

平成 21 年 6 月 23 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590596

研究課題名（和文） カビの吸入と接触によるアトピー性皮膚炎増悪作用に関する研究

研究課題名（英文） Inhalation and contact of fungi enhance house dust mite-induced atopic dermatitis-like skin lesions 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：

カビに、アトピー性皮膚炎を悪化させる作用があるか動物実験を行って調べた。台所や風呂場に生えているススカビの抽出物を予め気道に注入したマウスでは、カビを気道に注入していないマウスよりも症状が悪化する傾向がみられた。またアトピー性皮膚炎の炎症部に、ススカビの抽出物を塗ったところ、著しく症状が悪化した。以上の実験結果より、炎症部位にカビが接触したり、予めカビを吸入した状態であったりすると、アトピー性皮膚炎が悪化する可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

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，アトピー性皮膚炎，増悪作用，カンジダ，ススカビ

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は、発症のメカニズムがまだ明らかになっていないことに加え、様々な環境要因が複雑に関与している。これがアトピー性皮膚炎治療を困難にしている原因であり、環境要因を明らかにすることは治療、症状軽減の一助となる。

カビはアレルギーの原因物質の一つであることが知られている。アスペルギルス肺症、夏型過敏性肺炎は、空中の真菌胞子を大量に吸入することにより発症する。アトピー性皮膚炎患者の住居のほとんどにカビ（真菌）が

検出されることから、アトピー性皮膚炎においてもカビが発症の原因物質である可能性が指摘されている。しかし、カビ誘発性アトピー性皮膚炎モデル動物は実験的に未だ確立されておらず、疫学的調査結果との齟齬が生じている。アトピー性皮膚炎患者の皮膚から数種の真菌が検出されていること、アトピー性皮膚炎の治療に抗真菌剤投与が有効であることから、アトピー性皮膚炎に真菌が何らかの影響を及ぼしていることは明らかである。以前、申請者の研究グループは、アレルギー性喘息モデルマウスに、真菌構成成分

のβ-グルカンを経口投与した結果、好酸球性気道炎症が増悪することを明らかにした。この結果は、真菌がアレルギー性喘息の増悪因子であることを示唆している。アトピー性皮膚炎は、アレルギー性喘息と同じI型アレルギーであることから、アトピー性皮膚炎においても真菌が、症状を増悪する可能性が高いと考えられた。よって、本研究では、ダニ抗原誘発性アトピー性皮膚炎モデルマウスにカビを曝露し、その影響を調べることとした。実験に用いるカビは、ススカビとカンジダとした。ススカビ（アルテルナリア）、カンジダは共に台所や風呂場など湿った場所を好む室内浮遊真菌である。これらはごく一般的な家庭で検出されるカビであることから、ヒトとの接触機会が多いと考えた。

2. 研究の目的

今回、実験に用いたカビは室内浮遊真菌であることから、ヒトへ影響を及ぼすのは、呼吸器から吸入したケースと皮膚に接触したケースであると考えた。

(1) ススカビ、カンジダの経気道的曝露によるアトピー性皮膚炎への影響

ススカビやカンジダは、胞子を作り空中を漂う。これらを鼻や口から吸入することによって体内に取り込まれる。このようにして生体に曝露されたススカビ、カンジダがアトピー性皮膚炎の発症および症状に影響を及ぼしている可能性が懸念される。そこで、本研究では、予めカビを経気道的に吸入したマウスにアトピー性皮膚炎を発症させ、発症にどのような影響があらわれるか、また症状に増悪がみられるか検討することを目的とした。

(2) ススカビ、カンジダの経皮的曝露によるアトピー性皮膚炎への影響

本研究では、カビが皮膚に接触した時、アトピー性皮膚炎にどのような影響があらわれるか、検討することを目的とした。アトピー性皮膚炎患者は、遺伝的に皮膚バリア機能が脆弱であることがわかっている。また最近の研究で、病巣部に黄色ブドウ球菌のコロニーが検出されることが報告され、抗真菌薬の処理により症状が軽減することがわかっている。このことから、アトピー性皮膚炎は、皮膚に接触したアレルゲンや刺激物質に対し、これを排除する機能が弱く、正常人に対し、その影響を受けやすいことが考えられる。従って、カビも皮膚バリアが破綻した部位から皮下に侵入し、何らかの影響を及ぼすことが懸念された。そこで、マウスにアトピー性皮膚炎を発症させ、その病巣部に繰り返し、ススカビまたはカンジダを塗布することにより、カビのアトピー性皮膚炎への影響を調べた。

