

令和元年6月7日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11216

研究課題名(和文) 農薬の気道アレルギー増強作用の解明と新規標的分子の探索

研究課題名(英文) Study of mechanism for enhancing respiratory allergy by agricultural drugs and exploration of new target

研究代表者

久保 和彦 (Kubo, Kazuhiko)

九州大学・大学病院・特別教員

研究者番号：00419540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：PM2.5には農薬を含む環境化学因子が多く付着しているが、スギ・ヒノキ花粉症症状のうちくしゃみ、鼻みずは前日のPM2.5の飛散量が多いほど症状が強くなり、鼻茸上皮ではAhR発現細胞が多いほど好酸球遊走因子Eotaxin-1を発現する細胞が多いことを見出した。気道のうち咽頭・喉頭の構成細胞である扁平上皮細胞の増殖をある種の農薬が増強することが分かり、in vitroでの新規標的分子の探索のための系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、日本人の気道アレルギーとして最多のスギ・ヒノキ花粉症がPM2.5によって増悪すること、そしてヒトでの鼻組織にて実際に環境化学因子の受容体であるAhRとアレルギー増強要因の好酸球遊走因子Eotaxin-1の関連していることを初めて示した。また、培養細胞を用いてそのスクリーニング系を確立するための基礎実験を終了した。このことは、今後の研究継続の意義を強めたとともに、将来農薬の安全なスクリーニング法を完成させるための1歩を踏み出したといえる。

研究成果の概要(英文)：Many environmental chemicals including agricultural drugs binds to PM2.5. Amount of PM2.5 correlated the number of sneezing and the volume of nasal discharge positively in the patients with pollinosis for japanese cedar or cypress. In addition, the number of cells expressing AhR correlated those expressing eotaxin-1 positively. Some pesticides enhanced the ability of proliferation in human squamous cell carcinoma cells, and We developed the in vitro system for the exploration of new targets for biological evaluation of agricultural drugs.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：農薬 アレルギー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患は世界中で増加しており、その対策は喫緊の課題である。疾病は遺伝要因と環境要因によって起こるが、環境要因の一つである環境化学因子は生体に種々の影響をもたらすことが知られている。環境化学因子の代表である大気汚染、特にディーゼル排気中微粒子の気道アレルギー増強作用は詳しく解明されてきたが、一方で農薬の気道アレルギー増加に関しては疫学的証拠があるにもかかわらず、そのメカニズムは全く解明されていない。食の安全は生命の維持に直結する重要な問題で、農業使用が食糧生産につながっている現代においては、安全な農薬かどうかのスクリーニングは極めて重要な課題であるが、従来の毒性試験(致死率、催奇形性)によってしか安全性評価がなされていないという現実がある。

1997年環境ホルモン問題が日本で初めてクローズアップされて以降、化学物質の安全性評価が従来の毒性試験だけではカバーしきれないことが判明した。我々もビスフェノールAが日常使用濃度で脳と行動の性差を変化させることを報告し、脳機能評価の重要性を訴えてきた。アレルギーについても環境ホルモン物質による免疫応答異常が報告され、化学物質の安全性評価としてアレルギー評価を加えることが必要と指摘されている。

2. 研究の目的

前述のような背景の中ではあるが、化学物質のアレルギーに関する安全性スクリーニング法は全く存在しない。アレルギーに関与する細胞や部位が多彩であることが一つの原因と考えられるため、*in vitro* 実験および *n vivo* 実験を組み合わせることで農薬の気道アレルギー増強作用の解明およびその新規標的分子を探索し、今後の新規安全性スクリーニング法を確立することが社会的に求められている。本研究は、その礎となるべきものとして、日本人に最も多いアレルギー疾患であるスギ・ヒノキ花粉症に関する疫学調査やヒト組織における変化の調査と、培養細胞を用いた農薬の安全性スクリーニング法確立のための基盤づくりを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒトのスギ・ヒノキ花粉症における環境化学因子の影響

昨今天気予報で出てくるPM2.5には農薬や発がん物質など、数多くの環境化学因子が付着していることが知られている。以前から、PM2.5が多いと花粉症がひどくなるという都市伝説が存在していたが、実際に関連を調べた研究は存在しなかった。そのため、RAST検査にてスギ花粉特異的IgEを有しており、本研究に書面同意した21名を対象に、2017年2~4月の3か月間毎日症状日記をつけてもらった。症状の程度は、鼻アレルギー診療ガイドライン2016年版に従って、5段階評価とした。同時に、インターネット上で福岡市におけるPM2.5および窒素酸化物(NOx)の飛散量を毎日モニタリングし、その相関関係を検討した。

