

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 - 80 - 2008

環境化学物質の高次機能への影響を総合的に
評価する *in vivo* モデルの開発と検証
(特別研究)

Development and evaluation of the *in vivo* model which elucidate
the effects of environmental chemicals on allergic disorders

平成17～19年度

FY2005～2007

NIES



独立行政法人 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

<http://www.nies.go.jp/>

環境化学物質の高次機能への影響を総合的に
評価する *in vivo* モデルの開発と検証
(特別研究)

Development and evaluation of the *in vivo* model which elucidate
the effects of environmental chemicals on allergic disorders

平成 17～19 年度

FY2005～2007

特別研究「環境化学物質の高次機能への影響を総合的に評価する *in vivo* モデルの開発と検証」

(期間 平成17～19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：井上健一郎・小池英子・柳澤利枝

序

本報告書は、平成17年度から19年度に実施された特別研究「環境化学物質の高次機能への影響を総合的に評価する *in vivo* モデルの開発と検証」の成果を取りまとめたものです。

近年、我々の身近な環境を汚染する化学物質は日々増加しており、その健康影響を速やかに明らかにする必要性が増しています。また、環境を汚染する化学物質の健康影響については、毒性の強い物質の大量排出・曝露による臓器（肝臓や腎臓等）に対する毒性の発現という古典的な観点だけではなく、いわゆる‘毒性’の乏しい物質の低濃度曝露、あるいは、低濃度複合曝露による免疫・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も評価する必要性が高まっています。これらの影響の研究から、環境汚染物質に対する感受性が高い人々が存在することや、疾患、性別、時期等により影響の現れ方が異なることも明らかにされています。

本研究課題では、研究代表者らが既に開発している「*in vivo* スクリーニングモデル」を応用・改良し、多くの環境化学物質のアレルギー増悪影響を *in vivo* で検討し、さらに、より簡易なスクリーニング手法の開発を試みました。

その成果として、

(1) 環境ストレスに対し免疫・アレルギー影響等の高次機能影響が出現しやすい動物モデルを用い、短期、かつ簡便に、環境汚染化学物質のアレルギー増悪影響を評価することが可能な *in vivo* スクリーニングモデルを改良・検証することができました。

(2) 多くの環境化学物質について、*in vivo* におけるアレルギー増悪作用の有無を短期間で評価することができました。

(3) 全ての環境化学物質が非特異的にアレルギーを増悪することはないが、ある種の化学物質は、既存の臓器毒性より求められた *noadverse effect level* (NOAEL) より低濃度で、アレルギー増悪影響を発揮することが明らかになりました。

(4) DNA マイクロアレイの併用や *in vivo* スクリーニング手法の導入により、より短期、かつ簡便に、環境化学物質のアレルギー増悪影響を推定することができるスクリーニングシステムを提案することができました。

本成果により、

(1) 古典的な毒性ではなく、【高次機能影響】、あるいは、【*quality of life* に密接に関与し、生命・生体システムのかく乱に基づく健康影響】という新たな健康影響の評価軸を提言することができました。また、こうした高次機能影響が、いわゆる臓器毒性に比較してより低い濃度でも惹起されうることを示し、科学的なインパクトと共に、化学物質規制のための環境政策に新たな方向性（の存在する可能性）を与えることができました。

(2) 簡便かつ短期間で影響評価が可能なスクリーニング手法を提案し、環境政策に資する基礎データの蓄積を加速することができました。

今後、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20年12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. 研究の背景, 経緯, 目的	
1.1 研究の背景と経緯	1
1.2 研究の目的と作業仮説	6
2. 研究の成果	
2.1 <i>in vivo</i> スクリーニングによる化学物質のアレルギー増悪影響評価に関する研究 (サブテーマ1)	7
2.2 アレルギー増悪影響のより簡易なスクリーニング手法の開発に関する研究 (サブテーマ2)	17
2.2.1 DNA マイクロアレイを用いた短期スクリーニング手法の開発に関する研究	17
2.2.2 培養細胞系を用いた簡易スクリーニング手法の開発に関する研究	21
3. 研究成果のまとめと意義, 波及効果	31
4. 今後の展望	34
[資 料]	
I 研究の組織と研究課題の構成	37
1 研究の組織	37
2 研究課題と担当者	37
II 研究成果発表一覧	38
1 誌上発表	38
2 口頭発表	42

1. 研究の背景, 経緯, 目的

1.1 研究の背景と経緯

現代社会においては、経済性、簡便性、機能性の一層の向上等を含む様々な理由から、既存の化学物質に加えて新たな化学物質が次々に合成され、大量に生産され、上市され、使用されるようになってきている。このため、身の周りの一般環境においても、生活の中で使用され、われわれが接しうる化学物質（環境化学物質）は莫大な数に上る。もちろん、これらの物質は、われわれに接する可能性のみならず、皮膚（生活製品との接触や職業上の理由等を由来とする経皮的曝露）や消化管（水や食事等を介する経口的曝露）や呼吸器（呼吸による空気吸入を介する経気道曝露）を介して、われわれの体内にまで侵入する可能性がある。しかし、これらの莫大な数の環境化学物質がわれわれの健康に与える影響は、極一部分のみが明らかにされているにすぎない。また、こうした環境化学物質やそれらのわれわれへの曝露に関する近年の特徴として、以下のような点が列挙されることを考慮する必要もある。

- 1) 過去には合成、生産されていなかった新たな環境化学物質が新たに出現し、それらの曝露が生じていること。
- 2) 過去に問題となってきた公害等に比較し、低濃度における曝露が一般的であること。
- 3) 細胞や生体に対する障害性や死に基づく古典的な急性・亜急性毒性には乏しい物質の曝露が一般的であること。
- 4) 他の環境化学物質や他の環境要因（物理的要因、生物学的要因、精神的要因、等々）との複合的な曝露が存在し、それらの複合作用、影響を考慮する必要があること。
- 5) シックハウス症候群や化学物質過敏症の患者さんの例に代表されるように、物質の曝露に対する影響発現に関する感受性に個人差があること。

これらの状況をふまえると、環境化学物質の曝露による健康影響を評価するにあたり、今日、下記のような条件を充たすことが重要となってきたと考えら

れる。

- 1) 古典的な細胞、生体毒性だけでなく、より軽度な、しかし生活や生命の質（quality of life : QOL）に密接に関連する影響を検討・評価できること。
- 2) 細胞や個体の死に基づくレベルの影響ではなく、「遺伝子発現のかく乱」や「シグナル伝達のかく乱」を含む「生命・生体システムのかく乱」に基づくレベルで（図1）、健康影響を評価できること。
- 3) 多数の物質を対象とし、簡便、かつ、短期間のうちに影響を評価、あるいは、推定できること。
- 4) 複合曝露の影響もあわせて評価できること。
- 5) 個人差、あるいは、高感受性群をも対象として、評価できること。
- 6) 低濃度における影響をも評価できること。

上述の【QOLに密接に関与し、生命・生体システムのかく乱に基づく健康影響】について、生命・生体システム構成の代表的機構を例に挙げて簡単に説明を加えると、以下ようになる（図1）。ある生理的な刺激が体内の細胞に加わると、その刺激に特有に反応する細胞膜や細胞質内の受容体がまず活性化される。その後、活性化された受容体を介して、種々のシグナル（信号）が細胞内で伝達される。この過程は、細胞内のタンパク質の酸化やリン酸化等の化学的修飾、遺伝子の転写を開始する転写因子や核内受容体の細胞質から核への物理的移行や化学的変化等を含む。こうして伝達されたシグナルは細胞質から核へと進み、様々な遺伝子を転写し（遺伝子発現）、

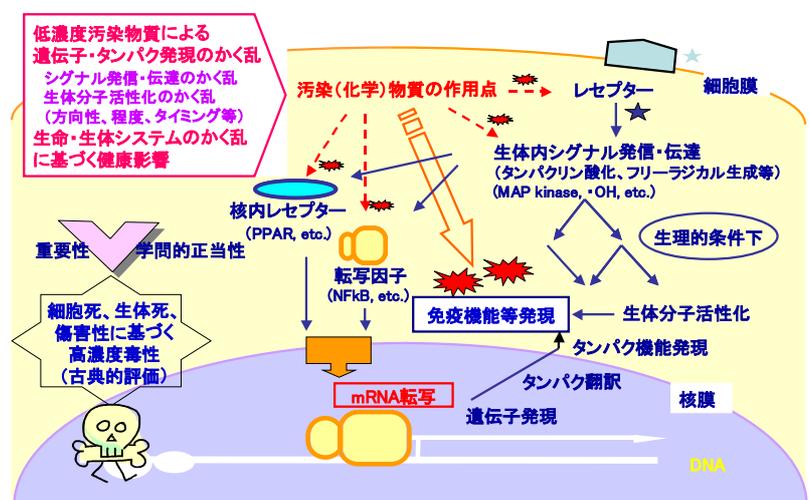


図1 環境汚染化学物質は生命・生体システムのかく乱によりアトピー・アレルギー疾患を増悪する可能性がある

それを基に様々な生理活性を持つタンパク質が産生され（タンパク翻訳）、生理学的作用が発揮される。もちろん、ここでいう生理学的作用は、免疫・アレルギー系に関与することもあり、神経・行動系、内分泌系に関与することもありうる。たとえば、ヒト固有のホルモンは、それぞれに特有な受容体を活性化することにより、特異的なシグナルを伝達し、そのホルモン作用に特有な遺伝子、ひいては、タンパク質を作り出し、生理活性（ホルモン作用）を発揮する。一方、環境ホルモンー内分泌かく乱化学物質ーは、ヒト固有のホルモンのシグナル伝達系を様々なステップでかく乱することにより、その影響を発揮する。たとえば、女性ホルモンであるエストロゲンと特有に反応する核内受容体にエストロゲン受容体というものがあるが、この受容体はある種の化学物質によっても活性化されたり抑制化されたりする。そして、もちろん、この活性化や抑制化は、本来のエストロゲンの作用をかく乱する結果をきたす。このようなメカニズムにより、ある種の環境化学物質は、環境ホルモンたりうるのである。

一方、転写因子や核内受容体には、内分泌系の遺伝子を転写するものだけでなく、免疫・アレルギー系や神経・行動系の遺伝子を転写し生理活性を持つタンパクを生成する（生理作用を発揮する）ものも数多く存在することが確認されている。この事実より、内分泌系をかく乱する化学物質が存在すると言うことは、免疫・アレルギー系や神経・行動系をかく乱する環境化学物質が存在しうることを強く示唆する。このように、「遺伝子発現のかく乱」、「シグナル伝達のかく乱」、「タンパク翻訳のかく乱」等の様々なステップで、「生命・生体システムのかく乱」に基づく健康影響は環境化学物質により惹起される可能性が理論的に存在し、また、その影響は免疫・アレルギー、神経・行動、内分泌系等で発現されうると考えられる。一方、免疫・アレルギー、神経・行動、内分泌を軸とするいわゆる「高次機能」は人類を含む高等動物においてよく発達しているため、人を対象とした環境化学物質の生体影響の中では、最も重要な検討対象と考えられる。しかし、これらの高次機能影響を対象とし、上述の要件1) -6) を満たす影響評価系は、まったく確立していないのが現状である。

さて、一方、免疫・アレルギー系の影響や疾患に関する現状を振り返ると、アトピー性皮膚炎、花粉症、気管支喘息をはじめ免疫・アレルギー疾患は若年者を中心に

激増し、新たな「国民病」の一角を占め、国民、特に若年者の心身両面の健康と成長に大きな被害をもたらしている。故に、こ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が必須である。

ある影響や疾患の発現、増加、増悪と関連する二大要因として、遺伝因子と環境因子が一般に挙げられる。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、常染色体遺伝、伴性遺伝等の遺伝形式により遺伝因子単独でもある種の疾患群は惹起される。一方、アレルギー疾患等の多くの人々を冒す疾患に悩む人々には、一般に大きな遺伝子の異常は認められない。しかし、ある疾患になりやすい個人（高感受性個体・個人）とそうでない個人が存在することは一般的に認められており、その理由を説明する事象のひとつとして、例えば、一塩基多形(single nucleotide polymorphism : SNP)の概念があげられる。すなわち、遺伝子を構成する莫大な数の核酸のわずかひとつが変異することにより、ある疾患に対するかかりやすさ（高感受性）が規定され、その上に様々な外的要因が加わ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、この発症や増悪の誘因となる外的要因が環境因子ということになる。

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て変異をきたすということは非常に考えにくい。一方、われわれを取り巻く環境に関しては、それが急速に、かつ、大きく変化していることを認めざるを得ない。すなわち、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2）。そして、アレルギー疾患の急増に関わりうる環境因子としては、以下のようなものが列挙されている。



図2 アトピー・アレルギー疾患は急増している！！
その主要因は環境因子の変化と考えられている！

(1) 居住環境の変化

最近の家屋に関しては、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、居住環境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経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、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もある。一方、木材、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インテリア製品や一般家電製品、各種事務設備・機器にも多くの化学物質が使用されるようになり、これらの環境化学物質の曝露機会の増加も危惧されている。

(2) 食環境の変化

国際的な交流や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。われわれがかつてない食材を口にする機会も増加している。新たな食材に含まれる成分は、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患者さんの多くは、ダニ、スギ花粉、卵、牛乳、小麦、ソバ、ハチ等の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多く、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難しい。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考えている研究者もある。肉食の増加と魚食の低下がその代表例である。そして、もう一つの側面として、食物やその容器に対する添加物（化学物質）の使用も挙げられる。食品の劣化、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、食品原材料の効率的な生育・飼育のために、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製剤が使用される場合も指摘されている。また、利便性や経済性のためにディスプレイの食器や容器がしばしば使用されるが、この原材料であるプラスチックやビニールを形成するためには可塑剤としていくつもの化学物質が使用されており、この溶出によりわれわれはその曝露を受ける可能性がある。特に、脂溶性の高い可塑材は、食品に含まれる脂肪分に溶出し、容易に経口的に曝露される可能性がある。また、自然界における捕食ピラミッドの上位にある大型魚類等には、有機

スズ、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可能性もあるため、われわれは食物等を介して、これらの環境汚染物質を経口的に摂取している可能性がある。

(3) 衛生環境の変化

寄生虫疾患や細菌感染症の減少も、アレルギー疾患増加の一因と考えられている。寄生虫に対するIgE抗体がマスト細胞の表面に多量に固着し、花粉やダニのアレルゲンに対するIgE抗体がマスト細胞に固着するのを妨害することにより、花粉やダニに対するアレルギーが抑制されるのであろうという考え方もある。しかし、近年、寄生虫疾患の罹患が、逆に、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なされ、結論は出ていない。一方、細菌感染症の減少とアレルギー疾患の増加の関連に関しては、以下のような考え方が代表的である。多くのアレルギー疾患は、一般に、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。一方、過去に多数みられた感染症の代表的存在である結核等では、Th1リンパ球（Th2リンパ球としばしば拮抗する活性を示す。）が主役を演じている場合が多かった。これらの感染症が減少したため、Th1が減弱し、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いう考え方もある。しかし、これについても、結核等の感染症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、議論が残っている。一方、もう一つの重要な変容は、抗生物質、抗菌性化学物質等の化学物質の使用である。われわれは抗菌的化学物質の曝露を生活の中で受けている可能性がある。

(4) 水・大気・土壌環境の変化

水・大気・土壌環境等狭義の環境因子の変化（いわゆる環境汚染）がアレルギー疾患の増加、増悪に関与するという考え方やその論拠も数多い。たとえば、われわれは、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。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アレルギー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喘息を悪化しているものと考えることができた。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喘息増悪のシナリオも推測されている（図3）。

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である。」ということも可能であり、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。

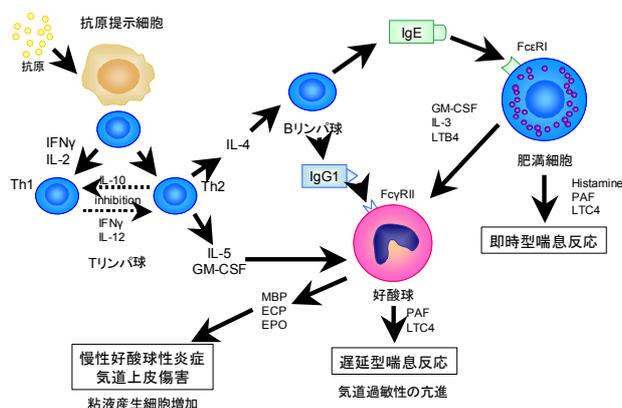


図3 アレルギー性気管支喘息のメカニズム

そこで、われわれは、平成15-17年度における先行特別研究において、環境化学物質とアレルギー疾患の関連性について、以下の点を検討し、興味ある結論を得た。

1) 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、DEPに含まれる脂溶性化学物質（群）であり、脂溶性化学物質を抽出後の残渣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炎症は相乗的に増悪することが、経気道曝露を実施した研究により明らかになった。アレルギー喘息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喘息でも重要な役割を演じているため、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。

2) DEP に含有される環境化学物質である 9, 10-フェナントラキノンの経気道曝露が、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。9, 10-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。

3) DEP に含有される環境化学物質である 1, 2-ナフトキノンの経気道曝露は、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、1, 2-ナフトキノンのアレルギー性喘息増悪影響は、9, 10-フェナントラキノンのアレルギー性喘息増悪影響に比較すると、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。一方、9, 10-フェナントラキノンは異なり、1, 2-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した。また、1, 2-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、9, 10-

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。

4) 自然発症、塩化ピクリル塗布、もしくは、ダニアレゲンを皮内投与することにより誘導した各種マウス皮膚炎モデルに対し、フタル酸ジエチルヘキシルを4, 8, 24, 120, 600 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を投与し検討を行ったところ、3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。逆に、高用量曝露では増悪影響は逆に目立たなくなった。ダニアレゲン皮内投与による皮膚炎モデルは、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。600 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ のフタル酸ジエチルヘキシル曝露では、増悪効果はほとんど消失していた(図4, 5)。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。また、フタル酸エステルによるアレルギー

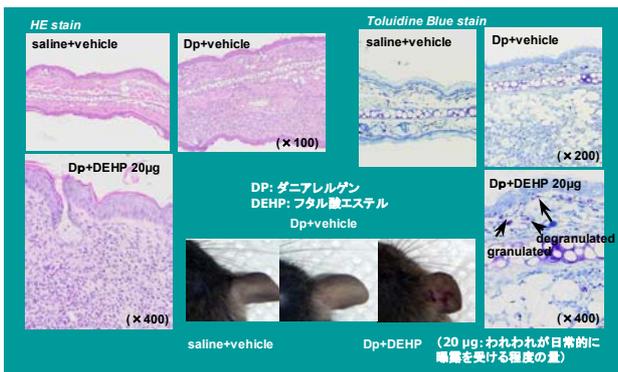


図4 フタル酸エステルはアトピー性皮膚炎を増悪する

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 等の遺伝子や蛋白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、ダニアレゲン誘発アトピー性皮膚炎モデルを用いることにより、短期間の実験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るとも考えられた。この実験系は、特殊技術も不要で、化学物質の投与方法も簡易であり、実際にダニアレゲンに関連するアトピー性皮膚炎という病態を表現しうることで、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で、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(図6)。

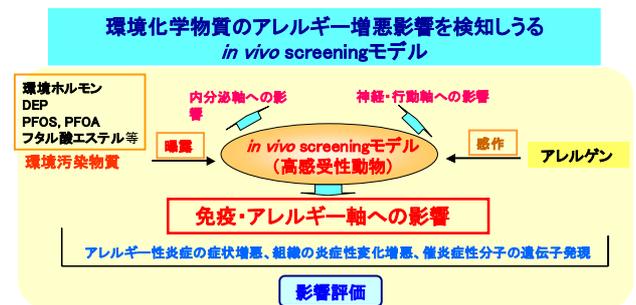


図6 アトピー・アレルギー増悪影響を評価する手法の開発

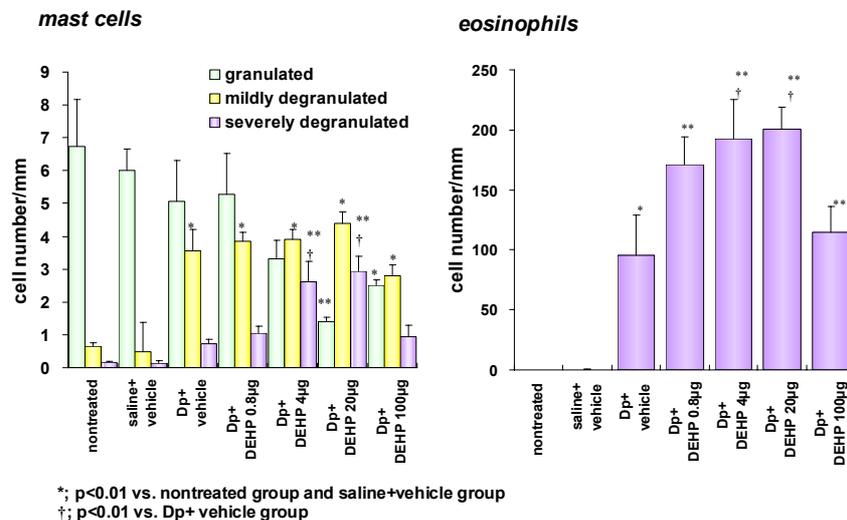


図5 フタル酸エステルはアトピー性皮膚炎の病理組織学的変化も増悪する

そして、われわれは、自らの一連の研究の実践と他の文献を調査・検討してきた過程で、以下の点に注目するに至った。

1) DEPのアレルギー増悪作用のかかなりの部分は、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（環境化学物質）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環境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、発癌性、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。

我々は、アレルギー疾患の増加や増悪に関与する環境因子として、ディーゼル排気微粒子とそれに含まれる脂溶性物質、9,10-フェナントラキノン、1,2-ナフトキノン、フタル酸エステル等の化学物質が存在することを、先行特別研究で明らかにした。また、化学物質のアレルギー増悪影響が、古典的毒性を指標としたNOAELに比較し、数百分の一という低濃度でも発現しうることも明らかにした。しかし、先行特別研究で検討対象となっていなかった化学物質が、アレルギー疾患の重要な増悪要因である可能性も否定できない。

これらの状況より、「日に日に増加しつつある環境化学物質が高次機能に及ぼす影響を、免疫・アレルギー系に特に注目し、短期、かつ、簡便に、総合的に評価することができるシステムの開発とその実行、および、検証」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・危急性の高い課題であると考えられるに至った。

1.2 研究の目的と作業仮説

本研究課題は、「免疫・アレルギー系に焦点を当て(1)環境化学物質の高次機能への影響をより簡易・迅速に、評価することが可能な *in vivo* スクリーニングモデル、*in vitro* スクリーニングモデルを開発すること。(2) その短期化、簡便化を一層図るとともに、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。」ことを目的とした。

また、研究代表者は、本研究課題について、以下のような作業仮説と成果を期待した。

(1) 先行特別研究で提案した *in vivo* スクリーニングシステムを応用することにより、多くの環境化学物質について、アレルギー増悪作用が存在するか否かを評価することができること。

(2) 今回検討する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し、そのメカニズムとしては、炎症細胞の活性化や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等が重要であること。

(3) DNA マイクロアレイの併用や *in vitro* スクリーニングの導入により、より短期、かつ、簡便な環境化学物質影響スクリーニングシステムを開発することができること。

(4) これにより、複数の化学物質の影響を評価することが、より簡便になること。

また、本研究の波及効果として、以下の事項を想定した。

(1) 古典的な毒性ではなく、【高次機能影響】、あるいは、【QOLに密接に関与し、生命・生体システムのかく乱に基づく健康影響】という新たな健康影響の評価軸を提言することにより、化学物質規制のための環境政策やその方向性にインパクトを与えうること。

