

## 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 4月 4日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790135

研究課題名（和文） 食品汚染物質 3-MCPD およびグリシドールの免疫応答への影響

研究課題名（英文） The effect of the food contaminants 3-MCPD and glycidol on immune responses

研究代表者

八巻 耕也 (YAMAKI KOUYA)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00351768

研究成果の概要（和文）：

食品汚染物質である 3-MCPD およびグリシドールの免疫応答に与える影響について解析した。その結果、0.3 % 以上の濃度の 3-MCPD や、その類縁化合物であるグリシドールの生体への曝露が生体機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。0.3 % という濃度は 3-MCPD やグリシドールの一般的な曝露レベルより低いため、通常生じうるこれらの食品汚染物質の曝露がヒトの免疫系に影響を与えることはないと推定されるが、食品に事故的な高濃度汚染が生じ、それを摂食した場合には、免疫応答が何らかの影響を受ける可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We determined the effect of the food contaminants 3-MCPD and glycidol on immune responses. Our results indicated 3-MCPD and its derivative glycidol at or above concentration of 0.3 % may potentially affect immune responses. Although the food contaminants at low concentrations in foods in usual might not affect human health, accidental contamination of the compounds at high concentration might affect immune responses upon its intake.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：食品汚染物質、3-MCPD、グリシドール、免疫、T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

クロロプロパノール類は食品汚染物質であり、3-MCPD がその代表的な物質である。3-MCPD は酸加水分解植物タンパクの製造過程で生成することが知られており、これを用いて製造されたしょうゆやその他の食品、

例えばパン、肉、ビールなど、様々な食品中に検出される。また、マーガリンや油脂、乳幼児用のミルク中には 3-MCPD 脂肪酸エステルが含まれていることがあり、摂取すると生体内の消化過程で 3-MCPD を遊離すると考えられている。この 3-MCPD について

ては変異原性を持つ疑いがあるだけでなく、体内で代謝されてグリシドールという発がん性を持つ疑いが強い物質（国際がん研究機関 IARC 発がんリスク分類グループ 2A）に変換され、生成したグリシドールが生体へ悪影響を与える可能性も懸念されている。しかし、生命の維持において重要な役割を果たす免疫応答に対して 3-MCPD の摂取が与える影響についてはほとんど解析されておらず、胸腺や脾臓などの細胞数を減少させる、抗体産生細胞数を減少させる (Lee et al., *Toxicology* 2004, 204, 1-11)、脾臓細胞やマクロファージの活性化を抑制する (Byun et al., *Toxicology in Vitro* 2006, 20, 272-278) という報告がなされているのみである。また、グリシドールの摂取によっては抗体産生細胞数を減少させる、ナチュラルキラー細胞の活性化を抑制する (Guo et al., *Drug and Chemical Toxicology* 2000, 23, 433-457) という報告がある。しかし、3-MCPD およびグリシドールが免疫応答に与える影響については、これで十分に解明されているとはいえ、特にアレルギーや自己免疫疾患などの疾患と関係が深い Th1/Th2/Th17/Treg 免疫応答のバランスへ与える影響については全く解析されていない。

## 2. 研究の目的

3-MCPD およびグリシドールの曝露が Th1/Th2/Th17/Treg 免疫応答に、また、Th1/Th2/Th17/Treg 免疫応答と関連が深いアレルギー疾患モデル、自己免疫疾患モデルの病態形成や免疫応答に与える影響について解析する。

この解析で明らかにする研究目標は2点。まず、免疫応答に与える影響から 3-MCPD およびグリシドールの無影響量を推定する。また、推定された無影響量以上の 3-MCPD およびグリシドールの曝露により、免疫応答および疾患モデルがどのような影響を受けるか明らかにする。

具体的には、本解析では、毒性やがん形成に関する研究では明らかにしえなかった 3-MCPD およびグリシドールの免疫系に対するあらたな生理活性が明らかになるだけでなく、本研究の結果と毒性およびがん形成に関する研究の結果を比較し、総合的に解析することにより、これらの食品汚染物質の免疫系への無影響量、ひいては、個体に対する無影響量などを推定することが可能と考えられる。さらに、本研究の結果は現在存在する、また、将来存在が明らかにされる 3-MCPD およびグリシドールに類似した食品汚染物質の性質を解析するにあたり、解析の必要性の判断や解析結果の評価を行う際にも有益な情報となりうるため、この研究以後にも行われるであろう 3-MCPD やグリ

シドールの類縁物質が免疫系に与える影響の解析において試金石となると思われる。また、ヒトが何らかの事故により大量の 3-MCPD およびグリシドールに曝露された場合に免疫系に起こる症状を推定することが可能となり、その症状に対する治療法の策定や発見に有用な知見が得られると考えられる。

## 3. 研究の方法

薬物の急性毒性については、種々の濃度の 3-MCPD およびグリシドールをマウスに腹腔内投与し、マウスに対する急性毒性が生じないか、投与 1 時間後まで観察した。

