

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00861

研究課題名(和文)食品中化学物質と細菌性毒素の複合暴露による生体影響とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文) Toxic effects of combined exposure to food chemicals and bacterial toxin

研究代表者

増田 修一 (Masuda, Shuichi)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：40336657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、各種化学物質および病原性細菌の複合暴露による、化学的および生物学的毒性の変動・影響について明らかにすることを目的に研究を行った。その結果、病原性細菌である黄色ブドウ球菌およびその菌体外成分といくつかの化学物質の複合暴露により、化学物質のDNA損傷性および変異原性が増強した。また、黄色ブドウ球菌に化学物質を暴露することにより、黄色ブドウ球菌の毒素産生やバイオフィルム形成等の病原因子の発現が増強した。これら化学物質暴露時の黄色ブドウ球菌の病原因子の発現は、培地条件下と生体内では異なることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果より、病原性細菌である黄色ブドウ球菌およびその菌体外成分と化学物質の複合暴露により、それぞれの生物学的および化学的毒性が変動することを明らかにした。化学物質および細菌性毒素の複合暴露により惹起される生体影響を評価することにより、総合的なリスク削減対策において、有用な基礎的知見を提供することができる。今後の更なる研究により、それぞれの生物学的および化学的毒性の変動を誘導する因子を解明することで、両リスクが誘導する各種疾病に対する治療法や予防法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, the toxic effects of combined exposure to various chemicals and pathogenic bacteria were examined. As a result, combined exposure of the pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus* and its extracellular components to several chemicals enhanced the DNA damage and mutagenicity of the chemicals. Also, exposure of *S. aureus* to chemicals enhanced the expression of pathogenic factors such as toxin production and biofilm formation of *S. aureus*.

研究分野：食品衛生学

キーワード：化学物質 黄色ブドウ球菌 複合暴露 遺伝毒性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食品中化学物質の生体影響を評価する場合、我々は日常的に、病原性細菌等の化学物質以外の因子の影響を受けており、それらの存在と影響についても考慮すべきである。近年、糖尿病、感染症、皮膚炎等は、ヒトの細菌叢に異常をきたし、病原性細菌が極端に増加することにより発症することが報告されているが、その増加メカニズムについては明らかにされていない。しかし、一部の病原性細菌が増加する原因のひとつとして、化学物質による免疫系の異常反応が考えられる。また、いくつかの化学物質 (Edwards *et al.*, 1993; Laskin *et al.*, 1995) と細菌性毒素 (Ramachandran, 2014) は、ともにサイトカインの分泌亢進やそれに伴う慢性皮膚炎等の症状の悪化に関与しており、両者が共通の経路を介して生体に対して悪影響を誘導する可能性が考えられる。したがって、複数の化学物質や細菌性毒素に同時に暴露されることで、両者の毒性が増強することが考えられ、そのリスク評価系を新たに構築する必要がある。

2. 研究の目的

食環境中に存在するリスク因子には、有害化学物質等の化学的リスク因子と病原性細菌等の生物学的リスク因子がある。食環境中には、これら両リスク因子が共存していることから、両者が共存した際のリスクを評価する必要がある。しかし、両者の複合暴露による各毒性発現の変動については明らかになっていない。そこで、本研究では、食品中化学物質および細菌性毒素の同時暴露による毒性の変動・影響を検討する新たな評価系の構築に向けた知見の取得を目指して、各種化学物質および病原性細菌の複合暴露による、化学的および生物学的毒性の変動・影響について解析した。化学的リスク因子の毒性評価として、細菌性毒素との複合暴露による化学物質の遺伝毒性の変動について調べた。また、生物学的リスク因子の評価として、化学物質暴露時における黄色ブドウ球菌の病原因子への影響について解析した。

3. 研究の方法

(1) 化学物質が誘導する DNA 損傷性に及ぼす黄色ブドウ球菌の病原因子の影響

C57BL6/J マウスから脾臓細胞を採取し、脾臓細胞希釈液 (1×10^7 cell/mL) に acrylamide (AA) 溶液および staphylococcal enterotoxin A (SEA) を、それぞれ終濃度が 15 mM、50 ng/mL となるように添加した後、37°C、5% CO₂ で 16 時間培養し、細胞試料とした。AA の DNA 損傷性に及ぼす SEA の影響を通常のコメットアッセイおよび Fpg 添加コメットアッセイ法にて評価した。スライド 1 枚につき、細胞 50 個をカウントし、Tail moment、Tail length および %Tail DNA を求めた。なお、各動物実験は、静岡県公立大学法人静岡県立大学における動物実験の指針 (承認番号 175160、185183 および 195227) に従い実施した。

