

アレルギー性足蹠炎症反応における末梢神経の役割

林田 一志¹ 笹岡 知子¹ 糸井マナミ²
 京極 方久¹ 雨貝 孝^{1, 2}

¹明治鍼灸大学大学院 鍼灸基礎医学

²明治鍼灸大学 免疫微生物学教室

要旨: 抗原特異的炎症反応における末梢神経の役割について検討するため、マウスを免疫後、外科的に除神経を行った foot pad または正常側 foot pad への抗原 challenge 後の腫脹反応を測定した。除神経側 foot pad では、抗原 challenge 6~72 時間後の腫脹反応が正常側に比して有意に減弱し、抗原領域内への白血球遊走数も有意に減少した。また、正常マウスに NK-1 antagonist を投与すると、抗原 challenge 後 6~72 時間の腫脹反応が対照群に比して有意に抑制された。除神経側 foot pad へ Substance P を抗原と共に投与すると、除神経による腫脹反応の減弱が正常側 foot pad の反応と同等にまで回復した。これらの結果は、抗原特異的炎症反応では、末梢神経が促進的に作用し、その神経由来因子が Substance P である可能性を示唆する。

1 はじめに

近年、炎症反応の調節因子として、神経系の役割が注目されている^{1, 2)}。ことに、外界との接点である皮膚・感覚器・消化管での炎症反応が神経系の作用により増強されることが報告されている^{3, 4, 5)}。また、知覚神経を電気刺激することにより、支配領域の血管拡張および肥満細胞の脱顆粒が誘導されることが知られている⁶⁾。この現象は、外来性の刺激による知覚神経の興奮が急性炎症反応の開始に関与していることを示唆している。また、foot pad へのドライアイス刺激による寒冷炎症反応において、支配神経を外科的に切除することにより、炎症領域での細胞遊走と血漿漏出が減少することが報告されている⁷⁾。このことは、末梢知覚神経系が炎症の開始のみではなく持続にも作用している可能性を示唆している。

アレルギー性炎症反応における神経系の役割については、近年いくつかの報告がみられるが、未だ十分明らかになっていない。成獣ラットまたは

マウスでの抗原特異的遅延型反応において、capsaicin 処置により肺や皮膚での血漿漏出と細胞遊走が増強されることが報告されている^{8, 9)}。しかしながら、成獣への capsaicin 処置では、C 線維や A δ 線維への作用よりもむしろ他の神経細胞への非特異的な作用が強く^{10, 11)}、また処置後持続的な下垂体・副腎ホルモンの分泌亢進が起こることも報告されている^{12, 13, 14)}。このように、capsaicin 処置は、生体に多様な影響を与えることから、単に除神経の作用のみを示すものとは言い難い。

そこで我々は、外科的に除神経を行った動物モデルを用いて、抗原特異的炎症反応における神経の役割を検討した。他方、神経系に由来する炎症反応調節因子として種々の神経ペプチドが知られている¹⁵⁾。そのうち、Substance P (SP) の炎症反応における役割がもっとも詳しく研究されている¹⁶⁾。すなわち、SP receptor antagonist の投与により神経原性の急性炎症反応が抑制され¹⁷⁾、また、SPの皮内投与により、投与後数時間にわた

平成8年6月27日受付、平成8年8月7日受理

Key Words: アレルギー性足蹠反応 Allergic foot pad reaction 除神経 Denervation

末梢神経 Peripheral nerves Foot pad 反応 Foot pad reaction Substance P

†連絡先

る肥満細胞依存性の顆粒球遊走を伴う炎症像が認められることが報告されている^{18,19,20)}。そこで、我々は抗原特異的炎症反応におけるSPの役割についても検討を加えた。その結果、外科的除神経により遅延相における腫脹反応の減弱と炎症局所の遊走白血球数の減少がみられ、また、SPが遅延相炎症反応に関与することが明らかとなったので報告する。

II 材料および方法

1. 実験動物

Specific pathogen free (SPF) 条件下で飼育した雄性 C57BL/6CrSlc マウス 6~9 週令を使用した。

2. Foot pad 反応

即時型および遅延反応を誘導するため、抗原として卵白アルブミン (OVA) (生化学工業) を水酸化アルミニウムゲル²¹⁾ (Alum) に吸着させて用いた。Alum 1mg と OVA 1 μ g (Alum-OVA) を生理食塩水 (250 μ l) 中に懸濁し、腹腔内に投与した。投与2週間後、同量の Alum-OVA を 50 μ l (air pouch 内投与では 25 μ l) 生理食塩水に懸濁し、26 G 針を付けたマイクロシリンジを用いて foot pad へ challenge した。炎症惹起後の腫脹反応は、foot pad の厚さをダイヤル付きノギスを用いて challenge 直前及び 0.5, 3, 6, 9, 24, 48, 72 時間後に計測し、抗原 challenge 前値との差を mm で示した。

