

1. 室内空气中化学物質の免疫系に対する 影響評価に関する基礎的研究

1. 小児気管支喘息患者における

ホルムアルデヒド特異 I g E 抗体保有率に関する検討

2. リポ多糖体吸入暴露後のラット気道におけるホルムアルデヒドの惹起性

愛知学泉大学家政学部

鳥居 新平

名古屋大学医学部小児科

坂本 龍雄

3. ホルムアルデヒド暴露によるアレルギー反応に対する影響に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部

安藤 正典

国立医薬品食品衛生研究所療品部

鹿庭 正昭

五十嵐良明

国立医薬品食品衛生研究所総合評価室

鎌田 栄一

4. 室内空气中化学物質の吸入実験装置の開発に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部

安藤 正典

国立医薬品食品衛生研究所総合評価室

鎌田 栄一

室内環境中のホルムアルデヒドの気道傷害性に関する研究

鳥居新平 (愛知学泉大学家政学部)

坂本龍雄 (名古屋大学医学部小児科)

研究背景

ホルムアルデヒド (以下FAと略す) は超揮発性有機化合物 (VOC) のひとつであり、室内空気に含まれる化学汚染物質の中でもとりわけ重要な健康障害の原因物質と考えられている。

FAは接着剤の材料に用いられ、これらは合版、フローリング、パーティクルボード等に繁用されている。また、防腐剤、防カビ剤として壁紙施行用接着剤、化粧品、洗剤等に添加されており、室温が上昇するとこれらの建材や製品からFAが発生して室内濃度を上昇させる。タバコ煙やガスの燃焼排気中にもFAが含まれており、FAの室内濃度は室外の数倍に達する場合があると報告されている。従って、気密性の高い新築家屋の居住者は比較的高濃度のFAガスに曝露されやすく、また、化粧品、洗剤、壁紙等に含まれるFAは直接皮膚に接触する可能性がある。

著者らは、全身麻酔、人工換気下のラットの下気道にFAガスを直接吸入させると、気道壁及び気道内腔に血漿漏出が惹起されることを明らかにした (文献1)。その機序であるが、FAが気道知覚神経末端から神経ペプチドを遊離し、これらの物質が血管内皮細胞に分布するタキキニンNK1受容体を刺激して血漿漏出を惹起すると考えられている (文献1)。また、FAが気道組織と内腔への好中球浸潤、気道上皮の剥離・傷害を引き起こすことを見出した。以上、著者らが解明したFAによる急性の気道反応をまとめると、1) 血管透過性亢進、2) 知覚神経刺激、3) 分泌亢進、4) 上皮剥離、5) 炎症細胞の浸潤であり、これらの作用は気道内径の狭小化と気道反応性亢進に関連することから、FAが喘息の増悪因子として働く可能性が考えられる。このことは、FAが職業性喘息の原因物質の一つであり、職場におけるFA曝露によって喘息症状が発症・増悪し、FA曝露を回避することで喘息症状が消失・軽快するような「FA喘息」患者が少なからず存在することからもうかがえる。

FAは低分子物質であるが、蛋白や多糖体と結合してIgE抗体を産生することが証明されている。FAが血液透析回路から経静脈的に体内に侵入し、アナフィラキシーショックをおこした透析患者の症例や、歯科治療に用いる充填剤からFAが遊離し、アナフィラキシーを引き起した例が報告されている。一方、FAによる職業性喘息と診断された患者では、FA特異IgE抗体の保有率はきわめて低いと考えられている。しかし、Wantkeら (文献2) は62名の学童を対象にFA特異IgE抗体を測定し、39%という高い陽性率を報告している。小児は成人に比し、FAに対するIgE感作性が高い可能性が考えられるが、この点はまだ十分に解明されていない。

研究内容

1. 小児気管支喘息患者における

ホルムアルデヒド特異IgE抗体保有率に関する検討

〈研究目的〉

小児は成人に比し、FAに対するIgE感受性が高い可能性が考えられるが、この点はまだ十分に解明されていない。そこで著者らは我国の小児気管支喘息患者のFA特異IgE抗体保有率をCAPシステムを用いて検討した。

〈研究の対象及び方法〉

愛知県内の8施設を受診した小児気管支喘息患者122名と非アレルギー疾患児（アレルギー疾患の既往のない小児）33名を対象として、血清中のFA特異IgE抗体価及び総IgE値をCAPシステムを用いて測定した。同時に表1のごとく、主治医により対象患児のプロフィールを調査した。

〈結果〉

- 1) 小児気管支喘息群のFA特異IgE抗体保有率は1.6%（2名）であった。一方、非アレルギー疾患群にはFA特異IgE抗体保有者を認めなかった。
- 2) FA特異IgE抗体陽性者2名のうち、気管支喘息の重症度では1名が重症、他方が軽症であった。また、粘膜刺激性に関する質問では1名は「よくある」、他方は「ほとんどない」と回答しており、FA特異IgE抗体陽性喘息患児の臨床的特徴を見い出すことはできなかった（表2）。
- 3) 本調査の集計結果を表3に示す。

〈考察及び今後の課題〉

FA特異IgE抗体の病的意義であるが、気管支喘息の場合、FAによるアレルギー炎症が既存の喘息性気道傷害に加算されるとすれば、FAにIgE感作されることの影響は深刻である。しかし、FA特異IgE抗体陽性を示す気管支喘息患者が重症、難治であるという証拠は揃っておらず、今後の検討課題である。

近年、FAがIgE抗体産生に対して促進的に作用するという興味深い報告がなされている。マウスを用いた実験（文献3）では、マウスにおいてFAを経鼻曝露しつつ、卵白アルブミンの経鼻感作を行った場合、FA非曝露群に比べ、有意に高い卵白アルブミン特異IgE抗体が産生された。一方、卵白アルブミンを腹腔内投与した場合は、FAのアジュバンド効果は見られなかった。また、モルモットを用いた実験（文献4）では、0.25ppmという低濃度のFAを5日間吸入して卵白アルブミンの吸入感作を行うと、FA非曝露群と比較して、卵白アルブミン特異IgG1抗体の産生と抗原吸入による気道収縮反応が有意に上昇した。Smedjeら（文献5）は校舎内のFA濃度と喘息罹患率が正の相関を持つことを報告しているが、FAの免疫修飾作用が喘息罹患率の増加の一因となっている可能

性が示唆される。

FAのアレルゲン性及びIgE抗体産生促進作用についてはまだ研究の緒にいたるところであり、引き続き研究を進める必要があるだろう。

表1 患者のプロフィール

患者氏名（またはID）_____（男/女）年齢 _____

◎ 総IgE値 _____（測定法 _____）

◎ 喘息の特徴（最近2年間の病状により評価してください）

- ① 初発発作（ _____ 歳）、罹病期間（ _____ 年）
- ② 病型（アトピー型 / 非アトピー型）
- ③ 重症度（重症 / 中等症 / 軽症）*日本小児アレルギー学会の分類に従う
- ④ 発作の好発時期（春、夏、秋、冬 / 通年 / 一定せず）
- ⑤ 最近の1年間（改善傾向 / 不変 / 増悪傾向）
- ⑥ 発作の好発時間（朝 / 昼 / 夕方 / 夜間 / 一定せず）
- ⑦ 発作の起きやすい場所（戸外 / 室内 / 一定せず）

◎ 喘息以外のアレルギー疾患

アレルギー性鼻炎 / アレルギー性結膜炎 / 花粉症 / アトピー性皮膚炎 / 反復性蕁麻疹 / 食物アレルギー / その他（ _____ ）

◎ 喘息の家族歴

同居する場合に限る

続柄		喘息の有無 医師の診断を受けたことがある場合に限る		
父方	祖父	有	無	不明
	祖母	有	無	不明
母方	祖父	有	無	不明
	祖母	有	無	不明
父		有	無	不明
母		有	無	不明
同胞		有	無	不明
		有	無	不明
		有	無	不明

◎ 住宅構造

タイプ（一戸建て / 集合住宅）
 家屋構造（木造・モルタル / 鉄筋・鉄骨）
 築年数（0～5年 / 5～10年 / 10年以上）
 喫煙者（有 / 無）

◎ 問い

新築の建物、閉め切った部屋、衣料品・家具売り場に入った時、目や鼻が急に痛くなったり、咳こんだりすることがありますか？

（ほとんどない / 時々ある / よくある）

表2 陽性例のプロファイル

	Case1	Case2
総IgE値	9800IU/ml	1270IU/ml
重症度	重症	軽症
住宅構造	一戸建て/木造	一戸建て/木造
築年数	10年以上	10年以上
喫煙者	無	無
粘膜刺激症状	時々ある	ほとんどない

表3 《結果》

	BA 群	NA 群
N	122	33
性別 (M/F)	82/40	21/12
年齢	9.5 ± 3.5	8.8 ± 3.0
重症 / 中等症 / 軽症	13/38/68	—
アトピー型 / 非アトピー型	113/6	—
総IgE (IU/ml)	1278 ± 1648	304 ± 447 *
FA 特異IgE 陽性者	2 (0.42/0.46)	0
* P < 0.01		Mean ± S.D.

2. リポ多糖体 (LPS) 吸入曝露後のラット気道におけるFA惹起性 血管透過性亢進に関する検討

〈研究目的〉

FAはカプサイシンと同様、気道の無髄性知覚神経 (C-fiber) を選択的に刺激し、神経末端部よりタキキニン (サブスタンスP、ニューロキニンA) を遊離させて強力な血漿漏出を引き起こす。FAのこうした作用が、細菌内毒素の本態であり、室内環境汚染物質のひとつであるLPS曝露によりどのように修飾されるかを検討した。

〈研究方法〉

Wistar雄性ラット (8週齢) を12群 (n=4-8) に分け、ペントバルビタール (50mg/kg i.p.) で全身麻酔し、気管内挿管後、人工換気を行った (1回換気量: 10ml/kg、呼吸回数: 90回/分)。超音波ネブライザーを用いてLPS (0.2mg/ml、E. coli: 055:B5) または生食のエアロゾルを発生させ、5分間気道内に送り込んだ。ラットをいったん覚醒させ、18時間後に再びペントバルビタール (80mg/kg i.p.) で全身麻酔を行い、頸部気管内に気管カニューラを挿入して1回換気量8ml/kg、呼吸回数90回/分で人工換気を施行した。気道組織中に漏出したエバンスブルー量を気道の血管透過性亢進の指標とし、エバンスブルー溶液 (40mg/ml) を0.5ml/kg静注し、続いてFA (5ppm、10分間吸入)、カプサイシン (7.5umol/kg i.v.)、またはサブスタンスP (30nmol/kg i.v.) を投与した。10分後に体循環と肺循環を生食で灌流し、血中エバンスブルーを除去した。下部気管及び主気管支を採取し、これらの組織中のエバンスブルーをホルマミドで抽出し、組織湿重量1mgあたりのエバンスブルー量を算出した。

LPS吸入による気道組織中のサブスタンスP含有量の変化を検討するため、一定サイズに切り出した気道組織を粉碎し、遠心分離後、上清中のサブスタンスP濃度を酵素抗体法を用いて測定した。

〈結果〉

1. LPSの前処置は、LPSの溶解液である生食と比較して、18時間後の気道内圧 (PIP) や血圧に有意な変動を引き起こさなかった (表4)。
2. LPSの前処置は、18時間後の気道組織中のサブスタンスP含有量を有意に変化させなかった。
3. LPSの前処置は、18時間後のSham刺激に対する気道血管透過性亢進に有意な変化を引き起こさなかった (図1)。
4. LPS前処置群では、生食前処置群と比較して、サブスタンスPによる気道壁への血漿漏出が有意に増強された。しかし、FAまたはカプサイシンによる気道反応には、LPS前処置による有意な変化を認めなかった (図1)。

〈考察〉

LPSの前処置がサブスタンスPによる血漿漏出を増強させることは、LPSが気道上皮に分布するneutral endopeptidase (NEP) の活性阻害作用があることから説明でき、また、LPSがFAやカプサイシンによる気道反応を増強させる可能性を予想させる。しかし、本研究ではFAやカプサイシンによる気道組織中への血漿漏出は、LPSの前処置で増強されなかった。気道組織中のタキキニン含有量がLPSにより減少しなかったという結果とあわせて考えると、これらの物質によるタキキニンの遊離能が、LPS前処置によって抑制されたと推測される。

本研究は、LPS曝露が内蔵知覚神経の機能を障害する可能性を示唆している。FA曝露に対する咳嗽、胸部苦悶感、気道閉塞等の急性反応が抑制されることで、FA曝露下にあることに気づかず、過剰にFAにさらされる危険性が考えられる。しかし、気道内の無髄性の知覚神経の機能は十分に解明されておらず、本研究の意義を理解するためにはさらなる検討が必要である。

〈引用文献〉

1. Ito, K., Sakamoto, T., Hayashi, Y., et al. *Eur. J. Pharmacol.*, 307:291, 1996.
2. Wantke, F., Demmer, C.M., Tappler, P., et al. *Clin. Exp. Allergy*, 26:276, 1996.
3. Tarkowski, M., Gorski, P. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 106:422, 1995.
4. Riedel, F., Hasenauer, E., Barth, P.J., et al. *Allergy*, 51:94, 1996.

表4 Basal values of pulmonary insufflation pressure (PIP) and mean systemic arterial blood pressure (BP) in the different treatment groups.

Pretreatment/Stimulation	n	PIP(cmH ₂ O)	BP(mmHg)
<i>Study 1.</i> Saline / Sham	5	9.8±0.2	104.4±6.0
LPS / Sham	5	10.0±0.3	101.5±3.3
Saline / Substance P	8	9.8±0.2	103.0±6.2
LPS / Substance P	6	9.5±0.4	105.0±7.8
<i>Study 2.</i> Saline / Sham	5	10.1±0.3	116.5±11.0
LPS / Sham	5	10.0±0.2	100.8±6.1
Saline / Capsaicin	5	10.0±0.1	119.2±8.8
LPS / Capsaicin	4	10.3±0.3	106.5±7.2
<i>Study 3.</i> Saline / Sham	5	10.2±0.2	109.8±7.8
LPS / Sham	5	10.2±0.2	105.1±8.0
Saline / Formaldehyde	5	10.5±0.4	108.6±11.6
LPS / Formaldehyde	5	10.1±0.3	116.4±3.5

Values are expressed as the mean±S.E.M.

LPS: lipopolysaccharide. PIP: pulmonary insufflation pressure. BP: mean systemic arterial blood pressure.

There were no significant differences in baseline PIP and BP between the groups used in each study.

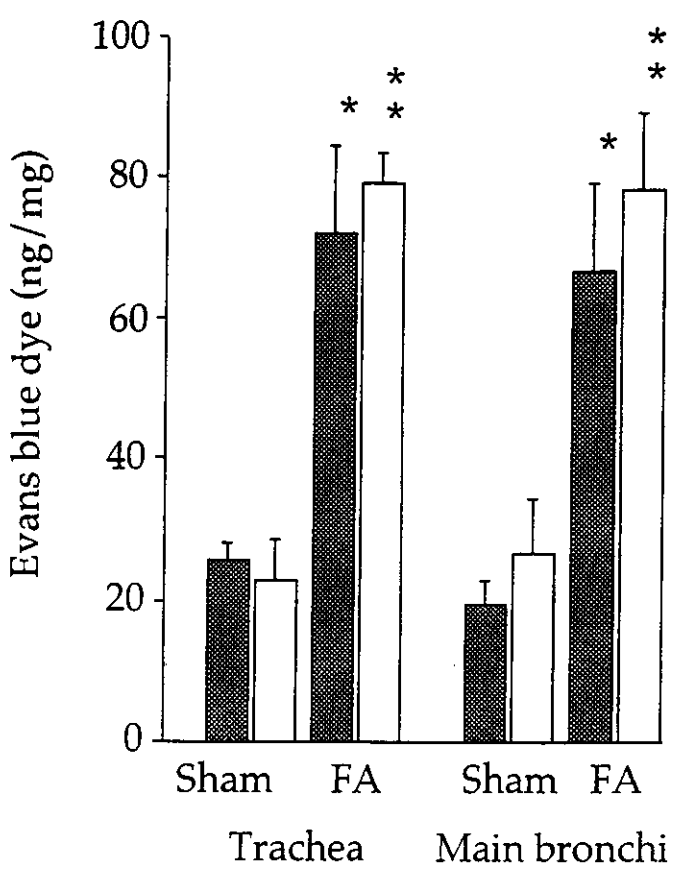
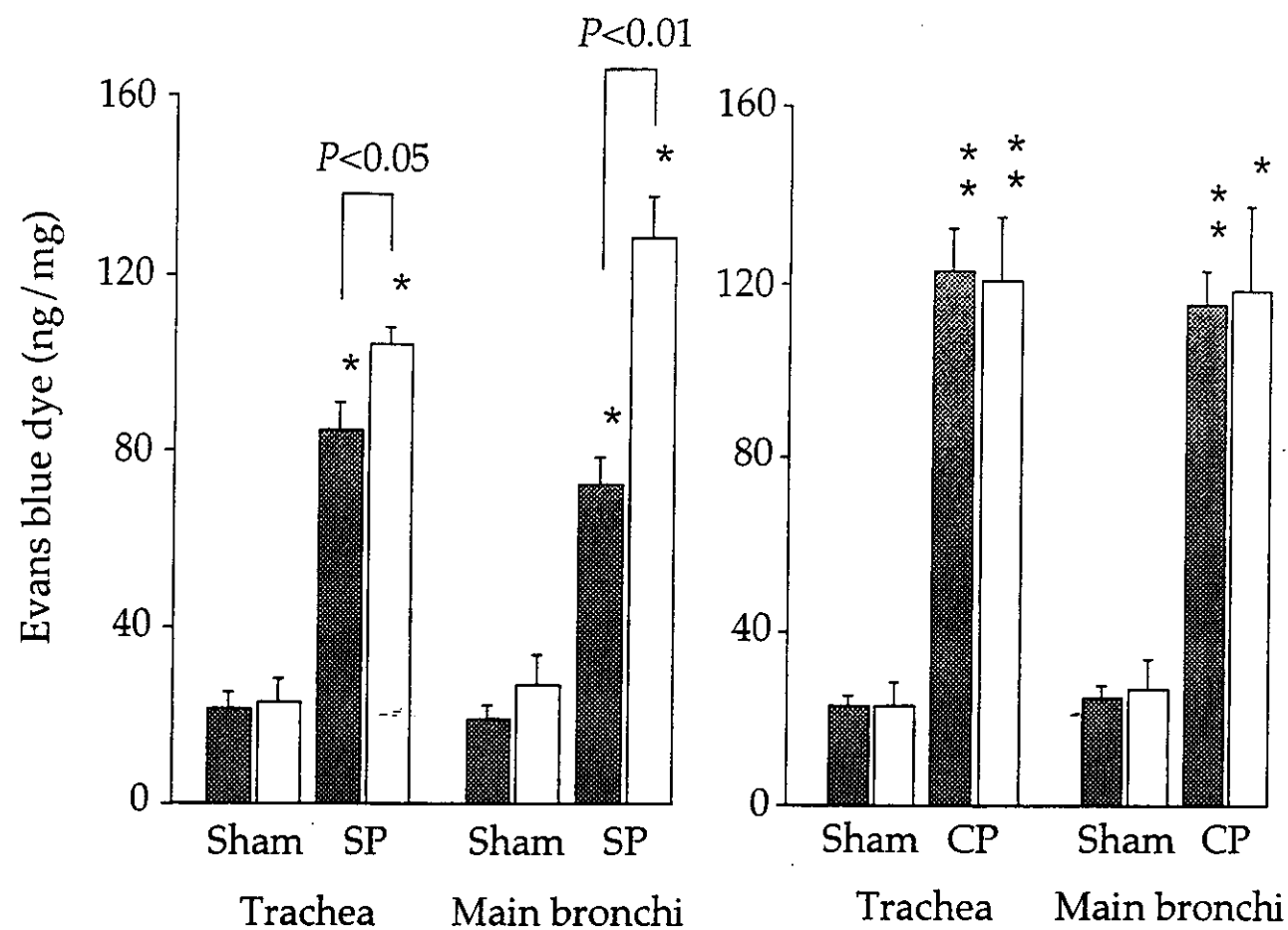


Fig. 1 Extravasation of Evans blue dye in the rat trachea and main bronchi induced by i.v. substance P (SP, 30 nmol/kg), i.v. capsaicin (7.5 μmol/kg), and inhaled formaldehyde (5 ppm for 10 min) 18 h after pretreatment with a 5-min inhalation of lipopolysaccharide (LPS, 0.2 mg/ml, open bars) or its vehicle (0.9% saline, shaded bars). Intravenous administration (0.5 ml/kg) of 0.9% saline and 7.5% dimethyl sulfoxide in 0.9% saline was used as sham for substance P and capsaicin, respectively. Room air was used as sham for 5 ppm formaldehyde. Values are the means ± S.E.M (n = 4-8). **P* < 0.01 vs. vehicle-treated, sham-stimulated group. There was a significant difference in leakage of dye between the two different substance P-stimulated groups, but not between two different capsaicin- or formaldehyde-stimulated groups.

3. ホルムアルデヒド暴露によるアレルギー反応に対する影響に関する研究

安藤 正典 国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部部長

五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所療品部主任研究官

鹿庭 正昭 国立医薬品食品衛生研究所療品部室長

鎌田 栄一 国立医薬品食品衛生研究所総合評価室主任研究官

研究要旨

ホルムアルデヒドへの暴露が trimellitic anhydride (TMA)による I型アレルギー反応または 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB)による IV型アレルギー反応に及ぼす影響をマウスモデルで検討した。DNCBによる感作誘導期の耳介リンパ節細胞(LNC)増殖反応は、*in vitro*でのホルマリン溶液(HCHO)の添加で影響を受けなかった。惹起段階において、DNCB感作リンパ球の幼若化反応及びIFN- γ 産生はHCHO添加によって変化しなかった。TMA感作リンパ球からのIL-4産生量についても、HCHOの効果は認めなかった。よって、アレルギー反応に対してHCHOの*in vitro*添加による効果はないと考えられた。次に、HCHOの*in vivo*前処理の効果を調べるため、2% HCHOまたはアセトンを経皮塗布したマウスに対してTMAまたはDNCBで感作し、その免疫反応を比較した。TMAによるLNC増殖反応は、HCHOで前処理したマウスの方がアセトンで前処理したマウスより著しく高い値を示した。一方、DNCBによるLNCの増殖反応については、それほど変化はなかった。HCHO前処理によってDNCB惹起に対する耳腫脹反応はアセトン前処理に比べて弱くなった。TMA処理による血清IgE抗体価はHCHO群とアセトン群でほぼ同等であった。したがって、HCHOの経皮塗布による前処理は、I型アレルギーの感作誘導を増強するが、IV型アレルギーの感作誘導には影響しない。さらにI型アレルギーの惹起反応に対しては影響を及ぼさず、IV型アレルギーの惹起反応をむしろ抑制することがわかった。

A. 研究目的

生活環境には数多くの化学物質が存在し、その発生源も極めて多様である。食品や水等を介して経口的に、居住空間や労働環境あるいは大気を通して経気道的に、化粧品、家庭用品や建築資材などの居住環境を通して経皮的にこれらの化学物質に暴露されている。近年、化学物質による皮膚アレルギー、粘膜気道アレルギー疾患が急激に増加している。さらに、極めて微量の化学物質に接触するだけで不快感、記憶力の低下などの自律神経症状や精神症状、せき、喘息や皮膚炎などといった免疫症状などを訴える人も現れている。こうした症状を化学物質過敏症と呼んでいる。化学物質過敏症は室内空気汚染が原因ではないかと考えられている。室内環境中の化学物質を分析すると、ホルムアルデヒド、トルエン、トリクロロエチレンなどの揮発性有機化合物などが検出される。特に、ホルムアルデヒドは接着剤、テキスタイル、木材など種々の分野で使用され室内環境に発生しており、安全性評価からの

指針値が示され具体的な施策が動き出している。¹⁾ したがって、ホルムアルデヒドは化学物質過敏症の発症との関連が疑われているが、実験的には証明されていない。神経系、内分泌系、免疫系は相互に調節し合っている。²⁾ ホルムアルデヒドは皮膚アレルギー性を持つことが明らかになっており、³⁾ その免疫作用が種々の症状に何らかの影響を与える可能性もある。しかしながら、ホルムアルデヒドの暴露が他の化学物質によるアレルギー症状に与える効果について研究した例は少ない。

本研究では、ホルムアルデヒド暴露とアレルギー症状との関与についての基礎的な研究として、マウス感作リンパ球に対し *in vitro* でホルムアルデヒドを適用した場合、その反応性に変化が生じるか検討した。次に、ホルムアルデヒドを経皮暴露して前処理したマウスに種々のアレルゲンを適用した場合の反応性についても検討した。

B. 研究方法

試薬：ホルムアルデヒドとして、市販ホルマリン溶液（37%ホルムアルデヒド）（以下、HCHO）を用いた。アレルゲンとして、気道アレルギーなど即時型アレルギー（I型アレルギー）を誘導する trimellitic anhydride (TMA)、接触皮膚炎を代表とする遅延型アレルギー（IV型アレルギー）を誘発する dinitrochlorobenzene (DNCB) を、それぞれ acetone:olive oil(4:1)(AOO)に溶解して用いた。

動物：BALB/c系マウス（雌、6～8週齢）を用いた。

ホルムアルデヒドによる前処理：毛刈りしたマウスの腹部に、2% HCHO のアセトン溶液 50 μ l を塗布した。塗布は1週間に6日、2週間行った。対照群はアセトンを同様に塗布した。HCHO 処理の最終日の翌日から、後述のとおりアレルゲンで処置した。また、HCHO の *in vitro* 添加による効果を見る試験では、マウスは HCHO での前処置を行わずに、試験物質で処置した。

Local lymph node assay (LLNA)：⁴⁾ マウス（1群3匹）の両耳に1% DNCB または10% TMA の AOO 溶液を 25 μ l ずつ3日間連続で塗布した。コントロール群は AOO のみを同様に塗布した。最終塗布の翌日、耳介リンパ節を取り出し試験群ごとにまとめた後、リンパ節細胞(LNC)を分離し、牛胎児血清を10%含有する RPMI1640 培地に浮遊させた。LNC を 1 \times 10⁶ 個ずつ 96 穴プレートの各穴に入れ（1群4穴）、種々の濃度の HCHO 溶液と ³H-thymidine (³HTdR) 0.5 μ Ci を添加して、37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。培養終了後、細胞内に取り込まれた ³HTdR 量(dpm)を液体シンチレーションカウンターによって測定した。HCHO 添加群の未添加群と比較したときの ³HTdR 取り込み量の増加率を stimulation index として示した。

耳腫脹試験：⁵⁾ マウス（1群6匹）の毛刈りした腹部に1% DNCB の AOO 溶液 50 μ l を塗布して感作させた。7日後、耳の厚さを測定した後、1% DNCB 溶液 25 μ l を塗布し、24時間及び48時間後の耳の厚さを測定して増加率を求めた。さらに7日後、再惹起を行い、同様に耳の腫脹の程度を調べた。

IgE アッセイ：⁶⁾ マウス（1群6匹）の腹部に20% TMA の AOO 溶液 50 μ l を塗

布し、7日後、10% TMA 溶液を 25 μ l ずつ両耳に塗布した。さらに7日後、心臓採血し、血清を分離、ELISA 法によって IgE 抗体価を測定した。

リンパ球幼若化反応：7) マウスの腹部に、1% DNCB の AOO 溶液を 50 μ l 塗布して感作した。5日後、両耳に 1% DNCB 溶液を塗布して耳の厚さの増加を見て感作の成立を確かめた。コントロール群は AOO で同様に処置した。耳への塗布から5日後、脾臓を取り出し、細胞浮遊液を調製し 5 \times 10⁵ 個 ずつ 96 穴プレートに入れ、種々の濃度の HCHO 溶液、及び抗原として sodium 2,4-dinitrobenzenesulfonic acid (DNBS) 100 μ g/ml を添加して 96 時間培養した。培養終了 4 時間前に ³HTdR 0.25 μ Ci を添加して細胞内に取り込まれた ³HTdR 量(dpm)を測定した。

IFN- γ アッセイ：8) マウス (1 群 5 匹) の腹部を毛刈りし、1% DNCB の AOO 溶液を 50 μ l 塗布した。5日後、同様の処置を行った。これからさらに5日後、両耳に 1% DNCB 溶液を 25 μ l ずつ塗布した。耳への塗布は 3 日間連続で行った。コントロール群は AOO を用いて同様に処置した。最終塗布の翌日、耳介リンパ節または脾臓を取り出し、細胞浮遊液を調製し 1 \times 10⁷ 個 ずつ 24 穴プレートに入れ、種々の濃度の HCHO 溶液と DNBS 100 μ g/ml または Con A 2 μ g/ml を添加して 24~96 時間培養した。培養上清を遠心して回収し、IFN- γ 濃度を市販キットにより定量した。

IL-4 アッセイ：8) 試験物質として TMA を用い、10% 濃度で IFN- γ 産生方法と同様に動物を処置し、耳介 LNC を採取した。刺激物質として Con A 2 μ g/ml を用い、種々の濃度の HCHO 共存下 24~96 時間培養し、その上清を IL-4 測定用とした。

C. 研究結果

1. ホルムアルデヒドの in vitro 添加による影響

DNCB による感作誘導時の LNC の増殖反応に対する HCHO の in vitro 添加の効果を調べた。LLNA 法に従って、DNCB を耳に連続塗布した後、耳介 LNC を培養する時に HCHO が共存するとその増殖反応に影響を受けるかどうか検討した。HCHO の濃度は前もって行われた細胞毒性試験の結果などから 0.5 μ g/ml を最高に、順次希釈して添加した。その結果、HCHO を添加しても増殖反応に変化はなかった (表 1)。

表1. LLNAにおけるホルマリン共存下でのリンパ節細胞 (LNC)増殖反応

Treatment	HCHO conc. ($\mu\text{g/ml}$)	$^3\text{HTdR}$ incorporation (Mean \pm SD, dpm)	Stimulation Index
A00	0	1275 \pm 147	-
	0.1	1335 \pm 61	1.05
	0.25	1317 \pm 94	1.03
	0.5	1225 \pm 101	0.96
1% DNCB	0	3126 \pm 136	-
	0.1	3050 \pm 291	0.98
	0.25	3174 \pm 162	1.02
	0.5	3155 \pm 117	1.01

次に、DNCBに感作したマウスの *in vitro* での惹起反応の1つであるリンパ球幼若化反応に対する HCHO 添加の効果調べた。DNCB と同じ抗原決定基を有する DNBS を用いて刺激する際に HCHO を先の試験と同様に添加して反応を比較した。96 時間培養した時の幼若化反応は HCHO の添加によって変化はなかった (表 2)。

未感作及び DNCB 感作マウスの脾臓リンパ球を 24~96 時間培養した時の上清中の IFN- γ 量を測定した結果を図 1 に示した。未感作の脾臓リンパ球では培養時間を延長しても産生される IFN- γ はほとんど増加しないが、DNCB 感作リンパ球では培養時間が長くなるにつれて IFN- γ 産生量が増加した。耳介 LNC についても同様の結果が得られた。よって、以降の実験では、最も差が大きくなる 96 時間培養後の上清を測定に用いることにした。また、DNCB に感作したマウス LNC は *in vitro* で DNBS を共存させると、先の幼若化に伴ってより多くの IFN- γ を産生した。一方、未感作マウスの LNC では DNBS を添加しても IFN- γ の産生はなく、この産生は抗原特異的な反応であることがわかった。そこで、感作 LNC を DNBS で刺激する際に HCHO が共存した場合、IFN- γ 産生量に変化が生じるかどうか調べた。表 3 に示したとおり、HCHO 未添加の場合とほとんど差はなかった。

