

5S2-12

環境化学物質による発達期の神経系
ならびに免疫系への影響における
メカニズムの解明に関する研究

研究代表者： 伏木信次 京都府立医科大学

研究実施期間：平成22年度～平成25年度

累積予算額：158,839千円

研究体制

(1) 環境化学物質への曝露による脳形成・発達への影響とそのメカニズムの解明に関する研究

伏木 信次 京都府立医科大学医学研究科 教授

伊東 恭子 京都府立医科大学医学研究科 准教授

矢追 毅 京都府立医科大学医学研究科 助教

(2) 環境化学物質によるアレルギー疾患増悪メカニズムの解明とスクリーニング手法の開発

高野 裕久 京都大学大学院工学研究科 教授

柳澤 利枝 国立環境研究所環境健康研究センター 主任研究員

小池 英子 国立環境研究所環境健康研究センター 主任研究員

市瀬 孝道 大分県立看護科学大学看護学部 生体反応学 教授

吉田 成一 大分県立看護科学大学看護学部 生体反応学 准教授

定金 香里 大分県立看護科学大学看護学部 生体反応学 助教

研究の背景

ビスフェノールA(以下、BPA)はプラスチック素材として汎用されているため、ヒト血清や尿、羊水、胎盤、母乳から検出され、日常的にヒトはBPAに曝露されている。しかし胎生期から新生仔期にかけてのBPA曝露が脳機能に及ぼす影響を動物で広く調べた報告はなく、その影響の詳細とメカニズムの解明が必要である。

小児アレルギー疾患急増の主因は環境要因の急変にあり、中でも、環境汚染の重要性が指摘されてきた。しかし、環境化学物質によるアレルギー増悪影響の評価やメカニズムの解明は不十分で、その影響を簡易にスクリーニングできる評価系も確立されていない。故に、フタル酸エステル類(フタル酸ジエチルヘキシル:DEHP、フタル酸ジイソノニル:DINP)、ベンゾピレン(BaP)、ビスフェノールA(BPA)をはじめとする環境化学物質のアレルギー増悪影響の評価とメカニズム解明、及び、影響を簡易・迅速・高感度にスクリーニングできる評価系の確立が必要であり、小児・若年者のアレルギー疾患への対策として重要である。

研究開発目的

環境中の化学物質が小児の発達段階における神経系と免疫系に及ぼす影響とそのメカニズムを実験的に解明し、エコチル調査を連携・補完することを目的とする。

サブテーマ (1):

BPAの脳形成・発達への影響を短期的影響から長期的な影響まで網羅的に解明することを目的とし、以下の二つを目標とした。

①胎生期から新生仔期のマウスを低用量BPAに曝露したときの影響を、大脳皮質、海馬、中脳等、脳の領域毎に病理学的・生化学的に解析するとともに、行動への影響とそのメカニズムを明らかにする。②①と同様の系を対象に、エピゲノムへの影響を多角的に解明する。リンパ球で影響を検出できるようなバイオマーカーを探索する。

サブテーマ (2):

フタル酸エステル類、ベンゾピレン (BaP)、ビスフェノールA (BPA) のアレルギー増悪影響の評価とメカニズム解明、及び、環境化学物質の増悪影響を簡易にスクリーニングできる評価系の確立を目的とし、以下を目標とした。

①アレルギー性喘息・鼻炎、アトピー性皮膚炎モデルを用い、フタル酸エステル類、BaP、BPAがアレルギー疾患に及ぼす影響を広く評価し、増悪メカニズムを明らかにする。②一部、継世代影響も検討する。③*in vitro*でも増悪メカニズムの解明を図る一方、種々の環境化学物質のアレルギー増悪影響を簡易にスクリーニングできる評価系を開発する。

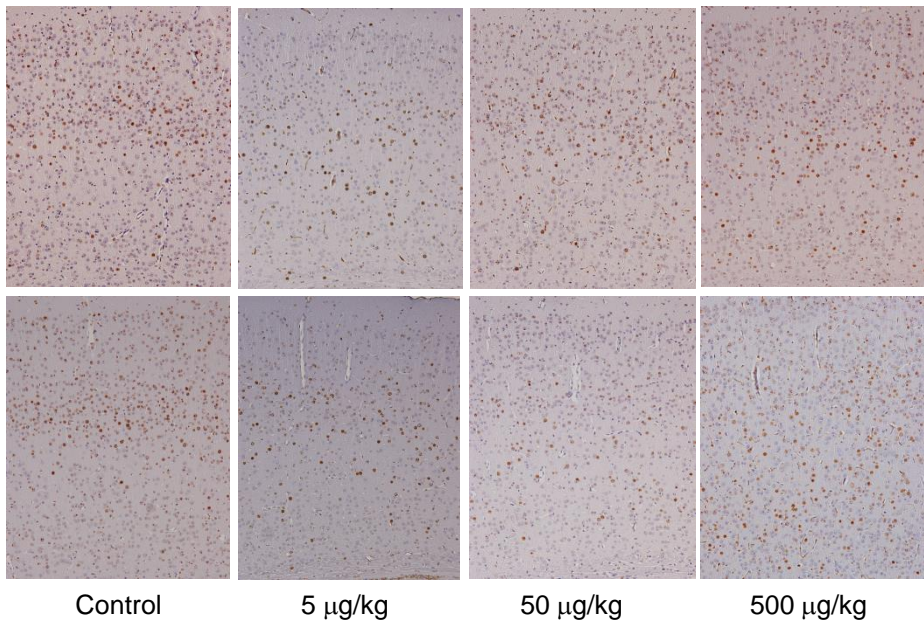
代表的成果

サブテーマ (1)-1

環境化学物質への胎生期・新生仔期
曝露による脳形成・発達・成熟および
行動への影響とそのメカニズム解明

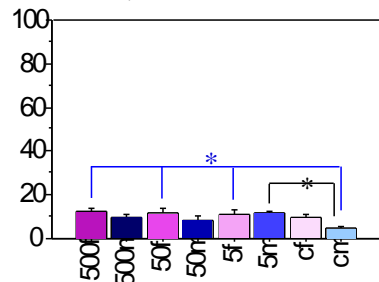
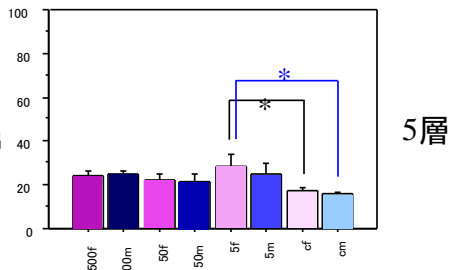
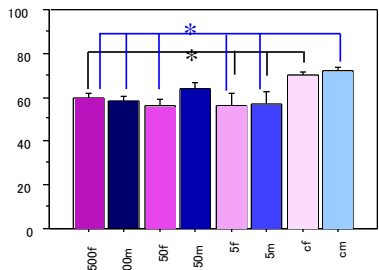
大脳皮質: E14.5にBrdU 標識