3. 除神経

抗原 challenge 12 日前に、ペントバルビタール (ピットマン・ムーア社) 麻酔下 (59 mg/kg i.p.) で、左殿部から背部にかけて剃毛し、左殿部の皮膚を切開し、大殿筋と中殿筋の境界部を剥離後、坐骨神経を引き出し軸索を切り取った。切開創を消毒し、Wound clip (ベクトンディッキンソン) で留めた。次に、左鼠径部を剃毛後、皮膚を切開し、実体顕微鏡下で大腿動静脈から伏在神経を剥離し、軸索を切り取った。切開創を消毒後、ナイロン縫合糸にて閉じた。切断の際には、軸索再生による再結合を防ぐため軸索を 7 mm 以上切り取った。神経切断後に自傷をおこしたマ

ウスは実験群から除外した。

4. 組織学的検討

脱血死させたマウスから foot pad を切り出し、20%ホルマリン固定し、パラフィン包埋後、5 μ mの薄切標本とし、ヘマトキシリン・エオジン染色または0.05%トルイジンブルー (pH2.5) 染色を行った。トルイジンブルー染色を行った連続組織標本について、皮膚組織の上皮から真皮にかけて分布する肥満細胞を 0.125 mm² を1区画として1標本あたり5区画を数え、1 foot padについて6標本ずつ計30区画3.75 mm²あたりの肥満細胞数を計測値とした。

5. 抗原領域への遊走細胞数の測定

抗原 challenge 24 時間前に、26G針をつけたマイクロシリンジを用い、foot pad へ 50 μ l の空気を注入して pouch を作成した。Air pouch を足底部に局限させる目的で、空気を注入する間のみ踵の近位側を糸で結んだ。糸で結んだ際の局所の皮膚損傷は起こらなかった。Alum-OVA をマイクロシリンジを用いて air pouch 内に challenge した。対照には pouch 内に生理食塩水のみを投与した。抗原 challenge 24 時間後または 48 時間後に、脱血死させたマウスの足底部の皮膚を腱とともに切り出した後、皮膚を剥離し、抗原の入った pouch を取り出した。氷冷下で 1% 牛血清アルブミン、0.1% アジ化ナトリウム加 Eagle's minimum essential medium 1ml 中で、pouch をはぐした後、脱脂綿で濾過して組織片を除去し、遊走細胞浮遊液を得た。細胞浮遊液を遠心により 300 μ l に濃縮し、その100 μ l および 10 μ l を培地 1 ml 中に浮遊させた後、細胞遠心機 (SHANDON) を用いて標本を作成した。細胞標本に Wright-Giemsa 染色をおこない、光学顕微鏡下で、好中球・好酸球・単核球を区別して数えた。結果は、測定した細胞数を pouch あたりの細胞数に換算して示した。

6. 薬物処置

NK-1 receptor antagonist RP67580と非活性

構造類似体 RP68651 (Rone-Poulenc Rorer) を 1% Dimethyl Sulfoxide (DMSO; 和光純薬) 加生理食塩水に溶解し, 5.0×10^{-9} mol/400 μ l とした. 抗原 challenge 10 分前と 1 時間後に 400 μ l ずつ尾静脈より投与した. また, SP (ペプチド研究所) は生理食塩水に溶解して, 1.0×10^{-9} mol/50 μ l とし, foot pad へ抗原と共に 50 μ l 投与した.

7. 統計解析

数値はすべて平均 (Mean) $\pm$ 標準誤差 (SEM) で示した. foot pad 腫脹の対照群と実験群の比較には, 分散分析を行った後ボンフェローニ多重比較検定を用い, air pouch 内への遊走細胞数の比較及び foot pad の皮膚肥満細胞数の比較には, マンホイットニーU検定を用いた. 検定の有意水準は, $P < 0.05$ とした.

III 結果

1. Foot pad 領域を支配する神経の外科的切除により遅延相の Alum-OVA 誘導腫脹反応が減弱する

Alum-OVA により誘導される腫脹反応において, その領域を支配する末梢神経系が関与しているかどうかを検討するために, 左側 foot pad の除神経 (坐骨神経と伏在神経切断) を行ったマウスで, 除神経側 foot pad への抗原 challenge 後の腫脹反応を測定した. 対照群には同様に除神経を行ったマウスの正常側 (右側) foot pad への抗原 challenge 後の腫脹反応を測定した. なお, Alum-OVA 投与 2 週間後 (foot pad への抗原 challenge する日に相当) のマウス血清の Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA) 反応は陽性であった. 対照群における腫脹反応の極大は, 抗原 challenge 後 0.5 時間で 1.17 ± 0.09 mm, 6 時