薬物の慢性毒性については、種々の濃度の 3-MCPD およびグリシドールをマウスに週 5 回腹腔内投与し、マウスに対する何らかの毒性が生じないか、3 週間にわたって観察した。

薬物の免疫系に与える影響については、まず day 0 に、マウスにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 500  $\mu$ l に溶解した卵白アルブミン (OVA) を抗原として腹腔内投与することにより免疫した。薬物を単回投与する場合は、薬物を OVA とともに PBS に溶解し、腹腔内投与した。薬物を反復投与する場合は、OVA を投与した日を含め、それ以降、週 5 回、3 週間薬物を投与した。Day 21 に血清を回収し、血清中の OVA に対する IgG1 レベルを enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により測定した。

ELISA 法は、以下のように行った。96 well microplate の各 well に 100  $\mu$ g/ml OVA を含む PBS を 100  $\mu$ l 加え、4  $^{\circ}$ C で 16 時間保温した。PBS で各 well を洗浄後、1 % カゼインを含む PBS 200  $\mu$ l を各 well に加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間保温した。0.25 % TWEEN 20 を含む PBS (TPBS) で洗浄後、試料として PBS で希釈した種々の濃度の血清 100  $\mu$ l を各 well に加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間保温した。TPBS で洗浄後、アルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG1 100  $\mu$ l を各 well に加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間保温した。TPBS で洗浄後、基質である p-nitrophenylphosphate 100  $\mu$ l を各 well に加え、経時的に 405 nm の吸光度を測定した。

## 4. 研究成果

食品汚染物質である 3-MCPD およびグリシドールの免疫応答に与える影響について解析した。まず、一般的な急性毒性について解析するために、0.3、1、3 および 10 % 3-MCPD を含むリン酸緩衝生理食塩水 0.5 ml を腹腔内投与した結果、1 % 以上の 3-MCPD の腹腔内投与はマウスに対して麻酔薬と類似した作用を示すことが明らかとなった

(Table 1)。

Table 1  
Representative results of toxicity of 3-MCPD to mice

1 % 3-MCPD 腹腔内 投与後の 経過時間	投与されたマウスの状態
15 分	激しく動く
30 分	動く場合は、ほふく前進
35 分	つつくと動くがぐったり
60 分	動きにぶい生存

そこで、そのような影響が認められない濃度である 0.3 % 以下の 3-MCPD を用いて、そのアジュバント作用について検討した。3-MCPD と抗原である卵白アルブミンをマウスに投与し、21 日後に血清中の抗卵白アルブミン IgG1 量を測定した結果、0.003 から 0.3 % の 3-MCPD はアジュバント作用を示さないことが明らかになった (Figure 1)。

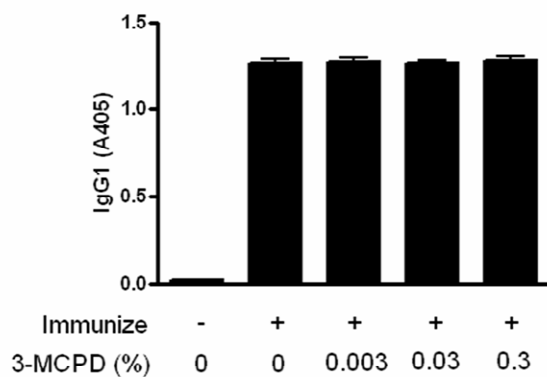


Figure 1 The effect of single 3-MCPD exposure on anti-OVA IgG1 production in mice.

Mice were i.p. injected with 100  $\mu$ g of OVA with or without 0.003, 0.03, and 0.3 % of 3-MCPD (day 0). On day 21, anti-OVA IgG1 antibodies in sera were determined by ELISA. Values are expressed as mean + S.E.M. of 5 to 6 mice.

そこで次に、3-MCPD の週 5 日腹腔内投与がアジュバント作用を示すか検討した。週 5 日投与では、0.3 % 3-MCPD が致死的な毒性を示した (Table 2) ため、そのような影響が認められない 0.1 % 3-MCPD を用いて解析したところ、週 5 日投与によっても 3-MCPD はアジュバント作用を示さなかった (Figure 2)。

Table 2  
Toxicity of repeated intraperitoneal injection of 3-MCPD to mice

3-MCPD (%)	Number of dead/number of tested
0	0 / 5
0.1	0 / 5
0.3	4 / 4

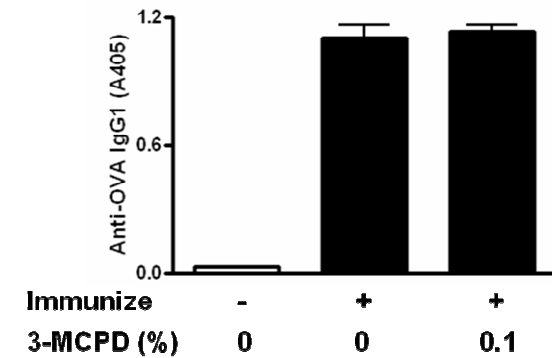


Figure 2 The effect of repeated 3-MCPD exposure on anti-OVA IgG1 production in mice.

