

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590733

研究課題名(和文) TRPV-1 活性に対する気道分泌反応からみた化学物質過敏症の病態解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of chemical sensitivity as seen from the respiratory secretions response to TRPV-1 activity

研究代表者

色川 俊也 (IROKAWA, Toshiya)

東北大学・環境・安全推進センター・准教授

研究者番号：70375179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：「化学物質過敏症」の病因を解明する目的で、気道の先天的生体防御反応である気道分泌との関連から検討を行った。気道での曝露刺激感受性部位と推定されるTRPV-1受容体を介した気道分泌物に注目して、可視的定量法を用いMCS患者の気道分泌による防御機構を検討した。我々の実験結果から、TRPV1のアゴニストであるカプサイシン(10 $\mu$ M)の粘膜側添加は、軽度の分泌更新をもたらすこと、また、粘膜面をホルマリン(20ppm30-60分)に暴露した気道では分泌が一時的に亢進していることが示された。これらのデータは、MCS患者の気道分泌が一時的に亢進している可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of elucidate the pathogenesis of "chemical sensitivity", we have examined it by the relationship to the respiratory secretions that is innate biological defense reaction of the respiratory tract. We have focused on respiratory secretions through the noxious stimuli-sensitive receptor TRPV-1(transient receptor potential, vanilloid subfamily member 1), which is estimated to be exposed-stimulation sensitive site in the respiratory tract and used optical methods to measure the airway secretion for investigating the defense mechanism of MCS patients. Our consequence would be explained that the addition of capsaicin (10 $\mu$ M), which is the agonist of TRPV1, to the mucosal side mild increased airway secretion and it is elevated temporarily in the airway mucosa that is exposed formalin (20ppm) for 30-60min. These data suggest the possibility of airway secretion is elevated temporarily in MCS patients.

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：産業中毒 化学物質過敏症の生体防御機構 TRPV-1

## 1. 研究開始当初の背景

「化学物質過敏症」(以下:Multiple Chemical Sensitivity = MCS)の患者数は、02年の旧厚生省の調査では日本人の約0.7%と推定されている(平成14年度厚生省報告書、pp139-146)“シックハウス症候群”と病態・疾患概念を明確に区別することは困難であり、シックハウス症候群は、建物内環境に存在する化学物質に起因するMCSと考えられる。TRPV-1は、気道では上皮下に存在するカプサイシン、酸、熱などの侵害刺激感受性の受容体で、活性化によりC線維末端からSubstance Pなどの神経ペプチド放出を促すことが知られている。TRPV-1(transient receptor potential vanilloid 1)は気道の中枢から末梢の広範囲に分布しているが、MCSにおける特異的な役割、他の機序との相互作用などについて未だ明らかになっていなかった。これまでにMCSに関連したTRPV-1作用について次のような性質が報告されている。

(1)多種の化学物質がTRPV-1を刺激する。(2)TRPV-1の過剰刺激は末梢気道の化学物質感受性と関係する。(3)MCS患者は、capsaicinなどのTRPV-1特異的agonistに高感受性である。(4)TRPV-1活性のあるsubstance Pのレベルが患者気道では上昇している。(5)TRPV-1活性化により気道の一酸化窒素(NO)産生やNMDA受容体活性が上昇する。(6)TRPV-1活性により神経原性炎症が惹起される。(7)TRPV-1が多数のagonistによる活性化を受けると、TRPV-1活性のdown-regulationが起こる。

TRPV-1は化学物質の主たる受容体で、気道の炎症・過敏反応で中心的な役割を果たしていることが示唆される。一方、気道では、気道表面の分泌液が外界からの異物(化学物質)、細菌、ウイルスなどの侵入に対する防御機構の重要な一端を担っており、気道分泌が極端に低下するような病態では、気道のク

リアランス低下が気道感染を誘発し、その増悪がCOPDなどの慢性呼吸器疾患の致死的要因となっている。MCS患者気道で上昇しているsubstance Pは、TRPV-1活性があるばかりでなく、気道粘膜下腺からの粘液分泌を亢進すること(Choi JY, J Clin Invest. 2009;119(5):1189-200)が知られており、又、気道のNOの上昇(Nagaki M, Respir Physiol. 1995;102(1):89-95.)や神経原性炎症の進展も気道粘膜下腺分泌亢進の要因となる事が知られている。この様に、気道分泌は、MCSにおいてもその病態の形成/進展に大きな影響を及ぼしている可能性が示唆されが、これまでの研究では、TRPV-1の活性化と気道分泌の主因である気道粘膜下腺からの粘液分泌に関する検討は全くなされていなかった。