神経伝達物質の定量(HPLC)



Female	DA	DOPAC	DOPAC /DA	5-HT	5-HIAA	5-HIAA /5-HT	NE	GABA	Glu
CO	ns	ns	ns	ns	ns	ns	††	††	††
BG	ns	-	-	††	ns	ns	ns	††	††
AMY	ns	ns	ns	†	ns	ns	ns	††	††
HIP	-	-	-	ns	ns	ns	ns	†	††
HT	††	††	ns	ns	ns	ns	††	††	†
TH	ns	ns	†	ns	ns	ns	††	††	††
DR	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ND	ND
SN	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	††	†
LC	-	-	-	ns	ns	††	ns	ND	ND

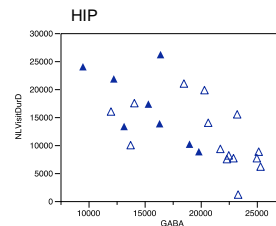
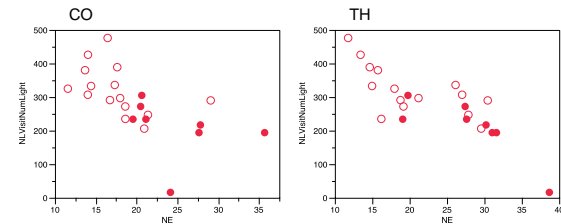
Male	DA	DOPAC	DOPAC /DA	5-HT	5-HIAA	5-HIAA /5-HT	NE	GABA	Glu
CO	ns	ns	ns	ns	†	†	†	ns	†
BG	ns	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AMY	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	†
HIP	-	-	-	ns	ns	ns	ns	†	ns
HT	ns	††	††	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TH	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	††
DR	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ND	ND
SN	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
LC	-	-	-	ns	ns	ns	ns	ND	ND



社会行動異常と神経伝達物質変動の相関

Spearman's ρ		Num. (Diur.)	
		WoD	
		CNT	BPA
CO	NE	-0.686 †	-0.687
TH	NE	-0.729 ††	-0.892 †

Spearman's ρ		Dur. (Noct.)	
		WoD	
		CNT	BPA
HIP	GABA	-0.729 ††	-0.571



サブテーマ (1)-1で得られた主な成果

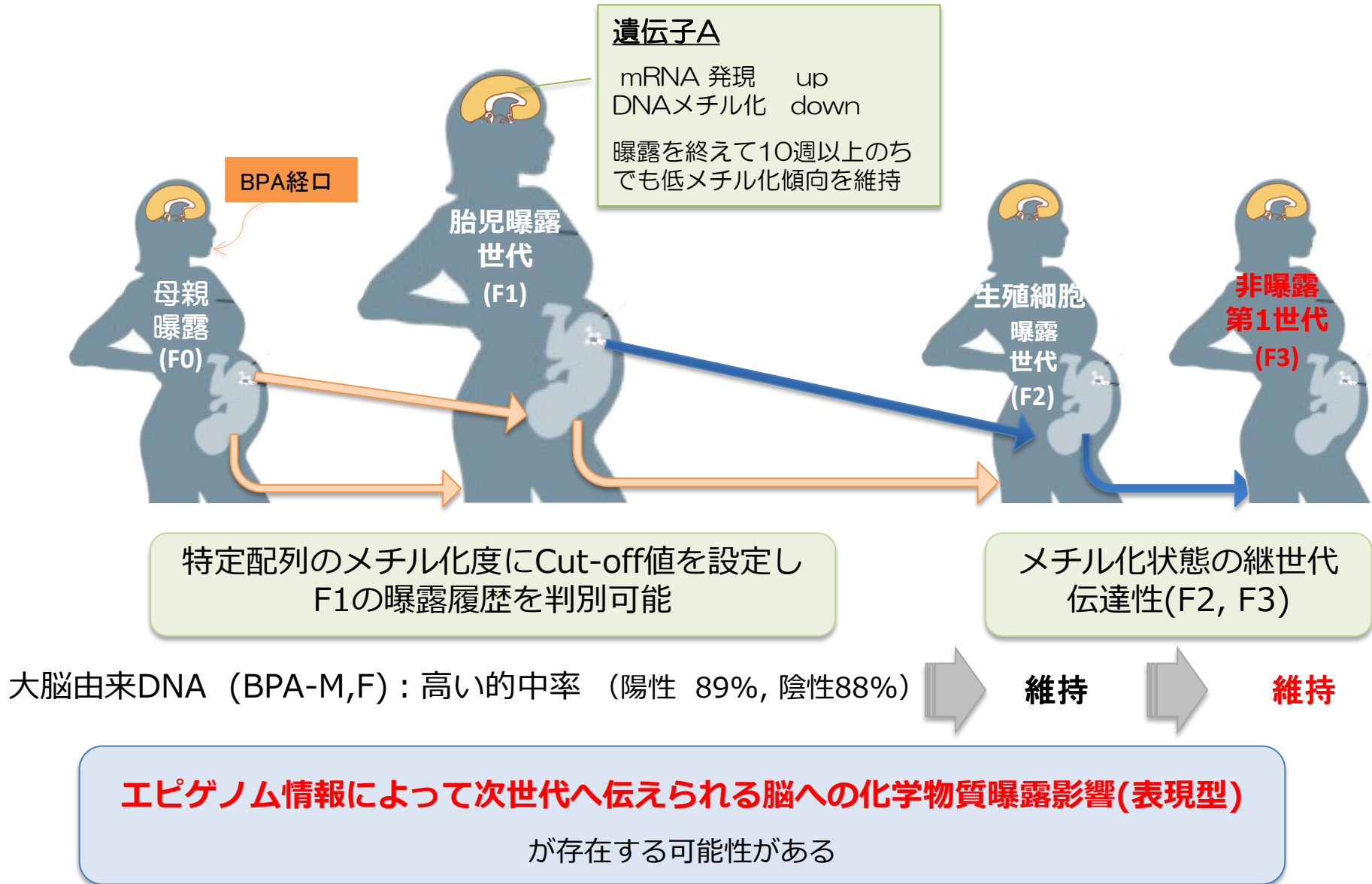
解析項目	解析群	BPA-F	BPA-M
形態学的解析	大脳皮質細胞構築	3週齢で、胎生14.5日に分化した神経細胞の配列異常	
	青斑核のTH陽性細胞数	3週、8週齢で減少、16週齢で正常化	8週齢で増加、16週齢で正常化
	青斑核からの投射線維密度	3週、8週、16週齢で変化なし	3週、8週、16週齢で変化なし
機能的解析	社会行動 (IntelliCage)	報酬を求めない行動の抑制	報酬場所への嗜好性増大
		(覚醒・選択注意の変動?)	(報酬への中枢制御のかく乱?)
	神経伝達化学物質	大脳皮質・視床でのNE増加	海馬でのGABA減少

