

アレルギー反応を指標とした化学物質の
リスク評価と毒性メカニズムの解明に関する研究
—化学物質のヒトへの新たなリスクの提言と
激増するアトピー疾患の抑圧に向けて—
(特別研究)

Risk assessment of environmental chemicals on allergic reactions and diseases

平成14～16年度
FY 2002～2004

NIES



独立行政法人 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES
<http://www.nies.go.jp/>

国立環境研究所特別研究報告

Report of Special Research from the National Institute for Environmental Studies, Japan

SR-63-2005

アレルギー反応を指標とした化学物質の
リスク評価と毒性メカニズムの解明に関する研究
—化学物質のヒトへの新たなリスクの提言と
激増するアトピー疾患の抑圧に向けて—
(特別研究)

Risk assessment of environmental chemicals on allergic reactions and diseases

平成14～16年度
FY 2002～2004

独立行政法人 国立環境研究所
NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

特別研究「アレルギー反応を指標とした化学物質のリスク評価と毒性メカニズムの解明に関する研究－化学物質のヒトへの新たなリスクの提言と激増するアトピー疾患の抑圧に向けて－」
(期間 平成14～16年度)

特別研究責任者：高野裕久
特別研究幹事：高野裕久
特別研究報告書編集担当：高野裕久

序

本報告書は、平成14～16年度の3年間にわたって実施した特別研究「アレルギー反応を指標とした化学物質のリスク評価と毒性メカニズムの解明に関する研究－化学物質のヒトへの新たなリスクの提言と激増するアトピー疾患の抑圧に向けて－」の研究成果を取りまとめたものです。

近年、アレルギー疾患は急増し、新たな「国民病」となっています。一般に、ある疾患の増加の二大要因として、遺伝要因と環境要因が挙げられます。アレルギー疾患の増加は遺伝要因が急速に多くの人びとに共通した変化をきたしたとは考えにくいことから、遺伝要因の変化より環境要因の急変によるものと考えられています。急変した環境要因としては、居住環境の変化、食環境の変化、衛生環境の変化、水・大気・土壌環境の変化等が列挙されますが、いずれの変化にも化学物質による汚染が共通して存在していることは注目すべき点でしょう。一方、当研究所においてディーゼル排気微粒子がアレルギーを増悪するメカニズムを検討・調査してきた過程で、その増悪作用が化学物質により惹起されている可能性が示唆されてきました。こうした背景から、本研究は、先導的に選択したいくつかの化学物質がアレルギー疾患に及ぼす影響を明らかにすることを目的として進められました。特に、ヒトのアレルギー疾患によく類似した動物モデルを用いること、ヒトと動物のアレルギーに共通する分子レベルでのメカニズムを解明することに留意しました。

結果として、(1) アレルギー性気管支喘息を増悪させるディーゼル排気微粒子 (DEP) の主成分は、粒子ではなく、脂溶性化学物質であり、粒子と脂溶性化学物質群が共存することによりアレルギーは相乗的に増悪すること、(2) この増悪メカニズムがヒトと動物の間で共通していること、(3) DEPに含まれるキノン系化合物もアレルギー増悪影響を発揮するが、それだけでDEPに含有される脂溶性化学物質のアレルギー増悪影響を説明しうるものではないこと、(4) フタル酸エステルがアトピー性皮膚炎モデルに対し増悪効果を発揮すること、(5) これに関し認められる量－反応関係は、環境ホルモン作用でしばしば観察されるパターンをとること、(6) この増悪に関わる分子メカニズムがヒトと動物でよく相同していること、(7) ダニアレルゲン誘発アトピー性皮膚炎モデルは、化学物質のアレルギー増悪作用を検討する「*in vivo* スクリーニングモデル」として非常に有用であること、等々が明らかになりました。

近年、環境化学物質は日ごとに増加しつつあり、その健康影響を速やかに明らかにする必要性があります。さらに、環境化学物質の健康影響については、大量曝露による古典的な毒性発現という観点ではなく、低濃度曝露による免疫・アレルギー、神経・行動、内分泌を主軸とする高次機能への影響という観点から再評価する必要性も高まっています。今回開発した「*in vivo* スクリーニングモデル」を活用し、より多くの環境化学物質のアレルギー増悪影響を検討することは、今後の重要な課題でしょう。

本研究の成果を、国民の健康の保持・増進のための施策に結びつけ、安全・安心な環境の保全に役立てていきたいと考えています。

本研究を推進する上で、研究所内外の多くの方々にご協力とご助言をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

平成17年10月

独立行政法人 国立環境研究所
理事長 大塚 柳太郎

目 次

1 研究の目的と経緯	1
1.1 研究の背景と経緯	1
1.2 研究の目的と作業仮説	4
2 研究の成果	5
2.1 DEPに含まれる化学物質がアレルギー性疾患に及ぼす影響とメカニズムの解明に関する研究	6
2.2 フェナントラキノンがアレルギー性疾患に及ぼす影響とメカニズムの解明に関する研究	10
2.3 ナフトキノンがアレルギー性疾患に及ぼす影響とメカニズムの解明に関する研究	12
2.4 フタル酸エステルがアレルギー性疾患に及ぼす影響とメカニズムの解明に関する研究	16
2.4.1 フタル酸エステルが自然発症アトピー性皮膚炎に及ぼす影響に関する研究	16
2.4.2 フタル酸エステルが塩化ピクリル誘発皮膚炎に及ぼす影響に関する研究	17
2.4.3 フタル酸エステルがダニ抗原誘発皮膚炎に及ぼす影響とメカニズム解明および「 <i>in vivo</i> スクリーニングモデル」の開発に関する研究	19
2.4.4 フタル酸エステルの若齢期曝露が皮膚炎に及ぼす影響に関するまとめ	22
2.5 フタル酸エステルの乳児期、胎児期曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響に関する研究	22
2.5.1 フタル酸エステルの乳児期曝露が仔のアトピー性皮膚炎に及ぼす影響に関する研究	22
2.5.2 フタル酸エステルの胎児期曝露が仔のアトピー性皮膚炎に及ぼす影響に関する研究	25
2.6 全体のまとめと展望	27
[資料]	
I 研究の組織と研究課題の構成	33
1. 研究の組織	33
2. 研究課題と担当者	33
II 研究成果発表一覧	34
1. 誌上発表	34
2. 口頭発表	37

1 研究の目的と経緯

1.1 研究の背景と経緯

近年、アトピー性皮膚炎、食物アレルギー、花粉症、アレルギー性鼻炎、気管支喘息などのアトピー（アレルギー）疾患は若年者を中心に急増し、国民の数人に1人に認められる新たな「国民病」となってきた。アレルギー疾患が成人の健康や生活の質（quality of life）、あるいは、次世代を担う若年者の心身両面の健康と成長に及ぼす影響は大きく、アレルギー疾患の増加要因を解明し適切かつ迅速な国家的対策を講ずることは、国民の健康保守と我が国の持続的発展を維持するために、きわめて必要性・危急性の高い課題と考えられる。

ある疾患の増加や発症及び増悪を誘導する二大要因として、一般的に、遺伝因子と環境因子が挙げられる。遺伝因子は、我々の遺伝子により規定される要因である。たとえば、祖先から受け継いだ遺伝子の組み合わせは、常染色体遺伝、伴性遺伝等の遺伝形式により、遺伝因子のみでも疾患の原因となる。一方、アレルギー疾患等の多くの人々を悩ます疾患は、近年、common diseases と呼称されているが、これらのcommon diseasesに悩む人々には一般に大きな染色体や遺伝子群の変異は見られない。しかし、「体質」という言葉でも表現されてきたように、ある疾患になりやすい個人とそうでない個人が存在することを、多くの医師は経験的に感じ取ってきた。最近、一塩基多型（single nucleotide polymorphism: SNP）の概念が導入され、その経験は理論的に証明されつつあ

る。すなわち、ある疾患に対し高感受性である（ある疾患にかかりやすい）ことが遺伝子で規定されている人に（我々の遺伝子を構成する莫大な数の核酸のうち、わずかに一個、もしくは、数個の核酸の種類が変異しているだけでも高感受性になりうる。）、ある種の外的要因が作用することにより、疾患が発症したり増悪したりするという考え方である。そして、この発症や増悪の直接的な誘因となる外的要因こそ、環境因子に他ならないのである（図1）。

次に、近年を迎え急速に増加した、あるいは、増加している疾患の急増要因を考えてみると、我々の遺伝子が急速に、かつ、多くの人々に共通したタイプの変異をきたすということは、放射線等の強力な環境因子の作用がない限り、非常に考えにくい。一方、我々を取り巻く環境について考えてみると、それが急速に、かつ、大きく変化していることに気づかされる。このように、疾患を規定する二大要因の視点から判断すると、アレルギー疾患の急増原因としては、遺伝因子の変化より環境因子の急変がより考えやすい（図1）。また、アレルギー疾患の急増に関わりうる近年急速に変化した、あるいは、変化している環境因子としては、以下のようなものが挙げられる。

（1）居住環境の変化

最近の家屋におけるアルミサッシの使用やコンクリート住宅化、気密化工法の導入等により、我々の居住環境

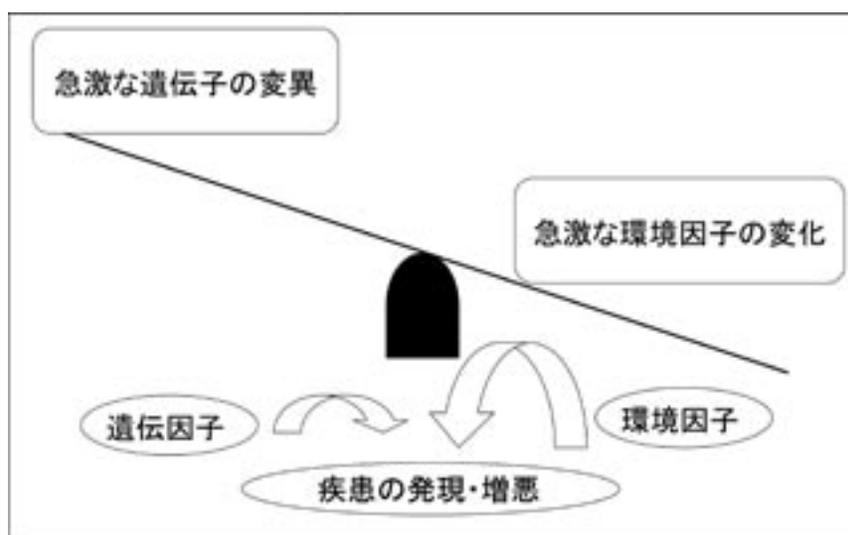


図1 アレルギー疾患の急増要因

は密閉化されてきている。また、空調の使用により室温が定常化され、ダニの繁殖に適した温度条件が通年的に生じやすくなっている。これらの諸条件によりダニに関連するアレルゲンが増加し、種々のアレルギー疾患が増加している可能性があるという考え方である。その一方、木材等の建材の防腐や防虫を企図した種々の化学物質の使用や、壁紙、塗料、接着剤、パーティクルボード等に含まれる化学物質の使用も、近年急速に変化した環境因子のひとつである。これらの変化は、居住空間における化学物質曝露機会の増加を我々にもたらす。

(2) 食環境の変化

物資の流通が飛躍的に向上し、食生活の多様化も急速に進んでいる。我々は、かつて目にしたことさえない食材を口にすることが増えている。新たな食材に含まれている成分は、新たなアレルゲンとなる可能性を否定できない。しかし、現在急増しているアレルギー疾患の患者さんの多くは、ダニやスギ花粉、卵や牛乳、小麦といった昔から存在するアレルゲンに対し特異的な反応を示している場合がほとんどであり、新たなアレルゲンとの遭遇がアレルギー疾患を急増させていると判断することは困難である。一方、食生活の欧米化がアレルギー疾患の増加の一因であるとする研究者もいる。もう一つ重要な側面として、種々の添加物（化学物質）の食物やその容器に対する使用も挙げられている。食品の腐食や食中毒の防止のための防腐剤、酸化を防止するための抗酸化剤、色合いを引き立たせるための着色剤等、様々な化学物質が食品に使用されている。さらに、食品材料の効率的な生育のために、植物に対する農薬や除草剤、動物に対する抗生物質やホルモンの使用といった問題も皆無とはいきれない。また、その利便性・経済性から繁用されるディスプレイの食器あるいは容器にはプラスチックやビニールが使用されることが多いが、その中には可塑剤としていくつかの化学物質が使用されており、この溶出により我々はその曝露を受ける可能性がある。また、大型魚類等の捕食ピラミッドの上位にあるものには水銀やダイオキシン等、水質あるいは底質の汚染物質が濃縮して存在することがあるため、我々は食物を通してこれらの化学物質を摂取する可能性もある。このように、様々な側面から、我々は多くの化学物質の曝露を受ける可能性を否定できない。

(3) 衛生環境の変化

寄生虫疾患や細菌感染症の減少をアレルギー疾患増

加の原因と考える研究者もある。寄生虫に対するIgE抗体がマスト細胞の表面に固着し、花粉やダニ抗原に対するIgE抗体がマスト細胞に固着するのを妨害するという考えもある。マスト細胞は、アレルゲンとアレルゲンに対するIgEが結合すると活性化して疾患のトリガーとなる。そのため両者の接触が防止されるとアレルギーがおこりにくくなるという考え方である。しかし、逆に、寄生虫疾患の罹患が、他のアレルゲンによるアレルギー疾患を増悪したという報告も提出され、議論には余地がある。一方、細菌感染症の減少がアレルギー疾患の増加に関与しているという考え方もある。多くのアレルギー疾患はTh2細胞というリンパ球が中心的役割を演じている病態である。結核等のTh1リンパ球（Th2リンパ球としばしば拮抗する活性を示す。）が主役を演じる感染症が減少したため、Th2細胞が相対的に有意になり、アレルギー反応や疾患が発症・増悪しやすくなったと考える研究者もある。しかし、これについても、結核は必ずしも減少していないこと、感染症によりアレルギーが逆に増悪されるケースなどもあることから、異論も少なからず存在する。一方、もう一つの重要な変化は、抗生物質、抗菌性化学物質等の化学物質の使用である。この現象は、いわゆる抗菌グッズの増加にも象徴されているが、我々は生活の中で抗菌的化学物質の曝露を受けている可能性を否定できない。

(4) 水・大気・土壌環境の変化

最後に、水・大気・土壌環境等、狭義の環境因子の変化があげられる。これは、大気汚染、水質汚染、あるいは土壌汚染として論ぜられてきた環境汚染である。我々は、大気汚染物質であるディーゼル排気微粒子（diesel exhaust particles: DEP）やディーゼル排気（diesel exhaust: DE）がアレルギー性気管支喘息を増悪させることをこれまでに明らかにしてきた。言い換えると、DEPやDEはアレルゲンによる好酸球性気道炎症、粘液産生増加、気道反応性亢進、アレルゲン特異的抗体産生という喘息の諸病態をさらに増悪する。また、DEPは、アレルゲンの存在下で多種のサイトカイン（炎症を惹起する様々な機能を有するタンパク質）の局所発現を増強するが、中でもTh2リンパ球由来のinterleukin (IL) -5というサイトカインの発現を加速することによりアレルギー性気管支喘息を悪化しているものと考えられてきた。我々の実験モデルでは、IL-5により誘導、活性化された好酸球という白血球が、IL-4やIL-2という他の

サイトカインにより産生へと導かれた抗体やその他の炎症性分子の刺激により脱顆粒（活性化に伴い、細胞内の顆粒に含まれる毒性物質を放出すること）し、顆粒に含まれる酵素等の活性物質により気道の傷害や粘液産生細胞の増生などが引き起こされるというアレルギー疾患増悪のシナリオも推測された（図2）。

さて、DEの組成は、粒子成分とガス成分の二種類に大別される。ガス成分には、炭化水素(C1-C10)とその誘導體、アルデヒド、ケトン、ギ酸、アセチレン、ジカルボニル、飽和脂肪酸、アルカン、アルケン、芳香族酸、メタン、メタノール、トルエン、ベンゼン、キノン、ハロゲン化物、スルホン酸塩、硝酸塩、硫酸塩、一酸化窒素、二酸化窒素、二酸化硫黄、一酸化炭素、二酸化炭素、水分等が含まれる。粒子成分（DEP）は、元素状炭素を核として持つことが多いが、沸点の高い炭化水素からなることもある。一般に、核の周囲や内部に、分子量の大きな炭化水素(C14-C35)とその誘導體、多環芳香族炭化水素、スルホン酸塩、ケトン、アルコール、飽和脂肪酸、シクロアルカン、芳香族酸、キノン、硝酸塩、硫酸塩、金属等の非常に多くの物質が存在する。すなわち、DEPは、粒子と莫大な数の化学物質の集合体ということが可能であり、ここでも化学物質というキーワードがアレルギーの増悪と関連して出現していることに気付かされる。

我々はDEPがアレルギー性気管支喘息や花粉症に及

ぼす悪影響を明らかにし、そのメカニズムを解明し、他の文献をも調査・検討してきた過程で、以下の点に注目するにいたった。1) DEPのアレルギー反応増悪作用のかなりの部分は、芳香族炭化水素をはじめとする化学物質により発揮されている可能性があること。2) 化学物質の経気道曝露により気管支喘息や花粉症の増加・増悪は説明し得るが、アトピー性皮膚炎や食物アレルギーの増悪に関しては経気道曝露の影響だけでは説明が困難であり、他の曝露様式（経口、経皮、等）を主とする環境因子(化学物質)の存在に注意を払う必要があること。3) アレルギー疾患の発症年齢の若年化は、環境因子の胎児期、乳児期、若年期における曝露の重要性を示唆すること。

これらを総合的に判断し、『複数の経路よりヒトが曝露を受ける【化学物質】は近年のアレルギー疾患の急増要因の重要な候補と考えられ、若年期における曝露に、特に注意を払う必要がある。』と考えるにいたった。しかし、化学物質に関するこれまでの健康影響評価は、皮膚・粘膜刺激性、発がん性、呼吸器、消化器、神経、肝、腎、血液等への一般毒性によって論じられ、アレルギー疾患への影響をヒトに外挿可能な病態モデルを用いて明らかにしようとする試みはなく、また、若年者への影響に注目した研究はほとんど存在しなかった。



図2 DEPによるアレルギー増悪のメカニズム

1.2 研究の目的と作業仮説

本研究の第一の目的は、ヒトに外挿が可能な（ヒトのアレルギー疾患とよく類似している）適切な病態モデルを用いて、化学物質の曝露がアレルギー疾患に及ぼす影響を明らかにし、ヒトにおいて重要であるにも関わらず見落とされていた可能性がある新たな健康影響指標を提言することにある。第二に、先導的に選択したいくつかの化学物質について、いかなる物質の、いかなる時期における曝露が、アレルギー疾患を増悪するかを明らかにする。第三に、ヒトと動物の病態に共通して重要な役割を演じている遺伝子やタンパクのレベルで、増悪メカニズムを明らかにする。第四に、化学物質のアレルギー増悪影響を簡易、かつ、短期間で評価・推定することが可能な「*in vivo* スクリーニングモデル」を開発し、その有用性を検討する。

我々は、化学物質とアレルギー疾患の関連について、以下のような作業仮説を考えた。『ある種の化学物質は、アレルギー反応やアレルギー疾患を増悪する。増悪メカニズムとしては、ヒトと動物に共通する Th2 タイプのリンパ球に由来するサイトカインやケモカインの発現亢進が重要である。この発現亢進には、化学物質の毒性発現やアレルギー反応に関連する転写因子や核内レセプターが重要な役割を演じている可能性がある。』

2 研究の成果

まず、研究計画の概要をスキームで示した（図3）。具体的には、数種類の化学物質を先導的に選択し、胎児期、乳児期、若齢期等にマウスに曝露した。仔動物の5週齢から8週齢への成長を目安としてアレルゲンの投与を開始し、成長過程におけるアレルギー疾患の増悪の有無を評価した。

先導的に選択する化学物質としては、（1）「核内レセプターである peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) を介して作用する化学物質（フタル酸エステル）」、（2）「aryl hydrocarbon receptor (Ah receptor) を介して作用する化学物質」、（3）「フリーラジカル生成を介し転写因子を活性化する可能性がある化学物質（フェナントラキノン、ナフトキノン等のキノン類）」、特に、（2）、（3）の特徴を同時に満たす化学物質としてDEPに含まれる脂溶性化学物質（群）を選択した。なお、フタル酸エステルは労働衛生環境における調査により、DEPに含まれる脂溶性化学物質は *in vitro* の実験系により、いずれもアレルギー反応を増悪する可能性が報告されている。

