

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05894

研究課題名（和文）病原性細菌が誘導する炎症発症リスクに対する化学物質の作用機序の解明

研究課題名（英文）Effect of chemicals on the risk of inflammation induced by pathogenic bacteria

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、黄色ブドウ球菌の病原因子発現に対する化学物質の影響およびヒトケラチノサイトの炎症関連遺伝子発現に対する化学物質とブドウ球菌毒素（SEA）の複合暴露の影響について検討した。その結果、*in vitro*皮膚モデルおよびBHI培地において、黄色ブドウ球菌の増殖および病原因子発現を変動させる化学物質を明らかにした。さらに、SEAは、ヒト表皮角化細胞の炎症関連遺伝子の発現量を亢進させることを見出した。単独ではヒトに対して毒性が低い化学物質においても、SEAとの複合暴露により炎症が惹起される可能性がある。今後、これら両因子の複合暴露による炎症等毒性発現メカニズムを明らかにする必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学物質および細菌性毒素を原因とする様々な疾患が存在するが、化学物質が黄色ブドウ球菌などのヒト常在菌を介して宿主にどのように影響するのことは明らかになっていない。本研究の成果より、病原性細菌による感染時に化学物質に暴露された結果として、単独暴露とは異なる毒性や免疫応答を誘導する可能性があることが示唆された。本研究の成果および今後の更なる研究により、SEAとの複合暴露が皮膚における炎症誘導に及ぼす影響について明らかにすることで、新たなリスク評価およびSEAが誘導する各種疾病を予防するための新たな戦略構築が期待される。

研究成果の概要（英文）：Variations of toxicity of combined exposure to chemicals and pathogenic bacteria such as *Staphylococcus aureus* present in the food environment were evaluated. The expression of virulence factors of *Staphylococcus aureus* in a skin model, BHI medium, and HaCaT cells was analyzed by adding chemicals such as cosmetic materials. Addition of chemicals increased *Staphylococcus aureus* toxin (SEA) expression in skin models and in BHI medium. Combined exposure of HaCaT cells to SEA, phenoxyethanol, and other chemicals increased the expression of inflammation-related genes. This study revealed that the combined exposure of *Staphylococcus aureus* and chemicals enhances toxicity such as inflammation. These results indicate that even chemicals with low toxicity may induce inflammation upon combined exposure with SEA, and the mechanism of toxicity induced by combined exposure to these two factors needs to be clarified in the future.

研究分野：食品衛生学

キーワード：化学物質 病原性細菌 黄色ブドウ球菌 SEA 炎症 複合暴露

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの皮膚や鼻腔に常在する病原性細菌である黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、毒素 (staphylococcal enterotoxin A; SEA) などの病原因子を菌体外に放出し、ヒト (宿主) に炎症応答を誘導し、様々な疾病を引き起こすことが知られている (Gurung *et al.*, *PLoS one*, 6(11): e27958, 2011)。また、食環境中には、多種多様の化学物質が存在しており、これらの中には免疫応答や遺伝毒性を示すものもあり、さらに発がんを誘導することが知られている。このように、食環境中には、病原性細菌と化学物質の両者が存在することから、これらに対する免疫反応が単独時とは異なり、その毒性が相乗的に増加することが考えられる。

申請者は、基盤研究 (C) (2017-2019 年度) において、食品中化学物質が黄色ブドウ球菌の SEA 産生能や病原因子の発現を上昇させることを見出している。しかし、化学物質が黄色ブドウ球菌の病原性を増強させる作用機序および化学物質により影響を受けた黄色ブドウ球菌がヒトの免疫システムに及ぼす影響については明らかになっていない。また、化学物質が病原性細菌による感染症の発症リスクを増大させ、その結果としてヒト (宿主) に炎症応答を誘導し、様々な疾病を引き起こす可能性が考えられる。

2. 研究の目的

これまでに、病原性細菌および化学物質の個々の生体影響については報告されているが、両者の生体影響を総合的に評価した報告はない。そこで、本研究では、常在菌である黄色ブドウ球菌に対する化学物質の作用の解明を目的に、化学物質が本菌の増殖および病原因子の発現に及ぼす影響について解析した。また、化学物質暴露後の黄色ブドウ球菌およびその病原因子が宿主の免疫システムに及ぼす影響について明らかにするために、ヒトケラチノサイトの炎症関連遺伝子発現に対する SEA と化学物質の複合暴露の影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) 化学物質および供試菌株