TMA による I 型アレルギーの *in vitro* の反応として IL-4 の産生量を測定した。TMA 処理後、耳介リンパ節を取り出し、LNC を 24~96 時間培養した。経時的に IL-4 量は増加するが、著しいものではなかった。また、TMA 処理しても溶媒処理群とほとんど変化はなかった。次に、LNC に Con A 2 μ g/ml を添加して刺激したときの IL-4 量を測定した。Con A 刺激により IL-4 産生は著しく増加した。また、TMA 感作マウスの LNC からの Con A 刺激による IL-4 産生量は、溶媒のみで処理したマウスのそれよりも高い値を示した。24~96 時間培養したそれぞれの上清について測定した結果、24 時間培養後の上清で IL-4 量が最も高かった。先と同様、HCHO を共存下、Con A 刺激による TMA 感作マウスの LNC からの IL-4 産生量を測定した。しかしながら、HCHO 添加による増強などの効果は認められなかった (表 4)。

表2. 脾臓リンパ球幼若化反応に対するホルマリンの影響

Stimulant	HCHO conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Vehicle (AOC)-treated mice		DNCB-treated mice	
		$^3\text{HTdR}$ incorporation (Mean \pm SD, dpm)	Stimulation index	$^3\text{HTdR}$ incorporation (Mean \pm SD, dpm)	Stimulation index
-	0	1934 \pm 559	-	2612 \pm 243	-
	0.1	2846 \pm 1552	1.47	2838 \pm 281	1.09
	0.25	3150 \pm 973	1.63	1897 \pm 384	0.73
	0.5	3264 \pm 1534	1.69	2138 \pm 563	0.82
DNBS 100 $\mu\text{g/ml}$	0	2280 \pm 857	-	8446 \pm 916	-
	0.1	2589 \pm 206	1.14	8232 \pm 872	0.97
	0.25	2611 \pm 812	1.14	7306 \pm 861	0.86
	0.5	3245 \pm 241	1.42	8022 \pm 1174	0.95

Stimulation index is an increase in $^3\text{HTdR}$ incorporation in HCHO-added wells relative to that of no-added wells.

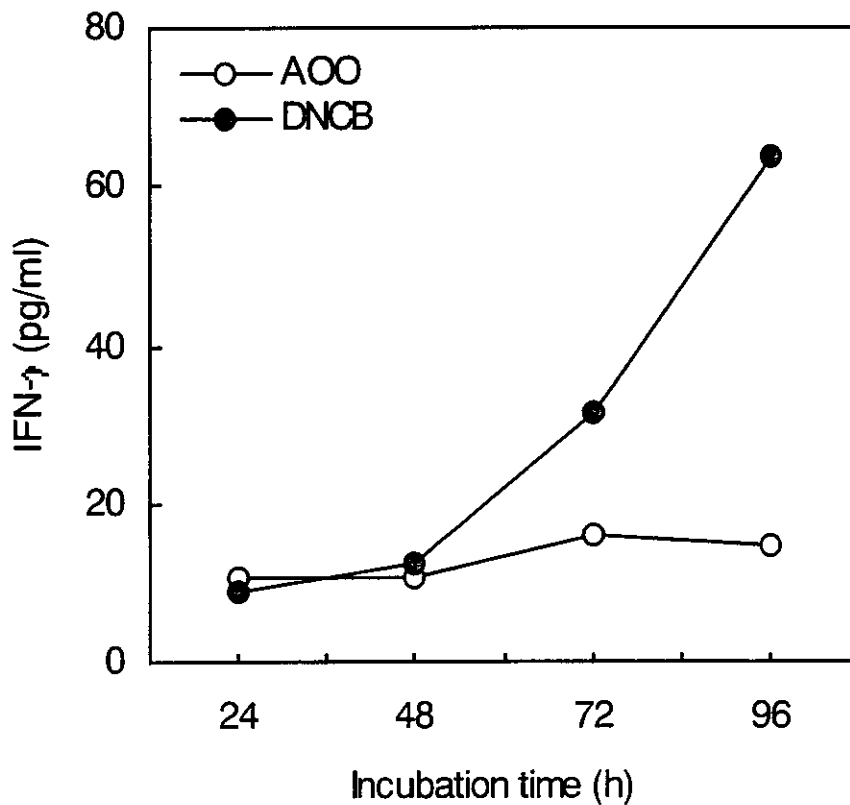


図1. 脾臓細胞からのIFN- γ 産生の経時変化

表3. DNCB感作したマウスリンパ節細胞 (LNC)のIFN- γ 産生に及ぼすホルマリンの影響

Simulant	HCHO conc. ($\mu\text{g/ml}$)	AOC-treated mice		DNCB-treated mice	
		IFN- γ (pg/ml)	Stimulation index	IFN- γ (pg/ml)	Stimulation index
-	0	4.2	-	4.8	-
	0.05	4.4	1.04	4.8	1.01
	0.1	5.1	1.22	5.0	1.05
	0.25	4.0	0.95	5.0	1.05
	0.5	4.4	1.04	5.3	1.11
Con A 2 $\mu\text{g/ml}$	0	13.5	-	18.9	-
	0.05	NT	NT	19.2	1.02
	0.1	NT	NT	12.9	0.68
	0.25	9.2	0.68	NT	NT
	0.5	9.3	0.69	21.0	1.12
DNBS 100 $\mu\text{g/ml}$	0	4.9	-	26.1	-
	0.05	4.7	0.96	30.7	1.18
	0.1	5.0	1.03	23.8	0.91
	0.25	3.7	0.77	32.7	1.25
	0.5	4.2	0.87	28.4	1.09

NT = not tested.

