

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460804

研究課題名(和文)トリプトファンサプリメント摂取によるアレルギー反応誘発機構の解明

研究課題名(英文)The elucidation of the mechanisms behind the allergic reaction induced by tryptophan supplement byproducts.

## 研究代表者

岡本 威明 (OKAMOTO, Takeaki)

愛媛大学・教育学部・准教授

研究者番号：20398431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：トリプトファンサプリメント事故品に含まれる不純物3-phenylamino-L-alanine (PAA) を用いて、EoL-3細胞株およびヒト末梢血由来好酸球における各種ケモカインレセプター発現レベルの検討を行ったところ、PAA濃度依存的にヒト末梢血由来好酸球におけるCXCR2発現は増大し、CCR3発現は抑制された。EoL-3細胞株においても同様の傾向が確認された。これらの結果から、PAA曝露により好酸球に好中球の性質が一部付与され、インターロイキン(IL)-8への走化性を強めたことにより、更なる炎症が惹起され好酸球増多筋痛症(EMS)発症に至ったのではないかと推察された。

研究成果の概要(英文)：The expression of CXCR1 and CXCR2, and the eotaxin receptor, CCR3, in human eosinophils exposed to the contaminant 3-phenylamino-L-alanine (PAA). Chemotactic activity and CXCR1 and CXCR2 expression increased after PAA exposure in a dose-dependent manner. The CXCR2 expression level was higher than that of CXCR1. These data suggest a strong correlation between chemotactic activity and IL-8 receptor expression in eosinophils exposed to PAA. In contrast, the expression of CCR3 was inhibited by PAA in a dose-dependent manner. These results suggest that the eosinophils partially lost their original character and partially adopted the character of neutrophils upon exposure to PAA. Therefore, we suggest an eosinophilia-myalgia syndrome (EMS) onset mechanism, based on the findings that PAA increased the expression of IL-8 receptors in human eosinophils, which then developed chemotaxis to IL-8, an inflammatory chemokine, leading to further inflammation that may result in EMS onset.

研究分野：食品免疫学、食品衛生学

キーワード：トリプトファン 好酸球 不純物 好中球 走化性 ケモカインレセプター ケモカイン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 薬事法改正により、消費者はスーパーやコンビニエンスストアなどで気軽にサプリメントを購入できるようになった。様々なサプリメントが市場に溢れる中で注意しなければならない事由は、サプリメント摂取によるアレルギー反応性の健康障害である。

(2) 過去のサプリメントの代表的な事故例として、1989 年秋、米国にてトリプトファンサプリメント摂取により激しい筋肉痛と好酸球の異常増加を伴う好酸球増多筋痛症 (EMS) が発症した。また、これまでにトリプトファンサプリメント事故品中の不純物 3-phenylamino-L-alanine (PAA) が報告されている。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、ヒト好酸球における不純物ならびにその代謝産物による IDO 発現抑制効果が T 細胞の免疫応答にどのような影響を及ぼすのかについて検討する。

(2) 細胞動態解析装置を用いて好酸球の走化性に与える効果についても検討を加える。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト末梢血由来好酸球の分離

健康人男性より、末梢血を 100mL 採血し、PBS に溶かしたデキストラン 200,000 を血液の半量加えた。常温で 15 分間静置させた後、上清を回収し 2 倍量の PBS を加え 300×g、5 分間遠心した。遠心後、細胞懸濁液を上清と等量のリンホプレップの上に重層し、400×g、20 分間遠心した。遠心後、顆粒球を含む赤血球ペレットに滅菌水を加えて、赤血球を溶血させ、顆粒球を分離した。分離された顆粒球に、PBS で溶解された 0.5% BSA 2mM EDTA を加えて懸濁し、Eosinophil Biotin-Antibody カクテルを加えて冷蔵で静置した。さらに

MACS バッファーを加え、Anti-Biotin マイクロビーズを加え再び冷蔵で静置した。遠心後、細胞懸濁液を LS カラムを用いて好酸球を分離した。分離された好酸球を PAA 各濃度で一定時間曝露した。PAA は純度 95% に化学合成された。PAA 曝露後、トリパンブルー染色法を用いて細胞の生存率を測定した。

### (2) 細胞培養および PAA 曝露

培養細胞は、ヒト好酸球性白血病由来細胞株 EoL-3 (理研バイオリソースセンター) を用いた。EoL-3 細胞株は、10% ウシ胎児血清を添加した RPMI1640 培地 (シグマ・アルドリッチ株式会社) で 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下において培養した。EoL-3 細胞株を 1.0×10<sup>6</sup> cells/mL で播種し、PAA 各濃度で一定時間曝露した。