化学物質として、主に保湿剤として用いられる、流動パラフィン、スクワラン、ミリスチン酸イソプロピル、トリエチルヘキサノイン、ジメチコン、マカデミアナッツ油、グリセリン、PEG-8、BG およびペンチレングリコール、防腐剤として用いられるメチルパラベン、フェノキシエタノールおよび酸化亜鉛、乳化剤として用いられるポリソルベート 80、PEG-60 水添ヒマシ油およびミリストイルメチルタウリン Na の 16 種類を試験に供した。供試菌株として、*S. aureus* C-29 (SEA 産生、ヒト分離株、以下、*S. aureus*) を用いた。

(2) *S. aureus* の増殖および病原因子発現に対する化学物質の影響

培地と皮膚では、化学物質に暴露された際の *S. aureus* 病原因子発現パターンが異なることが予想されることから、*in vitro* 皮膚モデル (以下、皮膚モデル) の構築を試みた。角質成分であるケラチンをベースに人工汗液、人工指脂液、グルコースおよびスクワレンを添加した皮膚モデルを構築し、この皮膚モデルおよび Brain-Heart Infusion (BHI) 培地における *S. aureus* の増殖および病原因子 (*sea*, RNAIII (クオラムセンシング制御遺伝子)、*icaA* (バイオフィーム形成関連遺伝子) および *hly* (溶血毒素関連遺伝子)) の発現に及ぼす影響について、平板希釈法および Real-time RT-PCR を用いて解析した。

(3) ヒトケラチノサイトの炎症関連遺伝子発現に対する SEA と化学物質の複合暴露の影響

ヒト表皮角化細胞 (HaCaT 細胞) における炎症関連遺伝子 (IL-8、IL-1 β 、NF- κ B1 および NF- κ B2) の発現に対する SEA と化学物質の複合暴露の影響について Real-time RT-PCR を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) *S. aureus* の増殖および病原因子発現に対する化学物質の影響

皮膚モデルでは、保湿剤である流動パラフィン、マカデミアナッツ油、PEG-8、BG および防腐剤であるメチルパラベンを添加した群で菌数が増加する傾向が認められた。また、皮膚モデルに保湿剤であるスクワラン、トリエチルヘキサノイン、ジメチコン、ペンチレングリコールおよび防腐剤である酸化亜鉛を添加した群では、菌数が有意に減少した。一方、BHI 培地では、保湿剤である流動パラフィン、スクワラン、ジメチコンおよびマカデミアナッツ油で菌数が有意に増加した (Fig. 5 (B))。また、BHI 培地にミリスチン酸イソプロピル、トリエチルヘキサノイン、グリセリン、PEG-8、1,3-ブチレングリコールおよびペンチレングリコールおよび防腐剤であるメチルパラベン、フェノキシエタノールおよび酸化亜鉛を添加した群では、菌数が有意に減少した。また、*S. aureus* の増殖に対する各種乳化剤の影響について調べたところ、皮膚モデルおよび BHI 培地のいずれにおいても試験に供した全ての乳化剤 (ポリソルベート 80、PEG-60 水添ヒマシ油およびミリストイルメチルタウリン Na) において、菌数が有意に減少した。これらの結

果より、皮膚モデルとBHI培地では、化学物質に対する *S. aureus* の感受性が大きく異なることが示唆された (図1)。

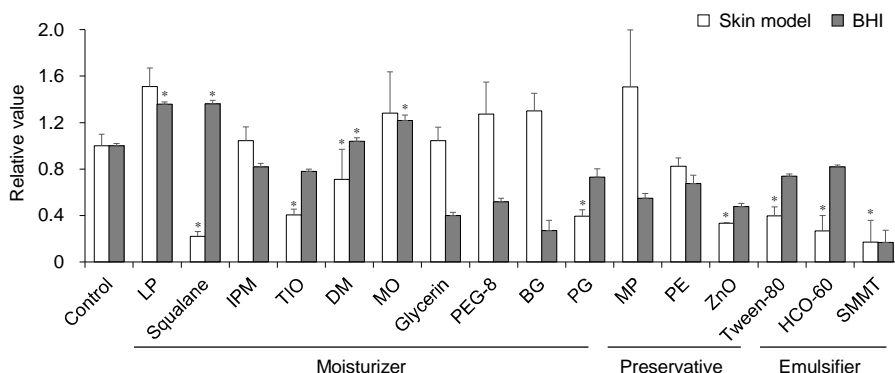


図1: *S. aureus* の増殖に対する化学物質の影響

化学物質を添加していないControl群を1とした相対値で示した。誤差範囲は標準偏差を示す。LP: 流動パラフィン、IPM: ミリスチン酸イソプロピル、TIO: トリエチルヘキサノイン、DM: ジメチコン、MO: マカデミアナッツ油、BG: 1,3-ブチレングリコール、PG: ペンチレングリコール、MP: メチルパラベン、PE: フェノキシエタノール、ZnO: 酸化亜鉛、Tween-80: ポリソルベート80、HCO-60: 80 PEG-60 水添ヒマシ油、SMMT: ミリスチルメチルタウリンNa。* $p < 0.05$ vs Control (n=3)

(2) *S. aureus* の病原因子発現に対する化学物質の影響

S. aureus の *sea* 発現量に及ぼす化学物質の影響について調べたところ、皮膚モデルで発現量が有意に増加した。さらに、*S. aureus* の病原因子 (RNAIII、*icaA* および *hlyB*) 発現量に及ぼす化学物質の影響について調べたところ、6種の保湿剤、1種の防腐剤および2種の乳化剤において、いずれの発現量もBHI培地と比較して皮膚モデルで高値を示した (図2)。これらの結果より、皮膚モデルとBHI培地では、*S. aureus* の病原因子発現への化学物質の影響に差異があることが示唆された。

S. aureus の増殖と病原因子発現量との関連性について検討したところ、BHI培地では、菌数と病原因子発現量に負の相関が認められたが、皮膚モデルでは、相関が認められなかった (図3)。皮膚モデルでは、病原因子発現が増殖に左右されなかったことから、両者の発現制御機構が異なる可能性が示唆された。

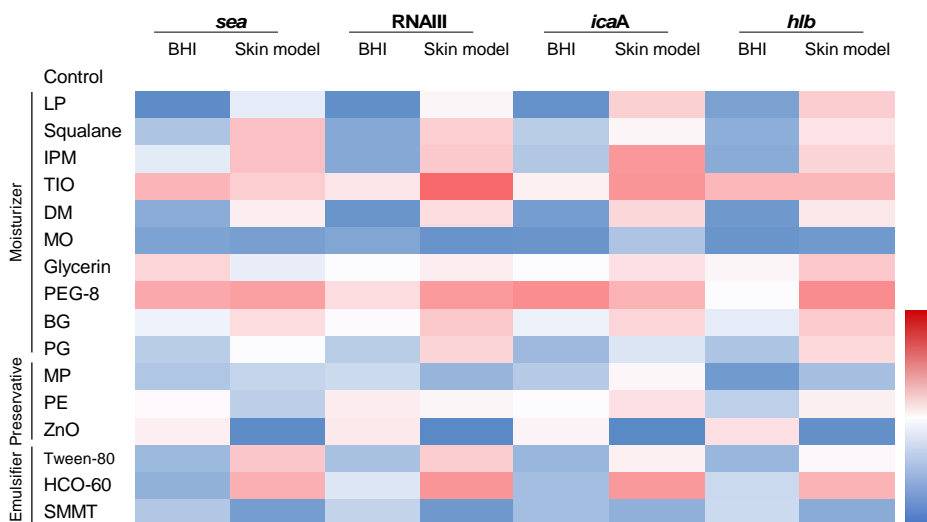


図2: 化学物質が誘導する *S. aureus* の病原因子発現におけるヒートマップ

BHI培地および皮膚モデルにおいて、化粧品素材を添加していないコントロールと比較して、有意に発現上昇または発現低下した遺伝子をそれぞれ赤および青で示した。

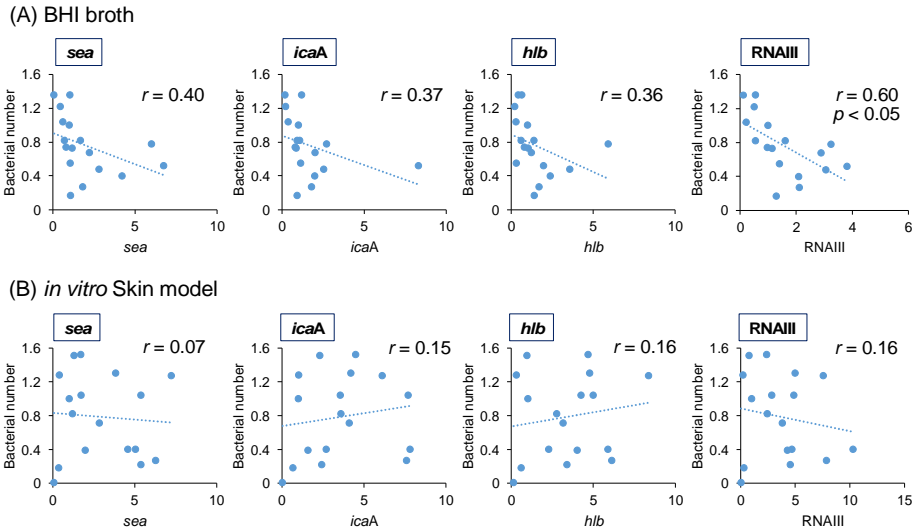


図 3: *S. aureus* の増殖と病原因子発現量との関連性

(3) ヒトケラチノサイトの炎症関連遺伝子発現に対する SEA と化学物質の複合暴露の影響

HaCaT 細胞の炎症関連遺伝子の発現に対する SEA の影響について検討したところ、SEA の暴露により、IL-8、IL-1 β 、NF- κ B1 および NF- κ B2 の発現量が有意に増加した。さらに、HaCaT 細胞に SEA と化学物質を複合暴露したところ、SEA 単独暴露と比較して、フェノキシエタノールおよび酸化亜鉛の添加により IL-8 および IL-1 β 、また、酸化亜鉛およびミリスチルメチルタウリン Na の添加により NF- κ B1 の発現量が有意に増加した (図 4)。同じ用途で用いられる化学物質であっても、SEA との複合暴露により誘導される炎症関連遺伝子の発現パターンは異なることが示唆された。

本研究では、*in vitro* 皮膚モデルを構築し、*S. aureus* の増殖および病原因子発現を変動させる化学物質を明らかにした。さらに、化学物質と SEA の複合暴露は、表皮角化細胞の炎症関連遺伝子の発現量を亢進させることを見出した。今後の更なる研究により、SEA と化学物質の複合暴露が皮膚における炎症誘導に及ぼす影響について明らかにすることで、化学物質の新たなリスク評価および SEA が誘導する各種疾病を予防するための新たな戦略の構築が期待される。

