

平成 22年 5月 14日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590602

研究課題名（和文） 有機リン農薬による免疫毒性の新機序：有機リン農薬による免疫細胞のアポトーシス

研究課題名（英文） New mechanism of organophosphorus pesticide-induced immunotoxicity: organophosphorus pesticide-induced apoptosis in immune cells

研究代表者

李 卿 (LI QING)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：50250048

研究成果の概要（和文）：

これまで申請者らは、有機リン農薬が Granule exocytosis pathway 及び Fas ligand/Fas pathway の両方を障害することによってNK, CTL及びLAK活性を抑制することを明らかにした。しかし、これだけでは有機リン農薬によるNK活性低下の機序を十分に説明しきれず、他の機序も関与していることが示唆されている。そこで、我々は有機リン農薬による免疫細胞のアポトーシスに着目し、有機リン農薬によるNKとT細胞のアポトーシス及びその機序を検討した。また有機リン農薬が生体内で代謝されるので、生体内（In vivo）においても有機リン農薬が免疫担当細胞のアポトーシスを誘導するかどうか、も検討した。アポトーシスの測定は、FITC-Annexin Vを用いて有機リン農薬によるNKとT細胞の早期アポトーシスを測定した。またDNA ladder及び細胞内活性化Caspase-3も測定した。

その結果、DDVPまたはChlorpyrifosはいずれも用量依存的・処理時間依存的にNK92CI、NK92MI及びT細胞のアポトーシスを誘導することが明らかとなった。25ppm以上の濃度ではChlorpyrifosがDDVPより早くNK92CIのアポトーシスを誘導するが、一方で、12.5～1.56ppmの低濃度域においてはDDVPがChlorpyrifosより強くアポトーシスを誘導することが明らかとなった。その違いは不明であるが、それぞれの毒性及び水溶性の違いと関連があるかもしれない。DDVPとChlorpyrifosに対する反応性においてNK92CIはNK92MIより感受性が高いことが判明した。これはDDVPによるNK92CI活性抑制がDDVPによるNK92MI活性抑制より強いことと関連があると示唆された。

またChlorpyrifosまたはDDVPは用量・処理時間依存的にNKとT細胞内の活性化Caspase-3のレベルを上昇させることが明らかとなった。さらにCaspase-3阻害剤が有意にChlorpyrifosまたはDDVPによるアポトーシスを抑制できることから、ChlorpyrifosまたはDDVPによるヒトNKとT細胞のアポトーシスは細胞内のCaspase-3活性化を介して誘導したことが判明した。

In vivo 実験ではFNTが量依存的に脾細胞中のCD8陽性T細胞を減少させ、高投与群のCD8陽性T細胞が対照群より有意に減少したことが明らかとなった。一方、CD4とCD3陽性細胞では各群の間に有意差が認められなかった。MNPの高投与群ではCD3とCD8陽性T細胞が共に対照群より有意に減少したことが明らかとなった。一方、CD4陽性細胞において各群の間に有意差が認められなかった。FNTが量依存的に脾臓重量、体重及び脾臓と体重の比を有意に減少させ、脾臓重量、体重及び脾臓と体重の比においていずれもFNT高投与群が対照群より有意に低いことが明らかとなった。FNT及びMNPは、脾細胞中のB細胞、NK細胞及びマクロファージへの影響は認められなかった。電子顕微鏡ではFNT投与群の脾臓にアポトーシス細胞が検出された。

研究成果の概要 (英文) :

We previously found that organophosphorus pesticides (OPs) significantly inhibited natural killer (NK) activity, which is mediated by the following mechanisms: 1) OPs impair the granule exocytosis pathway of NK, LAK and CTL cells by inhibiting the activity of granzymes (Li et al., 2002) and by decreasing the intracellular level of perforin, granzyme A, and granulysin, which was mediated by inducing degranulation of NK cells, and by inhibiting the transcription of mRNAs of perforin, granzyme A, and granulysin; 2) OPs impair the FasL/Fas pathway of NK, LAK and CTL cells, as investigated by using perforin-knockout mice, in which the granule exocytosis pathway of NK cells does not function and only the FasL/Fas pathway remains functional. However, the above two mechanisms cannot completely explain the all mechanism of OP-induced inhibition of NK activity and there must be other mechanisms involve. This encourages us to speculate that OPs may induce apoptosis in NK and CTL and ultimately inhibited cytolytic activity of effectors.

In order to explore the mechanism of OP pesticide-induced immunotoxicity, we investigated whether OP pesticides can induce apoptosis in human natural killer (NK) cells. NK-92CI and NK-92MI cells, which are interleukin-2 independent human NK cell lines, express CD56, perforin, granzymes A, B, 3/K, and granulysin and are highly cytotoxic to K562 cells in the chromium release assay were treated with DDVP or CP *in vitro*. It was found that DDVP and CP significantly induced apoptosis in NK-92 cells in a dose- and time-dependent manner. DDVP also induced an increase in intracellular active caspase-3 in NK-92CI cells in a dose- and time-dependent manner, and a caspase-3 inhibitor, Z-DEVD-FMK, significantly inhibited DDVP-induced apoptosis, suggesting that this apoptosis is partially mediated by the activation of intracellular caspase-3. The pattern of apoptosis induced by CP differed from that induced by DDVP. CP showed a faster response than DDVP at higher doses; whereas, DDVP showed a slower but stronger apoptosis-inducing ability than CP at lower doses. Moreover, the response to OP pesticides differed between NK-92CI and NK-92MI cells, and NK-92CI cells were more sensitive to OP pesticides than NK-92MI cells. This is similar to the inhibition of NK activity induced by DDVP, in which NK-92CI cells were more easily inhibited by DDVP than NK-92MI cells and strongly suggested a relationship between DDVP-induced apoptosis and the inhibition of cytolytic activity in NK cells. Taken together, these findings suggest that OP pesticide-induced inhibition of NK activity may be at least partially mediated by OP pesticide-induced apoptosis in NK cells.

To explore the mechanism of OP pesticide-induced inhibition of cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity, it was also investigated whether OP pesticides can induce cell death/apoptosis in T cells using Jurkat human T cells *in vitro*. It was found that CP induced the cell death of Jurkat human T cells in a dose- and time-dependent manner. CP also induced apoptosis in Jurkat T cells in a dose- and time-dependent manner suggesting that CP-induced cell death consisted of apoptosis. CP also induced an increase in intracellular active caspase-3 in Jurkat T cells in a dose-and time-dependent manner, and Z-DEVD-FMK significantly inhibited CP-induced apoptosis. These findings indicate that CP can induce apoptosis in human Jurkat T cell cells, and this effect is partially mediated by the activation of intracellular caspase-3.

To investigate the effect of OP on the splenocytes and the underlying mechanism *in vivo*, Fenitrothion (FNT) and its main metabolite, 3-methyl-4-nitrophenol (MNP) were administered orally to Wistar rats in daily doses of 0, 5 and 10 mg/kg, 4-5 days/week for 9 weeks. Splenocytes were harvested from control and exposed rats, and the following cell phenotypes were quantified by flow cytometry: (1) B cells, (2) T cells, (3) T cell subsets (CD4/CD8), (4) natural killer (NK) cells, and (5) macrophages. Body weight, weight of the spleen and histopathological alterations of spleens were also examined. The percentage of splenic CD8⁺ T cells and the ratio of CD8/CD4 in the group receiving 10 mg/kg FNT, and the percentages of splenic CD3⁺ and CD8⁺ T cells in the group receiving 10 mg/kg MNP were significantly decreased compared with those in the controls. FNT exposure also significantly decreased the weight of the spleen and body weight. In addition, apoptotic lymphocytes in spleen were observed in FNT-exposed rats under transmission electron microscope. However, FNT and MNP exposures did not affect splenic NK cells, B cells, and macrophages. The above findings indicate that FNT and MNP may selectively affect splenic T cells in rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：環境中毒

1. 研究開始当初の背景

有機リン農薬は、アセチルコリンエステラーゼ阻害による急性中毒を惹起するが、近年、毒性の比較的低い有機リン農薬に変わってきたため急性有機リン中毒は急激に減少している。一方で、低毒性の有機リン農薬による生体への慢性的な影響、特に腫瘍監視機構の機能低下による発癌、化学物質過敏症、アレルギー等の免疫関連疾患のリスク増大が懸念されている。化学物質過敏症などには、有機リン農薬の関与が示唆されているが、有機リン農薬の免疫系に対する影響の機序は明らかになっていない。従って、有機リン農薬の免疫系に対する影響の機序を明らかにすることは、予防医学・社会医学上極めて重要であると考えられる。

申請者らは平成12年度と13年度の科研費で、有機リン農薬がNK (natural killer)活性、LAK (lymphokine-activated killer)活性及びCTL (cytotoxic T lymphocyte)活性を顕著に抑制することを明らかにした。NK、LAK及びCTLは主に二つのメカニズムで標的細胞を傷害する。その1はこれらの細胞内顆粒中に存在するPerforin、GranzymeおよびGranulysinの放出による標的細胞の傷害であり(Granule exocytosis pathway という)、その2はFas ligand/Fas pathwayを介した標的細胞の傷害である。平成15～17年度の科研費で、申請者らは有機リン農薬がGranule exocytosis pathway及びFas ligand/Fas pathwayの両方を障害することによってNK、CTL及びLAK活性を抑制することを明らかにした。しかし、これだけでは有機リン農薬によるNK活性低下の機序を十分に説明しきれず、他の機序も関与していることが示唆されている。そこで、我々は有機リン農薬による免疫細胞のアポ

トーシスに着目した。Chlorpyrifos等の有機リン農薬が神経細胞のアポトーシスを誘導することが報告されたが、免疫細胞についての報告は未だに見当たらない。この背景の下で、我々はChlorpyrifosを用いてin vitroでヒト単球様細胞株U937細胞を処理した結果、ChlorpyrifosがU937細胞のアポトーシスを誘導することを発見した。これらの結果はToxicology誌で発表した(Toxicology 224(3):202-9, 2006)。

有機リン農薬によるNK活性、LAK活性及びCTL活性への影響において申請者らはこれまで4篇の英文論文を発表し、有機リン農薬がGranule exocytosis pathway及びFas ligand/Fas pathwayの両方を障害することによってNK、CTL及びLAK活性を抑制することを明らかにした(Li, et al: Toxicology, 146, 209-220, 2000; Li, et al: Toxicology, 172, 181-190, 2002; Li, et al: Toxicology 204, 41-50, 2004; Li, et al: Toxicology 213, 107-16, 2005)。有機リン農薬によるNK活性、LAK活性及びCTL活性への影響において国外にもいくつかの報告があるが、NK細胞のアポトーシスの視点から有機リン農薬によるNK活性低下のメカニズムを検討することは国内外でも初めての研究である。また有機リン農薬が神経細胞のアポトーシスを誘導することが報告されているが、NK細胞についての報告は皆無である。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて本研究では以下のことを目的とした。

1. これまで有機リン農薬(Chlorpyrifos)は、ヒト単球様細胞株U937細胞を誘導する

ことが確認されたが、ヒトNK細胞のアポトーシスも誘導するのか？もし誘導するならば、有機リン農薬によるNK細胞のアポトーシスとNK活性低下との間に相関があるのか、を検討した。

2. 1年目では、有機リン農薬によるNK細胞のアポトーシスの機序を明らかにした。2年目では、有機リン農薬によるCTL (cytotoxic T lymphocyte)活性抑制の機序を検討する目的で有機リン農薬によるT細胞のアポトーシスの機序を検討した。
3. 有機リン農薬が生体内で代謝されるので、生体内 (In vivo) においても有機リン農薬が免疫担当細胞のアポトーシスを誘導するかどうか、も検討した。

以上のことを明らかにすることによって有機リン農薬による免疫毒性の新しい機序が解明された。

3. 研究の方法

平成19年度

1. 有機リン農薬：Dimethyl 2,2-dichlorovinyl phosphate (DDVP: Dichlorvos)とChlorpyrifosを用いた。
2. ヒトNK細胞：NK細胞株NK92CIとNK92MIを用いてDDVP及びChlorpyrifosによるアポトーシスを検討した。
3. 細胞の処理：1.56~100ppmのDDVPまたはChlorpyrifosを用いてin vitroでNK92CIまたはNK92MIをそれぞれ1~72時間処理した後、経時的に以下の方法でDDVP及びChlorpyrifosによるアポトーシスを測定した。
4. アポトーシスの測定：FITC-Annexin Vを用いて有機リン農薬によるNK細胞の早期アポトーシスを測定した。

平成20年度

1. 有機リン農薬：Chlorpyrifosを用いた。
2. ヒトT細胞：Jurkat T細胞株を用いてChlorpyrifosによるアポトーシスを検討した。
3. 細胞の処理：6.25~100ppmのChlorpyrifosを用いてin vitroでJurkat T細胞を2~6時間処理した後、経時的に以下の方法でChlorpyrifosによるアポトーシスを測定した。
4. アポトーシスの測定：FITC-Annexin Vを用いて有機リン農薬によるNK細胞の早期アポトーシスを測定した。またDNA ladder及び細胞内活性化Caspase-3も測定した。

