

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 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22510072

研究課題名（和文） 昆虫忌避剤・防虫剤の吸入暴露による化学物質過敏症などの炎症性疾患発症と病態解析

研究課題名（英文） Pathogenic mechanism of inflammatory disease caused by exposure to an insect repellent

研究代表者

横田 恵理子（AIZU-YOKOTA ERIKO）

慶應義塾大学・薬学部・講師

研究者番号：10222457

研究成果の概要（和文）：昆虫忌避剤 DEET や、ピレスロイド系の防虫・殺虫剤は家庭・地域において日常的に使用されている。これら化合物は化学物質過敏症や炎症性疾患発症への関与が考えられているが、その詳細な作用機序については不明である。DEET は、ラット好塩基球形白血病細胞株 RBL-2H3 細胞での抗原依存性脱顆粒に対し抑制作用を示す一方、持続性の ERK 活性化を示した。ピレスロイド系化合物のアレスリンは、抗原非依存性に脱顆粒と ERK 活性化を引き起こした。また、これら化合物は、ヒト肺胞上皮由来 A549 細胞においてサーファクタントタンパク質 SP-A の発現を増強し、ERK 活性化も引き起こした。DEET およびピレスロイド系化合物は、細胞のシグナル伝達系に影響し、免疫応答に関わる細胞機能を修飾することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) and pyrethroids are widely used as insect repellents in households. Exposure to these chemicals may induce sick building syndrome or inflammatory diseases, however, its pathogenic mechanism is not well known. In the present study, effects of these chemicals on the cellular function were determined. In RBL-2H3 cells, antigen dependent degranulation was inhibited by pretreatment of DEET. DEET induced prolonged activation of ERK in the presence of antigen. Pyrethroid, allethrin, showed stimulation of degranulation and ERK activation in an antigen-independent manner. In A549 cells, surfactant protein A (SP-A) is constitutively secreted. Both SP-A secretion and ERK activation was enhanced by treatment of these chemicals. It seems that DEET and pyrethroids influence ERK kinase cascade and modify the cellular function related to immune response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：トキシコロジー

1. 研究開始当初の背景

(1) 昆虫忌避剤 DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) は、1946 年に米軍により開発さ

れた薬剤であり、蚊やダニによって媒介されるマラリア、デング熱、ツツガムシ病などからヒトを防護する目的で広く用いられてお

り、これらの病気が蔓延する地域においては、有用かつ重要な薬剤となっている。一般に、副作用の少ない安全な薬剤と考えられているが、吸入や塗布により、稀ではあるが神経障害や皮膚炎を起こした例が報告されている。日本における重篤な副作用報告はないが、2005年厚生労働省は「使用上の注意」等の添付文書を改訂するよう通知しており、その中では「6ヶ月未満の乳児には使用しない」など小児に対する使用法が細かく規定されている。しかし、DEET濃度が10%以下のものは医薬部外品であるため、スーパーやコンビニエンスストアなどでも販売されており、散歩や公園等で遊ぶ時など、乳幼児に対し日常的に用いられている。

(2) 家庭(家屋)には内外を問わず多種の化学物質が存在し、特にピレスロイド系防虫剤はタンスやクローゼットで、同系の殺虫剤はハエや蚊を駆逐するため多用されている。注目すべきは、これらの薬剤が“無臭”をうたっている点であり、私達はこれら薬剤に無意識のまま日常的にさらされていると考えられる。最近、小児における発達障害や神経症、成人も含めたアレルギー性疾患(喘息、鼻炎)や化学物質過敏症の増加が報告されている。その原因には、育児環境の変化、大気汚染物質、花粉やダニなどの抗原の多様化、増加等が考えられるがその1つに日常的なDEETや防虫・殺虫剤暴露の可能性も考えられる。

(3) 化学物質過敏症は、欧米とは異なり、日本では疾病としての認識がようやくなされてきた段階であり、化学物質の使用制限なども充分ではない。また、その発症機序、病態形成過程に関しては未だ不明な点が多く、解析も進んでいない。症状の一つとして、気道粘膜や皮膚においてI型アレルギー様炎症を示すにも関わらず、一般に血清IgE濃度の顕著な上昇は認められないため、免疫応答の過剰反応のみでは説明しきれない。

2. 研究の目的

DEETや、ピレスロイド系の防虫・殺虫剤は家庭・地域において日常的に使用されている。これらの化学物質過敏症発症への関与や、また併用による脳機能への影響が報告されているが、その詳細な作用機序については不明である。特にDEETは、より影響の出やすい小児に対し“虫除け”として頻繁に用いられており、成長過程における影響が危惧される。本応募研究課題では、アレルギー性炎症疾患や化学物質過敏症の症状の一つでもある「喘息」「鼻炎」に着目し、これら化合物