(2) 化学物質の変異原性に及ぼす黄色ブドウ球菌菌体外成分の影響

Salmonella typhimurium TA 98 株および TA 100 株 (\pm S9mix) によるエームス試験を用いて、化学物質の変異原性に及ぼす黄色ブドウ球菌の培養上清 (3 kDa 以上および以下) の影響について検討した。TA98 株用の陽性対照として、MeIQx (+S9 mix 用)、2-nitrofluorene (-S9 mix 用)、TA100 株用の陽性対照として、sodium azide (+S9 mix 用)、2-aminoanthracene (-S9 mix 用) を用いた。

(3) 黄色ブドウ球菌の病原因子の発現に及ぼす化学物質の影響

黄色ブドウ球菌 SEA 産生株に 8 種の化学物質を暴露して 37°C で培養し、SEA 遺伝子 (リアルタイム RT-PCR) およびバイオフィルム形成 (クリスタルバイオレット染色法) に及ぼす影響を調べた。黄色ブドウ球菌と複合暴露させる食環境中に存在する化学物質として、AA、glycidamide (GA)、*N*-dimethylnitrosamine (NDMA)、2-amino-1-methyl-6-phenyl-1H-imidazo [4,5-b] pyridine (PhIP)、2-amino-3,8-dimethyl-3H-imidazo [4,5-f] quinoxaline (MeIQx)、bisphenol A (BPA) および nonylphenol (NP) を用いた (図 1)。

(4) 血清 (FBS) 中の黄色ブドウ球菌の病原因子発現に及ぼす化学物質の影響

より生体内に近い条件下で病原性細菌の生体内における毒性を評価するために、黄色ブドウ球菌を FBS 中で培養し、各種化学物質が病原因子関連遺伝子の発現および β -hemolysin 活性 (溶血活性) に及ぼす影響について解析した。

(5) 黄色ブドウ球菌の毒素 (SEA) 産生量に及ぼす化学物質の影響

黄色ブドウ球菌 SEA 産生株に AA を暴露して 37°C で培養し、SEA 産生量の変動を Western blot 解析を用いて調べた。また、菌株間で、AA の暴露が SEA 産生量に及ぼす影響が異なる可能性を配慮して、ヒト由来 SEA 産生株 10 菌株について、Western blot 解析を用いて、AA 暴露時の SEA 産生量を比較した。

4. 研究成果

(1) 化学物質が誘導する DNA 損傷性に及ぼす黄色ブドウ球菌の病原因子の影響

マウス脾臓細胞に AA および SEA を複合暴露した際の DNA 損傷性の変動について、コメットアッセイを用いて評価した。SEA 単独暴露においては、Tail moment、Tail length および % Tail

DNA に変化は認められなかった。一方、AA および SEA を複合暴露した脾臓細胞では、コントロール（滅菌水）と比較して、Tail moment および Tail length が有意に増強し、% Tail DNA においては増強傾向が認められた (data not shown)。AA と SEA の複合暴露が AA の毒性変動に及ぼす影響について、より詳細に明らかにするために、マウス脾臓細胞に AA および SEA を複合暴露した際の DNA 損傷性を Fpg 添加コメットアッセイを用いて評価した。その結果、Fpg を添加することにより、検出感度が約 2.5 倍増加し、AA および SEA を複合暴露した脾臓細胞において、コントロール（滅菌水）と比較して、Tail moment、Tail length および % Tail DNA が有意に増強した (図 2)。また、AA 単独暴露と比較しても、AA および SEA を複合暴露した脾臓細胞において、Tail moment、Tail length および % Tail DNA が有意に増強した (図 2)。これらの結果より、化学物質および細菌性毒素の複合暴露により、化学物質の遺伝毒性が増強する可能性が示唆された。

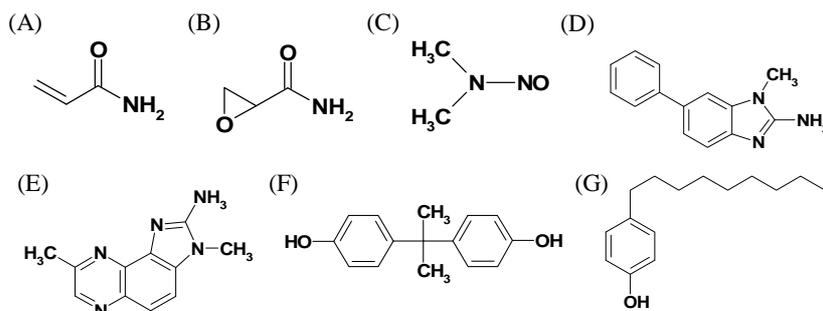


図 1: 本研究で用いた化学物質の構造

(A) acrylamide (AA), (B) glycidamide (GA), (C) *N*-dimethylnitrosamine (NDMA), (D) 2-Amino-1-methyl-6-phenyl-1H-imidazo [4,5-b] pyridine (PhIP), (E) 2-Amino-3,8-dimethyl-3H-imidazo [4,5-f] quinoxaline (MelQx), (F) bisphenol A (BPA), (G) nonylphenol (NP).

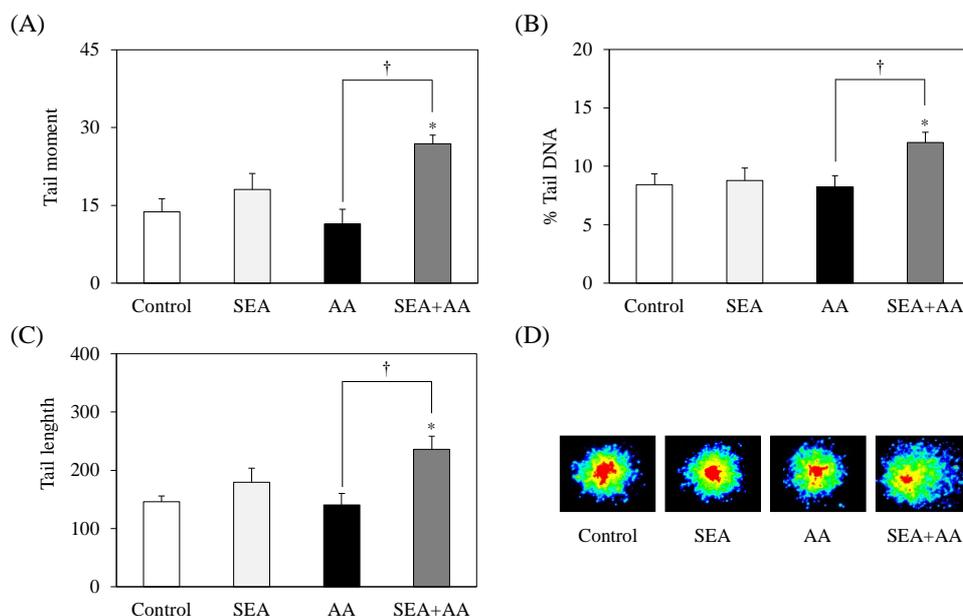


図 2: 化学物質が誘導する DNA 損傷性に及ぼす黄色ブドウ球菌の病原因子の影響

(A) Tail moment, (B) Tail length, (C) % Tail DNA, (D) Cells containing DNA strand breakage (with long tails). *Represents $p < 0.05$ compared to the control. † $p < 0.01$; unpaired, two-tailed student's t-test ($n=3$).

(2) 化学物質の変異原性に及ぼす黄色ブドウ球菌菌体外成分の影響

化学物質の変異原性に及ぼす黄色ブドウ球菌の培養上清の影響について調べた。その結果、TA 98 株の ± S9mix および TA 100 株の +S9mix 条件下においては、それぞれ MelQx、2-NF および 2-AA の遺伝毒性を増強する効果は見られなかった (図 3 (A-C))。一方、TA 100 株の -S9mix 条件下においては、培養上清の 3 kDa 以上の画分に変異原性は見られなかったが、AZS との複合暴露により、復帰変異コロニー数が増加した (図 3 (D))。これらの結果より、黄色ブドウ球菌の培養上清は、AZS の変異原性を増強したと考えられた。

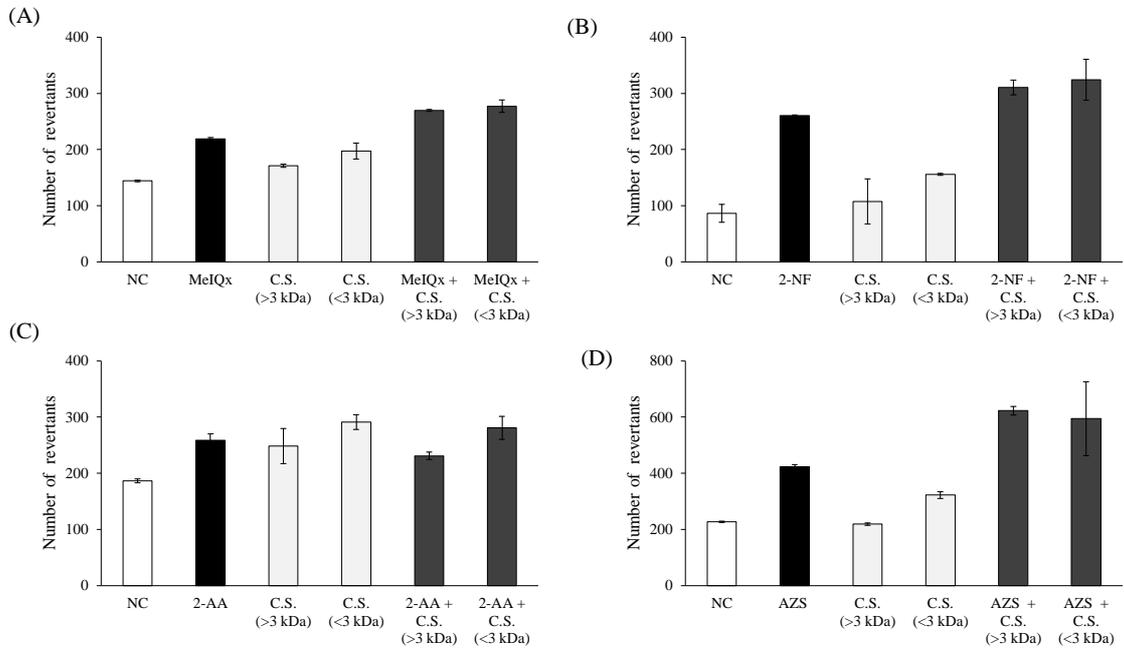


図 3: 化学物質の変異原性に黄色ブドウ球菌菌体外成分が及ぼす影響
 (A) *Salmonella typhimurium* TA 98 株, +S9 mix, (B) *Salmonella typhimurium* TA 98 株, -S9 mix, (C) *Salmonella typhimurium* TA 100 株, +S9 mix, (D) *Salmonella typhimurium* TA 100 株, -S9 mix.

(3) 黄色ブドウ球菌の病原因子の発現に及ぼす化学物質の影響

各種化学物質暴露時における黄色ブドウ球菌の SEA 遺伝子の mRNA 発現量の変動について検討したところ、暴露した全ての化学物質において SEA 遺伝子の発現量が増加する傾向が認められた (図 4 (A))。また、化学物質暴露が黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成に及ぼす影響について、クリスタルバイオレット染色法を用いて評価したところ、GA、BPA、NP および PhIP を暴露した菌体においては、有意な変動は認められなかったが、AA および NDMA の暴露により、バイオフィーム形成量が有意に増加した (図 4 (B))。

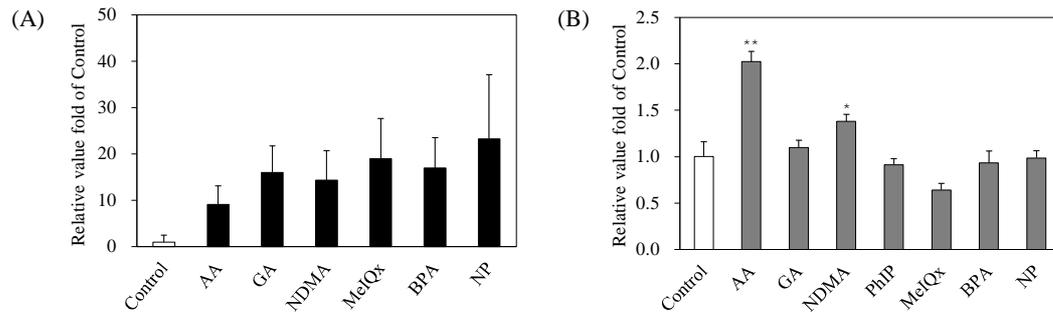


図 4: 黄色ブドウ球菌の病原因子の発現に化学物質が及ぼす影響
 (A) Staphylococcal enterotoxin A 遺伝子の発現量に化学物質が及ぼす影響, (B) 黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成に化学物質が及ぼす影響. *Represents $p < 0.05$ compared to the control, **represents $p < 0.01$ compared to the control.

