調査・資料

ラット好塩基球白血細胞内の β -ヘキソサミニダーゼ遊離に及ぼす
ピレスロイド系及び有機リン系農薬の影響

(平成 12 年 4 月 5 日受理)

田中之雄* 田口修三* 吉田精作*
堀伸二郎* 高垣 裕*Effects of Pyrethroid and Organophosphorus Pesticides on β -Hexosaminidase Release
from Rat Basophilic Leukemia Cells (RBL-2H3)

Yukio TANAKA, Shuzo TAGUCHI, Seisaku YOSHIDA, Shinjiro HORI and Yutaka TAKAGAKI

(Osaka Prefectural Institute of Public Health: 1-3-69, Nakamichi,
Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan)

With the increase of imported foods, the question of the safety of post-harvest pesticides and residual pesticides has become an important topic in food hygiene. On the other hand, allergic diseases such as atopic dermatitis have been increasing steadily, and this might be related to synthetic chemicals in food and the environment. The effect of pesticides on immediate allergic reaction was evaluated using cultured cells (RBL-2H3) instead of conventional methods based on histamine release from mast cells.

Ten kinds of pyrethroid pesticides and 25 kinds of organophosphorus pesticides were investigated for their effects on the enzyme activity of β -hexosaminidase as an index of chemical mediator release from RBL-2H3 cells. We found that pyrethroid pesticides such as permethrin, pyrethrin, and organophosphorus pesticides such as EPN, prothiofos, terbufos promoted β -hexosaminidase release. The release induced by these pesticides was found to be 1.7~2.5 times greater than in the control cells. The promotive action was caused by a concentration of pesticide (200 μ mol/L) which had essentially no effect on cell viability. Thus, it was suggested that this release-promotive action was caused by the promotion of chemical mediator release *via* IgE antibody.

(Received April 5, 2000)

Key words: アレルギー allergy; ラット好塩基球白血細胞 (RBL-2H3) rat basophilic leukemia cell (RBL-2H3); β -ヘキソサミニダーゼ遊離 β -hexosaminidase release; ピレスロイド系農薬 pyrethroid pesticide; 有機リン系農薬 organophosphorus pesticide

緒 言

食品の安全性についての国民の関心は大きなものがあり、なかでも残留農薬に対する不安は根強いものがある。また、近年食品の輸入は年々増加傾向をたどり、ポストハーベスト農薬をはじめとする残留農薬の安全性に関する問題は、食品衛生上の緊急課題となっている。一方、アトピー性皮膚炎や花粉症などのアレルギー疾患は近年増え続けており、この原因として遺伝的な要因に加えて、食品や環境中の合成化学薬品が何らかの影響を及ぼしているものと考えられている。これまで残留農薬の安全性を評価する際には、一般毒性試験や発ガン性、催奇形性などの特殊毒性試験の結果に基づいて残留基準が設定されてきた。しか

し、アレルギー性試験に関しては何ら考慮されていない。

ポストハーベスト農薬を含む農薬類の免疫毒性に関する研究は報告されている^{1)~3)}が、即時型アレルギー反応に及ぼす影響に関する報告⁴⁾は非常に少ない。我が国で平成 11 年 11 月時点で残留基準値⁵⁾が設定されている農薬は 199 種類あり、ピレスロイド剤、有機リン剤、含窒素剤、カーバメイト剤及び有機塩素剤などに分類される。そこで本研究では、まず 10 種類のピレスロイド系農薬及び 25 種類の有機リン系農薬について、培養細胞 (RBL-2H3)⁶⁾を用いて β -hexosaminidase^{7), 8)} (以下 β -HEX と略す) 遊離を指標とする測定方法⁹⁾によって、即時型アレルギー反応に及ぼす影響について検討したので報告する。

* 大阪府立公衆衛生研究所: 〒537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69

実験方法

1. 培養細胞

Rat basophilic leukemia cell (RBL-2H3細胞)⁶⁾ を RPMI-1640 培地 (Sigma 社製) に 3% fetal calf serum (Hy-Clone 社製) 及び 0.2% bovine serum albumin (生化学工業(株)製, Fraction V) を添加した液体メジウムで 37°C, 5% CO₂ 中で培養を行い, 増殖し浮遊した細胞を実験に供した。