平成21年度

1. 有機リン農薬：Fenitrothion (FNT)を用いた。またFNTによる免疫毒性の機序を解明す

るために、FNTの代謝物3-methyl-4-nitrophenol (MNP)も用いた。

2. 動物：Wistar雄ラット(10週齢)を、対照群、FNT低投与群(5 mg/kg)、FNT高投与群(10 mg/kg)、MNP低投与群(5 mg/kg)及びMNP高投与群(10 mg/kg)に分ける。なお、FNT 10 mg/kgの投与により代謝生成されるMNPのモル数は、MNP 5 mg/kg投与群にほぼ等しい。

3. 試薬の投与：FNTとMNPを2ヶ月経口投与してから(週4-5日)、最終投与の翌日に以下の測定を実施する。

4. 測定項目

1. FNTによる脾臓リンパ球構成への影響：脾細胞を調製し、Flow cytometry法を用いて測定した。
2. FNTによる脾臓細胞アポトーシスの検討：光学・電子顕微鏡で形態学的変化を検討した。

4. 研究成果

平成19年度

1. DDVP及びChlorpyrifosはいずれも用量依存的・処理時間依存的にNK92CI及びNK92MIのアポトーシスを誘導することが明らかとなった。
2. 25ppm以上の濃度ではChlorpyrifosがDDVPより早くNK92CIのアポトーシスを誘導するが、一方で、12.5~1.56ppmの低濃度域においてはDDVPがChlorpyrifosより強くアポトーシスを誘導することが明らかとなった。その違いは不明であるが、それぞれの毒性及び水溶性の違いと関連があるかもしれない。
3. DDVPとChlorpyrifosに対する反応性においてNK92CIはNK92MIより感受性が高いことが判明した。これはDDVPによるNK92CI活性抑制がDDVPによるNK92MI活性抑制より強いことと関連があると示唆された。今後、有機リン農薬によるNK細胞のアポトーシスとそれによるNK活性抑制との関連性を探究していきたい。

平成20年度

1. Chlorpyrifosは用量・処理時間依存的にJurkat T細胞のDNA断片化を誘導し、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。
2. Chlorpyrifosは用量・処理時間依存的にJurkat T細胞内の活性化Caspase-3のレベルを上昇させることが明らかとなった。さらにCaspase-3阻害剤が有意にChlorpyrifosによるアポトーシスを抑制できることから、

Chlorpyrifos によるヒト T 細胞のアポトーシスは細胞内の Caspase-3 活性化を介して誘導したことが判明した。今後、有機リン農薬による T 細胞のアポトーシスとそれによる CTL 活性抑制との関連性を探究していきたい。

平成 21 年度

1. FNT が量依存的に脾細胞中の CD8 陽性 T 細胞を減少させ、高投与群の CD8 陽性 T 細胞が対照群より有意に減少したことが明らかとなった。一方、CD4 と CD3 陽性細胞では各群の間に有意差が認められなかった。
2. MNP の高投与群では CD3 と CD8 陽性 T 細胞が共に対照群より有意に減少したことが明らかとなった。一方、CD4 陽性細胞において各群の間に有意差が認められなかった。
3. FNT が量依存的に脾臓重量、体重及び脾臓と体重の比を有意に減少させ、脾臓重量、体重及び脾臓と体重の比においていずれも FNT 高投与群が対照群より有意に低いことが明らかとなった。
4. FNT 及び MNP は、脾細胞中の B 細胞、NK 細胞及びマクロファージへの影響は認められなかった。
5. 電子顕微鏡では FNT 投与群の脾臓にアポトーシス細胞が検出された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (5 件)

1. Li Q. New mechanism of organophosphorus pesticide-induced immunotoxicity. *Journal of Nippon Medical School*, 74(2); 92-105, 2007.
2. Li Q, Kobayashi M, Kawada T. Organophosphorus pesticides induce apoptosis in human NK cells. *Toxicology* 239(1-2):89-95; 2007.
3. Li Q, Kobayashi M and Kawada T (2008) DDVP markedly decreases the expression of granzyme B and granzyme 3/K in human NK cells. *Toxicology* 243: 294-302.
4. Li Q, Kobayashi M and Kawada T (2009) Chlorpyrifos induces apoptosis in human T cells. *Toxicology* 255(1-2):53-57.
5. Li Q, Kobayashi M, Inagaki H, Hirata Y, Sato S, Ishizaki M, Okamura A, Wang D, Nakajima T, Kamijima M and Kawada T. Effect of oral exposure to fenitrothion and 3-methyl-4-nitrophenol on splenic cell populations and histopathological alterations

in spleen in Wistar rats. *Human and Experimental Toxicology* (2010, in press).