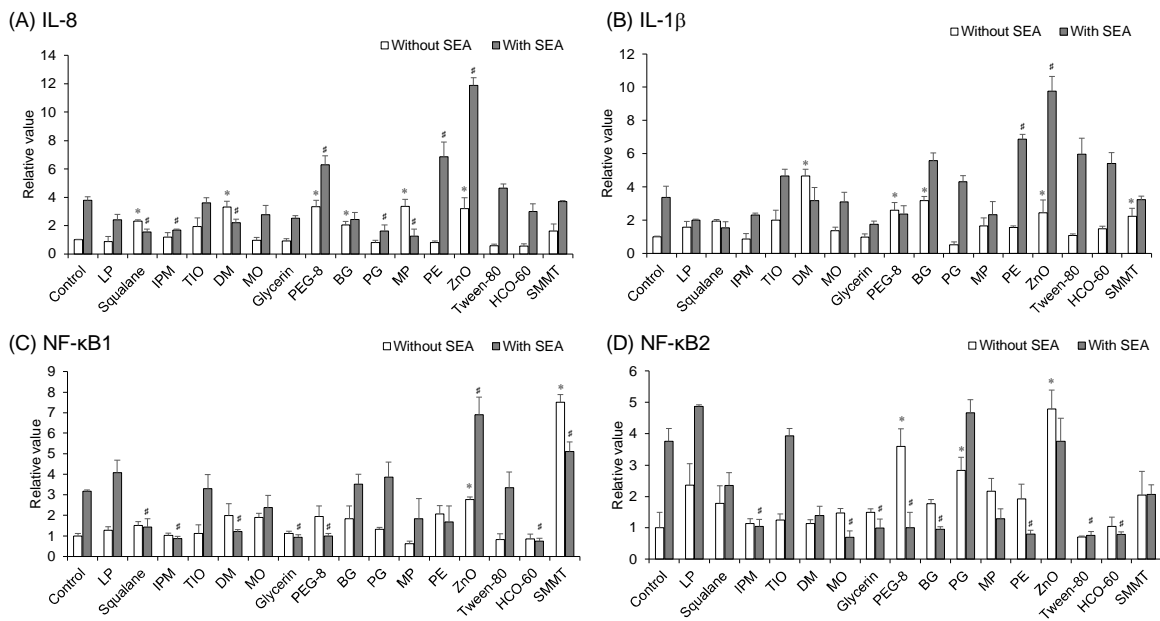


図 4: HaCaT 細胞における SEA 誘導性炎症関連遺伝子の発現に対する化学物質の影響

遺伝子発現量は、DPBS を添加した Control 群を 1 とした相対値で示した。誤差範囲は標準誤差を示す。* $p < 0.05$ vs Control without SEA (n=3)、# $p < 0.05$ vs Control with SEA (n=3)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5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 Shimamura Y., Noaki R., Kurokawa A., Utsumi M., Hirai C., Kan T., Masuda S.	4. 巻 13(9)
2. 論文標題 Effect of (-)-epigallocatechin gallate on activation of JAK/STAT signaling pathway by staphylococcal enterotoxin A.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins13090609	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 Shimamura Y., Yui T., Horiike H., Masuda S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Toxicity of combined exposure to acrylamide and Staphylococcus aureus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Toxicology Reports	6. 最初と最後の頁 876-882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxrep.2022.04.018	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 Yamanashi Y., Shimamura Y., Sasahara H., Komuro M., Sasaki K., Morimitsu Y., Masuda S.	4. 巻 10(3)
2. 論文標題 Effect of (-)-epigallocatechin gallate on activation of JAK/STAT signaling pathway by staphylococcal enterotoxin A	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms10030574	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 Shimamura Y., Okuda A., Ichikawa K., Inagaki R., Ito S., Honda H., Masuda, S.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Factors influencing the formation of chemical-hemoglobin adducts.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Toxics	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxics10010002	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8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 野秋理奈, 市川顕哉, 島村裕子, 菅敏幸, 増田修一
2. 発表標題 免疫応答に及ぼす黄色ブドウ球菌毒素の影響およびカテキン類による制御機構の解明
3. 学会等名 第35回茶学術研究会総会・講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹村智花, 鈴木しおり, 島村裕子, 増田修一
2. 発表標題 食中毒菌の病原因子発言に対する食品化学物質の影響
3. 学会等名 第117回日本食品衛生学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山梨佑花, 島村裕子, 増田修一
2. 発表標題 食中毒菌の膜小胞中成分に及ぼす培養条件の影響
3. 学会等名 第117回日本食品衛生学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大浦由起乃, 土屋まどか, 山梨佑花, 島村裕子, 岩佐氏智, 二階堂勝, 山内恒治, 鴨志田真弓, 増田修一
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌由来膜小胞が誘導する炎症・アレルギー反応に対する微酸性電解水の作用
3. 学会等名 日本食品科学工学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大浦由起乃, 山梨佑花, 島村裕子, 増田修一
2. 発表標題 食中毒菌由来膜小胞の性状および炎症反応に対するカテキンの影響
3. 学会等名 第17回日本カテキン学会年次学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大浦由起乃, 山梨佑花, 島村裕子, 増田修一
2. 発表標題 食中毒菌由来膜小胞の性状および炎症誘導に対するポリフェノールの影響
3. 学会等名 第118回日本食品衛生学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田代萌香, 島村裕子, 増田修一
2. 発表標題 糖尿病状態時における細菌の病原性発現に変異・発がん物質が及ぼす影響
3. 学会等名 第118回日本食品衛生学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田代萌香, 島村裕子, 大石里夏, 下位香代子, 増田修一
2. 発表標題 グリシドール-ヘモグロビン付加体を生成する化学物質およびその生成に対する影響因子の探索
3. 学会等名 第49回日本毒性学会
4. 発表年 2022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)	

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