

平成30年6月19日現在

機関番号：82101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12612

研究課題名(和文) 難燃剤曝露は肥満を基本病態としたアレルギー性喘息の発症・進展に寄与し得るか

研究課題名(英文) Can exposure to flame retardants induce the onset and development of allergic asthma in obese subjects?

研究代表者

柳澤 利枝 (Yanagisawa, Rie)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員

研究者番号：70391167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：難燃剤曝露が肥満を基本病態としたアレルギー性喘息の発症・進展に与える影響を検討した。リン系難燃剤Tris(2-butoxyethyl) phosphate混餌高脂肪食摂取したアレルギー性喘息マウスモデルにおいて、雄性マウスで肺炎症の悪化と所属リンパ節の細胞増殖能の亢進を認めた。一方、雌性マウスでは明らかな変化を認めなかった。これより、難燃剤曝露は、肥満を基本病態としたアレルギー性喘息を増悪する可能性があり、この影響には性差があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The prevalence of obesity and allergy has rapidly increased over the past few decades. Obesity is a known risk factor for allergic asthma; however, the underlying mechanisms for the association between obesity and asthma are not fully understood. In our study, we investigated the effects of exposure to flame retardants, one of the environmental toxicants, on allergic asthma in high fat-fed obese mice. Oral exposure to tris (2-butoxyethyl) phosphate (TBEP), a major phosphorus flame retardant, with high fat diet (56.7 kcal% fat) increased the infiltration of macrophages into the lungs of male mice, but not female mice. Additionally, TBEP enhanced the proliferation of the local lymph node cells compared to vehicle in allergen-treated high fat-fed mice. These results suggested that exposure to low dose of flame retardants can exacerbate allergic asthma with obesity. Furthermore, flame retardants may have gender specific effects on allergic and immune responses.

研究分野：環境毒性学

キーワード：難燃剤 肥満 アレルギー・喘息 化学物質 環境 衛生

1. 研究開始当初の背景

近年、小児を中心にアレルギー疾患が急増しており、日本では3人に1人が何らかの疾患を有している。一方、肥満の割合も日本をはじめとした先進国のみならず、発展途上国でも増加傾向にあり、その健康被害は深刻である。肥満は、糖尿病、高血圧、動脈硬化等の発症・進展における基本病態と言われているが、アレルギー疾患との関連を示唆する報告も多い。特に、喘息に関しては、多くの疫学的研究において、Body Mass Index(BMI)と、喘息の発症率や重症度との関連性が指摘されている。その作用機構としては、肥満による肺容量の減少等の呼吸機能低下、脂肪細胞などからの炎症性因子産生による慢性的な全身性炎症の関与等が考えられている。加えて、喘息の発症率や重症度には年代に関連した性差があり、遺伝的背景以外に、呼吸機能の差、性ホルモンが影響していると言われている。

肥満、アレルギー疾患の発症・進展はいずれも多因子性という共通性があり、その共通因子の1つとして環境要因の変化が関与している。特に、食環境・住環境、衛生環境の変化には環境中の化学物質の増加や多様化が伴っており、化学物質曝露による両疾患への影響も多数報告されている。本応募課題で対象とする難燃剤は、家電製品や繊維製品の難燃性を高める化学物質であり、近年その使用量が増加している一方、製品からの放散により室内ダスト中に高濃度で検出されることから、健康への影響が懸念されている。難燃剤は、甲状腺機能のかく乱作用を有することが報告されているが、我々の先行研究においても、臭素系難燃剤が免疫系や呼吸器系に影響することを明らかにしている^{1),2)}。肥満に関しても、臭素系難燃剤の1つであるヘキサプロモシクロドデカンの経口曝露が、食餌性肥満における糖・脂質代謝のかく乱、および脂肪組織における炎症反応の亢進を介して病態を悪化することを見出した³⁾。以上のことから、肥満を基本病態としたアレルギー性喘息に対する難燃剤曝露が、炎症・免疫系、内分泌・代謝系のかく乱を介して喘息病態の発症・進展に寄与し、その影響に性差が存在し得る可能性がある。

2. 研究の目的

本応募課題では、室内ダスト中に多く含まれる難燃剤曝露が肥満を基本病態としたアレルギー性喘息の発症・進展へ及ぼす影響について検討することを目的とする。加えて、炎症・免疫系、内分泌・代謝系のかく乱作用、および両者の相互作用にも着目し、その作用機序の解明を試みる。さらに、喘息病態亢進における性差の有無についても併せて検討する。

3. 研究の方法

(1)肥満を基本病態としたアレルギー性喘息

モデルの確立

C57BL/6J 雌雄マウス(日本エスエルシー株より導入)に対し、5週齢より高脂肪食(HFD, 62.2 kcal% fat)、あるいは普通脂肪食(ND, AIN-93M)を自由摂取させた(いずれもオリエンタル酵母工業株)。肥満が成立した12週齢より卵白アルブミン(ovalbumin; OVA)4、10 µg/50 µL/mouse の2用量を隔週で気管内投与した(対照群には PBS(-)を処置(Vehicle 群))。喘息病態成立は、塩化メサコリン吸入刺激に対する気道反応性の変化を経時的に測定することにより確認した。呼吸・肺機能評価システム(DSI社製 FinePointe™)を用い、OVA投与24時間後、気道抵抗指標(Enhanced pause (Penh))、一回換気量、呼吸回数等の測定を実施した(16、18、20週齢)。最終OVA投与48時間後、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の細胞数を計測した。BALF中の炎症性因子(IL-4, IL-5, IL-13, IL-33, eotaxin, KC)、OVA特異的IgE、IgG₁抗体の産生は、ELISA法を用いて測定した。

(2)食餌性肥満アレルギー性喘息モデルにおける難燃剤曝露の影響評価

(1)で確立した肥満を基本病態としたアレルギー性喘息モデルを用い、リン系難燃剤 Tris(2-butoxyethyl) Phosphate(TBEP)の影響を検討した。C57BL/6J 雌雄マウスに対し、耐容一日摂取量(TDI: Tolerable Daily Intake) 2 µg/kg/day 相当量となるよう調製したTBEP混餌高脂肪飼料(脂肪分56.7%カロリー比、日本クレア株)を、5-20週齢の間自由摂取させた。また、6週齢、10週齢において、24時間の摂餌量、摂水量の測定を行った。肥満が成立した12週齢より ovalbumin (OVA) 10 µg/50 µL/mouse を隔週で計5回、気管内投与した。OVA最終投与24時間後における呼吸・肺機能測定、48時間後のBALF中の細胞数、OVA特異的抗体産生量の測定は(1)と同様に実施した。加えて、血清中ホルモン濃度(Leptin, Adiponectin, Insulin)は、ELISA法を用いて測定した。二次リンパ組織の縦隔リンパ節については、細胞数を計測した後、細胞表面分子(MHC class II, CD86, TCR, CD4, CD8等)の発現をフローサイトメトリーにて解析した。また、OVA刺激下で2日間または5日間培養し、細胞増殖能とサイトカイン産生量(IFN-γ, IL-4, IL-5等)をELISA法にて解析した。

4. 研究成果

(1)雄マウスでは、ND群においてOVA用量依存的に好酸球の浸潤を主とした肺炎症が亢進した。一方、HFD群ではOVAによる肺炎症はND群に比し著しく減弱しており、OVA用量依存性も認められなかった。気道反応性は、20週齢においてHFD、ND群いずれもOVA 10 µg/mouse投与でPenh値の上昇を認め、HFD群でより顕著であった。雌マウスでは、ND群、HFD群いずれもOVA用量依存的に肺炎症が亢

進し、好酸球に加え好中球数の増加が顕著であり、雄よりも炎症の程度が強かった。食餌による明らかな差異は認めなかったが、ND群で亢進する傾向にあった。また、BALF上清中のIL-5, IL-13, eotaxin, OVA特異的IgE, IgG₁抗体の産生もこれに並行していた。気道反応性は、20週齢でHFD、ND群いずれもOVA投与でPenh値の上昇傾向を認め、ND群でより顕著であった。16、18週齢では雌雄ともに各群における明らかな気道反応性の違いはなかった。

以上の結果から、OVA気管内投与によるアレルギー性喘息の病態形成には性差があり、肥満を基本病態とした場合の反応性も雌雄によって異なることが明らかとなった。難燃剤曝露による影響検出には、中程度の炎症反応が望ましいことから、曝露実験はOVA 4 μg/mouse、20週齢（OVA投与5回）で評価を行うこととした。（この結果を踏まえ、(2)の実験を実施したが、OVA投与によるアレルギー性肺炎症が再現できなかったため、10 μg/mouseに変更し再試験を行った。）

(2) 雌雄いずれのマウスにおいても、TBEP曝露による体重、組織重量、摂餌量、摂水量の変化は認めなかった。また、OVA特異的IgE、IgG₁、Leptin、Adiponectin濃度も各群における有意な差はなかった。雄性マウスでは、Vehicle+TBEP(+)群、OVA+TBEP(-)群に比し、OVA+TBEP(+)群でBALF中マクロファージ数の有意な増加を認め(図1)、好中球数も増加傾向であった。また、Penh値も上昇傾向を示した。一方、雌性マウスでは、TBEP曝露による喘息病態の有意な変化はなかったが、insulin濃度はOVA+TBEP(+)群で抑制傾向を認めた。

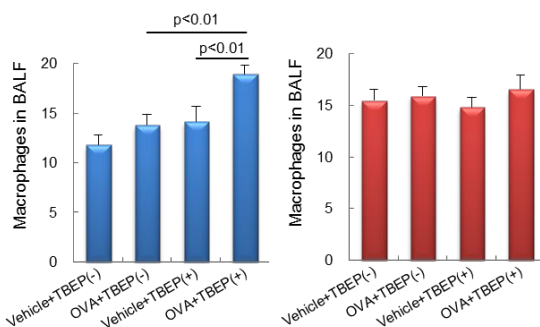


図1. TBEP曝露による気管支肺胞洗浄液中のマクロファージ数の変化
Data were expressed as means ± SE for 6 animals per group. Left: Male mice, Right: Female mice.

縦隔リンパ節の解析では、雄性マウスにおいて、Vehicle+TBEP(-)群、Vehicle+TBEP(+)群、OVA+TBEP(-)群に比し、OVA+TBEP(+)群で総細胞数の増加傾向が観察された。MHC class II⁺CD86⁺細胞の割合は、Vehicle+TBEP(-)群に比し、OVA+TBEP(-)群で増加、Vehicle+TBEP(+)群で低下の傾向を示したが、OVA+TBEP(+)群による明確な変化は認められ

なかった。CD4 T細胞/CD8 T細胞比(TCR⁺CD4⁺/TCR⁺CD8⁺)は、他群に比しVehicle+TBEP(+)群で高い傾向であった。OVA刺激下の培養(5日間)による細胞増殖能は、TBEP(-)群に比しTBEP(+)群で、加えてOVA+TBEP(-)群に比しOVA+TBEP(+)群で有意に増加した(図2)。一方、各群のサイトカイン産生量(IFN- γ , IL-4, IL-5)は、2日間または5日間の培養でともに非常に低く、TBEP曝露による影響も検出されなかった。雌性マウスにおいては、総じてTBEP曝露による明確な変化は認められなかった。

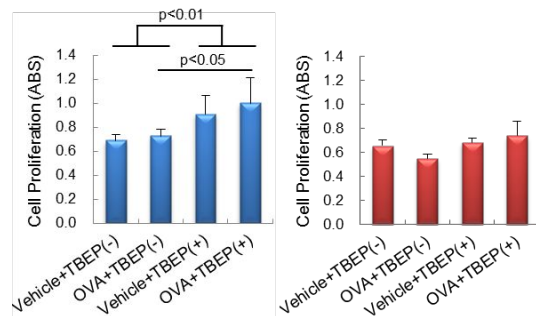


図2. TBEP曝露による縦隔リンパ節の細胞増殖能の変化
Data were expressed as means ± SE for 4-6 animals per group. Left: Male mice, Right: Female mice.

以上の結果から、難燃剤曝露は肥満を基本病態とするアレルギー性喘息の病態を軽微ではあるが亢進し、その影響には性差がある可能性が示唆された。リン系難燃剤に関しては、室内ダスト中のTBEP、あるいはTris(2-chloro-iso-propyl) phosphateの濃度がアトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、喘息の関連があるという疫学研究や⁴⁾、Triphenylphosphate、あるいはTris(1,3-dichloroisopropyl) phosphateの曝露がマウス樹状細胞の活性化やサイトカイン産生を亢進するという報告がある⁵⁾。我々の検討においても、食餌性肥満アレルギー性喘息モデルに対するTBEP曝露によって、喘息病態の亢進と免疫担当細胞の活性化を認めたことから、肥満が基本病態としてある場合、低用量の難燃剤曝露でアレルギー症状が悪化する可能性が示唆された。また、OVA非存在下でも縦隔リンパ節細胞の活性化を認めたことから、TBEP曝露は非アレルギー性の免疫反応を亢進する可能性も考えられた。今回、雄の食餌性肥満アレルギー性喘息モデルにおいてのみ喘息病態の亢進を認めた。性差が認められた機序として、内分泌系へのかく乱作用の可能性が考えられるため、性ホルモン受容体、甲状腺ホルモン関連受容体、あるいはホルモン産生の変化の有無について現在解析中である。

本研究課題において、BFRs曝露によりTDI相当の低用量曝露でも肥満を基本病態としたアレルギー性喘息モデルにおいて、肺炎症を増悪する可能性があることが示唆された。加えて、環境化学物質に対する感受性要因の

一つとして、性差も考慮する必要性を示した。今後はさらに、実環境中の曝露濃度による影響についても検討する必要がある。加えて、BFRs の動態や生体内における化学形態との関連性も含め、さらなるデータの蓄積を行うことにより、新たなリスク管理の視点の必要性の提示に繋がることが期待される。

<引用文献>

- 1) Koike E, Yanagisawa R, Takano H. Brominated flame retardants, hexabromocyclododecane and tetrabromobisphenol A, affect proinflammatory protein expression in human bronchial epithelial cells via disruption of intracellular signaling. *Toxicol In Vitro*. 2016 Apr;32:212-9. doi: 10.1016/j.tiv.2015.12.013.
- 2) Koike E, Yanagisawa R, Takigami H, Takano H. Brominated flame retardants stimulate mouse immune cells in vitro. *J Appl Toxicol*. 2013 Dec;33(12):1451-9. doi: 10.1002/jat.2809.
- 3) Yanagisawa R, Koike E, Win-Shwe TT, Yamamoto M, Takano H. Impaired lipid and glucose homeostasis in hexabromocyclododecane-exposed mice fed a high-fat diet. *Environ Health Perspect*. 2014 Mar;122(3):277-83.
- 4) Araki A, Saito I, Kanazawa A, Morimoto K, Nakayama K, Shibata E, Tanaka M, Takigawa T, Yoshimura T, Chikara H, Saijo Y, Kishi R. Phosphorus flame retardants in indoor dust and their relation to asthma and allergies of inhabitants. *Indoor Air*. 2014 Feb;24(1):3-15. doi: 10.1111/ina.12054.
- 5) Canbaz D, Logiantara A, van Ree R, van Rijt LS. Immunotoxicity of organophosphate flame retardants TPHP and TDCIPP on murine dendritic cells in vitro. *Chemosphere*. 2017 Jun;177:56-64. doi: 10.1016/j.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

柳澤 利枝 (Rie Yanagisawa)
国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員
研究者番号：70391167

(2)研究分担者

小池 英子 (Eiko Koike)
国立環境研究所・環境リスク・健康研究セ

ンター・室長

研究者番号：60353538