

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：34428

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550040

研究課題名(和文)新規アレルギー誘発・増悪物質の探索のための腸管機能模倣型インビトロシステムの開発

研究課題名(英文)Development of the intestinal function imitated model in vitro system for searches of the newly allergic induction/exacerbation compounds

研究代表者

太田 壮一(Ohta, Souichi)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：10213729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000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的情報の検討を行った。その結果、種々の環境汚染物質がバリア機能を破綻させ、また免疫応答を攪乱することを観察した。従って、この観察は、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. This observation suggested 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：環境保健学

キーワード：食物アレルギー 疾病予防 環境汚染物質 恒常性攪乱物質 ダイオキシン 簡易迅速試験法

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の多種多様な食品は、我々の体に必要な栄養素等を供給しているだけでなく、毎日の食卓をバラエティーかつ豊かにしている。一方、近年、「食の安全」とりわけ食品中の残留農薬、環境汚染物質や食品添加物等によるヒトへの毒性影響について、国民の多くが深刻な懸念や不安を抱いているのも事実である。ヒトへの健康影響の中で最も懸念される対象となるのは、生体防御機構が極めて未熟かつ脆弱な乳幼児等であろう。

ところで、食品は主に腸管で消化・吸収されるが、この時、腸管粘膜は生体内外を隔てるバリアとして機能するだけでなく、栄養素の吸収の他、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。それ故に、腸管粘膜は通常、種々のアレルゲンの透過を抑制しているが、タイトジャンクションで構成されるバリア機能が化学物質等の作用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、免疫担当細胞がさらに惹起され、アレルギー増悪作用を引き起こす可能性が高い。

本研究では、日本人の食物アレルギーの誘発・増悪に対する予防医学的観点に立ち、研究代表者が新規開発した、細胞応答の異なる2種類の細胞を同時に培養可能なTranswellを用いたハイブリッド式検出法を用いて、環境・食品中のアレルギー増悪物質の探索とその安全性評価を行うことを目的とする。

## 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、簡易かつ高精度な *in vitro* 検出法の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、バリア機能を評価した。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、-HCH と HCB とでは TER 値の低下は観察されなかった。

## (2) 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 2.5 µg/mL であったのに対して、TCDD 投与では 4.6 µg/mL、また B(a)P 投与では 2.7 µg/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 12.4 µg/mL を示した。また、6 時間までの被検物質投与による AUC<sub>0-6h</sub> を算出したところ、TCDD の AUC<sub>0-6h</sub> は 22.9 µg·h/mL、B(a)P は 32.1 µg·h/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ころを明らかとした。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機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 3 件)

Ohta, S. 他 4 名、「Levels of tetrabromobisphenol A, tribromobisphenol A, dibromobisphenol A, monobromobisphenol A, and bisphenol A in Japanese breast milk」, *Chemical Research in Toxicology*, Vol.28, 722-728, 2015. (査読有)

Ohta, S.、他 5 名、「Detection of tribromobisphenol A as debrominated compounds of tetrabromobisphenol A in breast milk collected in Japan」, *J. Environ Chem.*, Vol.25, 61-67, 2015. (査読有)

Ohta, S.、他 4 名、In vitro and in vivo induction of cytochrome P450 by coplanar polychlorinated/brominated biphenyls (Co-PXBs) providing high TEQ in mother's milk in Japan. *Toxicology*, Vol.324, 68-75, 2014. (査読有)

### (2) 学会発表 (計 8 件)

太田壮一、他 4 名「ダイオキシン類が有する腸管バリア破綻に伴った免疫毒性影響」, 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会 2014 年 10 月 11 日、京都薬科大学 (京都府・京都市)

太田壮一、他 4 名「健康有害物質が Caco-2 細胞のバリア機能に及ぼす影響評

価」, 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会 2014 年 10 月 11 日、京都薬科大学(京都府・京都市)

— 角谷 秀樹, 太田壮一, 他 3 名「ダイオキシンは腸管バリア機能を破綻することにより免疫毒性を示す」, 第 23 回環境化学討論会、2013 年 5 月 25 日、京都大学(京都府・京都市)

— Hideki Kakutani, Souichi Ohta,  
「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(千葉県・千葉市)

— 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 (Seoul, Republic of Korea) 26-29th, August, 2013

— Souichi Ohta, 他 4 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 (Seoul, Republic of Korea), 26-29th, August, 2013

— 太田壮一, 他 4 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(東京都・府中市)

— 西本貴樹, 太田壮一, 他 3 名「腸管ルーブ法を用いた環境・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(東京都・府中市)