

# ホルムアルデヒド反復経気道暴露のモルモット喘息モデルに及ぼす影響に関する研究

|       |   |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2017-10-04<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者:<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/2297/9417">http://hdl.handle.net/2297/9417</a>               |

## ホルムアルデヒド反復経気道暴露のモルモット喘息モデルに及ぼす影響に関する研究

金沢大学医学部医学科内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

北 俊 之

ホルムアルデヒド (formaldehyde, FA) の生活環境下の吸入暴露が, アレルギー体質の誘因・増悪因子となっている可能性があり, 気管支喘息の発症頻度の増加や重症度との関連が示唆されている。しかし, その機序はまだ完全には解明されていない。本研究では, その機序を解明するため, モルモットのメサコリン誘発気管支収縮反応や抗原誘発気管支収縮反応に及ぼすFA反復経気道暴露の影響を検討した。無感作モルモットに, 0.1% FA, 1.0% FAあるいは生理食塩水を週3回, 6週間反復経鼻投与した後, メサコリン (50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ ) を5分間隔で順次吸入させた。次に, 同様のプロトコールにて, FAあるいは生理食塩水を反復経鼻投与したモルモットを, 抗原チャレンジの7日前に抗卵白アルブミン血清 (抗OA血清) を腹腔内投与して受動感作した。3番目のシリーズとして, モルモットをOAで能動感作し, FAあるいは生理食塩水を前述のプロトコールと同様の方法で反復経鼻投与した。麻酔下モルモットの気管支収縮反応の指標として, 気道内圧の側圧 (pressure at the airway opening, Pao) を測定した。能動感作モルモットの抗原誘発によるPaoの増加率の時間曲線は, FA投与により用量依存的に有意に増強された。しかし, メサコリンで誘発されたPaoの増加率の用量反応曲線と, 受動感作モルモットの抗原誘発によるPaoの増加率の時間曲線は, FA投与によって変化しなかった。受身皮膚アナフィラキシー (passive cutaneous anaphylaxis) 反応を用いて測定した抗OA血清抗体価 (IgG) は, 能動感作モルモットにおいて有意に上昇していた。これらの成績より, FAの気道内反復投与は, 抗原に対する感作を増強することによって, アレルギー性気管支収縮反応を増強させる可能性が示唆された。

**Key words** bronchial asthma, formaldehyde, transnasal exposure, enhancement of sensitization

近年, 喘息, アトピー性皮膚炎, アレルギー性鼻炎などのアレルギー疾患の有病率が増加している。ダニ, カビ, 食物などの様々な抗原 (アレルゲン) がこれらアレルギー疾患の原因と考えられているが, 新築家屋などで接着剤の材料に多用されている揮発性有機化合物, とくにホルムアルデヒド (formaldehyde, FA) が, その症状を増悪させ「アレルギー体質」を作る誘因・増悪因子になっている可能性がある。FAによる喘息は, 毛皮染色業者やゴム靴製造業者などに発症することが以前より知られている<sup>1)</sup>。また, 医療関係では, 人工透析器具の消毒にFAを用いていた看護婦が喘息反応を起こした事例が報告されている<sup>2)</sup>。このように, FAの人体に及ぼす影響は, 以前は職業上の暴露による急性中毒が問題とされていたが, 近年では, 生活環境下においてFAを発生する接着剤や樹脂を使用した合板, 塗料, 繊維製品, 化学製品等の普及に加えて, 家屋構造の変化による気密性の高い住空間における生活様式が増加し, 日常生活での慢性暴露が問題となってきた<sup>3)4)</sup>。

ヒトの臨床研究では, 短期間のFA暴露によって中等度の肺機能障害が生じたと報告されている<sup>5)6)</sup>。職業上, 慢性的にFA

暴露を受けている非喫煙者の検討でも, 肺機能が障害されたと報告されている<sup>7)</sup>。しかしながら, 慢性的なFA暴露と呼吸器症状との関連はまだ明らかにされていない<sup>8)9)</sup>。ホルムアルデヒド喘息ではその成立機序として, FAによる気道への直接刺激作用, ホルムアルデヒドに対する免疫反応, FAの直接的ヒスタミン遊離作用などが示唆されている<sup>10)</sup>。

最近の研究では, FAに暴露したマウスにおいて, 経鼻的に投与された抗原に対する特異的IgE抗体価が高かったとの報告<sup>11)</sup>や, モルモットに低濃度のFAを暴露すると, アレルゲンに対する感作が増強したとの報告がなされている<sup>12)</sup>。しかしながら, FA暴露による気管支収縮反応と免疫学的反応への影響や, これらの関連に関する報告はみられない。そこで本研究ではモルモットの喘息モデルを用いて, FA反復経鼻暴露が抗原誘発気管支収縮反応と気道過敏性に及ぼす影響について検討した。さらに, 受身皮膚アナフィラキシー (passive cutaneous anaphylaxis, PCA) 反応を用いて抗原に対するIgG抗体価を測定し, FA反復暴露の免疫学的反応に及ぼす影響についても検討した。

平成11年1月11日受付, 平成11年3月5日受理

Abbreviations: BAL, bronchoalveolar lavage; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; CFA, complete Freund's adjuvant FA, formaldehyde; IAR, immediate asthmatic response; OA, ovalbumin; Pao, pressure at the airway opening; PCA, passive cutaneous anaphylaxis

## 対象および方法

## I. 実験動物

体重250～350 gのハートレー系雄性モルモット（三共ラボ、東京）を購入し、金沢大学動物実験施設内の空調飼育施設（室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ ）で一週間以上飼育し、肉眼的観察により健康と判断した動物を実験に使用した。

## II. モルモットの抗卵白アルブミン (ovalbumin, OA) 血清の作製

Santivesら<sup>13)</sup>の方法に従って抗OA血清を作製した。すなわち総量500  $\mu\text{g}$ のOAを完全フロイントアジュバント (complete Freund's adjuvant, CFA) にてエマルジョンの状態にし、モルモットの両側鼠径部、両側腋窩部、項部の5箇所に分けて皮内注射した。2週間後同様の処置により追加免疫を行った。さらに2週間後採血し、血清を分離して同一容器に集めて均一化した後、小スピッツに分注して $-20^\circ\text{C}$ にて凍結保存した。作製した抗OA血清の4時間、24時間および7日後のPCA反応による抗体価は、それぞれ12,800倍、6,400倍および512倍であった。受動感作は実験の7日前に、抗OA血清1 ml/kgを腹腔内注射することにより行った。

## III. 実験装置および測定項目

実験は、既報の実験装置および方法を用いて実施した(図1)<sup>14)</sup>。すなわち、ペントバルビタール (sodium pentobarbital) (Abott Laboratories, Chicago, USA) 75 mg/kgの腹腔内投与によってモルモットを麻酔した後、仰臥位にて胸骨上縁より1横指頭側にて気管切開を行って気管カニューラを装着し、小動物用従量式レスピレーター (Model-1680, Harvard Co. Inc, South Natic, USA) を用いて陽圧換気を行った。気管カニューラは、ポリエチレン製で、外径2.5 mm、内径2.1 mmである。1回換気量は10 ml/kg、換気回数は毎分60回とした。気管支収縮反応の指標として、気管カニューラの側圧 (pressure at the airway opening, Pao) を圧差トランスデューサー (Model TP-603T, 日本光電, 東京) を用いて測定した。Paoは、実験中はX-Yレコーダーに連続的に記録し、実験終了後2分間隔で値を読み取った。

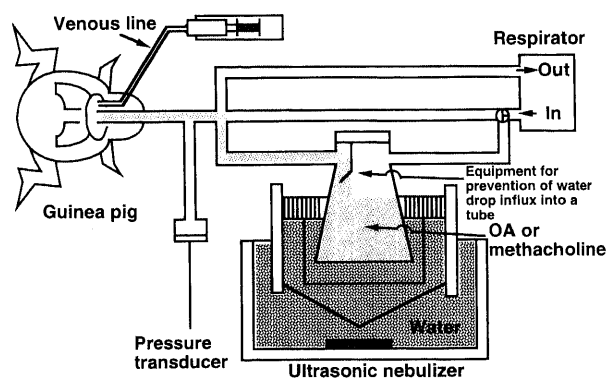


Fig. 1. Design of the experimental system. An anaesthetized guinea pig was placed in the supine position and the trachea was cannulated with polyethylene tube. The animal was artificially ventilated by a small animal respirator and nebulized with methacholine or ovalbumin (OA) solution. Pressure at the airway opening (Pao) was continuously recorded as an overall index of bronchial response using a pressure transducer and an X-Y recorder.

Paoの変化は、気管支収縮反応を中枢側から末梢側までの総和として反映する指標である<sup>14)</sup>。気管支収縮反応は、抗原吸入直前の値を基礎値としたPaoの増加率として表した。薬物の吸入投与は、南らが開発した超音波吸入器を改良した小動物用吸入負荷装置を使用し、Paoの安定を15分間確認してから、呼吸状態を変化させることなく安静換気下で吸入することにより行った<sup>15)</sup>。エアゾールの発生量は15.2  $\mu\text{g}/\text{分}$ であり、その46.4%がモルモットの肺に沈着する<sup>15)</sup>。薬剤の腹腔内投与は、当教室で開発した腹腔内投与器を用いて確実に投与した。なお、モルモットに各種薬物の溶液またはそれぞれの対照液としての溶媒を静脈内投与する際は、液量負荷を一定にするために1 ml/kgの投与量とした。

## IV. OA能動感作モデルの作製

東田<sup>16)</sup>の方法に準じてOA能動感作モデルを作製した。すなわち、モルモットにシクロフォスファミド (cyclophosphamide) (塩野義製薬, 大阪) 30 mg/kgを腹腔内注射し、2日後にOA (Sigma Grade V) 2,000  $\mu\text{g}$ とアジュバントとして水酸化アルミニウム (和光純薬工業, 大阪) 100 mgを腹腔内注射した。さらにその3週間後に、追加免疫として、OA 10  $\mu\text{g}$ と水酸化アルミニウム 100 mgを腹腔内注射した。追加免疫後3週目に、能動感作モデルとして実験に使用した。

## V. FA反復経鼻暴露の方法

FA (和光) を生理食塩水に溶解し、0.1%のFA溶液と1.0%のFA溶液を準備した。各濃度のFA溶液250  $\mu\text{l}/\text{kg}$ を、エッペンドルフ・ピペットを用いてモルモットの右鼻腔内に2回に分けて静かに注入した。週3回、6週間 (合計18回)、同様の経鼻投与を行った。各々の処置中、モルモットはジエチルエーテル (和光) で軽麻酔した。対照として生理食塩水250  $\mu\text{l}/\text{kg}$ を同様に注入した。第18回目の経鼻投与から48時間後に、モルモットを実験に用いた。

## VI. 気管支肺胞洗浄

気管切開後に挿入した気管カニューラから、室温の無菌生理食塩水10 mlを注入して低圧持続吸引する操作を2回繰り返して、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) を採取した。BALFは回収直後にガーゼで濾過し、1,000 rpmで10分間遠心した後に、沈渣をRPMI-1640培養液 (Grand Island Biological Co., Grand Island, USA) 3 mlに再浮遊させた。BALF総細胞数は、細胞浮遊液100  $\mu\text{l}$ を同量のチュルク染色液に混じて、パーカーチュルク型計算板を用いて算定した。また、細胞分画は、細胞浮遊液100  $\mu\text{l}$ をサイトスピン2 (Shandon Southern Products Ltd., Cheshire, England) を用いて800 rpmで8分間遠心して塗抹標本を作製し、メイギムザ染色を施して光学顕微鏡下に気道上皮を除く細胞を300個観察して算定した。

## VII. 実験プロトコール

## 1. FA反復経鼻投与の気道過敏性に対する影響

メサコリン (和光) を生理食塩水で溶解し、50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のメサコリン溶液を準備した。無感作のFA反復経鼻モルモット (0.1%, n=11; 1.0%, n=11) に対し、それぞれ低濃度メサコリン溶液より5分間隔で20秒間吸入負荷し、Paoの変化を観察した。対照群として無感作の生理食塩水反復経鼻モルモット11匹を使用した。

## 2. FA反復経鼻投与の即時型喘息反応 (immediate asthmatic response, IAR) に対する影響

## 1) 受動感作モルモットにおける影響

実験の7日前に受動感作したFA反復経鼻モルモット (0.1%, n=6; 1.0%, n=8) に対し、生理食塩水で溶解して1 mg/mlの濃度に調整したOA溶液を30秒間吸入負荷し、Paoの変化を30分間観察した。対照群として同様に受動感作した生理食塩水反復経鼻モルモット6匹を使用した。

#### 2) 能動感作モルモットにおける影響

初回OA投与より6週間FAを反復経鼻投与した能動感作FA反復経鼻モルモット (0.1%, n=11; 1.0%, n=11) に対し、生理食塩水で溶解して1 mg/mlの濃度に調整したOA溶液を30秒間吸入負荷し、Paoの変化を30分間観察した。対照群として同様に能動感作した生理食塩水反復経鼻モルモット11匹を使用した。

