

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32305  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2018～2021  
課題番号：18K02259  
研究課題名(和文)洗濯用合成洗剤の主要成分であるアルキルベンゼンスルホン酸の免疫に対する影響解析

研究課題名(英文)Effect of alkylbenzene sulfonate, the major component of synthetic laundry detergent, on immunity

研究代表者  
田中 進 (TANAKA, Susumu)  
高崎健康福祉大学・健康福祉学部・教授

研究者番号：70348142  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：免疫抑制剤の標的酵素であるカルシニューリン(CN)を阻害する物質として同定した直鎖アルキルベンゼンスルホン酸(LAS)は、陰イオン界面活性剤であり洗濯用合成洗剤の主要成分でもある。本研究では標準品のC12-LASがヒトCNを阻害すること、ヒト白血病T細胞株Jurkat細胞においてIL-2 mRNAの発現を抑制すること、また胃癌細胞株のPGE2産生を抑制することを示した。次に市販の陰イオン界面活性剤14種類を用いてヒト肺線維芽細胞WI-38、WI-38 VA13およびJurkat細胞に対する毒性作用を評価し、一部のスルホン酸塩についてJurkat細胞のIL-2産生に対する影響を検討した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

LASは陰イオン界面活性剤であり、洗濯用合成洗剤の主要成分でもある。一方、ホスホプロテインホスファターゼの一つであるCNは細胞性免疫に関与する酵素として知られている。従って、CNを阻害するLASは、細胞性免疫に影響を与えることが懸念される。本研究では、標準品のC12-LASを用いて、遺伝子レベル、酵素レベル、細胞レベルにおいて、細胞性免疫や炎症に与える影響を検討した。また、日常で流通・使用されている市販の陰イオン界面活性剤14種類に範囲を広げて、WI-38、WI-38 VA13およびJurkat細胞に対する毒性作用を検討し、一部のスルホン酸塩について細胞性免疫に対する影響を検討した。

研究成果の概要(英文)：Linear alkylbenzene sulfonate (LAS) is an anionic surfactant and the main component of synthetic laundry detergents. It inhibits the activity of calcineurin (CN), which is the target enzyme for immunosuppressive drugs.

This study showed that sodium linear dodecylbenzenesulfonate standard (C12-LAS) inhibits the activity of recombinant human CN. It suppresses the expression of IL-2 mRNA through transcription factors in Jurkat cells (immortalized human T lymphocytes) and suppresses the production of PGE2 in gastric cancer cell lines. The toxic effects on WI-38 cells (human lung fibroblasts), WI-38 VA13 cells (SV40 virus-transformed derivative of WI-38), and Jurkat cells were assessed using 14 commercially available anionic surfactants. We also examined the effects of some sulfonate compounds on IL-2 production in Jurkat cells.

研究分野：栄養生化学

キーワード：直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 陰イオン界面活性剤 カルシニューリン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ホスホプロテインホスファターゼの一つであるカルシニューリン (CN) は、PP2B と呼ばれ、カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) /カルモジュリン (CaM) 依存性のセリン/トレオニンホスファターゼとして知られている。CN は下等真核生物から植物・動物を含む高等真核生物に至る細胞に存在しており、様々な細胞機能において重要な役割を果たしている。特にヒトでは一酸化窒素 (NO) 合成、心肥大の制御、興奮性神経細胞死やアルツハイマー病で観察される異常にリン酸化されたタウタンパク質の形成などに CN が関与している報告がある。また CN は、T 細胞においてインターロイキン-2 (IL-2) mRNA の発現を制御する転写調節因子の一つであるリン酸化 nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 (リン酸化 NFATc1) を脱リン酸化型に変換することで IL-2 mRNA の発現を上昇させることから、細胞性免疫に関与する酵素として知られている。免疫抑制剤として臨床で使用されているシクロスポリンやタクロリムス (FK506) はそれぞれシクロフィリンや FK506 結合タンパク質 (FKBP) といった結合タンパク質 (イムノフィリン) を介して間接的に CN を阻害することから、CN は免疫抑制剤の標的酵素となっている。

先行研究において、我々は CN のホスファターゼ活性を阻害する物質をスクリーニングしていく過程で、日常で流通・使用されているプラスチック・ゴム製品の溶出物から複数の CN 活性阻害物質を見出した。その一部の構造解析を行ったところ、阻害物質は洗濯用合成洗剤の主要成分として我々の生活に密接に関係する物質であり、また環境汚染物質としても知られている直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS) の同族異性体であった (図 1)。従って、CN は細胞性免疫に関わる酵素であることから、LAS はヒトの免疫系に影響を与えることが懸念された。

