

機関番号：16301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21710034

研究課題名 (和文) 農薬系化学物質による免疫系に及ぼす影響評価

研究課題名 (英文) The effect of pesticides on mammalian immune system

研究代表者

西本 壮吾 (NISHIMOTO SOGO)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・グローバル COE 研究員

研究者番号：70392066

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、諸外国で使用されている農薬である Endosulfan について、免疫系、特にアレルギー反応に関する影響評価を行った。Endosulfan はアレルギー誘発マウスにおいて、血清中の抗原特異的 IgE 量を増加させ、アレルギー反応を惹起させる可能性を示した。また、IL-4 産生量においても増加させた。Endosulfan は、アレルギー反応を誘発するだけでなく、炎症物質の放出を促進したことから、アレルギー反応に影響を及ぼすことが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

In this research, we investigated the influence of endosulfan used in various countries on mammalian immune system, especially allergy response. Endosulfan increased the amount of antigen-specific IgE in serum from allergy-induced mice. Moreover, endosulfan enhanced the IL-4 production in serum and splenocytes culture medium. Endosulfan not only induced the initiation of allergy response, but also stimulated the release of chemical mediator as inflammatory substances. We suggested that the effect of endosulfan was concerned with both initiation and inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：食品免疫学、実験動物学

科研費の分科・細目：環境学、環境影響評価・環境政策

キーワード：健康影響評価、免疫攪乱化学物質

1. 研究開始当初の背景

食品に化学物質が混入した場合、様々な健康被害の発症が想定される。内分泌攪乱作用のある化学物質が生体に作用した場合、内分泌系の攪乱により生殖障害やアレルギー疾患を誘引する危険性がとされている。近年、輸入食品に由来する健康被害が頻発し、「食物の安全性」が大きくクローズアップされ、

社会全体が高い関心を寄せている。国産農作物には、農薬や除草剤に対する厳格な使用制限が法的に設けられているが、諸外国では日本の基準値以上の濃度で使用されており、輸入時のチェック体勢はあるものの農薬残留の危険性は皆無ではない。また、土壌を汚染した農薬が河川や海洋に流出し、環境的食物連鎖により我々が間接的に摂取する可能性

も否定できない。

研究代表者は、使用禁止農薬の代替品として使用される農薬に含まれる Endosulfan に着目した。Endosulfan は安価であることから諸外国で現在も使用されており、土壌・海洋の汚染実態が報告され、その生体リスクが注目されている化学物質である。これまでの化学物質の生体リスク研究の多くは、組織蓄積量や生殖系に対する影響の解析が多く、免疫系に焦点を当てた研究は少ないのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、「食と安全」の観点から、食物に対する化学物質、特に農薬の汚染が生じ、生体内に取り込まれた場合、生体にどのような影響を及ぼすかを細胞及び個体レベルで検討し、研究結果をヒトに対する総合的なリスク評価に役立てることである。日本では使用が禁止されているが、諸外国で使用されている農薬系化学物質として、Endosulfan を評価対象とした。免疫系に及ぼすリスクに焦点を当て、抗体やサイトカインの産生能、アレルギー疾患との関連性について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Endosulfan は、2 種類 (α 体及び β 体) の光学異性体が存在する。各 endosulfan において、アレルギー反応との関連を検討した。

(1) 各 endosulfan の二次リンパ組織由来リンパ球に対する影響

マウスより脾臓、腸間膜リンパ節 (MLN; mesenteric lymph node)、及びパイエル板 (PP; Peyer's patch) を回収し、リンパ球を調製した。各 endosulfan を添加培養後、培地中に含まれる抗体量を、ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法によって測定した。

(2) β -endosulfan 投与マウスの二次リンパ組織由来リンパ球に対する影響

β -endosulfan を2週間経口投与したマウスより、脾臓、MLN を回収し、リンパ球を調製した。培養後、培地中に含まれる抗体量を、ELISA 法によって測定した。