#### 3. FA反復経鼻投与のIAR後のBALF細胞成分に及ぼす影響

##### 1) 受動感作モルモットにおける影響

実験の7日前に受動感作したFA反復経鼻モルモット (0.1%, n=6; 1.0%, n=8) に対し、OA (1 mg/ml) 溶液を30秒間吸入負荷し、30分後に気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage, BAL) を行った。対照群として同様に受動感作した生理食塩水反復経鼻モルモット6匹を使用した。

##### 2) 能動感作モルモットにおける影響

能動感作したFA反復経鼻モルモット (0.1%, n=11; 1.0%, n=11) に対し、OA (1 mg/ml) 溶液を30秒間吸入負荷し、30分後にBALを行った。対照群として同様に能動感作した生理食塩水反復経鼻モルモット11匹を使用した。

#### 4. 抗OA-IgG抗体価の測定

PCA反応の常法にしたがって行った。すなわち、FA (0.1%, n=11; 1.0%, n=11) あるいは生理食塩水 (n=11) を反復経鼻投与した能動感作モルモットに対し、OA溶液を吸入させることによりIARを惹起させ、30分後に頸動脈より採血した血液を2,000 rpmで10分間遠心して得られた血清を倍々希釈し、その0.1 mlずつを体重300~400 gのHartley系雄性モルモットの両側背部に皮内注射した。血清注射の48時間後に、5 mgのOA, 1% エバンスブルー (和光) および生理食塩水の混合液0.5 mlをモルモットの右内頸静脈内に投与して反応を惹起した。30分後に、モルモットの頭部を強打して屠殺し、腹部正中線にそって切開し、皮膚を剥離した。皮膚内面から反応の指標として青色斑を測定し、直径5 mm以上の青色斑を呈する最終希釈倍数の逆数をもってPCA抗体価とした。

#### VII. 使用薬物

使用した薬物は以下のとおりである。すなわちOA (Sigma, Basel, Switzerland), CFA (Difco Laboratories, New York, USA), ペントバルビタール (sodium pentobarbital) (ネプタール®注射液, Abbott Laboratories, Chicago, USA), メサコリン (methacholine) (和光), ホルムアルデヒド (formaldehyde solution) (和光), ジエチルエーテル (diethyl ether) (和光), エバンスブルー (Evans blue) (和光)。

#### IX. 統計学的解析

成績はすべて平均値±標準誤差で表した。抗原吸入前のPaoの基礎値、Paoの基礎値からの任意の時点の増加率およびPaoの最大増加率の差の検定と、BALF中の細胞数、細胞分画比率およびPCA反応による抗体価の差の検定には、3群以上の場合にはKruskal-Wallis検定を、2群の場合にはMann-WhitneyのU検定を用いた。各実験における抗原吸入後のPaoの基礎値からの増加率の経時的変化に関する差の検定には、繰り返し測定

ある分散分析 (analysis of variance, ANOVA) を用いた。両側検定にて危険率5%以下を有意差ありと判定した。

## 成 績

#### 1. FA反復経鼻投与の気道過敏性に対する影響

メサコリン吸入直前のPaoの値は、0.1% FA反復経鼻投与群  $9.7 \pm 0.1$  cmH<sub>2</sub>O, 1.0% FA反復経鼻投与群  $9.6 \pm 0.2$  cmH<sub>2</sub>O, 対照群  $9.9 \pm 0.3$  cmH<sub>2</sub>Oであり、3群間に差を認めなかった。メサコリン吸入後のPaoの増加率の用量-反応曲線を図2に示した。吸入メサコリン濃度200 μg/mlのメサコリン吸入時のPaoの増加率は、0.1% FA, 1.0% FAおよび生理食塩水を反復経鼻投与した各群において、 $158.1 \pm 44.6\%$ ,  $150.0 \pm 42.3\%$  および  $182.7 \pm 31.4\%$  であり、各群間に有意差を認めなかった。50 μg/ml および100 μg/mlのメサコリン吸入時のPaoの増加率も、各群間に有意差を認めなかった。

#### 2. FA反復経鼻投与のIARに対する影響

##### 1) 受動感作モルモットにおける影響

抗原吸入直前のPaoの値は、0.1%または1.0%のFAあるいは生理食塩水を反復経鼻投与した群で、それぞれ  $9.5 \pm 0.2$  cmH<sub>2</sub>O,  $10.5 \pm 0.2$  cmH<sub>2</sub>O,  $10.2 \pm 0.4$  cmH<sub>2</sub>Oであり、各群間に有意差を認めなかった。抗原吸入後のPaoの増加率の時間経過を図3に示した。抗原吸入後のPaoの最大増加率は、0.1%または1.0%のFAまたは生理食塩水を反復経鼻投与した群において、それぞれ  $376.7 \pm 46.1\%$ ,  $368.0 \pm 36.4\%$ ,  $394.3 \pm 10.6\%$  であり、各群間に有意差を認めなかった。

##### 2) 能動感作モルモットにおける影響

抗原吸入直前のPaoの値は、0.1%または1.0%のFAまたは生理食塩水を反復経鼻投与した群において、それぞれ  $9.1 \pm 0.2$  cmH<sub>2</sub>O,  $9.1 \pm 0.2$  cmH<sub>2</sub>O,  $9.2 \pm 0.2$  cmH<sub>2</sub>Oであり、各群間に有意差を認めなかった。抗原吸入後のPaoの増加率の時間経過を図4に示した。抗原吸入後のPaoの最大増加率は、0.1%または1.0%のFAまたは生理食塩水を反復経鼻投与した群で各々  $302.5 \pm 30.2\%$ ,  $333.6 \pm 35.9\%$ ,  $214.8 \pm 13.6\%$  であり、0.1% および1.0% FA反復経鼻投与群が対照群に比較して有意に高値を示した (それぞれ  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ )。

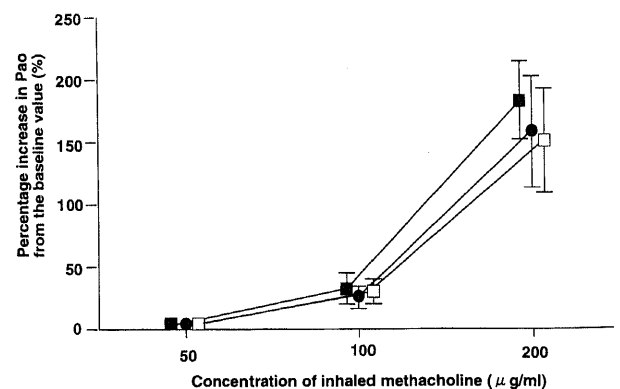


Fig. 2. Effect of repeated intranasal administration of formaldehyde on percentage increase in Pao caused by inhaled methacholine in non-sensitized guinea pigs. The group, treated with 0.1% formaldehyde (FA) (n=11) (●); treated with 1.0% FA (n=11) (□); treated with saline (n=11) (■). Each point indicates  $\bar{x} \pm$  SEM.