## 2. 研究の目的

「化学物質過敏症」の病態は未だ明確になっていない。気道上皮下に分布する侵害刺激感受性受容体であるTRPV-1の活性化によるC線維末端からの神経ペプチド放出は、神経原性気道炎症を誘発し、化学物質過敏症の病態形成に関与していることが知られているが、TRPV-1の活性化が気道生態防御機能である、気道分泌に及ぼす影響についてはこれまで報告されていない。本研究では、TRPV-1活性が気道分泌に及ぼす影響を明らかにし、化学物質過敏症の病態解明の一助とすることを目的とした。

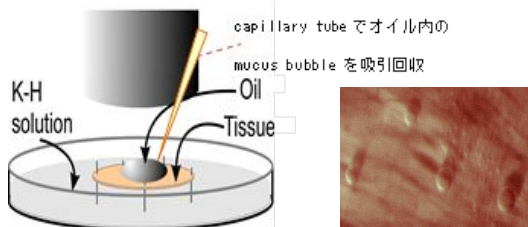
## 3. 研究の方法

### (1) 動物実験(ブタ気道)を用いた気道分泌定量実験系の確立と基礎データ

ヒトの気道と同様に気道粘膜下腺の発達したブタ気管を用いて気道粘膜下腺個々の分泌管開口部からの分泌量をOptical Methodを用いて定量同定する。

ブタの気管は、95%O<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub>ガスにて飽和させたKrebs-Ringer-bicarbonate buffer(KRB)溶液中にて約2cm程度に分割し、膜様部より気管を展開し、更に漿膜側より軟骨を剥離

する。この組織片を、粘膜側を表としてシリコンでコーティングした 35mm ディッシュにピンで留め展開し、綿棒で表面の汚れをふき取った後、粘膜側に mineral oil (Sigma) を広げ、漿膜側を KRB で満たす。



### 気道粘膜下腺 (Single gland) からの無刺激状態、TRPV-1 agonist (capsaicin) 投与下での分泌の定量的計測

気管組織を展開した 35mm ディッシュを加熱プラットフォームにて 37℃ に保ち 95%O<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub> ガス投与下に実験を行う。ディッシュの真上にデジタルカメラを設置し 5 分間隔で粘膜側表面の接写写真を高画質モードで撮影する。まず、20~30 分間、無刺激 (定常) 状態での分泌を計測した後、KRB 中 (気管漿膜側) に capsaicin を加え、TRPV-1 活性化が気道分泌に及ぼす効果を定量する。写真の様に組織上に展開した mineral oil 中に分泌された粘液は、球状を呈しており、ハードディスクに保存したイメージの個々の粘液 bubble の体積をイメージソフト YCU Viewer にて計測し単位時間当りの体積変化率 (分泌率 = secretion rate (S.R.)) を計算する。

#### Substance P による気道分泌の評価

TRPV-1 活性のある substance P のレベルが患者気道では上昇していることが知られている。そこで、粘膜側に Substance P を前投与し、MCS 患者気道の状態を模倣して、TRPV-1 活性化により産生される気道分泌の定量を行い、MCS 患者の気道における分泌の状態を模倣し、その結果と比較/検討を行う。

