

課題名	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
課題代表者名	伏木 信次（京都府公立大学法人 京都府立医科大学 副学長・大学院医学研究科 分子病態病理学 教授）
研究実施期間	平成22～25年度
累計予算額	158,839千円（うち25年度32,011千円） 予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 環境化学物質、ビスフェノールA、脳形成、神経伝達物質、行動異常、エピゲノム、アトピー性皮膚炎、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、評価手法

## 研究体制

- サブテーマ(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  
 サブサブテーマ(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（京都府立医科大学）  
 サブサブテーマ(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（京都府立医科大学）
- サブテーマ(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  
 サブサブテーマ(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(京都大学、(独)国立環境研究所)  
 サブサブテーマ(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((独)国立環境研究所、大分県立看護科学大学)  
 サブサブテーマ(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(大分県立看護科学大学)  
 サブサブテーマ(2)-4)環境化学物質のアレルギー性疾患増悪影響に対するスクリーニング手法の開発(京都大学、(独)国立環境研究所)

## 研究概要

### 1. はじめに(研究背景等)

小児における発達障害患児の増加が、近年注目され、その発生に環境中の化学物質が関連しているのではないかと指摘がなされている。環境化学物質の中でプラスチック素材として汎用されているビスフェノールA (BPA)は、ヒト血清や尿、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。他方で、胎生期から授乳期にかけてのBPA曝露が脳形成・脳機能に及ぼす影響を広く調べた報告はこれまでなく、その影響の詳細を多角的に明らかにし、その作用メカニズムを解明することが急務である。

われわれは胎生期BPA曝露が、マウス大脳皮質形成過程における神経細胞の分化・移動、神経回路形成に影響を及ぼすこと、また胎仔期エピゲノムに変化をもたらすことを報告してきたが、その実験系ではBPA投与経路が、自然により近い経口曝露ではなかった。また発達障害との関連を論じるにはその科学的根拠が未だ十分ではない。そこで妊娠期から授乳期にかけて母マウスへの経口的曝露を介して、経胎盤的ならびに母乳摂取によって、仔が低用量BPAに持続曝露される実験系を作製し、組織形態学的、神経化学的、行動学的、分子生物学的な手法を駆使して多角的に解析すること、とりわけ大脳皮質以外の脳領域においてBPA曝露の影響が見られるかどうか、さらにエピゲノム変化が生後も維持されるかどうかを解明することが、BPAの規制やヒトでの影響評価を行ううえで重要であると考えた。

近年、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、花粉症等のアトピー・アレルギー疾患が小児・若年者を中心に急増している。アレルギー疾患急増の主因は環境要因の急変と考えられ、衛生環境、食環境、住環境の変化とともに、環境汚染の関与が指摘されてきた。われわれは、ディーゼル排ガス微粒子(DEP) がアレルギー性喘息を増悪することを明らかにし、疫学的既報に実験的論拠を与えた。その後、DEPに含まれる脂溶性化学物質(群)の経気道曝露やプラスチック可塑剤であるフタル酸ジエチルヘキシル(DEHP)等の環境化学物質の腹腔内曝露が、アレルギー性喘息やアトピー性皮膚炎を増悪することも報告した。特に、DEHPは、少量、若齢期の曝露や乳児

期の曝露によってもアトピー性皮膚炎増悪影響を發揮した。しかし、莫大な数にのぼる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未だに不十分であり、環境化学物質のアレルギー増悪影響を簡易・迅速・高感度にスクリーニングできる評価系も確立されていない。このため、フタル酸エステル類、ベンゾピレン(BaP)、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対策として重要である。

## 2. 研究開発目的

サブテーマ1では、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て、以下の二つを目標とした。①胎生期から授乳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、脳の領域ごとに病理学的・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。血液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では、フタル酸エステル類(DEHP、フタル酸ジイソノニル:DINP)、BaP、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、BPA、BaP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、次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。

## 3. 研究開発の方法

### (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

妊娠マウス(C57BL/6J)に胎生0日から生後の3週間まで連日、経胃管投与によってBPAを5 µg/kg bw/day, 50 µg/kg bw/day, 500 µg/kg bw/day投与するモデル系を作製した。Vehicle群(非曝露対照群)には0.01%エタノールを投与した。これらマウスを対象に、bromodeoxyuridine標識による大脳皮質、海馬、基底核、視床手綱核、視床下部、脳幹、小脳における神経細胞増殖・分化・遊走の解析、青斑核(Locus coeruleus: LC)の発生・分化、青斑核の大脳皮質投射形成に関する形態学的解析を行った。性的二型核の一つであるLCについては、胎生12日、14日、18日、生後3週、生後8週、16週齢のマウスにおいて、チロシン水酸化酵素(Tyrosine hydroxylase: TH)を含有するノルアドレナリン作動性神経細胞をTHの免疫染色を行い計測した。また、生後8週齢のマウスのLCに関して、TH免疫染色を施した4µm厚の連続組織切片を用いて3次元再構成を行い、当該核の形状、容積を調べた。さらにLCのノルエピネフリン作動性神経細胞が投射する大脳皮質:前頭前皮質に着目し、生後3週、生後8週、16週齢のマウスにおいて40 µm厚の凍結切片を作製し、免疫蛍光染色によるノルエピネフリントランスポーター(Norepinephrine transporter)陽性線維密度を計測した。

行動学的解析については、胎生期・授乳期にBPAを500 µg/kg bw/dayあるいはvehicleを投与された生後11週～15週齢のマウスを対象として、IntelliCageを用いて社会行動の評価を行った。IntelliCageは、自動制御・24時間モニタリングとRFタグでの個体認識により、集団生活環境下での行動実験が可能である。IntelliCageの4隅のコーナーに設けられた水ボトルへのアクセス・飲水という報酬行動を評価することで、マウス個体における嗜好の成立、情動性、自閉性などを抽出した。プロトコルは、実験開始後2日間はIntelliCageの4コーナーすべてを自由に訪問し、各コーナーに2ヶ所設置された水ボトルにアクセス・飲水が可能な適応期とした。その後、コーナーにある水ボトルにはシャッターが設置され、ノーズポークをすることでシャッターが開き飲水が7秒間可能となる条件を設定し、飲水という報酬に対するマウスの集団生活下での各個体の行動を解析した。

神経伝達物質の生化学的解析については、胎生期・授乳期にBPAを500 µg/kg bw/dayあるいはvehicleを投与された生後13週～16週齢のマウスを対象として、速やかにマウス脳を摘出後、大脳皮質前頭前野近傍、基底核、海馬、扁桃核、視床、視床下部、中脳黒質、背側縫線核、青斑核の9領域に正確に分割し、液体窒素にて測定まで凍結した。HPLC-ECD, LC-MSを用いて、各脳領域のドパミン(Dopamine:DA)、ドパミン代謝産物(DOPAC)、セロトニン(5HT)、セロトニン代謝産物(5-HIAA)、ノルエピネフリン(NE)、ガンマアミノ酪酸(GABA)、グルタミン酸(Glu)を測定した。

### (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

動物および核酸の抽出精製:(1) - 1)に記載した方法でマウスを作製し、生後3週齢(P3W)または13-14週齢(P13-14W)時点で雌雄別に、心臓採血により全血を採取した。その後脳を採取し9領域(大脳皮質・海馬・中脳・小脳・基底核・視床・視床下部・扁桃核・脳幹)に分割した。全血および脳組織からゲノムDNAを、脳組織か

らはRNAを抽出した。なお、解析用のゲノムDNAとRNAは、同一の組織溶解液から同時に抽出精製した。

継世代影響解析用マウス家系の作出は以下のように行った。妊娠全期間を通じてBPAに曝露した母マウス(C57BL/6J) (以下F0マウス)から生まれた仔マウス(以下F1マウス)に、出生直後(生後0日)から21日目まで経母乳的にBPAに曝露する群とvehicleのみ投与する対照群を作製した。8週齢になったF1マウスの雌雄それぞれを、BPA非曝露マウス(8週齢)と交配し、F2マウスを得た(BPAは非投与)。同様にF3マウス・F4マウスを作出した。F1～F4の各個体(P3W)について、雌雄別に核酸抽出用と交配用の2群に分けた。

**遺伝子発現変動の解析:** 同腹仔雌雄1対ずつを妊娠マウス4匹から取得し、蛍光1色標識マイクロアレイ法(Agilent SurePrint G3 Mouse GE microarray 8x60k (large intervening non-coding RNA probe 搭載))に用いた。変動遺伝子抽出は、volcano plot法により行った。また、個体間での総当たり比較による発現変動遺伝子候補の抽出も行った。抽出された変動遺伝子候補の生物学的情報は、Cytoscape、PPI network(Genome Network Platform Viewer)、Pathway Studioを用いて検索した。遺伝子発現変動をStepONE plusにより確認した。

**網羅的DNAメチル化変動解析:** プロモーターやその周辺領域でのメチル化変動をゲノムワイドに効率的に検出できるMIAMI法により解析した。解析に用いるDNAは発現解析に用いた同一個体から得た。なお、MIAMI法によるメチル化変動アレイ解析を行うに先立ち、解析対象の絞り込みを主成分解析により行った。メチル化変動候補配列のメチル化状態の確認には、メチル化感受性制限酵素を用いた定量PCR法(MS-qPCR)により実施した。ゲノムDNAの制限酵素処理には、MIAMI法と同じ*Msp* I、*Hpa* IIを用いた。

**個別遺伝子における1塩基レベルでのメチル化変動解析:** ゲノムDNAをBisulfite処理し、サンプル量の少ない血液DNAについては更に全ゲノムDNA増幅法によりBisulfite処理DNAの増幅を行った。これらDNAを鋳型とするPCR反応を行い、標的配列領域を増幅した。この反応産物の塩基配列を決定すること(Bisulfite Sequencing法)により注目配列領域中のCpGメチル化率を調べた。

#### (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

若齢期のアレルギー性喘息モデルマウスを、1) 溶媒投与群、2) アレルギー性喘息(卵白アルブミン:OVA)群、3) OVA+環境化学物質1/400投与群、4) OVA+環境化学物質1/20、5) OVA+環境化学物質投与群の5群に分け、DEHP、DINP、BPA、BaPを経気道曝露した。環境化学物質は、大気中の予測最大曝露量の100倍量を最高用量とし、その1/20、1/400の3用量を設定した。気道炎症、抗原特異的抗体産生、肺の病理組織学的変化、炎症性分子の発現等を評価した。また、環境化学物質を乳児期曝露し、仔のアレルギー性喘息への影響も検討した。

#### (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

若齢期のアトピー性皮膚炎モデルマウスを、1) 溶媒投与群、2) アトピー性皮膚炎(ダニアレルゲン:Dp、皮内注射)群、3) Dp+環境化学物質1/400 NOAEL(過去の報告値)投与群、4) Dp+環境化学物質1/20 NOAEL投与群、5) Dp+環境化学物質NOAEL投与群の5群に分け、DEHP、DINP、BPA、BaPを経口曝露した。皮膚症状、炎症性分子の発現、抗体産生、皮膚の病理組織学的変化等を評価した。また、乳児期に経母乳的に環境化学物質を曝露し、仔のアトピー性皮膚炎への影響も検討した。

#### (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

1) OVA存在下、マウス由来マクロファージ様細胞株(RAW264.7細胞)を用い、炎症性分子の遺伝子発現に対するBPAとDEHPの量-反応関係を調べた。2) 比較的高濃度のBPAをマウスの腹腔内に曝露し、スギ花粉抗原(Cryj1)経鼻曝露によるアレルギー性鼻炎への影響を検討した。3) 低用量のBPAをOVAと共に経鼻曝露し、アレルギー性鼻炎への影響を調べた。4) 低用量のDEHPをOVAと共にマウスに経鼻曝露し、アレルギー性鼻炎への影響を検討した。5) 低用量のBaPを腹腔内曝露し、OVA経鼻曝露によるアレルギー性鼻炎への影響を検討した。なお、*in vivo*における検討では、炎症性分子の発現、抗体産生、病理組織学的変化等を評価した。

#### (2)-4) 環境化学物質のアレルギー性疾患増悪影響に対するスクリーニング手法の開発

BaP、DEHP、DINP、BPAを評価対象とし、これらの環境化学物質が、*in vitro*で主要な抗原提示細胞である樹状細胞に及ぼす影響とアレルギー性喘息モデルマウスにおける免疫担当細胞の機能やサブセットに及ぼす影響について、分子生物学的・生化学的手法により解析した。

### 4. 結果及び考察

#### (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

**a. 神経細胞増殖・分化・遊走に関する形態学的解析:** BPA曝露マウスの大脳皮質体性感覚野において神経細胞分布異常を見出した。この変化には、性差、BPA曝露用量への依存性はなく、5 µg/kg bw/dayの極低用量でも有意な差異がみられた。神経細胞の分化・遊走過程にBPAが作用した可能性が考えられるが、胎生14.5日に分化した神経芽細胞に限られた変化であったことから、BPAの大脳皮質形成過程に及ぼす影響には臨界期の存在が示唆される。海馬、基底核、視床手綱核、視床下部、脳幹、小脳に神経細胞の分化・遊走の異常

はみられず、影響は脳皮質に特異的かつ限定的であった。われわれは既にBPA胎生期曝露による脳皮質形成過程への影響解析結果を報告しているが、マウス系統、投与方法、投与量、投与期間を変更しても脳皮質形成過程へのBPA曝露の影響に高い再現性がみられたことは特筆すべきと考える。

**b. 青斑核(Locus coeruleus: LC)の発生・分化に関する形態学的解析:** LCにおけるTH陽性神経細胞の解析から、胎生期・授乳期におけるBPA曝露は、雌の成熟過程である生後3週から8週齢-ヒトでは思春期に相当すると考えられる時期-において、LCの神経細胞数をvehicle群雄と同レベルまで減少させ、性差の逆転、即ち雌の雄化という現象を惹起した。当該変化が、低用量(50 µg/kg/day)のBPAを妊娠・授乳期間中の母体に経口投与することで引き起こされたことは重要である。LCの連続組織切片を用いたコンピュータによる3次元構成を行い、LCの容積、形状の凹凸を解析したところ、LCの表面性状が不規則な凹凸を示すことが明らかになった。LC内の部位による構成神経細胞のBPA感受性の差異を反映している可能性がある。

**c. 青斑核(Locus coeruleus: LC)の脳皮質投射形成に関する形態学的解析:** LCにおけるTH陽性ノルエピネフリン作動性神経細胞総数は、b.に記載したように性差の逆転を生後3週、8週齢でみとめたが、その主たる投射先である前頭前皮質における投射線維密度には変化がなかった。BPA曝露により有意に減少したLCのノルエピネフリン作動性神経細胞が脳皮質以外の領域に投射する細胞であった可能性や神経細胞軸索終末での分枝数の増減がフィードバック機構により惹起された可能性などが考えられる。

**d. 行動学的解析:** BPA投与群雄では、vehicle群雄に比し、コーナー滞在時間が夜間・昼間ともに有意に長く、報酬の得られない(=飲水しない)条件でも有意差を示し、コーナーに対する嗜好性も形成された。また、BPA投与群雄では、前者のマウスにひき続いてコーナーを訪問する性向がみられ、特に報酬行動(=飲水する)の場合に顕著であった。これらはBPA曝露マウスの社会行動の異常であり、自閉性、固執性、情動性などが関与している可能性があり、海馬-中隔-中脳腹側被蓋野を結ぶ報酬系のかく乱がその病態背景として考えられる。

**e. 神経伝達物質の生化学的解析:** BPA曝露群雌では脳皮質、基底核、扁桃核、海馬、視床下部、視床、中脳黒質でGABA、Gluの有意な増加、脳皮質、視床、視床下部でNEの有意な増加をみた。BPA曝露群の雄では、扁桃核と海馬でGABAの有意な減少、Gluの有意な増加がみられ、BPA曝露影響に雌雄差をみとめた。LCのノルエピネフリン作動性神経細胞にBPA曝露の影響・雌雄の差異が消失する16週齢において、BPA曝露群雌の脳皮質でNE量が有意に増加していたことは、LCの神経細胞数とは関係なく、ノルエピネフリン作動性神経細胞の機能亢進状態が基盤にあることを示唆する。

**f. 社会行動と神経伝達物質変動の相関:** BPA曝露群雌では、昼間の報酬行為を伴わない(=飲水しない)コーナー訪問回数が有意に減少していたが、この行動と脳皮質、視床におけるNEの増加が有意な相関を示した。一方、BPA曝露群雄では、vehicle群雄に比し、コーナー滞在時間が夜間・昼間ともに有意に長く、報酬の得られない条件(=飲水しない)でも有意差を示しており、コーナーに対する嗜好性が形成された。このコーナー滞在時間の増大と、海馬におけるGABA減少との間に有意な相関関係がみられた。

#### (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

**a. 発現変動遺伝子候補の抽出:** 得られたアレイデータから、遺伝子抽出を行ったところ、51プローブ(BPA曝露でUPが29、DOWNが22)存在したが、これら遺伝子についてRT-qPCR法による変動確認を行った結果、BPA曝露群としてのFold Changeは1.5に満たなかった。さらに、GSEA(Gene Set Enrichment Analysis)法による検討を行ったが、発現変動遺伝子群を抽出できなかった。

**b. MIAMI法によるDNAメチル化変動遺伝子候補の抽出:** 全8対の同腹仔ペア間で蛋白をコードする遺伝子上のDNAメチル化をMIAMI法にて検索した。その結果、DNA中の「CCGG」配列を認識するメチル化感受性制限酵素Hpa II認識部位34カ所においてメチル化の違いが見出された。しかしながら個体差の影響が予想外に大きく、MIAMI法を用いて有意なBPA曝露応答性メチル化変動部位を抽出することは困難と判断した。

**c. 発現変動遺伝子候補の抽出:** 同一性間の比較によるBPA応答性変動遺伝子の抽出を発現変化量2倍以上を基準として行った。遺伝子ごとに抽出回数をカウントし、カウント数上位に位置する遺伝子のうち、各遺伝子領域にDNAメチル化の標的となるCpGに富む配列領域(CpG island; 以下CGI)が少なくとも1つ存在する遺伝子に着目し、RT-qPCR法により発現変動を確認した。その結果、3つのBPA応答性発現変動遺伝子A、B、Gnasを得た。Gnas遺伝座からは4つのalternative promoterから異なるmRNAが転写されるが、NespおよびGnasxlにおいてBPA応答性発現変動を見出した。

**d. 脳(P3W)における候補遺伝子領域のDNAメチル化変動の解析:** 発現アレイやMIAMI法の解析に用いた個体のゲノムDNAを用いて、3つの候補遺伝子(A、B、Gnas)領域それぞれのCGIを対象にBisulfite Sequencing法にて1塩基レベルでのCpGメチル化状態を解析した。NespおよびGnasxlの各転写開始点周囲のCGIのCpGにおいてBPA応答性メチル化変動は見出されなかった。A・B両遺伝子はゲノム上の狭い領域に隣接し、各遺伝子内に2つずつのCGIを、さらに遺伝子間に2つのCGIを持つ。これらのCGIとA遺伝子転写開始点上流(0.5kb内)の複数のCpGについて調べたところ、P3W脳において、遺伝子AのCGI1領域中に存在する23

カ所のCpGのうち8番目のCpG(以下、CpG\_8)のみがBPA曝露依存性のメチル化状態変動を示した。この変動は性差に依存せず、かつmRNA発現変動との間に強い逆相関を示す唯一の部位であった。

**e. 離乳直後のP3Wおよび離乳後にはBPA曝露を受けていないP13-14Wのマウス大脳におけるCpG\_8のメチル化変動を解析:** 大脳におけるA遺伝子CpG\_8のメチル化変動を、BPA曝露群28匹(P3W♂6, ♀6; P13-14W♂8, ♀8)、vehicle群25匹(P3W♂6, ♀6; P13-14W♂9, ♀4)について解析した。離乳後にはBPA曝露を受けていないP13-14Wのマウス大脳においても低メチル化傾向が維持されていたことから、ROC曲線を作成し、

Youkin's index法により最適カットオフ値を求めた。その結果、「CpG\_8におけるメチル化度が18.5%以下であれば曝露歴有り」と判定したとき、その感度(真陽性率)・1-特異度(偽陽性率)は各々89.29%、12%となりROC曲線下面積(AUC)は87.1%であった。これは既報の腫瘍関連遺伝子エピゲノムマーカーと遜色ない感度と特異性を示すものであり、BPA曝露履歴の判定において高い予測能・診断能を持つ指標となることが期待された。

**f. 全血由来DNAにおけるA遺伝子のメチル化変動:** BPA非曝露・曝露両群のマウス(P13-14W)の全血由来DNAを用いて、CpG\_8を含むA遺伝子CGI1のメチル化変動をBisulfite Sequencing法で調べた。その結果、離乳後にはBPA曝露を受けていないP13-14Wのマウスで複数のCpG部位においてBPA応答性DNAメチル化変動が惹起されていること、大脳とはプロファイルが異なること、プロファイルには性差があることが判明した。しかし、単一CpG部位のメチル化変動に着目した指標ではBPA曝露履歴を判別できなかった。複数のCpG部位におけるメチル化変動の共起性に着目し、そのパターンを指標にすれば全血由来DNAでBPA曝露履歴を判別しうることを見出した。ROC曲線下面積(AUC)は86.8%であり、「2つのCpGが共に脱メチル化したパターンの出現率が62.25%以下であれば曝露歴有り」と判定したときの感度(真陽性率)、1-特異度(偽陽性率)は、各々78.57%、12.5%となった。さらに、雄の同一個体における判定結果から両組織の指標を組み合わせて判定を行った場合には、ROC曲線下面積(AUC)は96.485%、感度(真陽性率)、1-特異度(偽陽性率)は各々90.91%、0%となり、より高い判別能を持つことがわかった。

**g. 大脳においてA遺伝子に刷り込まれたBPA応答性エピゲノム・マークの継世代維持の解析:** マウス大脳皮質DNAをもとにBisulfite Sequencing法によりA遺伝子CpG\_8のメチル化度を評価した場合、F1世代では雌雄差なくメチル化度は18.5%(カットオフ値)未満まで低下する。この結果は、今回の作出家系でのF1世代においても再現された。さらに、この低メチル化傾向は、F2世代のみならず F3世代の個体においても維持されていた。すなわち、解析個体の雌雄や生殖細胞系列の雌雄の組み合わせの違いに依存せず、直接曝露を受けていない最初の世代の大脳皮質細胞に伝えられたことを示唆する結果であった。

一方F3世代(P3W)およびその親個体(P16W)の全血DNAを調べたところ、大脳とは異なり全血DNAではBPA応答性エピゲノム・マークが継世代性に維持されないことが明らかとなった。

本研究によってわれわれは、胎生期～授乳期のBPA曝露によって大脳皮質ゲノムへ雌雄差なく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、雌雄どちらの生殖細胞系列を介しても次世代の大脳皮質ゲノムへと受け継がれることを初めて明らかにした。このことは、体細胞系列において新たに刷り込まれたエピゲノム・マーク即ちエピゲノム情報の変化が未知のメカニズムによって生殖細胞系列を介して次世代に伝達されること、さらに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。

一方、脳と同等の的中率で曝露履歴を判定できた雄(F1)由来血液DNAのエピゲノム・マークには継世代性が見られず、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を示すものである。今後、性差に依存しない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。

## (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およびBPAの若齢期における低用量経気道曝露は、気道炎症や炎症性分子の発現を亢進した。DEHP、およびDINPは、アレルギー性喘息に対する影響は軽微であった。また、BaPの乳児期曝露は、雌雄の仔獣いずれにおいてもアレルギー性喘息への影響は軽微であったが、曝露用量に対する反応性には性差がある可能性が示された。以上の結果から、環境化学物質の低用量経気道曝露により、アレルギー性喘息が増悪する可能性が示された。また、母体が摂取した環境化学物質が、母乳を介して子のアレルギー性喘息を増悪する可能性も示された。

## (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

DEHPの若齢期経口曝露では、アトピー性皮膚炎様症状の増悪は認めなかったが、DINP、BPA、BaPでは、症状の増悪傾向と炎症細胞浸潤の亢進を認めた。また、DINPの乳児期経母乳曝露では、メスでアトピー性皮膚炎様症状の増悪傾向と炎症細胞浸潤の亢進を認めた。以上の結果から、これらの環境化学物質の低用量経口曝露により、アトピー性皮膚炎が増悪する可能性が示された。また、母体が摂取した化学物質を、母乳を介して曝露された子のアトピー性皮膚炎が増悪する可能性も示された。

## (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

1) OVA存在下に、BPA低用量曝露は炎症性分子の遺伝子発現を高め、生体のアレルギー反応を増強する

可能性が示された。2)比較的高用量のBPA曝露は、スギ花粉によるアレルギー性鼻炎を軽減する可能性が示された。3)環境レベルに近い低用量のBPA曝露には、OVA特異的抗体産生を高める作用があることが明らかになった。4)DEHPの低用量経鼻曝露がアレルギー性鼻炎や炎症性分子発現を悪化させることが明らかになった。5)低用量のBaP曝露はOVA誘発性アレルギー性鼻炎を悪化させることも明らかになった。

#### (2)－4)環境化学物質のアレルギー性疾患増悪影響に対するスクリーニング手法の開発

マウスの骨髄由来樹状細胞(BMDC)を用いた包括的な遺伝子発現解析の結果、BaPおよびDEHP、DINPの*in vitro*曝露が、免疫・炎症反応や防御機構等に関わる因子(IL-6やインターフェロン関連因子)の発現を増加すること、共通あるいは化学物質特異的な変動因子が存在することが明らかになった。また、いずれの曝露においても、CD86等の活性化マーカー分子の発現増加や、樹状細胞サブセット(pDCとcDC)の割合の変化が認められた。さらに、アレルギー性喘息モデルマウスを用いて、BaP、DEHP、DINP、BPAの若齢期曝露およびBaPの乳児期曝露が免疫担当細胞の構成や機能に及ぼす影響を検討した結果、所属リンパ節である縦隔リンパ節における細胞数や増殖能の増加、樹状細胞サブセットの変化を含む抗原提示細胞の活性化(CD86の増加等)やT細胞の活性化(Th2サイトカイン産生の増加等)など、免疫担当細胞の構成・機能への影響が存在することが明らかになった。以上より、当該環境化学物質は、樹状細胞サブセットの変化など抗原提示細胞の分化・活性化を修飾することで免疫応答を亢進し、アレルギー病態の悪化に寄与する可能性が示された。また、本研究で各物質に共通して認められた抗原提示細胞の活性化マーカー分子の発現やサブセットの変化は、*in vitro*スクリーニングにも有用と考えられた。

### 5. 本研究により得られた主な成果

#### (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、形態学的ならびに機能的な変化を引き起こすことを示した。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、マウス大脳ならびに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(ヒトの離乳期～思春期に相当する時期)を経たあとも維持されていることを初めて見出した。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。

サブテマ1全体を通しての科学的意義のまとめ: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。また脳においてBPA曝露による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示すことを明らかにし、曝露履歴評価に活用し得るといふ科学的提言をするに至った。胎生～新生仔期のBPA曝露によって大脳皮質ゲノムへ雌雄差なく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、雌雄どちらの生殖細胞系列を介しても次世代の大脳皮質ゲノムへと受け継がれることを初めて明らかにした。

(2)－1)BaPおよびBPAの若齢期における低用量経気道曝露は、アレルギー性喘息を増悪すること、またそのメカニズムの一部を明らかにした。DEHPおよびDINPは、アレルギー性喘息に対する影響は軽微である可能性を示した。BaPについて、母乳を介した次世代影響が存在し、性差が存在する可能性も指摘した。

(2)－2)DINP、BPA、BaPの低用量経口曝露は、顕著ではないものの若齢期のアトピー性皮膚炎を増悪すること、またそのメカニズムを明らかにした。DINPについて、母乳を介した次世代影響が存在し、性差が存在する可能性も指摘した。

(2)－3)低用量のBPA曝露は炎症性分子の発現を*in vitro*で、OVA特異的抗体産生を*in vivo*で高め、アレルギー反応を増強する可能性があることを指摘した。DEHPの低用量経鼻曝露が、アレルギー性鼻炎を増悪することとそのメカニズムを明らかにした。低用量のBaP曝露がアレルギー性鼻炎を悪化させることも示した。

(2)－4)BaP、DEHP、DINP、BPAを対象とし、*in vitro*および*in vivo*曝露による免疫担当細胞への影響を解析した結果、樹状細胞の炎症関連因子の発現増加やサブセットの変化、喘息モデルマウスにおける免疫担当細胞の構成・機能の変化が存在し、環境化学物質によるアレルギー増悪メカニズムにおいて重要であることを初めて示すことができた。また、*in vitro*スクリーニング(簡易評価系)に有用な分子や変化も確認した。

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が種々のアレルギー疾患を増悪しうること、(2)その発現メカニズム、(3)物質そのもののみならず、その曝露経路や病変の主座の相違によって環境化学物質の増悪影響は異なること、(4)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、「環境化学物質のアレルギー増悪影響

の評価にあたっては、*in vitro*簡易評価系により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）、小児期曝露、次世代影響存在の可能性を念頭に置き、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。

## (2) 環境政策への貢献

### <行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

### <行政が活用することが見込まれる成果>

(1)－1) マウスにおいて、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あたっては、「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。

(2)－1) BPA、BaPの小児期における少量、経気道曝露が、アレルギー性喘息の増悪因子であることを示した。また、少量曝露時の乳児期曝露等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、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) これまでの成果から見出されたアレルギー増悪影響を反映するバイオマーカーを利用したスクリーニングにより、多種の物質の影響評価およびアレルギーを増悪しうる環境化学物質の探索が容易となり、化学物質規制対策への提言、影響の未然防止に貢献できる。

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) BPA曝露の脳形成・発達への影響に関する情報や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簡易*in vitro*影響評価系を確立・普及し、アレルギー疾患を増悪しうる環境化学物質の探索を容易にする。また、複数のアレルギー疾患モデルを用いた*in vivo*における評価系をあわせた影響評価システムを構築し、増悪因子の特定に役立てる。ひいては、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) 現在進行中の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、当該調査において脳発達障害や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の提案、曝露履歴マーカーの開発に対する提言に貢献する。なお、実際に、関連の調査では、既に、フタル酸エステル類とアレルギーの関係が疫学的に検討されつつある。

## 6. 研究成果の主な発表状況

### (1) 主な誌上発表

#### <査読付き論文>

1) 伊東恭子：日本小児科学会雑誌，116，10-19（2012）

「脳形成・発達と環境化学物質」

2) H. OGI, K. ITOH and S.FUSHIKI: Brain Behav, 3, 223-228 (2013)

“Social behavior is perturbed in mice after exposure to bisphenol A: a novel assessment employing an IntelliCage.”

3) TT. WIN-SHWE, R. YANAGISAWA, E. KOIKE, H. NITTA and H. TAKANO: J Appl Toxicol, 33, 1070-1078 (2013)

“Expression levels of neuroimmune biomarkers in hypothalamus of allergic mice after phthalate exposure.”

4) M. HE, K. INOUE, S. YOSHIDA, M. TANAKA, H. TAKANO, G. SUN and T. ICHINOSE T: Immunopharmacol Immunotoxicol, 35, 3, 390-395(2013)

“Effects of airway exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate on allergic rhinitis”

5) S, TANDO, K. ITOH, T. YAOI, H. OGI, S. GOTO, M. MORI and S. FUSHIKI: *Neuropathology* (2014), doi:10.1111/neup.12137[Epub ahead of print]

“Bisphenol A exposure disrupts the development of the locus coeruleus-noradrenergic system in mice.”

6) K. SADAKANE, T. ICHINOSE, H. TAKANO, R. YANAGISAWA and E. KOIKE: *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 36, 1, 61-69 (2014)

“Effects of oral administration of di-(2-ethylhexyl) and diisononyl phthalates on atopic dermatitis in NC/Nga mice”

7) 定金香里、市瀬孝道、高野裕久、柳澤利枝、小池英子：日本職業・環境アレルギー学会誌（印刷中）  
「アトピー性皮膚炎モデルマウスに対するビスフェノールA経口曝露の影響」

### <その他誌上発表(査読なし)>

1) 伊東恭子、伏木信次：小児科臨床, 66, 1461-1467 (2013)  
「4) 環境化学物質と脳形成障害」

### (2)口頭発表(学会等)

- 1) 高野裕久：第15回ラテックスアレルギー研究会(2010)  
「化学物質とアレルギー」
- 2) 伊東恭子：第52回日本神経病理学会総会学術研究会(2011) 招待講演  
シンポジウム「脳形成障害とオミックス」にて「環境化学物質の胎生期曝露と脳形成障害」
- 3) 丹藤 創、伊東恭子、森脇三造、韓 龍哲、安田竜有二、伏木信次：第52回日本神経病理学会総会学術研究会(2011)  
「ビスフェノールAが脳形成過程へ及ぼす影響の形態学的解析」
- 4) 森脇三造、伊東恭子、中村恵子、外崎 円、丹藤 創、伏木信次：第52回日本神経病理学会総会学術研究会(2011)  
「ビスフェノールAがマウス大脳皮質神経細胞遊走に及ぼす影響の解明：タイムラプス蛍光イメージングを用いて」
- 5) 伏木信次：京都府立図書館・京都府立医科大学附属図書館連携事業府民講演会(2011)  
「子どもの脳を守る—環境化学物質はどのような影響を及ぼすか—」
- 6) 伏木信次：京都府立医科大学公開講座(2011)  
「環境中の化学物質と脳発達」
- 7) 柳澤利枝、小池英子、高野裕久：第61回日本アレルギー学会秋季学術大会(2011)  
「ベンゾ[a]ピレン(BaP)の経気道曝露がアレルギー性気道炎症モデルに与える影響」
- 8) 市瀬孝道、賀 森、吉田成一：フォーラム2011 衛生薬学・環境トキシコロジー(2011)  
「化学物質が花粉症に与える影響」
- 9) 伏木信次、矢追 毅、伊東恭子：第39回日本毒性学会学術年会(2012) 招待講演  
シンポジウム「エピジェネティクスから捉えた毒作用発現」にて「環境化学物質ビスフェノールAと脳形成・発達」
- 10) 伏木信次：福井大学 大学院セミナー(2012) 招待講演  
「環境化学物質への胎生期曝露と脳の形成・発達」
- 11) 伊東恭子：平成23年度京都府立医科大学健康セミナー「保育サポーター養成・支援講座」(2012)  
「子どもの脳と化学物質—環境化学物質はどのような影響を及ぼすか—」
- 12) E. Koike, R. Yanagisawa, H. Takano: The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, Sendai, Japan, 2012  
“Immunological effects of phthalates and other chemicals in consumer products”
- 13) 柳澤 利枝、小池 英子、ウインシュイ ティンティン、市瀬 孝道、高野 裕久：第19回日本免疫毒性学会学術大会(2012)  
「フタル酸エステル類の経気道曝露がアレルギー性喘息に及ぼす影響」
- 14) ウインシュイ ティンティン、柳澤利枝、小池英子、新田裕史、高野裕久：第19回日本免疫毒性学会学術大会(2012)  
「アレルギー喘息モデルマウスにおけるフタル酸エステル類曝露が神経・免疫バイオマーカーの発現に及ぼす影響」

- 15) 定金香里、市瀬孝道、高野裕久、柳澤利枝、小池英子：第82回日本衛生学会学術総会（2012）  
「アトピー性皮膚炎モデルマウスに対するフタル酸ジエチルヘキシル経口曝露の影響」
- 16) 高野裕久：2012年室内環境学会 第1回講演会（2012）  
「室内、室外の環境汚染物質による生活環境病、生活習慣病の増悪とその軽減対策」
- 17) H. TAKANO: First Malaysian congress of toxicology, Kuala Lumpur, Malaysia, 2012 招待講演  
“Environmental pollution and allergic diseases”
- 18) 高野裕久：第62回日本アレルギー学会秋季学術大会（2012）教育講演  
「環境ストレスとアレルギー」
- 19) 定金香里、市瀬孝道、高野裕久、柳澤利枝、小池英子：第82回日本衛生学会学術総会（2012）  
「アトピー性皮膚炎モデルマウスに対するフタル酸ジエチルヘキシル経口曝露の影響」
- 20) 伊東恭子：第59回日本病理学会秋期特別総会 A演説（2013）学術研究賞受賞講演  
「脳形成障害の発生病理解明—遺伝要因と環境要因に着目して」
- 21) 高野裕久：京都府立医科大学公開講座（2013）公開講座  
「環境と健康」
- 22) 高野裕久：愛知学院大学薬学部附属医療生命薬学研究所第1回サイエンスフォーラム（2013）招待講演  
「環境汚染物質による生活環境病、生活習慣病の増悪とその軽減対策」
- 23) 定金香里、市瀬孝道、高野裕久、柳澤利枝、小池英子：第83回日本衛生学会学術総会（2013）  
「アトピー性皮膚炎モデルマウスに対するフタル酸ジイソノニル経口曝露の影響」
- 24) 定金香里、市瀬孝道、高野裕久、柳澤利枝、小池英子：第44回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会（2013）  
「アトピー性皮膚炎モデルマウスに対するビスフェノールA経口曝露の影響」
- 25) 定金香里、市瀬孝道、高野裕久、柳澤利枝、小池英子：第63回日本アレルギー学会秋季学術大会（2013）  
「ベンゾ[a]ピレン低用量経口曝露によるアトピー性皮膚炎増悪作用」
- 26) 柳澤利枝、小池英子、ウィンシュイ ティンティン、高野裕久：第63回日本アレルギー学会秋季学術大会（2013）  
「ビスフェノールAの経気道曝露がアレルギー性気道炎症に及ぼす影響」
- 27) 小池英子：日本薬学会第133年会（2013）  
「フタル酸エステル等の生活用品に含有される化学物質が免疫応答に与える影響」
- 28) 丹藤 創、伊東恭子、伏木信次：第55回日本神経病理学会総会学術研究会（2014）  
「内分泌攪乱化学物質、ビスフェノールAの青斑核への影響解析」(アブストラクト提出、採択済み)
- 29) 定金香里、高野裕久、柳澤利枝、小池英子、市瀬孝道：第45回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会（2014）  
「アトピー性皮膚炎モデルマウスに対するフタル酸ジイソノニル経母乳曝露の影響」
- 30) 小池英子、柳澤利枝、高野裕久：第41回日本毒性学会学術年会（2014）  
「環境化学物質による免疫応答の修飾—アレルギーに及ぼす影響機序の解明に向けて—」(アブストラクト提出済み)

## 7. 研究者略歴

課題代表者：伏木 信次

京都府立医科大学大学院修了、博士(医学)、現在、京都府立医科大学 副学長・大学院医学研究科教授

研究分担者

サブテーマ1

1)伊東恭子

神戸大学医学部卒業、博士(医学)、現在、京都府立医科大学大学院医学研究科准教授

2)矢追 毅

九州大学大学院薬学研究科修了、修士(薬学)、現在、京都府立医科大学大学院医学研究科助教

サブテーマ2

1) 高野裕久

京都府立医科大学医学部卒業、博士(医学)、現在、京都大学大学院教授

2) 柳澤利枝

筑波大学大学院修士課程修了、博士(医学)、現在、国立環境研究所主任研究員

3) 定金香里

東京大学大学院博士課程単位取得退学、博士(医学)、現在、大分県立看護科学大学助教

4) 市瀬孝道

麻布獣医科大学獣医学部卒業、獣医学博士、現在、大分看護科学大学看護学部教授

5) 吉田成一

東京理科大学薬学部卒業、博士(薬学)、現在、大分県立看護科学大学看護学部准教授

6) 小池英子

筑波大学大学院博士課程修了、博士(医学)、現在、国立環境研究所主任研究員

## 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

### (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

京都府立医科大学

大学院医学研究科	分子病態病理学	伏木 信次
大学院医学研究科	分子病態病理学	伊東 恭子
大学院医学研究科	分子病態病理学	矢追 毅

<研究協力者>

大学院医学研究科	分子病態病理学	丹藤 創
大学院医学研究科	分子病態病理学	荻 寛志 (平成24～25年度)
大学院医学研究科	分子病態病理学	及川 優 (平成22～24年度)

平成22～25年度累計予算額：79,420千円（うち、平成25年度予算額：16,005千円）

予算額は、間接経費を含む。

#### [要旨]

環境化学物質、プラスチック素材として汎用されているビスフェノールA(BPA)は、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。しかし胎生期から授乳期にかけてのBPA曝露が脳形成・脳機能に及ぼす影響を広く調べた報告はこれまでない。そこで、本サブテーマでは、妊娠期から新生仔期にかけて母マウスへの経口的曝露を介して、経胎盤のならびに母乳摂取により、仔が低用量BPAに持続曝露される実験系を作製し、多様な手法による解析を行った。その結果、(1) 出生後の中枢神経系において、大脳皮質層構築の異常、性的二型核である青斑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を明らかにし、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示した。5 µg/kg/dayという極低用量曝露によって大脳皮質層構築に異常をきたすこと、ならびに脳内神経伝達物質変動と行動学的異常を関連付けた知見は科学的意義が大きい。(2) 分子生物学的解析によって、胎生期・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（ヒトの離乳期から思春期に相当）を経たあとも維持されていることを初めて見出した。さらにBPA曝露により生じた大脳のエピゲノム・マークにF3世代までの継世代伝達性があることを世界で初めて見出した。本成果は、低用量BPA曝露が脳発達障害の原因になり得ることを示唆するが、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。また、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、曝露影響評価に活用し得るという科学的提言をする。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・安心の確保に貢献する。エコチル調査を補完する科学的基盤を提供し、エコチル調査においてBPAの曝露影響を評価する検査手法の提案に貢献する。

## [キーワード]

ビスフェノールA、脳形成、神経伝達物質、行動異常、エピゲノム

### 1. はじめに

ビスフェノールA (以下、BPA) は、プラスチック素材として人間の生活環境で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、ヒトは日常的にBPAに曝露されていることが知られている。近年、発達障害を有する児童の増加と環境化学物質曝露との関連が喧伝されるようになったが、その科学的基盤は依然として不十分であると言わざるを得ない。他方で、胎生期から授乳期にかけてのBPA曝露が脳形成や脳機能に及ぼす影響を広く調べた報告はこれまでなく、その影響の詳細を多角的に明らかにし、その作用メカニズムを解明することが必要である。

われわれは胎仔期BPA曝露が、マウス大脳皮質形成過程における神経細胞の分化・移動、神経回路形成に影響を及ぼすこと<sup>1,2)</sup>、また胎仔期エピゲノムに影響が出現することを報告した<sup>3)</sup>が、その実験系ではBPA投与経路が、より自然に近い経口曝露ではなかった。そこで、妊娠期から授乳期にかけて母マウスへの経口的曝露を介して、経胎盤的ならびに母乳摂取により、仔が低用量BPAに持続的に曝露される実験系を作製し、組織形態学的、神経化学的、行動学的、分子生物学的な手法による多角的解析を行うことが、BPAの規制や影響評価をヒトで行ううえで必要であると考えた。とりわけ大脳皮質以外の脳領域においてBPA曝露の影響が見られるかどうか、エピゲノム変化が生後も維持されるかどうかを解明することが重要と考えた。

### 2. 研究開発目的

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て、以下の二つを目標とした。

1) 胎生期から授乳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、脳の領域ごとに病理学的・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。2) 1) 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。

### 3. 研究開発方法

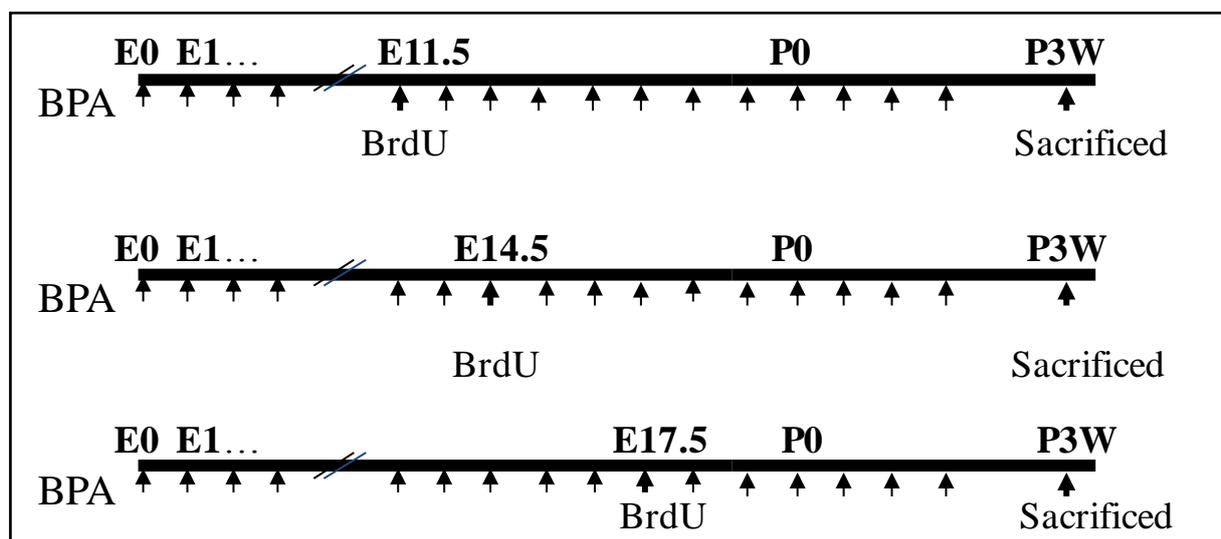
1) 環境化学物質への胎生期・新生仔期曝露による脳形成・発達・成熟および行動への影響とそのメカニズム解明

#### a. 神経細胞増殖・分化・遊走に関する形態学的解析

妊娠マウス (C57BL/6J) に胎生0日から授乳期である生後の3週間まで連日、経胃管投与によって、0.01%エタノールに溶解したビスフェノールA(BPA)を5 µg/kg bw/day, 50 µg/kg bw/day, 500 µg/kg bw/day投与するモデル系を作製した。Vehicle群 (非曝露対照群) には0.01%エタノールを投与した。

胎生11.5日、14.5日、17.5日に5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, 12.5mg/kg bw)を腹腔内単回投与した。生後3週齢で仔マウス脳を摘出、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後パラフィン包埋切片を作製し、BrdU免疫組織化学と種々の細胞マーカーを用いた免疫組織化学染色を施行、脳

を網羅的に形態学的解析した(図(1)-1-1)。解析領域は、大脳皮質のほか、海馬、視床、視床下部、線条体、A8, A9, A10ドパミン神経核及び青斑核である。解析個体数はBPA投与群(異なる投与量、計3群)とVehicle群各々に対して、異なるBrdU投与時期(胎生11.5, 14.5, 17.5日)ごとに、n=10(母個体数:n=4-5)とした。



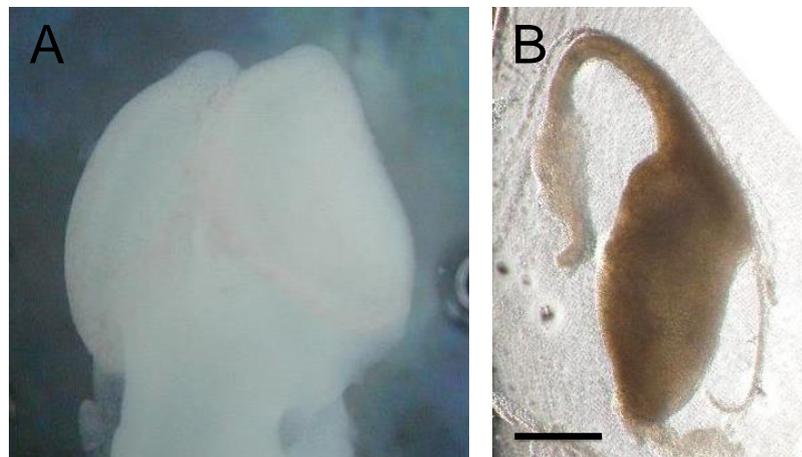
図(1)-1-1. BPA曝露モデルマウス作製のプロトコル

次に、胎生12.5日から14.5日における大脳皮質神経細胞の放射状遊走に関して組織培養系を対象にタイムラプス解析を行った。Oregon-Green BAPTA-1 488 AM蛍光標識と倒立型共焦点レーザー顕微鏡(Eclipse Ti-E, Nikon)を組み合わせたタイムラプス蛍光イメージングの観察系に、ImageJ、Manual Trackingプラグイン、LabVIEWによる解析系を用いて、発生期脳の大脳皮質神経細胞の放射状遊走へのBPA曝露の影響解明を企図した。