一方、対象とするアレルギー疾患モデルとしては、発症年齢の若年化が著しいアトピー性皮膚炎とアレルギー

マーチの終着にあたる気管支喘息を選択し、ヒトにおける病態を的確に再現しうる動物モデルを用いた。さらに、化学物質によるアレルギー疾患の増悪メカニズムを明らかにするために、多方面から分子生物学的検討を加えた。同時に、動物とヒトの病態において共通して重要な役割を演じている遺伝子とタンパクをターゲットとして分子生物学的検討を行うことにより、動物モデルにおける実験成果をヒトにおける健康影響に外挿するための確固たるエビデンスを与えることをめざした。検討対象とする分子あるいは細胞種としては、アレルゲンに特異的な抗体、リンパ球、肥満細胞、好酸球をはじめとするアレルギー疾患の成立に重要な役割を演じている免疫担当細胞、サイトカイン (IL-5, IL-4, IL-2, etc) およびケモカイン (EOTAXIN, RANTES, IL-8 etc.) 等に特に注目した。

最後に、化学物質がアレルギー疾患に及ぼす影響を簡易、かつ、短期間で評価・推定することが可能な「*in vivo* スクリーニングモデル」を開発を試みた。このモデルは、アトピー性皮膚炎という実際のアレルギー疾患への増悪影響を表現している点、陽性コントロールとして用いることができる化学物質が存在するという点にお

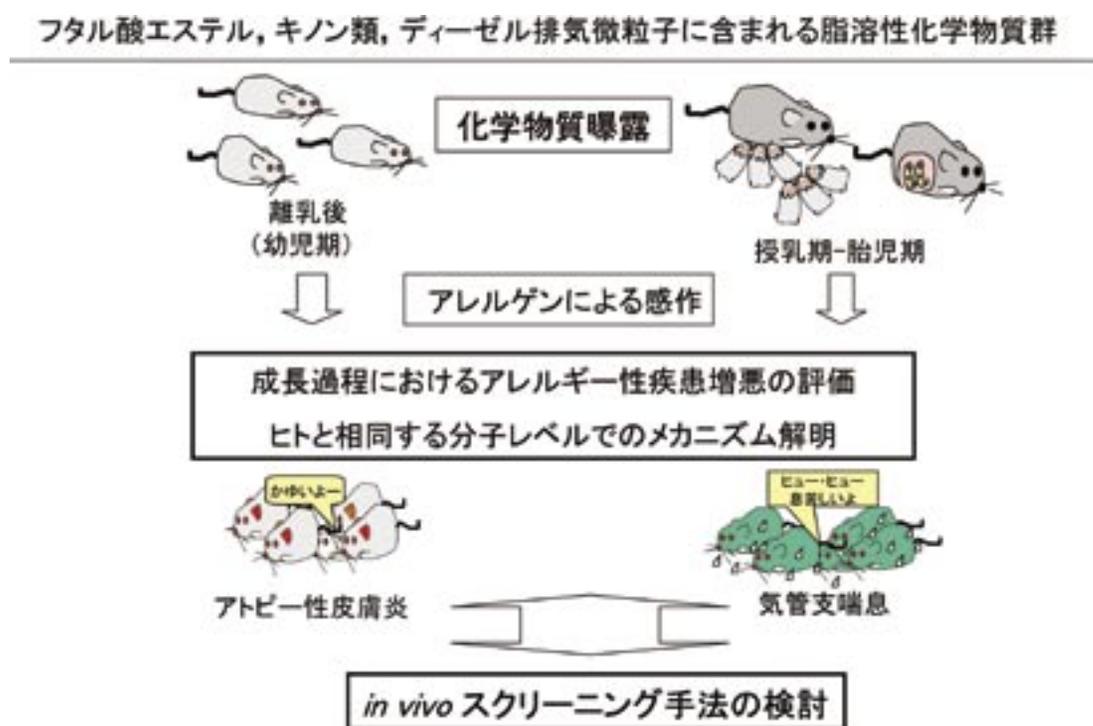


図3 研究全体のスキーム

いても、非常に優れたスクリーニングモデルと考えられた。

各研究課題の具体的成果を以下に示した。

2.1 DEPに含まれる化学物質がアレルギー性疾患に及ぼす影響とメカニズムの解明に関する研究

DEPを脂溶性溶媒であるジクロロメタン中で超音波を用いてよくかくはんした。図4に示すプロトコールにより、DEPをジクロロメタンで抽出される脂溶性化学物質(organic chemicals in DEP: DEP-OC)とジクロロメタンに溶けない残渣粒子(washed DEP)に分けた。これらのDEP成分を用い、どちらの成分がDEPによるアレルギー性気管支喘息増悪作用において主たる役割を演じているかについて検討した。本実験のプロトコールを図5に示す。若齢のICR系雄性マウスを6群に分けた。第1群には、各成分の溶解(懸濁)に用いた溶液(vehicle: 0.1 ml/animal)を、第2群にはvehicleに溶解(懸濁)したDEP-OC (50 µg/animal)を、第3群には

vehicleに溶解(懸濁)したwashed DEP (50 µg/animal)を、第4群にはvehicleに溶解(懸濁)したDEP全成分(whole DEP: 100 µg/animal)を、第5群にはアレルギーとして卵白アルブミン(ovalbumin: OVA, 1 µg/animal)溶液を、第6群にはDEP-OCとアレルギーを、第7群にはwashed DEPとアレルギーを、第8群にはwhole DEPとアレルギーを、それぞれ、ハロセン麻酔下にポリエチレンチューブを用いて気管内投与した。vehicle, DEP-OC, washed DEP, whole DEPは毎週、計7回、アレルギーは隔週、計4回、気管内投与した。最終投与の24時間後にマウスを解剖し、下記の検討を行った。

まず、深麻酔下に採血をした後、気管に先端鈍の針を挿入し、これを通して、生理食塩水により気管支と肺胞を洗浄(気管支肺胞洗浄)した。回収した気管支肺胞洗浄液の中に含まれる炎症性細胞の数を算定し、各群の炎症の強度を定量的に比較した。

アレルギー性炎症には好酸球という白血球が重要な傷害的役割を演じている。vehicle, DEP-OC, washed DEP

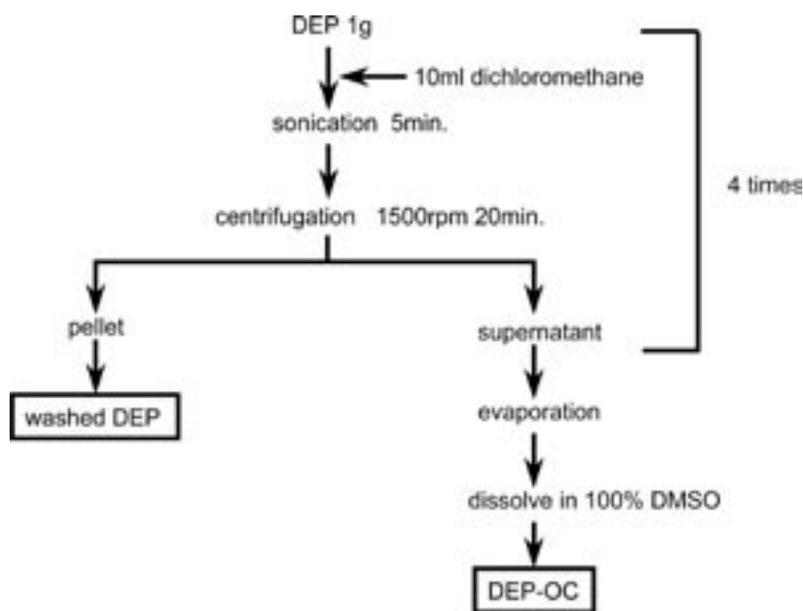


図4 DEP構成成分の分離法

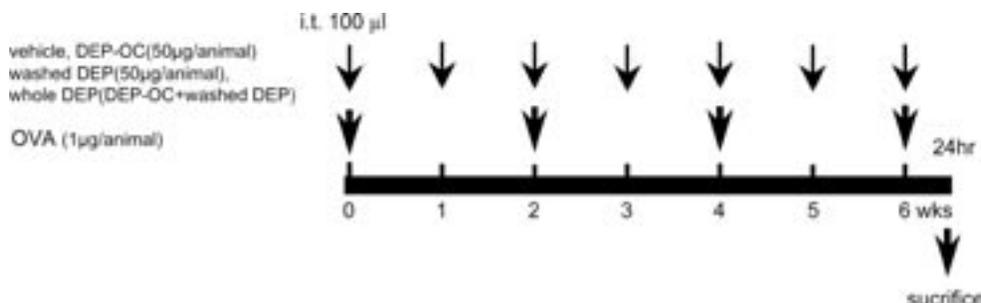


図5 アレルゲンとDEP構成成分の経気道曝露実験のデザイン

を気管内投与しても、気管支肺胞洗浄液中に好酸球は認められなかった（図6）。whole DEPもしくはアレルギーを単独で気管内投与すると、気管支肺胞洗浄液中に好酸球が出現した。washed DEPとアレルギーをともに気管内投与しても、好酸球の出現はアレルギー単独投与に比較し少数であった。しかし、DEP-OCとアレルギーを併用して投与すると、アレルギー単独投与群に比較し、好酸球数は明らかに増加していた。さらに、whole DEPとアレルギーを併用投与すると、最も多くの好酸球の浸出が気管支肺胞内に認められた。

好酸球とともに炎症に関わる白血球として好中球が

上げられる。気管支肺胞洗浄液中の好中球の浸出は（図7）、vehicle、DEP-OCではほとんど誘導されなかった。washed DEP、whole DEP、アレルギーの単独投与により、気管支肺胞洗浄液に好中球の浸出が認められた。DEP-OCとアレルギーを併用して投与すると、好中球数は明らかに増加していた。さらに、whole DEPとアレルギーをともに投与すると、最も多くの好中球の浸出が気管支肺胞内に認められた。

次に、肺における炎症の重症度を、組織学的にも検討した。好中球、好酸球とともに、アレルギー性炎症で重要な役割を演じる単核球の出現の程度、アレルギー

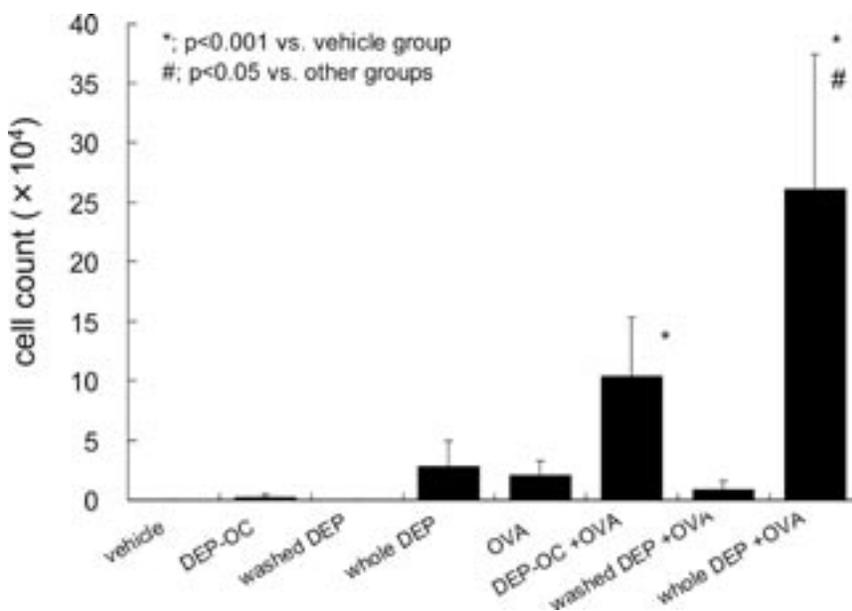


図6 気管支肺胞洗浄液中の好酸球数

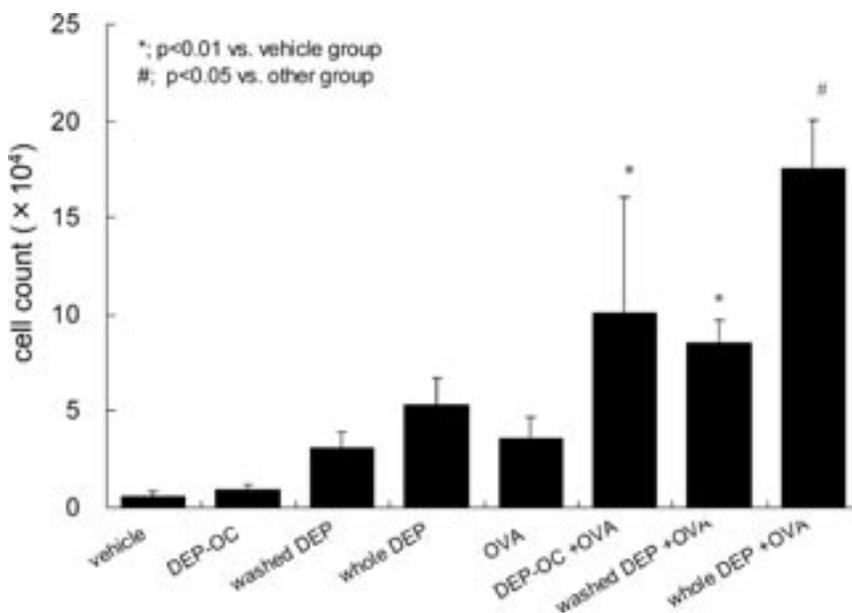


図7 気管支肺胞洗浄液中の好中球数

アレルギー性気管支喘息の重症化と密接に関連する粘液産生細胞の出現の程度についても、各動物において重症度をスコア化して評価することにより、定量的に比較した(表1)。vehicle, DEP-OC, washed DEP, whole DEPを単独で気管内投与しても、好中球や好酸球の出現はほとんど認められなかった。アレルゲンの単独投与により、好酸球や好中球(多形核白血球)の肺組織中への出現が観察された。DEP-OC, washed DEP, whole DEPとアレルゲンを併用して投与すると、好酸球や好中球による炎症は、各々の単独投与と比較し、有意に増悪していた。whole DEPとアレルゲンの併用投与により最も顕著な炎症の増悪が観察された。単核球と粘液産生細胞の出現に関しても、DEP-OC, whole DEPとアレルゲンの併用投与により、アレルゲン単独投与と比較し有意な出現の増加が認められた。DEP-OC, whole DEPと比較すると、washed DEPの併用投与に関しては、アレルギー性炎症の増悪効果は弱かった。

以上より、アレルギー性気管支喘息の基本的病態である好酸球、好中球、単核球等による気道炎症と粘液産生細胞の増加は、washed DEPよりむしろ、DEP-OCとアレルゲンとの併用投与により増悪させられることが明らかになった。また、whole DEPの併用による増悪効果は、

もっとも顕著であった。この結果より、アレルギー性気管支喘息を増悪させるDEPの主たる構成成分は、残渣粒子ではなく、脂溶性化学物質(群)であることが明らかになった。また、粒子と脂溶性化学物質群が共存することにより、アレルギー性の炎症が相乗的に増悪させられることも明らかとなった。

続いて、DEP構成成分によるアレルギー性炎症の増悪効果について、タンパク分子レベルでメカニズムの解明を試みた。アレルギー性炎症においては、Th2リンパ球が産生するTh2タイプのサイトカインという活性タンパク質が重要な役割を演じている。好酸球の活性化に特に重要なIL-5、抗体産生やTh2リンパ球の活性化に重要なIL-4, IL-10、粘液産生細胞の増加に重要なIL-13というサイトカインについて、肺における発現量をELISAという手法を用いて各々の動物個体の肺について定量し、各群における差異を比較検討した(表2)。

中でも、特徴的所見が認められたのは、IL-5であった。IL-5は、vehicle投与と比較し、whole DEP, アレルゲンの単独投与で、若干の発現亢進が認められた。DEP-OCとアレルゲンを併用投与すると、各々の単独投与と比較し、IL-5の肺における発現は明らかに増強していた。しかし、whole DEPとアレルゲンの併用投与のIL-5上昇

表1 病理組織像における重症度スコア

群	動物数(n)	多形核白血球数	単核球数	粘液産生細胞数
vehicle	4	0	0.500 ± 0.204	0
DEP-OC	4	0	1.000 ± 0.612	0.625 ± 0.625
washed DEP	5	0.100 ± 0.100	0.800 ± 0.339	0.500 ± 0.387
whole DEP	5	0.100 ± 0.100	1.100 ± 0.332	0.200 ± 0.122
OVA	5	0.800 ± 0.515	1.000 ± 0.548	0.500 ± 0.274
DEP-OC+OVA	5	2.700 ± 0.464 ^{##, ‡}	3.000 ± 0.224 ^{#, ††}	2.100 ± 0.510 ^{**, †}
washed DEP+OVA	5	2.700 ± 0.464 ^{##, ‡}	1.800 ± 0.604 [*]	1.300 ± 0.539 [*]
whole DEP+OVA	5	2.900 ± 0.332 ^{##, ‡}	3.000 ± 0.224 ^{#, ††}	2.300 ± 0.561 ^{**, ††}

*; p<0.05 vs. vehicle group, **; p<0.01 vs. vehicle group, #; p<0.001 vs. vehicle group, ##; p<0.0001 vs. vehicle group, †; p<0.05 vs. OVA group, ††; p<0.01 vs. OVA group, ‡; p<0.001 vs. OVA group, ‡‡; p<0.0001 vs. OVA group.

表2 肺組織におけるTh2タイプサイトカインの発現変化

pg/supernatant	IL-4	IL-5	IL-10	IL-13
vehicle	276.01 ± 29.51	12.34 ± 0.31	24.92 ± 3.06	1.285 ± 1.29
DEP-OC	249.37 ± 23.05	13.22 ± 0.47	17.26 ± 1.52 [*]	3.32 ± 2.00
washed DEP	245.65 ± 23.63	12.83 ± 0.32	13.73 ± 1.66 ^{**}	1.129 ± 0.43
whole DEP	254.48 ± 12.68	31.80 ± 16.65	18.57 ± 2.57	29.24 ± 13.35
OVA	258.23 ± 21.90	33.52 ± 12.98	19.98 ± 1.69	22.31 ± 9.57
DEP-OC+OVA	256.07 ± 17.51	75.34 ± 18.02 ^{**, †}	22.24 ± 2.81	39.42 ± 27.38
washed DEP+OVA	259.95 ± 31.15	22.90 ± 7.45	13.38 ± 2.95 [#]	6.27 ± 5.41
whole DEP+OVA	306.34 ± 23.43	184.15 ± 23.13 [§]	30.79 ± 1.76 ^{††, ††, §§}	165.03 ± 36.27 [§]

*; p<0.05 vs. vehicle group, **; p<0.01 vs. vehicle group, #; p<0.001 vs. vehicle group, †; p<0.05 vs. OVA group, ††; p<0.01 vs. OVA group, †††; p<0.01 vs. washed DEP+OVA and DEP-OC+OVA group, §§; p<0.0001 vs. washed DEP+OVA group, §; p<0.0001 vs. other groups.