(4) 血清 (FBS) 中の黄色ブドウ球菌の病原因子発現に及ぼす化学物質の影響

黄色ブドウ球菌と各種化学物質を FBS 中で培養し、病原因子関連遺伝子の発現量を測定した。その結果、AA の暴露により、黄色ブドウ球菌の病原因子を調節する small RNA である RNAIII およびバイオフィーム関連遺伝子の *icaA* の発現量が有意に増加し (図 5 (A), (B))、ヘテロサイクリックアミンの一種である PhIP または MeIQx の暴露により、SEA 産生量が増加した (図 5 (C))。また、FBS 中で BPA および PhIP を暴露した一部のコロニーには、溶血活性 (ハロー) が認められた (図 6)。これらの結果より、培地条件下と生体内では、黄色ブドウ球菌の病原因子の発現調節機構が異なることが示唆された。

(5) 黄色ブドウ球菌の SEA 産生量に及ぼす化学物質の影響

黄色ブドウ球菌 SEA 産生株に AA を暴露した後、SEA 産生量の変動を調べたところ、3 mM の AA 添加により、SEA 産生量が有意に増加した (図 7 (A))。また、ヒト由来 SEA 産生株 10 菌株を用

いて、同様に AA (3 mM) 添加による SEA 産生量を調べたところ、全ての菌株で SEA 産生量の増加が認められた (図 7 (B)) が、菌株ごとに増加の程度は異なっており、AA 未添加時の菌株の SEA 産生量との相関は認められなかった (図 7 (C))。これらの結果より、菌株の種類によっても化学物質への応答機構が異なる可能性が示唆された。今後の更なる研究により、それぞれの生物学的および化学的毒性の変動を誘導する因子を解明することにより、両リスクが誘導する各種疾病に対する治療法や予防法の開発に繋がることが期待される。

< 引用文献 >

- Edwards *et al.*, *Toxicol. Appl. Pharm.*, 119, 1993, 275-2791.
 Laskin *et al.*, *Hepatology*, 21, 1995, 1045-1050.
 Ramachandran, *Virulence*, 5, 2014, 213-218.

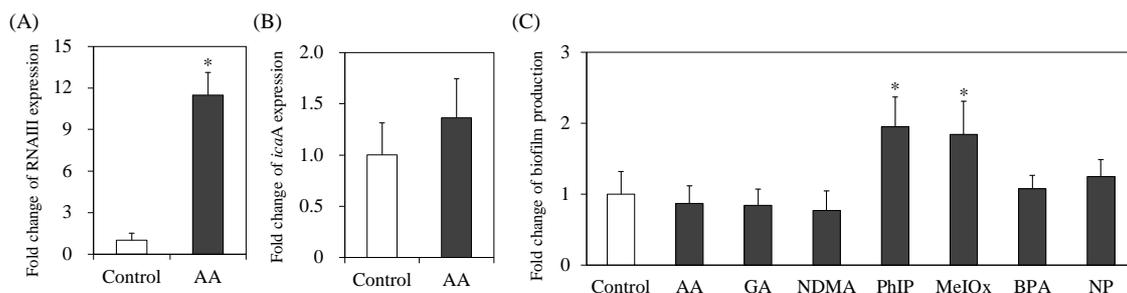


図 5: 血清中の黄色ブドウ球菌の病原因子発現に及ぼす化学物質の影響 (A) RNAIII の発現に AA が及ぼす影響, (b) *icaA* の発現に AA が及ぼす影響, (C) 血清中の黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成に化学物質が及ぼす影響. * represents $p < 0.05$ compared to control.

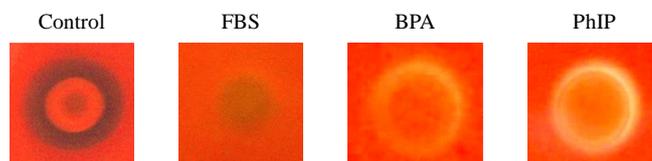


図 6: 血清中の黄色ブドウ球菌の溶血活性に及ぼす化学物質の影響 Control: β -ヘモリジン産生株, FBS: 化学物質未添加. 血清 (FBS) 中に BPA または PhIP を添加して黄色ブドウ球菌を培養した後, 菌体の溶血活性を測定した.

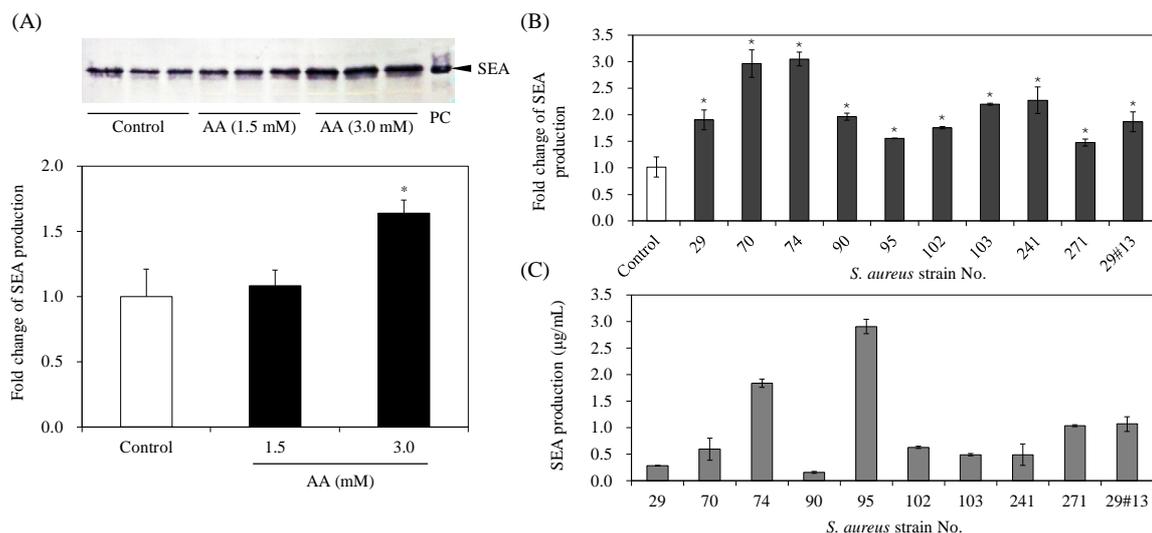


図 7: 黄色ブドウ球菌の SEA 産生量に及ぼす化学物質の影響 (A) AA の暴露が黄色ブドウ球菌 No.29 株の SEA 産生量に及ぼす影響, PC; positive control (SEA protein), (B) 黄色ブドウ球菌 SEA 産生株における SEA 産生量に及ぼす AA の影響の比較, (C) 黄色ブドウ球菌 SEA 産生株における SEA 産生量の比較 (AA 未添加). グラフは Western blot 解析の結果を数値化したものを示す. * represents $p < 0.05$ compared to control.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shimamura Y, Utsumi M, Hirai C, Kurokawa A, Kan T, Ohashi N, Masuda S.	4. 巻 25(8)
2. 論文標題 Effect of (-)-epigallocatechin gallate to staphylococcal enterotoxin A on toxin activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25081867	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Inagaki R, Uchino K, Shimamura Y, Masuda S.	4. 巻 6(1)
2. 論文標題 Investigation of DNA damage of glycidol and glycidol fatty acid esters using Fpg-modified comet assay.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fundam. Toxicol. Sci.	6. 最初と最後の頁 9-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2131/fts.6.9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 2. Shimamura, Y., Utsumi, M., Hirai, C., Nakano, S., Ito, S., Tsuji, A., Ishii, T., Hosoya, T., Kan, T., Ohashi, N., Masuda. S	4. 巻 23(5)
2. 論文標題 Binding of Catechins to Staphylococcal Enterotoxin A	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules23051125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀池 隼雄, 島村 裕子, 増田 修一
2. 発表標題 病原性細菌および化学物質の複合暴露による生物学的・化学的毒性の変動
3. 学会等名 第115回日本食品衛生学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀池 隼雄, 油井 拓哉, 島村 裕子, 増田 修一
2. 発表標題 化学物質および病原性細菌の毒性変化に及ぼす複合暴露の影響
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 油井 拓哉, 内海 未央, 島村 裕子, 増田 修一
2. 発表標題 各種化学物質および病原性細菌の同時暴露がそれぞれの毒性変化に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 油井 拓哉, 島村 裕子, 大橋 典男, 増田 修一
2. 発表標題 化学物質と細菌性毒素の同時暴露による毒性の変動
3. 学会等名 第46回日本環境変異原学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	島村 裕子 (Shimamura Yuko) (60452025)	静岡県立大学・食品栄養科学部・助教 (23803)	