による病態形成への関与について細胞を用いて解析し、分子レベルでの理解を進める。

3. 研究の方法

(1) 使用細胞：ラット由来好塩基球性白血病細胞株細胞株(RBL-2H3)、ヒト由来白血病細胞株(HIT93)、ヒト由来肺胞上皮細胞株(A549)

(2) 検討化合物：DEET、ピレスロイド系防虫剤(アレスリン、デルタメトリン、レスメトリン)

(3) ラット好塩基球性白血病細胞株RBL-2H3を、マスト細胞のモデルとして用いた脱顆粒反応

①抗原依存性脱顆粒反応：細胞をIgE抗体(抗DNP-IgE)で感作した後、被験化合物存在下で30分間培養した。抗原(DNP-HSA)刺激後30分間の脱顆粒反応を、 β -ヘキソサミニダーゼ活性を指標に測定した。

②抗原非依存性脱顆粒反応：被験化合物存在下で30分間培養した細胞を、カルシウムイオンのフォアA23187(10 μ M)刺激後30分間の脱顆粒反応を、 β -ヘキソサミニダーゼ活性を指標に測定した。

③脱顆粒反応に関わる細胞内シグナルとして、SykおよびMAPKカスケードのリン酸化(活性化)をウェスタンブロット法で検出し、被験化合物の影響を検討した。

(4) ヒト白血病細胞(HIT93)の活性型レチノイン酸による好酸球様への分化誘導

①分化の指標として形態変化、転写因子GATA-1の発現、ケモカイン(エオタキシン-2)の産生とその受容体CCR3の発現を用い、被験化合物の影響を検討した。

②細胞死の解析を、核の断片化の有無およびカスパーゼ-3活性化を指標に検討した。

(5) ヒト由来肺胞上皮細胞を用いた炎症反応惹起に関する検討

リポ多糖(LPS)による、サイトカイン・ケモカイン産生、肺サーファクタントタンパク質の発現誘導、細胞内シグナル伝達系の活性化を指標に、被験化合物の影響を検討した。

4. 研究成果

(1) ラット好塩基球性白血病細胞株RBL-2H3を、マスト細胞のモデルとして用い、脱顆粒反応に対する影響を検討した。

①抗原刺激前のDEET刺激により、DEET濃度(1~200 μ M)に依存した抑制作用が観察された。(図1)

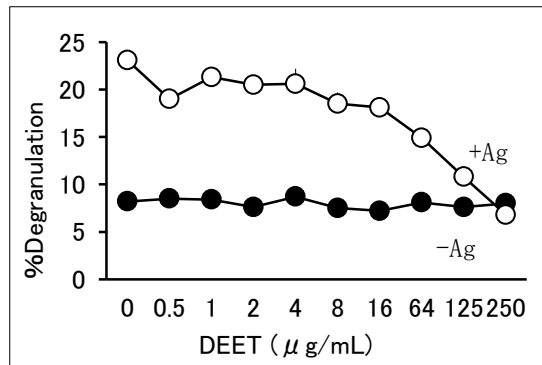


図1 抗原依存性脱顆粒反応における DEET の作用

このとき、脱顆粒反応に関わる細胞内シグナルとして、Syk および ERK のリン酸化(活性化)に着目して検討した。Syk のリン酸化は、抗原による Fc 受容体凝集後の細胞内シグナル伝達系の初期段階で生じ、ERK 活性化につながる。DEET により Syk のリン酸化は抑制されたが、ERK のリン酸化はほとんど抑制されなかった。通常、抗原刺激後 ERK のリン酸化は減弱するが、DEET 存在下ではリン酸化が持続していた。DEET 単独処理では、脱顆粒や、Syk や ERK のリン酸化のいずれも観察されなかった。

②アレスリンは抗原依存性脱顆粒反応を抑制したが、一部の細胞内シグナルの活性化も引き起こした。アレスリンは DEET と異なり、抗原非存在下でも単独で ERK 活性化および脱顆粒を誘導したことから、抗原に依存せずマスト細胞を活性化する可能性が考えられた。DEET による抗原依存性の ERK 持続的活性化や、アレスリンによる ERK 活性化の機序については、直接的活性化と、脱リン酸化の抑制などによる間接的メカニズムが考えられるが、特定はできなかった。

③カルシウムイオンのフォア A23187 は、細胞内カルシウム濃度を上昇させることで、脱顆粒反応を起こす。この抗原非依存性脱顆粒反応を、DEET およびアレスリン(A11)の前処理 30 分行うことで、濃度依存性 (1~250 μg/mL) に抑制された。(図 2)