効果は、より顕著であった。一方、washed DEP とアレルギーの併用投与は、アレルギー単独投与に比較し、特に変化をきたさなかった。IL-13 に関して、DEP-OC とアレルギーを併用投与すると、アレルギーの単独投与に比較し、IL-13 の肺における発現は 2 倍程度に増強していた。また、whole DEP とアレルギーの併用投与の IL-13 上昇効果は、8 倍前後とより顕著であった。一方、washed DEP とアレルギーの併用投与では、アレルギー単独投与に比較し、IL-13 は発現が低下する傾向にあった。IL-10 に関して結果は同様の傾向にあったが、IL-5 や IL-13 に比較すると、その傾向は顕著とはいえなかった。IL-4 に関しては、whole DEP とアレルギーの併用投与により発現量は最も多かったが、有意な変化は認めなかった。

次に、アレルギー反応に対し抑制的に働くことが報告されている Th1 リンパ球に由来する Th1 タイプのサイトカインの肺における発現量を、ELISA により測定した (表 3)。アレルギー性炎症を抑制する作用を持つ interferon (IFN) γ は、アレルギーと washed DEP を併用して投与すると、アレルギー単独投与に比較し、その発現が亢進していた。IL-12 に関しては、有意な変化を

認めなかった。

最後に、白血球を炎症部位に呼び寄せる機能を有するケモカインという機能性タンパクの肺における発現量を ELISA により検討した (表 4)。最も特徴的所見が観察されたのは、好酸球を呼び寄せる効果を持つ eotaxin というケモカインであった。

eotaxin は、DEP-OC、washed DEP、whole DEP の投与により、vehicle 投与に比較して、その発現量は若干増加していた。アレルギーの単独投与では、vehicle 投与に比較して、有意な発現の増加が観察された。DEP-OC とアレルギーを併用投与すると、各々の単独投与に比較し、eotaxin の肺における発現は有意に増強していた。また、whole DEP とアレルギー併用投与時の eotaxin 上昇効果は、最も顕著であった。一方、washed DEP とアレルギーの併用投与は、アレルギー単独投与に比較し、低下傾向を示した。

単核球を主として呼び寄せる作用を持つ monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 の肺における発現を、次に検討した。アレルギー単独投与により MCP-1 の発現は、vehicle に比較し亢進していたが、whole DEP とアレルギーの併用投与は、これをさらに増加させた。

表 3 肺組織における Th1 タイプサイトカインの発現変化

pg/supernatant	IFN- γ	IL-12
vehicle	561.14 \pm 37.24	901.98 \pm 100.44
DEP-OC	584.16 \pm 55.57	1102.74 \pm 270.87
washed DEP	558.21 \pm 25.22	1049.16 \pm 130.76
whole DEP	533.48 \pm 24.46	944.42 \pm 70.26
OVA	535.65 \pm 59.83	802.67 \pm 74.67
DEP-OC+OVA	621.43 \pm 48.98	884.77 \pm 76.80
washed DEP+OVA	696.36 \pm 73.71 \dagger	1082.03 \pm 115.88
whole DEP+OVA	455.19 \pm 74.90 \S	960.76 \pm 66.97

\dagger ; p<0.05 vs. OVA group, \S ; p<0.01 vs. washed DEP+OVA group

表 4 肺組織におけるケモカインの発現変化

pg/supernatant	Eotaxin	MIP-1 α	MCP-1	RANTES
vehicle	36.06 \pm 17.62	2.17 \pm 1.13	24.21 \pm 3.10	218.85 \pm 11.67
DEP-OC	116.13 \pm 4.94	5.16 \pm 1.56	28.17 \pm 2.91	264.22 \pm 26.36
washed DEP	130.85 \pm 6.82	24.71 \pm 7.58	54.25 \pm 5.95	347.02 \pm 44.62 *
whole DEP	255.36 \pm 108.62	53.79 \pm 7.28 $\#$	72.50 \pm 32.52	252.63 \pm 33.25
OVA	355.33 \pm 145.78 *	15.12 \pm 2.01	130.79 \pm 19.50 $^{##}$	307.24 \pm 49.84
DEP-OC+OVA	765.13 \pm 163.68 $^{##, \dagger}$	10.88 \pm 10.13	96.26 \pm 10.99 **	374.45 \pm 23.45 **
washed DEP+OVA	222.75 \pm 75.46	12.09 \pm 1.73	54.14 \pm 6.04 $\dagger \dagger$	370.34 \pm 40.61 **
whole DEP+OVA	1375.91 \pm 169.43 \S	76.45 \pm 22.78 $^{##, \dagger \dagger, \ddagger}$	162.39 \pm 27.27 $^{##, \dagger}$	337.11 \pm 25.34 *

* ; p<0.05 vs. vehicle group, ** ; p<0.01 vs. vehicle group, # ; p<0.001 vs. vehicle group, ## ; p<0.0001 vs. vehicle group, \dagger ; p<0.05 vs. OVA group, $\dagger \dagger$; p<0.01 vs. OVA group, \ddagger ; p<0.0001 vs. OVA group, $\dagger \dagger$; p<0.01 vs. washed DEP+OVA and DEP-OC+OVA group, $\dagger \dagger \dagger$; p<0.0001 vs. washed DEP+OVA and DEP-OC+OVA group, \S ; p<0.0001 vs. other groups

好中球を主として呼び寄せる作用を持つ macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α は、whole DEP 単 独 投 与 により、vehicle 投与に比較し、有意に増強したが、whole DEP とアレルゲンの併用投与ではさらなる発現の上昇が観察された。

以上より、DEP 構成成分によるアレルギー性炎症の増悪メカニズムとしては、好酸球を活性化するサイトカインである IL-5 と好酸球を呼び寄せるケモカインである eotaxin の肺における発現増強が非常に重要な役割を演じていることが示唆された。また、粘液産生細胞の増加効果を持つ IL-13 というサイトカインの発現増強、単核球や好中球を呼び寄せる効果を持つ MCP-1 や MIP-1 α の発現亢進も、重要な役割を演じていることが示唆された。これらのサイトカインやケモカインは、ヒトにおけるアレルギー性炎症でも重要な役割を演じていることが、既に明らかにされている。ヒトと動物の病態に共通して重要な役割を演じているタンパク分子のレベルで増悪メカニズムを明らかにできたことは、本動物実験における結果をヒトにおける健康影響に外挿する上で重要と考えられる。

2.2 フェナントラキノンがアレルギー性疾患に及ぼす影響とメカニズムの解明に関する研究

フェナントラキノン (図 8) は、燃焼を起源とする一般大気中の浮遊粒子状物質や DEP に含まれる多環芳香族炭化水素のひとつであり、酸化還元サイクルによりフリーラジカルを生成し、生体に酸化ストレスを与えることが知られている。酸化ストレスは、生体傷害の原因となりうることや転写因子というタンパク質の活性化をもたらす炎症に

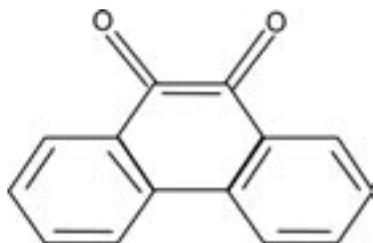


図 8 フェナントラキノン (PQ) の構造式

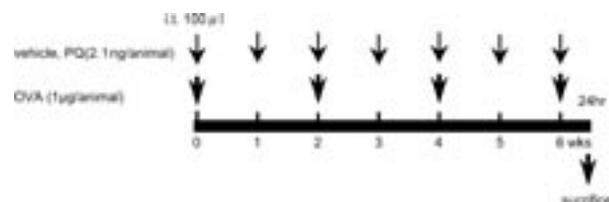


図 9 アレルゲンとフェナントラキノンの経気道曝露実験のデザイン

関わる種々の分子を誘導することも明らかにされている。そこで、次に、フェナントラキノンの経気道曝露がアレルギー性気管支喘息に及ぼす影響を検討した。

実験のプロトコルを図 9 に示す。若齢の ICR 系雄性マウスを 4 群に分けた。第 1 群には、各成分の溶解に用いた溶液 (vehicle : 0.1 ml/animal) のみを、第 2 群には vehicle に溶解したアレルゲン (OVA: 1 μ g/animal) を、第 3 群には vehicle に溶解したフェナントラキノン (DEP 100 μ g に含まれると換算される 2.1 ng/animal という量を設定した。) を、第 4 群にはフェナントラキノンとアレルゲンを、それぞれ、ハロセン麻酔下にポリエチレンチューブを用いて気管内投与した。vehicle, フェナントラキノン (PQ) は毎週、計 7 回、アレルゲンは隔週、計 4 回、気管内投与した。最終投与の 24 時間後にマウスを解剖し、下記の検討を行った。

まず、気管支肺胞洗浄液の中に含まれる炎症性細胞の数を算定し、各群の炎症の強度を定量的に比較した。vehicle, フェナントラキノンを経気道投与しても、気管支肺胞洗浄液中に好酸球は認められなかった (図 10)。アレルゲンを単独で気管内投与すると、気管支肺胞洗浄液中に好酸球が出現した。フェナントラキノンとアレルゲンを併用して投与すると、アレルゲン単独投与に比較し、好酸球数は有意に増加していた。

気管支肺胞洗浄液中の単核球の浸出も (図 11)、vehicle, フェナントラキノンの気管内投与では見られなかった。アレルゲンを単独で気管内投与すると、気管支肺胞洗浄液中に単核球が出現した。フェナントラキノンとアレルゲンを併用して投与すると、各々の単独投与に

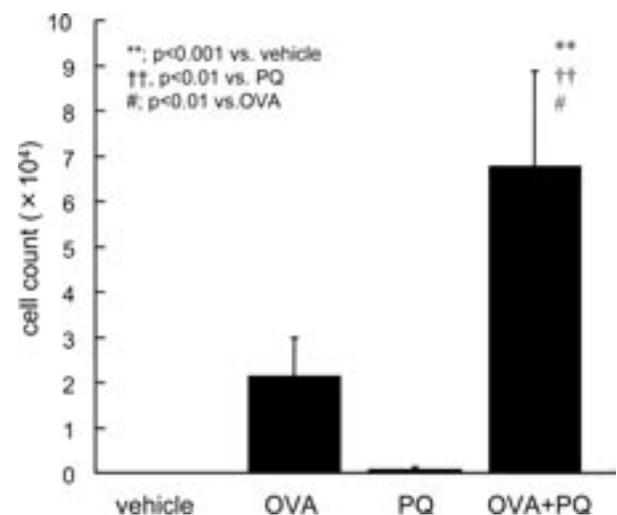


図10 気管支肺胞洗浄液中の好酸球数

比較し、単核球数も有意に増加していた。

次に、肺における炎症の程度を、組織学的に検討した。好酸球と粘液産生細胞は、vehicle、フェナントラキノンの気管内投与ではほとんど誘導されなかった（表5）。アレルギーの単独投与により、好酸球や粘液産生細胞の肺組織中における増加が観察された。しかし、フェナントラキノンとアレルギーを併用して投与しても、好酸球や粘液産生細胞の増加は、アレルギー単独投与に比較して有意な増加を示さなかった。

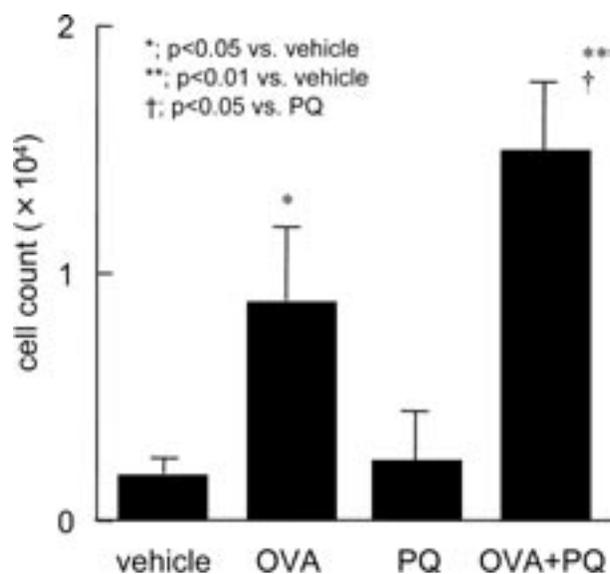


図11 気管支肺胞洗浄液中の単核球数

以上のように、フェナントラキノン、アレルギーにより気管支肺胞内に浸出する炎症細胞数を有意に増加させたが、肺の組織内部ではアレルギー性炎症の増悪効果は乏しかった。すなわち、フェナントラキノンはアレルギー性気道炎症を部分的に増悪しうるが、DEP-OCに比較するとその効果は弱いと考えられる。このように、フェナントラキノンはアレルギー増悪影響を発揮しうるものの、その作用だけでDEP-OCのアレルギー増悪影響を説明しうるものではないことが明らかにされた。

続いて、フェナントラキノンによるアレルギー性炎症の増悪効果について、タンパク分子レベルでメカニズムの解明を試みた（表6）。まず、Th2サイトカインに関する結果を示す。IL-5は、vehicle投与に比較し、アレルギーの単独投与で発現の亢進が認められた。しかし、フェナントラキノンとアレルギーを併用投与しても、アレルギーの単独投与に比較し、IL-5の肺における発現に有意な変化を認めなかった。IL-4とgranulocyte macrophage

表5 病理組織像における重症度スコア

Group	n	好酸球	粘液産生細胞
vehicle	9	0.25 ± 0.25	0.50 ± 0.38
OVA	8	2.75 ± 0.28*	2.44 ± 0.26*
PQ	7	0.86 ± 0.21	0.29 ± 0.18
PQ + OVA	8	2.78 ± 0.19* †	2.39 ± 0.45* †

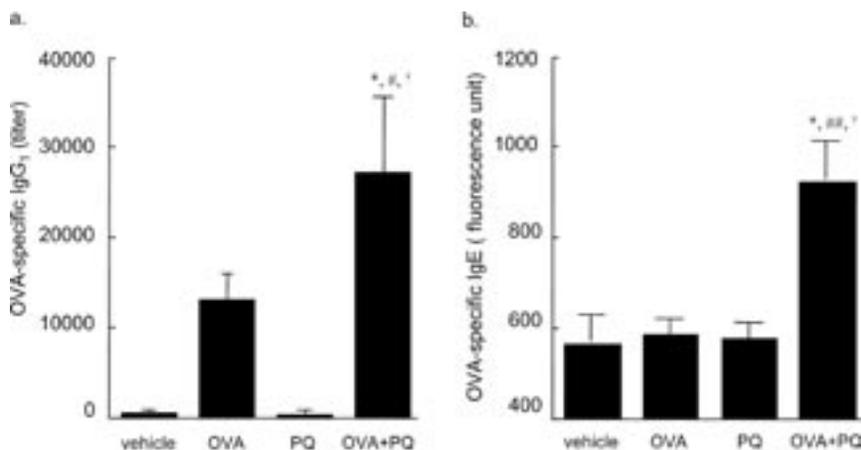
*; p<0.05 vs. vehicle, †; p<0.001 vs. PQ

表6 肺組織における炎症性タンパクの発現変化

Group	n	IFN-γ	IL-2	IL-4	IL-5	eotaxin	GM-CSF
vehicle	7	1128.5 ± 124.1	226.6 ± 14.3	N.D	3.5 ± 1.4	34.9 ± 6.6	15.1 ± 0.9
OVA	8	1320.3 ± 136.5	252.5 ± 13.6	N.D	75.0 ± 23.6**	460.0 ± 141.5*	13.9 ± 0.5
PQ	7	1412.4 ± 300.7	223.4 ± 9.0	N.D	4.7 ± 1.7	58.4 ± 7.2	14.7 ± 0.8
PQ + OVA	8	1093.9 ± 85.2	229.1 ± 17.2	N.D	43.9 ± 22.2	336.1 ± 189.2	13.1 ± 0.4

pg/total lung supernatants

*; p<0.05 vs. vehicle, **; p<0.01 vs. vehicle



*; p<0.001 vs. vehicle, #; p<0.05 vs. OVA, ##; p<0.001 vs. OVA, †; p<0.001 vs. PQ

図12 アレルギー特異的抗体価の産生量

colony stimulating factor (GM-CSF) に関しては、各群間で有意な変化を認めなかった。

Th1 サイトカインの肺における発現量に関しても、IFN- γ も IL-2 も、各群間で有意な変化を認めなかった。

最後に、ケモカインについても検討した。eotaxin は、アレルゲンの単独投与により、vehicle 投与に比較して、有意に発現が増加した。しかし、フェナントラキノンとアレルゲンを併用投与しても、アレルゲンの単独投与に比較し、eotaxin の肺における発現に有意な変化は認めなかった。

以上より、フェナントラキノンによるアレルギー性炎症の部分的増悪効果は、DEP-OC とは異なり、Th2 サイトカインの発現亢進によるものではないことが示唆された。また、この点からも、フェナントラキノンだけで DEP-OC のアレルギー増悪影響を説明しうるものではないことが明らかにされた。

一方、アレルゲン特異的抗体産生に対する効果からも、フェナントラキノンのアレルギー増悪効果を検討した。アレルギー反応の増悪には、IgG1 という抗体や IgE という抗体が重要な役割を演じている。これらの抗体は好酸球や肥満細胞という白血球に捕そくされ、抗体に特異的なアレルゲンと反応する。アレルゲンと抗体の相互作用が惹起されると、好酸球や肥満細胞はその内部の顆粒という小さな袋に蓄えられていた毒性物質を放出し、アレルギー反応を惹起する。アレルゲンの単独投与によりアレルゲン特異的 IgG1 抗体の産生が誘導されたが (図 12a)、アレルゲンとフェナントラキノンを併用して投与すると、アレルゲン特異的抗体産生はさらに顕著に増加していた。一方、アレルゲン特異的 IgE 抗体も、アレルゲンとフェナントラキノンの併用投与により、他群に比較し、有意な産生の増強が観察された (図 12b)。以上より、フェナントラキノンは、アレルゲン特異的抗体産生を増強することによっても、アレルギー性疾患を増悪しうることが示唆された。

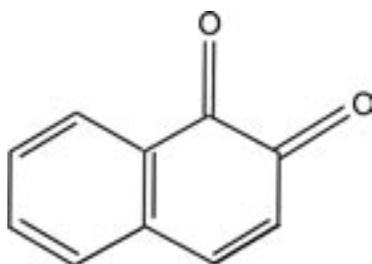


図13 ナフトキノン (NQ) の構造式

2.3 ナフトキノンがアレルギー性疾患に及ぼす影響とメカニズムの解明に関する研究

ナフトキノン (図 13) も、DEP や燃焼を起源とする一般環境中の浮遊粒子状物質に含まれる多環芳香族炭化水素のひとつであり、酸化還元サイクルによりフリーラジカルを生成し、生体に酸化ストレスを与える。また、ナフトキノンには、種々のタンパク分子と共有結合を形成することによっても生体毒性を発揮する可能性があることも報告されている。そこで、次に、ナフトキノンの経気道曝露がアレルギー性気管支喘息に及ぼす影響を検討した。

若齢の ICR 系雄性マウスを 8 群に分け、図 14 に示すようなプロトコールで実験を行った。第 1 群には、各成分の溶解に用いた溶液 (vehicle : 0.1 ml/animal) のみを、第 2 群には vehicle に溶解したナフトキノン (DEP:100 μ g に含まれると換算される 1.58 ng/animal) を、第 3 群には vehicle に溶解したナフトキノン (15.8 ng/animal) を、第 4 群には vehicle に溶解したナフトキノン (158 ng/animal) を、第 5 群には vehicle に溶解したアレルゲン (OVA: 1 μ g/animal) を、第 6 群にはナフトキノン (1.58 ng/animal) とアレルゲンを、第 7 群にはナフトキノン (15.8 ng/animal) とアレルゲンを、第 8 群にはナフトキノン (158 ng/animal) とアレルゲンを、それぞれ、ハロセン麻酔下にポリエチレンチューブを用いて気管内投与した。vehicle、ナフトキノン (NQ) は毎週、計 7 回、アレルゲンは隔週、計 4 回、気管内投与した。最終投与の 24 時間後にマウスを解剖し、下記の検討を行った。

まず、気管支肺胞洗浄液の中に含まれる炎症性細胞の数を算定し、各群の炎症の重症度を定量的に比較した。vehicle、ナフトキノンを気管内投与しても、気管支肺胞洗浄液中に好酸球はほとんど認められなかった (図 15a)。アレルゲンを単独で気管内投与すると、気管支肺胞洗浄液中に好酸球が出現した。ナフトキノンとアレルゲンを併用して投与すると、各々の単独投与に比較し、好酸球数は増加し、最も濃い濃度では有意な上昇が観察された。アレルゲン単独気管内投与に比較し、ナフトキノンとア

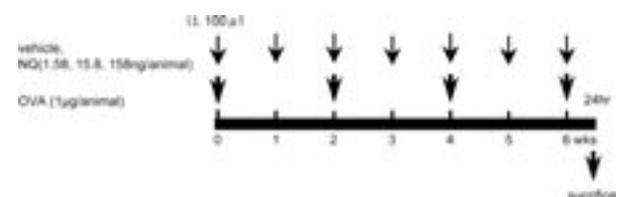


図14 アレルゲンとナフトキノンの経気道曝露実験のデザイン

レルゲンの併用投与により、気管支肺胞洗浄液中の単核球 (図 15b) と好中球の浸出も増加し (図 15c)、最も濃い濃度では有意な上昇が観察された。

次に、肺における炎症の程度を、組織学的に検討した (図 16, 図 17)。好酸球は、vehicle, ナフトキノンの気管内投与ではほとんど誘導されなかった (図 16a, 図 17a,b)。アレルギーの単独投与により、好酸球の肺組織中における増加が観察された (図 16a, 図 17c)。ナフトキノンとアレルギーを併用して気管内投与すると、ア

レルゲン単独投与と比較し、好酸球による炎症は有意に増悪していた (図 16a, 図 17d)。vehicle, ナフトキノンの気管内投与と比較し、アレルギーの単独投与により、単核球は増加傾向にあった (図 16b)。アレルギーとナフトキノンを併用して気管内投与すると、アレルギー単独投与と比較しても、有意かつナフトキノンの濃度に比例して、単核球の浸潤 (細胞が血管の中から外に出て、組織中に存在するようになること) は増悪していた。粘液産生細胞も vehicle, ナフトキノンの気管内投与では