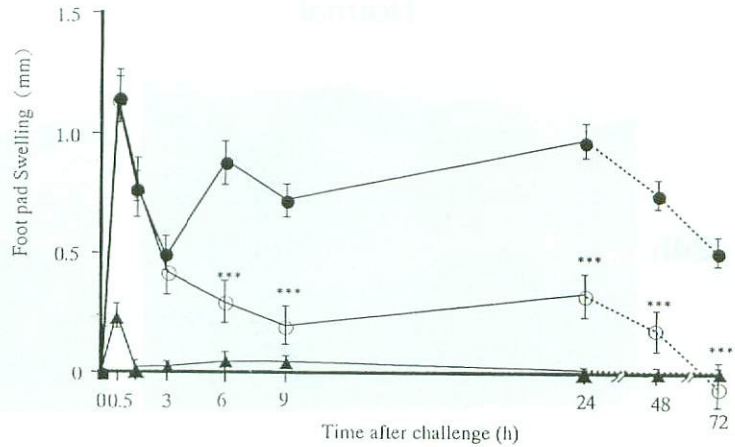


Fig.1 Foot pad 領域を支配する神経の外科的切除による Alum-OVA 誘導 foot pad 腫脹反応の遅延相の減弱

Foot pad への抗原 challenge 14 日前に Alum-OVA の腹腔内投与によりマウスを免疫し, 抗原 challenge 12 日前に左坐骨神経と伏在神経を外科的に切断した. Alum-OVA を除神経側左脚 foot pad (○, $n=16$) または正常側 foot pad (●, $n=17$) に challenge した. 注射刺激の腫脹反応への影響をみるため, 正常側 foot pad へ生理食塩水 (50 μ l) を投与 (▲, $N=4$) し腫脹反応を測定した. 腫脹反応は抗原 challenge 後の foot pad の厚さから抗原 challenge 前の foot pad の厚さを差し引いた値 (mm) とし, 数値は Mean $\pm$ SEM で示した. *** ; $P < 0.001$ (●vs○).

間で 0.90 ± 0.09 mm, 24 時間で 0.98 ± 0.07 mm となり, 3 相性を示した (Fig.1). 除神経側 foot pad における腫脹反応は, 抗原 challenge 後 0.5 時間では 1.15 ± 0.11 mm で, 対照群との差はみられなかったが, 抗原 challenge 後 6 時間 0.31 ± 0.09 mm, 9 時間 0.20 ± 0.08 mm, 24 時間 0.33 ± 0.09 mm, 48 時間 0.20 ± 0.09 mm, 72 時間 0.05 ± 0.08 であり, 対照群に比し, 6 ~ 72 時間後の遅延相において有意に減弱した. これらの結果から, foot pad 領域を支配する神経の外科的切除により, 遅延相の腫脹反応が減弱することが明らかとなった.

2. Foot pad 領域を支配する神経の外科的切除により抗原 challenge 領域への細胞遊走が減少する

神経切断による遅延相の腫脹反応の減弱が, 抗

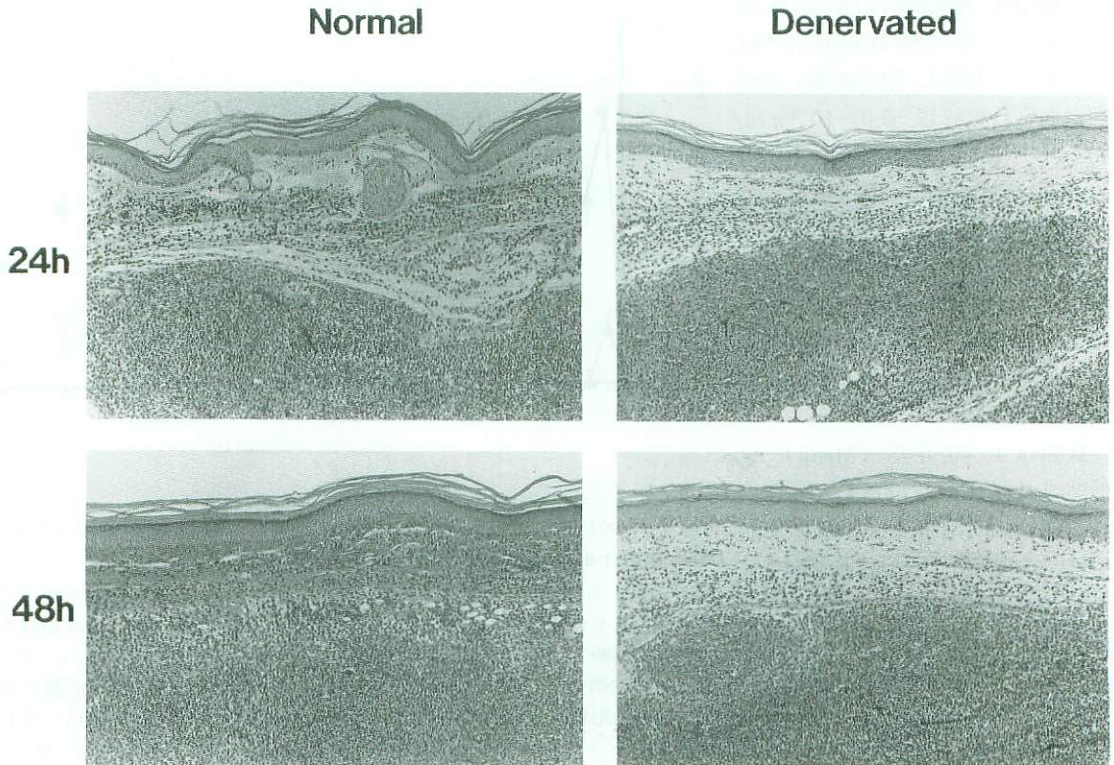


Fig.2 除神経側および正常側 foot pad の Alum-OVA 投与部位の HE 染色組織像 ($\times 40$), 抗原 challenge 後 24 時間および 48 時間の炎症像を示す.