#### (2) MCS を模倣した実験系の作成

##### MCS 模倣モデルの作成

より生体の化学物質曝露状況に近い状態を再現し、MCS 患者の気道病態の評価を行う

目的で、展開したブタ気管の粘膜側を一定の濃度に調整した化学物質に曝露し、気道の化学物質曝露状態を再現する。

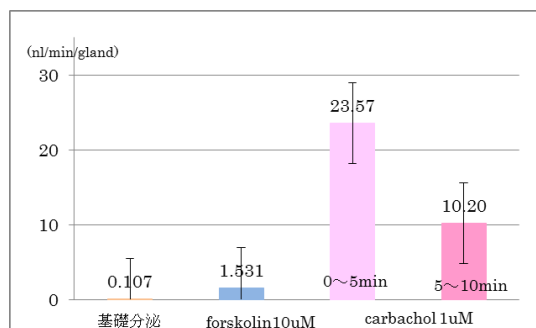
#### 化学物質曝露気道を用いた気道分泌評価

で化学物質に曝露した気管を用いて optical method 法による分泌の評価を行う。ここでは、定常状態での観察後、KRB 溶液中に細胞内 cAMP 上昇を来たして気道の分泌亢進をもたらす forskolin、更に、最大の分泌刺激をもたらすコリン作動性 agonist・carbachol (10 μM) などに加え、S.R. を測定し正常気管との差異を検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 動物実験 (ブタ気道) を用いた気道分泌定量実験系の確立と基礎データ

平成 23 年度は、東日本大震災で実験室が被害を受け、予定通りには進まなかったが、実験系の確立と基礎データを集約した。正常ブタ気道分泌下腺からの定常状態 (無刺激状態) での基礎分泌量は、 $0.11 \pm 0.33$  (nl/min/gland) (n=4 15glands) 細胞内 cAMP 濃度上昇により分泌を亢進する Forskolin 10 μM の漿膜側投与刺激による分泌量は  $1.53 \pm 0.61$  (nl/min/gland) (n=4 14glands)、又、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させ分泌を亢進する Carbachol 1 μM の漿膜側投与刺激による分泌量は、急速な分泌亢進を来す、投与直後の 5 分間で  $23.6 \pm 9.9$  (nl/min/gland) (n=4 15glands)、緩やかに持続する分泌亢進を来す 5~10 分間で  $10.2 \pm 4.3$  (nl/min/gland) (n=4 15glands) であった。



ブタ粘膜下腺分泌の基礎データ

平成 24 年度は、TRPV-1agonist である、capsaicin 100  $\mu$ M の粘膜側投与刺激により分泌量は、 $0.47 \pm 0.18$ (nl/min/gland) (n=28glands)であった。当初はこれらの結果から、TRPV-1 刺激により軽度ではあるが気道分泌が亢進している傾向が示されていたが、その後の実験で、組織の基礎分泌量の大きい、(0.5~0.9ng/min/gland) 物もいくつか経験するようになり、結果的に capsaicin の効果については未だ定かではない。基礎分泌の比較的大きな組織での実験を重ねることにより、組織の variability の問題か、capsaicin の効果なのかを検証して行きたい。

次に、我々は、気道組織の粘膜下腺開口部から分泌された分泌液に含まれる、抗炎症性物質(ライソザイム、ラクトフェリン)や抗炎症性サイトカイン(IL-6 など)の存在を確認しようと計測を試みたが、一回の実験で回収できる分泌液が多くても 2.0  $\mu$ l 程度であること、可視的定量評価のために加えているミネラルオイルと分泌液の分離が困難である事などから、未だ ELISA 方による測定が出来ない状態である。

#### SubstanceP による気道分泌の評価

1 度だけの実験であるが、SubstanceP 10  $\mu$ M の粘膜側投与刺激により分泌量は、 $0.21 \pm 0.19$ (nl/min/gland) (n=15glands)であった。顕著な変化ではないために、今後実験を重ねてデータを集積し検討する必要がある。SubstanceP の濃度依存性についても検討する必要がある。

#### (2) MCS を模倣した実験系の作成

##### MCS 模倣モデルの作成

平成 25 年度は、化学物質過敏症を模倣した状態での気道分泌反応を観察することを目的とした。当初の実験計画では、輪状の気管粘膜側を一定濃度のホルムアルデヒドで環流し、MCS 曝露状態を模倣する予定であったが、同時に気管漿膜側をクレブス液で環流する 2 重構造の環流装置の作成が困難であっ

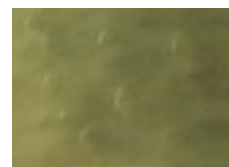
たため、1.2L の容積を持つ容器内に、10%ホルマリン溶液 0.2ml を滴下し、およそ 15~20ppm の容器内環境を作った。

容器内のホルムアルデヒド濃度は、個人曝露サンプル用のパッシブドジチューブを用いて測定した。その容器内に、クレブス液状に、粘膜側を上に向け 35mm ディッシュに展開した気管を 30 分、または 60 分留置し、その後、定常状態(無刺激状態)の分泌やフォルスコリンやカルバコールに対する分泌反応を正常気道のものと比較した。

