

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590554

研究課題名(和文)カーバメイト系農薬による免疫毒性及びその機序

研究課題名(英文)Carbamate pesticide-induced immunotoxicity and its mechanism

研究代表者

李 卿(Li, Qing)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50250048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：カーバメイト系農薬が化学物質過敏症、アレルギー等の免疫関連疾患などに関与していることから、カーバメイト系農薬の免疫系に対する影響の機序を究明することは予防医学・社会医学上極めて重要である。本研究ではカーバメイト系農薬Ziramが免疫細胞NK(natural killer)、LAK(lymphokine-activated killer)及びCTL(cytotoxic T lymphocyte)細胞活性を抑制することを明らかにした。そのメカニズムとしてZiramはNK細胞内の抗癌タンパク質を減少させ、免疫細胞のアポトーシスを誘導することによってその免疫毒性を発揮することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Carbamate pesticides are widely used throughout the world in agriculture as fungicides and insecticides. Since carbamate pesticides contribute to chemical sensitivity and allergy related diseases; therefore, it is very important to investigate the immunotoxicity of carbamate pesticides and its mechanism in the perspective of preventive medicine. In this study, we found that ziram, a carbamate fungicide, significantly inhibits natural killer (NK), lymphokine-activated killer (LAK) and cytotoxic T lymphocyte (CTL) activities. We have also found that ziram significantly induced apoptosis and necrosis in NK and T cells, and reduced the intracellular levels of anticancer proteins in NK cells, which contributed to the inhibitions of NK, LAK and CTL activities.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学公衆衛生学

キーワード：環境毒性学 免疫毒性学 農薬中毒 アポトーシス 抗癌タンパク NK活性 CTL活性 LAK活性

1. 研究開始当初の背景

カーバメイト系農薬は、アセチルコリンエステラーゼ活性阻害による急性中毒を惹起するが、近年、毒性の比較的低いカーバメイト系農薬に変わってきたため急性カーバメイト系農薬中毒は急激に減少している。一方で、低毒性のカーバメイト系農薬による生体への慢性的な影響、特に腫瘍監視機構の機能低下による発癌、化学物質過敏症、アレルギー等の免疫関連疾患のリスク増大が懸念されている。またカーバメイト系農薬は環境ホルモン（外因性内分泌攪乱物質）としても良く知られている。化学物質過敏症、アレルギー等の免疫関連疾患などには、カーバメイト系農薬の関与が示唆されているが、カーバメイト系農薬の免疫系に対する影響の機序は明らかになっていない。従って、カーバメイト系農薬の免疫系に対する影響の機序を明らかにすることは、予防医学・社会医学上極めて重要であると考えられる。

NK (natural killer)、LAK (lymphokine-activated killer)及びCTL (cytotoxic T lymphocyte)細胞は、細胞免疫の主役を担い、腫瘍細胞の発生・増殖・転移を抑制する免疫学的監視機能、感染症の防止、免疫機能の制御において重要な役割を果たす。これらの細胞は、主に二つの機序で標的細胞（がん細胞等）を傷害する。その1は、これらの細胞内顆粒中に存在する抗がんタンパク質Perforin、Granzyme及びGranulysinの放出による標的細胞の細胞死であり、これはPerforin/Granzyme/Granulysin pathwayという。その2は、Fas ligand (FasL)/Fas pathwayを介した標的細胞の傷害である（Li and Kawada, 2006; Li, 2007）。

申請者らは平成 12～21 年度の科研費で有機リン農薬がNK、LAK 及び CTL 細胞内の Granzyme（セリンプロテアーゼ）の酵素活性を阻害し、Perforin/Granzyme/Granulysin pathway への影響を介してNK、LAK 及び CTL 活性を抑制することを明らかにした（Li et al. 2000, 2002, 2005, 2006, 2007, 2008）。

有機リン農薬と同様にカーバメイト系農薬もセリンプロテアーゼであるアセチルコリンエステラーゼを阻害することからカーバメイト系農薬も Granzyme の酵素活性を阻害し、Perforin/Granzyme/Granulysin pathway への影響を介してNK、LAK 及び CTL 活性を抑制することが十分に推測される。そこで、我々はまずカーバメイト系農薬によるNK活性への影響に着目して検討した結

果、カーバメイト系農薬であるジラムが極めて低濃度で人NK活性を顕著に抑制することを明らかにした（H21 日本免疫毒性学会発表、論文作成中）。以上のことを考えると、ジラムによるNK活性抑制においてPerforin/Granzyme/Granulysin pathwayの関与が十分に考えられる。

2. 研究の目的

これまでカーバメイト系農薬によるNK活性への影響において国外にいくつかの報告があるが、カーバメイト系農薬によるLAK及びCTL活性への影響に関する報告は見当たらない。さらにPerforin/Granzyme/Granulysin系への影響という視点からカーバメイト系農薬によるNK、CTL及びLAK活性抑制の機序を検討する研究は皆無である。

この背景の下で、本研究で我々は、カーバメイト系農薬がPerforin/Granzyme/Granulysin系への影響を介してNK、LAK及びCTL活性を抑制するという仮説を立てカーバメイト系農薬によるNK、CTL及びLAK活性への影響及びそのメカニズムを検討する。

そこで、平成22年度では、まずカーバメイト系農薬による免疫系の主役であるNK (natural killer)、LAK (lymphokine-activated killer)及びCTL (cytotoxic T lymphocyte)細胞活性への影響について検討した。

平成22年度の結果を踏まえて平成23年度ではカーバメイト系農薬 Ziram によるNK細胞内のPerforin/Granzyme/Granulysin 発現レベルへの影響を調べ、カーバメイト系農薬によるNK活性抑制の機序を検討した。

平成24年度ではZiramによるNK細胞とT細胞のアポトーシスの視点からZiramによるNKとCTL活性抑制の機序にアプローチしてみた。

平成25年度ではさらにカーバメイト系農薬 Thiram によるNK細胞内のPerforin/Granzyme/Granulysin 発現レベルへの影響を調べ、カーバメイト系農薬によるNK活性抑制の機

序を検討した。

3. 研究の方法

平成 22 年度

1. これまでの研究では人NK細胞株NK-92MI細胞が典型的NK細胞の機能を有することを実証したので (Li et al. 2006, 2007)、本研究ではNK細胞としてNK-92MI細胞を用いた。
2. CTL細胞はマウスの脾細胞をYAC-1細胞で120時間感作して作成した (Li et al. 2002)。
3. LAK細胞は人末梢血リンパ球をIL-2存在下で72時間培養して得た(Li et al. 2002)。
4. カーバメイト系農薬はジラム (Ziram)を用いた。
5. In vitroにおいてジラムでNK、CTLとLAK細胞を1~4時間処理し、経時的にNK、CTL及びLAK活性を測定し、ジラムによるNK、CTL及びLAK活性への影響を検討した。
6. NK及びLAK活性測定はK562細胞を標的細胞とし、CTL活性測定はYAC-1細胞を標的細胞とし、⁵¹Cr放出率の算定による細胞傷害法を用いた(Li et al. 2002, 2006, 2007)。

平成 23 年度

- 1.本研究ではNK細胞としてNK-92MI細胞を用いた。
2. カーバメイト系農薬はジラム (Ziram)を用いた。
3. In vitroにおいてジラムでNK細胞を一定の時間で処理した。
- 4.NK細胞内のPerforin、Granzyme A、Granzyme B、Granzyme 3/K及びGranulysin発現レベルの測定：Flow cytometry法を用いてマウス抗ヒトPerforin、Granzyme A、Granzyme B及びGranzyme 3/K抗体による蛍光免疫染色法でNK細胞内のPerforin、Granzyme A、Granzyme B及びGranzyme 3/Kの発現レベルを測定した。Granulysin発現レベルの測定はウサギ抗人Granulysin抗体を用いた(Li et al. 2005, 2006, 2008)。

平成 24 年度

0.06~4μMのZiramを用いてin vitroでヒトNK細胞

であるNK-92MI細胞を2~64時間処理した後、以下の方法でアポトーシスとその機序を検討した。

1. FITC-Annexin V/PIを用いて早期アポトーシスを測定した。
2. 細胞内活性化Caspaseの測定：FITC-caspase 3 active抗体及びCaspTag Caspase In Situ Assay kitsを用いた。
3. Ziramによるアポトーシスに対するCaspase阻害剤の予防効果：Caspase-3阻害剤Z-DEVE-FMKとgeneral caspase阻害剤Z-VAD-FMKを用いた。
4. ミトコンドリア膜電位差への影響：MitoLight Apoptosis Detection Kitを用いた。
5. ミトコンドリアからCytochrome-Cのリリース：FITC-cytochrome-c抗体を用いた。

平成 25 年度

- 1.本研究ではNK細胞としてNK-92CI細胞を用いた。
2. カーバメイト系農薬はThiramを用いた。
3. In vitroにおいてジラムでNK細胞を一定の時間で処理した。
- 4.NK細胞内のPerforin、Granzyme A、Granzyme B、Granzyme 3/K及びGranulysin発現レベルの測定：Flow cytometry法を用いてマウス抗ヒトPerforin、Granzyme A、Granzyme B及びGranzyme 3/K抗体による蛍光免疫染色法でNK細胞内のPerforin、Granzyme A、Granzyme B及びGranzyme 3/Kのレベルを測定した。Granulysinレベルの測定はウサギ抗人Granulysin抗体を用いた(Li et al. 2005, 2006, 2008)。

4. 研究成果

平成 22 年度

1. Ziramが処理量と処理時間に依存してNK活性を抑制することを明らかにした。
2. Ziramが処理量に依存してCTL活性及びLAK活性を抑制することも明らかとなった。
3. NK細胞が最もジラムの影響を受けやすい。今後はジラムによるNK、CTL及びLAK活性抑制のメカニズムを検討していく。

平成 23 年度

1. Ziramが処理量に依存してNK細胞内のPerforin、

Granzyme A、Granzyme B、Granzyme 3/K及び Granulysinの発現レベルを有意に低下させることを明らかにした。

2. Granzyme 3/KとGranulysinはPerforin、Granzyme A、Granzyme Bよりジラムの影響を受けやすいことも明らかにした。
3. 以上の結果より、ZiramがNK細胞内のPerforin、Granzyme A、Granzyme B、Granzyme 3/K及び Granulysinの発現レベルを低下させることによってNK活性を抑制したことが示唆された。

平成 24 年度

1. Ziram は用量・処理時間に依存して NK-92MI 細胞のアポトーシスを誘導することが明らかとなった。
2. Ziram は用量に依存してNK-92MI細胞内活性化 Caspase-3, Caspase-3/7, 8, 9 及び pan-caspase のレベルを上昇させた。さらに Caspase 阻害剤が有意に Ziram によるアポトーシスを抑制できることから、このアポトーシスは細胞内の Caspase 活性化を介して誘導したことが判明した。
3. Ziram は用量に依存してミトコンドリア膜電位差を破壊し、ミトコンドリアから Cytochrome-C をリリースさせることから、このアポトーシスは、mitochondria pathway をも介して誘導したことが判明した。

平成 25 年度

1. Thiramが処理量に依存してNK細胞内の Perforin、Granzyme A、Granzyme B、Granzyme 3/K及びGranulysinの発現レベルを有意に低下させることを明らかにした。
2. 免疫毒性においてThiram はZiramより強いことも判明した。
3. さらに各抗癌タンパク質はThiramに対する反応性が異なり、その感受性はPerforin > Granulysin > Granzyme 3/K Granzyme A Granzyme Bの順である。
4. 以上の結果より、ThiramがNK細胞内の Perforin、Granzyme A、Granzyme B、Granzyme 3/K及びGranulysinの発現レベルを低下させることによってNK活性を抑制したことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(9件)

1. Li Q, Kobayashi M, Kawada T. Ziram induces apoptosis and necrosis in human immune cells. 査読有 Arch Toxicol. 2011;85:355-61. DOI 10.1007/s00204-010-0586-9
2. Li Q(1 番目), Kawada T(11 番目, 11 人). Effect of oral exposure to fenitrothion and 3-methyl-4-nitrophenol on splenic cell populations and histopathological alterations in spleen in Wistar rats. 査読有 Hum Exp Toxicol. 2011;30:665-74.
3. Li Q, Kobayashi M, Inagaki H, Hirata Y, Kawada T, Suda M, Wang RS. Effects of subchronic inhalation exposure to ethyl tertiary butyl ether on splenocytes in mice. 査読有 Int J Immunopathol Pharmacol. 2011;24(4):837-47.
4. Li Q, Kobayashi M, Kawada T. Effect of ziram on natural killer, lymphokine-activated killer and cytotoxic T lymphocyte activity. 査読有 Arch Toxicol. 2012;86:475-81. DOI: 10.1007/s00204-011-0771-5
5. Li Q, Kobayashi M, Kawada T. Mechanism of ziram-induced apoptosis in human T lymphocytes. 査読有 Arch Toxicol. 2012 ;86(4):615-23. DOI: 10.1007/s00204-011-0791-1.
6. Li Q, Kobayashi M, Kawada T. Mechanism of ziram-induced apoptosis in human natural killer cells. 査読有 Int J Immunopathol Pharmacol. 2012;25:883-91.
7. Li Q, Kobayashi M, Kawada T. Carbamate pesticide-induced apoptosis and necrosis in human natural killer cells. 査読有 J Biol Regul Homeost Agents. 2014, 28; 23-32.
8. 李卿, 川田智之. 環境因子が生体の免疫機構に及ぼす影響-プラス影響とマイナス影響の視点から-. 査読有. 職業・環境アレルギー誌、18 : 35 - 47 , 2011.
9. 李卿(1 番目), 川田智之(9 番目, 9 人). 亜慢性 ETBE 吸入ばく露によるマウス脾臓細胞へ

の影響。査読有。労働安全衛生総合研究所 特別
研究報告 No.42, 163-170, 2012

〔学会発表〕(計 16 件)

1. Li Q(1 番目), Kawada T(11 番目、11 人). Effect of oral exposure to fenitrothion and 3-methyl-4-nitrophenol on splenic cell populations and histopathological alterations in spleen in Wistar rats. International Symposium on Occupational and Environmental Allergy and Immune Diseases April 7-9, 2010 (ISOEAID'10), KYOTO, JAPAN.
2. Qing Li, Maiko Kobayashi, Tomoyuki Kawada. Ziram induces apoptosis and necrosis in human immune cells. 第 17 回日本免疫毒性学会, 筑波, 2010 . 9.
3. Li Q, Kobayashi M and Kawada T. Mechanism of carbamate pesticide-induced inhibition of human NK activity. IUTOX 2010, July 19-23, Barcelona, Spain.
4. Li Q, Kobayashi M and Kawada T. Ziram induces apoptosis in human immune cells. 50th annual meeting of SOT, Washington DC, USA, 2011.3.5-10.
5. 李卿、小林麻衣子、川田智之 . カーバメイト系農薬による NK、CTL 及び LAK 活性への影響 . 第 84 回日本産業衛生学会総会 2011 . 5、東京
6. 李卿、小林麻衣子、川田智之 . 農薬 Ziram によるヒト T リンパ球アポトーシスのメカニズム . 第 18 回日本免疫毒性学会, 千葉, 2011 . 9.
7. Li Q, Kobayashi M and Kawada T. Ziram induces apoptosis in human T lymphocytes. 47th Congress of the European Societies of Toxicology, Paris, France, 2011.8.28-31.
8. Li Q, Kobayashi M and Kawada T. Effect of ziram on natural killer, lymphokine-activated killer and cytotoxic T lymphocyte activity. 51st annual meeting of SOT, San Francisco, USA, 2012.3.11-15.
9. 李卿、小林麻衣子、川田智之 . カーバメイト系農薬 Ziram によるヒト NK 細胞のアポトーシス . 第 82 回日本衛生学会学術総会, 2012 . 3, 京都

10. 李卿、小林麻衣子、川田智之 . カーバメイト系農薬 Ziram による T 細胞、単球系細胞及び NK 細胞死の違い . 第 85 回日本産業衛生学会総会 2012 . 5、名古屋
11. Li Q, Kobayashi M and Kawada T. Ziram induces apoptosis in human natural killer cells. 48th Congress of the European Societies of Toxicology, Stockholm, Sweden, 2012.6.17-20.
12. 李卿 (1 番目), 川田智之 (10 番目、10 人) . ヒト末梢血リンパ球内の perforin、granzymes 及び granulysin レベルが NK 活性を予測できるのか? 第 19 回日本免疫毒性学会, 東京, 2012 . 9.
13. Li Q, Kobayashi M and Kawada T. Carbamate pesticides induce apoptosis in human NK-92CI cells. 52nd annual meeting of SOT (Society of Toxicology), San Antonio, USA, 2013.3.10-14.
14. 李卿、小林麻衣子、川田智之 . カーバメイト系農薬によるヒト T 細胞死とその機序 . 第 86 回日本産業衛生学会総会 2013 . 5、松山
15. 李卿、小林麻衣子、川田智之 . カーバメイト系農薬によるヒト NK 細胞のアポトーシス . 第 83 回日本衛生学会学術総会 2013 年 3 月、金沢
16. Li Q, Kobayashi M and Kawada T. Carbamate pesticides induce apoptosis in human T cells. 49th Congress of the European Societies of Toxicology, Interlaken, Switzerland, September 1 to 4, 2013.

〔図書〕(計 2 件)

1. Li Q. NK Cell Assays in Immunotoxicity Testing, Immunotoxicity Testing Methods in series of Molecular Biology, Methods Mol Biol. 2010;598:207-19, Dietert RR, eds, Humana Press, NJ, USA.
2. Li Q. Apoptosis (Section-III, Chapter 13): In: Satoh T and Gupta R (eds): Anticholinesterrase Pesticides: Metabolism, Neurotoxicity and Epidemiology". John Wiley & Sons, USA, 2011, p165-174.

〔その他〕

ホームページ等

<http://forest-medicine.com>

<http://tlo.nms.ac.jp/researcher/872.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

李 卿 (LI Qing)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50250048

(2)研究分担者

川田智之 (KAWADA Tomoyuki)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00224791