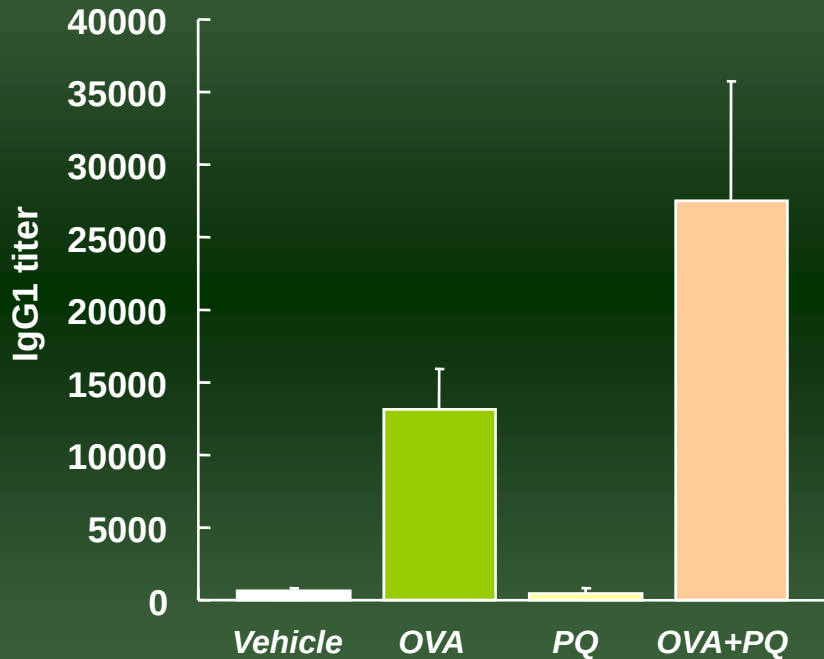


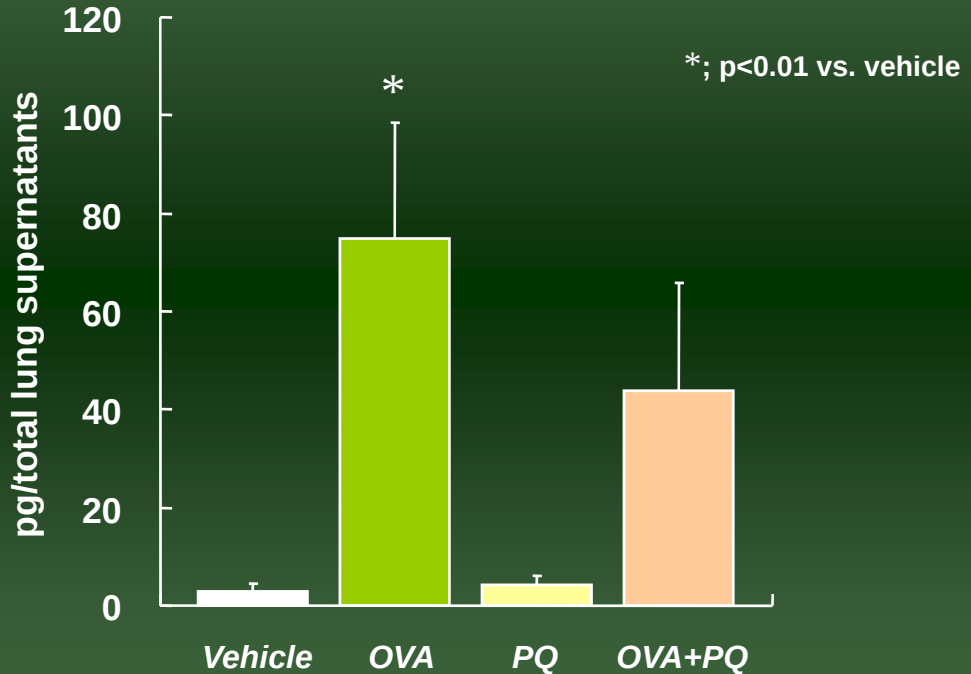
抗体価の変化

Allergen-specific IgG1 titer



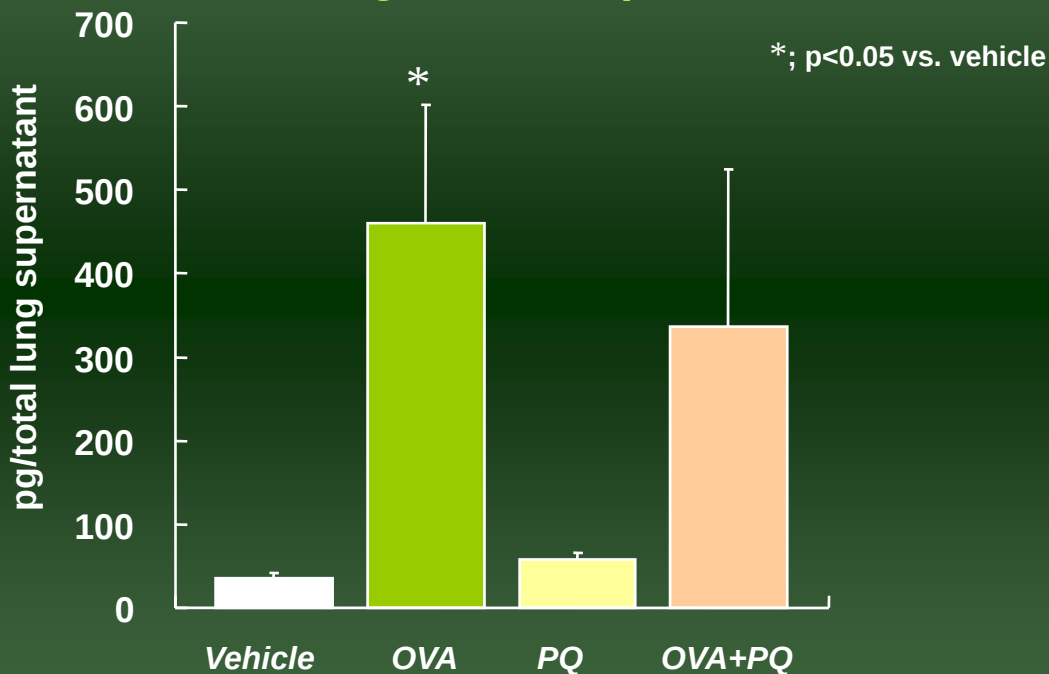
IL-5の肺における発現

IL-5 in lung tissue supernatants



エオタキシンの肺における発現

Eotaxin in lung tissue supernatants



まとめ (Summary)

- ・ ディーゼル排気微粒子に含有される脂溶性化学物質成分が、残渣粒子成分より、アレルギー性気管支喘息を増悪する。(Organic chemicals in DEP can dominantly enhance allergy.)
- ・ アレルギー性気管支喘息の増悪は、化学物質と粒子の併存により顕著に修飾される。(Organic chemicals with particles can synergistically enhance allergy.)
- ・ この増悪作用は、いわゆるTh2タイプのサイトカインやケモカインの発現とよく相関する。(Th2 cytokine are important.)
- ・ キノン系化学物質は、ディーゼル排気微粒子によるアレルギー増悪効果の一部分を担っているが、全てではない。(Quinons partially participate in the enhancement.)