サブテーマ (1)-2

環境化学物質への胎生期・新生仔期曝露による
ゲノムならびにエピゲノムへの影響と
その分子メカニズム解明

サブテーマ(1)-2で得られた主な成果

胎生期・新生仔期にBPA曝露を受けたマウス大脳



サブテーマ(1) 科学的意義

(1)-1: マウスにおいて、胎生期・授乳期における低用量BPA曝露(母体への経口投与と母乳による曝露)が、出生後の中枢神経系において、形態学的、機能的な変化を惹起することを示した。その変化は、**大脳皮質層構築の異常**、性的二型核における生理的な雌雄差の逆転、**行動学的に自閉性・固執性・情動性の制御の**かく乱を示唆する所見、**脳内神経伝達物質の変動**であった。BPAに対する感受性は、脳の領域によって差異があることを世界で初めて示した。

(1)-2: **胎生・授乳期のBPA曝露**によってマウス**大脳・血液**ゲノムへ新たに刷り込まれた**エピゲノム**マークが、**非曝露期間**(ヒトの離乳～思春期に相当)を経たあとも維持されていることを初めて見出した。**大脳**へのBPA曝露により生じた**エピゲノム**マークに**継世代伝達性**があることを世界で初めて見出した。このことは、**エピゲノム**情報によって次世代へ伝えられる**脳への化学物質曝露影響**が存在する可能性を示している。

BPAの曝露影響に関しては、脳の領域による感受性ならびに作用メカニズムに差異があることを示し、**環境化学物質曝露の脳への影響評価に際しては複数の脳領域を対象とする解析が必須**であることを科学的に提言するに至った。脳においてメチル化変動をきたす遺伝子が、全血由来DNAにおいてもメチル化変動をきたすことを示し、**曝露履歴評価に活用**し得るという科学的提言をするに至った。

サブテーマ (1) 環境政策への貢献

(1)-1:胎生期から新生仔期にかけての低用量BPA曝露(母体への経口投与と母乳による曝露)が、**脳発達障害の原因になり得る**ことを示した。

(1)-2:環境化学物質の脳機能に与える影響に対する**評価や対策の立案**には、「**エピゲノムの継世代伝達性**」への考慮も今後、必要となることを示した。

継世代性がない雄由来血液DNAのエピゲノムマークは脳と同等の的中率で曝露履歴を判定できたことから、**血液DNAを試料とする化学物質曝露履歴マーカーの開発可能性**が示された。今後このようなマーカーが開発されれば、**疫学データ**のより**詳細な解析**に資するものと期待される。

本成果は、

今後、論文発表、学会発表などを通じ、成果の広報・普及に努める。

上記の成果を**BPAの規制政策の今後の方針に役立てる**ことによって国民の安全・安心の確保と経済的損失の縮小に貢献する。

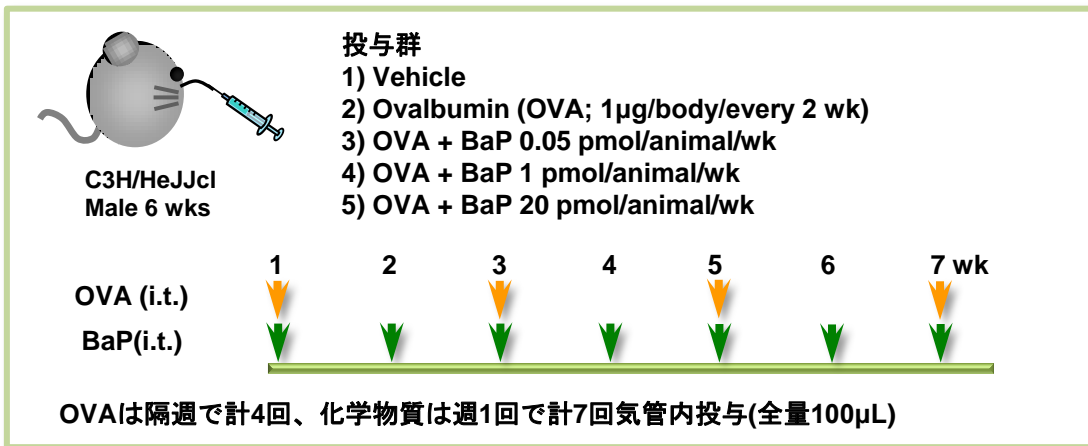
近年増加する小児期の高機能広汎性発達障害の病態解明の一助になるとともに、環境省によるエコチル調査の科学的基盤として、重要な知見と考える。

エコチル調査を補完し、疫学的観察事項に対し生物学的妥当性を付与すること、エコチル調査において優先的に調査すべき対象物質としての提案、さらにはBPAの曝露影響を評価する検査手法の提案に貢献する。

