

ホルムアルデヒド (formaldehyde) による NK 細胞の 活性化及び特異的 IgE, IgG の誘導に関する研究

具 然和¹⁾²⁾⁵⁾, 糸川由佳¹⁾, 増渕 崇¹⁾, 黒野有理¹⁾, Kwang-Ho CHO⁸⁾,
Jung-Sook CHOI⁷⁾, 中村 敬⁶⁾, Ihil-Bong CHOI²⁾, Ki-Mun KANG³⁾,
長谷川武夫¹⁾, 三浦俊宏¹⁾, 大嶋正己¹⁾, 鈴木郁功¹⁾, 石田寅夫⁴⁾⁵⁾

¹⁾ 鈴鹿医療科学大学 大学院 保健衛生学研究科

²⁾ Department of Radiation Oncology, Catholic University Medical College, Seoul, Korea

³⁾ Department of Therapeutic Radiology, Gyeongsang National University Hospital, Gyeongsang Institute of Health Sciences, Jinju, Korea

⁴⁾ 鈴鹿医療科学大学 鍼灸学部 鍼灸学科

⁵⁾ 鈴鹿医療科学大学 東洋医学研究所 (Hi-tech Research Center)

⁶⁾ 鈴鹿医療科学大学 健康管理センター

⁷⁾ Gyeongdo provincial college, Kyoungbook korea

⁸⁾ Department of Radiological Science, Catholic University of Deagu, College of Health Science, Deagu, Korea

キーワード: 住宅環境における化学物質, formaldehyde, NK 細胞, OVA 特異的 IgE

はじめに

最近では医学の発展と豊富な食生活により平均寿命が長くなっている。また生活環境の変化により、子供も屋内で生活する時間が長くなっている。このような生活及び住宅環境の人体への影響、特に体の不自由な老人や子供に対する影響が問題とされているが、いまだ生体に及ぼす影響を科学的実験に基づき統計的に解析された研究は少ない。ホルムアルデヒドガス (HCHO ガス) は無色で、刺激臭が強い化学物質であり、室内環境では建築資材である合板、パーティクルボー

ド、壁板、繊維板、それらに含まれている接着剤より室内に揮発する¹⁾。World Health Organization (WHO) によってホルムアルデヒド室内環境許容濃度は 0.08ppm 以下に保つよう推奨されているが、この根拠は主として感覚刺激を引き起こす濃度がその所以である²⁾。夏季ともなると、室温の上昇のため HCHO の揮発性が大幅に増大し、0.08ppm 以下に維持することは極めて困難な状態になる⁴⁾。しかも、児童の中には 0.08ppm の低濃度でさえ、流涙、鼻漏、くしゃみ等を訴える事例も報告され、類似の症状が発現するアレルギーとの関連性も指摘されつつある⁵⁾⁶⁾。こ

のように0.08ppmという濃度が室内環境において真に許容できる濃度であり、健康に何ら傷害を与えない濃度と判断しているWHOの推奨基準を疑問視する声が上がっている。

アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患や原因不明の皮膚炎と室内環境内にある化学物質との因果関係の解明が期待されている。本研究では、住宅環境の化学物質、ホルムアルデヒド (formaldehyde, FA) が生体に及ぼす影響、すなわち免疫能への影響 (たとえばIgEの産生増強) や血液生化学的、またその影響を及ぼすメカニズムを分析することにより、住宅環境と健康安全に関する基礎的な情報を提供することを目的とする。

方法

FA 暴露条件下でのマウスの飼育方法

実験動物は、雌4週目のC3Hマウス (日本SLC) を用いた。飼育は、次のような仕様で考案したFA所定濃度を維持する装置内で行った。この実験専用のケージを製作し、ケージの壁には、ホルムアルデヒドを付着させた合板を貼り付けた。ホルムアルデヒドの濃度による比較をするために、Control (合板なし)、低濃度 (合板2枚)、高濃度 (合板3枚) の3つのケージを用いた。FA濃度の設定を低濃度 (0.04ppm) と高濃度 (0.3ppm) に設定するような装置を作成した。アクリル透明樹脂で60×40×30cm (縦、横、高さ) の寸法で飼育箱を作成し、FAの所定濃度を付着させた合板を実験開始直後から飼育箱の壁に貼り付けた⁶⁾。実験期間は、5週まで行った。飼育は、12時間明、12時間暗条件とした。室温: 22 ± 2℃, 湿度: 60 ~ 65% である。飼料 (CA-1, 日本CLEA (株)) 及び水 (Top water) は、自由摂取させた。

FA 濃度測定方法

アクリル透明樹脂で60cm×40cm×30cm (それぞれ縦、横、高さ) のBOXの一箇所にDMPHカンレジフィルター設置した。BOXの中に低濃度の合板は、

縦40cm×横30cm, 2枚にし、高濃度の合板は、縦40cm×横30cm, 3枚設置した。さらにその中に通常のマウスケージを入れた。また、パーミエータを用いて、強制的にBOX内に2L/min) の割合で空気を注入した。その後、DMPHフィルターを回収し、溶剤により溶かして液体クロマトグラフィー (Shimazu; SCL-10A) で測定した。FA濃度の設定を低濃度 (0.04ppm) と高濃度 (0.3ppm) になるように設定した後、実験をスタートした。

C3H マウスの脾臓細胞数とNK細胞の活性度の測定

雌4週目のC3Hマウス (Control群: 10匹, Low Level FA群: 10匹, High Level FA群: 10匹) を用いて、専用の飼育箱で1週間飼育し、その後測定を行った。以下のNK細胞の測定方法は、Ebataらの方法に従って行った⁷⁾。