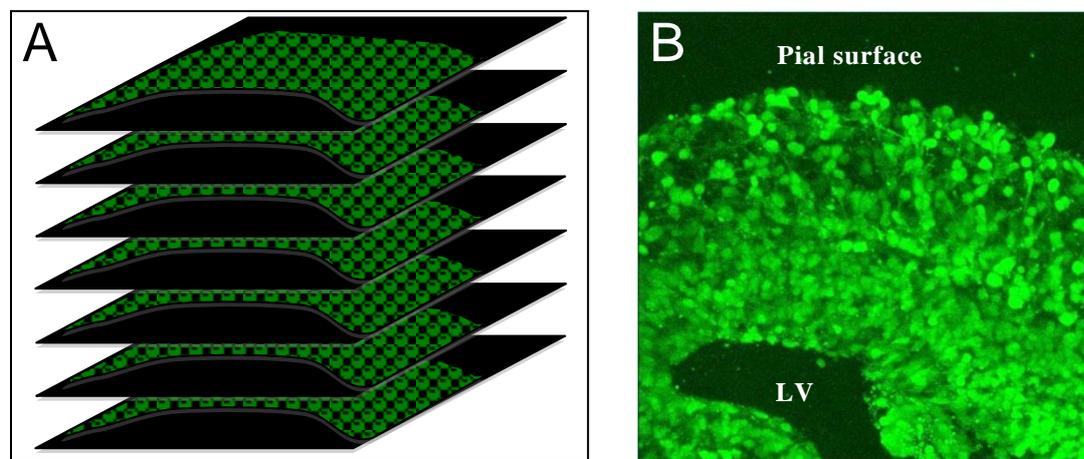
BPA曝露モデルマウスから、胎生12.5日目に胎仔脳を摘出し、200  $\mu\text{m}$ 厚の冠状断組織スライスを作製した(解析個体数:n=10)。冠状断組織スライスの蛍光標識には、Neurobasal培地に10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のOregon-Greenストック溶液、0.003%のPluronic F-127表面活性剤、1%のN2添加物、L-グルタミン添加剤、ペニシリン-ストレプトマイシン水溶液を添加した蛍光標識用ワーキング溶液を用いた。冠状断組織スライスを蛍光標識用ワーキング溶液に浸漬し、37°C/5%  $\text{CO}_2$ 条件下で1時間培養したのちハックス緩衝液で洗浄した。

蛍光標識後の冠状断組織スライスをガラスボトムディッシュに移し、コラーゲンゲル内で包埋したのちにディッシュを観察用チャンバーに固定した。観察用チャンバーに固定したディッシュ内の冠状断切片を倒立型共焦点レーザー顕微鏡へ取り付け、37°C/5%  $\text{CO}_2$ の環境下で観察終了まで培養を続けた。蛍光標識された冠状断組織スライスの画像を、20倍対物レンズ下、488 nm励起光と515 $\pm$ 15 nm蛍光フィルタを用いて、観察面と直交する方向(Z方向)に1.85 $\mu\text{m}$ の間隔で約30断面、12分毎に24時間にわたり、顕微鏡制御ソフトウェアEZ-C1(Nikon)を用いて取得した。画像を取得時刻毎に、複数枚のZ方向画像から1枚の圧縮画像へと積み重ね、合計121枚の画像に変換した。取得されたタイムラプス蛍光画像における細胞遊走については、画像解析ソフトウェアImageJとプラグ

インソフトウェアManual Trackingを用いて追跡し、記録した。この追跡記録については、遊走する細胞毎にLabVIEW (National Instruments, USA)を用いて解析した。概要を図(1)-1)-2および図(1)-1)-3に示す。



図(1)-1)-2. E12.5の胎仔脳冠状断組織スライス作製の取出した胎仔脳 (A, 対物レンズ2倍) および冠状断組織スライス (B, スケールバー: 500  $\mu\text{m}$ )



図(1)-1)-3. 蛍光標識された冠状断組織スライスZ方向画像の重ね合わせ  
取得時刻毎に複数枚のZ方向画像 (A) は1枚の画像 (B) として重ね合わされる。  
LV, lateral ventricle側脳室; pial surface, 軟膜表面。対物レンズ20倍

## b. 青斑核(Locus coeruleus: LC)の発生・分化に関する形態学的解析

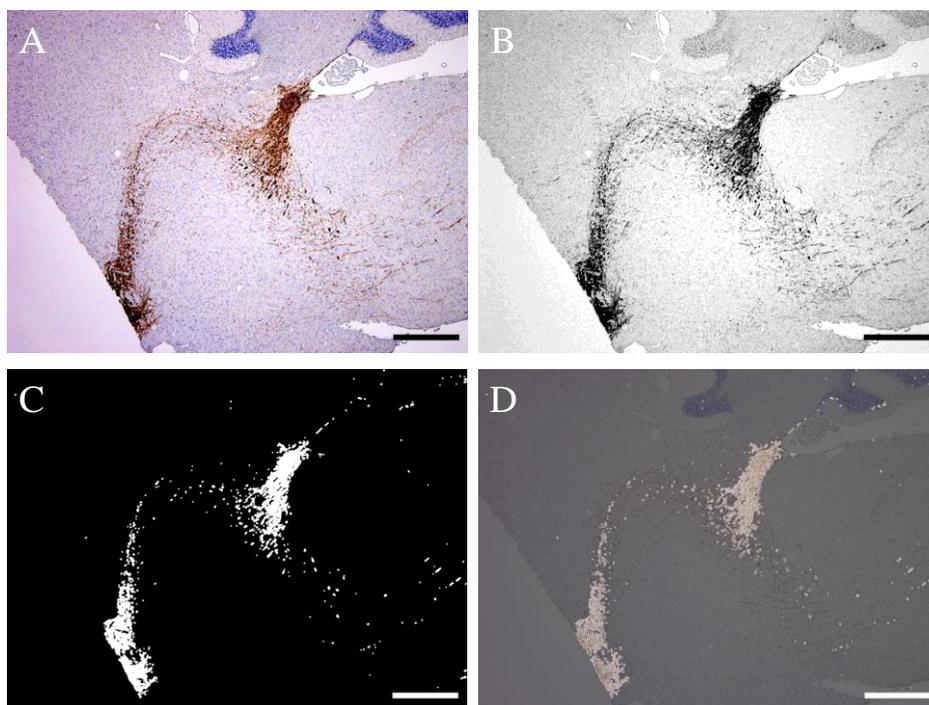
a. と同様の投与方法により、胎生期・授乳期にBPA曝露 (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day, 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day, 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day)をうけた、あるいはvehicleを投与された仔を用いた。性的二型核のひとつである青斑核(Locus coeruleus: LC)に着目し、胎生12日、14日、胎生18日、生後3週齢、生後8週齢、16週齢のマウスにおいて、チロシン水酸化酵素(Tyrosine hydroxylase: TH)を含有するノルエピネフリン作動性神経細胞をTHの免疫染色を行ったうえ計測した。解析個体数はBPA投与群 (異なる投与量、計3群) とVehicle群各々に対して、異なる胎齢・週齢(胎生12日、14日、胎生18日、生

後3週齢、生後8週齢、16週齢)、異なる性別(雌・雄)ごとに、n=10(母個体数：n=4-5)とした。

また、生後8週齢のマウスのLCに関して、THの免疫染色を施した4  $\mu\text{m}$ 厚の連続組織切片を用いて画像を取得したのち、Photoshp CS5 Extended (Adobe)とImage-Pro Analyzer 7.0.1(Media Cybernetics)を用いて画像処理を行った。画像処理の主な流れは、色補正、画像シーケンス構築、RGBチャンネルへ分解したのち青色チャンネルのみの取り出し、位置補正、二値化、3次元再構成である(図(1)-1)-4)。そののち、当該核の形状、体積、真球度を測定した。その概要を図(1)-1)-4、図(1)-1)-5に示す。解析個体数はBPA投与群、Vehicle群、異なる性別(雌・雄)ごとに、n=5(母個体数：n=2-3)とした。

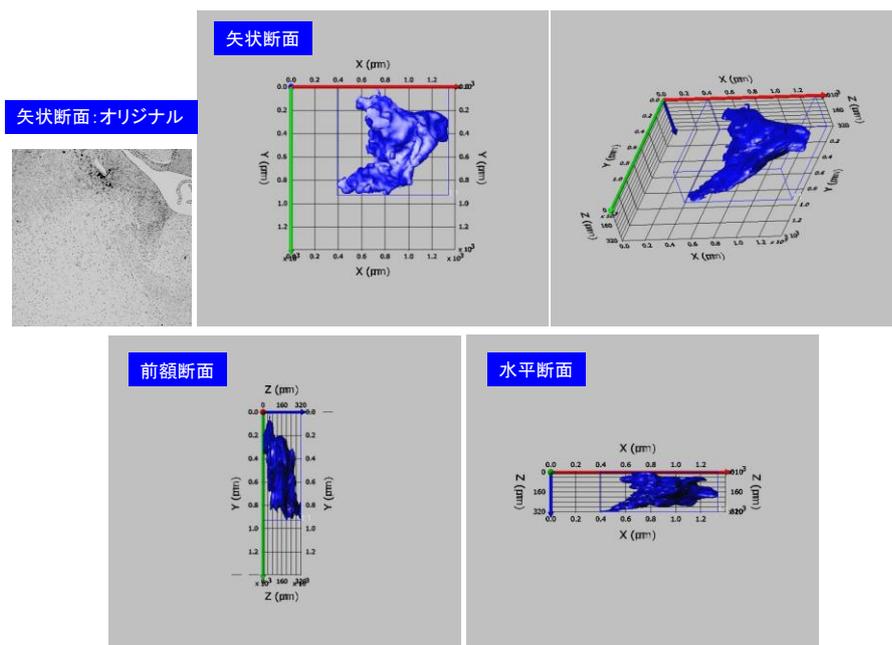
### c. 青斑核(Locus coeruleus: LC)の脳皮質投射形成に関する形態学的解析

a. と同様の投与方法により、胎生期・授乳期にBPAを500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/dayあるいはvehicleを投与するモデル系に関して、LCのノルエピネフリン作動性神経細胞が投射する脳皮質：前頭前皮質に着目し、生後3週、8週、16週齢のマウスにおいて、ノルエピネフリントランスポーター(Norepinephrine transporter: NET) 陽性線維密度を計測した。マウス脳は灌流固定後摘出し、40  $\mu\text{m}$ 厚の凍結切片を作製し、浮遊法を用いてNETを一次抗体とした免疫蛍光染色を施行し、レーザー顕微鏡でZ-stack画像を取得後、二値化法によりNET陽性線維の密度を画像解析した。解析個体数はBPA投与群、Vehicle群、各週齢(生後3週、8週、16週齢)、異なる性別(雌・雄)ごとに、n=10(母個体数：n=4-5)とした。



図(1)-1)-4. 画像処理の流れ

A：オリジナルの画像に色補正をかけた状態、B：青色チャンネルのみ取り出した状態、C：TH陽性部分を二値化したもの、D：オリジナル画像にTH陽性部分をオーバーレイ表示したものである。  
スケールバー：500  $\mu\text{m}$ .



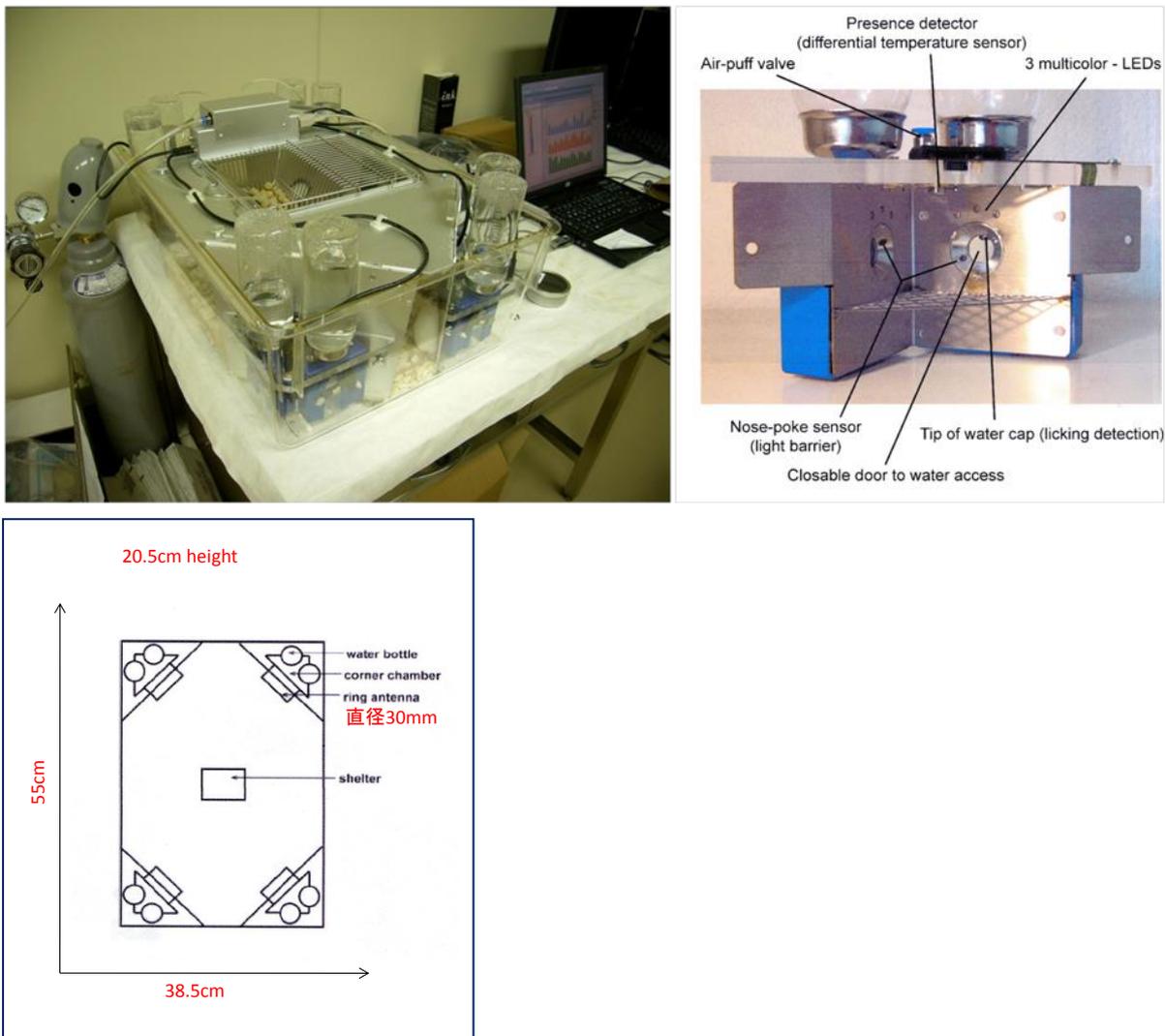
図(1-1)-5. 3次元再構成結果の例

BPA曝露群のオス3次元再構成結果の例を示す。左上がオリジナルの青色チャンネル画像で、左上から順に、矢状断面、矢状断面を傾けたもの、前額断面、水平断面となる。

軸の単位は $\times 10^3 \mu\text{m}$ で、TH陽性領域は、背腹・前後方向に1 mm、左右方向に300  $\mu\text{m}$ 程度である。矢状断面像では、三つの頂点を持つ矢じりのような形であることが判明した。

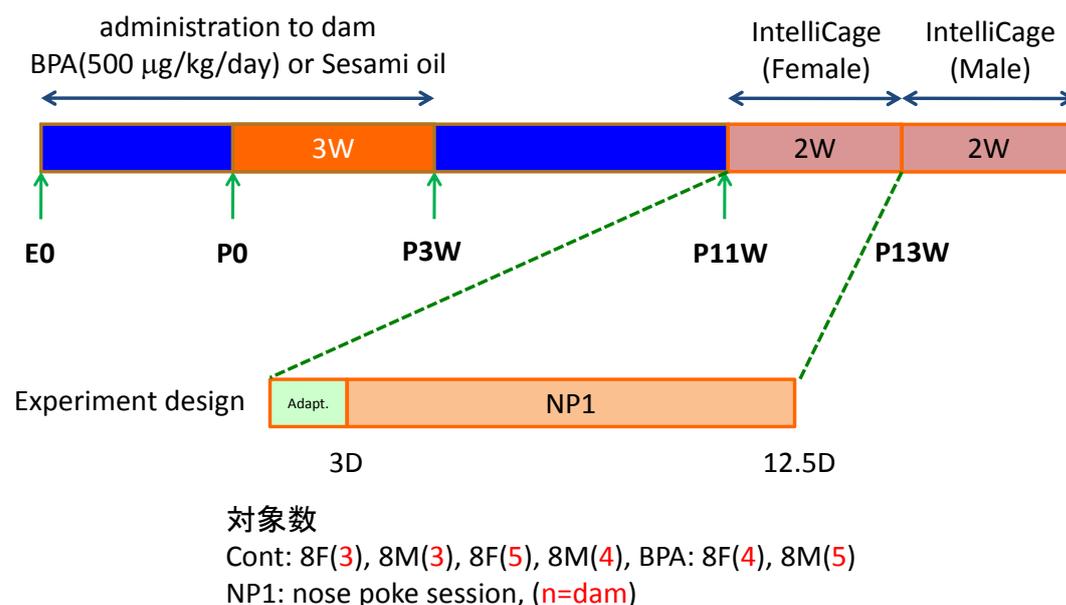
#### d. 行動学的解析

a. と同様の投与方法により、胎生期・授乳期にBPAを500  $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ あるいはvehicleを投与された生後11週～15週齢のマウスを対象として、社会行動の評価を行った。IntelliCageでは、自動制御・24時間モニタリングとRFタグでの個体認識により、集団生活環境下での行動実験を実施できる（図(1-1)-6）。IntelliCageの4隅のコーナーに設けられた水ボトルへのアクセス・飲水という報酬行動を評価することで、マウス個体における嗜好の成立、情動性、自閉性などを抽出することを企図した。プロトコルは、実験開始後2日間はIntelliCageの4コーナーすべてを自由に訪問し、各コーナーに2ヶ所設置された水ボトルにアクセス・飲水が可能な適応期とした。その後、コーナーにある水ボトルにはシャッターが設置され、ノーズポーク（＝鼻でつつく動作）をすることでシャッターが開き飲水が7秒間可能となる条件を設定し、飲水という報酬に対するマウスの集団生活下での各個体の行動を解析した。解析個体数は、BPA群雌(n=8)、BPA投与群雄(n=8)、vehicle群雌(n=16)、vehicle群雄(n=16)とした（図(1-1)-7）。



図(1-1)-6. IntelliCageの概観

自動制御・24時間モニタリングとRFタグでの個体認識により、集団生活環境下での行動実験が可能なケージである（左）。4隅に飲水コーナーがあり、ノーズポークによりシャッターが開き水ボトルへのアクセス、飲水が可能になる（右）。



図(1)-1)-7. 行動実験プロトコル

雌は、生後11週から2週間、雄は生後13週から2週間に行動実験を実施した。実験開始後2日間はIntelliCageの4コーナーすべてを自由に訪問し、各コーナーに2ヶ所設置された水ボトルにアクセス・飲水が可能な適応期とした。その後、コーナーにある水ボトルにはシャッターが設置され、ノーズポークをすることでシャッターが開き飲水が7秒間可能となる条件を設定し、飲水という報酬に対するマウスの集団生活下での各個体の行動を解析した。

#### e. 神経伝達物質の生化学的解析

a. と同様の投与方法により、胎生期・授乳期にBPAを500 µg/kg bw/dayあるいはvehicleを投与された生後13週～16週齢のマウスを対象として、脳内神経伝達物質の定量をHPLC-ECD, LC-MSを用いて行った。速やかにマウス脳を摘出後、大脳皮質前頭前野近傍、基底核、海馬、扁桃核、視床、視床下部、中脳黒質、背側縫線核、青斑核の9領域に正確に分割し、直ちに液体窒素にて凍結し測定時まで冷凍保存した。HPLC-ECD、LC-MSを用いて、各脳領域のドーパミン(Dopamine:DA)、ドーパミン代謝産物(DOPAC)、セロトニン(5HT)、セロトニン代謝産物(5-HIAA)、ノルエピネフリン(NE)、ガンマアミノ酪酸(GABA)、グルタミン酸(Glu)を測定した。解析個体数は、BPA群雌(n=8)、BPA投与群雄(n=8)、vehicle群雌(n=16)、vehicle群雄(n=16)とした。

#### 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

##### a. 動物および核酸の抽出精製：

妊娠全期間を通じてBPAに曝露した母マウス(C57BL/6J)から生まれた仔マウスに、出生直後から3週間、経母乳的にBPAに曝露する群とvehicleのみ投与する対照群(0.01%エタノール)を複製した。BPAは胃内チューブにより投与(500 µg/kg bw/day)した。生後3週齢(P3W)または13

～14週齢(P13-14W)時点で雌雄に分けて、心臓採血による全血採取を行った。そののち直ちに脳を採取し9領域（大脳・海馬・中脳・小脳・基底核・視床・視床下部・扁桃体・脳幹）に取り分けた。全血および脳組織からゲノムDNAを、更にRNAを脳組織からキットを用いて抽出した。なお、遺伝子発現変動とDNAメチル化変動の対応付けは本研究計画の根幹であることから、解析用のゲノムDNAとRNAは、同一の組織溶解液から同時に抽出精製した。

継世代影響解析用マウス家系の作出は以下のように行った。妊娠全期間を通じてBPAに曝露した母マウス(C57BL/6J) (以下F0マウス)から生まれた仔マウス(以下F1マウス)に、出生直後から3週間、経母乳的にBPAに曝露する群とvehicleのみ投与する対照群を作製した。8週齢になったF1マウスの雌雄それぞれを、BPA非曝露マウス(8週齢)と交配し、F2マウスを得た（BPAは非投与）。同様にF3マウス・F4マウスを作出した。F1～F4の各個体（P3W）について、雌雄別に核酸抽出用と交配用の2群に分けた。

#### b. 遺伝子発現変動の解析：

個体差による影響を考慮して、個体（P3W）ごとのデータを取得した(両群ともに雌n=4、雄n=4)。なお、雌雄差の影響を評価することを考慮して、生まれた同腹仔雌雄1対ずつを妊娠マウス4匹から取得し、蛍光1色標識マイクロアレイ法に用いた。マイクロアレイにはアジレント社のAgilent SurePrint G3 Mouse GE microarray 8x60k (large intervening non-coding RNA probe 搭載)を用いた。

以下のような発現データの解析手順により、個体差を超えて変動する遺伝子候補を抽出した。まず、2元配置分散分析の結果から、変動する遺伝子群の抽出を行う際の要因として、BPA曝露のみならず性別をも考慮すべきかどうかの判定を行った。要因ごとの変動遺伝子の抽出は、多重検定補正済み p-value とFold Change を組み合わせたvolcano plot法により行った。また、個体間での総当たり比較による発現変動遺伝子候補の抽出も行った。抽出された変動遺伝子候補の生物学的情報に関する解析は、Cytoscape、PPI network (Genome Network Platform Viewer)、Pathway Studioを用いて検索を行った。

RT-qPCR法を用いた相対的定量により遺伝子発現変動の確認を行った。すなわち、アレイ解析に用いたRNAと同ロットのRNAサンプルからSuperscript VILO cDNA合成キットにより調整したcDNAを鋳型とする定量PCR法を実施し、相対的な発現量比較を行った。PCR反応には、FastStart PCR premix試薬、Batch Primer3によりデザインしたPCRプライマーを使用した。測定は、StepONE plus により実施した。

#### c. 網羅的DNAメチル化変動解析：

これまでのわれわれの研究から、BPA曝露によって転写開始点周囲近傍におけるメチル化変動が惹起されると予想されたことから、主としてプロモーターやその周辺領域でのメチル化変動をゲノムワイドに効率的に検出できるMIAMI法により解析した。

解析に用いるDNAは発現解析に用いた同一個体から得ることによって発現解析との対応付けを可能にした。なお、MIAMI法によるメチル化変動アレイ解析を行うにあたっては、常に比較したい2サンプルのDNAを相異なる蛍光で標識しマイクロアレイで同時に検出しなければならないという方法論上の制約がある。しかし予算上、マイクロアレイ法による発現解析で用い

た全個体間で総当たり比較を行うことはできなかつたため、解析対象の絞り込みを、まず行った。先の発現変動アレイデータの全有効プローブ値を用いた主成分解析を、Gene Springを用いて行い、その結果から、BPA曝露有無の各群において、はずれ値を示す同腹雌雄ペア1組ずつを除いた。主成分解析の結果をもとに、BPA曝露有無の各群内における統計学的位置関係がよく似た同腹雌雄ペアの対を決め、MIAMI法によるメチル化変動アレイ解析を実施した（両群ともに雌n=3、雄n=3、合計12アレイデータ）。

メチル化変動候補配列のメチル化状態の確認は、メチル化感受性制限酵素を用いた定量PCR法(MS-qPCR)により実施した。ゲノムDNAの制限酵素処理には、MIAMI法と同じMsp I、Hpa IIを用いた。定量PCR法はFastStart PCR premixを使用した。PCRプライマーのデザインには、Batch Primer3を用いた。測定は、StepONE plusにより実施した。

#### d. 個別遺伝子における1塩基レベルでのメチル化変動解析：

ゲノムDNAをBisulfite処理し、サンプル量の少ない血液DNAについては更に全ゲノムDNA増幅法によりBisulfite処理DNAの増幅を行った。これらDNAを鋳型とするPCR反応を行い、標的配列領域を増幅した。この際使用したプライマーの配列は、メチル化の標的となるCpGを避けるようにMethPrimer（オンラインソフトウェア）を用いて設計した。この反応産物の塩基配列を決定すること（Bisulfite Sequencing法）により注目配列領域中のCpGメチル化率を調べた。概略、以下のように行った。PCR増幅産物をTAベクターにライゲーションし、大腸菌へ形質転換後、コロニーPCR法で増幅した挿入断片の塩基配列を直接シーケンシング法により決定した。QUMAソフトウェアを用いることで、1サンプルあたり24コロニー分の配列をアラインメントし、標的配列領域中の各CpG配列及び全CpG配列のメチル化度を求め、統計処理を行った。

#### e. 統計解析：

QUMA、Graphpad Prism5、R 2.15.2 GUI 1.53 Leopard build 64-bit (6335)を用いて行った。

### 4. 結果及び考察

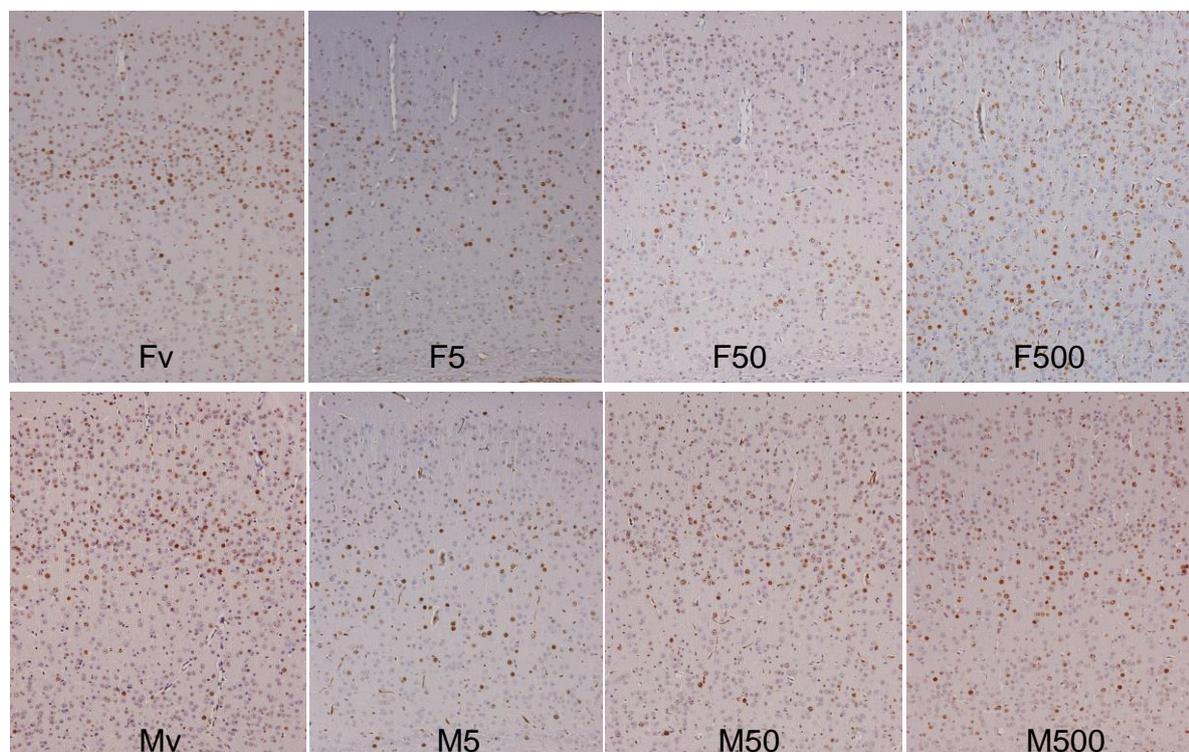
#### 1) 環境化学物質への胎生期・新生仔期曝露による脳形成・発達・成熟および行動への影響とそのメカニズム解明

##### a. 神経細胞増殖・分化・遊走に関する形態学的解析

##### i. 大脳におけるBrdU陽性細胞分布と組織計測学的検索

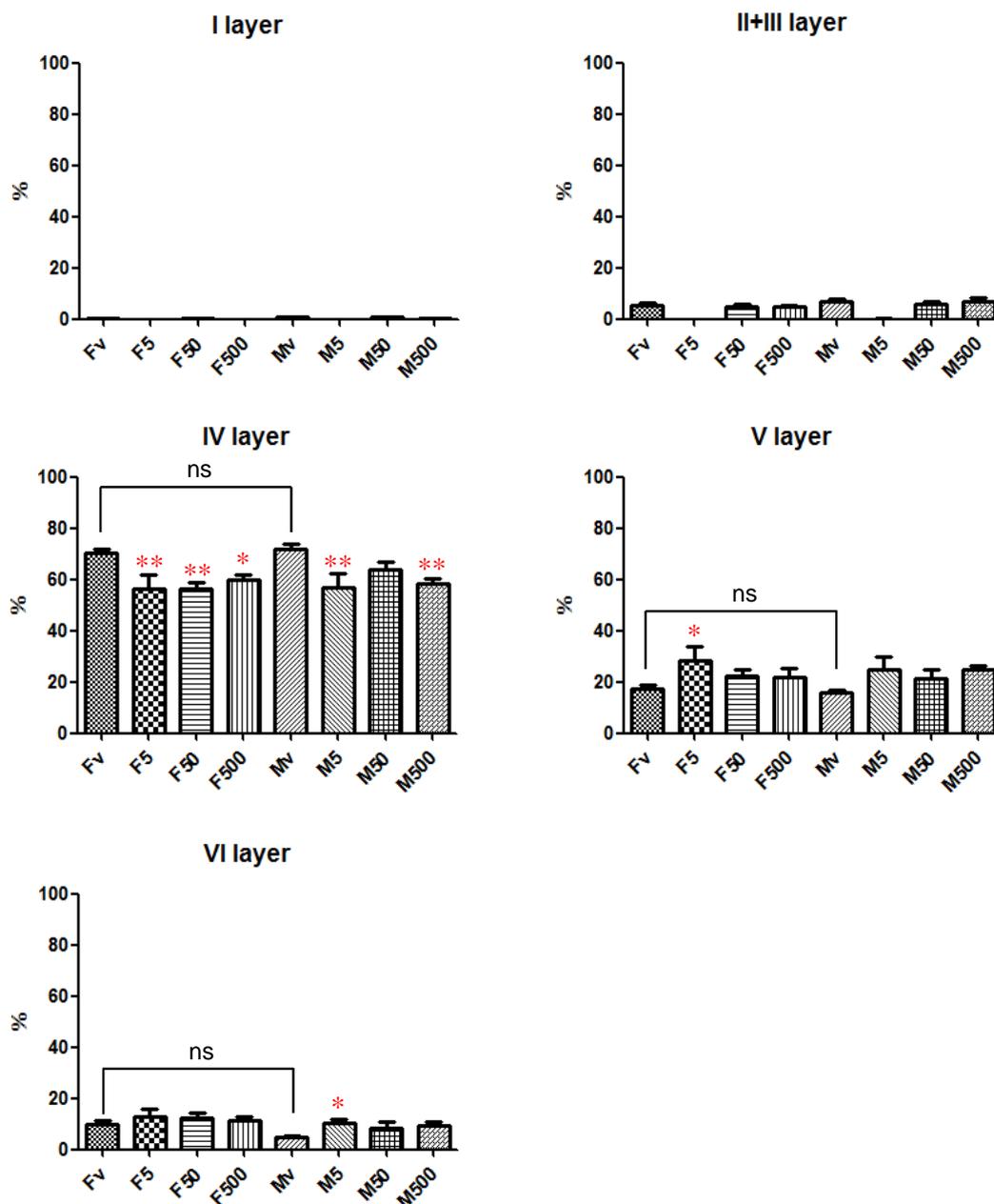
胎生14.5日にBrdUラベルし、生後3週齢で検索した体性感覚野大脳皮質におけるBrdU免疫染色結果を示した（図(1)-1-8）。vehicle群では、BrdU陽性細胞が大脳皮質のIV層にほぼ限局して層状に分布するのに対し、BPA投与群(50 µg/kg bw/day, 500 µg/kg bw/day)では雌雄ともに、BrdU陽性細胞が大脳皮質のIV層からVI層に広く分布していた。大脳皮質の各層：I層、II+III層、IV層、V層、VI層に分けて、組織計測学的に陽性細胞数の比率を計測した。胎生14.5日にBrdUラベルした群では、BPA投与群(5 µg/kg bw/day, 50 µg/kg bw/day, 500 µg/kg bw/day)の雌雄ともに、vehicle群に比較し、皮質IV層におけるBrdU陽性細胞分布比率は有意に低く、BPA投与群雌(5

$\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ )では皮質V層に分布する細胞比率が有意に高く、BPA投与群雄( $5 \mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ )では皮質VI層におけるBrdU陽性細胞分布比率が有意に高かった (図(1)-1)-9)。胎生11.5日、17.5日では、BrdU陽性細胞分布に有意差はなかった。



図(1)-1)-8. 胎生14.5日にBrdUラベルされた大脳皮質神経細胞の分布を示す(生後3週齢)

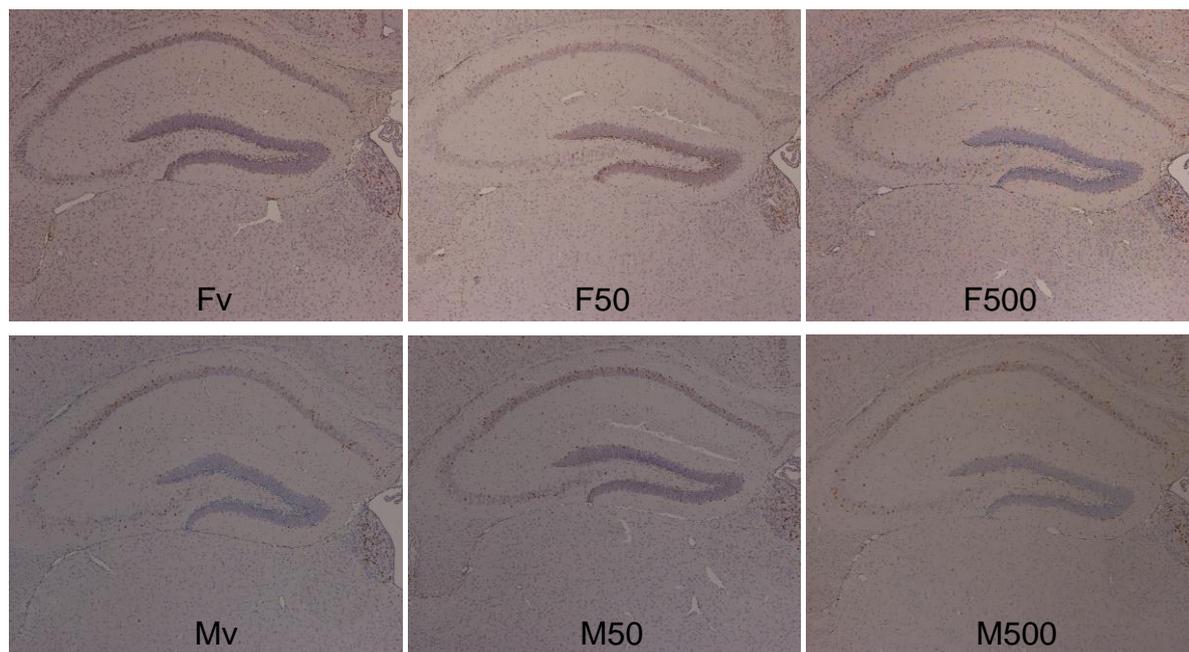
Fv: vehicle群雌; F5: BPA  $5 \mu\text{g}/\text{kg bw}$ 投与群雌; F50: BPA  $50 \mu\text{g}/\text{kg bw}$ 投与群雌; F500: BPA  $500 \mu\text{g}/\text{kg bw}$ 投与群雌; Mv: vehicle群雄; M5: BPA  $5 \mu\text{g}/\text{kg bw}$ 投与群雄; M50: BPA  $50 \mu\text{g}/\text{kg bw}$ 投与群雄; M500: BPA  $500 \mu\text{g}/\text{kg bw}$ 投与群雄



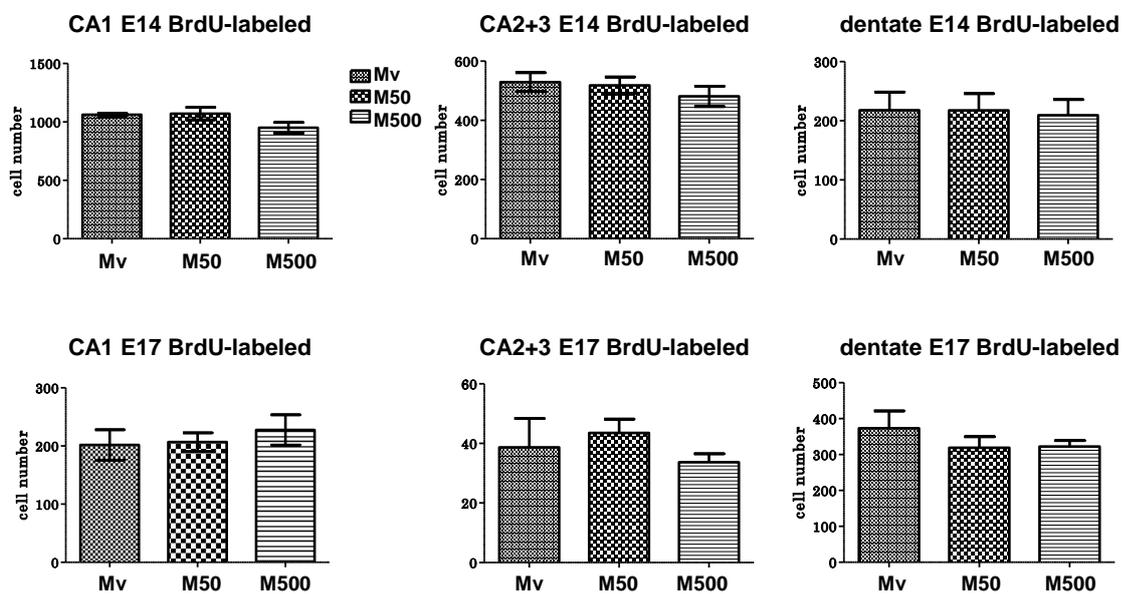
図(1)-1)-9. 胎生14.5日にBrdUラベルされた大脳皮質神経細胞の分布 (生後3週齢)

vehicle群では、BrdUにラベルされた神経細胞が大脳皮質のIV層にほぼ限局して層状に分布するのに対し、BPA投与群(5 µg/kg bw, 50 µg/kg bw, 500 µg/kg bw)では、皮質IV層におけるBrdU陽性細胞分布比率は有意に低く、BPA投与群雌(5 µg/kg bw)では、皮質V層の細胞分布比率が、BPA投与群雄(5 µg/kg bw)では、皮質VI層の細胞分布比率が有意に高かった。胎生11.5日、17.5日では有意な差はみられなかった。

\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ . vehicle群との比較



図(1)-1)-10. 海馬におけるBrdU標識細胞の分布: 胎生14.5日(E14.5)にBrdUラベルを施行。



図(1)-1)-11. 海馬におけるBrdU標識細胞数 (生後3週齢、雄)

胎生14.5日(E14.5)にBrdUラベルした細胞総数、E17.5にBrdUラベルした細胞総数はBPA投与群、vehicle群で有意差はみられなかった。

## ii. 海馬におけるBrdU陽性細胞密度

胎生14.5日、17.5日にBrdUラベルした群に関して、CA1、歯状回におけるBrdU陽性細胞総数・密度は、BPA投与群、vehicle群、雌雄で差は見られなかった(図(1)-1)-10, 図(1)-1)-11)。

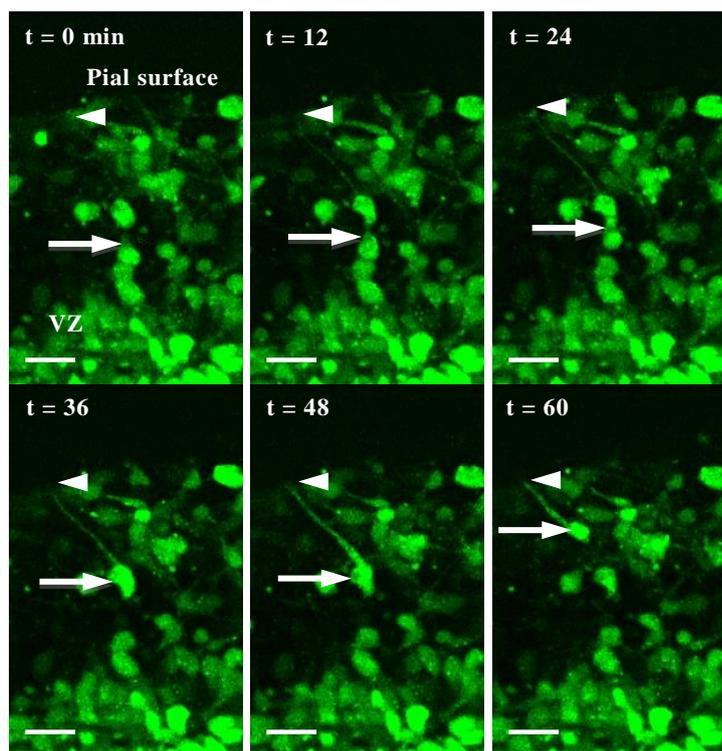
## iii. その他の脳領域

基底核、視床手綱核、視床下部、脳幹、小脳に関して、胎生11.5日、14.5日、17.5日にBrdUラベルされた細胞密度は、BPA投与群、対照群、雌雄で差は見られなかった。

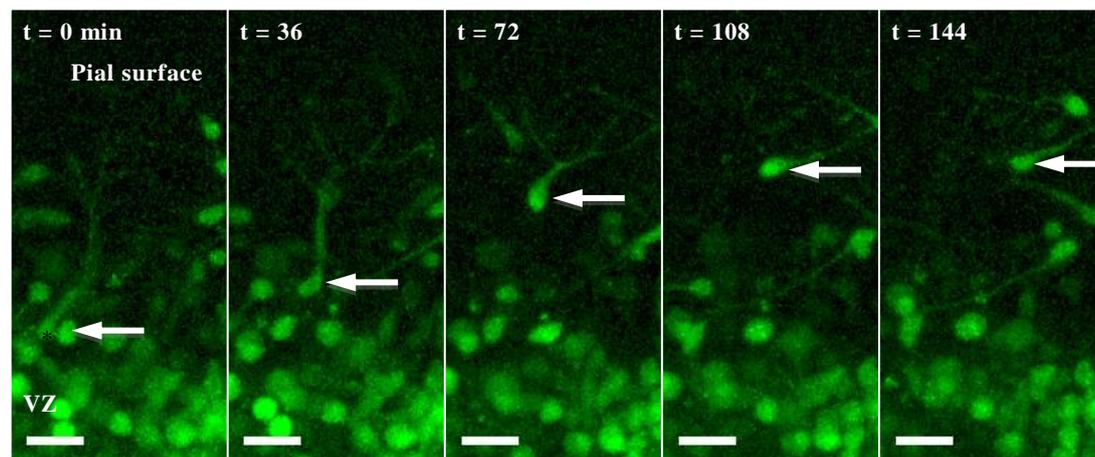
## iv. 大脳皮質神経細胞放射状移動のタイムラプス解析

Oregon-Green蛍光標識を施した冠状断組織スライスの観察により、背側終脳壁の脳室帯外側から辺縁帯における細胞体トランスロケーション(図(1)-1)-12)、ロコモーション(図(1)-1)-13)という放射状遊走様式を示す細胞ならびに接線方向の遊走を示す細胞を分類するとともに、皮質板深層に定着する神経細胞の放射状遊走を確認できた。

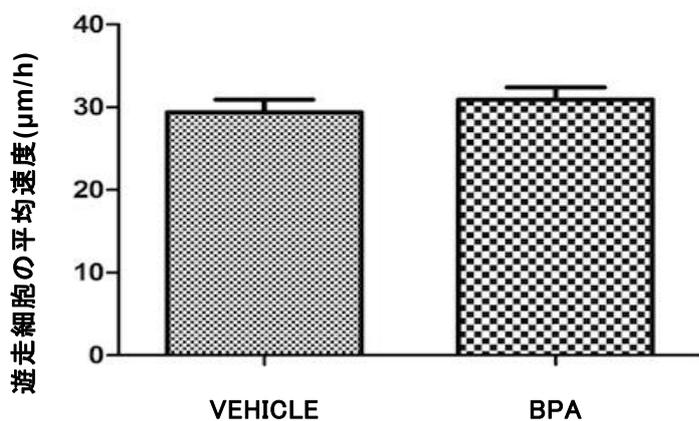
放射状遊走を示す細胞に着目し、vehicle群については89細胞(10胎仔から作製した冠状断組織スライス)、BPA投与群に関しては83細胞(13胎仔から作製した冠状断組織スライス)を対象に解析を行ったところ、細胞の平均遊走速度はBPA投与群の細胞( $30.9 \pm 1.5 \mu\text{m/h}$ ,  $n=83$ )においてvehicle群の細胞( $29.4 \pm 1.5 \mu\text{m/h}$ ,  $n=89$ )よりやや速かったが、統計学的な有意差は得られなかった(図(1)-1)-14)。次に、遊走細胞の細胞体の軌跡のばらつきの程度を解析した。すなわち、細胞が脳室帯において遊走を開始した地点を開始点、軟膜面近傍において遊走を終了した地点を終了点、開始点と終了点を結んだ直線を基準直線とし、基準直線からの距離を各時点において算出しその標準偏差を求め、ノンパラメトリックt検定を用いて統計解析した。その結果、vehicle群(標準偏差= $5.7 \pm 0.5$ ,  $n=89$ )と比較してBPA投与群(標準偏差= $4.1 \pm 0.3$ ,  $n=83$ )では、細胞体軌跡のばらつきが有意に減少していた(図(1)-1)-15)。



図(1)-1)-12. 細胞体トランスロケーション形態を示す細胞  
軟膜との突起の接着を維持し放射状に遊走する細胞が タイムラプス画像において観察される。脳室帯の細胞（矢印）は、放射状突起の先端（矢頭）を軟膜面に接着し、放射状に遊走する。VZ, ventricular zone. スケールバー: 20 $\mu$ m.

