

## ヒト肥満細胞に対する多環芳香族炭化水素及び植物由来物質の影響

久留戸涼子, 山本 蘭, 櫻井 正剛, 大浦 健

### The Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Plant Leaves on Human Mast Cells

Ryoko KURUTO, Ran YAMAMOTO, Seigo SAKURAI, Takeshi OHURA

2017年9月8日受理

#### 抄 録

近年、花粉症や食物アレルギーの患者が増加し、症状も重篤化していると言われ、この要因の一つに、環境汚染物質の関与が考えられている。本研究では、汚染物質として、多環芳香族炭化水素 (PAHs) とそのハロゲン化物に注目し、中でも、benzo[*a*]pyrene (BaP)、benz[*a*]anthracene (BaA)、phenanthrene (Phe) とそのハロゲン化物を用いて、アレルギーに関与する肥満細胞の増殖能にどのような影響を及ぼすか調べた。また、これらの作用を抑制するような物質の探索も試みた。BaP、ClBaP、BrBaP では、低濃度で細胞増殖を促進する傾向が認められた。ここに Epigallocatechin gallate (EGCG) を  $3 \times 10^{-5}$  M で複合曝露すると、その効果は抑制された。また、松葉にも抑制作用が認められた。BaA、ClBaA、BrBaA では、増殖の促進は認められず、Phe 及びそのハロゲン化物では、増殖を促進した。したがって、PAHs には、肥満細胞の増殖を促進するものもあり、アレルギーの重篤化に関与する可能性も考えられた。また、この作用を EGCG や松葉が抑制することも考えられた。

キーワード：BaP、BaA、Phe、EGCG、松葉

#### 1. 研究の背景

人間の生産活動により、環境中には様々な化学物質が排出され、環境汚染が問題となっている。これらの環境汚染物質の中には、人体に有害な影響を与えるものもあり、様々な疾患が増加し、症状も重篤化しているのではないかと考えられている。近年、増え続ける花粉症や食物アレルギーの患者も、環境汚染物質が関係しているのではないかと指摘されている。

環境汚染物質には様々あるが、筆者らは、その中の多環芳香族炭化水素 (PAHs) 及びそのハロゲン化物に注目してきた。PAHs は、芳香環を 2 個以上持つ化合物の総称で、ダイオキシン類と同様、様々な燃焼過程で生成され、環境中に排出されている。

PAHs は体内に吸収後、細胞内で芳香族炭化水素受容体 (AhR) と結合してシトクローム P450 (CYP) 1A1 や 1B1 等の薬物代謝酵素を誘導し、発がん性、変異原性だけでなく、内分泌攪乱作用もあることが報告されてきた (1, 2)。さらにハロゲンが付加された化合物は、付加されたハロゲンが多いほど不燃性、脂溶性があり、その難分解性、蓄積性が増し、少量であっても食物連鎖による生物濃縮などによって、生体への影響も懸念されている。塩素化 PAHs や臭素化 PAHs が、実際に大気微粒子中に存在することも明らかにされ、発生源についても推定されている (3 - 5)。そこで、本研究では、PAHs 中の benzo[*a*]pyrene (BaP)、benz[*a*]anthracene (BaA)、phenanthrene (Phe) 及びその塩素置換体、臭素置換体を対象とすることにした。

筆者らは既に、これらの乳がん細胞 MCF-7 に対する影響を報告した (6 - 8)。本研究では、アレルギーが起こる過程に参与する肥満細胞を用いることにした。肥満細胞は、ヒスタミンを産生するが、これがアレルギー疾患の原因となる。この肥満細胞に対して、環境汚染物質がどのような作用を及ぼすのか、まず細胞増殖能について、調べることにした。肥満細胞の増殖能を高める作用が認められた場合には、アレルギー疾患の原因となるヒスタミンの産生も高まる可能性が考えられた。

また、これらの作用を抑制するような物質の探索も重要である。増殖を抑制する作用が認められれば、ヒスタミンの産生の軽減に寄与できるものと考えた。乳がん細胞では、植物葉などでの抑制効果が示唆されているため、今回もこれらについて、調べることにした (9)。常葉大学静岡キャンパスの所在地である静岡市では、平成 25 年に世界文化遺産として三保松原が登録された。景観維持のために松葉が大量に廃棄され、その有効活用が考えられている。松葉には、ケルセチンが多く含まれ、抗腫瘍活性も認められるという報告もある (10, 11)。本研究では、まず植物葉として松葉に注目した。

## 2. 研究の目的

本研究では、環境汚染物質のアレルギー疾患への影響の一端を解明するため、アレルギーが起こる過程に参与する肥満細胞に注目した。環境汚染物質として、PAHs 中の BaP、BaA、Phe 及びその塩素置換体、臭素置換体に絞り、これらが、肥満細胞の細胞増殖能に、どのような影響を及ぼすのか調べた。同時に、これらの作用を抑制するような物質として、これまで扱った植物葉に関連したものから、お茶の成分である Epigallocatechin gallate (EGCG) や松葉について調べることにした。

## 3. 方法

### 3-1. ハロゲン化 PAHs の合成及び精製

既に確立した方法に従い、BaP、BaA、Phe を親物質として、塩素置換体、臭素置換体を単離精製した (6, 12, 13)。

塩素置換体としては、6-ClBaP、7-ClBaA、9-ClPhe、3,9,10-Cl<sub>3</sub>Phe が、臭素置換体としては、6-BrBaP、7-BrBaA、9-BrPhe が単離精製された (Fig. 1)。

### 3-2. 松葉の調製

三保松原の松葉を採集し、粉碎、粉末とした。粉末 1 g 当たり 50ml の PBS(-) に溶解し、室温で 3 時間、時々攪拌した。3000 回転で 10 分間遠心分離して、非溶解分を除き、上清をろ過滅菌し、松葉原液とした。

### 3-3. 細胞培養

ヒト肥満細胞 Mc $\epsilon$ 27 (独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所より分与) を、10%牛血清 (ICN Biomedicals)、10 $\mu$ M MTG (Monothioglycerol Solution) (Wako) を含む Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Gibco) を培地として、5%CO<sub>2</sub>、37°C下で培養した (Fig. 2)。細胞は 3 ~ 4 日ごとに培地交換を行い、継代を繰り返して培養を続けた。

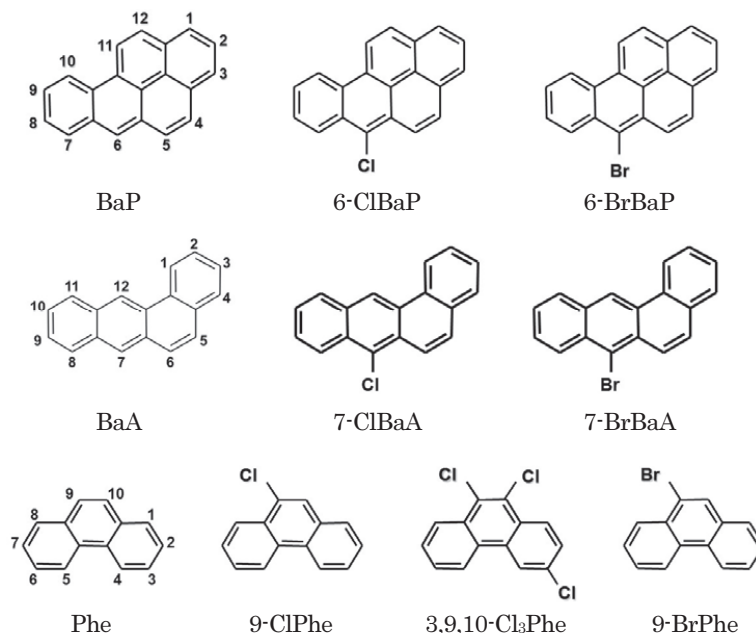


Fig. 1 Structures of BaP, BaA, Phe and their halogenated derivatives.

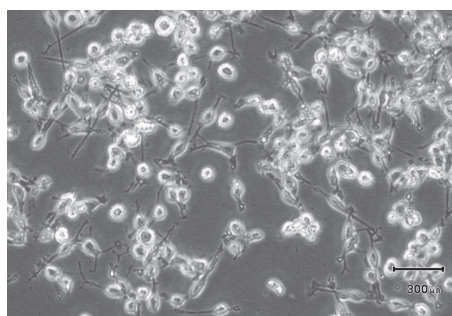


Fig. 2 Light microscopy showing human mast cells Mc $\epsilon$ 27.

### 3-4. 細胞増殖試験

- ① シャーレに張り付いている細胞をはがし、血球計算盤を使って細胞数を算出した。細胞数を算出後、 $5 \times 10^4$  個/mLとなるようにIMDM培地に懸濁し、96穴プレートに、 $5 \times 10^3$  個/wellとなるように100 $\mu$ lずつ播種した。
- ② 4時間後に、目的の濃度となるように検査試料を加え、さらに3日間培養した。松葉については、調製した原液、これをPBS(-)で10倍希釈した希釈液を、培地の1/10量となるように加えた。コントロールには、試料の溶媒であるdimethylsulfoxide (DMSO)を加えた。
- ③ 3日後、細胞増殖試験用試薬であるcell counting kit-8 (Dojin) (14, 15)を各ウェルに加えミキシングし、2時間呈色反応を行った。
- ④ マイクロプレートリーダーEL808 (BioTek)を用い、450 nm (参照波長630 nm)の吸光度を測定した。

## 4. 結果

### 4-1. BaPとハロゲン化BaP、及びEGCGの効果

BaP、ClBaP、BrBaPで、各濃度を $10^{-8}$ ~ $10^{-5}$  Mに変化させて、Mce27細胞に曝露した。いずれも $10^{-8}$ ~ $10^{-7}$  Mの低濃度では、細胞増殖を促進する傾向が認められたが、逆に $10^{-5}$  Mの高濃度では、コントロールと同程度となった (Fig. 3A - C)。

上記に、EGCGを $3 \times 10^{-5}$  Mで複合曝露した。EGCGについては、 $5 \times 10^{-5}$  Mでは、Mce27細胞の増殖能の低下が認められたが、 $3 \times 10^{-5}$  Mでは増殖能に影響が認められなかったという結果を得た (データ示さず)。Fig. 3Aに示されるように、 $3 \times 10^{-5}$  M EGCG単独では、コントロールと同程度の増殖能であったが、BaP、ClBaP、BrBaPとの複合曝露では細胞増殖能は抑制され、前述の $10^{-8}$ ~ $10^{-7}$  Mで

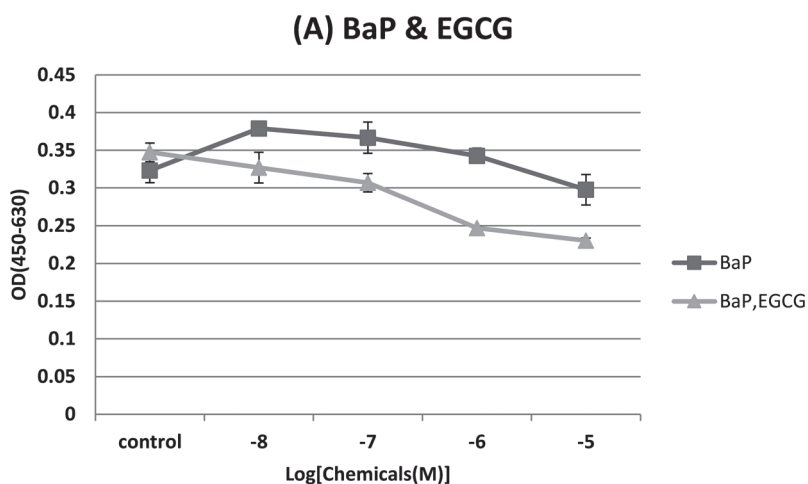


Fig. 3A Effects of BaP and EGCG on the growth of Mce27 cells.  
EGCG:  $3 \times 10^{-5}$  M

