

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23601027

研究課題名(和文) 室内環境化学物質胎児期暴露の骨髄細胞への影響：樹状細胞分化とTreg誘導の解析

研究課題名(英文) The influence on bone marrow cells of the indoor environment chemicals: Analysis of dendritic cell differentiation and the Treg induction

研究代表者

杉浦 勉 (SUGIURA, Tsutomu)

産業医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：40131924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：昨今、子供への多種多様な化学物質の暴露が健康影響するのではないか、という懸念から、化学物質胎児期暴露の影響を特にトルエンとホルムアルデヒドなど化学物質過敏症が疑われる物質の影響について検討した。暴露モデルマウスの検討から、暴露されたマウスの胸腺では、生まれた直後において、の細胞内蛋白質の一つである転写因子の活性化が観察され、分化誘導された細胞の活性化能も亢進していたことがわかった。以上より、低濃度化学物質胎児期暴露は、より未分化な細胞群の集まりである胸腺細胞に対し、分子レベルでの変化をもたらし、細胞の分化という観点からも化学物質の影響があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：As it has been reported that exposure of a wide variety of chemical substances to the child was increased, we investigated the effect of a substance chemical, such as formaldehyde and toluene, which is suspected in particular the effect of chemical prenatal period. From consideration of the exposure model mice, thymocytes immediately prepared from exposed mice after birth. Additionally, bone marrow derived cells were also highly activated. Thus, the low concentration chemical prenatal exposure affected cellular events on the molecular level.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：子ども学

キーワード：室内環境化学物質 制御性T細胞 骨髄由来細胞 STAT5

1. 研究開始当初の背景

室内環境化学物質が原因と考えられているものに化学物質過敏症がある。室内環境化学物質に職場で通常暴露され、発症には至らぬまでの化学物質過敏症予備群、或いは他の過敏症と合併して化学物質過敏症と気付いていない場合も存在することが予想される。昨今、子供への多種多様な化学物質の暴露が健康影響するのではないかと議論されており、そのためモデルマウスを用いた化学物質の暴露影響を解析することが試みられている。しかしながら低濃度暴露システムによる胎児期、幼児期への影響に関する研究は十分になされていない。

2. 研究の目的

そこで本研究課題では、化学物質胎児期暴露の影響を骨髄由来樹状細胞の分化への影響および Treg の誘導の観点から、化学物質の影響を評価する。

3. 研究の方法

(1) トルエンの暴露モデルマウスの構築

ホルムアルデヒド吸入暴露

C3H/HeN マウスにトルエン (5 ppm、50 ppm) を吸入暴露チャンバーにて終日全身暴露した。この濃度域は室内環境基準値 (50 ppm) を含み、いわゆる低濃度化学物質と想定している。暴露時間は1日8時間で行い、対照群には清浄空気のみを暴露する群を用意した。暴露時期は、生後4週から6週間行った。

脾臓細胞の細胞表面マーカーの解析

細胞表面マーカーは蛍光色素をラベルしたモノクローナル抗体で染色後、FACS を用いて CD4、CD8、CD11b、CD14、CD19、CD25 について、フローサイトメーターにより解析した。

(2) ホルムアルデヒドの暴露モデルマウスの構築

ホルムアルデヒド吸入暴露

実験動物には BALB/c 系妊娠マウスを用いた。BALB/c 系妊娠マウスは 80 ppb 暴露群、対照群をそれぞれケージに入れ、ステンレス製の吸入暴露チャンバー (柴田科学) 内に静置し、暴露を行った。幼児期暴露は2週令から1日16時間、2週間行った。胎児期暴露は、1日16時間、妊娠3日目から17日目までの2週間暴露した。対照群には清浄空気のみを暴露した。暴露群・対照群ともに暴露終了後、そのまま飼育し、4週令で麻酔下、血液、脾臓または胸腺を採取した。

増殖反応、液性因子の解析

マイトジェンに対する脾臓細胞及び胸腺細胞の増殖反応は thymidine の取り込みによる DNA 合成能により評価した。24時間後の培養上清中 IL-2 濃度はサンドイッチ ELISA 法により測定した。

転写因子の解析

転写因子 (NF- κ B、NFAT および STAT5) の活性化はそれぞれに特異的なプローブ・抗体を用いたゲルシフト法、およびウエスタンブロット法により解析した。

4. 研究成果

(1) トルエンによる生体影響

化学物質 (トルエン) の影響を調べるために、リンパ組織である脾臓における細胞分布についてフローサイトメトリーにより解析した。まず、マウスの脾臓重量変化を調べたが、トルエンによる影響は認められなかった (図1)。次に、脾臓細胞の細胞腫の変化を調べた。6週間暴露 (50 ppm、5 ppm) を行なったマウスでは、CD19 細胞の割合が若干増加していた (図2)。また Treg の細胞表面マーカーである CD4、CD25 については減少の傾向が認められた (図2)。

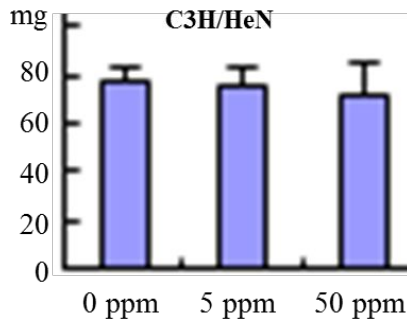


図 1

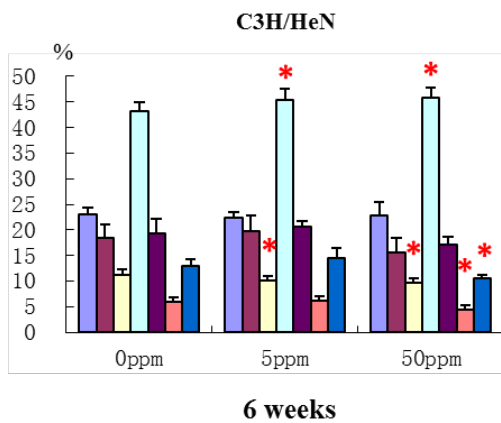


図 2

(2) ホルムアルデヒドによる生体影響

成獣にホルムアルデヒド暴露 (80 ppb) を行った。実験動物には雌性の BALB/c マウスを用いた。暴露終了後、マウスから脾臓細胞と胸腺細胞を調製し、それらのマイトジェン (LPS、ConA) に対する影響を増殖反応により評価したが、ホルムアルデヒドの影響は認められなかった (図 3 A、B)。しかしながら、胸腺細胞を ConA で刺激し、その培養上清中の IL-2 濃度を ELISA 法で測定したところ、ホルムアルデヒド暴露群で産生の増加が認められた (図 4)。

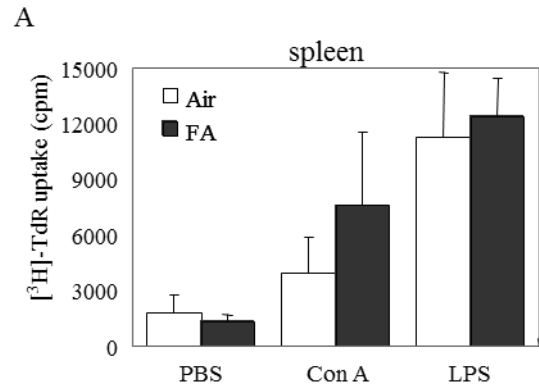


図 3 A

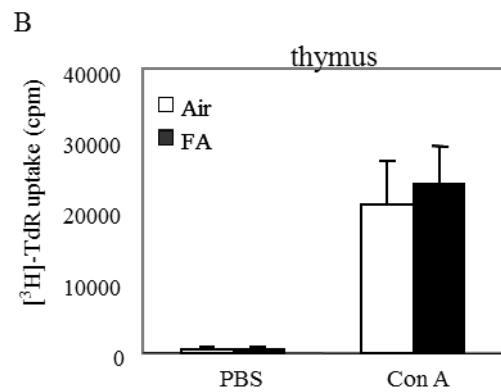


図 3 B

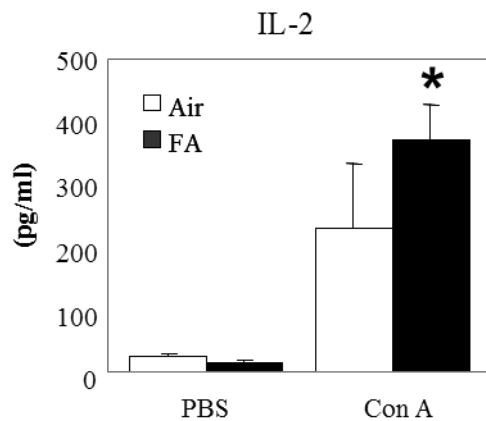


図 4

次に妊娠マウスへの化学物質暴露を行った。成獣の実験と同様、ホルムアルデヒド 80 ppb、2 週間を選択し、実験動物には BALB/c マウスを用いた。暴露のタイミングはプラークを確認後、2 日目を暴露初日とした。幼児期にホルムアルデヒドを暴露したマウスでは胸腺への影響が認められたので、胸腺細胞への影響に焦点を当て、解析を進めた。

暴露終了後、生まれた直後の胎児より胸腺を摘出し、細胞とその溶解液を調製した。最初に、細胞溶解液を使用し、転写因子の活性化をゲルシフト法で解析したところ、STAT5の活性化が観察された(図5)。また胸腺細胞を *in vitro* で培養し、それらのマイトジェン(ConA)に対する影響を増殖反応により評価したところ、ホルムアルデヒド暴露を受けた胎児マウスから調製した胸腺細胞は対照群と比べ、有意に高い反応性を示した(図6)。また、24時間後の培養上清中のIL-2産生も対照群よりも有意に高値であった(図7)。またホルムアルデヒド暴露を受けたマウスから骨髓細胞を調製し、肥満細胞を分化誘導させ、そのヘキソサミニダーゼ放出能を測定したところ、暴露群で有意に高い産生量が認められた(図8)。

以上より、低濃度化学物質胎児期暴露は、より幼弱な細胞群である胸腺細胞に対し、分子レベルで何らかの変化を来たし、細胞の分化という観点からも化学物質の影響があることが示唆された。

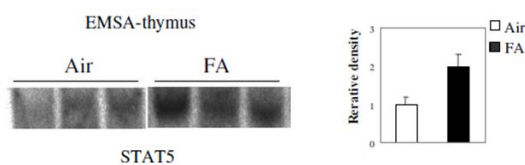


図5

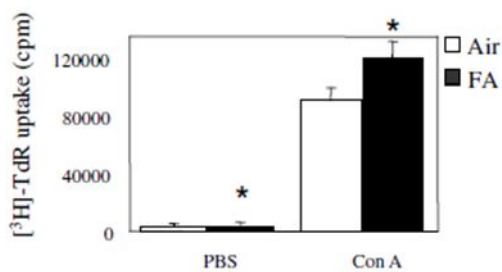


図6

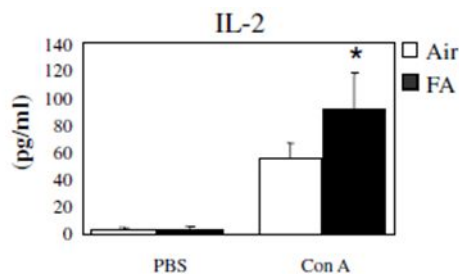


図7

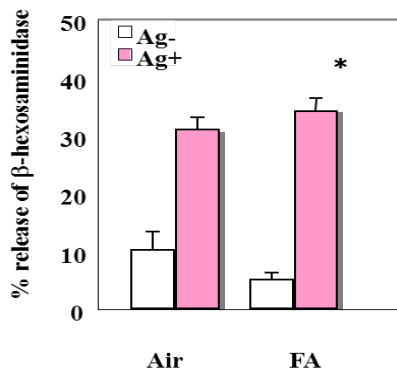


図8

5. 主な発表論文等

[論文発表](計1件)

Tin-Tin Win-Shwe, Naoki Kunugita, Daisuke Nakajima, Yasuhiro Yoshida, Hidekazu Fujimaki.:

Developmental stage-specific changes in immunological biomarkers in male C3H/HeN mice after early life toluene exposure. *Toxicology Letters*, 208 (2012) 133- 141, doi:10.1016/j.toxlet.2011.10.015

[学会発表](計4件)

(1) 森田健太郎, 吉田安宏ら.: 室内環境汚染物質 2 - エチルヘキサノールの免疫細胞機能に対する影響.

第36回日本分子生物学会, 2013年12月4日, 神戸国際会議場(神戸)

(2) 森田健太郎, 吉田安宏ら.: The indoor air pollutant 2-ethyl-hexanol affects immune cells.

第 42 回日本免疫学会， 2012 年 10 月 20 日，
幕張メッセ（千葉）

(3) 余旭勝， 吉田安宏ら.: 化学物質暴露
による特異抗体の検出に関する研究.

第 30 回産業医科大学学会， 2012 年 10 月 20
日， ラマツイーニホール（北九州）

(4) Song, Y., Yoshida, Y.: Intratracheal
administration of Asian sand dust induces
autophagic and apoptotic phenomena in
splenocytes.

第 34 回日本分子生物学会， 2011 年 12 月 8 日，
パシフィコ横浜（横浜）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

杉浦 勉 (SUGIURATsutomu)

産業医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：40131924

(2)研究分担者

吉田 安宏 (YOSHIDA Yasuhiro)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10309958

黒田 悦史 (KURODA Etsushi)

産業医科大学・医学部・講師

現 大阪大学・医学部・准教授

研究者番号：10299604