

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860447

研究課題名(和文)迅速高感度型ハイブリッド式検出法を用いたアレルギー誘発・増悪物質の探索と毒性評価

研究課題名(英文) Screening and toxic evaluation of the allergic induction and/or exacerbation substance using hybrid-hybrid screening system

研究代表者

角谷 秀樹 (Hideki, Kakutani)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：00581414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体バリアが破綻すると、アレルギー等の免疫疾患を誘発する可能性が指摘されている。本研究では、環境汚染物質が有するバリア機能及び免疫賦活化能を同時に評価可能なハイブリッド式検出法の開発のための基礎情報の収集を行った。その結果、種々の環境汚染物質がバリア機能を破綻させ、尚且つ免疫応答を攪乱することを見出した。これらのことは、バリア機能及び免疫賦活化能を同時に評価可能なハイブリッド式検出法の開発の可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：It is suggested that the immune diseases such as allergies causes it with the disruption of epithelial cell barrier. In this study, we performed the basic data for development of the hybrid detection system that could evaluate the barrier function and the immune response by an environmental pollution at the same time. It was observed that various environmental pollutants were decreased barrier function, and disrupted the immune response. There results suggest the possibility to develop the hybrid detection system that could evaluate the barrier function and the immune response by an environmental pollution at the same time.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アレルギー応答

1. 研究開始当初の背景

近年、化学物質の高濃度曝露等による顕在的な毒性発現に関する事例は、その法的規制や検査体制の整備により減少傾向にある。しかし、最近の毒性研究では、従来の毒性試験では「無毒」と評価されていた物質が、ヒトの高次機能に対する微弱なシグナルを検出できる毒性評価法の開発も相まって、極低用量で生体恒常性攪乱作用を有することが多数報告されている。実際、食物アレルギー、気管支喘息、アトピー性皮膚炎等に代表されるアレルギー疾患の患者数は、先進国、都市部を中心に近年著しい増加傾向にあり、人々の健康や社会経済に著しい損失をもたらしている。例えば、乳幼児期に発症したアトピー性皮膚炎が、なかなか完治しないまま成人まで持ち越すこと、並びにそれがアレルギー性鼻炎や気管支喘息の誘発因子になることが知られている。応募者は、上記現象の原因を考慮した結果、この現象を「日本人の遺伝的素因の変異説」で説明することには極めて無理があること、そして、その原因として、日常生活の中に「化学物質等が氾濫している日本人のライフスタイルの変化」が最も説明しやすいものと考えた。事実、Takanoらは、ダニアレルギーを予め接種したマウスに、種々のプラスチック製品等の可塑剤であるフタル酸ジエチルヘキシルを投与した時に、アトピー性皮膚炎を増悪させることを報告している (Takano H *et al*, *Environ Health Perspect*, 2006)。また同様な報告は、同研究グループの Inoue らによって、医薬品や化粧品等の原料や重合防止剤として用いられているナフトキノンにおいても観察しているもの (Inoue K *et al*, *Eur Respir J*, 2007)、両物質がどのような作用機構で生体内に侵入する (上皮細胞バリアを透過することにより、免疫担当細胞を賦活化させたか等の知見に関しては、未だ解明されていない。さらに、化学物質による免疫毒性影響評価が *in vivo* 研究に集中しているため、我々の生活環境中に無数に存在する化学物質のアレルギー性の有無を迅速に評価できるシステムが今日まで皆無であった。以上の背景より、応募者は、化学物質が有するアレルギーの誘発及び増悪作用を評価可能な迅速高感度型の *in vitro* 検出法を開発することが、上記疾患等の予防、治療対策として、極めて重要であるものと確信した。

2. 研究の目的

上記背景のもと、本研究では、食物アレルギーを誘発もしくは増悪しうる化学物質を簡便にスクリーニングできる *in vitro* 検出法の開発のために、腸管上皮粘膜組織の生体防御システムに着目した、簡易且つ高精度な *in vitro* 検出法の開発を試みるものである。

3. 研究の方法

(1) 被検物質

検討対象とした環境汚染物質は、ダイオキシン類、多環芳香族炭化水素、残留性有機汚染物質とした。

(2) 膜電気抵抗値を指標としたバリア機能評価

Caco-2 細胞を 6.5-mm Transwell (0.33 cm²) に播種し、37 °C、5% CO₂ の下で培養した。細胞の TJ の形成の度合いを Millicell®-ERS による膜電気抵抗値 (TER) の測定によって評価した。13-20 日後、TER が安定した時点で被検物質を apical 側から添加し、経時的に TER 値を測定した。

(3) 分子量の異なるデキストラン透過性を指標としたバリア機能評価

TER 値の低下が認められた Transwell の apical 側より、種々の蛍光標識デキストラン (FD) (MW; 4,000-400,000) を添加し、basal 側へ透過した蛍光標識デキストラン量を励起波長 485 nm、蛍光波長 535 nm にて測定した。

(4) *in situ* ループ法を用いたバリア機能評価

一昼夜絶食させた 11-12 週齢の雌性 C57BL/6 マウスの空腸に 3 cm のループを作製し、ループ内に被検物質と FD との混合液を投与した。投与後 0、1、2、4、6 時間目にマウス尾静脈より採血し、適宜希釈し、蛍光度計 (励起波長; 485 nm、蛍光波長; 535 nm) を用いて蛍光値を測定し、血中に移行した FD 量と投与後 6 時間目までの FD 濃度-時間曲線下面積 (AUC_{0-6 h}) を算出した。

(5) モデル抗原を用いた Th1 及び Th2 応答性の検討

ヒト T 細胞由来株 HPA-ALL 細胞を卵白アルブミン (OVA) で刺激し、各種サイトカインの mRNA 量をリアルタイム PCR 法にて測定した。

(6) モデル抗原のエピトープ部位の作製

OVA エピトープ保存ペプチドを発現するベクターを作製し、大腸菌に形質転換することで、作製した。

4. 研究成果

(1) 膜電気抵抗値を指標としたバリア機能評価

Caco-2 単層膜に被検物質を apical 側から添加し、TER 値を測定し、バリア機能の評価した。TER 値と細胞層のバリア機能とは強い相関関係があり、TER 値の低下は細胞間に隙間で出来ていることを示す。ダイオキシン類や PAHs を添加すると、添加時間依存的な

TER 値の低下が観察され、添加 72 時間では PCB で約 3 割、TCDD、TBDD、B(a)P で約 4 割、B(k)F で約 5 割の TER 値の低下が認められた。一方、 α -HCH と HCB とでは TER 値の低下は観察されなかった。

(2) 分子量の異なるデキストラン透過性を指標としたバリア機能評価

ダイオキシン類によるバリア機能破綻の程度を検討するために分子量の異なる蛍光標識デキストランを用いて、細胞間隙の透過量を測定した。その結果、TCDD により Caco-2 細胞のバリア機能を破綻させると、分子量 4,000 Da のデキストランのみが basal 側に移行した。

(3) *in situ* ループ法を用いたバリア機能評価

マウスの腸管ループ内に FD-4 (1 mg) と被検物質との混合液を投与したときの血中デキストラン量は、1 時間目において vehicle 投与 (DMSO; 対照) では 2.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であったのに対して、TCDD 投与では 4.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、また B(a)P 投与では 2.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。しかしながら、その後の挙動は両化合物で異なり、TCDD は 1 時間後の血中濃度が最大であり、投与後 6 時間までその血中濃度はほぼ一定であった。一方、B(a)P は投与 6 時間後まで経時的に血中濃度が上昇し、6 時間目の血中濃度は最終的に 12.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示した。また、6 時間までの被検物質投与による $\text{AUC}_{0-6\text{h}}$ を算出したところ、TCDD の $\text{AUC}_{0-6\text{h}}$ は 23.5 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 、B(a)P は 31.5 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ となった。

(4) モデル抗原を用いた Th1 及び Th2 応答性の検討

HPB-ALL 細胞を OVA で刺激すると、IL-4 及び IFN- γ の mRNA 量の増加が観察された。また BSA を用いた検討では観察されなかったことから、この観察は OVA に特異的な反応であることが推察された。さらに、OVA 存在下で HPB-ALL 細胞をダイオキシン類で刺激すると、OVA により増加した IL-4 の mRNA 量がさらに増加し、IFN- γ の mRNA 量は減少することを観察した。

(5) モデル抗原のエピトープ部位を用いた Th1 及び Th2 応答性の検討

大腸菌発現系を用いて OVA 保存エピトープを作製した。作製したペプチドは Ni カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。次に、HPB-ALL 細胞を、この精製した OVA 保存ペプチドを用いて刺激した。しかしながら、各種サイトカインの産生亢進は認められなかった。

以上の研究成果より、環境汚染物質、特に TCDD は上皮細胞バリア機能を破綻させるところを明らかとした。さらに HPB-ALL 細胞を用いることで、*in vitro* で免疫応答を評価可能

であることを見出した。しかしながら、Th1 系及び Th2 系応答を個別に検討する系の構築には至らなかった。今後は、全長の OVA を用い、エピトープ部分のアラニン置換体を用いることで、上記問題点の解決を試みる。これらのことは、バリア機能及び免疫賦活能を同時に評価可能なハイブリッド式検出法の構築のための基礎情報となり、今後さらなる改良を加えることで、*in vitro* 検出法の開発に繋がるものと確信した。それにより、バリア機能破綻能を有する環境・食品汚染物質のスクリーニングと、バリア機能破綻と免疫攪乱作用と連関を解明することが可能となり、アレルギー疾患等に対する予防及び治療対策の一助となるものと確信される。

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)

Kakutani H., Aozasa O., Akiyama E., Nakao T., Ohta S.; Property of cytochrome P450 1A inducibility by polychlorinated/brominated biphenyls (Co-PXBs) detected in Japanese breast milk. *Toxicology Reports*, **2**, 685-91, 2015.

Akiyama A., Kakutani H., Nakao T., Motomura Y., Takano Y., Sorakubo R., Mizuno A., Aozasa O., Ohta S.; Facilitation of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by debrominated tetrabromobisphenol A compounds detected in Japanese breast milk. *Environmental Research*, **140**, 157-64, 2015.

Nakao T., Akiyama E., Kakutani H., Mizuno A., Aozasa O., Akai Y., Ohta S.; Detection of tribromobisphenol A as debrominated compounds of tetrabromobisphenol A in breast milk collected in Japan. *Journal of Environmental Chemistry*, **25**, 69-77, 2015.

Nakao T., Akiyama E., Kakutani H., Mizuno A., Aozasa O., Akai Y., Ohta S.; Levels of tetrabromobisphenol A, tribromobisphenol A, dibromobisphenol A, and bisphenol A in Japanese breast milk. *Chemical Research in Toxicology*, **28**, 722-8, 2015.

Kakutani H., Aozasa O., Mizuno A., Akiyama E., Nakao T., Ohta S.; *In vitro* and *in vivo* induction of cytochrome P450 by coplanar polychlorinated/brominated biphenyls (Co-PXBs) providing high TEQ in mother's milk in Japan. *Toxicology*, **324**, 68-75, 2014.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 角谷秀樹、中西菜月、他 2 名「健康有害物質による間葉系幹細胞の脂肪・骨芽細胞分化攪乱作用」、第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2015 年 10 月 17 日、大阪大谷大学
2. 角谷秀樹、金城ちなみ、他 2 名「TCDD の経口・経鼻曝露による抗原特異的な抗体産生変動」、第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2015 年 10 月 17 日、大阪大谷大学
3. 角谷秀樹、中尾晃幸、太田壮一「健康有害物質 TCDD と TBBPA の曝露により観察される間葉系幹細胞分化攪乱影響」、第 24 回環境化学討論会、2015 年 6 月 24-26 日、札幌コンベンションセンター
4. 太田壮一、角谷秀樹、中尾晃幸、「マウス授乳期のダイオキシン曝露した新生仔の成獣期における抗体産生能への影響」、第 24 回環境化学討論会、2015 年 6 月 24-26 日、札幌コンベンションセンター
5. 秋山恵麻、樋口直美、角谷秀樹、他 3 名「臭素系難燃剤テトラプロモビスフェノール A による間葉系幹細胞分化攪乱作用」、第 17 回環境ホルモン学会、2014 年 12 月 9-10 日、東京大学
6. 秋山恵麻、千頭大毅、角谷秀樹、他 3 名「TCDD による間葉系幹細胞の脂肪・骨芽細胞分化攪乱作用に関する検討」、第 17 回環境ホルモン学会、2014 年 12 月 9-10 日、東京大学
7. 秋山恵麻、空久保良太、角谷秀樹、他 3 名「TeBBPA による脂肪細胞分化とエピジェネティック変化」、第 17 回環境ホルモン学会、2014 年 12 月 9-10 日、東京大学
8. 角谷秀樹、新田啓介、他 3 名「ダイオキシン類が有する腸管バリア破綻に伴った免疫毒性影響」、第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2014 年 10 月 11 日、京都薬科大学
9. 角谷秀樹、川口彩、他 3 名「健康有害物質が Caco-2 細胞のバリア機能に及ぼす影響評価」、第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2014 年 10 月 11 日、京都薬科大学
10. 角谷秀樹、古山英孝、他 3 名「ダイオキシンは腸管バリア機能を破綻することにより免疫毒性を示す」、第 23 回環境化学討論会、2014 年 5 月 14-16 日、京都大学

〔図書〕(計 0 件)

該当無し

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

該当無し

取得状況(計 0 件)

該当無し

〔その他〕

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角谷 秀樹 (KAKUTANI HIDEKI)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：00581414

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し