他の環境化学物質の
他のアレルギー疾患への影響は？
(Effects of the other environmental
chemicals on allergy)

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

独立行政法人 国立環境研究所
特別研究

平成17－19年度

背景 (Background)

環境化学物質は年々増加しており、その健康影響を速やかに明らかにする必要がある。また、環境汚染物質の健康影響については、大量曝露による古典的な毒性発現という観点ではなく、低濃度曝露による免疫・アレルギー、内分泌、神経・行動等を主軸とする高次機能への影響という観点から再評価する必要性が増している。

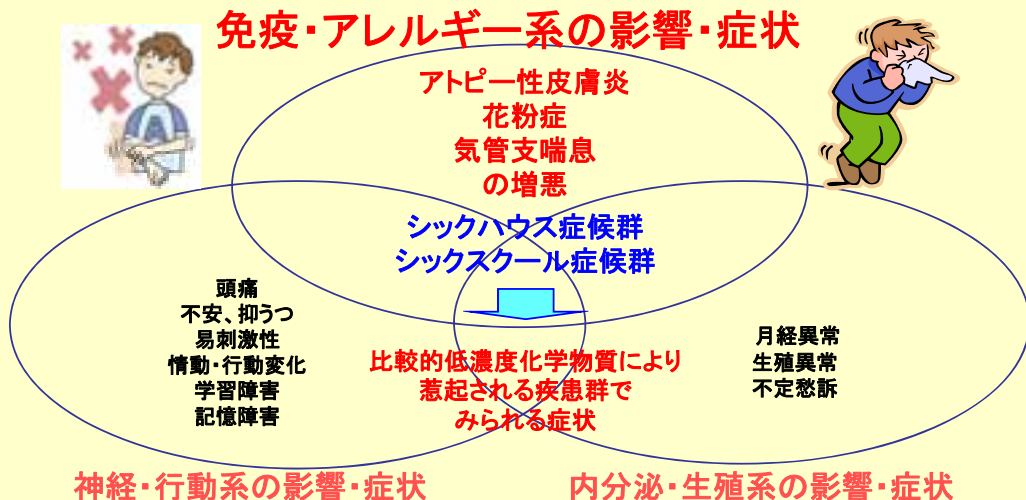
(Low dose effects of increasing environmental chemicals should be evaluated especially with neuro-, immune-, endocrine axis.)

「アレルギー疾患の増加・増悪」に関わる環境要因として 環境化学物質の存在を考慮すべき！

(Can environmental chemicals enhance allergy?!

Lesson from sick building syndrome?)