(2) *in vitro* スクリーニング系の確立

上気道の中で鼻と咽頭・喉頭はそれぞれ線毛円柱上皮と扁平上皮からなっており、上皮細胞の性質が全く違うためそれぞれに対してスクリーニング系を確立する必要がある。そのため、当初予定していたラット好塩基球由来細胞RBL-2H3細胞だけでなく、ヒト舌がん細胞SCC-9細胞も使用することとした。RBL-2H3はMEM培地で、SCC-9細胞はDMEM/F-12培地で培養し、ネオニコチノイド系農薬(アセタミプリド、ジノテフラン、イミダクロプリド、クロルチアニジン)、ピレスロイド系農薬(シベルメトリン)、トリブチルスズ(TBT)を添加して、細胞増殖に及ぼす影響を検討した。増殖能はPremix WST-1 Cell Proliferation Assay System(タカラバイオ社)を用い、経時的に蛍光プレートリーダーで計測した。

(3) ヒト鼻ポリープにおけるアレルギー反応と環境化学因子の関連

以前に手術にて摘出していた鼻ポリープ病理切片を用いて、組織中のAryl Hydrocarbon Receptor(AhR)やEotaxin-1の発現様式を免疫組織学的に評価し、生体情報(血中好酸球数、副鼻腔CT)との相関を比較検討した。個人情報は一切他に漏れないように管理した。

(4) 海外における研究動向調査

本研究領域は国内での情報収集には非常に限界があるため、海外の学会において情報収集する必要がある。そのため、欧州毒性学会EUROTOX2017に参加した。

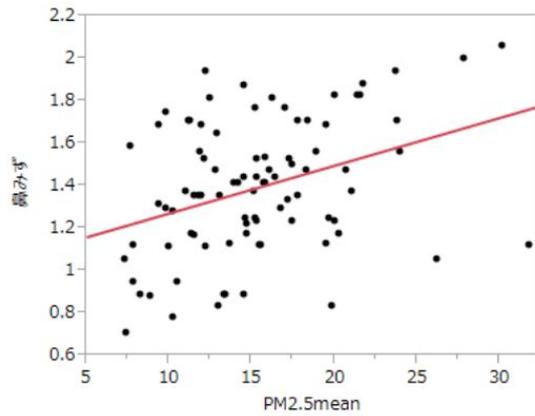
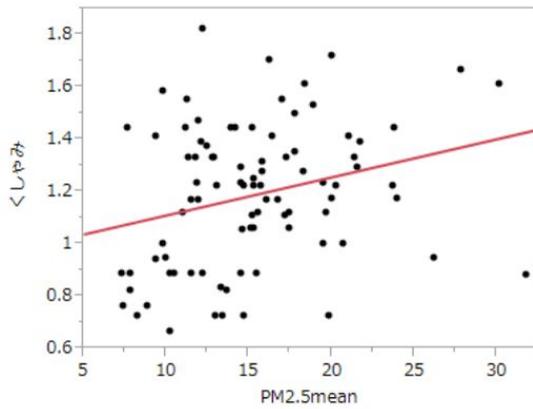
4. 研究成果

(1) ヒトのスギ・ヒノキ花粉症における環境化学因子の影響

2017年に福岡市内で観測されたスギ花粉は1730個、ヒノキ花粉は4815であった。単回帰分析では、下図のようにくしゃみ、鼻みず、日常生活の支障度は前日のPM2.5飛散量と有意な正の相関がみられたが、鼻づまりに関しては有意な相関関係は見られなかった。重回帰分析を行ったところ、くしゃみと鼻みずは有意な相関関係を示したが、日常生活の支障度は有意な相関を示さなかった。一方、NOxはいずれのパラメーターとも有意な相関を認めなかった。

これらの結果は、農薬を含む種々の環境化学因子が結合しているPM2.5がアレルギー性鼻炎症状の中でもくしゃみ、鼻みずといった即時型の反応を増悪させること、また、その増悪は可逆性であることを示している。本研究によって、PM2.5がスギ・ヒノキ花粉症を直接増悪させ

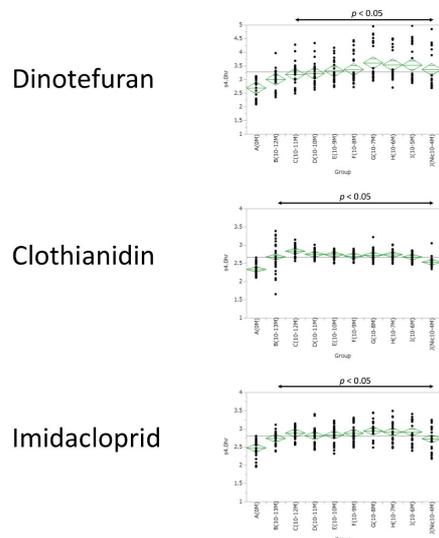
る世界初の証拠を見出した。



(2) in vitro スクリーニング系の確立

上気道のうち咽頭・喉頭は扁平上皮である。そのため、ヒト舌がん細胞 SCC-9 細胞に対してネオニコチノイド系農薬（アセタミプリド、ジノテフラン、イミダクロプリド、クロルチアニジン）、ピレスロイド系農薬（シペルメトリン）、トリブチルスズ（TBT）を $10^{-12}M \sim 10^{-5}M$ の濃度で添加して 3 日後の細胞増殖能を検討したところ、ジノテフラン、クロルチアニジン、イミダクロプリドは SCC-9 細胞の増殖をニコチン同様に促進した。アセタミプリド、シペルメトリンは増殖を促進せず、TBT は細胞障害性が極めて高かった。一方、ラット好塩基球由来細胞 RBL-2H3 細胞の増殖にはいずれの農薬も影響しなかった。