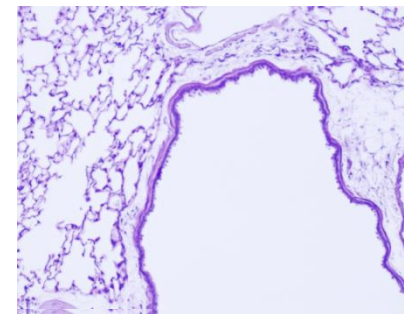
サブテーマ (2)-1

環境化学物質による
アレルギー性喘息増悪メカニズムの解明

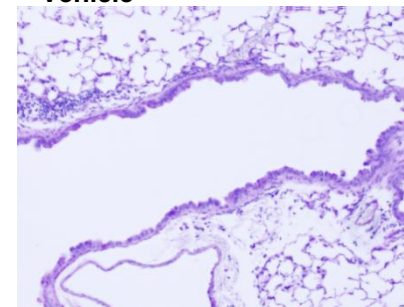
BaPの低用量経気道曝露はアレルギー性気管支喘息を増悪した



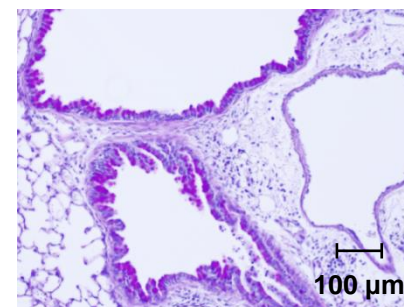
肺の病理組織像(PAS 染色)



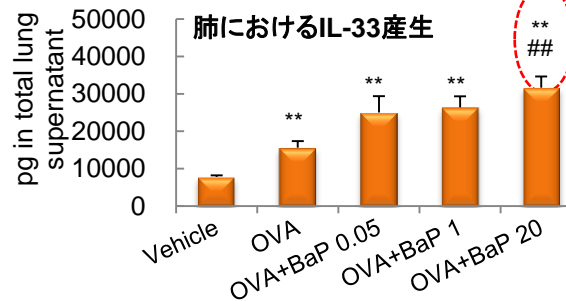
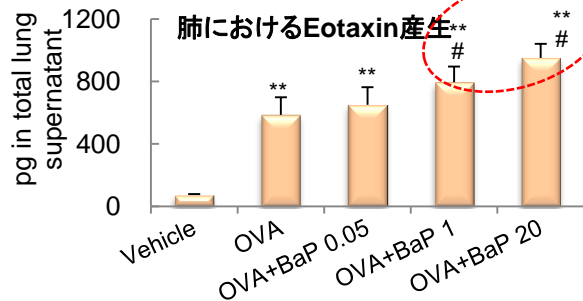
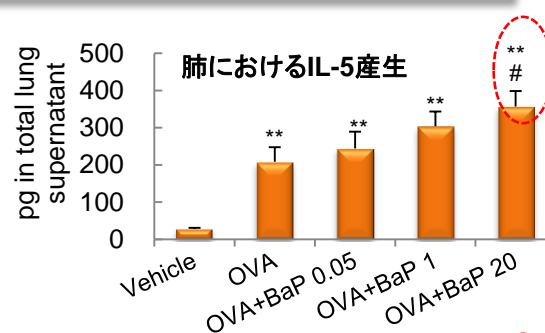
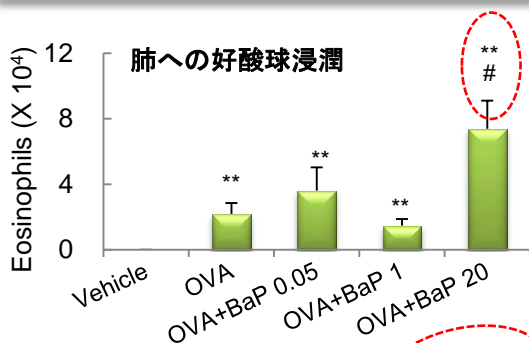
Vehicle



OVA



OVA+BaP 20 pmol/animal/wk



*; p<0.05 vs. Vehicle group, **; p<0.01 vs. Vehicle group, #; p<0.05 vs. OVA group, ##; p<0.01 vs. OVA group.
Data are the mean \pm SE of 15-16 animals per group for BaP.

“BaPの低用量経気道曝露は、アレルギー性喘息の肺局所における好酸球浸潤、およびTh2サイトカイン/ケモカインの発現を有意に増加した”

“BaP曝露はアレルギー性喘息における好酸球やリンパ球などの炎症細胞の浸潤、粘液産生細胞の増生を亢進した”

サブテーマ (2)-1で得られた主な成果

	物質	若齢期曝露				乳児期曝露	
		BaP	DEHP	DINP	BPA	BaP (経母乳)	
						Male	Female
肺	炎症細胞浸潤(BAL)	↑	↗	↗	↑	↗	↗
	炎症性因子の発現	↑	↗	↗	↑	↗	↗ ↑
	病理組織学的変化 (HE染色、PAS染色)	↑	↗	↗	↑	↗	↗
血液	抗原特異的抗体産生	↑	→	→	↗	↗	↗

※ ↑ ; 有意な増悪 ↗ ; 増悪傾向 → ; 影響なし

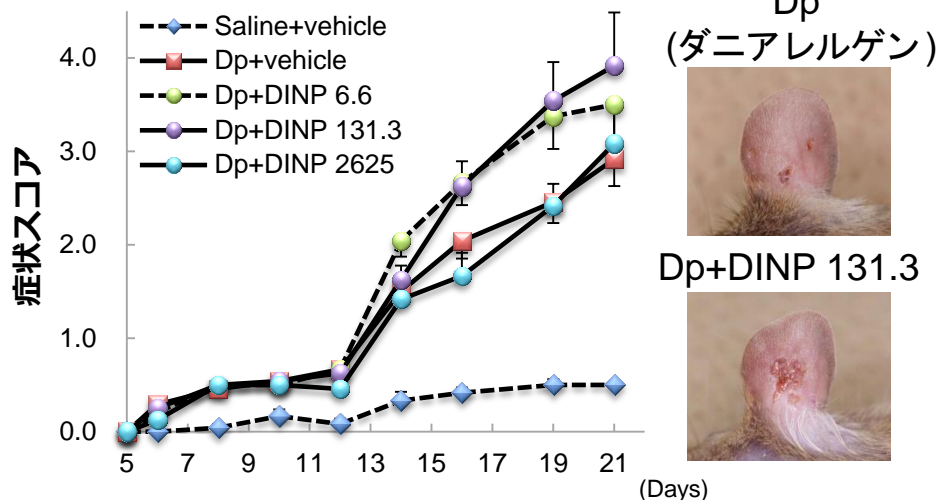
“BaP、BPAの低用量、経気道曝露が、小児のアレルギー性喘息を増悪することとそのメカニズムを明らかにした。 顕著ではないものの、BaPの低用量、乳児期(経母乳)曝露による次世代影響が存在し、性差がある可能性も指摘した”

サブテーマ (2)-2

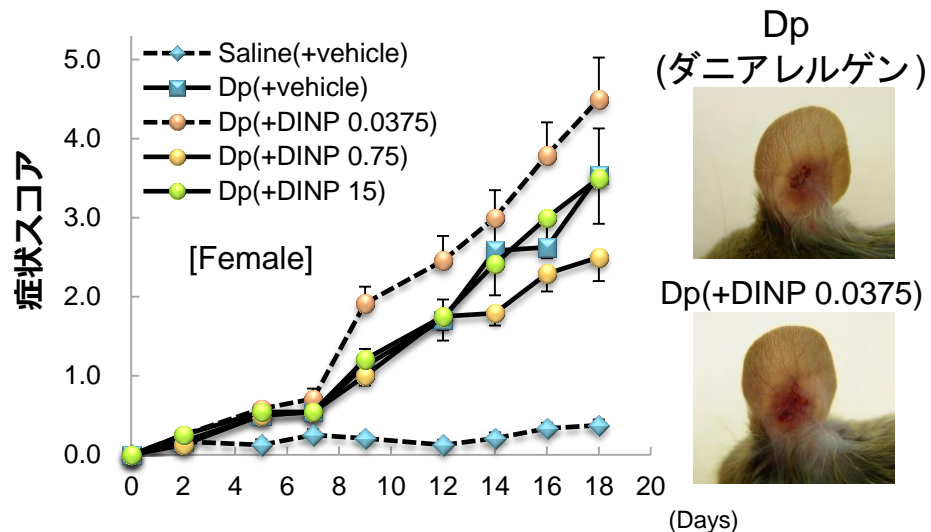
環境化学物質による
アトピー性皮膚炎増悪メカニズムの解明

DINPの低用量経口/経母乳曝露はアトピー性皮膚炎を増悪した

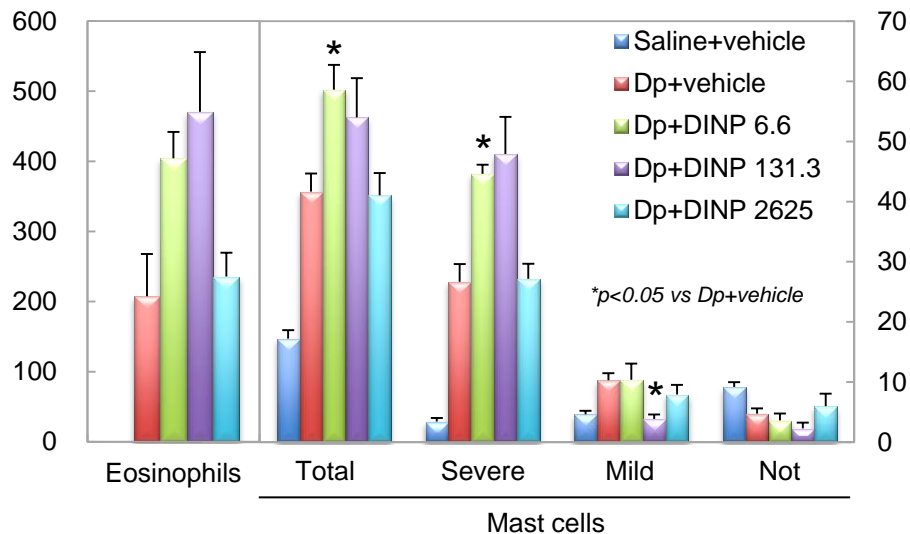
【経口曝露】



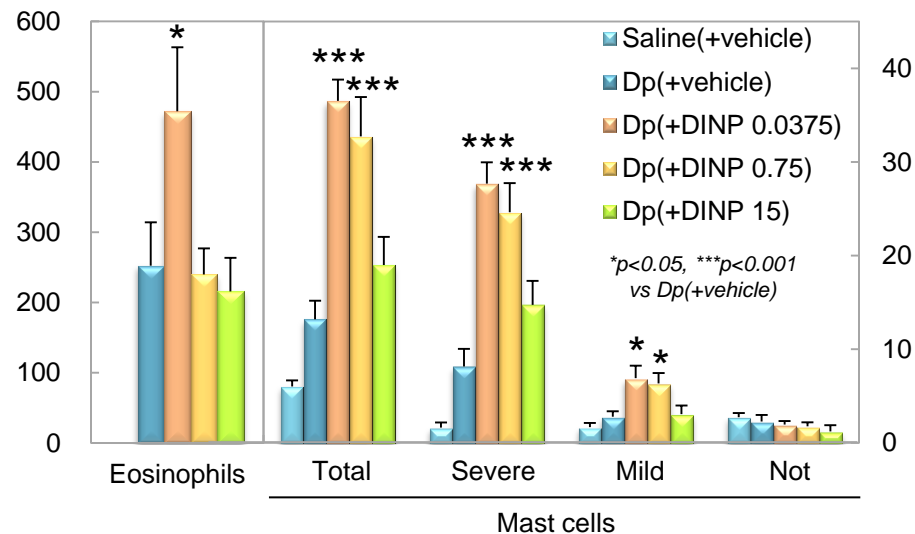
【経母乳(乳児期)曝露】



炎症細胞浸潤/mm



炎症細胞浸潤/mm



“DINPの低用量経口曝露は、炎症細胞浸潤を有意に亢進し、アトピー性皮膚炎症状をも増悪する傾向を示した”

“母乳を介した乳児期のDINP低用量曝露は、炎症細胞浸潤を有意に亢進し、皮膚炎症状をも増悪する傾向を示した”

サブテーマ (2)-2で得られた主な成果

	若齢期曝露				乳児期曝露	
	DEHP	DINP	BPA	BaP	DINP (経母乳)	
					Male	Female
皮膚症状	→	↗	↑	↗	→	↗
炎症細胞浸潤	↑	↑	↗	↗	↑	↑
炎症性因子の発現	↑	↗	↗	↗	→	→
血中抗体産生	↓	↗	→	↗	→	↑

