

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19083

研究課題名（和文）海洋プラスチック粒子は食物アレルギーのリスクファクターになるか？

研究課題名（英文）Evaluation of micro- and nano-sized plastics as a risk factor for food allergy

研究代表者

武村 直紀（Takemura, NaokiNaoki）

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：50648699

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：近年では、環境中に流出した廃棄プラスチックが細片化し、海洋や大気中を漂っている。人体がこれらに接触した場合に、健康被害が生じるのではないかと危惧されている。本研究では、プラスチック粒子が食物アレルギーのリスクファクターになると仮定して解析し、主に の結果を得た。マウスにプラスチック粒子と抗原を経口投与し続けたところ、抗原特異的なIgG抗体やIgE抗体の産生が亢進する傾向が見られた。プラスチック粒子は肥満細胞を傷害して顆粒成分の放出を誘導した。プラスチック粒子は皮膚上皮細胞を傷害し、炎症性サイトカインの放出を誘導した。プラスチック粒子による細胞傷害を抑制する化合物を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究にて得られた結果は、プラスチック粒子が免疫細胞ないし上皮細胞を傷害してアレルギー応答を増強する可能性を示した。また、その応答を化合物処理で抑え得ることも分かった。食物アレルギーを含め、アレルギー疾患は今や我が国で国民病と言われ、患者数は増加の一途を辿っている。その潜在的要因の1つとして、環境中に遍満しているプラスチック粒子が関与しているかについては、慎重に解析を重ねて議論せねばならないが、本研究の成果は並行してプラスチック粒子がアレルギーを亢進させる機序の詳細解析や、対策の確立を進める必要があることを示唆するものである。本研究の成果が端緒となり、基礎・応用研究が発展することが望まれる。

研究成果の概要（英文）：In recent years, waste plastics that have been shredded into micro-level or nano-level pieces are drifting in the ocean and atmosphere. There is growing concern that these particulate plastics pose a health hazard to the human body. In this study, we tested the hypothesis that particulate plastics act as a risk factor for food allergy. The main results are as follows (1) to (4): (1) Oral administration of particulate plastics to mice tends to enhance the production of IgG and IgE antibodies specific for an orally administered antigen; (2) particulate plastics damaged mast cells and induced the leakage of the granule contents; (3) particulate plastics damaged skin epithelial cells and induced the release of inflammatory cytokines; (4) We obtained candidate compounds that suppress the cytotoxicity of particulate plastics.

研究分野：免疫学

キーワード：プラスチック アレルギー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーは今や誰もが注意を払うほどに情報が身の周りに浸透し、例えばスーパーや食堂など食品を扱う場では、食品衛生法に則ったアレルギー物質の表示を見ることが当たり前になった。アレルギー研究は今もなお需要が大きく、アレルギーの成因となる環境的要因や遺伝的要因の追究や、対策法の開発が盛んに続けられている。

海洋生物への被害が世界的な問題となっている海洋プラスチック汚染について、近年では人体への健康被害の評価と、対策の策定が喫緊の課題として挙がり始めた。海洋に流出した廃棄プラスチックは、自然に分解されずに漂流し続け、その過程で波や紫外線などの影響で劣化・崩壊し、5 mm 以下のマイクロプラスチックや、100 nm 以下のナノプラスチックへと細片化する。プラスチック粒子が海洋生物により生物濃縮され、食事を介して人体に入ることによって、予期せぬ健康被害が生じる（あるいは既に生じている）恐れがある。

近年の研究により、様々な微粒子が免疫機構を刺激して炎症応答を誘発することが分かっている。免疫は異物を認識して排除する防御機構であり、自然免疫と獲得免疫に大別される。とくに自然免疫の役割は、感染初期に病原体を感知してサイトカインやインターフェロン、ケモカインなどの炎症応答誘導分子の産生を誘導し、病原体を攻撃・排除するための炎症応答を速やかに誘導することである。また、ときに細胞死を誘導し、病原体が細胞の栄養や機能を利用して増殖するのを防ぐためにその場所を奪う。しかし、こういった本来の役割とは裏腹に、自然免疫は微粒子をはじめとする非感染性の異物に反応して過度の炎症応答を惹起し、誤って身体を傷つけてしまう負の側面も持つ。消化管は体内で最も大きな免疫器官であり、プラスチック粒子が自然免疫を刺激し、炎症応答を介して健康被害をもたらす可能性を検証する必要がある。

2. 研究の目的

申請者による予備試験において、大小様々なポリスチレン (PS) 製プラスチック粒子でマウス消化管の各種細胞を刺激したところ、興味深いことに、100 nm 以下のナノプラスチックは腸上皮細胞を傷害し、Interleukin (IL)-33 の放出を誘導した。また、肥満細胞の顆粒成分の放出も誘導した。ナノプラスチックによる直接的な腸上皮傷害や、肥満細胞の顆粒成分の放出は、いずれも腸上皮バリアを脆弱化させ、食物抗原の透過性を亢進させる可能性がある。また IL-33 は Th2 応答を増強する。これらはいずれも食物アレルギーの成立や進行を促す危険要因であり、ナノプラスチックの食事混入が本当に食物アレルギーを誘発するのならば、世界的な食品衛生問題が勃発する恐れがある。そのような未曾有の危機に備えるため、本研究では、ナノプラスチックが食物アレルギーの成立を促すと仮定し、マウスを用いた疾患評価系の確立、疾患発症に関わる免疫応答の解明、さらに治療薬となる候補化合物の探索を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

試薬；後述する試薬は全て市販のものを購入した。FDA 承認薬ライブラリーは大阪大学創薬サイエンス研究支援拠点 化合物ライブラリー・スクリーニングセンターから提供を受けた。

経口感作実験；雌性の BALB/c マウスに抗原（卵白アルブミン、Sigma-Aldrich、0.1 mg/mouse）を単独、あるいはナノプラスチック粒子（Estapor、粒径 30 nm、1 mg/mouse）と共に、1 週間につき 5 日間経口投与するサイクルを 10 週間続けた。血液を回収し、抗原特異的総 IgG 抗体と IgE 抗体の力価を ELISA 法により測定した。

マウス肥満細胞の調製と刺激試験；マウス骨髄由来肥満細胞 Curr Protoc Immunol. 2006;Chapter 3:Unit 3.23. に準じた方法で調製した。肥満細胞をリポ多糖（100 ng/mL）で 6 時間刺激した後、96 well plate に播種した。ナノプラスチック粒子（Estapor、粒径 30 nm および 500 nm、100-500 µg/mL）で 30 分刺激したのち、上清を回収した。上清中に放出された顆粒成分 -ヘキソサミニダーゼは酵素基質反応を利用して検出した（Curr Protoc Immunol. 2010;Chapter 7:Unit7.38.）。TNF、IL-1、IL-1、IL-6、ロイコトリエン C4、乳酸脱水素酵素は市販の測定キットを用いて検出した。

マウス皮膚上皮細胞の培養と刺激試験；既報の手法に倣い、成マウスの皮膚から上皮細胞を培養した（J Vis Exp. 2017;(125):56027.）。培養した皮膚の細胞を TNF（20 ng/mL）、IFN-（10 ng/mL）、IL-17（100 ng/mL）で 6 時間刺激したのち、プラスチック粒子（Estapor および ThermoFisherScientific、粒径 20-2930 nm、300 ng/mL）で 2 時間刺激した。上清中に放出された顆粒成分 -ヘキソサミニダーゼは酵素基質反応を利用して検出した（Curr Protoc Immunol. 2010;Chapter 7:Unit7.38.）。上清中に放出された IL-1 や乳酸脱水素酵素は市販の測定キットを用いて検出した。

4. 研究成果

(1) ナノプラスチックが食餌抗原に対するアレルギーの成立を亢進するのかの検証

マウスに継続的に抗原を経口投与しつつ、PS 製ナノプラスチックを併せて経口投与することで、経口感作が亢進するかを評価した。抗原に感作されたことの指標として、血液中の抗原特異的 IgG 抗体や IgE 抗体の力価を追跡したところ、抗原のみを経口投与した場合は抗原特異的な IgG 抗体や IgE 抗体の上昇はほぼ見られなかったのに対して、ナノプラスチックを投与していた場合には約 40%の個体にて抗原特異的 IgG 抗体の上昇が見られた。さらにそのうちの約 70%の個体にて、抗原特異的 IgE 抗体の上昇が見られた。以上から、ナノプラスチックは食物アレルギーの成立を促すことが示唆された。

(2) ナノプラスチックによる刺激で肥満細胞から放出される分子の解析

PS 製ナノプラスチックで肥満細胞を刺激することで、肥満細胞から乳酸脱水素酵素 (LDH) の放出が強く見られ、細胞傷害性が認められた (図 1)。その際に、顆粒成分である α -ヘキソサミニダーゼの他に、細胞死に伴い放出されることでよく知られる IL-1 α 、IL-1 β の放出が認められた。重要なことに、同材質ながらも粒径が 500 nm のプラスチック粒子では同反応は認められなかった。ナノレベルのシリカ製粒子で肥満細胞を刺激した場合は、細胞傷害と IL-1 の放出は認められたものの、 α -ヘキソサミニダーゼと IL-1 の放出は認められなかった。また、ナノプラスチックで肥満細胞を刺激すると、TNF や IL-6 など、アレルギー応答を増幅することが知られている他の炎症誘発因子が放出されることも分かった。ただし、脱顆粒を誘導する古典的な刺激である抗原抗体反応を誘導した場合に肥満細胞から放出される脂質メディエーターであるロイコトリエン C4 は、ナノプラスチックの刺激ではほとんど放出されなかった。以上から、ナノプラスチックは抗原抗体反応で誘導される分子機序とは異なる様式で肥満細胞を刺激し、その作用は材質と粒径に依ることが推測された。

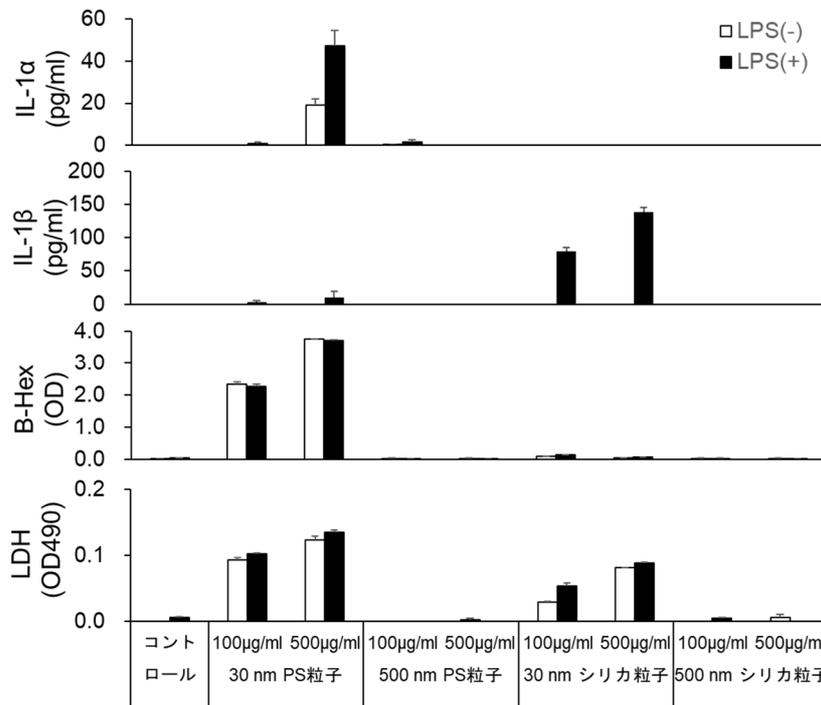


図 1

(3) ナノプラスチックが皮膚上皮細胞を傷害するのかの検証

近年では、プラスチック粒子は大気中にも飛散しており、皮膚を介して人体に接触していることも分かってきた。皮膚は体内への異物の侵入を防ぐ生体最大のバリアであるが、遺伝的あるいは環境的な要因により正常なバリア機能が破綻し、抗原が透過すると、抗原感作ひいてはアレルギーの発端になると考えられている。

皮膚へのプラスチック粒子の接触が食物抗原の感作を促すリスクになるかを評価するため、プラスチック粒子による皮膚バリアへの影響を解析した。マウスの皮膚上皮の初代培養細胞を様々な粒径の PS 製プラスチック粒子で刺激したところ、ナノレベルのプラスチックで刺激した際に乳酸脱水素酵素の漏出が検出され、極めて強い細胞傷害性を示すことが分かった (図 2)。ナノプラスチックによる細胞傷害に伴い、炎症性サイトカイン IL-1 が細胞外に放出されていることを確認した。IL-1 の放出は、アトピー性皮膚炎や乾癬などの皮膚疾患の発症や増悪と深く関係する TNF- α 、IFN- γ 、IL-17 の刺激で大きく亢進することも分かった。

ナノレベルのプラスチック粒子による皮膚上皮細胞の細胞死の誘導に関わる分子機序の解明を試みた。Cytochalasin D 処理をしても当該応答を防げなかったことから、粒子の取り込みに貪食を必要としないことが分かった。また、インフラマソーム応答を担う NLRP3 や Caspase-1 な

どの遺伝子を欠損したマウスの皮膚上皮細胞においても当該応答は防げなかった。

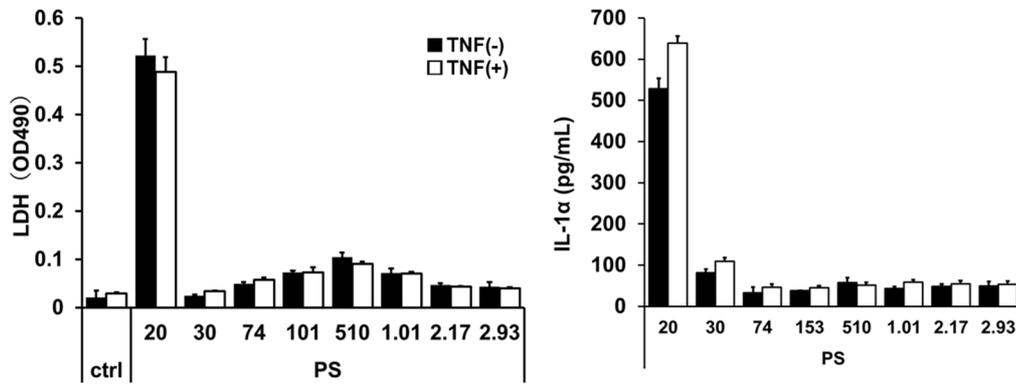


図 2

(4) ナノプラスチックが誘導する細胞傷害を抑える化合物の探索

アポトーシス、パイロトーシス、ネクロトーシスなどの既知の細胞死に関わる因子に対する種々の阻害剤を購入し、PS 製ナノプラスチックが誘導する顆粒内成分の放出に対する効果を評価したところ、ネクロトーシスの実行因子である MLKL の阻害剤である Necrosulfonamide が顆粒内成分の放出を抑えた。また、所属部局が保有する FDA 承認薬ライブラリーを使用して評価したところ、ある抗リウマチ薬(この場での化合物名の公表は控えさせて頂く)がナノプラスチックによる細胞傷害を抑えることが分かった。