3. 研究の方法

(1) ススカビ、カンジダの経気道的曝露によるアトピー性皮膚炎への影響

カビを吸入した時、アトピー性皮膚炎の発症や症状にどのような影響がみられるか調べるために、ススカビ（アルテルナリア）、カンジダの抽出物をマウスの気管内にプラスチックチューブを用いて投与（気管内投与）し、その後、アトピー性皮膚炎をマウスの耳介背側部に発症させた。

実験には 6 週齢の NC/Nga 系雄マウス (SPF) を用いた。一群 10~12 匹として 1) 対照群, 2) アルテルナリア群, 3) カンジダ群, 4) ダニ抗原群, 5) ダニ抗原+アルテルナリア群, 6) ダニ抗原+カンジダ群の 6 群に分けた。動物モデル作成のスケジュールを図 1 に示す。アルテルナリアの抽出物 (0.5 μg/animal) を生理食塩水に溶解し、週に 1 回、アルテルナリア群、ダニ抗原+アルテルナリア群のマウスに気管内投与した。カンジダも同様に、カンジダ群、ダニ抗原+カンジダ群に気管内投与した。対照群とダニ抗原群には生理食塩水を気管内投与した。真菌投与 3 回目からアトピー性皮膚炎の誘発処理を行った。ダニ抗原 (5 μg/animal) を、ダニ抗原群、ダニ抗原+アルテルナリア群、ダニ抗原+カンジダ群の 3 群に、2 日毎に計 8 回、マウス右耳介腹側に皮下注射した。他の 3 群には、生理食塩水を同様に皮下注射した。抗原を皮下注射した 24 時間後に皮膚症状を観察し、スコア化した。真菌投与を 5 回行った後、マウスを屠殺し、血清、耳介組織、耳介組織上清を抗体量測定、病理標本作製、サイトカイン・ケモカイン測定に供した。カビを気管内投与したアトピー性皮膚炎モデルマウスとカビを投与していないアトピー性皮膚炎モデルマウスの症状、病態を比較検討した。

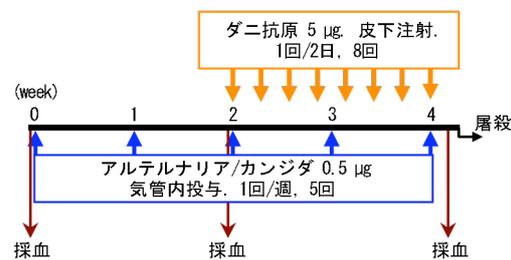


図 1. 実験スケジュール

(2) ススカビ、カンジダの経皮的曝露によるアトピー性皮膚炎への影響

カビがアトピー性皮膚炎炎症部位に接触したときの影響を調べるために、アトピー性皮膚炎を発症させたマウスの耳介背側部にススカビ（アルテルナリア）、カンジダの抽出物を塗布した。

実験には 6 週齢の NC/Nga 系雄マウス (SPF) を用い、1) 対照群, 2) アルテルナ

リア群, 3) カンジダ群, 4) ダニ抗原群, 5) ダニ抗原+アルテルナリア群, 6) ダニ抗原+カンジダ群の6群に分けた。動物モデル作成のスケジュールを図2に示す。ダニ抗原(5 $\mu\text{g}/\text{animal}$)を, ダニ抗原群, ダニ抗原+アルテルナリア群, ダニ抗原+カンジダ群の3群に, 2~3日毎に計8回, マウス右耳介腹側に皮下注射し, アトピー性皮膚炎を誘発した。病態が完成した後は, 症状維持のため週に2~3回, ダニ抗原の投与を行った。他の3群には, 生理食塩水を同様に皮下注射した。ダニ抗原の初回感作後, 21日目からカビの塗布を開始した。アルテルナリアの抽出物を生理食塩水に溶解し, 週に2回, アルテルナリア群, ダニ抗原+アルテルナリア群のマウス耳介の炎症発症部位に塗布した。カンジダも同様に, カンジダ群, ダニ抗原+カンジダ群の耳介に塗布した。塗布量は5 $\mu\text{g}/25 \mu\text{l}/\text{animal}$ とした。対照群とダニ抗原群には生理食塩水を同様に塗布した。最終塗布の翌日にマウスを屠殺した。(1)の実験と同じ項目で, アトピー性皮膚炎への影響を評価した。さらに血中の炎症惹起物質, システイニルロイコトリエンとプロスタグランジン E₂ メタボライトの測定を行った。

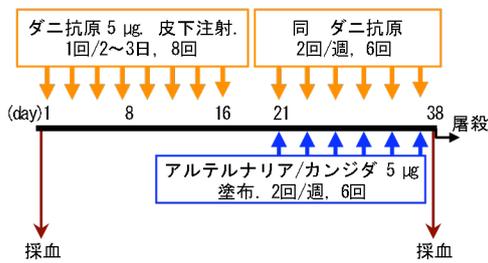


図2. 実験スケジュール

4. 研究成果

(1) スカビ, カンジダの経気道的曝露によるアトピー性皮膚炎への影響

①皮膚症状

図3に皮膚症状の経時変化を示す。ダニ抗原を投与した3群は対照群よりも有意なスコア上昇がみられた。ダニ抗原+アルテルナリア群は, 抗原皮下注射3回目以降, 統計的に有意な差は認めなかったが, ダニ抗原群よりも高い値を示した。ダニ抗原+カンジダ群は, ダニ抗原との違いはみられなかったが, 屠殺時にはダニ抗原+アルテルナリア群とほぼ同じスコアを示した。なお, カビの気管内投与を行い, アトピー性皮膚炎の誘発処理を行わなかったアルテルナリア群, カンジダ群には皮膚炎の発症は見られなかった。図4に屠殺直前時のダニ抗原+アルテルナリア群, ダニ抗原群, アルテルナリア群の耳介症状を一例ずつ示す。アルテルナリアを予め気管内投与したマウスでは, 若干であるがアトピー性皮膚炎様症状が悪化する傾向がみられた。カン

ジダはアルテルナリアと比較し, その影響は弱かった。

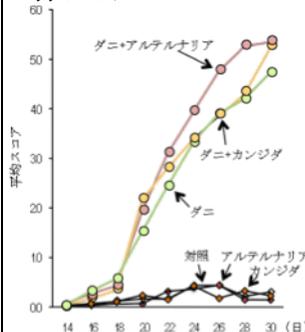


図3. 皮膚症状の変化



図4. マウス耳介像

②血中抗体産生の変化

屠殺時に心採血により得た血清中のダニ抗原特異的 IgG1 抗体価を測定した。有意差は認められなかったが, ダニ抗原+アルテルナリア群でやや高い値を示した(図5)。総 IgE 量の測定には, カビ抽出物投与前およびダニ抗原皮下注射前にマウスの眼窩静脈叢から採血した血清と, 屠殺時に心採血した血清を用いた。図6に, 各時期における総 IgE 濃度を示す。いずれの群も, 普通環境下での飼育期間が長くなるに従い抗体量が上昇していた。ダニ抗原群は, ダニ抗原皮下注射後, 著しく抗体産生量が増加した。しかしアルテルナリア, カンジダ抽出物を気管内投与し, アトピー性皮膚炎を誘発した2群では, IgE 抗体産生の増加率が他群よりも低かった。以上の結果から, アルテルナリア, カンジダを予め, 気管内投与したマウスでは抗原誘発性の抗体産生が抑制されることがわかった。

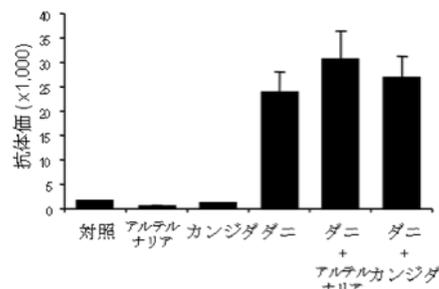


図5. 抗原特異的 IgG1 抗体価

③組織中の炎症細胞浸潤

病理標本を作製し, 炎症発症部位のマスト細胞数をカウントした。ダニ抗原+カンジダ群がダニ抗原群に比してやや増加傾向を示したが, スカビの気管内投与の影響はみられなかった(図7)。