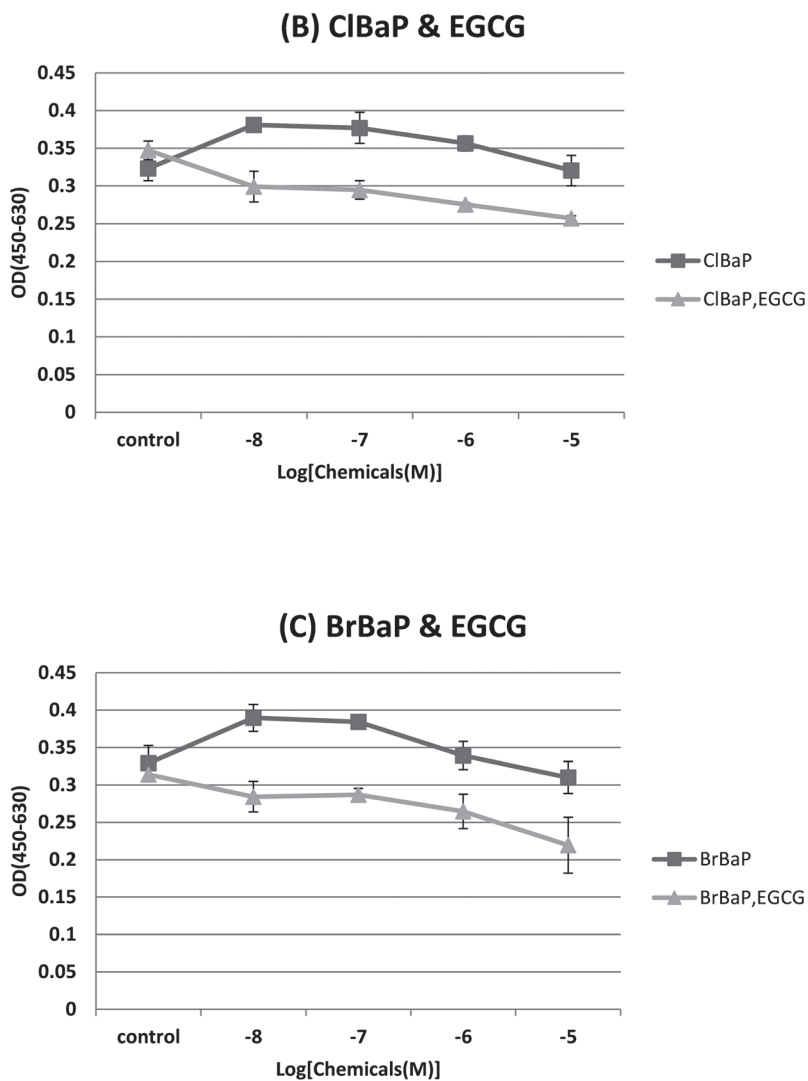


Fig. 3B, C Effects of ClBaP, BrBaP, and EGCG on the growth of Mce27 cells.  
EGCG:  $3 \times 10^{-5}$  M

の促進効果は打ち消され、 $10^{-6} \sim 10^{-5}$  M の高濃度でも、抑制効果が認められた。したがって、EGCG は、BaP 及びハロゲン化 BaP との複合曝露により、細胞増殖を抑制する効果を示した。