## 3. FA反復経鼻投与のIAR後のBALF細胞成分に及ぼす影響

## 1) 受動感作モルモットにおける影響

0.1%または1.0%のFAあるいは生理食塩水を反復経鼻投与した受動感作モルモット各群におけるBALF回収量は、それぞれ13.2±0.7 ml, 13.3±0.7 ml, 11.8±1.1 mlであり、有意差を認めなかった。BALF中の総細胞数に関しても、それぞれ(2.02±0.19)×10<sup>5</sup>細胞/ml, (1.73±0.49)×10<sup>5</sup>細胞/ml, (1.38±0.26)×10<sup>5</sup>細胞/mlであり有意差を認めなかった。細胞分画においても、それぞれの群間に有意差を認めなかった(図5)。

## 2) 能動感作モルモットにおける影響

0.1%または1.0%のFAあるいは生理食塩水を反復経鼻投与した能動感作モルモット各群におけるBALF回収量は、それぞれ

13.0±0.8 ml, 13.4±0.9 ml, 12.9±0.7 mlであり、有意差を認めなかった。BALF中の総細胞数に関しても、それぞれ(2.93±0.43)×10<sup>5</sup>細胞/ml, (2.97±1.15)×10<sup>5</sup>細胞/ml, (2.52±0.40)×10<sup>5</sup>細胞/mlであり、有意差を認めなかった。細胞分画でも、それぞれの群間に有意差を認めなかった(図6)。

## 4. 抗OA-IgG抗体価

0.1%または1.0%のFAあるいは生理食塩水を反復経鼻投与した能動感作モルモット各群における、PCA反応によるIgG抗体価の測定結果を図7に示す。0.1%FA, 1.0%FAまたは生理食塩水反復経鼻投与群のIgG抗体価は、それぞれ837.8±142.7倍, 1,256.7±333.7倍, 471.3±98.5倍であり、0.1%および1.0%FA反復経鼻投与群が対照群と比較して有意に高値を示した(それぞれp<0.05)。

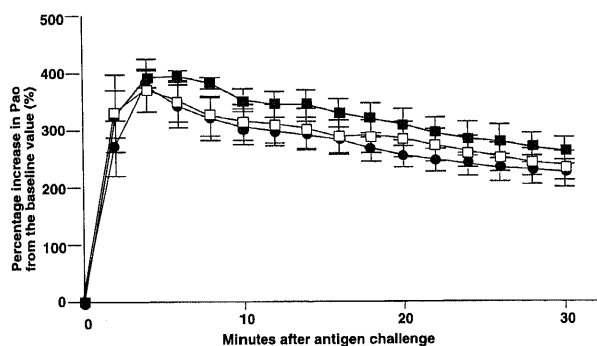


Fig. 3. Effect of repeated intranasal administration of formaldehyde and saline on percentage increase in Pao after inhalation of antigen in passively sensitized guinea pigs. Inhalation of OA as the antigen at 1 mg/ml. The group, treated with 0.1% formaldehyde (FA) (n=6) (●); treated with 1.0% FA (n=8) (□); treated with saline (n=6) (■). Each point indicates  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ .

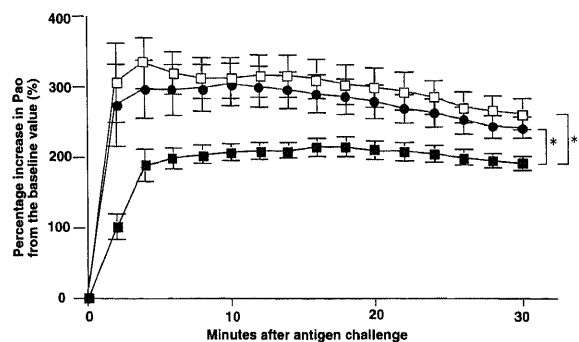


Fig. 4. Effect of repeated intranasal administration of formaldehyde and saline on percentage increase in Pao after inhalation of antigen in actively sensitized guinea pigs. Inhalation of OA as the antigen at 1 mg/ml. The group, treated with 0.1% formaldehyde (FA) (n=11) (●); treated with 1.0% FA (n=11) (□); treated with saline (n=11) (■). Each point indicates  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ . \*\* p<0.01, \* p<0.05 compared with saline treatment group analyzed by repeated measure analysis of variance (ANOVA).

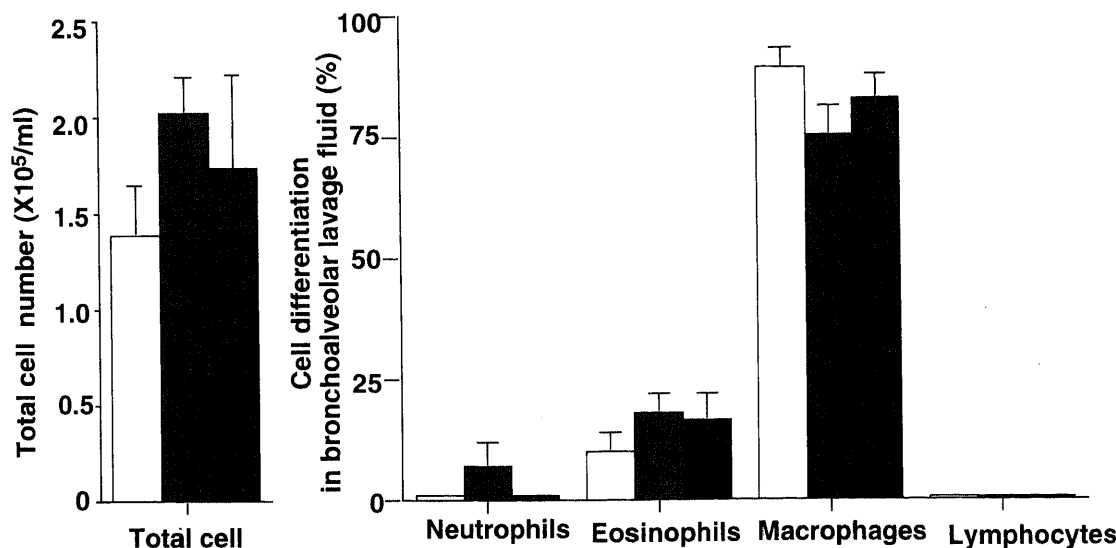


Fig. 5. Effect of formaldehyde (FA) on bronchoalveolar lavage cell component. Bronchoalveolar lavage was performed 30 minutes after antigen (OA) challenge in passively sensitized guinea pigs. Guinea pigs were divided into 3 groups, one group treated with 0.1% FA intranasally, one treated with 1.0% FA, and other treated with saline. Group: □, treated with saline (n=6); ●, treated with 0.1% formaldehyde (FA) (n=6); ■, treated with 1.0% FA (n=8). Each column indicates  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ .

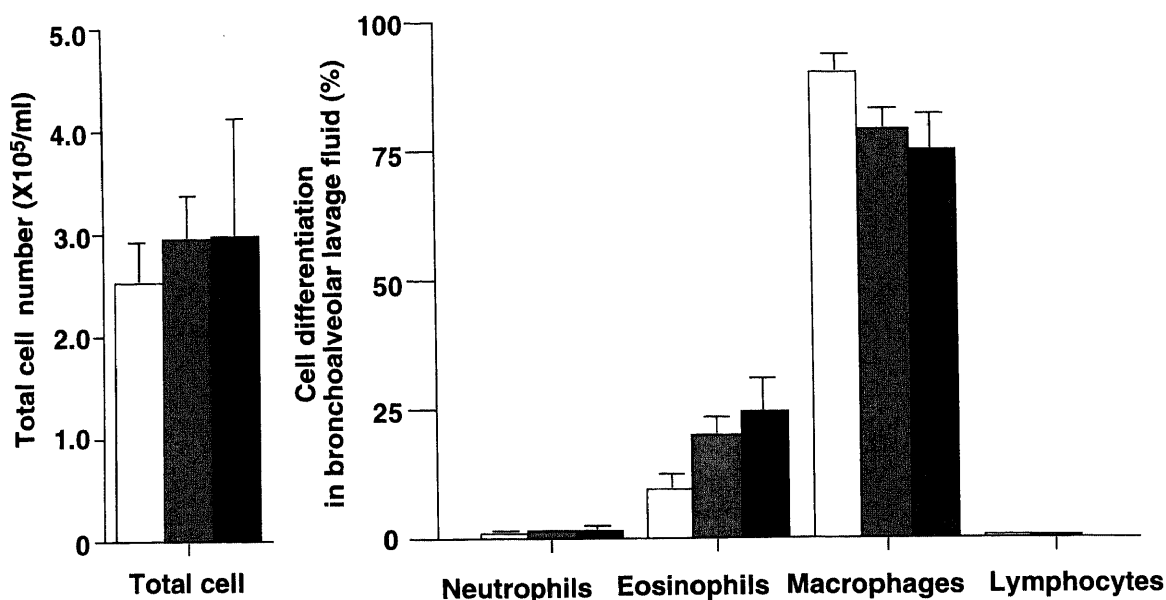


Fig. 6. Effect of formaldehyde (FA) on bronchoalveolar lavage cell component. Bronchoalveolar lavage was performed 30 minutes after antigen (OA) challenge in actively sensitized guinea pigs. Guinea pigs were divided into 3 groups, one group treated with 0.1% FA intranasally, one treated with 1.0% FA, and other treated with saline. Group: ■, treated with 0.1% formaldehyde (FA) (n=11); ▨, treated with 1.0% FA (n=11); □, treated with saline (n=11). Each column indicates  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ .

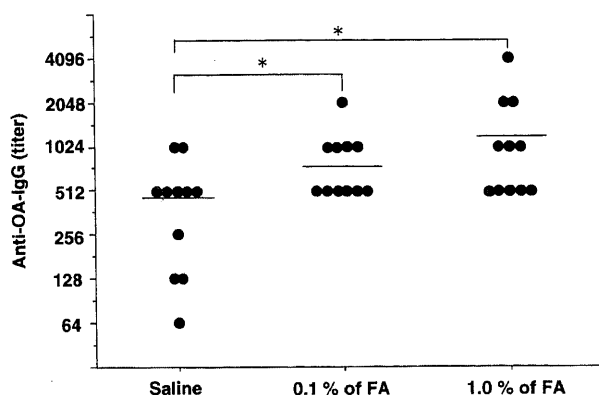


Fig. 7. Effect of formaldehyde (FA) on anti-OA IgG antibody titer in actively sensitized guinea pigs. The titer was assessed by passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reaction. Guinea pigs were divided into 3 groups, one group treated with 0.1% FA (n=11) intranasally, one treated with 1.0% FA (n=11), and other treated with saline (n=11). Each horizontal bar indicates median value. \* $p < 0.05$  compared with saline treatment group analyzed by Mann-Whitney's U test. OA, ovalbumin; FA, formaldehyde

## 考 察

気管支喘息はアレルギー反応と気道過敏性亢進の2つの基本病態から構成されている疾患であり、本疾患におけるアレルギー反応には Coombs と Gell の I 型アレルギー反応が関与し<sup>17)</sup>、外来アレルギーに対する IgE 抗体の産生、肥満細胞および好塩基球の細胞表面での IgE 抗体とアレルギーの反応による化学伝達物質の遊離、遊離されたヒスタミン、トロンボキサン A2 およびロイコトリエン等の化学伝達物質による組織反応、という

各段階から構成されている。一方、外来性気管支収縮物質に対する気管支平滑筋の易収縮性、すなわち気道過敏性亢進は、刺激受容体の感受性(咳感受性)とは相関がなく独立したものであり<sup>18)</sup>、アレルギーの関与が不明である内因型喘息においても認められる気管支喘息の生理学的基本病態である。そこで本研究では、FA のアレルギー性気管支収縮反応に及ぼす影響を、能動感作モルモットと受動感作モルモットに IAR を惹起させることによって検討した。また、気道過敏性については、無感作モルモットを用いてメサコリン気道反応性を測定して検討した。その結果、能動感作モルモットの抗原誘発による気管支収縮反応は、FA の反復投与により用量依存的に有意に増強された。しかし、メサコリンで誘発された気管支収縮反応の用量反応曲線と、受動感作モルモットの抗原誘発による気管支収縮反応は、FA の反復投与によって変化しなかった。PCA 反応を用いて測定した能動感作モルモットの抗 OA 血清抗体価 (IgG) は、FA の反復投与によって有意に上昇した。

FA は分子量 1,000 以下の低分子物質であり、感作性と刺激性を合わせ持つ物質 (micromolecular substances having both irritating and sensitizing properties) の一つとされ、気道への直接的刺激作用、感作物質としての作用、直接的ヒスタミン遊離作用の3つの作用があると考えられている<sup>11)19)</sup>。

ヒトを対象とした FA 急性暴露の検討では、5 ppm 以上の濃度では上部気道に対して直接的刺激作用があるとされている<sup>20)</sup>。気管支喘息患者に対しては、非特異的に気道を刺激し容易に発作を誘発しうる。一方、低濃度 FA の急性暴露に関しては、安静時と運動中に FA (2 ppm) を暴露した健康人<sup>21)</sup> と喘息患者<sup>22)</sup> では、呼吸機能に有意な変化を認めなかったと報告されている。しかし、3 ppm の暴露では、健康人では 55 分後に一秒量が 3.8% 低下したが、喘息患者では変化を認めなかったとも報告されている<sup>23)</sup>。これらの成績より、FA 急性暴露については、

健康人と気管支喘息患者では気道への直接的作用が異なると考えられる。

慢性暴露の検討では、Kilburnら<sup>7)</sup>が報告しているように、FA (0.2~1.9 ppm) を取り扱う業務に従事している50歳以上の健康人は、FAを取り扱う業務に携わっていない健康人と比較して、呼吸機能の低下が認められている。一方、Harvingら<sup>24)</sup>は、室内環境下の低濃度のFAを週1回、3週間連続して喘息患者に対して暴露させ、一秒量、気道抵抗、機能的残気量、喘息症状が暴露前後で変化しなかったと報告し、理由としてFAは上部気道で完全に除去され下部気道での反応が消失するためと考察している。すなわち、FAのヒト気管支に及ぼす影響は、急性暴露でも慢性暴露でも、喘息患者と健康者における気管支収縮反応に差異がみられ、作用機序の異なる可能性が示唆される。

FAの暴露を受けた労働者の免疫学的研究では、FA暴露による呼吸器系症状がFA人血清アルブミンに対するIgE、IgG抗体価と関連がなかったと報告されており<sup>25)26)</sup>、ヒトのFA喘息における免疫学的機序の関与は疑問視されている<sup>27)~29)</sup>。

実験動物を用いた気道過敏性の検討では<sup>30)</sup>、低濃度FA (0.3 ppm) を8時間暴露したモルモットのアセチルコリンに対する気管支収縮反応 (アセチルコリン気道過敏性) は有意に亢進し、高濃度FA (9.4 ppm) を2時間暴露したモルモットでも同様の所見が得られたと報告されている。そして、これらのアセチルコリン気道過敏性は、FA暴露後2時間から6時間で最大反応を示したが、24時間後では対照群に比較してごく軽度増加しているに過ぎなかったと報告されている<sup>30)</sup>。本研究では、Swiecichowskiら<sup>30)</sup>の研究とFAの暴露方法が異なるため、FA暴露の気道過敏性に対する影響について正確に比較することはできない。本研究では、FAの最終経鼻投与から48時間後に測定したメサコリン気道過敏性は変化していなかったが、Swiecichowskiら<sup>30)</sup>が報告したFA暴露後24時間以内にみられる気道過敏性亢進は、暴露48時間後には消失する可能性がある。すなわち、モルモットのFA反復経鼻暴露は、FA最終暴露から少なくとも48時間以上経過した時点では、気道過敏性を変化させないことが示唆された。

他方、FAは、1970年代以降、気道感作物質と考えられてきた。その蛋白質との結合能の強さと抗原性の強さが、感作物質としての可能性をより強めていた。FAに対する抗IgE抗体の存在は、ほとんどが症例報告に基づくものであった<sup>31)</sup>が、近年、低濃度のFAでも気道の感作を誘導することが報告された<sup>27)32)33)</sup>。また、FA暴露を受けた子供たちの間で、気管支喘息や慢性気管支炎が高頻度に発症する<sup>34)</sup>ことから、FAは高分子量アレルゲンの感作を促進している可能性も示唆されている<sup>1)</sup>。FAが高分子量アレルゲンの感作を助長する機序として、気道上皮の透過性亢進や免疫学的な抑制機構の破壊が挙げられる。一般に、上部気道の上皮細胞は、局所の免疫担当細胞と侵入してくる抗原との間の接触を制限するための重要な防御機構としての役割を演じている。しかしながら、いくつかの空中抗原には著明な溶解性があるため、健康人の気道上皮の防御壁でさえ貫通し侵入することが可能である<sup>35)</sup>。また、FAは気道内の粘液中では高い溶解性があり<sup>36)</sup>、FAの細胞毒性は気道上皮の細胞増殖を増加させること<sup>37)</sup>が、脆弱な気道上皮での免疫学的炎症反応を制御する抑制細胞に直接影響を及ぼしているのかもしれない<sup>1)</sup>。FAが抗原に対する免疫学的反応に対してど

のように影響を及ぼしているかについての実験的な証拠はないが、FA自体は感作物質そのものの作用と感作を促進する作用の2つの作用を有している可能性がある。

近年、TarkowskiとGorski<sup>11)</sup>が、OAを経鼻的に投与したマウスにFA (1.6 ppm) を10日間暴露すると、抗OA-IgE抗体が増加したと報告した。また、Riedelら<sup>12)</sup>は、モルモットに低濃度 (0.13~0.25 ppm) のFAを5日間暴露することによって、アレルゲンに対する感作を増強させたと報告している。本研究でも、FA反復経鼻投与は能動感作モルモットのIARを増強し、同時にOAに対するIgG抗体価を上昇させた。しかし、受動感作モルモットに対しては、IARを増強しなかった。これらの成績は、FA反復経鼻投与が、ケミカルメディエーターの放出能は変化させずに、OAに対する感作を増強することによってIARを増強することを示している。

次に、FA反復経鼻投与の抗原チャレンジ30分後のBALF細胞分画に及ぼす影響を検討した。受動感作モルモットも能動感作モルモットも、IAR後のBALF中の細胞分画はFA反復経鼻投与群と対照群の間に有意差を認めなかった。FA暴露がBALF細胞分画に及ぼす影響を検討した報告はないが、Riedelら<sup>12)</sup>の病理組織学的な検討では、FA吸入モルモットでは、下部気道には炎症所見を認めなかったと報告されている。またSwiecichowskiら<sup>30)</sup>は、0.3 ppmのFAを8時間暴露させた後のモルモットの気管上皮を病理学的に検討しているが、軽度の浮腫を認める以外、炎症所見を認めなかったと報告している。FA (10 ppm) を4時間暴露したラットの組織学的検討では、鼻粘膜の杯細胞容積の増加、細胞の脱落、線毛上皮の傷害が報告されている<sup>38)</sup>。すなわち、これらの動物実験から、FA暴露は上部気道に対しては、直接的な刺激作用があると同時に、病理学的検討からも上皮を傷害することが示唆される<sup>38)</sup>。一方、下部気道に対する直接的刺激作用に関しては、定説が得られていない。また、下部気道に対しては、病理学的には気道上皮の浮腫を起こす以外、炎症細胞浸潤等の変化を及ぼさないことから、FA暴露による下部気道の反応には直接的な刺激作用はそれほど関与していない可能性がある。

本研究では、ヒスタミン放出能に関する検討を行っていないため、FAのヒスタミン遊離作用については論証することはできない。また、本研究で用いたFA経鼻投与が、生活環境下のFA暴露のどのくらいに相当するのか不明である。そのため、生活環境下でのFA暴露の生体に及ぼす影響について、その作用機序を完全に解明するには至らなかった。しかし、FA反復経鼻投与が、メサコリン気道過敏性を変化させなかったこと、ケミカルメディエーターの放出能を変化させなかったこと、さらにPCA反応を用いて測定した抗OA-IgG抗体価を上昇させたことから、FAの慢性経鼻道的暴露は抗原に対する感作を増強し、その結果アレルギー性気管支収縮反応を増強することが明らかとなった。すなわち、FAの生活環境下の暴露が、人の「アレルギー体質」の発現や増悪に関与し、気管支喘息の発症頻度の増加や重症化に関与している可能性が示唆された。今後は、これらの機序を解明するために、慢性吸入暴露や病理学的検討などの詳細な検討が必要と考えられた。

## 結 論

FAの慢性暴露が気道に及ぼす影響を明らかにするために、モルモットにFAを反復経鼻投与して以下の結果を得た。

1. FA反復経鼻投与は、無感作モルモットのメサコリン気道過敏性を変化させなかった。

2. FA反復経鼻投与は、受動感作モルモットの即時型喘息反応 (IAR) を変化させなかった。

3. FA反復経鼻投与は、能動感作モルモットのIARを用量依存的に増強した。また、受身皮膚アナフィラキシー反応を用いた血清抗体価の検討では、FA反復経鼻投与は、抗卵白アルブミン-IgG抗体価を上昇させた。

4. FA反復経鼻投与は、受動感作モルモットならびに能動感作モルモットのIAR後の気管支肺胞洗浄液細胞成分に変化を与えなかった。

以上より、FAの反復経鼻投与は、モルモットの抗原に対する感作状態を増強させることにより、アレルギー性気管支収縮反応を増強させることが示唆された。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会と御校閲を賜った恩師松田 保教授ならびに、終始温かく御指導・御鞭撻いただきました藤村政樹講師に深甚なる謝意を表します。同時に御指導・御協力をいただきました当教室呼吸器グループの明 茂治博士ならびに諸先生方に深謝いたします。

本論文の要旨の一部は、第47回および第48回日本アレルギー学会総会ならびに第16回国際アレルギー臨床免疫学会において発表した。

#### 文 献

- 1) 小林節雄. 職業性呼吸器アレルギー. 呼吸器疾患の治療 (藤田監修), 初版, 339-359頁, 羊土社, 1986
- 2) Hendrick DJ, Lane DJ. Occupational formalin asthma. *Br J Ind Med* 34: 11-18, 1977
- 3) 土井まつ子, 石黒彩子, 伊藤 泉, 鳥居新平, 柴田英治. 日常生活におけるホルムアルデヒド暴露. *公衆衛生* 55: 208-212, 1991
- 4) 鳥居新平, 石黒彩子. 都市室内環境と気管支喘息. *アレルギーの臨床* 14: 21-23, 1994
- 5) Horvath EP, Anderson H Jr, Pierce WE, Hanrahan L, Wendick JD. Effects of formaldehyde on the mucous membranes and the lung. *JAMA* 259: 701-707, 1988
- 6) Sauder LR, Chatham MD, Green DJ, Kulle TJ. Acute pulmonary response to formaldehyde exposure in healthy nonsmokers. *J Occup Med* 28: 420-424, 1986
- 7) Kilburn KH, Warshaw R, Thornton JC. Pulmonary function in histology technicians compared with women from Michigan: effects of chronic low dose formaldehyde on a national sample of women. *Br J Ind Med* 46: 468-472, 1989
- 8) Levine RJ, DalCorso RD, Blunden PB, Battigelli MC. The effects of occupational exposure on the respiratory health of West Virginia morticians. *J Occup Med* 26: 91-98, 1984
- 9) Malaka T, Kodama AM. Respiratory health of plywood workers occupationally exposed to formaldehyde. *Arch Environ Health* 45: 288-294, 1990
- 10) 小林節雄. 職業性喘息. 原因物質と成立機序による分類. *日本臨床* 45: 125-134, 1987
- 11) Tarkowski M, Gorski P. Increased IgE antiovalbumin level in mice exposed to formaldehyde. *Int Arch Allergy Immunol* 106: 422-424, 1995
- 12) Riedel F, Hasenauer E, Barth PJ, Kozirowski A, Riegler CHL. Formaldehyde exposure enhances inhalative allergic sensitization in the guinea pig. *Allergy* 51: 94-99, 1996
- 13) Santives T, Roska A, Hensley GT, Moore VL, Fink JV, Abromoff P. Immunologically induced lung disease in guinea pig. *J Allergy Clin Immunol* 57: 582-594, 1976
- 14) 藤村政樹. In vivo モルモットにおける slow-reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) による気道反応とステロイドの抑制作用. *アレルギー* 32: 365-375, 1983
- 15) 南 真司, 岡藤和博, 佐賀 努, 藤村政樹, 金森一紀, 宮保 進, 服部絢一, 川井 清. モルモットにおける定量式噴霧装置の開発. *日胸疾患誌* 21: 252-258, 1983
- 16) 東田有智. 気管支喘息の発症機序の実験的解明: 実験的2相性喘息モデルによる検討. *近畿大医誌* 14: 133-149, 1989
- 17) Coombs RRA, Gell PGH. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. *In* PGH Gell, RRA Coombs, PJ Lachmann (eds), *Clinical Aspects of Immunology*, 3rd, p 761-780, Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1975
- 18) 関沢清久. 気道におけるニューロペプチドの役割—ニューロペプチドと咳. *呼と循* 37: 483-485, 1989
- 19) Salvaggio JE. Overview of occupational immunologic lung disease. *J Allergy Clin Immunol* 70: 5-10, 1982
- 20) Gough M, Hart R, Karrh BW, Koestner A, Neal R, Parkinson D, Perera F, Powell KE, Rosenkranz HS. Report on the consensus workshop on formaldehyde. *Environ Health Perspect* 58: 323-381, 1984
- 21) Schachter EN, Witek TJ, Tosun T, Leaderer BP, Beck GJ. A study of respiratory effects from exposure to 2 ppm formaldehyde in healthy subjects. *Arch Environ Health* 41: 229-239, 1986
- 22) Witek TJ, Schachter EN, Tosun T, Beck GJ, Leaderer BP. An evaluation of respiratory effects following exposure to 2.0 ppm formaldehyde in asthmatics: Lung function, symptoms, and airway reactivity. *Arch Environ Health* 42: 230-237, 1987
- 23) Green DJ, Sauder LR, Kulle TJ, Bascom R. Acute response to 3.0 ppm formaldehyde in exercising healthy nonsmokers and asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 135: 1261-1266, 1987
- 24) Harving H, Korsgaard J, Dahl R. Low concentrations of formaldehyde in bronchial asthma: a study of exposure under controlled conditions. *Br Med J* 293: 310, 1986
- 25) Dykewicz MS, Patterson R, Cugell DW, Harris KE, Wu AF. Serum IgE and IgG to formaldehyde-human serum albumin: lack of relation to gaseous formaldehyde exposure and symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 87: 48-57, 1991
- 26) Vojdani A, Ghoneum M, Brautbar N. Immune alternation associated with exposure to toxic chemicals. *Toxicol Ind Health* 8: 239-254, 1992
- 27) Kramp JA, Peltenburg LTC, Kerklaan PRM, Spijksma FTM, Valentijn RM, Dijkman JH. Measurement of specific antibodies in individuals exposed to formaldehyde. *Clin Exp Allergy* 19: 509-514, 1989
- 28) Pross HF, Day JH, Clark RH, Lees REM. Immunologic studies of subjects with asthma exposed to formaldehyde and urea-formaldehyde foam insulation (UFFI) of products. *J Allergy*



