

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19251

研究課題名(和文) 臭素系難燃材の微量曝露が、アレルギー疾患に及ぼす影響の検討と防止対応の研究

研究課題名(英文) Physiological effects of brominated flame retardants on allergic disease, study for prevention

研究代表者

田中 満崇 (Tanaka, Michitaka)

京都大学・工学研究科・特定研究員

研究者番号：80647264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：臭素系難燃剤(BFRs)は様々な物質に使われているが、アレルギー増加の一環境要因の可能性への検討は未知である。そこでBFRsの微量曝露がアトピー性皮膚炎モデルマウスに及ぼす影響を評価した。NC/Ngaマウスの耳介腹側に、ダニ抗原(Dp)を複数回皮内投与し、BFRs(DE71/DE79)を複数回腹腔内に曝露した。その後、経時的に耳介厚と皮膚炎の重症度を評価し、末梢血や耳介局所中のタンパク質の定量を行った。Dp投与によりIgE抗体価は上昇し、BFRs曝露により悪化傾向を示した。また、耳介局所中の各種アレルギー関連因子についても同様の傾向を示し、特に、発症早期に症状を悪化させる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Brominated flame retardants (BFRs) are used as additive or reactive components in various materials. Regarding their health concerns, their immunotoxicity have not been clarified yet. In the current study, we examined the effects of systemic exposure to two types of BFRs, DE71 and DE79, on pathophysiologic traits of murine atopic dermatitis (AD). Male NC/Nga mice were repeatedly injected intraperitoneally with DE71 and DE79 and/or mite allergen into their right ears. Thereafter, clinical scores (macroscopic findings of inflammatory foci), Ig values in serum and allergy-related protein in extract were examined. Both DEs significantly aggravated clinical scores induced by mite allergen including skin dryness and edema. Total IgE titer was significantly greater in the Dp + DE79 group than in the Dp group. Taken together, exposure to BFRs can exacerbate AD-like skin lesions related to mite allergen in mice. Particularly, it was shown that worsen atopic dermatitis wear early stage.

研究分野：免疫応答

キーワード：アレルギー 臭素系難燃剤 微量曝露

## 1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患が急増し、人と社会に多大な損失をもたらしている。アレルギー疾患急増の主因は環境要因の急変が考えられ、衛生環境、食環境、住環境の変化と共に、環境汚染の問題が指摘されてきた。我々のグループは、いくつかの環境汚染物質(ディーゼル排気微粒子や含有化学物質、フタル酸エステル類、ナノ粒子等)がアレルギー疾患(気管支喘息、アトピー性皮膚炎等)を増悪することを実験的に明らかにしてきた。しかし、我々の周囲には、その他の汚染物質による健康リスクも広く潜在している。例えば、臭素系難燃材(Brominated flame retardants: BFRs)は、カーテンや電化機器等、多数の製品に防燃を企図して使用されており、その成分は一般家庭やオフィスの埃(ハウスダスト)、魚類、鯨類試料と共に臍帯血を含むヒト血液や母乳からも検出され、広範な環境汚染とヒト集団における曝露の実態が確認されている。しかし、BFRsの健康影響は、神経系や内分泌系へのものが主として *in vitro* で検討されているにすぎない。ハウスダストは多くのアレルギー疾患の原因となる主要なアレルゲンでもあり、BFRsがハウスダストとの複合曝露によってアレルギーが悪化する可能性も危惧されてきた。

## 2. 研究の目的

このような背景から、本研究は下記の目的をもって進めた。

(1) 本研究は環境化学物質の単独大量曝露による毒性ではなく、その少量・微量曝露が、アレルギー疾患に与える(アレルゲンとの)複合影響を検討することにより、実世界においてより重要と考えられる『低用量(微量)複合曝露による健康影響: low dose, complicated effects』を明らかにする。

(2) 抗体産生、好酸球性炎症、肥満細胞の脱顆粒等、免疫応答の下流に存在する獲得免疫系が主に作動している病態の評価・解析に加え、自然、獲得免疫系の接点にある抗原提示細胞、及び、それと相互作用する細胞(上皮細胞・ストローマ細胞、種々のT細胞・NH細胞)に注目し、免疫応答の源流で臭素系難燃材によるアレルギー増悪機構を明らかにする。

(3) 健康影響の早期発見や未然防止に有用である『予防的バイオマーカー』に注目する。一方、病態の発現・増悪の早期に変化する指標(予防的バイオマーカー)を探索・同定し、アレルギー防止に役立てる。

本研究において、防燃効果を目的に室内製品等に広く使用され、近年、ハウスダスト(家埃)やヒトの血液、母乳においても広範な汚染が確認されている BFRs の中でもポリ臭素化ジフェニルエーテル類: PBDEs を検討対象とした。

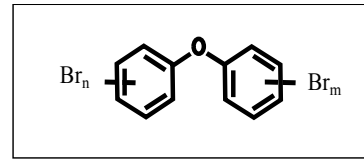


図1. 臭素系難燃剤の構造

テトラプロモジフェニルエーテル、ペンタプロモジフェニルエーテル、ヘキサプロモジフェニルエーテル、ヘプタプロモジフェニルエーテル混合標準品(DE-71)及び、ペンタプロモジフェニルエーテル、ヘキサプロモジフェニルエーテル、ヘプタプロモジフェニルエーテル混合標準品(DE-79)

## 3. 研究の方法

アトピー体質を持つ NC/Nga マウスを4グループに分け、その中の2グループの耳介腹側に、1-2日おきにダニアレルゲン(Dp)を計8回皮内投与し(5 µg/10 µL)、アトピー性皮膚炎様の病態を形成させる。さらに、臭素系難燃材(PBDEs)は、感作6日前より週1回、計4回腹腔内に投与し曝露させた。

- 1) Dp 非投与 (Vehicle) 群
- 2) PBDEs 曝露群
- 3) Dp 投与群
- 4) Dp+PBDEs 曝露群

次に、耳介の症状変化(乾燥肌、発疹、掻爬傷、浮腫)を経時的に四段階で評価し、総点数を症状スコアとして皮膚炎の重症度を比較した。耳介厚(腫脹)も定量的指標とした。さらに、最終投与24時間後に耳介組織を採取し、ホモジネートし、超遠心機を用いて、上清を回収し、そのサンプルを用いてアレルギー関連タンパク質の定量及び好酸球性炎症に関与するタンパク質の定量をELISA法を用いて行った。さらに酸化ストレスやアレルギーの関連タンパク質に係るシグナル伝達の変化をWestern Blot法を用いてそれぞれ評価した。

## 4. 研究成果

曝露実験開始後4週間おけるダニアレルゲン(Dp)投与群によって、ダニアレルゲン投与していない(Vehicle)群と比較して血清におけるアレルギー応答と関連の強い免疫グロブリンであるIgE抗体価の増加を確認した。また、耳介の症状変化(乾燥肌、発疹、掻爬傷、耳介厚(腫脹))を経時的に四段階で評価し、総点数を症状スコアとして皮膚炎の重症度を比較した結果、実験中期に有意差をもって重症化したことが確認された。一方、臭素系難燃剤を複数の濃度で行なった結果、濃度の違いによる大きな影響は認められなかった。

そこで、同物質の病態への影響が最も顕著であった曝露後2週間による影響を詳細に検討した。

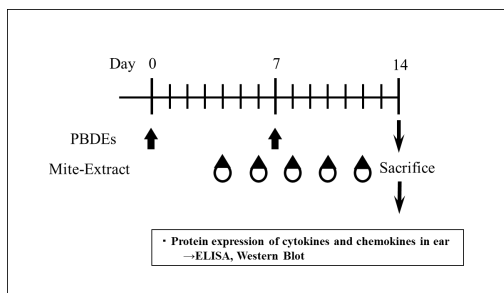


図2. 臭素系難燃剤及びダニアレルゲン曝露スケジュール

Dp投与群は、Vehicle群と比較して、IgE抗体価の増加を確認し、更にDp+DE79群において有意差をもってIgEの増加を確認した。

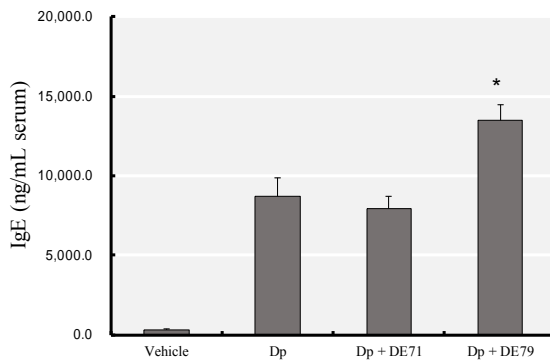


図3. 臭素系難燃剤曝露が血清中IgE抗体に及ぼす影響 \* $P < 0.05$ , Dp vs 1  $\mu$ g DE-79

また、耳介の症状変化(乾燥肌、発疹、掻爬傷、耳介厚)を経時的に四段階で評価し、総点数を症状スコアとして皮膚炎の重症度を比較した結果、Dp+PBDEs群において同病態への悪化影響が認められ、特にDp+DE79においては有意差をもってスコアの増強(病態悪化)が認められた。

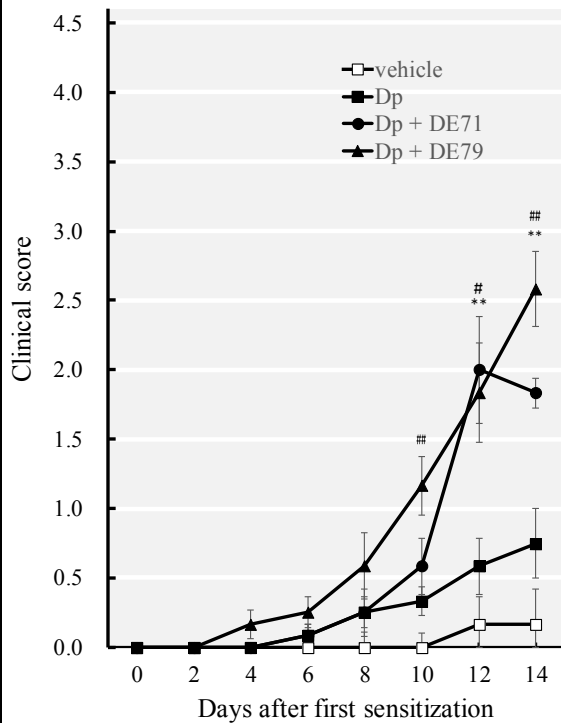


図4. 臭素系難燃剤曝露が耳介組織の症状変化に及ぼす影響

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Dp vs 1  $\mu$ g DE-71.

# $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , Dp vs 1  $\mu$ g DE-79

次に、マウス耳介組織の肉眼的変化を観察した。Vehicle群(A)と比較して、Dp群(B)において、若干の皮膚の乾燥・浮腫が確認された。さらにDp+DE71(C)やDp+DE79(D)において掻爬痕が観察された。

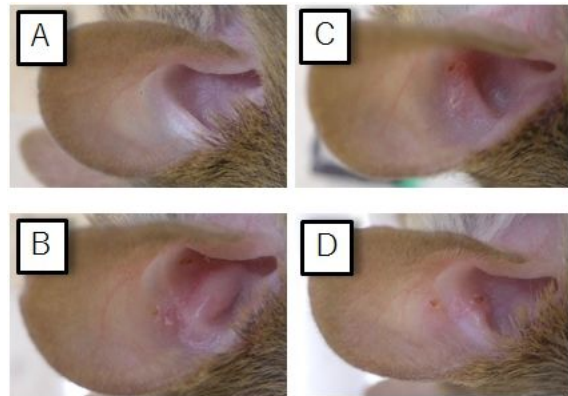


図5. 臭素系難燃剤曝露が耳介組織に及ぼす影響

一方、解剖後にマウス耳介組織から抽出したサンプルを用いてELISA法によって分子レベルでの影響を確認した結果、検討した各種アレルギー関連タンパク質において、その悪化傾向を確認したが、有意な変化は認められなかった。

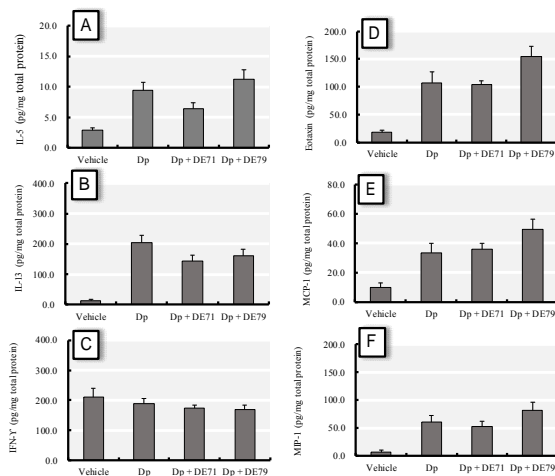


図6. 臭素系難燃剤曝露がアレルギー関連サイトカインに及ぼす影響：IL-5 (A)・IL-13 (B)・IFN-γ (C)、ケモカイン：Eotaxin (D)・MCP-1 (E)・MIP-1 (F)

さらに、酸化ストレスによる影響 (HO-1・Nitrotyrosine) やその上流タンパク質 (NF-B・NRF-2) の発現変化、皮膚炎による細胞接着関連タンパク質 (Selectin・ICAM) 及び、アレルギー関連上流シグナル伝達等のタンパク質マーカー (各種 STAT および P-STAT 他) の変動を Western Blot 法によって多岐にわたり検討した結果、有意な変化は認められなかった。

以上の結果より、臭素系難燃剤は、アトピー性皮膚炎の比較的初期段階において相加・相乗的悪化影響をもたらす可能性が示唆された。しかし、その悪化影響の根本となる部分 (キーとなる分子や増悪機構) の解明、及び、予防的マーカーの探索をすることで到達することが出来なかった。

今後は、今回検討した以外のアレルギー関連パラメーターの測定や、比較的早い段階におけるマウス耳介組織中の抗原提示細胞 (免疫応答の自然・獲得免疫系の中核) や種々のタイプの T 細胞・ストローマ細胞とそれらの相互作用に注目し、免疫応答の細胞での影響を含めた臭素系難燃剤によるアレルギー増悪機構を解明したいと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Tanaka M, Inoue KI, Shimada A, Takano H: Physiological effects of brominated flame retardants on NC/Nga mice. Immunopharmacol Immunotoxicol. 40:1-5, 2018.

〔学会発表〕(計 1 件)

田中満崇、井上健一郎、高野裕久、臭素系難燃剤の微量曝露がアトピー性皮膚炎へ及ぼす影響 第 66 回日本アレルギー学会学術大会 2017 年 6 月 16 日 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

田中 満崇 (Tanaka, Michitaka)

京都大学・工学 (系) 研究科・特定研究員

研究者番号：80647264

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

井上 健一郎 (Inoue Ken-ichiro)

静岡県立大学看護学部・教授

研究者番号：20373219

高野 裕久 (Takano Hirohisa)

京都大学・工学 (系) 研究科・教授

研究者番号：60281698