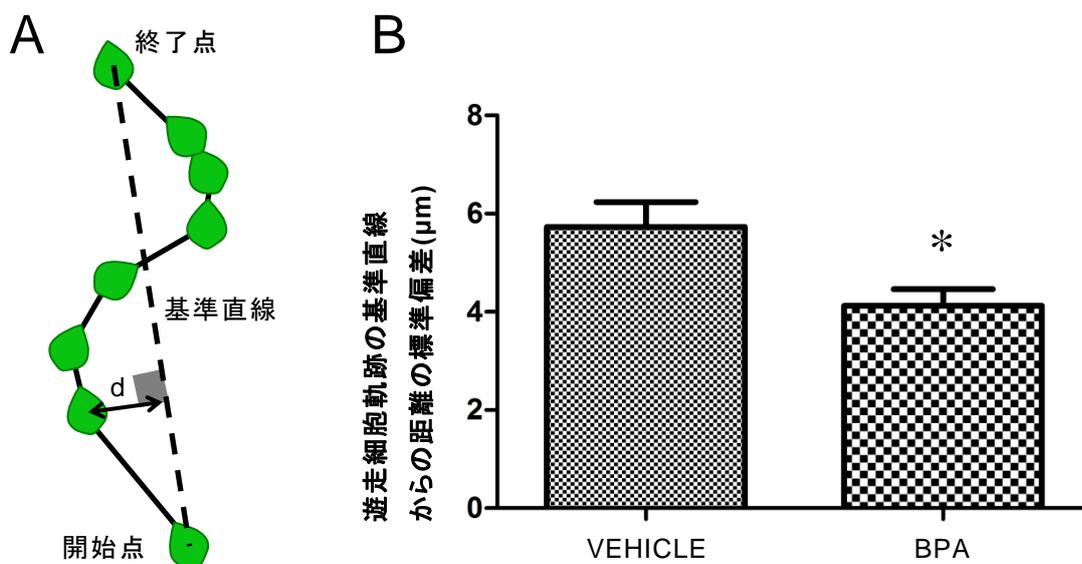


図(1)-1)-13. 軟膜面との接着を持たない単極性あるいは多極性突起を有し、ロコモーション形態で放射状遊走する細胞  
形態や方向の変化を伴いながら放射状遊走する様子が観察される。VZ, ventricular zone, 脳室帯; Pial surface, 軟膜表面 スケールバー : 20 $\mu$ m.



図(1-1)-14. 放射状遊走する細胞の平均速度

vehicle群;  $29.4 \pm 1.5 \mu\text{m/h}$ . BPA投与群;  $30.9 \pm 1.5 \mu\text{m/h}$ . エラーバーは標準誤差を示す。



図(1-1)-15. 放射状遊走する細胞の細胞体の軌跡のばらつき

(A) 各時刻における遊走細胞の基準直線（破線）からのばらつきを表す模式図。

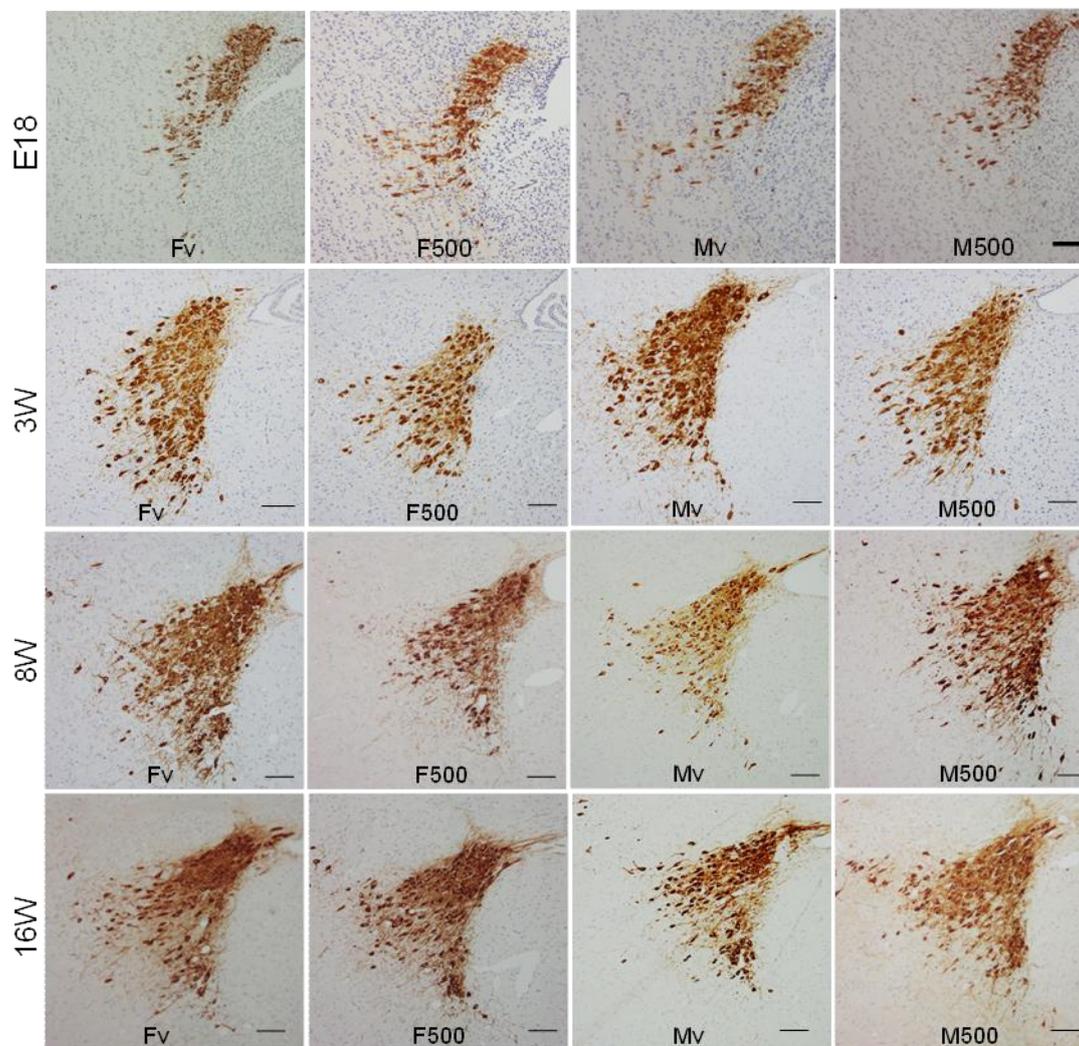
軌跡のばらつきは、各時刻において基準直線からの距離の標準偏差として計算した

(B) 遊走細胞軌跡の基準直線からの距離の標準偏差。数値が大きいほど基準直線からのばらつきが大きいことを示す。エラーバーは標準誤差を示す。vehicle群とBPA投与群の間の有意差はノンパラメトリックt検定により求めた：\*： $P < 0.05$

## b. 青斑核(Locus coeruleus: LC)の発生・分化に関する形態学的解析

### i. LCにおけるTH陽性神経細胞の計測

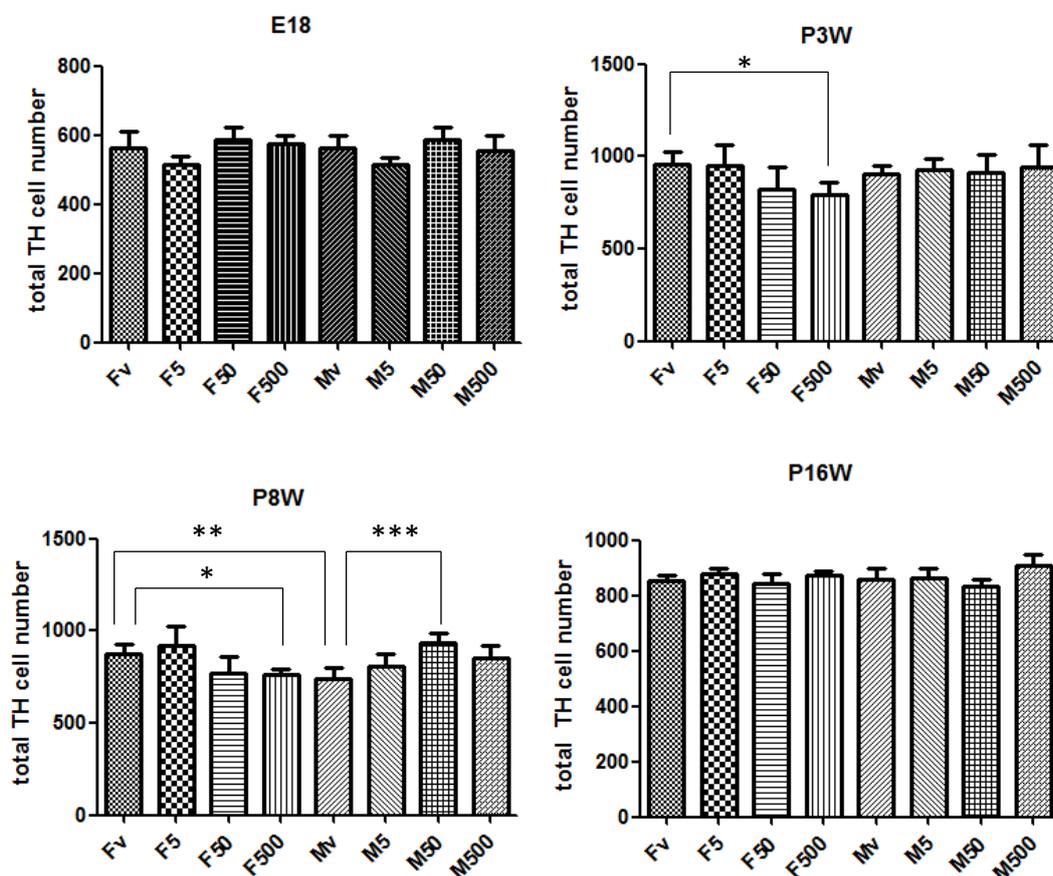
胎生12日では、LCにおけるTH陽性神経細胞は同定できなかったが、胎生14日から、LCの神経細胞にTHのタンパク発現が確認できた。



図(1-1)-16. LCにおけるTH陽性神経細胞：  
ノルアドレナリン作動性神経細胞がTH陽性に染色される。

LCにおけるTH陽性神経細胞総数は、胎生14日、胎生18日では、BPA投与群5 µg/kg bw/day, 50 µg/kg bw/day, 500 µg/kg bw/dayとvehicle群間に有意差は得られなかった。生後3週齢では、TH陽性神経細胞数は、BPA投与群500 µg/kg bw/dayの雌では、vehicle群の雌に比べて有意に減少していた ( $P < 0.05$ )。生後8週齢では、vehicle群で雌のTH陽性神経細胞数が雄に比し有意に多かった ( $P < 0.01$ )。しかし、BPA投与群500 µg/kg bw/dayでは、雌のTH陽性神経細胞数がvehicle群雄のレベルまで減少することで、vehicle群雌に比し有意に少なくなった ( $P < 0.05$ 、図(1-1)-16、図

(1)-1)-17)。一方、BPA 投与群50  $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ の雄では、vehicle群雄に比しTH陽性神経細胞数が有意に増加し、性差が完全に逆転した( $P < 0.001$ 、図(1)-1)-17)。また、生後16週齢では、vehicle群、BPA投与群500  $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ 、雌雄間で明らかな差異はみられなかった。



図(1)-1)-17. 青斑核のTH陽性神経細胞数経時的変化：

生後3週齢のvehicle群においてTH陽性神経細胞数に雌雄差は認められない。

生後3週齢のBPA群500  $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ の雌では、TH陽性神経細胞数が雌のvehicle群に比し有意に少ない。

生後8週齢のvehicle群では、雌のTH陽性神経細胞数が雄に比し有意に多い。BPA曝露群では、500  $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ の雌では、TH陽性神経細胞数が雌のvehicle群に比し有意に少ない。BPA群50  $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ の雄では、TH陽性神経細胞数が雄のvehicle群に比し有意に多く、BPA曝露による性差の逆転が生じている。

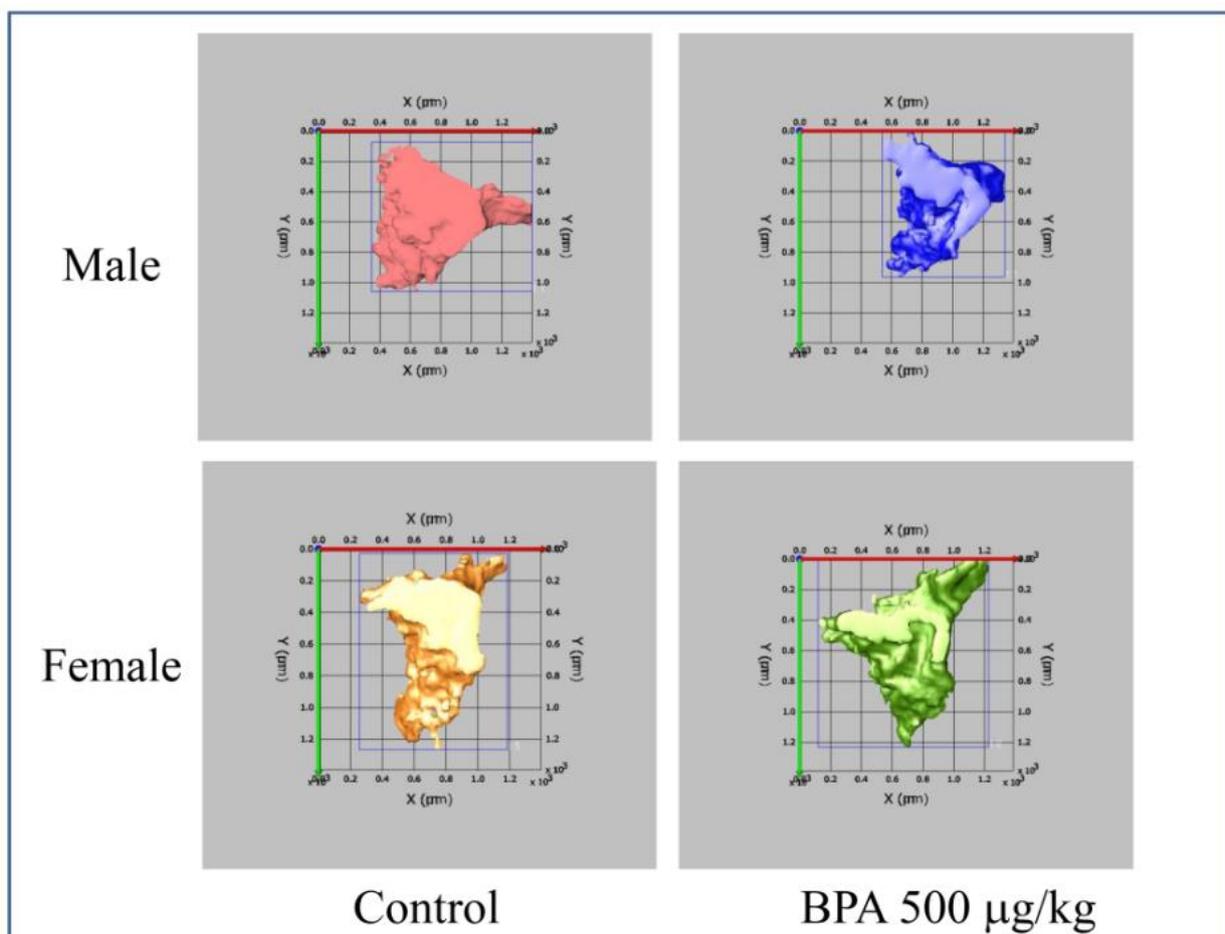
\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ .

## ii. LCの3次元再構成

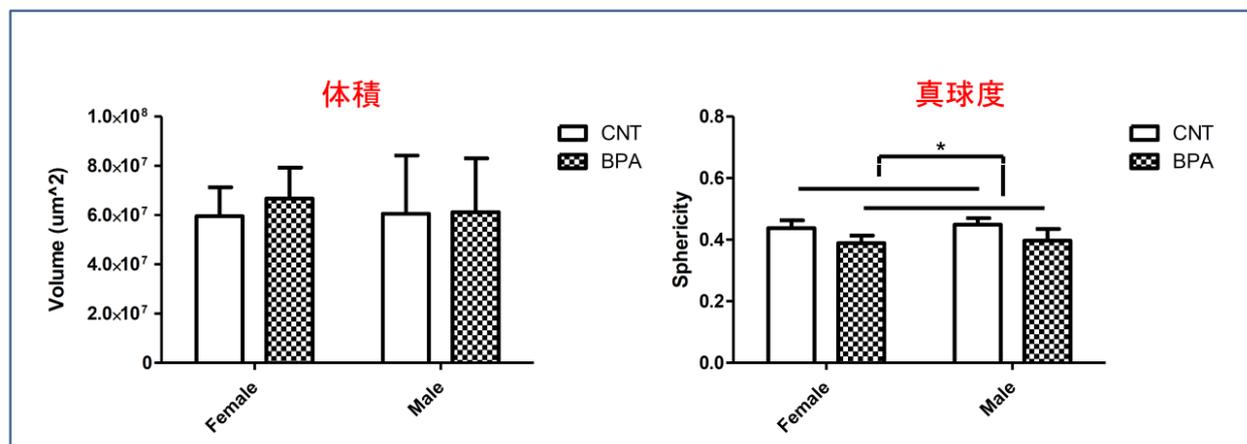
LCの連続組織切片を用いたコンピュータによる3次元構成を行い、LCの容積、形状の凹凸を解析した。BPA投与群500  $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ 、vehicle、雌雄の結果を示す(図(1)-1)-18)。LC体積はBPA投与群でvehicle群(CNT: control)に比し、雌雄ともにやや大きい傾向を示したが、有意差は得られなかった(図(1)-1)-19左)。核の表面性状を数値化するために、真球度を算出したところ、BPA

500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day投与群では雄雌ともにLCの真球度が有意に低く、核の表面性状が不規則な凹凸を示すことが明らかになった(図(1)-1)-19右)。

なお、真球度は $(6 \times \text{体積}) / (\text{表面積} \times \text{相当直径})$ で計算されるオブジェクト形状に関する値で、真球は1、その他の立体は1未満となる。同じ体積に対し、表面積が大きい、つまりオブジェクトに凹凸があると値が小さくなるという指標である。



図(1)-1)-18. LCの三次元再構成



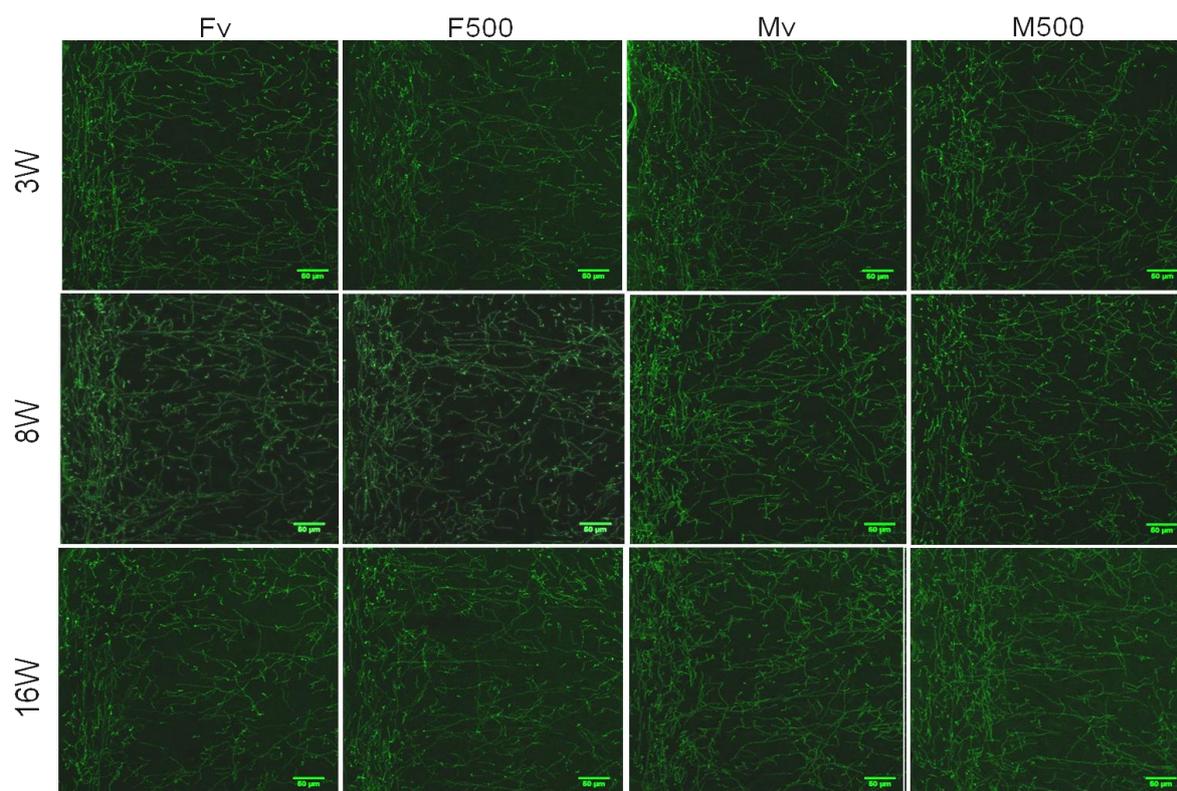
図(1)-1)-19. LCの体積(左)と真球度(右)

LC体積はBPA投与群(BPA)、vehicle群(CNT)間で有意差は得られなかった。真球度は、BPA投与群では雄雌ともにvehicle群に比し有意に低く、核の表面性状が不規則な凹凸を示した。

\*:  $P < 0.05$ .

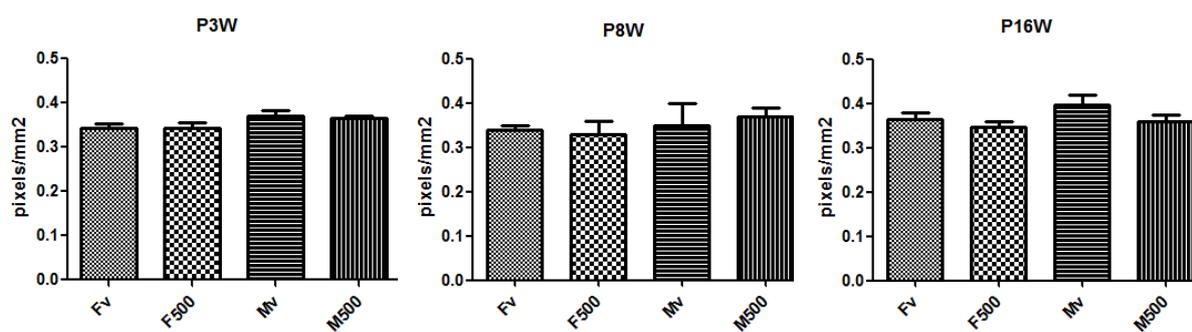
### c. 青斑核(Locus coeruleus: LC)の大脳皮質投射形成に関する形態学的解析

生後3週、8週、16週齢におけるNET陽性線維密度、分布形態は、vehicle群、BPA曝露群、雌雄間で有意差はみられなかった(図(1)-1)-20、図(1)-1)-21)。LCにおけるTH陽性ノルエピネフリン作動性神経細胞総数は、生後3週、8週齢では、BPA曝露群の雌でvehicle群の雌に比べて有意に減少( $p < 0.05$ )するとともに、BPA曝露群の雄でvehicle群雄に比し有意に増加し、性差が完全に逆転した( $p < 0.05$ 、図(1)-1)-17)。また、生後16週齢では、vehicle群、BPA曝露群500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day、雌雄間で明らかな差異はみられなかった。しかしながら、その主たる投射先である前頭前皮質における投射線維密度には変化がなかった。



図(1-1)-20. 前頭前皮質におけるNET陽性線維の蛍光免疫染色

P3W, P8W, P16Wにおいて、vehicle群、BPA曝露群、雌雄間でNET陽性線維の分布パターン、密度に差はみられない。Fv: vehicle群雌; F500: BPA 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw投与群雌; Mv: vehicle群雄; M500: BPA 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw投与群雄。



図(1-1)-21. 前頭前皮質におけるNET陽性線維密度

P3W, P8W, P16Wにおいて、vehicle群、BPA群、雌雄間で有意差はない。

#### d. 行動学的解析

##### i. 解析期間中のコーナー訪問回数(表(1-1)-1)

コーナー訪問回数は、vehicle群、BPA投与群ともに、夜間帯、しかも報酬の得られない(飲水しない)訪問回数が有意に多かった。

##### ii. 飲水コーナーでの滞在時間

BPA投与群雄では、vehicle群雄に比し、コーナー滞在時間が夜間・昼間ともに有意に長く、報酬の得られない（＝飲水しない）条件でも有意差を示した(図(1)-1)-22)。

iii. コーナーに対する嗜好性の形成

Preference Biasはマウス一頭のあるコーナーへの嗜好性を数学的に表したものである。

$$\text{Preference Bias}(j) = (C_{1st}(j) + C_{2nd}(j) - C_{3rd}(j) - C_{4th}(j))/2$$

$$C_{ij} = \frac{\text{animal}(j)\text{'s number of corner}(i)\text{ visits}}{\text{animal}(j)\text{'s number of total visits}}$$

$C_{1st}(j)$ は動物jのコーナー訪問割合のうち最大のものを示す。 $C_{2nd}(j)$ ,  $C_{3rd}(j)$ ,  $C_{4th}(j)$ はそれぞれ2番目, 3番目, 4番目のものである。動物jのコーナーiの訪問割合 $C_{ij}$ は上記で計算される。

Preference varianceは群としての嗜好傾向を数学的に示すものである。

$$\text{Preference Variance}(j) = \text{sqrt}\left(\sum_{i=1}^4 (C_{ij} - C_{iM})^2\right)$$

動物jのコーナー訪問割合 $C_{ij}$ と訪問割合の中央値 $C_{iM}$ とのユークリッド距離で定義する。中央値 $C_{iM}$ はコーナーごとに全動物の中央値を計算する。

図(1)-1)-23に示すように、BPA投与群雄では、Preference Biasが有意に高くコーナーに対する嗜好性が形成されたが、他群では嗜好性の形成はみられなかった。

Preference varianceに関しては各群に有意差はみられなかった(図(1)-1)-23)。

iv. コーナー訪問時の追従性

コーナー訪問において、直前に訪問した一頭体に追従するようなタイミングで他頭体がコーナーを訪問する性状を「コーナー訪問時の追従性」と定義し、2頭体の訪問時間間隔を算出した。BPA投与群雄では、前者にひき続いてコーナーを訪問する性向がみられ、特に報酬行動(＝飲水する)の場合に顕著であった(図(1)-1)-24)。

表(1)-1)-1. コーナー訪問回数

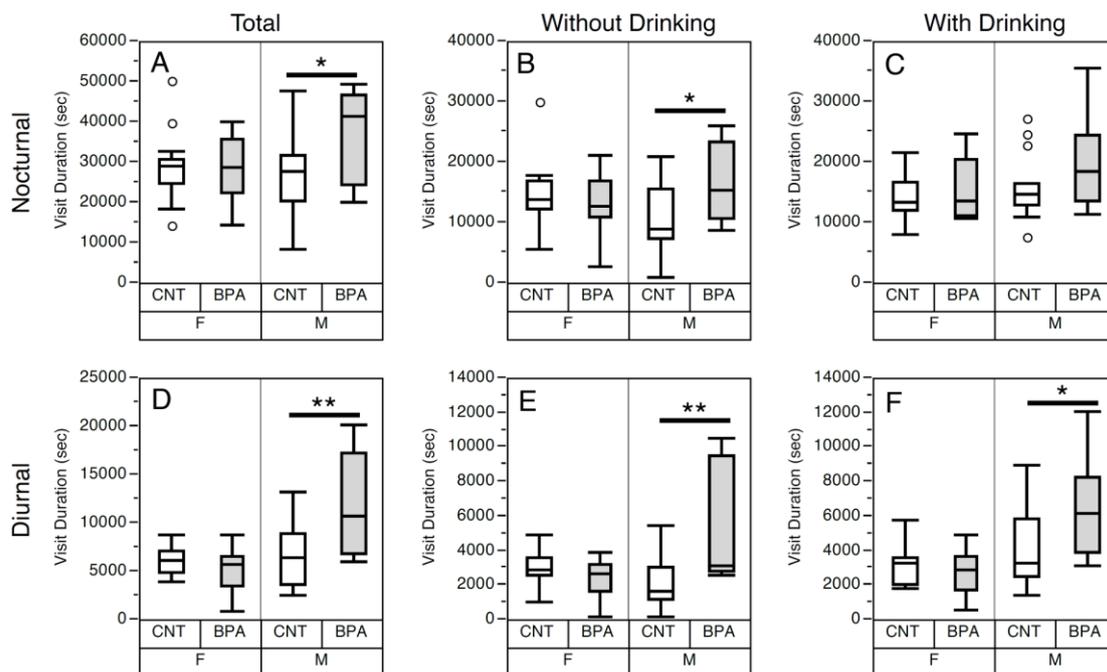
Visit	Nocturnal (1 day average)			Diurnal (1 day average)		
	Total	WoD	WD	Total	WoD	WD
CNT-F	170.8 ± 27.7 ****	121.8 ± 24.6 ****##	49.0 ± 6.4 ****	31.2 ± 6.7	21.6 ± 4.8 ##	9.6 ± 2.8
BPA-F	152.2 ± 56.0 ***	101.7 ± 47.9 **	50.5 ± 9.7 ***	21.6 ± 8.6 †	13.9 ± 5.7 #†	7.7 ± 3.2
CNT-M	143.3 ± 42.0 ****	91.7 ± 38.3 ****##	51.6 ± 9.2 ****	31.0 ± 15.3	17.9 ± 9.4 #	13.1 ± 7.4
BPA-M	149.0 ± 33.7 ***	95.1 ± 31.0 **	53.8 ± 8.5 ***	30.2 ± 8.7	17.7 ± 7.9	12.5 ± 4.5

Values represent mean ± SD. CNT: control, WoD: without drinking, WD: with drinking.

\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$  (nocturnal vs. diurnal, Wilcoxon rank-sum test)

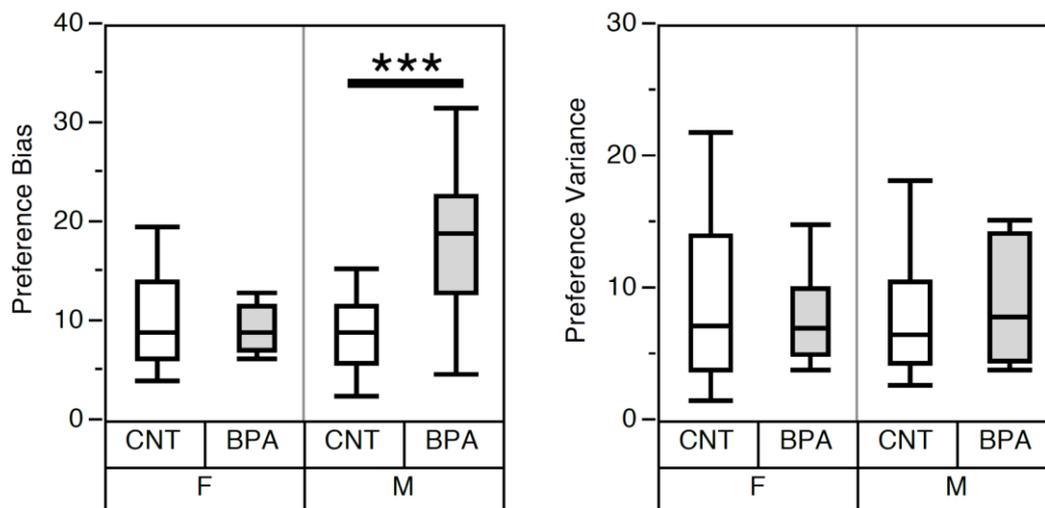
#  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.0001$  (drinking vs. without drinking, Wilcoxon rank-sum test)

†  $P < 0.01$  (treatment, Tukey's HSD)



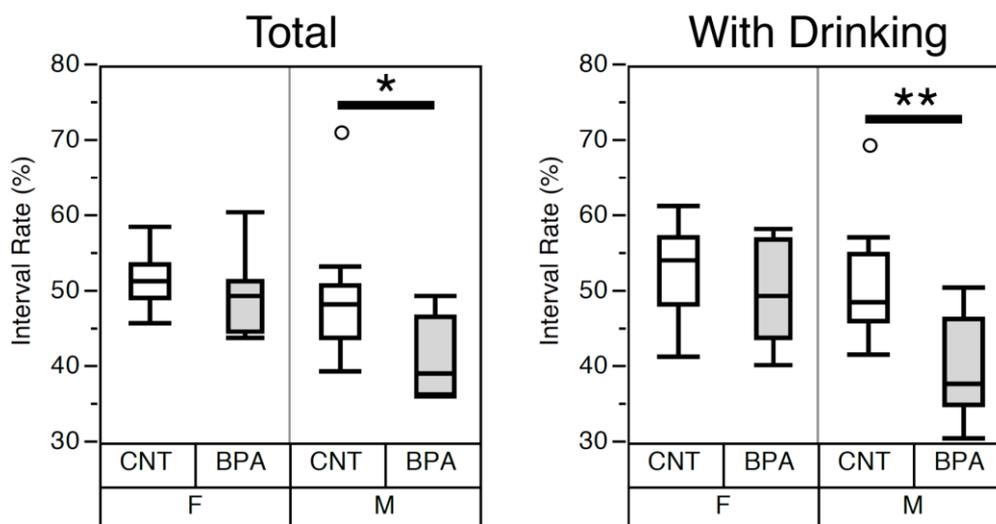
図(1-1)-22. 飲水コーナーでの滞在時間

BPA群雄では、vehicle群雄に比し、コーナー滞在時間が夜間・昼間ともに有意に長く、報酬の得られない条件でも有意差を示した。\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ .



図(1-1)-23. コーナーに対する嗜好形成

BPA群雄では、vehicle群雄に比し、コーナーに対する嗜好性が明らかに形成された。一方、雌では両群間に差はみられなかった。\*\*\*:  $P < 0.001$ .



図(1)-1)-24. コーナー訪問時の追従性

BPA群雄では、vehicle群雄に比しinterval（先の動物の訪問との時間間隔）が有意に短く、他個体に追従してコーナーを訪問する表現型がみられた。\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ .

#### e. 神経伝達物質の生化学的解析

##### i. モノアミン (DA、DOPAC、5HT、5-HIAA) 定量

DA、DOPAC、5HT、5-HIAAの定量結果を示す(図(1)-1)-25)。

BPA曝露群の雌で、基底核、扁桃核で5HTの増加、視床下部でDA、DOPACの有意な増加、BPA曝露群の雄でDOPAC/DAの比率の増大をみたが、多くは有意な差異を示さなかった。

##### ii. NE、GABA、Glu定量

BPA曝露群雌では大脳皮質、基底核、扁桃核、海馬、視床下部、視床、中脳黒質でGABA、Gluの有意な増加、大脳皮質、視床、視床下部でNEの有意な増加をみた(図(1)-1)-25)。BPA曝露群の雄では、扁桃核と海馬でGABAの有意な減少、Gluの有意な増加がみられ、BPA曝露影響に雌雄差のあることが判明した。

##### iii. 社会行動と神経伝達物質変動の相関

社会行動結果との相関を統計的に解析した(図(1)-1)-26, 図(1)-1)-27)。BPA曝露群雌では、昼間の報酬行為を伴わない（飲水しない）コーナー訪問回数が有意に減少していたが、この行動と大脳皮質、視床におけるNEの増加が有意な相関を示した。一方、BPA曝露群雄では、vehicle群雄に比し、コーナー滞在時間が夜間・昼間ともに有意に長く、報酬の得られない条件（＝飲水しない）でも有意差を示しており、コーナーに対する嗜好性が形成された。このコーナー滞在時間の増大と、海馬におけるGABA減少との間に有意な相関関係がみられた。

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

図(1)-1)-25. 神経伝達物質定量結果

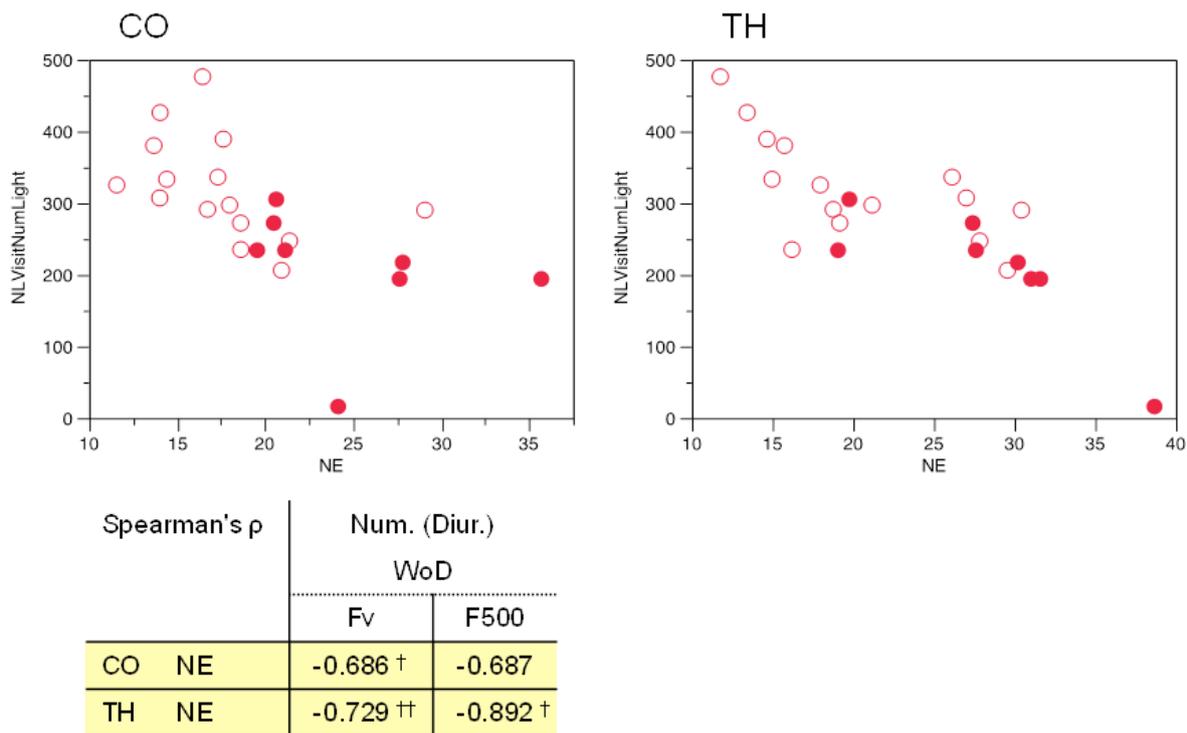
赤地(↑)はBPA曝露群で有意に増加、青地(↓)はBPA曝露群で有意に減少したものを示す。

CO: 大脳皮質、BG: 基底核、AMY: 扁桃核、HIP: 海馬、HT: 視床下部、TH: 視床、  
DR: 背側縫線核、SN: 黒質、LC: 青斑核

DA: ドパミン、DOPAC: ドパミン代謝産物、5-HT: セロトニン、5-HIAA: セロトニン代謝産物、NE: ノルアドレナリン、GABA: ガンマアミノ酪酸、Glu: グルタミン酸

ND: 検出できず

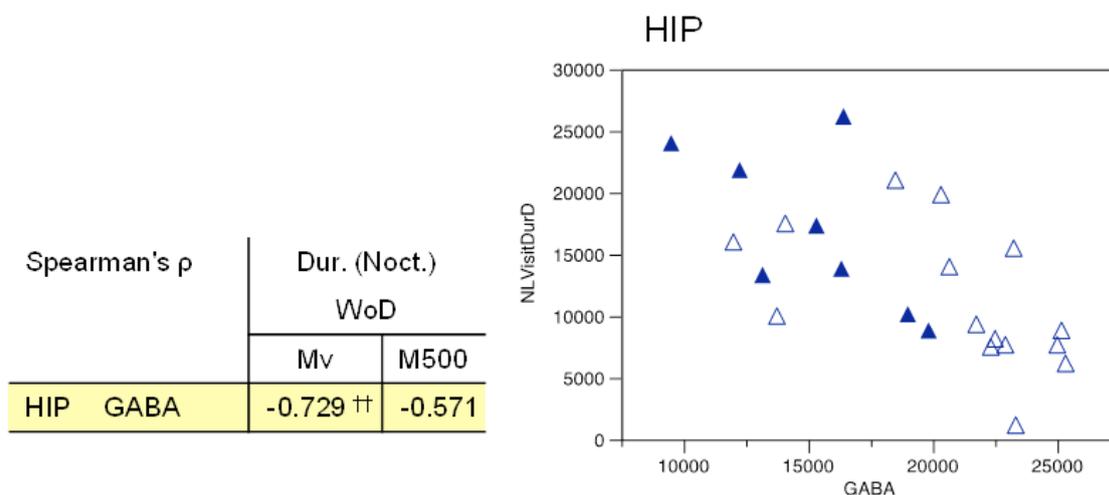
Wilcoxon rank-sum test (FDR≤10%) ↑および↓:  $q < 0.1$ , ↑↑:  $q < 0.05$ , ns: 有意差なし



図(1)-1)-26. 神経伝達物質定量と行動実験結果の相関

Spearman's rank correlation coefficient

†  $q \leq 0.1$  Num: 訪問回数、Diur.: 明期、WoD: 飲水行為なし、CO: 大脳皮質、TH: 視床、NE: ノルアドレナリン ●はメスBPA曝露群、○はメスvehicle群



図(1)-1)-27. 神経伝達物質定量と行動実験結果の相関

Spearman's rank correlation coefficient †  $q \leq 0.1$  Dur.: コーナー滞在時間

Noct: 暗期、WoD: 飲水行為なし、HIP: 海馬、GABA: ガンマ酪酸

▲はオスBPA曝露群、△はオスvehicle群

BPAの胎生期・授乳期曝露による脳形成過程に及ぼす影響を形態学的に検索したところ、大脳皮質形成過程において胎生14.5日に最終分裂直前のDNA合成期にあった（＝胎生14.5日に産生された）神経細胞は、生後3週齢の時点で皮質IV層における分布が非曝露対照群に比し少なくV層あるいはVI層に多く分布するという大脳皮質での分布異常を示した。この大脳皮質神経細胞分布異常には、性差、BPA曝露用量への依存性はなく5 µg/kg bw/dayの極低用量でも有意な差異が検出できた。われわれの以前の報告<sup>1)</sup>や大脳皮質組織培養系を対象とした蛍光イメージング・タイムラプス解析で得られた結果を勘案すると、BPAが神経細胞の遊走過程に促進的に作用したことが基盤にあると考えられるが、当該変化は胎生14.5日に分化した神経芽細胞に限られた変化であり、BPAの大脳皮質形成過程に及ぼす影響には臨界期の存在が示唆される。現在までの解析では、海馬、視床、視床下部、線条体に神経細胞の分化・遊走の異常はみられず、影響は大脳皮質に特異的かつ限定的であった。われわれは既にBPA胎生期曝露による大脳皮質形成過程への影響解析結果を報告しているが<sup>1)</sup>、マウス系統、投与法、投与量、投与期間を変更しても高い再現性がみられた本所見、すなわち大脳皮質形成過程へのBPA曝露の影響は特筆すべき所見と考える。

次に、性的二型核の一つである青斑核(Locus coeruleus: LC)におけるTyrosine hydroxylase: THを含むノルアドレナリン作動性神経細胞数の変動に関して検討を行った。胎生期・授乳期におけるBPA曝露は、雌の成熟過程である生後3週から8週齢-ヒトでは思春期に相当すると考えられる時期-において、LCの神経細胞数をvehicle群雄と同レベルまで減少させ、性差の逆転、即ち雌の雄化という現象を惹起することが示された。当該変化が、低用量(50 µg/kg/day)のBPAを妊娠・授乳期間中の母体に経口投与することで引き起こされたことは重要である。生理的には、LCにおけるTH陽性神経細胞数は生後30日で雌雄差はみられないが、生後60日では雌雄差が生じ、雌のTH陽性神経細胞数が雄のそれに比し有意に多くなり、生後120日では雌のTH陽性神経細胞数が減少することにより雌雄差が消失する。さらに、エストロゲン受容体βのノックアウトマウスでは、生後60日にピークに達したTH陽性神経細胞数は、生後週齢とともに生理的に生じる神経細胞減少がわずかにとどまり、野生型に比べ生後240日まで有意に細胞数が多いと報告されている<sup>4)</sup>。LCのノルアドレナリン作動性神経細胞にはエストロゲン受容体βが発現しており、エストロゲン支配性に神経細胞の生存、神経伝達物質の調節などが行われていると想定されている。BPAは弱いエストロゲン作用を有しておりその作用機序の全貌はなお明らかではないものの、一部はエストロゲン受容体を介して影響を及ぼすと考えられている。われわれの実験結果から、胎生期、授乳期におけるBPA投与はLCの神経細胞産生には影響を及ぼさないものの、その後の神経細胞の分化、神経伝達物質の産生機構に影響を及ぼす可能性が示唆された。

さらに、3次元構築モデルを作製してLCの体積・形状を解析したところ、BPA曝露による変化として体積の変動はみられなかったが、LC核の表面性状が不規則な凹凸を示すことが明らかになった。形状の変化の意味するところは現時点で明らかではないが、神経細胞の異常な分布、神経細胞の不規則な脱落、神経突起の分布の多様性などを含め、LC内の部位による構成神経細胞のBPA感受性の差異を反映している可能性がある。

引き続き、性的二型核LCのノルエピネフリン作動性神経細胞が投射する大脳：前頭前皮質の解析を行った。先に記載したように、胎生期・授乳期におけるBPA曝露は、雌の成熟過程である生後3週から8週齢においてLCの神経細胞数がvehicle群雄と同レベルまで減少し、性差の逆転、即ち雌の雄化という現象が生じていることが示唆された。その選択的投射先である前頭前皮質では、

NET陽性線維の分布・密度には3週、8週、16週齢いずれの年齢においても、BPA曝露群、vehicle群での有意差はみられなかった。この結果から、BPA曝露により有意に減少したLCのノルエピネフリン作動性神経細胞が脳皮質以外の領域に投射する細胞であった可能性、あるいは神経細胞軸索終末での分枝数の増減がフィードバック機構により惹起された可能性などが考えられる。

集団行動解析バッテリーであるIntelliCageを用いた行動実験では、BPA曝露マウスの社会行動の異常を抽出できたと考える。報酬とは無関係に社会集団から離れたコーナーに長時間滞在する傾向、嗜好性の形成、追従性の増加など、その変動はBPA投与群雄に顕著にみられた。背景病態に関しては議論のあるところであるが、自閉性、固執性、情動性などが関与している可能性がある。ヒトにおけるいかなる病態のモデルとなり得るかに関しては今後さらに解析を進めることが必要であるが、発達障害モデルとして理解することも可能である。

他方、脳の機能的変動を明らかにする一つのアプローチとして、脳内神経伝達物質の変動をHPLC-ECD, LC-MSを用いて測定したところ、BPA曝露の生物影響に性差のあることが立証できたと考える。興味深いことは、IntelliCageを用いた行動実験によりBPA曝露群雄に顕著にみられた行動、即ち報酬とは無関係に社会集団から離れたコーナーに長時間滞在する傾向や嗜好性の形成が、海馬におけるGABAの減少と相関していたことである。背景病態には議論のあるところであるが、海馬-中隔-中脳腹側被蓋野を結ぶ報酬系のかく乱がその病態背景として考えられる。

一方、LCのノルエピネフリン作動性神経細胞にBPA曝露の影響・雌雄の差異が消失する16週齢において、BPA曝露群雌の脳皮質でNE量が有意に増加していたことは、LCの神経細胞数とは関係なく、ノルエピネフリン作動性神経細胞の機能亢進状態が基盤にあることを示唆する。その意味するものはなお不明であるが、BPAへの胎生期・授乳期曝露により生理的にみられるLCのノルエピネフリン作動性神経細胞数の消長を喪失したことが、その後の神経細胞活動に何らかの変動をもたらした可能性を想定し、今後さらなる検証を進めることが求められる。

以上のように、胎生期から新生仔期にかけての低用量BPA曝露が脳形成過程に及ぼす影響の一部を解明し得たので、環境政策立案に資する科学的根拠となることを期待する。

## 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

### a. 発現変動遺伝子候補の抽出

得られたアレイデータのうち、少なくとも1サンプルで、有効なシグナルを示した31323アレイプローブを対象にデータ解析を進めた。まず、2元配置分散分析の結果から、投与条件のみが変動要因であること、すなわちBPA曝露により変動する遺伝子群は性別-BPA曝露の交互作用を受けないということが判明した。

そこで、各群の発現量（性別を無視した個体間平均値）をもとにvolcano plot法により変動遺伝子を抽出した。「多重検定補正済み p-value < 0.05 かつ Fold Change > 2」という一般的な基準で抽出される遺伝子はなく、多重検定補正済み p-value < 0.05での最大変動幅はFold Change < 1.5となった。遺伝子発現変動は胎仔脳に比べ予想外に小さいことがわかった。次に検定の閾値と同時にFold Changeの閾値を設定し直し、「多重検定補正済み p-value < 0.2 かつ Fold Change > 1.2」というかなり緩やかな条件で遺伝子の抽出を行ったところ、51プローブ存在した（BPA曝

露でUPが29、BPA曝露でDOWNが22；表(1)-2)-1)。表(1)-2)-1)にかかげた遺伝子群については、直接的な蛋白-蛋白間相互作用を示すものや共通の直接結合蛋白（変動遺伝子としては抽出されなかった）を有するものが少なからず含まれていた（図(1)-2)-1）。しかし、予想に反して、これらの変動は全て2倍に満たないものであった。これは、変動の有無に関する個体差が少なからず認められたことが大きく寄与したためと考えられた。これらの遺伝子について実施したRT-定量PCR法による変動確認においても、BPA曝露群としてのFold Changeは1.5に満たないものであることが確認されたことから、候補遺伝子とはならないと考えられた。

通常一般に変動遺伝子として見なされるよりもかなり緩やかな条件で抽出されたこれらの遺伝子が、真にBPA曝露に対する応答の結果なのかどうかの判断は難しい。しかし、ここまでに行った発現変動ランキングに基づく抽出手法の方法論的制約としては、繰り返し実験の少ない統計検定、多重検定の補正、ノイズの影響などを原因とする、重要遺伝子の抽出漏れの可能性が指摘されてきた。さらに個々の遺伝子だけではパスウェイへの影響がわからないという欠点もある。

そこで、GSEA(Gene Set Enrichment Analysis)法による遺伝子抽出に着手した。これは、例えば、10倍変動した1遺伝子に比べ、1.2倍変動した、同一のパスウェイ上にある10遺伝子のほうが重要では無いかという観点にたった解析手法であり、ある生物学的情報に関連する遺伝子がまとまって、わずかでも変動している場合に有効と考えられている。そこで、先に抽出された遺伝子群について、どのような関連性が濃縮されるかを検討した。その結果、Human PhenotypeとしてAbnormality of the alveolar ridges ( $p = 0.012471$ )、PathwayとしてGenes involved in Neuro t ransmitter Receptor Binding And Downstream Transmission In The Postsynaptic Cell ( $p = 0.005627$ )、Genes involved in Transmission across Chemical Synapses Cell ( $p = 0.030958$ )、Genes involved in Trafficking of GluR2-containing AMPA receptors ( $p = 0.094107$ )といったカテゴリーがヒットした。そこで、これらのカテゴリーに含まれる遺伝子が複数同時に動いているかどうかをBPA曝露群の個体ごとにみたところ、必ずしもそのような結果にはなっていなかった。このことから、GSEA法によっても、ある生物学的情報に関連する発現変動遺伝子群を必ずしもうまく抽出できなかったと判断した。

以上の結果から、各群の発現量の個体間平均値を利用する手法とは異なるアプローチによって、発現アレイデータから遺伝子抽出を行うことが必要であると判断した。

#### b. MIAMI法によるDNAメチル化変動遺伝子候補の抽出

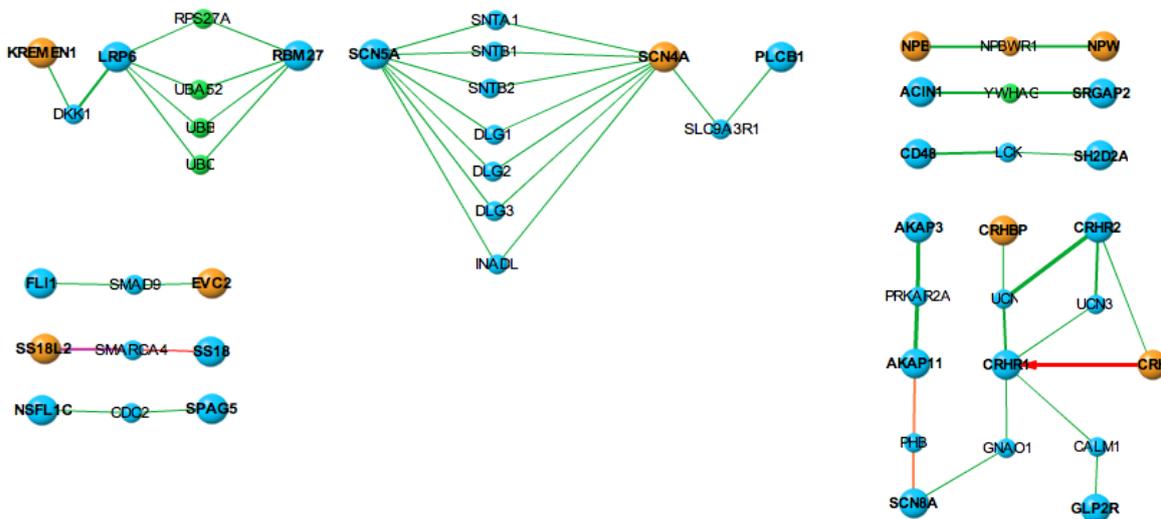
方法の項で述べたように、個体間総当たりでの比較を実施できない制約があったため、発現アレイの情報をもとに解析対象個体の絞り込みを行った。BPA曝露群とvehicle投与群それぞれにおいて同腹仔の関係にある雌雄4対(8匹)、合計雌雄8対16匹を発現解析では用いた。これらの個体を、有効なシグナルを示した31323プローブ全てのシグナル値を用いたクラスタリング解析の結果、同腹仔同士の発現状態が非常に似ていることが判った。そこで、全8対の同腹仔ペア間で主成分解析による比較を行った。その結果、vehicle投与群、BPA投与群それぞれにおいて、1対ずつのはずれペアが検出された(図(1)-2)-2)。そこで、まず、これら雌雄2対4匹を解析対象から外した。

そのうえで、各群内の3ペアの位置関係がよく類似していることに着目し、図(1)-2)-2)において両端矢印で示した比較対間でBPA曝露有無のメチル化解析を行うことにした。さらに、メチル

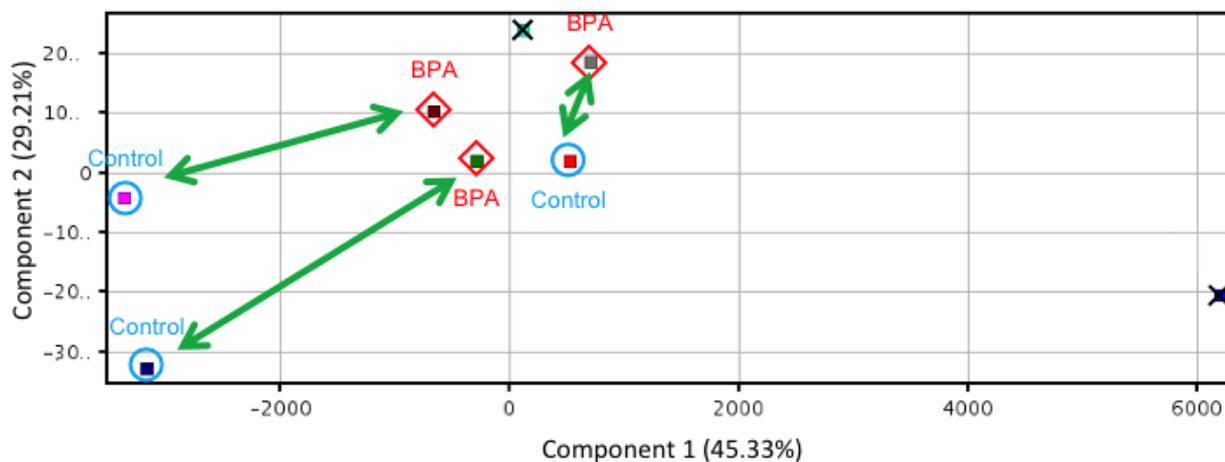
化の性差による影響を見るため、同腹仔の雌雄間での比較をvehicle投与群、BPA曝露群それぞれにおいて行うことにした。このようにして決められた比較すべき2個体間において、蛋白をコードする遺伝子上のDNAメチル化をMIAMI法にて検索した。

表(1)-2)-1. 変動遺伝子候補リスト

Gene Name	Entrez ID
<i>Fgfbp1</i>	14181
<i>Glp2r</i>	93896
<i>Slc10a7</i>	76775
<i>Gm10753</i>	100038731
<i>Tmem45a</i>	56277
<i>Cd48</i>	12506
<i>Gypc</i>	71683
<i>Gm5068</i>	277069
<i>4930423D22Rik</i>	74634
<i>Crh</i>	12918
<i>Ss18</i>	268996
<i>Tbx15</i>	21384
<i>lqsec3</i>	243621
<i>Gm4461</i>	100043474
<i>Cldn 5</i>	12741
<i>1700027A07Rik</i>	69996
<i>Nsf</i>	18195
<i>Gm7276</i>	639653
<i>Evc 2</i>	68525
<i>Pfch 1</i>	269437
<i>Sfmbt1</i>	54650
<i>Rpl</i>	19041
<i>Rbm27</i>	225432
<i>Sh2d2a</i>	27371
<i>Fli 1</i>	14247
<i>Spag5</i>	54141
<i>Smago</i>	207818
<i>Gm9174</i>	668450
<i>Akap1l</i>	219181
<i>Gnb4</i>	14696
<i>Gm5396</i>	385454
<i>Lrp6</i>	16974
<i>C03003GA07Rik</i>	654818
<i>Fitm2</i>	226859
<i>Plob 1</i>	18795
<i>Nav1</i>	215690
<i>Acin1</i>	56215
<i>A830005F24Rik</i>	442803
<i>Mex3b</i>	106797
<i>Kremen1</i>	84035
<i>9530062K07Rik</i>	78739
<i>Cd276</i>	102657
<i>6430548M08Rik</i>	234797
<i>Gm4514</i>	100043553
<i>Srpx</i>	51795
<i>Srgap3</i>	259302
<i>74930475L05Rik</i>	75818
<i>Fbxo15</i>	50764
<i>Ap2b1</i>	71770



図(1)-2)-1. 抽出された蛋白-蛋白間相互作用の例



図(1)-2)-2. 異なる同腹仔ペア間での発現傾向の主成分解析結果

その結果、DNA中の「CCGG」配列を認識するメチル化感受性制限酵素 *Hpa* II 認識部位34カ所においてメチル化の違いが見出された。しかし、その多くは特定の個体において見出されたものであった。このうち、15カ所はpromoter領域に、残り19カ所は転写開始点の10kb以内の下流で、かつ、ストップコドンより上流に位置していた。これら34カ所のうち、26カ所はBPA曝露群の雄のみで、2カ所は雌のみでメチル化の亢進を示した。2カ所は性差による影響のみを受けてい

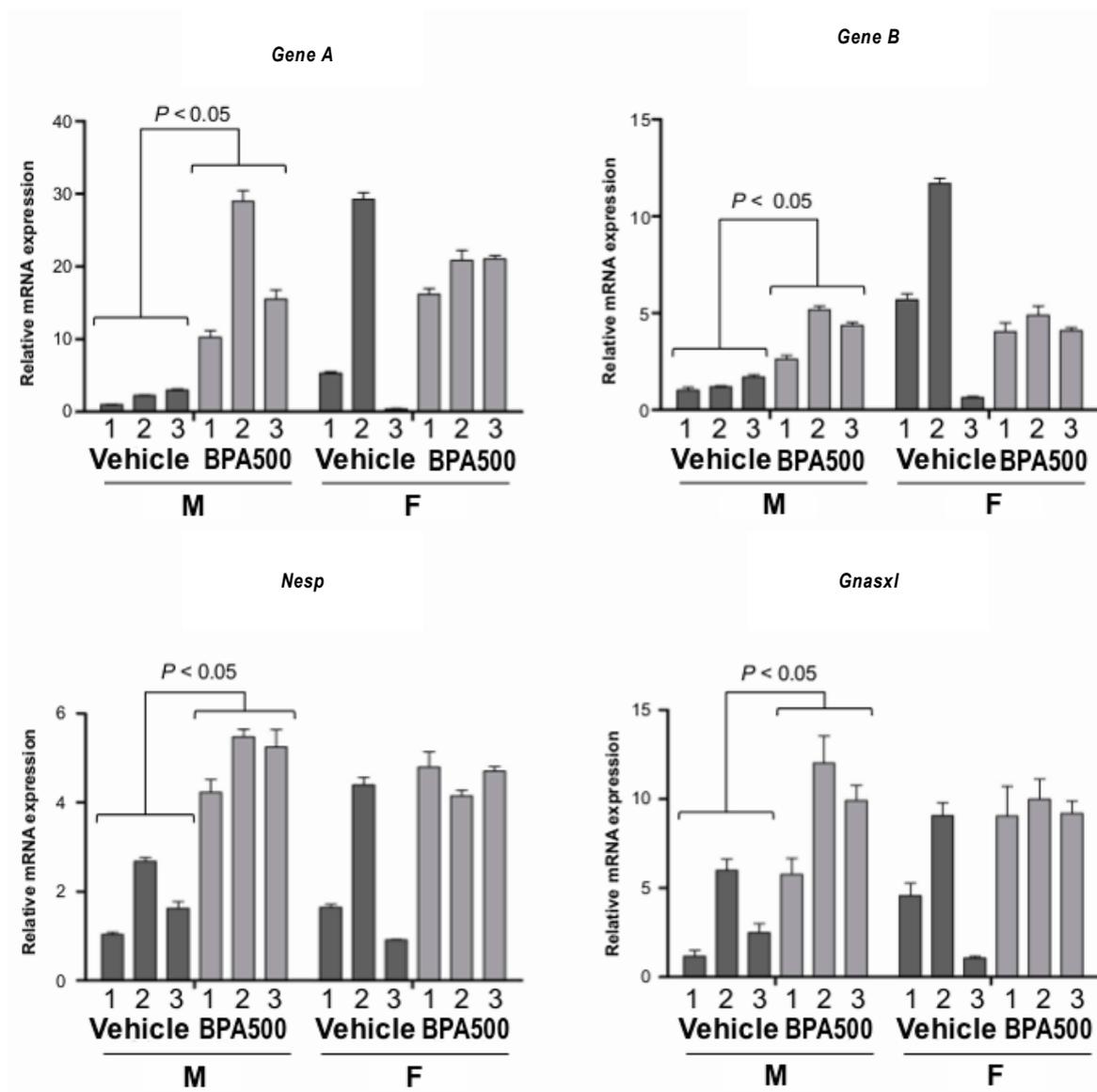
た。残り4カ所はBPA曝露群もしくはvehicle投与群内の雌雄差のみを示した。前述の遺伝子発現マイクロアレイ法の結果と同様、*Hpa* II認識部位に着目したメチル化変動解析の結果からは、個体差の影響が予想外に大きいことが明らかとなった。

遺伝子発現マイクロアレイ法による発現変動遺伝子候補とオーバーラップした遺伝子は特定の1匹において、3カ所（遺伝子）検出された。それら検出された*Hpa* II認識部位について、そのメチル化状態をMS-PCR法により定量した。アレイで比較した個体間に差は認められたが、2元配置分散分析の結果からは、性別やBPA曝露の有無による有意な群間差は得られなかった。またメチル化度と発現レベルの間に相関も得られなかった。

以上の結果から、MIAMI法を用いて有意なBPA曝露応答性メチル化変動部位を抽出することは困難であると判断した。

### c. 発現変動遺伝子候補の抽出

「a. 発現変動遺伝子候補の抽出」で述べた発現アレイデータからの遺伝子抽出作業を行うなかで、遺伝子発現レベルが同一群内でも個体差がみられる傾向にあることに気がついていた。そこで、必ずしも一般的な手法とはされていないけれども、個体間比較を総当たりで行う次のような2通りの抽出法を実施した：i) 同一性間の比較によるBPA応答性変動遺伝子の抽出、ii) 同一薬剤処理条件の同腹異性間差次的発現を示す遺伝子群から、片方の処理条件群にのみ現れる遺伝子の抽出。このとき、差のある発現量の基準として発現変化量2倍以上を設定した。これらの作業をすべての個体の組み合わせで行い、遺伝子ごとに抽出回数をカウントした。カウント数の多い上位の遺伝子のうち、各遺伝子領域にDNAメチル化の標的となるCpGに富む配列領域（CpG island; 以下CGI）が少なくとも1つ存在する遺伝子に着目し、RT-qPCR法により発現変動を確認した。その結果、i)の方針により3つのBPA応答性発現変動遺伝子A、B、*Gnas*を得ることができた。*Gnas*遺伝座からは4つのalternative promoterから異なるmRNAが転写されるが、*Nesp*および*Gnasxl*においてBPA応答性発現変動を見出した(図(1)-2)-3)。

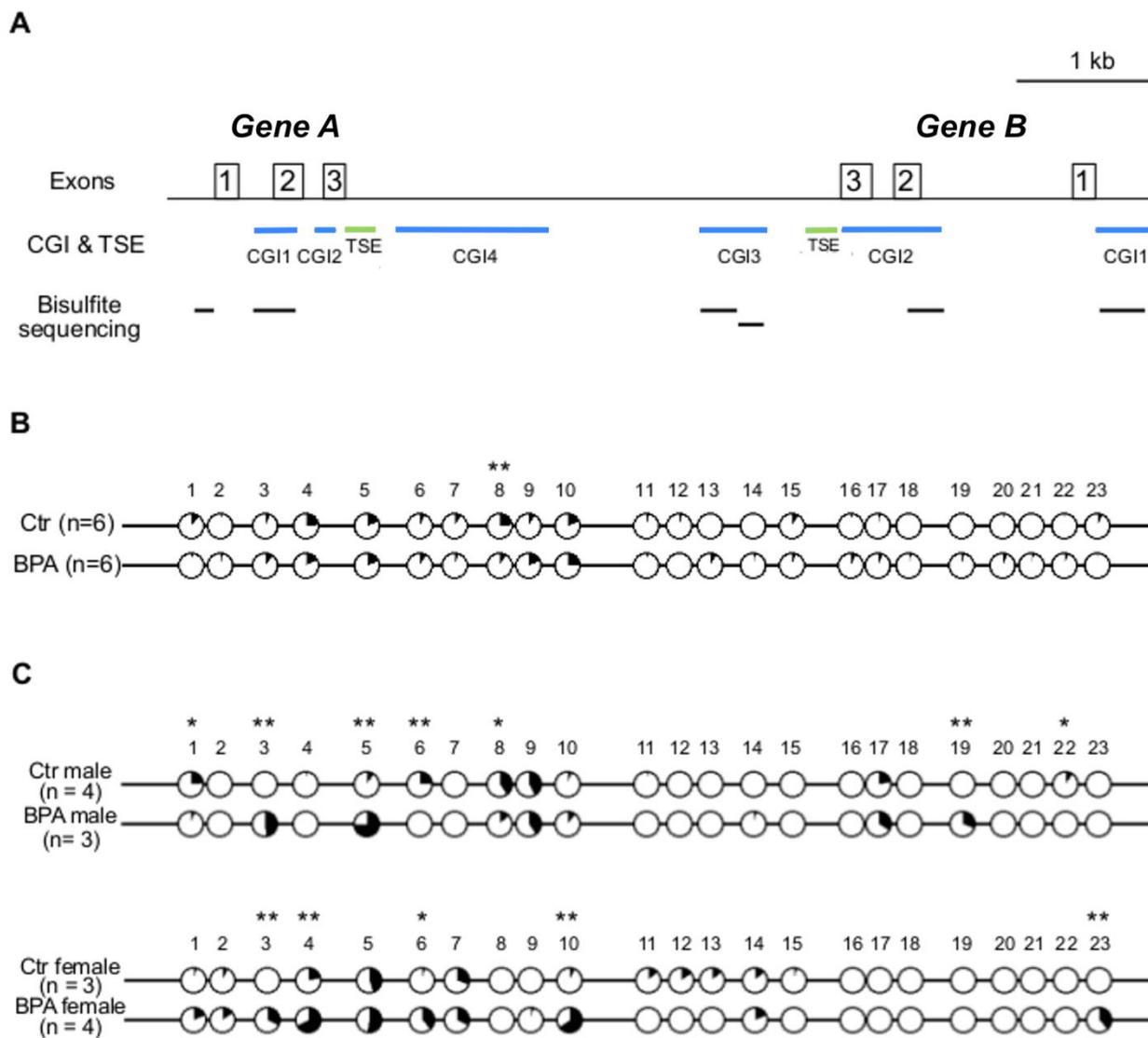


図(1)-2)-3. 大脳におけるBPA応答性発現変動

#### d. 大脳（P3W）における候補遺伝子領域のDNAメチル化変動の解析

発現アレイやMIAMI法の解析に用いた個体のゲノムDNAを用いて、3つの候補遺伝子(A, B, Gnas)領域それぞれのCGIを対象にBisulfite Sequencing法にて一塩基レベルでのCpGメチル化状態を解析した。NespおよびGnasxlの各転写開始点周囲にCGIが存在する。これらの領域中で検索したCpGにおいてBPA応答性メチル化変動は見いだされなかった。A・B両遺伝子はゲノム上の狭小な領域に隣り合って位置しており、それぞれの遺伝子内に2つずつのCGIを、さらに遺伝子間に2つのCGIを持つ(図(1)-2)-4A)。これらのCGIとA遺伝子転写開始点上流(0.5kb内)の複数のCpGについて調べた。その結果、P3Wの大脳において、AのCGI1領域中に存在する23カ所のCpGのうち8番目のCpG(以下、CpG\_8)のみがBPA曝露依存性のメチル化状態変動を示すことを見いだ

した。この変動は性差に依存しておらず(図(1)-2)-4B)、かつmRNA発現変動との間に強い逆相関を示す唯一の部位であった(図(1)-2)-5A)。そこで、CpG\_8を含むAのCGI領域に候補を絞り以後の解析を行った。



図(1)-2)-4. A遺伝子CGI領域におけるBPA曝露応答性メチル化変動

A) AおよびB遺伝子のゲノム構造。エクソンを白抜きボックス、CGI、組織特異的エンハンサー領域(TSE)、Bisulfite Sequencing法で解析した領域をそれぞれ線で示す。B, C) 円グラフによって、大脳(B)および血液(C)由来 DNAにおけるA遺伝子CGI領域中の各CpG部位(全23カ所)でのメチル化度(% ; 黒)を示す。Fisher's exact testによりBPA曝露群とvehicle投与群の間で有意差がある部位にはアスタリスクを付した。\* : significant at  $P < 0.05$ 、\*\* : significant at  $P < 0.01$

#### e. 離乳直後のP3Wおよび離乳後にはBPA曝露を受けていないP13-14Wのマウス大脳におけるCpG\_8のメチル化変動を解析

大脳におけるA遺伝子CpG\_8のメチル化変動の解析を、離乳直後の個体(P3W)について解析

個体数を拡大して実施した。さらに、離乳後はBPA曝露を受けていないP13-14Wのマウスも対象として解析した。大脳皮質におけるCpG\_8のメチル化変動を解析した個体数は以下のとおりである：非曝露群25匹(P3W♂6,♀6; P13-14W♂9,♀4)、曝露群28匹(P3W♂6,♀6; P13-14W♂8,♀8)。

2way-ANOVAの結果、BPA曝露歴のみがメチル化度の変動要因とされ、週齢・性別による違いはなかった(図(1)-2)-5B)。離乳後にはBPA曝露を受けていないP13-14Wのマウス大脳においても低メチル化傾向が維持されていたことから、大脳におけるCpG\_8のメチル化度(%)を指標とするBPA曝露履歴の判定が可能ではないかと考えた。

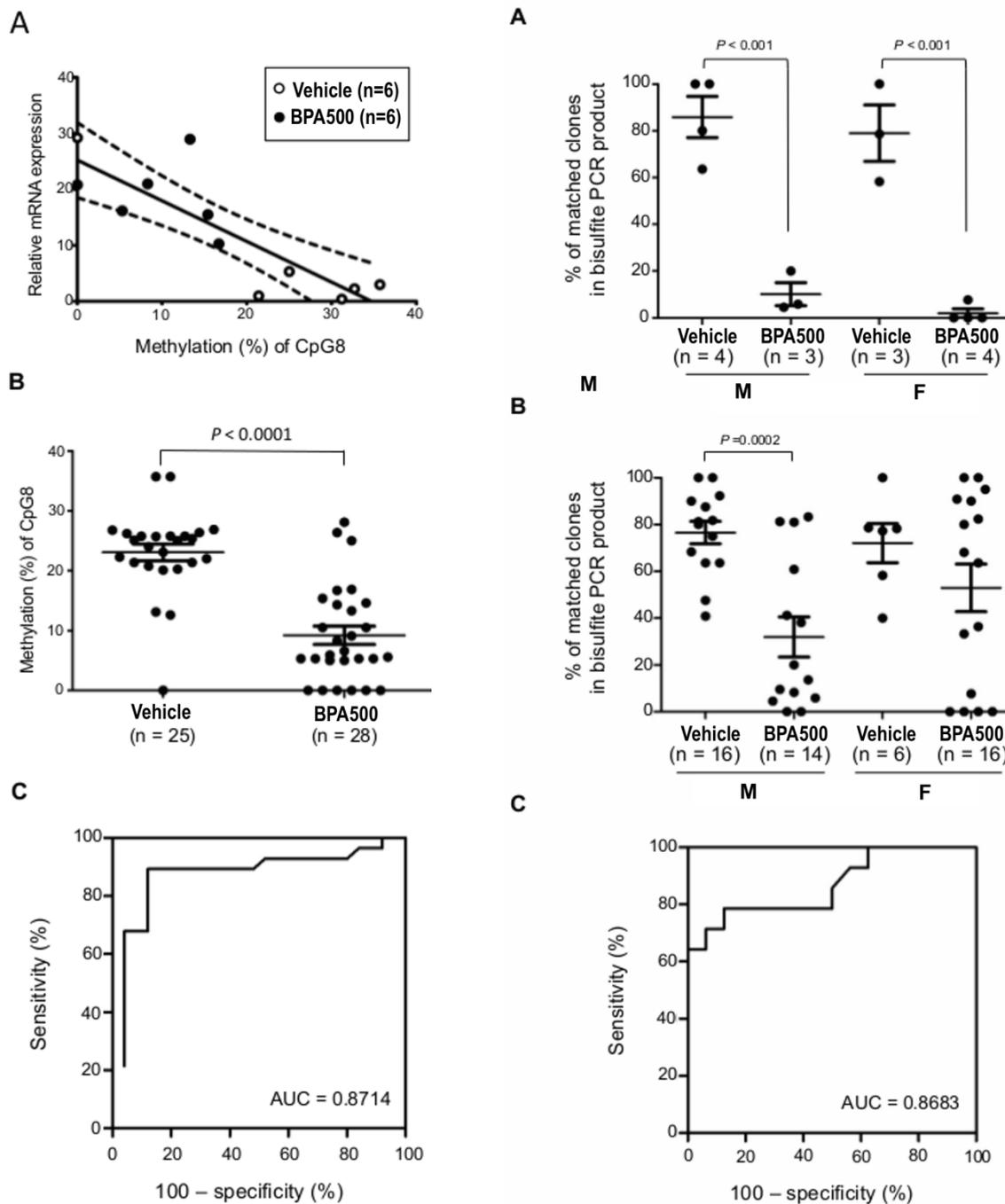
BPA曝露履歴の判定指標とするためには基準となるCpG\_8のメチル化度(%)のカットオフ値を求める必要がある。そこで、図(1)-2)-5BのデータをもとにROC曲線を作成し(図(1)-2)-5C)、Youkin's index法により最適カットオフ値を求めた。その結果、「CpG\_8におけるメチル化度が18.50%以下であれば曝露歴有り」と判定したとき、その感度(真陽性率)・1-特異度(偽陽性率)は各々89.29%、12.00%となりROC曲線下面積(AUC)は87.14%であった。これは既報<sup>5)</sup>の腫瘍関連遺伝子エピゲノムマーカーと遜色ない感度と特異性を示すものであり、BPA曝露履歴の判定において高い予測能・診断能を持つ指標となることが期待された。

#### f. 全血由来DNAにおけるA遺伝子のメチル化変動

大脳皮質における変動と高い相関をもって検出されるBPA応答性DNAメチル化変動が全血由来DNAにおいても存在するならば、個体のみならず脳へのBPA曝露履歴を評価する良い代理マーカーとなり、ヒトの疫学調査への応用が期待される。そこで、まずBPA非曝露・曝露両群のマウス(P13-14W)の全血由来DNAを用いて、CpG\_8を含むA遺伝子CGI1のメチル化変動をBisulfite Sequencing法で調べた。その結果(図(1)-2)-4C)、離乳後にはBPA曝露を受けていないP13-14Wのマウスにあって複数のCpG部位においてBPA応答性DNAメチル化変動が惹起されていること、大脳とは異なるプロファイルを示すこと、そのプロファイルには性差があることが判明した。しかし、大脳のように単一CpG部位のメチル化変動に着目した指標ではBPA曝露履歴を判別することができなかった。ところが、全血由来DNAでは複数のCpG部位におけるメチル化変動の共起性に着目し、そのパターンを指標にすればBPA曝露履歴を判別しうることを見出した。すなわち、雄では2つのCpGが共に脱メチル化したパターンが、雌では雄とは異なるCpGが共に脱メチル化したパターンが生じる頻度がBPA非曝露群において有意に高い割合を示すことを見出した(図(1)-2)-6A)。

すなわち、雌雄別個に、CpG\_8を含むA遺伝子CGI1領域におけるメチル化プロファイルに着目すれば、全血由来DNAを用いたBPA曝露履歴の判定が可能になると期待された。そこで、さらに個体数を増やしてプロファイルを比較した結果、雄のみで投与群間差が再び検出された。図(1)-2)-6Bに示すように、A遺伝子CGI1中の3および5番目のCpG脱メチル化の共起性頻度が、BPA曝露群においてF1世代の雄において顕著に低下していた。この結果から、cut-off値を設けることで、P3WおよびP13-14Wの雄においては、全血由来DNAを用いたBPA曝露履歴判定が可能であることが期待された。ROC曲線(図(1)-2)-6C)から最適カットオフ値を求めた。ROC曲線下面積(AUC)は86.83%であり、「2つのCpGが共に脱メチル化したパターンの出現率が62.25%以下であれば曝露歴有り」と判定したときの感度(真陽性率)、1-特異度(偽陽性率)は、各々78.57%、12.50%となった。

さらに、雄の同一個体における判定結果から両組織の指標を組み合わせて判定を行った場合には、ROC曲線下面積 (AUC) は96.49%、感度 (真陽性率)、1-特異度(偽陽性率)は各々90.91 %、0.00 %となり、より高い判別能を持つ指標となることがわかった。



図(1)-2)-5.(左図)

A) アレイ解析に用いたマウス的大脑におけるA mRNA発現レベルとCpG\_8のメチル化度(%)との間の相関直線と95%信頼区間(点線)

B) P3WおよびP13-14W的大脑DNAにおけるA遺伝子CpG\_8のメチル化度(%)

C) そのROC曲線解析

図(1)-2)-6.(右図)

A) P13-14W的大脑DNAにおける性特異的脱メチル化共起パターンの出現頻度

B) P3WおよびP13-14的大脑DNAにおける同上の共起パターンの出現頻度

C) 雄のROC曲線解析

これまでの研究結果をまとめると(表(1)-2)-2)、①大脳皮質 DNA、全血 DNA において見出されたそれぞれの BPA 応答性エピゲノムマーカー (CpG メチル化変動) は、腫瘍関連遺伝子エピゲノムマーカーと遜色ない感度と特異性を示した。②A 遺伝子の CGI 1 において見出した CpG メチル化変動部位は、脳組織を用いた BPA 曝露履歴の判定に応用可能な良いエピゲノムマーカーとなることが期待される。この配列部位はヒトでも保存された配列でありマウス・ヒトにおいて SNPs は今のところ見つかっていないことから、ヒト大脳組織を用いた BPA 曝露履歴判定マーカーの候補となる可能性がある。③雄マウスに限れば、全血 DNA は検出感度こそ劣るものの脳組織に代わって曝露履歴を判定するための代替試料になりうることが示唆された。

表(1)-2)-2 母体を介した BPA 曝露履歴判別能の組織間での比較

Tissue (sex)	AUC		Cut-off value (%)	Sensitivity (%) [95% CI]	Specificity (%) [95% CI]	PPV (%)	NPV (%)
	Estimate [95% CI]	P-value					
Cerebral Cortex (male + female)	0.8714 [0.7632 to 0.9796]	<0.0001	< 18.50	89.29 [71.77 to 97.73]	88.00[68.78 to 97.45]	89.29	88.00
Blood (male)	0.8683 [0.7343 to 1.0020]	0.0006	< 62.25	78.57 [49.20 to 95.34]	87.50 [61.65 to 98.45]	84.62	82.35
Cerebral Cortex + Blood (male)	0.9649 [-]	[-]	[-]	90.91 [-]	100.00 [-]	100.00	92.31

AUC: area under curve; CI: confidence interval; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value. Cerebral cortex: Vehicle (n = 25); BPA500 (n = 28), Blood: Vehicle (n = 16); BPA500 (n = 14), Cerebral Cortex + Blood (male): Vehicle (n = 12); BPA500 (n = 11).

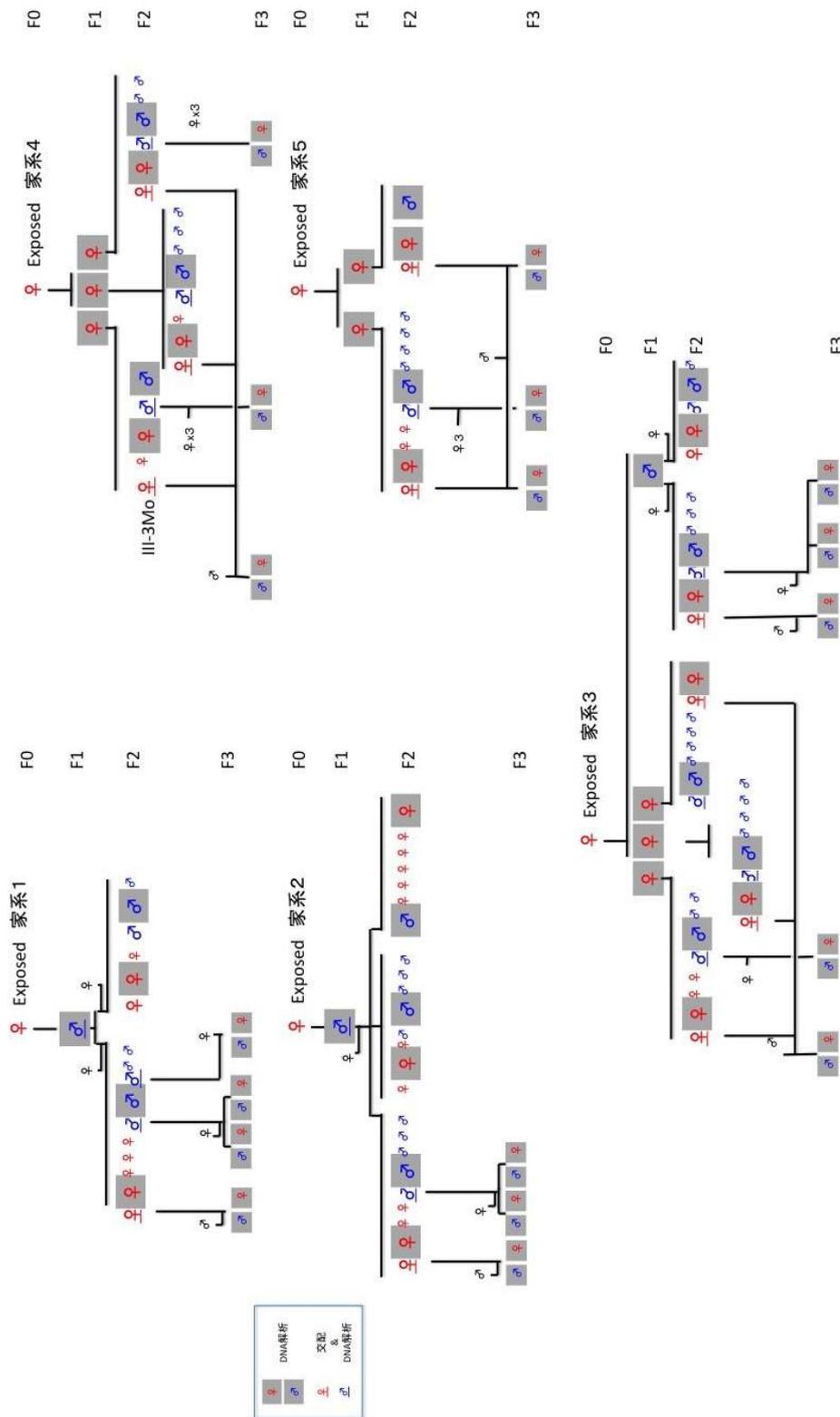
以上の結果を受けて更に BPA 応答性エピゲノム・マークの特性を明らかにするために、大脳においてこのエピゲノム・マークが世代を超えて伝達・維持されうるかどうかについて検討を加えた。

#### g. 大脳において A 遺伝子に刷り込まれた BPA 応答性エピゲノム・マークの継世代維持の解析

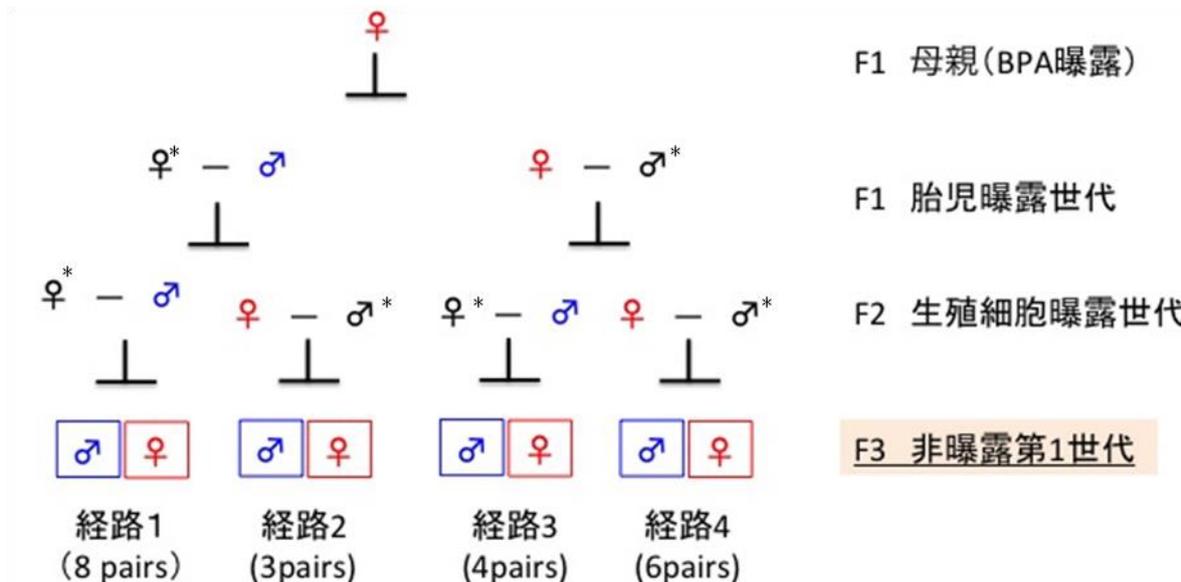
まず、BPA 曝露によって新たに F1 マウス大脳皮質ゲノムに刷り込まれたエピゲノム・マークの伝達とそれを担う生殖細胞系列を明らかにするためにマウス家系を作出した。5匹の F0 マウス(妊娠母体)から得られた家系および解析に用いた個体を図(1)-2)-7に示す。

BPA 投与は F0 妊娠マウスのみに行った。F1 世代は胎仔個体として、F2 世代は F1 胎仔の生殖細胞系列として直接曝露を受けており、F3 世代が最初の非曝露世代となる。この F3 世代の脳において、F1 世代の脳で見出された A 遺伝子 CGI1 中の 8 番目の CpG (以下、CpG\_8) の低メチル化傾向が示されていれば、脳における BPA 応答性エピゲノム・マークが継代的に維持されていると考えられる。

さらに、雌雄いずれかの生殖細胞依存的に継世代伝達がなされる可能性も考慮すると、F3 世代に至るまでに全 4 通りの伝達経路がある(図(1)-2)-8)。全経路での世代間伝達の知見を得るために図(1)-2)-6で示されたマウス個体(P3W)の大脳を対象として CpG\_8 のメチル化解析を行った。



図(1)-2)-7. 継世代影響解析用のマウス家系.

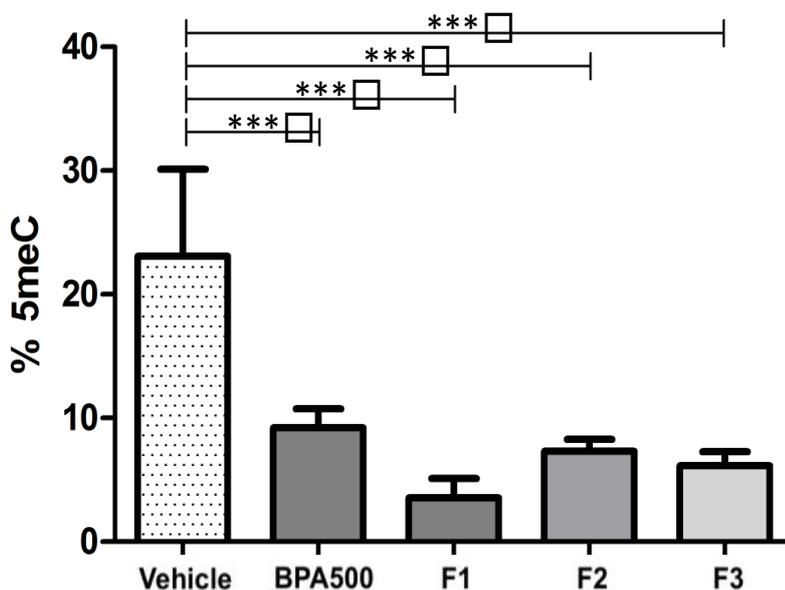


図(1)-2)-8. 雌雄いずれかの生殖細胞依存的に継世代伝達が行われる際にF3世代に至る伝達経路。  
\*を付した♂♀は交配用非曝露マウス、その他は曝露マウスの系統、( )内はF3の解析雌雄ペア数を示す。

マウス大脳皮質DNAをもとにBisulfite Sequencing法によりA遺伝子CpG\_8のメチル化度を評価した場合、F1世代に相当する前述の解析個体群では雌雄差無くメチル化度は18.5% (カットオフ値)未満まで低下する(図(1)-2)-9, BPA500)。この結果は、今回の作出家系で解析されたF1世代においても同様に再現された(図(1)-2)-9, F1)。さらに、この低メチル化傾向は、F2世代のみならず F3世代の個体においても維持されていた(図(1)-2)-9, F2およびF3)。すなわち、解析個体の雌雄や生殖細胞系列の雌雄の組み合わせの違いによる全4通りの伝達経路に依存せず、直接曝露を受けていない最初の世代の大脳皮質細胞に伝えられたことを示唆する結果であった。

一方これまでに明らかにしてきたように血液DNAにおいては、A遺伝子CGI1中の3および5番目のCpG脱メチル化の共起性頻度が、BPA曝露群においてF1世代の雄において顕著に低下する(62.25%未満)。そこで、F3世代(P3W)およびその親個体(P16W)の全血DNAを調べたところ、このような脱メチル化共起性頻度の低下は認められなかった。すなわち、大脳とは異なり全血DNAではBPA応答性エピゲノム・マークが継世代性に維持されないことが明らかとなった。

最近、「エピゲノムの継世代伝達」について、「表現型情報がDNA塩基配列以外の因子(エピジェネティックな分子機構)によって世代を超えて伝達される遺伝現象」と定義されることに一定のコンセンサスが得られるようになってきた。その一例として、抗アンドロゲン作用をもつVinclozolin (VCZ)の継世代影響を調べたSkinnerらによる報告<sup>6)</sup>がある。F0妊娠マウスに限ったVCZ投与によって F2、F3世代にも生殖能力低下や発病率増加等といった表現型の継世代性が認められた。その際、遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化プロファイルの世代を超えた変動も認められたことから、遺伝情報を次世代へ伝える生殖細胞においてエピジェネティックな変化が生じたことによる影響と考えられた。



図(1)-2)-9. P3Wの脳皮質DNAにおけるA遺伝子CpG\_8メチル化度(%)の継世代伝達. 非曝露群個体(vehicle)とBPA曝露群F1個体(BPA500)、および家系F1-F3個体群(F1, F2, F3)におけるメチル化度(Mean ± SD). One-way ANOVAおよびBonferonni/Dunn post-hoc test. \*\*\*  $P < 0.001$ .

本研究によってわれわれは、胎生期・授乳期のBPA曝露によって脳皮質ゲノムへ雌雄差なく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、雌雄どちらの生殖細胞系列を介しても次世代の脳皮質ゲノムへと受け継がれることを初めて明らかにした。このことは、体細胞系列において新たに刷り込まれたエピゲノム・マーク即ちエピゲノム情報の変化が未知のメカニズムによって生殖細胞系列を介して次世代に伝達されること、さらに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も示している。

本研究のBPA曝露モデルにおいては世代を超えて伝達される表現型やエピゲノム・マークと表現型との関連を明らかにするには至らなかった。しかし中枢神経系を含む体細胞への影響が次世代にも及ぶような分子機構の解明は化学物質の毒性や作用メカニズムを研究するうえで新たな重要課題になりえるものと考えられる。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、必要となるであろう。

一方、脳と同等の的中率で曝露履歴を判定できた雄(F1)由来血液DNAのエピゲノム・マークには継世代性が無かった。このことは血液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を示すものである。今後、性差に依存しないこのようなマーカーが開発されれば、疫学データにより詳細な解析に資するものと期待される。

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

#### 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

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、形態学的ならびに機能的な変化を引き起こすことを示した。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。

#### 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

胎生・授乳期のBPA曝露によって、マウス大脳ならびに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（ヒトの離乳期～思春期に相当する時期）を経たあとも維持されていることを初めて見出した。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。

全体を通しての科学的意義のまとめ：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。また脳においてBPA曝露による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示すことを明らかにし、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。

### (2) 環境政策への貢献

#### <行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

#### <行政が活用することが見込まれる成果>

#### 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

マウスにおいて、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。

#### 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

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あたっては、「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。

全体を通し、これまでも、また、今後も、

(1) 論文発表、学会発表、あるいは、市民を対象とした講演会やメディア等を通じ、成果の広報・普及に努める。

(2) 上記により、BPA曝露の脳形成・発達への影響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) BPAに関する規制政策の今後の方針、方向性の決定に役立てる。

(4) 現在進行中の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脳発達障害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、さらに曝露履歴マーカーの開発に対する提言に貢献する。

## 6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

#### <論文(査読あり)>

- 1) 伊東恭子：日本小児科学会雑誌, 116, 10-19 (2012) 「脳形成・発達と環境化学物質」
- 2) H. OGI, K. ITOH and S.FUSHIKI: Brain Behav. 3, 223-228 (2013)  
“Social behavior is perturbed in mice after exposure to bisphenol A: a novel assessment employing an IntelliCage.”
- 3) S, TANDO, K. ITOH, T. YAOI, H. OGI, S. GOTO, M. MORI and S. FUSHIKI: Neuropathology (2014), doi:10.1111/neup.12137[Epub ahead of print]  
“Bisphenol A exposure disrupts the development of the locus coeruleus-noradrenergic system in mice.”