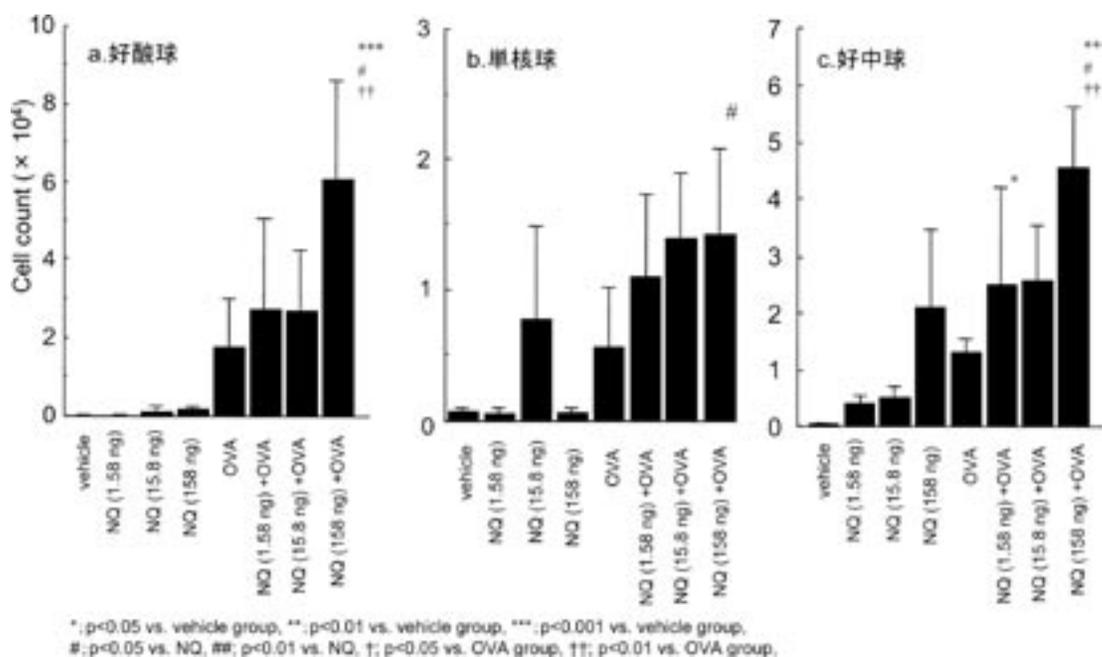


図15 気管支肺胞洗浄液中の細胞数の変化

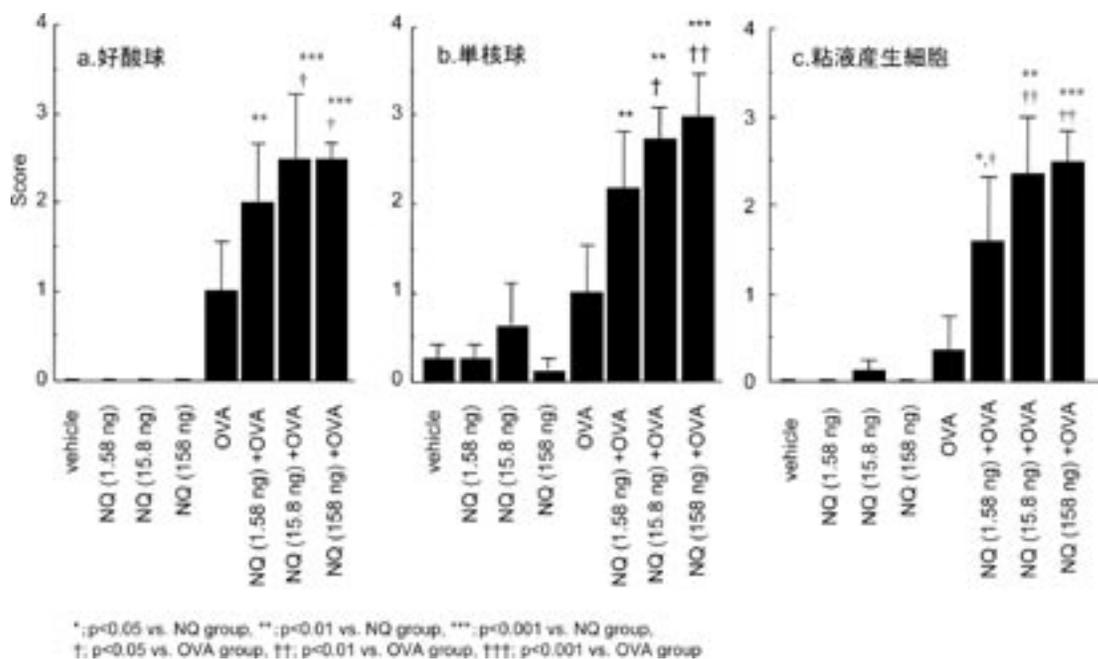


図16 病理組織における重症度スコア

ほとんど誘導されなかった (図 16c, 図 18a,b)。アレルギーの単独投与により、粘液産生細胞の肺組織中における増加が観察された (図 16c, 図 18c)。ナフトキノンをアレルギーを併用して気管内投与すると、アレルギー単独投与に比較し、粘液産生細胞の増加は有意かつナフトキノンの濃度に比例して増悪していた (図 16c, 図 18d)。

以上のように、ナフトキノンは、フェナントラキノンとは異なり、アレルギーにより気管支肺胞内に浸出する炎症細胞数には大きな変化をきたさなかった。しかし、ナフトキノンは、肺の組織内部におけるアレルギー性炎症と粘液産生細胞の増加を有意かつ濃度依存性に増悪した。DEP-OCはこの両者を増悪したことから、ナフトキノンはアレルギー性気道炎症を増悪するものの、DEP-OCに比較するとその効果は弱いことが示唆され

た。しかし、組織学的炎症と粘液産生細胞の増加というアレルギー性喘息の病態そのものを増悪していることから、ナフトキノンのアレルギー性炎症増悪効果は、フェナントラキノンに比較し、より大きく意義の深いものであることが示唆された。一方、DEP-OCとアレルギーの併用投与では認められた気管支肺胞内に浸出する炎症細胞数の顕著な変化がナフトキノンをアレルギーの併用投与では認められなかったことから、ナフトキノンの作用だけでDEP-OCのアレルギー増悪影響を説明するものではないことも明らかにされた。

続いて、ナフトキノンのアレルギー性炎症の増悪効果について、タンパク分子レベルでメカニズムの解明を試みた (表 7)。まず、Th2 サイトカインである IL-5 は、ナフトキノンの単独投与では、vehicle 投与に比較し、明らかな変化を認めなかった。vehicle 投与に比較し、ア

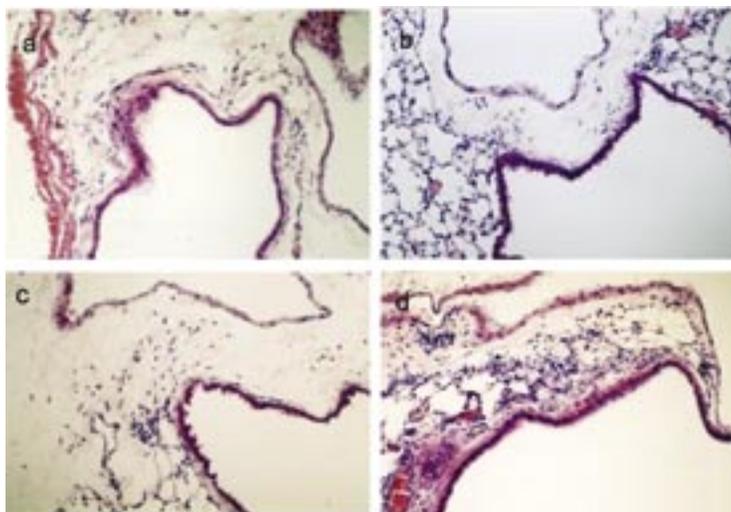


図17 肺の病理組織学的変化(HE染色)

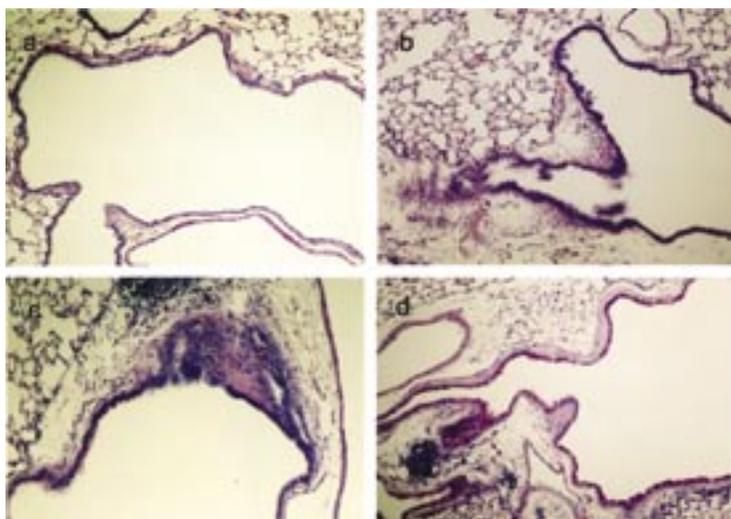


図18 肺の病理組織学的変化(PAS染色)

レルゲンの単独投与により IL-5 の発現亢進が認められた。ナフトキノンをアレルギーを併用投与すると、アレルギーの単独投与と比較し、IL-5 の肺における発現は増加する傾向にあった。ケモカインである eotaxin も、同様に、ナフトキノンを単独投与では、vehicle 投与と比較し、明らかな変化を認めなかった。vehicle 投与と比較し、アレルギーの単独投与により eotaxin の発現亢進が認められた。ナフトキノンをアレルギーを併用投与すると、アレルギーの単独投与と比較し、eotaxin の肺における発現は増加する傾向にあった。同じくケモカインに含まれる白血球を呼び寄せる作用を持つ MCP-1 と KC は、アレルギーの単独投与により、vehicle 投与と比較して若干の発現増強が認められた。ナフトキノンをアレルギーを併用投与すると、アレルギーの単独投与と比較し、MCP-1 と KC の肺における発現は、ナフトキノンの濃度に依存して増加する傾向にあり、最も濃い濃度のナフトキノンをアレルギーを併用投与により、アレルギーの単独投与と比較し、有意な発現の上昇が観察された。以上より、ナフトキノンをアレルギー性炎症の増悪効果は、DEP-OC とは異なり、Th2 サイトカインや eotaxin の発現亢進を主とするものではないことが示唆された。また、この点からも、ナフトキノンをだけで DEP-OC のア

レルギー増悪影響を説明するものではないことが明らかにされた。しかし、フェナントラキノンは異なり、ナフトキノンのアレルギー性炎症増悪効果が、MCP-1 あるいは KC というケモカインの発現亢進により、少なくとも部分的に、もたらされている可能性があることも示唆された。

次にアレルギー特異的抗体産生に対する効果からも、ナフトキノンのアレルギー増悪効果を検討した。アレルギーと最も少ない濃度のナフトキノンを併用して投与すると、アレルギーの単独投与と比較し、アレルギー特異的 IgG1 抗体産生はさらに増加していた (表 8)。一方、アレルギー特異的 IgE 抗体に関しては、アレルギーとナフトキノンの併用投与とアレルギーの単独投与の間で、有意な差は認めなかった。ナフトキノンのアレルギー増悪効果においては、アレルギー特異的抗体産生増悪作用は、フェナントラキノンのそれに比較し、重要度が低いものである可能性が示唆された。

以上のように、DEP や燃焼を起源とする一般環境中の浮遊粒子状物質に含まれる多環芳香族炭化水素であるフェナントラキノンをナフトキノンは、アレルギー性炎症を増悪しうることが明らかになった。しかし、その影響は量的にも質的にも両者において若干異なることが明

表 7 肺組織における炎症性タンパクの発現変化

Group	(n)	cytokine		chemokine	
		IL-5	eotaxin	MCP-1	KC
vehicle	8	14.56 ± 1.42	66.31 ± 2.52	18.44 ± 4.05	17.90 ± 4.61
NQ(1.58)	8	16.20 ± 1.47	63.46 ± 5.01	13.86 ± 2.45	15.30 ± 2.55
NQ(15.8)	8	10.86 ± 1.72	88.54 ± 14.42	29.28 ± 6.28	48.88 ± 13.51
NQ(158)	8	10.38 ± 1.21	74.76 ± 3.50	24.14 ± 3.72	19.81 ± 6.74
OVA	8	46.08 ± 15.98	233.70 ± 90.78	44.64 ± 9.37	32.38 ± 10.46
OVA+NQ(1.58)	6	52.52 ± 21.03	236.37 ± 147.55	35.20 ± 15.76	68.98 ± 23.22
OVA+NQ(15.8)	7	38.37 ± 10.47	140.67 ± 35.59	50.93 ± 15.58*	73.76 ± 35.98
OVA+NQ(158)	7	77.04 ± 29.94**##	405.97 ± 181.02***	79.71 ± 17.59****†	106.49 ± 40.51**#†

* ; p<0.05 vs.vehiclegroup, ** ; p<0.01 vs. vehicle group, *** ; p<0.001 vs. vehicle group, #; p<0.01 vs. NQ group, ##; p<0.001 NQ group, † ; p<0.05 vs. OVA group

表 8 アレルギー特異的抗体価の変化

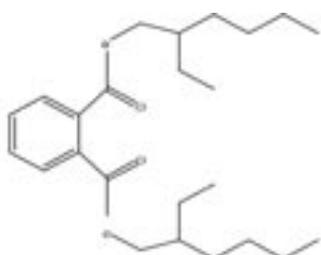
Group	(n)	IgE	IgG1
		(fluorescence unit)	(titer)
Vehicle	8	808.00 ± 74.79	9476.14 ± 2631.87
NQ(1.58)	8	690.00 ± 67.88	20243.47 ± 14149.69
NQ(15.8)	8	890.00 ± 71.23	7906.61 ± 2558.97
NQ(158)	8	1161.00 ± 136.37*	16916.50 ± 7284.73
OVA	8	851.00 ± 85.99	23857.60 ± 11268.83
OVA+NQ(1.58)	6	690.67 ± 48.65	180777.77 ± 10856.16***, #, ††
OVA+NQ(15.8)	7	564.57 ± 30.23	80392.98 ± 37169.91
OVA+NQ(158)	7	1281.14 ± 284.72**,*†	39856.72 ± 13380.47

* ; p<0.05 vs.vehiclegroup, ** ; p<0.01 vs. vehicle group, *** ; p<0.001 vs. vehicle group, #; p<0.01 vs. NQ group, † ; p<0.05 vs. OVA group, †† ; p<0.05 vs. OVA group

らかになった。総じて、フェナントラキノンに比較し、ナフトキノンの増悪影響がより強いものと考えられた。しかし、フェナントラキノンもしくはナフトキノンは、単独原因物質として、DEPのアレルギー増悪影響を担っているものとするのは困難であった。今後、DEPに含まれるその他の化学物質の重要性や、多種類の化学物質の複合影響について検討を加えるべきと考えられた。

2.4 フタル酸エステルがアレルギー性疾患に及ぼす影響とメカニズムの解明に関する研究

次に、近年増加と若年化が顕著であるアトピー性皮膚炎について、化学物質が与える影響の有無を検討した。化学物質としては、プラスチックの可塑剤として繁



NOAEL: 19mg/kg/day
 一日予測摂取量: 6 μ g/kg/day
 一日予測最大摂取量: 44 μ g/kg/day

図19 フタル酸ジエチルヘキシルの構造式

用されているフタル酸エステルを先導的に選択した。フタル酸エステルは、乳幼児や胎児への曝露が確認されており、産業衛生の現場ではアレルギー症状の増悪との関連を指摘する報告もある。また、核内レセプターであるPPARというタンパク質を活性化し、様々な遺伝子の活性化に関与していることも報告されている。フタル酸ジエチルヘキシル(図19)の、NOAEL(最大無毒性量)は、肝臓に対する毒性を指標とした実験から、19 mg/kg/dayという値が広く認められている。また、一日予測最大摂取量として、44 μ g/kg/dayという値を試算している報告もある。

一方、ヒトにおけるアトピー性皮膚炎に非常に近い動物モデルとして実験的に広く用いられているNc/Ngaマウスという系統のマウスを、本研究においても使用した。Nc/Ngaマウスは、通常飼育下で長期間飼育することによりアトピー性皮膚炎を自然発症することが知られており、塩化ピクリルという物質を耳に塗布することで、より早期に皮膚炎を発症することも確立している。

2.4.1 フタル酸エステルが自然発症アトピー性皮膚炎に及ぼす影響に関する研究

最初に、フタル酸ジエチルヘキシルが自然発症アトピー性皮膚炎に及ぼす影響を検討した。本計画のプロト

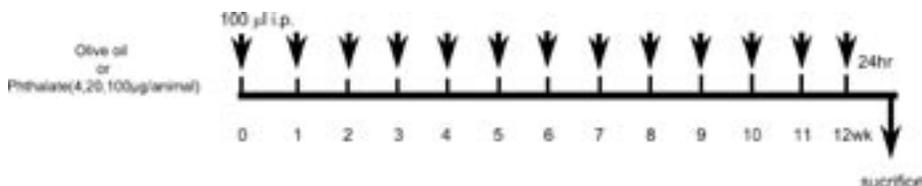


図20 フタル酸ジエチルヘキシル曝露実験のデザイン

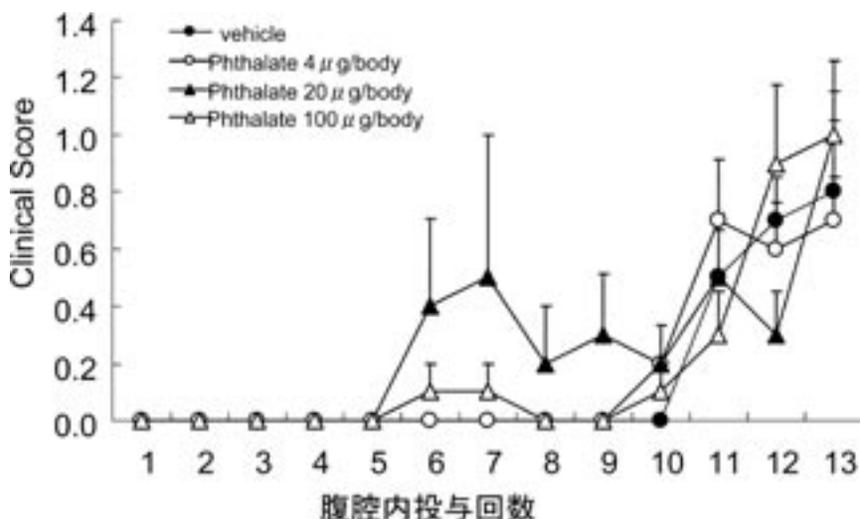


図21 フタル酸エステル腹腔内投与による病態の経時的変化

コールを図 20 に示す。5 週齢の Nc/Nga マウス（体重約 20～25g）を 4 群に分け、第 1 群にはフタル酸ジエチルヘキシルの溶解に用いたオリーブオイルを、100 μ l ずつ、週に 1 度、計 13 回、腹腔内に投与した。第 2 群には、フタル酸ジエチルヘキシルを 4 μ g/animal の量で、オリーブオイル 100 μ l に溶解し、週に 1 度、計 13 回、腹腔内に投与した。第 3 群には、フタル酸ジエチルヘキシルを 20 μ g/animal の量で、週に 1 度、計 13 回、腹腔内に投与した。第 4 群には、フタル酸ジエチルヘキシルを 100 μ g/animal の量で、週に 1 度、計 13 回、腹腔内に投与した。この研究計画における投与量は、概算で、24, 120, 600 μ g/kg/day 程度の一日あたりの曝露量に相当すると考えられる。

アトピー性皮膚炎の症状は、乾燥肌（カサカサ肌）、発疹（ブツブツ）、掻爬傷（引っかき傷）について、4 段階（0：なし；1：軽度；2：中等度；3：重度）とスコア値して定量的に評価した。総点数をクリニカルスコアとして、症状の重症度の総合的評価軸として用い、各群の差異を経時的に検討した。

図 21 に示すように、オリーブオイルの単独投与群では、アトピー性皮膚炎の症状は、投与開始 11 週目ごろから出現した。これに対し、フタル酸ジエチルヘキシルを 20 μ g ずつ毎週投与すると、6 週ごろから既にアトピー性皮膚炎の症状が出現し、その後も持続した。フタル酸ジエチルヘキシルを 100 μ g ずつ投与した動物でも、アトピー性皮膚炎の症状が 6 週ごろより出現したが、20 μ g 投与群と比較すると影響は軽微であった。4 μ g 投与群では、オリーブオイルの単独投与群と明らかな差は認めなかった。すべての群において、投与開始 11 週目ごろからは皮膚炎の重症度に明らかな差を認めなくなった。

以上より、フタル酸ジエチルヘキシルは自然発症アトピー性皮膚炎モデルの発症時期を早めることが明らかになった。また、この効果は、20 μ g/animal の投与量で最も顕著であった。

2.4.2 フタル酸エステルが塩化ピクリル誘発皮膚炎に及ぼす影響に関する研究

自然発症アトピー性皮膚炎モデルは、3～4 ヶ月にわたる長期の研究期間を必要とするため、化学物質投与以外にも長期飼育による様々な影響（他の動物からの受傷等）を受ける可能性が少なくない。また、多くの化学物質を対象として影響評価を実践してゆくためには、研究必要期間の短縮化が不可欠である。また、フタル酸ジエチルヘキシルの皮膚炎増悪効果は、複数のモデルで検証すべきとも考えられる。そこで、塩化ピクリルという物質を耳介部に塗布することにより、皮膚炎をより早期に誘導し、これにフタル酸ジエチルヘキシルが与える影響を検討した。