(3) β -endosulfan 投与期間中にアレルギー誘導を行ったマウスの血清中抗体量

28 日間にわたる β -endosulfan の投与期間のうち、7 日目及び 21 日目に卵白オボアルブミン (OVA) を腹腔内投与し、アレルギー誘導を行った。投与期間終了後、採血を行い、血清中に含まれる抗体量及びサイトカイン量

を ELISA 法によって測定した。

(4) ラット好塩基球 RBL-2H3 細胞による細胞内顆粒放出率測定

炎症物質を含む細胞内顆粒の放出により、アレルギー反応が惹起される。細胞内顆粒を含むラット好塩基球 RBL-2H3 細胞に、 α -及び β -endosulfan を添加培養し、顆粒に含まれる β -hexosaminidase 酵素活性をもとに顆粒放出率を算出した。

4. 研究成果

(1) 各 endosulfan の二次リンパ組織由来リンパ球に対する影響

β -endosulfan を添加培養した脾臓及び MLN リンパ球の抗体産生量は、IgM、IgG、IgA 全て濃度依存的に減少した。PP リンパ球の抗体産生量に差は認められなかった。 α -endosulfan の添加培養においても、著しい差が認められなかった。

(2) β -endosulfan 投与マウスの二次リンパ組織由来リンパ球に対する影響

β -endosulfan を経口投与したマウスから調製した脾臓リンパ球は、IgM 及び IgG 産生量を低下させた。また、MLN リンパ球は、IgG 産生量を抑制した。

(3) β -endosulfan 投与期間中にアレルギー誘導を行ったマウスの血清中抗体量

β -endosulfan 投与により、コントロールに比べて血清中の OVA 特異的な IgE 量が増加し、アレルギー状態をさらに悪化させていることが考えられた。また、OVA 特異的 IgG1 においても、同様に増加しており、アレルギー状態を悪化させていることが示唆された。

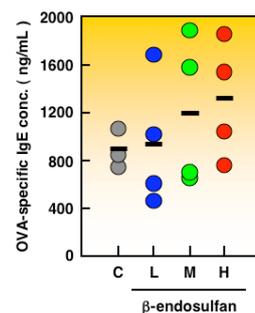


図 1. OVA 特異的 IgE 量

アレルギー反応では Th2 細胞のバランスが有意に傾くことから、血清中及び脾臓リンパ球培養上清中の Th2 型サイトカイン産生を ELISA 法によって定量した。

Th2 型サイトカインである IL-4 は、血清中で増加し、重篤なアレルギー状態であると考えられた。さらに、脾臓リンパ球の培養上清においても IL-4 産生量が増加し、アレルギー

一状態であることを確認した。

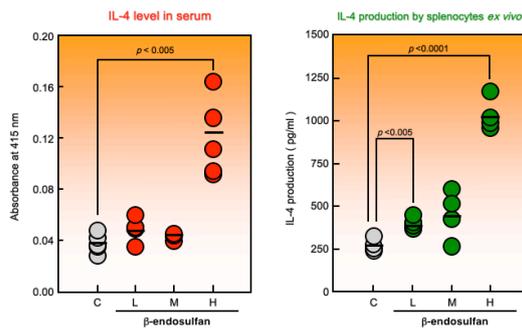


図 2. Th2 型サイトカインの産生促進

(4) ラット好塩基球 RBL-2H3 細胞による細胞内顆粒放出率測定

細胞内顆粒を含むラット好塩基球 RBL-2H3 細胞に、 β -endosulfan を添加培養し、顆粒に含まれる β -hexosaminidase 酵素活性をもとに顆粒放出率を算出した。その結果、 β -endosulfan は濃度依存的に顆粒放出を促進し、持続的に顆粒放出することが明らかとなった。

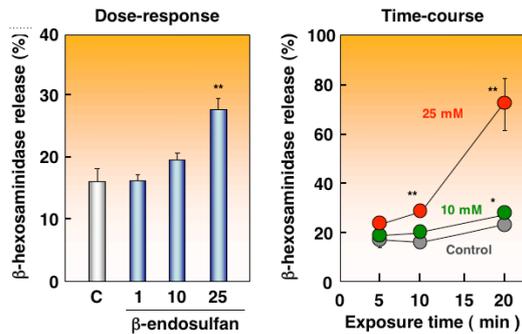


図 3. β -endosulfan の細胞内顆粒放出に対する影響

以上の結果は、学術論文として執筆中である。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

- 1) Nishimoto, S., Kanda, K., Okabe, M., Akiyama, K., Kakinuma, Y., Sugahara, T. The effects of pesticides on immune cells. *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, **16**, 377-381. (2009) 査読無.
- 2) Nishimoto, S., Kanda, K., Yamawaki, M., Okabe, M., Akiyama, K., Kakinuma, Y., Sugahara, T. Heavy oil fractions induce

the negative influences on mouse immune system. *The Journal of Toxicological Sciences*, **34**, 459-468. (2009) 査読有.

- 3) Nishimoto, S., Yamawaki, M., Akiyama, K., Kakinuma, Y., Kitamura, S -I., Sugahara, T. Severe abnormalities in the reproductive organs of mice caused by chemical substances in heavy oil. *The Journal of Toxicological Sciences*, **34**, 239-244. (2009) 査読有.

- 4) Nishimoto, S., Kanda, K., Okabe, M., Akiyama, K., Kakinuma, Y., Sugahara, T. Abnormal response induced by pesticides in mammalian immune system. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry*, **2**, 211-217. (2009) 査読有.

[学会発表] (計 9 件)

- 1) 細羽康介、西本壮吾、中田雄一郎、柿沼喜己、菅原卓也「エンドスルファンが雄マウスの生殖系に及ぼす影響」日本農芸化学会 2011 年度大会 (京都) 2011 年 3 月 27 日

- 2) 中田雄一郎、西本壮吾、柿沼喜己、細羽康介、菅原卓也「オルトフェニルフェノールの生体毒性について」日本農芸化学会 2011 年度大会 (京都) 2011 年 3 月 27 日

- 3) Nishimoto, S., Akiyama, K., Kakinuma, Y., Sugahara, T. The risk assessment of chemical substances in heavy oil on mammalian reproductive organs. *The 5th Global COE international Symposium. Modeling and Analysis of Marine Environmental Problems*. (Matsuyama, Japan) 2010. 9. 22.

- 4) Sugahara, T., Nishimoto, S., Atobe, S., Hosoba, K., Kakinuma, Y. Endosulfan exaggerates allergy symptoms. *The 5th Global COE international Symposium. Modeling and Analysis of Marine Environmental Problems*. (Matsuyama, Japan) 2010. 9. 22.

- 5) Nishimoto, S., Atobe, S., Okabe, M., Akiyama, K., Kakinuma, Y., Sugahara, T. Influence of endosulfan on allergic response in mouse. *The 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition*. P.M. 64, (Rimini, Italy) 2010. 9. 14.

- 6) Nishimoto, S., Okabe, M., Akiyama, K., Kakinuma, Y., Sugahara, T. Influence of chemical compounds in heavy oil on mouse reproductive system. The 23th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, p.215. (Sapporo, Japan) 2010.9.3.
- 7) Sugahara, T., Nishimoto, S., Atobe, S., Hosoba, K., Kakinuma, Y. (2010) Effect of endosulfan on allergic response. The 23th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, p.211. (Sapporo, Japan) 2010.9.3.
- 8) 西本壮吾、岡部正明、秋山浩一、柿沼喜己、菅原卓也「重油水溶性画分がマウス生殖系に及ぼす影響」日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京) 2010.3.28.
- 9) 跡部聡子、西本壮吾、岡部正明、柿沼喜己、菅原卓也「 β -endosulfan のマウス免疫系に与える影響」日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京) 2010.3.28.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西本 壮吾 (NISHIMOTO SOGO)
愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・グローバル COE 研究員
研究者番号 : 70392066