差を認めなかった。

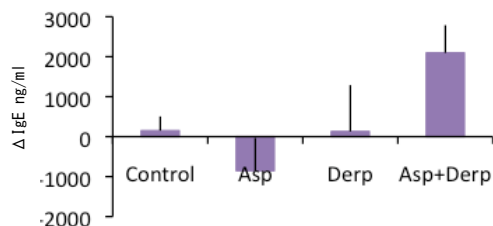


図 11. 血中総 IgE 抗体産生の変化
Der p 投与後の IgE 値から Der p 投与前の IgE 値の差

④組織中サイトカイン産生の比較

Asp+Der p 群は、Der p 群に対し IL-13、

eotaxin と MIP-1 α 産生が高値を示し、IFN- γ 産生は低値を示す傾向にあった（表 1）。

表 1. 耳介組織中サイトカイン量

	(pg/mg ear weight)			
	IL-13	eotaxin	MIP-1 α	IFN- γ
Control	15.61 \pm 6.17	0.00 \pm 0.00	224.72 \pm 58.66	61.28 \pm 28.73
Asp	14.08 \pm 8.77	2.19 \pm 2.19	329.62 \pm 222.92	27.53 \pm 23.55
Der p	194.11 \pm 36.91	260.99 \pm 39.79	792.98 \pm 220.44	140.52 \pm 44.03
Asp+Der p	311.13 \pm 29.69	310.66 \pm 29.92	1115.50 \pm 446.79	114.04 \pm 29.22

⑤まとめ

本研究では、長期好乾性真菌吸入によるアトピー性皮膚炎への影響を検討した。その結果、症状の増悪および炎症細胞の浸潤や活性化、総 IgE 抗体産生、I 型アレルギー関連炎症タンパク産生の増加などの傾向がみられた。

(4) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究では、好乾性真菌アスペルギルスが、ダニ抗原誘発性アトピー性皮膚炎様症状に及ぼす影響を、経皮曝露、経気道曝露の 2 つの曝露経路を想定して調べた。

経皮曝露では、患部に接触した時の影響は、好湿性真菌に比べ弱いものの、真皮層まで到達すると皮下組織中の I 型アレルギー反応の幾つかの指標が亢進する傾向が示された。すなわち、アトピー性皮膚炎発症により、皮膚バリアが破綻したときにカビの経皮曝露を受けると、より症状が悪化する可能性が考えられる。

また 6 ヶ月間、経気道曝露を行った後、アトピー性皮膚炎を発症させた結果、I 型アレルギー反応が亢進し、アトピー性皮膚炎様症状も増悪することが示された。このことから、カビを吸入した人がアトピー性皮膚炎を発症すると、吸入していない場合に比べ、症状が重症化する可能性が考えられる。

カビがアトピー性皮膚炎の原因物質で在ることはまだ証明されていないが、本研究により、少なくとも増悪因子であると考えられる。疫学調査に於いてダニと好乾性真菌はしばしば、同じ部屋から検出されている。アトピー性皮膚炎患者の中には、アレルゲンと好乾性真菌の共曝露により、症状がひどくなっている人が居る可能性が今回の研究結果から示された。湿度管理、清掃などダニやカビの繁殖を抑えることは、アトピー性皮膚炎の症状増悪を防止することに有効であると考えられる。

(5) 今後の展望

好乾性真菌アスペルギルスは、好湿性真菌に比べ塗布による影響が弱かった。しかし、長期の経気道曝露では、アトピー性皮膚炎様症状が増悪する傾向が認められた。今回、アスペルギルスのみについて検討したが、室内

で検出される好乾性真菌は、ユーロチウム、フレミアなど他にも存在する。これらの真菌の長期吸入がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響についても検討する必要がある。

本研究に於いて、好乾性真菌アスペルギルス抽出物を発症部位に塗布すると総IgE値は低下した。これは好湿性真菌の塗布においても同様の傾向が認められた。マスト細胞は、IgE抗体との結合部位を有し、IgE抗体の抗原結合部位にアレルゲンが結合することによって、脱顆粒を生じる。その結果、炎症が生じるのがI型アレルギーであるが、真菌塗布では、マスト細胞の脱顆粒が亢進されるにもかかわらず、IgE抗体産生は抑制される。このことから、真菌塗布では、IgE非依存的にマスト細胞の脱顆粒が生じると考えられる。アトピー性皮膚炎患者の中には、IgE値の上昇を認めないケースも見られる。これに関しては、IL-18と抗原存在下でアトピー性皮膚炎が発症することが実験的に確かめられており、アトピー性皮膚炎が典型的なI型アレルギー疾患ではないことが示されている。真菌塗布は、症状を増悪し、病理学的にも炎症細胞を活性化するのに、IgE抗体産生は抑制する。IgE値の上昇を認めないアトピー性皮膚炎患者の中に、真菌の曝露を受けることによってIgE値が低下している可能性も考えられる。一方、長期吸入曝露ではIgE抗体産生は増加する傾向を示した。このようにカビは曝露経路、期間に応じて異なる生体反応を示すことから、アトピー性皮膚炎への影響を明らかにするためには、カビがIgE産生を制御するメカニズムの解明が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

1. 定金香里、市瀬孝道、高野裕久 他. 「好乾性真菌アスペルギルス抽出物をアトピー性皮膚炎発症部位に塗布したときの影響」. 第52回大気環境学会年会. 平成23年9月15日, 長崎.
2. 定金香里、市瀬孝道、高野裕久 他. 「アスペルギルス反復投与がダニ抗原誘発性アトピー性皮膚炎マウスモデルに及ぼす影響」. 第81回日本衛生学会学術総会. 平成23年3月26日, 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

定金 香里 (SADAKANE KAORI)
大分県立看護科学大学・看護学部・助教
研究者番号：20322381