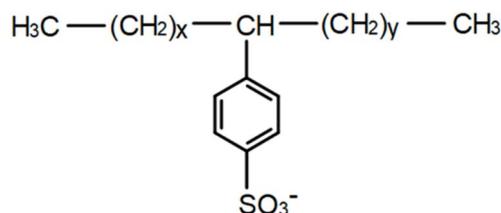


図1 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS)  
X+Yは7以上11以下で、且つXは0以上で、Yは11以下である。

### 【参考文献】

- ・ Ito N, Shibuguchi N, Ishikawa R, Tanaka S, Tokita Y, Nakajima-Shimada J, and Hosaka K : Identification of alkylbenzene sulfonate surfactants leaching from an acrylonitrile butadiene rubber as novel inhibitors of calcineurin activity. *Biosci Biotechnol Biochem* **77(5)**:954-960, 2013 doi: 10.1271/bbb.120902. Epub 2013 May 7.
- ・ Rusnak F and Mertz P. : Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* **80(4)**:1483-1521, 2000 doi: 10.1152/physrev.2000.80.4.1483.

### 2. 研究の目的

CN 活性を阻害する化合物の一つとして同定した LAS は陰イオン界面活性剤の一つあり、日常で使用されている洗濯用合成洗剤の主要成分でもある。本研究では標準品の C<sub>12</sub>-LAS および合成洗剤、シャンプー、化粧品などに使用されている市販の陰イオン界面活性剤にも範囲を広げ、細胞性免疫、炎症に対する影響解析を酵素レベル、遺伝子レベル、細胞レベルにより検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) リコンビナントヒト CN (rhCN) に対する C<sub>12</sub>-LAS の影響

酵素反応溶液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 0.025% NP-40) に、それぞれ 50 U の rhCN と 0.25 μM CaM を添加したものを標準酵素反応液とした。これに任意の濃度の、C<sub>12</sub>-LAS や類縁化合物をそれぞれ加え、基質として 150 μM の R<sub>1</sub> リン酸化ペプチド (Asp-Leu-Asp-Val-Pro-Ile-Pro-Gly-Arg-Phe-Asp-Arg-Arg-Val-pSer-Val-Ala-Ala-Glu) を添加し、30、60 分間、酵素反応を行った。60 分後、この溶液の 2 倍量のマラカイトグリーンを添加し、酵素反応の結果、生成したリン酸を波長 620 nm の吸光度を測定することにより、CN のホスファターゼ活性を求めた。

#### (2) ヒト白血病 T 細胞株 Jurkat 細胞の IL-2 mRNA 発現に対する C<sub>12</sub>-LAS の影響

任意濃度の C<sub>12</sub>-LAS と mitogen であるコンカナバリン A (ConA) を終濃度で 25 μg/mL とするようそれぞれ培地に加え、Jurkat 細胞を約 3 時間培養した。その後、細胞を回収し、全 RNA 抽出後、cDNA 合成を行い、リアルタイム RT-PCR により IL-2 mRNA の発現量を検討した。

#### (3) Jurkat 細胞の転写調節因子に対する C<sub>12</sub>-LAS の影響

任意濃度の C<sub>12</sub>-LAS と mitogen である ConA を終濃度で 25 μg/mL とするようそれぞれ培地に加え、Jurkat 細胞を約 3 時間培養した。その後、細胞を回収し、核タンパク質の抽出を行

い、IL-2 mRNA 発現に關与する転写調節因子 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) と activator protein-1 (AP-1) の測定を行った。

(4) ヒト胃癌細胞株のプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 産生に対する C<sub>12</sub>-LAS の影響

任意濃度の C<sub>12</sub>-LAS を培地に加え、ヒト胃癌細胞を約 24 時間培養した。培養上清を回収し、PGE<sub>2</sub> を測定した。

(5) ヒト肺線維芽細胞 WI-38、WI-38 VA13 sub 2 RA および Jurkat 細胞に対する市販の陰イオン界面活性剤の毒性作用

市販の陰イオン界面活性剤 (硫酸エステル塩 (6 種類)、スルホン酸塩 (7 種類)、脂肪酸塩 (1 種類)) を任意濃度でそれぞれ培地に加え、WI-38、WI-38 VA13 sub 2 RA、Jurkat 細胞を約 24 時間培養した。培養後、Cell Counting Kit-8 (Dojindo) による細胞増殖/細胞毒性アッセイを行った。

(6) Jurkat 細胞の IL-2 産生に対する市販の陰イオン界面活性剤 (スルホン酸塩) の影響

任意濃度の市販の陰イオン界面活性剤 (スルホン酸塩 3 種類) と mitogen である ConA を終濃度で 25  $\mu$ g/mL となるようにそれぞれ培地に加え、Jurkat 細胞を約 24 時間培養した。培養上清中の IL-2 を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) rhCN に対する C<sub>12</sub>-LAS の影響

アルキル側鎖の炭素数 12 の C<sub>12</sub>-LAS では数  $\mu$ M から rhCN の阻害作用を認めた。炭素数 10 から 14 の LAS を用いて、アルキル側鎖の長さの違いに対する阻害作用の検討を行ったところ、側鎖が長くなるほど rhCN に対する阻害作用は強くなる傾向を示した。

(2) Jurkat 細胞の IL-2 mRNA 発現に対する C<sub>12</sub>-LAS の影響

本研究と先行研究の結果、C<sub>12</sub>-LAS は毒性作用の影響のない濃度で、転写調節因子 NF- $\kappa$ B、AP-1、NFATc1 の転写活性を抑制することにより、IL-2 mRNA 発現を抑制させることが示唆された。

(3) ヒト胃癌細胞株の PGE<sub>2</sub> 産生に対する C<sub>12</sub>-LAS の影響

C<sub>12</sub>-LAS は、ヒト胃癌細胞の PGE<sub>2</sub> 産生を抑制することが示唆された。従って C<sub>12</sub>-LAS は、炎症作用に影響を与える可能性が示された。

(4) WI-38、WI-38 VA13 sub 2 RA および Jurkat 細胞に対する市販の陰イオン界面活性剤の毒性作用

本研究で用いた 14 種類の市販の各陰イオン界面活性剤の WI-38、WI-38 VA13 sub 2 RA および Jurkat 細胞に対する細胞増殖 50% 阻害濃度 (GI<sub>50</sub>) は、それぞれ数十から数百 ppm であった。また化学構造の違いによって、例えば同じスルホン酸塩であっても GI<sub>50</sub> が異なることが明らかとなった。3 種類の細胞間においては、各陰イオン界面活性剤の GI<sub>50</sub> には相関が見られた。

(5) Jurkat 細胞の IL-2 産生に対する市販の陰イオン界面活性剤 (スルホン酸塩) の影響

本研究で用いた 14 種類の市販の陰イオン界面活性剤の一部 (スルホン酸塩 3 種類) について Jurkat 細胞の IL-2 産生を検討したところ、毒性のない濃度で IL-2 産生の低下を認めた。従って、これらスルホン酸塩については、細胞性免疫に影響を与える可能性が示唆された。

## 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 0件）

1. 著者名 秋山珠璃、片山 豪、田中 進	4. 巻 37
2. 論文標題 アルミニウムイオンのカルシニューリン活性に対する影響	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 微量栄養素研究	6. 最初と最後の頁 28-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.51029/jtnrs.37.0_28	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 秋山珠璃、田中佑季、田中 進	4. 巻 36
2. 論文標題 クロムのカルシニューリン活性に対する影響	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 微量栄養素研究	6. 最初と最後の頁 35-38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.51029/jtnrs.36.0_35	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 秋山珠璃、田中佑季、田中 進	4. 巻 35
2. 論文標題 希土類元素のカルシニューリン活性に対する影響	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 微量栄養素研究	6. 最初と最後の頁 78-82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 秋山珠璃、曾根保子、田中 進
2. 発表標題 ヒトカルシニューリン活性に対する直鎖アルキルベンゼンスルホン酸の影響
3. 学会等名 日本家政学会 第74回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 進、三村凜心、秋山琉璃、曾根保子
2. 発表標題 Jurkat細胞のIL-2産生に対する市販陰イオン界面活性剤の影響
3. 学会等名 日本家政学会 第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 進、秋山 琉璃、片山 豪、曾根 保子
2. 発表標題 市販陰イオン界面活性剤のヒト培養細胞に対する毒性の基礎的研究
3. 学会等名 日本家政学会 第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋山琉璃、片山 豪、田中 進
2. 発表標題 アルミニウムイオンのカルシニューリン活性に対する影響
3. 学会等名 日本微量栄養素学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋山琉璃、田中佑季、田中 進
2. 発表標題 クロムのカルシニューリン活性に対する影響
3. 学会等名 日本微量栄養素学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋山珠璃、田中佑季、田中 進
2. 発表標題 希土類元素のカルシニューリン活性に対する影響
3. 学会等名 日本微量栄養素学会
4. 発表年 2018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	曾根 保子	高崎健康福祉大学・健康福祉学部・准教授	
	(SONE Yasuko)		
	(80452027)	(32305)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------