

令和 元年 5月 20日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26460811

研究課題名(和文)カーバメイト系農薬による抗癌免疫機能への影響及びその機序

研究課題名(英文) Mechanism and effect of anti-cancer immune function induced by carbamate pesticides

研究代表者

李 卿 (Li, Qing)

日本医科大学・大学院医学研究科・研究生

研究者番号：50250048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は予防医学の視点からカーバメイト系農薬が以下の機序で抗がん免疫機能を抑制することを解明した。その1はカーバメイト系農薬Thiram、Ziram、Maneb及びCarbarylがPerforin/Granzyme/Granulysin系への影響を介して抗がん免疫細胞であるNK、CTL及びLAK活性を抑制する。その2はカーバメイト系農薬が抗がん免疫細胞であるNK細胞とT細胞のアポトーシスを誘導して抗がん免疫機能を抑制する。さらに化学物質の免疫毒性評価においてNK細胞内Perforin、Granzymes及びGranulysinの測定はNK活性測定の代替法として有望であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は予防医学の視点からカーバメイト系農薬が以下の機序で抗がん免疫機能を抑制することを解明した。その1はカーバメイト系農薬がPerforin/Granzyme/Granulysin系への影響を介して抗がん免疫細胞活性を抑制する。その2はカーバメイト系農薬が抗がん免疫細胞のアポトーシスを誘導して抗がん免疫機能を抑制する。これによってカーバメイト系農薬による抗がん免疫機能への影響及びそのメカニズムを解明した。さらにカーバメイト系農薬による腫瘍監視機構機能の低下を介する発癌、化学物質過敏症、アレルギー等の免疫関連疾患への影響の解明にも大きく貢献した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified that carbamate pesticides inhibit anti-cancer immune function by the following mechanism from the viewpoint of preventive medicine. The first mechanism is that carbamate pesticides such as thiram, ziram, maneb and carbaryl inhibit the anti-cancer immune cells such as NK, CTL and LAK activity through the effect on Perforin/Granzyme/Granulysin pathway. The second is that carbamate pesticides induce apoptosis of anti-cancer immune cells such as NK cells and T cells to inhibit anti-cancer immune function. It was suggested that the measurement of intracellular level of Perforin, Granzymes and Granulysin is promising as an alternative method of NK activity measurement in the immunotoxicity evaluation of chemicals.

研究分野：免疫毒性

キーワード：免疫毒性 カーバメイト系農薬 NK活性 抗がん免疫機能 パーフォリン グランザイム グラニューライシン アポトーシス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 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 (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 22-25 年度の科研費でまずカーバメイト系農薬 Ziram による NK、LAK 及び CTL 活性への影響に着目して検討した結果、Ziram が極めて低濃度で Perforin/Granzyme/Granulysin pathway を介して NK、LAK 及び CTL 活性を顕著に抑制することを明らかにした (Li et al. Arch Toxicol. 2011, 2012, 2012; Li et al. Int J Immunopathol Pharmacol. 2012)。

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申請者らの研究を含めていくつかの報告があるが、Fas ligand/Fas 系への影響およびアポトーシス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。また申請者らのこれまでの研究では、Ziram による NK、LAK 及び CTL 活性抑制を明らかにしたが、しかし Ziram による NK、LAK 及び CTL 活性の抑制は Ziram そのもの特有な毒性であるか、それともカーバメイト系農薬の共通の毒性であるか、について不明であり、さらに追及する必要があると考えられる。この背景の下で、本研究で我々は、Ziram 以外のカーバメイト系農薬を用いてその免疫毒性を検討し、カーバメイト系農薬による免疫機能、特に抗癌免疫機能への影響の全容を解明することを目的とした。

## 2. 研究の目的

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。平成 22-25 年度の研究では、カーバメイト系農薬 Ziram が免疫系の主役である NK (natural killer)、LAK (lymphokine-activated killer)及び CTL (cytotoxic T lymphocyte)細胞活性を抑制することを明らかにした。本研究では、カーバメイト系農薬による NK、LAK 及び CTL 細胞活性抑制の機序を追求するうえ、さらに Ziram 以外のカーバメイト系農薬も同様な免疫毒性を発現するかどうか、についても検討し、カーバメイト系農薬による免疫機能、特に抗癌免疫機能への影響の全容を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究で 1 年目にカーバメイト系農薬 Thiram (殺菌剤)、Maneb (殺菌剤) 及び Carbaryl (殺虫剤)による NK、CTL 及び LAK 活性への影響を検討し、2 年目と 3 年目には Thiram (殺菌剤)、Maneb (殺菌剤) 及び Carbaryl (殺虫剤)による NK、CTL 及び LAK 活性への影響の機序を解明するという視点からそれぞれ Thiram, Maneb 及び Carbaryl による NK、CTL 及び LAK 細胞の Perforin/Granzyme/Granulysin 系 (抗がんタンパク質) への影響及び Fas ligand/Fas 系への影響を検討し、4 年目と 5 年目に Thiram, Maneb 及び Carbaryl による NK、CTL 及び LAK のアポトーシスを検討して、カーバメイト系農薬による NK、CTL 及び LAK 活性への影響の機序を解明し、論文を作成した。NK 細胞は人 NK 細胞株である NK-92CI 細胞を用い、CTL 細胞はマウスの脾細胞を YAC-1 細胞で感作して作成し、LAK 細胞は人末梢血リンパ球を IL-2 存在下で培養して得た。

平成 26 年度 Thiram, Maneb 及び Carbaryl による NK、CTL 及び LAK 活性への影響を検討した。

1. これまでの研究では人 NK 細胞株 NK-92CI 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. 2005, 2006, 2008, 2012)、本研究では NK 細胞として NK-92CI 細胞を用いた。
2. CTL 細胞はマウスの脾細胞を YAC-1 細胞で感作して作成した (Li et al. 2000, 2002, 2004, 2012)。
3. LAK 細胞は人末梢血リンパ球を IL-2 存在下で培養して得た (Li et al. 2002, 2012)。
4. In vitro において Thiram, Maneb および Carbaryl でそれぞれ NK、CTL 及び LAK 細胞を処理し、Thiram, Maneb 及び Carbaryl による NK、CTL 及び LAK 活性への影響を検討した。
5. NK、CTL 及び LAK 活性測定は K562 細胞または YAC-1 細胞を標的細胞とし、<sup>51</sup>Cr 放出率の算定による細胞傷害法を用いた (Li et al. 1998, 2000ab, 2002, 2004ab, 2006, 2007, 2008, 2012)。

平成 27 年度カーバメイト系農薬による Perforin/Granzyme/Granulysin 系への影響という視点から Thiram, Maneb 及び Carbaryl による NK 及び LAK 活性への影響の機序を検討し、明らかにした。

1. Thiram, Maneb 及び Carbaryl による Granzyme A, B 酵素活性への影響に関する検討 Granzyme A, B は市販されている測定キットを用いて実施した (Li et al. 2002)。
2. Thiram, Maneb 及び Carbaryl による Perforin/Granzyme/Granulysin の発現レベルへの影響に関する検討 NK 細胞は NK-92CI 細胞を用い、LAK 細胞は人末梢血リンパ球を IL-2 存在下で培養して得た。まず、in vitro において Thiram, Maneb および Carbaryl でそれぞれ NK 及び LAK 細胞を処理し、それから Flow cytometry 法を用いてマウス抗ヒト Perforin 抗体、マウス抗ヒト Granzyme A/B 抗体、ウサギ抗ヒト granulysin 抗体による蛍光免疫染色法で NK と LAK 細胞内の Perforin/Granzyme/Granulysin の発現レベルを測定し (Li et al. Toxicology, 2005, 2006, 2008, 2012)、Thiram, Maneb 及び Carbaryl による Perforin/Granzyme/Granulysin の発現レベルへの影響を明らかにした。

平成 28 年度 前述のように NK、CTL 及び LAK 細胞が Perforin/Granzyme/Granulysin pathway 及び Fas ligand/Fas pathway の両方を介してがん細胞を傷害することから、3 年目に Thiram, Maneb 及び Carbaryl による NK、CTL 及び LAK 細胞の Fas ligand/Fas 系への影響を検討した。Concanamycin A は Perforin/Granzyme/Granulysin 系の抑制因子として NK、CTL 及び LAK 細胞の Perforin/Granzyme/Granulysin 系を選択的に阻害する。(Kataoka et al. Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity. J Immunol. 1996;156:3678-86.) Concanamycin A で NK、CTL 及び LAK 細胞を処理すれば、Perforin/Granzyme/Granulysin 系が遮断され、Fas ligand/Fas 系しか機能しなくなる。そこで、本研究では Concanamycin A で処理した NK-92CI 細胞及び LAK 細胞を用いてカーバメイト系農薬によるこれらの細胞活性への影響を検討して、カーバメイト系農薬による Fas ligand/Fas 系への影響を解明した (Li et al. Toxicology, 2004)。

平成 29 と 30 年度はカーバメイト系農薬による NK、CTL 及び LAK 活性抑制の新機序：カーバメイト系農薬による NK、CTL 及び LAK 細胞のアポトーシスについて検討した。我々のこれまでの研究では有機リン農薬が NK と T 細胞のアポトーシスを介して NK 及び CTL 活性を抑制することを明らかにした (Li et al. Toxicology 2007, 2009)。この視点から我々は、カーバメイト系農薬も NK と T 細胞のアポトーシスを誘発し、NK 及び CTL 活性への抑制に寄与するという仮説を立て、カーバメイト系農薬による NK、LAK 及び T 細胞のアポトーシスを検討する。

NK 細胞は NK-92CI 細胞を使用し、T 細胞は Jurkat T 細胞株を使用し、LAK 細胞は末梢血リンパ球を IL-2 で培養して得る。アポトーシスの測定は、以下の方法を用いる (Nakadai, Li and Kawada, 2006; Li et al. 2007, 2009 Toxicology)。

- 1) 膜の変化：アネキシン V 染色性は、細胞膜の変化を測定し、アポトーシスの早期変化であり、DNA 断片化や核凝縮、膜透過性の変化に先行し、アポトーシス検出手段として汎用されている。本研究は FITC-Annexin V を用いてカーバメイト系農薬による早期アポトーシス細胞を検出した。
- 2) ミトコンドリア膜電位差への影響：アポトーシスでは細胞のミトコンドリア膜電位差に変化が起こるため、MitoLight Apoptosis Detection Kit を用いて検討した。
- 3) ミトコンドリアから Cytochrome-C の放出：アポトーシスではミトコンドリアから Cytochrome-C が放出されるため、FITC-cytochrome-C 抗体を用いて Cytochrome-C の放出を測定した。
- 4) 活性化 Caspase-3 の測定：アポトーシスの最終ステップは細胞内 Caspase-3 の活性化によるたんぱく質分解と DNA 断片化である。従って活性化 Caspase-3 の存在がアポトーシスの決定的証拠である。本研究では FITC 標識抗活性化 Caspase-3 モノクローナル抗体を

用いて FACS (Flow Cytometry)法でカーバメイト系農薬による細胞内活性化 Caspase-3 への影響を測定する。さらに活性化 Caspase-3 の特異的阻害剤 Z-DEVD-FMK を用いて活性化 Caspase-3 の関与を証明した。

#### 4. 研究成果

本研究は以下の研究成果を収め、予防医学の視点からカーバメイト系農薬による抗がん免疫機能抑制の機序を解明した。

1. Thiram, Ziram, Maneb 及び Carbaryl は用量・処理時間に依存して NK 活性を抑制することが明らかとなった。各農薬の強さの順位は Thiram ≒ Ziram > Maneb > Carbaryl である。
2. Thiram、Ziram、Maneb 及び Carbaryl は用量・処理時間に依存して NK-92CI 細胞内 Perforin、Granzymes A-B-3/K、及び Granulysin のレベルを低下させることが明らかとなった。各農薬の強さの順位は Thiram > Ziram > Maneb > Carbaryl である。
3. 農薬に対して各抗癌タンパク質の反応性が異なり、Perforin は最も抑制されやすく、その抑制順位は perforin > GRN > Gr3/K ≒ GrA ≒ GrB である。
4. カーバメイト系農薬による NK 活性の抑制機序はカーバメイト系農薬による NK 細胞内 Perforin、Granzymes A-B-3/K、及び Granulysin の減少と関連すると考えられる。
5. カーバメイト系農薬が用量・処理時間に依存して NK-92CI/MI、Jurkat T、U937 細胞死を誘導することが明らかとなった。各農薬の強さの順位は Thiram > Ziram > Maneb > Carbaryl である。
6. この細胞死は細胞内の Caspase 活性化及び mitochondria pathway を介して誘導したことが判明した。
7. 本研究は予防医学の視点からカーバメイト系農薬が以下の機序で抗がん免疫機能を抑制することを解明した。
8. その 1 はカーバメイト系農薬 Thiram、Ziram、Maneb 及び Carbaryl が Perforin/Granzyme/Granulysin 系への影響を介して抗がん免疫細胞である NK、CTL 及び LAK 活性を抑制する。
9. その 2 はカーバメイト系農薬が抗がん免疫細胞である NK 細胞と T 細胞のアポトーシスを誘導して抗がん免疫機能を抑制する。
10. 化学物質の免疫毒性評価において NK 細胞内 Perforin、Granzymes A-B-3/K 及び Granulysin の測定は NK 活性測定の代替法として有望であることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Li Q, Kobayashi M, Kawada T. Carbamate pesticide-induced apoptosis and necrosis in human natural killer cells. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2014, 28 (1); 23-32.
2. Li Q, Kobayashi M, Kawada T. Carbamate pesticide-induced apoptosis and necrosis in human T lymphocytes. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2015 Apr 1;12(4):3633-45. doi: 10.3390/ijerph120403633.
3. Li Q, Kobayashi M, Kawada T. Effect of carbamate pesticides on perforin, granzymes A-B-3/K, and granulysin in human natural killer cells. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2015 Sep;28(3):403-10. doi: 10.1177/0394632015582334. Epub 2015 Apr 28.
4. Li Q. Natural Killer (NK) Cell Assays in Immunotoxicity Testing. *Methods Mol Biol*. 2018;1803:231-241. doi: 10.1007/978-1-4939-8549-4\_15.