(2) 簡便かつ短期間で影響評価が可能なスクリーニング手法を提案できることにより、環境政策に資する基礎データの蓄積を加速できること。

(3) 早期影響指標を検出・活用することにより、化学物質の高次機能影響の未然防止に資すること。

2. 研究の成果

本研究課題は以下のサブテーマから構成され、その成果は下記の通りであった。

(サブテーマ1) *in vivo* スクリーニングによる化学物質のアレルギー増悪影響評価

(サブテーマ2) アレルギー増悪影響のより簡易なスクリーニング手法の開発

DNA マイクロアレイを用いた短期スクリーニング手法の開発

培養細胞系を用いた簡易スクリーニング手法の開発

2.1 *in vivo* スクリーニングによる化学物質のアレルギー増悪影響評価に関する研究 (サブテーマ1)

本サブテーマにおいては、研究代表者が先行特別研究において提案した「アレルギーを起こしやすい高感受性動物 (NC/Nga マウス) を用いた *in vivo* スクリーニングモデル」(図6) として確立したアトピー性皮膚炎モデルを利用し、検討対象とする化学物質を増やし、その *in vivo* におけるアレルギー増悪影響を評価した。対象とする環境化学物質は、可塑剤であるフタル酸ジイソノニル (DINP), アジピン酸ジイソノニル (DINA), トリメリ

ット酸トリス (2-エチルヘキシル) (TOTM), 樹脂原料であるビスフェノール A (BPA), スチレンモノマー (ST), コーティング剤・界面活性剤の原料であるペルフルオロオクタタン酸 (PFOA), ペルフルオロオクタタンスルホン酸 (PFOS), 4-ノニルフェノール (NP), 4-*t*-オクチルフェノール (OP), *p*-*t*-ブチルフェノール (BP), 防汚剤である塩化トリブチルスズ (TBTC), 大気汚染物質である9,10-フェナントラキノン (PQ), 1,2-ナフトキノン (NQ), ベンゾピレン (BaP), 食品中化学成分のアクリルアミド (AA), 接着剤の原料であるフタル酸ジブチル (DBP), 化粧品・香料などの溶媒として使用されているフタル酸ジエチル (DEPH) (図7) 等を選択した。これらは、内分泌かく乱作用が疑われている化学物質 (ビスフェノール A, 4-ノニル

フェノール, スチレンモノマー, 塩化トリブチルスズ, 等), ディーゼル排気微粒子 (DEP) にも含まれている Ah レセプター刺激物質 (ベンゾピレン, 1,2-ナフトキノン, 9,10-フェナントラキノン), PPAR 刺激物質 (ペルフルオロオクタタン酸, ペルフルオロオクタタンスルホン酸), フタル酸エステル類 (フタル酸ジエチル, フタル酸ジブチル), 可塑剤代替物 (フタル酸ジイソノニル, アジピン酸イソノニル, 等), 食品添加物 (アクリルアミド), 化粧品・香料などの溶媒として使用されているフタル酸ジエチル (DEPH), 等を含んでいる。

本実験 (*in vivo* スクリーニングモデル) のプロトコルを図8に示す。7週齢のアトピー・アレルギー疾患をきたしやすい NC/Nga 雄性マウス (20-23g) を用い、6群を設定した。第1群には、アレルゲン溶解のために用いた生理食塩水を右耳介腹側に10 μ L 皮内注射した (saline + vehicle 群)。第2-6群は、アレルゲンとして、ヤケヒョウヒダニ (*Dermatophagoides pteronyssinus*; 以下 Dp と表記, Cosmo Bio LSL) の成虫から抽出した抽出物を第1群同様に皮内投与した。Dp は、5 μ g (10 μ L, 0.5 mg/mL) を1回あたりの投与量とした。すべての群にお

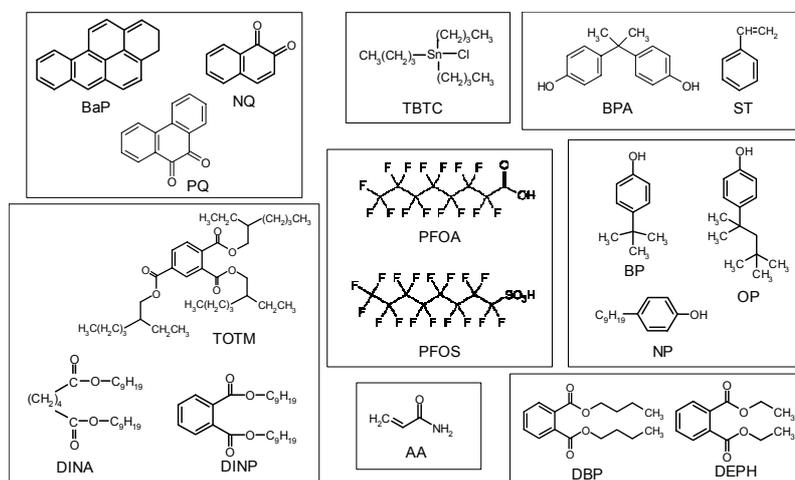


図7 環境化学物質構造式

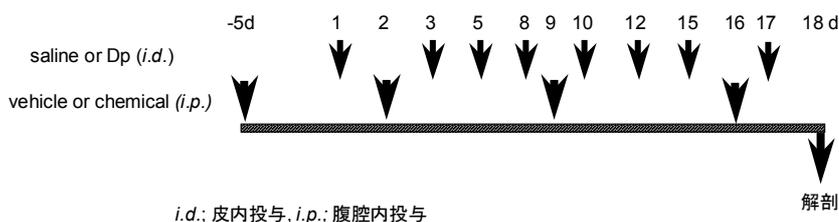


図8 環境化学物質およびアレルゲンの投与スケジュール

いて、Dp あるいは生理食塩水は、1, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17日目に、計8回処置した。また、各対象化学物質については、第1群、および第2群には、溶解に用いた溶液 (BPA は5% Ethanol を含む Olive Oil (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), PFOA, および PFOS は1% DMSO を含む生理食塩水, TBTC, NQ, PQ は0.1% DMSO を含む生理食塩水, AA は生理食塩水, それ以外の化学物質については、100%の Olive Oil を用いた。) を腹腔内に投与した。第1群、および第2群は、それぞれの溶媒を、第3-6群は、対象化学物質の濃度を4段階設定し、-5, 2, 9, 16日目に、計4回、100 μ L (BPA は200 μ L) 腹腔内に投与した。

アトピー性皮膚炎の病態を示す指標として、Dp を投与した右耳介の症状変化を、皮内投与の投与24時間後に毎回評価した。評価項目は、乾燥肌、発疹、掻爬傷、浮腫を対象とし、4段階 (0: なし; 1: 軽度; 2: 中等度; 3: 重度) で行った。総点数を、重症度を表す症状スコアとして、各群の症状変化を比較検討した。また、耳介腫脹の定量的評価として、右耳介の厚さを、ダイヤルシクネスゲージ (OZAKI MFG. Co., Ltd.) を用い、皮膚炎症状と同様に各皮内投与24時間後に毎回測定した。最終投与の24時間後、エーテル麻酔下に屠殺し、血清、耳介組織の採取を行った。

なお、対象環境化学物質の曝露量は、環境省、あるいは厚生労働省などにおける曝露影響評価の基礎データを参考に、既報告の NOAEL の10倍量程度を最高濃度とし、

より低濃度をも含む用量設定とした。また、NOAEL が報告されていない物質に関しては、NOAEL が規定されている類似の化学物質の含有量、あるいはヒトの推定曝露量の100倍程度を上限として換算し、より低濃度を含む用量設定とした。

1) 可塑剤のアレルギー増悪作用に関する検討

可塑剤として、最も大きなシェアを占めているフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) は、プラスチック製品などを始めとして広く用いられている。しかし、動物実験において、内分泌かく乱作用を有することが報告され、その健康影響が指摘されるようになり、各国でその使用が規制されている。我々の検討でも、DEHP 曝露がアトピー性皮膚炎を増悪する可能性があることを報告している。これに伴い、近年、DEHP の代替物の開発が進んでいる。これらの代替物は、一般的に DEHP に比べて毒性が低いとされているが、毒性実験では、生殖系への影響を指摘する報告もある。一方、免疫・アレルギー系に対する影響については、ほとんど検討されていない。これより、これらの可塑剤、中でも、DEHP の次に生産量が多い DINP, フタル酸エステル類以外の代替物として、DINA, TOTM を選択した。

[フタル酸ジイソノニル (DINP)]

図9に示すように、対照群である saline+vehicle 群では、皮膚炎は惹起されなかった。Dp+vehicle 群では、3回目の Dp 投与後から皮膚炎による症状が出現し、経時

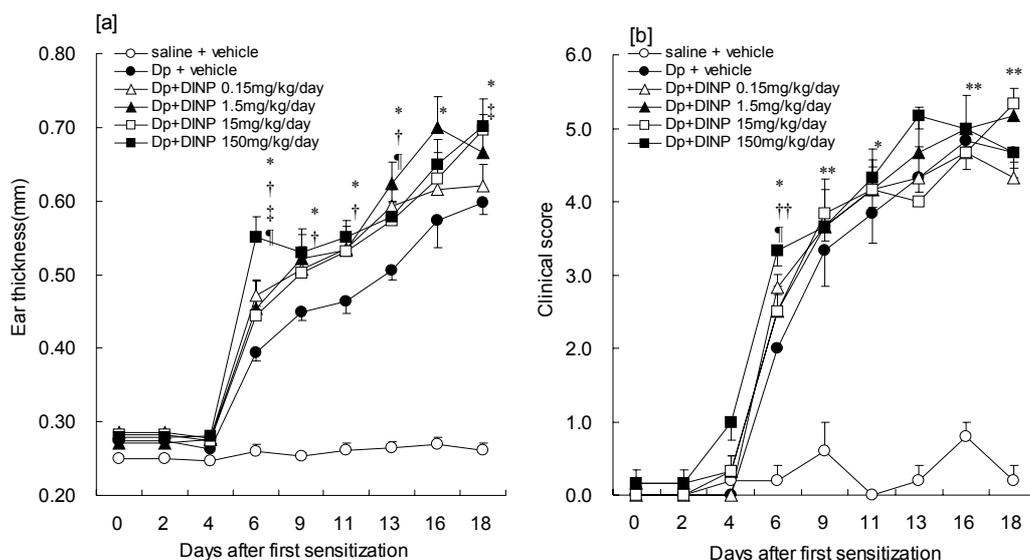


図9 DINP 曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響

*; $p < 0.05$, Dp treated groups vs. saline+vehicle group, †; $p < 0.05$, Dp+DNIP 150 mg/kg/day group vs. Dp+vehicle group
 ††; $p < 0.05$, Dp+DNIP 150 mg/kg/day group vs. Dp+vehicle group, ‡; $p < 0.05$, Dp+DNIP 15 mg/kg/day group vs. Dp+vehicle group
 ¶; $p < 0.05$, Dp+DNIP 0.15 mg/kg/day group vs. Dp+vehicle group

的に有意な増悪を認めた。一方、DINP 曝露群では、病態の形成段階によっては Dp+vehicle 群に比較して、有意な耳介腫脹の増悪を示した (図9a)。しかし、濃度依存性は認められなかった。皮膚炎症状については、Dp 処置群で、3回目の Dp 投与後から saline+vehicle 群に比較し、有意に症状スコアが上昇したが、DINP 曝露による増悪影響は見られなかった (図9b)。

[アジピン酸ジイソノニル(DINA)]

図10に示すように、対照群である saline+vehicle 群で

は、皮膚炎の症状は惹起されなかった。Dp+vehicle 群では、3回目の Dp 投与後から皮膚炎症状が出現し、経時的に有意な増悪を認めた。一方、DINA 曝露による耳介腫脹への影響は認められなかった (図10a)。また、症状スコアについても、概ね同様の傾向を示した (図10b)。

[トリメリット酸トリス(2-エチルヘキシル)(TOTM)]
 図11に示すように、対照群である saline+vehicle 群では、皮膚炎の症状は惹起されなかった。Dp+vehicle 群では、3回目の Dp 投与後から皮膚炎症状が出現し、経時

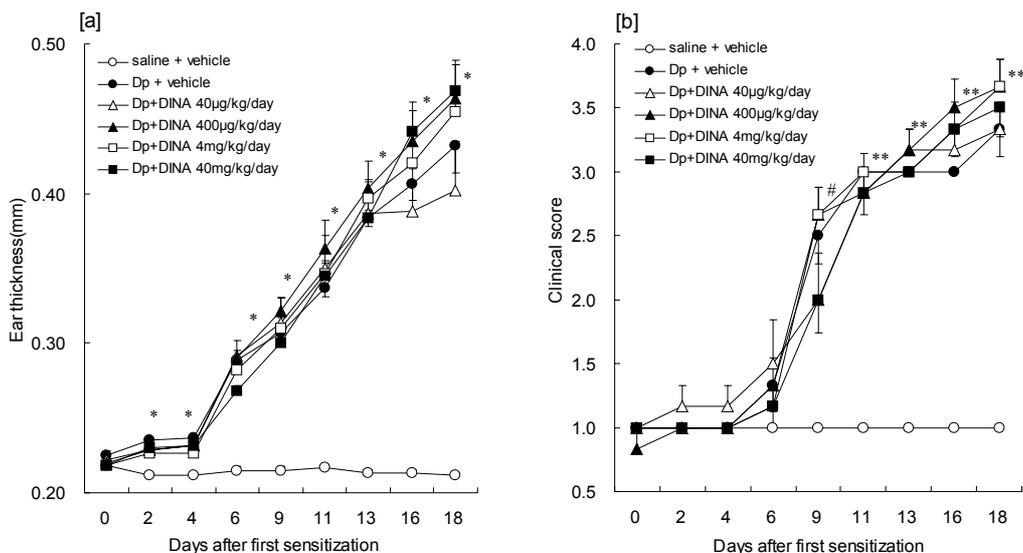


図10 DINA 曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響

* ; p<0.05, Dp treated groups vs. saline+vehicle group
 ** ; p<0.01, Dp treated groups vs. saline+vehicle group
 # ; p<0.05, Dp+vehicle, Dp+DINA 400 µg/kg/day, Dp+DINA 4 mg/kg/day, and Dp+DINA 40 mg/kg/day groups vs. saline+vehicle group

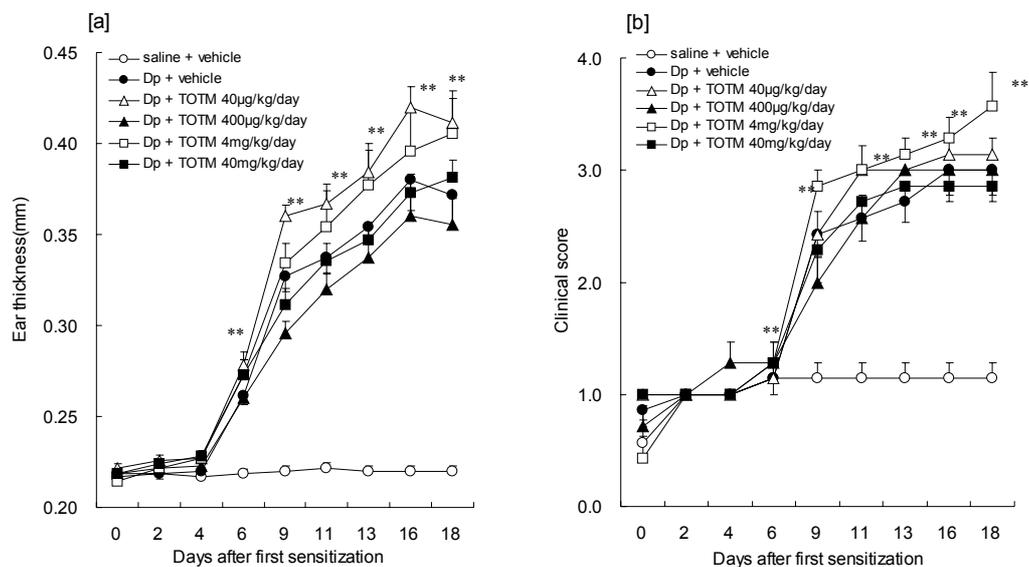


図11 TOTM 曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響

** ; p<0.01, Dp treated groups vs. saline+vehicle group

的に有意な増悪を認めた。一方、TOTM 曝露による耳介腫脹への影響は認められなかった (図11a)。また、症状スコアについても、概ね同様の傾向を示した (図11b)。

2) 樹脂原料のアレルギー増悪作用に関する検討

樹脂原料は、電子機器、医療機器、接着剤、あるいは塗料の原材料などに用いられており、一般環境中にも存在することから、ヒトへの曝露とそれによる影響の発現も懸念される。動物を用いた毒性実験では、生殖系・神経系への影響が指摘されているが、免疫・アレルギー系に対する影響については、ほとんど検討されていない。ここでは、樹脂原料の中でも、汎用性の高い BPA と、食品トレイに広く使用される熱処理により溶出されることが報告されている ST (今回はモノマーを用いた) を選択した。

[ビスフェノール A(BPA)]

図12に示すように、対照群である saline+vehicle 群では、皮膚炎の症状は惹起されなかった。Dp+vehicle 群では、3回目の Dp 投与後から皮膚炎症状が出現し、経時的に有意な増悪を認めた。一方、BPA 5 mg/kg/day を投与した群では、Dp 単独群に比較し、有意な耳介腫脹の悪化を認めた (図12a)。症状スコアは、Dp 処置群で、saline+vehicle 群に比較し、有意に上昇したが、BPA 曝露による影響は認められなかった (図12b)。尚、50 mg/kg/day 処置した群では、投与の過程で死亡例が出たため検討することができた例数が少なく、参考値として表記した。

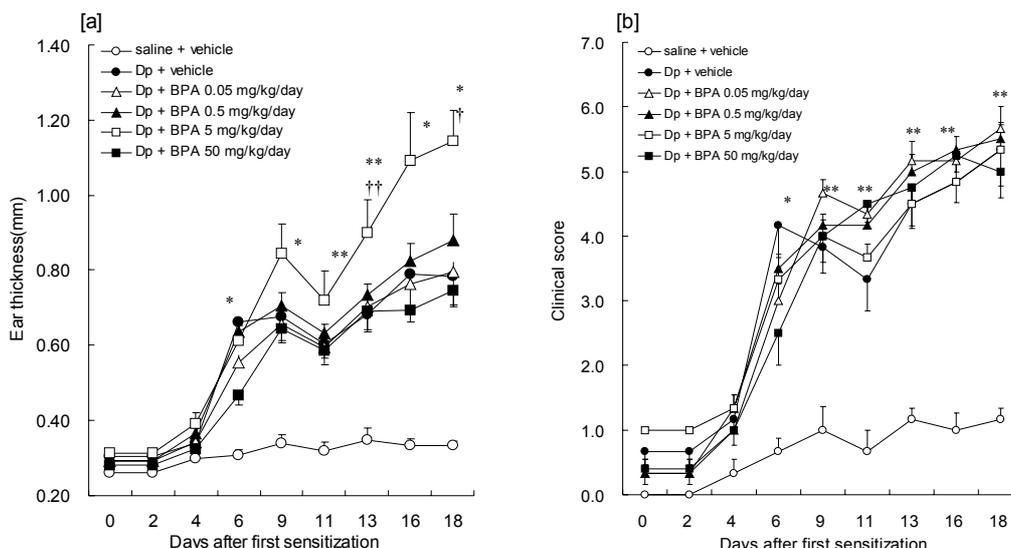


図12 BPA 曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響

* ; p<0.05, Dp treated groups vs. saline+vehicle group, ** ; p<0.01, Dp treated groups vs. saline+vehicle group
† ; p<0.05, Dp+BPA 5mg/kg/day group vs. Dp+vehicle group, ‡ ; p<0.01, Dp+BPA 5mg/kg/day group vs. Dp+vehicle group

[スチレンモノマー(ST)]

図13に示すように、対照群である saline+vehicle 群では、皮膚炎の症状は惹起されなかった。Dp+vehicle 群では、3回目の Dp 投与後から皮膚炎症状が出現し、経時的に有意な増悪を認めた。一方、ST 曝露により、Dp 単独群に比較し、Dp 投与3回目から有意な耳介腫脹の悪化を認め、特に、ST 1.4 mg/kg/day を投与した群において、最も顕著であった (図13a)。また、症状スコアについても、ST 1.4 mg/kg/day 曝露群で有意な上昇を示した (図13b)。一方、ST 14 mg/kg/day 曝露群では、皮膚炎の増悪影響は減弱していた。尚、140 mg/kg/day 処置した群では、ST 処置の過程で死亡例が多数出たため途中で実験を中止した。

3) コーティング剤・界面活性剤の合成原料のアレルギー増悪作用に関する検討

コーティング剤、あるいは界面活性剤などに使用されている有機フッ素化合物は、強い毒性を示すこと、環境中に生息する多種の動物へ蓄積することが報告されている。また、PPAR などのレセプターを活性化することから、生体内で生理活性を発揮し、何らかの健康影響を発現する可能性が懸念されている。

また、界面活性剤の一種であるアルキルフェノール類は、界面活性剤のみならず、樹脂原料などにも使用されている (日本国内では家庭用の洗剤には使用されていない)。中でも、NP, OP, BP は、代表的なアルキルフ

フェノール類であり、生産量ではNPが最も多い。特に、NPは、一般毒性に加え、内分泌かく乱作用を示すことが報告されており、健康への影響も懸念される。NPの影響としては、職業曝露による皮膚の脱色などの影響が報告されているが、免疫・アレルギー系への影響については、ほとんど検討されていない。

ここでは、有機フッ素化合物として汎用されているPFOA、およびPFOSを、アルキルフェノール類として、

NP, OP, BPを選択した。

[ペルフルオロオクタン酸(PFOA)]

図14に示すように、対照群であるsaline+vehicle群では、皮膚炎の症状は惹起されなかった。Dp+vehicle群では、3回目のDp投与後から皮膚炎症状が出現し、経時的に有意な増悪を認めた。一方、PFOA 1.5 µg/kg/day, 15 µg/kg/day, 1.5 mg/kg/day曝露群において、Dp+vehicle群と比較し、耳介腫脹が抑制傾向を示し、特に1.5

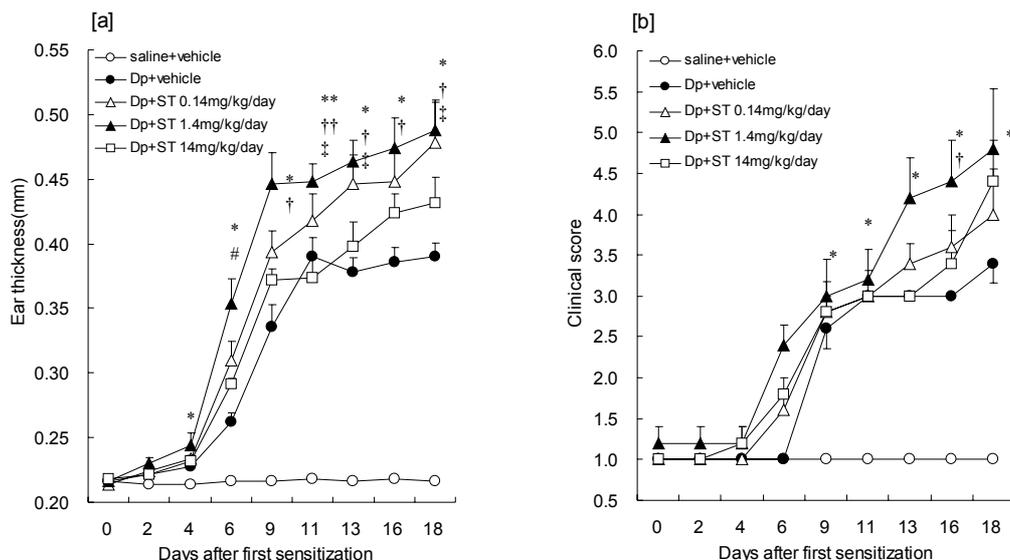


図13 ST曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響

*; p<0.05, Dp treated groups vs. saline+vehicle group, **; p<0.01, Dp treated groups vs. saline+vehicle group
 #; p<0.05, Dp+ST treated group vs. Dp+vehicle group, †; p<0.05, Dp+ST 1.4 mg/kg/day group vs. Dp+vehicle group
 ††; p<0.01, Dp+ST 1.4 mg/kg/day group vs. Dp+vehicle group, ‡; p<0.05, Dp+ST 0.14 mg/kg/day group vs. Dp+vehicle group

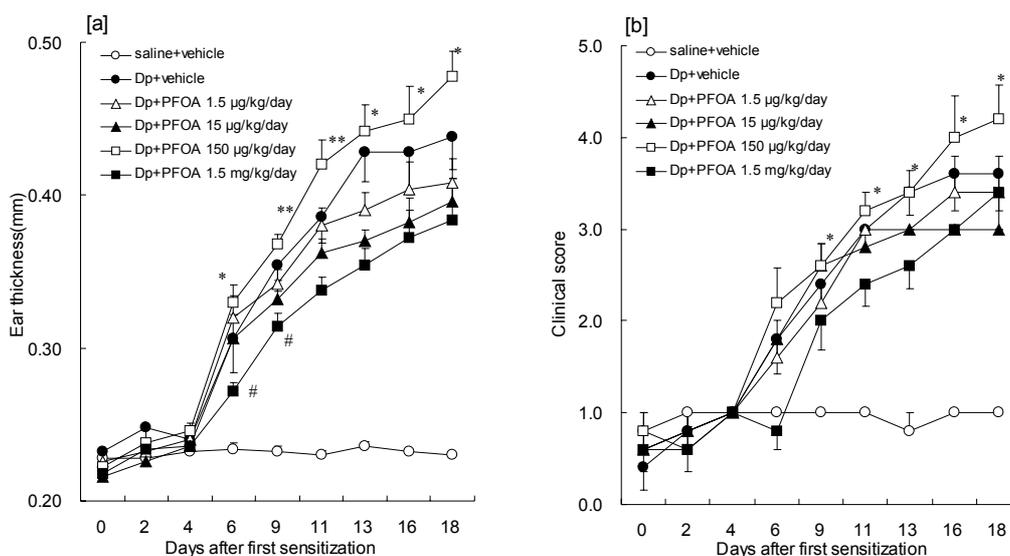


図14 PFOA曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響

*; p<0.05, Dp treated groups vs. saline+vehicle group, **; p<0.01, Dp treated groups vs. saline+vehicle group
 #; p<0.05, Dp+PFOA 1.5 mg/kg/day group vs. Dp+vehicle group

mg/kg/day 曝露群では、Dp+vehicle 群に比し、病態早期において有意に抑制された (図14a)。また、症状スコアについても、概ね同様の傾向を示した (図14b)。
[ペルフルオロオクタンズルホン酸(PFOS)]

図15に示すように、対照群である saline+vehicle 群では、皮膚炎の症状は惹起されなかった。Dp+vehicle 群では、3回目の Dp 投与後から皮膚炎症状が出現し、経時的に有意な増悪を認めた。一方、PFOS 曝露による耳介腫脹への影響は認めなかった (図15a)。また、症状スコア

アについても、概ね同様の傾向を示した (図15b)。
[4-ノニルフェノール(NP)]

図16に示すように、対照群である saline+vehicle 群では、皮膚炎の症状は惹起されなかった。Dp+vehicle 群では、3回目の Dp 投与後から皮膚炎症状が出現し、経時的に有意な増悪を認めた。一方、NP 1 mg/kg/day, 10 mg/kg/day 曝露群において、Dp+vehicle 群と比較し、耳介腫脹 (図16a)、および症状スコア (図16b) において増加傾向を示したが、有意な差はなかった。

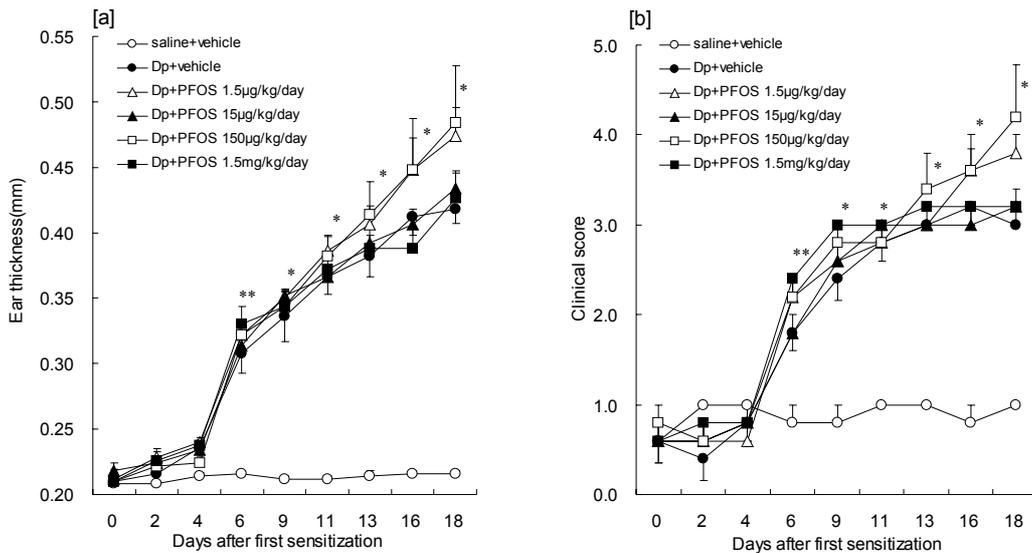


図15 PFOS 曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響

* ; p<0.05, Dp treated groups vs. saline+vehicle group
**; p<0.01, Dp treated groups vs. saline+vehicle group

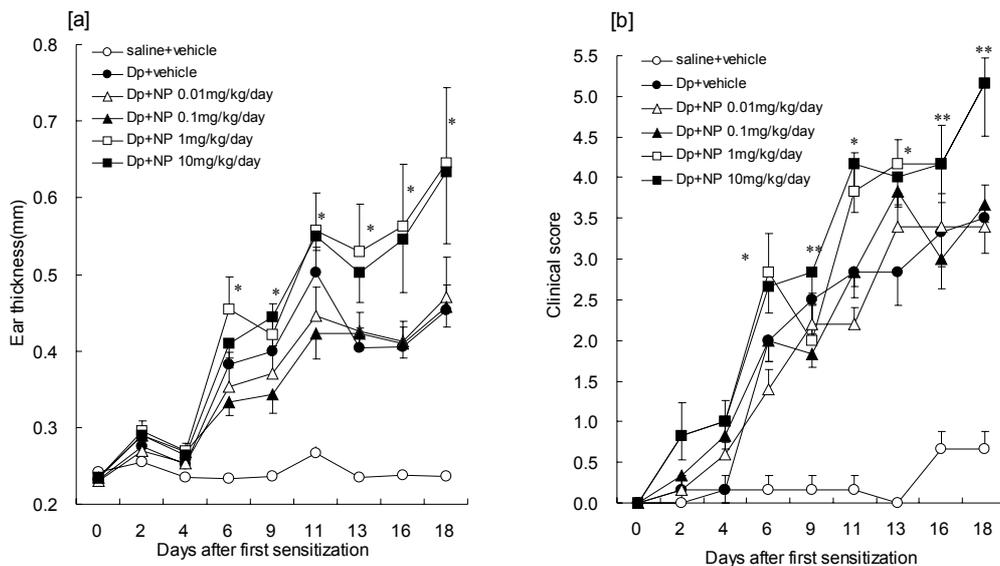
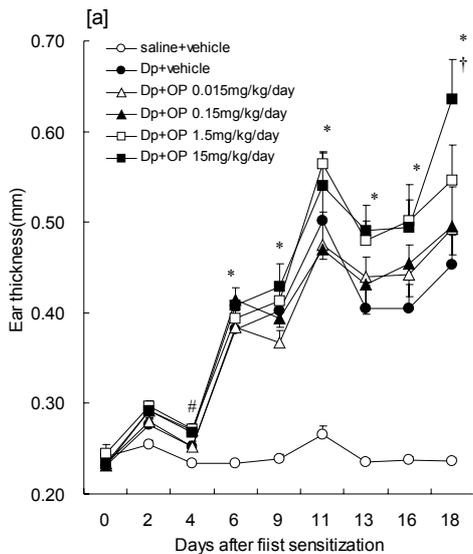


図16 NP 曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響

* ; p<0.05, Dp treated groups vs. saline+vehicle group, ** ; p<0.01, Dp treated groups vs. saline+vehicle group

[4-t-オクチルフェノール]

図17に示すように、対照群である saline+vehicle 群では、皮膚炎の症状は惹起されなかった。Dp+vehicle 群では、3回目の Dp 投与後から皮膚炎症状が出現し、経時的に有意な増悪を認めた。一方、OP 15 mg/kg/day 曝露群において、Dp 投与8回後の耳介腫脹 (図17a)、および症状スコアで、Dp+vehicle 群と比較し、有意な増悪を認めた(図17b)。また、OP 1.5 mg/kg/day 曝露群においても、耳介腫脹の増悪傾向を示したが、有意ではなかった。



[p-t-ブチルフェノール(BP)]

図18に示すように、対照群である saline+vehicle 群では、皮膚炎の症状は惹起されなかった。Dp+vehicle 群では、3回目の Dp 投与後から皮膚炎症状が出現し、経時的に有意な増悪を認めた。一方、BP 曝露群では、病態早期において、耳介厚 (図18a)、あるいは症状スコアが Dp+vehicle 群と比較し、有意な上昇を示し、病態完成期においても、BP 0.6-6 mg/kg/day 曝露群で増悪傾向を認めた (図18b)。

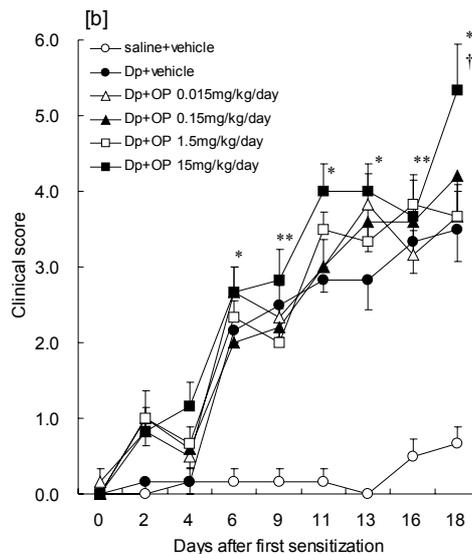


図17 OP 曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響

*; p<0.05, Dp treated groups vs. saline+vehicle group, **; p<0.01, Dp treated groups vs. saline+vehicle group
 #; p<0.05, Dp+OP 1.5 mg/kg/day group vs. Dp+vehicle group, †; p<0.05, Dp+OP 15 mg/kg/day group vs. Dp+vehicle group

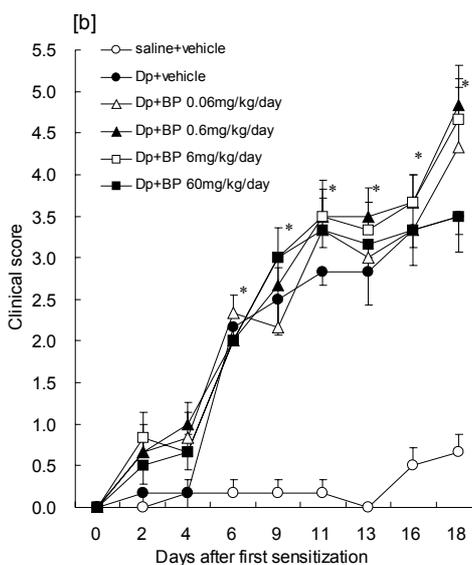
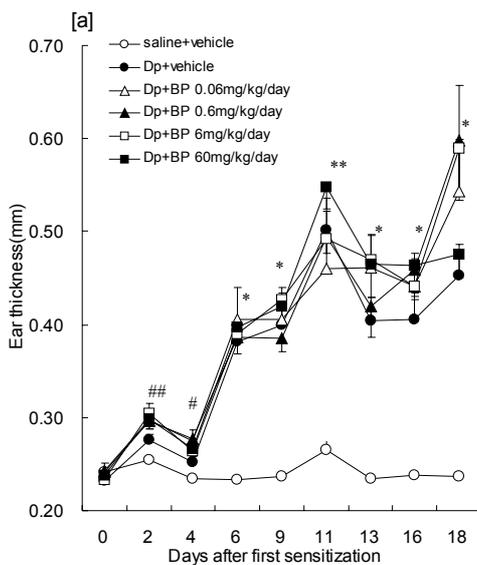


図18 BP 曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響

#; p<0.05, Dp+BP treated groups vs. saline+vehicle group, ##; p<0.01, Dp+BP treated groups vs. saline+vehicle group
 *; p<0.05, Dp treated groups vs. saline+vehicle group

4) 防汚剤のアレルギー増悪作用に関する検討

防汚剤の一種であるトリブチルスズ(TBT)は、1960年代半ばから船底塗料や漁網、木材、紙および住宅の塗装などの防汚剤として広く用いられてきた。欧米諸国や日本などでは、1980年代から部分的に使用規制が行われているが、未規制の国も存在する。TBTは、動物への蓄積性があり、野生動物への影響が懸念されている。その一方で、毒性影響に関する報告は少なく、動物を用いた短期実験では、免疫抑制に関与するという報告が数報あるのみである。ここでは、環境中における検出量が最も多く、毒性実験にも一般的に用いられている TBTC を選択した。

[塩化トリブチルスズ(TBTC)]

図19に示すように、対照群である saline+vehicle 群では、皮膚炎の症状は惹起されなかった。Dp+vehicle 群では、3回目の Dp 投与後から皮膚炎症状が出現し、経時的に有意な増悪を認めた。一方、TBTC による耳介腫脹への影響は認められなかった (図19a)。また、症状スコアについても、概ね同様の傾向を示した (図19b)。

5) 大気汚染物質のアレルギー増悪作用に関する検討

我々はこれまでに、大都市における大気汚染物質の主要成分である DEP がアレルギー性気管支喘息を増悪させることを明らかにしてきた。また、DEP に含有される環境化学物質である PQ, および NQ についても、アレルギー性気管支喘息の病態を増悪することを報告してい

る。一方、BaP も、コールタールや自動車の排気ガスなどに含まれる化学物質で、強い発ガン性を持つことが知られている。免疫・アレルギー系に関する報告は、アレルギー性鼻炎モデルで病態を増悪するなどの報告はあるが、皮膚炎については、コールタール処理したヒトの皮膚で DNA 付加体が増加するという報告があるのみで、アトピー性皮膚炎について検討した報告は皆無である。これより、これらの3物質を先導的に選択した。

[9,10-フェナントラキノン(PQ)]

図20に示すように、対照群である saline+vehicle 群では、皮膚炎の症状は惹起されなかった。Dp+vehicle 群では、3回目の Dp 投与後から皮膚炎症状が出現し、経時的に有意な増悪を認めた。PQ 12 ng/kg/day, および120 ng/kg/day 曝露群において、Dp+vehicle 群と比較し、3回目 Dp 投与後から有意な耳介腫脹の悪化を認めた。一方、PQ 1200 ng/kg/day 曝露群では、Dp+vehicle 群と比較し、増悪影響が減弱していた (図20a)。症状スコアについては、3回目の Dp 投与後において、Dp+vehicle 群と比し、PQ 12 ng/kg/day 曝露群で有意な上昇を認め、耳介腫脹と概ね同様の傾向を示した (図20b)。

[1,2-ナフトキノン(NQ)]

図21に示すように、対照群である saline+vehicle 群では、皮膚炎の症状は惹起されなかった。Dp+vehicle 群では、3回目の Dp 投与後から皮膚炎症状が出現し、経時的に有意な増悪を認めた。一方、NQ 0.9 ng/kg/day, 9 ng/kg/day, 90 ng/kg/day 曝露群において、Dp+vehicle

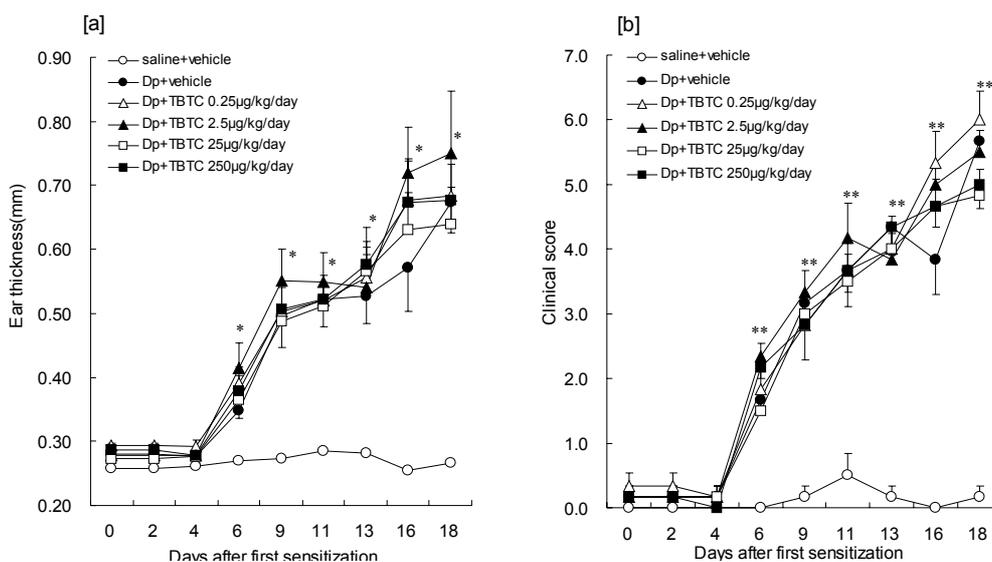


図19 TBTC曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響

* ; p<0.05, Dp treated groups vs. saline+vehicle group, ** ; p<0.01, Dp treated groups vs. saline+vehicle group

群と比較し、有意な耳介腫脹の悪化を認めた (図21a)。また、900 ng/kg/day 曝露群でも上昇傾向を認めたが、有意ではなかった。症状スコアは、Dp 投与3回目においてNQ 曝露群で有意な上昇を認め、耳介腫脹の結果と概ね同様の傾向を示した (図21b)。

[ベンゾピレン (BaP)]

図22に示すように、対照群である saline+vehicle 群では、皮膚炎の症状は惹起されなかった。Dp+vehicle 群

では、3回目の Dp 投与後から皮膚炎症状が出現し、経時的に有意な増悪を認めた。一方、BaP 2 μg/kg/day, および20 μg/kg/day 曝露群において、Dp+vehicle 群と比較し、有意な耳介厚 (図22a) と症状スコアの上昇を認めた (図22b)。一方、BaP 200 μg/kg/day, および2mg/kg/day 曝露群においても、Dp+vehicle 群と比較し、増悪傾向を示したが、低濃度曝露で認められた増悪影響は減弱していた。

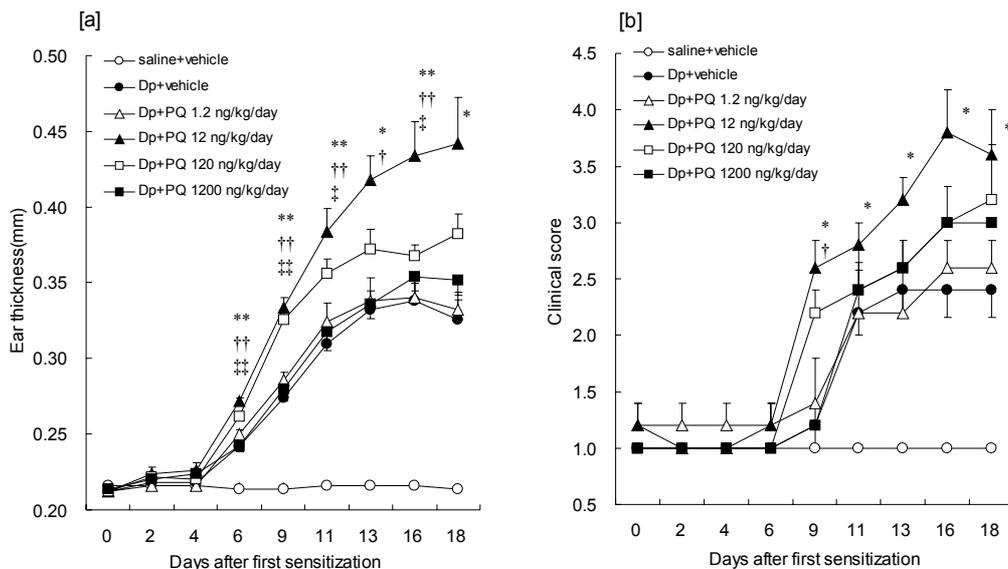


図20 PQ 曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響

*; p<0.05, Dp treated groups vs. saline+vehicle group, **; p<0.01, Dp treated groups vs. saline+vehicle group
 †; p<0.05, Dp+PQ 12 ng/kg/day group vs. Dp+vehicle group, ††; p<0.01, Dp+PQ 12 ng/kg/day group vs. Dp+vehicle group
 ‡; p<0.05, Dp+PQ 120 ng/kg/day group vs. Dp+vehicle group, ‡‡; p<0.01, Dp+PQ 120 ng/kg/day group vs. Dp+vehicle group

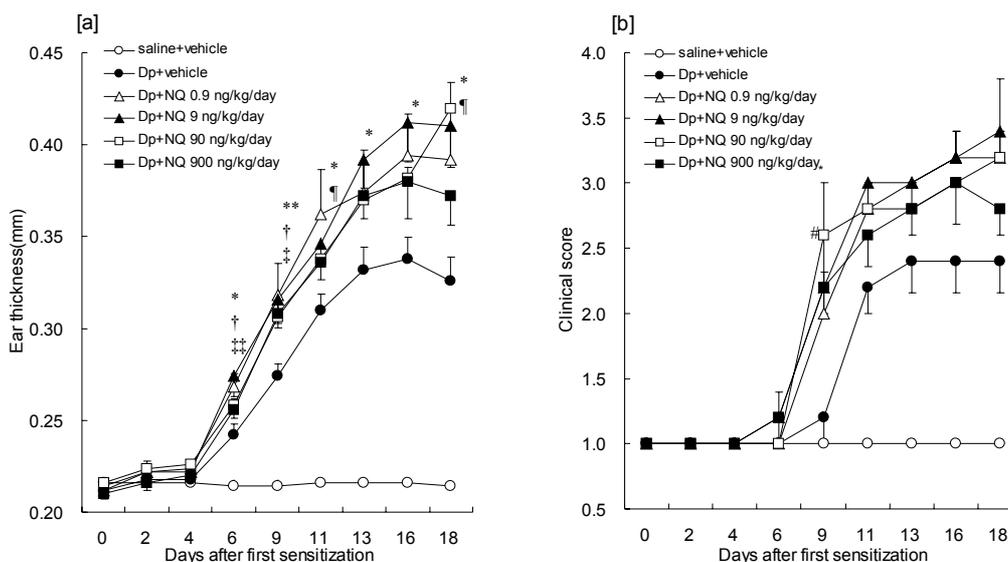


図21 NQ 曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響

*; p<0.05, Dp treated groups vs. saline+vehicle group, **; p<0.01, Dp treated groups vs. saline+vehicle group
 †; p<0.05, Dp+NQ 0.9 ng/kg/day group vs. Dp+vehicle group, ††; p<0.01, Dp+NQ 9 ng/kg/day group vs. Dp+vehicle group
 ‡; p<0.05, Dp+NQ 90 ng/kg/day group vs. Dp+vehicle group, ‡‡; p<0.01, Dp+NQ 90 ng/kg/day group vs. Dp+vehicle group

6) 食品に含まれる化学物質のアレルギー増悪作用に関する検討

食品に含まれる化学物質としては、食品添加物の生体影響に関する報告は散見される。中でも、アクリルアミド(AA)は、2002年4月、スウェーデン食品庁が、炭水化物を多く含む食材を高温で加熱して製造した食品（ポテトチップス、フライドポテト、ビスケットなど）に高濃度に含まれていると世界で初めて公表されて以来、健康への影響が懸念されている。動物実験では、神経毒性、発がん性、遺伝毒性、生殖・発生毒性を示すことが報告されている。一方、免疫・アレルギー系に関する報告は、