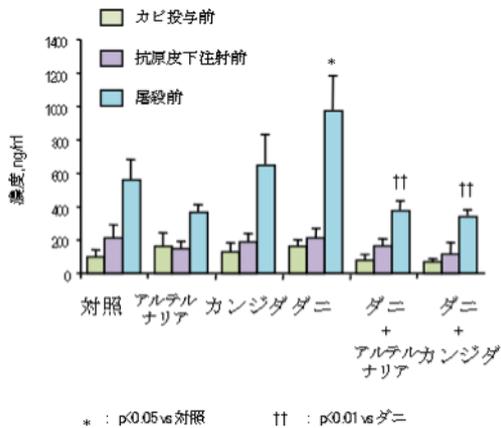


図 6. 総 IgE 濃度

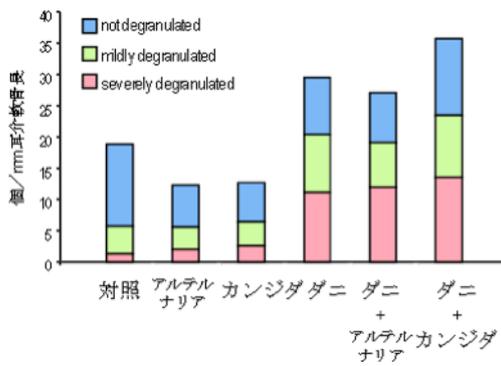


図 7. 皮下組織中のマスト細胞数

④組織中サイトカイン産生の変化

組織上清中の炎症性サイトカイン・ケモカインを ELISA 法にて測定した。結果を表 1 に示す。Th1 型のサイトカイン、IFN- γ はダニ抗原を投与すると産生が有意に低下した。しかし、ススカビの気管内投与を併用すると産生が有意に増加し、カンジダでも産生の増加がみられた。IL-18 ではダニ抗原+カンジダ群で産生が増加する傾向がみられた。Th2 型のサイトカイン IL-4, IL-13 にはカビの気管内投与の影響は見られなかった。炎症細胞遊走活性因子、eotaxin, KC, MCP-3 もカビの気管内投与の影響はみられなかった。IL-5, IL-3 は検出限界以下であった。

表 1. 組織中サイトカイン量

	IFN- γ	IL-18	IL-4
対照	92.4 \pm 17.2	461.8 \pm 34.1	9.1 \pm 0.6
アルテル	80.0 \pm 3.4	675.5 \pm 31.1	10.0 \pm 0.8
カンジダ	58.4 \pm 2.8	509.3 \pm 42.6	10.5 \pm 0.4
ダニ	14.2 \pm 1.7 ^{a,b}	1388.8 \pm 187.5 ^{a,b}	6.1 \pm 0.9
ダニ+アルテル	37.4 \pm 3.3 ^{a,b,d}	943.2 \pm 87.9 ^a	5.9 \pm 0.4
ダニ+カンジダ	42.0 \pm 5.4	1279.4 \pm 143.3	5.8 \pm 0.7

	IL-13	eotaxin	KC	MCP-3
	17.9 \pm 1.1	80.4 \pm 15.4	33.8 \pm 2.2	22.4 \pm 1.7
	17.6 \pm 0.3	40.0 \pm 2.7	35.7 \pm 3.3	23.9 \pm 0.4
	21.4 \pm 0.9	49.3 \pm 2.4	44.1 \pm 3.5	25.0 \pm 0.9
	21.7 \pm 2.6	123.2 \pm 26.5	26.6 \pm 2.8	14.2 \pm 1.7 ^{a,b,c}
	21.0 \pm 2.0	132.5 \pm 28.8	24.9 \pm 1.5 ^c	14.8 \pm 1.2 ^{a,b}
	20.3 \pm 0.9	100.0 \pm 20.2	28.3 \pm 3.2 ^c	15.1 \pm 1.3 ^{a,c}

測定値を耳介総タンパク量で補正した値で示す(pg/g).