#### 化学物質曝露気道を用いた気道分泌の評価



曝露無し



30 分曝露



60 分曝露

上記写真のようにホルムアルデヒドに曝露した粘膜面は、実験開始時に既に分泌が更新した状態にあった。また、その量は、30 分曝露時よりも 60 分曝露時の方が顕著であった。実験開始時に認められた分泌液粒子の体積平均は、曝露無しで  $0.24 \pm 0.05$ (nl) (7glands)、30 分ホルマリン曝露で、 $5.5 \pm 0.2$ (nl) (5glands)、60 分ホルマリン曝露で  $1.6 \pm 0.2$ (nl) (10glands)の結果であった。

実験開始後、20 分間の無刺激状態、20 分間の Forskolin 刺激状態、5 分間の Carbachol 刺激状態での単位時間あたりの分泌量 (Secretion rate) は、曝露無し状態では carbachol 刺激時以外、殆ど認められなかったのに対して、以下の様な結果であった。

曝露無し : 変化無, 変化無,  $5.05 \pm 2.03$   
 30 分曝露 :  $0.49 \pm 0.25$ ,  $3.20 \pm 0.64$ ,  $6.47 \pm$

2.16、60分曝露：0.16±0.07, 2.69±0.56, 3.47±1.39 (各々n=2、5~11glands 基礎分泌, Fsk10uM 刺激, Carba1uM 刺激の順に記載) 以上の結果からは、実験開始時の粘膜表面での分泌状態、基礎分泌量、フォルスコリンやカルバコールに対する反応ともにホルマリオン30分曝露状態がもっとも更新していることが示唆された。

ホルムアルデヒドによる気道粘膜曝露によって、気道の分泌は亢進状態となることが判明したが、今後は、その機序(反応を媒介するメディエータは何か? 30分曝露がピークとなっているのは、組織ダメージによる影響か、単に、この実験系では分泌物が枯渇してしまっただけか? など)を解明し、組織学的検索や分泌物回収物の質的分析を行うなど、更に知見を深めて行き、結果を日本産業衛生学会や日本呼吸器学会などの場で公表したいと考えている。

#### 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)

[雑誌論文](計 11 件)

1. Relationship between sleep bruxism and sleep respiratory events in patients with obstructive sleep apnea syndrome.

Hosoya H, Kitaura H, Hashimoto T, Ito M, Kinbara M, Geguchi T, Irokawa T, Ohisa N, Ogawa H, Takano-Yamamoto T

Sleep Breath. 2014 Feb 14.

DOI:10.1007/s11325-014-0953-5, 査読有

2. 閉塞型睡眠時無呼吸低呼吸症候群の重症化の性差

大久典子, 小川浩正, 色川俊也, 黒澤一

医学検査, 62巻6号, 666-672(2013), DOI 無, 査読有

3. 肺年齢による末梢気道障害の予測

大久典子, 小川浩正, 高野美菜、長尾愛子、色川俊也, 黒澤一、吉田克己

日本呼吸ケア・リハビリテーション学会誌, 23

巻1号, 82-89(2013), DOI 無, 査読有

4. 東日本大震災被災地における汚泥(ヘドロ)の分析結果に基づく被災地特有呼吸器疾患の診断と予防対策

色川俊也、小川浩正、矢内勝、黒澤一

大和証券ヘルス財団研究業績集 36巻 167-171(2013) DOI 無, 査読無

5. Bacterial Hazards of Sludge Brought Ashore by the Tsunami after the Great East Japan Earthquake of 2011.

Wada K, Fukuda K, Yoshikawa T, Hirose T, Ikeno T, Umata T, Irokawa T, Taniguchi H, Aizawa Y.

J Occup Health. 2012;54(4):255-62. DOI 無, 査読有

6. 東日本大震災における産業保健活動とその課題 色川俊也

交通医学, 66巻3・4号, 84-86(2012)

DOI 無, 査読無

7. 閉塞型睡眠時無呼吸低呼吸症候群患者の努力吸気肺活量についての検討

大久典子, 小川浩正, 色川俊也, 吉田克己, 飛田涉, 黒澤一

医学検査, 61巻4号, 711-715(2012)

DOI 無, 査読有

8. 産業医学における呼吸器科医師の役割

黒澤一, 長南達也, 大森久光, 色川俊也,

呼吸, 31巻4号, 329-336(2012)

DOI 無, 査読無

9. 閉塞型睡眠時無呼吸低呼吸症候群とCPAP治療

大久典子, 小川浩正, 色川俊也, 吉田克己, 飛田涉, 黒澤一

呼吸, 30巻8号, 735-741(2011)

DOI 無, 査読有

10. Application of impulse oscillometry for within-breath analysis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: pilot study.