まず頸椎脱臼でマウスを殺し、体表面を70%アルコールで消毒した。滅菌したハサミとピンセットで表皮を切開し、脾臓を取り出した。クリーンベンチ内で滅菌した器具を用いて、滅菌した銅金属メッシュ上でヘラを用いてすり潰した。すり潰した脾臓細胞にPBS液10mlを加えて、顕微鏡にて細胞数を測定した。次にこれを遠心分離にかけた (1,500rpm, 3min)。細胞が下に溜まっているので、上液のPBS液を捨てて、RPMI1640培養液を加えて、 2×10^7 cells/mlになるようにした。脾臓細胞にPBS液10mlを加えて、細胞数を測定した。脾臓細胞 2×10^7 cells/ml と YAC-1, 10^7 cells/ml を反応させ、100 μ Ci の ^{51}Cr を加え、37℃で1時間 incubate した。RPMI1640培養液で3回洗浄後、標的細胞として使用した。RPMI1640培養液を加えて前述と同じ方法で標識細胞とを混合し、遠心分離し (1,500rpm, 3min)、インキュベータ内で4時間培養した。培養後、96穴平底マイクロプレートに100 μ l ずつ、各種細胞数 (A: 2×10^6 , B: 1×10^6 , C: 5×10^5 , D: 2.5×10^5 , E: 1.25×10^5) に分けて、24時間放置した。その後、放出された ^{51}Cr をガンマカウンターで測定した。

BALB/C マウスの血液中 Total IgE の測定

雌 4 週令の BALB/C マウスを用いた。飼育条件は、前と同様であった。実験開始直後にマウスの眼の血管から 1 回目の血液を採取し、その後の採取は 5 週間後に行った（血液の凝固を防ぐために、血液 0.2ml とヘパリン 0.4ml を合わせた）。IgE, IgG の測定は ELISA (Enzyme-linked immunoadsorbent assay) キット（㈱ヤマサ醤油）を用い、取り扱いキットのプロトコールに従って行った。採取した血液は遠心分離にかけた（1,500rpm, 3min）。次に試験管内の上液を取り除き、血清は冷凍庫で保管した。蒸留水と wash buffer を用いて、9:1 の割合で 500ml 作成し、血清を 8 倍に希釈した。次に、96 穴平底マイクロプレートを用い、標準（スタンダードのデモキットの指定濃度）（0.4, 2, 10, 50, 100, 250, 500ng/ml）各 100 μ l 分けて入れた。また、8 倍に希釈した血清も各 100 μ l をピペットで分けて入れた。96 穴平底マイクロプレートに血清をすべて入れ、乾燥を防ぐために水をはった容器の中に 30 分間放置した。その時容器の周りをアルミ箔などで覆い暗くした。30 分後、96 穴平底マイクロプレート内の血清を捨て、乾いた布などの上で十分に水分を切った。次に希釈した wash buffer をプレート内に約 100 μ l ずつ入れ洗った。これをまた捨てた。この洗浄を 3 回繰り返した。この作業が終わったら、Antibody-HRP を 100 μ l 入れた。乾燥を防ぐために水をはった容器の中に 30 分間放置した。その時容器の周りをアルミ箔などで覆い暗くした。30 分後、96 穴平底マイクロプレート内の Antibody-HRP を捨て、乾いた布などの上で十分に水分を切った。次に希釈した wash buffer を 96 穴平底マイクロプレート内に約 100 μ l ずつ入れた。これをまた捨てた。この洗浄を 3 回繰り返した。この作業が終わったら、TMB substrate を 100 μ l 入れた。乾燥を防ぐために水をはった容器の中に 15 分間放置した。この時容器の周りをアルミ箔などで覆わなかった。15 分後、96 穴平底マイクロプレート内の TMB は捨てずに、その中に stop solution を 100 μ l 入れた。EIA 用マルチプレー

トオートリーダーで波長 450nm の吸光度を測定した。

BALB/C マウスの血液中 Total IgE, OVA 特異的 IgE, Total IgG, OVA 特異的 IgG の測定

雌 4 週令の BALB/C マウスを用いた。飼育条件は、前と同様であった。

OVA 及び Al₂O₃ の投与方法

OVA (2mg/ml) になるように OVA を生理食塩水に溶解した。一方、Al₂O₃ は Al₂O₃ (30mg/ml) になるように生理食塩水に溶解した。そして調製した溶液を、BALB/C マウス 1 匹あたり 0.5ml 【(OVA 10 μ g + Al₂O₃ 2mg)/マウス】を腹腔内注射して、免疫完了とした。腹腔内注射は Control 群（無投与）、Control + OVA + Al₂O₃ 群（実験開始直後 OVA + Al₂O₃, 1 週間後 OVA のみ）、低濃度 + OVA + Al₂O₃ 群（実験開始直後 OVA + Al₂O₃, 1 週間後 OVA のみ）、高濃度 + OVA + Al₂O₃ 群（実験開始直後 OVA + Al₂O₃, 1 週間後 OVA のみ）に行った。

OVA 特異的 IgE の測定

Coating buffer と rat anti-mouse IgE 抗体を 200 μ g/12ml の割合で調製し、96 穴平底マイクロプレートに 100 μ l ずつ入れた。rat anti-mouse IgE 抗体は MCA (MigE) ME-01-DE Cat#YA7627 (200 μ l) ヤマサ醤油生化学工業製を用いた。また Coating buffer の調製は、Na₂CO₃ (1.59g) + NaHCO₃ (2.93g) に蒸留水を加え 900ml とした。pH 9.6 になるように、NaOH または HCl を用いて調製し、全体量を 1000ml とした。次に湿気を保つ容器に 96 穴平底マイクロプレートを入れ、37℃ で 2 時間 incubate した。その後、96 穴平底マイクロプレートを逆さにして Coating buffer を捨てた。そして Rinsing buffer を入れ、Sera washer で 96 穴平底マイクロプレートを上下 2 方向で 3 回ずつ洗浄した。Rinsing buffer の調製は、Block Ace を蒸留水で 10 倍に希釈したものを 1000ml 作成し、それに Tween-80 を 0.05% になるように加えた (0.5ml/1L)。

スタラーで攪拌して溶解した。Block Ace を蒸留水で 4 倍に希釈したものを、96 穴平底マイクロプレートに 200 μ l ずつ加え、室温で 1 時間 incubate した。Incubate 後 96 穴平底マイクロプレートを逆さにしてペーパーの上で水分を切った。Blocking buffer の調製は Block Ace (大日本製薬 cat#UK-B25) を蒸留水で 4 倍に希釈して用いた。次に Test serum anti-OVA whole rerum (test samples) を 2-fold で希釈し、各 well に 100 μ l 加え、2 時間室温で incubate した。Incubate 後、液を捨て Sera washer で 96 穴平底マイクロプレートを上下 2 方向で 3 回ずつ洗浄した。Rinsing buffer と OVA Biotin-Rat anti-mouse IgE を 20 μ l/12ml になるように作成し、96 穴平底マイクロプレートに 100 μ l ずつ加え、室温で 1 時間 incubate した。Incubate 後、液を捨て Sera washer で 96 穴平底マイクロプレートを上下 2 方向で 3 回ずつ洗浄した。次に Rinsing buffer と Streptavidin-horse peroxidase を 12 μ l/12ml になるように作成し、96 穴平底マイクロプレートに 100 μ l ずつ加えた。完全遮光して incubate した。1 時間室温で incubate した。Incubate 後、液を捨て Sera washer で 96 穴平底マイクロプレートを上下 2 方向で 4 回ずつ洗浄した。次に Substrate buffer を作成し、その 20ml に O-phenylenediamine を 20mg 加えた (アルミ箔で遮光)。Streptavidin-horse peroxidase は radishconjugate, ZYMED, S. SanFrancisco, CA, 2.5mg/2.0ml を用いた。Incubate 終了直前に、その溶液に H_2O_2 を 2.4 μ l 加えた。その調製液を各 well に 100 μ l ずつ加えた。室温で 30 分間遮光した容器に入れ incubate した。Substrate buffer の調製は citrate acid monohydrate 9.6g に蒸留水 400ml を加え pH4.5 に調製し、最終的に 500ml の溶液 (stock solution) を作成した。反応停止液 6N H_2SO_4 を各 well に 50 μ l ずつ加えた。EIA 用マルチプレートオートリーダーで波長 492nm の吸光度を測定した。

Total IgG の測定

Total IgE の測定と同じ血清を用いて実験を行っ

た。Coating buffer と anti-mouse IgG を 10 μ l/ml の割合で調整し、96 穴平底マイクロプレートに 100 μ l ずつ加えた。Coating buffer の調製は、 Na_2CO_3 (1.59g) + $NaHCO_3$ (2.93g) に蒸留水を加え 900ml とした。PH9.6 になるように、NaOH または HCl を用いて調製し、全体量を 1000ml とした。次に湿気を保つ容器に 96 穴平底マイクロプレートを入れ、37℃で 2 時間 incubate した。96 穴平底マイクロプレートを逆さにして、Coating buffer を捨てた。その後 Rinsing buffer を用い、Sera Washer で 96 穴平底マイクロプレートを洗浄して、上下 2 方向で 3 回ずつ洗浄した。Rinsing buffer の調製は、Block Ace を蒸留水で 10 倍に希釈したものを 1000ml 作成し、それに Tween-80 を 0.05% になるように加えた (0.5ml/1l)。スタラーで攪拌して溶解した。次に Block Ace を蒸留水で 4 倍に希釈したものを、96 穴平底マイクロプレートに 200 μ l ずつ加え、1 時間室温で incubate した。Incubate 後 96 穴平底マイクロプレートを逆さにしてペーパーの上で水分を切った。Blocking buffer の調製は Block Ace (大日本製薬 cat#UK-B25) を蒸留水で 4 倍に希釈して用いた。次に Rinsing buffer を用いて血清を 50 倍に希釈した。これを 96 穴平底マイクロプレートに 100 μ l ずつ加え、1 時間 37℃で incubate した後、希釈した血清を捨てた。そして Rinsing buffer を用い、Sera Washer で 96 穴平底マイクロプレートを洗浄して、上下 2 方向で 3 回ずつ洗浄した。次に anti-mouse IgG₁-HRP を 1200 倍に希釈した。これを 96 穴平底マイクロプレートに 100 μ l ずつ加え、1 時間 37℃で incubate した後、この液を捨てた。そして Rinsing buffer を用い、Sera Washer で 96 穴平底マイクロプレートを洗浄して、上下 2 方向で 4 回ずつ洗浄した。酵素反応を見るために、Substrate buffer を作成し、その 20ml に O-phenylenediamine を 20mg 加えた (アルミ箔遮光)。Streptavidin-horse peroxidase は radishconjugate, ZYMED, S. SanFrancisco, CA, 2.5mg/2.0ml を用いた。Incubate 終了直前に、その溶液に H_2O_2 を 2.4 μ l 加えた。その調製液を各 well に 100 μ l ずつ加えた。遮光した容器

に入れ、室温で 30 分間 incubate した。Substrate buffer の調製は citrate acid monohydrate 9.6g に蒸留水 400ml を加え pH4.5 に調製し、最終的に 500ml の溶液 (stock solution) を作成した。反応停止液 6N H_2SO_4 を各 well に 50 μl ずつ加えた。EIA 用マルチプレートオートリーダーで波長 492nm の吸光度を測定した。

OVA 特異的 IgG の測定

Total IgE の測定と同じ血清を用いて実験を行った。Coating buffer と OVA を 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ の割合で調整し、96 穴平底マイクロプレートに 100 μl ずつ加えた。Coating buffer の調製は、 Na_2CO_3 (1.59g) + NaHCO_3 (2.93g) に蒸留水を加え 900ml とした。pH9.6 になるように、NaOH または HCl を用いて調製し、全量を 1000ml とした。次に湿気を保つ容器に 96 穴平底マイクロプレートを入れ、37°C で 2 時間 incubate した。96 穴平底マイクロプレートを逆さにして、Coating buffer を捨てた。その後 Rinsing buffer を用い、Sera Washer で 96 穴平底マイクロプレートを洗浄して、上下 2 方向で 3 回ずつ洗浄した。Rinsing buffer の調製は、Block Ace を蒸留水で 10 倍に希釈したものを 1000ml 作成し、それに Tween-80 を 0.05% になるように加えた (0.5ml/1l)。スタラーで攪拌して溶解した。次に Block Ace を蒸留水で 4 倍に希釈したものを、96 穴平底マイクロプレートに 200 μl ずつ加え、室温で 1 時間 incubate した。Incubate 後 96 穴平底マイクロプレートを逆さにしてペーパーの上で水分を切った。Blocking buffer の調製は Block Ace (大日本製薬 cat#UK-B25) を蒸留水で 4 倍に希釈して用いた。次に Test serum anti-OVA whole serum (test samples) を 2-fold で希釈し、各 well に 100 μl 加え、2 時間室温で incubate した。Incubate 後、液を捨て Sera washer で 96 穴平底マイクロプレートを上下 2 方向で 3 回ずつ洗浄した。次に Rinsing buffer を用いて血清を 50 倍に希釈した。これを 96 穴平底マイクロプレートに 100 μl ずつ加え、37°C で 1 時間 incubate した後、希釈した血清を捨て

た。そして Rinsing buffer を用い、Sera Washer で 96 穴平底マイクロプレートを洗浄して、上下 2 方向で 3 回ずつ洗浄した。次に anti-mouse IgG₁-HRP を 1200 倍に希釈した。これを 96 穴平底マイクロプレートに 100 μl ずつ加え、1 時間 37°C で incubate した後、この液を捨てた。そして Rinsing buffer を用い、Sera Washer で 96 穴平底マイクロプレートを洗浄して、上下 2 方向で 4 回ずつ洗浄した。酵素反応を見るために、Substrate buffer を作成し、その 20ml に O-phenylenediamine を 20mg 加えた (アルミ箔遮光)。Streptavidin-horse peroxidase は radishconjugate, ZYMED, S. San Francisco, CA, 2.5mg/2.0ml を用いた。Incubate 終了直前に、その溶液に H_2O_2 を 2.4 μl 加えた。その調製液を各 well に 100 μl ずつ加えた。室温で 30 分間遮光した容器に入れ、incubate した。Substrate buffer の調製は citrate acid monohydrate 9.6g に蒸留水 400ml を加え pH4.5 に調製し、最終的に 500ml の溶液 (stock solution) を作成した。反応停止液 6N H_2SO_4 を各 well に 50 μl ずつ加えた。EIA 用マルチプレートオートリーダーで波長 492nm の吸光度を測定した。

統計解析

統計解析は、データは平均値 $\pm$ 標準偏差 (SD) で表した。2 群間平均値の統計的有意差の検定は t 検定で行い、 $P < 0.05$ をもって有意とした⁷⁾。

結果

1. C3H マウスの脾臓細胞数と NK 細胞の活性度

脾臓細胞の数は、Control 群 ($2.07 \times 10^7 \pm 0.26$) に対して、Low Level FA 群 ($2.36 \times 10^7 \pm 0.33$) では有意に高値を認め ($P < 0.05$)、High Level FA 群 ($1.68 \times 10^7 \pm 0.34$) では有意に低値を示した ($P < 0.005$) (Fig. 1)。このことから、FA の濃度により脾臓細胞の数に変動があることが認められた。また C3H マウスの脾臓細胞における NK 細胞の活性については、FA を経鼻的に 5 週間投与すると、NK 細胞が活性化

