

報告番号	※甲	第	号
------	----	---	---

主論文の要旨

論文題目 Modulation of immunological activity on macrophages induced by diazinon
(ダイアジノンが誘導するマクロファージの免疫修飾活性)

氏名 小笠原 名奈子

論文内容の要旨

① 背景・目的

有機リン系殺虫剤は農業で広く用いられており、さまざまな害虫に対して広く殺虫活性を持つ。有機リン系殺虫剤はアセチルコリンエステラーゼ活性を阻害することで殺虫活性を示し、吸入曝露により人体に対してもさまざまな症状が引き起こされることが報告されている。ダイアジノンは有機リン系殺虫剤のひとつであり、農業だけでなく家庭菜園や屋内の害虫駆除などにも用いられている。しかし、その毒性からアメリカでは2004年に家庭での使用が禁止されたが、日本ではいまだに広く使用されている。ダイアジノンはラットの血清中および脳においてTNF- α の産生を増強させることが報告されており、免疫機能に何らかの影響を与える可能性が示唆されているが、その標的となる細胞や分子機構はまだ明らかになっていない。

マクロファージは自然免疫や獲得免疫において重要な役割を果たし、貪食能、フリーラジカルの合成、抗原提示などさまざまな免疫応答に関与している。有機リン系殺虫剤のひとつであるパラチオンは気道および肺内のマクロファージに作用し、TNF- α の産生を増加させることで気道過敏性を亢進させることが報告されており、ダイアジノンについてもマクロファージの機能を変化させることで免疫機能に影響を与えている可能性が考えられる。

本研究では、ダイアジノンがマクロファージの機能に及ぼす影響について検討した。

② 方法

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞、マウス気管支肺胞洗浄液 (BALF)中の細胞に加え、骨髄由来マクロファージ (BMDM)を用いて検討した。C57BL/6 マウスより回収した BALF 中の細胞は 95%以上がマクロファージであることを確認した。BMDM は C57BL/6 マウスの骨髄細胞を GM-CSF 存在下で1週間培養し樹立した。各種サイトカインおよび炎症関連分子の発現はリアルタイム PCR 法、ELISA 法、細胞表面分子の発現、細胞内 ROS 産生および貪食能はフローサイトメトリー、各種シグナル伝達はウエスタンブロッティング法を用いて解析した。なお、全ての動物実験は名古屋大学大学院医学系研究科の

動物実験委員会の承認のもと、名古屋大学における動物実験等に関する取扱規程を遵守して実施した。

③ 結果および考察

本研究では有機リン系殺虫剤であるダイアジノンがマクロファージの機能に及ぼす影響について検討した。

はじめに炎症性サイトカインの発現誘導および産生について検討した。ダイアジノンに曝露した RAW264.7 細胞は TNF- α 、IL-6 の発現および産生を誘導し、ダイアジノンはマクロファージを活性化させる可能性が示唆された。

殺虫剤曝露は酸化ストレスを誘導することが報告されている。ダイアジノン曝露による ROS の産生を RAW264.7 細胞を用いて検討した結果、ダイアジノンは濃度依存的に細胞内の ROS の産生を誘導した。また、酸化ストレスのもとで誘導される抗酸化酵素の heme oxygenase (HO)-1 の発現が誘導されたことからダイアジノンが酸化ストレスとして働くことが確認された。さらに、ダイアジノンは inducible nitric oxide synthase (iNOS) および cyclooxygenase (COX)-2 の発現も誘導した。ROS は炎症性サイトカインの産生や iNOS および COX-2 の発現を誘導することが報告されていることから、ダイアジノンによる ROS の過剰産生がマクロファージを活性化する可能性が示唆された。

次にマクロファージの主要な機能のひとつである貪食能について RAW264.7 細胞および BMDM 細胞を用いて検討した。ダイアジノンは炎症性サイトカイン、iNOS、COX-2 の発現を増強させ、マクロファージを活性化させたにも関わらず、貪食能は顕著に低下させた。貪食能を低下させる機序のひとつに COX-2 の関与が報告されており、ダイアジノンが貪食能を低下させる機序については今後さらなる検討が必要である。

また、マクロファージは抗原提示細胞としても働き、MHC クラス II 分子や、共刺激分子 (CD40、CD80、CD86) の発現増強を介して T 細胞を刺激する。これらの分子の発現について検討したところ、ダイアジノンは RAW264.7 細胞において CD40、CD86、MHC クラス II 分子の発現を、BMDM 細胞においては CD86 の発現を増強した。以上の結果より、ダイアジノンがマクロファージの抗原提示能に影響を及ぼす可能性が示唆された。

次にダイアジノンが細胞内シグナル伝達に及ぼす影響を検討した。ROS により活性化される重要なシグナル経路には、炎症性サイトカインの発現を調節する転写因子 NF- κ B が知られている。NF- κ B のサブユニットである p65 のリン酸化は NF- κ B の活性化の指標として評価したが、RAW264.7 細胞においてダイアジノンは p65 のリン酸化を誘導しなかった。また、MAPK の関与についても検討し、ダイアジノンは JNK のリン酸化は誘導せず、ERK、p38 のリン酸化を誘導することが明らかとなった。さらに、ERK および p38 の阻害剤によりダイアジノンによる IL-6 の発現誘導が減弱した。以上の結果より、ダイアジノンによる炎症性サイトカインの発現誘導は NF- κ B 非依存的に起こり、MAPK の ERK および p38 が関与している可能性が示唆された。

また、より生体に近い条件でダイアジノンがマクロファージの機能に及ぼす影響を検討するためにマウスより回収した BALF 中の細胞を用いてダイアジノンによる炎症性サイトカインの誘導を検討した。その結果、ダイアジノンは TNF- α と IL-6 の mRNA 発現を誘導した。以上の結果より、ダイアジノンは生理的状況下においてもマクロファージを活性化する可能性が示唆された。

④ 結語

本研究ではダイアジノンがマクロファージを活性化し炎症を誘導することが明らかになった。