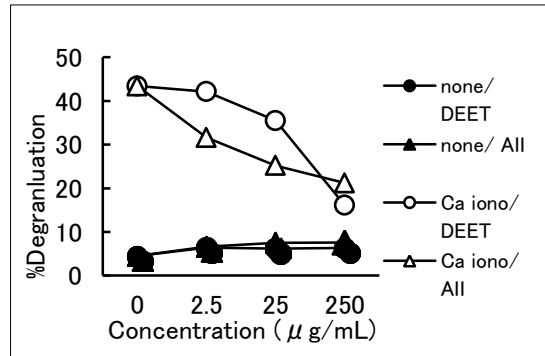


図2 カルシウムイオンのフォアによる脱顆粒反応に及ぼす DEET, A11 の作用

(2) ヒト白血病細胞 (HT93) は、活性型レチノイン酸 (により好酸球様への分化が誘導される。DEET 存在下で、形態変化や転写因子 GATA-1 発現に大きな変動はみられなかったが、CCR3 発現は抑制傾向がみられた。分化誘導後、種々のサイトカインで刺激し、エオタキシン-2 産生を検討したところ、DEET 存在下で分化誘導した細胞ではインターフェロン γ による産生が増強されたため、分化の方向が変化する可能性が考えられた。

一方、ピレスノイド系防虫剤のアレスリン (25~100 μM) は、核の断片化を伴う細胞死を誘導した。アレスリンによる細胞死では、刺激後 2~4 時間でカスパーゼ 3 の活性化が、8 時間後には核の断片化が検出された。他の接着性細胞 (RBL-2H3pyp に A549) では、このような細胞死誘導は観察されなかったため、白血球系細胞はアレスリンに対し感受性が高い可能性が考えられた。

(3) 呼吸器系への影響を検討するモデル系として、ヒト由来肺胞上皮細胞株 A549 を用い、リポ多糖 (LPS) による、サイトカイン・ケモカイン産生、肺サーファクタントタンパク質の発現誘導、細胞内シグナル伝達系の活性化、について検討した。

A549 細胞は恒常的に単球や塩基球遊走因子である CCL2 を産生するが、LPS 刺激により好中球遊走因子 CXCL8 を産生し、IL-4 刺激により好酸球遊走因子 CCL26 を産生する。DEET およびピレスノイド系のアレスリン (A11)、デルタメトリン、レスメトリン (3~100 μM) は、これらケモカインの産生に、ほとんど影響しなかった。(図 3)

サーファクタントタンパク質 A (SP-A) はリン脂質代謝を担う一方で、肺胞マクロファージの貪食反応を促進させることが知られている。A549 はサーファクタントを分泌する II 型細胞由来であるため、SP-A を恒常的に発現しているが、LPS はその発現を増加させる

事が報告されている。DEET およびアレスリン、デルタメトリン、レスメトリン (3~30 μ M) は、それぞれ SP-A 増加作用を示した。

(図 4)

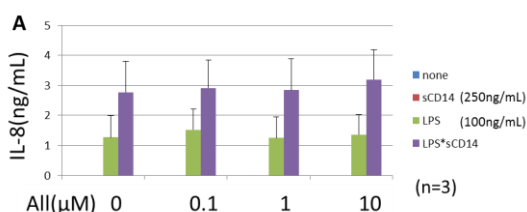


図 3 LPS 誘導 IL-8 産生に及ぼすアレスリン (A11) の影響

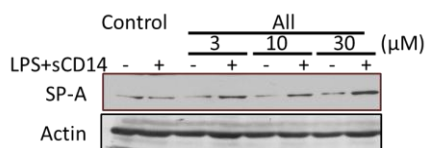


図 4 SP-A 産生に及ぼすアレスリン (A11) の影響

ケモカイン産生や SP-A 発現には、細胞内情報伝達系の MAPK や転写因子 NF- κ B の活性化が関与している。これら化合物は単独で SP-A を増加させたことから、細胞内情報伝達系への影響を検討した。ラット由来 RBL-2H3 細胞で、アレスリンは単独で ERK 活性化を引き起こしたが、A549 細胞においても ERK 活性化を LPS と同様に引き起こした。以上の事から、DEET やピレスロイド系防虫剤の一部は、単独で呼吸器系において免疫反応を活性化する事が示唆された。

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)

[学会発表] (計 2 件)

①日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月、横浜：
ピレスロイド系防虫剤・殺虫剤の肺サーファクタントタンパク質に対する影響、田島佳代子、横田恵理子、保科直美、園田よし子、笠原忠、阿部芳廣

②日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月、静岡：
マスト細胞の機能に及ぼす昆虫忌避剤 DEET の影響、横田恵理子、園田よし子、多胡めぐみ、笠原忠

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 恵理子 (AIZU-YOKOTA ERIKO)

慶應義塾大学・薬学部・講師

研究者番号：10222457

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし