

令和元年6月17日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00558

研究課題名(和文) 核内受容体を介した有機リン系難燃剤の免疫毒性作用に関する研究

研究課題名(英文) Immunotoxicity of phosphate-based flame retardants via nuclear receptor

研究代表者

井戸 章子 (Ido, Akiko)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：00336629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：リン酸エステル系難燃剤は空気中に徐々に揮発することから、シックハウス症候群や化学物質過敏症などの免疫関連疾患が疑われているが、科学的データがほとんどない。そこで、有機リン系難燃剤のリスク評価を目的として、炎症反応の進展や免疫機構に関与しているPPARなどの核内受容体を介した免疫機能への影響を検討した。その結果、有機リン系難燃剤の中にはPPARアゴニスト活性を示すものが存在するものの、抗原提示能への影響にはPPARに対する作用は関与しない可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、一部の有機リン系難燃剤が、免疫系の初期段階である樹状細胞への抗原提示に影響を及ぼす可能性を示した。さらに、免疫系に関わりのある核内受容体PPARに対してアゴニスト活性を示す有機リン系難燃剤が存在するものの、その作用はPPARを介していない可能性が示唆されている。本研究結果は初めて得られた知見であり、科学的根拠に乏しい有機リン系難燃剤の免疫毒性に対するリスクアセスメントに大きく貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)： Phosphate-based flame retardants gradually volatilize in the air. Therefore, immune-related diseases such as sick house syndrome and chemical hypersensitivity are suspected. But there is little scientific data. In order to evaluate the risk of phosphate-based flame retardants, we investigated the involvement in immune function via nuclear receptors such as PPAR, which is involved in the inflammatory response and immune mechanism. As a result, it was found that some organophosphorus flame retardants have an agonist activity for PPAR, and it has shown the possibility to influence the antigen presentation to dendritic cells important to the immune system. But it has been suggested that this action may be mediated by other nuclear receptors rather than PPAR.

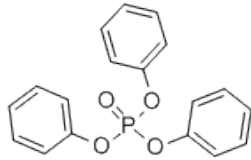
研究分野：環境・衛生系薬学、化学物質影響科学

キーワード：有機リン系難燃剤 RXR PPAR 核内受容体 免疫毒性 樹状細胞

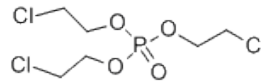
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難燃剤とは、プラスチックや化学繊維など可燃性素材を燃えにくくし、火災被害の軽減をはかるために添加される化学物質の総称で、臭素系、塩素系、リン系、無機系など多くの種類がある。世界的にはこれまで、臭素系難燃剤が主に使用されてきた。しかし、その代表である臭素化ジフェニルエーテル類 (PBDEs) については、生物蓄積性¹⁾ や内分泌かく乱作用²⁾ が報告され、国内では難燃剤協会が 1990 年代の初めに PBDEs の使用自粛を決定した³⁾。また国際的には、2009 年にストックホルム条約において、一部の PBDEs の生産および使用が禁止された。これにより、最近ではリン酸エステル類をはじめとするリン系難燃剤に使用が移行してきている (図 1)。



リン酸トリフェニル (TPhP)



リン酸トリス (2-クロロエチル) (TCEP)

図 1. 代表的な有機リン系難燃剤

世界保健機関 (WHO) は室内空気汚染源となる可能性のある有機化合物について沸点による分類を行っており、大きく揮発性有機化合物 (VOC) と半揮発性有機化合物 (SVOC) に分けて定義している⁴⁾。リン系難燃剤の一種であるリン酸エステル類は SVOC に属しており、慢性的な経肺曝露による喘息などの気道炎症や、経皮曝露による皮膚疾患などが懸念される。シックハウス症候群や化学物質過敏症との関連も疑われているが、科学的データはほとんど報告されていない。