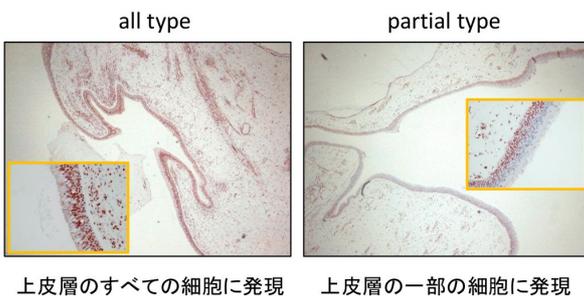
今後は、3 種の農薬がどのようなメカニズムで SCC-9 細胞を増殖させたのかを分子生物学的に検討するとともに、RBL-2H3 細胞の脱顆粒に対する各農薬の影響を評価していきたい。



(3) ヒト鼻ポリープにおけるアレルギー反応と環境化学因子の関連

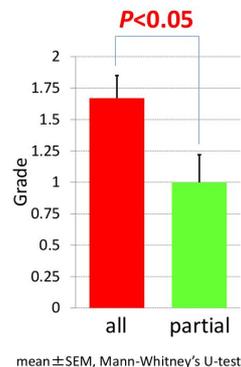
ヒト鼻ポリープ標本を手に入れることができるのは耳鼻咽喉科医であることから、貴重なヒト組織を無駄にせず研究に用いさせていただくことは非常に重要である。ヒト鼻ポリープにおける AhR の発現様式は上皮のすべての細胞に発現している all type と上皮の主に基底膜側のみに発現している partial type に分けられることが分かった。この all type と partial type では血中好酸球数も好酸球比率も、また副鼻腔 CT 所見である Lund-Mackay スコアにも有意な差はなく、2 つに区別される要因は見いだせなかった。しかし、Eotaxin-1 の発現様式をスコア化して両群で比較すると、all type の方が partial type よりも有意に Eotaxin-1 を発現している細胞が多かった。これまでにヒトの鼻内においてある種の農薬を含む環境化学因子と好酸球遊走因子に関する研究報告はなく、本研究によって、AhR のリガンドになりうる環境化学因子は好酸球炎症を増悪させる可能性を見出した。今後は AhR を発現する細胞が多いと、なぜ Eotaxin-1 を発現する細胞が多くなるのか、これらの細胞は同一なのか異なっているのか、さらに詳細に検討していきたい。

Two patterns of AhR expression in the epithelial layer



AhR vs Eotaxin-1

eotaxin (FL-97) : sc-28878 Santa Cruz Biotech. x200	
Grade	上皮層の染色パターン
Grade 1	ほとんど発現していない
Grade 2	一部の細胞が発現
Grade 3	ほとんどの細胞が発現



mean ± SEM, Mann-Whitney's U-test

(4) 海外における研究動向調査

EUROTOX2017 の演題を見ると、農薬は諸外国においても重要な研究テーマであるが、農業従事者の曝露実態、一般毒性試験結果、生殖毒性などの臓器別試験結果の報告やそのメカニズムを解明する分子生物学的研究結果は多くあるにもかかわらず、気道アレルギーに関する報告はほとんどなかった。ヒトの疫学、ヒト組織を用いた本研究が世界の中では独創的な研究であることが裏付けられたと同時に、当該分野の重要性を広く国内外に訴えていく必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

久保和彦:めまいと環境 めまいと環境化学物質 .Equilibrium Research 76(3):139-145, 2017 .

〔学会発表〕(計 4 件)

(1)久保和彦:ヒト鼻茸における AhR と eotaxin の発現、第 48 回日本職業・環境アレルギー学会、2017 年 .

(2)久保和彦:アレルギー性鼻炎と PM2.5、第 20 回環境ホルモン学会、2017 年 .

(3)久保和彦、村上大輔、中川尚志:アレルギー性鼻炎症状と大気汚染の関係、第 36 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2018 年 .

(4)久保和彦:ネオニコチノイド農薬の舌がんに及ぼす影響評価は本学会の対象か?、第 21 回環境ホルモン学会、2018 年 .

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:村上 大輔

ローマ字氏名:Murakami Daisuke

所属研究機関名:九州大学

部局名:大学病院

職名:助教

研究者番号(8桁):80568965

(2)研究協力者

なし

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。