以上の結果は、プラスチック粒子が腸や皮膚の肥満細胞ないし上皮細胞を傷害してアレルギー応答を増強する可能性を示した。また、その応答を特定の化合物による処理で抑え得ることも分かった。食物アレルギーを含め、アレルギー疾患は今や我が国で国民病と言われ、患者数は増加の一途を辿っている。その潜在的要因の1つとして、環境中に遍満しているプラスチック粒子が関与しているかについては、慎重に解析を重ねて議論せねばならないが、本研究の成果は並行してプラスチック粒子がアレルギーを亢進させる機序の詳細解析や、対策の確立を進める必要があることを示唆するものである。本研究の成果が端緒となり、基礎・応用研究が発展することが望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takasato Y, Kurashima Y, Kiuchi M, Hirahara K, Murasaki S, Arai F, Izawa K, Kaitani A, Shimada K, Saito Y, Toyoshima S, Nakamura M, Fujisawa K, Okayama Y, Kunisawa J, Kubo M, Takemura N, Uematsu S, Akira S, Kitaura J, Takahashi T, Nakayama T, Kiyono H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Orally desensitized mast cells form a regulatory network with Treg cells for the control of food allergy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mucosal Immunol.	6. 最初と最後の頁 640-651
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41385-020-00358-3. Epub 2020 Dec 10.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Wang J, Takemura N, Saitoh T.	4. 巻 44
2. 論文標題 Macrophage Response Driven by Extracellular ATP.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 599-604.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b20-00831.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sugisawa E, Kondo T, Kumagai Y, Kato H, Takayama Y, Isohashi K, Shimosegawa E, Takemura N, Hayashi Y, Sasaki T, Martino MM, Tominaga M, Maruyama K.	4. 巻 38
2. 論文標題 Nociceptor-derived Reg3 prevents endotoxic death by targeting kynurenine pathway in microglia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 110462
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.110462.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 田浦学, 武村直紀, 齊藤達哉	4. 巻 76
2. 論文標題 PRRを介した炎症反応における細胞骨格の役割	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 614-621
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikoma K, Takahama M, Kimishima A, Pan Y, Taura M, Nakayama A, Arai M, Takemura N, Saitoh T.	4. 巻 34
2. 論文標題 Oridonin suppresses particulate-induced NLRP3-independent IL-1 release to prevent crystallopathy in the lung.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 493-504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxac018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsui Y, Takemura N, Shirasaki Y, Takahama M, Noguchi Y, Ikoma K, Pan Y, Nishida S, Taura M, Nakayama A, Funatsu T, Misawa T, Harada Y, Sunazuka T, Saitoh T.	4. 巻 34
2. 論文標題 Nanaomycin E inhibits NLRP3 inflammasome activation by preventing mitochondrial dysfunction.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 505-518.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxac028.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 武村直紀, 齊藤達哉	4. 巻 285
2. 論文標題 パイロトーシスによる自然炎症とその制御: オルガネラを標的とする新たな抗炎症薬の開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 455-462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 東優一, 森田明典, 西山祐一, 村田貴嗣, 酒井杏樹, 金井昭教, 谷本大河, 坂井卓磨, 中田健也, 武村直紀, 齊藤達哉, 稲葉俊哉, 椎名勇
2. 発表標題 抗炎症作用を有する新規化合物の腸炎制御剤としての活性評価
3. 学会等名 日本Cell Death学会第29回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷本大河, 森田明典, 西山祐一, 村田貴嗣, 酒井杏樹, 金井昭教, 東優一, 國井大誓, 坂井卓磨, 貞富凌, 王冰, 下川卓志, 中田健也, 武村直紀, 齊藤達哉, 稲葉俊哉, 椎名勇
2. 発表標題 免疫調節作用を有する新規化合物は亜全身照射による腸死を防ぐ
3. 学会等名 日本放射線影響学会第 64 回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田周平, 武村直紀, 田浦学, 齊藤達哉
2. 発表標題 インフラマソームの活性化を阻害するプロスタグランジン類の解析
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 生駒健太, 武村直紀, 田浦学, 小迫英尊, 齊藤達哉
2. 発表標題 刺激性微粒子により誘導される細胞死の解析
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 潘逸羲, 武村直紀, 齊藤達哉
2. 発表標題 極小微粒子により誘導される炎症応答を阻害する化合物の探索
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武村直紀, 松井裕大, 田浦学, 齊藤達哉
2. 発表標題 Nanaomycin類化合物はイミキモド誘導性乾癬を抑制する
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 生駒健太, 武村直紀
2. 発表標題 微粒子による現代病を防ぐ延命草茶成分Oridoninの解析
3. 学会等名 日本食品免疫学会 第17回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoki Takemura, Manabu Taura, Tatsuya Saitoh
2. 発表標題 Oridonin as a potential therapeutic agent for microparticle-induced inflammatory diseases
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 生駒健太, 武村直紀, 田浦学, 君嶋敦, 荒井雅吉, 齊藤達哉
2. 発表標題 刺激性微粒子による炎症応答を阻害する生薬由来化合物の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武村直紀, 西田周平, 田浦学, 齊藤達哉
2. 発表標題 インフラマソームの活性化を阻害するプロスタグランジン類の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松井裕大, 武村 直紀, 田浦 学, 齊藤 達哉
2. 発表標題 Nanaomycin類化合物はイミキモド誘導性乾癬を抑制する
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生駒健太, 武村直紀, 齊藤達哉
2. 発表標題 刺激性微粒子による炎症応答を阻害する生薬由来化合物の解析
3. 学会等名 第21回・次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフィォーラム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武村直紀
2. 発表標題 環境中微粒子がもたらす炎症性疾患とその制御
3. 学会等名 第29回日本免疫毒性学会学術年会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武村直紀, 生駒健太, 松井裕大, 齊藤達哉
2. 発表標題 パイロトーンシスを標的とする新たな機序で働く抗炎症薬の開発
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoki Takemura, Tatsuya Saitoh
2. 発表標題 Nanaomycin E inhibits NLRP3 inflammasome activation by preventing mitochondrial dysfunction
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武村直紀
2. 発表標題 インフラマソーム非依存的パイロトーンシスに起因する微粒子疾患とその制御
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学 大学院薬学研究科 生体応答制御学分野 HP
<https://saitohatsuya.wixsite.com/saitohlab>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------