これまでに申請者らは、有機スズ化合物であるトリフェニルスズ (TPT) およびトリブチルスズ (TBT) が、核内受容体 Retinoid X receptor (RXR) のアゴニストとして作用することを見出した⁵⁾。また Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) γ のアゴニストとしての作用を有することも見出している。TBT や TPT の PPAR γ に対する転写活性化能、親和性はともに既知の合成アゴニストである Rosiglitazone と同等以上であり、有機スズ化合物の側鎖がブチル基よりもフェニル基である方が強いアゴニスト活性を有することを明らかにしている⁶⁾、⁷⁾。さらに、上記先行研究の結果から、有機スズ化合物における核内受容体アゴニスト作用には中心元素としてスズ原子 (Sn; 第 14 族元素) が重要であることが明らかとなっている。今回検討する有機リン系難燃剤の中心元素であるリン (P) は、周期表において Sn の近隣 (第 15 族元素) に属するため、有機リン化合物においても同様の核内受容体アゴニスト活性を有する可能性が考えられる。

一方で、PPAR γ は免疫系においてはマクロファージをはじめとする炎症細胞に発現し、細胞増殖やサイトカインの分泌調節を介して炎症反応の進展や免疫機構に参与していることが明らかとなっている。よって、SVOC に属している有機リン系難燃剤が呼吸器や皮膚から慢性的に曝露され、PPAR γ などの核内受容体を介して免疫機能を修飾し、何らかの疾患を引き起こす可能性が懸念される。

2. 研究の目的

本研究では、これまで明らかとされていないリン酸エステル類をはじめとする有機リン系難燃剤の免疫系に対するリスク評価を目的として、核内受容体と獲得免疫の中心的存在である抗原提示細胞の機能に焦点をおいて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 核内受容体リガンド活性を有する有機リン系難燃剤のスクリーニング

核内受容体応答性の検討

有機リン系難燃剤の PPAR γ および RXR に対する応答性を評価した。ヒト絨毛由来細胞株 JEG-3 または、ヒト胎児由来腎臓上皮細胞株 293T 細胞に酵母の転写因子である GAL4 の DNA binding domain (DBD) と核内受容体 (PPAR γ または RXR) Ligand binding domain (LBD) を融合したキメラタンパクおよびルシフェラーゼ遺伝子上流に GAL4 応答配列を連結したレポーター遺伝子を発現させた (図 2)。この細胞に被験物質を添加

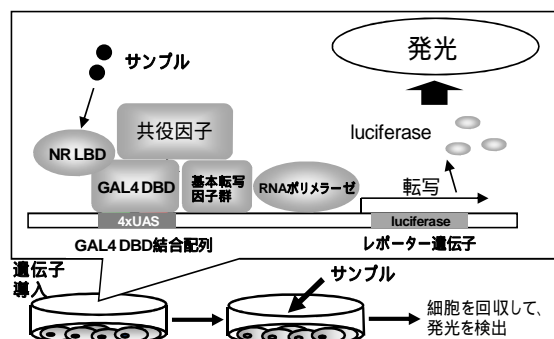


図 2. 核内受容体アゴニスト活性評価系

し、24 時間培養後に回収、Dual luciferase reporter system (Promega, Madison, WI, U.S.A.) を用いて、各被験物質におけるルシフェラーゼ活性を測定した。

核内受容体に対するリガンド結合親和性の検討

被験物質について、各核内受容体に対する結合親和性を確認する目的で、RI 標識リガンドを用いた競合阻害実験を行った。RI 標識リガンドとして、PPAR γ の既知のリガンドである [^3H]-Rosiglitazone、RXR の既知リガンドである [^3H]-9-cis-retinoic acid (9cRA) または、[^{14}C]-triphenyltin hydroxide (TPTOH) を用い、被験物質と共存させたときの結合阻害の程度を 50% 阻害濃度 (IC $_{50}$) により評価した。

(2) 樹状細胞を用いた抗原提示能に対する影響

抗原提示能への影響の評価は、マウス由来樹状細胞株 (DC2.4 細胞) とモデル抗原として卵白アルブミン (OVA) を用い、抗原刺激により DC2.4 細胞が分化成熟する過程で変動する表面抗原タンパク質 (CD80 および CD86) の発現を指標に行った。

有機リン系難燃剤の DC2.4 細胞に対する毒性評価

DC2.4 細胞に対する各被験物質の細胞毒性は、DNA 合成能への影響を指標に検討を行った。DC2.4 細胞を 37 °C で 24 時間プレインキュベートした後、さまざまな濃度の被験物質で 48 時間処理した。その後 [^3H]-Thymidine で 2 時間パルスし、細胞に取り込まれた放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。