接触性皮膚炎に関する検討のみで、アトピー性皮膚炎について検討した報告はない。これより、AA を選択することとした。

[アクリルアミド(AA)]

図23に示すように、対照群である saline+vehicle 群では、皮膚炎の症状は惹起されなかった。Dp+vehicle 群では、3回目の Dp 投与後から皮膚炎症状が出現し、経時的に有意な増悪を認めた。一方、AA 2 mg/kg/day 曝露群において、Dp+vehicle 群と比較し、有意な耳介厚(図23a)と症状スコアの抑制を認めた(図23b)。

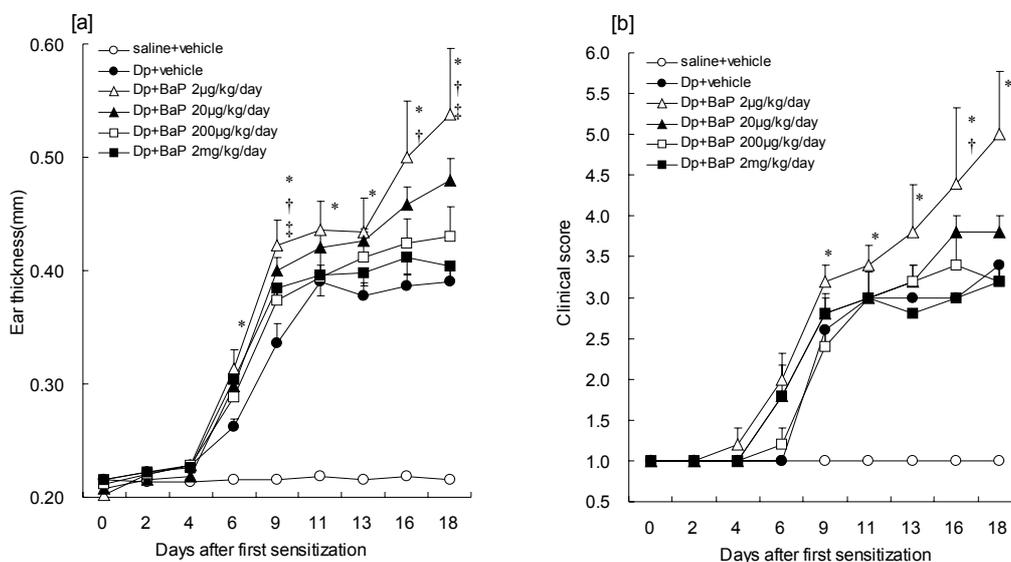


図22 BaP 曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響

*; $p < 0.05$, Dp treated groups vs. saline+vehicle group, †; $p < 0.05$, Dp+BaP 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ group vs. Dp+vehicle group
‡; $p < 0.05$, Dp+BaP 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ group vs. Dp+vehicle group

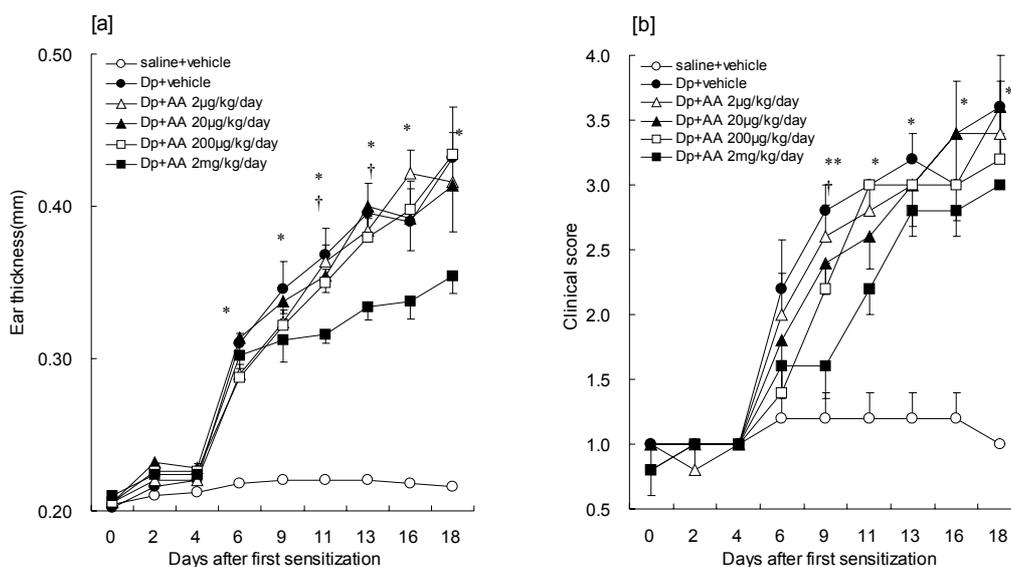


図23 AA 曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響

*; $p < 0.05$, Dp treated groups vs. saline+vehicle group, **; $p < 0.01$, Dp treated groups vs. saline+vehicle group
†; $p < 0.05$, Dp+AA 2 mg/kg/day group vs. Dp+vehicle group

7) 接着剤原料のアレルギー増悪作用に関する検討

フタル酸ジブチル (DBP) は、接着剤、インク、セロハン、殺虫剤の製造などに用いられている。DBP の生体影響については、これまでに、高用量曝露で生殖・発生毒性を示すことが報告されている。免疫・アレルギー系に関しては、DBP 曝露がアジュバント作用を示すという報告や、皮膚炎への影響を示唆する報告もあることから、本物質を先導的に選択した。

[フタル酸ジブチル(DBP)]

図24に示すように、対照群である saline+vehicle 群では、皮膚炎の症状は惹起されなかった。Dp+vehicle 群では、3回目の Dp 投与後から皮膚炎症状が出現し、経時的に有意な増悪を認めた。一方、DBP 0.5 mg/kg/day、および5 mg/kg/day 曝露群において、Dp+vehicle 群と比較し、耳介腫脹の増悪傾向を認めたが、有意ではなかった (図24a)。また、症状スコアは、Dp 処置群で有意に症状が悪化したが、DBP 曝露による影響は認めなかった (図24b)。

8) 化粧品・香料などに含まれる溶媒のアレルギー増悪作用に関する検討

化粧品・香料は、直接皮膚に接触する化学物質であるため、皮膚や皮膚炎への影響が懸念される。可塑剤をはじめ、香料の保留剤としても用いられているフタル酸ジエチルは、一般毒性、あるいは生殖・発生毒性も認められ、職業曝露による影響も懸念されているが、免疫・アレル

ギー系に対する影響についての報告はほとんどない。これより、本物質を選択することとした。

[フタル酸ジエチル(DEPH)]

図25に示すように、対照群である saline+vehicle 群では、皮膚炎の症状は惹起されなかった。Dp+vehicle 群では、3回目の Dp 投与後から皮膚炎症状が出現し、経時的に有意な増悪を認めた。一方、DEPH 曝露による影響は認められなかった。

2.2 アレルギー増悪影響のより簡易なスクリーニング手法の開発に関する研究 (サブテーマ2)

前出の *in vivo* スクリーニングモデルも、約3週間という比較的短期間でアレルギー増悪影響の判定が可能であるが、本サブテーマでは、より短期、あるいは、簡便に評価が可能なシステムの開発を目指した。また、同時に、汎用性の高いスクリーニングシステムの開発も心懸けた (図26)。

2.2.1 DNA マイクロアレイを用いた短期スクリーニング手法の開発に関する研究

第一に、DNA マイクロアレイを用いた短期スクリーニング手法の開発について検討した。我々は、既に、化学物質の集合体とも言えるディーゼル排気微粒子 (DEP) によるアレルギー性喘息増悪影響を明らかにしているが、この増悪作用における遺伝子の発現変化を、網羅的、かつ、経時的に解析した。その結果、病態潜在

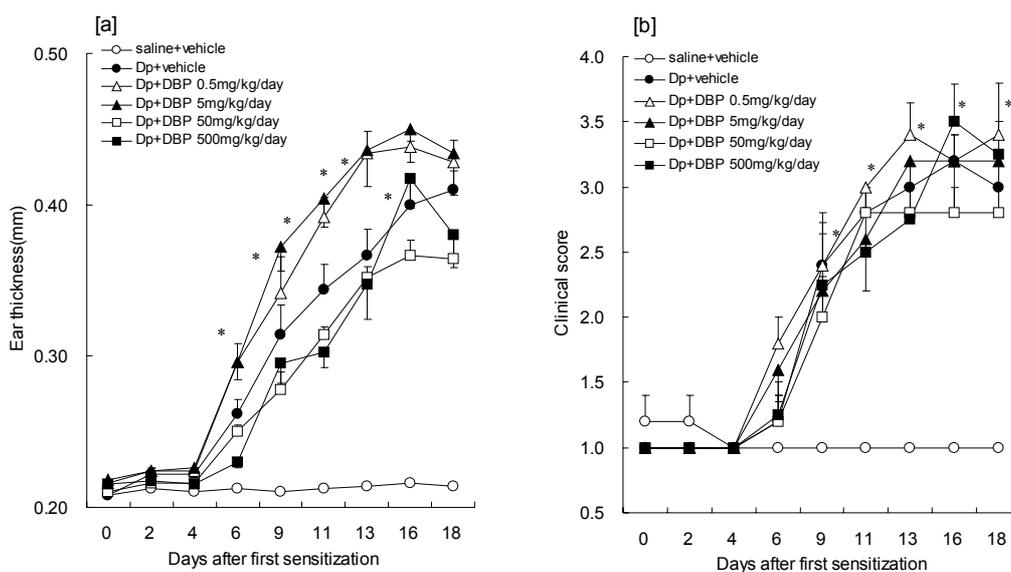


図24 DBP 曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響

*; p<0.05, Dp treated groups vs. saline+vehicle group

期, 早期, 進行早期, 完成期と病態の進行に伴い, より多数の遺伝子が発現変動することを見出した。また, 病態の潜在期や早期から完成期に至るまで, 継続して顕著な発現変動を示す遺伝子が存在することも明らかにした。これより, 本課題における *in vivo* スクリーニングモデルにおいても, 病態の各形成段階における遺伝子発現変動を, DNA マイクロアレイを用いて解析することにより, アトピー性皮膚炎を含むアレルギー疾患の病態増悪をより早期に予知するシステムの構築が可能か否かを, 早期変動遺伝子の発現に着目して検討した。

プロトコルを図27に示す。7週齢の NC/Nga 雄性マウス (20-23g) を3群に分けた。第1群には, アレルゲン溶解のために用いた生理食塩水を10 μL 右耳介腹側に皮内投与した (saline+vehicle)。第2, および3群は, Dp

を, 1回あたり5 μg (10 μL , 0.5 mg/mL) 投与した。Dp あるいは生理食塩水は, 1, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17日目に, 計8回, 投与を行った。また, 化学物質についてはアトピー性皮膚炎増悪作用を有する DEHP を選択し, 第1群, および第2群には, 溶解に用いたオリーブオイルを, 第3群には DEHP を120 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の濃度で調製し, 腹腔内に投与した。この濃度は, 過去の我々の検討で, アトピー性皮膚に対する増悪影響が認められている濃度である。尚, DEHP は, -5, 2, 9, 16日目に, 100 μL を, 計4回, 腹腔内に投与した。

皮膚炎症状の評価は, 2-2-1に記した方法と同様に行った。Dp 投与1(1st), 5(2nd), 10(3rd), 17日目(4th)の4時間後, エーテル麻酔下に屠殺し, 耳介組織を採取した。抽出した組織から, RNeasy Fibrous Tissue Mini kit

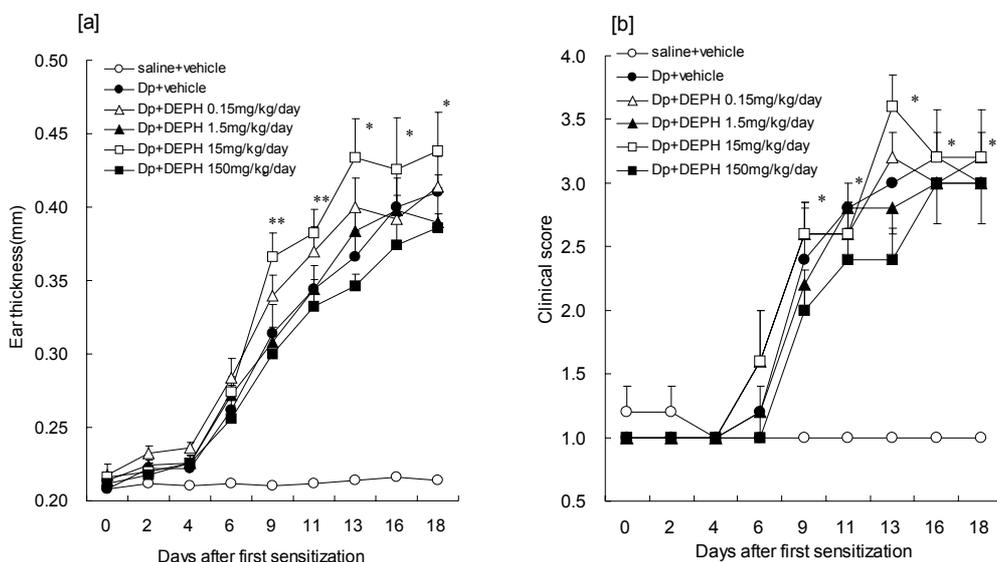


図25 DEHP 曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響

* ; $p < 0.05$, Dp treated groups vs. saline+vehicle group, ** ; $p < 0.01$, Dp treated groups vs. saline+vehicle group

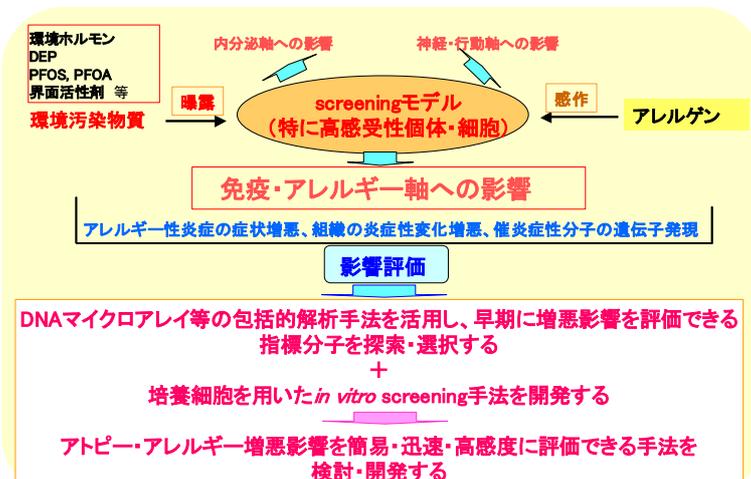


図26 アトピー・アレルギー増悪影響をより簡易・迅速に評価する手法の開発

(QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。実験は各群4匹で行い、各個体から抽出した total RNA を等量ずつ混合し、1サンプルとして解析に用いた。cDNA 合成、cRNA 増幅、Hybridization、Scan は Affymetrix 社で推奨するプロトコールに従った。アレイは、Affymetrix 社製の Gene Chip Mouse Expression Array 430A (Mouse 430A) を用いた。蛍光検出には、Affymetrix GeneChip Scanner 3000、解析ソフトは Affymetrix Microarray Suite 5.1、GeneSpring を使用した。蛍光強度を補正した後、チップ間の比較解析を行った。対照群と比較し、2倍以上、あるいは1/2以下に発現変動を示した遺伝子を抽出した。また、発現変動を示した遺伝子の機能解析は Affymetrix の NetAffx Analysis を用いた (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>)。

まず、本 *in vivo* スクリーニングモデルにおいて、各病態形成段階で、病変局所である耳介組織の遺伝子発現解析を行った。その結果、対照群 (saline+vehicle 群)

と比較し、各病態の形成段階において、2倍以上の発現上昇を示した遺伝子が、Dp+vehicle 群では、115、156、1492、1636遺伝子、Dp+DEHP 群では、182、292、1469、760遺伝子、1/2以下に発現が抑制された遺伝子が、49、718、3434、3346遺伝子、62、173、3644、3252遺伝子存在した (表1)。これより、早期より変動する遺伝子が存在すること、かつ、病態の進行に従い、遺伝子数が増加する傾向が示された。しかし、両群における発現遺伝子数に明確な差はなかった。一方、Dp+DEHP 群において、病態潜在期 (1st) から完成期 (4th) に渡り、継続的な発現変動を認めた遺伝子は8遺伝子存在し、serum amyloid A3、radical S-adenosyl methionine domain containing 2、immunoresponsive gene 1、chemokine (C-X-C motif) ligand 4などが含まれていた (表2)。これらは、その後の病態進行に関わる早期変動遺伝子として注目される。ただし、今回の解析においては、病態進行期および病態完成期における蛍光強度が全体に低く、そ

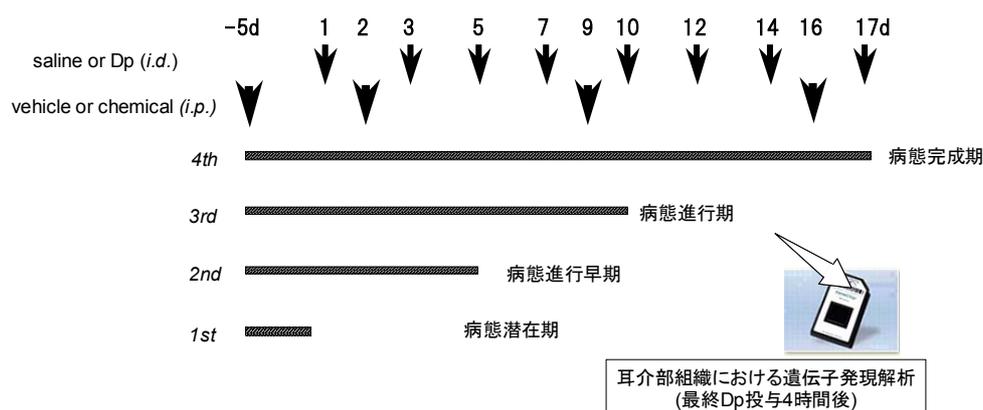


図27 DEHP およびアレルゲンの投与スケジュール

表1 ダニアレルゲン誘発性アトピー性皮膚炎モデルにおける各病態形成段階の病変局所において DEHP 曝露が遺伝子発現変動に及ぼす影響

up (2.0<)				
Group	1st	2nd	3rd	4th
Dp+DEHP vs. S+V	182	292	1469	760
Dp+V vs. S+V	115	156	1492	1636
Dp+DEHP vs. Dp+V	39	87	66	183
down (<0.5)				
	1st	2nd	3rd	4th
Dp+DEHP vs. S+V	62	173	3644	3252
Dp+V vs. S+V	49	718	3434	3346
Dp+DEHP vs. Dp+V	31	108	36	820

れ自体のデータの精度に加え、病態潜在期、および病態早期との比較解析という観点からも若干の問題が残った。さらに、2回目の実験、解析では、病態進行期、および完成期のサンプルにおいて、cRNAの十分な増幅が得られなかった。この原因としては、耳介組織のRNAの分解がかなり進んでいることが考えられた。分解が進む要因として、一つには、皮膚組織自体がRNaseのコンタミネーションを受けやすいことが考えられる。もう一つの理由として、本病態モデルでは、病変局所に顕著な好酸球浸潤が観察されるが、好酸球自体がRNase-richな細胞であることが、RNA分解に大きく寄与していると考えられた。実際、後述の顎下リンパ節組織を用いた遺伝子発現解析では、eosinophil-associated, ribonuclease A familyがアレルギー処置群で顕著に発現上昇していることを確認している。尚、病態潜在期、および早期の段階では、RNAの分解も顕著ではなく、cRNAの増幅についても問題はなかった。

一方、我々は、DEPの経気道曝露によるアレルギー性気管支喘息増悪モデルを用いた経時的遺伝子発現解析の

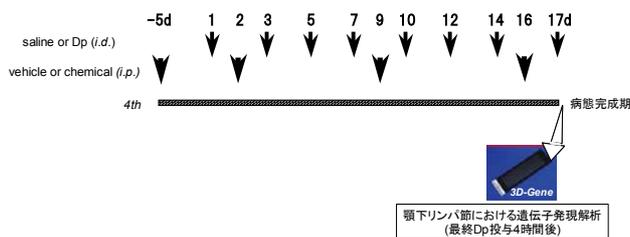


図28 DEHP およびアレルギーの投与スケジュール (病態完成期)

結果等を参考に、変動の著しい遺伝子を選抜して指標として用いることにより、環境化学物質のアレルギー増悪作用をより短期間で予知することを可能とするDNAチップを開発した(他予算による研究を含む)。これには、429遺伝子のプローブがduplicateで搭載されている。本カスタムDNAチップを用い、より汎用性の高いスクリーニング手法の可能性を検討した。アトピー性皮膚炎を用いたin vivoスクリーニングモデルにおいて、顎下リンパ節組織における遺伝子発現の解析を試みた。上述と同様の皮膚炎モデルのプロトコールに従い、最終Dp投与17日目(8回)の4時間後、顎下リンパ節組織を採取した(図28)。抽出した組織から、RNeasy Lipid Tissue Mini kit (QIAGEN)を用いてtotal RNAを抽出した。実験は各群4匹で行い、各個体から抽出したtotal RNAを等量ずつ混合し、1サンプルとして解析に用いた。メーカー推奨のプロトコールに従い、cDNA合成、aRNA増幅、Hybridization、およびScanを行った。対照群との比較は2色法(Cy3, Cy5)を用いた。得られた蛍光強度は、グローバルノーマライゼーション法により補正し、対照群に対して2倍以上、あるいは1/2以下に発現変動を示した遺伝子を抽出した。プローブはduplicateで搭載されているため、2スポットのシグナル比の平均値を比較した。また、発現変動を示した遺伝子の機能解析はAffymetrixのNetAffx Analysisを用いた(<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>)。

その結果、対照群(saline+vehicle群)に対して有意な発現上昇(2倍以上)を示した遺伝子数はDp+vehicle

表2 ダニアレルギー誘発性アトピー性皮膚炎モデルに対して、DEHP曝露が病態形成の各段階における遺伝子発現変動に及ぼす影響(Dp+DEHP group vs. saline+vehicle group)

Probe ID	Gene title	Gene Symbol	Signal log ratio (saline+vehicle)			
			1st	2nd	3rd	4th
1421009_at	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	Rsad2	34.30	6.06	7.46	13.93
1421578_at	chemokine (C-C motif) ligand 4	Ccl4	4.59	8.57	16.00	64.00
1425065_at	2'-5' oligoadenylate synthetase 2	Oas2	2.30	4.59	13.93	13.93
1427381_at	immunoresponse gene 1	Irg1	13.00	39.40	362.04	362.04
1436058_at	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	Rsad2	17.15	7.46	13.00	24.25
1438855_x_at	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	Tnfaip2	2.00	2.14	4.92	6.50
1450826_a_at	serum amyloid A 3	Saa3	4.59	9.85	64.00	27.86
1451567_a_at	interferon activated gene 203	Ifi203	2.83	2.64	6.96	19.70
1418142_at	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	Kcnj8	0.47	0.50	0.23	0.29
1418701_at	catechol-O-methyltransferase	Comt	0.50	0.50	0.18	0.05

