

しているが、中でも第 I 相反応における Cytochrome P450 は薬物代謝反応の約 8 割に関与するといわれ⁵⁾、多くの分子種を有し、組織に分布する。薬物代謝は遺伝、年齢、性、人種、種差、妊娠や様々な環境因子に影響を受ける⁵⁾。Cytochrome P450 についても様々な要因によって発現あるいは活性が異なるという報告がある。He.らが妊娠ラットの肝臓における Cytochrome P450 の発現動態を検討した結果、CYP1A1、2B1、2B2、2C6、2E1、4A1 が非妊娠ラットと比較して、妊娠中期及び後期で有意な低下を示し²⁾、さらに哺育 0 日 (出産当日) でも低下を示すが、哺育 14 日頃には増加を認め、非妊娠動物との間に有意差は認められなかった³⁾。また Walker. らは、ヒトの妊娠期における CYP1A2 活性及び発現の低下について、妊娠ラットをモデルとして用いて検討したところ、妊娠中期及び後期で CYP1A2 活性とタンパク発現は有意な低下を示し、さらに後期では遺伝子発現量も有意に低下することを報告した⁶⁾。このように妊娠期では、薬物代謝酵素活性及び発現が変化し、化学物質の作用に影響を及ぼすことが示唆されている。

我々はこれまでに若齢及び成熟雌性ラット、妊娠ラットを用いたパラチオン及びメタミドホスの単剤あるいは複合反復経口投与試験を実施した。その結果、単剤よりも複合投与で毒性は強く、また若齢、成熟期、妊娠ラットでは発現する毒性はライフステージにより異なり、特に妊娠期で増強することを確認した^{7),8),9)}。そこで本試験では、パラチオンやクロルピリホスなどの有機リン系殺虫剤の暴露によって活性化される薬物代謝酵素⁴⁾のうち、CYP1A、CYP3A、CYP2C 活性について肝ミクロソームを用いて検討

した。その結果、CYP1A は成熟期で有意に高く、妊娠後期では有意な低下を示した。また、CYP3A は若齢期で非常に高い活性を示し、妊娠中期及び後期では有意な低下を示した。これらの結果は、CYP1A 及び 3A は妊娠期間中に低下するという報告^{2),3),6)}と一致する。またラットにおける CYP3A 発現は、生後 4-15 日齢で低く、20 日齢で高い値を示す。その後、加齢とともに低下し、生後 4 ヶ月齢の雌では雄よりも非常に低い値を示した¹⁰⁾。CYP3A はステロイド代謝に関与する⁵⁾。そして、加齢に伴うステロイドあるいはステロイド受容体の低下が、CYP3A 発現を低下^{5),10)}させることを示唆している。女性ではプロゲステロン (PG) の血中濃度の高い青年期では、CYP3A4 の発現量が高いとされている⁵⁾。妊娠を維持するために重要な PG は胎盤や妊娠黄体から多く分泌される。本試験を含め、CYP3A 発現量が妊娠期に低下を示すことは、CYP3A による代謝活性を抑制し、妊娠を維持するという生体防御反応と推察した。CYP2C の妊娠期間中におけるタンパク発現について、He.らは妊娠中期及び後期の順に非妊娠動物と比較して低下する²⁾ことを報告し、一方、Dickmann.らの報告では妊娠 9 及び 19 日における Cyp2c の mRNA 及びタンパク発現量は非妊娠動物との間に統計学的有意差は認められなかった¹¹⁾。本試験における CYP2C 活性は、成熟期及び妊娠中期、後期で若齢期よりも有意に高いが、これらの間に有意差は認められなかった。

有機リン系農薬は P450 でオクソン体に分解された後、有機リン酸塩を加水分解する Paraoxonase 1 (PON1) で代謝される。PON1 活性と有機リン剤やカーバメート剤の暴露によって活性が抑制されるコリンエ

ステラーゼ (ChE) は、発育に伴い発現量が変化することが知られている。離乳前の動物が有機リン剤に暴露された場合、強い感受性を示す。これは代謝能力が低いことによるものであると考えられているが、離乳前の動物では潜在的な酵素合成率が高く、回復が早いとされている。これは新生児及び若齢期では CYP450 と PON1 代謝能力が大人よりも低いためであると示唆されている¹²⁾。また、PON1 は estradiol (E2) で調整され¹³⁾、有機リン・有機硫黄系殺虫剤である malathion と estradiol-17 β あるいは PG を投与すると、estradiol-17 β は malathion による AChE 活性低下を増強し、PG は抑制することが報告されている¹⁴⁾。ヒトでは一般に月経前あるいは妊娠中に ChE 活性が低下するといわれている。特に、妊娠を維持するために PG あるいはエストロゲン (EG) が多く分泌されるため、薬物代謝酵素の発現量は変化する。妊娠期の動物では、PON1 活性は低く¹⁵⁾、またパラチオンを妊娠マウスに投与すると非妊娠マウスよりも脳及び血清 ChE 活性が低下することが報告されている¹⁶⁾。これは、妊娠期では肝機能、ChE 活性、血清タンパク結合などが変化するためと示唆されている¹⁶⁾。本試験では、血清 ChE 活性は若齢期で最も低く、成熟期、妊娠後期、妊娠中期の順に高かった。若齢期における ChE 活性の低い値は、この時期では代謝酵素合成率が低いためと推察する。一方、妊娠期においても高い ChE 活性を示し、成熟期との間に統計学的有意差は認められなかった。さらに、肝臓における PON1 活性については、妊娠後期で最も低く、成熟期で最も高かった。また成熟期と妊娠中期では統計学的有意差は認められなかった。

本試験では CYP1A 及び 3A 活性の妊娠中

期と後期の有意な低下と、PON1 活性の妊娠後期における有意な低下を認める一方、CYP2C 及び ChE 活性は妊娠中期及び後期では明らかな低下は認められなかった。しかし、これらの結果は、薬物代謝酵素活性が加齢や妊娠によって変化することを示唆している。

2. 酸化ストレス及び除去因子

身体的・精神的ストレスによって分泌される Corticosterone (CORT) 及び抗酸化因子であるグルタチオン量を血清または肝臓を用いて測定した。いずれも加齢や発現する組織によって変化する。

CORT は出生直後、ストレス反応減少期であるため、一般的にストレスによる上昇が起きにくいとされている。しかし、妊娠期では経時的に増加し、出産直後では妊娠初期の 20 倍以上に上昇するが、出産後 5 日までに正常範囲内に低下する¹⁷⁾。

また妊娠期における肝臓及び胎盤におけるグルタチオン (GSH) 活性を測定した報告によると、肝臓の GSH は妊娠 9 日 (GD9) で最大で、その後、徐々に減少する。胎盤の GSH 活性は、GD14 よりも GD18 で低い値を示し、また GD9 及び GD10 の卵黄嚢では胎児の肝臓よりも高い値を示すと報告されている¹⁸⁾。妊娠期の経時的な CORT の上昇は、分娩に伴うホルモン分泌によるものと考えられ¹⁷⁾、GSH は外的因子から胎児を保護するために妊娠初期から中期に肝臓、胎盤及び卵黄嚢で高い値を示すと考察される¹⁸⁾。本試験における血清 CORT は妊娠中期で最も高い値を示し、妊娠後期、成熟期、若齢期の順に低い値を示した。肝臓の GSH は各測定時点で高い値を示すが、酸化 GSH は若齢期で最も低い値を示した。これは血清 CORT

と同様にストレスに対する感受性が低い
ためと考えられた。

E. 結論

妊娠ラットでは、有機リン系農薬の代謝に
関与する PON1、薬物代謝酵素の CYP1A 及
び 3A は低下し、ストレス関連因子の CORT
は逆に高値を示した。このことから、妊娠期
における著しい生理学的変化は薬物代謝酵
素やストレス因子の活性あるいは分泌量に
影響を及ぼすものと考えられた。さらに、こ
うした変化は、生体の薬物感受性を高め、毒
性発現の増強に繋がるものと推察した。

今後の研究では、有機リン剤を単剤ある
いは複合暴露をした若齢期、成熟期、妊娠中期
及び後期の雌ラットにおける薬物代謝酵素、
有機リン系農薬標的酵素活性を測定する。さ
らに、妊娠期の雌動物に薬物代謝酵素誘導剤
等を投与し、酵素活性の変化が、有機リン系
農薬暴露後の毒性発現にどのような影響を
及ぼすかについて検討する。