「シックハウス症候群」や「シックスクール症候群」に見られる化学物質の健康影響は、「アレルギー疾患」を有する人々にアレルギー症状の増悪として発現しやすい。



いかなる化学物質がアレルギー疾患を増悪する可能性があるか
簡易・迅速に評価する必要がある！

目的 (Aim)

免疫・アレルギー系に焦点を当て、環境化学物質の影響をより簡易・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(・検証)し、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。

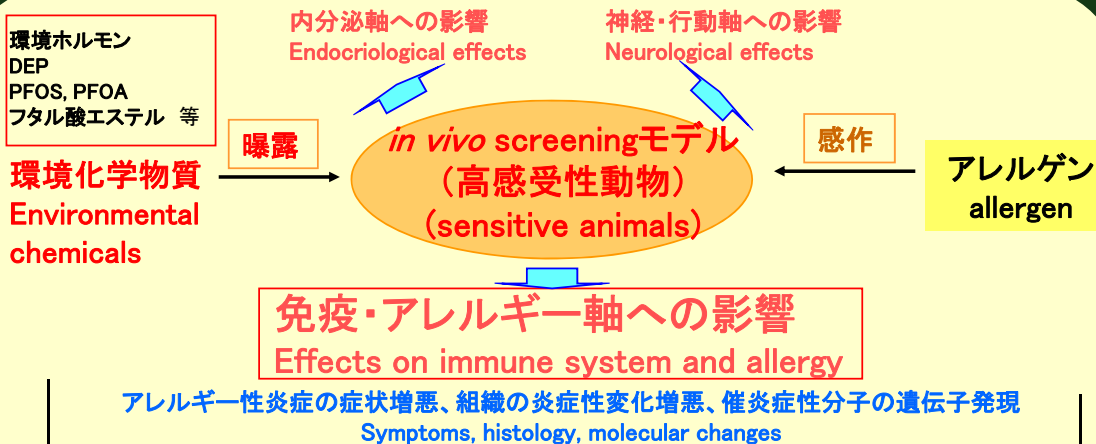
(*In vivo* and *in vitro* screening system, which can easily evaluate the enhancing effects of environmental chemicals on allergy, should be developed.)

本研究課題の成果 (Results)

- (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 (*in vivo* screening)
- (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 (*in vivo* screening using microarray)
 - 2) 培養細胞系を用いた簡易スクリーニング手法の開発 (*in vitro* screening)

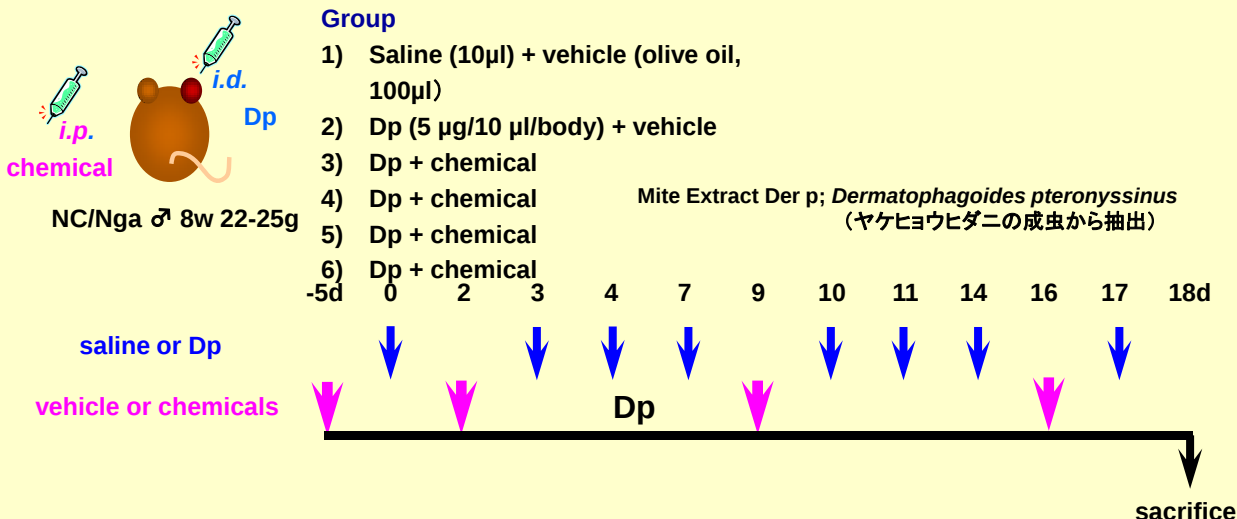
アレルギー増悪影響を評価する手法の開発と検証 (*in vivo* screening model)

環境化学物質のアレルギー増悪影響を検知する
in vivo screening モデルをわれわれは既に開発している！



影響評価
assesment

対象と方法 (Materials and methods)



評価項目

✓ **clinical skin severity score** (各Dp投与24時間後に評価)

耳介部につき、4徴候[乾燥肌、発疹、掻爬傷、浮腫]

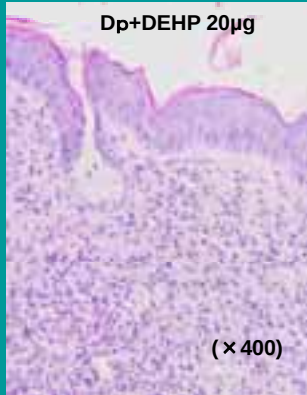
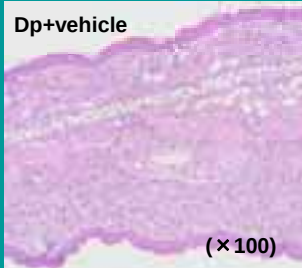
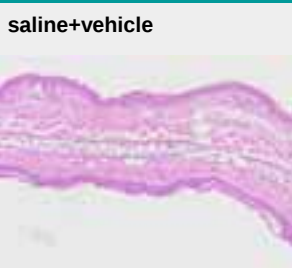
4段階[0:無し、1:軽度、2:中程度、3:重度]で評価。満点は12点

✓ **耳介厚測定** (腫脹の指標。各Dp投与24時間後に評価)

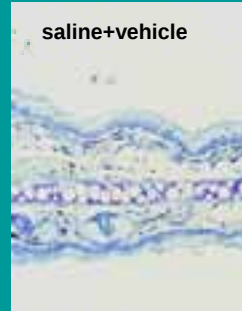
フタル酸ジエチルヘキシルはアトピー性皮膚炎を増悪する

DEHP enhances atopic dermatitis in our *in vivo* screening model.

HE stain



Toluidine Blue stain



DP: ダニアレルゲン (mite allergen)

DEHP: フタル酸ジエチルヘキシル

Dp+vehicle

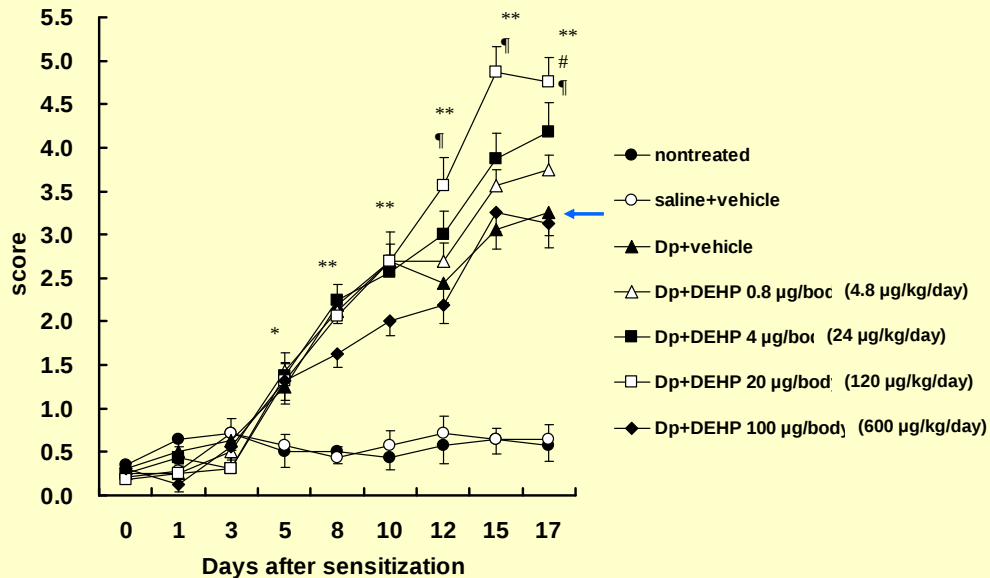


saline+vehicle

Dp+DEHP (20 µg: われわれが日常的に曝露を受ける程度の量)

DEHPはアトピー性皮膚炎を増悪する

DEHP enhances clinical scores



*; $p < 0.05$ Dp treated group vs. nontreated group and saline+vehicle group

**; $p < 0.01$ Dp treated group vs. nontreated group and saline+vehicle group

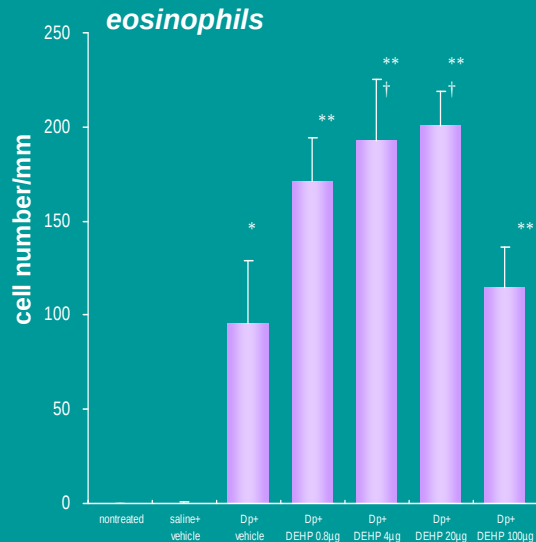
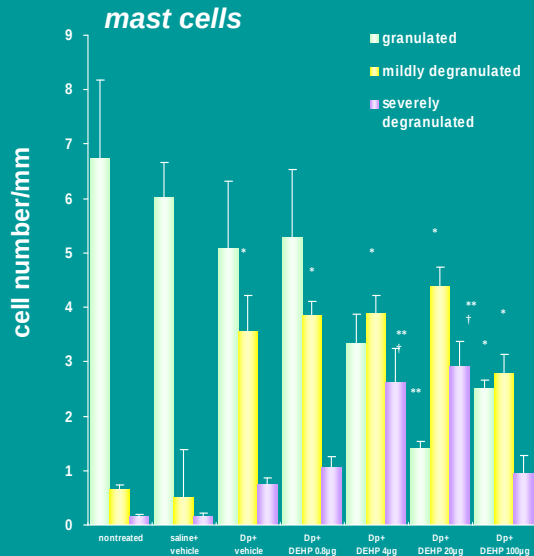
#; $p < 0.05$ Dp ext.+ DEHP 4 µg/body group vs. Dp+ vehicle group

†; $p < 0.01$ Dp ext.+ DEHP 20 µg/body group vs. Dp+ vehicle group

Takano H, et al.: Env Health Persp, 2006.

DEHPは皮膚炎を組織学的にも増悪する

DEHP enhances histological findings

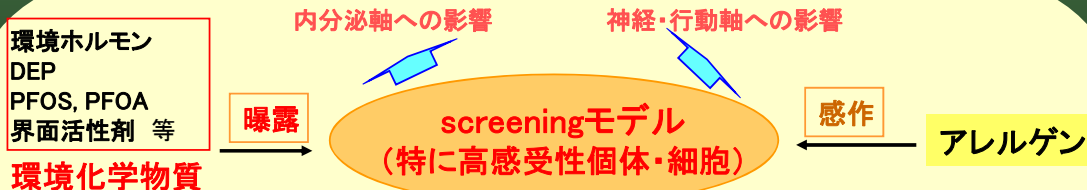


*; $p < 0.01$ vs. nontreated group and saline+vehicle group

†; $p < 0.01$ vs. Dp+ vehicle group

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

Improvement of screening system



免疫・アレルギー軸への影響

アレルギー性炎症の症状増悪、組織の炎症性変化増悪、催炎症性分子の遺伝子発現

影響評価

DNAマイクロアレイ等の包括的解析手法を活用し、早期に増悪影響を評価できる指標分子を探索・選択し、活用する (DNA microarray)

+

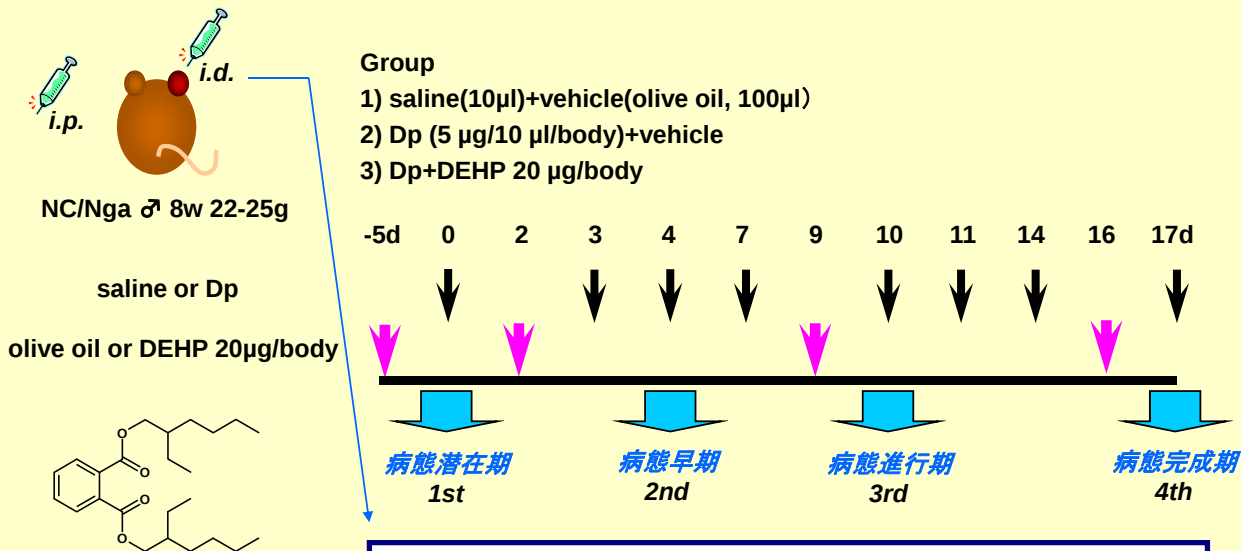
培養細胞を用いた *in vitro* screening 手法を開発する

アレルギー増悪影響を簡易(easy)・迅速(rapid)・広汎(broad)・高感度(sensitive)に評価できる手法(evaluation system)を検討・開発する

本研究課題の成果

- (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
- (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 (*in vivo* screening using microarray)
 - 2) 培養細胞系を用いた簡易スクリーニング手法の開発

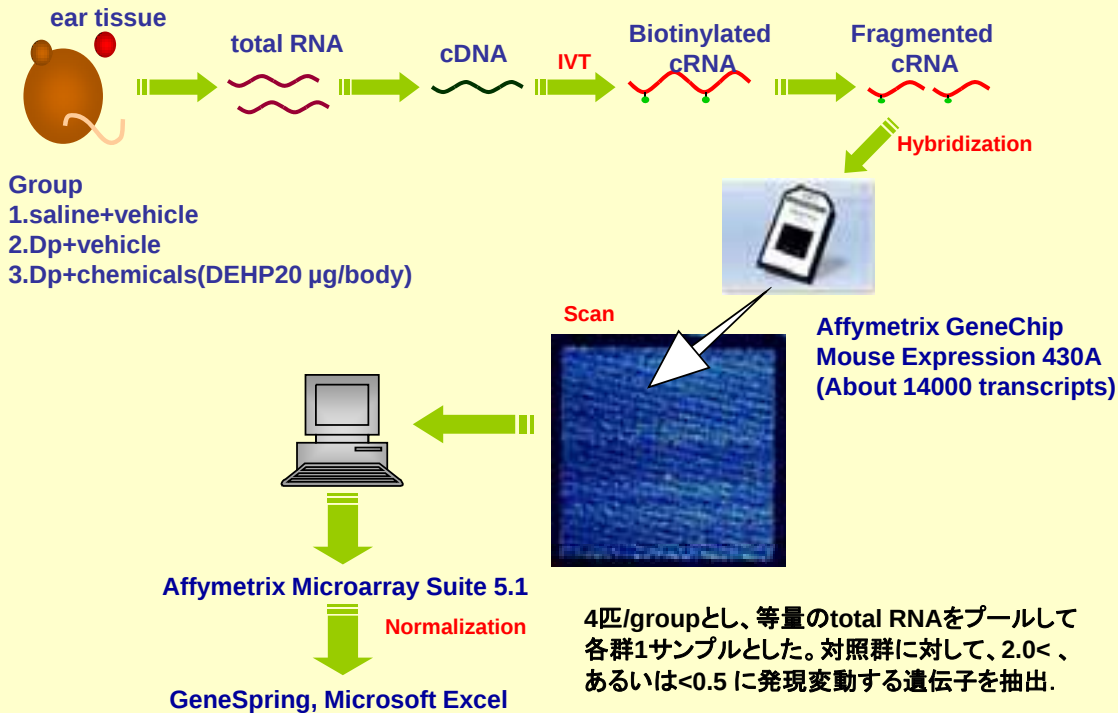
DNAマイクロアレイを用いた 短期スクリーニング手法の開発 (*in vivo* screening using microarray)



in vivo スクリーニングモデルにおける遺伝子発現変動を、病態の進行の各段階において解析する。解析遺伝子の中から、(早期に)変動する遺伝子を検索する。

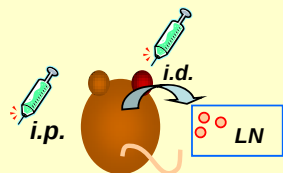
We examined global expression of genes in our *in vivo* screening model at multiple time points, and selected biomarker genes which show changes at earlier stages.

耳介部組織におけるcDNAマイクロアレイ解析 Methods for microarray analysis



顎下リンパ節組織を用いた遺伝子発現解析

Microarray analysis using lymphnodes



NC/NgaTndCrj (NC/Nga)
♂ 8w 22-25g

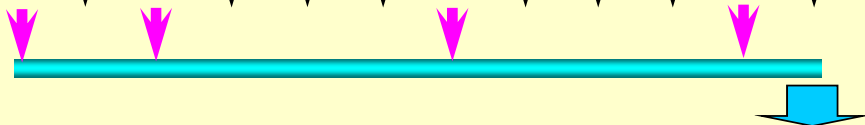
Group

- 1) saline(10 μ l)+vehicle(olive oil, 100 μ l)
- 2) Dp (5 μ g/10 μ l/body)+vehicle
- 3) Dp+DEHP 20 μ g/body

-5d 0 2 3 4 7 9 10 11 14 16 17d

saline or Dp (*i.d.*)

olive oil or DEHP (*i.p.*)

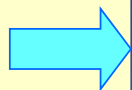


Microarray; GeneChip Mouse Expression 430A

2回独立の動物実験を行い(4匹/group)、それぞれで抽出された遺伝子
($2.0 < \text{or} < 0.5$)で共通していた因子のシグナル比の平均値を比較

病態完成期
4th

複数の実験系により、500弱の変動遺伝子を選抜し、アレルギー増悪影響を評価するDNAチップを作成した



本研究課題の成果

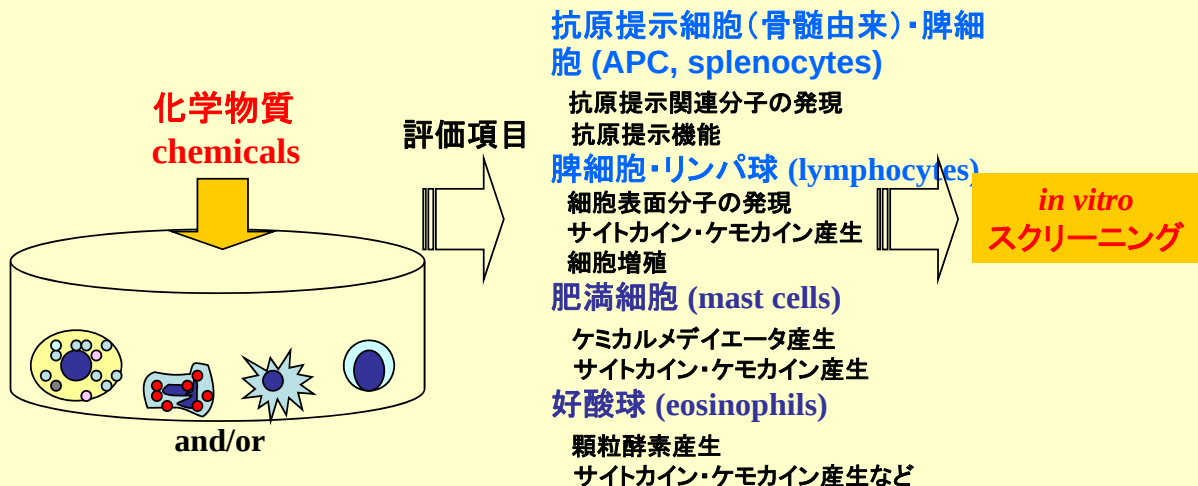
(1) *in vivo* スクリーニングによる化学物質のアレルギー増悪影響評価

(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

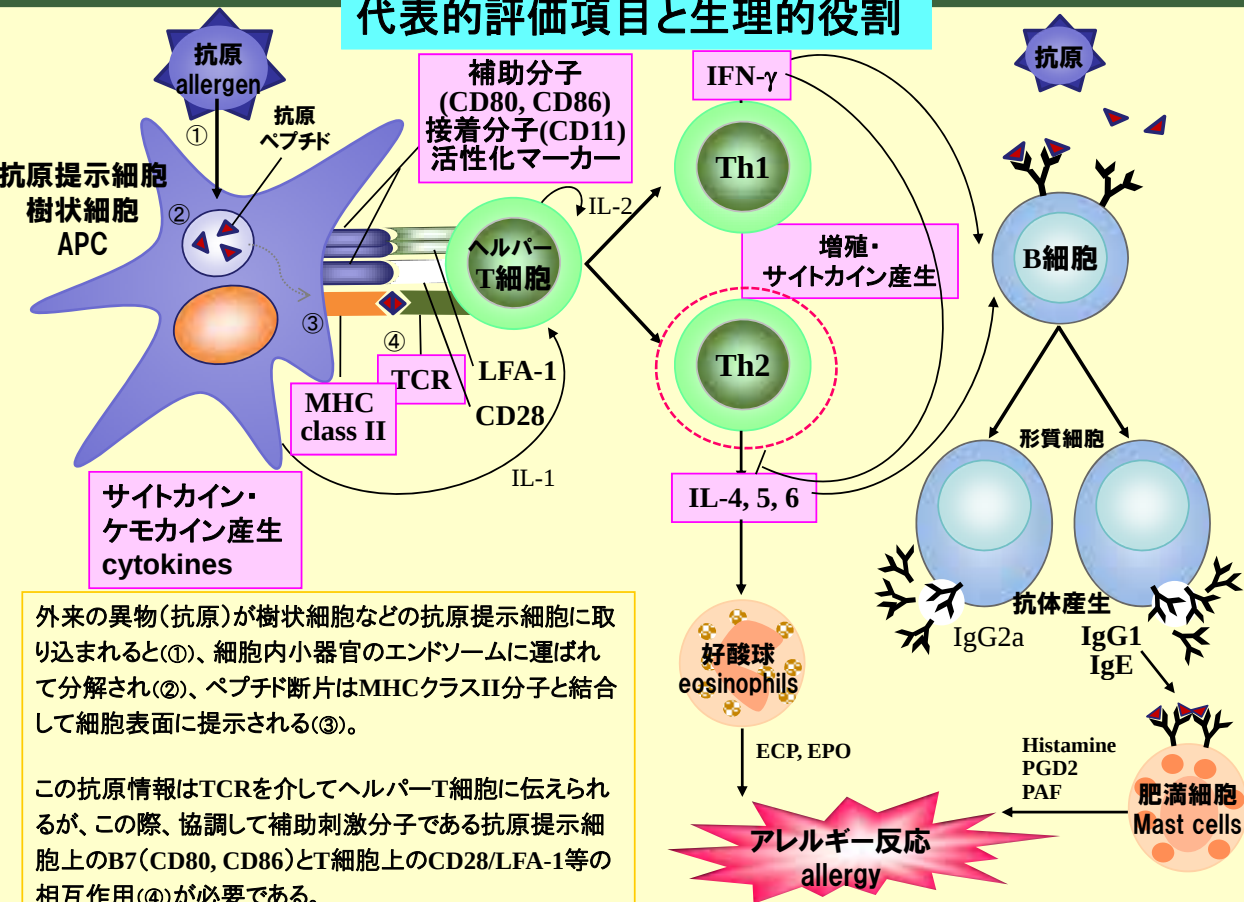
2) 培養細胞系を用いた簡易スクリーニング手法の開発 (*in vitro* screening)

培養細胞系を用いた 簡易スクリーニング手法の開発 in vitro screening system



アレルギー反応に関わる免疫担当細胞の培養系を用いて、
in vivo の結果を反映するより簡易な *in vitro* スクリーニング手法について検討した。

代表的評価項目と生理的役割



外来の異物(抗原)が樹状細胞などの抗原提示細胞に取り込まれると①、細胞内小器官のエンドソームに運ばれて分解され②、ペプチド断片はMHCクラスII分子と結合して細胞表面に提示される③。

この抗原情報はTCRを介してヘルパーT細胞に伝えられるが、この際、協調して補助刺激分子である抗原提示細胞上のB7(CD80, CD86)とT細胞上のCD28/LFA-1等の相互作用④が必要である。

骨髓由来抗原提示細胞を用いた評価系 対象と方法

In vitro screening system using bone marrow-derived APC

NC/NgaTndCrj (NC/Nga)



マウス



大腿骨
femule

骨髓細胞
Bone marrow cells



GM-CSF等存在下で培養



培地添加



3日目

培地交換



6日目

化学物質への曝露
Exposure to chemicals

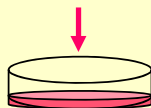


8日目

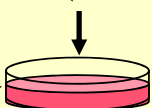
24時間

影響評価
assesment

化学物質への曝露



培地添加 (+化学物質)



3日目



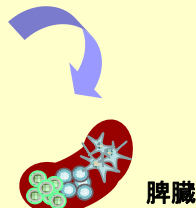
6日目

影響評価
assesment

脾細胞を用いた評価系 対象と方法

In vitro screening system using splenocytes -Methods-

NC/Ngaマウス
(♂ 12-15 wks)



脾細胞 splenocytes
($1 \times 10^6/\text{ml}$)



<対象化学物質>

*in vivo*で皮膚炎症状の増悪が認められた以下の化学物質を先導的に選択した。

フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP)

フタル酸ジイソニル (DINP)

ビスフェノールA (BPA)

化学物質 chemicals (0.1~100 μM), 24hrs

化学物質 (0.1nM~10 μM) + Dp (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 72hrs

細胞表面分子の発現 (surface marker expression)
(TCR, CD3, CD28, IL-4R, MHC class II, CD80, CD86)

FACS

Th1/Th2 サイトカイン産生 (Th cytokine production)
(IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-10)

ELISA

ダニアレルゲン (Dp) 刺激細胞増殖
(Allergen-activated lymphocyte proliferation)

ELISA

結論 (Conclusions)

アレルギー増悪影響を皮膚炎病態により判定することが可能な *in vivo* スクリーニングモデルを用い、複数の環境化学物質のアレルギー増悪影響を評価した。

検討対象とした物質の一部、ある種のフタル酸エステル類、キノン類、ビスフェノールA、ベンゾピレン、スチレン等が、既報告の No Adverse Effect Level (NOAEL) 近傍、もしくは、より低用量でアレルギー増悪作用を発揮することを明らかにした。

DNAマイクロアレイを用いた短期スクリーニング手法と抗原提示細胞(樹状細胞)、脾細胞等を利用した *in vitro* スクリーニング手法を開発し、その有用性を検証した。

より簡易で汎用性に富み、*in vivo* スクリーニングをよく反映する有望な *in vitro* スクリーニング手法を提案することができた。

We have developed *in vivo* screening system using a murine model of atopic dermatitis, which can evaluate the enhancing effects of environmental chemicals on allergic diseases in a few weeks.

Our results have indicated that phthalates, quinones, BaP, and ST can enhance allergy at relatively low doses.

We are now developing and improving screening system using microarray and *in vitro* screening system for environmental chemicals, which correlates with their *in vivo* effects on allergy.

Contributors

国立環境研究所 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

桜井美穂

植木尚子

阿部学