平均値 \pm 標準誤差

a: p<0.05 vs 対照, b: p<0.05 vs アルテルナリア,

c: p<0.05 vs カンジダ, d: p<0.05 vs ダニ抗原

⑤まとめ

アルテルナリア、カンジダの気管内投与は、アトピー性皮膚炎症状の弱い増悪傾向、ダニ抗原特異的 IgG1 抗体の若干の増加傾向を誘導することがわかった。一方、総 IgE 抗体産生の増強は見られないことから、皮膚症状の増悪には、IgE 抗体は関与しないことが示された。炎症局所における炎症細胞浸潤、Th2 サイトカイン産生には影響はみられなかった。通常、症状が増悪した時、炎症局所においては炎症細胞浸潤が亢進し、Th2 サイトカイン、炎症細胞遊走活性因子の産生増強、または Th1 サイトカイン産生の低下がみられる。今回、若干の症状増悪および IgG1 抗体産生の増加がみられたものの、これらのパラメーターにそのような変化はみられなかった。一方、カビを気管内投与することにより、ダニ抗原誘発性の Th2 反応が抑制される傾向がみられた。この結果はカビの気管内投与により、Th2 反応が抑制されるにもかかわらず、何らかの別のメカニズムがアトピー性皮膚炎様症状を維持していることを示唆している。

(2) ススカビ、カンジダの経皮的曝露によるアトピー性皮膚炎への影響

①皮膚症状

図 8 に皮膚症状の経時変化を示す。アルテルナリア、カンジダを単独塗布した群では、アトピー性皮膚炎様症状はみられなかった。ダニ抗原を投与した全ての群で、実験最終日まで対照群に対し有意なスコア上昇を認めた。ダニ抗原+アルテルナリア群はダニ抗原群と比し、高いスコアを示した。ダニ抗原+カンジダ群は、アルテルナリア群よりもスコアの上昇が遅れたが、ダニ抗原群よりもスコアが高い傾向を示した。図 9 に、屠殺直前のマウスの耳介像の一例を示す。

②血中抗体産生の変化

図 10 にダニ抗原特異的 IgG1 抗体価と血清中総 IgE 抗体濃度平均増加率を示す。カビ単独塗布群の IgG1 抗体価は対照群と同様の値であった。ダニを投与した 3 群は対照に対し有意に増加した。ダニ抗原+アルテルナリア

群はダニ抗原群に比し、有意に高値を認め、ダニ抗原+カンジダ群も高値を示した。総IgE抗体濃度増加率において、ダニ抗原群は、対照群、アルテルナリア群、カンジダ群に対し有意な産生増加が認められた。一方、ダニ抗原+アルテルナリア群は、ダニ抗原群に対しては有意に低値を示した。ダニ抗原+カンジダ群もダニ抗原群に対して有意に低値を示した。

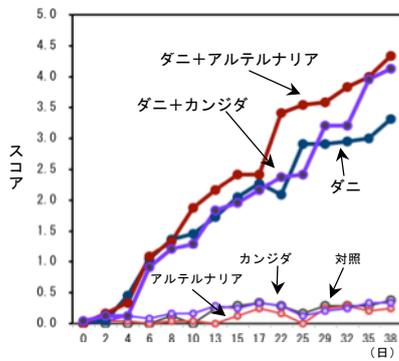


図 8. 皮膚症状の変化



図 9. マウス耳介像

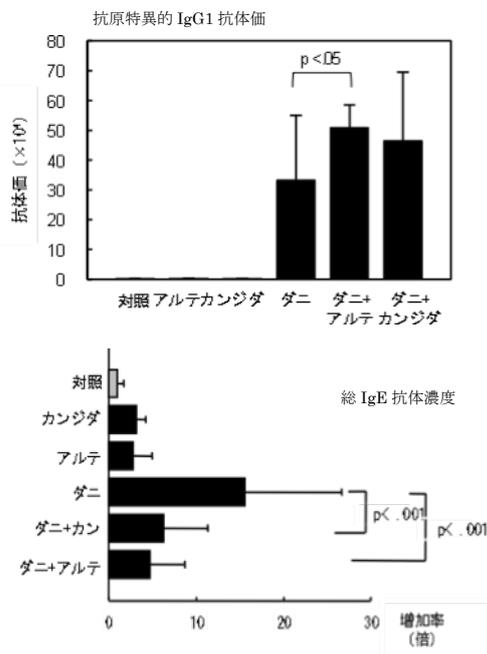


図 10. 抗体産生

③組織中の炎症細胞浸潤

皮下組織中の好酸球数とマスト細胞数を図 11 に示した。ダニ抗原を投与した 3 群は、対照に対し、有意な好酸球数の増加を認めた。さらに、ダニ抗原+アルテルナリア群、ダニ抗原+カンジダ群は、それぞれダニ抗原群と比較し、有意な好酸球数増加を認めた。一方、マスト細胞数については、ダニ抗原+アルテルナリア群、ダニ抗原+カンジダ群いずれもダニ抗原群との差は認められなかった。

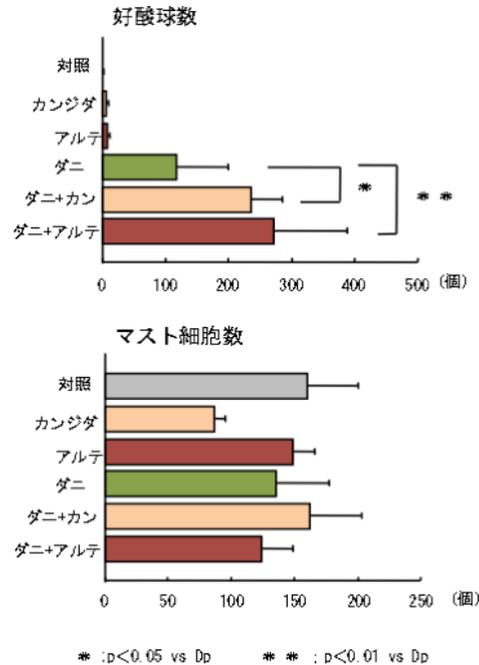


図 11. 皮下組織中炎症細胞数

④組織中サイトカイン産生の変化

組織上清中の炎症性サイトカイン・ケモカイン測定結果を表 2 に示す。Th1 型のサイトカイン、IFN- γ と TNF- α はダニ抗原を投与すると産生が有意に低下し、カンジダ塗布を併用した群ではダニ抗原群よりも有意に低下した。IL-18 ではダニ抗原群では産生が増加するのに対し、カビ塗布を併用した群では産生がダニ抗原群に比し、有意に産生が低下した。Th2 型のサイトカイン、IL-13 はダニ抗原+アルテルナリア群でダニ抗原群に比し、有意に産生が増加した。ダニ抗原+カンジダ群では有意な差は認められなかったものの増加する傾向がみられた。炎症細胞遊走活性因子、eotaxin はダニ抗原+アルテルナリア群で、ダニ抗原群に比し産生が増加する傾向がみられたが統計的に有意な差はなかった。IL-4、IL-5 は検出限界以下であった。

⑤血中炎症惹起物質の変化

屠殺時に心採血により採取した血清中の炎症惹起物質、システイニルロイコトリエンとプロスタグランジン E₂ メタボライトを ELISA 法にて測定した。システイニルロイコトリエンとプロスタグランジン E₂ メタボラ

イもカビ塗布による影響はみられなかった

表 2. 組織中サイトカイン量

	IFN- γ	TNF- α	IL-18	IL-13	eotaxin
対照	1260.5 \pm 111.1	494.7 \pm 49.5	651.7 \pm 98.1	19.9 \pm 0.9	23.8 \pm 1.4
アルテル	1273.2 \pm 170.5	522.5 \pm 31.9	768.6 \pm 35.2	20.3 \pm 1.0	31.8 \pm 5.4
カンジダ	2045.4 \pm 221.3	736.7 \pm 33.7	505.1 \pm 24.3 ^b	22.2 \pm 1.7	22.6 \pm 2.4
ダニ	713.3 \pm 69.1 ^c	391.8 \pm 20.3	1865.0 \pm 116.3 ^{a,b}	27.5 \pm 1.0 ^{a,b}	53.5 \pm 4.5 ^a
ダニ+アル	662.6 \pm 61.3 ^a	408.4 \pm 42.2	895.0 \pm 131.4 ^d	34.7 \pm 1.9 ^{b,d}	109.9 \pm 32.5 ^a
ダニ+カン	422.7 \pm 43.0 ^{a,c,d}	261.3 \pm 10.2 ^{a,c,d}	678.3 \pm 80.7 ^d	32.4 \pm 2.7 ^c	59.0 \pm 4.8 ^a

測定値を耳介総タンパク量で補正した値で示す。
平均値 \pm 標準誤差

a: p<0.05 vs 対照, b: p<0.05 vs アルテルナリア,
c: p<0.05 vs カンジダ, d: p<0.05 vs ダニ抗原

⑥まとめ

アトピー性皮膚炎発症部位にアルテルナリア、カンジダ抽出物を塗布することにより、アトピー性皮膚炎様症状が増悪することがわかった。さらにダニ抗原特異的 IgG1 抗体産生と好酸球浸潤の増強をもたらすことがわかった。IgG1 抗体は好酸球の脱顆粒、それに続く組織傷害を引き起こすことから、アルテルナリア、カンジダ塗布による症状増悪には、IgG1 と好酸球によるアレルギー反応の亢進が関与していると考えられた。

(3) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究は、カビによるアトピー性皮膚炎増悪作用を、モデル動物を用いた実験的研究によって初めて明らかにした。アトピー性皮膚炎発症部位に、ススカビ(アルテルナリア)、カンジダが接触するとアトピー性皮膚炎を増悪することがわかった。また、日常的にこれらの真菌を吸引することも、症状を増悪する可能性があると考えられる。疫学調査ではカビとアトピー性皮膚炎罹患率との間に正の相関があるにも関わらず、実験的にはカビがアトピー性皮膚炎誘発物質であることは証明されていなかった。今回、カビにアトピー性皮膚炎増悪作用があることが明らかとなったことから、やはりカビの存在は、アトピー性皮膚炎の罹患率に影響を及ぼしていると考えられる。

ススカビ、カンジダ等、浮遊真菌の曝露が症状悪化の原因になる可能性があり、また薬剤の効果を妨げている恐れもある。よって、今後、アトピー性皮膚炎患者に対しカビ除去に関する生活指導をする必要があると考えられる。

(4) 今後の展望

ススカビ、カンジダを予め気管内に投与したことにより、アトピー性皮膚炎様症状が若

干増悪した。カビの気管内投与により、抗原特異的 IgG1 抗体産生が若干、増加したものの局所における炎症性サイトカイン、ケモカイン産生にあまり影響はみられなかった。今回、カビの投与期間は一ヶ月で、カビ吸引の影響は、局所的にはまだ現れていなかった可能性もある。従って、さらに長期間の実験を行い、慢性的なカビ吸引の影響を調べる必要がある。

ススカビ、カンジダをアトピー性皮膚炎発症部位に塗布することによりアトピー性皮膚炎様症状が増悪した。通常、アトピー性皮膚炎発症時にはマスト細胞数の増加や IgE 抗体産生の増強がみられるが、今回の実験ではそれらは、変化がみられなかったか、あるいは抑制された。一方、ダニ抗原特異的 IgG1 抗体産生や好酸球数が増強した。このことは、カビ塗布によるアトピー性皮膚炎様症状の増悪が好酸球性炎症であることを示唆している。今後、この好酸球性炎症に関与する炎症性サイトカインを明らかにし、より詳細な増悪メカニズムを明らかにする必要がある。

今回、用いたススカビ、カンジダは風呂場や台所など、湿った場所によく生育する好湿性真菌である。一方、好乾性のカビは湿度 60%程度場所によく生育する。寝室や居間などのタタミ、カーペットが生育環境となり、好乾性のカビに曝される確率は、好湿性真菌よりも高く、また時間も長い。従って、ヒトの健康への影響がさらに懸念される。また、好乾性真菌の生育条件は、ダニとよく似ていることから、好乾性真菌とダニと共曝露されている可能性も高い。今後、好乾性真菌のアトピー性皮膚炎への影響についても検討する。

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 1 件)

定金香里、市瀬孝道、高野裕久 他。「真菌吸入によるアトピー性皮膚炎モデルマウスへの影響」。大気環境学会九州支部第 9 回研究発表会。平成 21 年 1 月 23 日。福岡市。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

定金 香里

大分県立看護科学大学・看護学部・助教
研究者番号：20322381