表4. TMA感作したマウスリンパ節細胞 (LNC)のIL-4産生に及ぼすホルマリンの影響

Stimulant	HCHO conc. (mg/ml)	24 h incubation		96 h incubation	
		IL-4 (pg/ml)	Stimulation index	IL-4 (pg/ml)	Stimulation index
-	0	20.9	-	47.0	-
	0.05	18.2	0.87	46.1	0.98
	0.1	16.5	0.79	48.9	1.04
	0.25	17.3	0.83	40.6	0.86
	0.5	18.5	0.88	42.5	0.90
A23187 1 mM	0	95.9	-	NT	
	0.05	127.6	1.33	NT	
	0.1	70.3	0.73	NT	
	0.25	96.0	1.00	NT	
Con A 2 mg/ml	0	53.4	-		
	0.05	44.6	0.84	NT	
	0.1	41.3	0.77	NT	
	0.25	36.8	0.69	NT	
	0.5	42.0	0.79	NT	

2. ホルムアルデヒドの *in vivo* 経皮塗布による前処理の影響

大気中のホルムアルデヒドは呼吸器系に加え、経皮的にも暴露される。そこで、今年度は HCHO の経皮暴露による影響を見ることにした。マウスに対するホルムアルデヒドの感作誘導能及び刺激濃度を考えて、2% HCHO のアセトン溶液を用いることにした。マウスの腹部に週 6 回、2 週間にわたって HCHO を連続塗布した後、TMA または DNCB で処置した。

感作誘導に対する HCHO 前塗布の効果を検討した。HCHO を経皮塗布後、LLNA 法に従って DNCB または TMA による耳介 LNC 増殖反応を測定した。HCHO 前処理群ではアセトン前処理群に比べ、AOO だけを耳に塗布した場合の $^3\text{HTdR}$ 取り込み量が若干高い値を示すことから、HCHO による免疫系の活性化が示唆された。TMA による LNC 増殖反応は HCHO で前処理したマウスの方がアセトンで前処理したマウスよりも著しく高かった。したがって、HCHO で前処理すると TMA による感作誘導が増強されることがわかった。一方、DNCB による LNC の増殖反応は HCHO 前処理によってわずかに増加したが、TMA ほど変化は大きくなかった。よって、HCHO は TMA による I 型アレルギーの感作誘導を増強するが、DNCB による IV 型アレルギーの感作誘導にはあまり影響しないことがわかった (表 5)。

次に MEST を用いて DNCB の *in vivo* 惹起反応に対する HCHO 前処理の効果を調べた (表 6)。1 回目の惹起において HCHO 群の耳の厚さの増加率はアセトン群に比べて小さかった。再惹起すると耳腫脹反応はより早く起き、その強度も強くなるが、HCHO 群の反応はアセトン群に比べて小さく、その差は 1 回目よりも大きかった。したがって、HCHO の前処理は DNCB 感作の惹起反応を逆に抑制する傾向があることがわかった。

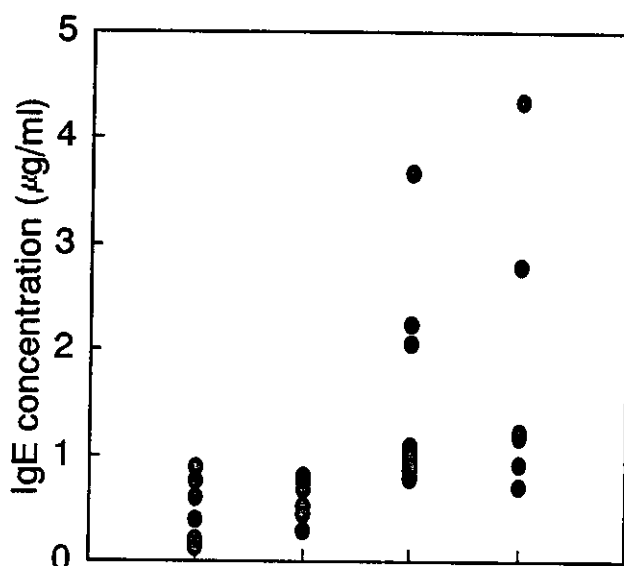
さらに、TMA による感作性反応の指標の 1 つとして、血清 IgE 抗体価を測定した。HCHO 処理しても血清 IgE 抗体価の増加は認めなかった。TMA で処理すると IgE 抗体価が上昇した。しかし、アセトン処理群と HCHO 処理群で、TMA による IgE 抗体価の増加に差はなく、HCHO 前処理による IgE 抗体産生に対する増強効果は認められなかった (図 2)。

表5. ホルマリンの前処理がTMA及びDNCBによるリンパ節細胞(LNC)の活性化反応に及ぼす影響

Pre-treatment	Chemical	Lymph node weight (mg)	LNC number (x 10 ⁶ cells)	LNC proliferation ³ HTdR incorporation (dpm)
Acetone	AOO	25.4	17.46	1045 ± 60
	10% TMA	68.8	64.86	59211 ± 2767
	1% DNCB	56.4	54.98	21305 ± 936
Formalin	AOO	24.6	13.83	2526 ± 181
	10% TMA	68.0	66.02	83095 ± 2991
	1% DNCB	56.4	59.41	26451 ± 1298

表6. ホルマリン前処理マウスとアセトン前処理マウスのDNCB惹起による耳腫脹反応

Pre-treatment	% increase in ear thickness (Mean±SD)		
	1st challenge		2nd challenge
	24 h after	48 h after	24 h after
Acetone	35.8 ± 15.1	47.6 ± 12.3	66.9 ± 28.6
HCHO	29.6 ± 8.8	44.3 ± 12.9	30.4 ± 14.2



Pre-treatment Acetone HCHO Acetone HCHO
Chemical AOO AOO TMA TMA

図2. ホルマリン前処理とTMA誘導血清IgE抗体価の変化