### (3) ギムザ染色

各細胞の形態およびヒト末梢血由来好酸球の精製度合いを確認するため、ギムザ染色を行った。好酸球画分および EoL-3 細胞株を 1.0×10<sup>6</sup> cells/mL に調製した後、スライドガラス上のリキッドブロッカーで作成した罫いの中に細胞懸濁液を適量滴下した。乾燥後、メタノール滴下により固定し、ギムザ染色液で 20 分間染色した。染色後、PBS を用いて洗浄を行った。乾燥後、検査用正立顕微鏡を用いて観察を行った。

### (4) ヒト好酸球における各種ケモカインレセプターの検出

PAA 曝露後、EoL-3 細胞株およびヒト末梢血由来好酸球をタンパク抽出した後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。泳動後、ウェスタンブロッティング法を用いて、各種ケモカインレセプターの検出を行った。得たバンドを数値化し、目的のバンドの数値を、内在性コントロールである GAPDH (HRP 標識抗 GAPDH 抗体) のバン

ドの数値で補正することにより、各サンプルのタンパク質量の相対値を求めた。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト末梢血由来好酸球および EoL-3 細胞株における形態観察

各細胞の形態およびヒト末梢血由来好酸球の精製度合いを確認するため、ギムザ染色後、顕微鏡観察により検討を行った。ヒト末梢血由来好酸球において、核は紫色、顆粒は赤紫色に鮮明に染色され、核の多くは 2 分葉の形態がみられた。EoL-3 細胞株においては、核は青紫色、顆粒は青色に染色された。しかしながら、核に 2 分葉は確認されなかった。また、好酸球分離実験毎に顕微鏡観察により、複数視野におけるヒト末梢血由来好酸球数及び好中球数をカウントし評価したところ、好酸球の精製度合いは平均して 90%以上であった。

##### (2) ヒト末梢血由来好酸球の各種ケモカインレセプター発現に及ぼす PAA の影響

ヒト末梢血由来好酸球において、PAA 曝露により各種ケモカインレセプター発現レベルが増強されるか否かの検討を、ヒト末梢血由来好酸球に PAA を 6 時間曝露し、SDS-PAGE 法ならびにウェスタンブロッティング法を用いて行った。ヒト末梢血由来好酸球に PAA を曝露することにより、PAA 濃度依存的に CXCR2 レセプター発現は増強され、CCR3 レセプター発現は抑制されることが確認された。また、PAA 曝露による各種ケモカインレセプターの発現レベルを評価した結果、PAA 無曝露群と比べ、PAA 濃度 0.5 $\mu$ M 曝露条件下において CXCR2 発現が約 1.8 倍に増強され、CCR3 発現が約 80%抑制された。

##### (3) EoL-3 細胞株の各種ケモカインレセプター発現に及ぼす PAA の影響

同様に、EoL-3 細胞株において、PAA 曝露に

より各種ケモカインレセプター発現レベルが増強されるか否かの検討を行ったところ、ヒト末梢血由来好酸球と同様の傾向がみられた。EoL-3 細胞株に PAA を曝露することにより、PAA 濃度依存的に CXCR2 レセプター発現は増強され、CCR3 レセプター発現は抑制されることが確認された。また、PAA 曝露による各種ケモカインレセプター発現レベルを評価した結果、PAA 無曝露群と比べ、PAA 濃度 0.5 $\mu$ M 曝露条件下において CXCR2 発現が約 2.1 倍に増強され、CCR3 発現が約 30%抑制された。

ヒト末梢血由来好酸球および EoL-3 細胞株において、ギムザ染色における呈色に違いがみられた。双方の細胞におけるギムザ染色において、核および顆粒の色に違いがみられたことから、核内部および顆粒の成分が異なると考えられる。好酸球中には炎症性メディエーターである Eosinophil Cationic Protein (ECP) や Eosinophil Derived Neurotoxin (EDN) 等が含まれており、活性化された好酸球から脱顆粒により放出される。しかし、ギムザ染色における呈色の違いから、ヒト末梢血由来好酸球および EoL-3 細胞株に含まれる炎症性メディエーター等が異なる可能性が示唆された。また、PAA はヒト好酸球における各種ケモカインレセプターの発現レベルに影響を及ぼすことが明らかとなった。通常、ヒト正常好酸球には CRTH2 レセプターならびに CCR3 レセプターが発現しており、走化性因子プロスタグランジン D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) ならびに Eotaxin に対して感受性を示すが、走化性因子インターロイキン (IL) -8 に対しては感受性を示さない。一方、好中球は CXCR1 および CXCR2 レセプターを発現し、IL-8 に対して感受性を示す。我々の研究においても、ヒト末梢血由来好酸球に PAA を曝露することにより、本来感受性を示さない IL-8 に対して PAA 濃度依存的に走化性を示すことが確認された。これは PAA 曝露好酸球にお

ける CXCR2 発現と同様の傾向であることから、PAA 曝露好酸球の走化性の誘導と CXCR2 レセプター発現の増大に深い関連があることが示唆された。また、ヒト好酸球において正常好中球に高発現している IL-8 レセプターが PAA 濃度依存的に増強され、正常好酸球に高発現している Eotaxin レセプターが PAA 濃度依存的に抑制されたことから、PAA 曝露により好酸球が本来の性質を一部失い、好中球の性質を部分的に獲得したのではないかと推察された。これらの結果から、EMS 発症機序の一つとして、トリプトファン事故関連物質である PAA が好酸球の IL-8 レセプターの発現を増大し、炎症性ケモカインである IL-8 への走化性を強めたことにより、さらなる炎症が惹起され EMS 発症に至ったのではないかと示唆された。今後は、好酸球表面マーカーの発現検討等により、PAA 曝露好酸球の IL-8 に対する走化性と CXCR2 レセプター発現との間における関係性について、さらなる検討を行う必要がある。

また、ヒト末梢血由来好酸球は、採血量に対して細胞の回収率が非常に低く、さらに、採血者の体調にデータが左右されるため、再現性が取りづらい。そのため、大規模な健康食品の安全性評価に対して利用することは難しい。そこで、本研究ではヒト好酸球性の細胞株である EoL-3 細胞株に注目し、ヒト末梢血由来好酸球における各種ケモカインレセプター発現との比較検討を行った。その結果、EoL-3 細胞株とヒト末梢血由来好酸球において PAA 曝露による CXCR2 および CCR3 発現制御に同様の傾向が認められた。このことから、EoL-3 細胞株を用いた各種ケモカインレセプターの発現による健康食品の安全性評価が行える可能性が示唆された。加えて、EoL-3 細胞株はヒト末梢血由来好酸球に比べ、大量かつ継続的な培養が可能となるため、フローサイトメトリー解析等の大量に細胞数が必要となる実験系に用いることができる。

また、性質が安定しており、再現性を取ることが容易であるため、作用機序の検討に用いることができるのではないかと考えられた。本研究で得られた内容は、EMS と臨床的に類似性を持つ好酸球関連疾患である好酸球性筋膜炎や線維筋痛症の発症メカニズム解明に対しても重要な知見を与え得るのではないかと期待される。今後さらに、EoL-3 細胞株ならびにヒト末梢血由来好酸球における細胞表面レセプターや各種走化性因子に対する遊走活性等のさらなる検討を行い、双方の細胞における特徴の違いを明らかにしていく必要がある。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1 田頭歩佳、加藤匡宏、山内加奈子、田中守、岡本威明、ヒト好酸球性白血病由来細胞株 EoL-3 を用いた健康食品の安全性評価系の確立、四国公衆衛生学会雑誌、査読有、61 巻、第 1 号、2016、pp.125-132

2 岡本威明、田頭歩佳、ヒト好酸球を用いた健康食品の安全性評価、月刊 アレルギーの臨床 北隆館、査読有、35 巻、第 8 号、2015、pp.55-60

〔学会発表〕(計 5 件)

1 田頭歩佳、岡本威明、田中守、ヒト好酸球を用いた健康食品の安全性評価系の確立、第 62 回 日本家政学会中国・四国支部大会、2015 年 9 月 20 日、鳥取短期大学(鳥取県・倉吉市)

2 田頭歩佳、山内明、山内加奈子、加藤匡宏、田中守、岡本威明、日本食品科学工学会 第 62 回大会、2015 年 8 月 27 日～29 日、京都大学(京都府・京都市)

<sup>3</sup> Takeaki Okamoto, Ayuka Tagashira, Mamoru Tanaka, Takuya Sugahara, The International Society for Nutraceutical and Functional Food (ISNFF 2014), 14-17 Oct.2014, Istanbul (Turkey)

<sup>4</sup> 田頭歩佳、田中守、岡本威明、ヒト好酸球の走化性と IL-8 レセプター発現に及ぼす不純物 PAA の影響、日本家政学会第 66 回大会、2014 年 5 月 23 日～25 日、北九州国際会議場（福岡県・北九州市）

<sup>5</sup> 岡本威明、田頭歩佳、山内明、菅原卓也、ヒト末梢血由来好酸球の走化性に及ぼす PAA および 4-AP の影響、第 86 回 日本生化学会、2013 年 9 月 11 日～13 日、パシフィコ横浜、（神奈川県・横浜市）

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

岡本 威明 (OKAMOTO Takeaki )  
愛媛大学・教育学部・准教授  
研究者番号：20398431

### (2)研究分担者

菅原 卓也 (SUGAHARA Takuya )  
愛媛大学・農学部・教授  
研究者番号：00263963

### (3)連携研究者

山内 明 (YAMAUCHI Akira )  
川崎医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：80372431

加藤 匡宏 (KATO Tadahiro )  
愛媛大学・教育学部・准教授  
研究者番号：60325363