DC2.4 細胞に発現する表面分子の測定

DC2.4 細胞を 37 °C で 24 時間プレインキュベートした後、モデル抗原として 1 mg/mL OVA で刺激を行うと同時に各被験物質をさまざまな濃度で処理した。さらに処理 24 時間後に DC2.4 細胞表面への CD80、CD86 の発現量をフローサイトメトリーにより測定した。

4. 研究成果

(1) 有機リン化合物の核内受容体リガンド活性

前述の通り、有機スズ化合物である TPT および TBT は RXR および PPAR γ のアゴニストとして作用し、その作用には中心元素である Sn が重要であることが、申請者らの先行研究で明らかになっている。周期表において Sn の近隣に属する P においても同様の作用を有する可能性が考えられるため、まずは有機リン化合物である Triphenylphosphine oxide (TPPO) および Tributylphosphine oxide (TBPO) について RXR および PPAR γ に対する応答性を評価した。すると、両化合物において RXR および PPAR γ のリガンド活性を認められた (図 3)。

しかし、TPPO について RXR および PPAR γ のリガンド結合親和性を評価したところ、競合阻害

実験により、[^3H]-9cRA (RXR)、[^3H]-Rosiglitazone (PPAR γ) に対する競合阻害は見られなかった。また、[^{14}C]-TPTOH についても同様に検討したところ、こちらについても競合阻害はみられなかった。

よって、TPPO は TPT とは異なる結合様式で RXR および PPAR γ と結合し、リガンドとして作用する可能性が示唆された。

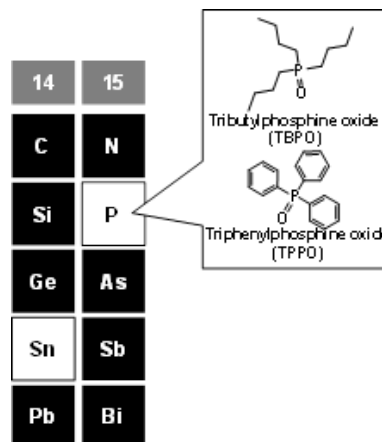


図 3 RXR および PPAR γ リガンド活性を示す有機リン化合物

(2) 核内受容体リガンド活性を有する有機リン系難燃剤のスクリーニング

(1) の検討において、有機リン化合物が PPAR γ リガンドとして作用する可能性が示されたため、実際に用いられている有機リン系難燃剤について、0.05 ~ 25 $\mu\text{mol/L}$ の濃度範囲における核内受容体リガンド活性を評価した。その結果、Triphenyl Phosphate (TPhP) において、既報告と同様に PPAR γ アゴニスト活性を示した⁸⁾。さらに、2-Ethylhexyl Diphenyl Phosphate (EHDPP) においても PPAR γ アゴニスト活性を持つことが、今回の検討で新たに明らかとなった。また、それぞれの 20% 効果濃度 (EC $_{20}$) は、2.78 $\mu\text{mol/L}$ (TPhP)、2.46 $\mu\text{mol/L}$ (EHDPP) であり、アゴニスト活性は、TPhP よりも EHDPP で強いことがわかった。

(3) 樹状細胞を用いた有機リン系難燃剤の抗原提示能に対する影響

樹状細胞は、皮膚表面や肺胞を始めとする全身組織に存在し、最も強力な抗原提示能を有するプロフェッショナル抗原提示細胞である。外来抗原を取り込み、T 細胞に抗原情報を伝達することで獲得免疫応答の始動に重要な役割を有する。また樹状細胞は、成熟化に伴い抗原提示

において必須の補助刺激分子 (CD80、CD86 など) の発現を増強することにより効率的な T 細胞の活性化を行う。そこで、有機リン系難燃剤が樹状細胞の抗原提示細胞への分化や抗原提示能に及ぼす影響を、抗原 (OVA) 刺激した DC2.4 細胞の表面に発現する CD80 および CD86 を指標として評価する系を立ち上げた。

前述のとおり、有機スズ化合物である TBT および TPT は、既に RXR および PPAR γ の強力なアゴニストであることがわかっている。さらに PPAR γ は免疫機構に關与する核内受容体であることが報告されているため、TBT、TPT 処理が DC2.4 細胞表面への CD80 および CD86 発現に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこでまず初めにこれらを対象として検討したところ、OVA 処理により有意に増加した DC2.4 細胞上の表面分子 CD80、CD86 の発現が、TBT および TPT を処理することにより有意に減少した。よって本実験系を用いて、被験物質が表面分子に与える影響を正確に評価できることが確認できた。

次に、本検討で用いる有機リン系難燃剤の濃度を決定するために、各被験物質が DC2.4 細胞へ与える毒性を [3 H]-Thymidine 取り込み試験により評価した。その結果、EHDPP を含む 4 化合物は 23 ~ 30 $\mu\text{mol/L}$ 、TPhP は 300 $\mu\text{mol/L}$ 、Tris(2-chloroethyl) Phosphate (TCEP) は 3500 $\mu\text{mol/L}$ から細胞が完全に死滅した。よって処理濃度は、EHDPP をはじめとする 4 化合物 : 3, 10 $\mu\text{mol/L}$ 、TPhP : 30, 100 $\mu\text{mol/L}$ 、TCE : 100, 300 $\mu\text{mol/L}$ に決定した。

以上の条件をもとに、これら有機リン系難燃剤が抗原提示能に及ぼす影響を評価したところ、実験 (2) において PPAR γ アゴニスト活性を示さなかった TCEP については、CD80 および CD86 の発現に変化は見られなかった。一方で、PPAR γ アゴニスト活性を示した TPhP、EHDPP を含む 5 種類の化合物において CD80 または CD86 の発現が有意に減少した。しかし、PPAR γ の合成アゴニストである Rosiglitazone (1 $\mu\text{mol/L}$) を用いて同様に検討したところ、CD80 および CD86 の発現に対して特に影響は見られなかった。その一方で、RXR の合成アゴニストである LG100268 (100 $\mu\text{mol/L}$) 処理において、表面分子発現の有意な減少が認められた。

以上より、一部の有機リン系難燃剤は免疫系の初期段階である樹状細胞への抗原提示能に影響を及ぼす可能性が示された。さらに、有機リン系難燃剤の中には PPAR アゴニスト活性を示すものが存在するが、この作用は抗原提示能に対する影響には關与しない可能性が示された。今後は RXR など他の核内受容体についても検討する必要があると考える。

【参考文献】

1) *Chemosphere* **46**, 709–716 (2002); 2) *Chemosphere* **46**, 757–777 (2002); 3) *Chemosphere* **53**, 645–654 (2003); 4) *WHO Regional Publication, Europeans Series No.23* (1987); 5) *Mol. Endocrinol.* **19**, 2502–2516 (2005); 6) *Sci. Rep.* **5**, 8520 (2015); 7) *Chem. Biol. Interact.* **180**, 238–244 (2009); 8) *Environ. Sci. Technol.* **49**, 10057–64 (2015).

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1) Erina Shiraishi, Akiko Ido, Youhei Hiromori, Kento Tanaka, Tomoki Kimura, Hisamitsu Nagase, Tsuyoshi Nakanishi: Utility of murine dendritic cell line DC2.4 for in vitro assay of skinsensitization potential. *Fundamental Toxicological Science* **4**, 2017, 123–126.

DOI: 10.2131/fts.4.121 (査読有)

2) Wenxin Hu, Fumei Gao, Hong Zhang, Youhei Hiromori, Shuhei Arakawa, Hisamitsu Nagase, Tsuyoshi Nakanishi, Jianying Hu: Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma and Disruption of Progesterone Synthesis of 2-Ethylhexyl Diphenyl Phosphate in Human Placental Choriocarcinoma Cells: Comparison with Triphenyl Phosphate. *Environmental Science and Technology* **51**, 2017, 4061-4068

DOI: 10.1021/acs.est.7b00872 (査読有)

3) Akiko Ido, Youhei Hiromori, Liping Meng, Haruki Usuda, Hisamitsu Nagase, Min Yang, Jianying Hu and Tsuyoshi Nakanishi: Occurrence of fibrates and their metabolites in source and drinking water in Shanghai and Zhejiang, China. *Scientific Reports* **7**, 2017, 45931

DOI: 10.1038/srep45931 (査読有)

4) Youhei Hiromori, Akiko Ido, Akira Aoki, Tomoki Kimura, Hisamitsu Nagase, and Tsuyoshi Nakanishi: Ligand Activity of Group 15 Compounds Possessing Triphenyl Substituent for the RXR and PPAR γ Nuclear Receptors. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **39**, 2016, 1596–1603.

DOI: 10.1248/bpb.b16-00186 (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

- 1) 白石絵里奈、井戸章子、永瀬久光、中西 剛：ブラジル産グリーンプロポリスの皮膚感作における安全性評価、第 4 回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2018 年)
- 2) Erina Shiraishi, Akiko Ido, Hisamitsu Nagase, Tsuyoshi Nakanishi: Potencial skin sensitization of Brazilian green propolis evaluated by using test guideline. 2018 Japan / Korea Symposium on Pharmaceutical Health Science and Environmental Toxicology (2018 年、国際学会)
- 3) 白石絵里奈、井戸章子、永瀬久光、中西 剛：桂皮酸誘導体及びフラボノイド類が及ぼす免疫細胞への影響、フォーラム 2018：衛生薬学・環境トキシコロジー (2018 年)
- 4) 荒川脩平、廣森洋平、安田賢人、井戸章子、中西 剛、永瀬久光：プロポリス成分の核内受容体を介した 胎盤内分泌機能修飾に関する検討、第 8 回岐阜薬科大学 機能性健康食品研究講演会 (2017 年)
- 5) Erina Shiraishi, Akiko Ido, Youhei Hiromori, Kento Tanaka, Tomoki Kimura, Tsuyoshi Nakanishi, Hisamitsu Nagase: Utility of murine dendritic cell line DC2.4 for in vitro assay of skinsensitization potential. 2018 Japan / Korea Symposium on Pharmaceutical Health Science and Environmental Toxicology (2017 年、国際学会)
- 6) Akiko Ido, Youhei Hiromori, Liping Meng, Haruki Usuda, Min Yang, Jianying Hu, Tsuyoshi Nakanishi, Hisamitsu Nagase: Occurrence of fibrates and their metabolites in source and drinking water in Shanghai and Zhejiang, China. 2018 Japan / Korea Symposium on Pharmaceutical Health Science and Environmental Toxicology (2017 年、国際学会)
- 7) 白石絵里奈、井戸章子、田中健人、中西 剛、永瀬久光：アレルギー性接触皮膚炎における MUP1 の機能解明に向けた検討、フォーラム 2017：衛生薬学・環境トキシコロジー (2017 年)
- 8) 白石絵里奈、田中健人、井戸章子、中西 剛、永瀬久光：ブラジル産グリーンプロポリスの皮膚感作性に関する検討、第 44 回日本毒性学会 (2017 年)
- 9) 井戸章子、廣森洋平、Liping Meng、臼田春樹、Min Yang、Jianying Hu、中西 剛、永瀬久光：中国における飲料水中フィブラート系薬物およびその代謝物の存在実態調査、日本薬学会第 137 年会 (2017 年)
- 10) 白石絵里奈、田中健人、井戸章子、中西 剛、永瀬久光：プロポリスの皮膚感作性に関する検討、フォーラム 2016：衛生薬学・環境トキシコロジー (2016 年)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：永瀬 久光

ローマ字氏名： Hisamitsu Nagase

所属研究機関名： 岐阜薬科大学

部局名： 薬学部

職名： 名誉教授

研究者番号(8桁)： 40141395

研究分担者氏名：中西 剛

ローマ字氏名： Tsuyoshi Nakanishi

所属研究機関名： 岐阜薬科大学

部局名： 薬学部

職名： 教授

研究者番号(8桁)： 50303988

(2)研究協力者

研究協力者氏名： 白石絵里奈(博士後期課程1年生)

ローマ字氏名： Erina Shiraishi

研究協力者氏名： 高橋京佑(学部6年生)

ローマ字氏名： Kyosuke Takahashi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。