

## 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24年5月15日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590134

研究課題名（和文） 地下水汚染物質トリクロロエチレンの飲水曝露によるアレルギー増悪化機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of mechanism on exacerbation of allergy by ingestion of trichloroethylene as a groundwater pollutant from drinking water

研究代表者

永瀬 久光（NAGASE HISAMITSU）

岐阜薬科大学・教授

研究者番号：40141395

研究成果の概要(和文): 著者は地下水汚染物質・トリクロロエチレン(TCE)を飲水摂取すると、それ自身が抗原となることなく、アレルギー反応が増悪化することを見出していた。本研究はそのメカニズムに関してマウスを用いた *in vivo* 及び *in vitro* 実験により、以下のことが解明された。(1)TCE 飲水曝露は抗原（卵白アルブミン）特異的な T 細胞増殖の亢進を介してアレルギー反応を増強させ、この T 細胞増殖亢進には TCE による IL-3 分泌の増加が関与している。(2)T 細胞からの TNF- $\alpha$  分泌の増加が直接的に炎症を増強させている。(3)TCE 曝露は T 細胞レセプターシグナルに対して直接的に作用し細胞増殖を亢進させる。

研究成果の概要(英文): The author had found that ingestion of trichloroethylene (TCE) as a groundwater pollutant from drinking water exacerbated allergy in rats and mice experiments. In this study, the mechanisms have been elucidated with mouse *in vivo* and *in vitro* experiments, as follows. (1) TCE ingestion from drinking water enhanced antigen-specific T cell proliferation, and the enhancement was associated with increase of IL-3 secretion. (2) Increase of TNF- $\alpha$  secretion from T cell directly enhanced inflammation. (3) TCE exposure enhanced T cell proliferation, and TCE acts as a potential T cell stimulator to accelerate the T cell receptor(TCR)-CD3-mediated signaling pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000   | 1,560,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：トリクロロエチレン、即時型アレルギー、アレルギー反応増強、サイトカイン分泌、T細胞増殖、T細胞受容体

## 1. 研究開始当初の背景

近年各先進国において、社会問題ともなっているように、我が国においても気管支喘息、アトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー性疾患は増加の一途をたどっている。

アレルギー疾患の患者数が急増した原因には、遺伝的な要因と環境的な要因が関連すると考えられているが、近年は環境的な要因が主に関連していると考えられている。これまでの研究によって、ホルムアルデヒド、デ

イーゼル排気微粒子(DEP)等の環境化学物質の中に直接抗原となることなく、免疫系に作用し、アレルギーの発症に大きな影響を与えている可能性がある物質が明らかにされてきている。ホルムアルデヒドは抗原特異的なIgE抗体産生を増強させる作用があるとの報告があり、DEPにはこのようなIgE抗体産生を増強させる作用に加えて、IgG抗体産生を増強させる作用や好酸球性の気道炎症を増悪させる作用、およびヘルパーT細胞の機能バランスを崩す作用を示すという報告がある(H.Fujimaki et al., Sci. Total Environ., 270, 113 (2001), C. C. Dong. et al., Toxicol. Science, 88, 150 (2005), K. Sadakane. et al., J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol., 21, 267 (2002))。

著者らは、地下水汚染物質として注目されていたトリクロロエチレン(TCE)やテトラクロロエチレン(PCE)に着目し、TCE や PCE をラットに飲水曝露させると、これら自身が抗原となることなく、Ⅱ型アレルギー反応が増強される免疫修飾作用を見出し、報告した(Toxicology, 243, 75 (2008), Immunobiology, 213, 663 (2008), Regul. Toxicol. Pharmacol., 52, 140 (2008))。

著者らの報告は TCE の水道水質基準値レベルで飲水した場合のアレルギー増強であり、水道水質基準値の見直しにも及ぶ可能性がある。したがって単に新規な毒性発現を見出したに止まらず、その作用メカニズムを解明することが求められている。

## 2. 研究の目的

本研究は、著者らがラットやマウスで見出した地下水汚染物質 TCE の飲水曝露によるアレルギー反応増強の現象について、そのメカニズムが未解明のままであることから、マウスを用いた個体、さらには細胞、分子レベルでそのメカニズムを解明することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) TCE 飲水曝露による抗原特異的脾臓細胞増殖の亢進作用

雄性 BALB/c マウスに 0.03、3 mg/L TCE を 2 週間または 4 週間自由飲水により曝露し、飲水終了 2 週間前、1 週前に卵白アルブミン(OVA)を 1 回ずつ腹腔内投与することにより免疫を行う。免疫終了後に脾臓を摘出して調製した脾臓細胞を用い、OVA または T 細胞マイトジェンであるコンカナバリン A (Con A)による刺激を加えて培養し、細胞内に取り込まれた<sup>3</sup>H-チミジンを液体シンチレーションカウンターにより測定する細胞増殖試験を行った。

### (2) TCE 飲水曝露による脾臓細胞のサイトカイン分泌亢進作用

雄性 BALB/c マウスに 2 週間 0.03、3 mg/L TCE または蒸留水(対照)を飲水させた後、卵白アルブミンで刺激を行ったマウスより脾臓を摘出して脾臓細胞を調製し、96 時間培養した上清中の IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-3 及び TNF- $\alpha$  の濃度を ELISA キットを用いて測定した。

### (3) TCE 飲水曝露による脾臓細胞プロファイルに及ぼす影響

雄性 BALB/c マウスに OVA を抗原として、アジュバントとして水酸化アルミニウムゲルを用いて、免疫を行い、その際に TCE を同時に 2 週間飲水により曝露した場合の脾臓細胞についてフローサイトメトリーによる細胞プロファイルの検討を行った。

### (4) TCE 曝露が T 細胞受容体(TCR)を介した T 細胞活性化に関わるシグナル伝達系に及ぼす影響の検討

雄性 BALB/c マウスから摘出した脾臓より得られたリンパ細胞に対して T 細胞レセプター (TCR) を直接的に刺激する抗マウス CD3 抗体を用い、*in vitro* で TCE をリンパ細胞に直接処理し、その細胞増殖に及ぼす影響について<sup>3</sup>H-チミジンの取込みによる細胞増殖試験を用いて検討するとともに、T 細胞サブセットによる影響の違いについてフローサイトメトリーによる解析を行った。さらに、TCR-CD3 刺激伝達において重要な役割を担っている Lck のリン酸化についてウエスタンブロットを用いて検討を行った。

### (5) TCE の飲水曝露による抗原免疫に伴う CD8<sup>+</sup> T 細胞の増加作用

雄性 BALB/c マウスに 0.03、3 mg/L TCE を 2 週間または 4 週間自由飲水により曝露し、飲水終了 2 週間前、1 週前に OVA を 1 回ずつ腹腔内投与することにより免疫を行う。免疫終了後に脾臓を摘出して調製した脾臓細胞を用い、そのサブpopulation について、フローサイトメトリーにより解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) TCE 飲水曝露による抗原特異的脾臓細胞増殖の亢進作用

抗原特異的なリンパ細胞増殖を検討するために、OVA により免疫を行ったマウス脾臓細胞に抗原として OVA、または Con A による刺激を加えて、チミジン取込み法により細胞増殖について検討を行った。2 週間飲水曝露においては、3 mg/L TCE 飲水曝露させたマウスからの脾臓細胞で、対照である蒸留水を飲水曝露させたマウスからの脾臓細胞と比べて、OVA または Con A で刺激した脾臓細胞の増殖が有意に増強されることが確認されたが、0.03 mg/L TCE 飲水曝露では、顕

著な変化は認められなかった(Fig.1A)。4週間飲水曝露においては、0.03、3 mg/L TCE 飲水曝露させたマウス脾臓細胞で、対照と比べて、OVA または Con A の刺激した脾臓細胞の増殖が有意に増強されることが確認された(Fig.1B)。また、データには示していないが、OVA/Alum による免疫を行わなかった場合には、OVA、Con A 刺激による脾臓細胞増殖の増強は確認されなかった。これらの結果より、TCE 飲水曝露によるリンパ細胞増殖の増強は抗原による免疫を行った場合のみ確認され、TCE 飲水曝露による ACA 反応の増強には、抗原特異的な T 細胞等のリンパ細胞増殖の亢進が関連していることが示唆された。

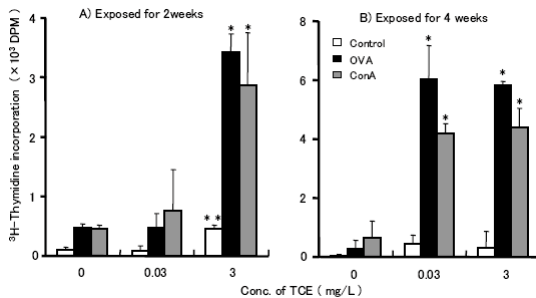


Fig.1 抗原特異的脾臓細胞増殖に及ぼす TCE 飲水曝露による影響  
(A):2週間曝露 (B):4週間曝露

(2) TCE 飲水曝露による脾臓細胞のサイトカイン分泌亢進作用

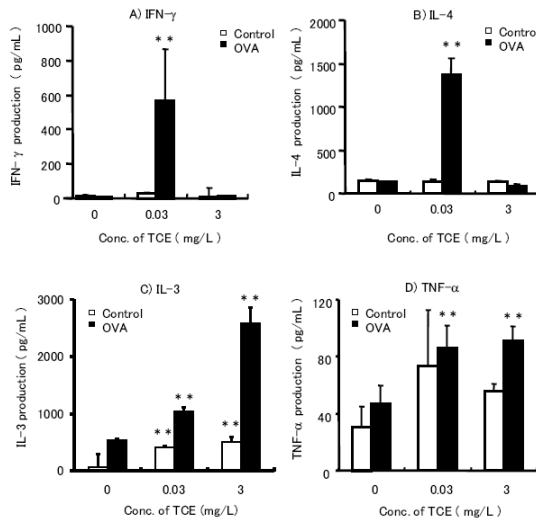


Fig.2 TCE 飲水曝露による脾臓細胞からのサイトカイン産生に及ぼす影響  
(A):INF- $\gamma$  (B):IL-4 (C):IL-3 (D):TNF- $\alpha$

2週間 0.03、3 mg/L TCE を飲水させたマウスの脾臓細胞において、IL-3、TNF- $\alpha$  分泌量が、対照と比較して有意に増加することが

確認された。IFN- $\gamma$ 、IL-4 分泌量については2週間 0.03 mg/L TCE 飲水曝露のみで対照と比較して分泌量の増加が確認された(Fig.2 A, B)。

これらの結果から TCE 飲水曝露により、脾臓細胞からの種々のサイトカイン分泌量が増加することが示唆された。

また、T 細胞からの TNF- $\alpha$  分泌の増加により直接的に炎症の増強関与する可能性も示唆された(Fig.2D)。TCE による免疫機能への影響はその曝露濃度により、影響が異なる可能性が考えられる。

IL-3 は T 細胞増殖に関与するサイトカインであるため、TCE 曝露による抗原特異的な T 細胞増殖亢進には、IL-3 分泌の増加が関与する可能性が示唆された。

(3) TCE 飲水曝露による脾臓細胞プロファイルに及ぼす影響

TCE 曝露群で脾臓細胞中 CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、CD3 陽性細胞の増加が確認された。このことから *in vivo* において T 細胞の分化に対しても影響を与える可能性が示唆された。

また未処置の BALB/c マウスから回収したリンパ球細胞について *in vitro* で抗 CD3 抗体により刺激を行い、同時に TCE を処理したところ、 $10^{-9}$ M 以上の濃度の TCE 処理により、抗 CD3 抗体刺激による T 細胞増殖の亢進が確認された。また CD4、CD8 陽性細胞を分取して同様の検討を行ったところ、CD8 陽性細胞により顕著な細胞増殖の亢進が確認された。

以上のことから TCE は *in vivo* において抗原特異的な T 細胞増殖の亢進に関与だけでなく、T 細胞レセプターシグナルに対して直接的に作用し細胞増殖を亢進する可能性が示唆された。また、その作用は CD8 陽性細胞においてより顕著である可能性が示唆された。

(4) TCE 曝露が T 細胞受容体(TCR)を介した T 細胞活性化に関わるシグナル伝達系に及ぼす影響の検討

TCE 処理による TCR-CD3 刺激を介した T 細胞増殖亢進作用

TCE による抗原特異的な T 細胞増殖亢進作用のメカニズムを検討するために、リンパ細胞に対して TCE を直接処理し、T 細胞レセプター (TCR) 刺激を介した T 細胞増殖に及ぼす影響について検討を行った。抗マウス CD3 抗体により刺激を行うと同時に、脾臓細胞、リンパ節細胞に TCE を処理すると、100 nM 以上の TCE 処理により脾臓細胞において有意な T 細胞の増殖亢進が認められ(Fig.3A)、1 nM 以上の濃度の TCE 処理によりリンパ節細胞においても有意な T 細胞の増殖亢進が認められた(Fig.3B)。T 細胞マイトジェンである Con A で刺激を行った場合においては、

TCE 処理により、TCE 未処理群と比べて T 細胞増殖の程度に有意な差は認められなかった(Fig.3C)

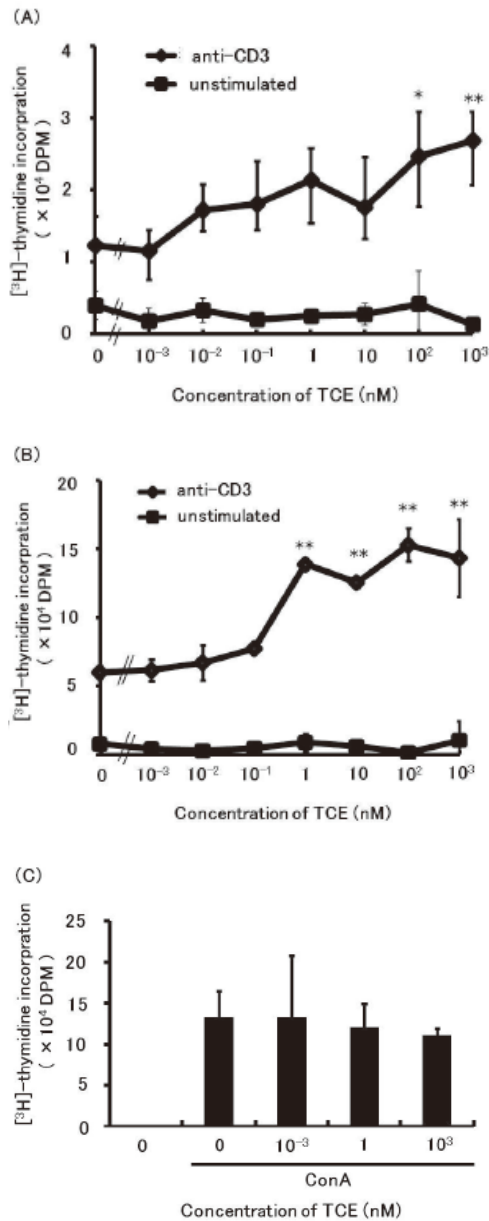


Fig.3 抗マウス CD3 抗体刺激を介した T 細胞増殖に TCE が及ぼす影響  
(A):脾臓細胞 (B):リンパ節細胞  
(C): ConA 刺激したリンパ節細胞

TCE 処理による CD4<sup>+</sup> または CD8<sup>+</sup> T 細胞の T 細胞増殖亢進作用に対する影響の違い

TCE 処理が T 細胞のサブタイプである CD4<sup>+</sup> または CD8<sup>+</sup> T 細胞の増殖に対して及ぼす影響について検討を行った。その結果、CD8<sup>+</sup> T 細胞においては 1 nM 以上の濃度の TCE 処理を行うことで、TCE の濃度依存的に有意な T 細胞の増殖亢進作用が認められた(Fig.4A)。しかしながら CD4<sup>+</sup> T 細胞においては、1 nM の TCE 処理でのみ有意な細胞増殖の亢進が認められた(Fig.4A, B)。

CD8<sup>+</sup> T 細胞においてより顕著な細胞増殖亢進が認められた。

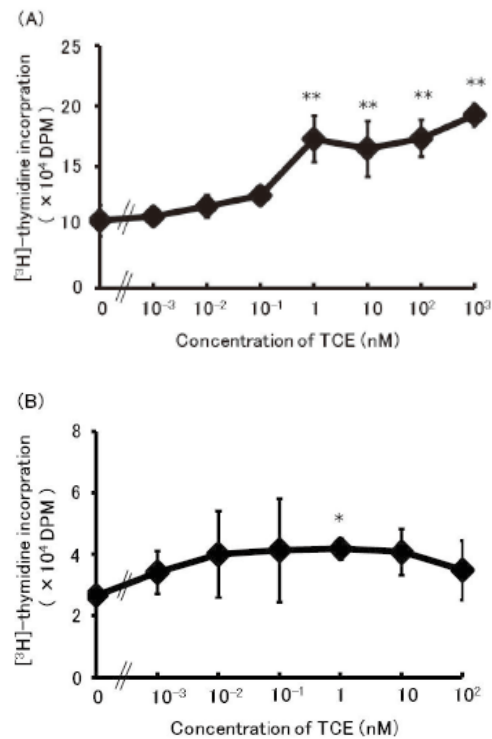


Fig.4 TCE 処理による CD8<sup>+</sup> および CD4<sup>+</sup> T 細胞の T 細胞増殖亢進に及ぼす影響  
(A):CD8<sup>+</sup>細胞 (B):CD4<sup>+</sup>細胞

TCE 処理による CD8<sup>+</sup> T 細胞の TCR-CD3 刺激を介した Lck リン酸化増強作用

Src キナーゼファミリーの 1 つである Lck は CD4 及び CD8 レセプターと関係しており、Lck のリン酸化は、TCR-CD3 刺激伝達において重要な役割を担っている。そこで Lck のリン酸化について検討を行った。

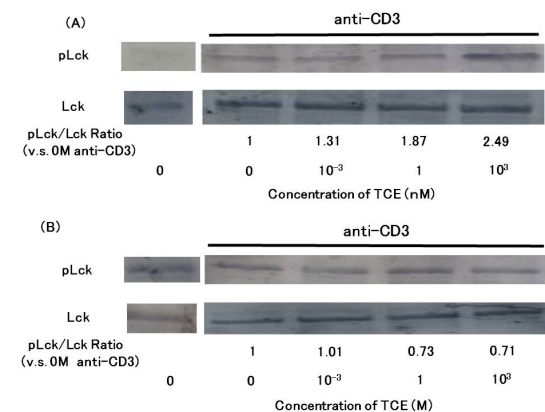


Fig.5 TCE 処理による CD8<sup>+</sup> T 細胞の TCR-CD3 刺激を介した Lck リン酸化増強作用  
(A):CD8<sup>+</sup>細胞 (B):CD4<sup>+</sup>細胞

CD4<sup>+</sup> 及び CD8<sup>+</sup> 細胞において、総 Lck レベルには TCE 処理群と未処理の対照群で有意な変化は認められなかった。しかしながら、CD8<sup>+</sup> 細胞においては、1 nM 以上の濃度の TCE 処理を行うことで Lck のリン酸化が亢進していることが認められた(Fig.5A)。一方、CD4<sup>+</sup> 細胞においては Lck のリン酸化に対する TCE 処理による影響は認められなかった(Fig. 5B)。

TCR 刺激を反映する Lck のリン酸化状態が、CD4<sup>+</sup> T細胞と比べて CD8<sup>+</sup> T細胞で顕著に上昇していた。また、in vivo において TCE 飲水曝露による免疫群の脾臓における CD8<sup>+</sup> T細胞、CD4<sup>+</sup> T細胞の割合の増加が認められた。これらのことから、TCE は TCR 刺激時に直接的に T細胞に作用し、その分化及び増殖に影響することが示唆された。

#### (5) TCEの飲水曝露による抗原免疫に伴う CD8<sup>+</sup>T細胞の増加作用

in vitroの検討で、TCE処理によるT細胞増殖亢進作用は、CD4<sup>+</sup> T細胞と比べて、CD8<sup>+</sup> T細胞で顕著に認められたことから、in vivoで抗原免疫時におけるCD8<sup>+</sup> T細胞の増加に対する影響についても検討を行った。

Table.1 TCEの飲水曝露による抗原免疫に伴うCD8<sup>+</sup>T細胞の増加作用

| Concentration of TCE (mg/L) | Non immunization |                  |                  |
|-----------------------------|------------------|------------------|------------------|
|                             | CD3 <sup>+</sup> | CD4 <sup>+</sup> | CD8 <sup>+</sup> |
| 0                           | 49.54 ± 5.77     | 33.25 ± 4.58     | 17.54 ± 1.38     |
| 0.03                        | 46.27 ± 2.38     | 34.67 ± 1.57     | 14.78 ± 1.00     |
| 3                           | 48.67 ± 0.71     | 34.93 ± 1.06     | 17.00 ± 0.64     |
| Concentration of TCE (mg/L) | OVA immunization |                  |                  |
|                             | CD3 <sup>+</sup> | CD4 <sup>+</sup> | CD8 <sup>+</sup> |
| 0                           | 46.75 ± 2.74     | 28.72 ± 0.98     | 16.34 ± 1.87     |
| 0.03                        | 51.88 ± 3.22     | 32.18 ± 2.00     | 19.90 ± 1.71*    |
| 3                           | 57.80 ± 4.86*    | 35.16 ± 3.52**   | 22.35 ± 2.22**   |

The data was expressed as means ± 1 S.D.(n=5)

Statistical difference for control group \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

OVAによる免疫を行ったTCE 3 mg/L飲水曝露群で対照群と比べて、CD3<sup>+</sup>細胞の割合が有意に増加していた(Table.1)。CD8<sup>+</sup>細胞については、OVAによる免疫を行ったTCE 0.03及び3 mg/L飲水曝露群で対照群と比べてCD8<sup>+</sup>細胞の割合が有意に増加していた(Table.1)。また、CD4<sup>+</sup>細胞についても、OVAによる免疫を行ったTCE 3 mg/L飲水曝露群で対照群と比べてCD4<sup>+</sup>細胞の割合が有意に増加していた(Table.1)。一方、OVAによる免疫を行わなかった場合においては、すべてのTCE飲水曝露群

で、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup>細胞のすべての細胞割合に有意な変化は認められなかった(Table.1)。

#### 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)

[雑誌論文](計 5件)

Ryo Kobayashi, Tsuyoshi Nakanishi, and Hisamitsu Nagase: Trichloroethylene enhances TCR-CD3-induced proliferation of CD8<sup>+</sup> rather than CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Toxicol. Sci.*, **37(2)**, 381-387 (2012) (査読有)

DOI: <http://dx.doi.org/10.2131/jts.37.381>

Makoto Seo, Ryo Kobayashi, Tetsunori Okamura, Koji Ikeda, Masahiko Satoh, Naoki Inagaki, Hiroichi Nagai and Hisamitsu Nagase: Enhancing effects of trichloroethylene and tetrachloroethylene on type I allergic responses in mice. *J. Toxicol. Sci.*, **37(2)**, 439-445 (2012). (査読有)

DOI: <http://dx.doi.org/10.2131/jts.37.439>

Makoto Seo, Ryo Kobayashi and Hisamitsu Nagase: "Immunotoxic effects of trichloroethylene and tetrachloroethylene". *J. Health Sci.*, **57(6)**, 488-496 (2011) (査読有)

DOI: <http://dx.doi.org/10.1248/jhs.57.488>

Ryo Kobayashi, Tadayoshi Ikemoto, Makoto Seo, Masahiko Satoh, Naoki Inagaki, Hiroichi Nagai and Hisamitsu Nagase: "Enhancement of immediate allergic reactions by trichloroethylene ingestion via drinking water in mice": *J. Toxicol. Sci.*, Vol. 35: No. 5, 699-707. (2010) (査読有)

DOI: <http://dx.doi.org/10.2131/jts.35.699>

瀬尾 誠、永瀬久光、有機塩素系溶剤によるアレルギー反応増悪化に関する研究、岐阜薬科大学紀要、58、9-18(2009) (査読有)  
URL:<http://www.gifu-pu.ac.jp/tosho/kiyou/no58.pdf>

[学会発表](計 3件)

Ryo Kobayashi, Tsuyoshi Nakanishi, Hisamitsu Nagase; The enhancement of CD8 positive T cell proliferation caused by trichloroethylene.

The 51st Annual Meeting of the Society of Toxicology (March 11-15, 2012, San Francisco, CA, USA)

小林 亮、中西 剛、永瀬久光、有機塩素系化合物による CD8 T細胞増殖促進作用とそのメカニズムの解明、フォーラム 2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2011年10月27-28日、金沢)

小林 亮、中西 剛、永瀬久光、トリクロロエチレンによる CD8 細胞増殖亢進作用に

関する検討、第 18 回日本免疫毒性学会学術  
大会（2011 年 9 月 8-9 日、千葉）

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.gifu-pu.ac.jp/research/research\\_eisei.html](http://www.gifu-pu.ac.jp/research/research_eisei.html)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

永瀬 久光 (NAGASE HISAMITSU)

岐阜薬科大学・教授

研究者番号：4 0 1 4 1 3 9 5