原局所への白血球遊走の減少を伴うのかどうかを検討するために, 除神経側 foot pad または正常側 foot pad へ抗原 challenge した群について 24 時間後および 48 時間後の foot pad 組織の HE 染色標本を作成し, 炎症領域への細胞浸潤を調べた. 正常側 foot pad では, 抗原 challenge 後 24 時間と 48 時間ともに, 抗原投与部位に主として顆粒球の著明な浸潤 (一部単核球を含む) が認められたが, 除神経側 foot pad では, 抗原 challenge 後 24 時間と 48 時間ともに, 抗原領域中心部への細胞浸潤が著しく減少していた (Fig.2). さらに, 除神経側 foot pad または正常側 foot pad に作成した air pouch 内へ抗原を challenge し, pouch 内に遊走した白血球数を Wright-Giemsa 染色し, 好中球, 好酸球, 単核白血球に区別して

測定した (Fig.3). 抗原 challenge 24 時間後では, 好中球数は, 正常側 foot pad で $1292.5 \pm 290.1/\text{pouch}$ であったのに対し, 除神経側 foot pad では $253.0 \pm 69.9/\text{pouch}$ であり, 正常側 foot pad の約 20% であった. 抗原 challenge 48 時間後においても, 正常側 footpad における好中球数は $635.0 \pm 118.9/\text{pouch}$ であったのに対し, 除神経 foot pad で $149.0 \pm 66.6/\text{pouch}$ で, 正常側 foot pad の約 23% であった. さらに 抗原 challenge 48 時間後では, 単核白血球数においても正常側 foot pad で $57.5 \pm 14.1/\text{pouch}$ であるのに対して, 除神経側 footpad では $14.0 \pm 4.6/\text{pouch}$ で, 正常側 foot pad の約 24% であった. また, foot pad に生理食塩水のみを投与した対照群では, 遊走細胞が全くみられ

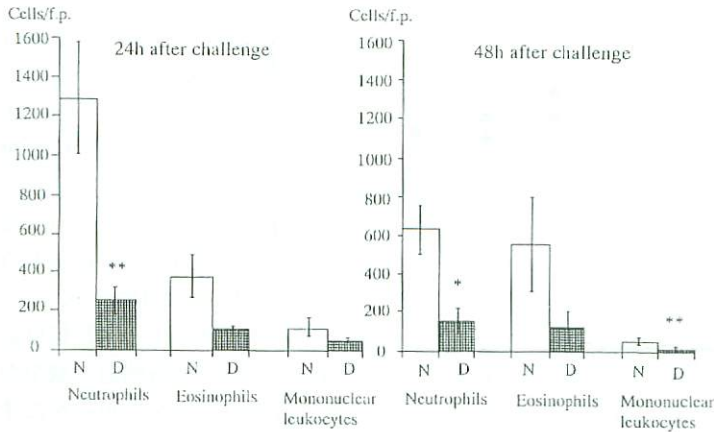


Fig.3 除神経による Alum-OVA 誘導 foot pad 腫脹反応における抗原投与部位への白血球遊走数の抑制

Foot pad への抗原 challenge 14 日前に Alum-OVA の腹腔内投与によりマウスを免疫した。除神経は、抗原 challenge 12 日前に左坐骨神経と伏在神経を外科的に切断した。抗原 challenge 24 時間前に作成した air pouch に、Alum-OVA (25 μ l) を投与し、24 または 48 時間後に air pouch 内に遊走した白血球を回収し測定した。数値は Mean $\pm$ SEM で示した。N: 正常側 foot pad air pouch 内に抗原 challenge した群 (n=6), D: 除神経側 foot pad air pouch 内に抗原 challenge した群 (n=6)。** ; $P<0.05$, * ; $P<0.01$ 。

なかった。これらの結果から、支配神経の外科的切除によって、抗原 challenge 領域への遊走白血球が減少することが明らかとなった。

3. NK-1 antagonist 投与により遅延相の腫脹反応が抑制される

Foot pad 領域の外科的除神経により、遅延相の腫脹反応の減弱と遊走細胞数の減少がおこることから、抗原特異的な細胞遊走相の反応に対して神経因子が促進的に作用することが明らかとなった。そこで Alum-OVA challenge 後の反応にあずかる神経由来因子として SP が関与するかどうかを検討するために、正常マウスに NK-1 receptor antagonist である RP67580 (5×10^{-9} mol/mouse i.v.) を投与し、抗原 challenge 後の腫脹反応を測定した。対照群には、非活性構造類似体 RP68651 または vehicle (1% DMSO 加生

理食塩水) を投与した。非活性構造類似体 RP68651 投与群と vehicle 投与群における腫脹反応の極大は、抗原 challenge 0.5 時間後でそれぞれ 0.68 ± 0.05 mm, 0.58 ± 0.08 mm, 6 時間後で 0.80 ± 0.07 mm, 0.71 ± 0.03 mm, 24 時間後で 1.13 ± 0.09 mm, 1.02 ± 0.09 mm であり同様な 3 相性を示し、両群間で有意な差はみられなかった (Fig.4)。それに対して、RP67580 投与群においては、抗原 challenge 後 0.5 時間では 0.58 ± 0.05 mm であり対照群と同程度の腫脹反応がみられたが、6~72 時間後においては 6 時間 0.35 ± 0.02 mm, 24 時間 0.64 ± 0.04 mm, 48 時間 0.66 ± 0.04 mm, 72 時間 0.58 ± 0.07 mm であり、vehicle 投与群に対し有意に抑制された。このことから、Alum-OVA で誘導された foot pad 遅延相の腫脹反応に SP が関与することが示唆された。

4. 除神経により減弱した遅延相の腫脹反応は foot pad への SP 投与により回復する

Alum-OVA により誘導された遅延相の腫脹反応は NK-1 receptor antagonist 処置により抑制されることから、この反応には SP が関与していることが示唆された。そこで、除神経による foot pad の遅延相の腫脹反応の減弱に SP が関与しているかどうかを明らかにするために、除神経側 foot pad への SP 投与の効果を検討した。SP は抗原と共に除神経側 foot pad へ投与し、除神経側 foot pad もしくは正常側 foot pad へ抗原のみを challenge した群と比較した。正常側 foot pad における腫脹の極大は、抗原 challenge 0.5 時間後で 1.03 ± 0.06 mm, 6 時間後で 0.72 ± 0.1 mm, 24 時間後で 0.73 ± 0.08 mm であり、3 相性を示した (Fig.5)。除神経側 foot pad への SP 投与により、遅延相の腫脹反応が回復した。

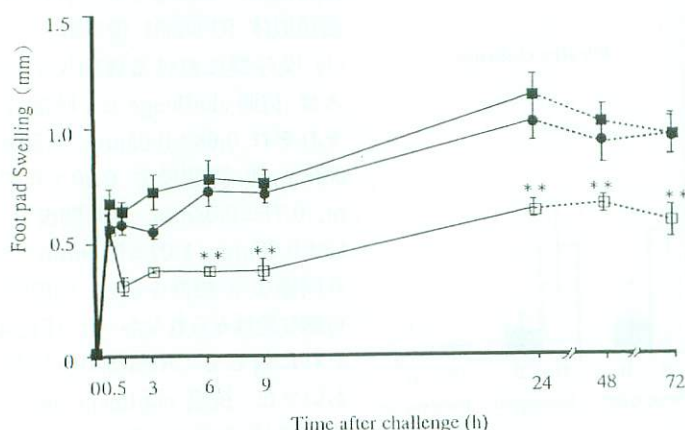


Fig.4 Alum-OVA 誘導 foot pad 腫脹反応遅延相の

NK-1 antagonist 投与による抑制

抗原 challenge 14日前に Alum-OVA をマウスに腹腔内に投与し, foot pad への抗原 challenge 10分前と1時間後に NK-1 receptor antagonist RP67580 (5.0×10^{-5} mol/400 μ l) (□, n=13), 非活性構造類似体 RP 68651 (5.0×10^{-5} mol/400 μ l) (●, n=12) または vehicle (1% DMSO 加生理食塩水, 400 μ l) (○, n=12) を尾静脈より投与した. 腫脹反応は, foot pad への Alum-OVA (50 μ l) challenge 後の foot pad 厚さから抗原 challenge 前の foot pad の厚さを差し引いた値 (mm) とし, 数値はMean $\pm$ SEMで示した. ** ; $P < 0.01$ (● vs □).

t pad では, 抗原 challenge 0.5 時間後で 0.98 ± 0.09 mm, 6 時間後で 0.45 ± 0.06 mm, 24 時間後で 0.45 ± 0.06 mm, 48時間後で 0.32 ± 0.03 mm で, 抗原 challenge 後 6 ~ 48 時間で, 正常側 foot pad に対し有意に減弱していた. 他方, 除神経側 foot pad へ SP を投与した群では, 抗原 challenge 0.5 時間後で 1.24 ± 0.05 mm, 6 時間後で 0.85 ± 0.05 mm, 24 時間後で 1.07 ± 0.27 mm, 48 時間後で 0.69 ± 0.08 mmであり, 除神経側 foot pad に対して, 3 ~ 48 時間後で有意に増強した. また, 抗原 challenge 3 時間後と24 時間後では, 除神経により減弱した遅延相の腫脹反応が正常側 foot pad の腫脹反応に比べて有意に増強していた. 除神経側 foot pad への SP 投与により, 除神経により減弱した遅延相の腫脹反応が, 正常側 foot pad の腫脹と同等以上に

まで回復した.

5. 除神経により foot pad の皮膚肥満細胞数は変化しない

我々の実験結果から, Alum-OVA によって誘導される遅延相の腫脹反応には神経性調節因子として SP が関与することが示唆され, また, SP による調節は肥満細胞を介することが多いとされている^{18,19,20}. よって, 除神経による遅延相反応の減弱において肥満細胞の減少がみられるのかどうかを明らかにするために, 正常側 foot pad および神経切断後12日目(抗原 challenge する日に相当)の神経切断側 foot pad について薄切片を作成し, トルイジンプルー染色をおこない, 皮膚肥満細胞数を測定した. 正常側の foot pad 皮膚肥満細胞数は 282.0 ± 11.6 個/3.75mm² (n=3) で, 除神経側の foot pad 皮膚肥満細胞数は 265.7 ± 14.2 個/3.75mm² (n=3)であり (Table 2), 正

常側および除神経側 foot pad の皮膚肥満細胞数には有意な差がみられなかった. このことから, 除神経側の遅延相反応の減弱は, 神経切断による除神経側の皮膚肥満細胞数の減少が原因ではないことが明らかとなった.

IV 考 察

抗原特異的な皮膚炎症反応は, 炎症惹起後の時間の経過と共に, 漿液性滲出相・線維素性滲出相・白血球浸潤相(好中球浸潤相・リンパ球浸潤相)へと移り変わるとされている²¹. 今回の我々の実験から, 坐骨神経と伏在神経の切断により, Alum-OVA で誘導された foot pad 腫脹反応の遅延相が減弱し, さらに好中球を中心とした遊走細胞数が減少することが明らかとなった. このことは抗原特異的な炎症反応の遅延相すなわち線維素性滲出相と好中球浸潤相に相当する炎症反応相において,

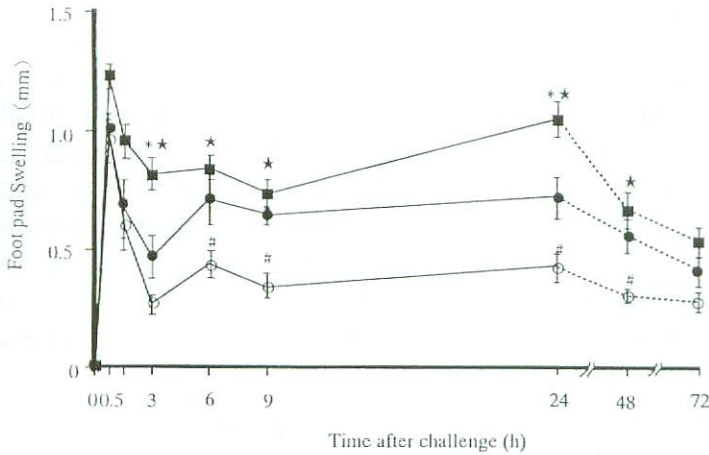


Fig.5 除神経側 foot pad での Alum-OVA 誘導腫脹反応遅延相の減弱に対する Substance P 投与による回復効果

抗原 challenge 14 日前に Alum-OVA の腹腔内投与により、マウスを免疫し、抗原 challenge 12 日前に左坐骨神経と伏在神経を外科的に切断。正常側 foot pad (●, n=6), 除神経側 foot pad (○, n=6) に Alum-OVA を投与した群、および除神経側 foot pad に Alum-OVA と Substance P (1.0×10^{-6} mol/50 μ l) を投与した群 (■, n=7) の腫脹反応を経時的に示す。腫脹反応は、抗原 challenge 後の foot pad の厚さから抗原 challenge 前の foot pad の厚さを差し引いた値 (mm) とし、数値は Mean $\pm$ SEM で示した。# ; $P < 0.05$ (● vs ○), * ; $P < 0.05$ (● vs ■), ★ ; $P < 0.01$ (■ vs ○)。

末梢神経の影響が重要であることを示している。末梢神経の電気刺激によって炎症が惹起されることはよく知られている⁶⁾。また、寒冷組織損傷による血漿漏出と白血球遊走反応が、支配神経の外科的切除によって減少することも報告されてい

る⁷⁾。これらの結果は、末梢神経系が抗原特異的炎症反応のみならず、種々の刺激による炎症反応の調節に関与していることを示唆している。

Alum-OVA で誘導された遅延相の腫脹反応の調節に神経系が関わることから、神経由来因子としてニューロペプチドの関与が考えられ、我々は、その因子が SP であるかどうかを検討した。正常マウスに SP receptor である NK-1 receptor に対する antagonist RP67580 を投与すると Alum-OVA で誘導される遅延相の腫脹反応が抑制された。この NK-1 antagonist 投与実験において、即時相の腫脹反応が低値を示したが、これは vehicle 中の DMSO が軽度の腫脹抑制作用を示すこと²³⁾ によるものと思われる。また、除神経側 foot pad に抗原と共に SP を投与すると、除神経による遅延相の腫脹反応の減弱が認められなくなった。

これらの結果は、抗原特異的な炎症反応の遅延相において SP が重要な促進因子として作用していることを示唆している。Garret ら¹⁰⁾ は、神経の電気刺激によって引き起こされる血管拡張と血漿漏出が、NK-1 receptor antagonist 処置によ

Table 2

Comparison of dermal mast cell numbers in normal and denervated foot pads. *

	Numbers of mast cells in 3.75mm ² / foot pad (n=3)
Normal foot pad	282.0 $\pm$ 11.6
Denervated foot pad	265.7 $\pm$ 14.2

* Foot pad sections were prepared from normal and denervated foot pads of mice whose left sciatic and splanchnic nerves were transected 12 days previously. Numbers of mast cells were counted after toluidine blue staining. Data represent Mean $\pm$ SEM/3.75mm². Normal foot pad vs denervated foot pad $P = 0.28$ by using Mann-Whitney's U test.