[学会発表] (計 9 件)

1. Li Q, Kobayashi M, Kawada T. Organophosphorus pesticides induce apoptosis in human NK cells. XIth International Congress of Toxicology, Montréal, Canada, 2007.7.
2. Li Q, Kobayashi M, Kawada T. Dichlorvos significantly decreases the expression of granzyme B and granzyme 3/K in human NK cells. 47th annual meeting of Toxicology of SOT (Society of Toxicology), Seattle, WA, USA, 2008.3
3. Li Q, Kobayashi M, Kawada T. Chlorpyrifos induces apoptosis in human T cells. 48th annual meeting of Toxicology of SOT (Society of Toxicology), Baltimore, Maryland, USA, 2009.3
4. Li Q, Kobayashi M, Inagaki H, Hirata Y, Ishizaki M, Okamura A, Wang D, Nasu T, Kamijima M and Kawada T. Effect of oral exposure to fenitrothion and 3-methyl-4-nitrophenol on immune function in Wistar rats. 46th Congress of the European Societies of Toxicology, September 13th to 16th, 2009, Dresden, Germany.
5. Li Q, Kobayashi M, Inagaki H, Hirata Y, Sato S, Ishizaki M, Okamura A, Wang D, Nakajima T, Kamijima M and Kawada T. Effect of oral exposure to fenitrothion and 3-methyl-4-nitrophenol on splenic cell populations and histopathological alterations in spleen in Wistar rats. International Symposium on Occupational and Environmental Allergy and Immune Diseases April 7-9, 2010 (ISOEAID'10), KYOTO, JAPAN.
6. 李卿, 小林麻衣子, 川田智之. 有機リン農薬によるヒト NK 細胞のアポトーシス. 第 80 回日本産業衛生学会総会 2007 年 4 月 大阪
7. 李卿, 小林麻衣子, 川田智之. 有機リン農薬 Chlorpyrifos によるヒト T 細胞のアポトーシス. 第 15 回日本免疫毒性学会, 東京, 2008. 9.
8. 李卿, 稲垣弘文, 平田幸代, 岡村愛, 王棟, 那須民江, 上島通浩, 川田智之. Fenitrothion (FNT) と 3-methyl-4-nitrophenol (MNP) の経口曝露によるラット免疫機能への影響. 第 82 回日本産業衛生学会総会 2009 年 5 月 福岡
9. Li Q, Kobayashi M, Kawada T. Effect of ziram, a carbamate pesticide, on human NK activity. 第 16 回日本免疫毒性学会, 旭川, 2009. 8.

〔図書〕(計 3 件)

1. Li Q. Chapter 3: Organophosphorus compounds inhibit natural killer cell activity. In: Natural Killer T-Cells: Roles, Interactions and Interventions. Fournier NV (eds). Nova Science Publishers, Inc. 400 Oser Avenue, Suite 1600, Hauppauge, NY, 2008, p81-102.
2. Li Q. NK Cell Assays in Immunotoxicity Testing, Immunotoxicity Testing Methods in series of Molecular Biology, Methods Mol Biol. 2010;598:207-19, Dietert RR, eds, Humana Press, NJ, USA.
3. Li Q. Apoptosis (Section-III, Chapter 13): In: Satoh T and Gupta R (eds): Anticholinesterrase Pesticides: Metabolism, Neurotoxicity and Epidemiology". John Wiley & Sons, 2010, p165-174 (in press).

〔その他〕

ホームページ等

<http://forest-medicine.com>

6. 研究組織

(1)研究代表者

李 卿 (LI QING)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：50250048

(2)研究分担者

川田 智之 (KAWADA TOMOYUKI)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00224791

稲垣 弘文 (INAGAKI HIROFUMI)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：50213111

平田 幸代 (HIRATA YUKIYO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：40322515

佐藤 茂 (SATO SHIGERU)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：10125073