※ ↑ ; 有意な増悪 ↗ ; 増悪傾向 ↓ ; 有意な減少 → ; 影響なし

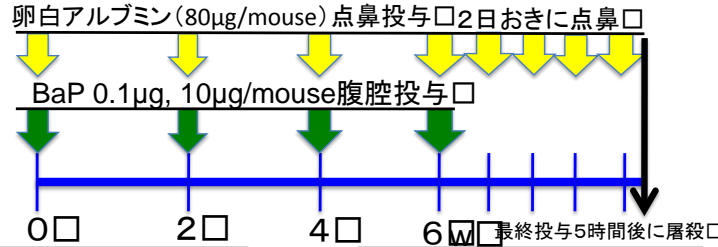
“DINP、BPA、BaPの低用量、経口曝露がアトピー性皮膚炎を増悪することとそのメカニズムを明らかにした。DINPの低用量、乳児期(経母乳)曝露でも皮膚炎は増悪し、次世代影響が存在し、性差がある可能性も指摘した”

サブテーマ (2)-3

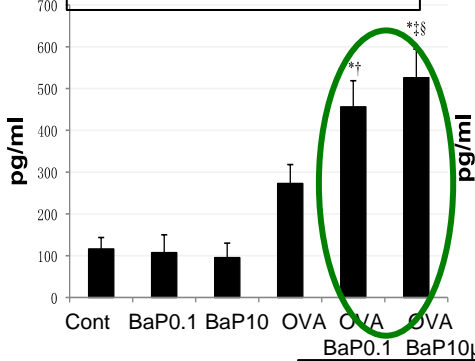
環境化学物質による
アレルギー性鼻炎増悪メカニズムの解明

BaPとDEHPの低用量曝露はアレルギー性鼻炎を増悪した

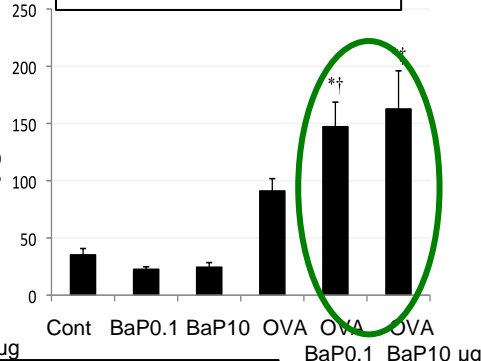
実験方法



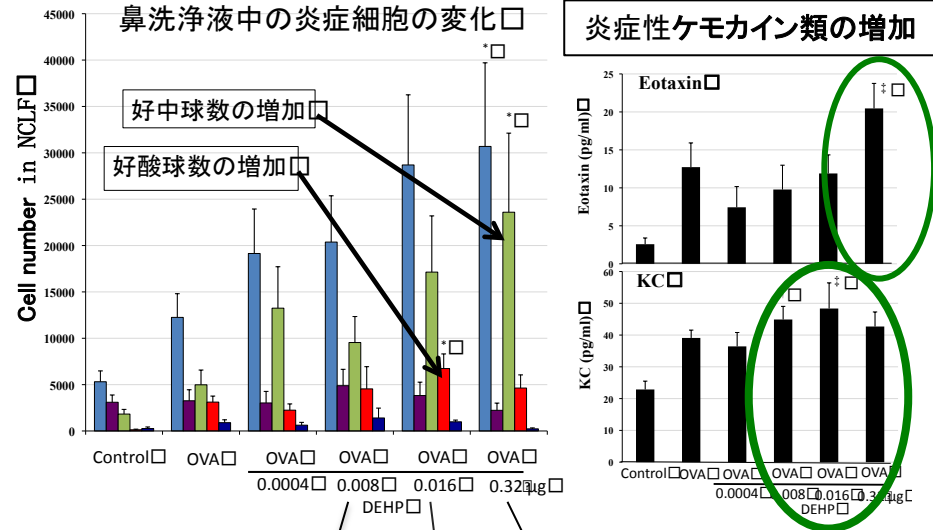
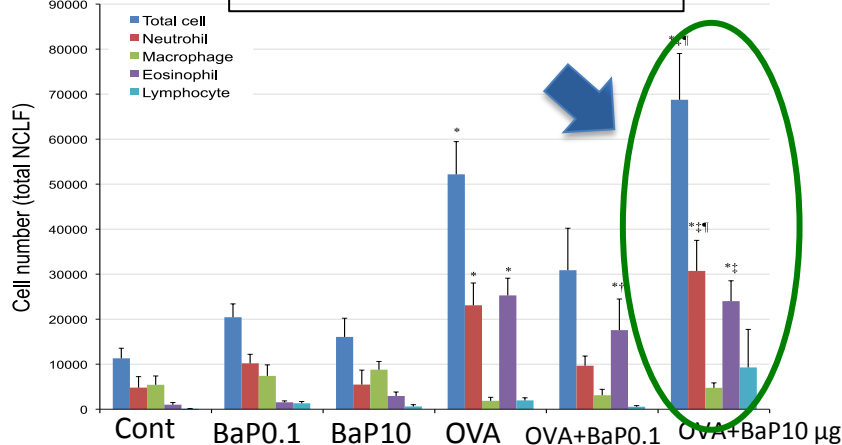
鼻洗浄液中のIL-6増加