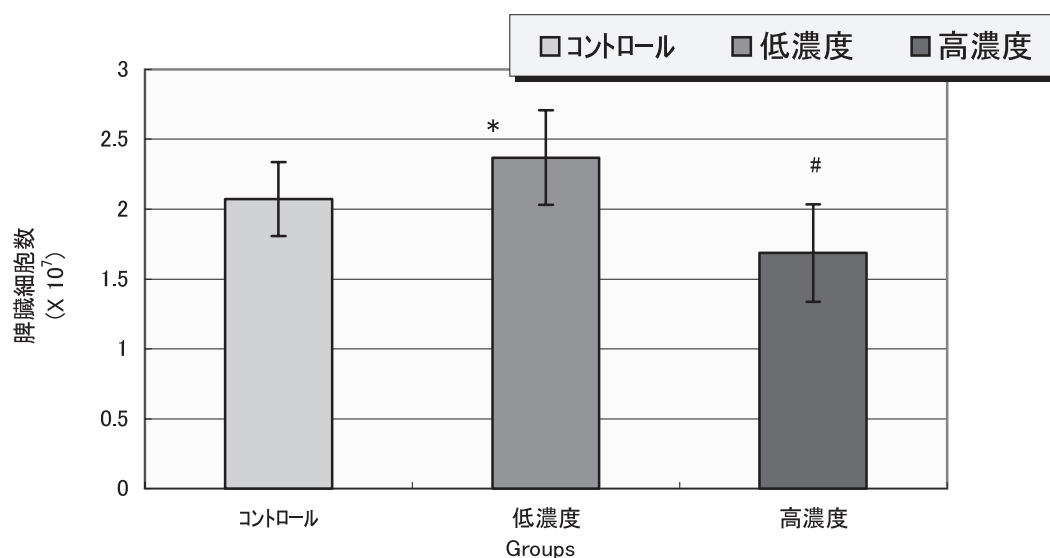


Fig. 1. FA の各濃度に対するマウスの脾臓細胞数の変化
P value ; **P* < 0.05, ***P* < 0.01, #*P* < 0.01

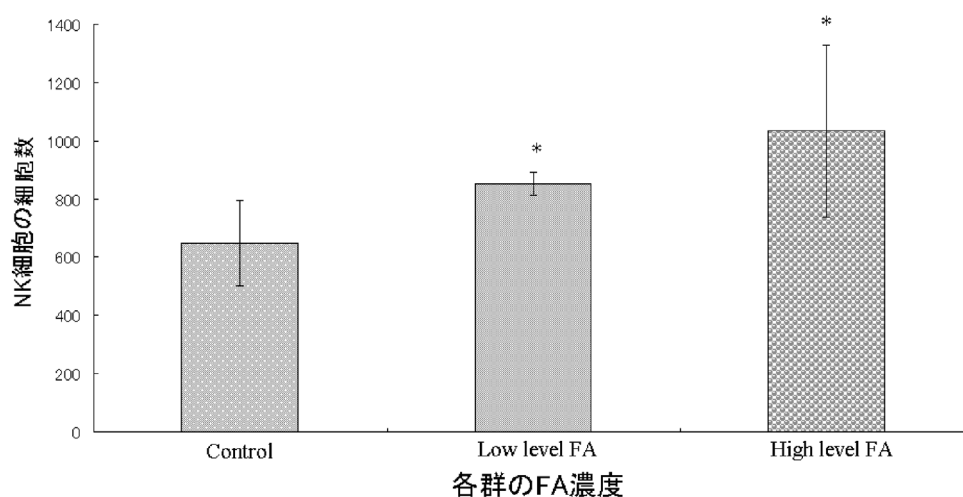


Fig.2. FA に対するマウス脾臓細胞の NK 細胞の活性度
P value ; **P* < 0.05, ***P* < 0.01

することを認める結果が得られた (Control 群 (657 ± 125), Low Level FA 群 (835 ± 46), High Level FA 群 (1168 ± 273) (Fig. 2)。

2. FA による BALB/C マウスの血液中総 IgE

Fig. 3 は 5 週目の総 IgE 値を示している。FA を経鼻的に 5 週間投与により, Control 群 (2.5 ± 12ng/ml) と Low Level FA 群 (19 ± 17ng/ml) と High Level FA 群 (15.9 ± 18ng/ml) 共に有意差が認められた (*P*

< 0.05)。以上のように, FA 濃度は総 IgE 値に変動を与えた (Fig. 3)。

3. FA による BALB/C マウスの血液の OVA 特異的 IgE

Fig. 4 は 5 週目の OVA 特異的 IgE 値を示している。FA を経鼻的に 5 週間投与により, Control 群 (8.1 ± 5.3ng/ml) と比べて OVA + Control 群 (13.8 ± 10ng/ml) に有意差が認められた (*P* < 0.05)。また,

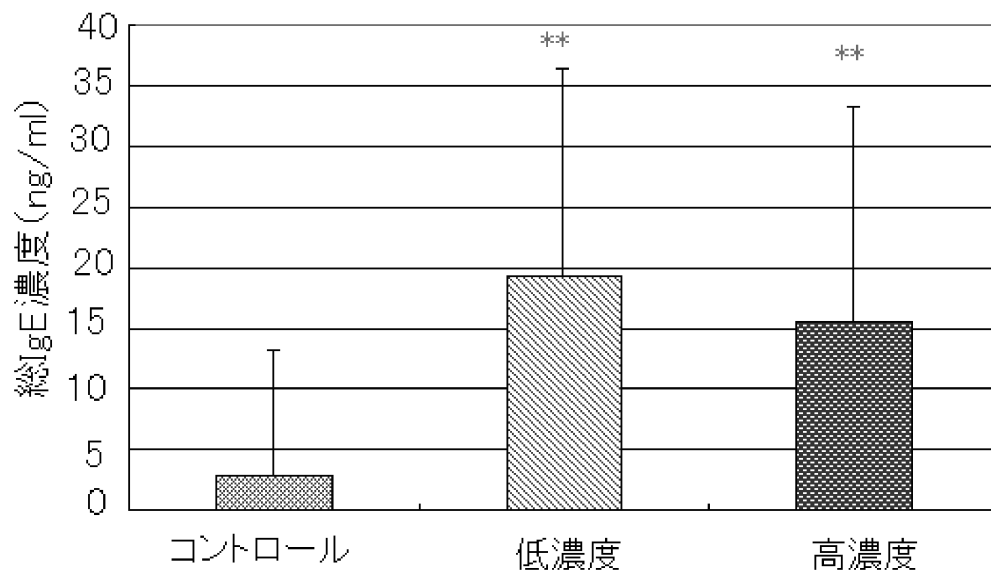


Fig.3. BALB/C マウスの血液における総 IgE

P value; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

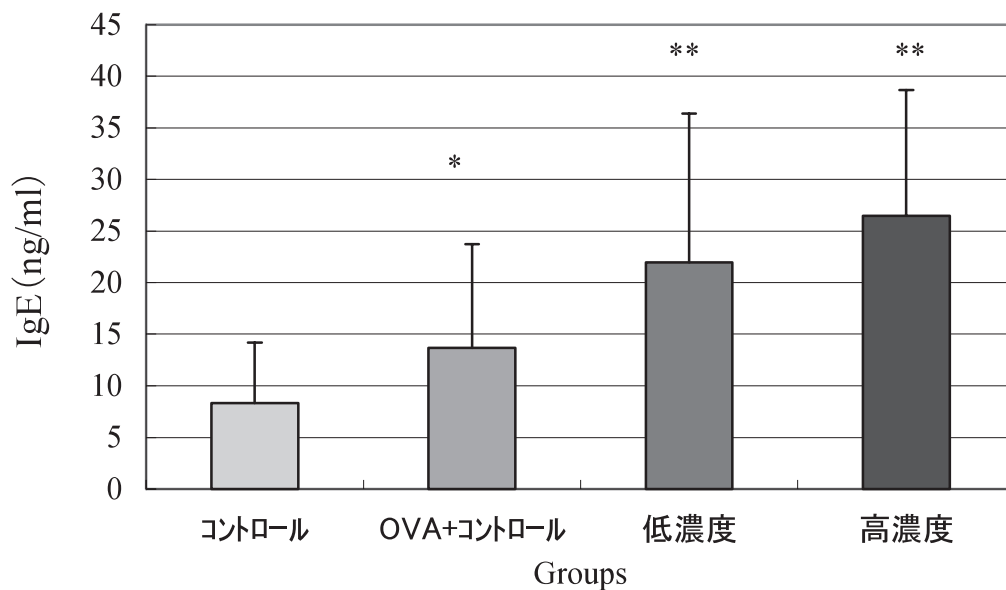


Fig.4. BALB/C マウスの血液における OVA + IgE (5 週目)

P value; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

OVA + Control に比べて OVA + Low Level FA 群 ($22 \pm 15\text{ng/ml}$) と OVA + High Level FA 群 ($26.8 \pm 13\text{ng/ml}$) 共に有意差が認められた ($P < 0.01$)。以上のように、OVA 特異的 IgE 値は FA 濃度依存的に増加した (Fig. 4)。

4. FA による BALB/C マウスの血液中 Total IgG の経時的変化

各群の 1 週目を基準として検定した結果、FA を経鼻的に 5 週間投与により、OVA + Control 群と比べて OVA + Low Level FA 群、OVA + High Level FA 群ともに有意差はなかった。2 週目では、OVA +

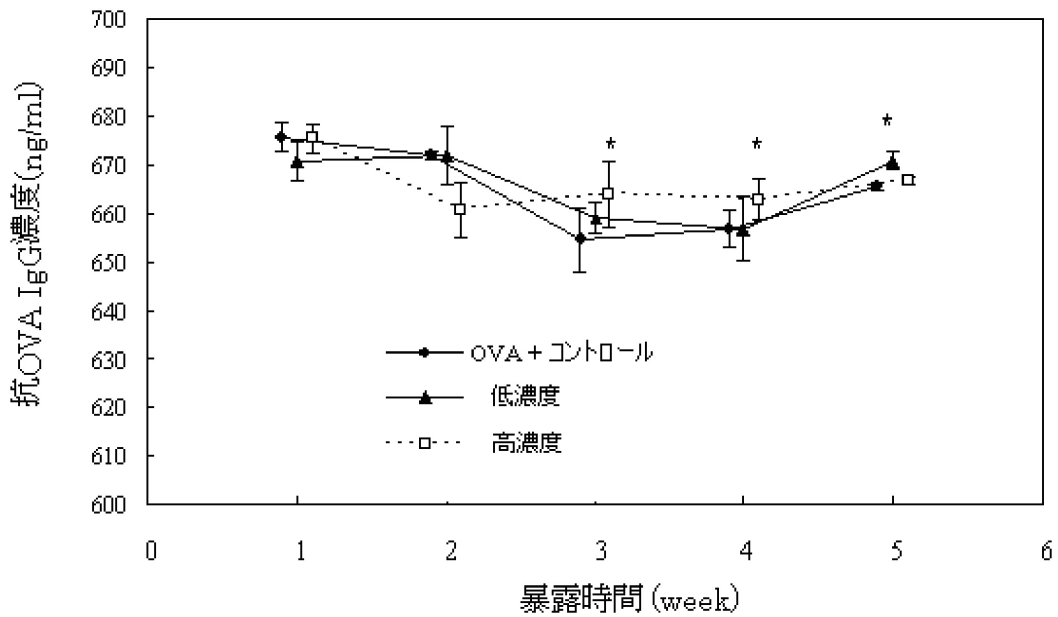


Fig.5. BALB/C マウスの血液における Total IgG (1-5 週目)

P value; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Control 群と比べて OVA + High Level FA 群では低値を示した。しかし、3-5 週目では、OVA + Control 群と比べて OVA + High Level FA 群では有意な増加が認められた ($P < 0.05$)。以上のように、FA による総 IgG 値は、OVA + High Level 群において変動を認めた (Fig. 5)。

考察

C3H マウスの脾臓細胞の数と NK 細胞の活性度

C3H マウスの脾臓細胞の数は、Control 群に対して、Low Level FA 群では高値を示し、High Level FA 群では低値を示した。また Low Level FA 群に対して High Level FA 群は低値を示した。このことは、C3H マウスに低濃度 (0.04ppm) の FA を 5 週間暴露することにより、脾臓細胞数の増加が認められたことを示す。最近、hormesis (ホルメシス) 論を示唆する報告がある⁸⁾。これは毒性物質が抑制濃度以下で生体に対して示す刺激効果のことであるが、本研究でも同様のことが推測できる。FA の濃度 (0.04ppm) が低い場合では、人体に悪影響を及ぼすのではなく、むしろ何

らかの機序により脾臓細胞を増加させる効果があるということである。また、FA の濃度 (0.3ppm) が高い場合では、脾臓細胞を減少させたことから、脾臓細胞の増減には、FA の濃度による閾値が存在すると示唆された。このことから、現在、WHO による FA の住居室内基準は 0.08ppm とされているが、今後の基礎的研究を重ねることで、得られる実験データに基づいた住居室内基準の設定が可能になると考えられる。

C3H マウスの脾臓細胞における NK 細胞の活性度は、Control 群に対して、Low Level FA 群と High Level FA 群ともに高値を示した。また、Low Level FA 群に対しても、High Level FA 群は高値を示した。このことから、FA を経鼻的に投与すると、NK 細胞が活性化することを認める結果が得られた。北らは、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することを示唆している⁹⁾¹⁰⁾。さらに、荒瀬らによれば、NKT 細胞を活性化すると通常の T 細胞や B 細胞そして NK 細胞が活性化され、NKT 細胞の活性化がその後の免疫応答に大きな影響を与えることが示唆されたと報告している¹¹⁾¹²⁾。本研究では FA により NK 細胞の活性化が認められたが、FA が

経鼻的に投与されてから、どのような機序で NK 細胞を活性化させたのか、検討を重ねる必要があると考えられる。

BALB/C マウスの血液中の総 IgE と OVA 特異的 IgE

BALB/C マウスの血液中総 IgE 測定のため、5 週目に採血を行った。その結果、Control 群と Low Level FA 群と High Level FA 群共に有意差が認められた。

Riedel らは、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、アレルギーに対する感作を増強させたと報告している¹³⁾。本研究において 5 週目の総 IgE 値は、各 FA 群で増加していた。このことから、BALB/C マウスに低、高濃度の FA を暴露することにより、IgE 産生を増加させることが認められたと考えられる。しかし、Riedel らの報告による FA の濃度 (0.13 ~ 0.25ppm) と本研究で用いた FA の OVA + Low Level FA 群の濃度 (0.125ppm) にはほとんど差はないのに、OVA + Low Level FA 群で総 IgE 値の増加が認められなかったことについて、今後、更なる研究を行う必要があると考えられる。

OVA 特異的 IgE に対しては、5 週目では OVA + Control 群と比べて OVA + Low Level FA 群と OVA + Low Level FA 群と OVA + High Level FA 群で有意差が認められた。Tarkowski と Gorski が OVA を経鼻的に投与したマウスに FA (1.6ppm) を 10 日間暴露すると、抗 OVA-IgE 抗体が増加したと報告している¹⁴⁾。橋本らは、OVA と同時に大気中の浮遊粒子物質 (suspended particulate matter: SPM) をマウスに経鼻的に 1 日 12 時間、5 週間にわたり暴露したところ、血清中抗原特異的 IgE の産生強調を示したと報告している¹⁵⁾。また小松らは、BALB/C マウスに OVA を腹腔内投与と経鼻的投与の両方から行い、血清 OVA-IgE の上昇を認め、Heme Oxygenase-1 (HO-1) がアレルギー性の炎症過程において組織障害に対する防御機構の 1 つとして関与している可能性

があるとし唆する報告をしている¹⁶⁾。Tarkowski らは、FA (1.6ppm) よりかなり低い濃度で、BALB/C マウスに低濃度 (0.125ppm) の FA を暴露することにより、OVA 特異的 IgE 産生を増加させたことが認められたと考えられる¹⁴⁾。また、FA は大気中に刺激臭を出すことから、橋本らの報告にある SPM と同じような働きがあっても不思議ではない¹⁵⁾。しかし、OVA + High Level FA 群の濃度 (0.5ppm) で OVA 特異的 IgE 値の増加が認められなかったことについて、今後、更なる研究を行う必要があると考えられる。

BALB/C マウスの血液中の総 IgG

BALB/C マウスの血液中の総 IgG 値は、各週ごとにそれぞれの群を検定した場合、週ごとに有意差の有無にばらつきが認められた。また経時的变化を各群の 0 週目を基準として検定した場合、Control 群では 1 ~ 3 週目、OVA + Control 群では 2 ~ 4 週目、OVA + Low Level FA 群では 2 ~ 3 週目、OVA + High Level FA 群では 1 ~ 4 週目で有意に低値を示した。Control 群に有意差が認められたのは、何らかのアレルギーに自然に暴露したためだと思われる。防御免疫を担う総 IgG 値は 0 週目と比較して、それぞれの群で下降する傾向にあることから、FA が生体に影響を与え、IgG 抑制をうながしていると考えられる。本研究では、FA が OVA 特異的 IgE と IgG に対して影響を及ぼした。今後、詳細な測定方法の確立が重要な課題になると考えられる。

参考文献

1. Kelly TJ, Smith DL, Satola J: Emission rates of formaldehyde from materials and consumer products found in California homes. *Environ Sci Technol* **33**, 81-88, 1999.
2. Sakamoto T, Doi S, Torii S: Effects of formaldehyde, as an indoor air pollutant, on The airway. *Allergology International* **48**, 151-160, 1999.
3. World Health Organization: Regional Office for Europe, Air quality guidelines-Second edition. 2000.

