

図 2. 8-OHdG 尿中排泄量の推移

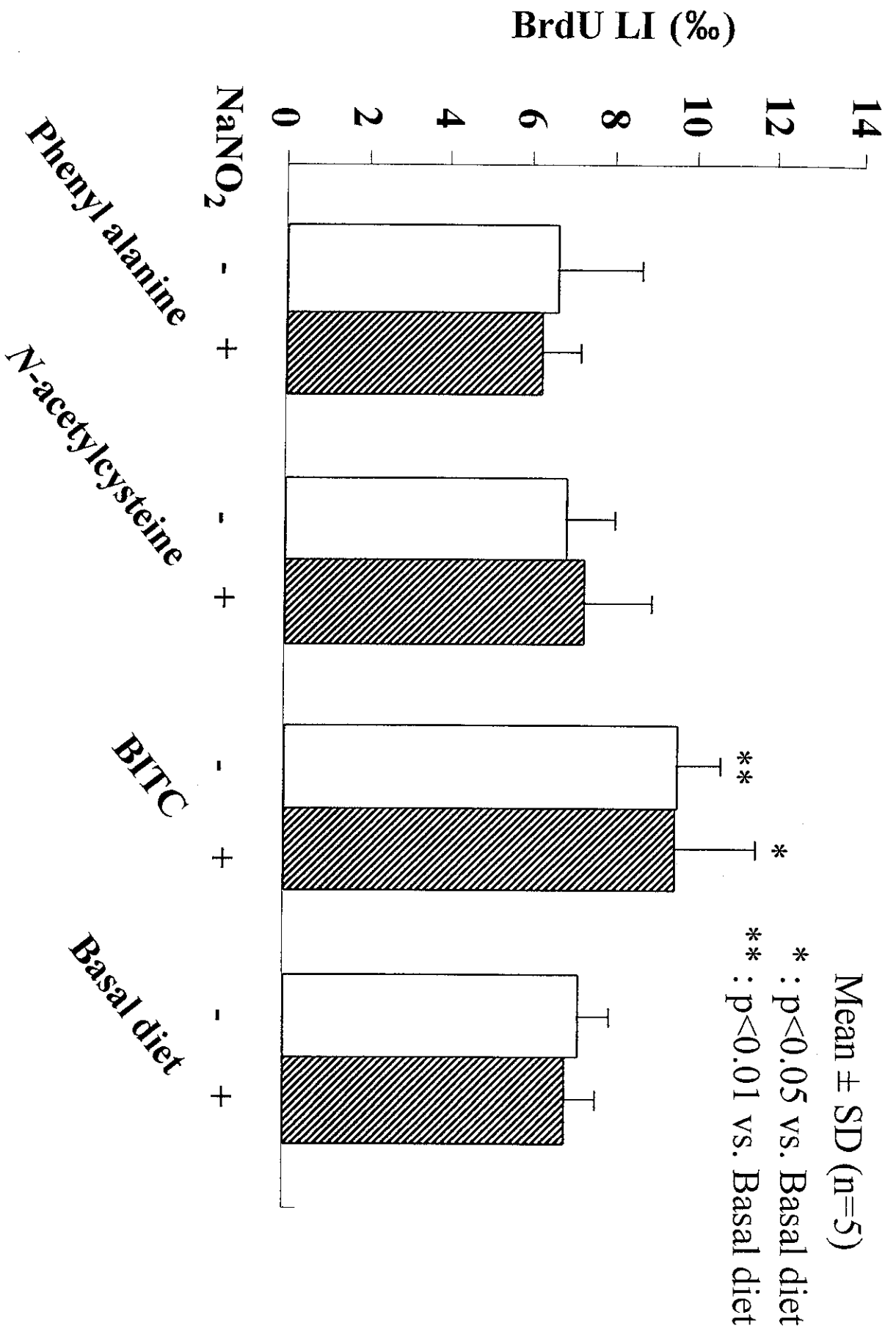


図 3. 腎皮質尿管上皮のBrdU 標識率

厚生科学研究費助成金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

食品中化学物質の相互作用等に関する調査研究

分担研究課題：肝中期発がん試験法を用いた食品中化学物質の相互作用の影響

分担研究者 白井 智之 名古屋市立大学医学部第一病理学教室 教授

研究要旨

加熱した肉類魚類に含まれる発がん性ヘテロサイクリックアミンの1つである MeIQx と、食品中に含まれそれ自体は変異原性、発がん性を持たない Harman または Norharman とを同時投与すると MeIQx 単独投与群に比較して前癌病変巣の数および面積が減少し、Harman および Norharman は MeIQx の発がん促進作用を減弱することが明らかとなった。一方、MeIQx と亜硝酸を同時投与すると CYP1A1 の発現上昇が認められ、亜硝酸は MeIQx の発がん促進作用を増強した。また、ラットに投与すると MeIQx を代謝活性化する CYP1A2 を肝に誘導し、家畜の駆虫剤として使用される Fenbendazole は、MeIQx との同時投与でもその発がん性を修飾しないことが明らかとなった。

A. 研究目的

食品中には無数の化学物質が含まれており、ヒトは多数の化学物質に暴露されているが、それらの物質がいかなる相互作用、複合作用を体内で起こしているかはそれらの発がん性を考える上で重要な課題である。本研究は、食品中の化学物質の発がん作用に対する複合作用を検索する一つのモデルとして、加熱調理した肉類などに含まれる MeIQx と Harman, Norharman または亜硝酸との同時投与により如何に MeIQx の発がん修飾作用が影響されるかを検索した。また、MeIQx の代謝に関連すると考えられる CYP1A1,1A2 の発現量の変化を検索した。さらに家畜の駆虫剤として用いら

れ食肉からヒトが暴露される危険性があり、CYP1A2 を誘導するとされる Fenbendazole と MeIQx を同時投与することにより如何に MeIQx の発がん作用が修飾されるかを検索した。

B. 研究方法

動物は F344 雄ラット 6 週令を用いた。DEN200mg/kg 腹腔内投与でイニシエーション処置を行い、2 週間後 MeIQx(0.03%) と Harman(0.05%), Norharman(0.05%)または NaNO₂(0.1%) を 6 週間同時投与し、実験開始 3 週後に肝部分切除を行い、実験期間 8 週で剖検屠殺を行った。MeIQx, Harman, Norharman

は混餌投与、亜硝酸は飲料水に混じて投与した。Group1 は MeIQx+Harman, Group2 は MeIQx+Norharman, Group3 は MeIQx+NaNO₂, Group4 は MeIQx 単独、Group5 は Harman 単独、Group6 は Norharman 単独、Group7 は亜硝酸単独、Group8 は基礎食のみとした (図1)。屠殺剖検時に肝を取り出し、アセトン固定後、パラフィン包埋切片を作製し、肝の前癌病変巢マーカーである GST-P の免疫染色を行い、その単位面積あたりの数と面積を計測した。また、これらの複合投与を2週間行ったラット肝から mRNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法にて各種の CYP の発現を検索した。CYP の発現量は内因性コントロールである Cyclophilin の発現量に対する比として表した。次に、MeIQx と Fenbendazole との同時投与の影響を前述の肝中期発がん検索法を用いて検索した。Group1 から Group5 は DEN でイニシエーション処置を行った群である。group6 から group9 はイニシエーション処置を行わずに生食を投与した群である。実験開始2週間後から Group1 は MeIQx(0.03%) + Fenbendazole(0.02%), group2,6 は MeIQx + Fenbendazole(0.06%), Group3,7 は MeIQx 単独、Group4,8 は Fenbendazole(0.06%) 単独、Group5,9 は基礎食のみの与えた。本実験も8週間の実験終了後、肝の GST-P 陽性細胞巢を計測することにより、MeIQx の肝発がん修飾作用に対する高濃度(0.06%)と低濃度(0.02%)の Fenbendazole の影響について検索した。

本研究における倫理面への配慮については、本大学における実験動物倫理委員会の承諾を得たものであり、動物愛護の精神を十分に考慮して行われたものである。

C. 研究結果

肝の GST-P 陽性細胞巢の単位面積あたりの数と面積を画像解析装置(IPAP)で計測した結果を図2に示す。加熱した肉魚類に含まれる発がん性ヘテロサイクリックアミンの1つである MeIQx を単独で投与すると基礎食のみを与えた対照群に比べ、GST-P 陽性細胞数の単位面積あたりの数と面積が統計学的有意差をもって増加した。MeIQx と亜硝酸を同時投与すると MeIQx 単独群に比較し、さらに GST-P 陽性細胞数の単位面積あたりの数と面積が増加し、亜硝酸が MeIQx の肝発がん性を増強させることが明らかとなった。一方、MeIQx と Harman または Norharman の同時投与では、GST-P 陽性細胞巢の数および面積とも有意差に減少し、Harman、Norharman とともに MeIQx の発がん性を減弱させることが明らかとなった。なお、Harman、Norharman および亜硝酸単独投与では発がん修飾作用は見いだされなかった。また、亜硝酸を MeIQx と同時投与すると MeIQx を代謝するとされる CYP1A1 の mRNA の肝組織での発現は、MeIQx 単独投与群に比較して、約15倍と著明な発現上昇がみられた。MeIQx 投与により CYP1A2 の発現上昇が見られたが、Harman、Norharman、亜硝酸の同時投与によってはその CYP1A2 の発現に影響を与えなかった (図3)。Fenbendazole は 0.06%、0.02% のいずれの濃度においても MeIQx との同時投与で GST-P 陽性細胞巢の数、面積とも、対照群である MeIQx 単独投与群の値と有意差は見られず、むしろ減少傾向が見られ、MeIQx の発がん性を明らかに修飾しないことが判明した。また、Fenbendazole 単独投与でも明らかな肝発がん修飾作用は見られなかった(図4)。

D. 考察

それ自体が発癌修飾作用も CYP の誘導能も見られない亜硝酸が MeIQx の発がん性を増強し、CYP1A 1 の顕著な誘導を認めた。これは、亜硝酸と MeIQx の同時投与により、MeIQx の代謝活性化に関与すると考えられる CYP1A1 の発現が誘導され、MeIQx が発がん性を持つ活性体により効率よく代謝されたか、あるいは、亜硝酸と MeIQx が胃内の酸性条件下で反応し、ニトロサミンなど通常では認められない、より発がん性の強い物質が形成されたか等の可能性があり、今後の研究課題と考えられる。一方、Harman, Norharman は MeIQx の発癌性を減弱させたが、今回検索した CYP の分子種に明らかな変化はみられず、その機序が解明されれば、がんの化学予防にも応用可能である重要な研究となると考えられる。

Fenbendazole は MeIQx を代謝活性化する CYP1A2 を誘導することが報告されており、MeIQx の肝発がん性を増強させることが期待されたが、その効果は認められなかった。従って、単に酵素誘導のみからではその発癌修飾作用の予測が困難で、個体レベルの検索が必須と考えられた。

E. 結論

ラット肝中期発がん検索法を用いて、MeIQx に対する発がん修飾作用を検索したところ、Harman, Norharman はその発がん性を減弱し、亜硝酸は逆に増強することが明らかとなった。亜硝酸の MeIQx に対する発がん増強作用の一端は CYP1A 1 の発現亢進によるものと考えられた。Fenbendazole には MeIQx の発がん性に対しても、それ自体にも明らかな発がん修飾作用は見いだされなかった。以上より、

食品中の化学物質には相互作用を示すものがあることが明らかとなり、このような相互作用の研究の重要性が確認された。

F. 研究発表

論文発表

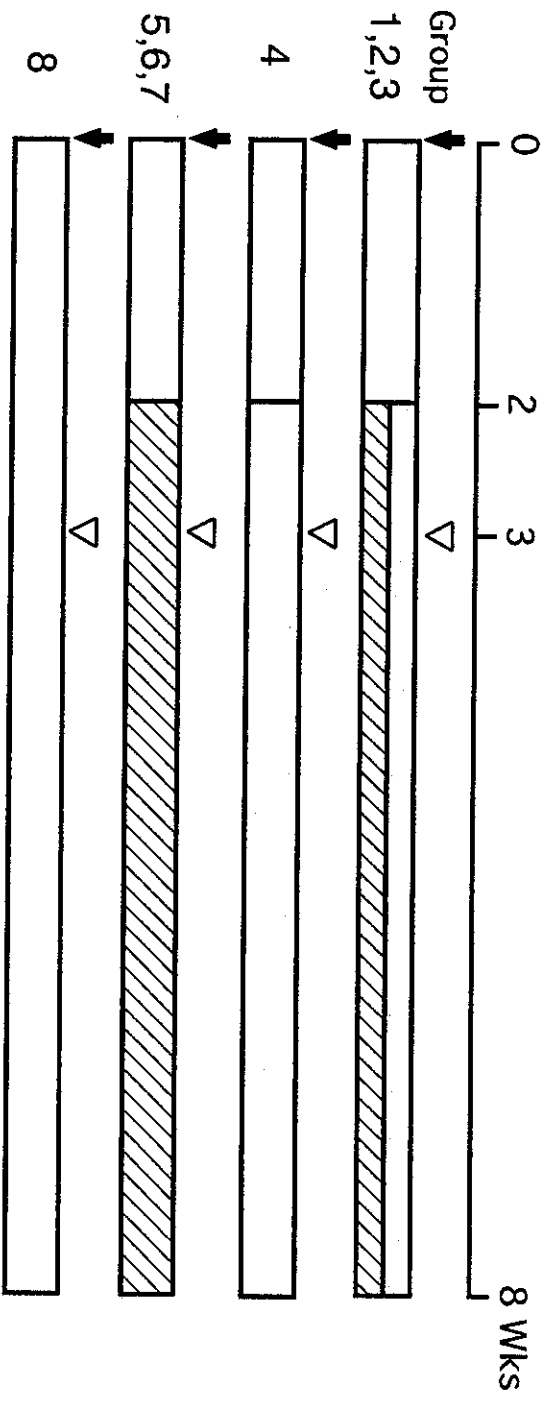
1. Shirai, T., Hirose, M., Ito, N. Medium-term bioassays in rats for rapid detection of the carcinogenic potential of chemicals. In: D. B. McGregor, J. M. Rice, S. Venitt (eds.), *The Use of Short- and Medium-term Tests for Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation*, Vol. IARC Scientific Publications No. 146, pp. 251-272. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1999.
2. Moore, M. A., Tsuda, H., Tamano, S., Hagiwara, A., Imaida, K., Shirai, T., Ito, N. : Marriage of medium-term liver model to surrogate markers - a practical approach for risk and benefit assessment. *Toxicol. Pathol.* 27: 237-242, 1999.
3. Hirose, M., Takahashi, S., Ogawa, K., Futakuchi, M., Shirai, T., Shibutani, M., Uneyama, C., Toyoda, K., Iwata, H. : Chemoprevention of heterocyclic amine-induced carcinogenesis by phenolic compounds in rats. *Cancer Lett.* 143: 173-178, 1999.
4. Hirose, M., Takahashi, S., Ogawa, K., Futakuchi, M., Shirai, T. : Phenolics: Blocking agents for heterocyclic amine-induced carcinogenesis. *Fd. Chem. Toxic.* 37: 985-992, 1999.

学会発表

1. 白井智之：動物がん予防研究の現状と展望,
第6回がん予防研究会, 1999.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし



Animals : F344 male rats, 6-week-old

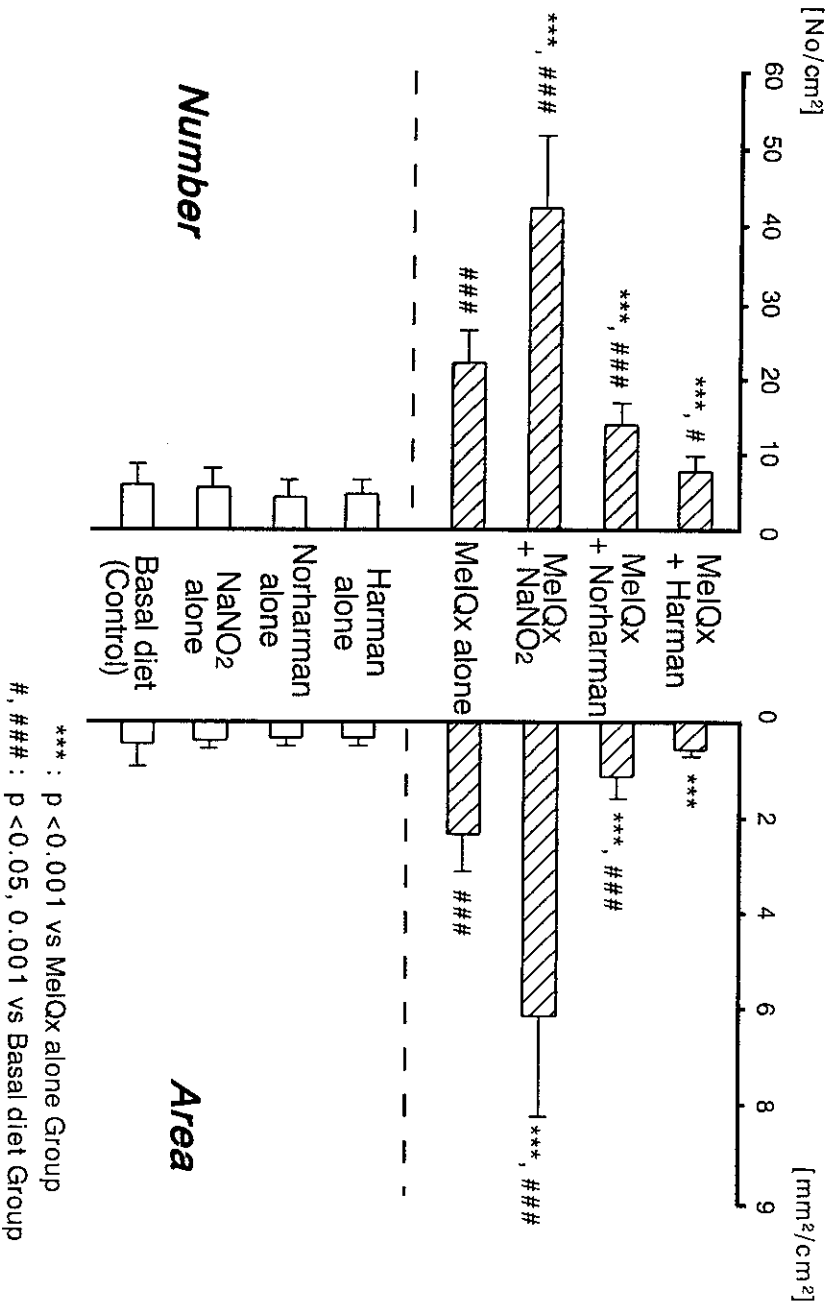
↓ : Diethylnitrosamine (DEN), 200 mg/kg b.w., i.p.

▽ : 2/3 Partial hepatectomy

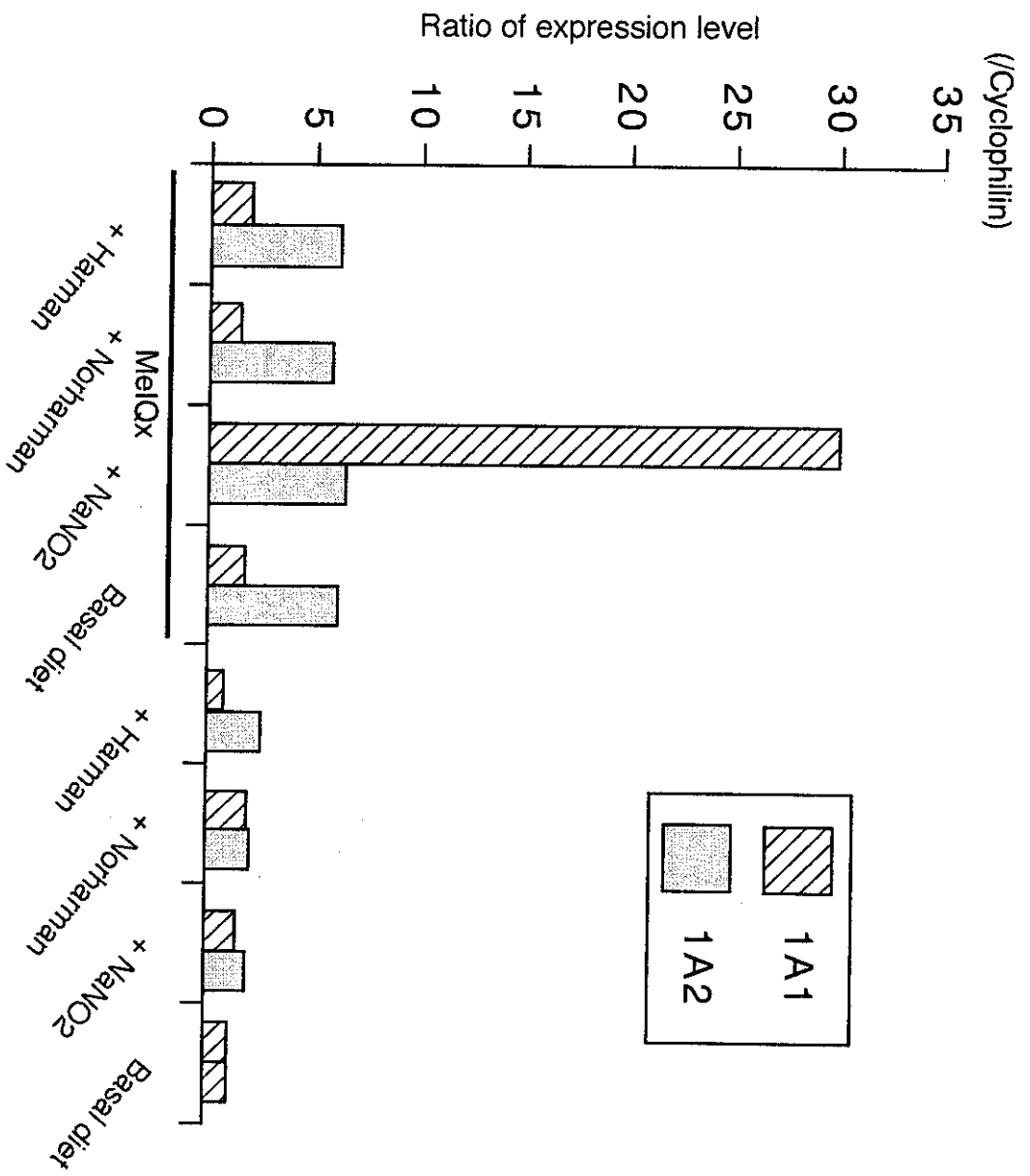
▭ : MelQx, 0.03% in diet

▨ : Harman, Norharman (0.05%), NaNO₂ (0.2%) in diet

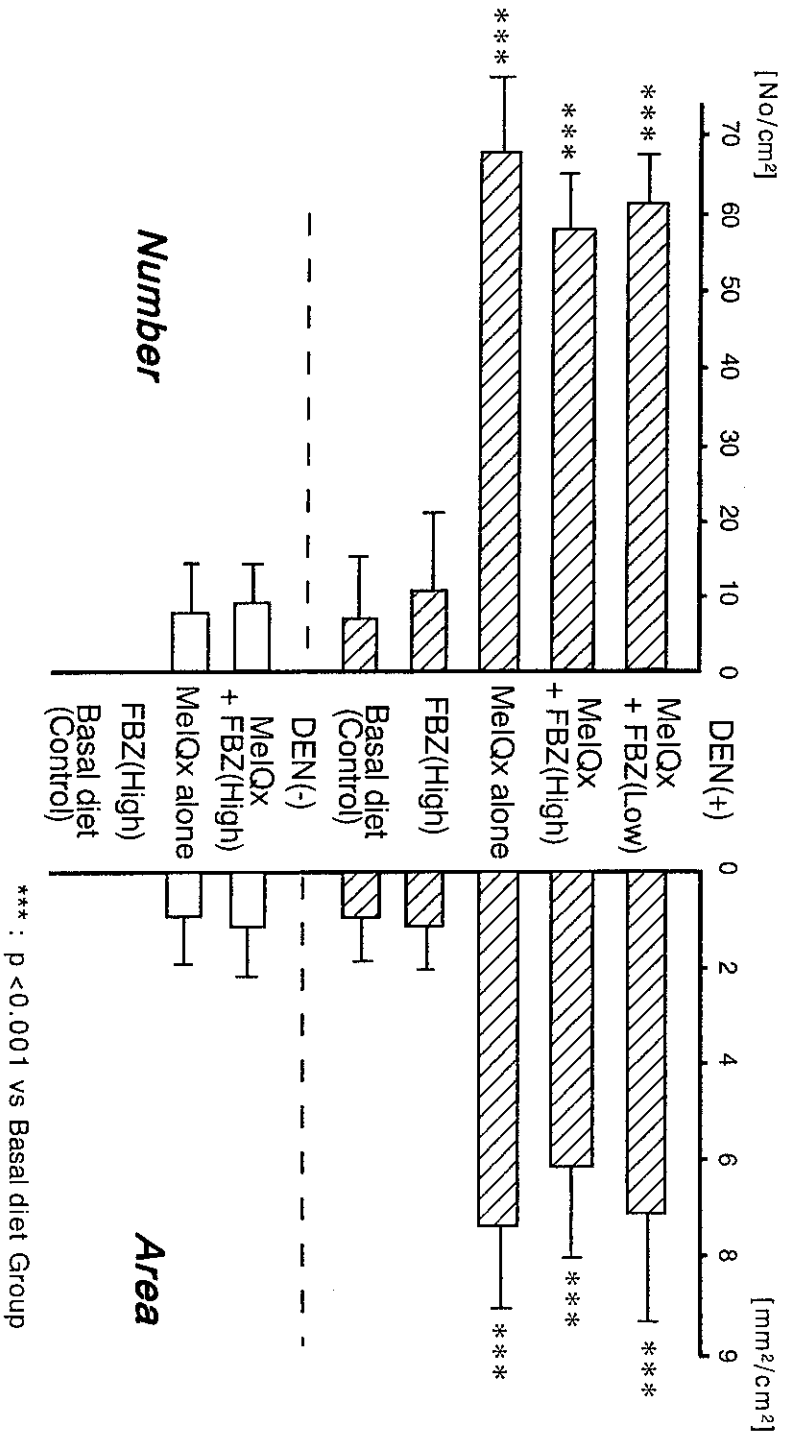
Experimental design for the combined effects of MelQx and harman, norharman or NaNO₂ in the medium term liver bioassay



Quantitative analysis of GST-P positive foci



Expression profile of CYP1A1 and 1A2 in the liver



Quantitative analysis of GST-P positive foci

平成 11 年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
「食品中化学物質の相互作用等に関する調査研究」
分担研究報告書

ギャップジャンクション構成分子の消退を指標としたインビトロ
発がんプロモーター検出系の開発と応用

分担研究者 井上 達 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部長

研究要旨

本年度は、ギャップ結合細胞間連絡(GJIC)とともにアポトーシスを指標に加えた発がんプロモーター検出系の確立のため、v-myc 遺伝子導入によりアポトーシス亢進系とした培養肝細胞(WB-MYC 細胞)での解析の有用性を検討した。発がんプロモーターのモデル物質として pentachlorophenol(PCP)を用い、血清除去により誘導される WB-MYC 細胞のアポトーシス及び GJIC に対する影響を調べた。その結果、PCP によるアポトーシス阻害性ならびにそれに先行する GJIC 阻害性が検出された。またそれぞれの阻害要因として、アポトーシス誘導因子の p53 ならびに GJ 蛋白コネクシンの発現抑制の関与が示唆された。以上のことから、GJIC 及びアポトーシスの双方を指標とした本解析系は、複数の化学物質による発がんプロモーター作用の評価系として有用であることの展望が開けた。

A. 研究目的

本研究は、発がんプロモーター物質を精度良く検出するため、ギャップ結合細胞間連絡(GJIC)阻害作用及びギャップ結合構成分子の発現・修飾、さらにアポトーシスへの影響を同時に評価するインビトロ検出系の樹立と応用を目的とする。この試験系により、複数の化学物質による相互作用の危害評価への展望が開けるものと期待される。本年度は、前年度に引き続いての GJIC 解析とともにアポトーシスを指標に加えた発がんプロモーター検出系の確立のため、v-myc を導入した肝細胞系(WB-myc)の有用性を検討した。すなわち、肝発がんプロモーター物質である PCP を用いて、このものの WB-myc 細胞の血清除去によるアポトーシス誘導への影響、及び GJIC 機能に対する作用を調べ、さらにそれらの阻害機序に関する基礎的研究を行い、双方の関連性を明らかにすることを目的として行った。

B. 研究方法

本解析には、血清除去によりアポトーシスを亢進する特徴のある、v-myc を遺伝

子導入したラット肝由来の WB 細胞 (WB-MYC 細胞)を用い、このアポトーシスに対する PCP 処理の阻害効果を検討した。血清存在下で confluent まで培養した WB-MYC 細胞を、無血清培養液に置き換え、同時に PCP 処理を開始して、以下の解析を行った。

GJIC については、scrape loading dye transfer 法により、アポトーシスの指標としては、形態的变化、ヘキサ DNA 切断等によって解析した。またそれぞれの阻害要因を考察するため、GJIC については connexin43 (Cx43)の発現・局在性、また、アポトーシス阻害要因について、特に p53 の発現変化の可能性について検討した。

C. 研究結果

1. GJIC の時間経過

GJIC 阻害性について SL/DT 法で解析した結果、コントロールでは 12 時間後までは大きな変化はないが、PCP 処理では 1 時間後から有意な阻害効果が見られ、その後もこの阻害が持続した(Fig. 1 & 2)。

2. アポトーシスの形態的变化

血清除去 12 時間後の細胞形態ならびにヘキスト染色で観察した染色体の形態変化を観察した結果、コントロールでは、アポトーシスに伴い認められる離脱細胞の増加、染色体の凝縮が多く細胞に観察された。一方、PCP 処理ではこのような形態的变化を起こす細胞の頻度は非常に少なかった(Fig.3)。

3. DNA 切断作用

TUNEL 染色によって、アポトーシスに伴う DNA 切断を確認した。コントロールでは TUNEL 陽性細胞が多く認められたが、PCP では陽性細胞数が明らかに減少していることが確認された(Fig.2B)。さらに DNA ラダーアッセイによって時間経過を解析した。コントロールではアポトーシス特有のラダー形成が 6 時間から 12 時間にかけて顕著となるが、PCP 処理では明らかにこのラダー形成が抑制された(Fig. 4)。

4. Cx43 の発現変化

GJIC 阻害要因を考察するため、GJIC 機能に関わる Cx43 の発現変化を検討した。Western blotting により Cx43 のリン酸化及び発現変化を解析した結果、PCP 処理ではリン酸化の程度には変化は見られなかった。コントロールでは、アクチンレベルが 6 時間以降から減少傾向が見られ、これに併行して、Cx43 の発現レベルも 6 時間以降から減少傾向にあった。一方で、PCP 処理ではアクチンレベルの変化はなく、しかし Cx43 レベルが 6 時間以降に特異的に減少していた(Fig. 5)。

PCP が転写レベルで Cx43 の発現を抑制しているかについて、RT-PCR で解析した。その結果、PCP 処理により 6 時間以降から mRNA レベルでの減少が認められた(Fig.6)。

さらに、Cx43 の細胞膜での局在性の変化について、immunostaining で解析した。コントロールでは、血清除去 12 時間後においても、細胞膜上に発現している Cx43 のプラークが多く観察された。PCP 処理では、細胞膜における発現には影響がな

いが、プラークの密度、大きさがコントロールより減少していた(Fig.7)。

5. p53 及び bcl-2 の発現変化

アポトーシス阻害の要因として、まずアポトーシス誘導の key molecule である p53 の発現レベル、ならびにアポトーシス抑制因子である Bcl-2 の発現に対する影響を調べた。

Western blotting により定量した結果、P53 レベルは PCP 処理により 6 時間以降より減少傾向が観察された。一方 BCL-2 の発現レベルには、12 時間の処理時間を通しては、処理による有意な影響は見られなかった。P53 と BCL-2 との発現比で表示すると、p53 のレベル低下に併行して、6 時間後より減少が認められた(Fig.8)。

p53 の発現低下には、mRNA レベルでの抑制が関わるかについて RT-PCR で解析した。その結果、PCP 処理によって、6 時間後より p53 の mRNA の低下傾向が見られた(Fig. 9)。

P53 に対する作用として、PCP が p53 の核内移行を抑制する可能性が考えられる。そこで p53 の immunostaining で細胞内局在性を解析した。血清存在下のコントロールでは細胞質内に局在が見られ、またアポトーシスを進行している細胞では、核内に発現が見られる。また血清除去後では核内に局在した細胞が増加してくる。一方、PCP 処理によっても p53 の核内での局在が多くの細胞に見られた(Fig.10)。

D. 考察

WB-MYC 細胞を用いて、PCP の GJIC とアポトーシスへの作用を解析した結果、GJIC の阻害が初期から起こることを確認し、またアポトーシス誘導に伴う、形態的变化、DNA 切断作用を抑制することが明らかとなった。また GJIC 阻害要因として、Cx43 の発現レベルの低下の関与が示唆され、アポトーシス阻害要因としては、p53 の発現レベルの抑制の可能性が示唆された。

以上のように、2つの生物指標(GJIC、アポトーシス)に着目した本解析系が、精度良い発がんプロモーター物質の検出系として有用であることを示す結果が得られた。

本解析系の特徴をまとめると、1)発がんプロモーター物質による2つの生物作用特性(GJIC 阻害、アポトーシス阻害)の両事象を評価の対象としている点、2)両事象を高感度に検出できる培養細胞系である点、3)迅速で効率的である点、4)メカニズム研究に有用である点等が挙げられる。従って、この解析系は複数の発がんプロモーター物質による相互作用のインビトロ評価系として有用であることが期待される。

今後は、複数の既知の発がんプロモーター物質の複合作用、ならびに発がんプロモーター物質と抗発がんプロモーター物質による相互作用等を検討し、本法の複合効果評価系としての有用性について、さらに検証していく。

E. 結論

本年度のモデル物質による解析によって、2つの生物指標(GJIC、アポトーシス)に着目した本解析系が、精度良い発がんプロモーター物質の検出系として有用であることの展望が開けた。

F. 研究発表

1.論文発表

- 1) Yoshida, K., Inoue, T., Hirabayashi, Y., Nojima, K., Sado, T.(199) Calorie restriction and apontaneous hepatic tumors in C3H/HE mice. J. Nutr. Health Age. 3, 121-126.

- 2) Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Takagi A, Kitajima S, Miyazaki Ji, Inoue T: MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. Development 126(15):3437-47, 1999.
- 3) Kurata H, Liu CB, Valkova J, Koch AE, Yssel H, Hirabayashi Y, Inoue T, Yokota T, Arai Ki.: Recombinant adenovirus vectors for cytokine genetherapy in mice. Allergy Clin Immunol, 103: 471-84, 1999.

2.学会発表

- 1) Pentachlorophenol inhibits gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells. 1999 International Gap junction Conference Gwatt, Switzerland (August 28 ~ September 2, 1999)H/He
- 2) 佐井君江、菅野 純、黒川 雄二、井上 達 : Pentachlorophenol の肝培養細胞におけるアポトーシス阻害作用ならびにギャップ結合細胞間連絡阻害との関連 : 第 58 回日本癌学会総総会、広島 (平成 11 年 9 月 29 日~10 月 1 日)
- 3) 平林容子、高木篤也、児玉幸夫、菅野 純、黒川雄二、井上達 : Mn-SOD 遺伝子導入マウス骨髄細胞での紫外線抵抗性 : 第 58 回日本癌学会総会、 広島(平成 11 年 9 月 29 日~10 月 1 日)
- 4) K.Sai, J.E.Trosko, T.Inoue: Pentachlorophenol-induced down-regulation of gap junctional intercellular communication was ameliorated by (-)-epigallocatechin gallate in rat liver epithelial cells. Epigenetic Toxicant-Induced Signal Transduction and Altered Cell-Cell Communication, Ann Arbor, Michigan (Oct.17-20,1999)

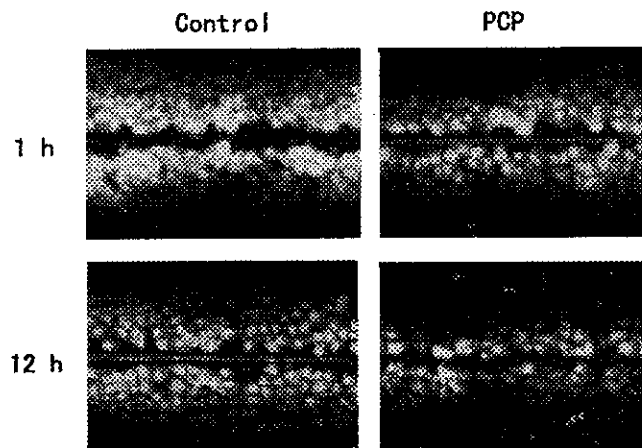


Fig. 1 Inhibition of GJIC in WB-MYC Cells after PCP-Treatment

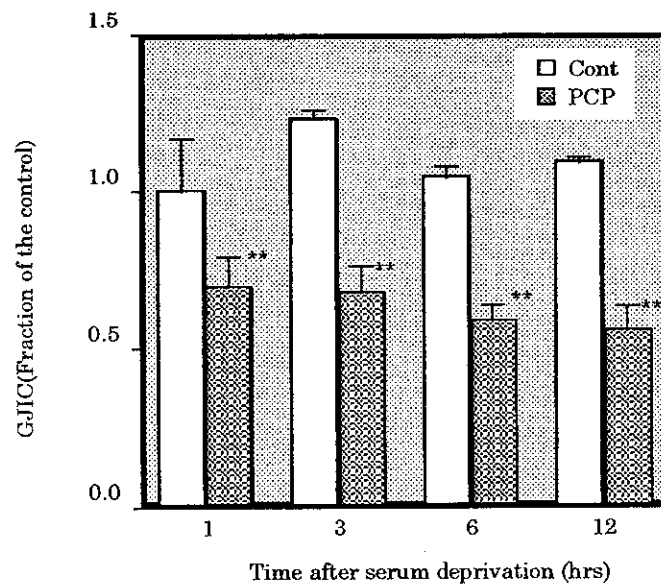
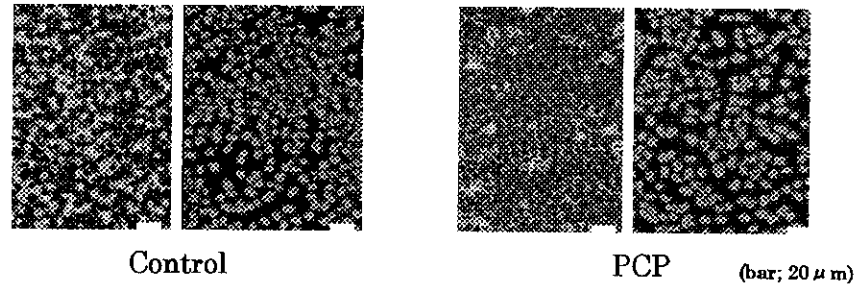


Fig. 2 Time Course of GJIC in WB-MYC Cells after PCP-Treatment

The value represents the mean \pm SD of data from 3 samples.

**p<0.01 vs control.

(A) Hoechst 33342



(B) TUNEL

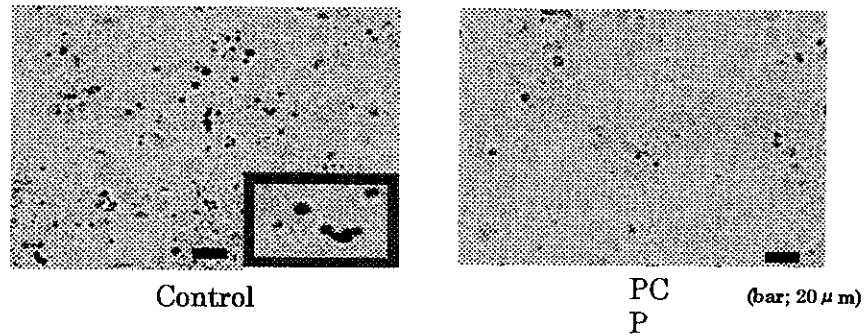


Fig 3 Inhibition of Apoptotic Changes by PCP-Treatment in WB-MYC Cells at 12 h after Serum Deprivation

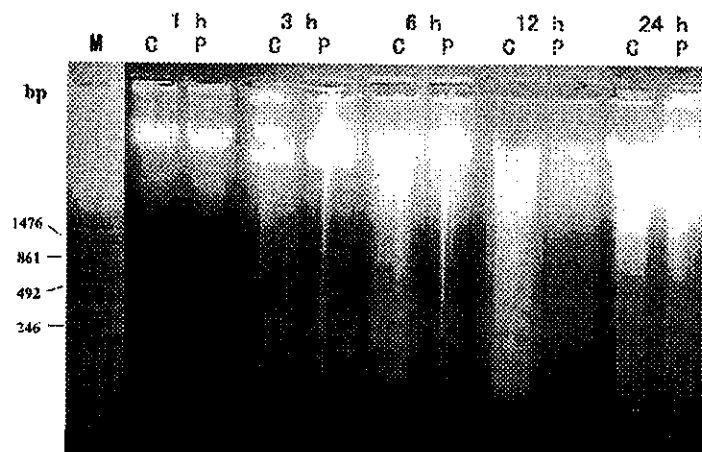


Fig. 4 Inhibition of DNA Ladder Formation by PCP in WB-MYC Cells after Serum Deprivation

Western blotting for Cx43 and Actin

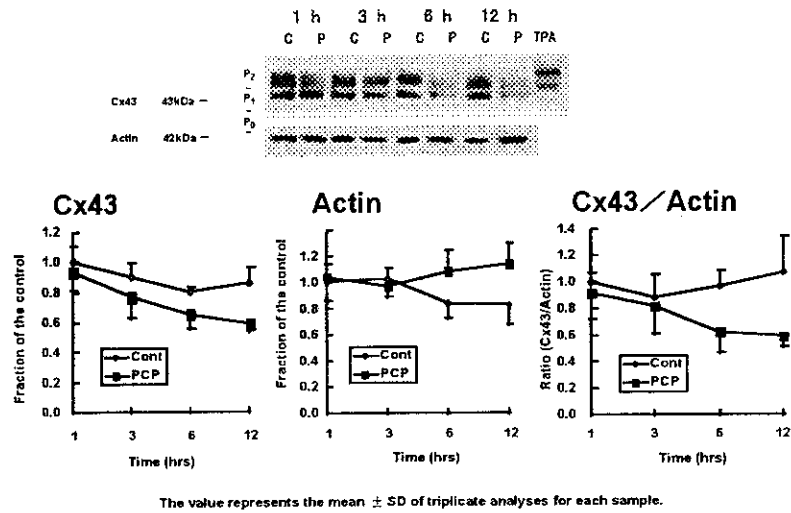


Fig. 5 Changes in Protein Level of Cx43 in the WB-MYC Cells after PCP-Treatment

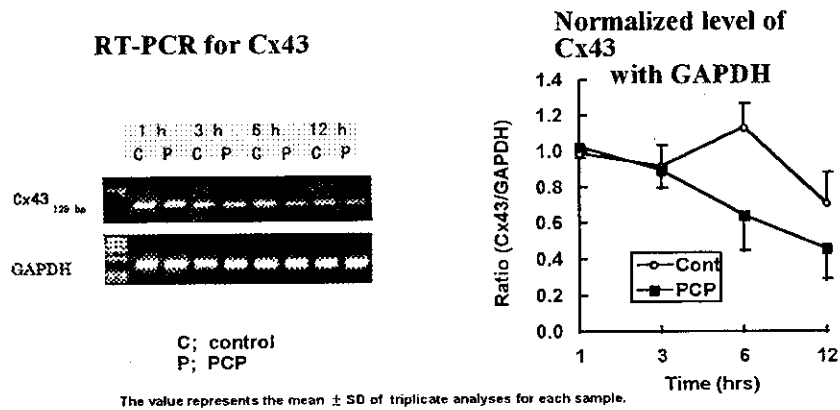


Fig. 6 Changes in mRNA Level of Cx43 in the WB-MYC Cells after PCP-Treatment

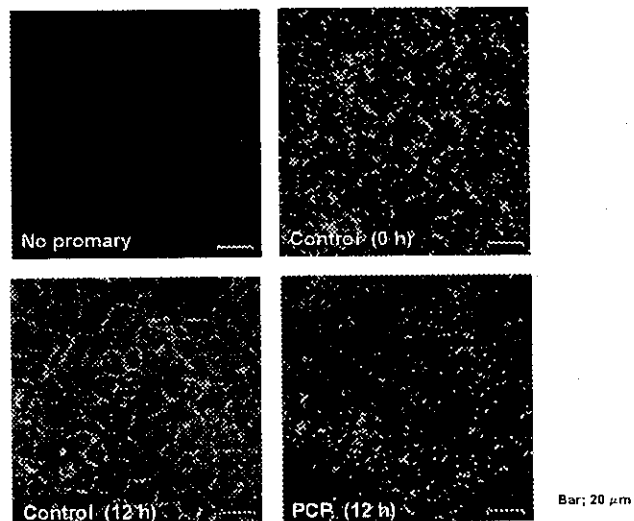


Fig. 7 Localization of Cx43 in WB-MYC Cells after PCP-Treatment

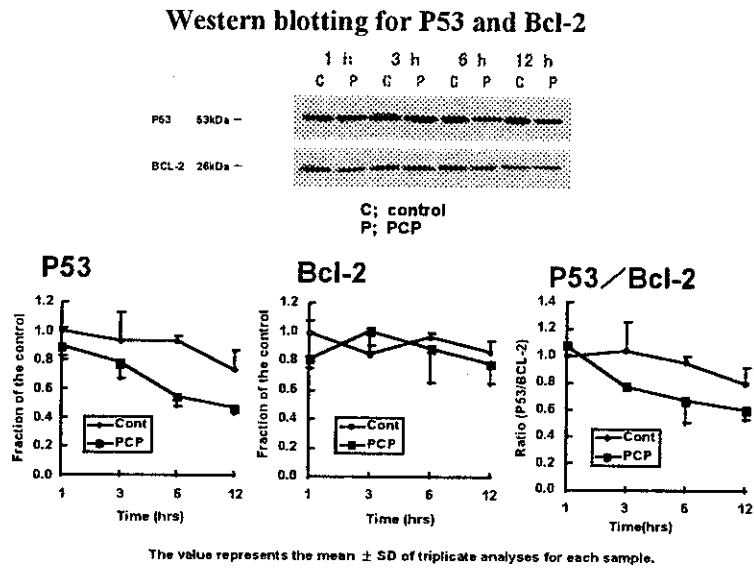


Fig. 8 Changes in Protein Level of p53 in the WB-MYC Cells after PCP-Treatment

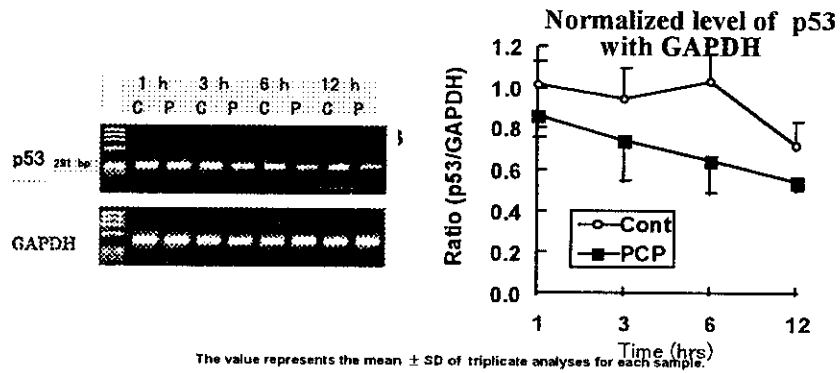


Fig. 9 Changes in mRNA Level of p53 in the WB-MYC Cells after PCP-Treatment

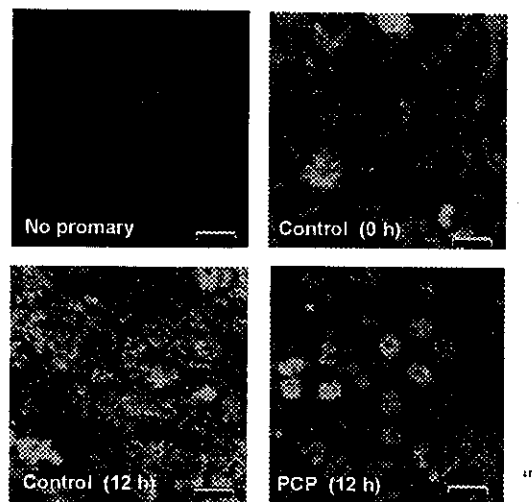


Fig. 10 Localization of P53 in WB-MYC Cells after PCP-Treatment

平成 11 年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

「食品中化学物質の相互作用等に関する調査研究」
アレルギーモデル系を用いた化学物質の複合投与に関する研究

分担研究者 小野 宏 （財）食品薬品安全センター秦野研究所 所長

研究協力者 澤田 純一、手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所、
小島 幸一、金澤 由基子、新藤 智子、古谷 真美、
松岡 千明 （財）食品薬品安全センター秦野研究所

研究要旨

農薬等食品化学物質相互のアレルギー増強作用の有無を検討するための *in vitro* モデル系を用いて、有機リン系農薬(フェントエート、PAP)、含窒素系農薬(クロロニトロフェン、CNP)及びパラコートについて、ラット、マウス由来肥満細胞、並びに臍帯血由来ヒト肥満細胞からの脱顆粒反応への影響について検討した結果、10-100 $\mu\text{g/mL}$ の CNP、および PAP 1mg/mL で、IgE 感作されたマスト細胞の抗原刺激に伴う脱顆粒促進活性が観察された。また、NC/Nga マウスを用いた *in vivo* の実験では、デキサメサゾン (DEX) 投与による免疫抑制状態およびトルエンジイソシアネート (TDI) 投与による I 型アレルギー状態における有機リン系農薬 (フェニトロチオン、FTN) 投与の影響を調べた。その結果、脾細胞培養上清中の総 IgM 濃度および IL-10 濃度に影響が認められた。以上の結果より、RBL-2H3 細胞、BMMC、CBMC からの脱顆粒反応および NC/Nga マウスを用いた種々の免疫機能の測定は、アレルギーモデルとして有用であるり、複数の化学物質の相互作用によるアレルギーの増悪作用を捉えられる可能性が示唆された。

A. 研究目的

アレルギー疾患が近年増加する傾向が認められているが、環境汚染物質の影響がその原因の一つとして疑われている。これらの環境汚染物質曝露によるアレルギー疾患増悪の有無を明らかにすることが急務とされるものの、簡便かつ適切な評価系に乏しいのが現状である。食品中には原材料が有する食品成分に加えて、多くの化学物質が種々の目的のために添加されている。従って、今後食品を摂取することによる多種類の化学物質の複合作用の起因する疾患の発生が一層問題となるものと考えられる。本研究ではアレルギーモデル系を確立するとともに、その試験法を用いて、複数の化学物質の相

互作用によるアレルギーの増悪作用を明らかにすることを目的としている。昨年度は食品とともに摂取される可能性の高い有機リン系農薬に焦点を当て、マラチオン、マラオキソンが、ラットがん化好塩基球(RBL-2H3)細胞、骨髄由来マスト細胞(BMMC)からの脱顆粒、サイトカイン産生に対して弱い増強効果を示すことが確認された。また、*invivo*のアレルギーモデルとして、NC/Ngaマウスを用いる系について、卵白アルブミンやスギ花粉、ジニトロクロロベンゼン(DNCB)の抗原感作によるアレルギーモデルを作製した。この系により、経時的IgE測定や脾臓細胞培養上清中IL-4測定、Ear Swelling Testで、抗原刺激による免疫機能の変化を捉

えられることを確認した。また、フェニトロチオンが、ジニトロクロロベンゼンによる遅延型アレルギー反応に対して弱い増強効果を示し、複数の化学物質の相互作用によるアレルギーの増悪作用を捉えられる可能性が示唆された。これらの結果を踏まえて、今年度は、昨年度の有機リン系農薬、マラチオン、マラオキソンの肥満細胞への影響を調べる実験に加えて、他の有機リン系農薬であるフェントエート(PAP)、含窒素系農薬であるクロロニトロフェン(CNP)、及びパラコートについて、DNP (ジニトロフェノール)特異的IgEで感作されたラット及びマウス肥満細胞からの抗原刺激に伴う脱顆粒反応への影響を検討し、さらにIgE感作されたヒト由来肥満細胞のIgE受容体架橋形成に伴う脱顆粒反応への影響も合わせて検討した。

またNC/Ngaマウスを用いた *in vivo* の実験では、デキサメサゾン (DEX) 投与による免疫抑制状態およびトルエンジイソシアネート (TDI) 投与によるI型アレルギー状態における有機リン系農薬 (フェニトロチオン、FTN) 投与の影響を調べた。

B. 研究方法

1. *in vitro* アレルギーモデル系の検討

(1) 試薬の調製：フェントエート(PAP)、クロロニトロフェン(CNP)、パラコート (和光純薬より購入) は、100mg/mlの濃度でDMSOまたはエタノールに溶解し、PIPES緩衝液 [10mM PIPES(pH7.4), 0.14 M NaCl, 5mM KCl, 0.1%BSA, 5.5mM glucose, 1.0mM CaCl₂, 0.6mM MgCl₂] を用いて所定の薬物濃度になるように調製し、DMSOまたはエタノール濃度は、0.5%として細胞に作用させた。

(2) 脱顆粒反応の測定：10% FCSを含むDMEMに1 x 10⁵ cells/mLの濃度に浮遊させたRBL-2H3細胞、またはIL-3存在下で1か月以上分化させたBMMC、SCF (80ng/

mL)、及びIL-6 (50ng/mL)存在下で2か月以上分化させたヒト臍帯血由来肥満細胞¹⁾を、24ウェルのマイクロタイタープレートに1mlずつ加え、37℃で16時間CO₂インキュベータ中で培養した。その際、RBL-2H3細胞、BMMCについては、DNP特異的マウスモノクローナルIgE抗体溶液5 μgを培養液に加えた。ヒト肥満細胞については、ヒトIgE (1mg/ml)、IL-4 (20ng/ml) を培養液に加えて、細胞の感作を行った。上清を除き、細胞をPIPES緩衝液で洗浄した後、各種濃度の農薬を加え、37℃で30分培養し、次いで抗原 (DNP-BSA, 10mg/ml) または、抗ヒトIgE抗体 (2 mg/ml)を加え、刺激を開始した。刺激開始後、35分後に上清を分取し、上清中に放出されたβ-hexosaminidase 活性を基質を用いて比色法にて測定し、脱顆粒の程度の指標とした。なお、細胞に残った酵素量は、細胞から0.2% Triton-X100処理で溶出させ、比色法にて測定し、IgE受容体架橋形成に伴って放出された酵素の割合(%)を計算した。

2. *in vivo* アレルギーモデル系の検討

動物は、4週齢の雄NC/Ngaマウスを使用した。DEX 0.5mg/kgを週5回、3週間経口投与することにより免疫抑制状態とした動物、0.075% TDIを週1回、3週間塗布することによりI型アレルギー状態とした動物を作製した。これらの物質を単独あるいは複合的に作用させた動物に対するFTN 6mg/kg投与の影響を検討した。群構成を表1に示した。

最終感作投与の7日後に解剖し、脾臓および胸腺重量の測定、脾細胞の分泌するIgM、サイトカイン(IL-10, IFN-γ)濃度の測定 (マウス IL-10, IFN-γ ELISA キット：バイオソース) を行った。腹部下大静脈より採血して得た血清を用いて、血清中総IgE濃度をマウス IgE ELISA キットヤマサを用いて測定した。

統計学的処理には Student's t 検定を用いた。

C. 研究結果

1. in vitro アレルギーモデル系の検討

表2に示すように、RBL-2H3細胞からの抗原刺激に伴う脱顆粒(β -hexosaminidase)遊離は、10mg/mLの paraquat 及び CNP 存在下で、農薬非存在下での脱顆粒に対して有意に上昇した。なお、paraquat は、より高濃度の100mg/mLでは、促進効果はみられなかった。PAP は、高濃度の1mg/mLで脱顆粒反応を亢進する傾向がみられた。同様の傾向は、BMMCからの抗原刺激に伴う脱顆粒反応でもみられ、paraquat 10mg/mL, CNP 10-100mg/mL, PAP 1mg/mLで増強効果が観察された(表3)。CNPについて、ヒト臍帯血由来肥満細胞からのIgE受容体架橋形成に伴う脱顆粒反応への影響を調べた結果、100mg/mlの濃度で上昇させる傾向のあることが確認された(表4)。

2. in vivo アレルギーモデル系の検討

免疫抑制物質(DEX)、アレルゲン物質(TDI)とFTNとの複合投与の影響を調べて結果をまとめて表5に示した。一般状態および体重増加に、各物質投与による影響は認められなかった。各物質投与による脾臓および胸腺重量の変化を図1に示した。DEX投与により脾臓および胸腺重量の低下が認められたが、FTN併用投与による変化は認められなかった。TDI投与によって脾臓および胸腺重量の変化は認められず、FTN併用投与による変化も認められなかった。脾細胞をmitogen(PHA)刺激のもとに7日間培養したときの培養上清中の総IgM濃度とIL-10濃度を図2に示した。DEXあるいはTDI単独投与群に比べ、DEXとTDIを併用投与することにより、IgM濃度の上昇が認められた。FTN投与により、対照群を含め、DEXおよびTDIの単独あるいは併用投与群における総IgM濃度は、FTNの複合投与により抑制される傾向が認められた。IL-10濃度は、DEXおよびTDI投与により上昇したが、FTNの併用投与による変化は認められなかった。総IgE濃度およびIFN- γ 濃度はすべて検出限界以下であった。

D. 考察

1. in vitro アレルギーモデル系の検討

昨年度までの有機リン系農薬フェニトロチオン、馬拉チオンのRBL-2H3細胞への影響について検討を行った研究に続いて今年度は、含窒素系農薬についても検討を行った。今回用いた有機リン系農薬PAP、含窒素系農薬CNP及びパラコートは、いずれも、ラット腹腔肥満細胞からの抗原刺激に伴う脱顆粒反応を促進することが、佐藤らにより報告されている農薬²⁾であるが、今回培養肥満細胞であるRBL-2H3細胞、マウスBMMCでも特定の濃度で、脱顆粒反応の促進することが観察された。CNPについては、ヒト培養肥満細胞からの脱顆粒反応も促進する傾向がみられた。それぞれの農薬によるマスト細胞からの脱顆粒促進のメカニズムについては、不明であるが、CNPに関しては、ジフェニルI-*tert*型の農薬であり、ジフェニルI-*tert*型構造を持つものが、不飽和脂肪酸の光酸化型過酸化を引き起こし、膜の破壊を起こすという報告もあり、これらの作用が、脱顆粒反応の亢進につながる可能性も考えられる。次年度は、他の含窒素系でジフェニルI-*tert*型構造を持つ他の農薬についても、培養マスト細胞からの脱顆粒への影響を調べ、構造活性相関についても議論することを計画している。また、細胞の作用機構が違ふと思われる有機リン系農薬FTNと、含窒素系農薬CNPの併用効果による脱顆粒反応への影響について調べ、動物のアレルギー評価系実験で得られたデータとの比較検討を行いたいと考えている。

2. in vivo アレルギーモデル系の検討

今回用いたNC/Ngaマウス(NCマウス)は、免疫系の感受性が高い系統であり、化学物質の複合投与による免疫系の微妙な変化を捉えるために有用な系統であると考えられる。今年度はDEX投与による