て抑制されることを報告している。組織学的にも、SP 陽性神経線維が真皮と皮下組織の血管に沿って存在していることも明らかとなっている²⁴⁾。また、SP の皮内投与により血漿漏出と顆粒球遊走が起こることも明らかとなっている^{18,19)}。以上のことは、神経系に由来する SP が血漿滲出と白血球遊走の促進因子として働くことを示している。

SP が炎症反応増強にあずかる際の標的細胞あるいは介在細胞として、肥満細胞・好中球・ヘルパーT細胞などの可能性があげられる^{2,25,26)}。Oura²⁴⁾ は、SP 陽性神経終末が肥満細胞と接していることを示している。また、Kowalski と Kaliner⁶⁾ は、ラット伏在神経の電気刺激により肥満細胞の脱顆粒が起こることを報告している。他方、肥満細胞欠損マウスでは、遅延相腫脹反応が減弱することが報告されている²⁷⁾。これらの報告は、神経由来の SP が肥満細胞の活性化を介して遅延相の腫脹反応を促進している可能性を示している。今回の我々の実験では、神経切断によって皮膚肥満細胞数の減少が認められないことが明らかとなった。しかし、神経由来因子が肥満細胞へ作用することによりサイトカイン放出機構へ影響を及ぼす可能性は否定できない。他方、遅延相腫脹反応発現における好中球²⁸⁾ やヘルパーT細胞²⁹⁾ の役割も指摘されており、SP がこれらの炎症性細胞の活性化をおこす可能性もある。今回の実験において、神経切断が遅延相の腫脹反応と炎症部位への好中球浸潤を抑え、SP receptor の障害が神経切断と同じ効果を示したことから、神経切断による Alum-OVA 誘導炎症反応の遅延相の抑制には、SPとその receptor が関与していることは明らかである。そのメカニズムの一つとして、標的細胞からの炎症性サイトカインの誘導が考えられる^{30,31,32)}。Ansel³³⁾ は SP 刺激により肥満細胞からの TNF- α の合成分泌が起こることを報告している。また、活性化した末梢血単核球やヘルパーT細胞に SP を添加することにより、サイトカインの産生が増強されることが知られている^{34,35)}。他方、ヒトの皮内への SP 投与により、

遊走細胞数の増加と平行して血管内皮上に E-selectin が有意に発現されることが報告されている³⁶⁾。また、in vitro においても器官培養皮膚への SP 添加により肥満細胞依存性に血管内皮上に E-selectin の発現が起こることが報告されている³⁶⁾。これらは、SP がサイトカイン誘導や接着分子の発現を介して、細胞遊走の誘導に関与していることを強く示唆している。我々は、SP がどの細胞に作用し、どのようなメカニズムで遅延相の炎症に関与しているかについて現在も研究を進めている。

V 謝 辞

組織標本の作成に際し、御指導頂いた明治鍼灸大学・解剖学教室 熊本賢三助教授と明治鍼灸大学・病理学教室 廣瀬眞理助手に厚く感謝いたします。また、統計解析について御助言を頂いた明治鍼灸大学・基礎鍼灸学教室 篠原 鼎講師と明治鍼灸大学・第一東洋医学臨床教室 石崎直人助手に感謝いたします。

VI 参考文献

- 1) Payan DG, Goetzl EJ : Neuropeptide regulation of immediate and delayed hypersensitivity. *Intern J Neuroscience*, 38:211-221, 1988.
- 2) Marshall JS, Bienenstock J : The role of mast cells in inflammatory reactions of the airways, skin and intestine. *Curr Opin Immunol*, 6: 853-859, 1994.
- 3) Carr RW, Delaney CA, Westerman RA, et al: Denervation impairs cutaneous microvascular function and blister healing in the rat hindlimb. *NeuroReport*, 4 : 467-470, 1993.
- 4) Bynke G, Hkanson R, Folcker K: Long-term administration of a substance P antagonist, (D-Pro2,D-Trp7,9)-SP, abolishes the response to ocular trauma. *Experientia*, 40 : 368-369, 1984.
- 5) McKay DM, Bienenstock J : The interact

on between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. *Immunology Today*, 15: 533-539,1994.

6) Kowalski ML, Kaliner MA: Neurogenic inflammation, vascular permeability, and mast cells. *J Immunol*, 140: 3905-3911, 1988.

7) Helme RD, Andrews PV: The effect of nerve lesions on the inflammatory response to injury. *J Neuroscience Research*, 13: 453-459,1985.

8) Girolomoni G, Tigelaar RE: Capsaicin-sensitive primary sensory neurons are potent modulators of murine delayed-type hypersensitivity reactions. *J Immunol*, 145: 1105-1112,1990.

9) Buckley TL, Nijkamp FP: Mucosal exudation associated with a pulmonary delayed-type hypersensitivity reaction in the mouse. *J Immunol*, 153: 4169-4178,1994.

10) Williams JT, Zieglgansberger W: The acute effects of capsaicin on rat primary afferents and spinal neurons. *Brain Res*, 253: 125-131,1982.

11) Hajos M, Svensson K, Nissbrandt H, et al: Effects of capsaicin on central monoaminergic mechanisms in the rat. *J Neural Transm*, 66: 221-242,1986.

12) Meuller GP: Beta-endorphin immunoreactivity in rat plasma: variations in response to different physical stimuli. *Life Sci*, 29: 1669-1674,1981.

13) Lembeck F and Amann R: The influence of capsaicin sensitive neurons on stress-induced release of ACTH. *Brain Res Bull*, 16: 541-543, 1986.

14) Watanabe T, Kawata T: Enhancement by capsaicin of energy metabolism in rats through secretion of catecholamine from adrenal medulla. *Agric Biol Chem*, 51: 75-79,1987.

15) Goetzl EJ, Chernov T, Renold F, et al:

Neuropeptide regulation of the expression of immediate hypersensitivity. *J Immunol*, 135: 802s-805s, 1985.

16) Pernow B: Role of tachykinins in neurogenic inflammation. *J Immunol*, 135: 812s-815s, 1985.

17) Garret C, Carruette A, Fardin V, et al: Pharmacological properties of a potent and selective nonpeptide substance P antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 10208-10212,1991.

18) Matsuda H, Kawakita K, Kiso Y, et al: Substance P induces granulocyte infiltration through degranulation of mast cells. *J Immunol*, 142: 927-931, 1989.

19) Yano H, Wershil BK, Arizono N, et al: Substance P-induced augmentation of cutaneous vascular permeability and granulocyte infiltration in mice is mast cell dependent. *J Clin Invest*, 84: 1276-1286,1989.

20) Smith CH, Barker JNWN, Morris RW, et al: Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. *J Immunol*, 151: 3274-3282,1993.

21) Levine BB and Vaz NM: Effect of combinations of inbred strain, antigen, and antigen dose on immune responsiveness and antigen production in the mouse. *Int Arch Allergy*, 39: 156-171,1970.

22) Hayashi H: The intracellular neutral S-H-dependent protease associated with inflammatory reaction. *Int Rev Cytol*, 40: 101-151, 1975.

23) Kawada T, Kambara K, Arakawa M, et al: Pretreatment with catalase or dimethyl sulfoxide protects alloxan-induced acute lung edema in dogs. *J Appl Physiol*, 73: 1326-1333, 1992.

24) Oura H, Takeda K, Daikoku S: Blood ves

- sels and immunoreactive substance P- containing nerve fibers in rat skin treated topically with clobetasol propionate, a corticosteroid. *J Dermatology*, 19: 335-341, 1992.
- 25) Perretti M, Ahluwalia A, Flower RJ, et al: Endogeneous tachykinins play a role in IL-1-induced neutrophil accumulation: involvement of NK-1 receptors. *Immunology*, 80: 73-77, 1993.
- 26) Rameshwar P, Gascon P, Ganea D: Stimulation of IL-2 production in murine lymphocytes by substance P and related tachykinins. *J Immunol*, 151: 2484-2496, 1993.
- 27) Askenase PW, Loveren HV, Kraeuter-Kops S, et al: Defective elicitation of delayed-type hypersensitivity in W/W^v and Sl/Sld mast cell-deficient mice. *J Immunol*, 131: 2687-2567, 1983.
- 28) Kudo C, Yamashita T, Araki A, et al: Modulation of in vivo immune response by selective depletion of neutrophils using a monoclonal antibody, RP-3. *J Immunol*, 150: 3728-3738, 1993.
- 29) Iwamoto I, Tomoe S, Tomioka H, et al: Role of CD4⁺ T lymphocytes and interleukin-5 in antigen-induced eosinophil recruitment into the site of cutaneous late-phase reaction in mice. *J Leukoc Biol*, 52: 572-578, 1992.
- 30) Gordon JR, Burd PR, Galli SJ: Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunology Today*, 11: 458-464, 1990.
- 31) Galli SJ: New concepts about the mast cell. *New Eng J of Med*, 328: 257-265, 1993.
- 32) Galli SJ, Gordon JR, Wershil BK: Cytokine production by mast cells and basophils. *Current Opinion in Immunology*, 3: 865-873, 1991.
- 33) Ansel JC, Brown JR, Payan DG, et al: Substance P selectively activates TNF- α gene expression in murine mast cells. *J Immunol*, 150: 4478-4485, 1993.
- 34) Lotz M, Vaughan JH, Carson DA: Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science*, 241: 1218-1221, 1988.
- 35) Matis WL, Lavker RM, Murphy GF: Substance P induces the expression of an endothelial-leukocyte adhesion molecule by microvascular endothelium. *J Invest Dermatol*, 94: 492-495, 1990.

Augmentation of Late Phase Reaction by Peripheral Nervous System

HAYASHIDA Itsushi,¹ SASAOKA Tomoko,¹ ITOI Manami,²
KYOGOKU Masahisa,¹ and 'AMAGAI Takashi^{1, 2}

¹ Department of Immunology and Biochemistry, Graduate School of
Acupuncture and Moxibustion, Meiji University of Oriental Medicine

² Department of Immunology and Biochemistry, Meiji University of Oriental Medicine

Summary : We investigated the role of peripheral nerves on antigen specific foot pad response. Sensitized mice were denervated at the left saphenous and sciatic nerves, and foot pad swelling responses in these mice were examined after antigen challenge to the left (denervated) or the right (intact) foot pad. The swelling response of the denervated food pad was significantly lower than that of the intact foot pad 6 to 72 h after the challenge. The number of accumulated leucocytes at the site of antigen challenge in the denervated food pad was smaller than that in the intact food pad. By the administration of a NK1 antagonist, foot pad response of normal mice was significantly suppressed 6 to 72 h after the challenge. However, when substance P was injected with the antigen into the denervated food pad, there was no detectable suppression of swelling response. These results suggest that peripheral nerves augment antigen-specific late phase reaction, and substance P acts as a neuronal factor.

Received on June 27, 1996; Accepted on August 7, 1996

† To Whome correspondence should be addressed.