Mice were i.p. injected with 100  $\mu$ g of OVA with or without 0.003, 0.03, and 0.3 % of 3-MCPD (day 0). The same doses of 3-MCPD were administered 5 times per week for 3 weeks. On day 21, anti-OVA IgG1 antibodies in sera were determined by ELISA. Values are expressed as mean + S.E.M. of 5 to 6 mice.

また、0.1 から 0.3 % グリシドールについて同様の検討を行なったところ、麻酔様作用、毒性 (data not shown)、アジュバント作用 (Figure 3) とも認められなかった。

さらに、免疫応答と関連が深い肥満細胞の脱顆粒反応に対する 3-MCPD の影響についても解析した。その結果、0.3 % 以上の濃度の 3-MCPD は肥満細胞の脱顆粒反応を抑制した (data not shown)。

これらのことから 0.3 % 以上の高濃度の 3-MCPD や、その類縁化合物であるグリシドールの生体への曝露は生体機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。0.3 % という濃度は一般的な 3-MCPD やグリシドールの曝露レベルより低いため、通常生じうるこれらの食品汚染物質の曝露がヒトの免疫系に影響を与えることはないと推定されるが、食品に事故的な高濃度汚染が生じ、それを摂食した場合には、免疫応答が何らかの影響を受ける可能性が考えられた。

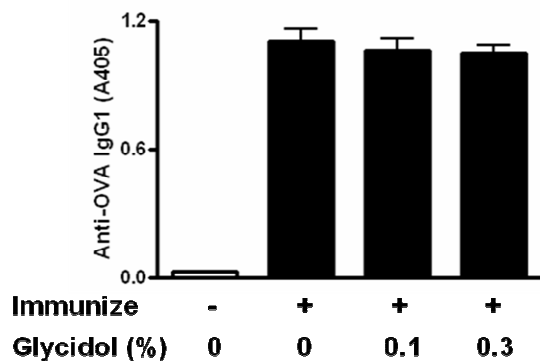


Figure 3 The effect of single glycidol exposure on anti-OVA IgG1 production in mice.

Mice were i.p. injected with 100 µg of OVA with or without 0.1 and 0.3 % of glycidol (day 0). On day 21, anti-OVA IgG1 antibodies in sera were determined by ELISA. Values are expressed as mean + S.E.M. of 5 to 6 mice.

これらの結果は、通常食品が汚染されている程度の濃度の 3-MCPD やグリシドールについては、大きな問題はないことを示唆しており、有害であるという結果が得られた場合と比較すると、そのインパクトは小さいものとなったが、社会に対する情報としては有用なものと思われる。今後、さらに多様な系を用いた検討を行い、これらの物質に関して、より詳細な安全性が明らかにされることが重要であると思われる。

#### 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 5 件)

Yamaki K, Yoshino S.  
Tyrosine kinase inhibitor sunitinib relieves systemic and oral antigen-induced anaphylaxes in mice.  
Allergy. 2012, 67, 114-22.

Yamaki K, Yoshino S.  
Aspergillus oryzae lectin induces anaphylactoid oedema and mast cell activation through its interaction with fucose of mast cell-bound non-specific IgE.  
Scand J Immunol. 2011, 74, 445-53.

Yoshino S, Sasahara M, Hutamekalin P,  
Yamaki K, Mizutani N, Kuramoto H.  
Suppression of antibody-mediated arthritis in mice by Fab fragments of the mediating antibodies.

Br J Pharmacol. 2010, 161, 1351-60.

Yamaki K, Yoshino S.  
Enhancement of FcεRI-mediated degranulation response in the rat basophilic leukemia cell line RBL2H3 by the fluorosurfactants perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate.  
Environ Toxicol Pharmacol. 2010, 29, 183-9.

Matsumura M, Nagata M, Nakamura K, Kawai M, Baba T, Yamaki K, Yoshino S.  
Adjuvant effect of zinc oxide on Th2 but not Th1 immune responses in mice.  
Immunopharmacol Immunotoxicol. 2010, 32, 56-62.

[学会発表] (計 3 件)

八巻 耕也、吉野 伸  
マウス食物アレルギーモデルに対するチロシンキナーゼ阻害薬 sunitinib の効果  
日本薬学会 第 132 年会  
2012 年 3 月 30 日、札幌

八巻 耕也、吉野 伸  
環境汚染物質 PFOA および PFOS による肥満細胞のメディエーター放出促進  
第 115 回 日本薬理学会近畿部会  
2011 年 7 月 8 日、名古屋

八巻 耕也、吉野 伸  
肥満細胞の IgE 依存的活性化に対する酸化亜鉛ナノ粒子およびマイクロ粒子の抑制作用の比較  
日本薬学会 第 130 年会  
2011 年 3 月 30 日、静岡

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

八巻 耕也 (YAMAKI KOUYA)  
神戸薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号：00351768

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし