



Title	Nasal Mucosa Sensitization with Toluene diisocyanate (TDI) Increases Preproptachykinin A (PPTA) and prepro CGRP mRNAs in Guinea Pig Trigeminal Ganglion neurons.
Author(s)	Kalubi, Bukasa
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37988">https://hdl.handle.net/11094/37988</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">ご参照ください</a> 。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	カルビ Kalubi	ブカサ Bukasa
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	第 10202 号	
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 外科系専攻	
学位論文名	<b>Nasal Mucosa Sensitization with Toluene diisocyanate (TDI) Increases Preproptachykinin A (PPTA) and prepro CGRP mRNAs in Guinea Pig Trigeminal Ganglion neurons.</b> (鼻過敏症における P 物質及びカルシトニン遺伝子関連ペプチド前駆体 mRNA の変化：鼻過敏症モデル動物による解析)	
論文審査委員	(主査) 教授 松永 亨 (副査) 教授 遠山 正彌 教授 藤田 尚男	

## 論文内容の要旨

### (目 的)

Toluene diisocyanate (TDI) は鼻過敏症を引き起こすことでよく知られている。その機作としては鼻粘膜に存在する知覚神経の末梢枝端が TDI により刺激され、いわゆる神経性炎症を引き起こす可能性が広く受け入れられている。すなわち、知覚神経末梢枝端には P 物質 (SP) やカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) が豊富に存在することはよく知られており、末梢枝端の TDI による刺激によりこれらの生理活性物質が末梢枝端より遊離され、神経性炎症の原因となるとする考えである。しかし、末梢枝端よりの SP, CGRP 遊離の機序については不明な点が多い。本研究では TDI 感作により鼻過敏症を引き起こしたモルモット三叉神経知覚系における SP, CGRP 及びそれらの前駆体 mRNA の動態をそれぞれ免疫組織化学及び In situ ハイブリダイゼーション (ISH) 法を用いて検討した。

### (方 法)

実験動物 体重200～600 g の Hartley 系モルモット40匹を使用した。32匹を TDI 感作動物として、残り 8 匹をコントロール動物として使用した。TDI 感作動物はさらに急性実験群 (12匹) と慢性実験群 (20匹) 分けた。急性実験群では 5 % TDI 含有酢酸エチル液 (20  $\mu$  l) を鼻粘膜に塗布した後、10分後に免疫組織化学或いは ISH 法に供した。一方、慢性実験群では10% TDI 含有酢酸エチル液 (20  $\mu$  l) を 1 日 1 回 5 日間鼻粘膜に連続塗布した。その後 3 週間無処理のまま放置した後、5 % TDI 含有酢酸エチル液 (20  $\mu$  l) を 1 週間に 1 度 4 週間鼻粘膜に塗布した。最終誘発の10分後 (15匹) 及び 7 日後 (5 匹) に免疫組織化学及び ISH 法に供した。

免疫組織化学 ペントバルビタール麻酔下においてザンボン液で灌流固定を行い、鼻粘膜、三叉神経

脊髄路核における三叉神経知覚終末及び三叉神経節ニューロンにおける SP 及び CGRP 様免疫活性の変化を検討した。使用した抗 SP 抗体、抗 CGRP 抗体の特異性については吸収試験、阻害試験で確認した。

ISH 法 麻酔下で断頭後、ただちに三叉神経節を取り出し、ドライアイスで急速凍結を行い新鮮凍結切片を作成し、乳剤オートラジオグラフィーによる ISH 法に供した。SP 前駆体（プレプロタキニン A, PPTA）及び CGRP 前駆体 mRNA の証明には合成オリゴヌクレオチドを用いた。PPTA 及び CGRP 前駆体プローブは各々 228-444, 311-350 の塩基配列の部位のアンチセンス DNA を作成し、 $[^{35}\text{S}]$  標識を行った。プローブの特異性は RNAase 処理及び競合試験で確認した。

#### （結 果）

##### 〔I〕 SP, CGRP 様免疫活性（IR）の変化

- （1）鼻粘膜 コントロール動物鼻粘膜においては粘膜固有層に SP-, CGRP-IR 線維が豊富で、特に血管壁、粘膜腺周囲に密な神経網を形成する。急性実験群ではこれらの SP-, CGRP-IR 線維には大きな変化を認めなかった。しかし、慢性実験群においては最終誘発後 10 分では SP-, CGRP-IR 線維の著しい増強（数及び免疫活性）が認められた。一方最終誘発後 7 日ではこのような変化は観察できなかった。
- （2）三叉神経脊髄路核 コントロール動物においては膠様層を中心に密な SP-, CGRP-IR 線維網が観察される。急性実験群においては大きな変化を認めなかった。最終誘発後 10 分後に採取した慢性実験群においては SP-, CGRP-IR 線維の若干の増強が見られたが最終誘発後 7 日後ではコントロール群と差がなかった。
- （3）三叉神経節 コントロール群では 20～20% の細胞が CGRP 陽性を示す。急性実験ではコントロール群との間に大きな差はなかった。慢性実験では最終誘発 10 分では SP 及び CGRP の著しい免疫活性の減弱を認め、同定しうる陽性細胞の数もコントロール群の約半数であった。しかし、最終誘発後 7 日ではコントロールレベルに復していた。

##### 〔II〕 三叉神経節における PPTA 及び CGRP 前駆体 mRNA の変化

コントロール群においては 10～30% の細胞が PPTA, CGRP プローブに標識された。急性実験ではコントロール群と大きな差はなかった。慢性実験では最終誘発後 10 分では両ペプチド前駆体 mRNA の著しい増加を認め、神経節の 30～50% 細胞が両プローブにより標識された。最終誘発後 7 日ではその変化は認めることができなかった。

#### （総 括）

TDI 感作により鼻過敏症を引き起こしたモルモットにおいて三叉神経系における SP, CGRP の動態を検討した。

TDI の単一投与（急性実験）では三叉神経知覚系の SP, CGRP には変化が認められなかった。しかし、TDI の繰り返し投与（慢性実験）においてはそれらの動態に大きな変化が見られた。すなわち、鼻粘膜における SP-, CGRP-IR 線維の著しい増強、三叉神経節ニューロンにおける SP-, CGRP-様免疫活性の著しい減少とそれに反して SP 及び CGRP 前駆体 mRNA の著しい増強である。これらの事

実はTDIの鼻粘膜への慢性投与は三叉知覚系におけるSP, CGRPの産生と軸索輸送の著しい増強を引き起こしていることを示す。従って、鼻過敏症においては三叉神経SP, CGRP系の亢進が引き起こされていると結論した。

### 論文審査の結果の要旨

本研究はToluene diisocyanate (TDI) 感作により鼻過敏症を引き起こしたモルモット三叉神経知覚系におけるSP, CGRP及びそれらの前駆体mRNAの動態をそれぞれ免疫組織化学及びin situ ハイブリダイゼーション (ISH) 法を用いて検討したものである。TDIの慢性実験において、鼻粘膜におけるSP-, CGRP-陽性線維の著しい増強、三叉神経節ニューロンにおけるSP-, CGRP-様免疫活性の著しい減少とそれに反してSP及びCGRP前駆体mRNAの著しい増強を観察した。このことは、TDIの鼻粘膜への慢性投与が三叉神経知覚系におけるSP, CGRPの産生と軸索輸送の著しい増強を引き起こしていることを示しており、鼻過敏症においては三叉神経SP, CGRP系の亢進が引き起こされていることを証明したものである。

以上の研究は、鼻過敏症におけるSP, CGRP系の関与を示唆するものであり、今後の臨床への適用が期待される。従って、本研究は学位論文として十分価値のあるものと評価される。