F. 参考文献

- 1) 新版トキシコロジー、朝倉書店 (2009
年)
- 2) He XJ, Ejiri N, Nakayama H and Doi
K. (2005) Effects of pregnancy on CYPs
protein expression in rat liver. *Exp.
Mol. Pathol.* 78: 64-70.
- 3) He XJ, Ejiri N, Nakayama H and Doi
K. (2005) Changes in cytochrome P450
isozymes (CYPs) protein levels during
lactation in rat liver. *Exp. Mol. Pathol.*
79: 224-228.
- 4) Foxenberg RJ, McGarrigle BP, Knaak
JB, Kostyniak PJ and Olson JR. (2007)
Human Hepatic Cytochrome
P450-Specific Metabolism of Parathion
and Chlorpyrifos. *Drug. Metab. Dispos.*
35(2): 189-193.
- 5) 薬物代謝学 第2版 加藤隆一、鎌滝哲也
編、東京化学同人 (2000年)
- 6) Walker AA, Dickmann L and
Isoherranen N. (2011) Pregnancy
Decrease Rat CYP1A2 Activity and
Expression. *Drug. Metab. Dispos.*
39(1):4-7.
- 7) 財団法人残留農薬研究所 (2010):厚生労
働科学研究費補助金 (食品の安全性高度
化推進研究事業) 食品中の複数の化学物
質による神経・免疫毒性に関する研究 平
成 21 年度分担研究報告書『若齢ラットに
おける有機リン系農薬パラチオン及びメ
タミドホスの複合暴露影響』
- 8) 財団法人残留農薬研究所 (2011):厚生労
働科学研究費補助金 (食品の安全性高度
化推進研究事業) 食品中の複数の化学物
質による神経・免疫毒性に関する研究 平
成 23 年度分担研究報告書『ラットにおけ
るパラチオンとメタミドホスの複合経口
投与による発達神経毒性』
- 9) 一般財団法人残留農薬研究所 (2012):厚
生労働科学研究費補助金 (食品の安全性
高度化推進研究事業) 食品中の複数の化

- 学物質による神経・免疫毒性に関する研究 平成 24 年度分担研究報告書『妊娠あるいは成熟雌ラットに対するパラチオン及びメタミドホス複合暴露影響』
- 10) Lee PC and Werlin SL. (1995) The induction of hepatic cytochrome P450 3A in rats: Effects of age. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 210: 134-139.
- 11) Dickmann, LJ, Tay, S, Senn TD, Zhang H, Visone A, Unadkat JD, Hebert MF and Isoherranen N. (2008) Change in maternal liver Cyp2c and Cyp2d expression and activity during rat pregnancy. *Biochem. Pharmacol.* 15; 75(8): 1677-1687.
- 12) Timchalk C, Poet TS and Kousba AA (2006) Age-dependent pharmacokinetic and pharmacodynamics response in preweanling rats following oral exposure to the organophosphorus insecticide chlorpyrifos. *Toxicology* 220: 13-25.
- 13) Ahmad A and Scott JE. (2010) Estradiol enhances cell-associated paraoxonase 1 (PON1) activity in vitro without altering PON1 expression. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 397(3): 441-446.
- 14) Mathews MS. and Devi KS. (1993) Effect of malathion, estradiol-17-beta and progesterone on ascorbic acid metabolism in prenatal rats and their pups. *Vet. Hum. Toxicol.* 35(1): 6-10.
- 15) Fortin MC, Aleksunes LM and Richardson JR. (2013) Alteration of expression of pesticide-metabolizing enzymes in pregnant mice: potential role in the increased vulnerability of the developing brain. *Drug Metab. Dispos.* 41: 326-331.
- 16) Weitman SD., Vodcnik MJ. and Lech JJ. (1983) Influence of pregnancy on parathion toxicity and disposition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 71: 215-224.
- 17) Noguchi M. (1988) Changes in human serum corticosterone and cortisol during pregnancy, Labor and delivery. *Nihon sanko fujinka gakkai zasshi.* 40(1): 14-20.
- 18) Di llio C, Tibomi GM, Sacchetta P, Angelucci S, Bucciarelli T, Bellati U and Aceto A. (1995) Time-dependent and tissue-specific variations of glutathione transferase activity during gestation in the mouse. *Mech. Ageing. Dev.* 78(1): 47-62.
- G. 研究発表
1. 論文発表
なし
2. 学会発表
- 1) 妊娠ラットに対するパラチオン及びメ

タミドホス複合暴露影響：元村 淳子、首藤 康文、藤江 秀彰、小松 豊、林 宏一、大塚 亮一、山口 悟、小嶋 五百合、相馬 克実、高橋 尚史、吉田 敏則、坂 真智子、青山 博昭、原田 孝則 第 156 回 日本獣医学会学術集会 (岐阜、2013)

H. 知的財産権の出願・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

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
平成 25 年度分担研究報告書

食品中の複数の化学物質による健康影響に関する調査研究

分担研究課題：食品中残留農薬の複合暴露影響に関する研究

2. 複合暴露による発達免疫毒性及び各種免疫疾患に対する影響

研究分担者： 原田孝則 （一財）残留農薬研究所 毒性部
研究協力者： 西野里沙子 （一財）残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室
福山朋季 （一財）残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室
渡部優子 （一財）残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室
黒澤好 （一財）残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室
小坂忠司 （一財）残留農薬研究所 試験事業部

研究要旨

我々は、これまで異なる 2 種類の農薬の成獣に対する複合暴露による免疫毒性影響を調査し、有用な結果を得てきた。平成 25 年度以降では、動物のライフステージにおける特に発達期の影響に着目し、農薬暴露が吸入アレルギーに及ぼす影響について調査することを主眼としている。初年度の平成 25 年度では、①免疫毒性評価候補農薬の選定、②マウスを用いた吸入アレルギー実験系の確立を目的に実験を行った。①候補農薬の選定には、有機塩素剤（メトキシクロル、 γ -BHC）、有機リン剤（パラチオン、DDVP）及びピレスロイド剤（レスメトリン、テトラメトリンを用い、ヒト T 細胞性急性白血病由来細胞（Jurkat T 細胞）に対するアポトーシス誘発能及び Balb/c マウスの羊赤血球抗原特異的 IgM 抗体産生能を調査した。②吸入アレルギー実験系の確立には、8 週齢の Balb/c マウス及び吸入アレルギー性を持つ 2.5 μm 以下の微小粒子状物質（トリメリト酸無水物、TMA）を用い、TMA を 3 週間経皮感作後に 3 日間吸入惹起する事で血中、肺胞洗浄液中、肺門リンパ節中に誘導される IgE、サイトカイン、ケモカイン及び免疫担当細胞数を測定した。

その結果、①免疫毒性評価候補農薬の選定実験では、全ての剤でアポトーシス誘発能が増大し、抗原特異的 IgM 抗体産生能が減少し、免疫毒性影響が強く示唆された。②マウスを用いた吸入アレルギー実験系の確立では、TMA を感作及び惹起した群で血中、肺胞洗浄液中、肺門リンパ節中に誘導される IgE、サイトカイン、ケモカイン及び免疫担当細胞数が、無処置群あるいは感作のみの実施群と比較して有意に増加し、吸入アレルギーが適切に誘導されていることが示唆された。

A. 研究目的

食品中に残存する農薬の安全性について、単剤における評価は、登録時に純分になされており、問題とはならない。しかし、農薬の複合毒性については、社会的関心は高いものの、実験上および評価上の困難性などの理由から毒性情報の蓄積が不足しており、特に近年懸念されている食品中残留農薬の乳幼児・子供への累積暴露影響に関しては不明な点が多く、今後の研究課題である。従って、これらの課題を解明することは社会的かつ医学的にも有意義なことと考えられる。我々の実験班ではこれまでに、有機塩素剤や有機リン剤などの殺虫剤を対象に、食品中の残留農薬が複合的に反復暴露された場合の免疫系への影響を実験動物で調査し、ヒト健康影響へのリスク評価に必要な基礎的毒性情報を収集してきた。

平成 25 年度の本研究では、免疫系への影響が示唆されている有機塩素系、有機リン系およびピレスロイド系農薬を対象に、様々なライフステージに反復経口投与し、その際の吸入アレルギー疾患に及ぼす影響を調査した。

B. 研究方法

①免疫毒性評価候補農薬の選定

有機塩素系（メトキシクロル、 γ -BHC）、有機リン系（パラチオン、DDVP）ないしはピレスロイド系（レスメトリン、テトラメトリン）農薬を、ヒト T 細胞性急性白血病由来細胞（Jurkat T 細胞）ないしは 7 週齢の雌性 Balb/c マウスに 7 日間反復経口投与し、アポトーシス誘発能ないしは羊赤血球抗原特異的 IgM 抗体産生能を調査した。

1. 被験物質

使用した被験物質情報を下記に示す。供給元は全て和光純薬工業株式会社（大阪府）であった。

名称： メトキシクロル標準品
純度： 97.0%以上

分子量： 345.65
外観： 白色結晶性粉末
保管条件： 冷蔵暗所

名称： γ -BHC 標準品
純度： 99.0%以上
分子量： 290.83
外観： 白色結晶性粉末
保管条件： 冷蔵暗所

名称： レスメトリン標準品
純度： 98.0%以上
分子量： 338.44
外観： 白色結晶性粉末
保管条件： 冷蔵暗所

名称： テトラメトリン標準品
純度： 98.0%以上
分子量： 331.41
外観： 白色結晶性粉末
保管条件： 冷蔵暗所

名称： DDVP 標準品
純度： 98.0%
分子量： 220.98
外観： 無色透明の液体
保管条件： 冷凍暗所

名称： パラチオン標準品
純度： 97.0%以上
分子量： 291.26
外観： 薄い黄色～黄赤色、透明の液体
保管条件： 冷蔵暗所

2. 供試細胞株および細胞培養条件

リンパ球のアポトーシス誘発確認にヒト T 細胞性白血病培養細胞（Jurkat E6.1、DS ファーマバイオメディカル株式会社、大阪府）を使用した。供試細胞は、37°C、高湿度、5%二酸化炭素濃度を維持する炭酸ガス恒温培養装置中で 75 cm² 培養フラスコを用いて無菌的に培養した。基本培地は

RPMI1640 (GIBCO®, Invitrogen Corp., California, U.S.A.) に非働化したウシ胎児血清 (GIBCO®) 10%加えて作成した。細胞濃度は血球計算版を用いて測定した。

3. Jurkat T細胞を用いたアポトーシス誘発能測定試験

全ての被験物質で 0、10、100 および 1000 nmol の 4 濃度を実験に用いた。全ての被験物質は水に不溶であるため、アセトンに溶解して用いた。被験物質溶液は用時に使用する最高濃度 (1000 nmol) を調製し、それより低濃度の溶液は段階希釈により調製した。なお、被験物質溶液添加後の培地中におけるアセトンの最終濃度は 1% とした。上記濃度の被験物質ないし溶媒を添加した培地を 24 穴マイクロプレートに各濃度 6 穴ずつ 800 μ L ずつ添加し、対数増殖期にある細胞を培地で 1×10^6 個/mL に調整し、100 μ L ずつ添加後 6 時間のカスパーゼ 3/7 活性を Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega KK. 東京都) および Annexin V 陽性細胞数を Annexin V : FITC Apoptosis Detection Kit I (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社、東京都) を用いて測定した。

4. 試験動物

日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センター (神奈川県) で生産された近交系 SPF マウス (Balb/cAnNCrIj) の雌動物を用いた。Balb/c マウスは免疫・アレルギー研究での使用に適している系統動物である。試験動物は 6 週齢にて購入し、6~8 日間試験環境に馴化した後、7 週齢で試験に用いた。馴化期間中毎日一般状態を観察した。動物は温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、換気回数 10 回以上/時間 (オールフレッシュエア方式)、照明時間 12 時間/日 (午前 7 時点灯、午後 7 時消灯) に設定された動物飼育室で飼育した。経口投与開始日に全ての動物の体重を測定し、体重値に基づいた層別無作為抽出法により群分けを実施した。基礎飼料には保証飼料 MF 固型 (オ

リエントル酵母工業株式会社) を用い、ステンレス鋼製バスケット型給餌器に入れて動物に自由に摂取させた。飲料水は、市上水 (常総市) をプラスチック製給水びんに入れて動物に自由に摂取させた。

5. 試験群

全ての被験物質で経口経路にて毒性および死亡の起こらない用量を最高用量として選択し、それぞれ公比 3 にて、メトキシクロル、レスメトリンおよびテトラメトリンは 30、100、300 mg/kg、 γ -BHC は 1.5、5、15 mg/kg、パラチオンは 0.15、0.5、1.5 mg/kg、DDVP は 2、6、20 mg/kg の各 3 用量を設定した。

6. 被験物質投与液の調製

初回投与直前に調製した。被験物質は純度補正せずに用い、投与容量は 10 mL/kg とした。目標濃度となるよう、コーンオイルを用いて調製し、必要に応じて超音波処理やマグネチックスターラー等での混合を実施した。投与液の調製時に均一性を目視により確認する。また、投与終了時の残余液について、調製直後と比べて変化していないことを目視にて確認してから廃棄した。各用量の投与液は小分けし、冷蔵・遮光 (4°C) 条件下にて保存した。投与液は投与直前に室温に戻して使用した。

7. 被験物質の投与

被験物質を 7 日間にわたって強制経口投与した。経口による暴露はヒトで予想される本被験物質の主たる暴露経路に一致する。強制経口投与方法は反復経口投与毒性試験で通常用いられている方法である。被験物質の投与液をスターラー等で攪拌して均質な状態に保ち、注射筒内に吸い上げ、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

8. 観察および検査項目

8.1. 死亡および臨床症状の観察

全動物について、投与期間中少なくとも 1

日 1 回、臨床症状、瀕死状態ないし死亡の有無をケージサイドから観察した。

8.2. 剖検および臓器重量

全例をイソフルラン吸入麻酔下で後大静脈および腹大動脈を切断し放血により安楽死させ、胸腺および脾臓を採取した。胸腺は重量を測定した。脾臓は測定時まで冷蔵 PBS 中で保存した。

8.3. 免疫グロブリン抗体価の測定

採血および剖検の 5 日前に、 6×10^7 個のヒツジ赤血球細胞 (SRBC、Seep Red Blood Cell、(株)日本生物材料センター、東京都) をマウスに 0.2 mL 静脈内投与した。採血後に血清を分離し、測定時まで凍結保存 (-70°C 以下) した。

血清中のヒツジ赤血球特異的免疫グロブリン M クラス抗体 (抗ヒツジ赤血球免疫グロブリン M 抗体) の抗体価を Temple ら²⁾ の方法に従い、酵素免疫測定法 (ELISA) で測定した。測定には BD OptEIA™ Reagent Set B (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を使用した。まず、ヒツジ赤血球を溶解した 0.1M の炭酸水素ナトリウム水溶液 (pH 9.5) を抗原液として、マイクロプレートの各ウェルに 100 μ L ずつ入れ、1 時間室温で培養後、冷蔵庫にて一晚静置した。翌日 200 μ L のアッセイ希釈液 (10% 牛胎児血清添加リン酸緩衝液) を用い 2 時間室温で培養してブロッキングを行った後、各血清試料の希釈液を各ウェルに 100 μ L ずつ入れ、2 時間室温で培養した。各個体の血清はアッセイ希釈液を用い 4 倍希釈で 7 段階希釈した (4 ~ 16384 倍希釈)。次に 15000 倍希釈のアフィニティ精製ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス IgM 抗体 (Rockland Inc., PA, USA) を各ウェルに 100 μ L ずつ入れ、2 時間室温で培養した。発色液 (3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine) を各ウェルに 100 μ L ずつ入れ、20 分間室温に静置後、50 μ L の反応停止液 (1M リン酸) を添加して反応を停止した。マイクロ

プレートリーダー (モレキュラーデバイス株式会社、大阪府) を用い 450 nm のフィルターでマイクロプレートの吸光度を測定した。なお、コーティングの段階から発色溶液注入の各段階まで洗浄液 (0.05% Tween20 添加リン酸緩衝液) を用いて 2 ~ 5 回洗浄した。抗体価は、吸光度が 0.5 を示す血清の希釈倍率をもって表した。

8.4. 免疫グロブリン抗体反応の測定

採取した脾臓は、時計皿に設置したステンレスメッシュ上に置き、5% FBS (Fetal bovine serum) - RPMI 1640 Medium (RPMI、インビトロゲン株式会社) に浸した。ステンレスメッシュ上でピンセット等を用いて圧迫することにより脾臓をほぐし、細胞懸濁液を得た。脾臓中のヒツジ赤血球特異的免疫グロブリン M クラス抗体 (抗ヒツジ赤血球免疫グロブリン M 抗体) の抗体反応は、Plaque forming cell (PFC) 法³⁾により測定した。原則として、反応液中の各終濃度が、細胞懸濁液は 10%、SRBC は 1%、乾燥補体 (デンカ生研株式会社、東京都) 調製液が 10% となるように調製し、反応液を 40 μ L ずつ Cunningham チャンバーに添加した。チャンバーをパラフィルムで密封し、CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) で 90 分間培養した。培養後にチャンバーのパラフィルムをはがし、水滴をキムワイプでふき取り実体顕微鏡にセットした。プラークを標識しながらコロニーカウンターでプラーク数を計測した。脾臓細胞 1×10^6 個あたりと脾臓あたりのプラーク数を算出した。

8.5. 胚中心陽性 B 細胞数測定

単離した脾臓細胞における Germinal center 陽性 B 細胞数測定をフローサイトメトリー法により行った。一定量 (50 μ L) の細胞を 12 \times 75-mm のポリスチレンチューブに採取し、Mouse BD Fc Block™ (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を 1 μ g

添加し、氷冷下にて約 5 分培養した。培養後に染色液を各細胞に 100 μ L ずつ添加、攪拌し氷冷・遮光下で約 30 分培養した。染色液として FITC 標識 PNA 抗体および PerCP Cy5.5 標識マウス CD19 抗体（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）を用いた。抗体の力価（抗体添付のデータシートを参照）に基づき 1 チューブあたり 1×10^6 個リンパ球の染色が可能となるように、5%FBS-RPMIにて調製した。培養後、1 mL の 5%FBS-RPMI を添加し、遠心分離（4°C、1300 rpm、5 分）した。上清を捨てた後、500 μ L の PBS 添付し、攪拌後測定に供した。測定にはフローサイトメーター（FACSVerse、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）および解析ソフト（FACSuite、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）を用いた。測定時には 20000 個の細胞を取り込んだ。

8.6. サイトカイン産生量測定：

無菌化で調製した脾臓細胞 5×10^5 個について、48 穴培養プレート上で CD3 および CD28 抗体（Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28、GIBCO、東京）と共に CO₂ インキュベーター（37°C、5%CO₂）で 24 時間共培養し、細胞上清中のサイトカイン産生量（インターロイキン 6、IL6）を測定した。

9. 有意差検定

各検査項目について、対照群と各被験物質投与群間の統計学的有意差の有無を危険率 5 および 1%レベルで解析した。

最初に各データについて Bartlett の等分散検定を行なった。この検定によって全用量群における分散が均一であるという判定が出た場合には、一元配置分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた時は、Dunnett の多重比較法を実施して対照群と各投与群間における有意差の有無を判定した。Bartlett の等分散検定で各群の分散が

等しくないという判定が出た場合は、Kruskal-Wallis のノンパラメトリックな分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた時は、Dunnett 型の多重比較法を用いて対照群と各投与群間における平均順位の有意差の有無を判定した。

②吸入アレルギー実験系の確立

Balb/c マウス雌および吸入アレルギー性を持つ 2.5 μ m 以下の微小粒子状物質（トリメリト酸無水物、TMA）を用いて、吸入アレルギー検出モデルを作成した。

1. 被験物質

名称： トリメリト酸無水物
(Trimellitic anhydride)

純度： 97.0%以上

分子量： 192.13

CAS 番号： 552-30-7

外観： 白色 ~ わずかにうすい黄色

供給元： 和光純薬工業株式会社

保管条件： 室温暗所

2. 試験動物

日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センター（神奈川県）で生産された近交系 SPF マウス (Balb/cAnNCrI/Crlj) の雌動物を用いた。Balb/c マウスは免疫・アレルギー研究での使用に適している系統動物である。試験動物は 7 週齢にて購入し、6 日間試験環境に馴化した後、8 週齢で試験に用いた。馴化期間中毎日一般状態を観察した。動物は温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、換気回数 10 回以上/時間（オールフレッシュエアー方式）、照明時間 12 時間/日（午前 7 時点灯、午後 7 時消灯）に設定された動物飼育室で飼育した。経皮感作投与開始日に全ての動物の体重を測定し、体重値に基づいた層別無作為抽出法により群分けを実施した。基礎飼料には保証飼料 MF 固型（オリエンタル酵母工業株式会社）を用い、ステンレス鋼製バスケット型給餌器に入れ

て動物に自由に摂取させた。飲料水は、市上水（常総市）をプラスチック製給水びんに入れて動物に自由に摂取させた。

3. 試験群

TMA は経皮感作濃度として 1%、吸入惹起濃度として 0.5 mg/L を選択し、投与を行った。上記濃度は、経皮および吸入経路にて毒性、皮膚刺激性および死亡の起こらない濃度である。試験群として、無処置群、感作のみ TMA 投与群、感作および惹起ともに TMA を投与する 3 群を設定した。

4. 被験物質投与液の調製

経皮感作用の TMA 溶液は用時調製とした。純度換算は行わず、所定量の被験物質を秤量した後、アセトン/オリーブオイル（アセトン（和光純薬工業株式会社）：オリーブオイル（和光純薬工業株式会社）=4:1）にて溶解させた。対照群の投与液はアセトン/オリーブオイルとした。

吸入惹起用の TMA は暴露前に平均粒子径が 2 μm 以下となるように粉碎処理を行い、吸入ダストとして暴露を行った。

5. 被験物質投与方法およびスケジュール

経皮感作は被験物質投与液をスターラー等で攪拌して均質な状態に保ち、ピペットを用いて左右の耳介後方に 25 μL ずつ解放経皮投与した。吸入暴露は、投与毎に同一チャンバー内で 30 分の連続暴露を行った。動物の鼻部のみが暴露チャンバー内に露出されるようにマウスを個別にアニマルホルダー（トキワ科学器械株式会社、東京都）に収容し、空気流動型鼻部暴露チャンバー（気積 31.2 L、トキワ科学器械株式会社）に装着した。暴露システムの概要および動物の装着部位を図 1 に示した。被験物質等の発生は、空気流動型鼻部暴露チャンバーおよびターンテーブル型ダストフィーダー（DF-3、ターンテーブル TA32、柴田科学株式会社、東京都）を用いて行った。発生用空気は、コンプレッサー（ES4AD-5、

KOBELCO、東京都）で発生させ、その後超高性能フィルター（F3000-10-Y、CKD 株式会社、愛知県）で清浄化した圧搾空気をダストフィーダーに供給した。暴露チャンバーへの空気供給は、ダストフィーダーのエジェクター流量が 20 L/min になるように調整することで行った。排気はブロアー（TFO-K4P、株式会社日立製作所、東京都）で行い、バグフィルター、ヘパフィルターおよび活性炭フィルターからなる排気処理装置（トキワ科学器械株式会社）で浄化した後大気中に放出した。ダストフィーダーのエジェクター流量が 20 L/min に保たれていることを暴露中確認した。上記条件下では、暴露チャンバー内に被験物質等ダストが安定的に充填するまでの時間（ t_{95} ）は 5 分以内と算出されるため暴露の起点は暴露開始時とした。

投与スケジュールは図 2 に示した。

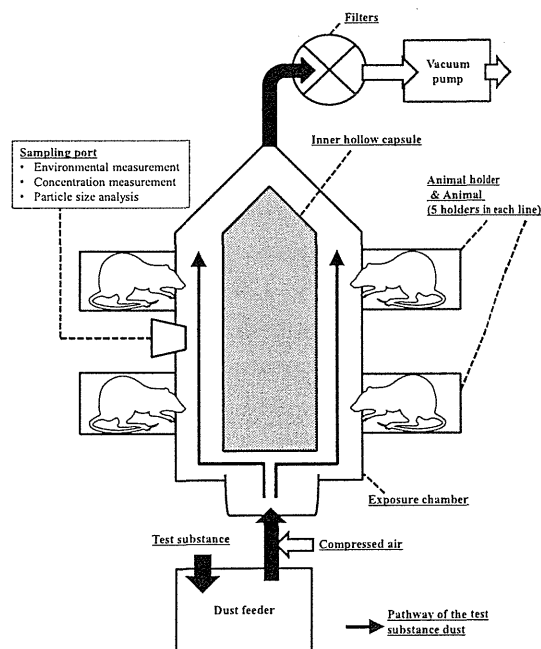


図 1 吸入暴露システム

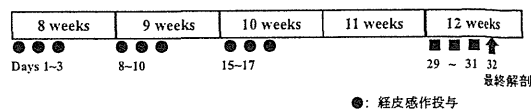


図 2 被験物質投与スケジュール

6. 観察および検査項目

6.1. 死亡および臨床症状の観察

全動物について、投与期間中少なくとも1日1回、臨床症状、瀕死状態ないし死亡の有無をケージサイドから観察した。

6.2. 組織採取

最終吸入惹起翌日に全例をペントバルビタール注射麻酔下で後大静脈および腹大動脈を切断し放血により安楽死させ、胸腺および脾臓を採取した。胸腺は重量を測定した。脾臓は測定時まで冷蔵 PBS 中で保存した。

最終吸入惹起の翌日、全動物についてペントバルビタール注射麻酔下で後大静脈より採血し、肺胞洗浄液 (BALF) および肺門リンパ節を採材した。血液からは血清を分離し、ELISA 法により総 IgE 量を定量した。BALF はフローサイトメトリー法による各種細胞数解析 (好中球、好酸球) およびケモカイン量測定 (RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、KC、MCP-1) に供した。肺門リンパ節は、10%牛胎児血清含有 RPMI1640 メディウムを用いて、ナイロンメッシュ (75 μ m メッシュ) 上で播りつぶし、単細胞懸濁液を得た。細胞懸濁液の一部はフローサイトメーターを用いて IgE 陽性 B 細胞数、記憶ヘルパー T 細胞数および記憶傷害性 T 細胞数を測定した。また、CD3 および CD28 抗体と 24 時間共培養することで T 細胞から放出されるサイトカイン量 (IL-4、5、9、13、17A) を定量した。

6.2. BALF の解析

BALF 中細胞分画測定はフローサイトメーターを用いて実施した。解析には、PE 標識 CD49d 抗体、PerCp-Cy5.5 標識抗マウス Gr-1 抗体および APC-Cy7 標識 CD11c 抗体 (全て日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を用い、好中球および好酸球を染色した。反応抗体との非特異的結合を防ぐため、1 μ g Mouse BD Fc Block™ にて 4°C で 10 分間培養後、上記の蛍光標識抗マウス

細胞膜表面抗原の抗体を用いて 4°C 遮光下で 30 分間培養して染色した。染色後、PBS で洗浄した後、フローサイトメーターを用いて解析を実施した。

BALF 上清中の各ケモカイン (RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、KC、MCP-1) 量測定は BD Cytometric Bead Array (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を用いて実施した。

6.3. 肺門リンパ節細胞の調製

肺門リンパ節を 5%FCS 添加 RPMI1640 培地にて氷冷下で浸した後、ペトリ皿上にてナイロンメッシュ (75 μ m メッシュ) 上で播りつぶし、単細胞懸濁液を得た。細胞懸濁液を遠心した後、5%FCS 添加 RPMI1640 培地で洗浄し、細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液中のリンパ球数は、コールターカウンター Z2 を用いて測定した。

6.4. 肺門リンパ節細胞の解析

肺門リンパ節中細胞分画測定は、フローサイトメーターを用いて実施した。解析には FITC 標識抗マウス IgE 抗体、APC-Cy7 標識抗マウス CD45R/B220 抗体、PE-Cy7 標識抗マウス CD4 抗体、APC-Cy7 標識抗マウス CD8 抗体および PE 標識抗マウス CD62L 抗体 (全て日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を用い、IgE 陽性 B 細胞数、記憶ヘルパー T 細胞数および記憶傷害性 T 細胞数を測定した。反応抗体との非特異的結合を防ぐため、1 μ g Mouse BD Fc Block™ にて 4°C で 10 分間培養後、上記の蛍光標識抗マウス細胞膜表面抗原の抗体を用いて 4°C 遮光下で 30 分間培養して染色した。染色後、PBS で洗浄した後、フローサイトメーターを用いて解析を実施した。

6.5. 肺門リンパ節細胞の解析

無菌化で調製した肺門リンパ節細胞 5×10^5 個について、48 穴培養プレート上で CD3 および CD28 抗体 (Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28) と共に

CO₂ インキュベーター (37°C、5%CO₂) で 24 時間共培養し、細胞上清中のサイトカイン産生量 (IL-4、5、9、13、17A) を測定した。

7. 有意差検定

各検査項目について、各投与群間の統計学的有意差の有無を危険率 5 及び 1% レベルで解析した。

まず Bartlett の等分散検定を行なった。この検定によって全用量群における分散が均一であるという判定が出た場合には、一元配置分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた時は、Tukey の多重比較法を実施して対照群と各投与群間における有意差の有無を判定した。

(倫理面への配慮)

なお、動物の取り扱いに関しては残留農薬研究所で定める動物実験規程に従い実施した (動物実験委員会承認番号 ; AC13103)。

C. 研究結果

①免疫毒性評価候補農薬の選定

1. Jurkat T 細胞のアポトーシス誘発能 (図 3)

図の上段がアポトーシス細胞に発現する Annexin V を染色した Annexin V 陽性細胞数、下段がアポトーシスの誘発に関わる Caspase 3/7 活性を示す。全ての剤について、Annexin V 陽性細胞数の濃度依存性の増加が認められ、Caspase 3/7 活性についてもほぼ同様の傾向が認められた。DDVP については Caspase 3/7 活性の増加が Annexin V 陽性細胞数の増加と比較して、低値であった。

2. マウス獲得免疫能の解析

2.1. 胸腺重量 (図 4)

図 4 の上段に示す。全ての被験物質で用量依存性の有意な減少が認められた。

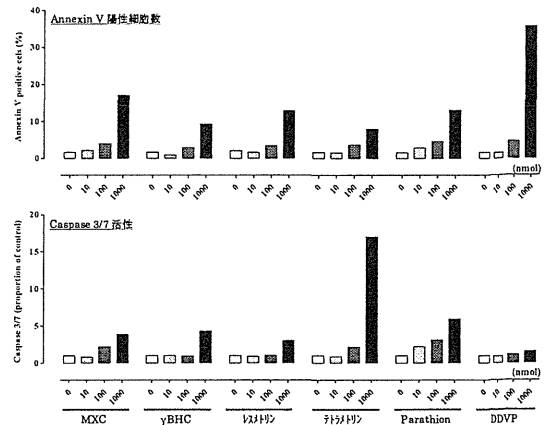


図 3 アポトーシス誘発能

2.2. 羊赤血球特異的 IgM 抗体産生能 (図 4)

図 4 の下段に羊赤血球特異的 IgM 抗体産生能結果を示す。有機塩素剤および有機リン剤については用量依存性の有意な減少が認められたが、ピレスロイド剤のテトラメトリンは変化が認められなかった。レスメトリンには有意な減少が認められたものの、用量依存性の変化ではなかった。

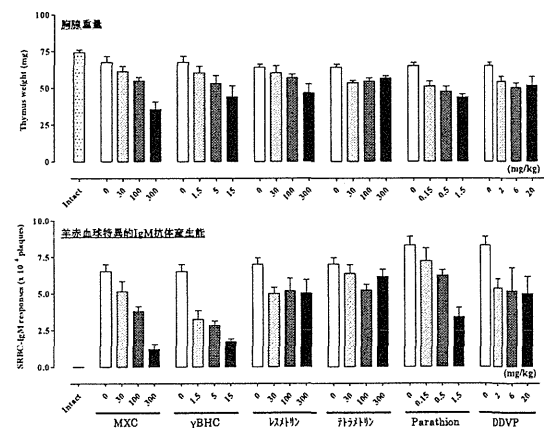


図 4 マウス獲得免疫能の解析 (胸腺重量、羊赤血球特異的 IgM 抗体産生能)

2.3. 胚中心陽性 B 細胞数 (図 5)

図 5 の上段に肺中心陽性 B 細胞数測定結果を示す。胸腺重量および羊赤血球特異的 IgM 抗体産生能結果と同様、有機塩素剤および有機リン剤については用量依存性の有

意な減少が認められた。しかし、プレスロイド剤については変化が認められなかった。
 2.4. 脾臓中 IL-6 産生能 (図 5)

図 5 の下段に脾臓中 IL-6 産生能測定結果を示す。その他の結果と同様、有機塩素剤および有機リン剤については用量依存性の有意な減少が認められたが、プレスロイド剤については変化が弱く、レスメトリンには有意な減少は認められなかった。

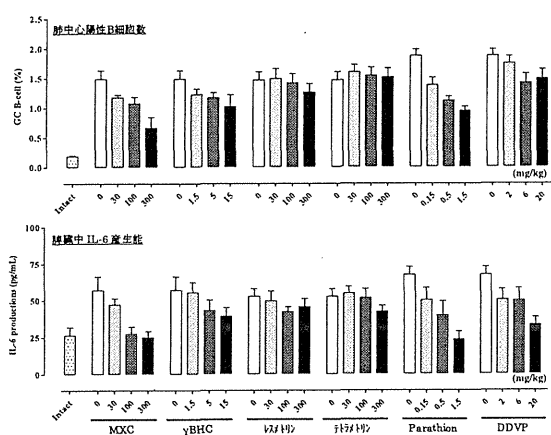


図 5 マウス獲得免疫能の解析 (胚中心陽性 B 細胞数測定、脾臓中 IL6 産生能)

②吸入アレルギー実験系の確立

1. 血清中総 IgE 量 (図 6)

図 6 の上段左に血清中 IgE 量測定結果を示す。TMA 感作のみ群と TMA 感作・惹起群のいずれも無処置群と比較して有意な増加が認められた。TMA 感作のみ群と TMA 感作・惹起群の間には差は認められなかった。

2. 肺門リンパ節中 IgE 陽性細胞数 (図 6)

図 6 の上段右に肺門リンパ節中 IgE 陽性 B 細胞測定結果を示す。TMA 感作・惹起群で TMA 感作のみ群と無処置群と比較して有意な増加が認められた。TMA 感作のみ群と無処置群の間には差は認められなかった。

3. 肺胞洗浄液の解析 (図 7)

図の左上より、好酸球数、好中球数および各ケモカイン量 (RANTES、MIP-1α、

MIP-1β、KC、MCP-1) 測定結果を示す。いずれのパラメーターについても、TMA 感作・惹起群で TMA 感作のみ群と無処置群と比較して有意な増加が認められた。TMA 感作のみ群と無処置群の間には差は認められなかった。

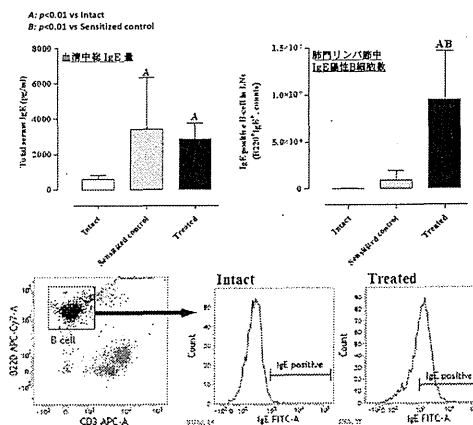


図 6 IgE 反応

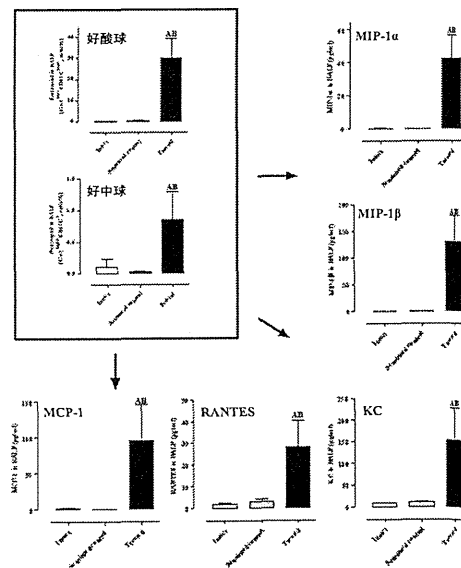


図 7 肺胞洗浄液の解析

4. 肺胞リンパ節の解析 (図 8)

図 8 の左上より、記憶傷害性 T 細胞数、記憶ヘルパー T 細胞数および各サイトカイン量 (IL-4、5、9、13、17A) 測定結果を示す。いずれのパラメーターについても、

TMA 感作・惹起群で TMA 感作のみ群と無処置群と比較して有意な増加が認められた。TMA 感作のみ群と無処置群の間には差は認められなかった。

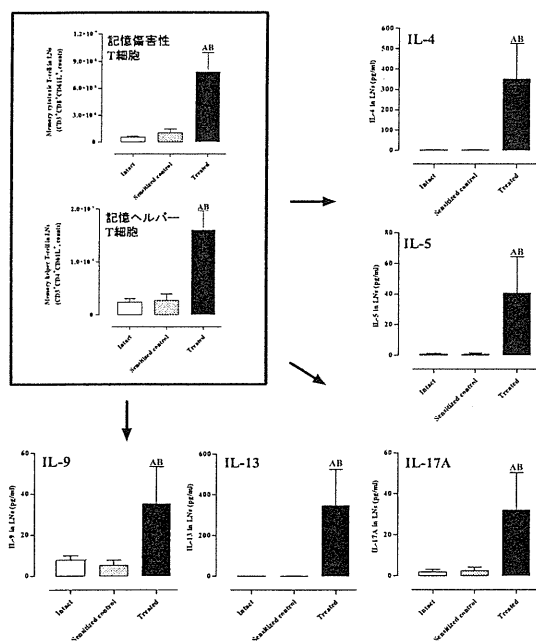


図 8 肺門リンパ節の解析

D. 考察

平成 25 年度の本研究では、今後の当該研究の遂行に向け、①免疫毒性評価候補農薬の選定、②マウスを用いた吸入アレルギー実験系の確立を目的に実験を行った。

①候補農薬の選定には、有機塩素剤（メトキシクロル、 γ -BHC）、有機リン剤（パラチオン、DDVP）およびピレスロイド剤（レスメトリン、テトラメトリン）を用い、Jurkat T 細胞に対するアポトーシス誘発能およびマウスの羊赤血球抗原特異的 IgM 抗体産生能を調査した。結果、各被験物質を暴露した Jurkat T 細胞で Annexin V 陽性細胞数および Caspase 3/7 活性の有意な増加が認められ、リンパ球細胞に各薬剤がリンパ球細胞にアポトーシスを誘発することが示唆された。有機塩素剤および有機リン剤のアポトーシス誘発能については、我々の研究チームが行った過去の研究報告^{4,5)}におい

ても同様の結果が得られており、今回の結果の妥当性が示唆された。一方、ピレスロイド剤については、過去に免疫担当細胞にアポトーシスを誘発するといった報告がなく、新たな事象であることが示唆された。

In vitro 実験で免疫細胞に対するアポトーシス誘発能が示された上記被験物質について、マウスに 7 日間経口経路で暴露し、胸腺重量、羊赤血球抗原に対する IgM 抗体産生能、脾臓中の胚中心陽性 B 細胞数および IL-6 産生量を測定した。結果、全てのパラメーターについて、有機塩素剤および有機リン剤を投与した群では用量依存性の有意な減少が認められており、我々の過去に行った研究報告⁵⁻⁷⁾とも相関した結果が得られた。一方で、ピレスロイド剤投与群では、コントロール群と比較して変化が認められず、in vivo での免疫毒性作用は示唆されなかった。In vitro 実験は親化合物の影響調査が主であるのに対し、in vivo 実験は親化合物に加え各代謝物の影響が実験結果に大きく寄与する。本年度の結果から、ピレスロイド剤では親化合物で免疫影響があるが、代謝物では影響がない事が示唆された。以上の結果を基に、次年度以降の本研究では有機塩素剤および有機リン剤を用いて実験を行うこととする。

また、上記のような免疫抑制反応の誘発には、各種ストレス、暴露される化学物質の種類、暴露を受ける時期、解析を行う時期そして核内受容体等の様々な要因が存在する。今回候補として取り上げた被験物質は、エストロゲンレセプター、アンドロゲンレセプターおよびアリルハイドロカーボンレセプターに結合することによって免疫毒性が誘発することが示唆されている。次年度以降の当該研究では、これらの要因が免疫異常の攪乱にどのように寄与するかも調査することとする。

②マウスを用いた吸入アレルギー実験系の確立には、以前の我々の研究報告⁸⁾で有用な結果を得た、マウスに吸入アレルギー性を持つ TMA を 3 週間経皮感作後に 3 日

間吸入惹起するスケジュールを用い、血中、肺胞洗浄液中、肺門リンパ節中に誘導される IgE、サイトカイン、ケモカインおよび免疫担当細胞数を測定する事で、その有用性を確認した。吸入暴露の際には、TMA を肺胞に到達させるべく、事前に平均粒子径が 2 μm 以下となるように粉碎処理した。

結果、TMA を感作および惹起した群で血中、肺胞洗浄液中、肺門リンパ節中に誘導される IgE、サイトカイン、ケモカイン及び免疫担当細胞数が無処置群あるいは感作のみの実施群と比較して有意に増加し、吸入アレルギーが適切に誘導されていることが示唆された。

E. 結論

平成 25 年度の本研究では、今後の当該研究遂行に向け、①免疫毒性評価候補農薬の選定、②マウスを用いた吸入アレルギー実験系の確立を目的に実験を行った。①候補農薬の選定には、有機塩素剤（メトキシクロル、γ-BHC）、有機リン剤（パラチオン、DDVP）及びピレスロイド剤（レスメトリン、テトラメトリン）を用い、Jurkat T 細胞に対するアポトーシス誘発能及びマウスの羊赤血球抗原特異的 IgM 抗体産生能を調査した。②吸入アレルギー実験系の確立には、マウスに吸入アレルギー性を持つ TMA を 3 週間経皮感作後に 3 日間吸入惹起する事で血中、肺胞洗浄液中、肺門リンパ節中に誘導される IgE、サイトカイン、ケモカイン及び免疫担当細胞数を測定した。

その結果、①免疫毒性評価候補農薬の選定実験では、全ての剤でアポトーシス誘発能が増大し、抗原特異的 IgM 抗体産生能が減少し、免疫毒性影響が強く示唆された。②マウスを用いた吸入アレルギー実験系の確立では、TMA を感作および惹起した群で血中、肺胞洗浄液中、肺門リンパ節中に誘導される IgE、サイトカイン、ケモカイン及び免疫担当細胞数が無処置群あるいは感作のみの実施群と比較して有意に増加し、吸入アレルギーが適切に誘導されているこ

とが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Fukuyama, T., Kosaka, T., Hayashi, K., Miyashita, L., Tajima, Y., Wada, K., Nishino, R., Ueda, H., and Harada, T. Immunotoxicity in mice induced by short-term exposure to methoxychlor, parathion, or piperonyl butoxide. *J Immunotoxicol*, 10(2):150-9, 2013.

2) Nishino, R., Fukuyama, T., Kosaka, T., Hayashi, K., Watanabe, Y., Kurosawa, Y., Ueda, H., and Harada, T. Effects of short-term oral combined exposure to environmental immunotoxic chemicals in mice. *J Immunotoxicol*, 2013, in press.

2. 学会発表

1) 環境中化学物質の複合暴露が及ぼす獲得免疫能抑制効果の検出：福山朋季,西野里沙子,小坂忠司,林宏一,渡部優子,黒澤好,上田英夫,原田孝則 第 40 回日本毒性学会,2013 年 6 月

2) 環境中免疫毒性化学物質の複合暴露における評価：福山朋季,西野里沙子,小坂忠司,渡部優子,黒澤好,林宏一,上田英夫,原田孝則 第 20 回日本免疫毒性学会,2013 年 9 月

F. 参考文献

1) 一般財団法人残留農薬研究所 (2012) : 厚生労働科学研究費補助金 (食品の安全性高度化推進研究事業) 食品中の複数の化学物質による神経・免疫毒性に関する研究 平成 24 年度分担研究報告書

2) Temple, L., Kawabata, T. T., Munson, A. E., and White, K. L., Jr. Comparison

of ELISA and plaque-forming cell assays for measuring the humoral immune response to SRBC in rats and mice treated with benzo[a]pyrene or cyclophosphamide. *Fundam. Appl. Toxicol.* 21:412-419, 1993.

3) Cunningham, A. J. A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells. *Nature* 207:1106-1107, 1965.

4) Fukuyama, T., Tajima, Y., Ueda, H., Hayashi, K., Shutoh, Y., Harada, T., and Kosaka, T. Apoptosis in immunocytes induced by several types of pesticides. *J. Immunotoxicol.* 7:39-56, 2010.

5) Fukuyama, T., Kosaka, T., Hayashi, K., Miyashita, L., Tajima, Y., Wada, K., Nishino, R., Ueda, H., and Harada, T. Immunotoxicity in mice induced by short-term exposure to methoxychlor, parathion, or piperonyl butoxide. *J. Immunotoxicol.* 10:150-159, 2013.

6) Fukuyama, T., T. Kosaka, Y. Tajima, K. Hayashi, Y. Shutoh, and T. Harada. Detection of thymocytes apoptosis in mice induced by organochlorine

pesticides methoxychlor. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 33:193-200, 2011.

7) Nishino, R., Fukuyama, T., Kosaka, T., Hayashi, K., Watanabe, Y., Kurosawa, Y., Ueda, H., and Harada, T. Effects of short-term oral combined exposure to environmental immunotoxic chemicals in mice. *J Immunotoxicol*, 2013, in press.

8) Fukuyama, T., Ueda, H., Hayashi, K., Tajima, Y., Shutoh, Y., Saito, T. R., Harada, T., and Kosaka, T. Use of long term dermal sensitization followed by intratracheal challenge method to identify low-dose chemical-induced respiratory allergic responses in mice. *Toxicol Lett* 181, 163-170, 2008.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

食品中の複数の化学物質による健康影響に関する調査研究

分担研究課題：異物代謝酵素誘導を指標とした食品中化学物質の複合影響
ヘテロサイクリックアミン類およびベンズイミダゾール類による
ヒト AhR の活性化

研究分担者： 氏名 出川 雅邦 所属 静岡県立大学 薬学部教授
研究協力者： 氏名 関本 征史 所属 静岡県立大学 薬学部講師

研究要旨

食品中成分の毒性発現における複合影響を調べるにあたり、加熱食品成分中から見出されている9種の癌原性ヘテロサイクリックアミン(HCAs: Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2, MeAαC, AαC, IQ, MeIQ, PhIP)を選択し、これら化合物による AhR 活性化や自身の代謝活性化酵素(CYP1As)誘導能をヒト肝がん由来 HepG2 細胞、あるいは申請者らが樹立したヒト AhR-based reporter gene assay 用細胞株(HepG2-A10)を用いて検討した。その結果、Glu-P-1、Glu-P-2、PhIPを除く6種のHCAsにはヒト AhR 活性化能およびCYP1As誘導能があることを明らかにした。これら結果は、これまでのマウスあるいはラット肝臓に対する酵素誘導試験結果とは一部異なるものであり、Glu-P-1、Glu-P-2、PhIPの3化合物についてはその応答性(CYP1As誘導性)に種差がある可能性を示した。

また、改良型 AhR-based reporter gene assay 用細胞株(ヒト HepG2-XL24 およびマウス Hepa-XL11)を樹立した。これら細胞株を用いて、6種のベンズイミダゾール化合物(Benzimidazole, Thiabendazole, Carbendazim, Benomyl, Omeprazole, Lansoprazole)の AhR 活性化能を調べ、それら活性能が種差(ヒトとマウス細胞株差)を示すことを明らかにした。さらに、ベンゾイミダゾール類と代表的な AhR リガンド(3-methylcholanthrene, MC)の複合曝露による AhR 活性化能への影響について種差(ヒトとマウス細胞株差)を検討し、MCとの複合曝露による AhR 活性化の増強や、その複合影響の種差を明らかにした。

A. 研究目的

Aryl hydrocarbon receptor (AhR) は、癌原性多環式芳香族炭化水素(PAH)類や癌原性ヘテロサイクリックアミン(HCA)類の代謝活性化に関わる CYP1A 酵素遺伝子の活性化を担う転写因子として知られる。こ

の AhR の活性化は、ダイオキシン類による催奇形性発現、HCA による発がんに関わることが知られているが、さらに最近では脂質代謝や免疫機能の調節にも重要な役割を果たすことが示されている。

一方、我々は、食品中の化学物質による

複合影響を解析する一環として、それらの AhR 活性化能や CYP1A 酵素誘導能を調べるとともに、代表的な AhR リガンドの PAH 類との複合影響を検討してきた。その結果、防かび剤である Thiabendazole (TBZ) が PAH 類との複合曝露で、AhR 活性化や CYP1A 酵素誘導を相加・相乗的に増強することを明らかとしている。

本研究では、食品中の化学物質による複合影響について、以下 2 項目を検討した。

1) 癌原性 HCA 類による AhR 活性化と CYP1A 酵素誘導

本研究では、食品成分中の HCA 類に着目し、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞およびヒト AhR-based reporter gene assay 用細胞株 (HepG2-A10) を用いて、それらの AhR 活性化能と CYP1A 酵素誘導能との関連性を検討した。

2) ベンズイミダゾール類の AhR 活性化能とその動物種差

我々は既に、ベンズイミダゾール構造を持つ防かび剤の TBZ が、AhR リガンドの PAH 類による AhR 活性化や CYP1A 酵素誘導を増強することを明らかとしている。

そこで本研究では、ベンズイミダゾール類による AhR 活性化作用や、PAH 類との複合効果について検討した。なお、AhR 活性化能の測定には、改良型ヒト AhR-based reporter gene assay 用細胞株の HepG2-XL24 を用いた。

また、TBZ や Omeprazole (OME) などのベンズイミダゾール化合物による AhR 活性化は、ヒト HepG2 細胞では見られる一方、マウス Hepa-1 細胞では見られないことが示

されている。そこで、このことを確認するため、マウス AhR-based reporter gene assay 用細胞株 Hepa-XL11 を用いて比較検討した。

B. 研究方法

1) 試験細胞株

HCA 類による AhR 活性化および CYP1A 酵素誘導は、ヒト肝がん HepG2 細胞、あるいは AhR 結合配列 (XRE) を組み込んだルシフェラーゼプラスミド (XRE-Luc) を安定に発現させたヒト HepG2-A10 細胞を用いてそれぞれ解析した。

また、ベンズイミダゾール類による AhR 活性化の解析には、改良型 XRE-ルシフェラーゼプラスミド (XRE-pGL4.15) を安定に発現させたヒト HepG2-XL24 およびマウス Hepa-XL11 細胞株を使用した。

いずれの細胞も、5%胎児ウシ血清と硫酸カナマイシンを含んだ DMEM 培地を用い、5%炭酸ガス下、37°C で培養した。

2) 被検化合物

本研究で使用した化合物の構造式を図 1 に示した。HCA 類として、Trp-P-1、Trp-P-2、Glu-P-1、Glu-P-2、A α C、MeA α C、IQ、MeIQx および PhIP を使用した。これら化合物は国立がんセンター研究所生化学部より供与頂いた。また、MC、 α -naphthoflavone (ANF) およびベンズイミダゾール化合物 (Benzimidazole (BEZ)、Thiabendazole (TBZ)、Carbendazim (CBD)、Benomyl (BML)、Omeprazole (OME) および Lansoprazole (LAN)) はいずれも Sigma 社より購入して使用した。

各化合物はいずれも 1000 倍濃縮液となるようにジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、使用した。

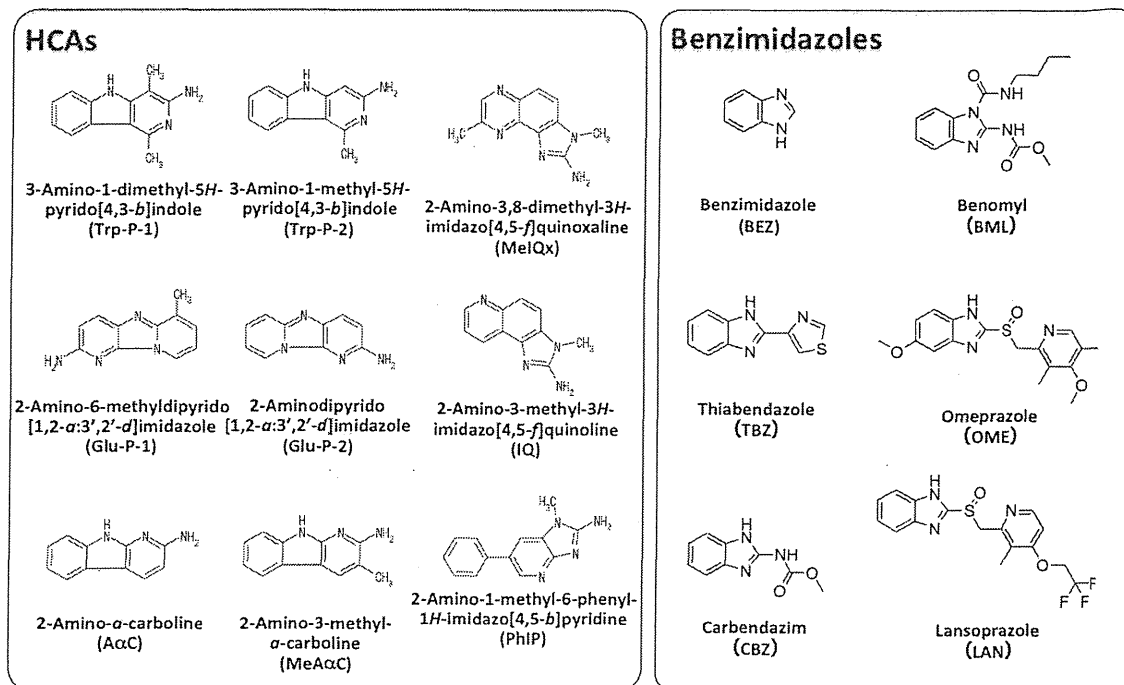


図1 本研究で使用した化合物

なお、研究者の健康保持のため、本研究で使用する化合物・薬品は安全キャビネット等で厳重に注意して取り扱った。

3) AhR 活性化の測定

各 AhR-based reporter gene assay 用細胞株 (HepG2-A10、HepG2-XL24、Hepa-XL11) をそれぞれ 2×10^4 cell/cm² となるように播種し、48 時間前培養後、被検化合物を処理した。Reporter Lysis Buffer (Promega) を用いて細胞溶解液を調製し、これをルシフェラーゼ基質液 (東洋インキ) と混和して生じた発光を Wallac1420 ARVO-SX (Perkin Elmer) により測定した。さらに、BCA-protein assay kit (PIERCE) を用いて細胞溶解液中の蛋白質濃度を測定し、蛋白質あたりの発光強度を算出した。

4) 遺伝子発現量の測定

HepG2 細胞を 2×10^4 cell/cm² となるように播種し、被験化合物 (HCA 類) を添加し

て一定時間培養後、Total RNA を ISOGEN (ニッポンジーン) により単離した。この Total RNA より、ランダムヘキサマーと MMLV-逆転写酵素 (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した。この cDNA に各種遺伝子に特異的なプライマーと Power SYBR PCR Master Mix (Applied Biosystems) を添加し、7300/7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム PCR を行った。さらに、各遺伝子の発現量を GAPDH 遺伝子の発現量で除することにより標準化した。

5) CYP1A 酵素活性の測定

CYP1A 酵素の代表的な基質として知られるエトキシレゾルフィン (ER) を用い、その脱エチル化活性 (EROD 活性) を指標として、CYP1A 酵素活性を測定した。

前項に準じて HepG2 細胞を前培養し、被検物質を処理した。培養後、細胞を洗浄し、さらに ER を含んだ無血清培地にて 30 分間培養