- Clin Immunol 79: 797-810, 1987
- 29) Grammer LC, Harris KE, Cugell DW, Patterson R. Evaluation of a worker with possible formaldehyde-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 92: 29-33, 1993
- 30) Swiecichowski AL, Long KL, Miller ML, Leikauf GD. Formaldehyde-induced airway hyperreactivity in vivo and ex vivo guinea pigs. *Environ Res* 61: 185-199, 1993
- 31) Maurice F, Rivory JP, Larsson PH, Johansson SG, Bousquet J. Anaphylactic shock caused by formaldehyde in a patient undergoing long-term hemodialysis. *J Allergy Clin Immunol* 77: 594-597, 1986
- 32) Matsumura Y. The effects of ozone, nitrogen dioxide, and sulfur dioxide on the experimental induced allergic respiratory disorder in guinea pigs. 1. The effects on sensitization with albumin through the airway. *Am Rev Respir Dis* 102: 430-437, 1970
- 33) Colizzo F, Krantz MJ, Fish JE, Hastie AT. Ciliated respiratory epithelial surface changes after formaldehyde exposure. *J Toxicol Environ Health* 35: 221-234, 1992
- 34) Krzyzanowski M, Quackenboss JJ, Lebowitz M. Chronic respiratory effects of indoor formaldehyde exposure. *Environ Res* 52: 117-125, 1990
- 35) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Dujvestijn AM, Vriesman PJC, Sminia T. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today* 13: 219-224, 1992
- 36) Mannix RC, Phalen RF, Walters RB, Kurosaki TT. Effects of sulfur dioxide and formaldehyde on particle clearance in the rat. *J Toxicol Environ Health* 12: 429-440, 1983
- 37) Swenberg JA, Gross EA, Randall HW, Barrow CS. The effect of formaldehyde exposure on cytotoxicity and cell proliferation. In Clary JJ, Gibson JE, Waritz RS (eds), *Formaldehyde Toxicology, Epidemiology and Mechanisms*, 1st ed, p225-236, Dekker, New York, 1983
- 38) Bhalla DK, Mahavni V, Nguyen T, McClure T. Effects of acute exposure of formaldehyde on surface morphology of nasal epithelia in rats. *J Toxicol Environ Health* 33: 171-188, 1991

**Potential of Allergic Bronchoconstriction in Guinea Pigs by Repeated in Vivo Exposure to Formaldehyde**  
Toshiyuki Kita, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 - J. J. J. Med Soc., **108**, 252 - 259 (1999)

**Key words** bronchial asthma, formaldehyde, repeated transnasal exposure, antigen sensitization

#### Abstract

While it is widely recognized that exposure to indoor formaldehyde (FA) may worsen an allergic constitution and may be a factor in increasing the incidence and severity of asthma attacks, the exact mechanism remains unclear. The present study was conducted to elucidate this mechanism. The effects of repeated exposure to FA on methacholine- and antigen-induced bronchoconstriction were studied in guinea pigs in vivo. Nonsensitized guinea pigs were transnasally treated with 0.1 or 1.0 % of FA or saline three times a week for 6 weeks, and increasing doses of methacholine (50, 100 and 200  $\mu$ g/ml) were inhaled at 5-minute intervals. Secondly, guinea pigs pretreated with transnasal administration of FA or saline by the same protocol were passively sensitized with anti-ovalbumin (OA) serum 7 days before antigen challenge. Thirdly, guinea pigs were actively sensitized with OA and pretreated with transnasal administration of FA or saline by the same protocol. The lateral pressure of the tracheal tube (Pao) was measured under anesthesia. The time course curve for antigen-induced increase in Pao in actively sensitized guinea pigs was significantly potentiated by the FA treatment in a dose dependent manner. However, the dose-response curve of methacholine-induced increase in Pao and the time course curve for antigen-induced increase in Pao in passively sensitized guinea pigs was not altered by the FA treatment. Transnasal administration of FA significantly increased the anti-OA homocytotropic antibody titer (IgG) in the serum as measured by passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reaction in the actively sensitized guinea pigs. These results suggest that repeated exposure to FA worsens allergic bronchoconstriction through enhancement of antigen sensitization.