#### 4-2. BaP と ClBaP、及び松葉の効果

BaP、ClBaP で、各濃度を  $10^{-8}$  ~  $10^{-5}$  M に変化させて、松葉の原液、及び 10 倍希釈を複合曝露した。松葉の原液の単独曝露で、細胞増殖能は大幅に低下し、BaP による細胞増殖の促進も、松葉の原液との複合曝露で  $10^{-8}$  ~  $10^{-5}$  M すべての濃度で同様に低下した (Fig. 4D)。松葉の 10 倍希釈では、その効果は減少したが、BaP による細胞増殖促進を低下させた。ClBaP についても、同様の結果となった (Fig. 4E)。したがって、松葉には増殖抑制効果があることが示された。

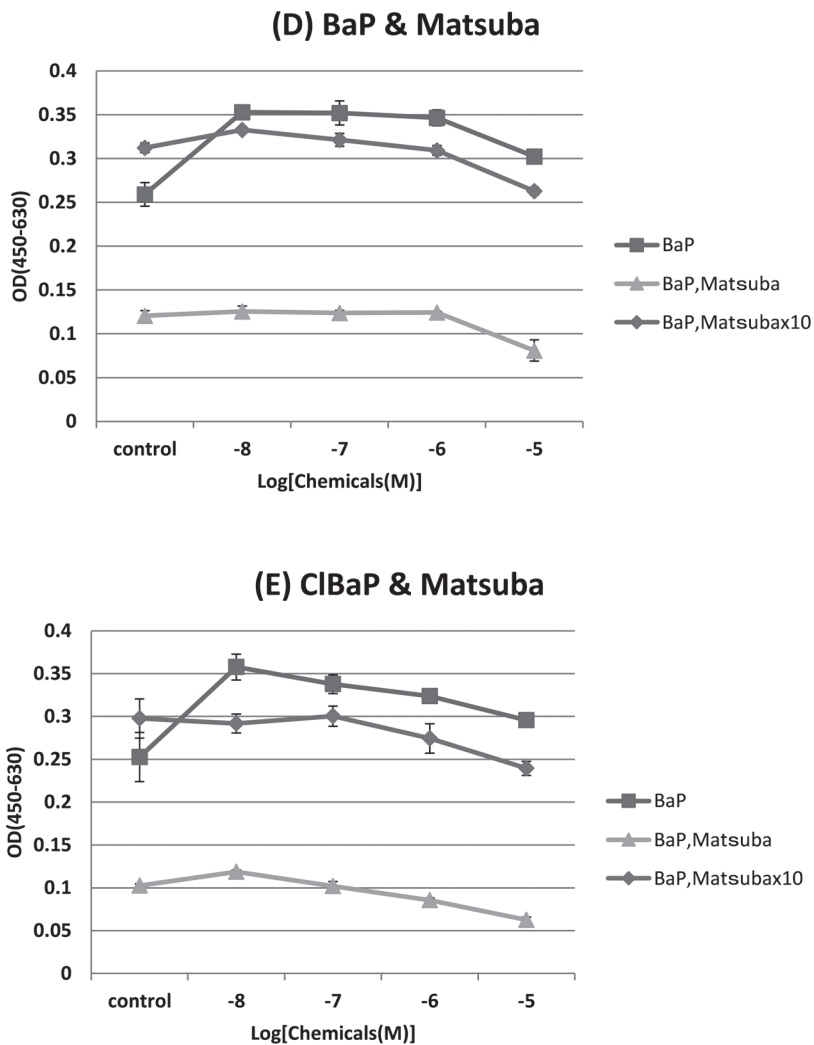


Fig. 4D. E Effects of BaP, ClBaP, and Matsuba on the growth of Mce27 cells. x10: 10-fold dilution.

## 4-3. BaA とハロゲン化 BaA、及び EGCG の効果

BaA、ClBaA、BrBaA で、各濃度を  $10^{-8}$  ~  $10^{-5}$  M に変化させて、Mc $\epsilon$ 27 細胞に曝露した。いずれも細胞増殖を促進する傾向は認められなかった (Fig. 5F, G, H)。ここに、EGCG を  $3 \times 10^{-5}$  M で複合曝露した。 $3 \times 10^{-5}$  M EGCG 単独では、コントロールと同程度の増殖能であったが、BaA、ClBaA、BrBaA との複合曝露では、若干の増殖能の抑制効果が認められた。したがって、EGCG には BaA 及びハロゲン化 BaA の存在下で、増殖抑制効果を示した。

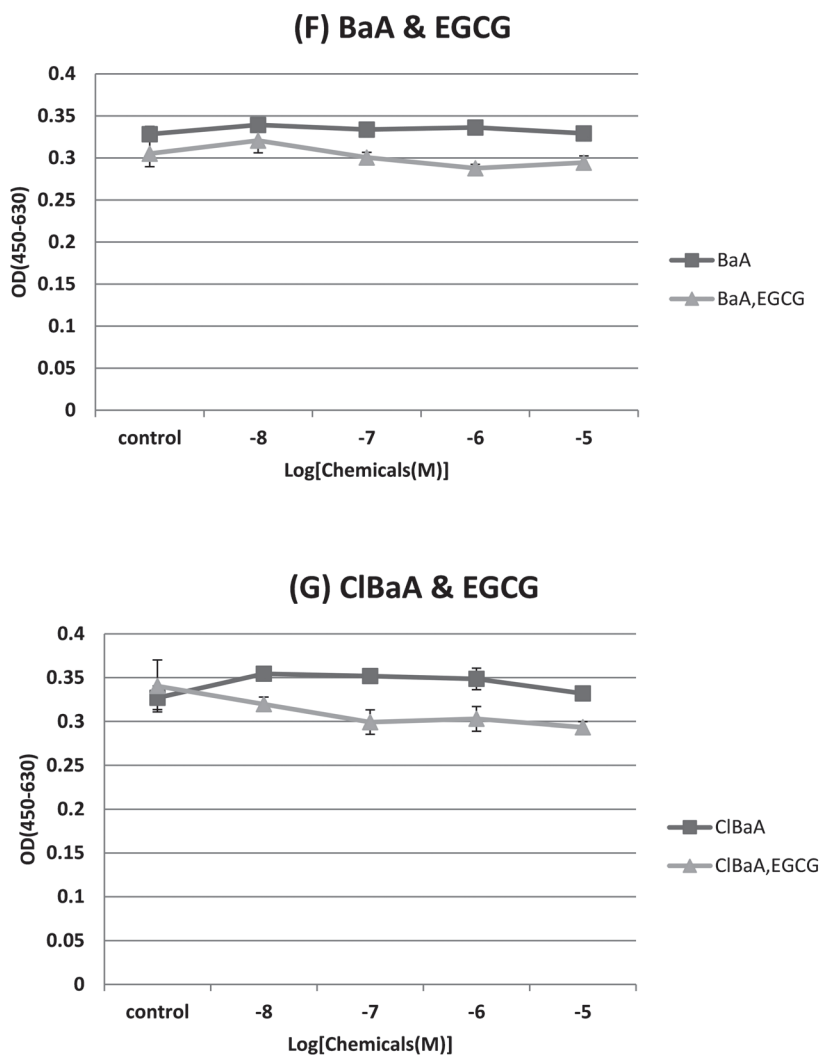


Fig. 5F, G Effects of BaA, ClBaA, and EGCG on the growth of Mc $\epsilon$ 27 cells.  
EGCG:  $3 \times 10^{-5}$  M

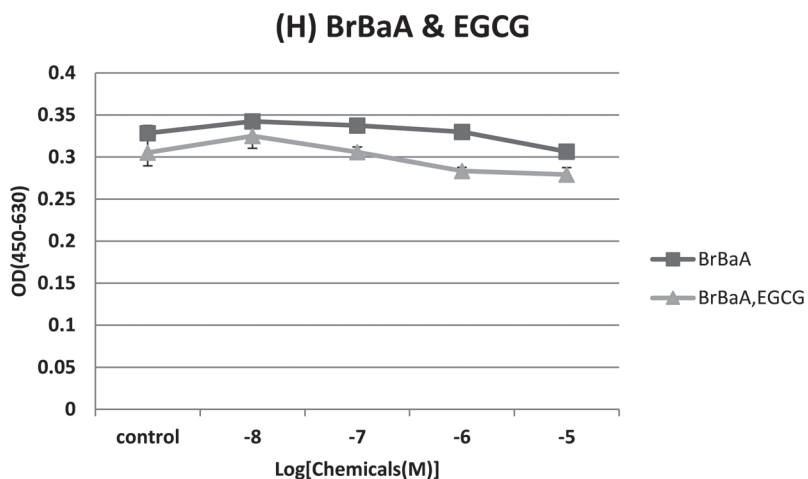


Fig. 5H Effects of BrBaA and EGCG on the growth of MCF7 cells.  
EGCG:  $3 \times 10^{-5}$  M

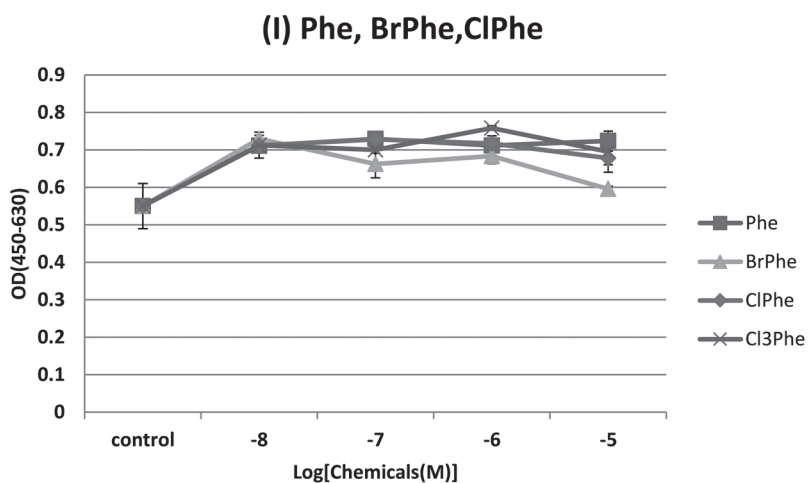


Fig. 6I Effects of Phe, BrPhe, and ClPhe on the growth of MCF7 cells.

#### 4-4. Phe及びハロゲン化Phe

Phe、ClPhe、Cl<sub>3</sub>Phe、BrPheで、各濃度を  $10^{-8}$  ~  $10^{-5}$  M に変化させて、MCF7細胞に曝露した。いずれも細胞増殖を促進する傾向が認められた(Fig. 6I)。したがって、Pheやハロゲン化Pheは、BaPと同様に肥満細胞の増殖を高める物質であることが示唆された。



## 5. 考察

本研究では、PAHs 中の、BaP、BaA、Phe、及びそのハロゲン化物について、肥満細胞 Mcc27 の増殖能に及ぼす影響を調べた。BaA 及びそのハロゲン化物では細胞増殖を促進する傾向は認められなかったが、BaP、Phe、並びにそのハロゲン化物については、細胞増殖能を高めた。このことから、PAHs の中には、肥満細胞の増殖を促進するものもあり、アレルギーの重篤化に関与する可能性も考えられた。

また、今回、植物葉が細胞にどのような影響を及ぼすかを、PAHs との複合曝露を中心に解析し、リスク軽減に寄与するかどうか検証した。筆者らは、既に、乳がん細胞 MCF-7 において、BaA と ClBaA が濃度依存的に細胞増殖能を高めるが、ここに松葉を添加することにより、増殖能が抑制されたことを報告した (9)。今回、肥満細胞 Mcc27 でも、松葉で増殖抑制効果が認められた。EGCG も BaP などの複合曝露により、増殖抑制効果が認められた。したがって、松葉や EGCG には、環境汚染物質の作用を軽減し、それが原因とされる疾患の減少にも寄与できる可能性が考えられた。今後は、遺伝子発現レベルについても解析し、そのメカニズムについても調べる予定である。

## 参考文献

1. Sakakibara, H., Ohura, T., Morita, M., Hirabayashi, S., Kuruto-Niwa, R., Amagai, T., Shimoi K. : Aryl hydrocarbon receptor-mediated gene expression by chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons and cross-talk with estrogen receptors. *Interdiscip. Stud. Environ. Chem.*, 2, 197-202, 2009.
2. Ohura, T., Morita, M., Kuruto-Niwa, R., Amagai, T., Sakakibara, H., Shimoi, K. : Differential action of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons on aryl hydrocarbon receptor-mediated signaling in breast cancer cells. *Environ. Toxicol.*, 25, 180-187, 2010.
3. Kakimoto, K., Nagayoshi, H., Inazumi, N., Tani, A., Konishi, Y., Kajimura, K., Ohura, T., Nakano, T., Tang, N., Hayakawa, K., Toriba, A. : Identification and characterization of oxidative metabolites of 1-chloropyrene. *Chem. Res. Toxicol.*, 26, 1728-1736, 2015.
4. Kamiya, Y., Ikemori, F., Ohura, T. : Optimization of pretreatment and ionization for GC/MS analysis for the determination of chlorinated PAHs in atmospheric particulate samples. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 95, 1157-1168, 2015.
5. Ohura, T., Sakakibara, H., Watanabe, I., Shim, W. J., Manage, P. M., Guruge, K. S. : Spatial and vertical distributions of sedimentary halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons in moderately polluted areas of Asia. *Environ. Pollut.*, 196, 331-340, 2015.

6. Kuruto, R., Ohura, T., Terao, Y. : Effects of the chlorinated derivatives of environmental pollutant on gene expression. *Tokoha Gakuen University Research Review (Faculty of Education)*, 30, 377-391, 2010.
7. Kuruto, R., Yamamoto, S., Ohura, T. : Effects of halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons on gene expression. *Tokoha Gakuen University Research Review (Faculty of Education)*, 33, 279-294, 2013.
8. Kuruto, R., Abe, T., Yoshida, K., Ohura, T. : The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons and their halogenated derivatives on estrogenic action. *Tokoha University Research Review (Faculty of Education)*, 35, 269-290, 2015.
9. Kuruto, R., Aburame, M., Sakurai, S., Ohura, T. : The effects of plant leaves on the action of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Tokoha University Research Review (Faculty of Education)*, 37, 239-253, 2017.
10. Yi, J., Wang, Z., Bai, H., Yu, X., Jing, J., Zuo, L. : Optimization of Purification, Identification and Evaluation of the *in Vitro* Antitumor Activity of Polyphenols from *Pinus Koraiensis* Pinecones. *Molecules*. 20, 10450-10467, 2015.
11. Ortiz-Miranda, A.S., König, P., Kahlert, H., Scholz, F., Osete-Cortina, L., Doménech-Carbó, M.T., Doménech-Carbó, A. : Voltammetric analysis of Pinus needles with physiological, phylogenetic, and forensic applications. *Anal. Bioanal. Chem.*, 408, 4943-4952, 2016.
12. Kitazawa, A., Amagai, T., Ohura, T. : Temporal trends and relationships of particulate chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons and their parent compounds in urban air. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 4592-4598, 2006.
13. Horii, Y., Ok, G., Ohura, T., Kannan, K. : Occurrence and profiles of chlorinated and brominated polycyclic aromatic hydrocarbons in waste incinerators. *Environ. Sci. Technol.*, 42, 1904-1909, 2008.
14. Ishiyama, M., Miyazono, Y., Sasamoto, K., Ohkura, Y., Ueno, K. : A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta*, 44, 1299-1305, 1997.
15. Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K., Watanabe, M. : A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.*, 36, 47, 1999.