[学会発表] (計 11 件)

1. Li Q, Kobayashi M and Kawada T. Effect of Carbamate Pesticides on Perforin, Granzymes A-B-3/K, and Granulysin in Human Natural Killer Cells. The 54th Annual Meeting of SOT (Society of Toxicology), San Diego, CA, USA, 2015.3.22-26.
2. Li Q, Kobayashi M and Kawada T. Effects of carbamate pesticides on human natural killers and T lymphocytes. 51th Congress of the European Societies of Toxicology, 13 - 16 September 2015, Porto, Portugal
3. Li Q, Kobayashi M and Kawada T. Effect of carbamate pesticides on human natural killer activity. The Society of Toxicology 55th Annual Meeting, New Orleans Ernest N. Morial Convention Center, Louisiana, 2016.3.13-17.
4. Li Q, Kobayashi M and Kawada T. Effect of carbamate pesticides on human natural killer activity. The 55th Annual Meeting of SOT (Society of Toxicology), New Orleans, Louisiana, March 13–17, 2016
5. Li Q, Kobayashi M and Kawada T. Mechanism of carbamate pesticide-induced apoptosis in human immune cells. 53th Congress of the European Societies of Toxicology, 10 - 13 September 2017, Bratislava, Slovak.
6. Li Q, Kobayashi M and Kawada T. Evaluation of immunotoxicity of carbamate pesticides by immune cell lines in vitro. The 57th Annual Meeting of SOT (Society of Toxicology of USA), 2018.3.11-15, San Antonio, Texas, USA.
7. Li Q, Kobayashi M and Kawada T. Mechanism of carbamate pesticide-induced inhibition of human natural killer activity 第 27 回日韓中産業保健学会議、2017 年 5 月 30 日～ 6 月 1 日：札幌
8. 李卿、川田智之. カーバメイト系農薬によるヒトNK細胞内Perforin、Granzymes A-B-3/K 及び Granulysin への影響. 第 88 回日本産業衛生学会総会 2015 年 5 月、大阪
9. 李卿、小林麻衣子、川田智之. カーバメイト系農薬による NK 細胞活性への影響. 第 22 回日本免疫毒性学会学術年会. 2015 年 9 月 10 日-11 日京都
10. 李卿、小林麻衣子、川田智之. カーバメイト系農薬による NK 細胞活性抑制のメカニズム. 第 90 回日本産業衛生学会. 2017 年 5 月 11 日-13 日東京
11. 李卿、小林麻衣子、川田智之. In vitro 法を用いた免疫細胞株によるカーバメイト系農薬の免疫毒性の評価. 第 88 回日本衛生学会総会. 2018 年 3 月 22 日-24 日東京

〔図書〕(計 1 件)

Li Q. Natural Killer (NK) Cell Assays in Immunotoxicity Testing. Methods Mol Biol. 2018;1803:231-241. Part of the Methods in Molecular Biology book series (MIMB, volume 1803)

**Editors:** Jamie C. DeWitt, Cheryl E. Rockwell, Christal C. Bowman

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年：  
 国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

研究代表者

研究分代表者氏名：李卿

ローマ字氏名：Li Qing

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

研究者番号（8桁）：50250048

職名：准教授（2014年4月～2016年3月）、研究生（2016年4月～2019年3月）

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：川田智之

ローマ字氏名：Kawata Tomoyuki

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：00224791

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：小林麻衣子

ローマ字氏名：Kobayashi Maiko

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。