#### <その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 伊東恭子、伏木信次：小児科臨床, 66, 1461-1467 (2013)  
「4) 環境化学物質と脳形成障害」

### (2) 口頭発表(学会等)

- 1) 伊東恭子：第52回日本神経病理学会総会学術研究会 (2011) 招待講演  
シンポジウム「脳形成障害とオミックス」にて「環境化学物質の胎生期曝露と脳形成障害」
- 2) 丹藤 創、伊東恭子、森脇三造、韓 龍哲、安田竜有二、伏木信次：第52回日本神経病理学会総会学術研究会 (2011)  
「ビスフェノールAが脳形成過程へ及ぼす影響の形態学的解析」
- 3) 森脇三造、伊東恭子、中村恵子、外崎 円、丹藤 創、伏木信次：第52回日本神経病理学会総会学術研究会 (2011)

「ビスフェノールAがマウス大脳皮質神経細胞遊走に及ぼす影響の解明：タイムラプス蛍光イメージングを用いて」

- 4) 伏木信次：京都府立図書館・京都府立医科大学附属図書館連携事業府民講演会（2011）  
「子どもの脳を守る—環境化学物質はどのような影響を及ぼすか—」
- 5) 伏木信次：京都府立医科大学公開講座（2011）  
「環境中の化学物質と脳発達」
- 6) 伏木信次、矢追 毅、伊東恭子：第39回日本毒性学会学術年会（2012） 招待講演  
シンポジウム「エピジェネティクスから捉えた毒作用発現」にて「環境化学物質ビスフェノールAと脳形成・発達」
- 7) 伏木信次：福井大学 大学院セミナー（2012） 招待講演  
「環境化学物質への胎生期曝露と脳の形成・発達」
- 8) 伊東恭子：平成23年度京都府立医科大学健康セミナー「保育サポーター養成・支援講座」（2012）  
「子どもの脳と化学物質—環境化学物質はどのような影響を及ぼすか—」
- 9) 伏木信次：京都府立医科大学公開講座（2013）  
「子どもの脳と環境要因」
- 10) 伊東恭子：第59回日本病理学会秋期特別総会 A演説（2013） 受賞講演  
「脳形成障害の発生病理解明—遺伝要因と環境要因に着目して」
- 11) 丹藤 創、伊東恭子、伏木信次：第55回日本神経病理学会総会学術研究会（2014）  
「内分泌攪乱化学物質、ビスフェノールAの青斑核への影響解析」（アブストラクト提出、採択済み）

### （3）出願特許

特に記載すべき事項はない。

### （4）シンポジウム、セミナー等の開催（主催のもの）

- 1) 京都府立医科大学公開講座「子どもの健康と化学物質」  
（2011年12月18日、京都府立医科大学附属図書館ホール、観客30名）
- 2) 京都府立医科大学公開講座「環境化学物質と健康」  
（2013年3月20日、京都府立医科大学図書館ホール、観客50名）

### （5）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

### （6）その他

- 1) 伊東恭子：日本病理学会学術研究賞 受賞、2013年11月22日  
「脳形成障害の発生病理解明—遺伝要因と環境要因に着目して」

## 8. 引用文献

- 1) Nakamura K, Itoh K, Sugimoto T, Fushiki S. (2007) Prenatal exposure to bisphenol A affects adult murine neocortical structure. *Neurosci. Lett.* 420: 100-105.
- 2) Nakamura K, Itoh K, Yaoi T, Fujiwara Y, Sugimoto T, Fushiki S. (2006) Murine neocortical histogenesis is perturbed by prenatal exposure to low doses of bisphenol A. *J. Neurosci. Res.* 84: 1197-1205.
- 3) Yaoi T, Itoh K, Nakamura K, Ogi H, Fujiwara Y, Fushiki S. (2008) Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376: 563-567.
- 4) Pendergast JS, Tuesta LM, Bethea JR. (2008) Oestrogen receptor beta contributes to the transient sex difference in tyrosine hydroxylase expression in the mouse locus coeruleus. *J. Neuroendocrinol.* 20: 1155-1164.
- 5) Hua D, Hu Y, Wu YY, Cheng ZH, Yu J, et al. (2011) Quantitative methylation analysis of multiple genes using methylation-sensitive restriction enzyme-based quantitative PCR for the detection of hepatocellular carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.* 91:455-460. doi: 10.1016/j.yexmp.2011.05.001
- 6) Chang HS, Anway MD, Rekow SS, Skinner MK. (2006) Transgenerational epigenetic imprinting of the male germline by endocrine disruptor exposure during gonadal sex determination. *Endocrinology* 147: 5524-41.

## (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

京都大学 工学研究科

高野裕久

(独) 国立環境研究所 環境健康研究センター

柳澤利枝・小池英子

大分県立看護科学大学 看護学部

市瀬孝道・吉田成一・定金香里

平成22～25年度累計予算額：79,419千円（うち、平成25年度予算額：16,006千円）

予算額は、間接経費を含む。

### [要旨]

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解明は不十分であり、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。本サブテーマでは、(1) ベンゾピレン(BaP)、ビスフェノールA (BPA) の低用量、経気道曝露が、若齢期のアレルギー性喘息を増悪することとそのメカニズム、次世代影響と性差がある可能性を示し、(2) フタル酸ジイソノニル (DINP)、BPA、BaPの低用量、経口曝露が若齢期のアトピー性皮膚炎を増悪することとそのメカニズム、次世代影響と性差がある可能性も指摘した。(3) BaP、フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) の低用量曝露が、若齢期のアレルギー性鼻炎を増悪することとそのメカニズムを明らかにし、(4) BaP、DEHP、DINP、BPAの*in vitro*および*in vivo*曝露が、樹状細胞等の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。以上、(1) 一般環境でも想定されるような少量の化学物質曝露がアレルギー疾患を増悪しうること、(2) その発現メカニズム、(3) 物質そのもののみならず、曝露経路や病変の主座の相違によって影響は異なること、(4) 経口的あるいは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示し、「環境化学物質のアレルギー増悪影響の評価には、簡易*in vitro*評価系で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、実社会で想定される曝露経路と曝露量（少量曝露）、小児期曝露、次世代影響を念頭に、評価・解析を行うことが重要である。」ことを科学的に提言した。本成果を、国民の安全・安心の確保に役立て、増悪影響評価系・システムの確立・普及により、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。エコチル調査を補完し、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と共に、疫学的観察事項に生物学的妥当性を付与する。

### [キーワード]

環境化学物質、アトピー性皮膚炎、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、評価手法

### 1. はじめに

近年、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、花粉症等のアトピー・アレルギー疾患が小児・若年者

を中心に急増している。アレルギー急増の主因は環境要因の急変と考えられ、衛生環境、食環境、住環境の変化とともに、環境汚染の関与が指摘されてきた。われわれは、ディーゼル排ガス微粒子(DEP)がアレルギー性喘息を増悪することを明らかにし、疫学的既報に実験的論拠を与えた。その後、DEPに含まれる脂溶性化学物質(群)、プラスチック可塑剤であるDEHP等の環境化学物質の腹腔内曝露が、アレルギー性喘息やアトピー性皮膚炎を増悪することも報告した。特に、DEHPは、少量曝露や若齢期曝露、乳児期曝露によってもアトピー性皮膚炎増悪影響を發揮した。しかし、莫大な数にのぼる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未だに不十分であり、環境化学物質のアレルギー増悪影響を簡易・迅速・高感度にスクリーニングできる評価系も確立されていない。このため、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)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。

## 2. 研究開発目的

フタル酸エステル類(DEHP、フタル酸ジイソノニル：DINP)、BaP、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、BPA、BaP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、母乳を介した次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。

## 3. 研究開発方法

### 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

アレルギー性喘息マウスモデルは、C3H/HeJマウス(雄、6週齢)に対し、卵白アルブミン(OVA) 1 µg/animalを、隔週で計4回、経気道曝露することにより作製した。OVAはリン酸緩衝生理食塩水(PBS ; pH7.4)に懸濁し、投与量は全量で100µL/回とした。OVAと化学物質の投与が重なる時は同時投与した。

H22年度は、BaPを選択した。実験群は1群25-28匹として、1) Vehicle群、2) OVA、3) OVA+BaP 0.05 pmol/animal/wk、4) OVA+BaP 1 nmol/animal/wk、5) OVA+BaP 20 nmol/animal/wkの5群に分けた。BaPは、100% ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した後、PBSで適宜希釈し、OVA初回投与時より、週1回、計7回、経気道曝露した(DMSOの終濃度は0.01%)。Vehicle群は、0.01% DMSOを含むPBSを投与した。

H23年度は、DEHPを選択した。実験群は、1群13-17匹として、1) Vehicle群、2) OVA、3) OVA+DEHP 0.02 nmol/animal/wk、4) OVA+DEHP 0.4 nmol/animal/wk、5) OVA+DEHP 8 nmol/animal/wkの5群に分けた。DEHPは、100% DMSOに溶解した後、PBSで適宜希釈し、OVA初回投与時より、週1回、計7回、経気道曝露した(DMSOの終濃度は0.1%)。Vehicle群は、0.1% DMSOを含むPBSを投与した。

H24年度は、DINPを選択した。実験群は、1群15-19匹として、1) Vehicle群、2) OVA、3) OVA+DINP 0.02 nmol/animal/wk、4) OVA+DINP 0.4 nmol/animal/wk、5) OVA+DINP 8 nmol/animal/wkの5群に分けた。DINPは、100% DMSOに溶解した後、PBSで適宜希釈し、OVA初回投与時より、週1回、計7回、経気道曝露した(DMSOの終濃度は0.1%)。Vehicle群は、0.1% DMSOを含むPBSを投与した。

H25年度は、BPAを選択した。実験群は、1群12-13匹として、1) Vehicle群、2) OVA、3) OVA+BPA 0.0625 nmol/animal/wk、4) OVA+BPA 1.25 nmol/animal/wk、5) OVA+BPA 25 nmol/animal/wkの5群に分けた。BPAは、99.5% エタノールに溶解した後、PBSで適宜希釈し、OVA初回投与時より、週1回、計7回、経気道曝露した(エタノールの終濃度は0.001%)。Vehicle群は、0.001% エタノールを含むPBSを投与した。

BaPの乳児期曝露実験は、妊娠14-15日齢のC3H/HeJマウスを導入し、1群11-17匹として、出産直後に産仔調整を行い(5匹/腹)、1) Vehicle群、2) BaP 0.25 pmol/animal/wk、3) BaP 5 pmol/animal/wk、4) BaP 100 pmol/animal/wkの4群に分けた。BaPはオリーブオイルに懸濁し、適宜希釈した。Vehicle群にはオリーブオイルを投与した。出産1日目から週1回、計3回(Day 1, 8, 15)、母獣に対して経口的に投与した。仔獣は、3週齢で離乳し、前述の4群に対して6週齢よりOVA(1 µg/animal)、あるいはVehicle(PBS)を隔週で計4回気管内投与した。

各実験において、最終投与24時間後の気管支肺胞洗浄液(BAL)中の細胞数、肺における炎症性因子の発現 (IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、IL-12、IFN- $\gamma$ 、MCP-1、RANTES、eotaxin、MCP-3)、血中OVA特異的抗体量 (OVA-IgE、OVA-IgG<sub>1</sub>、OVA-IgG<sub>2a</sub>)を測定した。また、肺の病理組織学的変化は、気管支、および血管周囲への炎症細胞浸潤はヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)、気道上皮の粘液産生細胞の増生はPeriodic acid-Schiff 染色(PAS染色)を用いて評価した。

## 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

若齢期曝露の影響を調べる実験では、アトピー素因を有するNC/Nga系マウス(SPF、オス、7週齢)を、1物質の検討につき、60匹用いた。これを表(2)-2-1に示すような5群に分けた。各々、1)溶媒のみを投与した群、2)ダニ抗原感作 (Dp) 群、3)Dp+環境化学物質1/400 NOAEL投与群、4) Dp+環境化学物質1/20 NOAEL投与群、5) Dp+環境化学物質NOAEL投与群を設定した。各環境化学物質をオリーブ油に溶解し、3)~5)群に、週1回、計4回、経口的に曝露した (図(2)-2-1)。アトピー性皮膚炎を誘発するアレルゲンにはヤケヒョウヒダニ抽出物(Dp)を用い、マウス耳介背側に注射し炎症を発症させた。一方、母乳を介した乳児期DINP曝露の影響を調べる実験では、NC/Nga系妊娠マウス (SPF) を4つの群に分け (n=14/群)、出産0日目、7日目、14日目に、溶媒またはDINPを投与した (図(2)-2-2)。投与量は、若齢期曝露と同様、1/400 NOAEL、1/20 NOAEL、NOAELの3用量とした。仔獣を生後4日目に5匹/腹となるよう調製した後、3週間の授乳期間を経て母獣から分離、7週齢時の仔獣に対し、アトピー性皮膚炎への影響評価を開始した。溶媒を投与した母獣から産まれた仔をさらに2群に分け、一方の群には溶媒を皮下投与し (非アトピー性皮膚炎誘発群; Saline(+vehicle)群)、もう一方およびDINP経母乳曝露された仔の群には、Dpを皮下投与し、アトピー性皮膚炎を発症させた。表(2)-2-1に各群名を記す。

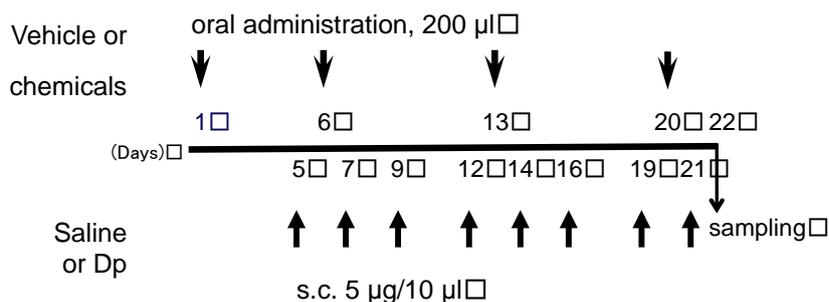
いずれの実験においても、誘発期間中に症状を経時的に観察、スコア化した (n=12/群)。また、屠殺時に採取した血液中の総IgE濃度、抗原特異的IgG<sub>1</sub>抗体価を、ELISAを用いて測定した (n=12/群)。また、屠殺時に採取した耳介組織中の炎症関連タンパク量もELISAを用いて測定した (n=6/

群)。皮下組織中の病理的变化を調べるため、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色およびトルイジンブルー（TB）染色を施した耳介組織標本を用いて炎症細胞数を測定した（n=6/群）。なお、各化学物質のNOAELは、齧歯類に化学物質混合飼料を中・長期的に与えたときの病理的变化に基づき決定された値で、DEHPが19 mg/kg/day、DINPは15 mg/kg/day、BPAは5 mg/kg/day、BaPは0.21 mg/kg/dayである。

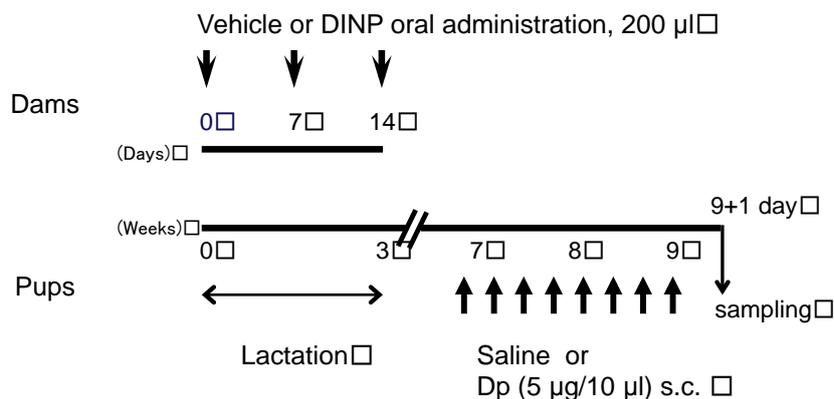
表(2)-2)-1. 化学物質によるアトピー性皮膚炎影響評価における実験群

	若齢期曝露実験				乳児期曝露実験
	DEHP	DINP	BPA	B[a]P	DINP
1)	Saline+vehicle	Saline+vehicle	Saline+vehicle	Saline+vehicle	Saline(+vehicle)
2)	Dp+vehicle	Dp+vehicle	Dp+vehicle	Dp+vehicle	Dp(+vehicle)
3)	Dp+DEHP 8.3	Dp+DINP 6.6	Dp+BPA 2.19	Dp+B[a]P 0.09	Dp(+DINP 0.0375)
4)	Dp+DEHP 166.3	Dp+DINP 131.3	Dp+BPA 43.75	Dp+B[a]P 1.84	Dp(+DINP 0.75)
5)	Dp+DEHP 3,325	Dp+DINP 2,625	Dp+BPA 875	Dp+B[a]P 36.75	Dp(+DINP 15)

若齢期曝露実験では、マウスの体重を25 g、投与間隔を7日おきとし、各化学物質の1/400 NOAEL、1/20 NOAEL、NOAELを換算した値をマウスへの1回投与量とした。3)～5)群の数値は、1回投与量を表している。乳児期曝露実験ではvehicleを投与した母獣から産まれた非アトピー性皮膚炎誘発群を1)群、アトピー性皮膚炎誘発群を2)群、DINPを投与した母獣から産まれたアトピー性皮膚炎誘発群を3)～5)群とした。母獣へのDINP投与は7日おきとし、投与時には体重を量り、3)群には0.0375 mg/kg/day、4)群には0.75 mg/kg/day、5)群には15 mg/kg/dayに相当する量を各母獣に経口的に投与した。



図(2)-2)-1. 若齢期曝露実験の投与スケジュール



図(2)-2)-2. 乳児期曝露実験の投与スケジュール

### 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

まず、マクロファージ株を用い、炎症性サイトカイン遺伝子発現におけるBPAとDEHPの影響を評価した。マウス由来マクロファージ様細胞株 (RAW264.7) を用いた。RAW264.7細胞を $10 \times 10^4$  cells/mlの濃度に調整し、細胞懸濁液を1枚当たり4ml播種後、37°C、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。対照群以外の細胞にOVA処理を行い、OVA濃度は100µg/ml、処理時間は24時間とした。24時間後、所定濃度に調整した化学物質 (BPA : 0.5、5、50mM、DEHP : 15、150mM) を処理し、24時間後に細胞を回収した。化学物質未処理群 (対照群、OVA処理群) には同量のPBS (-)を処理し、24時間後に同様に細胞を回収した。各群、4枚ずつ作成した。回収した細胞から定法に従い、総RNAを回収、DNase処理を行った後、逆転写反応を行い、cDNAを合成した。作成したcDNAを用い、発現遺伝子の定量解析をABI PRISM®7000 Sequence Detection Systemにて行った。解析した遺伝子は、IL-1β、IL-6、MCP-1、MIP-1α、TNF、KCである。

次いで、スギ花粉抗原を用いたアレルギー性鼻炎マウスモデルにおいてBPAの影響を評価した。BALB/c雌マウス (6週齢) を1群12匹として、対照 (生理食塩水投与)群、Crij1-4µg投与群、Crij1-4µg+BPA0.1mg投与群、Crij1-4µg+BPA1mg投与群の計4群とした。初期感作として、水酸化アルミニウム1.5mg+Crij1の5µgを頸部皮下に投与し、その後、PBSで調整したCrij1溶液を3週間間隔で2回点鼻した。Crij1の1回投与量は、マウス1匹あたり4µgとし、左右の鼻に2µgずつ点鼻した。その後、99.5%アルコールに溶解したBPAをオリーブ油で0.1 mg/200µl 或いは1 mg/200µlになるように調整し、これらを1週間に1回、計3回腹腔内投与した。対照群とCrij1-4µgのみを投与した群はBPAの代わりにオリーブ油を3回腹腔内投与した。その1日後からCrij1-4µgを毎日連続して5回点鼻投与した。全てのマウスは最終点鼻投与5時間後に、深麻酔下で心採血によって屠殺し、6匹のマウスは咽頭部より生理食塩水を注入して鼻腔洗浄を行い、鼻腔洗浄液中の炎症細胞数や炎症性サイトカイン類を測定した。残り6匹のマウスは鼻の組織標本を作成して形態学的な観察を行った。一方、卵白アルブミンを用いアレルギー性鼻炎マウスモデルにおいて低用量BPAの影響を評価した。BALB/c 雌マウス (6週齢) を1群14匹として、対照 (生理食塩水点鼻投与) 群、BPA1 (0.02µg)

群; BPA2 (0.2 $\mu$ g) 群; BPA3 (2 $\mu$ g) 群; 卵白アルブミンOVA (60 $\mu$ g) 単独投与群; OVA + BPA1 (0.02 $\mu$ g) 群; OVA + BPA2 (0.2 $\mu$ g) 群 : OVA + BPA3 (2 $\mu$ g) 群の8群に分けた。これらの混合液を2週間おきに4回点鼻投与し、その後、対照群以外はOVA (60 $\mu$ g) を2日間隔で3回点鼻投与し、BPA添加群では最終投与時に再び上記のOVA+BPAの混合液を点鼻投与した (OVAは計8回、BPAは計5回投与)。最終点鼻投与5時間後に8匹のマウスを屠殺し鼻洗浄液を回収し、炎症細胞数と炎症性サイトカイン・ケモカインを測定し、残りの6匹のマウスからは鼻の病理標本を作成した。屠殺時に心採血した血液は血清分離後、OVA-特異的IgG1とIgE測定に用いた。また鼻の搔痒感の指標として鼻かき回数を最終投与15分間測定した。

培養細胞実験として、前記に示す8群のマウスの脾臓から脾細胞を取り出し、脾臓細胞 (リンパ球) の増殖反応を調べた。取り出した脾細胞は1週間培養後、 $2 \times 10^5$ /well/200  $\mu$ lになるように調整してから、ConAとLPSにて刺激し、72時間後の脾細胞数をCell Viability Assay法にて測定した。

次いで、卵白アルブミンを用いたアレルギー性鼻炎マウスモデルにおいてDEHPの影響も評価した。BALB/c雌マウス (6週齢) を1群14匹として、対照 (生理食塩水点鼻投与) 群、卵白アルブミンOVA (50 $\mu$ g) 群; OVA+DEHP1群 : OVA (50 $\mu$ g) +DEHP (0.0004 $\mu$ g) 投与; OVA+DEHP2群 : OVA (50 $\mu$ g) +DEHP (0.008 $\mu$ g) 投与; OVA+DEHP3群 : OVA (50 $\mu$ g) +DEHP (0.16 $\mu$ g) 投与; OVA+DEHP4群 : OVA (50 $\mu$ g) +DEHP (3.2 $\mu$ g) 投与、の6群に分け、これらの混合液を2週間おきに4回点鼻投与した。その後、対照群以外はOVA (50 $\mu$ g) を2日間隔で3回点鼻投与し、DEHP添加群では最終投与時に再び上記のOVA+DEHPの混合液を点鼻投与した (OVAは計8回、DEHPは計4回投与)。最終点鼻投与5時間後に8匹のマウスを屠殺し鼻洗浄液を回収し、炎症細胞数と炎症性サイトカイン・ケモカインを測定した。また洗浄後の鼻粘膜組織の炎症性サイトカイン・ケモカインも測定した。残りの6匹のマウスからは鼻の病理標本を作成した。

加えて、卵白アルブミン用いたアレルギー性鼻炎マウスモデルにおいて低用量BaPの影響も評価した。BALB/c雌マウス (6週齢) を1群14匹として、①対照 (生理食塩水点鼻投与) 群、②BaP 0.1 $\mu$ g 群 ; ③BaP 10 $\mu$ g 群 ; ④卵白アルブミン (OVA : 80 $\mu$ g) 群 ; ⑤OVA (80 $\mu$ g) +BaP0.1 $\mu$ g 群 ; ⑥OVA (80 $\mu$ g) +BaP 10 $\mu$ g投与の6群に分けた。OVAは生理食塩水に溶解し40 $\mu$ g/8 $\mu$ l溶液を調整した。BaPはオリーブオイルに溶解し、0.1 $\mu$ g/0.1mlと10 $\mu$ g/0.1ml溶液に調整した。OVA + BaP群ではBaPの0.1 $\mu$ gもしくは10 $\mu$ gを、2週間おきに4回腹腔内投与し、OVAはBaPの腹腔内投与5時間後に左右の鼻腔に8 $\mu$ lずつ4回点鼻投与した。その後、2日おきに4回、OVA溶液を8 $\mu$ lずつ左右に点鼻投与した。なお、対照群にはBaP溶液の代わりにオリーブオイルの0.1mlを2週間間隔で4回とOVAの代わりに8 $\mu$ lの生理食塩水を8回点鼻投与した。またOVA群ではBaP溶液の代わりに2週間おきに4回オリーブオイルを腹腔内投与し、またBaP 0.1 $\mu$ g群とBaP 10 $\mu$ g群ではOVAの代わりに生理食塩水を計8回点鼻投与した。最終点鼻投与5時間後にマウスを屠殺し、各群8匹のマウスから鼻洗浄液を回収し、炎症細胞数と炎症性サイトカイン・ケモカインを測定した。残りの6匹のマウスからは鼻の病理標本を作成した。また血清中のOVA-特異的IgEとIgG1抗体を測定した。

#### 4) 環境化学物質のアレルギー性疾患増悪影響に対するスクリーニング手法の開発

環境化学物質の*in vitro*曝露が樹状細胞に及ぼす影響を検討した。環境化学物質は、BaPおよびDEHP、DINP、BPAは、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した後、RPMI-1640培地に10% 非働化ウシ胎児血清 (FBS) 、100 U/ml ペニシリン、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン、50  $\mu$ M 2-メル

カプトエタノールを添加したR10培地で希釈して使用した。曝露時のDMSOの最終濃度は0.1%となるように調製した。動物は、アトピー素因をもつNC/NgaTndCrIj雄性マウス（13週齢、26-28g）を使用し、大腿骨より骨髓細胞を採取した。骨髓細胞は、溶血処理した後、遠心洗浄し、R10培地に懸濁した。生細胞数は、トリパンブルー色素排除法により求めた。骨髓細胞（ $4 \times 10^5$  cells/ml）は、20 ng/mlリコンビナントマウス顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）を含むR10培地に懸濁し、10 mlの骨髓細胞懸濁液を $\phi 100$  mmカルチャーディッシュ中で培養した。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骨髓由来樹状細胞（BMDC）として回収した。生

遺伝子発現の解析では、BMDC（ $1 \times 10^6$  cells/ml）は、GM-CSF（10 ng/ml）の存在下で、10  $\mu$ Mの環境化学物質またはvehicle（0.1% DMSO）に6、24時間曝露した。実験は、N=2で行った。曝露後の細胞は、PBSで遠心（4°C, 400  $\times$ g, 5 min）洗浄した。RNeasy Mini（QIAGEN）のプロトコールに従い、細胞（ $7 \times 10^6$  cells/sample）は、lysis buffer 600  $\mu$ l/sampleを加えて懸濁し、ペレットペッスルを用いて氷上で1分間ホモジネートした後、total RNAを抽出した。total RNAサンプルからのcDNA合成、cRNA増幅は、Affymetrix社の推奨プロトコールに従って行い、遺伝子発現の変動は、Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Arrayを用いて解析した。蛍光強度を補正した後、曝露群の遺伝子の発現率（曝露群のシグナルレベル/vehicleのシグナルレベル）を用いてデータ解析し、曝露群の発現率が1.5倍以上に増加あるいは0.65倍以下に低下した遺伝子を抽出した。

BMDCサブセットの解析においては、骨髓細胞をGM-CSF（20 ng/ml）またはGM-CSF（5 ng/ml）とFlt3リガンド（Flt3L, 200 ng/ml）を含む培地で8日間培養することによりBMDCを分化誘導した。この、BMDC（ $1 \times 10^6$  cells/ml）は、GM-CSF（10 ng/ml）またはGM-CSF（5 ng/ml）とFlt3リガンド（Flt3L, 200 ng/ml）の存在下で、環境化学物質（0.1-100  $\mu$ M）およびvehicle（0.1% DMSO）に24時間曝露した。また、環境化学物質が樹状細胞の前駆細胞に及ぼす影響として、BMDCの分化誘導過程に対する影響を検討するため、骨髓細胞（ $4 \times 10^5$  cells/ml）をGM-CSF（10 ng/ml）と環境化学物質（0.1-10  $\mu$ M）の存在下で6日間培養した。培養終了後、形質細胞様樹状細胞（plasmacytoid DC, pDC: CD11c<sup>+</sup>PDCA-1<sup>+</sup>）および従来型樹状細胞（conventional DC, cDC: CD11c<sup>+</sup>PDCA-1<sup>-</sup>）のサブセットマーカーの発現等について検討した。細胞表面分子（CD11c, PDCA-1）の発現とサイトカイン（TARC, MDC, IL-12p40, IFN- $\alpha$ ）の産生は、それぞれフローサイトメトリーとELISA法を用いて測定した。

一方、サブテーマ(2)-1のアレルギー性喘息モデルマウスにおいて、免疫担当細胞に関する検討も加えた。同サブテーマと同様のアレルギー性喘息モデルマウスを用いて、同実験条件で環境化学物質（BaP, DEHP, DINP, BPA）の若齢期曝露およびBaPの乳児期曝露を実施し、免疫担当細胞の構成や機能に及ぼす影響を評価した。当該モデルマウスの所属リンパ節である縦隔リンパ節の細胞（LNC）を採取し、細胞表面分子（抗原提示細胞マーカー: MHC class II, CD86; 樹状細胞マーカー: CD11c, PDCA-1; T細胞マーカー: TCR, CD4, CD8, CD28）の発現を検討した。さらに、抗原である卵白アルブミン（OVA, 100  $\mu$ g/ml）の再刺激有無の条件下で、LNC（ $1 \times 10^6$  cells/ml）を2日または3日間培養した後、サイトカイン（IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, SDF-1 $\alpha$ 等）の産生や細胞増殖を検討した。また、一部の実験においては、骨髓細胞を採取し、GM-CSFまたはFlt3Lの刺激下でBMDCを誘導し、細胞表面分子（抗原提示細胞マーカー: MHC class II, CD86; 樹状細胞マーカー: CD11c, PDCA-1）の発現とサイトカイン（TARC, MDC, IL-12p40, IFN- $\alpha$ ）の産生を検討した。細胞の調製、

培養方法は、先述の通りであり、細胞表面分子およびサイトカイン産生、細胞増殖は、それぞれフローサイトメトリーおよびELISA法、BrdU incorporation assayを用いて測定した。

#### 4. 結果及び考察

##### 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

OVA感作により、Vehicle群に比し、気管支肺胞洗浄液(BAL)中の好中球、好酸球、および単球の細胞数が有意に増加し(図(2)-1-1)、肺におけるIL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-33, MCP-2, RANTES, eotaxinのタンパク発現も顕著に上昇した(表(2)-1-1, 表(2)-1-2)。OVA感作時におけるBaPの経気道曝露により、OVA+BaP 20 pmol/animal/wk群で、OVA群に比し好酸球数が有意に増加した。病理組織学的検討では、OVA感作による気管支、および血管周囲への炎症細胞の集積(図(2)-1-2)や、気管支上皮の粘液産生細胞の増生(データ非表示)が、BaPの経気道曝露により亢進し、OVA+BaP 20 pmol/animal/wk群で最も顕著であった。また、OVA+BaP 20 pmol/animal/wk群において、OVA群に比し、IL-5, IL-10, IL-13, IL-33, eotaxin, OVA特異的IgG<sub>1</sub>(図(2)-1-3)産生も有意な上昇を示した。

OVA感作時におけるDEHPの経気道曝露により、好中球、好酸球、単球の細胞数がOVA単独に比してDEHP用量依存的に増加傾向を認めたが、有意な変化ではなかった(図(2)-1-4)。また、病理組織学的検討では、OVA感作による気管支、および血管への炎症細胞浸潤(図(2)-1-5)や、気管支上皮の粘液産生細胞の増生(データ未表示)が観察されたが、DEHP曝露による明確な影響は認められなかった。肺におけるIL-5, IL-13, eotaxin(表(2)-1-3)、および血中OVA特異的IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>(図(2)-1-6)においても、DEHP曝露による増加傾向は認めたが有意な変化ではなかった。OVA特異的IgE産生は、DEHP曝露による影響を認めなかった。

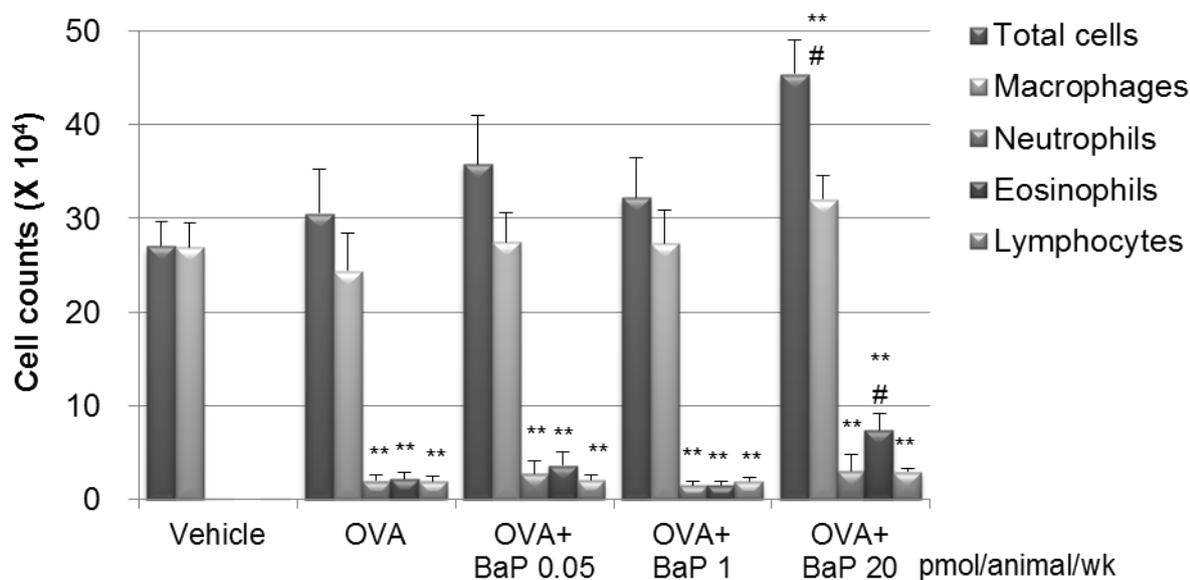
OVA感作時におけるDINPの経気道曝露により、BAL中の好中球、好酸球の細胞数がOVA単独に比してDINP用量依存的に増加傾向を認め、リンパ球数は、OVA+DINP 8 nmol/animal/wk群で有意な増加を示した(図(2)-1-7)。また、病理組織学的検討では、OVA感作による気管支、および血管周囲への炎症細胞浸潤(図(2)-1-8)や、気管支上皮の粘液産生細胞の増生(データ未表示)が観察されたが、DINP曝露による明確な影響は認められなかった。肺におけるIL-5, IL-13, eotaxin(表(2)-1-4)、および血中OVA特異的IgE, IgG<sub>1</sub>産生(図(2)-1-9)においても、DINP曝露による増加傾向は認めたが有意な差ではなかった。

OVA感作時におけるBPAの経気道曝露により、BAL中の好酸球、好中球、リンパ球、マクロファージの細胞数がOVA単独に比して増加し、この増加は低用量、中用量曝露群でより顕著であった(図(2)-1-10)。病理組織学的検討では、OVA存在下におけるBPA曝露で気管支、および血管周囲への炎症細胞の集積(図(2)-1-11)や、粘液産生細胞の増生(データ未表示)を認め、中用量群で最も顕著であった。加えて、肺におけるIL-13, IL-33, RANTES、およびKCのタンパク発現(表(2)-1-5, 表(2)-1-6)は、特に低用量、中用量曝露群で有意な上昇を認めた。血中OVA特異的IgE, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>抗体産生(図(2)-1-12)は、いずれもBPA曝露で上昇傾向を認めたが、曝露用量による影響は認めず、OVA群に対する有意な変化はなかった。

BaPの乳児期曝露により、OVA感作した雄の仔獣において、BaP 0.25 pmol/animal/wk群でBAL中の好酸球、リンパ球が増加傾向を認めたが(図(2)-1-13(a))、有意な変化ではなかった。また、気管支、および血管周囲への炎症細胞の集積、気管支上皮の粘液産生細胞の増生(データ未表示)も同様であ

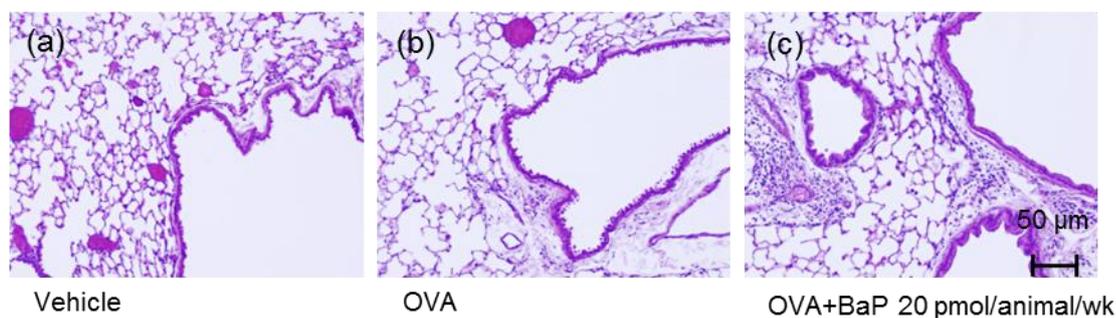
った。肺におけるIL-5, IL-13, MCP-1, eotaxin, RANTESの発現(表(2)-1)-7)、血中OVA特異的IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>の産生(図(2)-1)-14(a-c))も、BaPの乳児期曝露により増加傾向を認めたが有意な変化ではなかった。OVA感作した雌の仔獣では、BaP 0.25 pmol/animal/wk群で好中球、リンパ球が、BaP 1 pmol/animal/wk群で好酸球が増加傾向を認めたが(図(2)-1)-13(b))、有意な変化ではなかった。また、気管支、および血管周囲への炎症細胞の集積、気管支上皮の粘液産生細胞の増生も同様であった(データ未表示)。肺におけるIL-33, IFN- $\gamma$ のタンパク発現(表(2)-1)-8)、OVA特異的IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>の産生は、BaP 0.25、あるいはBaP 1 pmol/animal/wk群で増悪傾向を認めた(図(2)-1)-14(d-f))。一方、BaPの乳児期曝露のみでは、雌雄の仔獣ともに気道炎症への影響は認めなかった。

以上の結果より、BaP、あるいはBPAの若齢期における経気道曝露は、アレルギー性喘息を増悪する可能性が示唆され、その作用機序として、環境化学物質曝露によるTh2反応の亢進が寄与していることが考えられた。また、BPA曝露では、ヒトが環境中で曝露され得る濃度で影響が認められたことから、低用量曝露による影響評価が重要であると考えられた。一方、フタル酸エステル類として選択した、DEHP、およびDINP曝露は、アレルギー性喘息に及ぼす影響は軽微であると考えられた。また、BaPの乳児期曝露は、雌雄の仔獣いずれにおいてもアレルギー性喘息へ及ぼす影響は軽微と考えられたが、その存在が示唆され、曝露用量に対する反応性には性差がある可能性も示された。



図(2)-1)-1. BaPの経気道曝露による気管支肺胞洗浄液中の細胞数の変化

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



図(2)-1)-2. BaPの経気道曝露による肺の病理組織学的変化(HE染色)

(a) Vehicle group, (b) OVA group, (c) OVA+BaP 20 pmol/animal/wk group. (N=5)

表(2)-1)-1. BaPの経気道曝露による肺におけるサイトカインのタンパク発現変化

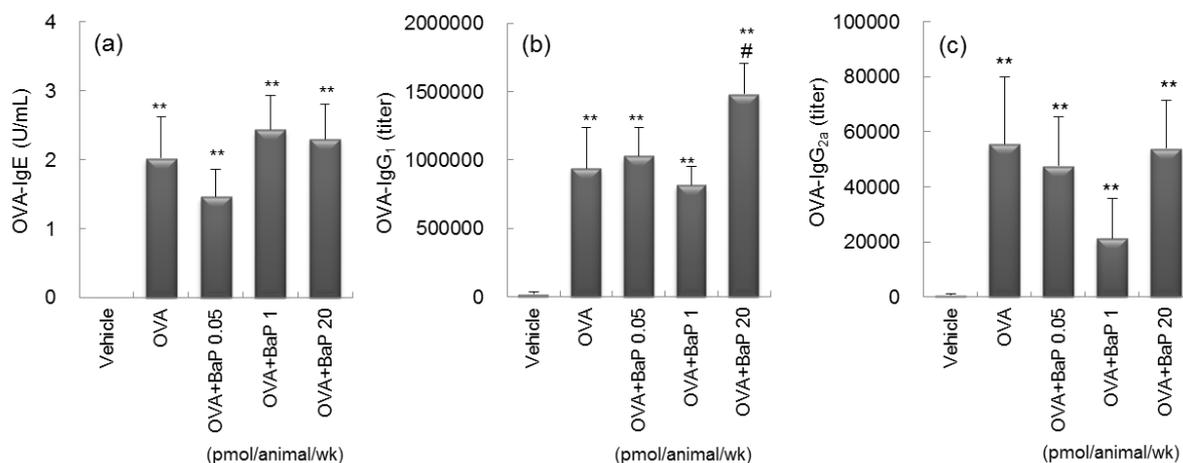
Group	N	pg in total lung supernatants						
		Th1 cytokines		Th2 cytokines				
		IFN- $\gamma$	IL-12	IL-4	IL-5	IL-10	IL-13	IL-33
Vehicle	16	5116 $\pm$ 298	1074 $\pm$ 40.2	15.9 $\pm$ 2.35	29.2 $\pm$ 1.64	23.2 $\pm$ 1.50	3.53 $\pm$ 0.67	7847 $\pm$ 332
OVA	15	5194 $\pm$ 403	1201 $\pm$ 44.9	31.7 $\pm$ 6.51	208 $\pm$ 39.1**	27.8 $\pm$ 1.67	156 $\pm$ 28.4**	15606 $\pm$ 1743**
OVA+BaP 0.05 pmol/animal/wk	15	4840 $\pm$ 330	1152 $\pm$ 35.3	35.0 $\pm$ 6.85*	244 $\pm$ 45.1**	33.3 $\pm$ 2.51**	227 $\pm$ 46.0**	25017 $\pm$ 4364**
OVA+BaP 1 pmol/animal/wk	16	5415 $\pm$ 277	1182 $\pm$ 33.1	30.4 $\pm$ 3.87**	304 $\pm$ 39.9**	33.3 $\pm$ 1.46**	220 $\pm$ 28.8**	26390 $\pm$ 2963**
OVA+BaP 20 pmol/animal/wk	16	4488 $\pm$ 320	1098 $\pm$ 32.3	37.1 $\pm$ 4.07**	357 $\pm$ 41.5**#	37.7 $\pm$ 2.41**##	299 $\pm$ 29.7**##	31649 $\pm$ 2996**##

Data are the means  $\pm$  SEM of 15-16 animals per group. \*\*: p<0.01 vs. Vehicle group, #; p<0.05 vs. OVA group, ##; p<0.01 vs. OVA group.

表(2)-1)-2. BaPの経気道曝露による肺におけるケモカインのタンパク発現変化

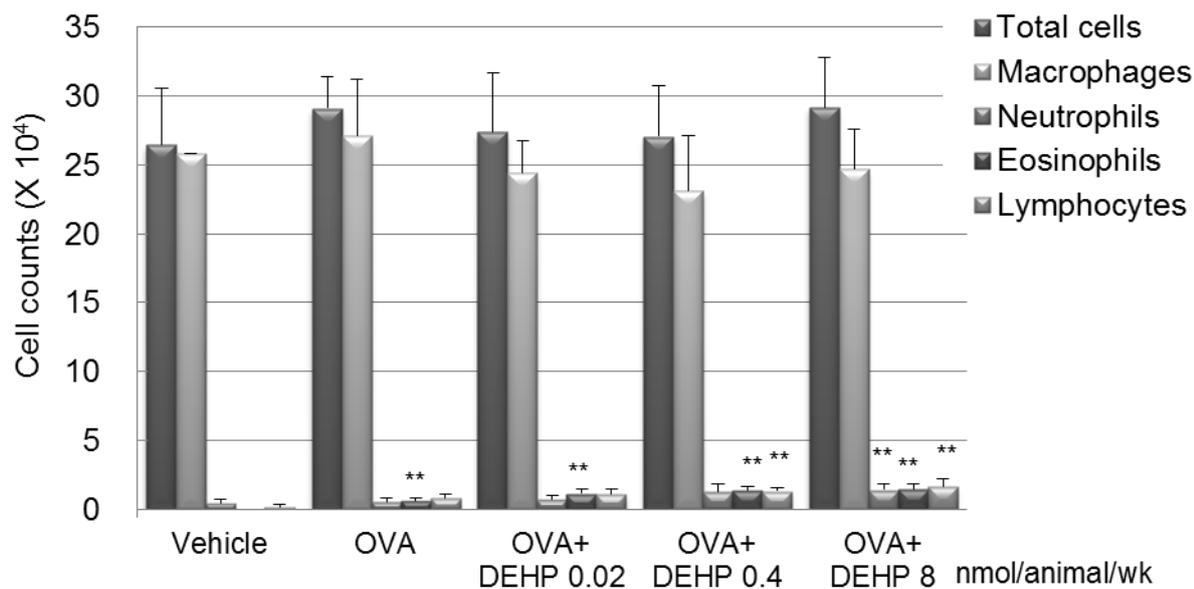
Group	N	pg in total lung supernatants		
		MCP-3	RANTES	eotaxin
Vehicle	16	132 $\pm$ 8.24	123 $\pm$ 7.56	74.8 $\pm$ 3.89
OVA	15	254 $\pm$ 24.0**	222 $\pm$ 22.8**	586 $\pm$ 113**
OVA+BaP 0.05 pmol/animal/wk	15	253 $\pm$ 24.6**	245 $\pm$ 27.2**	651 $\pm$ 120**
OVA+BaP 1 pmol/animal/wk	16	273 $\pm$ 18.0**	230 $\pm$ 19.9**	795 $\pm$ 101**#
OVA+BaP 20 pmol/animal/wk	16	296 $\pm$ 23.3**	267 $\pm$ 23.4**	951 $\pm$ 89.9**#

Data are the means  $\pm$  SEM of 15-16 animals per group. \*\*: p<0.01 vs. Vehicle group, #; p<0.05 vs. OVA group.



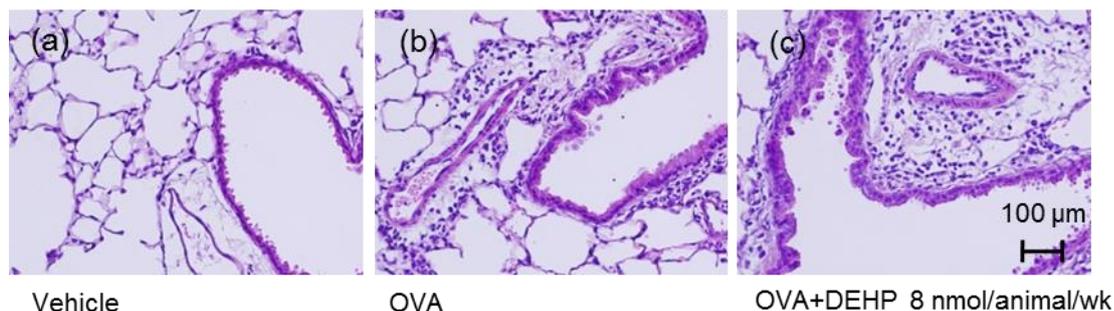
図(2)-1)-3. BaPの経気道曝露による血中抗原特異的抗体産生の変化

(a) OVA-IgE, (b) OVA-IgG<sub>1</sub>, (c) OVA-IgG<sub>2a</sub>. Data are the means  $\pm$  SEM of 25-28 animals per group. \*\*, p < 0.01 vs. Vehicle group, #; p < 0.05 vs. OVA group.



図(2)-1)-4. DEHPの経気道曝露による気管支肺胞洗浄液中の細胞数の変化

\*\*; p < 0.01 vs. Vehicle group. Data are the mean  $\pm$  SE of 9-13 animals per group.



