

研究成果の概要

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、環境化学物質の高次機能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 NOEL に匹敵する濃度、あるいは、より低用量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る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高次機能影響を評価することがより可能になった。

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 NOEL 近傍、あるいは、より低い濃度でも惹起されうることが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の方向性に新たな指針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

前出の *in vivo* スクリーニングモデルを利用し、ビスフェノール、ノニルフェノール、スチレン、トリブチルスズ、アルキルフェノール、ベンゾピレン、ナフトキノロン、フェナントラキノロン、ペルフルオロオクタノール、ペルフルオロオクタノールスルホン酸、フタル酸ジイソノニル、アジピン酸イソノニル、トリメット酸エチルヘキシル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジブチル、アクリルアミド等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(表1)。その結果、フタル酸ジイソノニル、ビスフェノールA、ベンゾピレン、ナフトキノ、フェナントラキノ、スチレン(モノマー)、4-t-オクチルフェノールといった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NOEL 近傍、あるいは、より低濃度においても発揮されることが示された。他の結果においても、いわゆる inverted U タイプの量-反応関係が得られている知見が存在し、アレルギー増悪作用と内分泌かく乱作用の類似性も示唆された。一方で、アレルギー増悪影響の存在しない物質や、アクリルアミドやペルフルオロオクタン酸のように抑制効果が示唆される物質も複数存在した。フタル酸ジエチルヘキシルによるアレルギー増悪影響のメカニズムとしては、病変局所(耳介組織)におけるケモカイン発現亢進とそれに基づくと考えられる好酸球性炎症の増悪および肥満細胞の脱顆粒が重要な役割を演じていると考えられた。フタル酸ジエチルヘキシルについて、曝露時期による影響発現の特異性を詳細に検討したところ、授乳期における曝露の増悪影響が雄動物において顕著であることが明らかになった。

(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

2) 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、病態早期、病態進行期、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フタル酸ジエチルヘキシルを、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、radical S-adenosyl methionine domain containing 2、chemokine (C-C motif) ligand 4、serum amyloid A 3 などが病態の潜在期から完成期に至るまで共通して発現変動を示した。しかし、対象とした耳介組織では、病態の進行や重症化に従い RNA の分解が進み、解析および定量性などに若干の問題が残った。より汎用性の高いスクリーニング手法の可能性を検討するために、次に、顎下リンパ節組織における遺伝子発現変動の解析を試みた。病態完成期に、フタル酸ジエチルヘキシル曝露によって特異的に変動を示した遺伝子として、chemokine (C-C motif) ligand 24、tumor necrosis factor alpha induced protein 6、Immunoglobulin heavy chain 6 といった炎症や免疫応答に関わる因子が含まれており、DNA マイクロアレイによる影響指標の検索が可能であることが示された。病態早期における検知・予測という観点からは、今後さらなる検討が必要と考えられたが、RNA の安定性や定量性に関してはよりすぐれていると考えられた。一方、本スクリーニングモデルと DEP によるアレルギー性気管支喘息増悪モデルにおける遺伝子発現の経時的変動結果を参考に、変動の著しい遺伝子を約 429 個選抜して影響指標として利用することにより、環境化学物質のアレルギー増悪作用を短期間で判定することを可能とするチップを開発した(他予算による研究を含む)。

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、リンパ球、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 株) 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 等の発現を、T 細胞については TCR, CD3, CD28, IL-4R 等の発現やサイトカイン・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 2)。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 やフタル酸ジエチルヘキシル、フタル酸ジイソノニル、ビスフェノール A を先導的に選択した。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 産生増加、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。