4. Endo Y, Miyazaki T, Hikita Y, Azuma M, Ikeda H, Fukunaga K, Endo G: Sampling methods and residential factors affecting formaldehyde concentration in indoor air. *Tohoku J Exp Med* **195**, 227-236, 2001.
5. Kränke B, Aberer W: Indoor exposure to formaldehyde and risk of allergy. *Allergy* **55**, 402-404, 2000.
6. Sherriff A, Farrow A, Golding J, Henderson J: Frequent use of chemical household products is associated with persistent wheezing in pre-school age children. *Thorax* **60**, 45-49, 2005.
7. Ebata K, Shimizu Y, Nakayama Y, Minemura M, Murakami J, Kato T, Yasumura S, Takahara T, Sugiyama T, Saito S. Immature NK cells suppress dendritic cell functions during the development of leukemia in a mouse model. *J Immunol.* **176 (7)**, 4113-4124. 2006.
8. Riedel F, Hasenauer E, Barth PJ, Kozirowshi A, Riegar CHL: Formaldehyde exposure enhances inhalative allergic sensitization in the guinea pig. *Allergy* **51**, 94-99, 1996.
9. Waalkes MP, Perantoni A: Isolation of a novel metal-binding protein from rat testes: characterization and distinction from metallothionein. *Journal of Biological Chemistry*, **261**, 13079-13103, 1986.
10. 北俊之:ホルムアルデヒド反復経気道暴露のモットモット喘息モデルに及ぼす影響に関する研究. 金沢大学十全医学雑誌 **108**, 252-259, 1999.
11. 荒瀬尚: NKT 細胞のサイトカイン産生とその意義. 最新医学社. **55**, 818-823, 2000.
12. 香城諭, 安達佳宏, 住田孝之: GPI-anchored antigen に対する IgG 産生は CD1d 拘束性 NKT 細胞によって誘導されている. 臨床免疫研究会. **33**, 106-112, 2000.
13. Riedel F, Hasenauer E, Barth PJ, Kozirowshi A, Riegar CHL: Formaldehyde exposure enhances inhalative allergic sensitization in the guinea pig. *Allergyl.* **51**, 94-99, 1996.
14. Tarkowski M, Gorski P: Increased IgE antiovalbumin level in mice exposed to formaldehyde. *Int Arch Allergy Immunol.* **106**, 422-424, 1995.
15. 橋本修, 権寧博: 大気汚染とアレルギー性炎症. *Air Pollution and Allergic Inflammation.* **48**, 661-666, 2000.
16. 小松茂: アレルギー性気道炎症の即時型反応における home oxygenase-1 (HO-1) の発現. 横浜市立大学医学会. **49**, 377-385, 1998.

The Activity of NK cells, and Blood Levels of IgE and IgG After Exposure in Formaldehyde

Yeunhwa GU¹⁾²⁾⁵⁾, Yuka ITOKAWA¹⁾, Takashi MASUBUCHI¹⁾,
Yuri KURONO¹⁾, Kwang-Ho CHO⁸⁾, Jung-Sook CHOI⁷⁾,
Takashi NAKAMURA⁶⁾, Ihil-Bong CHOI²⁾, Ki-Mun KANG³⁾,
Takeo HASEGAWA¹⁾, Toshihiro MIURA¹⁾, Masami OSHIMA¹⁾,
Ikukatsu SUZUKI¹⁾, and Torao ISHIDA⁴⁾⁵⁾

¹⁾Graduate School of Health Science, Suzuka University of Medical Science

²⁾Department of Radiation Oncology, Catholic University Medical College, Seoul, Korea

³⁾Deptment of Therapeutic Radiology, Gyeongsang National University Hospital, Gyeongsang Institute of Health Sciences, Jinju, Korea

⁴⁾Department of Acupuncture Moxibustion, Faculty of Acupuncture Moxibustion, Suzuka University of Medical Science

⁵⁾Hi-tech Research Center, Suzuka University of Medical Science

⁶⁾Health care center, Suzuka University of Medical Science

⁷⁾Gyeongdo provincial college, Kyoungbook korea

⁸⁾Department of Radiological Science, Catholic University of Deagu, College of Health Science, Deagu, Korea

Key Words: Chemical materials in house environment, formaldehyde, NK cell, OVA specific IgE

Abstract

It has long been questioned whether exposure to formaldehyde in indoor environments may be a risk factor for developing allergen specific IgE-mediated inflammatory responses, since there is limited clinical or experimental evidence that formaldehyde is involved in the cascade for IgE production. Strict formaldehyde gas level-controlled environment was established. Mice were primed with specific ovalbumin (OVA) allergen, followed by exposure to gaseous formaldehyde at high (0.8 ppm), threshold (0.1 ppm) or null concentrations in this environment. Plasma levels of IgE antibody and NK activity in mice were evaluated after 5 weeks of formaldehyde exposure. Exposure at a low threshold concentration or higher concentrations of indoor formaldehyde did not induce formaldehyde-specific IgG or IgE antibody production in mice after a 5 week exposure. When mice were primed with OVA allergen, exposure to formaldehyde caused a marked enhancement of allergen specific IgE production above that seen in control mice. In unchallenged mice, exposure to

formaldehyde at any concentration produced far greater expression of NK1.1⁺ and NK1.1⁺ NK cell activity than the non-formaldehyde control. Thus, formaldehyde, even at low threshold concentrations, may lead to a risk of developing allergic inflammatory responses that can be undermined by activated NK1.1⁺ NK cells. The threshold limit of formaldehyde did not reduce allergen-specific IgE inflammatory immune responses, but might be involved in promoting allergic effects in subjects once primed with specific allergens by NK cell activation. It is conceivable that preexisting allergic symptoms may be confounded by concomitant exposures to volatile organic compounds (VOC) and formaldehyde found in indoor residences.