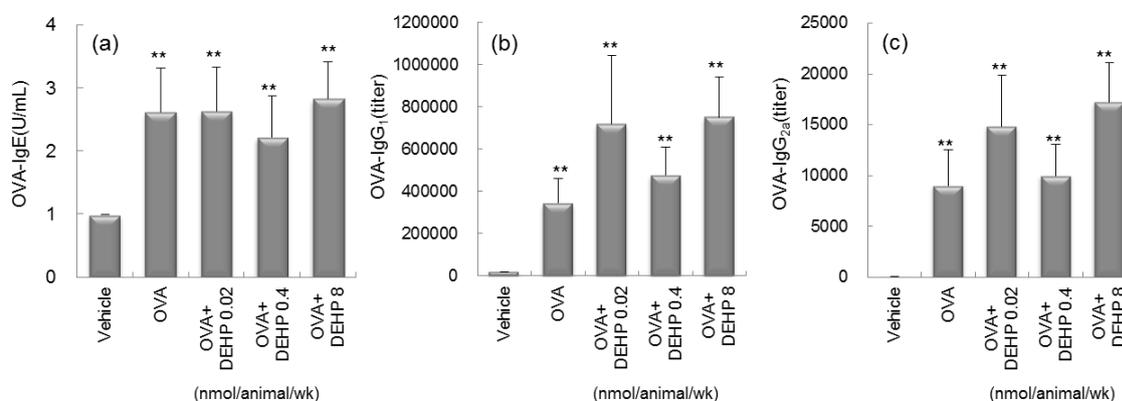
図(2)-1)-5. DEHPの経気道曝露による肺の病理組織学的変化(HE染色)

(a) Vehicle group, (b) OVA group, (c) OVA+DEHP 8 nmol/animal/wk group. (N=4)

表(2)-1)-3. DEHPの経気道曝露による肺におけるサイトカインおよびケモカインのタンパク発現変化

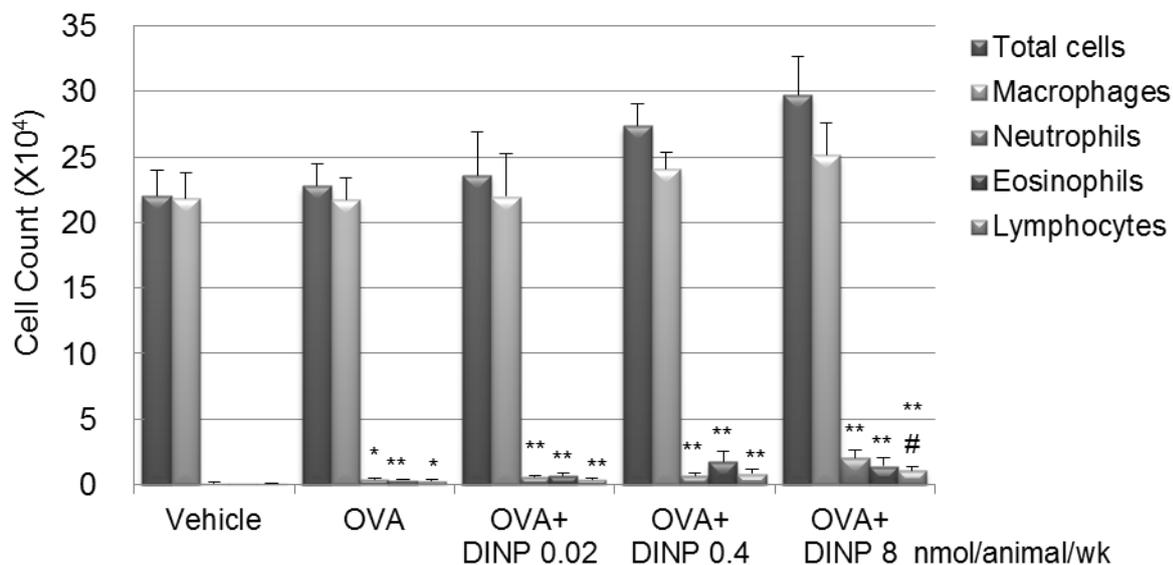
Group	N	pg in total lung supernatants					
		IL-4	IL-5	IL-13	IFN- $\gamma$	RANTES	eotaxin
Vehicle	14	0	3.08 $\pm$ 0.48	1.44 $\pm$ 0.70	1342 $\pm$ 76.1	117 $\pm$ 15.7	71.3 $\pm$ 6.41
OVA	13	0.83 $\pm$ 0.83	108 $\pm$ 29.8**	111 $\pm$ 27.3**	1395 $\pm$ 81.9	138 $\pm$ 10.0	316 $\pm$ 75.6**
OVA+DEHP 0.02 nmol/animal/wk	11	0.10 $\pm$ 0.10	135 $\pm$ 37.1**	158 $\pm$ 40.9**	1505 $\pm$ 48.5	144 $\pm$ 14.5	350 $\pm$ 89.2*
OVA+DEHP 0.4 nmol/animal/wk	13	0.82 $\pm$ 0.72	176 $\pm$ 34.7**	186 $\pm$ 35.3**	1430 $\pm$ 69.0	159 $\pm$ 11.4	440 $\pm$ 94.5**
OVA+DEHP 0.8 nmol/animal/wk	13	2.08 $\pm$ 1.21	190 $\pm$ 36.6**	182 $\pm$ 36.1**	1490 $\pm$ 69.4	134 $\pm$ 13.4	440 $\pm$ 84.3**

\*;  $p < 0.05$  vs. Vehicle group, \*\*;  $p < 0.01$  vs. Vehicle group. Data are the mean  $\pm$  SE of 9-13 animals per group.



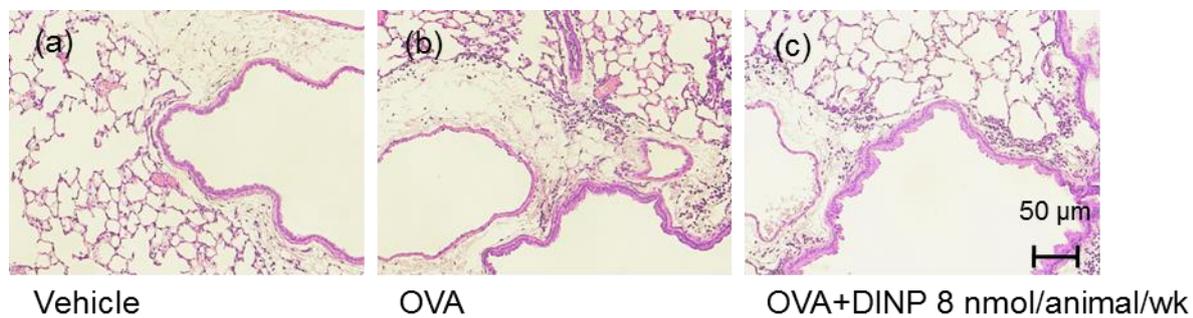
図(2)-1)-6. DEHPの経気道曝露による血中抗原特異的抗体産生の変化

(a) OVA-IgE, (b) OVA-IgG<sub>1</sub>, (c) OVA-IgG<sub>2a</sub>. \*\*;  $p < 0.01$  vs. Vehicle group. Data are the mean  $\pm$  SE of 9-13 animals per group



図(2)-1)-7. DINPの経気道曝露による気管支肺胞洗浄液中の細胞数の変化

\*\* $p < 0.01$  vs. Vehicle group. Data are the mean  $\pm$  SE of 11-14 animals per group.



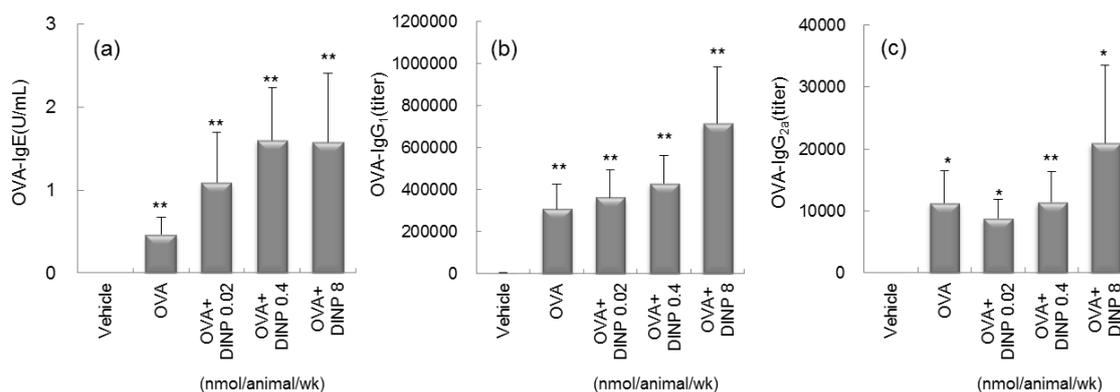
図(2)-1)-8. DINPの経気道曝露による肺の病理組織学的変化(HE染色)

(a) Vehicle group, (b) OVA group, (c) OVA+DINP 8 nmol/animal/wk group.(N=4-5)

表(2)-1)-4. DINPの経気道曝露による肺におけるサイトカインおよびケモカインのタンパク発現変化

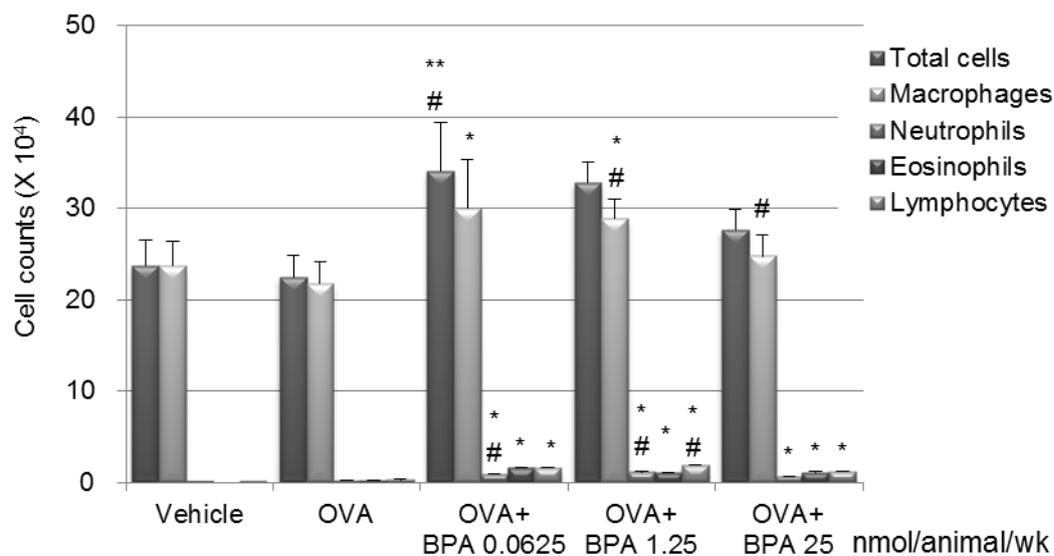
Group	N	pg in total lung supernatants					
		IL-4	IL-5	IL-13	IFN- $\gamma$	RANTES	eotaxin
Vehicle	11	30.8 $\pm$ 56.5	4.01 $\pm$ 0.41	0.00	710 $\pm$ 42.8	117 $\pm$ 12.1	68.4 $\pm$ 4.65
OVA	13	56.5 $\pm$ 8.70	84.1 $\pm$ 24.7**	106 $\pm$ 35.0**	883 $\pm$ 71.8	125 $\pm$ 13.6	284 $\pm$ 83.8**
OVA+DINP 0.02 nmol/animal/wk	14	57.7 $\pm$ 7.79	109 $\pm$ 23.3**	151 $\pm$ 35.0**	814 $\pm$ 50.0	147 $\pm$ 9.97	320 $\pm$ 67.3**
OVA+DINP 0.4 nmol/animal/wk	14	50.3 $\pm$ 6.71	135 $\pm$ 30.9**	180 $\pm$ 45.0**	834 $\pm$ 52.0	155 $\pm$ 17.7	336 $\pm$ 71.9**
OVA+DINP 0.8 nmol/animal/wk	13	48.0 $\pm$ 13.4*	132 $\pm$ 33.4**	155 $\pm$ 45.8**	923 $\pm$ 51.5*	156 $\pm$ 18.5	344 $\pm$ 72.9**

Data are the mean  $\pm$  SE of 11-14 animals per group. \*,  $p < 0.05$  vs. Vehicle group, \*\*,  $p < 0.01$  vs. Vehicle group.



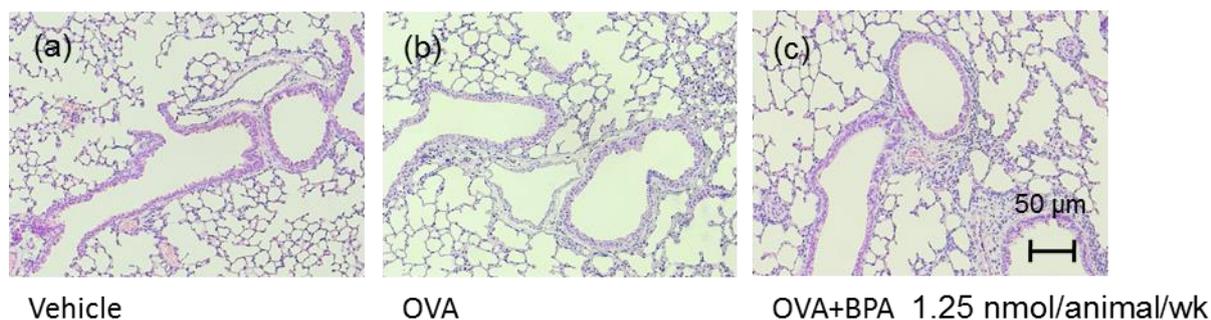
図(2)-1)-9. DINPの経気道曝露による血中抗原特異的抗体産生の変化

(a) OVA-IgE, (b) OVA-IgG<sub>1</sub>, (c) OVA-IgG<sub>2a</sub>. Data are the means  $\pm$  SEM of 11-14 animals per group. \*,  $p < 0.05$  vs. Vehicle group, \*\*,  $p < 0.01$  vs. Vehicle group.



図(2)-1)-10. BPAの経気道曝露による気管支肺胞洗浄液中の細胞数の変化

\*; p<0.05 vs. Vehicle group, \*\*; p<0.01 vs. Vehicle group, #; p<0.05 vs. OVA group.



図(2)-1)-11. BPAの経気道曝露による肺の病理組織学的変化(HE染色)

(a) Vehicle group, (b) OVA group, (c) OVA+BPA 1.25 nmol/animal/wk group. (N=4-5)

表(2)-1)-5. BPAの経気道曝露による肺におけるサイトカインのタンパク発現変化

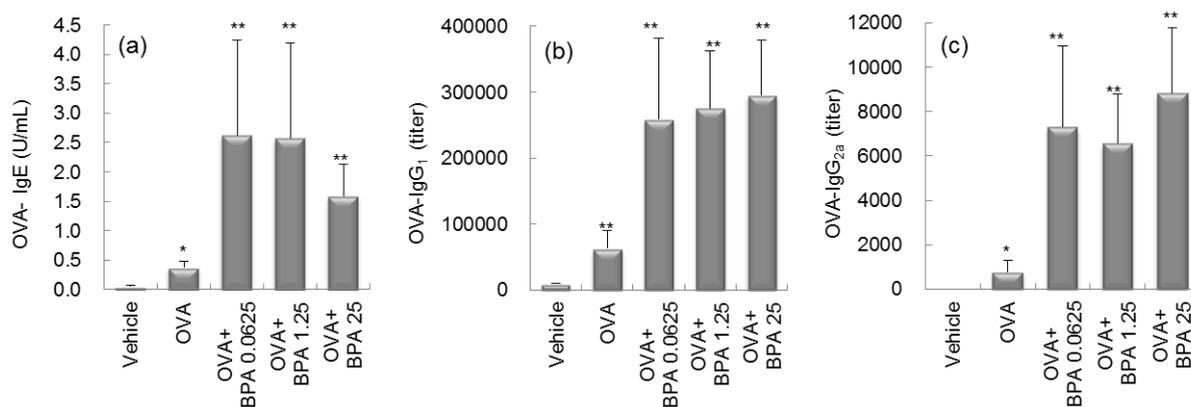
Group	N	pg in total lung supernatants						
		Th2 cytokine				Th1 cytokine		
		IL-4	IL-5	IL-10	IL-13	IL-33	IFN-γ	IL-12
Vehicle	8	25.8 ± 2.91	7.94 ± 0.44	11.0 ± 2.06	0.69 ± 0.69	4481 ± 333	592 ± 30.0	2152 ± 99.5
OVA	7	34.8 ± 2.70	78.1 ± 16.8**	17.4 ± 1.34	67.4 ± 15.0**	7214 ± 668*	754 ± 26.6**	2378 ± 53.8
OVA+BPA 0.0625 nmol/animal/wk	8	49.0 ± 7.13*	267 ± 80.2**	22.3 ± 2.19*	218 ± 65.6*	13451 ± 1974**	923 ± 46.3**#	2110 ± 48.7#
OVA+BPA 1.25 nmol/animal/wk	7	45.4 ± 7.83	264 ± 86.2**	24.8 ± 3.50**	202 ± 55.6**#	14305 ± 2056**##	764 ± 46.8**	2049 ± 57.1##
OVA+BPA 25 nmol/animal/wk	7	66.2 ± 22.4	188 ± 62.6**	22.7 ± 3.44*	163 ± 54.4*	10516 ± 1702**	729 ± 38.8*	2019 ± 94.2##

Data are the mean ± SE of 7-8 animals per group. \*; p<0.05 vs. Vehicle group, \*\*; p<0.01 vs. Vehicle group, #; p<0.05 vs. OVA group, ##; p<0.01 vs. OVA group.

表(2)-1)-6. BPAの経気道曝露による肺におけるケモカインのタンパク発現変化

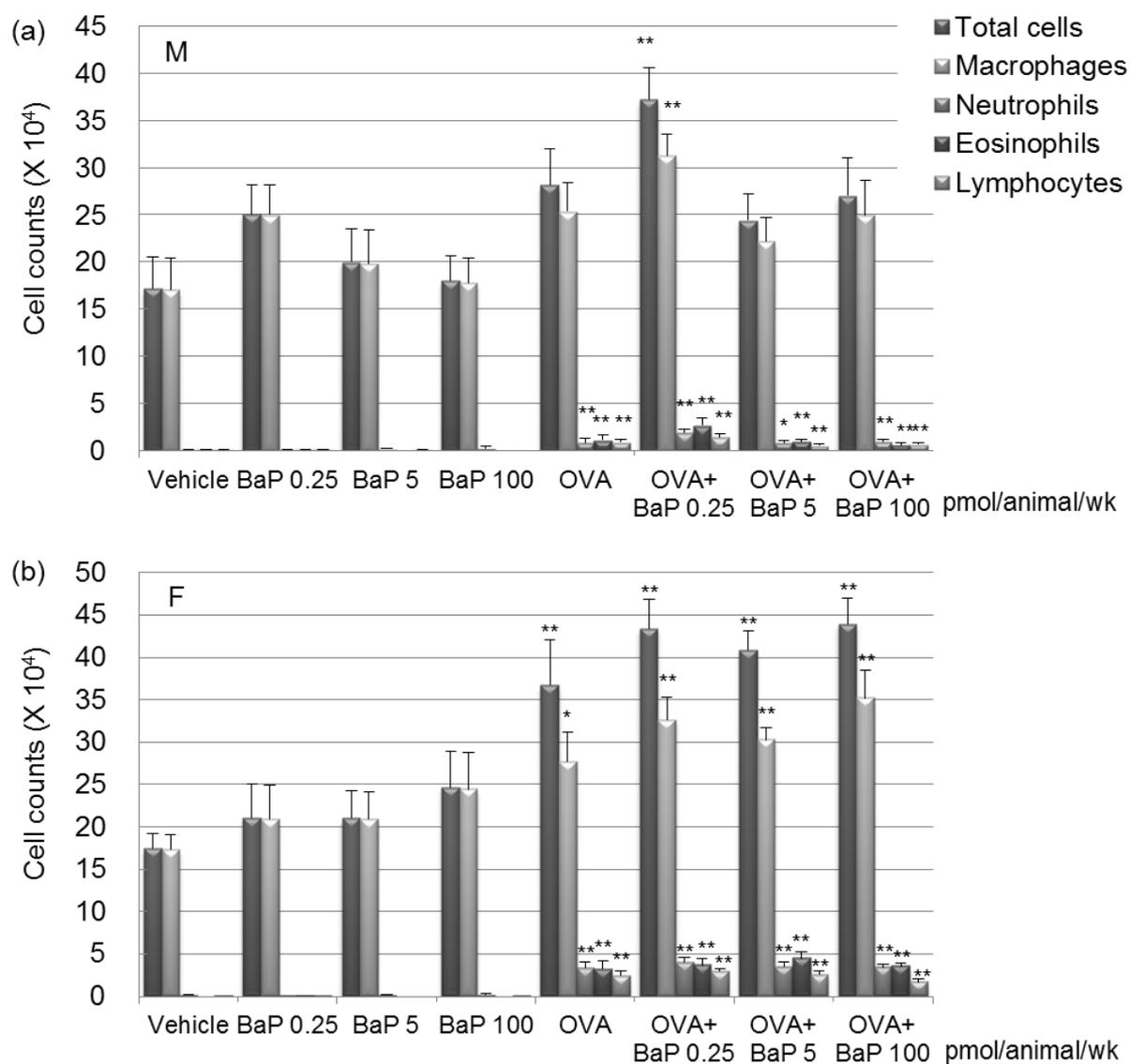
Group	N	pg in total lung supernatants					
		MIP-1 $\alpha$	KC	MCP-1	eotaxin	MCP-3	RANTES
Vehicle	8	7.63 $\pm$ 2.86	0.00 $\pm$ 0.00	26.7 $\pm$ 2.86	36.5 $\pm$ 4.93	120 $\pm$ 5.54	52.1 $\pm$ 5.64
OVA	7	7.48 $\pm$ 3.31	2.50 $\pm$ 2.50	65.0 $\pm$ 6.54**	173 $\pm$ 30.7**	146 $\pm$ 13.8	66.9 $\pm$ 6.66
OVA+BPA 0.0625 nmol/animal/wk	8	29.3 $\pm$ 7.53	40.0 $\pm$ 14.2*	133 $\pm$ 32.5**	363 $\pm$ 94.7	222 $\pm$ 35.6*	135 $\pm$ 17.7**,#
OVA+BPA 1.25 nmol/animal/wk	7	39.3 $\pm$ 15.4	72.0 $\pm$ 38.0*#	194 $\pm$ 87.0*	407 $\pm$ 123**	272 $\pm$ 68.9*	189 $\pm$ 47.3**##
OVA+BPA 25 nmol/animal/wk	7	31.6 $\pm$ 6.32	77.1 $\pm$ 35.4*#	133 $\pm$ 30.6*	355 $\pm$ 118	188 $\pm$ 62.6	95.0 $\pm$ 12.1*

Data are the mean  $\pm$  SE of 7-8 animals per group. \*,  $p < 0.05$  vs. Vehicle group, \*\*,  $p < 0.01$  vs. Vehicle group, #;  $p < 0.05$  vs. OVA group, ##;  $p < 0.01$  vs. OVA group.



図(2)-1)-12. BPAの経気道曝露による血中抗原特異的抗体産生の変化

(a) OVA-IgE, (b) OVA-IgG<sub>1</sub>, (c) OVA-IgG<sub>2a</sub>. Data are the means  $\pm$  SEM of 7-8 animals per group. \*,  $p < 0.05$  vs. Vehicle group, \*\*,  $p < 0.01$  vs. Vehicle group.



図(2)-1)-13. BaPの乳児期曝露による血中抗原特異的抗体産生の変化

(a) 雄(M), (b) 雌(F) Data are the means  $\pm$  SEM of 4-8 animals per group. \*,  $p < 0.05$  vs. Vehicle group, \*\*,  $p < 0.01$  vs. Vehicle group.

表(2)-1)-7. BaPの乳児期曝露による肺におけるサイトカインおよびケモカインのタンパク発現変化(雄)

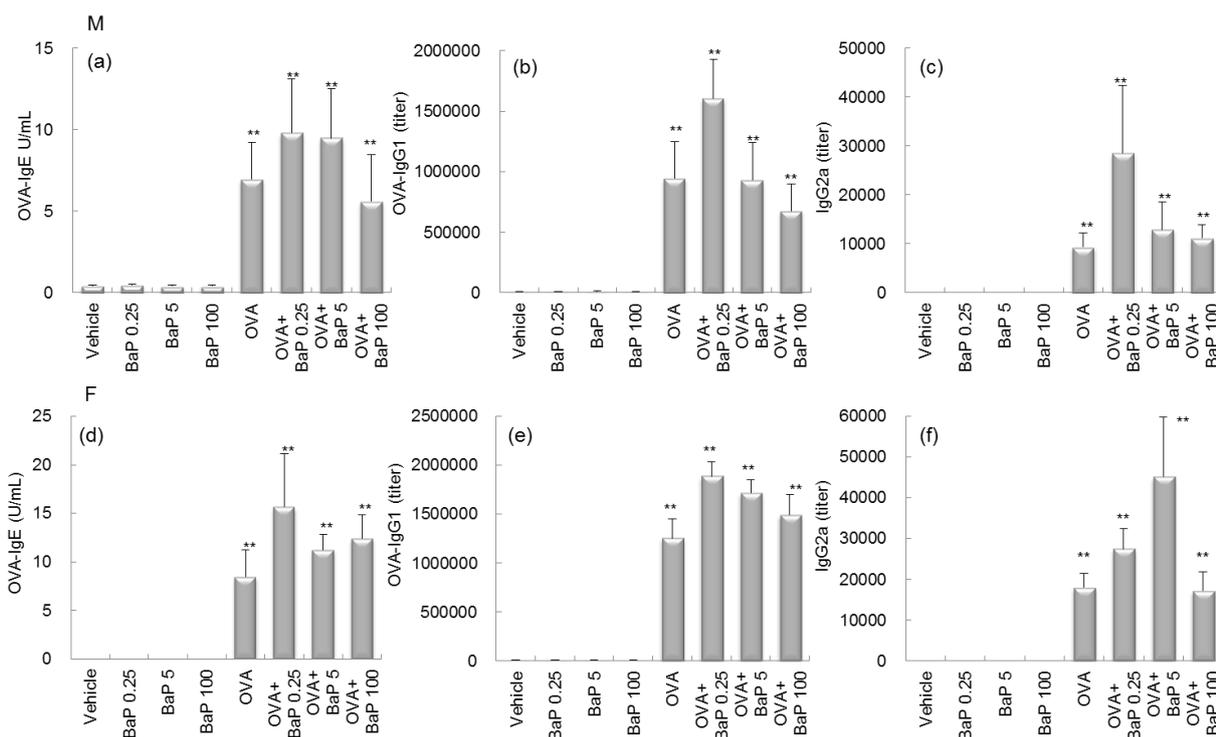
Group	N	pg in total lung supernatants								
		IL-4	IL-5	IL-13	IL-33	IFN- $\gamma$	IL-12	MCP-1	eotaxin	RANTES
Vehicle	7	91.3 $\pm$ 8.56	3.95 $\pm$ 0.33	0.35 $\pm$ 0.33	5377 $\pm$ 180	1665 $\pm$ 44.3	182 $\pm$ 8.68	1.18 $\pm$ 0.60	40.0 $\pm$ 2.45	97.8 $\pm$ 9.70
BaP 0.25 pmol/animal/wk	5	98.0 $\pm$ 15.3	3.45 $\pm$ 0.43	4.25 $\pm$ 0.75	5620 $\pm$ 565	1822 $\pm$ 102	171 $\pm$ 9.83	11.2 $\pm$ 4.44	47.0 $\pm$ 1.38	101 $\pm$ 15.4
BaP 5 pmol/animal/wk	4	65.0 $\pm$ 6.08	3.66 $\pm$ 1.15	4.33 $\pm$ 0.75	5252 $\pm$ 239	1730 $\pm$ 74.9	167 $\pm$ 9.57	4.58 $\pm$ 2.89	39.4 $\pm$ 3.74	102 $\pm$ 13.0
BaP 100 pmol/animal/wk	4	68.8 $\pm$ 2.87	2.26 $\pm$ 0.10	0.96 $\pm$ 0.90	5206 $\pm$ 124	1430 $\pm$ 62.1	170 $\pm$ 11.0	1.81 $\pm$ 1.11	45.7 $\pm$ 4.53	89.8 $\pm$ 10.8
OVA	8	77.0 $\pm$ 9.40	175 $\pm$ 17.7**	340 $\pm$ 49.4**	13225 $\pm$ 151**	1664 $\pm$ 64.9	128 $\pm$ 14.2	148 $\pm$ 29.6**	575 $\pm$ 83.3**	139 $\pm$ 10.4*
OVA+BaP 0.25 pmol/animal/wk	8	63.8 $\pm$ 15.5	319 $\pm$ 62.9**	394 $\pm$ 71.0**	15902 $\pm$ 1659**	1739 $\pm$ 117	169 $\pm$ 20.1	198 $\pm$ 36.4**	823 $\pm$ 158**	204 $\pm$ 35.2*
OVA+BaP 5 pmol/animal/wk	8	63.7 $\pm$ 8.58	211 $\pm$ 49.4**	263 $\pm$ 57.5**	11902 $\pm$ 1468**	1660 $\pm$ 88.1	122 $\pm$ 7.99**	120 $\pm$ 29.1**	544 $\pm$ 119**	183 $\pm$ 20.3*
OVA+BaP 100 pmol/animal/wk	8	64.0 $\pm$ 3.76	190 $\pm$ 35.6**	270 $\pm$ 51.0**	15354 $\pm$ 1422**	1746 $\pm$ 35.0	161 $\pm$ 19.7	113 $\pm$ 23.0**	540 $\pm$ 110**	246 $\pm$ 30.0**

Data are the means  $\pm$  SEM of 4-8 animals per group. \*, p<0.05 vs. Vehicle group, \*\*, p<0.01 vs. Vehicle group.

表(2)-1)-8. BaPの乳児期曝露による肺におけるサイトカインおよびケモカインのタンパク発現変化(雌)

Group	N	pg in total lung supernatants								
		IL-4	IL-5	IL-13	IL-33	IFN- $\gamma$	IL-12	MCP-1	eotaxin	RANTES
Vehicle	7	48.4 $\pm$ 6.89	11.0 $\pm$ 0.27	0.00 $\pm$ 0.00	5369 $\pm$ 406	1954 $\pm$ 92.0	193 $\pm$ 12.4	0.60 $\pm$ 0.50	42.3 $\pm$ 4.37	117 $\pm$ 20.0
BaP 0.25 pmol/animal/wk	5	63.7 $\pm$ 14.9	11.0 $\pm$ 0.35	0.23 $\pm$ 0.23	4720 $\pm$ 295	1875 $\pm$ 76.3	217 $\pm$ 5.15	1.40 $\pm$ 0.98	37.4 $\pm$ 2.99	121 $\pm$ 13.2
BaP 5 pmol/animal/wk	4	35.2 $\pm$ 7.63	10.4 $\pm$ 0.31	0.08 $\pm$ 0.08	6492 $\pm$ 1530	2143 $\pm$ 128	230 $\pm$ 13.2	3.68 $\pm$ 1.56	39.9 $\pm$ 2.16	110 $\pm$ 10.8
BaP 100 pmol/animal/wk	4	57.3 $\pm$ 8.12	11.6 $\pm$ 0.34	0.00 $\pm$ 0.00	4885 $\pm$ 335	1519 $\pm$ 101*	226 $\pm$ 14.9	3.93 $\pm$ 1.87	54.4 $\pm$ 4.30	157 $\pm$ 19.4
OVA	8	67.7 $\pm$ 6.10	372 $\pm$ 71.7**	332 $\pm$ 56.8**	23218 $\pm$ 2249**	2025 $\pm$ 101	304 $\pm$ 21.2**	221 $\pm$ 38.1**	658 $\pm$ 107**	311 $\pm$ 32.4**
OVA+BaP 0.25 pmol/animal/wk	8	56.6 $\pm$ 5.71*	553 $\pm$ 83.6**	447 $\pm$ 55.4**	29794 $\pm$ 3143**	2019 $\pm$ 72.1	337 $\pm$ 16.8**	254 $\pm$ 24.0**	712 $\pm$ 59.6**	265 $\pm$ 18.5*
OVA+BaP 5 pmol/animal/wk	8	49.6 $\pm$ 6.60	492 $\pm$ 30.6**	396 $\pm$ 29.8**	33850 $\pm$ 2300**#	2329 $\pm$ 104*#	347 $\pm$ 26.0**	268 $\pm$ 20.8**	725 $\pm$ 52.0**	361 $\pm$ 29.9**
OVA+BaP 100 pmol/animal/wk	8	68.8 $\pm$ 7.12	479 $\pm$ 36.3**	414 $\pm$ 20.0**	29191 $\pm$ 2329**	2172 $\pm$ 86.5	311 $\pm$ 21.5**	224 $\pm$ 32.6**	828 $\pm$ 72.7**	360 $\pm$ 48.5**

Data are the means  $\pm$  SEM of 4-8 animals per group. \*, p<0.05 vs. Vehicle group, \*\*, p<0.01 vs. Vehicle group. #; p<0.05 vs. OVA group.



図(2)-1)-14. BaPの乳児期曝露による血中抗原特異的抗体産生の変化

(a),(d) OVA-IgE, (b),(e) OVA-IgG<sub>1</sub>, (c),(f) OVA-IgG<sub>2a</sub>. (a-c) 雄, (d-f) 雌. Data are the means ± SEM of 4-8 animals per group. \*\*: p<0.01 vs. Vehicle group.

## 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

若齢期(7週齢)のアトピー性皮膚炎モデルマウス、NC/Nga (SPFグレード、雄)に対し、NOAEL以下のDEHP、DINP、BPA、B[a]Pを経口的に曝露し、症状・病態への影響を検討した。

Dpをマウス耳介皮下に繰り返し、投与することにより乾燥、紅斑、浮腫、かひやびらんの形成などアトピー性皮膚炎様症状が耳介背側の表皮に発症した。DEHPの経口曝露では、これら症状の増悪は認められなかった(図(2)-2)-3)。しかし、皮下組織中のマスト細胞や好酸球の浸潤がDEHPを曝露した群の方が増加する傾向が見られ、最も高用量の3,325 μgを投与した群(Dp+DEHP 3,325)では、好酸球数の増加に有意差が認められた(図(2)-2)-4)。また、即時型アレルギーを誘発するTh2系サイトカインのひとつ、IL-13でDEHP経口曝露群は、産生が増加する傾向に有り、中用量の166.3 μgを投与した群(Dp+DEHP 166.3)で有意な差が認められた(表(2)-2)-2)。抗体の産生には、DEHP経口曝露の影響はみられない、あるいは減少を示した(表(2)-2)-2)。

DINPの経口曝露では、低用量(6.6 μg)、中用量(131.3 μg)を投与したマウスでアトピー性皮膚炎様症状が増悪する傾向がみられた(図(2)-2)-5)。また低・中用量DINP曝露群では、組織中MIP-1α量、血中IgE抗体量も増加する傾向がみられた(表(2)-2)-3)。さらに両群の皮下組織中炎症細胞浸潤が有意に亢進していた(図(2)-2)-6)。高用量群では組織中のeotaxin産生量の増加傾向がみられたが、症状や炎症細胞浸潤には影響が見られなかった。

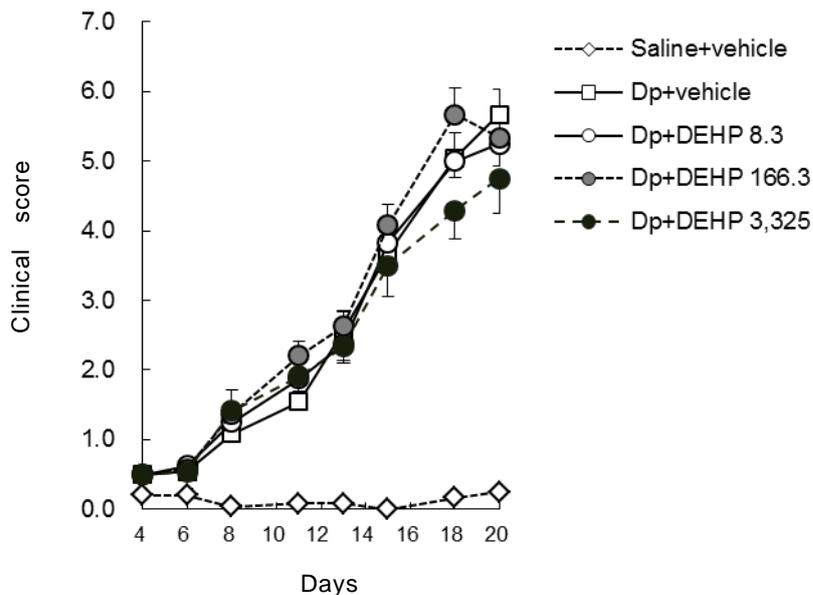
BPAの経口曝露では、低用量(2.19 μg)を投与したマウスでアトピー性皮膚炎様症状が増悪す

る傾向がみられた(図(2)-2-7)。また、皮下組織中の好酸球浸潤も有意に亢進していた(図(2)-2-8)。皮下組織中のIL-18、IL-13、MIP-1 $\alpha$ もやや産生量が増していた(表(2)-2-4)。一方、中用量・高用量のBPA曝露では、症状・病態ともに影響が見られなかった。

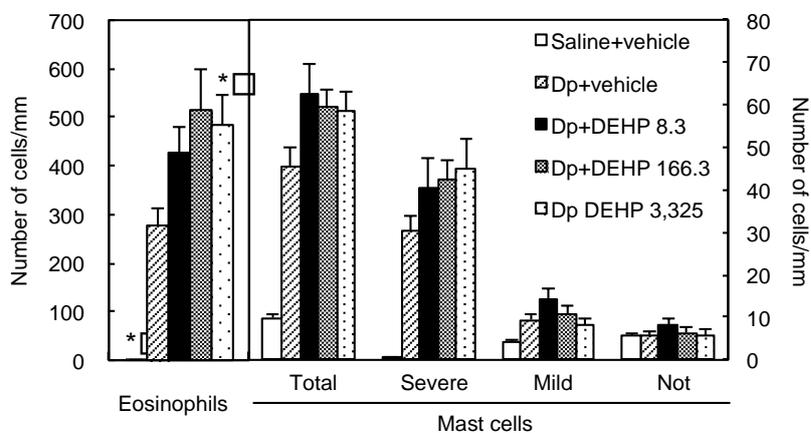
BaPの経口曝露では、低用量(0.09  $\mu$ g)、次いで高用量(36.75  $\mu$ g)を投与したマウスでアトピー性皮膚炎様症状が増悪する傾向がみられたが、中用量(1.84  $\mu$ g)曝露では影響がみられなかった(図(2)-2-9)。また、皮下組織中のマスト細胞数(図(2)-2-10)やMIP-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 量、血中総IgE抗体量(表(2)-2-5)も皮膚症状の結果と併行していた。

以上、NOAEL以下のDEHP、DINP、BPA、BaPを若齢期アトピー性皮膚炎モデルマウスに経口曝露した結果、各化学物質が皮膚症状に与える影響は総じて弱いものであった。しかし、統計的に有意ではないものの、DINP、BPA、BaPでは、皮膚症状スコアが、非曝露群に比べ高い傾向を示していた。特にDINPの曝露は、好酸球やマスト細胞の活性を亢進する結果が得られた。また、いずれの物質も、高用量よりもむしろ低用量で増悪する傾向がみられた。皮膚症状の増悪に関連する因子としては、これら化学物質が炎症局所の炎症細胞浸潤を活性化し、症状を増悪していることが考えられた。概して即時型アレルギーの発症関連因子である抗体やTh2系のサイトカイン(IL-4、IL-5、IL-13)の産生の亢進は、認められないか弱いものであったが、炎症細胞遊走因子であるMIP-1 $\alpha$ が関与することが示唆された。BaPの曝露ではIL-1ファミリーの関与も示された。

若齢期経口曝露実験で検討した4種類の化学物質の中から、最も炎症の増悪を惹起したDINPを用いて、経母乳曝露によるアトピー性皮膚炎増悪作用を検討した。乳児期に母乳を介しDINP曝露した仔に対し、7週齢でアトピー性皮膚炎を発症させたところ、オスではアトピー性皮膚炎様症状に変化がみられなかったが、最も低用量(0.0375 mg/kg/day)のDINPを投与された母獣から産まれたメスでは増悪傾向が見られた(図(2)-2-11)。同群では皮下組織中の炎症細胞浸潤と(図(2)-2-12)、血中抗原特異的IgG<sub>1</sub>抗体産生(表(2)-2-6)が顕著に亢進していた。一方、組織中のサイトカイン類の産生への影響は弱かった。また、中用量曝露群のメス、オスともにマスト細胞の浸潤、活性化、メスのDINP経母乳曝露全群で抗原特異的IgG<sub>1</sub>抗体産生の有意な増加が認められた(図(2)-2-12、13、表(2)-2-6)。以上の結果から、母親が経口的にDINPに曝露されたとき、母乳を介して、仔のアトピー性皮膚炎様症状や病態を増悪する可能性が示された。また、その傾向は、若齢期曝露と同様、低用量曝露において顕著であることも示された。仔への影響には性差が存在し、メスの方がより増悪する傾向が認められた(表(2)-2-7)。



図(2)-2)-3 DEHPを経口曝露した若齢期マウスの皮膚症状スコア  
Data are the means  $\pm$  SEM of 12 animals per group.



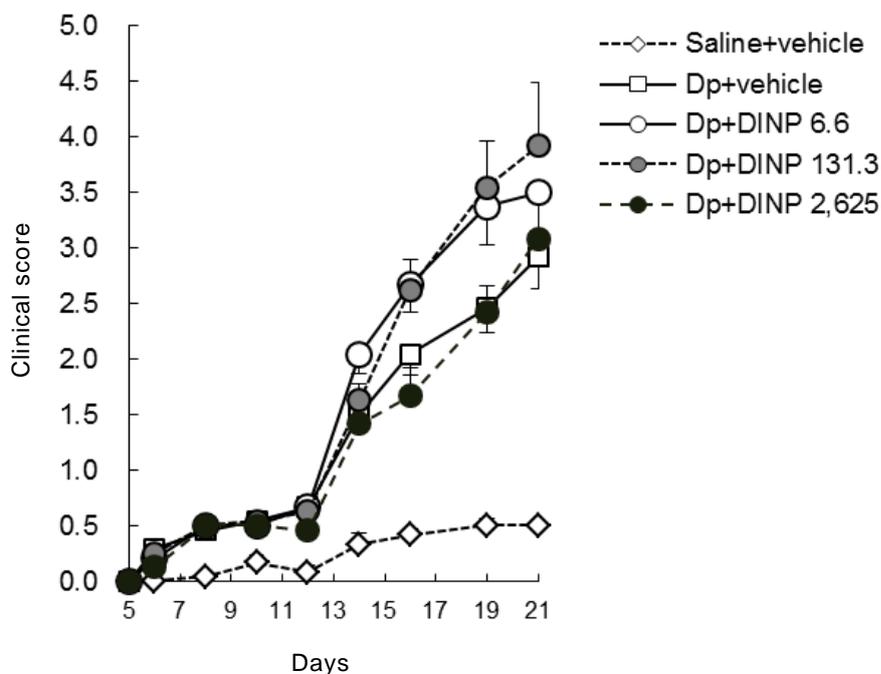
図(2)-2)-4 DEHPを経口曝露した若齢期マウスの皮下組織中炎症細胞数  
Data are the means  $\pm$  SEM of 6 animals per group. Total; total mast cells. Severe; severely degranulated mast cells. Mild; mildly degranulated mast cells. Not; non-degranulated mast cells. \*  $p < 0.05$  vs. Dp+vehicle group.

表(2)-2)-2. DEHP経口曝露におけるサイトカイン・抗体産生量

	IL-13 (pg/mg total ear protein)			MIP-1 $\alpha$ (pg/mg total ear protein)			total IgE (ng/ml)		Dp-IgG <sub>1</sub> (titer)			
Saline+vehicle	11.46	$\pm$ 1.46	**	0.75	$\pm$ 0.75	*	55.47	$\pm$ 24.01	**	225.60	$\pm$ 15.99	**
Dp+vehicle	35.60	$\pm$ 2.44		294.49	$\pm$ 51.76		351.21	$\pm$ 56.89		674.76	$\pm$ 64.85	
Dp+DEHP 8.3	43.91	$\pm$ 5.47		402.53	$\pm$ 95.53		234.11	$\pm$ 45.83		365.29	$\pm$ 51.37	**
Dp+DEHP 166.3	58.22	$\pm$ 3.61	**	424.76	$\pm$ 82.96		358.55	$\pm$ 68.98		495.82	$\pm$ 87.39	
Dp+DEHP 3,325	47.45	$\pm$ 4.76		251.67	$\pm$ 72.46		209.59	$\pm$ 29.04		452.97	$\pm$ 60.38	

Data are the means  $\pm$  SEM of 6 animals per group (IL-13 and MIP-1 $\alpha$ ) or 12 animals per group (total IgE and Dp-IgG<sub>1</sub>). Dp-IgG<sub>1</sub> means Dp-specific IgG<sub>1</sub>.

\*  $p < 0.05$ , and \*\*  $p < 0.01$  vs. Dp+vehicle group.



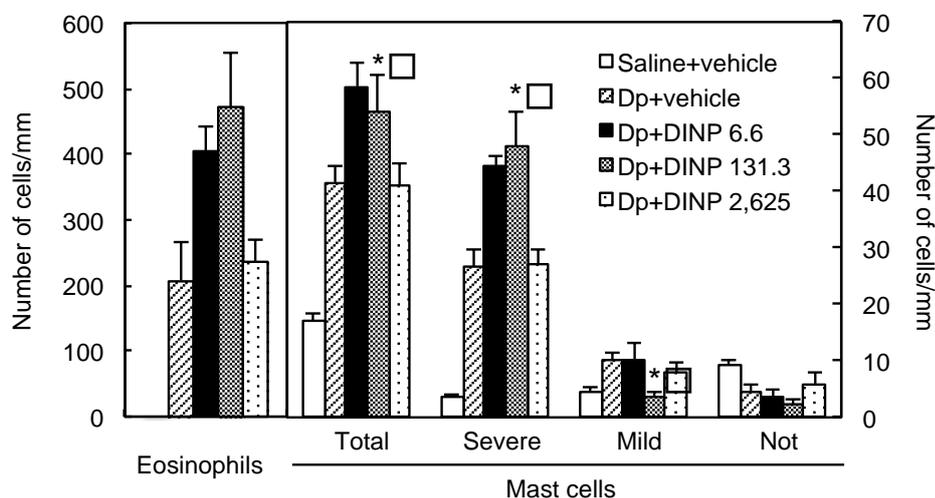
図(2)-2)-5 DINPを経口曝露した若齢期マウスの皮膚症状スコア

Data are the means  $\pm$  SEM of 12 animals per group.

表(2)-2)-3. DINP経口曝露におけるサイトカイン・抗体産生量

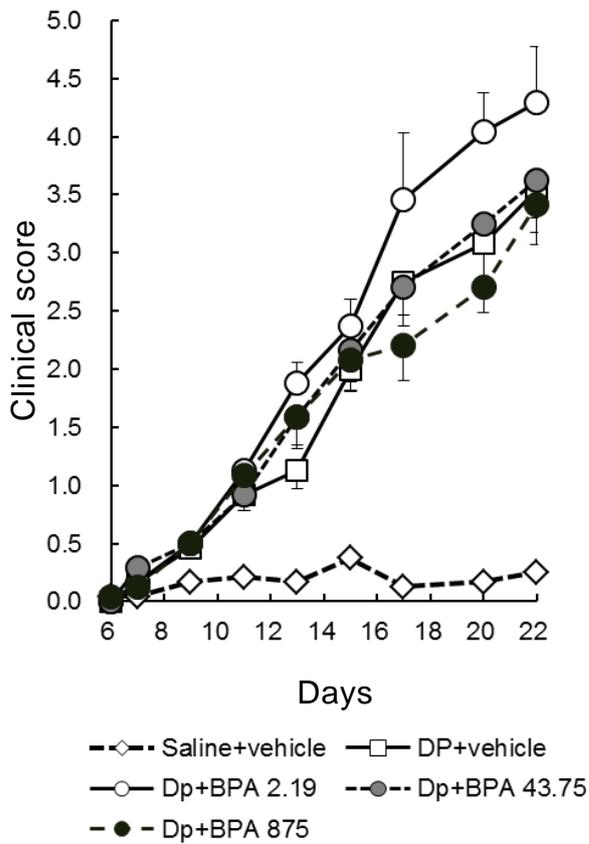
	MIP-1 $\alpha$ (pg/mg total ear protein)		eotaxin	total IgE (ng/ml)	
Saline+vehicle	0.00 $\pm$ 0.00	*	1.37 $\pm$ 1.14	309.87 $\pm$ 37.45	**
Dp+vehicle	74.81 $\pm$ 20.14		16.07 $\pm$ 1.48	1093.33 $\pm$ 160.42	
Dp+DINP 6.6	101.59 $\pm$ 21.00		20.18 $\pm$ 4.68	1219.70 $\pm$ 126.47	
Dp+DINP 131.3	100.12 $\pm$ 24.09		19.18 $\pm$ 3.03	1302.35 $\pm$ 67.32	
Dp+DINP 2,625	64.07 $\pm$ 17.07		34.22 $\pm$ 6.81	1035.72 $\pm$ 105.44	*

Data are the means  $\pm$  SEM of 6 animals per group (MIP-1 $\alpha$  and eotaxin) or 12 animals per group (total IgE). \* p < 0.05, and \*\* p < 0.01 vs. Dp+vehicle group.

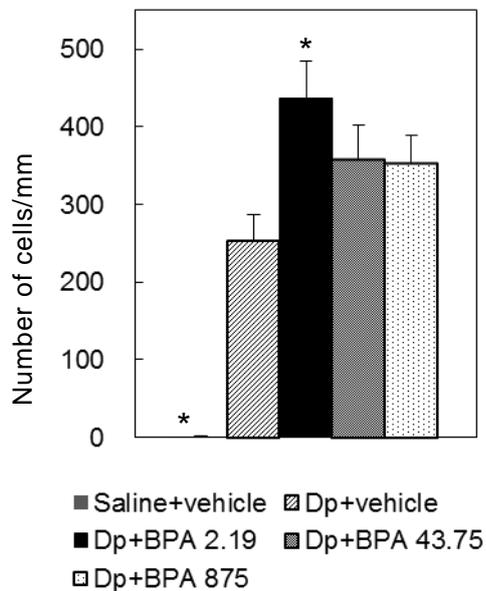


図(2)-2)-6 DINPを経口曝露した若齢期マウスの皮下組織中炎症細胞数

Data are the means  $\pm$  SEM of 6 animals per group. Total; total mast cells. Severe; severely degranulated mast cells. Mild; mildly degranulated mast cells. Not; non-degranulated mast cells. \* p < 0.05 vs. Dp+vehicle group.



図(2)-2)-7 BPAを経口曝露した若齢期マウスの皮膚症状スコア  
Data are the means  $\pm$  SEM of 12 animals per group.



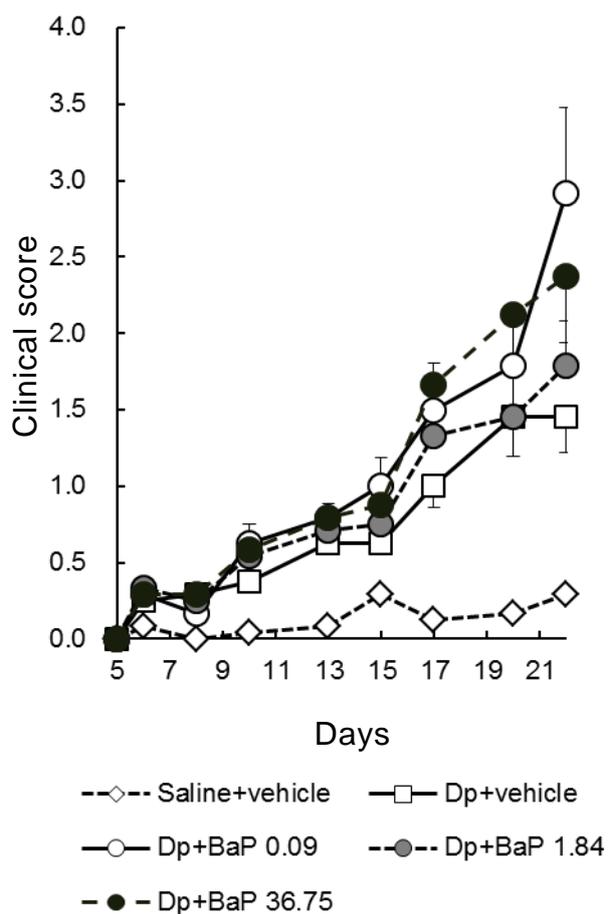
図(2)-2)-8 BPAを経口曝露した若齢期マウスの皮下組織中好酸球数  
Data are the means  $\pm$  SEM of 6 animals per group  
\*  $p < 0.05$  vs. Dp+vehicle group.

表(2)-2)-4. BPA経口曝露におけるサイトカイン産生量

	IL-18	IL-13	MIP-1 $\alpha$
	(pg/mg total ear protein)		
Saline+vehicle	1235.09 $\pm$ 177.19	10.67 $\pm$ 2.37 *	11.69 $\pm$ 2.40 *
Dp+vehicle	1301.83 $\pm$ 150.56	33.24 $\pm$ 1.40	199.58 $\pm$ 41.04
Dp+BPA 2.19	1756.80 $\pm$ 323.65	46.31 $\pm$ 5.67	291.49 $\pm$ 26.05
Dp+BPA 43.75	1604.26 $\pm$ 137.09	39.15 $\pm$ 4.96	211.22 $\pm$ 32.60
Dp+BPA 875	1276.26 $\pm$ 281.55	48.73 $\pm$ 5.69	309.50 $\pm$ 93.81

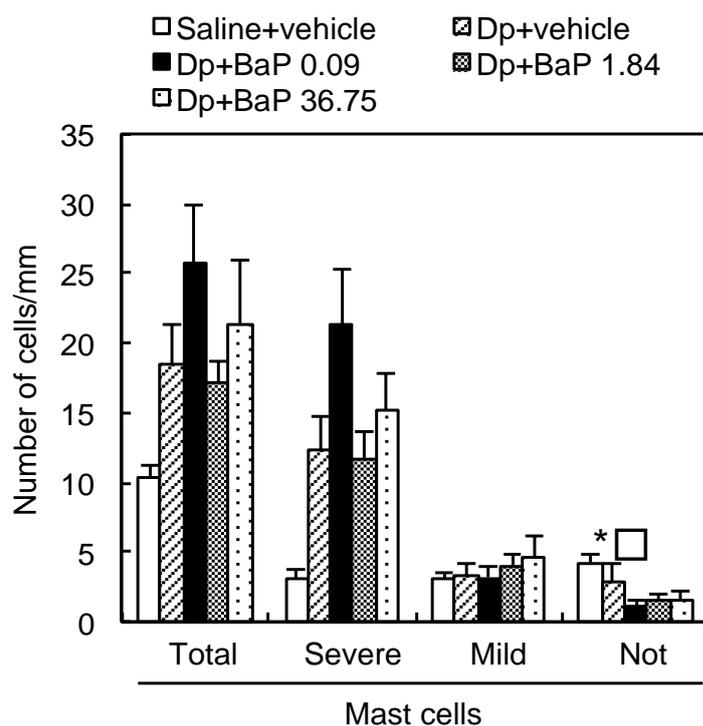
Data are the means  $\pm$  SEM of 6 animals per group.

\*  $p < 0.05$  vs. Dp+vehicle group.



図(2)-2)-9 BaPを経口曝露した若齢期マウスの皮膚症状スコア

Data are the means  $\pm$  SEM of 12 animals per group.



図(2)-2)-10 BaPを経口曝露した若齢期マウスの皮下組織中マスト細胞数

Data are the means  $\pm$  SEM of 6 animals per group

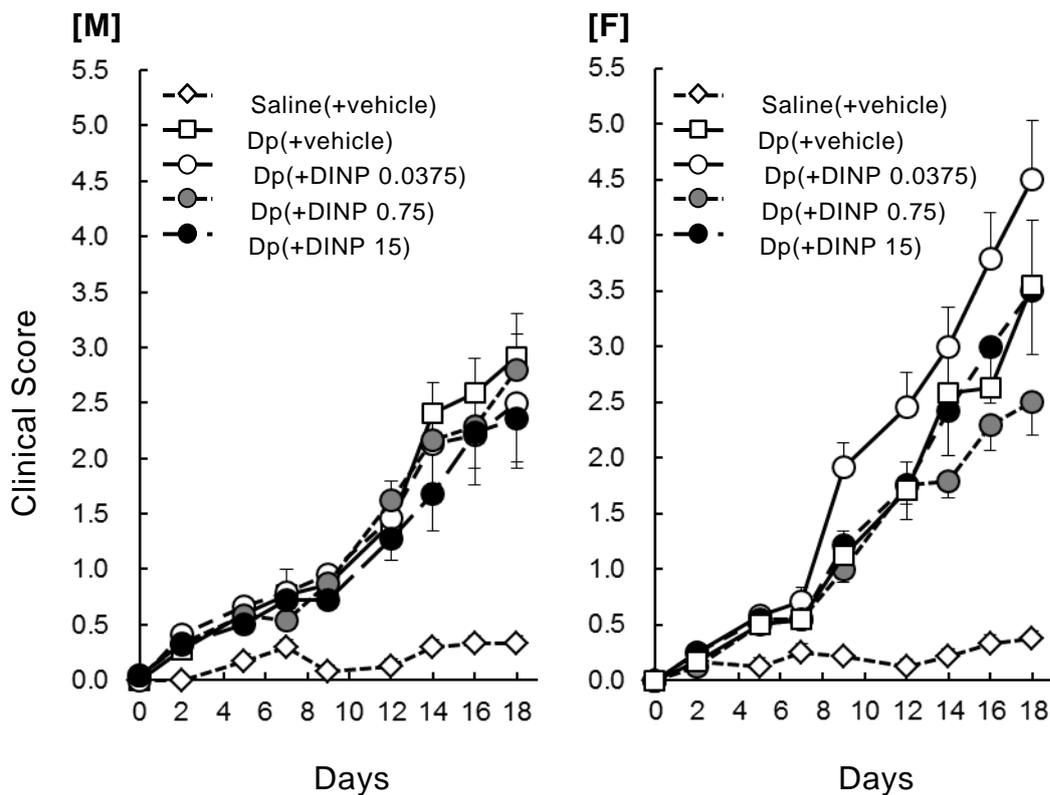
\*  $p < 0.05$  vs. Dp+vehicle group.

表(2)-2)-5. BaP経口曝露におけるサイトカイン・抗体産生量

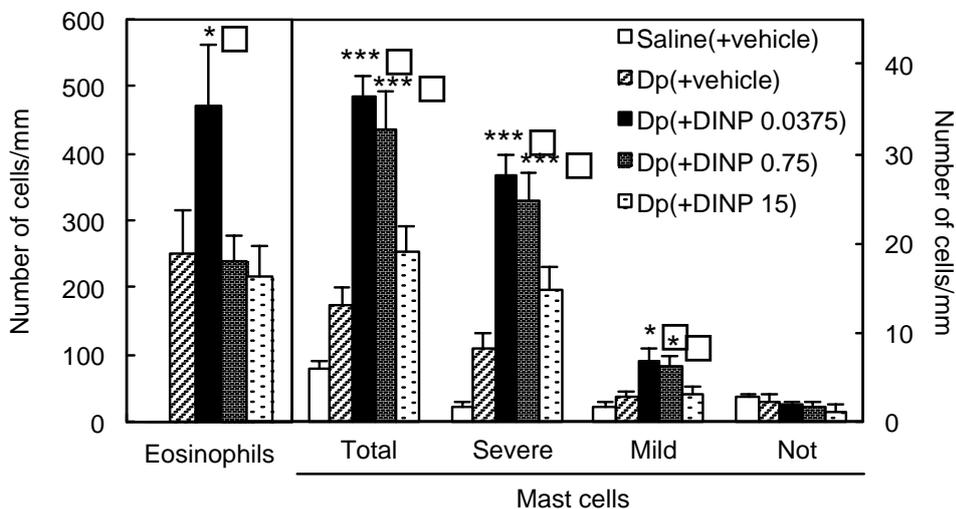
	MIP-1 $\alpha$		IL-1 $\beta$		total IgE	
	(pg/mg total ear protein)				(ng/ml)	
Saline+vehicle	3.29 $\pm$ 0.32	*	30.58 $\pm$ 3.15	*	345.39 $\pm$ 96.63	**
Dp+vehicle	75.84 $\pm$ 12.49		130.37 $\pm$ 37.02		1931.05 $\pm$ 368.29	
Dp+BaP 0.09	109.65 $\pm$ 33.21		257.83 $\pm$ 106.03		2391.66 $\pm$ 569.15	
Dp+BaP 1.84	76.29 $\pm$ 25.76		193.14 $\pm$ 82.10		1561.13 $\pm$ 188.13	
Dp+BaP 36.75	117.38 $\pm$ 28.07		254.65 $\pm$ 84.41		1936.79 $\pm$ 280.56	

Data are the means  $\pm$  SEM of 6 animals per group (MIP-1 $\alpha$  and eotaxin) or 12 animals per group (total IgE).

\*  $p < 0.05$  vs. Dp+vehicle group.



図(2)-2)-11 DINPを乳仔期に経母乳曝露したマウスの皮膚症状スコア  
Data are the means ± SEM of 12 animals per group. [M]; male, [F]; female.



図(2)-2)-12 DINPを乳仔期に経母乳曝露したメスマウスの皮下組織中炎症細胞数  
Data are the means ± SEM of 6 animals per group. Total; total mast cells. Severe; severely degranulated mast cells. Mild; mildly degranulated mast cells. Not; non-degranulated mast cells.

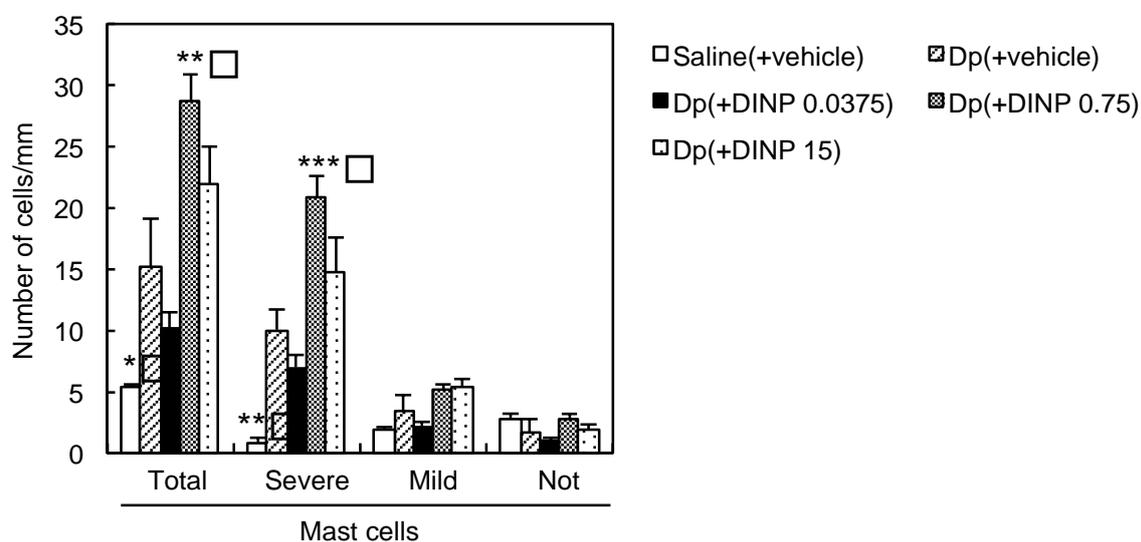
\*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001 vs Dp(+vehicle)

表(2)-2)-6. DINP乳仔期経母乳曝露における抗原特異的IgG<sub>1</sub>抗体産生量

	Male		Female		
	(titer)				
Saline(+vehicle)	92.97	± 6.14	**	45.95 ± 5.94	**
Dp(+vehicle)	3603.70	± 330.83		3036.09 ± 449.75	
Dp(+DINP 0.0375)	3837.66	± 604.71		34677.49 ± 10685.50	**
Dp(+DINP 0.75)	2677.10	± 279.19		8356.12 ± 1513.63	**
Dp(+DINP 15)	4158.65	± 808.21		9511.56 ± 1642.97	**

Data are the means ± SEM of 12 animals per group.

\*\* p < 0.01 vs. Dp(+vehicle) group.



図(2)-2)-13 DINPを乳仔期に経母乳曝露したオスマウスの皮下組織中マスト細胞数

Data are the means ± SEM of 6 animals per group

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, and \*\*\* p < 0.001 vs. Dp(+vehicle) group.

表(2)-2)-7 DNP乳仔期経母乳曝露における影響の性差

Saline(+vehicle)				Dp(+vehicle)			
	Male	Female		Male	Female		Female
Dp-IgG <sub>1</sub>	93.0 ± 6.1	46.0 ± 5.9	***	Total IgE	39.4 ± 11.7	120.4 ± 19.4	**
IL-13	171.0 ± 26.4	68.5 ± 21.6	*	IL-33	63840.7 ± 7939.3	90635.8 ± 7059.8	*
				Eotaxin	198.1 ± 44.9	342.7 ± 22.8	*
Dp(+DINP 0.0375)				Dp(+DINP 0.75)			
	Male	Female		Male	Female		Female
Score	3837.7 ± 604.7	34677.5 ± 10685.5	*	Dp-IgG <sub>1</sub>	2677.1 ± 279.2	8356.1 ± 1513.6	**
Dp-IgG <sub>1</sub>	3837.7 ± 604.7	34677.5 ± 10685.5	*	IL-33	58050.3 ± 5225.9	77067.6 ± 5740.3	*
EOS	231.5 ± 34.5	472.1 ± 91.3	*				
MC	10.1 ± 1.5	36.5 ± 2.3	***	Dp(+DINP 15)			
Severe	7.0 ± 0.9	27.7 ± 2.3	***		Male	Female	
Mild	2.2 ± 0.4	6.9 ± 1.3	*	Dp-IgG <sub>1</sub>	4158.7 ± 808.2	9511.6 ± 1643.0	**
				IL-13	419.2 ± 41.7	687.3 ± 90.5	*
				MCP-3	401.6 ± 49.8	207.8 ± 63.1	*

Data are the means ± SEM. Score; clinical score. EOS; the number of the eosinophils. MC; the total number of the mast cells. Severe; the number of the severely degranulated mast cells. Mild; the number of the mildly degranulated mast cells. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, and \*\*\* p < 0.001.

### 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

細胞培養実験を図(2)-3-1に示した。OVA処理により、IL-1 $\beta$ およびIL-6 mRNA発現量が増加した。OVAと化学物質を併用処理した群では、OVA単独処理群と比較して、mRNA発現に有意な変動は認められなかった。また、MCP-1 mRNA発現はOVA処理により、対照群と比較して約8.5倍に増加した。化学物質(BPA、DEHP)を併用処理すると、BPAではすべての濃度において、MCP-1 mRNA発現はOVA処理群と比較して有意な発現変動は認められなかった。しかし、DEHP 150 $\mu$ M併用処理群ではOVA単独処理群と比較すると約1.5倍(対照群と比較すると約13倍)の有意な発現誘導が認められた。さらに、MIP-1 $\alpha$  mRNA発現量はOVA処理により、対照群と比較して約1.7倍に増加した。化学物質の併用処理により全ての併用処理群で発現量の増加が認められ、特にBPA 0.5、5 $\mu$ M併用処理群、DEHP 150 $\mu$ M処理群では有意な発現誘導が認められた(それぞれOVA単独処理群と比較して、約1.9倍、2.0倍、1.9倍)。

一方、TNF mRNA発現量はOVA処理により、対照群と比較して約2.1倍増加したが、化学物質の併用により、有意差は認められなかったが、その発現誘導が抑制される傾向をしめした。また、KC mRNAは対照群では発現しておらず、OVA処理により、発現誘導が認められるものの、その発現は弱く、また、化学物質の併用処理によっても大きな発現変動は認められなかった。

以上の結果より、in vitro実験ではOVAの存在下において、炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ 、IL-6、MIP-1 $\alpha$ ) mRNA 発現に対するBPAの発現誘導が認められたため、BPAはアレルギー反応を増強する可能性を示唆した。

Crij1を用いたアレルギー性鼻炎マウスモデルにおけるBPAの影響評価については、Crij1単独投与群の体重は対照群に比較して低下傾向を示し、Crij1+BPA0.1mg群の体重はCrij1単独投与群よりも更に低下しており、対照群と比較すると有意( $P<0.05$ )に低下していた。Crij1+BPA1mg群の体重はCrij1単独投与群よりも低下していたが、対照群との比較では有意差を示さなかった。

Crij1単独投与群の鼻洗浄液(NCLF)中の総細胞数( $p<0.001$ )、好中球数( $p<0.001$ )及び好酸球数( $p<0.01$ )は対照群に比較して有意に増加していた(図(2)-3)-2)。Crij1+BPA0.1mg群の総細胞数( $p<0.05$ )と好酸球数( $p<0.05$ )は対照群に比較して有意に増加していたが、Crij1単独投与群と比較すると総細胞数や炎症細胞数は減少傾向を示していた(図(2)-3)-2)。Crij1+BPA1mg群の総細胞数( $p<0.05$ )と好酸球数( $p<0.01$ )は対照群との比較では有意に増加していた。しかし、Crij1単独投与群と比較すると好中球数は有意( $p<0.05$ )に減少し、更にリンパ球もCrij1+BPA0.1mg群に比較して有意( $p<0.05$ )に減少していた(図(2)-3)-2)。

Crij1単独投与群ではIL-5とINF- $\gamma$ には殆ど発現が認められなかったが、IL-1 $\beta$ 、IL-6やIL-13に発現が認められた。またケモカイン類では好酸球の遊走、活性化に関連したEotaxinやMPC-3には発現が認められなかったが、好中球に関連したKCに発現が認められた。またMCP1、MIP-1 $\alpha$ やTNF- $\alpha$ にも弱いながら発現が認められた。Crij1+BPA0.1mg群とCrij1+BPA1mg群のNCLF中のサイトカインやケモカイン発現はNALF中の炎症細胞数の変化と類似していた(表(2)-3)-1)。サイトカインのIL-1 $\beta$ とIL-6はBPAの投与量に依存して低下する傾向をしていた。またケモカイン類のKCやMIP-1 $\alpha$ にもBPAの投与量に依存して低下する傾向が見られた(表(2)-3)-2)。一方、鼻の組織学的観察では、対照群の鼻粘膜下に好酸球等の炎症細胞の浸潤はほとんど認められなかったが、Crij1を投与したマウスでは、粘膜下組織や粘膜上皮内に好酸球の著しい浸潤が見られた。しかし、BPA投与群(0.1mgと1mg)では鼻粘膜下への好酸球浸潤がCrij1を投与よりも減弱していた。

以上の結果より、AlumとCrij1初期感作によるスギ花粉症誘発モデルではBPAの投与は鼻洗浄液中の炎症細胞数やサイトカイン・ケモカインの発現を低下させ、アレルギー性鼻炎の病態を軽減させた。Alum+ Crij1感作系では、BPAはむしろアレルギー反応を抑制する方向に作用することが明らかとなった。

OVAを用いたアレルギー性鼻炎マウスモデルにおける低用量BPAの影響評価については、BPA単独投与群の鼻洗浄液(NCLF)中の総細胞数は図(2)-3)-3に示すように増加が認められなかった。OVA単独群では総細胞数が増加したが、OVA+BPA群では総細胞数の増加は認められず、むしろBPAを添加することによって低下傾向を示した(図(2)-3)-3)。またOVA+BPA群のNCLF中の炎症性サイトカインIL-6、EotaxinやKCはOVA単独群と変わらなかった。鼻の病理学的観察でもOVA+BPA群の鼻粘膜下の好酸球性炎症はOVA単独群に比較して低減していた。一方、血清中のOVA特異的-IgE抗体は検出されなかった。OVA特異的-IgG1抗体産生はBPAの0.02 $\mu$ gと0.2 $\mu$ g群で濃度依存的に増加したが、2 $\mu$ gでは0.2 $\mu$ gよりも低下する傾向を示した(図(2)-3)-4)。Ex vivo実験において、BPAの2 $\mu$ g群ではConAやLPS刺激による脾細胞の増殖反応が高められた(図(2)-3)-5)。一方、OVA添加群ではConAやLPS刺激によってBPA濃度依存的に増殖反応が低下する傾向を示した。以上の結果から、総細胞に増加が見られないことから、低用量のBPAはアレルギー炎症を高める作用がないことが示唆された。しかし、OVA特異的-IgG1抗体産生がBPAの低用量で濃度依存的に増加したことから、IgG1産生に対してはアジュバント作用があることが示された。Ex vivo実験でのConAやLPS刺激における2 $\mu$ g BPA群の脾細胞増殖反応の増加やOVA+BPA群における増

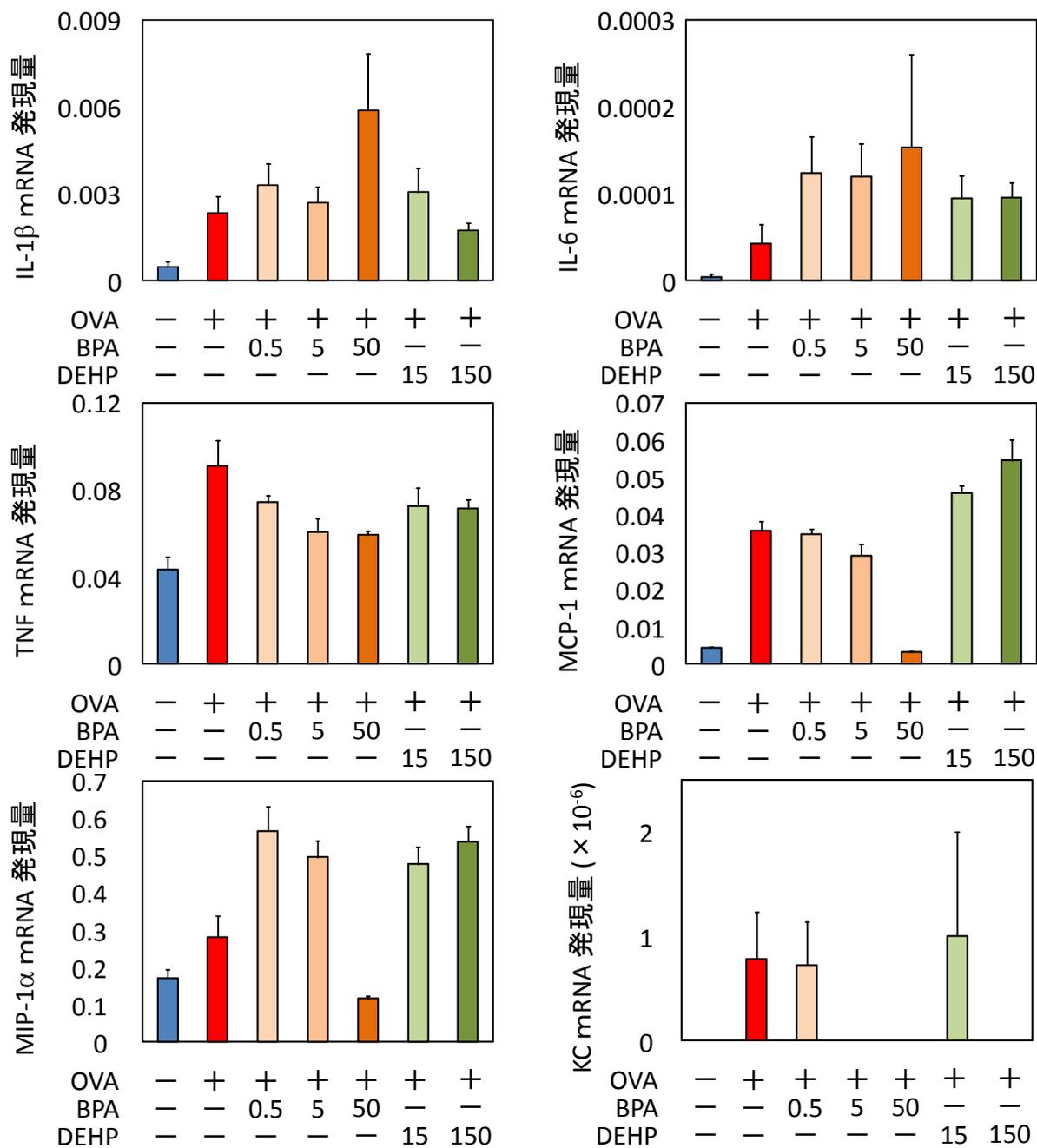
殖反応の低下は、2次刺激によって脾細胞が何らかの影響（リンパ球の活性化、アポトーシスや老化の促進）を受けている可能性が推察された。

OVAを用いたアレルギー性鼻炎マウスモデルによるDEHPの影響評価については、DEHP添加群の鼻洗浄液中の好中球数は投与量に依存して増加傾向を示し、DEHPの投与量の最も多い3.2 $\mu$ g投与群では対照群と比較して有意な増加を示した（図(2)-3)-6）。アレルギー炎症指標の好酸球数はDEHP投与によって増加傾向を示し、0.16 $\mu$ g投与群では対照群と比較して有意な増加を示した。しかしOVA群との間に有意差はなかった。鼻洗浄液中のサイトカイン/ケモカイン（表(2)-3)-3）のうちIL-6, Eotaxin, KCがOVA投与によって増加傾向を示し、OVA+DEHP投与群（0.008 $\mu$ g, 0.16 $\mu$ g, 3.2 $\mu$ g）ではIL-13, EotaxinとKCが対照群に比較して有意に増加し、IL-13はOVA単独群と比較しても有意に増加していた。

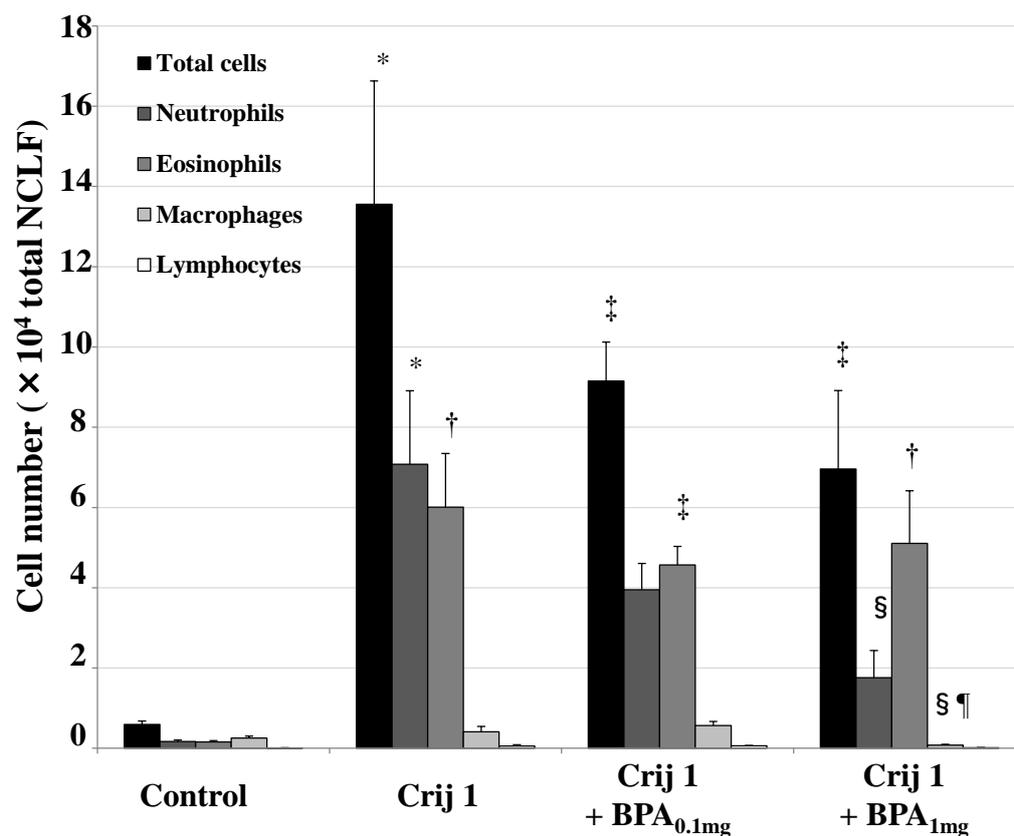
鼻組織ではOVA投与によってIL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-13, Eotaxin, KC, MCP-1, MCP-3やMIP-1 $\alpha$ に増加傾向が認められたものの有意差を示すには至らなかった（データ示さず）。OVA+DEHP投与群のうち対照群との間に有意差を示したものはDEHP（0.008 $\mu$ g）投与群のIL-6とKCであったが、OVA群との有意差は示さなかった。鼻粘膜の病理組織変化として、OVA単独投与群では鼻粘膜上皮細胞の増生と丈の延長、粘膜下組織には好酸球の浸潤が認められた（図(2)-3)-7）。OVA+DEHP（0.0004 $\mu$ g, 0.008 $\mu$ g, 0.16 $\mu$ g, 3.2 $\mu$ g）投与群では総じてこれらの変化がOVA単独群より強く見られ、特に3.2 $\mu$ g投与群では粘膜下組織への好酸球の浸潤が強い傾向にあった（図(2)-3)-7F）。粘液細胞の増生はOVAやOVA+DEHP投与によって若干増加が認められるが著しい変化ではなかった。以上の結果から、DEHPは環境中で曝露される低濃度レベルであっても炎症性サイトカイン発現を高めてアレルギー性鼻炎を悪化させる可能性が示唆された。

OVAを用いたアレルギー性鼻炎マウスモデルにおける低用量ベンツ（a）ピレン（BaP）の影響評価については、BaP0.1 $\mu$ g群とBaP10 $\mu$ g群の鼻洗浄液中の炎症細胞数は対照群と変わらなかった（図(2)-3)-8）。OVA群では好中球数と好酸球数が増加し、対照群との間に有意差を示しアレルギー性鼻炎が惹起していることが示唆された。OVA+BaP0.1 $\mu$ g群ではOVA群よりもそれらの炎症細胞数は低下する傾向を示したが、OVA+BaP10 $\mu$ g群では総細胞数、好中球数やリンパ球数が増加する傾向を示した。一方、OVA群の鼻洗浄液中のサイトカイン/ケモカインのIL-6とKCは対照群と比較すると増加傾向を示し（図(2)-3)-9）、OVA+BaP0.1 $\mu$ g群とOVA+BaP10 $\mu$ g群では量-依存的に増加し、対照群との間に有意差を示した。またOVA+BaP10 $\mu$ g群のIL-6はOVA群との間でも有意差を示した。OVA群のEotaxinは対照群と比較して有意に増加したが、OVA+BaP0.1 $\mu$ g群はOVA群と変わらず、OVA+BaP10 $\mu$ g群ではむしろ低下する傾向を示した。Th2サイトカインのIL-13は検出限界に近い値でOVAやBaP投与による影響は認められなかった。鼻組織の病理的な観察でも、OVA+BaP10 $\mu$ g群ではOVA群に比較して鼻粘膜の浮腫性変化と鼻粘膜下への好酸球浸潤が強いことが確認された。一方、OVA群の血清中のOVA-特異的IgG1とIgE抗体は対照群よりも有意に増加したが、併用群ではBaPを加えたことによる影響は認められなかった。

以上の結果から、少なくともBaP10 $\mu$ g群ではアレルギー性鼻が亢進していることが示唆されたが、IgEやIgG1抗体産生に関してはBaPの腹腔内投与による影響は無いものと考えられた。



図(2)-3)-1. RAW264.7細胞を用いた炎症性サイトカイン遺伝子スクリーニング系におけるビスフェノールA (BPA) とフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) の影響



図(2)-3)-2. BPAを投与したマウスの鼻洗浄液中の炎症細胞の変化

値は平均値± SEM. \* p < 0.001 vs. Control ; † p < 0.01 vs. Control;

‡ p < 0.05 vs. Control ; § p < 0.05 vs. Crij1; ¶ p < 0.01 vs. Crij1

+ BPA<sub>0.1</sub>

表(2)-3)-1 BPAを投与したスギ花粉症モデルマウスの鼻洗浄液中のサイトカイン発現

Group	Animals(n)	Cytokines (pg protein/total NCLF)				
		IL-1β	IL-5	IL-6	IL-13	IFN-γ
Control	6	0.60±0.38	0	33.4±14.9	0.39±0.37	0
Crij 1	6	197±53.5*	0.73±0.58	248±29.5*	2.70±1.70	0
Crij 1 + BPA <sub>0.1</sub> mg	6	77.5±7.39‡	0.90±0.90	260±30.0*	0.30±0.30	0
Crij 1 + BPA <sub>1</sub> mg	6	56±13.1†	0	142±37.9§	0	0

値は平均値± SEM示す。

\* p < 0.001 versus Control ; † p < 0.01 versus Crij 1 ; ‡ p < 0.05 versus Crij 1 ;

§ p < 0.05 versus Crij 1+BPA<sub>0.1</sub>

表(2)-3)-2. BPAを投与したスギ花粉症モデルマウスの鼻洗浄液中のケモカイン発現

Group	Animals(n)	Chemokines (pg protein/total NCLF)					
		Eotaxin	KC	MCP-1	MCP-3	MIP-1 $\alpha$	TNF- $\alpha$
Control	6	0	16.6 $\pm$ 5.22	3.68 $\pm$ 0.11	0	0	8.72 $\pm$ 1.48
Crij 1	6	0	252 $\pm$ 19.5	4.01 $\pm$ 0.22	0	8.68 $\pm$ 6.67*	11.4 $\pm$ 1.63
Crij 1 + BPA <sub>0.1mg</sub>	6	0	205 $\pm$ 16.0	4.03 $\pm$ 0.20	0	5.79 $\pm$ 0.96	13.3 $\pm$ 1.68
Crij 1 + BPA <sub>1mg</sub>	6	0	126 $\pm$ 23.4 <sup>†</sup>	4.02 $\pm$ 0.17	0	3.99 $\pm$ 1.50	7.51 $\pm$ 0.47 <sup>†</sup>

値は平均値 $\pm$  SEM示す。

\* p < 0.05 versus Crij 1 ; <sup>†</sup>p < 0.05 versus Crij 1+BPA<sub>0.1</sub>

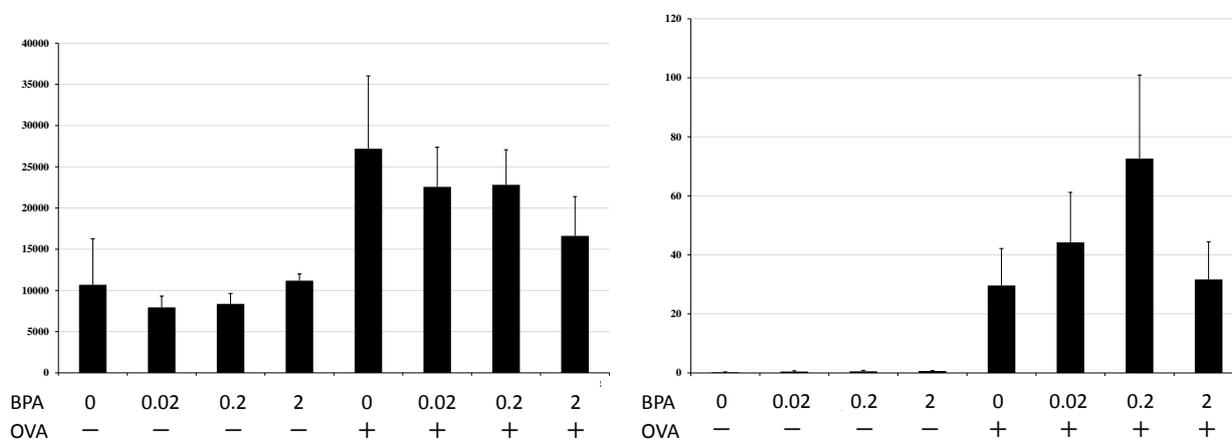


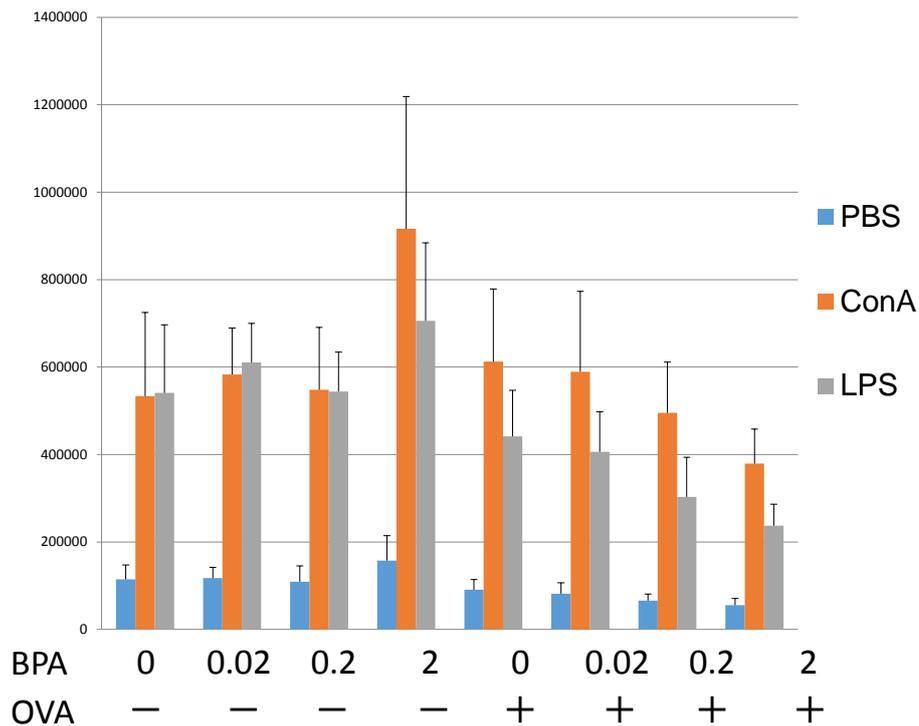
図 (2)-3)-3.(左図)

鼻洗浄液中の総細胞数の変化値は平均値 $\pm$  SEで示す。

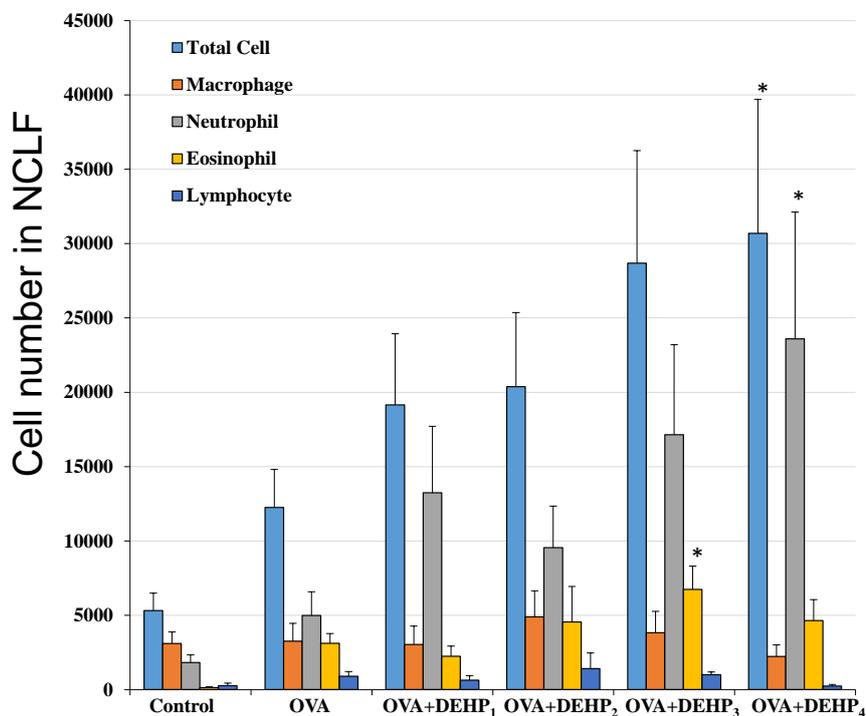
図 (2)-3)-4.(右図)

血清中の抗原特異的-IgG1産生量値は平均値 $\pm$  SEで示す。

\* p < 0.05 vs. Cont; <sup>†</sup>p < 0.05 vs. BPA0.2



図(2)-3)-5. 脾臓リンパ球の増殖反応  
値は平均値±SEで示す。

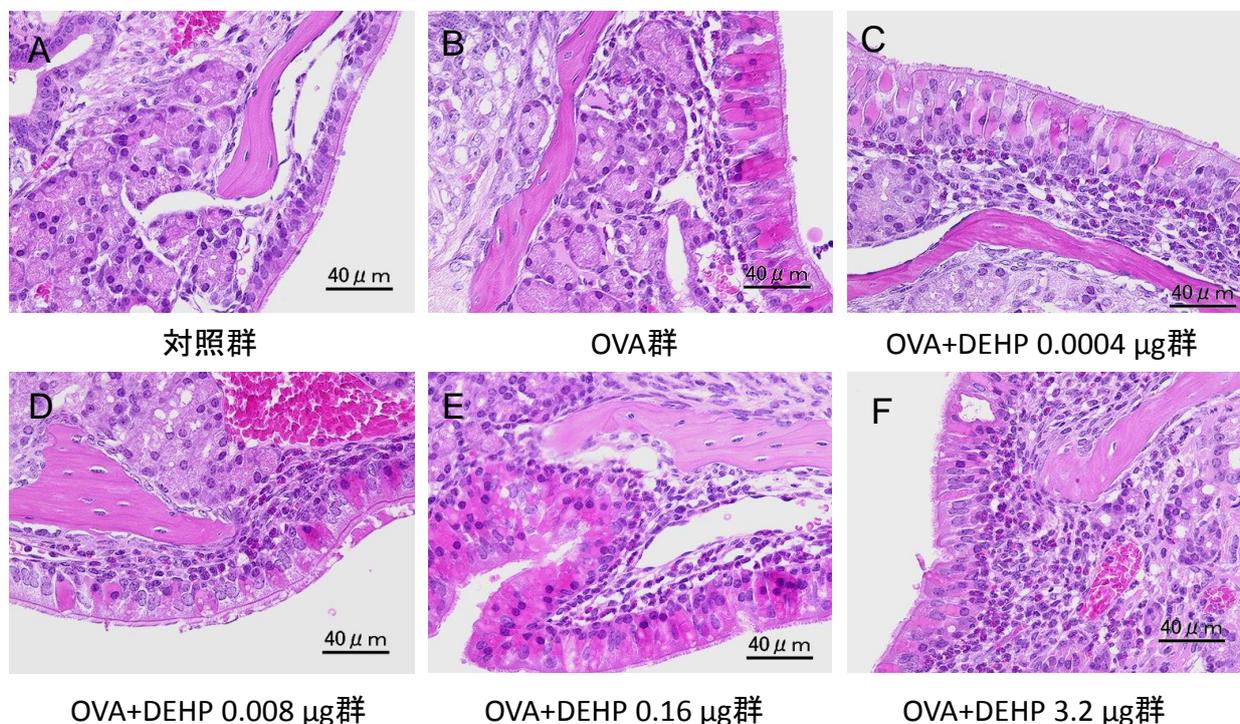


図(2)-3)-6. 卵白アルブミン(OVA)とDEHPを点鼻投与したマウスの  
鼻洗浄液中の炎症細胞の変化  
値は平均値±SEで示す。\*p < 0.05 vs. Control.