本計画のプロトコールを図 22 に示す。6 週齢の Nc/Nga マウス（体重約 20～25g）を 4 群に分け、第 1 群にはフタル酸ジエチルヘキシルの溶解に用いたオリーブオイルを、100 μ l ずつ、週に 1 度、計 13 回、腹腔内に投与した。第 2 群には、フタル酸ジエチルヘキシルを 4 μ g/animal の量で、オリーブオイル 100 μ l に溶解し、週に 1 度、計 13 回、腹腔内に投与した。第 3 群には、フタル酸ジエチルヘキシルを 20 μ g/animal の量で、週に 1 度、計 13 回、腹腔内に投与した。第 4 群には、フタル酸ジエチルヘキシルを 100 μ g/animal の量で、週に 1 度、計 13 回、腹腔内に投与した。この研究計画における投与量は、概算で、24, 120, 600 μ g/kg/day 程度の一日あたりの曝露量に相当すると考えられる。これらすべての群に対し、塩化ピクリル処置を行った。まず、Acetone 2.5ml, Ethanol 7.5ml(=1:3)を混合し、0.5g の塩化ピクリルを加え溶解した (fc.5%)。初回感作として、この溶液 150 μ l を剃毛した腹部に筆で塗布した。この 4 日後より、週に一度ずつ、Olive oil 7.5ml, Acetone 7.5ml(=1:1)を混合し 0.12g の塩化ピクリルを加え溶解 (fc. 0.8%) した溶液を左右耳介に併せて 150 μ l、背部（両耳の間を中心に前肢辺りまで）に 150 μ l、筆で塗布した。

皮膚炎の症状は、3 部位（耳、顔、頭～背中）について、

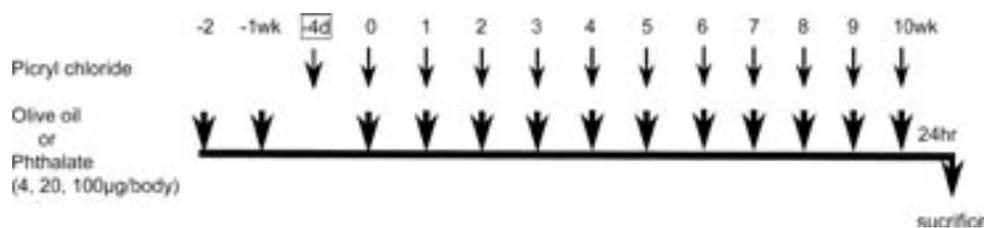


図22 塩化ピクリル誘発皮膚炎モデルに対するフタル酸エステルの影響の実験デザイン

乾燥肌（カサカサ肌）、発疹（ブツブツ）、掻爬傷（引っかき傷）を対象とし、4段階（0：なし；1：軽度；2：中等度；3：重度）で評価した。総点数を総合的重症度を表すクリニカルスコアとして用い、定量的、かつ、経時的に各群の症状変化を比較検討した。

図23に示すように、オリーブオイルの単独投与群では、皮膚炎症状は、塩化ピクリル塗布開始3週目ごろから出現し、経時的に増悪した。これに対し、フタル酸ジエチルヘキシルを4もしくは20 µg ずつ毎週投与した動物では、オリーブオイルを単独で投与した動物と比較し、塩化ピクリル塗布開始6週もしくは7週後から、皮膚炎の症状は有意に増悪していた。症状は、その後も、フタル酸ジエチルヘキシルを4もしくは20 µg ずつ毎週投与した動物で、オリーブオイルを単独で投与した動物と比較して顕著であった。しかし、フタル酸ジエチルヘキシルを100 µg ずつ投与した動物では、オリーブオイルを単独で投与した動物と比較しわずかに症状は増悪していたが、4もしくは20 µg ずつ毎週投与した動物に比

較するとその増悪効果は軽微であった。代表的な肉眼所見を図24に示す。乾燥肌（カサカサ肌）、発疹（ブツブツ）、掻爬傷（引っかき傷）は、フタル酸ジエチルヘキシルを4もしくは20 µg ずつ毎週投与した動物で強かった。また、一般に炎症が惹起されると、その部位に腫脹（腫れ上がること）が出現する。そこで、炎症が惹起されている耳介の厚さを測定することによっても、皮膚炎の重症度を定量化した。この結果（図25）もクリニカルスコアとほぼ同様であり、フタル酸ジエチルヘキシルを投与した動物では、オリーブオイルを単独で投与した動物と比較し、耳介が腫脹により厚くなっていた。また、この効果は、20, 100, 4 µg の順に顕著であった。

一方、この塩化ピクリル塗布誘発皮膚炎モデルは、塩化ピクリルそのものにより比較的重症の皮膚炎が惹起されるため、他の化学物質の相加・相乗影響を検討するためには、感度等の点で若干問題が残ると考えられた。また、自然発症モデルと比較し研究必要期間を短縮することが可能であったが、なお評価に2～3ヵ月を要した。

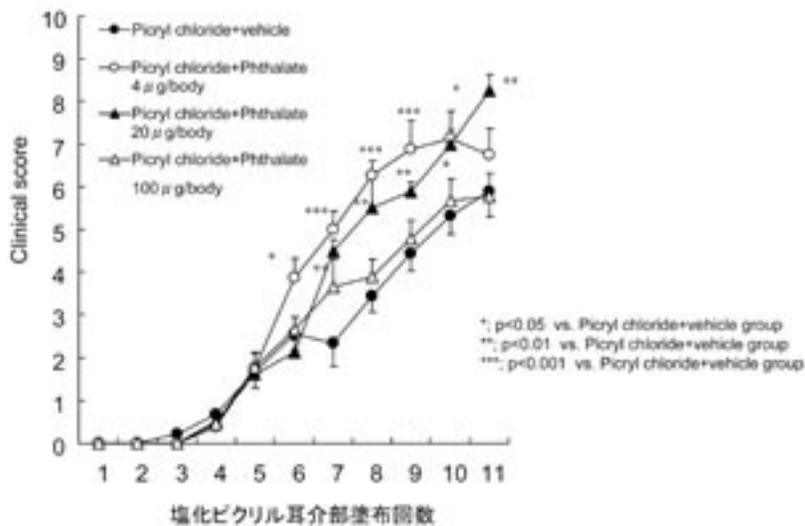


図23 塩化ピクリル塗布による病態変化とフタル酸エステルの影響



図24 フタル酸エステル曝露による塩化ピクリル誘発皮膚炎モデルにおける肉眼所見

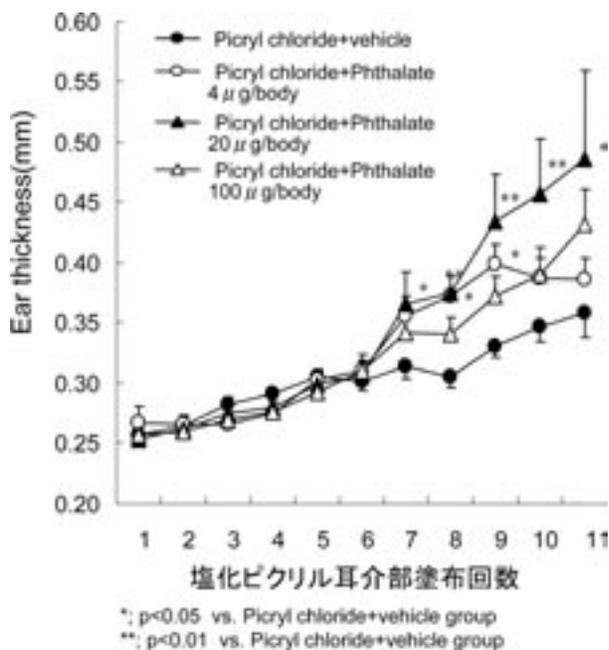


図25 塩化ピクリル塗布による耳介厚の変化とフタル酸エステルの耳介厚に及ぼす影響

2.4.3 フタル酸エステルがダニ抗原誘発皮膚炎に及ぼす影響とメカニズム解明および「*in vivo* スクリーニングモデル」の開発に関する研究

より多くの化学物質についてアレルギー増悪影響を評価するためには、さらなる研究必要期間の短縮が必須である。「*in vivo* スクリーニングモデル」として、当初は、化学物質を曝露したマウスにアレルギーの腹腔内投与を行い、アレルギーの重要な効果細胞である好酸球が腹腔内に浸出してくる数と、好酸球の遊走・活性化をもたらす IL-5, eotaxin の腹腔内濃度等を測定することにより、当該化学物質のアレルギー増悪の可能性を評価するという *in vivo* スクリーニング手法の確立を企図した。しかし、実験期間の短縮効果、実験操作の簡略化、実際のアレルギー疾患モデルとの相同性、化学物質の投与方法の制約、等に、種々の問題を残した。そこで、Nc/Nga マウスを用い、ダニ抗原を耳介の皮内に投与することにより、塩化ピクリルと比較して軽度の皮膚炎を早期から誘

導する「*in vivo* スクリーニングモデル」の開発を試みた。このダニ抗原誘発アトピー性皮膚炎モデルにフタル酸ジエチルヘキシルが与える影響を検討した。

本実験のプロトコルを図 26 に示す。8 週齢の Nc/Nga マウス（体重約 20 ~ 25g）を 7 群に分けた。第 1 群には何の処置も施さなかった（無処置群）。第 2 群には、ダニ抗原の溶解のために用いた生理食塩水を 10 μl 右側の耳介に皮内注射した。また、フタル酸ジエチルヘキシルを溶解したオリーブオイルを腹腔内に投与した。第 3 群には、10 μl の生理食塩水に溶解したダニ抗原（5 μg/animal）を右側の耳介に皮内注射した。また、フタル酸ジエチルヘキシルを溶解したオリーブオイルを腹腔内に投与した。第 4 群には、ダニ抗原を右側の耳介に皮内注射し、フタル酸ジエチルヘキシルを 0.8 μg/animal の量で投与した。第 5 群には、ダニ抗原を右側の耳介に皮内注射し、フタル酸ジエチルヘキシルを 4 μg/animal の量で投与した。第 6 群には、ダニ抗原を右側の耳介に皮内注射し、フタル酸ジエチルヘキシルを 20 μg/animal の量で投与した。第 7 群には、ダニ抗原を右側の耳介に皮内注射し、フタル酸ジエチルヘキシルを 100 μg/animal の量で投与した。すべての群において、ダニ抗原もしくは生理食塩水は、フタル酸ジエチルヘキシル投与開始の 4, 6, 8, 11, 13, 15, 18, 20 日後に、計 8 回、皮内投与した。フタル酸ジエチルヘキシルもしくはオリーブオイルは、100 μl を、週に 1 度、計 4 回、腹腔内に投与した。この研究計画におけるフタル酸ジエチルヘキシルの投与量は、概算で、4.8, 24, 120, 600 μg/kg/day 程度の日あたりの曝露量に相当すると考えられる。

耳介のアトピー性皮膚炎の症状を、ダニ抗原の皮内投与 24 時間後に評価した。評価は、乾燥肌（カサカサ肌）、発疹（ブツブツ）、搔爬傷（引っかき傷）、浮腫（腫れ）を対象とし、4 段階（0：なし；1：軽度；2：中等度；3：重度）で行った。総点数を、総合的重症度

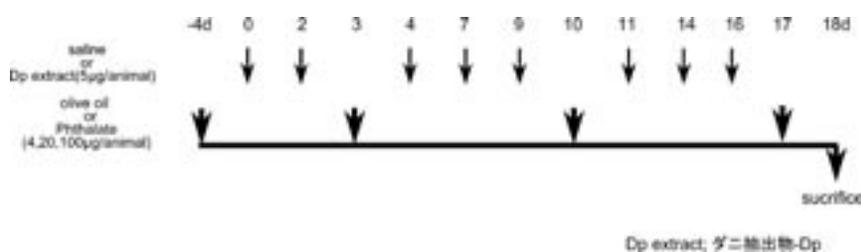


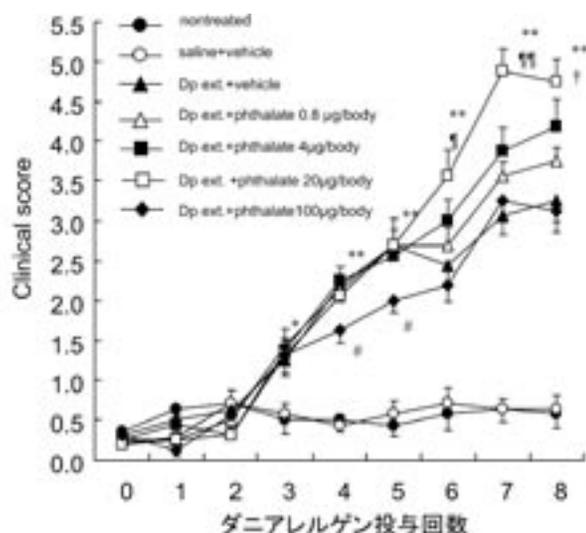
図26 ダニ抗原誘発皮膚炎モデルにおけるフタル酸エステルの若齢期曝露実験のデザイン

を表すクリニカルスコアとして、定量的、かつ、経時的に各群の症状変化を比較検討した。耳介厚についても経時的に測定した。

図 27 に示すように、ダニアレルゲンを投与していない第 1 群と第 2 群では、3 週間の間に皮膚炎の症状は惹起されなかった。ダニアレルゲンを皮内投与すると、3 回目のアレルゲン投与後から皮膚炎症状が出現し、経時的に増悪した。フタル酸ジエチルヘキシルを 0.8、4 もしくは、20 μg ずつ毎週投与した動物では、オリーブオイルを単独で投与した動物に比較し、アレルゲン投与

4 回目後より、皮膚炎の症状は有意に増悪していた。実験期間の 3 週間を通してこの増悪影響は観察された。また、この増悪効果は、フタル酸ジエチルヘキシルの投与量に依存して強くなっていたが、100 μg ずつ毎週投与した動物では、増悪影響は逆に軽微であった。代表的な肉眼所見を図 28 に示すが、症状は、フタル酸ジエチルヘキシルを 20 μg ずつ毎週投与した動物で最も強かった。また、耳介の厚さに関して (図 29) もクリニカルスコアと同様の結果であった。

このダニアレルゲン誘発アトピー性皮膚炎モデルは、



*, p<0.05 nontreated group and saline+vehicle group vs. other groups. **, p<0.0001 nontreated group and saline+vehicle group vs. other groups
 †, p<0.05 Dp ext.+ vehicle group vs. Dp ext.+Phthalate 100 $\mu\text{g}/\text{body}$ group. ††, p<0.01 Dp ext.+ vehicle group vs. Dp ext.+Phthalate 100 $\mu\text{g}/\text{body}$ group
 ‡, p<0.05 Dp ext.+ vehicle group vs. Dp ext.+Phthalate 4 $\mu\text{g}/\text{body}$ group. ‡‡, p<0.001 Dp ext.+Phthalate 20 $\mu\text{g}/\text{body}$ group vs. other groups
 †††, p<0.0001 Dp ext.+ vehicle group vs. Dp ext.+Phthalate 20 $\mu\text{g}/\text{body}$ group

図27 フタル酸エステル若齢期曝露によるアトピー性皮膚炎の症状変化

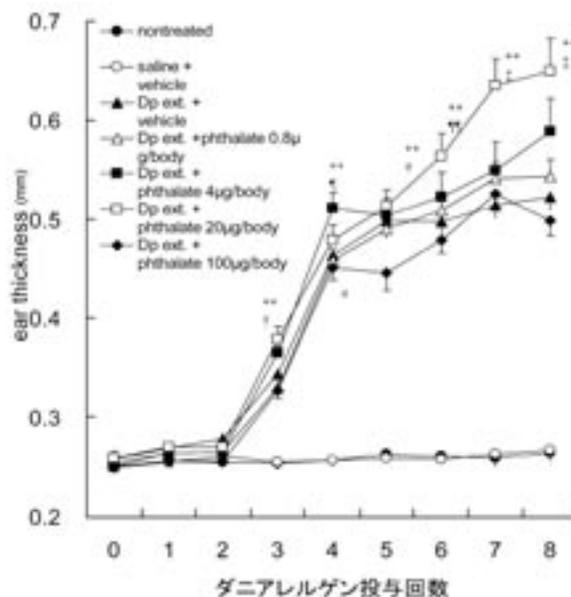


図28 フタル酸エステル若齢期曝露によるダニアレルゲン誘発皮膚炎の肉眼所見

当初予定していたスクリーニング手法に比較し、3週間という短期間の研究期間で化学物質の影響を判断することが可能であり、気管内投与等の特殊技術も不必要で化学物質の投与方法にも制約がなく、実際の皮膚炎という病態を表現しうること、また、フタル酸ジエチルヘキシルという陽性コントロールを持つこと、等から、「*in vivo* スクリーニングモデル」として、より有用であると考えられた。また、ダニ抗原皮内投与による皮膚炎モデルは、自然発症モデルや塩化ピクリル誘導モデルに比較し、相対的に軽症であり、化学物質の影響を感度よく検知するためにもより有用であると考えられた。

続いて、フタル酸ジエチルヘキシルによるダニアレゲン誘発アトピー性皮膚炎モデルの増悪効果について、タンパク分子レベルでメカニズムの解明を試みた(表9)。ELISA という方法により、耳介におけるサイ

トカインやケモカインというタンパク質の発現量を測定した。Th2リンパ球が産生するTh2タイプのサイトカインであるIL-5は、ダニアレゲンの皮内投与により、生理食塩水の皮内投与に比較し、有意に発現の上昇が認められた。ダニアレゲンを皮内投与した動物間で比較を行うと、フタル酸ジエチルヘキシルを4µgずつ毎週投与した動物では、オリーブオイルを単独で投与した動物に比較し、IL-5の耳介部における発現は明らかに増強していた。しかし、クリニカルスコア判定の24時間後に耳介をタンパク測定に供したためか、症状の増悪とIL-5の発現量は、必ずしも並行していなかった。IL-10に関しても、ダニアレゲンを皮内投与した動物間で比較すると、フタル酸ジエチルヘキシルを毎週投与した動物では、オリーブオイルを単独で投与した動物に比較し、耳介部における発現量は明らかに増強してい



***p*<0.0001 nontreated group and saline+vehicle group vs. other groups, #*p*<0.05 Dp ext.+ vehicle group vs. Dp ext.+Phthalate 100 µg/body group, †*p*<0.05 Dp ext.+ vehicle group vs. Dp ext.+Phthalate 20 µg/body group, ††*p*<0.01 Dp ext.+ vehicle group vs. Dp ext.+Phthalate 20 µg/body group, †††*p*<0.01 Dp ext.+ vehicle group vs. Dp ext.+Phthalate 4 µg/body group, ‡*p*<0.001 Dp ext.+Phthalate 20 µg/body group vs. other groups

図29 フタル酸エステル若齢期曝露によるダニアレゲン誘発皮膚炎の耳介厚変化

表9 耳介部における炎症性タンパクの発現変化

Group	Aminals (n)	IL-5	IL-10	Eotaxin
nontreated	8	0.005 ± 0.005	2.104 ± 0.624	4.07 ± 0.39
saline+vehicle	8	0	0.859 ± 0.382	6.64 ± 0.91
Dp+vehicle	8	1.626 ± 0.422	2.889 ± 0.188	24.33 ± 3.47
Dp+Phthalate0.8 µg/body	8	2.667 ± 0.736*	2.046 ± 0.218	25.70 ± 4.09
Dp+Phthalate4 µg/body	8	3.298 ± 0.956**	4.327 ± 0.778*	64.65 ± 16.35**
Dp+Phthalate20 µg/body	8	2.632 ± 0.439*	2.885 ± 0.472#	32.54 ± 5.22†, †
Dp+Phthalate100 µg/body	8	4.003 ± 0.679***	2.165 ± 0.201	28.05 ± 4.00

*; *p*<0.01 vs. nontreated and saline+vehicle group, **; *p*<0.001 vs. nontreated and saline+vehicle group,

***; *p*<0.0001 vs. nontreated and saline+vehicle group, #; *p*<0.05 vs. saline+vehicle group.

† ; *p*<0.01 vs. Dp+vehicle group.

た。IL-5と同様に、フタル酸ジエチルヘキシルを4 µg ずつ投与した動物でIL-10の耳介における発現量は最も多かった。好酸球を呼び寄せる効果を持つケモカインであるeotaxinも、ダニアレルゲンの皮内投与により、生理食塩水の皮内投与と比較し、有意に発現の上昇が認められた。ダニアレルゲンを皮内投与した動物間で比較すると、フタル酸ジエチルヘキシルを毎週投与した動物では、オリーブオイルを単独で投与した動物と比較し、耳介部における発現量は明らかに上昇していた。サイトカインの結果と同様に、フタル酸ジエチルヘキシルを4 µg ずつ投与した動物でeotaxinの耳介における発現量は最も多かった。

以上より、フタル酸ジエチルヘキシルによるアトピー性皮膚炎増悪のメカニズムとしても、好酸球を活性化するサイトカインであるIL-5と好酸球を呼び寄せるケモカインであるeotaxinの炎症局所である耳介部における発現増強が非常に重要な役割を演じていることが示唆された。また、Th2細胞の増強効果を持つIL-10というサイトカインの発現上昇も重要な役割を演じていることが示唆された。これらのサイトカインやケモカインは、ヒトにおけるアトピー性皮膚炎でも重要な役割を演じていることが、既に明らかにされている。ヒトと動物の病態に共通して重要な役割を演じているタンパク分子のレベルで増悪メカニズムを明らかにできたことは、本動物実験における結果をヒトにおける健康影響に外挿する上で重要と考えられた。

2.4.4 フタル酸エステルの若齢期曝露が皮膚炎に及ぼす影響に関するまとめ

フタル酸ジエチルヘキシルがNc/Ngaマウスの皮膚炎に及ぼす影響をここにまとめる。自然発症、塩化ピクリル塗布、もしくは、ダニアレルゲンを皮内投与することにより誘導した各モデルに対するフタル酸ジエチルヘキシルの曝露影響を検討した。フタル酸ジエチルヘキシルは、0.8, 4, 20, 100 µg/animal (概算で、4.8, 24, 120, 600 µg/kg/day 程度の一泊あたりの曝露量に相当)を基本に、週に1度腹腔内に投与した。三種類のモデルで若干傾向は異なるものの、皮膚炎の重症度は、フタル酸ジエチルヘキシルの曝露で明らかに増悪していた。自然発症モデルは、実験が長期に及ぶことにより、飼育環境や動物間のファイティング等によるかく乱要因が無視できないように考えられた。また、多数の化学物質の影響

を評価するスクリーニングとしては不相当とも考えられた。塩化ピクリル塗布皮膚炎モデルは、塩化ピクリルそのものにより比較的重症の皮膚炎が惹起されるため、他の化学物質の相加・相乗影響を検討するためには、感度等の点で問題が残ると考えられた。また、自然発症モデルと比較すると研究期間は短縮したが、なお、2～3ヵ月を評価に要し、多数の化学物質の影響を評価するスクリーニングとしては不相当と考えられた。一方、ダニアレルゲン皮内投与による皮膚炎モデルは、4もしくは20 µg/animal/週 (概算で24もしくは120 µg/kg/day)のフタル酸ジエチルヘキシル曝露で明らかに増悪した。驚くべきことに、100 µg/動物/週のフタル酸ジエチルヘキシルの曝露では、増悪効果はほとんど消失していた。また、これらの増悪に関わる分子生物学的メカニズムとしては、IL-5やeotaxin等の遺伝子やタンパクの皮膚における発現が重要と考えられた。このダニアレルゲン誘発アトピー性皮膚炎モデルは、短期の研究期間で化学物質の影響を判断することが可能であり、特殊技術も不必要で、化学物質の投与方法も簡易であり、実際の皮膚炎という病態を表現しうること、また、フタル酸ジエチルヘキシルという陽性コントロールを持つこと、相対的に軽症であり化学物質の影響を感度よく検知できること、等から、「*in vivo*スクリーニングモデル」として非常に有用であると考えられた。なお、ダニアレルゲン皮内投与による皮膚炎モデルで見られたような量-反応関係(高濃度で逆に作用が減弱していた)は、いわゆる環境ホルモンの作用でもしばしば観察される現象である。このことは、フタル酸ジエチルヘキシルのアレルギー増悪作用が、環境ホルモン作用と類似するメカニズムを介している可能性があることを意味するとも考えられる。一般に、ある特定の物質が対応する特定の受容体を介して作用を発揮する場合には、その受容体とその後の影響が最も効率的に活性化される特定の物質濃度が存在する。このことから、フタル酸ジエチルヘキシルのアレルギー増悪作用が、何らかの受容体を介して出現している可能性も十分にあるものと考えられた。

2.5 フタル酸エステルの乳児期、胎児期曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響に関する研究

2.5.1 フタル酸エステルの乳児期曝露が仔のアトピー性皮膚炎に及ぼす影響に関する研究

フタル酸は多くのプラスチック製品等に含まれている

ことから、乳児期の子供はおしゃぶりや人工授乳そのものを通じてフタル酸エステルの曝露を受ける可能性がある。そこで、次に、フタル酸エステルの乳児期曝露によるアレルギー増悪影響の評価を試みた。

本実験のプロトコールを図 30 に示す。9 週齢の Nc/Nga の雄性および雌性マウス（体重約 22～28g）を 7 群に分けた。各群で 1 週間、群交配を行い、その後雌雄を分離し、雌性マウスは一匹ずつ飼育した。第 1 群には何の処置も施さなかった（無処置群）。第 2 群および第 3 群には、フタル酸ジエチルヘキシルの溶解のために用いたオリーブオイルを腹腔内に投与した。第 4 群には、オリーブオイルで溶解したフタル酸ジエチルヘキシルを 0.8 μg/animal の量で投与した。第 5 群には、フタル酸ジエチルヘキシルを 4 μg/animal の量で投与した。第 6 群には、フタル酸ジエチルヘキシルを 20 μg/animal の量で投与した。第 7 群には、フタル酸ジエチルヘキシルを 100 μg/animal の量で投与した。フタル酸ジエチルヘキシルもしくはオリーブオイルは、100 μl を、週に 1 度、計 3 回（交配初日より 21 日目、28 日目、35 日目）、腹腔内に投与した。この研究計画におけるフタル酸ジエチルヘキシルの投与量は、概算で、4.8、24、120、600 μg/kg/day 程度の日あたりの曝露量に相当すると考えられる。産まれた仔マウスは、4 週齢で雌雄を分離し、7 週齢まで SPF（特定の病原微生物が存在しない条件下）で飼育した。その後 1 週間、通常環境で飼育を行い、ダニアレルゲン（5 μg/animal）、もしくは、その溶解のために用いた生理食塩水を右側の耳介に 10 μl 皮内注射した。第 2 群には生理食塩水、第 3、4、5、6、7 群にはダニアレルゲンを皮内注射した（0 日目）。すべての群において、ダニアレルゲン、もしくは生理食塩水は、0、2、4、7、9、11、14、16 日目に、計 8 回投与

した。第 1 群は無処置とした。

耳介のアトピー性皮膚炎の症状は、ダニアレルゲンの皮内投与 24 時間後に評価した。評価は、乾燥肌（カサカサ肌）、発疹（ブツブツ）、搔爬傷（引っかき傷）、浮腫（腫れ）を対象とし、4 段階（0：なし；1：軽度；2：中等度；3：重度）で重症度を分類した。総点数を、総合的重症度を表すクリニカルスコアとして、定量的、かつ、経時的に各群の症状変化を比較検討した。耳介厚についても経時的に測定した。

図 31 に示すように、ダニアレルゲンを投与していない第 1 群と第 2 群では、3 週間の間に皮膚炎の症状は惹起されなかった。ダニアレルゲンを皮内投与すると、3 回目のアレルギー投与後から皮膚炎症状が出現し、経時的に増悪した。実験期間の 3 週間を通してこの増悪は観察された。雄の仔マウスにおいては、親マウスにフタル酸ジエチルヘキシルを 100 μg 投与した仔マウスにおいて、親マウスにフタル酸ジエチルヘキシルを 0.8 μg 投与した仔マウスと比較し、アレルギー投与 5 回、6 回、7 回、8 回後において、有意な症状の増悪を認めた。親マウスにフタル酸ジエチルヘキシルを 100 μg 投与した仔マウスにおいて、親マウスがフタル酸ジエチルヘキシルを 4 μg 投与された仔マウスと比較し、アレルギー投与 6 回、7 回、8 回後において、有意にスコアが上昇した。親マウスにフタル酸ジエチルヘキシルを 100 μg 投与した仔マウスにおいて、親マウスにフタル酸ジエチルヘキシルを 20 μg 投与した仔マウスと比較し、アレルギー投与 4 回、6 回、7 回、8 回後において、有意にスコアが上昇した。また、親マウスにフタル酸ジエチルヘキシルを 100 μg 投与した仔マウスにおいて、親マウスにオリーブオイルを投与した仔マウスと比較し、増悪傾向は認められたが、有意ではなかった。

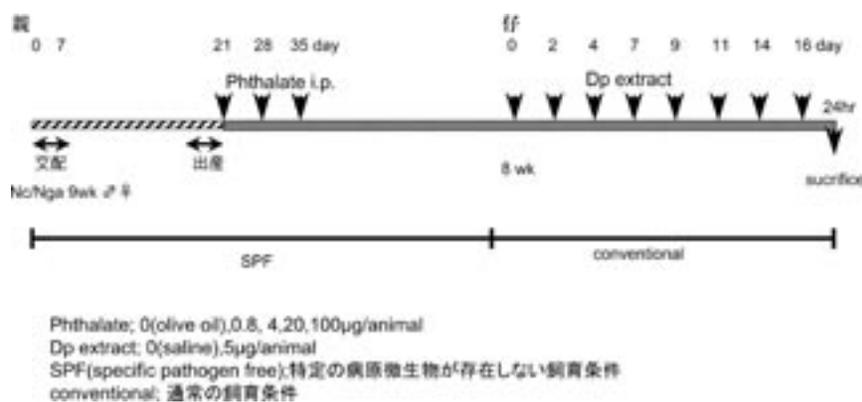


図 30 アトピー性皮膚炎モデルにおけるフタル酸エステルの乳児期曝露実験

一方、雌の仔マウスにおいては、雄マウス同様、ダニアレルゲンを皮内投与すると、3回目のアレルゲン投与

後から皮膚炎症症状が出現し、経時的に増悪した。親マウスにフタル酸ジエチルヘキシルを0.8 μg投与した仔マ

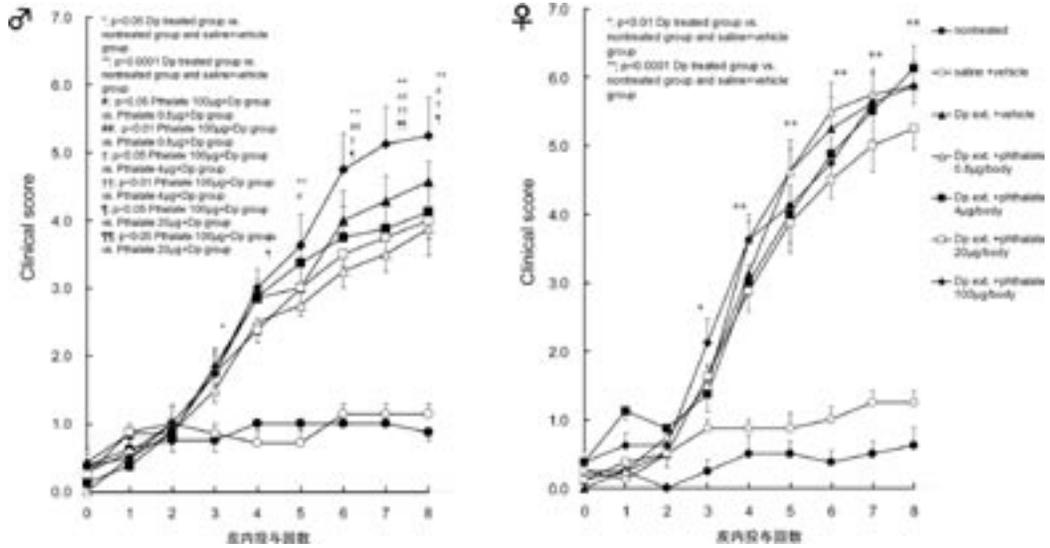


図31 フタル酸エステル乳児期曝露によるアトピー性皮膚炎の症状変化

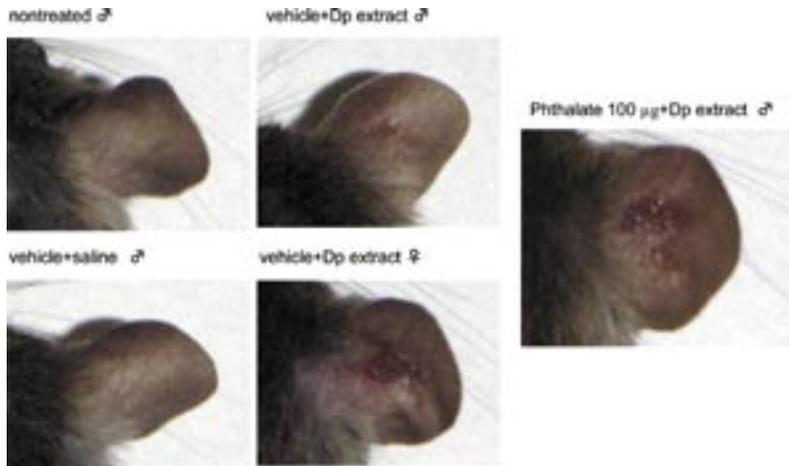


図32 フタル酸エステル乳児期曝露によるアトピー性皮膚炎の肉眼所見

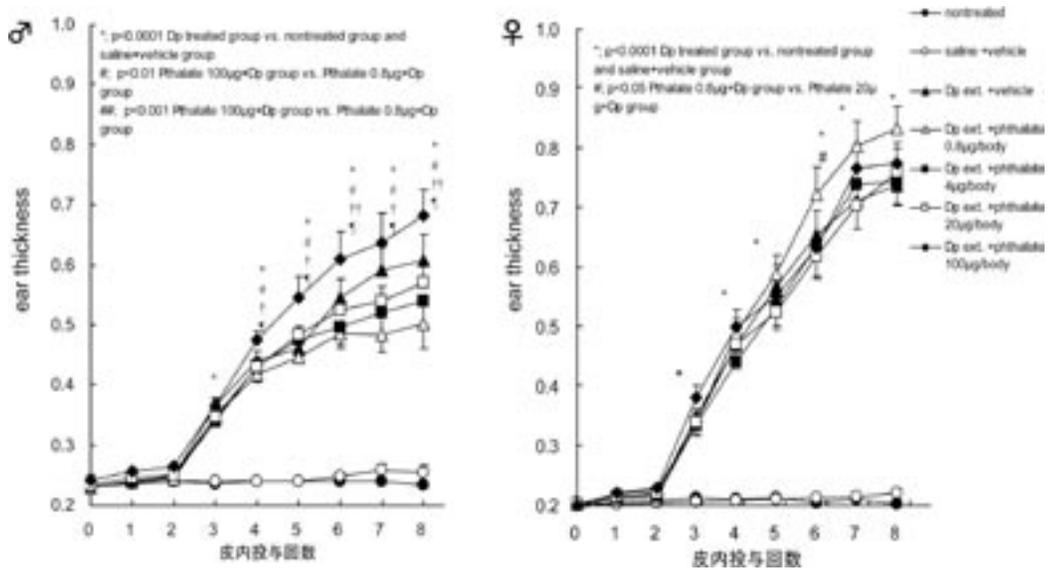


図33 フタル酸エステル乳児期曝露によるアトピー性皮膚炎の耳介厚変化

ウスにおいて、親マウスにオリーブオイルを投与した仔マウスと比較し、増悪傾向を認めたが、有意な違いは認められなかった。

代表的な肉眼所見を図 32 に示す。第 1 群、および第 2 群では、ほとんど変化はなかった。アレルゲンを投与した群では、搔爬による痂皮形成や出血、浮腫が観察された。特に、親マウスにフタル酸ジエチルヘキシルを 100 μg 投与した雄の仔マウスには、図のように糜爛形成が観察される個体もいた。また、耳介厚の変化についても (図 33)、クリニカルスコアと同様の結果であった。

以上のように、フタル酸エステルの乳児期曝露による仔のアトピー性皮膚炎発症に及ぼす影響は、雄の仔マウスにおいては、親マウスに対する投与量により、親マウスにオリーブオイルを投与した仔マウスと比較し、増悪、あるいは抑制の両傾向を示した。一方、雌の仔マウスでは、親マウスにフタル酸ジエチルヘキシルを 0.8 μg 投与した仔マウスにおいて、親マウスにオリーブオイルを投与した仔マウスと比較し、増悪傾向を認めたが、有意な違いは認められなかった。

フタル酸ジエチルヘキシルの乳児期曝露は、仔のアトピー性皮膚炎に影響を及ぼし、曝露濃度によっては、皮膚炎の重症度を増悪する可能性も示唆された。また、その増悪影響には性差が観察された。影響の確定のためには、さらなる研究の続行が必要と考えられた。

2.5.2 フタル酸エステルの胎児期曝露が仔のアトピー性皮膚炎に及ぼす影響に関する研究

フタル酸エステルの若齢期曝露がアトピー性皮膚炎を増悪する可能性があることが示唆されたが、乳児期とともに胎児期の曝露による次世代 (子供) への影響が存在する可能性も否定しきれない。そこで、次に、フタル酸

エステルの胎児期曝露がアトピー性皮膚炎の増悪に及ぼす影響の評価を試みた。

本実験のプロトコールを図 34 に示す。9 週齢の Nc/Nga の雄性および雌性マウス (体重約 22 ~ 28g) を 7 群に分けた。各群で 1 週間交配を行い、その後雌雄を分離し、雌性マウスは一匹ずつ飼育した。第 1 群は無処置群とし、何の処置も施さなかった。第 2 群および第 3 群には、フタル酸ジエチルヘキシルの溶解のために用いたオリーブオイルを腹腔内に投与した。第 4 群には、フタル酸ジエチルヘキシルを 0.8 $\mu\text{g}/\text{animal}$ の量で投与した。第 5 群には、フタル酸ジエチルヘキシルを 4 $\mu\text{g}/\text{animal}$ の量で投与した。第 6 群には、フタル酸ジエチルヘキシルを 20 $\mu\text{g}/\text{animal}$ の量で投与した。第 7 群には、フタル酸ジエチルヘキシルを 100 $\mu\text{g}/\text{animal}$ の量で投与した。フタル酸ジエチルヘキシルもしくはオリーブオイルは、100 μl を、週に 1 度、計 3 回 (交配初日より 0 日目、7 日目、14 日目)、腹腔内に投与した。この研究計画におけるフタル酸ジエチルヘキシルの投与量は、概算で、4.8, 24, 120, 600 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 程度の一泊あたりの曝露量に相当すると考えられる。これらの親動物よりその後産まれてきた仔マウスは、4 週齢で雌雄を分離し、7 週齢まで SPF 環境下で飼育した。その後さらに 1 週間、通常環境下で飼育を行い、ダニアレルゲン (5 $\mu\text{g}/\text{animal}$)、もしくは溶解のために用いた生理食塩水を、右側の耳介に、10 μl 皮内に注射した (0 日目)。なお、第 2 群には生理食塩水を、第 3, 4, 5, 6, および 7 群にはダニアレルゲンを、0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 日目に、計 8 回、右側の耳介に皮内注射した。第 1 群は無処置群とした。

耳介のアトピー性皮膚炎の症状は、ダニアレルゲンの皮内投与 24 時間後に評価した。乾燥肌 (カサカサ肌)、

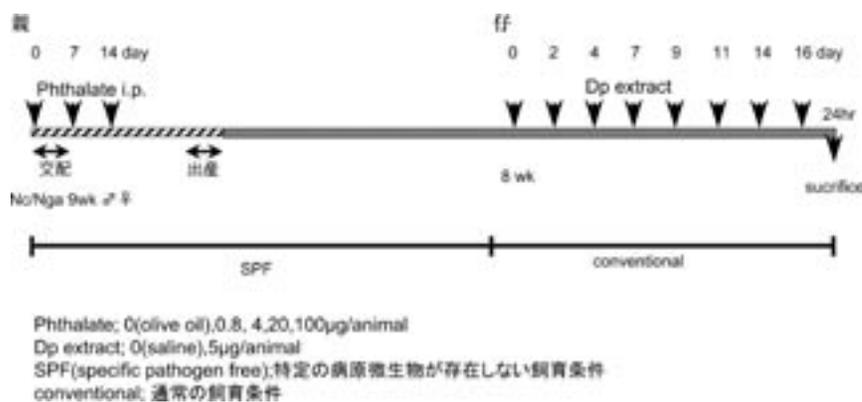


図34 アトピー性皮膚炎モデルにおけるフタル酸エステルの胎児期曝露実験

発疹（ブツブツ）、掻爬傷（引っかき傷）、浮腫（腫れ）を対象とし、4段階（0：なし；1：軽度；2：中等度；

3：重度）で重症度を評価した。総点数を、総合的重症度を表すクリニカルスコアとして、定量的、かつ、経時

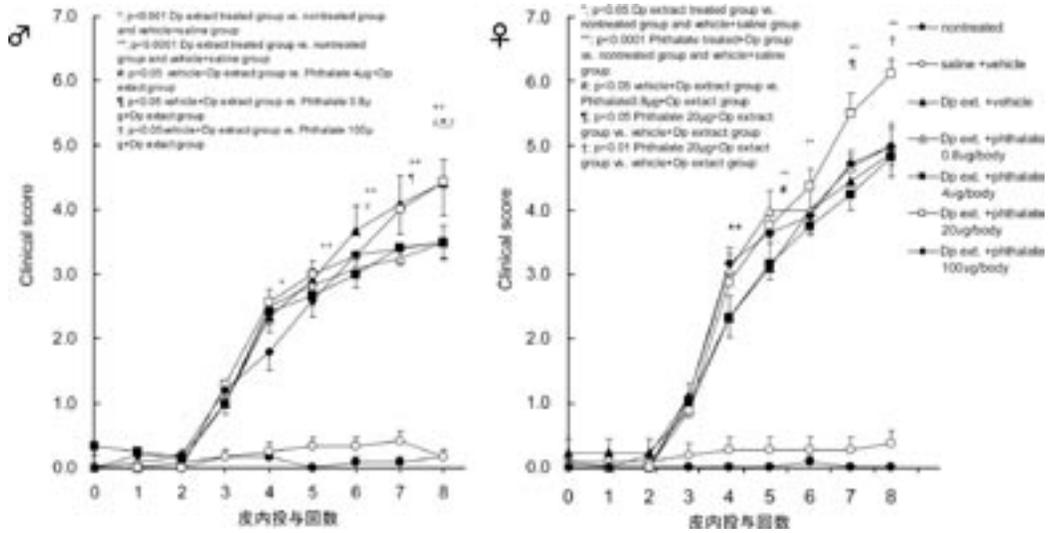


図35 フタル酸エステル胎児期曝露によるアトピー性皮膚炎の症状変化

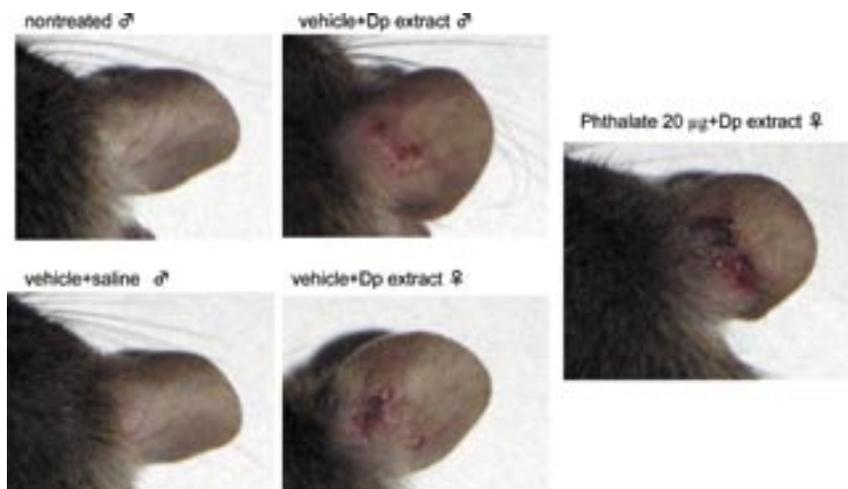


図36 フタル酸エステル胎児期曝露によるアトピー性皮膚炎の肉眼所見

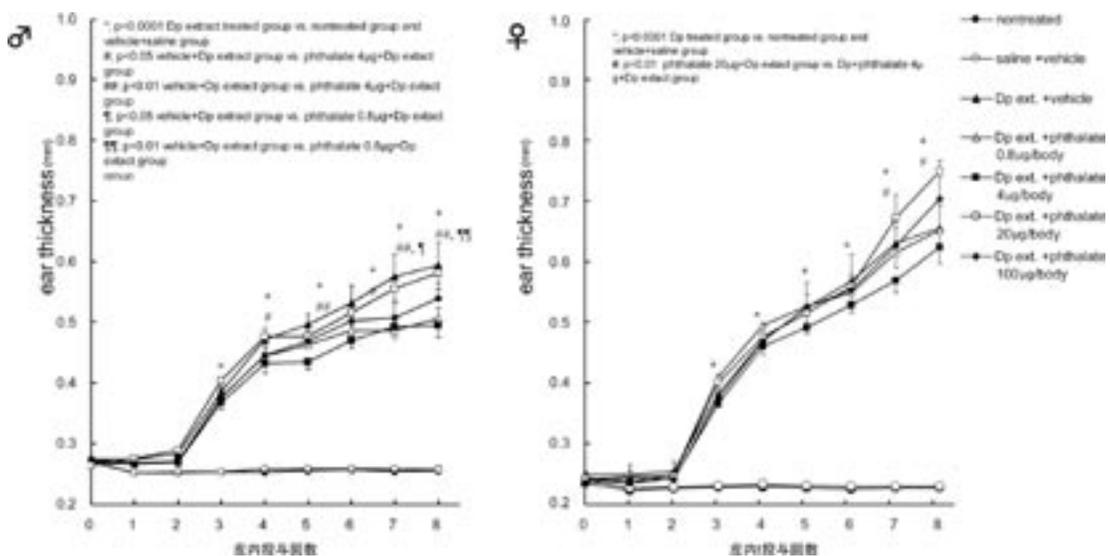


図37 フタル酸エステル胎児期曝露によるアトピー性皮膚炎の耳介厚変化

的に各群の症状変化を比較検討した。耳介厚についても経時的に測定した。

図 35 に示すように、雄、雌マウス共に、ダニアレルゲンを投与していない第 1 群と第 2 群では、観察した 3 週間の間に皮膚炎の症状は惹起されなかった。ダニアレルゲンを皮内投与すると、3 回目のアレルゲン投与後から皮膚炎症状が出現し、経時的に増悪した。実験期間の 3 週間を通してこの増悪は観察された。雄の仔マウスにおいては、アレルゲン投与 6 回、8 回後では、アレルゲンを単独で投与した群に比較し、親マウスにフタル酸ジエチルヘキシルを 4 μg 投与した仔マウスにおいて、有意な抑制が認められた。さらに、アレルゲン投与 7 回、8 回後では、オリーブオイルを投与した群に比較し、親マウスがフタル酸ジエチルヘキシルを 0.8 μg 投与された仔マウスにおいて、また 8 回後では 100 μg 投与された仔マウスにおいても、有意な抑制が認められた。一方、雌の仔マウスにおいても、雄マウス同様、ダニアレルゲンを皮内投与すると、3 回目のアレルゲン投与後から皮膚炎症状が出現し、経時的に増悪した。また、アレルゲン投与 7 回、8 回後では、オリーブオイルを単独で投与した群に比較し、親マウスにフタル酸ジエチルヘキシルを 20 μg 投与した仔マウスにおいて、有意な皮膚炎症状の悪化が認められた。代表的な肉眼所見を図 36 に示す。無処置、および対照群ではほとんど変化はなかった。アレルゲンを投与した群では、搔爬による痂皮形成や出血、浮腫が観察された。症状が進んだものでは、図のように糜爛が認められた。また、耳介厚の変化についても(図 37)、クリニカルスコアと同様の結果であった。

以上のように、フタル酸ジエチルヘキシルの胎児期曝露による仔のアトピー性皮膚炎発症に及ぼす影響は、曝露量によって、雄の仔マウスにおいては、抑制傾向を示した。一方、雌の仔マウスでは、曝露量によって、逆に、有意な増悪が観察された。フタル酸ジエチルヘキシルの胎児期曝露による皮膚炎症状への増悪影響の可能性は、特に女性において否定できない。しかし、性差の問題を含め、影響の確定にはさらなる検討が必要と考えられた。

2.6 全体のまとめと展望

数種類の化学物質を先導的に選択し、胎児期、乳児期、若齢期等にマウスに曝露し、成長過程におけるアレルギー疾患の増悪の有無を評価した。先導的に選択する

化学物質としては、(1)「核内レセプターである PPAR を介して作用する化学物質 (フタル酸エステル)」, (2)「Ah receptor を介して作用する化学物質」, (3)「フリーラジカル生成を介し転写因子を活性化する可能性がある化学物質 (フェナントラキノン, ナフトキノン等のキノン類)」, (2), (3) の特徴を同時に満たす化学物質として DEP に含まれる脂溶性化学物質 (群) を選択した。一方、対象とするアレルギー疾患モデルとしては、アトピー性皮膚炎と気管支喘息を選択し、ヒトにおける病態を的確に再現しうる動物モデルを用いた。

さらに、化学物質によるアレルギー疾患の増悪メカニズムを明らかにするために、分子生物学的検討も加えた。同時に、動物とヒトの病態において共通して重要な役割を演じている遺伝子とタンパクをターゲットとして分子生物学的検討を行うことにより、動物モデルにおける実験成果をヒトにおける健康影響に外挿するための確固たるエビデンスを与えることをめざした。特に、アレルゲンに特異的な抗体、免疫担当細胞、サイトカイン (IL-5, IL-4, IL-2, etc) およびケモカイン (EOTAXIN, RANTES, IL-8 etc.) 等に注目した。

加えて、化学物質がアレルギー疾患に及ぼす影響を簡易、かつ、短期間で評価・推定することが可能な「*in vivo* スクリーニングモデル」を開発した。

DEP に含まれる化学物質がアレルギー性疾患に及ぼす影響とメカニズムの解明に関する研究

アレルギー性気管支喘息を増悪させる DEP の主たる構成成分は、残渣粒子ではなく、脂溶性化学物質 (群) であり、粒子と脂溶性化学物質群が共存することによりアレルギー性の炎症は相乗的に増悪した。さらに、この増悪のメカニズムとして、好酸球を活性化するサイトカインである IL-5 と好酸球を呼び寄せるケモカインである eotaxin の肺における発現増強が非常に重要な役割を演じていることが明らかになった。また、粘液産生細胞の増加効果を持つ IL-13 というサイトカインの発現増強、単核球や好中球を呼び寄せる効果を持つ MCP-1 や MIP-1 α の発現亢進も、重要な役割を演じていると考えられた。これらのサイトカインやケモカインは、ヒトにおけるアレルギー性炎症でも重要な役割を演じている。ヒトと動物の病態に共通して重要な役割を演じているタンパク分子のレベルで増悪メカニズムを明らかにできたことは、本動物実験における結果をヒトにおける影響に外挿する

上で重要と考えられた。

これらの結果より、呼吸を通じて曝露される化学物質、および、DEPを代表とするような粒子とともに存在する化学物質を環境中から削減することは、アレルギー疾患に対する対策のひとつとして期待される。また、今後、いかなる化学物質がDEPのアレルギー増悪影響の主体をなすのか、明らかにしてゆく必要があるものとも考えられた。

フェナントラキノンがアレルギー性疾患に及ぼす影響とメカニズムの解明に関する研究

フェナントラキノンはDEPに含有される化学物質である。フェナントラキノンがアレルギー特異的IgE抗体およびIgG抗体の産生を増強することが明らかになった。また、フェナントラキノンはアレルギー性気道炎症に対しても軽度の増悪影響を示したが、その作用はDEPに含有される脂溶性化学物質（群）に比較すると弱かった。加えて、フェナントラキノンは、DEPに含有される脂溶性化学物質（群）とは異なり、Th2タイプのサイトカインの発現を亢進しないことも明らかになった。これらのことから、フェナントラキノンはアレルギー増悪影響を発揮するものの、その作用だけでDEPに含有される脂溶性化学物質（群）のアレルギー増悪影響を説明するものではないことが示唆された。

ナフトキノンのアレルギー性疾患に及ぼす影響とメカニズムの解明に関する研究

ナフトキノンもDEPに含有される化学物質である。ナフトキノンは、フェナントラキノンとは異なり、アレルギー性喘息の病態そのものである肺の組織内部におけるアレルギー性気道炎症と粘液産生細胞の増加を有意かつ濃度依存性に増悪した。このことから、ナフトキノンのアレルギー性炎症増悪影響は、フェナントラキノンに比較すると、より大きいものであることが示唆された。しかし、その作用は、DEPに含有される脂溶性化学物質（群）に比較すると弱かった。また、ナフトキノンによるアレルギー性炎症の増悪効果がTh2タイプのサイトカインやeotaxinの発現亢進を主とするものではないことも明らかになった。これらのことから、ナフトキノンの作用だけでDEPに含有される脂溶性化学物質（群）のアレルギー増悪影響を説明するものではないことも示唆された。一方、フェナントラキノンとは異なり、ナ

フトキノンのアレルギー性炎症増悪効果が、MCP-1あるいはKCというケモカインの発現亢進により、少なくとも部分的に、もたらされている可能性があることも明らかになった。また、ナフトキノンのアレルギー増悪効果においては、アレルギー特異的抗体産生増悪作用は、フェナントラキノンのそれに比較し、重要度が低いものであることが示唆された。

キノンに関する結果を総合すると、DEPや燃焼を起源とする一般環境中の浮遊粒子状物質に含まれる多環芳香族炭化水素であるフェナントラキノンやナフトキノンの経気道曝露は、アレルギー性気道炎症を増悪しうるということが示唆された。しかし、その影響は量的にも質的にも両者において若干異なった。総じて、フェナントラキノンに比較し、ナフトキノンの増悪影響がより強いものと考えられた。しかし、フェナントラキノンもしくはナフトキノンが、それ単独でDEPのアレルギー増悪影響を担っているものと考えすることは困難であった。今後、DEPに含まれるその他の化学物質の重要性や、多種類の化学物質の複合的な増悪影響について、検討の余地があろう。

フタル酸エステルがアレルギー性疾患に及ぼす影響とメカニズムの解明に関する研究

自然発症、塩化ピクリル塗布、もしくは、ダニアレルギーを皮内投与することにより誘導した各種皮膚炎モデルに対するフタル酸ジエチルヘキシルの曝露影響を検討した。フタル酸ジエチルヘキシルは、0.8, 4, 20, 100 $\mu\text{g}/\text{animal}$ （概算で、4.8, 24, 120, 600 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 程度程度の曝露量に相当）を基本に、週に1度腹腔内に投与した。三種類のモデルで若干傾向は異なっていたが、皮膚炎の重症度は、フタル酸ジエチルヘキシルの低用量曝露で増悪した。高用量曝露では、増悪影響は逆に目立たなくなった。ダニアレルギー皮内投与による皮膚炎モデルは、4もしくは20 $\mu\text{g}/\text{animal}/\text{週}$ （概算で24もしくは120 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ）のフタル酸ジエチルヘキシル曝露で明らかに増悪していた。100 $\mu\text{g}/\text{animal}/\text{週}$ のフタル酸ジエチルヘキシルの曝露では、増悪効果はほとんど消失していた。このような量-反応関係は環境ホルモン作用でもしばしば観察される現象であることから、フタル酸ジエチルヘキシルのアレルギー増悪作用は環境ホルモン作用と類似したメカニズムを介している可能性が示唆された。そのひとつとして、フタル酸ジエチルヘキシルのア

レルギー増悪作用が、何らかの受容体を介して出現している可能性を考えるべきかもしれない。フタル酸エステルがPPARという核内受容体に作用することは、非常に興味深い事実であり、今後の研究のターゲットとなる可能性もある。これの点に関し、さらなる検討が今後必要と考えられる。

また、フタル酸エステルによるアレルギー性炎症の増悪に関わる分子生物学的メカニズムとしては、IL-5やeotaxin等のタンパクの皮膚における発現が重要と考えられた。これらのサイトカインやケモカインは、ヒトにおけるアレルギー性炎症でも重要な役割を演じている。ヒトと動物の病態に共通して重要な役割を演じているタンパク分子のレベルで増悪メカニズムを明らかにできたことは、本動物実験における結果をヒトにおける影響に外挿する上で重要と考えられた。

さらに、ダニアレルゲン誘発アトピー性皮膚炎モデルは、短期の研究期間で化学物質のアレルギー増悪影響を判断することが可能であり、特殊技術も不必要で、化学物質の投与方法も簡易であり、実際の皮膚炎という病態を表現しうること、また、フタル酸ジエチルヘキシルという陽性コントロールを持つこと、相対的に軽症であり化学物質の影響を感度よく検知できること、等から、「*in vivo* スクリーニングモデル」として非常に有用であると考えられた。一方、自然発症モデルは、実験が長期に及ぶため、多数の化学物質の影響を評価するスクリーニングとしては不相当と考えられた。塩化ピクリル塗布皮膚炎モデルも、比較的重症の皮膚炎が惹起されるため、他の化学物質の相加・相乗影響を検討するには、感度等の点で問題が残ると考えられた。また、2～3ヵ月を影響評価に要すことから、多数の化学物質の影響を評価するスクリーニングとしては不相当と考えられた。

フタル酸エステル以外にも、細胞内の受容体に作用する化学物質は数多く存在する。また、近年、環境化学物質は日ごとに増加しつつあり、その健康影響を速やかに明らかにする必要性を指摘する声も多い。さらに、環境化学物質の健康影響については、大量曝露による古典的な毒性発現という観点ではなく、低濃度曝露による免疫・アレルギー、神経・行動、内分泌を主軸とする高次機能への影響という観点から再評価する必要性もある。今後、今回開発した「*in vivo* スクリーニングモデル」を活用し、より多くの環境化学物質のアレルギー増悪影響を検討することが望ましいものとも考えられる。また、

このモデルを軸に、「環境化学物質の高次機能影響を総合的に評価することが可能な *in vivo* モデルを開発し、その短期化、簡便化を図るとともに、複数の環境化学物質を対象として、その有効性を検証する。」こともきわめて重要な課題と考えられる。

フタル酸エステルの胎児期、乳児期曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響に関する研究

フタル酸エステルの乳児期曝露による仔のアトピー性皮膚炎発症に及ぼす影響は、雄の仔マウスにおいて、親マウスに対する投与量により、アレルゲン単独に比較し、増悪、あるいは抑制の両傾向を示した。一方、雌の仔マウスでは、アレルゲン単独投与に比較し、投与量によって増悪傾向を認めたが、有意な違いは認められなかった。フタル酸ジエチルヘキシルの乳児期曝露は、仔のアトピー性皮膚炎に影響を及ぼし、曝露濃度によっては、皮膚炎の重症度を増悪する可能性も示唆された。また、その増悪影響には性差が観察された。しかし、影響の確定のためには、さらなる検討の続行が必要と考えられた。

フタル酸ジエチルヘキシルの胎児期曝露による仔のアトピー性皮膚炎発症に及ぼす影響は、雄の仔マウスにおいては、曝露量によって、アレルゲン単独投与に比較し、抑制傾向を示した。一方、雌の仔マウスでは、曝露量によって、逆に、有意な増悪が観察された。フタル酸ジエチルヘキシルの胎児期曝露による皮膚炎症状への増悪影響の可能性は、特に女性において否定できない。しかし、性差の問題を含め、影響の確定にはさらなる検討が必要と考えられた。

謝辞

最後に、本特別研究の遂行は、これまでご協力頂いた客員研究員、他所内外の多くの方々に加え、歴代理事長、理事、研究企画官、その他管理部門の方々、動物実験にあたり、動物専門官、アニマルケア係などの多くの方々のご協力、励ましによって可能であった。特に、研究室の構成員、研究所内の準構成員、および筑波大学大学院を始めとする各大学院生など共同研究員の方々、実験補助として、植木尚子氏、桜井美穂氏の協力は何者にも代え難いものであった。ここに、関係各位のご協力、ご支援に心から感謝の意を表する次第である。

[資 料]

I 研究の組織と研究課題の構成

1 研究の組織

[A 研究担当者]

環境健康研究領域長	高野裕久
環境健康研究領域	
分子細胞毒性研究室	柳澤利枝
健康指標研究室	井上健一郎
生体防御研究室	藤巻秀和（平成14年度のみ）
内分泌かく乱化学物質及びダイオキシン類のリスク評価と管理プロジェクトグループ	
病態生理研究チーム	石堂正美
計測・生物検定・動態研究チーム	白石不二雄

[B 客員研究員]

市瀬孝道	（大分県立看護科学大学）	（平成14～16年度）
島田章則	（鳥取大学）	（平成14～16年度）
市川 寛	（京都府立大学）	（平成15～16年度）
古倉 聡	（京都府立医科大学）	（平成15～16年度）
井上 衛	（京都府立医科大学）	（平成16年度）

2 研究課題と担当者（*客員研究員）

- （1）DEPに含まれる化学物質がアレルギー性疾患に及ぼす影響とメカニズムの解明に関する研究
高野裕久・柳澤利枝・井上健一郎・藤巻秀和・市瀬孝道*・島田章則*
- （2）フェナントラキノンがアレルギー性疾患に及ぼす影響とメカニズムの解明に関する研究
高野裕久・柳澤利枝・井上健一郎・市瀬孝道*
- （3）ナフトキノンがアレルギー性疾患に及ぼす影響とメカニズムの解明に関する研究
高野裕久・柳澤利枝・井上健一郎・市瀬孝道*
- （4）フタルエステルがアレルギー性疾患に及ぼす影響とメカニズムの解明に関する研究
高野裕久・柳澤利枝・石堂正美・白石不二雄・市瀬孝道*・島田章則*・市川 寛*・古倉 聡*・井上 衛*
（ア）フタル酸エステルの胎児期・乳児期暴露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響に関する研究
高野裕久・柳澤利枝・市瀬孝道*

II 研究成果発表一覧

1 誌上発表

発表者・題目・掲載誌・巻(号)・頁・刊年

Yoshino S., Hayashi H., Taneda S., Takano H., Sagai M., Mori Y.: Effects of diesel exhaust particle extracts on TH1 and TH2 immune response in mice., *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **15** : 13-18, 2002

Yoshino S., Hayashi H., Taneda S., Takano H., Sagai M., Mori Y.: Effect of diesel exhaust particle extracts on induction of oral tolerance in mice., *Toxicol. Sci.*, **66** : 293-297, 2002

Takano H., Yanagisawa R., Ichinose T., Sadakane K., Inoue K., Yoshida S., Takeda K., Yoshino S., Yoshikawa T., Morita M.: Lung expression of cytochrome P450 1A1 as a possible biomarker of exposure to diesel exhaust particles., *Arch. Toxicol.*, **76** : 146-151, 2002

Takano H., Yanagisawa R., Ichinose T., Sadakane K., Yoshino S., Yoshikawa T., Morita M.: Diesel exhaust particles enhance lung injury related to bacterial endotoxin through expression of proinflammatory cytokines, chemokines, and ICAM-1. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, **165** : 1329-1335, 2002

Sadakane K., Ichinose T., Takano H., Yanagisawa R., Sagai M., Yoshikawa T., Shibamoto T.: Murine strain differences in airway inflammation induced by Diesel exhaust particles and house dust mite allergen., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **128** : 220-228, 2002

Ichinose T., Takano H., Miyabara Y., Sagai M., Sadakane K., Shibamoto T.: Diesels exhaust particles enhance antigen-induced eosinophilic inflammation in the airway of mast cell deficient mice. *Toxicology*, **180** : 293-301, 2002

Sadakane K., Takano H., Ichinose T., Yanagisawa R., Shibamoto T.: Formaldehyde enhances mite allergen-induced eosinophilic inflammation in the murine airway., *J. Environ. Pathology Toxicology and Oncology*, **21** : 267-276, 2002

Ichinose T., Takano H., Sadakane K., Yanagisawa R., Kawazato H., Sagai M., Shibamoto T.: Differences in airway-inflammation development by house dust mite and diesel exhaust inhalation among mouse strains., *Toxicol. Applied Pharmacol.*, **187** : 29-37, 2003

Yoshino S., Yamaki K., Yanagisawa R., Takano H., Hayashi Y., Mori Y.: Effects of bisphenol A on antigen-specific antibody production, proliferative responses of lymphoid cells, and TH1 and TH2 responses in mice. *Br. J. Pharmacol.*, **138** : 1271-1276, 2003

Yamaki K., Uchida H., Harada Y., Yanagisawa R., Takano H., Hayashi Y., Mori Y., Yoshino S.: Effect of the non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin on Th1 and Th2 immune responses in mice., *J. Pharm. Sci.*, **92** : 1723-1729, 2003

Sanbongi C., Takano H., Osakabe N., Sasa N., Natsume M., Yanagisawa R., Inoue K., Yoshikawa T.: Rosmarinic acid inhibits lung injury induced by diesel exhaust particles. *Free Radic Biol. Med.*, **34** : 1060-1069, 2003

Inoue K., Takano H., Yoshikawa T.: Inflammatory chemokine in the pathogenesis of the common cold., *Lancet*, **361** : 782, 2003

Inoue K., Takano H., Kawahito Y., Sano H., Yoshikawa T.: Cyclooxygenase-2 inhibitors in aspirin-induced asthma., *Chest*, **123** : 1317-1318, 2003

Yanagisawa R., Takano H., Inoue K., Ichinose T., Sadakane K., Yoshino S., Yamaki K., Kumagai Y., Uchiyama K., Yoshikawa T., Morita M.: Enhancement of acute lung injury related to bacterial endotoxin by components of diesel exhaust particles., *Thorax*, **58** : 605-612, 2003

Yamaki K., Uchida H., Harada Y., Xiaojuan Li, Yanagisawa R., Takano H., Hayashi H., Taneda S., Mori Y., Yoshino S.: Effect of methotrexate on Th1 and Th2 immune responses in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, **55** : 1661-1666, 2003

Inoue K., Takano H., Yanagisawa R., Morita M., Ichinose T., Sadakane K., Yoshino S., Yamaki K., Uchiyama K., Yoshikawa T.: Effect of 15-deoxy- Δ 12, 14-PGJ2 on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **481** : 261-269, 2003

Ichinose T., Takano H., Sadakane K., Yanagisawa R., Yoshikawa T., Sagai M., Shibamoto T.: Mouse strain differences in eosinophilic airway-inflammation caused by intratracheal instillation of mite allergen and diesel exhaust particles., *J. Appl. Toxicol.*, **24** : 69-76, 2004

Takano H., Yanagisawa R., Inoue K., Shimada A., Ichinose T., Sdakane K., Yoshino S., Yamaki K., Yoshikawa T. :Nitrogen dioxide air pollution near ambient levels is an atherogenic risk, primarily in obese subjects. , *Exp. Biol. Med.*, (formerly: *P. Soc. Exp. Biol. Med.*), **229** : 361-364, 2004

Inoue K., Takano H., Yanagisawa R., Morita M., Ichinose T., Sadakane K., Yoshino S., Yamaki K., Yoshikawa T.: 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2 enhances cyclooxygenase-2 expression in the murine lung in the presence of lipopolysaccharide. *Arzneim Forsch/Drug Res.*, **54** : 711-714, 2004

Sanbongi C., Takano H., Osakabe N., Sasa N., Natsume M., Yanagisawa R., Inoue K., Sadakane K., Ichinose T., Yoshikawa T.: Rosmarinic acid in perilla extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen., *Clin. Exp. Allergy*, **34** : 971-977, 2004.

Inoue K., Takano H., Yanagisawa R., Ichinose T., Sadakane K., Yoshino S., Yamaki K., Uchiyama K., Yoshikawa T.: Components of diesel exhaust particles differently affect lung expression of cyclooxygenase-2 related to bacterial endotoxin., *J. Appl. Toxicol.*, **24** : 415-418, 2004

Yamaki K., Li X., Alam AHM, Hossain H., Yanagisawa R., Takano H., Hayashi H., Taneda S., Mori Y., Yoshino S.: Effects of the phosphodiesterase IV inhibitor rolipram on Th1 and Th2 immune responses in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, **56** : 877-882, 2004.

Inoue K., Takano H., Yanagisawa R., Sakurai M., Ueki N., Ichinose T., Sadakane K., Yoshino S., Uchiyama K., Yoshikawa T.: Effects of 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2 on nuclear localization of GATA-3 in the murine lung in the presence of lipopolysaccharide. *ArzneimForsch/DrugRes.*, **55** : 167-171, 2005.

Yoshino S., Yamaki K., Xiaojuan Li., Sai T., Yanagisawa R., Takano H., Hayashi H., Mori Y.: Prenatal exposure to bisphenol A upregulates immune responses, including T helper 1 and T helper 2 responses, in mice. *Immunology*, **112** : 489-495, 2004.

Hiyoshi K., Takano H., Inoue K., Ichinose T., Yanagisawa R., Tomura S., Cho AK., Froines JR., Kumagai Y.: Effects of a single intratracheal administration of phenanthraquinone on murine lung., *J. Appl. Toxicol.*, **25** : 47-51, 2005.

Yanagisawa R., Takano H., Inoue K., Ichinose T., Sadakane K., Yoshida S., Takeda K., Yoshino S., Yamaki K., Kumagai Y., Yoshikawa T.: Complementary DNA microarray analysis in acute lung injury induced by lipopolysaccharide and diesel exhaust particles. *Exp. Biol. Med.* (formerly: *P. Soc. Exp. Biol. Med.*) **229** : 1081-1087, 2004.

Inoue K., Takano H., Yanagisawa R., Sakurai M., Ichinose T., Sadakane K., Hiyoshi K., Sato M., Shimada A., Yoshikawa T., Role of metallothionein in antigen-related airway inflammation. *Exp. Biol. Med.*, (formerly: *P. Soc. Exp. Biol. Med.*: in press)

Ichinose T., Nishikawa M., Takano H., Nobuyuki S., Sadakane K., Mori I., Yanagisawa R., Oda T., Tamura H., Hiyoshi K., Quan H., Shibamoto T.: Pulmonary toxicity induced by intratracheal instillation of Asian yellow dust (Kosa) in mice. *Environ. Toxicol. Phar.*, (in press)

Inoue K., Takano H., Yanagisawa R., Ichinose T., Sadakane K., Yoshino S., Uchiyama K., Yoshikawa T.: Effects of 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2 on Toll-like receptor 4 and 2 expression in the murine lung in the presence of lipopolysaccharide. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **32** : 230-232, 2005.

Inoue K., Takano H., Yanagisawa R., Yoshikawa T.: Eosinophilic pneumonia and arthritis. *Chest*, **127** : 2294-2295, 2005

Yamaki K., Uchida H., Li X., Yanagisawa R., Takano H., Hayashi H., Mori Y., Yoshino S.: Effect of varying types of anti-arthritic drugs on Th1 and Th2 immune responses in mice. *Int. J. Immunopathol Pharmacol.*, **18**: 133-144, 2005

Inoue K., Takano H., Yanagisawa R., Yoshikawa T.: Air pollution and pulmonary diseases. *Chest*, **128**: 1075, 2005.

[総説]

高野裕久, 吉川敏一: 環境汚染とアレルギー 化学物質によるアレルギーの修飾 アレルギー科, **16**: 403-411, 2003.

[著書]

吉川敏一, 井上健一郎, 高野裕久: 炎症に関与する細胞・分子 「内科学」, 朝倉書店, 27-31, 2003

高野裕久: 各論 3. 環境医学 4. 大気汚染物質 b. ディーゼル排ガスおよび排ガス中微粒子, 「分子予防環境医学」, 本の泉社, 544-554, 2003

高野裕久: 環境 131. DEP 「予防医学事典」, 朝倉書店, 東京 (印刷中)

2 口頭発表

発表者・題目・学会等名称・開催都市名・年月

橋本健一, 石井幸雄, 内田義之, 関澤清久, 高野裕久, 嵯峨井勝: ディーゼル排気 (DE) と気管支喘息, 第 42 回日本呼吸器学会総会, 仙台, 2002.4

[公開シンポジウム]

高野裕久: ディーゼル排ガス粒子とアレルギー, 第 9 回環境ホルモン学会講演会, 東京, 2002.6

柳澤利枝, 高野裕久, 定金香里, 市瀬孝道, 井上健一郎, 小林隆弘: PM2.5・DEP の構成成分による傷害性の相違について, 第 43 回大気環境学会年会, 府中, 2002.9

市瀬孝道, 定金香里, 高野裕久, 柳澤利枝, 鈴木 明, 嵯峨井勝: ダニ抗原とディーゼル排気暴露による気道炎症発症におけるマウス系統差, 第 43 回大気環境学会年会, 府中, 2002.9

三本木千秋, 越坂部奈緒美, 佐々直子, 夏目みどり, 高野裕久, 吉川敏一: アトピー性皮膚炎モデルを用いた赤シソ抽出物の抗アレルギー効果の検討, 第 52 回日本アレルギー学会総会, 横浜, 2002.11

定金香里, 市瀬孝道, 高野裕久, 柳澤利枝, 川里浩明, 安田愛子: ダニ抗原及びディーゼル排気暴露による肺組織中サイトカイン産生のマウス系統差, 第 52 回日本アレルギー学会総会, 横浜, 2002.11

佐々直子, 三本木千秋, 越坂部奈緒美, 柳澤利枝, 高野裕久, 井上健一郎, 吉川敏一: ダニ抗原誘発気道炎症モデルマウス赤シソ由来ロズマリン酸の抗アレルギー効果の検討, 第 52 回日本アレルギー学会総会, 横浜, 2002.11

[特別講演]

高野裕久: ディーゼル排気微粒子によるエンドトキシン関連肺傷害の増悪, 第 8 回日本エンドトキシン研究会, 大阪, 2002.11

吉田 成一, 平野佐世子, 高野 裕久, 増村健一, 能美健彦, 青木康展: ディーゼル排気微粒子のエストロゲンレセプター mRNA 発現抑制作用の解析, 第 123 回日本薬学会, 長崎, 2003.3

橋本顕子, 天沼喜美子, 日吉孝子, 高野裕久, 木津良一, 早川和一, 武田 健: pt delta トランスジェニックマウスを用いた Benzo(a)pyrene の気管内投与による突然変異の解析, 第 123 回日本薬学会, 長崎, 2003.3

日吉孝子, 高野 裕久, 柳澤利枝, 市瀬孝道, 下條信弘, 熊谷嘉人: 大気中微小粒子成分 9,10 フェナントラキノンの経気道暴露による催炎症作用, 第 73 回日本衛生学会, 大分, 2003.3

[シンポジウム]

高野裕久, 市瀬孝道, 吉川敏一: 化学物質によるアレルギーの修飾, 第 15 回日本アレルギー学会春期臨床大会, 横浜, 2003.5

[市民講座]

高野裕久: 環境汚染物質によるアレルギー疾患の修飾, ディーゼル排気微粒子による気管支喘息の増悪を中心に, 市民フォーラム 2003, 岡山, 2003.9

吉田成一, 六田沙織, 平野佐世子, 早川和一, 高野裕久, 武田 健, 市瀬孝道: ディーゼル排気微粒子中に含まれるエストロゲンレセプター mRNA 発現低下に関与する物質の探索, フォーラム 2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 仙台, 2003.10

机 直美, 藤元彩葉, 吉田成一, 柳澤利枝, 菅原 勇, 高野裕久, 武田 健: ディーゼル排ガスの妊娠期曝露による胎子および胎盤への影響, フォーラム 2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 仙台, 2003.10

小野なお香, 吉田成一, 机 直美, 押尾 茂, 菅原 勇, 高野裕久, 武田 健: 胎仔期ディーゼル排ガス曝露による雄性マウス出生仔の生殖器系に及ぼす影響の解析 フォーラム 2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 仙台, 2003.10

小田桐隆志, 西口主真, 阿部 学, 机 直美, 吉田成一, 松岡 隆, 高野裕久, 成田 年, 鈴木 勉, 井原智美, 菅又昌雄, 武田 健: 胎仔期ディーゼル排ガス暴露によるマウスの行動への影響, フォーラム 2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 仙台, 2003.10

渡邊 学, 机 直美, 高野裕久, 武田 健: ディーゼル排ガスの周産期暴露によるマウス脳神経系への影響解析, フォーラム 2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 仙台, 2003.10

日吉孝子, 高野裕久, 柳澤利枝, 市瀬孝道, 熊谷嘉人: OVA 感作アレルギーに対する大気中微小粒子成分 9, 10-フェナントラキノンの修飾効果, フォーラム 2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 仙台, 2003.10

井上健一郎, 高野裕久, 柳澤利枝, 桜井美穂, 日吉孝子, 市瀬孝道, 定金香里, 吉川敏一: エンドトキシン (LPS) による肺傷害にディーゼル排気微粒子 (DEP) の構成成分が及ぼす影響—第 2 報, 第 53 回日本アレルギー学会総会, 岐阜, 2003.10

日吉孝子, 熊谷嘉人, 戸村成男, 市瀬孝道, 柳澤利枝, 高野裕久: 卵白アルブミンによる喘息モデルに大気中微小粒子成分 9, 10 フェナントラキノンの及ぼす影響について, 第 53 回日本アレルギー学会総会, 岐阜, 2003.10

日吉孝子, 熊谷嘉人, 戸村成男, 市瀬孝道, 柳澤利枝, 井上健一郎, 高野裕久: 大気中微小粒子に含まれる 1,2-ナフトキノンが卵白アルブミン誘発マウス喘息モデルに及ぼす影響, 第 74 回日本衛生学会総会, 東京, 2004.3

日吉孝子, 熊谷嘉人, 戸村成男, 市瀬孝道, 柳澤利枝, 井上健一郎, 高野裕久: 大気中微小粒子に含まれる 9,10-フェナントラキノンの卵白アルブミン誘発マウス喘息モデルに及ぼす影響, 第 74 回日本衛生学会総会, 東京, 2004.3

井上健一郎, 高野裕久, 柳澤利枝, 桜井美穂, 市瀬孝道, 定金香里, 吉川敏一: ディーゼル排気微粒子 (DEP) は細菌毒素による急性肺傷害を増悪する, 第 44 回日本呼吸器学会, 東京, 2004.3

井上健一郎, 高野裕久, 柳澤利枝, 桜井美穂, 市瀬孝道, 定金香里, 吉川敏一: 細菌毒素 (LPS) による肺内サイトカイン・ケモカイン産生にディーゼル排気微粒子 (DEP) の構成成分が及ぼす影響, 第 44 回日本呼吸器学会, 東京, 2004.3

井上健一郎, 高野裕久, 柳澤利枝, 桜井美穂, 市瀬孝道, 定金香里, 森田昌敏, 内山和彦, 吉川敏一: 細菌毒素誘発急性肺傷害に対する 15d-PGJ2 の効果とそのメカニズム, 第 44 回日本呼吸器学会, 東京, 2004.3

柳澤利枝, 高野裕久, 桜井美穂, 井上健一郎, 日吉孝子, 市瀬孝道, 定金香里, 早川和一: マウス喘息モデルに対するディーゼル排気微粒子 (DEP) 構成成分の影響, 第 16 回日本アレルギー学会春期臨床大会, 前橋, 2004.5

定金香里, 市瀬孝道, 高野裕久, 柳澤利枝, 川里浩明, 安田愛子: ディーゼル排気微粒子抽出物塗布の影響, 第 16 回日本アレルギー学会春期臨床大会, 前橋, 2004.5

日吉孝子, 熊谷嘉人, 戸村成男, 市瀬孝道, 柳澤利枝, 井上健一郎, 高野裕久: 卵白アルブミンによる喘息モデルマウスに大気中微小粒子成分 1, 2-ナフトキノンが及ぼす影響について, 第 16 回日本アレルギー学会春期臨床大会, 前橋, 2004.5

日吉孝子, 熊谷嘉人, 戸村成男, 市瀬孝道, 定金香里, 柳澤利枝, 井上健一郎, 高野裕久: OVA 感作アレルギーに対する大気中微小粒子成分 1,2-ナフトキノンの修飾効果, 第 45 回日本大気環境学会年会, 秋田, 2004.10

柳澤利枝, 高野裕久, 井上健一郎, 吉田成一, 武田 健, 吉川敏一: ディーゼル排気微粒子がエンドトキシン誘発性急性肺傷害に及ぼす影響に関する cDNA マイクロアレイ解析, 第 45 回日本大気環境学会年会, 秋田, 2004.10

桜井美穂, 高野裕久, 柳澤利枝, 井上健一郎, 日吉孝子, 市瀬孝道, 定金香里, 吉川敏一: P-46 アレルギー性気管支喘息モデルにディーゼル排気微粒子 (DEP) 構成成分が及ぼす影響, 第 45 回大気環境学会年会, 秋田, 2004.10

日吉孝子, 熊谷嘉人, 戸村成男, 市瀬孝道, 柳澤利枝, 井上健一郎, 高野裕久: 卵白アルブミンによる喘息モデルに大気中微小粒子成分 1,2-ナフトキノンが及ぼす影響について, 第 54 回日本アレルギー学会総会, 横浜, 2004.11

柳澤利枝, 高野裕久, 桜井美穂, 井上健一郎, 日吉孝子, 定金香里, 市瀬孝道, 唐 寧, 早川和一: マウス喘息モデルに対するディーゼル排気微粒子 (DEP) 構成成分の影響 2, 第 54 回日本アレルギー学会総会, 横浜, 2004.11

定金香里, 市瀬孝道, 高野裕久, 柳澤利枝, 井上健一郎, 桜井美穂, 川里浩明, 安田愛子, 早川和一: ディーゼル排気微粒子抽出物塗布によるアトピー性皮膚炎の増悪機序の検討, 第 54 回日本アレルギー学会総会, 横浜, 2004.11

Yanagisawa R., Takano H., Inoue K., Uchiyama K., Yoshikawa T.: Components of diesel exhaust particles diversely enhance acute lung injury related to lipopolysaccharide., 8th conf. Int. Soc., Kyoto, 2004.11

Sakurai M., Takano H., Yanagisawa R., Inoue K., Oda Y., Tamura H., Ichinose T., Yoshikawa T.: Effects of components of diesel exhaust particles on systemic inflammatory response related to acute lung injury in mice., 8th conf. Int. Soc., Kyoto, 2004.11

諸星佳織, 川口真以子, 山本裕史, 近藤卓哉, 高野裕久, 今井秀樹, 森田昌敏: ラットにおけるペンタクロロフェノールの次世代影響について, 環境ホルモン学会第 7 回研究発表会, 名古屋, 2004.12

REPORT OF SPECIAL RESEARCH FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN

国立環境研究所特別研究報告
SR-63-2005

平成17年10月31日発行

編 集 国立環境研究所 編集委員会

発 行 独立行政法人 国立環境研究所

〒305-8506 茨城県つくば市小野川16番2

電話 029-850-2343 (ダイヤルイン)

印 刷 有限会社 ア レ ス

〒300-3257 茨城県つくば市筑穂1-14-2

Published by the National Institute for Environmental Studies

16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan

October 2005

無断転載を禁じます