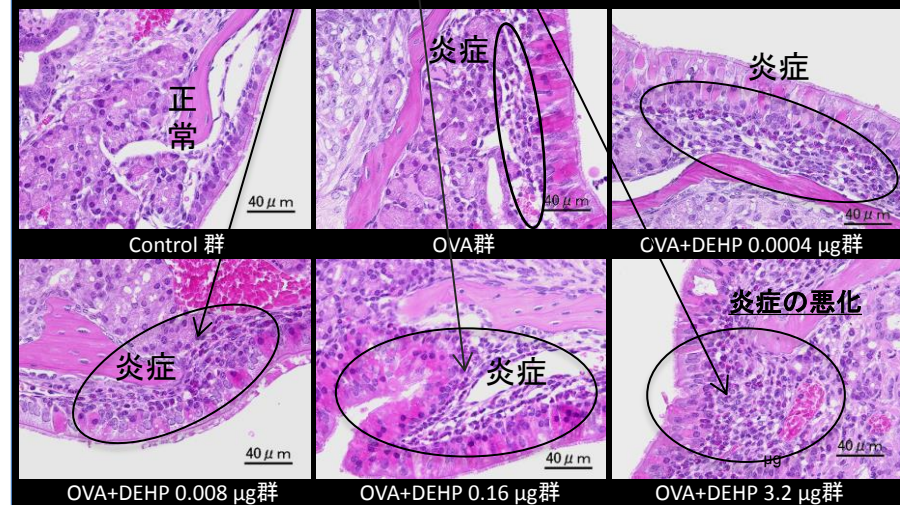
鼻洗浄液のKC増加



鼻洗浄液中の炎症細胞の増加



OVA+DEHPを点鼻投与したマウスの鼻粘膜下の好酸球浸潤



“低用量のBaP腹腔内曝露は、アレルギー性鼻炎の炎症細胞浸潤と炎症性因子の発現を増悪した”

“DEHPの低用量経鼻曝露は、アレルギー性鼻炎の炎症細胞浸潤と炎症性因子の発現を増悪した”

サブテーマ (2)-3で得られた主な成果

若齢期曝露

物質		BaP		DEHP	
鼻洗浄液炎症細胞	マクロファージ	低用量	→	微・低用量	→
		高用量		中・高用量	
	好中球	低用量	↘	微・低用量	↗
		高用量	↗	中・高用量	↑
	好酸球	低用量	→	微・低用量	↗
		高用量		中・高用量	↑
	リンパ球	低用量	→	微・低用量	→
		高用量	↗	中・高用量	
鼻洗浄液サイトカイン類	IL-6	低用量	↗	微・低用量	→
		高用量	↑	中・高用量	
	KC	低用量	↗	微・低用量	↗
		高用量	↑	中・高用量	↑
	Eotxin	低用量	↗	微・低用量	→
		高用量	↘	中・高用量	↗
	IL-13	低用量	→	微・低用量	↑
		高用量		中・高用量	
鼻病理	好酸球炎症	低用量		微・低用量	↗
		高用量		中・高用量	↑
抗体	IgE	低用量	→	微・低用量	→
		高用量		中・高用量	
	IgG1	低用量	→	微・低用量	→
		高用量		中・高用量	

※ ↑ ; 有意な増悪 ↗ ; 増悪傾向 ↘ ; 減少傾向 ↓ ; 有意な減少 → ; 影響なし

“BaP、DEHPの低用量曝露が、アレルギー性鼻炎を増悪することを明らかにし、そのメカニズムを明らかにした”

サブテーマ (2)-4

環境化学物質のアレルギー疾患増悪影響
に対するスクリーニング手法の開発

種々の環境化学物質の *in vitro*, *in vivo* 曝露は免疫担当細胞の機能を変化させた

(*in vitro* 曝露)

(*in vivo* 曝露) (2)-1 喘息モデルを用いた *ex vivo* 解析

フタル酸エステル (DEHP, DINP), BaP, BPA

マウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC)

< 遺伝子発現解析 >

“免疫・炎症反応や防御機構に関わる因子が増加し、IL-6やI型IFNに関連する因子がDEHP, DINP, BaP曝露で共通して変動することを明らかにした”

※ I型インターフェロンはpDC関連因子
⇒環境化学物質による樹状細胞サブセットへの影響？

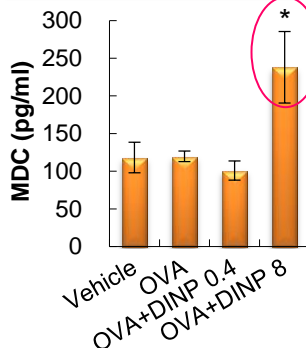
pDC [Plasmacytoid DC]: アレルギーに対し抗炎症
cDC [Conventional DC]: 炎症亢進作用

< 樹状細胞サブセットの解析 >

- ◆ DEHP, DINP, BPA: cDCの分化誘導を促進する傾向
- ◆ BaP: pDCを促進し, cDCを抑制する傾向

“樹状細胞サブセットの分化・活性化過程が修飾されることを明らかにした”

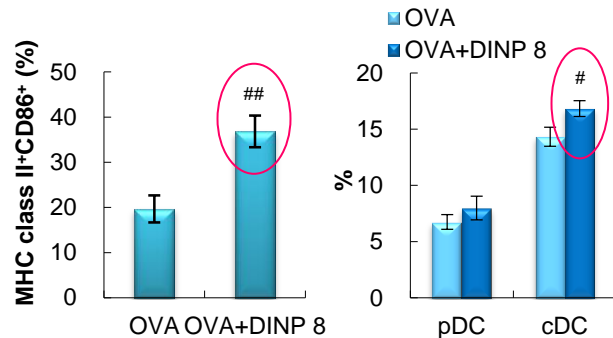
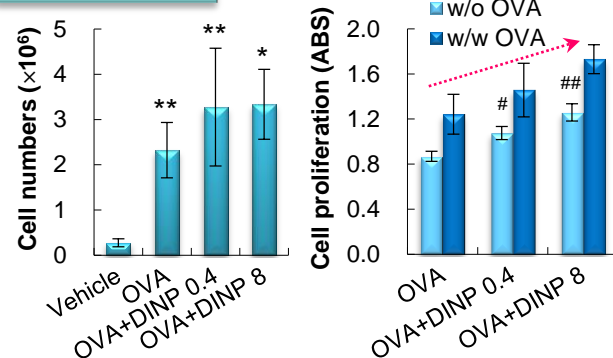
骨髄由来樹状細胞



*p<0.05 vs. Vehicle group,

#p<0.05, ##p<0.01 vs. OVA group

リンパ節細胞



< DINP低用量曝露による影響機序の解析 >

- ◆ 骨髄細胞数, BMDCのTh2ケモカイン産生---増加傾向
- ◆ BMDCにおけるpDCの割合---減少傾向
- ◆ リンパ節細胞の数, 増殖能, Th2サイトカイン産生---増加傾向
- ◆ リンパ節細胞のCD86発現, cDCの割合---増加

“骨髄中の前駆細胞から抗原提示細胞への分化・活性化過程の修飾による免疫応答亢進メカニズムを明らかにした”

サブテーマ (2)-4で得られた主な成果

<i>in vitro</i>	骨髄由来抗原提示細胞に及ぼす影響			
物質	BaP	DEHP	DINP	BPA
BMDC				
- 遺伝子発現	免疫・炎症関連因子、防御系因子 (eg. IL-6や I 型、II 型インターフェロンに関連する因子) ↑			左記の変化なし
- フェノタイプ	CD86 ⁺ 細胞 ↑, サブセット(pDC, cDC)の変化			

<i>in vivo</i>	小児期曝露				乳児期曝露	
物質	BaP	DEHP	DINP	BPA	BaP	
					Male	Female
骨髄細胞	-	細胞数 ↓	細胞数 ↑	-	-	-
BMDC	-	pDC ↓	pDC ↓ MDC, IL-12 ↑	-	-	-
LNC						
- 細胞数	↑	↓	↑	↑	↑	↑
- 増殖能	↑	-	↑	↑	→	↑
- フェノタイプ	MHC ⁺ CD86 ⁺ ↑ cDC ↑	CD11c, CD86 の発現強度 ↑	MHC ⁺ CD86 ⁺ ↑, cDC ↑	MHC ⁺ CD86 ⁺ ↑, cDC ↑	MHC ⁺ CD86 ⁺ ↑	MHC ⁺ CD86 ⁺ ↑, cDC ↑
- サイトカイン (IL-4, IL-5等)	-	-	↑	↑	↑	↑

※樹状細胞サブセット： pDCはアレルギーに対し抗炎症作用、cDCは炎症亢進作用を示す

“BaP、DEHP、DINP、BPAの*in vitro*および*in vivo*曝露が、樹状細胞をはじめとする免疫担当細胞の構成・機能に影響を及ぼすこと、物質共通、および、特異的な変動因子が存在することを明らかにし、バイオマーカー同定と影響メカニズムの解明に役立てた”

サブテーマ(2) 科学的意義

(2)-1: BaP、BPAの低用量、経気道曝露が、小児のアレルギー性喘息を増悪することとそのメカニズムを明らかにした。顕著ではないものの、次世代影響が存在し、性差がある可能性も指摘した。

(2)-2: DINP、BPA、BaPの低用量、経口曝露がアトピー性皮膚炎を増悪することとそのメカニズムを明らかにした。次世代影響が存在し、性差がある可能性も指摘した。

(2)-3: BaP、DEHPの低用量曝露が、アレルギー性鼻炎を増悪することを明らかにし、そのメカニズムを明らかにした。

(2)-4: BaP、DEHP、DINP、BPAの*in vitro*および*in vivo*曝露が、樹状細胞をはじめとする免疫担当細胞の構成・機能に影響を及ぼすこと、物質共通、および、特異的な変動因子が存在することを明らかにし、バイオマーカー同定と影響メカニズムの解明に役立てた。

全体を通し、①一般環境でもその存在が想定されるような少量の環境化学物質の曝露は種々のアレルギー疾患を増悪すること、②曝露経路や病変の主座の相違によって物質の影響は異なること、③経口的、あるいは、リアルワールドで存在する病変局所的な低用量曝露の影響を評価することが重要であることを初めて示した。

「環境化学物質のアレルギー疾患増悪影響の評価にあたっては、スクリーニングされた対象物質について、複数のアレルギー疾患モデルを用い、リアルワールドで想定される曝露経路と曝露量(少量曝露)を念頭に置き、評価・解析を行うことが重要である。」ことを科学的に提言するに至った。

サブテーマ(2) 環境政策への貢献

(2)-1: BaP、BPAの小児期における少量、経気道曝露と乳児期曝露が、アレルギー性喘息の増悪因子であることを示した。また、少量曝露時の次世代影響も検討すべきことを提案できた。

(2)-2: DINP、BPA、BaPの小児期における少量、経口曝露と乳児期曝露が、アトピー性皮膚炎の増悪因子であることを示した。また、少量曝露時の次世代影響も検討すべきことを提案できた。

(2)-3: BaP、DEHPの小児期における少量曝露が、アレルギー性鼻炎の増悪因子であることを示した。

(2)-4: 本研究で見出したバイオマーカーを利用し、アレルギー増悪影響をスクリーニングすることにより、影響の未然防止や化学物質規制対策への提言に貢献する。

全体を通し、これまでも、また、今後も、

①論文発表、学会発表などを通じ、**成果の広報・普及**に努める。

②**アレルギー増悪因子に関する情報を広く提供し、国民の安全・安心の確保と経済的損失の縮小に貢献する。**

③**今回の検討対象物質や可塑剤に関する規制政策の今後の方針に役立てる。**

④**アレルギー増悪影響のスクリーニング手法を開発し、アレルギー疾患を増悪する環境化学物質の探索を容易にし、複数のアレルギー疾患モデルを用いた検討・解析の結果もあわせ、増悪因子の特定に役立てることで、アレルギー疾患患者に対する新たな対策の提案や化学物質規制対策への提言、影響の未然防止に貢献する。**

⑤**エコチル調査を補完し、疫学的観察事項に対し生物学的妥当性を付与すること、エコチル調査において小児アレルギー増加との関連を優先的に調査すべき対象物質を提案することに貢献する。**

5S2-12 環境化学物質による発達期の神経系ならびに免疫系への影響におけるメカニズムの解明



相互に連携しつつ生体機能を統御する
2大高次システムに注目した実験科学的アプローチ

サブテーマ(1): 神経系・行動への影響

胎仔期・新生仔期のビスフェノールA等曝露が脳(病理学的・生化学的変化)と行動、エピゲノムに及ぼす影響の解析



影響のメカニズム解明、神経系機能異常予測に資する分子情報の確立、エピゲノム・バイオマーカーの探索

サブテーマ(2): 免疫系・アレルギーへの影響

ビスフェノールA、フタル酸エステル類、ベンゾピレン等の化学物質曝露がアレルギー性喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎を増悪させるメカニズムの解析、アレルギー疾患増悪影響のスクリーニング手法開発



アレルギー疾患増悪影響評価、メカニズム解明、評価指標(バイオマーカー)の探索、評価手法の開発

大規模疫学調査(エコチル調査)に連携・補完し、疫学的観察事項に生物学的妥当性を付与する