

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550076

研究課題名(和文) IL-8レポーター細胞を用いた微生物毒素簡易定量法の開発

研究課題名(英文) Development of an endotoxin detection system using IL-8 reporter cell

研究代表者

木村 裕 (Kimura, Yutaka)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：90375056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：環境中のエンドトキシン等の微生物由来毒素の混入を包括的に鋭敏かつ迅速に検出する方法はいまだ確立されていない。微生物由来の活性物質に幅広く反応する単球に注目し、THP-1単球系細胞株由来のIL-8レポーター細胞、THP-G8細胞を用い評価系の構築を目指した。仙台およびマニラ周辺の環境水について、リムルス試験での測定値とTHP-G8でのIL-8レポーター活性を比較したところ、完全には相関せずエンドトキシン以外の免疫攪乱物質が関与しその活性を評価できる可能性が示唆された。またTLR4のアンタゴニスト、または抗酸化剤による抑制を指標として環境水は分類され、定性、定量的に評価できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：So far, the assay system which can detect contamination of microorganism-derived toxin such as endotoxin to environmental water comprehensively, sensitively and rapidly have not been developed. Our aim was to develop assay system widely screening microorganism-derived toxin, using a THP-1 monocyte cell line derived IL-8 reporter cell, THP-G8.

The environmental water around Sendai, Japan and Manila, Phillipine induced IL-8 reporter activity, however, these induction were not completely correlated with the result measured by LAL method, suggesting that immunodisturbance except endotoxin related to the induction and that THP-G8 could access these activity. Using the suppression index by TLR4-antagonist and anti-oxidant, the environmental water could be divided to several groups and could be estimated qualitatively and quantitatively.

研究分野：免疫学

キーワード：エンドトキシン ルシフェラーゼアッセイ 環境水 免疫攪乱

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 微生物由来毒素の定量評価系の必要性：河川（発展途上国）、飲料水、さらには、それを用いて作られた食品など人々が日常摂取するものの中には、本来、細菌および細菌由来毒素の混入は許されない。しかし、発展途上国においては日常茶飯事に、また、我々社会においても時に食中毒という形で飲料水、食物中の細菌汚染が問題になる。一方、導入患者数が30万人に達するといわれる人工透析においては、透析液の細菌感染、あるいはその毒素が透析患者の健康に多大な影響を及ぼす。このように、細菌とその毒素に汚染されていない水の供給は、太古から人類の大きな課題であった。

(2) インターロイキン-8 (IL-8) レポーター細胞 (THP-G8) の樹立とリポ多糖 (LPS) に対する反応性  
我々は、IL-8 プロモーター下流にオレンジ色に発光する stable luciferase orange (SLO) ルシフェラーゼ遺伝子、G3PDH プロモーター下流に赤色に発光する stable luciferase red (SLR) ルシフェラーゼ遺伝子を導入した単球由来安定細胞株 THP-G8 を樹立した<sup>(1)</sup>。このレポーター細胞に LPS を添加することにより IL-8 プロモーター活性の上昇が認められ、その感度は 1 ng/ml で 10 エンドトキシンユニット (EU)/ml に相当する。

(3) THP-G8 を用いた包括的微生物由来生理活性物質評価系の構築  
近年、Toll 様受容体 (TLR) を始めとして、多くの微生物由来物質が生体内の受容体を刺激し、生体に様々な影響を及ぼすことが明らかにされた。言うまでもなく、その一部は敗血症や食中毒の原因となる。そこで、我々は、樹立した THP-G8 細胞を用いた微生物由来生理活性物質（微生物毒素を含む）のハイスループット評価系を構築することを思い立った。すでに、この細胞でエンドトキシンの定量が可能であることを明らかにしているが、本研究課題では、LPS で代表される TLR4 アゴニスト以外の TLR アゴニストさらには他の微生物由来生理活性物質（Nucleotide binding oligomerization domain 様受容体 (NLR) アゴニスト、ブドウ球菌由来スーパー抗原）などを評価できないか検討する。

## 2. 研究の目的

河川、飲料水など環境中のエンドトキシンを始めとする微生物由来毒素の混入は、発展途上国のみならず、時に先進国でも問題となるが、これらを包括的に鋭敏かつ迅速に検出する方法はいまだ確立されていない。我々は、毒素を始め微生物由来の活性物質に幅広く反応する単球に注目し、THP-1 単球系細胞株に IL-8 プロモーターに制御された SLO ルシフェラーゼ遺伝子を導入し THP-G8 細胞を樹

立した(1)。この細胞の IL-8 プロモーター活性が日本に飛来する黄砂中の粉塵により誘導され、かつその誘導が学童の喘息の病態と関連することが報告されている<sup>(2)(3)</sup>。我々は、この細胞を用い、環境水中の微生物由来毒素を広範にスクリーニングする評価系の構築を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) リムルス試験：

採取した水を 121 °C、2 気圧下に 20 分、オートクレーブ処理したのち、エンドトキシンフリー水で 1000 倍希釈し Toxin SensorTM Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GeneScript) を用い測定した。

### (2) ルシフェラーゼアッセイ：

THP-G8 細胞は IL-8 プロモーターに制御された SLO、G3PDH プロモーターに制御された SLR をヒト急性単球性白血病由来細胞株である THP-1 細胞に導入し樹立した(1)。1 ウェル当たり  $5 \times 10^4$  個の THP-G8 細胞/100  $\mu$ l を黒色の 96-well プレートに播種し、採取した水を 121 °C、2 気圧下に 20 分、オートクレーブ処理したものを 10  $\mu$ l 加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 6 時間インキュベートした。細胞溶解剤とルシフェラーゼ反応の基質であるルシフェリンの混合剤である Tripluc luciferase assay reagent (TOYOBO) を混合し、室温で 10 分振盪させたのちマルチプレート対応型ルミノメーターにてルシフェラーゼ活性を測定した。

### (3) 本測定で使用するパラメーター

- ① SLO-luciferase activity (SLO-LA) : SLO のルシフェラーゼ活性 (IL-8 プロモーターの下流で発現)
- ② SLR-luciferase activity (SLR-LA) : SLR のルシフェラーゼ活性 (G3PDH プロモーターの下流で発現)
- ③ Normalized SLO-LA (nSLO-LA) : SLO-LA / SLR-LA (SLO-LA の値を SLR-LA の値で標準化した値)
- ④ %suppression : (1-阻害剤存在下での nSLO-LA / 阻害剤非存在下での nSLO-LA) x 100 (%suppression=0 は全く阻害されないこと、%suppression=100 は完全に阻害されることを意味する)

## 4. 研究成果

### (1) Toll 様受容体 (TLR), Nucleotide binding oligomerization domain 様受容体 (NLR) アゴニストに対する THP-G8 細胞の反応性 (図. 1)

1 ウェル当たり  $5 \times 10^4$  個の THP-G8 細胞/100  $\mu$ l を黒色の 96-well プレートに播種し種々の TLR アゴニストまたは NLR アゴニスト (InvivoGen) を添加、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 6 時間インキュベートしルシフェラーゼ活性を測定した。G3PDH プロモーターの下流で発現し



ター活性の誘導が NAC によりそれぞれ 82.0%、76.2% に抑制されたが、ポリミキシン B によっては抑制されなかった (それぞれ -29.1%、-13.4%)。仙台およびマニラ周辺の環境水について X 軸にポリミキシン B による %suppression、Y 軸に NAC による %suppression をプロットしたところマニラ周辺の環境水からなるポリミキシン B 高抑制群と、主に仙台周辺の環境水からなるポリミキシン B 低抑制群に分類することができ、THP-G8 細胞を用いて環境水を定性、定量的に評価できる可能性が示唆された。(図. 5) すなわち IL-8 レポーター活性の誘導単独での評価も可能であるが、阻害剤を併用することによりさらに詳細な解析、評価が可能であることが示唆された。

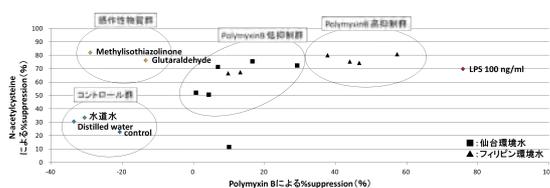


図5 仙台およびマニラ周辺の環境水に誘導されるTHP-G8のIL-8プロモーター活性に対するPolymyxin BとN-acetylcysteineによる阻害

#### <引用文献>

- (1) Takahashi et al. An In Vitro Test to Screen Skin Sensitizers Using a Stable THP-1-Derived IL-8 Reporter Cell Line, THP-G8 Toxicological Sciences 124(2), 359-369 (2011)、査読有
- (2) Watanabe et al. Effects on asthma and induction of interleukin-8 caused by Asian dust particles collected in western Japan. J Asthma. 51(6), 595-602 (2014) 、査読有
- (3) Watanabe et al. Decreased pulmonary function in schoolchildren in western Japan associated with interleukin-8 induced by Asian desert dust. BioMed Research International in press、査読有

#### 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)

[学会発表] (計1件)

木村 裕、藤村 千鶴、相場 節也  
 IL-8 レポーター細胞を用いた微生物毒素簡易定量法の開発  
 日本動物実験代替法学会第27回大会  
 平成26年12月5-7日  
 横浜国立大学(神奈川県横浜市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

木村 裕 (KIMURA, Yutaka)  
 東北大学・大学病院・助教  
 研究者番号: 90375056