

平成22年6月14日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790432
 研究課題名（和文） 食品中の残留農薬曝露が若齢期のアレルギー疾患に及ぼす影響に関する研究
 研究課題名（英文） Effects of oral exposure to pesticide residues in allergic diseases during early childhood.
 研究代表者
 柳澤 利枝 (YANAGISAWA RIE)
 独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究領域・研究員
 研究者番号：70391167

研究成果の概要（和文）：本研究では、食環境での曝露が想定される食品中の残留農薬の若齢期曝露が、アレルギー疾患、特にアトピー性皮膚炎とアレルギー性気管支喘息に与える影響を各々の病態動物モデルを用いて評価することを目的とした。その結果、若齢期における農薬の経口曝露は、アトピー性皮膚炎に対しては、雌雄共に明確な影響を示さなかった。一方、アレルギー性気管支喘息モデルでは、ある種の農薬が気道炎症を増悪することが明らかとなった。また、この増悪影響には性差が認められた。以上より、若齢期における農薬曝露の影響には、アレルギー疾患の種類、および性差によって相違がある可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Pesticide residues, ones of environmental pollutants, may increase the potency of allergens and thereby play a role in the onset and progression of allergic diseases. We determined whether oral exposure to pesticides in early childhood affect allergic diseases including atopic dermatitis and allergic airway inflammation in murine model. Exposure to pesticides did not show significant enhancing effects in atopic dermatitis-like skin lesions either male or female mice. On the other hand, γ -benzene hexachloride (BHC) aggravated allergen-related airway inflammation in female mice, but not male mice. Taken together, oral exposure to pesticides in early childhood can show various effects in the type of disorders and/or sex differences.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：食品衛生

1. 研究開始当初の背景

近年、アトピー性皮膚炎、アレルギー性気

管支喘息、花粉症、食物アレルギーなどのアレルギー疾患が若年層を中心とした急増が

指摘されている。これらの疾患の発現、あるいは進展を規定する要因の一つに、環境因子、中でも環境化学物質への曝露影響が挙げられる。環境化学物質への曝露経路の一つとして、食環境を介した経路が考えられるが、これは単に、食環境の変化や、国内外の物流の飛躍的向上に因るものだけでなく、農作物や家畜の生産性の向上を目的とした農薬、動物用医薬品、及び飼料添加物の開発や使用に起因する所が大きい。一方、農薬、動物用医薬品、及び飼料添加物の使用に関しては、日本や欧米を始めとする先進諸国において、独自の基準値を設け使用を規制している。しかし、その設定基準、対象物質は各国で異なっており、国内で規制されている物質が、農作物や食肉、あるいは加工品として流入する可能性は否定できない。特に、農薬は、残留性や蓄積性が高いという性質を有する物質が多く、人体への影響が懸念される。

また、農薬には、内分泌攪乱作用を有する物質も多く存在し、これらの物質が核内受容体を介して、生殖系だけでなく、免疫・アレルギー系にも影響を及ぼすことが予想される。これより、農薬は、優先的に検討すべき化学物質であると考えた。加えて、農薬を始めとする化学物質の毒性は、高用量曝露による単独毒性を基準として評価される場合がほとんどで、若年層、アレルギー疾患罹患患者、あるいは遺伝的にアトピー素因を有するなど、いわゆる「高感受性群」を念頭に置いた検討は全くなされていない。以上のことから、食品中の残留農薬の低用量曝露が、若齢期におけるアレルギー疾患に及ぼす影響について評価することは、可及的速やかに取り組むべき課題であると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、食品中の残留農薬が、若齢期のアレルギー疾患に与える影響を検討することを目的とし、複数のアレルギー疾患モデルを用いて農薬の影響を評価した。

(1) アトピー性皮膚炎に及ぼす影響

アトピー素因を有し、ヒトのアトピー性皮膚炎様の病態を形成する動物モデル NC/NgaTndCr1j (以下 NC/Nga) マウスを用いて、対象物質の経口曝露がアトピー性皮膚炎に与える影響を検討した。

(2) アレルギー性気管支喘息に及ぼす影響

アレルギーとして卵白アルブミンをアレルギーモデルとして汎用されている C3H/HeJc1 (以下、C3H/HeJ) マウスに経気道曝露することにより、アレルギー性気管支喘息モデルを作製し、対象物質の経口曝露が喘息病態に及ぼす影響を検討した。

いずれの実験系も、実際の曝露経路を想定し、農薬は経口投与とした。また、若齢期における影響についても考慮し、5 週齢の動物を使用した。加えて、性差による影響の相違についても併せて検討した。

また、対象とする農薬は、内分泌攪乱作用を示す物質、及び「平成 15 年度食品中の残留農薬の一日摂取量調査結果」(厚生労働省調べ)で、食品への残留が認められた物質を考慮して選択した。影響が確認された物質については、その作用機構について、さらに詳細な検討を行うこととした。

3. 研究の方法

本研究における農薬の曝露量は、無毒性量 (NOAEL=No Observed Adverse Effect Level) を上限値、一日許容摂取量 (ADI=Acceptable Daily Intake) を下限値として、3 用量設定した。また、実際の曝露経路を反映するため、農薬の曝露は経口投与とした。

(1) 若齢期における農薬の経口曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響

動物は、雌雄共に NC/Nga マウス、5 週齢を用いて、農薬曝露による影響を評価した。対象物質は、有機リン・有機硫黄系農薬である Malathion と有機塩素系農薬の γ -BHC を選択した。Malathion の投与量は、0.02 mg/kg/day, 0.2 mg/kg/day, 2 mg/kg/day、 γ -BHC は、0.001 mg/kg/day, 0.01 mg/kg/day, 0.1 mg/kg/day とし、経口投与した。投与群は、以下の 5 群を設定した。

・対照群

(生理食塩水 (Saline) + Vehicle (Corn oil))

・Dp + Vehicle

・Dp + 低用量曝露群

・Dp + 中用量曝露群

・Dp + 高用量曝露群

ダニアレルゲン (*Dermatophagoides pteronyssinus*; Dp) は、NC/Nga マウスの右耳介腹側に対し、1-2 日おきに、計 8 回皮下投与し (5 μ g/10 μ L)、皮膚炎病態を形成させた。対照群には、溶媒として用いた Saline を処置した。対象物質は、感作 6 日前より週 1 回、計 4 回、体重測定後、前述の用量を経口ゾンデを用いて投与した。対照群、および Dp 群には、溶媒として用いた Corn oil を処置した。皮膚炎病態の変化は、Dp 投与 24 時間後に、①肉眼所見による症状変化のスコア化 (Dp 投与 24 時間後、4 徴候 [乾燥肌、発疹、搔爬傷、浮腫]、4 段階 [0: 無し、1: 軽度、2: 中程度、3: 重度] を毎回評価し、点数化。満点は 12 点)、②耳介厚の測定 (耳介腫脹) を行い、評価した。耳介厚の測定は、ダイヤルシクネスゲージ (榊尾崎製作所) を用いた。

(2) 若齢期における農薬の経口曝露がアレルギー

アレルギー性気管支喘息に及ぼす影響

動物は、雌雄共に C3H/HeJ マウス、5 週齢を用いて、農薬曝露による影響を評価した。対象物質としては、有機塩素系農薬である p,p'-DDT と γ -BHC を選択した。p,p'-DDT の投与量は、0.01 mg/kg/day, 0.1 mg/kg/day, 1 mg/kg/day、 γ -BHC は、0.001 mg/kg/day, 0.01 mg/kg/day, 0.1 mg/kg/day とした。投与群は、以下の 5 群を設定した。

- ・ 対照群 (PBS(pH7.4) + Vehicle(Corn oil))
- ・ OVA + Vehicle
- ・ OVA + 低用量曝露群
- ・ OVA + 中用量曝露群
- ・ OVA + 高用量曝露群

C3H/HeJ マウスに、アレルゲンとして卵白アルブミン(OVA)を隔週で、計 4 回、気管内投与し、アレルギー性気管支喘息様の病態を形成させた。対照群には、溶媒として用いた PBS を処置した。対象物質は、週 1 回、計 7 回、体重測定後、前述の用量を経口ゾンデを用いて投与した。対照群、および OVA 群には、溶媒として用いた Corn oil を処置した。OVA 感作時は、その前日に対象物質を処置した。最終 OVA 投与 24 時間後に屠殺し、気管支肺胞洗浄(BAL)を行い、洗浄液(BALF)中の細胞数を算定することにより農薬による影響を評価した。影響が認められた物質については、肺組織ホモジネート上清中の炎症性タンパクの産生量を ELISA 法にて測定した。また、肺の病理組織学的変化については、HE 染色、PAS 染色を行い評価した。

4. 研究成果

(1) アトピー性皮膚炎に及ぼす影響

① Malathion

雌雄共に、Dp 投与により、耳介患部の腫脹、痂皮形成、乾燥などの症状が認められたが、いずれの用量においても Malathion 曝露による皮膚炎病態へ影響は認められなかった。

② γ -BHC

雌雄共に、Dp 投与により、耳介患部の腫脹、痂皮形成、乾燥などの症状が認められた。雌の γ -BHC 高用量曝露群(0.1 mg/kg/day)において、Dp + Vehicle 群に比し、症状の増悪傾向を認めたが、有意ではなかった(図 1(A))。一方、雄マウスでは、いずれの用量においても皮膚炎への明確な影響は認められなかった(図 1(B))。

(2) アレルギー性気管支喘息に及ぼす影響

① p,p'-DDT

雌雄共に、OVA 投与により、BALF 中の細胞数の増加を認めたが、p,p'-DDT 曝露は、いずれの用量においても、細胞数、細胞構成に明確な影響を示さなかった。

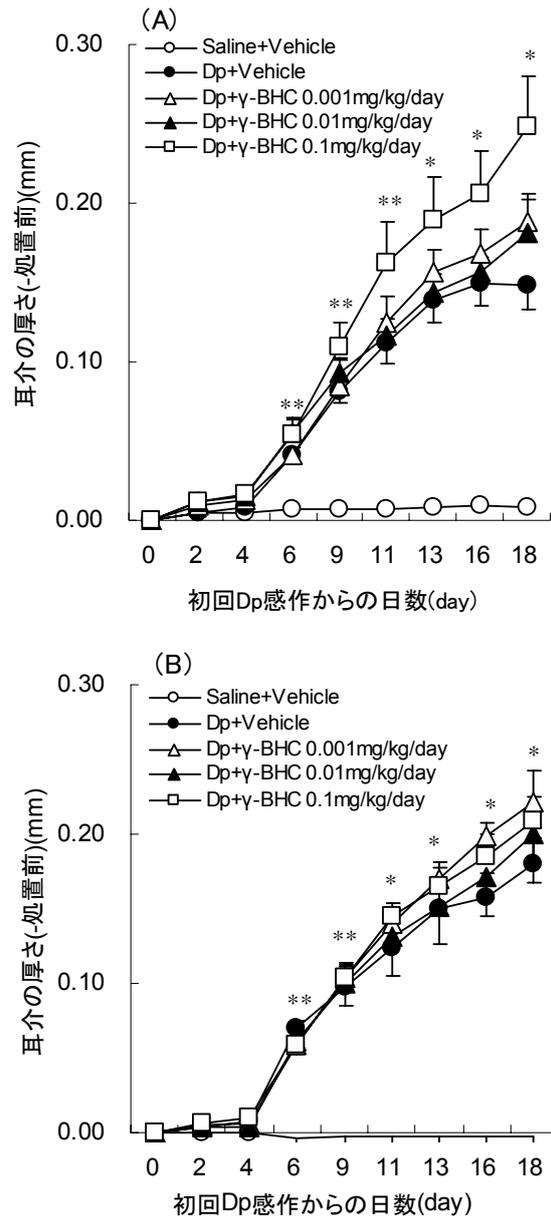


図 1. γ -BHC 曝露がアトピー性皮膚炎に及ぼす影響

(A) 雄、(B) 雌

*; $p < 0.05$, vs. Saline+Vehicle group

**; $p < 0.01$, vs. Saline+Vehicle group

② γ -BHC

雌マウスにおいて、OVA 投与により、対照群に比し、BALF 中の総細胞数の有意な増加を認め(図 2(A))、雄マウスでは、増加傾向を示した(図 2(B))。加えて、雌マウスでは、 γ -BHC 曝露により、用量依存的に BALF 中の好酸球、単球、リンパ球の細胞数が増加し、最高用量の 0.1 mg/kg/day 曝露群では、OVA+Vehicle 群に比し、有意な上昇を示した(図 3)。病理組織学的検討においても、気管支周囲に好酸球を主体とした炎症細胞浸潤が観察された。

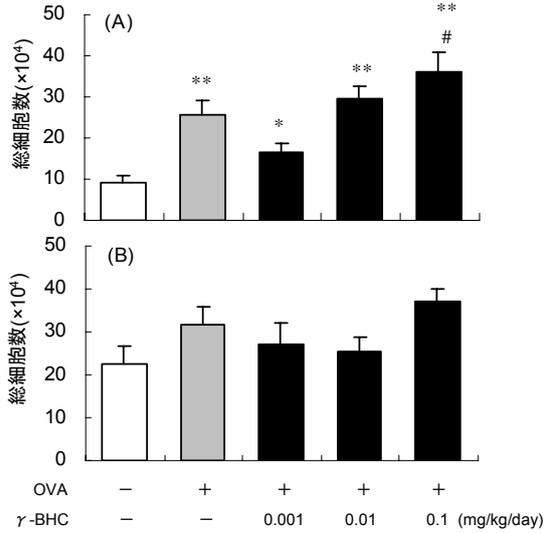


図2. γ-BHC曝露によるBALF中の総細胞数の変化

(A)雌、(B)雄

*; p<0.05 vs. PBS+Vehicle group

**; p<0.01 vs. PBS+Vehicle group

#; p<0.05 vs. OVA+Vehicle group

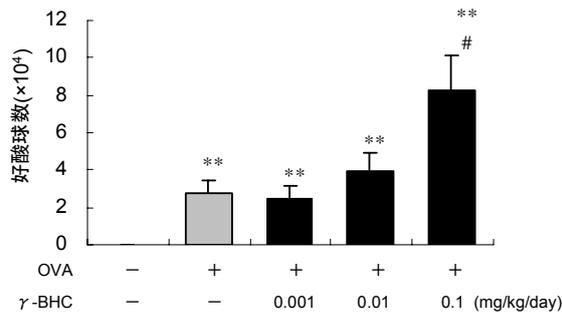


図3. γ-BHC曝露によるBALF中の好酸球数の変化

(A)雌、(B)雄

*; p<0.05 vs. PBS+Vehicle group

**; p<0.01 vs. PBS+Vehicle group

#; p<0.05 vs. OVA+Vehicle group

加えて、肺組織ホモジネート上清中のIL-13、IL-33、RANTESといったTh2サイトカインの産生が、OVA+Vehicleに比し、γ-BHC用量依存的に有意な増加を示した(図4)。一方、IFN-γ、IL-12などに代表されるTh1サイトカイン、及び血清中の抗体産生量(OVA-IgE、OVA-IgG1、OVA-IgG2a)に、γ-BHC曝露による影響は認められなかった。これより、若齢期におけるγ-BHC曝露は、アレルギー性気管支喘息モデルにおいて、炎症性因子や白血球遊走因子の発現増強といった、Th2反応を亢進することにより、病態を増悪しうる可能性が示唆された。

以上の結果から、若齢期における農薬曝露は、アレルギー性気管支喘息モデルにおいて、病態を増悪することが明らかとなった。また、

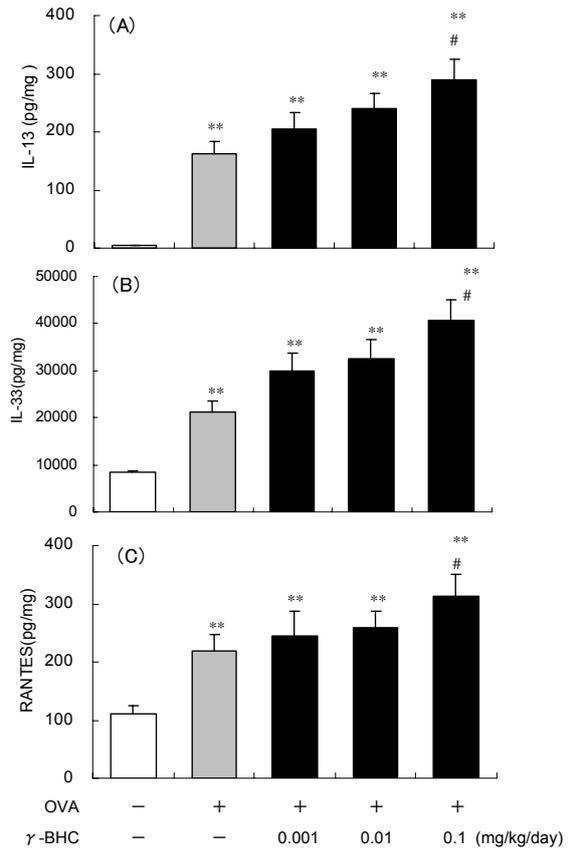


図4. γ-BHC曝露による肺組織ホモジネート上清中のタンパク発現変化

(A)IL-13、(B) IL-33、(C) RANTES

*; p<0.05 vs. PBS+Vehicle group

**; p<0.01 vs. PBS+Vehicle group

#; p<0.05 vs. OVA+Vehicle group

その影響には性差がある可能性が示唆された。一方、アトピー性皮膚炎モデルにおいては、明確な増悪影響は認められなかったが、雌において増悪傾向が認められた。

農薬曝露が、免疫・アレルギーに及ぼす影響に関する検討としては、接触性皮膚炎や抗体産生への影響が主であり、アレルギー疾患に対する影響を明らかにしたのは、本研究が初めてである。アレルギー疾患の性差については、アレルギー性鼻炎、気管支喘息は女兒に比べて男児の方が多いと言われているが、ある年齢を境に逆転するという報告もあり、その作用機構も含め、未だ不明な点が多い。

今後は、農薬曝露がアレルギー疾患に及ぼす影響について、性差による相違を念頭に置き、性ホルモンの病態増悪への関連性も含め、検討を進めていく必要がある。また、疾患の違いにより、影響が異なる点についても留意する必要がある。加えて、さらに実社会に近い曝露環境を想定し、より低用量で長期間曝露した場合の影響についても検討を加えていく必要があると考える。

5. 主な発表論文等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳澤 利枝 (YANAGISAWA RIE)
独立行政法人国立環境研究所・
環境健康研究領域・研究員
研究者番号：70391167

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし