

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790596

研究課題名(和文) バリア破綻能 - 免疫賦活化能を有するアレルギー増悪物質のハイブリッド式検出法の開発

研究課題名(英文) Development of hybrid screening system for barrier-disrupted and immune-activated substance

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：生体バリアが破綻すると、アレルギー等の免疫疾患を誘発する可能性が指摘されている。本研究では、環境汚染物質が有するバリア機能及び免疫賦活化能を同時に評価可能なハイブリッド式検出法の開発のための基礎情報の収集を行った。その結果、種々の環境汚染物質がバリア機能を破綻させ、尚且つ免疫応答を攪乱することを見出した。これらのことは、バリア機能及び免疫賦活化能を同時に評価可能なハイブリッド式検出法の開発の可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：It is suggested that the immune diseases such as allergies causes it with the disruption of epithelial cell barrier. In this study, we performed the basic data for development of the hybrid detection system that could evaluate the barrier function and the immune response by an environmental pollution at the same time. It was observed that various environmental pollutants were decreased barrier function, and disrupted the immune response. There results suggest the possibility to develop the hybrid detection system that could evaluate the barrier function and the immune response by an environmental pollution at the same time.

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：アレルギー応答 腸管バリア

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、快適な生活を追求する余り、現在までに何万種類もの合成化学物質を開発してきた。そして実際に、我々はそれら化学物質から計り知れないほどの恩恵を享受してきている。しかし、その一方でシックハウス症候群等に代表される様に、非意図的に摂取したホルムアルデヒド等の化学物質によって、我々の皮膚・粘膜の悪化や頭痛・倦怠感等の多彩且つ非特異的発症や原因不明の喘息や皮膚炎等の、病態未解明な疾患の発症例まで報告されている（厚生労働科学研究：シックハウス症候群診療マニュアル）。また近年、合成化学物質が直接的なアレルゲンではないものの、花粉症（鼻アレルギー）、気管支喘息、食物アレルギー等のアレルギー疾患の患者が、幼児から若年者等を中心に急増している。応募者は、上記現象の原因を考慮した結果、この現象を「日本人の遺伝的素因の変異説」で説明することには極めて無理があること、そして、その原因として、日常生活の中に「化学物質等が氾濫している日本人のライフスタイルの変化」が最も説明しやすいものと考えた。事実、Takanoらは、ダニアレルゲンを予め接種したマウスに、種々のプラスチック製品等の可塑剤であるフタル酸ジエチルヘキシルを投与した時に、アトピー性皮膚炎を増悪させることを報告している（Takano H *et al*, *Environ Health Perspect*, 114, 1266-9, 2006）。また同様な報告は、同研究グループのInoueらによって、医薬品や化粧品等の原料や重合防止剤として用いられているナフトキノンにおいても観察されているものの（Inoue K *et al*, *Eur Respir J*, 29, 259-67, 2007）、両物質がどのような作用機構で生体内（上皮粘膜バリア透過）に侵入することにより、免疫担当細胞を賦活化させたか等の知見に関しては、未だ解明されていない。さらに、化学物質による免疫賦活化能の評価は *in vivo* に集中しており、*in vitro* における報告例は皆無である。このような背景より、応募者は、どのような化学物質がアレルギー疾患の発症及び増悪作用を有しているのかを評価可能な簡易・迅速且つ高精度な *in vitro* スクリーニング試験法を開発することが、アレルギー疾患の発症及び増悪作用の予防、治療対策として、極めて重要であると確信した。

## 2. 研究の目的

上記背景のもと、本研究では、食物アレルギーを誘発もしくは増悪しうる化学物質を簡便にスクリーニングできる *in vitro* 検出法の開発のために、腸管上皮粘膜組織の生体防御システムに着目した、簡易且つ高精度な *in vitro* 検出法を開発を試みるものである。

## 3. 研究の方法

### (1) 被検物質

検討対象とした環境汚染物質は、ダイオキシン類、多環芳香族炭化水素、残留性有機汚染物質とした。

### (2) 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。

### (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

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 (FD) (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。

### (4) *in situ* ループ法を用いたバリア機能評価

一昼夜絶食させた 11-12 週齢の雌性 C57BL/6 マウスの空腸に 3 cm のループを作製し、ループ内に被検物質と FD との混合液を投与した。投与後 0、1、2、4、6 時間目にマウス尾静脈より採血し、適宜希釈し、蛍光度計（励起波長；485 nm、蛍光波長；535 nm）を用いて蛍光値を測定し、血中に移行した FD 量と投与後 6 時間目までの FD 濃度-時間曲線下面積 (AUC<sub>0-6 h</sub>) を算出した。

### (5) モデル抗原を用いた Th1 及び Th2 応答性の検討

マウス T リンパ腫細胞株 E.G7-OVA 細胞もしくはヒト T 細胞由来株 HPA-ALL、Jurkat 細胞を卵白アルブミン (OVA) で刺激し、各種サイトカインの mRNA 量をリアルタイム PCR 法にて測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 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、 $\alpha$ -HCH と HCB 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。

#### (3) *in situ* ループ法を用いたバリア機能評価

マウスの腸管ループ内に FD-4 (1 mg) と被検物質との混合液を投与したときの血中デキストラン量は、1 時間目において vehicle 投与 (DMSO; 対照) では 2.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であったのに対して、TCDD 投与では 4.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、また B(a)P 投与では 2.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。しかしながら、その後の挙動は両化合物で異なり、TCDD は 1 時間後の血中濃度が最大であり、投与後 6 時間までその血中濃度はほぼ一定であった。一方、B(a)P は投与 6 時間後まで経時的に血中濃度が上昇し、6 時間目の血中濃度は最終的に 12.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を示した。また、6 時間までの被検物質投与による  $\text{AUC}_{0-6\text{h}}$  を算出したところ、TCDD の  $\text{AUC}_{0-6\text{h}}$  は 23.5  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 、B(a)P は 31.5  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$  となった。

#### (4) モデル抗原を用いた Th1 及び Th2 応答性の検討

E.G7-OVA 細胞を OVA で刺激すると、IL-4 の mRNA 量が増加したものの、その増加率は僅かなものであった。また、ヒト T 細胞由来細胞株を用いた検討では、Jurkat 細胞では変化は観察されなかった。一方、HPB-ALL 細胞を用いた検討では、OVA 刺激により IL-4 及び IFN- $\gamma$  の mRNA 量の増加が観察された。さらに、OVA 存在下で HPB-ALL 細胞をダイオキシン類で刺激すると、OVA により増加した IL-4 の mRNA 量がさらに増加し、IFN- $\gamma$  の mRNA 量は減少することを観察した。

以上の研究成果より、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とを明らかとした。さらに HPB-ALL 細胞を用いることで、*in vitro* で免疫応答を評価可能であることを見出した。これらのことは、バリア機能及び免疫賦活化能を同時に評価可能なハイブリッド式検出法の構築のための基礎情報となり、今後さらなる改良を加えることで、*in vitro* 検出法の開発に繋がるものと確信した。それにより、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が可能となり、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)

#### (1) 雑誌論文 (計 0 件)

該当無し

#### (2) 学会発表 (計 11 件)

Hideki Kakutani, 他 1 名「Orally exposure with dioxins facilitates OVA-specific immunoglobulin production」, 第 42 年会日本免疫学会総会・学術集会、2013 年 12 月 11-13 日、幕張メッセ

Souichi Ohta, Hideki Kakutani, 他 2 名「Dioxins and their related compounds weaken tight junction as epithelial barrier with decrease of claudin in Caco-2 cells」, 33th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutant (Korea), 26-29th, August, 2013

Hideki Kakutani, 他 3 名「Observation of antigen-specific immunoglobulin production in 70-days long-term TCDD-exposed mice sensitized without adjuvants」, 33th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutant (Korea), 26-29th, August, 2013

角谷秀樹、他 3 名「マウス授乳期の TCDD 曝露の有無による免疫機能に対する毒性影響」, 第 22 回環境化学討論会、2013 年 7 月 31 日-8 月 2 日、東京農工大学

西本貴樹、角谷秀樹、他 3 名「腸管ループ法を用いた環境・食品汚染物質による生体バリア破綻能の比較」, 第 22 回環境化学討論会、2013 年 7 月 31 日-8 月 2 日、東京農工大学

角谷秀樹、他 4 名「塩素・臭素化ダイオキシン類の薬物代謝酵素誘導能」, 第 133 年会日本薬学会、2013 年 3 月 27-30 日、パシフィコ横浜

Hideki Kakutani, 他 3 名「Damaging effect of tight junctions as barrier function in Caco-2 cells indicated by dioxins and their related compounds」, 32th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutant (Australia), 27-31th, August, 2012

山本翔、角谷秀樹、他 3 名「TCDD の長期連続投与による抗原特異的な抗体産生の推移」, 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2012 年 10 月 20 日、武庫川女子大学

山下治子、角谷秀樹、他 3 名「生体膜破綻能を指標とした環境汚染物質の毒性評価」,

第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2012  
年 10 月 20 日、武庫川女子大学

角谷秀樹、他 5 名「ダイオキシン類が有  
する免疫攪乱作用の検討-70 日連続投与ダイ  
オキシン類による抗原特異的な抗体産生変  
動-」第 21 回環境化学討論会、2012 年 7 月  
11-13 日、愛媛県県民文化会館

太田壮一、角谷秀樹、他 5 名「Dextran 透  
過を指標とした TCDD と B(a)P による生体膜  
破綻作用」第 21 回環境化学討論会、2012 年  
7 月 11-13 日、愛媛県県民文化会館

(3) 図書 (計 0 件)

該当無し

(4) 産業財産権

出願状況 (計 0 件)

該当無し

取得状況 (計 0 件)

該当無し

(5) その他

該当無し

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