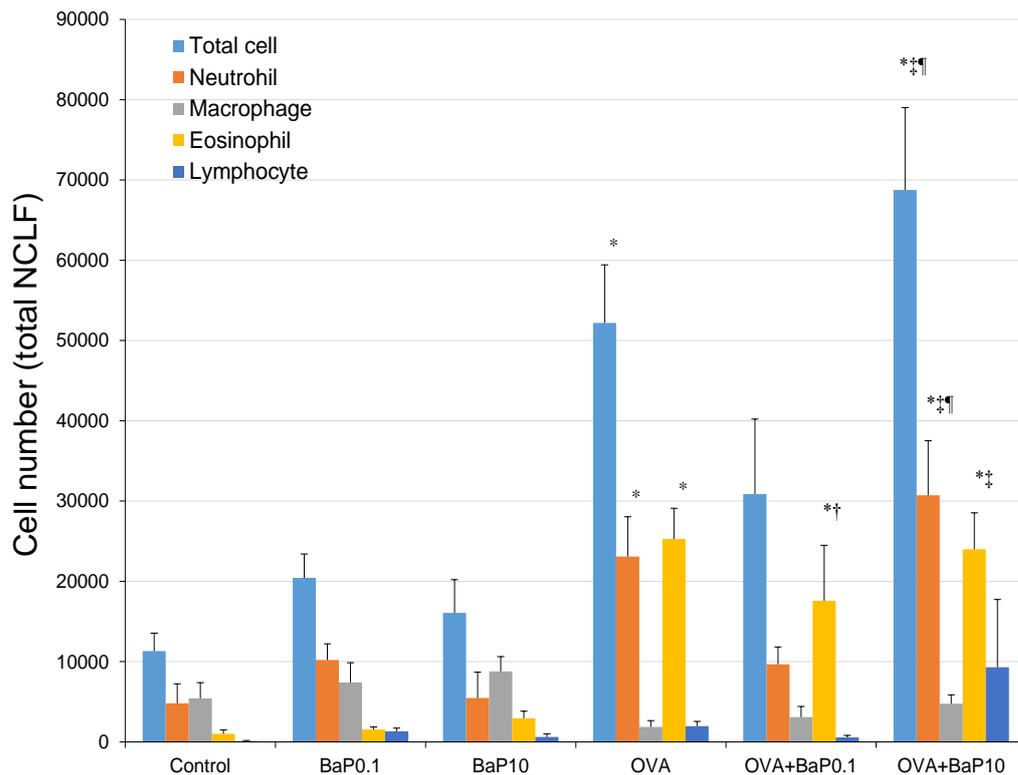
表(2)-3-3. 鼻洗浄液中の炎症性サイトカイン・ケモカインの変化

Group *	Animals (n)	Cytokines and chemokines (pg protein/ml)							
		IL-1 $\beta$	IL-5	IL-6	IL-13	IL-33	Eotaxin	KC	MCP-1
Control	8	ND	ND	36.3 $\pm$ 6.95	ND	ND	2.58 $\pm$ 0.82	22.9 $\pm$ 2.60	ND
OVA	8	ND	ND	96.8 $\pm$ 30.2	ND	ND	12.7 $\pm$ 3.19	39.1 $\pm$ 2.46	ND
OVA + DEHP <sub>1</sub>	8	ND	ND	63.8 $\pm$ 16.3	ND	ND	7.44 $\pm$ 2.73	36.4 $\pm$ 4.39	ND
OVA + DEHP <sub>2</sub>	8	ND	ND	128 $\pm$ 42.6	5.15 $\pm$ 0.43 <sup>†</sup>	ND	9.78 $\pm$ 3.19	44.9 $\pm$ 4.12 <sup>†</sup>	ND
OVA + DEHP <sub>3</sub>	8	ND	ND	113 $\pm$ 41.6	5.31 $\pm$ 0.52 <sup>†</sup>	ND	11.9 $\pm$ 2.45	48.4 $\pm$ 8.07 <sup>‡</sup>	ND
OVA + DEHP <sub>4</sub>	8	ND	ND	90.3 $\pm$ 22.8	5.09 $\pm$ 0.40 <sup>†</sup>	ND	20.5 $\pm$ 3.30 <sup>‡</sup>	42.7 $\pm$ 4.58	ND

\*Control: saline; OVA: OVA (50 $\mu$ g); OVA+DEHP1: OVA (50 $\mu$ g) + DEHP (0.0004 $\mu$ g); OVA+DEHP2: OVA (50 $\mu$ g) + DEHP (0.008 $\mu$ g); OVA+DEHP3: OVA (50 $\mu$ g) + DEHP (0.16 $\mu$ g); OVA+DEHP4: OVA (50 $\mu$ g) + DEHP (3.2 $\mu$ g). \*All values were expressed as mean  $\pm$  SE. <sup>†</sup>p < 0.05 vs. Control; <sup>‡</sup>p < 0.01 vs. Control; <sup>§</sup>p < 0.001 vs. Control; <sup>¶</sup>p < 0.001 vs. OVA.



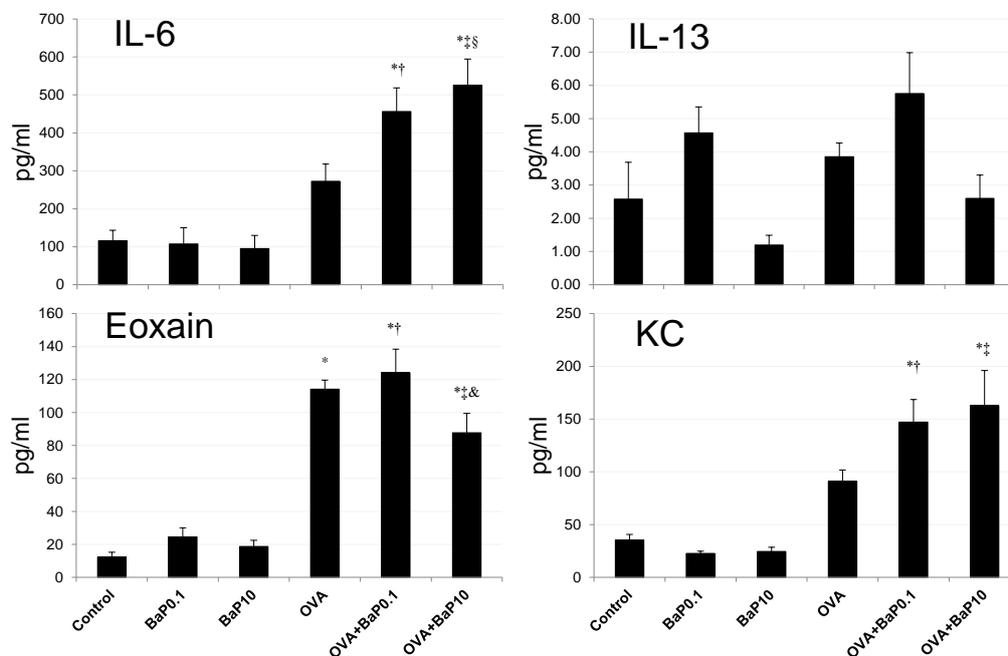
図(2)-3-7. OVA+DEHPを点鼻投与したマウスの鼻粘膜下の好酸球浸潤  
鼻粘膜下への著しい好酸球浸潤を示す (F)。HE 染色



図(2)-3)-8. 鼻洗浄液中の炎症細胞の変化. データは  $M \pm SE$  ( $n=8$ )で示す.

\*  $p < 0.05$  vs. Control, †  $p < 0.05$  vs. BaP0.1,

‡  $p < 0.05$  vs. BaP10, ††  $p < 0.01$  vs. OVA+BaP0.1.



図(2)-3)-9 鼻洗浄液中のサイカイン, ケモカインの変化

\*  $p < 0.05$  vs. control; †  $p < 0.05$  vs. BaP0.1; ‡  $p < 0.05$  vs. BaP10;

§  $p < 0.05$  vs. OVA; &  $p < 0.05$  vs. OVA + BaP0.1

#### 4) 環境化学物質のアレルギー性疾患増悪影響に対するスクリーニング手法の開発

本研究では、平成22年度にDEHPとDINPを対象として、平成23年度にはBaPとBPAを対象として、*in vitro*曝露が樹状細胞の遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。平成24年度には、DEHPとDINPを対象とし、*in vitro*曝露による樹状細胞サブセットの変化とアレルギー性喘息モデルマウスを用いた若齢期曝露が免疫担当細胞の構成や機能に及ぼす影響について検討した。最終年度の平成25年には、BaPとBPAを対象として平成24年度と同様の検討を行い、加えて、BaPの乳児期曝露が免疫担当細胞の構成や機能に及ぼす影響についても検討した。

まず、環境化学物質の*in vitro*曝露が樹状細胞に及ぼす影響については、BMDCの包括的遺伝子発現解析においては、DEHPおよびDINP、BaPの曝露により、BMDCのサイトカインやサイトカイン受容体、シグナル伝達系因子、細胞外基質、細胞分化・増殖やアポトーシスに関連する因子などの遺伝子の発現が増加することを明らかにし、共通して変動する遺伝子の存在も見出した。これらの環境化学物質は、先行研究において、BMDCの活性化を示す細胞表面分子の発現を増加することも確認している。一方、BPAの曝露による遺伝子発現の変動は非常に少なく、6時間曝露による顕著な遺伝子発現の変動は、FOS遺伝子の発現増加のみであった。24時間曝露においては、いくつかの防御系因子の遺伝子発現増加が観察されたが、IL1RAP [IL-1 receptor accessory protein]やIL13RA1 [IL13 receptor, alpha 1]、CD69等の免疫応答に関わる遺伝子の発現低下も観察された。BPAは、BMDCの活性化を示す細胞表面分子の発現への影響も少なかったことから、抗原提示細胞への直接的な修飾作用は弱い可能性が示唆された。これらの結果を、表(2)-4)-1にまとめた。

代表例として、BaPの結果について述べる。BaP曝露により発現が変動した遺伝子数は24時間よりも6時間の曝露の方が多く、サイトカインやサイトカイン受容体、転写因子、リン酸化・脱リン酸化酵素、細胞外基質、細胞分化・増殖やアポトーシス、ストレス応答に関連する因子等の遺伝子の変動が観察された。中には、6時間と24時間両方で発現増加が観察された遺伝子 (CD93、CCL7 [chemokine (C-C motif) ligand 7]、CCL12、CXCL10 [chemokine (C-X-C motif) ligand 10]、IIGP1 [interferon inducible GTPase 1]、IFIT1, 2, 3 [interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1, 2, 3]、IFIH1 [interferon induced with helicase C domain 1]、IRF7 [interferon regulatory factor 7]、RSAD2 [radical S-adenosyl methionine domain containing 2]、CYP1B1 [cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1] 等) もあった。また、BaP曝露とDEHPまたはDINP曝露に共通して発現増加した遺伝子 (IL6やIL12RB1 [IL-12 receptor, beta 1]、IL13RA1 [IL-13 receptor, alpha 1]、CXCL10 [C-X-C motif chemokine 10]、CCR2 [chemokine (C-C motif) receptor-like 2]、TLR7 [toll-like receptor 7]、SERPINB2 [serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 2]、MMP14 [matrix metalloproteinase-14]、RSAD2等) も観察された。

BaPの6、24時間曝露とDEHPの6時間曝露で増加を示したRSAD2は、感染防御などに重要な役割を果たす抗ウイルスタンパクであり、樹状細胞サブセットのpDCにおいてTLR7/9の刺激によりIRF7依存的に強く発現誘導され、I型インターフェロンの産生を誘導することが知られている。加えて、RSAD2と関連性のあるCXCL10 (IP-10, interferon gamma inducible protein 10としても知られている) やIFIT1、IRF7等もまた、BaP曝露で遺伝子発現が増加することが明らかとなった。また、IL-12RB1、TLR7、SERPINB2遺伝子は、BaPとDEHP、DINPいずれの6時間曝露においても発現増加が観察された。一方、BaPの6時間曝露では、Th2応答の調節に関わるIDO1 [indoleamine 2,3-dioxygenase 1] やCCR2、早期活性化マーカー分子のCD69、抗原提示に関わる補助刺激分子の

CD86遺伝子等の発現増加に加え、喫煙との関連が示唆されているセルサイクルに重要な転写因子のBBX [bobby sox homolog] 遺伝子の発現増加といった特徴的な変化も観察された。タバコ煙にはBaPが含まれていることから、喫煙とBBXの関連性にはBaPが寄与している可能性も示唆された。さらに、フタル酸エステルと同様にBaPは、BMDCの活性化を示す細胞表面分子の発現等をタンパクレベルでも増加することも確認している。

以上より、フタル酸エステルとBaPは、樹状細胞を刺激し、免疫・炎症反応や防御機構等に関わる因子を修飾すること、加えて特徴的な遺伝子変動の存在も示された。BMDCの包括的遺伝子発現解析の結果は、表(2)-4-1に示した。

包括的遺伝子発現解析の結果から、pDCに関連する因子の変動が認められたことから、環境化学物質が樹状細胞サブセット (pDCおよびcDC) に及ぼす影響について解析を進めた。これまでに、アレルギー性喘息において、pDC (CD11c+PDCA-1+) は抗炎症作用を、cDC (CD11c+PDCA-1-) は炎症亢進作用を示すことが報告されている<sup>4)</sup>。解析の結果、GM-CSFとFlt3Lで分化誘導したBMDCに対しては、BaP曝露によりpDCが増加しcDCが減少したが (図(2)-4-1a)、DEHPとDINP、BPA曝露による影響は観察されなかった。GM-CSFで分化誘導したBMDCに対しては、BaP曝露によりpDCが増加しcDCが減少、DEHP曝露によりpDCが増加、BPA曝露によりpDCが低下したが、DINP曝露による影響は認められなかった。一方、GM-CSFによるBMDCの分化誘導過程に及ぼす影響 (すなわち樹状細胞の前駆細胞に及ぼす影響) においては、BaP曝露によりcDCが減少したが (図(2)-4-1b)、DEHP (図(2)-4-1c) およびDINP (図(2)-4-1d)、BPA (図(2)-4-1e) 曝露により、cDCの有意な増加が観察された。

以上の結果より、培養条件による影響の差異もあるが、フタル酸エステルとBPAは、樹状細胞の前駆細胞に作用してcDCの分化を促進する可能性があり、BaPは、pDCを促進し、cDCを抑制する可能性が示唆された。

一方、環境化学物質がアレルギー性喘息モデルマウスの免疫担当細胞に及ぼす影響について検討した。

#### 【BaPの若齢期曝露における解析】

LNCの総細胞数は、Vehicle群に対してOVA群で有意に増加し、OVA+BaP群でさらに増加する傾向であった (図(2)-4-2a)。LNCの細胞増殖能は、用量依存性はなかったが、OVA群に対し、OVA+BaP群で増加する傾向がみられた。また、OVA群に対し、OVA+BaP中用量および高用量群で、LNC中のMHC class II<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>細胞 (活性化抗原提示細胞) の割合の有意な増加および細胞数の増加傾向が認められたことから、抗原提示細胞を活性化する可能性が示唆された。DCサブセットに大きな変化はなかったが、cDCの割合は、OVA群に対してOVA+BaP群でむしろ減少する傾向であり、pDCおよびcDCの細胞数は、いずれも増加する傾向であった。BaPは、樹状細胞以外の抗原提示細胞を活性化する可能性があるが、*in vitro*の結果も含め、樹状細胞に対しては、pDCを促進してアレルギー反応を抑制する方向に作用している可能性も示唆された。

#### 【フタル酸エステルの若齢期曝露における解析】

LNCの総細胞数は、OVA群に対し、OVA+DEHP群で減少傾向、OVA+DINP群で増加傾向であった (図(2)-4-2b, c)。また、OVA群に対し、OVA+DINP高用量群で、LNC中のMHC class II<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>細胞 (図(2)-4-2d) やcDC (図(2)-4-2e) の割合の有意な増加、LNCの細胞増殖 (図(2)-4-2f)、IL-4、IL-5産生の増加傾向が観察された。一方、DEHPは、樹状細胞の活性化を抑制する可能性が示唆さ

れた。フタル酸エステルにおいては、骨髄細胞に及ぼす影響についても検討した。その結果、総骨髄細胞数は、OVA+DINP群で増加する傾向であったが、有意な変化は認められなかった。一方、この骨髄細胞からGM-CSFで分化誘導したBMDCは、OVA群でpDCの割合が有意に増加したが、その増加はDEHPまたはDINPの曝露を加えることで低下する傾向であった。また、一部の曝露条件で、cDCが増加した。さらに、Flt3Lで分化誘導したBMDCにおいては、OVA群での変化は認められなかったが、OVA+DINP高用量群は、pDCの割合を低下したが、MHC class II<sup>+</sup>細胞の割合およびMDCとIL-12p40産生を増加する傾向が観察された。以上の結果から、喘息モデルマウスにおけるDEHPの樹状細胞への影響は総じて軽微であったが、DINPは、*in vitro*の結果も含め、樹状細胞の前駆細胞に作用して活性化cDCの増加あるいは局所リンパ節への移行を促している可能性が示唆された。

#### 【BPAの若齢期曝露における解析】

LNCの総細胞数は、Vehicle群に対し、BPA中用量とBPA高用量、OVA、OVA+BPA高用量群で増加傾向、OVA+BPA低用量および中用量群では有意に増加した。また、OVA+BPA中用量群は、OVA群に対しても有意な増加を認めた（図(2)-4)-3a）。さらに、OVA群に対し、OVA+BPA低用量および中用量群では、活性化抗原提示細胞やcDC、T細胞（TCR<sup>+</sup>細胞）の数が増加する傾向であったが、OVA+BPA高用量群では有意に低下した。OVA再刺激下における培養後のLNCの細胞増殖は、OVA群に対し、OVA+BPA低用量群でのみ増加傾向がみられた。また、OVA群に対し、特にOVA+BPA低用量群でIFN- $\gamma$ 、IL-4（図(2)-4)-3b）、IL-5（図(2)-4)-3c）、SDF-1 $\alpha$ の産生が有意に増加または増加する傾向が観察された。OVA+BPA群で観察されたLNCの総細胞数や活性化抗原提示細胞数、サイトカイン産生の増加は、肺局所での炎症病態と並行する結果であった。

#### 【BaPの乳児期曝露における解析】

雄のLNCの総細胞数は、Vehicle群に対し、BaP中用量とBaP高用量群で増加傾向、OVAとOVA+BaP群で有意な増加を認めた。また、OVA群に対し、OVA+BaP低用量群で有意な増加を示した（図(2)-4)-4a）。細胞表面分子の解析では、Vehicle群に対しBaP高用量群で、OVA群に対しOVA+BaP低用量および中用量群で、活性化抗原提示細胞、活性化T細胞（TCR<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>細胞）の数が増加または増加する傾向がみられた。OVA再刺激下で45時間培養したLNCは、細胞増殖に顕著な変化は認められなかったが（図(2)-4)-4c）、OVA群に対し、OVA+BaP低用量および中用量群でIL-4産生が増加する傾向であった（図(2)-4)-4b）。

雌のLNCの総細胞数は、Vehicle群に対し、OVAとOVA+BaP群で有意な増加を認め、OVA群に対し、OVA+BaP群で増加傾向を示した（図(2)-4)-4d）。また、細胞生存率が、Vehicle群に対し、OVA+BaP高用量群で有意に低下した。細胞表面分子の解析では、Vehicle群に対しBaP高用量群で、OVA群に対しOVA+BaP群で、cDCサブセットや活性化抗原提示細胞、T細胞の数が増加または増加する傾向がみられた。Vehicle群に対してBaP高用量群では、活性化T細胞も有意に増加した。OVA再刺激下で45時間培養したLNCは、OVA群に対し、OVA+BaP中用量群で、IFN- $\gamma$ とIL-4（図(2)-4)-4e）、IL-5産生の増加傾向および細胞増殖（図(2)-4)-4f）の有意な増加を認めた。

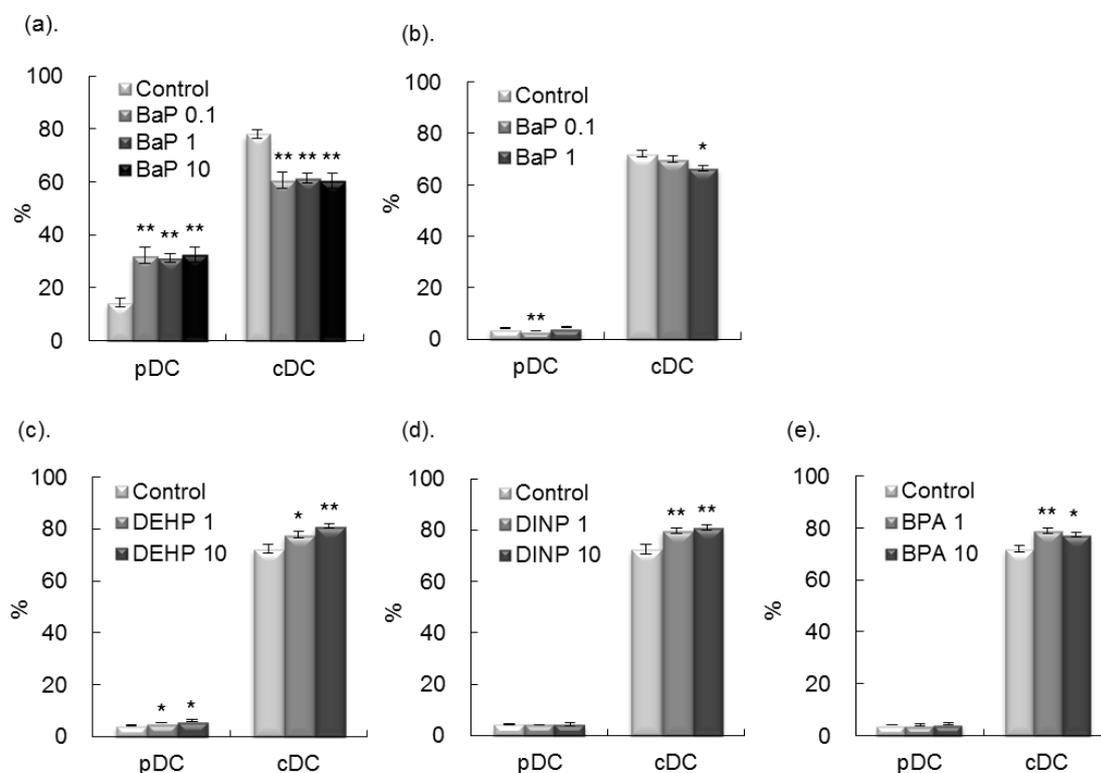
BaPの乳児期曝露の影響には、性差の存在も示唆されたが、雌雄ともに、肺局所での炎症反応に並行して、OVA+BaP群でLNCの総細胞数、活性化抗原提示細胞数、サイトカイン産生の増加が観察された。

以上の結果を、表(2)-4)-2、(2)-4)-3にまとめた。総じて、本研究で観察された環境化学物質の若齢期曝露および乳児期曝露による免疫担当細胞への影響は、肺局所での炎症病態と並行する結果

であり、環境化学物質が所属リンパ節における樹状細胞等の抗原提示細胞の活性化を促すことでTh2反応を亢進し、喘息病態の悪化に寄与している可能性が示された。また、*in vitro*および*in vivo*曝露の研究成果から見出された抗原提示細胞の活性化マーカー分子は、*in vitro*スクリーニングにも有用であると考えられる。

表(2)-4)-1. 環境化学物質の*in vitro*曝露がBMDCの遺伝子発現に及ぼす影響

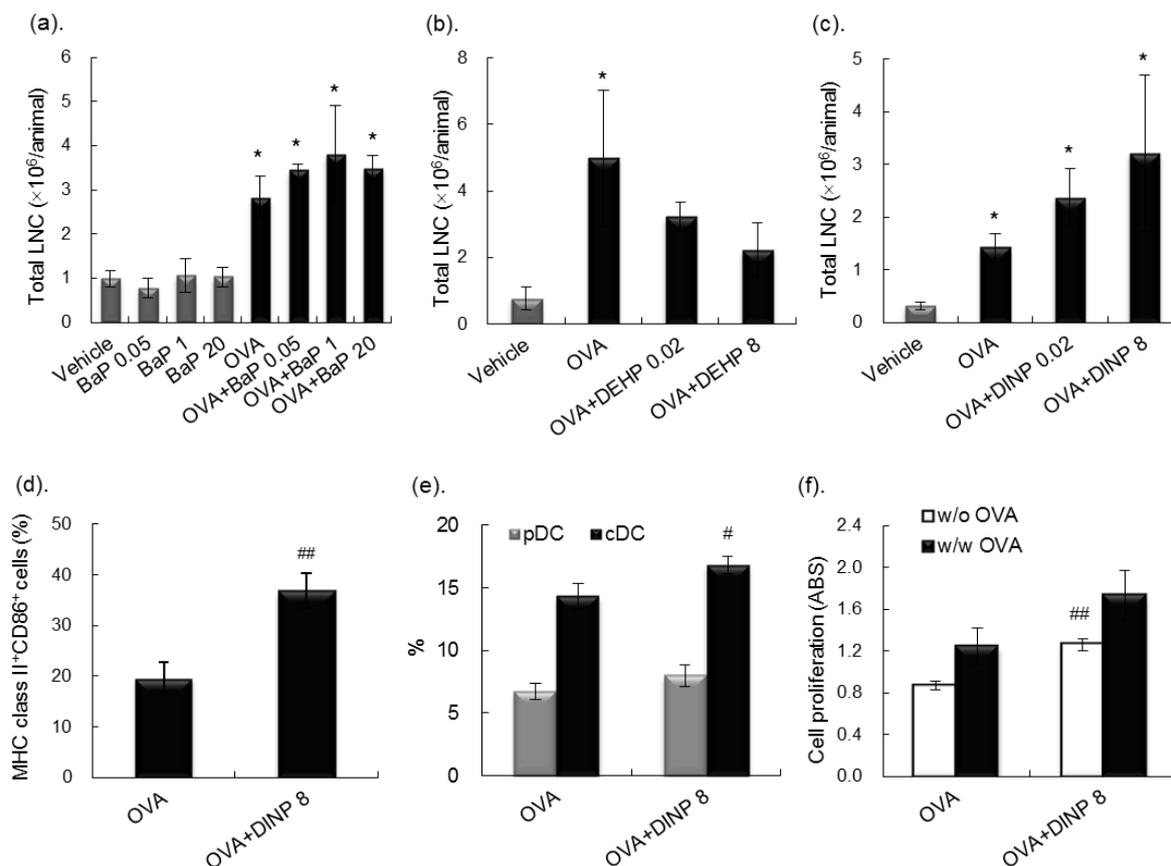
( <i>In vitro</i> exposure)	BaP	DEHP	DINP	BPA
<b>BMDC</b>				
- Gene expression				
- Gene numbers (AVE > 2.0-fold)	6 h (117), 24 h (26)	6 h (25), 24 h (15)	6 h (53), 24 h (27)	6 h (1), 24 h (49)
(AVE < 0.5-fold)	6 h (115), 24 h (5)	6 h (51), 24 h (32)	6 h (111), 24 h (48)	6 h (0), 24 h (3)
- Common change (Up-regulation)	Immune/inflammatory regulators; Cell defense-related factors e.g. IL-6, IL-6R, IL-12, IL-12R, IL-13R, CXCL10, CCR2, MMP-14, RSAD2, TLR7/9, IFIT1/2/3, IRF7			FOS
- Specific change (Up-regulation)	e.g. BBX, IDO1, IGTP, IIGP1, IFIH1, IFIT1,2,3, IRF7, GM14446, MPA2I	e.g. Al607873, IL-7, TRIP13, PPOX, ATG12		-



図(2)-4)-1 環境化学物質の*in vitro*曝露によるBMDCサブセットの変化

(a). GM-CSFとFlt3Lで分化誘導後、BaP (0.1-10  $\mu$ M) に24時間曝露したBMDCサブセット (pDC, CD11c<sup>+</sup>PDCA-1<sup>+</sup>; cDC, CD11c<sup>+</sup>PDCA-1<sup>-</sup>)、(b-e). 環境化学物質 (BaP: 0.1, 1  $\mu$ M; DEHP, DINP, BPA: 1, 10  $\mu$ M) とGM-CSFの存在下で6日間の培養により分化誘導したBMDCサブセット。

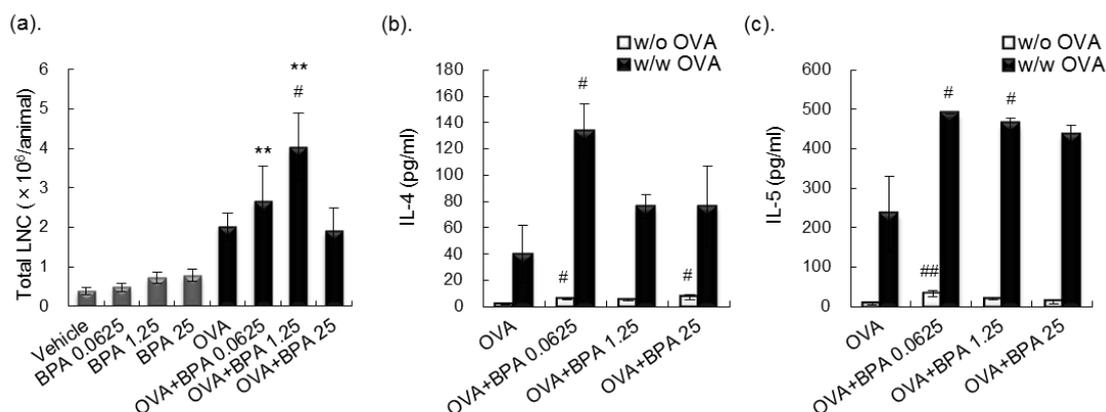
Data are the means  $\pm$  SEM of triplicate culture. \*, p<0.05, \*\*, p<0.01 vs. Control.



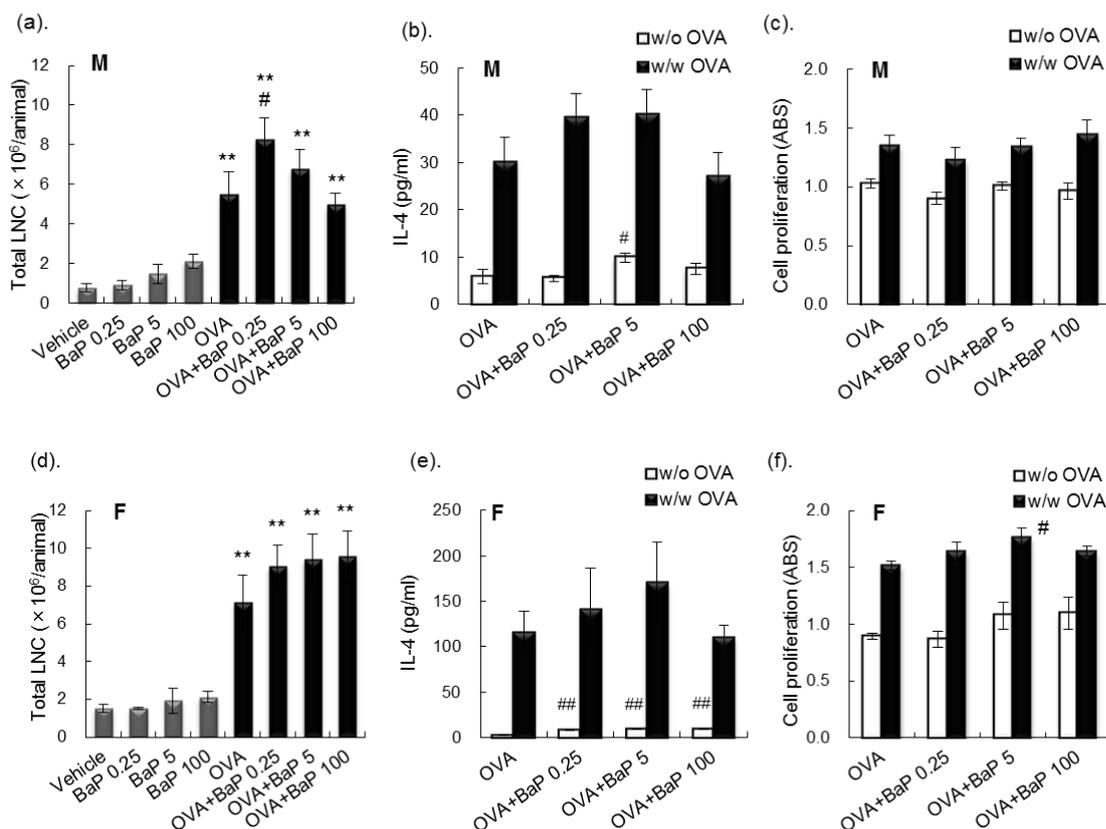
図(2)-4)-2 BaPおよびフタル酸エステルの若齢期曝露によるアレルギー性喘息モデルマウスの免疫担当細胞の変化

(a-c). LNCの総細胞数、(d). LNC中の活性化抗原提示細胞 (MHC class II<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>細胞) の割合、(e). LNC中の樹状細胞サブセット (pDC: CD11c<sup>+</sup>PDCA-1<sup>+</sup>; cDC; CD11c<sup>+</sup>PDCA-1<sup>-</sup>) の割合、(f). OVAの再刺激有無で3日間 (67時間) 培養したLNCの細胞増殖。

BaP: 0.05, 1, 20 pmol/body/week; DEHP, DINP: 0.02, 8 nmol/body/week. Data are the means  $\pm$  SEM of 4-8 animals per group. \*, p<0.05 vs. Vehicle group, #; p<0.05, ##; p<0.01 vs. OVA group.



図(2)-4-3 BPAの若齢期曝露によるアレルギー性喘息モデルマウスの免疫担当細胞の変化  
 (a). LNCの総細胞数、(b, c). OVAの再刺激有無で3日間 (66時間) 培養したLNCのサイトカイン産生。  
 BPA: 0.0625, 1.25, 25 nmol/body/week. Data are the means  $\pm$  SEM of 4-8 animals per group. \*\*:  $p < 0.01$   
 vs. Vehicle group, #:  $p < 0.05$ , ##:  $p < 0.01$  vs. OVA group.



図(2)-4-4 BaPの乳児期曝露によるアレルギー性喘息モデルマウスの免疫担当細胞の変化  
 (a, d). LNCの総細胞数、(b, e). OVAの再刺激有無で2日間 (45時間) 培養したLNCのIL-4産生、(c, f).  
 OVAの再刺激有無で2日間 (45時間) 培養したLNCの細胞増殖。  
 BaP: 0.25, 5, 100 pmol/body/week, M: male, F: female. Data are the means  $\pm$  SEM of 4-8 animals per  
 group. \*\*:  $p < 0.01$  vs. Vehicle group, #:  $p < 0.05$ , ##:  $p < 0.01$  vs. OVA group.

表(2)-4)-2. 環境化学物質の若齢期曝露が喘息モデルマウスの免疫担当細胞に及ぼす影響

<b>(In vivo exposure)</b> <b>Allergic asthma model</b>	<b>Exposure in childhood</b>			
	<b>BaP</b>	<b>DEHP</b>	<b>DINP</b>	<b>BPA</b>
<b>Bone marrow cells</b>				
- Numbers		↘	↗	
- BMDC by GM-CSF		pDC (%)↘	pDC (%)↘	
- BMDC by Flt3L	-	→	MHC II <sup>+</sup> (%)↗, pDC (%)↘ MDC, IL-12 production↗	-
<b>Mediastinal LNC</b>				
- Numbers	↗	↘	↗	↑
- Proliferation	↗	-	↗	↗
- Phenotypes				
(% of positive cells)	MHC II <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> ↑, cDC↘	→	MHC II <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> ↑, pDC↗, cDC ↑	MHC II <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> ↗, CD11c <sup>+</sup> ↗, cDC↗
(positive cell numbers)	MHC II <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> ↗, pDC, cDC↗	MHC II <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> ↓, pDC, cDC↘	MHC II <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> ↑, pDC↗, cDC↗	MHC II <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> ↗, CD11c <sup>+</sup> ↗
- Cytokine production	-	-	IL-4, IL-5 ↗	IL-4, IL-5, SDF-1α ↑, IFN-γ↗

↑ 増加、↓ 減少、↗ 増加傾向、↘ 減少傾向、→ 変化なし、- 未検討

表(2)-4)-3. BaPの乳児期曝露が喘息モデルマウスの免疫担当細胞に及ぼす影響

<b>(In vivo exposure)</b> <b>Allergic asthma model</b>	<b>Exposure in infancy</b>	
	<b>BaP</b>	
<b>Mediastinal LNC</b>	<b>M</b>	<b>F</b>
- Numbers	↑	↗
- Proliferation	→	↑
- Phenotypes		
(% of positive cells)	CD11c <sup>+</sup> ↓, cDC ↓	MHC II <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> ↗, CD11c <sup>+</sup> ↗, cDC↗
(positive cell numbers)	MHC II <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> ↗, CD11c <sup>+</sup> ↘, cDC↘	MHC II <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> ↗, CD11c <sup>+</sup> ↑, cDC ↑
- Cytokine production	IL-4, IL-5↗	IL-4, IL-5, IFN-γ↗

↑ 増加、↓ 減少、↗ 増加傾向、↘ 減少傾向、→ 変化なし

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

#### 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およびBPAの若齢期における低用量経気道曝露は、アレルギー性喘息を増悪すること、またそのメカニズムの一部を初めて明らかにした。DEHPおよびDINPは、アレルギー性喘息に対する影響は軽微である可能性を示した。BaPの乳児期曝露による仔のアレルギー性喘息への影響は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初めて指摘した。

#### 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、BPA、BaPの若齢期における低用量経口曝露およびDINPの母乳を介した乳児期曝露が、アトピー性皮膚炎を増悪することとそのメカニズムを初めて明らかにした。また、次世代影響と性差の存在も初めて指摘した。

#### 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

低用量のBPA曝露は炎症性分子の発現を*in vitro*で、OVA特異的抗体産生を*in vivo*で高め、アレルギー反応を増強する可能性があることを指摘した。DEHPの低用量経鼻曝露が、アレルギー性鼻炎を増悪することとそのメカニズムを初めて明らかにした。低用量のBaP曝露がアレルギー性鼻炎を悪化させることも示した。

#### 4) 環境化学物質のアレルギー性疾患増悪影響に対するスクリーニング手法の開発

BaP、DEHP、DINP、BPAを対象とし、*in vitro*および*in vivo*曝露による免疫担当細胞への影響を解析した結果、樹状細胞の炎症関連因子の発現増加やサブセットの変化、喘息モデルマウスにおける免疫担当細胞の構成・機能の変化が存在し、環境化学物質によるアレルギー増悪メカニズムにおいて重要であることを初めて示すことができた。また、*in vitro*スクリーニング(簡易評価系)に有用な分子や変化を確認した。

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が種々のアレルギー疾患を増悪しうること、(2)その発現メカニズム、(3)物質そのもののみならず、その曝露経路や病変の主座の相違によっても環境化学物質の増悪影響は異なること、(4)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、「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、*in vitro*簡易評価系により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)、小児期曝露、次世代影響存在の可能性を念頭に置き、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。

### (2) 環境政策への貢献

#### <行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

#### <行政が活用することが見込まれる成果>

##### 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およびBPAの小児期における少量経気道曝露が、アレルギー性喘息の増悪因子であることを

示した。また、BaPの少量曝露時の次世代影響（特に男児）も検討すべき事案であることを提案できた。

## 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、BPA、BaPの小児期における少量経口曝露、授乳によるDINP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（特に女児）も検討すべき事案であることを提案できた。

## 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、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。

## 4) 環境化学物質のアレルギー性疾患増悪影響に対するスクリーニング手法の開発

これまでの成果から見出されたアレルギー増悪影響を反映するバイオマーカーを利用したスクリーニング(簡易影響評価)系により、多種の物質の影響評価およびアレルギーを増悪しうる環境化学物質の探索が容易となり、化学物質規制対策への提言、影響の未然防止に貢献できる。

全体を通し、これまでも、また、今後も、

(1) 論文発表、学会発表、あるいは、市民を対象とした講演会やメディア等を通じ、成果の広報・普及に努める。

(2) 上記により、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、方向性の決定に役立てる。

(4) アレルギー増悪影響の簡易*in vitro*影響評価系を確立・普及し、アレルギー疾患を増悪しうる環境化学物質の探索を容易にする。また、複数のアレルギー疾患モデルを用いた*in vivo*における評価系をあわせた影響評価システムを構築し、増悪因子の特定に役立てる。ひいては、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) 現在進行中の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。なお、実際に、関連の調査では、既に、フタル酸エステル類とアレルギーの関係が疫学的に検討されつつある。

## 6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) TT. WIN-SHWE, R. YANAGISAWA, E. KOIKE, H. NITTA and H. TAKANO: J Appl Toxicol, 33, 1070-1078 (2013)

“Expression levels of neuroimmune biomarkers in hypothalamus of allergic mice after phthalate exposure.”

- 2) M. HE, K. INOUE, S. YOSHIDA, M. TANAKA, H. TAKANO, G. SUN and T. ICHINOSE:  
Immunopharmacol Immunotoxicol, 35, 3, 390-395 (2013)  
“Effects of airway exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate on allergic rhinitis”
- 3) K. SADAKANE, T. ICHINOSE, H. TAKANO, R. YANAGISAWA and E. KOIKE:  
Immunopharmacol Immunotoxicol, 36, 1, 61-69 (2014)  
“Effects of oral administration of di-(2-ethylhexyl) and diisononyl phthalates on atopic dermatitis in NC/Nga mice”
- 4) 定金香里、市瀬孝道、高野裕久、柳澤利枝、小池英子：日本職業・環境アレルギー学会誌（印刷中）  
「アトピー性皮膚炎モデルマウスに対するビスフェノールA経口曝露の影響」

#### <その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 高野裕久、小池英子、柳澤利枝：チャイルドヘルス、15、850-854（2012）  
「環境化学物質とアレルギー疾患」
- 2) 柳澤利枝：国立環境研究所ニュース、32、4、3-5（2013）  
「大気汚染物質を含む環境汚染物質が免疫・アレルギーに及ぼす影響とその作用機構の解明」
- 3) 本田晶子、柳澤利枝、小池英子、井上健一郎、高野裕久：アレルギーの臨床、33、8、18-22（2013）  
「環境化学物質とアレルギー」
- 4) 高野裕久：アレルギー、62、548-554、（2013）  
「環境ストレスとアレルギー」
- 3) 高野裕久：環境衛生工学研究、（印刷中）  
「環境汚染による生活環境病、生活習慣病の増悪・増加」
- 6) 本田晶子、上田佳代、高野裕久：日本予防医学会雑誌、（印刷中）  
「環境汚染物質とアレルギー」

#### （2）口頭発表（学会等）

- 1) 高野裕久：第15回ラテックスアレルギー研究会（2010）  
「化学物質とアレルギー」
- 2) 柳澤利枝、小池英子、高野裕久：第61回日本アレルギー学会秋季学術大会（2011）  
「ベンゾ[a]ピレン（BaP）の経気道曝露がアレルギー性気道炎症モデルに与える影響」
- 3) 市瀬孝道、賀 森、吉田成一：フォーラム2011 衛生薬学・環境トキシコロジー（2011）  
「化学物質が花粉症に与える影響」
- 4) E. KOIKE, R. YANAGISAWA and H. TAKANO: The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, Sendai, Japan, 2012  
“Immunological effects of phthalates and other chemicals in consumer products”
- 5) 柳澤 利枝、小池 英子、ウィンシュイ ティンティン、市瀬 孝道、高野 裕久：第19回日本免疫毒性学会学術大会（2012）  
「フタル酸エステル類の経気道曝露がアレルギー性喘息に及ぼす影響」

- 4) ウィンシュエイ ティンティン、柳澤利枝、小池英子、新田裕史、高野裕久：第19回日本免疫毒性学会学術大会 (2012)  
「アレルギー喘息モデルマウスにおけるフタル酸エステル類曝露が神経・免疫バイオマーカーの発現に及ぼす影響」
- 5) 定金香里、市瀬孝道、高野裕久、柳澤利枝、小池英子：第82回日本衛生学会学術総会 (2012)  
「アトピー性皮膚炎モデルマウスに対するフタル酸ジエチルヘキシル経口曝露の影響」
- 8) 高野裕久：2012年室内環境学会 第1回講演会 (2012)  
「室内、室外の環境汚染物質による生活環境病、生活習慣病の増悪とその軽減対策」
- 9) H. TAKANO: First Malaysian congress of toxicology, Kuala Lumpur, Malaysia, 2012 招待講演  
“Environmental pollution and allergic diseases”
- 10) 高野裕久：第62回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2012) 教育講演  
「環境ストレスとアレルギー」
- 11) 高野裕久：京都府立医科大学公開講座 (2013) 公開講座  
「環境要因と健康」
- 12) 高野裕久：愛知学院大学薬学部附属医療生命薬学研究所第1回サイエンスフォーラム (2013) 招待講演  
「環境汚染物質による生活環境病、生活習慣病の増悪とその軽減対策」
- 13) 定金香里、市瀬孝道、高野裕久、柳澤利枝、小池英子：第82回日本衛生学会学術総会 (2012)  
「アトピー性皮膚炎モデルマウスに対するフタル酸ジエチルヘキシル経口曝露の影響」
- 14) 定金香里、市瀬孝道、高野裕久、柳澤利枝、小池英子：第83回日本衛生学会学術総会 (2013)  
「アトピー性皮膚炎モデルマウスに対するフタル酸ジイソノニル経口曝露の影響」
- 15) 定金香里、市瀬孝道、高野裕久、柳澤利枝、小池英子：第44回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会 (2013) 「アトピー性皮膚炎モデルマウスに対するビスフェノールA経口曝露の影響」
- 16) 定金香里、市瀬孝道、高野裕久、柳澤利枝、小池英子：第63回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2013)  
「ベンゾ[a]ピレン低用量経口曝露によるアトピー性皮膚炎増悪作用」
- 17) 柳澤 利枝、小池 英子、ウィンシュエイ ティンティン、高野 裕久：第63回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2013)  
「ビスフェノールAの経気道曝露がアレルギー性気道炎症に及ぼす影響」
- 18) 小池英子：日本薬学会第133年会 (2013)  
「フタル酸エステル等の生活用品に含有される化学物質が免疫応答に与える影響」
- 19) 定金香里、高野裕久、柳澤利枝、小池英子、市瀬孝道：第45回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会 (2014)  
「アトピー性皮膚炎モデルマウスに対するフタル酸ジイソノニル経母乳曝露の影響」
- 20) 小池英子、柳澤利枝、高野裕久：第41回日本毒性学会学術年会 (2014)  
「環境化学物質による免疫応答の修飾 – アレルギーに及ぼす影響機序の解明に向けて –」 (アブストラクト提出済み)

**(3) 出願特許**

特に記載すべき事項はない。

**(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）**

特に記載すべき事項はない。

**(5) マスコミ等への公表・報道等**

1) 日刊工業新聞（2013年6月18日、全国版、23頁、「花粉症などアレルギー性疾患 骨髄由来細胞使い簡易判定 京大など新手法」）

**(6) その他**

特に記載すべき事項はない。

**8. 引用文献**

特に記載すべき事項はない。

## **Studies on Mechanisms by which Environmental Chemicals Affect Developing Nervous System and Immunological System**

Principal Investigator: Shinji FUSHIKI

Institution: Kyoto Prefectural University of Medicine  
Graduate School of Medical Science  
Kawaramachi Hirokoji Kajii-cho 465, Kamigyo-ku,  
Kyoto 602-8566, JAPAN  
Tel: +81-75-251-5849/ Fax: +81-75-251-5849  
E-mail: sfushiki@koto.kpu-m.ac.jp

Cooperated by: Kyoto University, National Institute for Environmental Studies, Oita University of Nursing and Health Sciences

[Abstract]

**Key Words:** Environmental chemicals, Bisphenol A, Brain development, Neurotransmitter, Behavioral abnormalities, Epigenome, Atopic dermatitis, Allergic asthma, Allergic rhinitis, Evaluation methods

The aim of subtheme 1 was to demonstrate the effects of exposure of bisphenol A (BPA) on the development and maturation of murine brain, employing histological, neurochemical, behavioral, and molecular biological techniques.

Offspring exposed continuously to bisphenol A during prenatal and lactational periods showed 1) abnormal cytoarchitecture of the cerebral cortex, 2) reversal of the physiological sex differences observed in the locus coeruleus, 3) abnormal social behavior, and 4) neurotransmitter concentration changes in several brain regions. Furthermore, 5) some genes showed epigenetic changes in DNA methylation in the cerebral cortex and blood, which remained long after cessation of the BPA exposure, and 6) epigenetic marks found in the cerebral cortex were maintained transgenerationally to the third generation.

The aims of subtheme 2 were to evaluate the effects of environmental chemicals on allergic diseases, including allergic asthma, atopic dermatitis and allergic rhinitis, to elucidate the underlying mechanisms of the related enhancing effects, and to develop evaluation methods for the enhancing effects of chemicals.

Specifically, (1) intratracheal exposure to BaP or BPA aggravated allergic asthma through the enhancement of Th2 responses in a murine model. In addition, maternal exposure to BaP during neonatal periods tended to enhance the allergic responses in offspring. (2) In animal models, oral exposure to DINP, BPA, or BaP at doses lower than the previously reported NOAEL tended to increase the allergic response via the activation

of inflammatory cells related to atopic dermatitis. In addition, maternal exposure to DINP during neonatal periods accelerated the infiltration of inflammatory cells into subcutaneous tissue in offspring. (3) Intranasal exposure to DEHP and intraperitoneal exposure to BaP possibly exacerbated OVA-induced allergic rhinitis. (4) Exposure to BaP, DEHP, DINP, or BPA affected the phenotypes of immune cells and the increased Th2 responses *in vivo* and/or *in vitro* that could be useful biomarkers for evaluation methods, suggesting that environmental chemicals may aggravate allergic diseases by modifying the differentiation/activation of immune cells, such as antigen-presenting cells.

In conclusion, these results on the effects of BPA on brain development, as well as the data and evaluation methods related to chemicals responsible for allergic disease enhancement, should be useful for new policy proposals concerning chemicals, allergy patient remedies, and the promotion of health nationwide. Furthermore, these results suggested environmental chemicals requiring priority evaluations for association with developmental brain disorders and allergies, and contributed to the epidemiological data for the Japan Eco & Child Study.