群で42遺伝子, Dp+DEHP群で50遺伝子であった(表3)。一方, 発現抑制(1/2以下)を示した遺伝子数は, Dp+vehicle群で16遺伝子, Dp+DEHP群で15遺伝子であり, 両群における発現上昇遺伝子数には, 顕著ではないが相違が認められた。また, Dp+DEHP群において, 顕著な発現上昇を示す遺伝子には, chemokine (C-C motif) ligand 24, immunoglobulin heavy chain 4 (serum IgG1), arginase 1, liver, eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 11, serum amyloid A3などが含まれていた(データ未表示)。特に, serum amyloid A3は, 我々が開発した *in vivo* スクリーニングモデル(皮膚炎モデル)における耳介組織や, DEP曝露したアレルギー性気道炎症モデルの肺局所においても, 病態潜在期から継続して発現変動が認められた遺伝子の一つであった。このことから, 顎下リンパ節組織においても, 病態の潜在期, あるいは早期に変動を示している可能性も充分考慮しうる。環境化学物質のアレルギー病態への影響を早期に予知するという観点からは, 病態潜在期, あるいは病態早期に変動する指標を利用することが望ましい。この意味で, タンパク発現に先行する遺伝子の発現を検討することはきわめて有望なツールと考えられる。我々が開発した *in vivo* スクリーニングモデルにおいて, 顎下リンパ節組織や耳介等において今回指摘された早期発現変動遺伝子を検討することは, 当該モデルの短期化に有用であることが示唆された。

一方, こうした動物実験や DNA マイクロアレイ解析の実施は, 一定規模以上の試験・研究施設に限られ, 多数の物質を対象とするには限界がある。このため, より多くの施設で, より多くの対象化学物質の影響評価が可能な汎用性の高い手法として, 次に, 細胞培養系を用いた簡易スクリーニング手法の開発を試みた。

2.2.2 培養細胞系を用いた簡易スクリーニング手法の開発に関する研究

研究所や一定規模以上の試験所・施設においては, 実

験動物を用い, 実際の病態をよく反映する影響評価や DNA マイクロアレイを用いたスクリーニング手法を実施することが可能である。しかし, より多くの施設でより多くの対象物質の影響評価が可能な汎用性の高い手法としては, 培養細胞系を用いた簡易スクリーニング手法が適当な候補となることと考えやすい。本サブテーマの第二の小テーマとして, 免疫・アレルギー反応に深く関わる樹状細胞, 脾細胞, リンパ球の単独, あるいは, 複合培養系を用い, 環境化学物質の影響を *in vitro* で評価することが可能か否か, また, *in vivo* スクリーニング結果をよく反映する *in vitro* スクリーニング手法の開発が可能か否か検討し, その簡便性, 普及性を含め, 総合的に有用性を検討した。

対象環境化学物質としては, *in vivo* でアレルギー性気道炎症(気管支喘息)あるいはアトピー性皮膚炎(*in vivo* スクリーニングモデル)の増悪が認められている DEHP および DINP, BPA, DEP 等を先導的に選択し, 細胞表面分子やサイトカイン・ケモカイン産生, 抗原提示機能等に及ぼす影響について詳細に検討した。評価項目一覧を表4, 5に示す。

1) マウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を用いた環境化学物質の *in vitro* 影響評価に関する研究

アトピー素因をもつ NC/Nga 雄性マウス(11-15週齢)の大腿骨より骨髄を採取し, 骨髄細胞 (4×10^5 cells/ml) を, 20 ng/ml リコンビナントマウス GM-CSF [granulocyte macrophage colony stimulating factor] を含む RPMI-1640培地(10%非働化ウシ胎児血清, 100 U/ml ペニシリン, 100µg/ml ストレプトマイシン, 50 µM 2-メルカプトエタノール含有)中で8日間培養した。培養の間は, 3日目に等量の培地を加え, 6日目に半量の培地を新しい培地と交換し, 8日目に浮遊細胞と弱い接着細胞を未熟・成熟 BMDC として回収した。DEHP および DINP, BPA は, DMSO に溶解し, 培地で希釈した後, 超音波処理(output 5, duty 20, 3分間)により分散させ

表3 DEHP 曝露が炎症局所(耳介組織)の発現遺伝子数の変動に及ぼす影響

Group	Signal ratio (vs. vehicle group)					
	2<	4<	8<	<1/2	<1/4	<1/8
Dp+V	42	15	7	15	1	0
Dp+DEHP 20 µg/body	50	16	8	16	0	0

た。環境化学物質が BMDC の活性化に及ぼす影響については、Day8の分化誘導後の BMDC (1×10⁶ cells/ml) を、GM-CSF (10 ng/ml) の存在下で、0.1-100 μM の DEHP または DINP, BPA (0.1% DMSO 含有) に24時間曝露した。曝露後、培養上清と細胞を回収し、各測定を実施した。環境化学物質が BMDC の分化・成熟に及ぼす影響については、骨髓細胞の培養0日目から6日目まで、GM-CSF (10

ng/ml) の存在下で、0.1-10 μM の DEHP または DINP, BPA (0.1% DMSO 含有) に曝露した。曝露後、培養上清と細胞を回収し、各測定を実施した。プロトコールを図29に示す。

まず、BMDC の phenotype の変化について検討した。分化・成熟・活性化レベルの指標として、抗原提示に関わる細胞表面分子である MHC class II と補助刺激分子

表4 マウス骨髓由来樹状細胞 (BMDC) を用いた環境化学物質の *in vitro* 影響評価項目

細胞	評価項目	
骨髓由来樹状細胞 (BMDC)	細胞表面分子の発現	
	MHC class II	抗原提示に関わる抗原提示細胞表面分子
	CD80 (B7.1)	
	CD86 (B7.2)	
	CD11c	樹状細胞活性化マーカー
	DEC205	
	サイトカイン, ケモカイン産生	
	TARC	樹状細胞の活性化に関わるケモカイン
	MDC	
	IL-12	
	IL-6	Th2サイトカイン
	IL-10	IFN-γ 誘導因子
	IL-18	
	T 細胞との混合培養系	
	特異的抗原提示機能	T 細胞増殖刺激活性
	アロ混合リンパ球反応 (MLR)	
	IFN-γ	Th1サイトカイン
	IL-17	Th2サイトカイン
	IL-4	
IL-6		
IL-10		
IL-18	IFN-γ 誘導因子	

表5 リンパ球を用いた環境化学物質の *in vitro* 影響評価項目

細胞	評価項目	
マウス脾細胞	T 細胞表面分子の発現	
	TCR	抗原提示に関わる T 細胞表面分子
	CD28	
	IL-4R	IL-4レセプター
	CD3	T 細胞マーカー
	抗原提示細胞表面分子の発現	
	MHC class II	抗原提示に関わる抗原提示細胞表面分子
	CD80 (B7.1)	
	CD86 (B7.2)	
	CD19	B 細胞マーカー
	F4/80	マクロファージマーカー
	DEC205	樹状細胞活性化マーカー
	サイトカイン, 抗体産生	
	IL-4	Th2サイトカイン
IgE	アレルギー関連抗体	
T 細胞 マウス脾臓 T 細胞 又は ヒト T 細胞株 (Jurkat)	細胞表面分子の発現	
	TCR	抗原提示に関わる T 細胞表面分子
	IL-4R	IL-4レセプター
	IFN-γR	IFN-γ レセプター
	CD69	リンパ球活性化マーカー
	CD154	T 細胞活性化マーカー
CD279 (PD-1)		
IL-4	Th2サイトカイン	

(CD80, CD86) および樹状細胞マーカー (CD11c, DEC205) の発現をフローサイトメトリーにより測定した。その結果, DEHP は, 10 μ M において, 分化誘導後の BMDC (day8) の CD80, CD86, DEC205 の発現を増加させる傾向がみられたが有意な変化ではなかった。これに対し, DEHP は, 分化・成熟段階の細胞 (day0-6) の MHC class II と CD86, CD11c, DEC205

の発現の有意な増加または増加傾向を誘導した (図30)。DINP は, 分化誘導後の BMDC の CD80, CD86 の発現の有意な増加および CD11c, DEC205 の発現の増加傾向を認め (図31), 分化・成熟段階の細胞に対しても, CD86, CD11c, DEC205 の発現を有意に増加させた (図32)。BPA は, 分化誘導後の BMDC においては DEC205 のみ, 分化・成熟段階の細胞においては MHC class II と CD86,

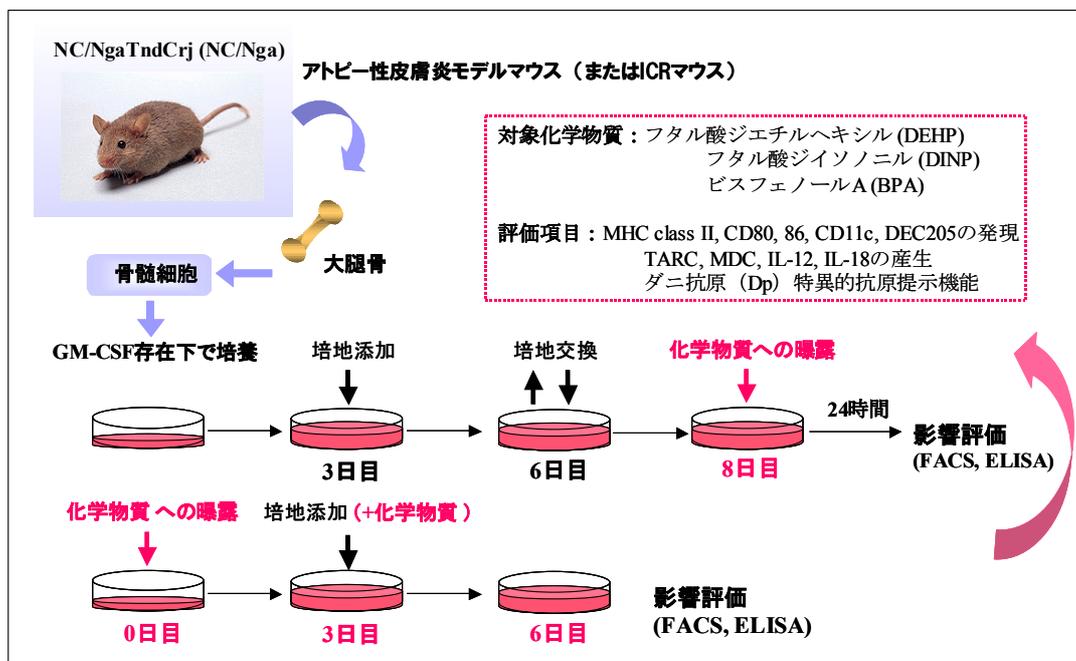


図29 マウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) の分化誘導および環境化学物質の影響評価方法

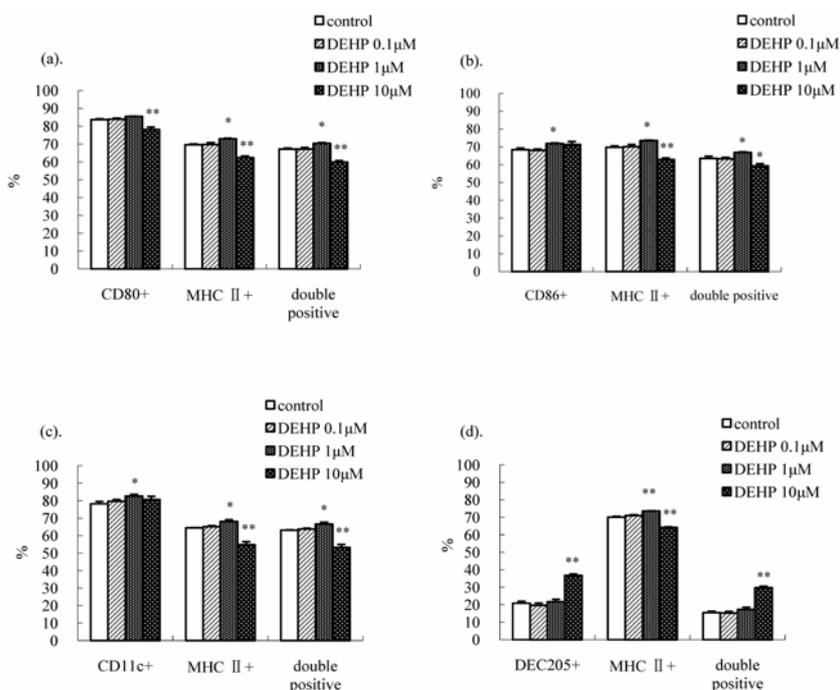


図30 DEHP が NC/Nga マウス BMDC の分化・成熟に及ぼす影響

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control

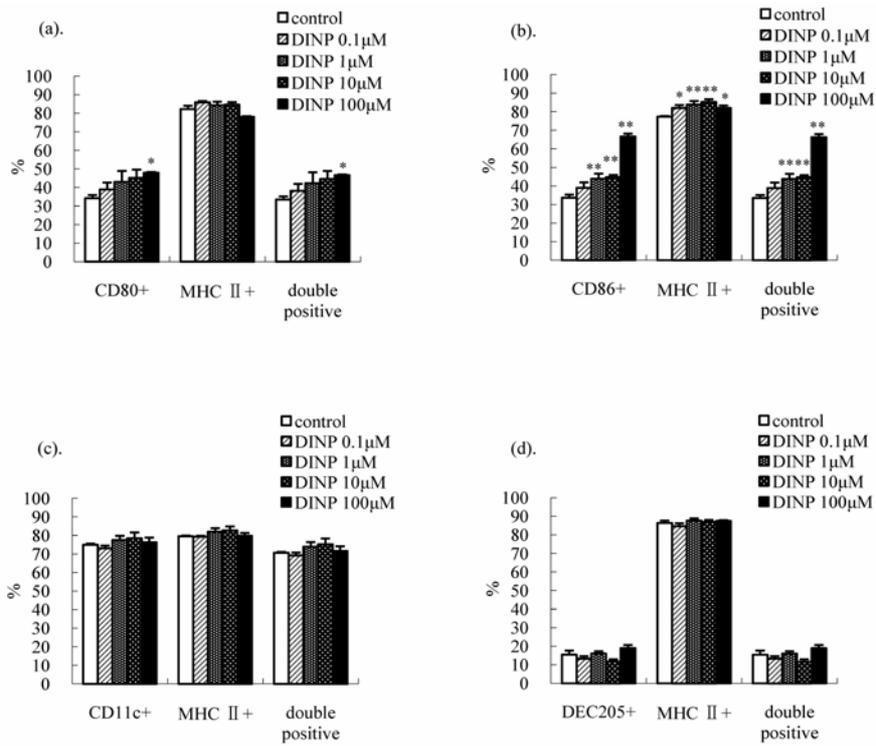


図31 D1NP が NC/Nga マウスの分化誘導後の BMDC の活性化に及ぼす影響

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control

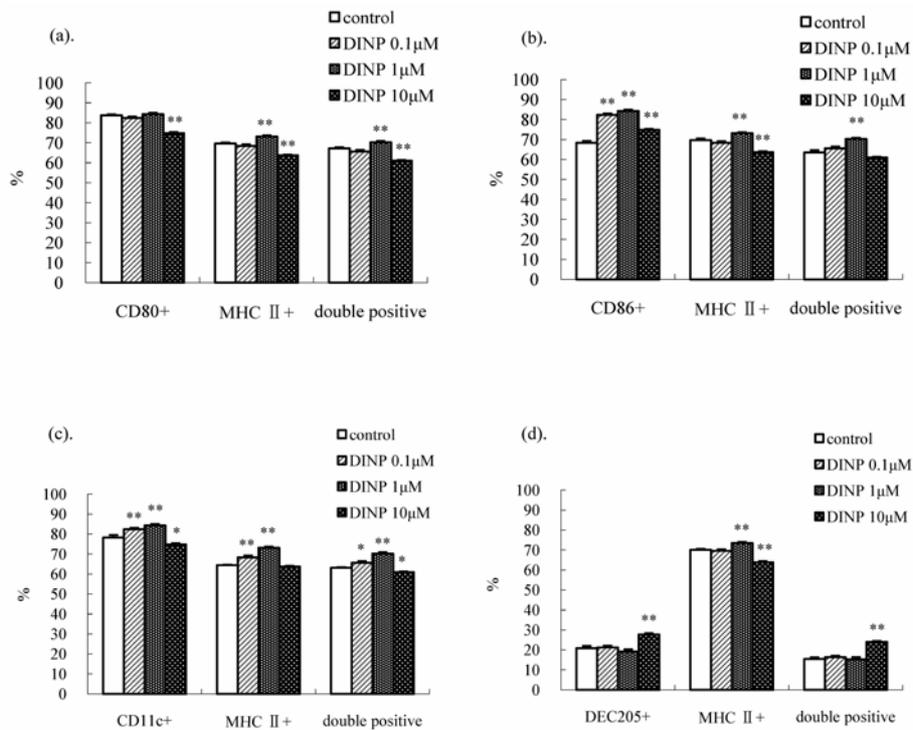


図32 D1NP が NC/Nga マウス BMDC の分化・成熟に及ぼす影響

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control

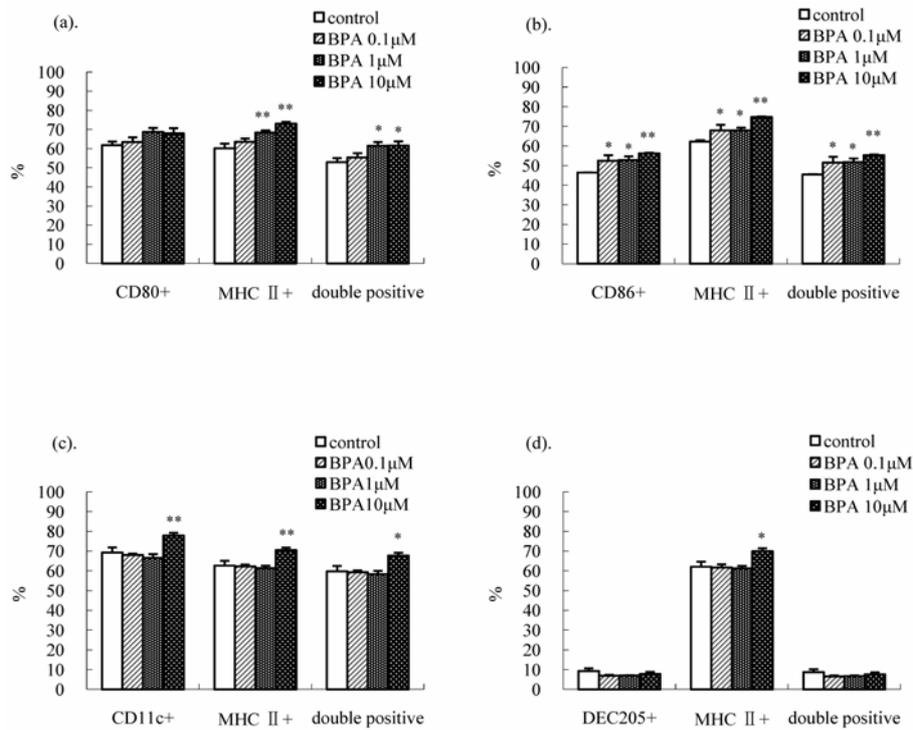


図33 BPAがNC/NgaマウスBMDCの分化・成熟に及ぼす影響

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control

CD11cの発現を有意に増加させた(図33)。

次に、BMDCの抗原提示機能について検討した。抗原提示機能は、Dp特異的なT細胞の増殖反応を指標として測定した。この際、BMDCは、細胞増殖を阻害するため、50 μg/mlマイトマイシンCで37°C、20分間処理したものを使用した。実験の2週間前に、水酸化アルミニウムゲル(1 mg)とDp(50 μg)を含む生理食塩水溶液100 μlをNC/Ngaマウスに腹腔内投与し、このDp感作マウスより脾細胞を採取し、ナイロンファイバーカラムを用いてT細胞を分離した。T細胞(1×10^6 /ml)とBMDC(T細胞数に対して1.25または2.5, 5%)は、Dp(10 μg/ml)を含む培地中で、4日間混合培養した。培養終了後、上清を回収し、Th1サイトカイン(IFN- γ , IL-17), Th2サイトカイン(IL-4, IL-6, IL-10, IL-18)含有量をELISAにより定量した。細胞増殖は、Cell-proliferation ELISA, BrdU(calorimetric) kitを用いて、BrdUの取り込み量をELISAで測定することにより定量した。

DEHPおよびBPAは、分化誘導後のBMDCの抗原提示機能に対して、部分的に増加させる傾向がみられたものの有意差は認められなかった。DINPは、分化誘導後のBMDCの抗原提示機能を有意に増加させた(図34a)。

また、DEHPでは観察されなかったが、DINPはIFN- γ とIL-4の産生を(図34b)、BPAはIL-4産生を有意に増加させた。一方、分化・成熟段階での環境化学物質への曝露がBMDCの抗原提示機能に及ぼす影響については、DEHP(図35a)およびDINP(図36a)、BPA(図37a)いずれにおいても有意な増加が観察された。また、IFN- γ やIL-4を含むTh1/Th2サイトカインの産生増加が観察された(図35b, 36b, 37b)。これより、NC/Ngaマウスにおいて、DEHPとBPAは、分化誘導後のBMDCの活性化よりも分化・成熟を促進する作用を持ち、DINPは、BMDCの分化・成熟・活性化のいずれの段階も促進する作用を持つことが明らかとなった。

さらに、NC/Ngaマウスと同様に、ICR雄性マウス(11-15週齢)の骨髄細胞をGM-CSFを含む培地中で8日間培養することによりBMDCを誘導した。この分化誘導後のBMDCをDEHPまたはDINP、BPA(0.1% DMSO含有)に24時間曝露し、細胞表面分子の発現をフローサイトメーターにより測定した。その結果、DEHPおよびDINPは、BMDCのMHC class IIおよびCD80, DEC205の発現に対する増加傾向とCD86の発現に対する有意な増加を誘導した。一方、BPA曝露は、最高濃度においてBMDCのMHC class IIとDEC205の発現を抑制

したが、CD80およびCD86の発現を増加させる傾向が観察された。

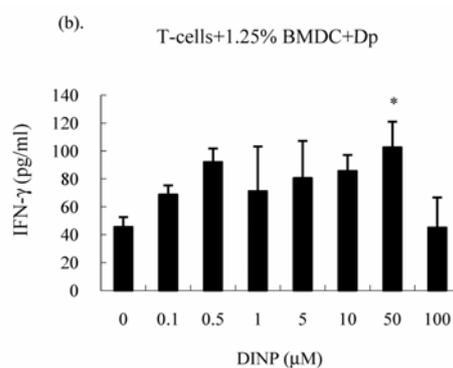
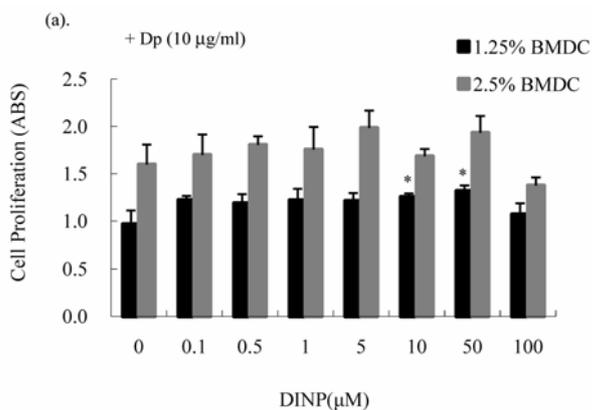


図34 DINP が NC/Nga マウスの分化誘導後の BMDC の Dp 特異的抗原提示機能とサイトカイン産生に及ぼす影響
*p<0.05, **p<0.01 vs. controlo

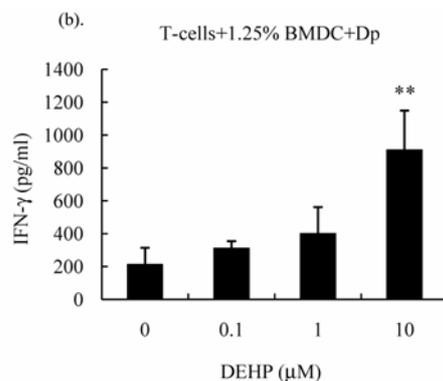
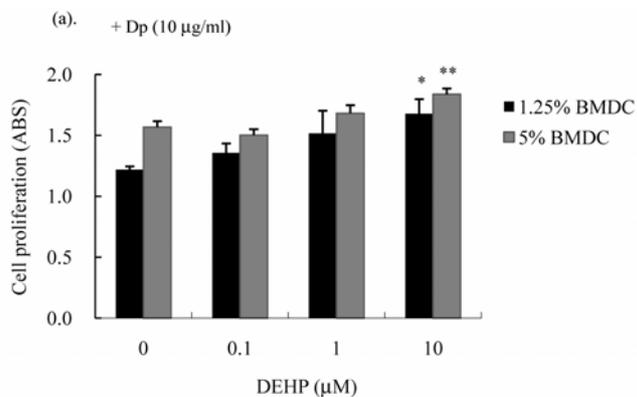
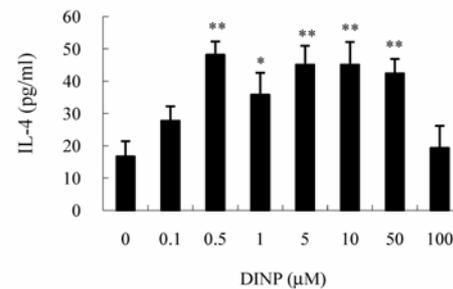
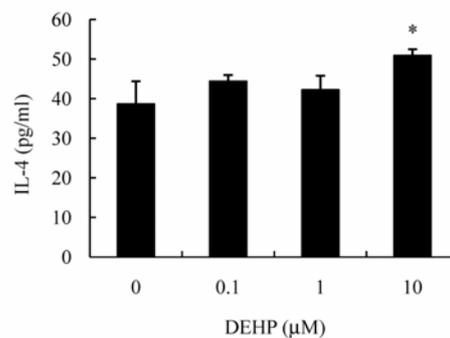


図35 DEHP 存在下で誘導した NC/Nga マウス BMDC の Dp 特異的抗原提示機能およびサイトカイン産生
*p<0.05, **p<0.01 vs. control



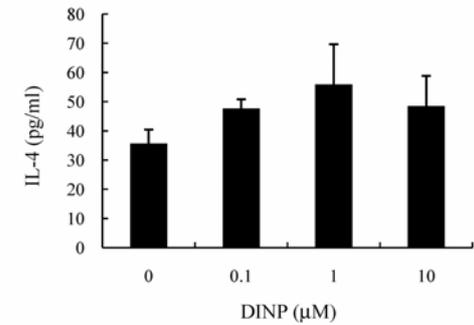
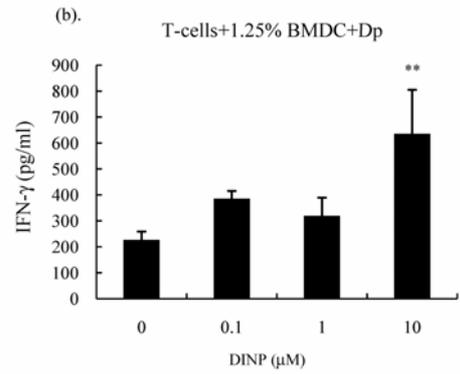
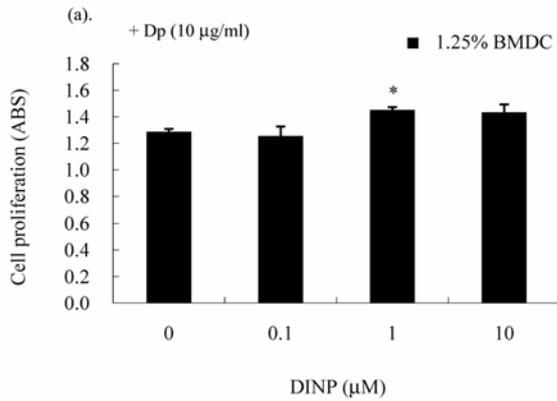


図36 DINP 存在下で誘導した NC/Nga マウス BMDC の Dp 特異的抗原提示機能およびサイトカイン産生
*p<0.05, **p<0.01 vs. control

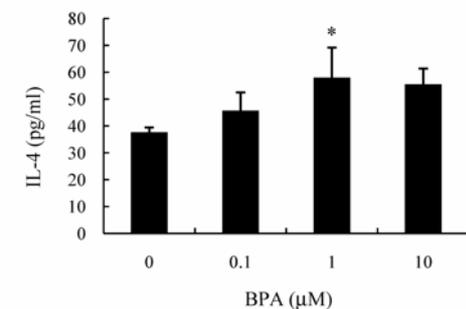
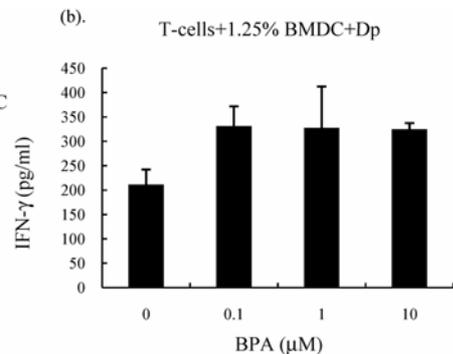
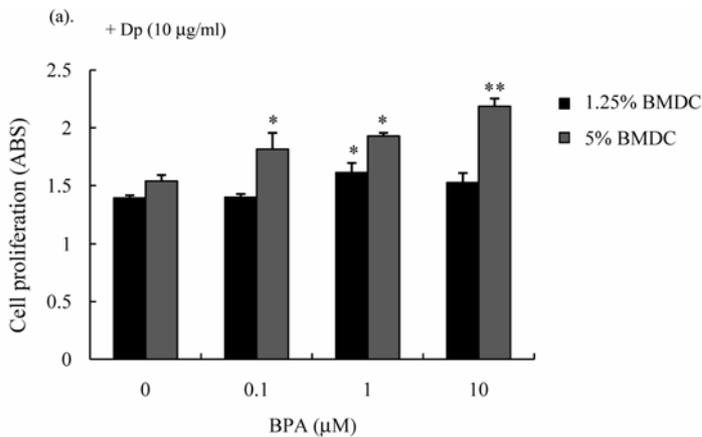


図37 BPA 存在下で誘導した NC/Nga マウス BMDC の Dp 特異的抗原提示機能およびサイトカイン産生
*p<0.05, **p<0.01 vs. control

2) マウス脾細胞を用いた環境化学物質の *in vitro* 影響評価に関する研究

NC/Nga マウス (11-15週齢) の脾細胞 (1×10^6 cells/ml) を, 0.1-100 μM の DEHP または DINP, BPA (0.1% DMSO 含有) に24時間曝露した後, T 細胞表面分子である TCR, IL-4 receptor, CD28, CD3および抗

原提示細胞表面分子である MHC class II, CD80, CD86, DEC205 (樹状細胞マーカー), CD19 (B 細胞マーカー), F4/80 (マクロファージマーカー) の発現をフローサイトメトリーにより, Th1サイトカイン (IFN-γ, IL-12), Th2サイトカイン (IL-4, IL-10) の産生を ELISA により測定した。次に, NC/Nga マウスの脾細胞 (1×10^6

cells/ml) を, Dp (10 µg/ml) の存在下において, 10^4 - 10^6 µM の DEHP または DINP, BPA (0.1% DMSO 含有) に72時間曝露し, 細胞増殖を測定した。プロトコールを 図38 に示す。

その結果, DEHP は, 脾細胞の TCR および CD3 の発現を有意に増加させ, IL-4 receptor と CD28, 抗原提示

細胞表面分子の発現を低下させた (図39)。DINP は, 脾細胞の TCR および CD86 の発現を有意に増加させ, CD3 の発現を増加させる傾向が観察された。また, DINP は, IL-4 receptor と CD28, CD86 以外の抗原提示細胞表面分子の発現を低下させた (図40)。BPA は, 脾細胞の TCR の発現を増加させる傾向が観察されたが, その他の分子

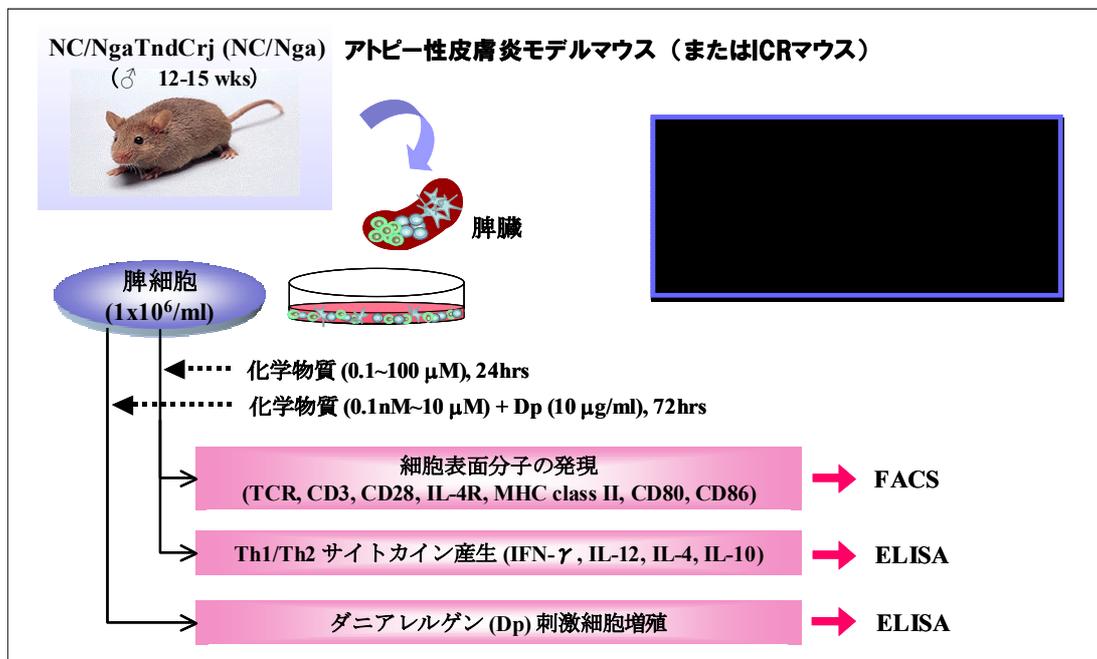


図38 マウス脾細胞を用いた環境化学物質の影響評価方法

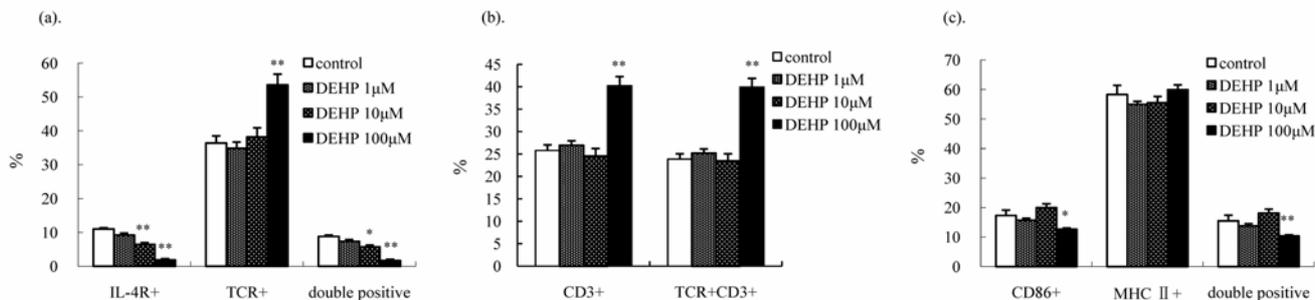


図39 DEHP が NC/Nga マウス脾細胞の細胞表面分子の発現に及ぼす影響

*p<0.05, **p<0.01 vs. control

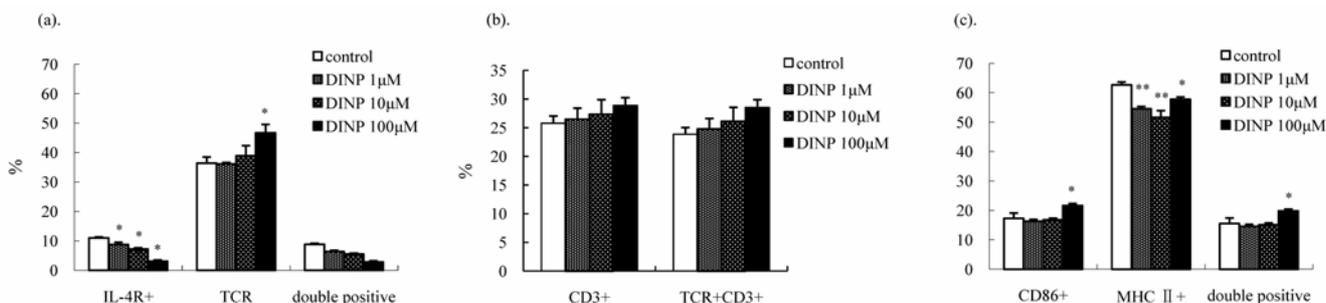


図40 DINP が NC/Nga マウス脾細胞の細胞表面分子の発現に及ぼす影響

*p<0.05, **p<0.01 vs. control

の発現は低下させた(図41)。また、DEHPおよびDINP、BPAはいずれも脾細胞のIL-4産生を有意に亢進した(図42)。いずれの環境化学物質も高濃度域では、抗原刺激に誘導される脾細胞増殖を抑制する傾向が観察されたが、DEHPとBPAは 10^{-3} と 10^{-2} μM 、DINPは 10^{-3} -1 μM の

低濃度域において、抗原刺激による脾細胞増殖を有意に増加させた(図43)。

さらに、ICRマウスの脾細胞を用いて、DEPとその構成成分を割合に基づき曝露し、それらの影響を検討した。ICRマウスの脾細胞(1×10^6 cells/ml)を、0.1%

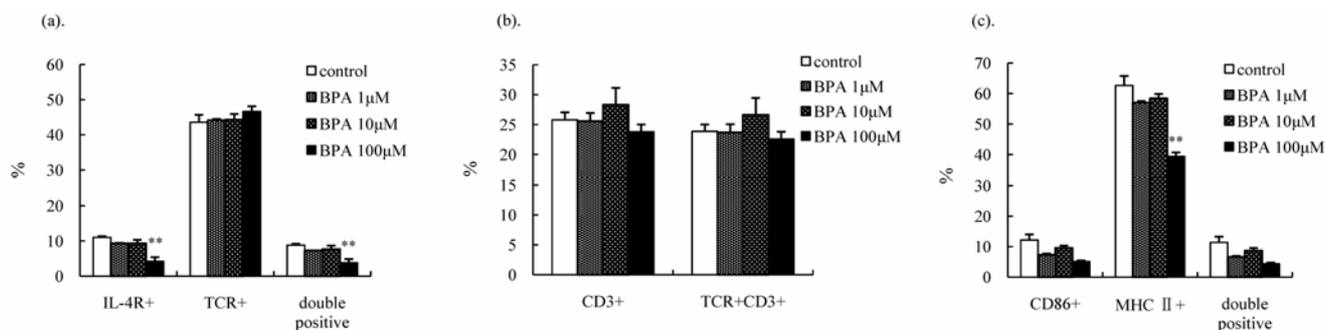


図41 BPAがNC/Ngaマウス脾細胞の細胞表面分子の発現に及ぼす影響

** $p < 0.01$ vs. control

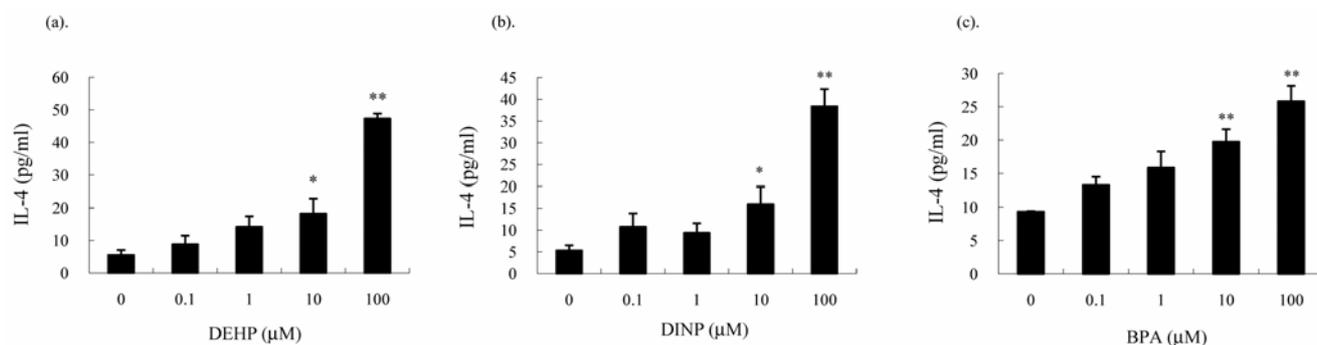


図42 環境化学物質がNC/Ngaマウス脾細胞のIL-4産生に及ぼす影響

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control

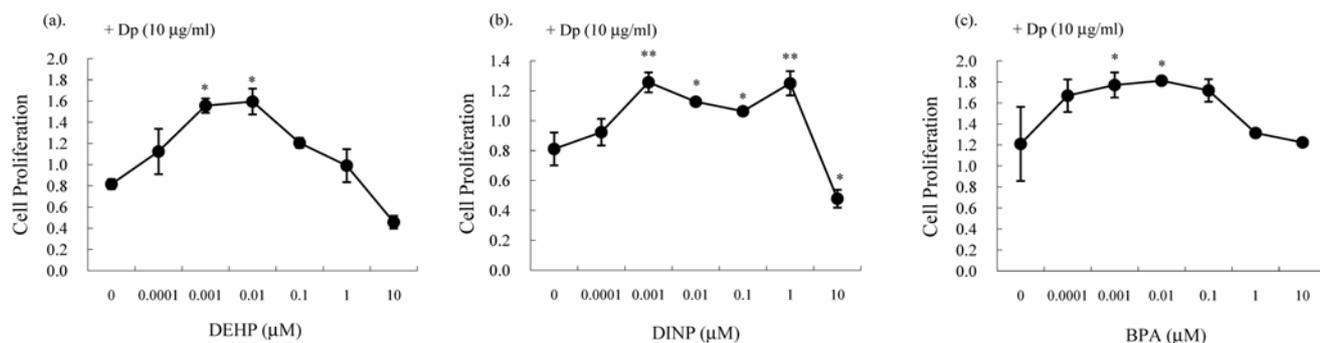


図43 環境化学物質がダニ抗原(Dp)刺激によるNC/Ngaマウス脾細胞の細胞増殖に及ぼす影響

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control

DMSO および0.05% Tween80を含有する DEP (10, 50, 100 µg/ml) または DEP ジクロロメタン抽出物 (DEP-OC ; 7.5, 37.5, 75 µg/ml), DEP 残渣粒子 (DEP-RP ; 2.5, 12.5, 25 µg/ml) に24時間曝露し, T細胞表面分子 (TCR, IL-4 receptor, IFN-γ receptor, CD69, CD154, CD279) および抗原提示細胞表面分子 (MHC class II, CD80, CD86) の発現をフローサイトメトリーにて, IL-4産生を ELISA にて測定した。

その結果, DEP は, 脾細胞の T細胞表面分子ではなく, 補助刺激分子の CD86の発現を有意に増加させ, CD80の発現を増加させる傾向がみられた。DEP 中の有機化学物質は, 検討した全ての T細胞および抗原提示細胞表面分子の発現に対して, 増加傾向または有意な増加を示した。DEP 残渣粒子は, T細胞および抗原提示細胞表面分子の発現をむしろ抑制する傾向が観察された。一方, 脾細胞の IL-4産生は, DEP および DEP 中の有機化学物質, DEP 残渣粒子いずれの曝露においても有意に亢進された。

3) T細胞を用いた環境化学物質の *in vitro* 影響評価に関する研究

細胞は, ICR マウスの脾細胞からナイロンファイバークラムを用いて分離した T細胞, または, ヒト株化 T細胞 (Jurkat) を使用した。これらの T細胞は, 先に述べた ICR マウス脾細胞の検討と同様に, DEP とその構成成分をそれらの割合に基づき曝露し, T細胞表面分子の発現と IL-4産生を検討した。

その結果, DEP は, 脾臓 T細胞の TCR 以外の分子の

発現と Jurkat 細胞の TCR, IL-4 receptor, IFN-γ receptor の発現を有意に増加させた。DEP 中の有機化学物質は, 脾臓 T細胞および Jurkat 細胞の検討した全ての T細胞表面分子の発現を有意に増加させた。DEP 残渣粒子は, 脾臓 T細胞の CD279と Jurkat 細胞の TCR の発現のみ増加せる傾向が観察された。一方, 脾臓 T細胞と Jurkat 細胞の IL-4産生は, DEP および DEP 中の有機化学物質, DEP 残渣粒子いずれの曝露においても有意に亢進された。また, 脾臓 T細胞に対する DEP の影響は, 脾細胞全体で検討した時よりも顕著であること, 脾細胞およびT細胞を用いたいずれの評価系においても, DEP の影響は *in vivo* 評価系における増悪影響と同様に, DEP 中の有機化学物質の寄与が強いことが検出できることが示唆された。

以上のことから, *in vivo* でアレルギー病態の増悪影響を発揮する環境化学物質は, 物質により作用点は異なるものの, BMDC, および, 脾細胞, T細胞を用いた *in vitro* 影響評価系においてもアレルギー/アトピー反応に関連する指標に対し修飾作用を示すことが明らかとなった (表7-9)。当該の *in vitro* 影響評価系において, BMDC については CD86等の細胞表面分子の発現や抗原提示機能, 脾細胞については TCR, CD86の発現や IL-4産生, 抗原刺激による細胞増殖, T細胞については TCR 等の細胞表面分子の発現や IL-4産生を, *in vivo* の増悪影響を的確かつ簡便に予測しうる有望なバイオマーカーの候補として選択し, これらを利用した *in vitro* スクリーニングモデルを提案することができた。

3. 研究成果のまとめと意義、波及効果

本研究課題の成果の概要を以下に示す。

- (1) 環境ストレスに対し高次機能影響（免疫・アレルギー影響等）が出現しやすい動物を用い、これらに環境化学物質を投与することにより、短期、かつ、簡便に、環境化学物質の影響を評価することが可能な *in vivo* スクリーニングシステムを開発・検証することができた。
- (2) 多くの環境化学物質について、*in vivo* におけるアレルギー増悪作用の有無を短期間で評価することができた。
- (3) 全ての環境化学物質が非特異的にアレルギーを増悪することはないが、ある種の化学物質は、既存の NOAEL に匹敵する濃度、あるいは、より低濃度で、アレルギー増悪影響を發揮しうることが明らかになった。
- (4) DNA マイクロアレイの併用や *in vitro* スクリーニング手法の導入により、より短期、かつ、簡便に環境化学物質のアレルギー増悪影響を推定することができ、スクリーニングシステムを提案することができた。
- (5) これにより、より多数の環境化学物質を対象とし、様々な濃度におけるアレルギー増悪影響を評価することがより簡便になった。

また、本研究の波及効果として、以下の事項が挙げられる。

- (1) 古典的な毒性ではなく、【高次機能影響】、あるいは、【quality of life に密接に関与し、生命・生体システムのかく乱に基づく健康影響】という新たな健康影響の評価軸を提言することにより、また、この影響が既存の NOAEL 近傍、あるいは、より低い濃度でも惹起されうることを世界で初めて明らかにしたことにより、科学的なインパクトと共に、化学物質規制のための環境政策に新たな方向性（の存在する可能性）を与えることができた。
- (2) 簡便かつ短期間で影響評価が可能なスクリーニング手法を提案することができたことにより、環境政策に資する基礎データの蓄積を加速することができた。
- (3) 早期影響指標を検出・活用することにより、化学物質の高次機能影響の未然防止に資する可能性を提供することができた。

本研究の具体的研究成果のまとめを以下に示す。

- (1) *in vivo* スクリーニングによる化学物質のアレルギー増悪影響評価

先行特別研究において提案したアレルギーを起こしやすい高感受性動物（NC/Nga マウス）を用いた *in vivo* スクリーニングモデルを利用し、DINP, DINA, TOTM, BPA, PFOA, PFOS, TBTC, NP, OP, BP, BaP, NQ, PQ, ST, AA, DBP, DEPH を選択し、これらの環境化学物質に関し、アレルギー増悪影響の有無を評価した。その結果を表6に示す。DINP, BPA, ST, BaP, NQ, PQ 等、複数の環境化学物質物質がアレルギー増悪影響を示した。注目すべきこととして、一部の物質のアレルギー増悪影響は、既報告の NOAEL 近傍、あるいは、より低濃度においても發揮されることが示された。しかし、一方で、アレルギー増悪影響の存在しない物質や、AA のように抑制効果が示唆される物質も存在した。また、物質によっては、いわゆる inverted U の用量-反応関係を呈する化学物質の存在が明らかとなった。この用量-反応曲線は、内分泌かく乱作用が報告されている化学物質でも見られる現象であることから、アレルギー増悪作用と内分泌かく乱作用の類似性が示唆された。

- (2) アレルギー増悪影響のより簡易なスクリーニング手法の開発

- 1) DNA マイクロアレイを用いた短期スクリーニング手法の開発

前出の *in vivo* スクリーニングモデルにおける遺伝子発現変動を、DNA マイクロアレイを用いて経時的（病態潜在期～病態完成期）、かつ、網羅的に解析し、短期スクリーニング手法への応用の可能性について検討した。対象物質は、既に増悪影響を確認している DEHP を、対象組織は、アレルゲンを投与し病態の局所である耳介組織を用いた。その結果、病態の進行に伴い、発現変動遺伝子数は増加傾向を示した。また、病態潜在期から完成期に至るまで継続して発現変動を示す遺伝子が存在し、これらの化学物質曝露がアレルギー疾患病態に及ぼす影響の予知に有効であることが考えられた。ただし、病変部である耳介組織では遺伝子の安定性などに若干の問題が残った。

表6 環境化学物質曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響(結果一覧)

用途・発生源	分類	物質名	略称	設定濃度(/kg/day)	NOAEL, LOAEL (/kg/day)	Results	
						Ear thickneing	Clinical score
可塑剤	フタル酸エステル	フタル酸ジイソノニル	DINP	0.15-150mg	15mg	↑	↗
	アジピン酸エステル	アジピン酸ジイソノニル	DINA	0.04-40mg(*1)	-	→	→
	その他可塑剤	トリメリット酸トリス(2-エチルヘキシル)	TOTM	0.04-40mg(*1)	-	→	→
樹脂原材料	樹脂原材料	ビスフェノールA	BPA	0.05-50 mg	50mg (LOAEL)	↑↑	→
	スチレン	スチレンモノマー	ST	0.14-140mg	140mg	↑↑	↑
コーティング剤・界面活性剤合成原料	有機フッ素化合物	ペルフルオロオクタタン酸	PFOA	1.5-1500 µg	-	↓	↘
	有機フッ素化合物	ペルフルオロオクタンスルホン酸	PFOS	1.5-1500 µg	0.15mg	→	→
	アルキルフェノール類	4-ニルフェノール	NP	0.01-10mg	1mg	↗	↗
	アルキルフェノール類	4-t-オクチルフェノール	OP	0.015-15mg	1.5mg	↑	↑
	アルキルフェノール類	p-t-ブチルフェノール	BP	0.06-60mg	6mg	↗	↗
船底塗料、防汚剤	有機スズ化合物	塩化トリブチルスズ	TBTC	0.25-250µg	0.025mg(*2)	→	→
大気中浮遊粒子状物質	DEP構成成分	ベンゾピレン	BaP	2-2000µg	0.21mg	↑	↑
	DEP構成成分	1,2-ナフトキノン	NQ	0.9-900 ng	-	↑	↑
	DEP構成成分	9,10-フェナントラキノン	PQ	1.2-1200 ng	-	↑↑	↑
食品中化学物質		アクリルアミド	AA	2-2000µg	0.2mg	↓	↘
接着剤、セロハン、殺虫剤などの製造	フタル酸エステル	フタル酸ジブチル	DBP	0.5-500mg	50mg	↗	→
化粧品・香料の溶媒、可塑剤	フタル酸エステル	フタル酸ジエチル	DEHP	0.15-150mg	15mg	→	→

*1; NOAELが設定されていないため、類似の化学物質の含有量、あるいはヒトの推定曝露量より算出

*2; TBTOのNOAELから換算

一方、我々は、DEPの経気道曝露によるアレルギー性気管支喘息増悪モデルを用いた経時的な遺伝子発現変動解析などを参考に、環境化学物質のアレルギー増悪作用を短期間で予知することを目的とするDNAチップを開発した(他予算による研究を含む)。本カスタムDNAマイクロアレイを用いて、*in vivo*スクリーニングモデルにおける顎下リンパ節組織の遺伝子発現解析を試みた。その結果、複数の遺伝子の変動が確認され、かつ、変動遺伝子の中には、*in vivo*スクリーニングモデルにおける耳介組織やDEPによるアレルギー性喘息増悪モデルの肺において早期から継続して発現変動が認められた遺伝子も含まれていた。*in vivo*スクリーニング系の短期化という観点からは、早期変動遺伝子を検討することが有用と考えられる。この意味からも、*in vivo*スクリーニングモデルに顎下リンパ節組織や耳介組織等を対象としたDNAマイクロアレイ解析を導入した本スクリーニング系は有用であると考えられた。

2) 培養細胞系を用いた簡易スクリーニング手法の開発
免疫・アレルギー反応や疾患に深く関わる樹状細胞、

脾細胞の単独、あるいは、複合培養系を用い、*in vivo*スクリーニングの結果をよく反映する*in vitro*スクリーニング手法の開発が可能か否か検討し、その簡便性、普及性を含め、総合的に有用性を検討した。具体的には、NC/NgaマウスやICRマウスより、骨髄由来樹状細胞、脾細胞、脾臓由来T細胞を採取し、あるいは、株化T細胞(Jurkat)を対象として用いた。抗原提示細胞についてはMHC class II, CD80, CD86, CD11c, DEC205等の発現、T細胞についてはTCR, CD3, CD28, IL-4R等の発現、また、サイトカイン・ケモカインの産生を環境化学物質の存在下、非存在下で比較検討した(表4, 5)。対象とする環境化学物質としては、*in vivo*スクリーニングモデルにおいてアレルギー増悪影響が認められたDEPやDEHP, DINP, BPAを先導的に選択した。結果一覧を表7-9に示す。総じて、樹状細胞におけるCD86の発現増加、脾細胞におけるTCRの発現およびIL-4産生、抗原刺激による細胞増殖の増強は、*in vivo*におけるアレルギー増悪影響をよく反映し、*in vitro*スクリーニング系、及び、指標として有用であると考えられた。

表7-1 環境化学物質が NC/Nga マウス BMDC の活性化に及ぼす影響

評価項目	対象化学物質		
	DEHP	DINP	BPA
細胞表面分子			
MHC class II	↓	↑	↓
CD80 (B7.1)	→	↑	↘
CD86 (B7.2)	→	↑	↗
CD11c	↓	↗	↓
DEC205	↗	↗	↑
サイトカイン、ケモカイン産生			
TARC	↓	↑	↓
MDC	↘	↑	↓
IL-12	ND	ND	ND
Dp特異的抗原提示機能	↗	↑	↗
サイトカイン産生			
IFN-γ	↓	↑	→
IL-4	↓	↑	↑

表7-2 環境化学物質が NC/Nga マウス BMDC の分化・成熟に及ぼす影響

評価項目	対象化学物質		
	DEHP	DINP	BPA
細胞表面分子			
MHC class II	↗	↗	↑
CD80 (B7.1)	↘	↘	↗
CD86 (B7.2)	↑	↑	↑
CD11c	↑	↑	↑
DEC205	↑	↑	→
サイトカイン、ケモカイン産生			
TARC	↓	↓	→
MDC	↓	↓	↓
IL-12	↓	↓	↓
Dp特異的抗原提示機能	↑	↗	↑
サイトカイン産生			
IFN-γ	↑	↑	↗
IL-4	↑	↗	↑

表7-3 環境化学物質が ICR マウス BMDC の活性化に及ぼす影響

評価項目	対象化学物質		
	DEHP	DINP	BPA
細胞表面分子			
MHC class II	→	↗	→
CD80 (B7.1)	↗	↗	↗
CD86 (B7.2)	↑	↑	↗
CD11c	↘	→	↘
DEC205	→	↗	↓
サイトカイン、ケモカイン産生			
TARC	↓	↓	↓
MDC	↓	→	↘
IL-12	↑	↑	→

表8-1 環境化学物質が NC/Nga マウス脾細胞に及ぼす影響

評価項目	対象化学物質		
	DEHP	DINP	BPA
T細胞表面分子			
TCR	↑	↑	↗
CD28	↓	↓	→
IL-4R	↓	↓	↓
CD3	↑	↗	→
抗原提示細胞 表面分子			
MHC class II	→	↓	↓
CD80 (B7.1)	↓	↓	↓
CD86 (B7.2)	↓	↑	↘
CD19	↓	→	→
F4/80	↓	↓	↓
DEC205	↓	↓	↓
サイトカイン、抗体産生			
IFN-γ	↑	↑	→
IL-4	↑	↑	↑
IgE	↗	↗	↗
抗原刺激細胞増殖	↑	↑	↑

表8-2 環境化学物質が ICR マウス脾細胞に及ぼす影響

評価項目	対象化学物質		
	Whole DEP	DEP-OC	DEP-RP
T細胞表面分子			
TCR	→	↑	↘
IL-4R	→	↑	↓
IFN-γR	↓	↗	↓
CD69	→	↑	↓
CD154	→	↗	↓
CD279 (PD-1)	↘	↗	↘
抗原提示細胞表面分子			
MHC class II	→	↗	↘
CD80 (B7.1)	↗	↑	→
CD86 (B7.2)	↑	↑	↘
サイトカイン産生			
IL-4	↑	↑	↑

表9 環境化学物質がT細胞に及ぼす影響

細胞	評価項目	対象化学物質		
		Whole DEP	DEP-OC	DEP-RP
脾臓T細胞 (ICRマウス)	TCR	→	↑	↘
	IL-4R	↑	↑	→
	IFN-γR	↑	↑	→
	CD69	↑	↑	→
	CD154	↑	↑	→
	CD279 (PD-1)	↑	↑	↗
Jurkat (ヒトT細胞株)	TCR	↑	↑	↗
	IL-4R	↑	↑	→
	IFN-γR	↑	↑	→
	サイトカイン産生			
	IL-4	↑	↑	↑

4. 今後の展望

本特別研究で得られた成果により、まず、先行特別研究において提案したアレルギーを起こしやすい高感受性動物（NC/Nga マウス）を用いた *in vivo* スクリーニングモデルの有用性を検証することができた。また、この *in vivo* スクリーニングモデルへの DNA マイクロアレイの応用や *in vitro* スクリーニングの導入により、より、短期、かつ、簡便な環境化学物質の高次機能影響スクリーニングシステムを提案することができた。今後、これらを、より、簡便性、汎用性の高いものとしてゆくため、一層の改良と検証を進めてゆく必要があるものと考えられる。また、対象とする環境化学物質を増やし、スクリーニング間の相関性をより厳密に検証していくことも望ましいものと考えられる。現在、免疫反応の起点である樹状細胞を用いた *in vitro* スクリーニングシステムの改良と検証については、他の競争的資金の対象課題に選出され、研究を進行しつつある。また、汎用性の観点からは、脾細胞を用いた *in vitro* スクリーニングシステムの改良と検証も必須であり、一層進展してゆく必要が高いものと認識しており、何らかの予算措置を得るべく努力したいものと考えている。これらの成果を着実に積み重ねて

ゆくことにより、多数の環境化学物質について *in vitro* スクリーニングを実行し、*in vivo* における増悪影響を *in vivo* スクリーニングモデルにおいて確認し、大規模疫学における検討対象化学物質として提案すると共に、環境政策の今後の方向性の設定に示唆を与え、国民の健康の保持（安全と安心）と環境影響の未然防止に役立てていきたいと考えている。

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（企画部長、企画部員）、その他管理部門の方々、動物実験にあたり、アニマルケア㈱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、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、阿部学氏の協力は何者にも代え難いものであった。さらに、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 高野裕久

生体影響評価研究室 井上健一郎
小池英子
柳澤利枝

[B 客員研究員]

市瀬孝道	(大分県立看護科学大学)	(平成17～19年度)
島田章則	(鳥取大学)	(平成17～19年度)
市川 寛	(京都府立大学)	(平成17～19年度)
古倉 聡	(京都府立医科大学)	(平成17～19年度)
佐藤雅彦	(愛知学院大学)	(平成17～19年度)

2 研究課題と担当者 (*客員研究員)

(1) *in vivo*スクリーニングによる化学物質のアレルギー増悪影響評価に関する研究

高野裕久・柳澤利枝・井上健一郎・市瀬孝道*・島田章則*・佐藤雅彦*

(2) アレルギー増悪影響のより簡易なスクリーニング手法の開発に関する研究の実施内容

高野裕久・柳澤利枝・井上健一郎・市川 寛*・古倉 聡*

(3) DNA マイクロアレイを用いた短期スクリーニング手法の開発に関する研究の実施内容

高野裕久・柳澤利枝・井上健一郎・市川 寛*・古倉 聡*

(4) 培養細胞系を用いた簡易スクリーニング手法の開発に関する研究の実施内容

高野裕久・小池英子・井上健一郎

II 研究成果発表一覧

1 誌上発表

(英文査読つき論文)

発表者 (刊年) 題目・掲載誌・巻(号)・頁

Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Sakurai M, Ueki N, Ichinose T, Sadakane K, Yoshino S, Uchiyama K, Yoshikawa T (2005) 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

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

Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Sakurai M, Ichinose T, Sadakane K, Hiyoshi K, Sato M, Shimada A, Yoshikawa T (2005) Role of metallothionein in antigen-related airway inflammation, *Exp Biol Med (formerly: P Soc Exp Biol Med)*, 230, 75-81

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

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

Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Yoshikawa T (2005) Air pollution and pulmonary diseases, *Chest*, 128, 1075 (correspondence)

Hashimoto AH, Amanuma K, Hiyoshi K, Takano H, Masumura KI, Nohmi T, Aoki Y (2005) In vivo mutagenesis induced by benzo[a]pyrene instilled into the lung of gpt delta transgenic mice, *Environ Mol Mutagen*, 45, 363-373

Hiyoshi K, Ichinose T, Sadakane K, Takano H, Nishikawa M, Mori I, Yanagisawa R, Yoshida S, Kumagai Y, Tomura S, Shibamoto T (2005) Asian Sand dust enhances ovalbumin-induced eosinophil recruitment in the alveoli and airway of mice, *Environ Res*, 99, 361-368

Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Ichinose T, Shimada A, Yoshikawa T (2005) Pulmonary exposure to diesel exhaust particles induce airway inflammation and cytokine expression in NC/Nga mice, *Arch Toxicol*, 79, 595-599

Inoue K, Takano H, Shiga A, Fujita Y, Makino H, Yanagisawa R, Ichinose T, Kato Y, Yamada T, Yoshikawa T (2005) Effects of volatile constituents of a rosemary extract on allergic airway inflammation related to house dust mite allergen in mice, *Int J Mol Med*, 16, 315-319

Yoshino S, Yamaki K, Taneda S, Yanagisawa R, Takano H (2005) Reactivation of antigen-induced arthritis in mice by oral administration of lipopolysaccharide, *Scan J Immunol*, 62, 17-122

Hiyoshi K, Takano H, Inoue K, Ichinose T, Yanagisawa R, Tomura S, Kumagai Y (2005) Effects of phenanthraquinone on allergic airway inflammation in mice, *Clin Exp Allergy*, 35, 1243-1248

Fujimoto A, Tsukue N, Watanabe M, Sugawara I, Yanagisawa R, Takano H, Yoshida S, Takeda K (2005) Diesel exhaust affects immunological action in the placentas of mice, *Environ Toxicol*, 20, 431-440

Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Sakurai M, Ichinose T, Sadakane K, Yoshikawa T (2005) Effects of nano particles on antigen-related airway inflammation in mice, *Resp Res*, 6, 106

Yamaki K, Khurshid Alam AHM, Aslam Hossain Md, Taneda S, Yanagisawa R, Takano H, Yoshino S (2005) Effect of rolipram, a phosphodiesterase IV inhibitor, on allergic footpad swelling using various adjuvants in mice, *Scand J Immunol*, 62, 378-384

Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Hirano S, Ichinose T, Shimada A, Yoshikawa T (2006) The role of toll like receptor-4 in airway inflammation induced by diesel exhaust particles, *Arch Toxicol*, 80, 275-279

- Yanagisawa R, Takano H, Inoue K, Sakurai M, Ichinose T, Sadakane K, Yoshino S, Yamaki K, Yoshikawa T, Hayakawa K (2006) Components of diesel exhaust particles differentially affect Th1/Th2 response in a murine model of allergic airway inflammation, *Clin Exp Allergy*, 36, 386-395
- Ichinose T, Sadakane K, Takano H, Yanagisawa R, Nishikawa M, Mori I, Kawazato H, Yasuda A, Hiyoshi K, Shibamoto T (2006) Enhancement of mite allergen-induced eosinophil infiltration in the murine airway and local cytokine/chemokine expression by Asian sand dust, *J Toxicol Environ Health*, 69, 1571-1585
- Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Ichinose T, Sakurai M, Yoshikawa T (2006) Effects of nano particles on cytokine expression in murine lung in the absence or presence of allergen, *Arch Toxicol*, 80, 614-619
- Hashimoto AH, Amanuma K, Hiyoshi K, Takano H, Masumura KI, Nohmi T, Aoki Y (2006) In vivo mutagenesis in the lungs of gpt-delta transgenic mice treated with 1,6-dinitropyrene, *Environ Mol Mutagen*, 47, 277-283
- Sugamata M, Ihara T, Takano H, Oshio S, Takeda K (2006) Maternal diesel exhaust exposure damages newborn murine brains, *J Health Sciences*, 52, 82-84
- Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Hirano S, Kobayashi T, Ichinose T, Yoshikawa T (2006) Effects of organic chemicals derived from ambient particulate matter on lung inflammation related to lipopolysaccharide, *Arch Toxicol*, 80, 833-838
- Takano H, Yanagisawa R, Inoue K, Ichinose T, Sadakane K, Yoshikawa T (2006) Di-(2-ethylhexyl) phthalate enhances atopic dermatitis-like skin lesions in mice, *Environ Health Persp*, 114, 1266-1269
- Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Sakurai M, Ueki N, Yoshikawa T (2006) Effects of diesel exhaust on lung inflammation related to bacterial endotoxin in mice, *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 99, 346-352
- Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Hirano S, Sakurai M, Shimada A, Yoshikawa T (2006) Effects of airway exposure to nanoparticles on lung inflammation induced by bacterial endotoxin in mice, *Environ Health Persp*, 114, 1325-1330
- Yoshida S, Ono N, Tsukue N, Oshio S, Umeda T, Takano H, Takeda K (2006) In utero exposure to diesel exhaust increased accessory reproductive gland weight and serum testosterone concentration in male mice, *Environ Sci*, 13, 139-147
- Feng H, Yamaki K, Takano H, Inoue K, Yanagisawa R, Yoshino S (2006) Suppression of Th1 and Th2 immune responses in mice by sinomenine, an alkaloid extracted from the Chinese medicinal plant *sinomenium acutum*, *Planta Medica*, 72, 1383-1388
- Kaewamatawong T, Shimada A, Okajima M, Inoue H, Morita T, Inoue K, Takano H (2006) Acute and subacute pulmonary toxicity of low dose of ultrafine colloidal silica particles in mice after intratracheal instillation, *Toxicol Pathol*, 34, 958-965
- Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Sakurai M, Ueki N, Yoshikawa T (2007) Effects of diesel exhaust particles on cytokine production by splenocytes stimulated with lipopolysaccharide, *J Appl Toxicol*, 27, 95-100
- Inoue K, Takano H, Hiyoshi K, Ichinose T, Sadakane K, Yanagisawa R, Tomura S, Kumagai Y (2007) Naphthoquinone enhances antigen-related airway inflammation in mice, *Eur Respir J*, 29, 259-267
- Yamaki K, Li X, Hossain Md A, Khurshid Alam AHM, Taneda S, Yanagisawa R, Takano H, Yoshino S (2007) Difference in preventive effects between the phosphodiesterase IV inhibitor rolipram and anti-arthritis drugs on antigen-induced arthritis in mice, *Immunol Invest*, 36, 131-145
- Arimoto T, Takano H, Inoue K, Yanagisawa R, Yoshino, Yamaki K, Yoshikawa T (2007) Pulmonary exposure to diesel exhaust particle components enhances circulatory chemokines during lung inflammation, *Int J Immunopathol Pharmacol*, 20, 197-201
- Inoue K, Takano H, Ichinose T, Tomura S, Yanagisawa R, Sakurai M, Sumi D, Cho AK, Hiyoshi K, Kumagai Y (2007) Effects of naphthoquinone on airway responsiveness in the presence or absence of antigen in mice, *Arch Toxicol*, 81, 575-581
- Ono N, Oshio S, Niwata Y, Yoshida S, Tsukue N, Sugawara I, Takano H, Takeda K (2007) Prenatal exposure to diesel exhaust impairs mouse spermatogenesis, *Inhal Toxicol*, 19, 275-281

- Yanagisawa R, Takano H, Ichinose T, Mizushima K, Nishikawa M, Mori I, Inoue K, Sadakane K, Yoshikawa T (2007) Gene expression analysis of murine lungs following pulmonary exposure to Asian sand dust particles, *Exp Biol Med*, 232, 1109-1118
- Aoki Y, Hashimoto AH, Amanuma K, Matsumoto M, Hiyoshi K, Takano H, Masumura K, Itoh K, Nohmi T, Yamamoto M (2007) Enhanced Spontaneous and Benzo(a)pyrene-Induced Mutations in the Lung of Nrf2-Deficient gpt Delta Mice, *Cancer Res*, 67, 5643-5648
- Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Hirano S, Kobayashi T, Fujitani Y, Shimada A, Yoshikawa T (2007) Effects of inhaled nanoparticles on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice, *Toxicology*, 238, 99-110
- Yamaki K, Taneda S, Yanagisawa R, Inoue KI, Takano H, Yoshino S (2007) Enhancement of allergic responses in vivo and in vitro by butylated hydroxytoluene, *Toxicol Applied Pharmacol*, 223, 164-172
- Hashimoto AH, Amanuma K, Hiyoshi K, Sugawara Y, Goto S, Yanagisawa R, Takano H, Masumura KI, Nohmi T, Aoki Y (2007) Mutations in the lungs of gpt-delta transgenic mice following inhalation of diesel exhaust, *Environ Mol Mutagen*, 48, 682-693
- Feng H, Yamaki K, Takano H, Inoue K, Yanagisawa R, Yoshino S (2007) Effect of sinomenine on collagen-induced arthritis in mice, *Autoimmunity* 40, 532-539
- Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Sakurai M, Abe S, Yoshino S, Yamaki K, Yoshikawa T (2007) Effects of components derived from diesel exhaust particles on lung physiology related to antigen, *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 29, 403-412
- Wakahara K, Tanaka H, Takahashi G, Tamari M, Nasu R, Toyohara T, Takano H, Saito S, Inagaki N, Shimaoka K, Nagai H (2008) Repeated instillations of *Dermatophagoides farinae* into the airways can induce Th2-dependent airway hyperresponsiveness, eosinophilia and remodeling in mice-Effect of intratracheal treatment of fluticasone propionate-. *Eur J Pharmacol* (in press)
- Koike E, Takano H, Inoue K, Yanagisawa R, Sakurai M, Aoyagi H, Shinohara R, Kobayashi T (2008) Pulmonary exposure to carbon black nanoparticles increases the number of antigen-presenting cells in murine lung, *Int J Immunopathol Pharmacol* (in press)
- Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Sakurai M, Abe S, Yoshino S, Yamaki K, Yoshikawa T (2007) Effects of nanoparticles on lung physiology in the presence or absence of antigen, *Int J Immunopathol Pharmacol*, 20, 737-744
- Inoue H, Shimada A, Kaewamatawong T, Morita T, Ohta Y, Inoue K, Takano H (2008) Ultrastructural changes of the air-blood-barrier in mice after intratracheal instillation of lipopolysaccharide and ultrafine carbon black particles, *Exp Toxicol Pathol* (in press)
- Inoue K, Takano H, Ohnuki M, Yanagisawa R, Sakurai M, Shimada A, Mizushima K, Yoshikawa T (2008) Size effects of nanomaterials on lung inflammation and coagulatory disturbance, *Int J Immunopathol Pharmacol* (in press)
- Inoue K, Takano H, Kumagai Y (2008) Pin1 blockade in asthma by naphthoquinone? *J Allergy Clin Immunol* (in press, correspondence)
- Ichinose T, Yoshida S, Hiyoshi K, Sadakane K, Takano H, Nishikawa M, Mori I, Yanagisawa R, Kawazato H, Yasuda A, Shibamoto T (2008) Effects of microbial materials adhered to Asian sand dust (ASD) on allergic lung inflammation, *Arch Environ Con Tox* (in press)
- Ichinose T, Yoshida S, Sadakane K, Takano H, Yanagisawa R, Inoue K, Nishikawa M, Mori I, Kawazato H, Yasuda A, Shibamoto T (2008) Effects of Asian sand dust, Arizona sand dust, amorphous silica and aluminum oxide on allergic inflammation in the murine lung, *Inhal Toxicol* (in press)
- Yoshida S, Hiyoshi K, Ichinose T, Takano H, Oshio S, Sugawara I, Takeda K, Shibamoto T (2008) Effect of nanoparticles on the male reproductive function of mice, *Int J Androl* (in press)
- Huang F, Yamaki K, Tong X, Fu L, Zhang R, Cai Y, Yanagisawa R, Inoue KI, Takano H, Yoshino S (2008) Inhibition on the antigen-induced activation of RBL-2HS cells by sinomenine, *Int Immunopharm*, 8, 502-503
- Yanagisawa R, Takano H, Inoue K, Koike E, Sadakane K, Ichinose T (2008) Effects of maternal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate during fetal and/or neonatal periods on atopic dermatitis in male offspring, *Environ Health Persp* (in press)

(英文査読付き総説)

発表者 (刊年) 題目・掲載誌・巻 (号)・頁

Naito Y, Takano H, Yoshikawa T (2005) Oxidative stress-related molecules as a therapeutic target for inflammatory and allergic diseases, *Current Drug Targets*, 4, 511-515

Arimoto T, Inoue K, Yanagisawa R, Takano H (2006) Diesel exhaust particles synergistically enhance lung injury and oxidative stress induced by bacterial endotoxin, *J Clin Biochem Nutr*, 38, 133-137

Takano H, Yanagisawa R, Inoue K (2007) Components of diesel exhaust particles diversely enhance a variety of respiratory diseases related to infection or allergy -Extracted organic chemicals and the residual particles after extraction differently affect respiratory diseases-, *J Clin Biochem Nutr*, 40, 101-107

(和文総説)

発表者 (刊年) 題目・掲載誌・巻 (号)・頁

高野裕久 (2006) シックハウス症候群・化学物質過敏症の診療とその課題, *環境技術*, 35, 245-250

井上健一郎, 高野裕久, 柳澤利枝, 吉川敏一 (2006) ナノ粒子のアレルギー性気道炎症への影響, *アレルギーの臨床*, 26, 810-815

和文著書

発表者 (刊年) 題目・掲載誌・巻 (号)・頁

森田昌敏, 高野裕久 (2005) 環境とアレルギー, 「環境と健康」 p.232, 岩波書店, 109-145

高野裕久 (2005) 呼吸器・循環器影響の疫学. 「自動車排出ナノ粒子および DEP の測定と生体影響評価」, *NTS*, 177-186

高野裕久 (2005) シックハウス症候群の診断と治療. 「シックハウス症候群とその対策」, 吉川敏一編, オーム社, 57-66

高野裕久 (2005) 5.2. 感染症、免疫・アレルギー疾患 B. 免疫・アレルギー疾患. 「臨床栄養管理学」, 寺本房子・市川寛編, 講談社サイエンティフィク, 131-136

高野裕久, 井上健一郎, 柳澤利枝, 吉川敏一 (2006) 急性肺傷害と酸化ストレス, 「酸化ストレスフリーラジカル医学生物学の最前線」, 吉川敏一編, 医歯薬出版社, 372-375

2 口頭発表

発表者（年月） 題目・学会等名称・開催都市

井上健一郎, 高野裕久, 三本木千秋, 越坂部奈緒美, 佐々直子, 夏目みどり, 柳澤利枝, 加藤洋次, 大沢俊彦, 吉川敏一 (2005. 5) ディーゼル排気微粒子誘発肺傷害に対するロスマリン酸の予防効果, 第45回日本呼吸器学会, 東京

井上健一郎, 高野裕久, 柳澤利枝, 島田章則, 森田剛仁, 桜井美穂, 遠山千春, 佐藤雅彦, 吉川敏一 (2005. 4) 細菌毒素誘発急性肺傷害におけるメタロチオネインの保護的役割, 第45回日本呼吸器学会, 東京

井上健一郎, 高野裕久, 柳澤利枝, 島田章則, 森田剛仁, 桜井美穂, 遠山千春, 吉川敏一 (2005. 4) 敗血症時の肺胞出血に対する IL-6 の保護的効果, 第45回日本呼吸器学会, 東京

小池英子 (2005. 4) ディーゼル排気粒子が呼吸・免疫系に及ぼす影響, 第3回 肺研究フォーラム21, 幕張

高野裕久 (2005. 5) SIRS における cytoprotective molecules, 第20回日本ショック学会総会, 大分 (ランチョンセミナー)

井上健一郎, 高野裕久, 柳澤利枝, 桜井美穂, 河野浩之, 吉川敏一 (2005. 7) 内因性ウリナスタチンの抗炎症作用, 第26回日本炎症・再生医学会, 東京

高野裕久 (2005. 7) ディーゼル排気微粒子の健康影響 -DEP による肺傷害とその予防-, 第14回日本アポトーシス研究会学術集会, 倉敷

桜井美穂, 井上健一郎, 柳澤利枝, 植木尚子, 高野裕久 (2005. 9) 都市部 CAPS 曝露が細菌毒素に関連する急性肺傷害に与える影響, 第46回大気環境学会年会, 名古屋

市瀬孝道, 定金香里, 高野裕久, 柳澤利枝, 西川雅高, 森育子, 日吉孝子 (2005. 9) 黄砂、 Al_2O_3 及び SiO_2 の気道炎症増悪作用に関する実験的研究, 第46回大気環境学会年会, 名古屋

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 (2005. 9) ダニ抗原誘発性アトピー性皮膚炎モデルマウスに及ぼすディーゼル排気曝露の影響, 第46回大気環境学会年会, 名古屋

井上健一郎, 柳澤利枝, 桜井美穂, 植木尚子, 小田俊男, 田村弘志, 高野裕久 (2005. 9) ディーゼル排気微粒子の経気道曝露は肺炎に関連する血管内皮傷害を増悪する, 第46回大気環境学会年会, 名古屋

小池英子, 小林隆弘 (2005. 9) ディーゼル排気曝露により変動する肺の遺伝子発現における *in vivo* と *in vitro* の比較解析, 第46回大気環境学会, 名古屋

島浩稔, 小池英子, 尾村誠一, 小林隆弘 (2005. 9) ディーゼル排気粒子中の酸化能を有する画分の毒性及び化学的性状解析, 第46回大気環境学会, 名古屋

尾村誠一, 小池英子, 小林隆弘 (2005. 9) マイクロアレイを用いたディーゼル排気粒子中分画有機成分のラット肺胞上皮細胞に及ぼす影響の解析, 第46回大気環境学会, 名古屋

高野裕久 (2005. 9) 大気環境と健康, 独立行政法人環境再生保全機構 平成17年度保健指導研修, 大阪

高野裕久 (2005. 9) 大気環境と健康, 独立行政法人環境再生保全機構 平成17年度保健指導研修, 東京

小池英子 (2005. 9) 粒子状物質が免疫系に及ぼす影響と酸化ストレス作用, 第12回日本免疫毒性学会, 東京

青柳元, 小池英子, 小林隆弘 (2005. 9) ディーゼル排気粒子の構成成分がラットの肺胞マクロファージと末梢血単球の Ia, B7 分子の発現に及ぼす影響, 第12回日本免疫毒性学会, 東京

井上健一郎, 高野裕久, 柳澤利枝, 市瀬孝道, 定金香里, 吉川敏一 (2005. 10) メタロチオネインのアレルギー性気道炎症に対する保護作用, 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会, 盛岡

井上健一郎, 高野裕久, 柳澤利枝, 市瀬孝道, 定金香里, 日吉孝子, 吉川敏一 (2005. 10) NC/Nga マウスのディーゼル排気微粒子経気道曝露の影響, 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会, 盛岡

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 (2005. 10) アトピー性皮膚炎モデルマウスにおけるディーゼル排気曝露の影響に関する研究, 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会, 盛岡

市瀬孝道, 日吉孝子, 定金香里, 高野裕久, 柳澤利枝, 西川雅高, 森育子, 川里浩明, 安田愛子 (2005. 10) マウス喘息モデルに対する熱処理黄砂と非熱処理黄砂の影響比較, 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会, 盛岡

日吉孝子, 市瀬孝道, 井上健一郎, 戸村成男, 西川雅高, 高野裕久 (2005. 10) モルモットアレルギー性鼻炎モデルに対する黄砂及びカオリン粒子の影響, 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会, 盛岡

高橋剛, 若原恵子, 那須礼史, 田中宏幸, 高野裕久, 奥村弘樹, 前島一仁, 稲垣直樹, 永井博一 (2005.10) ダニ抗原によるマウス気道リモデリングに及ぼすディーゼル排気微粒子 (DEP) の影響, 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会, 盛岡

小池英子, 小林隆弘 (2005.10) ディーゼル排気粒子が抗原提示細胞に与える影響と酸化ストレスの関係, 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会, 盛岡

高野裕久 (2005.11) ディーゼル粒子の健康影響 Diesel exhaust particles and their components differently affect a variety of respiratory diseases, ディーゼル粒子シンポジウム (財団法人日本自動車研究所主催), 東京

高野裕久 (2005.11) 粒子の計測, 制御, 分析と, 環境・生体への影響 自動車排ガス中のナノ粒子の生体影響とその問題, 日本エアロゾル学会, 東京

高野裕久 (2005.11) マウス気道炎症モデルに対するディーゼル排気微粒子粒子構成成分の影響, 科学技術振興機構戦略的基礎研究推進事業 平成12年度採択課題「武田チーム」最終報告会・シンポジウム 大気中に存在する新しいタイプの内分泌かく乱物質-大気中微粒子の健康影響の解明を目指して- (科学技術振興機構戦略的基礎研究推進事業「武田チーム」主催), 野田

高野裕久 (2006.2) SIRS における cytoprotective molecules, 第7回侵襲と生体反応研究会

高野裕久 (2006.3) SIRS における cytoprotective molecules, 第33回日本集中治療医学会学術集会

Saito F., Tasaka S., Inoue K., Nakano Y., Ogawa Y., Kurihara A., Yamada W., Shimizu M., Koh H., Nakamura M., Hasegawa N., Fujishima S., Takano H., Ishizaka A. (2006.3) Role of interleukin-6 in Bleomycin-Induced acute lung injury, American Thorac. Soc, San Diego

柳澤利枝, 高野裕久, 井上健一郎, 定金香里, 市瀬孝道, 吉川敏一 (2006.5) フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) がマウスアトピー性皮膚炎モデルに及ぼす影響 [1], 第18回日本アレルギー学会春季臨床大会 (ポスター発表), 東京

柳澤利枝, 高野裕久, 井上健一郎, 定金香里, 市瀬孝道, 吉川敏一 (2006.5) フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) がマウスアトピー性皮膚炎モデルに及ぼす影響 [2], 第18回日本アレルギー学会春季臨床大会 (ポスター発表), 東京

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 (2006.5) ナノ粒子のアレルギー性気道炎症への影響 (第2報), 第18回日本アレルギー学会春季臨床大会 (ポスター発表), 東京

都丸誠, 高野裕久, 越坂部奈緒美, 安田亜紀子, 井上健一郎, 柳澤利枝, 植松宏 (2006.5) 糖尿病モデルにおける血糖値上昇はカカオポリフェノールにより予防できる, 第17回日本老年歯科医学会学術大会, 沖縄

斎藤史武, 田坂定智, 井上健一郎, 中野泰, 小川裕子, 栗原亜子, 西村知泰, 白石良樹, 長谷川直樹, 藤島清太郎, 高野裕久, 石坂彰敏 (2006.6) ブレオマイシン肺損傷モデルマウスにおける IL-6 の役割, 第46回日本呼吸器学会学術講演会, 東京

井上健一郎, 高野裕久, 柳澤利枝, 市瀬孝道, 定金香里, 吉川敏一 (2006.6) ナノ粒子の経気道曝露は抗原誘発アレルギー性気道炎症を増悪する, 第46回日本呼吸器学会学術講演会, 東京

都丸誠, 高野裕久, 井上健一郎, 柳澤利枝, 越坂部奈緒美, 安田亜紀子, 島田章則, 加藤陽二, 植松宏 (2006.7) 糖尿病モデルマウスにおける脂肪肝はディーゼル排気微粒子の経気道曝露により増悪する, 第33回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋

高野裕久 (2006.7) ナノ粒子・ナノマテリアルの健康影響, 第33回日本トキシコロジー学会学術年会

井上健一郎, 高野裕久, 柳澤利枝, 島田章則, 和田枝美子, 佐藤雅彦, 吉川敏一 (2006.7) 感染に関連する全身炎症反応におけるメタロチオネインの保護的役割, 第27回日本炎症・再生医学会, 東京

Tomaru M., Takano H., Osakabe N., Yasuda A., Inoue K., Yanagisawa R., Uematsu H. (2006.8) Elevation of blood glucose levels is prevented by intake of cacao liquor proanthocyanidins diabetic models, 18th Congr. Int. Assoc. Disability Oral Health, Goteborg

高野裕久 (2006.9) 大気環境と健康, 独立行政法人環境再生保全機構 平成18年度保健指導研修, 大阪

高野裕久 (2006.9) 炎症と環境因子, 第13回日本免疫毒性学会学術大会

高野裕久 (2006.9) 生活習慣病・生活環境病に対するカカオポリフェノールの効用, 第11回チョコレート・ココア国際栄養シンポジウム

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 (2006.9) ナノ粒子の経気道曝露によるアレルギー性気道炎症への影響, 第47回大気環境学会年会, 東京

- 柳澤利枝, 高野裕久, 井上健一郎, 市瀬孝道, 定金香里, 森育子, 西川雅高 (2006.9) 黄砂の経気道曝露による影響に関する GeneChip を用いた遺伝子解析, 第47回大気環境学会年会, 東京
- 都丸誠, 高野裕久, 井上健一郎, 柳澤利枝, 越坂部奈緒美, 島田章則, 加藤陽二, 植松宏 (2006.9) ディーゼル排気微粒子の経気道曝露により糖尿病モデルマウスにおける脂肪肝は増悪する, 第47回大気環境学会年会, 東京
- 都丸誠, 高野裕久, 井上健一郎, 柳澤利枝, 市瀬孝道, 植松宏 (2006.9) ディーゼル排気微粒子が肺の炎症に関連するアポトーシスに及ぼす影響, 第47回大気環境学会年会 (ポスター発表), 東京
- 桜井美穂, 井上健一郎, 柳澤利枝, 植木尚子, 高野裕久 (2006.9) 都市部 CAPS 曝露が細菌毒素に関連する急性肺傷害に与える影響(第3報), 第47回大気環境学会年会(ポスター発表), 東京
- 日吉孝子, 市瀬孝道, 吉田成一, 井上健一郎, 高野裕久, 川里浩明, 安田愛子, 西川雅孝 (2006.11) モルモットスギ花粉症モデルに対する黄砂の影響, 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京
- 柳澤利枝, 高野裕久, 井上健一郎, 市瀬孝道, 定金香里, 吉川敏一 (2006.11) ラテックス粒子が皮膚のバリア機能破綻時に皮膚炎に及ぼす影響, 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京
- 井上健一郎 (2006.11) エンドトキシンに関連する全身炎症反応, 血管内皮傷害, 凝固・線溶異常の保護的分子の研究, 第12回日本エンドトキシン研究会, 東京 (奨励賞受賞講演)
- 井上健一郎, 高野裕久, 柳澤利枝, 島田章則, 和田枝美子, 桜井美穂, 佐藤雅彦, 吉川敏一 (2006.11) Metallothionein はエンドトキシンによる全身炎症反応・血管内皮傷害を保護する, 第12回日本エンドトキシン研究会, 東京
- 高野裕久 (2006.10) 大気環境と健康, 独立行政法人環境再生保全機構 平成18年度保健指導研修, 東京
- 高野裕久 (2007.5) 住環境要因と疾患, 第5回住居医学講演会, 奈良 (招待講演)
- Hirohisa Takano, Rie Yanagisawa, Ken-ichiro Inoue, Eiko Koike (2007.4) Low dose effects of phthalates and other environmental chemicals on atopic dermatitis-like skin lesions in mice, Second Workshop on Low Dose Effects of Chemicals with Special Consideration of Phthalates, Berlin (invited speaker)
- 井上健一郎, 高野裕久, 柳澤利枝, 島田章則, 和田枝美子, 桜井美穂, 佐藤雅彦, 吉川敏一 (2007.5) SIRS 関連肺傷害におけるメタロチオネインの役割, 第47回日本呼吸器学会学術講演会, 東京
- 井上健一郎, 高野裕久, 柳澤利枝, 桜井美穂, 市瀬孝道, 吉川敏一 (2007.6) ディーゼル排気微粒子は naive リンパ球を Th2 反応へ誘導する, 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会, 東京
- 柳澤利枝, 高野裕久, 井上健一郎, 市瀬孝道, 定金香里, 吉川敏一 (2007.6) フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) の乳児期曝露がマウスアトピー性皮膚炎モデルに及ぼす影響, 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会, 東京
- 蒲池知子, 高野裕久, 柳澤利枝, 井上健一郎, 市瀬孝道, 定金香里, 吉川敏一 (2007.6) ナノサイズの二酸化チタン粒子 (TiO₂) がバリア機能破綻時に皮膚炎に及ぼす影響, 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会, 東京
- 高野裕久 (2007.6) ディーゼル排ガス成分と生活習慣病, 第34回日本トキシコロジー学会, 東京
- 柳澤利枝, 高野裕久, 水島かつら, 井上健一郎, 小池英子, 市瀬孝道, 定金香里, 吉川敏一 (2007.9) ディーゼル排気微粒子がアレルギー性気道炎症モデルに及ぼす影響に関する GeneChip を用いた遺伝子発現解析, 第14回日本免疫毒性学会学術大会, 神戸
- 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 (2007.9) ナノ粒子が呼吸器疾患に与える相乗影響, 第14回日本免疫毒性学会学術大会, 神戸
- 井上健一郎, 高野裕久, 柳澤利枝, 市瀬孝道, 島田章則, 吉川敏一 (2007.9) ディーゼル排気微粒子の反復経気道曝露がアトピーマウスへ与える影響, 第14回日本免疫毒性学会学術大会, 神戸
- 小池英子, 高野裕久, 井上健一郎, 柳澤利枝, 小林隆弘 (2007.9) カーボンブラックナノ粒子の曝露がマウス骨髄由来樹状細胞の分化と機能に及ぼす影響, 第14回日本免疫毒性学会学術大会, 神戸
- 蒲池知子, 高野裕久, 柳澤利枝, 井上健一郎, 小池英子, 市瀬孝道, 定金香里, 吉川敏一 (2007.9) ナノサイズの二酸化チタン (TiO₂) がバリア機能の破綻を想定した皮膚炎モデルに及ぼす影響, 第14回日本免疫毒性学会学術大会, 神戸
- 高野裕久 (2007.9) 大気環境と健康, 独立行政法人環境再生保全機構 平成19年度保健指導研修, 大阪
- 高野裕久 (2007.10) 大気環境と健康, 独立行政法人環境再生保全機構 平成19年度保健指導研修, 東京
- 井上健一郎, 高野裕久, 佐藤雅彦 (2007.9) メタロチオネインと炎症-疾患モデルを用いた検討- , メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会2007, 徳島

高野裕久, 井上健一郎, 柳澤利枝, 小池英子 (2007. 11) ディーゼル排気微粒子成分とアレルギー, 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会, 横浜

井上健一郎, 高野裕久, 日吉孝子, 柳澤利枝, 角大悟, 市瀬孝道, 定金香里, 小池英子, 戸村成男, 熊谷嘉人 (2007. 11) 大気浮遊粒子状物質由来9, 10-ナフトキノンが喘息マウスに及ぼす影響, 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会, 横浜

井上健一郎, 高野裕久, 小池英子, 柳澤利枝, 吉野伸, 八巻耕也, 吉川敏一 (2007. 11) DEP が抗原提示細胞に与える影響, 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会, 横浜

小池英子, 高野裕久, 井上健一郎, 柳澤利枝 (2007. 11) ナノ粒子の経気道曝露がマウス肺の抗原提示細胞に及ぼす影響, 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会, 横浜

高野裕久 (2008. 2) 浮遊粒子状物質による健康影響と包括的遺伝子解析 -ディーゼル排気微粒子・黄砂を対象に-, 日米医学協力研究会環境ゲノミックス・疾病専門部会平成19年度研究発表会, 東京

高野裕久 (2008. 2) PM2. 5の曝露, 疫学, 生体影響研究の現状と海外の動向 PM2. 5に関する毒性学的知見の整理, 大気環境学会健康影響分科会, 東京 (招待講演)

高野裕久 (2008. 3) 環境汚染物質による生活習慣病, 生活環境病の増悪とその予防 -ディーゼル排気微粒子を中心に-, 平成19年度北陸大学学術フロンティア年次研究集会, 金沢 (教育講演)

R. Yanagisawa, H. Takano, K. Mizushima, K. Inoue, E. Koike, T. Yoshikawa (2008.3) Microarray analysis of murine lungs following pulmonary exposure to diesel exhaust particles, 47th Annual Meeting & ToxExpo, シアトル

E. Koike, H. Takano, K. Inoue, R. Yanagisawa, M. Sakurai, T. Kobayashi (2008.3) Exposure to carbon black nanoparticles activates antigen-presenting cells in vivo and in vitro, 47th Annual Meeting & ToxExpo, シアトル

井上健一郎, 高野裕久 (2008. 3) 環境化学物質がアレルギー・アトピーに及ぼす影響, 第78回日本衛生学会総会, 熊本

柳澤利枝, 蒲池知子, 井上健一郎, 小池英子, 高野裕久 (2008. 3) ナノサイズの二酸化チタンがバリア機能破綻時のマウス皮膚炎モデルに及ぼす影響, 第78回日本衛生学会総会, 熊本

小池英子, 高野裕久, 井上健一郎, 柳澤利枝 (2008. 3) マウス脾細胞を用いた環境化学物質の *in vitro* 影響評価, 第78回日本衛生学会総会, 熊本

高野裕久 (2008. 3) 毒性学的見地から見た健康影響評価, 第78回日本衛生学会総会, 熊本

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-80-2008

平成 20 年 12 月 26 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 前田印刷株式会社筑波支店

〒305-0033 茨城県つくば市東新井 14-3

Published by the National Institute for Environmental Studies
16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan
December 2008

無断転載を禁じます