Ohishi J, Kurosawa H, Ogawa H, Irokawa T,

Hida W, Kohzuki M.

BMJ Open. 2011 Jan 1;1(2):e000184.D0I  
10.1136/bmjopen-2011-000184. 査読有

11. Measurement of fluid secretion from  
intact airway submucosal glands.

Wine JJ, Joo NS, Choi JY, Cho HJ, Krouse  
ME, Wu JV, Khansaheb M, Irokawa T, Ianowski  
J, Hanrahan JW, Cuthbert AW, Tran KV.

Methods Mol Biol. 2011;742:93-112.D0I doi:  
10.1007/978-1-61779-120-8\_6. 査読無

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 食道癌切除再建術が呼吸機能へ及ぼす影  
響 新國悦弘、荒川梨津子、色川俊也、小川  
浩正、黒澤一 第 23 回日本呼吸ケアリハビ  
リテーション学会 2013 年 10 月 11 日(東京都)

2. 宮城県内の医療施設内外の粒子状物質環  
境について

荒川梨津子、小川浩正、色川俊也、佐藤舞、  
黒澤一 第 72 回日本産業衛生学会東北地方  
会 2013 年 7 月 27 日(盛岡市)

3. 東日本大震災被災地がれき処理場の継続  
的な土壌細菌叢解析からみた被災地復旧作  
業労働者の健康障害要因の評価

色川俊也、諸富伸夫、福田和正、馬田敏幸、  
進藤拓、中村修、矢内勝、広瀬俊雄、小川浩  
正、谷口初美、黒澤一 第 86 回日本産業衛  
生学会 2013 年 5 月 16 日(松山市)

4. COPD 認知度および治療意欲度に関する検  
討 小川浩正、三浦元彦、田代祐介、田中里  
江、澤田千晴、中村優、大塚竜也、色川俊也、  
黒澤一 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会  
2013 年 4 月 20 日(東京都)

5. 石巻地区におけるがれき置き場の土壌細  
菌叢評価からみた復興作業従事者健康障害  
要因の評価 色川俊也、諸富伸夫、福田和正、  
馬田敏幸、進藤拓、中村修、矢内勝、小川浩  
正、谷口初美、黒澤一  
第 71 回日本産業衛生学会東北地方会 2012  
年 7 月 27 日(仙台市)

〔図書〕(計 5 件)

1. 東日本大震災にみる 石綿・粉じんなど  
による影響と対策・課題

第 1 章 東日本大震災の被害概要について  
色川俊也 日本産業衛生学会「震災関連石  
綿・粉じん等対策委員会」編,2-3(2013)

2. 東日本大震災にみる 石綿・粉じんなど  
による影響と対策・課題

第 3 章 . 土壌・水の環境調査報告 ヘド  
ロおよびがれきの細菌学的な健康リスク評  
価 色川俊也、和田耕治

日本産業衛生学会「震災関連石綿・粉じん等  
対策委員会」編,28-33(2013)

3. 大規模震災時における産業保健活動(講演  
抄録) 色川俊也 福岡県産業医学協議会編,  
けんこう福岡 47 号,12(2012)

4. 大学の被災状況と今後の防災指針(緊急企  
画) 色川俊也

化学と生物 49 巻 12 号,870-874(2011)

5. 「東日本大震災と産業保健」(特別寄稿)

色川俊也 日本産業衛生学会産業医部会編,  
日本産業衛生学会産業医部会会報 44  
号,1-2(2011)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

特に無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

色川俊也 (IROKAWA, Toshiya)

東北大学・環境・安全推進センター・准教授  
研究者番号: 7 0 3 7 5 1 7 9

(2)研究分担者

黒澤一 (KUROSAWA, Hajime)

東北大学・環境・安全推進センター・教授  
研究者番号: 6 0 3 3 3 7 8 8