

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：34428

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890222

研究課題名（和文） 環境と食品中に存在するバリア機能破綻作用を持つアレルギー増悪作用物質の探索と解明

研究課題名（英文） Screening and elucidation of an allergic exacerbation-barrier disruption action substance in environment and food

研究代表者

角谷 秀樹 (KAKUTANI HIDEKI)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：00581414

研究成果の概要（和文）：

生体は、上皮細胞の粘膜バリアにより抗原の侵入を防いでいる。そして、それを担っているのがタイトジャンクション (TJ) である。本研究では、腸管上皮細胞に着目し、環境と食品中に存在するバリア機能破綻作用と免疫攪乱作用とを有する化学物質の探索を行った。その結果、種々の環境汚染物質がタイトジャンクションのバリア機能を低下させることを見出した。また、マウスにダイオキシン類と抗原とを経口投与することでダイオキシン類の投与量依存的な抗原特異的な抗体価の上昇が観察された。これらのことは、我々の生活環境中の化学物質が上皮細胞バリアを破綻させ、尚且つ免疫攪乱作用を示すことを示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：

Epithelial cells surround mammalian organs and tissues and epithelial cell sheets constitute the principal barrier to cellular uptake and transport. The tight junction (TJ) plays a pivotal role as both a barrier to restrict various substances, such as pathogens, toxins, and allergens. In this study, we screened the chemical substances to disruption of barrier function and disturbance of immune system in environment and food. It was observed that various environmental pollutants were decreased barrier function of TJ. Furthermore, we observed that treatment of mice with dioxins and antigen results in significant elevation antigen-specific immunoglobulin production in a dose-dependent manner. These results suggest the chemical substance in environment and food dysregulates the barrier function and immune system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,220,000	366,000	1,586,000
2011年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,190,000	657,000	2,847,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：衛生学

キーワード：腸管バリア、環境汚染物質

## 1. 研究開始当初の背景

近年、化学物質の高濃度曝露等による顕在的な毒性発現による健康被害の事例は、その法的規制や検査体制の設備により減少傾向にある。しかし、過去の公害と比較して現代の人体汚染は相対的に低濃度曝露であること、並びに複合的な曝露が想定されることから、今後は「生体の恒常性に対する攪乱作用物質」に焦点を絞り、その作用を有する環境・食品汚染物質の探索と生体毒性影響に関する研究が社会のニーズとなるものと推察される。

皮膚や粘膜は生体内外の環境を境界し、生体外からの様々な物理学的並びに生物学的侵襲から生体を保護するための組織として分化している。しかし、粘膜は皮膚とは異なり、単なる物理的バリアとしての機能だけではなく、生体に必要な酸素や栄養物等の吸収と共に、有害な物質を選択的に排除するという役割を担っている。例えば、消化管粘膜では、腸管内に侵入した病原性微生物や食物抗原等によって免疫反応が誘導されることがしばしば観察される。この観察は、これら抗原が抗原性を有したまま生体内に入っていること、また侵入した抗原によって誘導される、上皮細胞粘膜組織の生体防御システムが、これ以上の抗原を生体に侵入させない様に働いていることを意味している。そして、この粘膜バリアの生体防御システムを担っているのがタイトジャンクション (TJ) である。TJは細胞間隙において、隣り合う細胞のTJと側面で対合することにより細胞間の接着を担っている。TJは、通常、細胞間の距離をゼロにすることによってアレルゲン等の生体異物の透過を制御しているものの、その細胞間接着が、環境や食品中の化学物質によって一旦破綻すれば、過剰のアレルゲンの透過・侵入を許すこととなり、その結果、免疫担当細胞が更に惹起され、アレルギー症状をより増悪する作用を引き起こす可能性が高い。従って、このTJのバリア機能を破綻させる物質の探索とその作用機構を明らかにしていくことが、アレルギー疾患の発症及び治療対策として、極めて重要かつ有効であると確信した。

## 2. 研究の目的

上記背景のもと、本研究では、どのような化学物質が上皮細胞の粘膜バリア機能を破綻させる能力を有するか否かを簡易的に判定、評価できる、培養細胞による *in vitro* 評価試験法を確立し、それを駆使して探索を行うこと、並びにその探索した物質について *in vivo* 評価試験法にて検証することに焦点を絞った。

## 3. 研究の方法

### (1) 被検物質

ダイオキシン類は 2, 3, 7, 8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin (TCDD)、2, 3, 7, 8-tetrabromo-dibenzo-*p*-dioxin (TBDD)、3, 3', 4, 4', 5-PeCB (PCB)、多環芳香族炭化水素 (PAHs) は benzo[a]pyrene (B[a]P)、benzo[k]fluoranthene (B[k]F)、残留性有機汚染物質 (POPs) は hexachlorocyclohexane ( $\alpha$ -HCH)、hexachlorobenzene (HCB)、を被検物質とした。

### (2) チトクロム P450-1A1 の活性誘導による評価

ヒト腸管モデルとして汎用される Caco-2 細胞を用いた。コンフルエントの状態の Caco-2 細胞 (96 穴プレート) に被検物質を含む培養液を添加し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> の下で培養した。24 時間後、培養液を除去し、7-ethoxyresorufin を添加し、生じた resorufin の量を励起波長 550 nm、蛍光波長 595 nm にて測定した。

### (3) 膜電気抵抗値を指標としたバリア機能評価

Caco-2 細胞を 6.5-mm Transwell (0.33 cm<sup>2</sup>) に播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> の下で培養した。細胞の TJ の形成の度合いを Millicell®-ERS による膜電気抵抗値 (TER) の測定によって評価した。13-20 日後、TER が安定した時点で被検物質を apical 側から添加し、経時的に TER 値を測定した。

### (4) 分子量の異なるデキストラン透過性を指標としたバリア機能評価

TER 値の低下が認められた Transwell の apical 側より、種々の蛍光標識デキストラン (MW; 4,000-400,000) を添加し、basal 側へ透過した蛍光標識デキストラン量を励起波長 485 nm、蛍光波長 535 nm にて測定した。

### (5) 実験動物モデルを用いた免疫誘導能評価

モデル抗原として汎用されている ovalbumin (OVA) と被検物質との混合溶液 (投与溶媒は生理食塩水、Tween20、メタノールを 89:10:1 で混合したものをを用いた) を 6 週齢の雌性 BALB/c マウス (日本 SLC) に 70 日間連続経口投与した。投与開始 1 週間後より毎週、血液と糞便とを採取した。血液は 3,000g で 10 分間遠心し、血清成分を調製した。糞便はリン酸緩衝液で懸濁後、3,000g で 10 分間遠心し、その上清を糞便抽出液として用いた。

血清及び糞便抽出液中の抗原特異的な抗体価は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により評価した。OVA を Immuno

plate に炭酸緩衝液 (pH 9.6) を用いて一晚インキュベートすることで固相化した。ブロックエースを用いブロッキング後、適宜希釈した血清及び糞便抽出液を添加し、室温にて 2 時間反応させた。その後、HRP detection antibody (IgG, IgA) を添加し、HRP の基質である TMB solution を加え反応させた。プレートリーダーを用いて、主波長 450 nm、副波長 595 nm で吸光度を測定した。結果は吸光度を log 10 の力価として表した。

#### 4. 研究成果

##### (1) チトクロム P450-1A1 の活性誘導による評価

ヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2 細胞におけるチトクロム P450-1A1 の活性誘導を EROD アッセイにより評価したところ、コントロールと比べて、TCDD (10 nM) と TBDD (10 nM) とは約 8 倍、PCB (10 nM) は約 3 倍、B[a]P (10 μM) は約 8 倍、B[k]F (10 μM) は約 9 倍高い値を示した。一方、α-HCH (10 μM) と HCB (10 μM) とは EROD 活性の上昇が観察されなかった。これらの結果から、ダイオキシン類や PAHs は腸管上皮細胞においてチトクロム P450-1A1 誘導能を有することが示唆された。

##### (2) 膜電気抵抗値を指標としたバリア機能評価

Caco-2 単層膜に被検物質を apical 側から添加し、TER 値を測定し、バリア機能の評価した。TER 値と細胞層のバリア機能とは強い相関関係があり、TER 値の低下は細胞間に隙間で出来ていることを示す。ダイオキシン類や PAHs を添加すると、添加時間依存的な TER 値の低下が観察され、添加 72 時間では PCB で約 3 割、TCDD、TBDD、B[a]P で約 4 割、B[k]F で約 5 割の TER 値の低下が認められた。一方、α-HCH (10 μM) と HCB (10 μM) とでは TER 値の低下は観察されなかった。

##### (3) 分子量の異なるデキストラン透過性を指標としたバリア機能評価

ダイオキシン類によるバリア機能破綻の程度を検討するために分子量の異なる蛍光標識デキストランを用いて、細胞間隙の透過量を測定した。その結果、TCDD により Caco-2 細胞のバリア機能を破綻させると、分子量 4,000 Da のデキストランのみが basal 側に移行した。これらのことから、ダイオキシン類や PAHs は細胞間の TJ の接着を弱め、物質透過を上昇させることが示唆された。

##### (4) 実験動物モデルを用いた免疫誘導能評価

TCDD の免疫攪乱作用を検討するために、モデル抗原である OVA と TCDD とを 10 週間、連

続経口投与した。その結果、TCDD 投与群ではコントロール群よりも高い血清中 OVA 特異的な IgG 抗体価が観察され、投与回数が増える毎に IgG 抗体価の上昇が認められた。加えて、TCDD の投与濃度依存的な IgG 抗体価の上昇も観察された。糞便抽出液中の OVA 特異的な IgA 抗体価は、血清中 IgG 抗体価の結果と同様に、TCDD の投与量依存的な抗体価の上昇が認められた。

以上の研究成果から、環境汚染物質、特に TCDD は上皮細胞バリア機能を破綻させること、さらに経口曝露により免疫攪乱作用を示すことを明らかとした。バリア機能破綻能を有する環境・食品汚染物質のスクリーニングと、バリア機能破綻と免疫攪乱作用と連関を解明することによりアレルギー疾患等に対する予防及び治療対策の一助となるものと確信される。

#### 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〕(計 0 件)  
該当無し

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 長村学、角谷秀樹、他 8 名「*in vitro* 及び *in vivo* バイオアッセイによる環境汚染物質の薬物代謝酵素誘導能」、第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2010 年 10 月、摂南大学

2. 角谷秀樹、他 3 名「ダイオキシン類が有する生体バリア機能破綻作用の検討」、第 20 回環境化学討論会、2011 年 7 月、熊本県立大学

3. Hideki Kakutani、他 3 名「Comparison of *In Vitro* and *In Vivo* Cytochrome P450-1A Activities Induced by Structural Difference of TXDDs and DL-PXBs」, 31<sup>st</sup> International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutant (Belgian), August, 2011

4. 山本宗宏、角谷秀樹、他 8 名「ダイオキシンとベンゾ[a]ピレン処理によって観察されたデキストランの生体膜透過性」、第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2011 年 10 月、神戸学院大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角谷 秀樹 (KAKUTANI HIDEKI)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：00581414

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し