2. マウス抗 DNP IgE 抗体のビオチニル化

ハイブリドーマから得て単離精製したマウス抗 DNP-IgE 抗体¹⁰⁾ を前報⁹⁾ に準じてビオチニル化を行った。

3. RBL-2H3 細胞の脱顆粒刺激方法

前報⁹⁾ と同じくビオチニル化マウス抗 DNP-IgE 抗体 (3 µg/mL) とアビジン (1 µg/mL) とのコンプレックスとして細胞の刺激を行った。(なお, アビジンは抗原として用い, ビオチン-アビジン結合反応によって抗原抗体反応を行わせた。)

4. 被験農薬溶液の調製

被験農薬溶液は, 農薬標準品 (関東化学(株)製) をすべてメタノールで 20 mmol/L 濃度となるように溶解し, 更にメタノールで適宜希釈して用いた。なお, ピレトリン標準品に関しては分子量 316.4~374.5 の 6 種類の混合物であるため, 分子量を 350 と仮定して 20 mmol/L 濃度に溶解した。

5. 試薬

測定メジウムは 117 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 2.0 mmol/L CaCl₂, 0.8 mmol/L MgSO₄, 5.6 mmol/L D-glucose, 25 mmol/L HEPES (Sigma 社製) 及び BSA (Sigma 社製, Globulin free) 1 mg/mL を含む溶液で, pH を 7.4 に調整した。

β-HEX 活性の測定時における基質は, 5.0 mmol/L *p*-nitrophenyl-2-acetamide-2-deoxy-β-D-glucopyranoside (ナカライテスク(株)製) 溶液 (0.05 mol/L クエン酸緩衝液, pH 4.5), 反応停止液は 0.2 mol/L グリシン緩衝液 (pH 10.7) を用いた。

その他の試薬はすべて和光純薬工業(株)製を用いた。

6. 測定方法

RPMI-1640 液体メジウム中で増殖し浮遊した RBL-2H3 細胞を, 5×10⁵ cells/well となるように 48 well (Costar 社製) に分注し, CO₂ インキュベーターで 24 時間培養を行った。Well に付着増殖した細胞を浮遊させないように注意深くメジウムを吸引除去し, あらかじめ 37°C に加温した測定メジウムで 2 回洗浄した。ここへあらかじめ調製した 37°C に加温した試験溶液 (測定メジウムに脱顆粒剤として用いたビオチニル化マウス抗 DNP-IgE 抗体とアビジン及び被験農薬溶液 10 µL を加えて全量 1 mL としたもの) を 250 µL/well 加え, 37°C で 1 時間インキュベーション後に細胞外液 100 µL を取り出し, 残液を吸引除去した。次に, 0.2% Triton X-100 を 250 µL/well 加え, 10 分後に細胞溶解液 (細胞内液)

Table 1. Effect of Pyrethroid and Organophosphorus Pesticides on β-Hexosaminidase Release from RBL-2H3 Cells

Pesticide	Relative % release	Pesticide	Relative % release
[Pyrethroid pesticides]			
Cyfluthrin	108.7	Flucythrinate	112.3
Cyhalothrin	113.8	Fluvalinate	107.2
Cypermethrin	108.2	Permethrin	167.4
Deltamethrin	107.1	Pyrethrin	222.3
Fenvalerate	106.1	Tralomethrin	93.5
[Organophosphorus pesticides]			
Acephate	101.6	Malathion	87.6
Chlorpyrifos	102.4	Methamidophos	97.6
Cyanofos	93.9	Phenthoate	99.0
Diazinon	108.3	Phosalone	84.9
Dichlorvos	94.9	Phoxim	115.7
Dimethoate	97.8	Pirimiphosmethyl	109.0
Edifenphos	84.6	Prothiofos	253.1
EPN	169.8	Quinalphos	86.8
Ethoprophos	101.9	Terbufos	169.6
Etrifos	96.6	Thiometon	114.2
Fenitrothion	95.1	Trichlorphon	95.5
Fensulfotthion	85.0	Vamidothion	91.2
Fenthion	105.8		

The cells were stimulated with the reaction mixture, which was prepared by adding 3 µg of biotinylated IgE, 1 µg of avidin (as the stimulator) and 10 µL of a pesticide solution (20 mmol/L in methanol), and diluting to a total quantity of 1 mL with the releasing medium. The final concentration of pesticide solution was 200 µmol/L. All data were mean of determinations with triplicate samples.

100 µL を取り出した。取り出した細胞外液及び細胞内液中の β-HEX の酵素活性を測定した。すなわち基質として, *p*-nitrophenyl-2-acetamide-2-deoxy-β-D-glucopyranoside 溶液 400 µL を加え, 37°C で 30 分間インキュベーションを行い, 反応停止液 1 mL を加えて生成した *p*-nitrophenol を O.D. 405 nm で測定し, β-HEX の Net % release を (1) 式により求めた。

$$\text{Net \% release} = (A - C) / [(A + B) - C] \times 100 \quad (1)$$

A: 細胞外液中の β-HEX 量

B: 細胞内液中の β-HEX 量

C: Control 細胞外液中の β-HEX 量

また, β-HEX の Relative % release は (2) 式により求めた。

$$\text{Relative \% release} = (A/B) \times 100 \quad (2)$$

A: 脱顆粒剤と被験農薬で刺激したときの Net % release

B: 脱顆粒剤で刺激したときの Net % release (25.0%)

なお, RBL-2H3 細胞を脱顆粒剤のみで刺激を行い, その細胞外液 99 µL に被験農薬溶液 (20 mmol/L) 1 µL を加えて β-HEX の酵素活性の測定を行い, 被験農薬溶液が酵素活性そのものに影響しないことを確認した。

Fig. 1. Dose response curves of β -hexosaminidase release and cell viability by permethrin

The results were obtained by treating the cells with the stimulator and the pesticide. Each plotting point was obtained in duplicate.

Fig. 2. Dose response curves of β -hexosaminidase release and cell viability by pyrethrin

For details see Fig. 1.

細胞の生存率はトリパンブルー染色法¹¹⁾で求めた。

実験結果

1. RBL-2H3 細胞内の β -HEX 遊離に及ぼす農薬の影響

被験農薬として10種類のピレスロイド系農薬及び25種類の有機リン系農薬について、*in vitro*におけるRBL-2H3細胞中の顆粒内酵素の β -HEX遊離に及ぼす影響を検討した。その結果をTable 1に示した。

検討したピレスロイド系農薬の中では、ペルメトリン及びピレトリンに、また有機リン系農薬の中では、EPN、プロチオホス及びテルブホスに β -HEX遊離亢進作用が観察され、特にピレトリン及びプロチオホスが非常に強い遊離亢進作用を示した。残り30種類の農薬類は、 β -HEX遊離に対して作用を示さなかった。

2. ピレスロイド系農薬の用量-反応曲線

検討したピレスロイド系農薬の中で、強い β -HEX遊離亢進作用が観察されたペルメトリン及びピレトリンの用

Fig. 3. Dose response curves of β -hexosaminidase release and cell viability by EPN

For details see Fig. 1.

Fig. 4. Dose response curves of β -hexosaminidase release and cell viability by prothiofos

For details see Fig. 1.

量-反応曲線をFig. 1~2にそれぞれ示した。

ペルメトリン及びピレトリンは、 β -HEX遊離率、生存率ともほぼ同じ挙動を示した。すなわち、農薬濃度が100 μ mol/L前後より遊離率が増え始め、150~200 μ mol/Lでは急激な増加を認め、ピレトリンの方がその遊離率は大きかった。細胞の生存率に関しては、両農薬ともいずれの農薬濃度においても99%以上を示した。なお、コントロール実験として農薬のみによる細胞の刺激、農薬とビオチニル化抗DNP-IgE抗体による細胞の刺激及び農薬とアビジンによる細胞の刺激を行ったところ、農薬濃度が200 μ mol/Lでも β -HEX遊離は観察されなかった。

3. 有機リン系農薬の用量-反応曲線

検討した有機リン系農薬の中で、強い β -HEX遊離亢進作用が認められたEPN、プロチオホス及びテルブホスの用量-反応曲線をFig. 3~5にそれぞれ示した。

3種類の有機リン系農薬とも、2項で示したペルメトリン及びピレトリンと同様に β -HEX遊離率、生存率ともほぼ同じ挙動を示した。すなわち、農薬濃度が100 μ mol/L前後より遊離率が増え始め、150~200 μ mol/Lでは急激

Fig. 5. Dose response curves of β -hexosaminidase release and cell viability by terbufos
For details see Fig. 1.

な増加を認め、プロチオホスの遊離率が最も大きかった。細胞の生存率に関しては、3 農薬ともいずれの農薬濃度においても 99% 以上を示した。なお、Fig. 1~2 と同様にコントロール実験として農薬のみによる細胞の刺激、農薬とビオチニール化抗 DNP-IgE 抗体による細胞の刺激及び農薬とアビジンによる細胞の刺激を行ったところ、農薬濃度が 200 $\mu\text{mol/L}$ でも β -HEX 遊離は観察されなかった。

考 察

今までに農薬類の免疫毒性に関する研究は報告されている^{1)~3)}が、即時型アレルギー反応に及ぼす影響に関する報告⁴⁾は非常に少ない。そこで、今回 10 種類のピレスロイド系農薬及び 25 種類の有機リン系農薬について、RBL-2H3 細胞内の β -HEX 遊離に及ぼす影響を検討した（なお、本報で用いた測定方法は、ラット肥満細胞を用いて化学伝達物質としてヒスタミン遊離を指標とする従来の方法¹²⁾に代わって、RBL-2H3 細胞を用いて β -HEX 遊離を指標とする新たな測定方法⁹⁾であり、RBL-2H3 細胞内のヒスタミン遊離を指標とする方法同様に信頼できる方法であることを確認済み¹³⁾である）。その結果、ピレスロイド系農薬のベルメトリン、ピレトリンと有機リン系農薬の EPN、プロチオホス、テルブホスの 5 種類の農薬類に遊離亢進作用が観察された (Table 1)。これらの農薬類は比較的高濃度 (100~200 $\mu\text{mol/L}$) で顕著な遊離亢進作用を示しているが、細胞の生存率にはほとんど影響を与えていない (Fig. 1~5)。また、コントロール実験として農薬のみによる細胞の刺激、農薬とビオチニール化抗 DNP-IgE 抗体による細胞の刺激及び農薬とアビジンによる細胞の刺激を行っても、 β -HEX の遊離は観察されなかった。これらの実験結果から、本亢進作用は農薬の細胞傷害性に起因しない作用メカニズム、すなわち、抗 DNP-IgE 抗体を介した化学伝達物質遊離反応系の亢進によることが示唆された。これらの農薬類の作用点として、RBL-2H3 細胞の IgE レセプターと IgE 抗体との結合反応への作用、リン

脂質メチル化反応及びカルシウムイオン流入反応への作用などが考えられるが、今回の実験だけでは作用点を明らかにすることができなかった。しかし、IgE 抗体を介した遊離亢進作用が示唆された化学物質を初めて見いだしたことは、今後即時型アレルギー反応の亢進作用機序を解明するうえで重要な意味を持つものと考えられる。今回は、同じ基本骨格の化学構造を有するピレスロイド系農薬及びコリンエステラーゼ阻害作用を有する有機リン系農薬について、アレルギー反応に及ぼす影響について検討を行ったが、その構造-活性相関については今後の検討課題である。更に、6 種類の化合物の混合物であるピレトリンについても、真のアレルギー反応亢進活性成分を同定する必要がある。

ポストハーベスト農薬を含む農薬類の免疫毒性に関する報告^{1)~3)}の中で、ピレスロイド系農薬に関しては、山羊の免疫反応に対するフェンバレレート (fenvalerate) の慢性影響が検討され、体液性及び細胞性免疫応答を低下させている¹⁾。有機リン系農薬に関しては、マウスとラットにフェニトロチオン (fenitrothion) の経口投与を行ったところ、溶血斑形成細胞数を低下させ抗体産生能を抑制している²⁾。更に、ホサロン (phosalone) のマウスの免疫応答に対する影響に関する研究では、体液性及び細胞性免疫応答に対する可逆性を認めている³⁾。

一方、農薬類の即時型アレルギー反応に及ぼす影響に関する研究は非常に少ない。佐藤らの報告⁴⁾によると、有機リン系殺虫剤のフェントエート (phenthoate)、ジフェニルエーテル系除草剤のクロルニトロフェン (chlornitrofen) 及びジピリジウム系除草剤のパラコート (paraquat) が、肥満細胞を抗 DNP-IgE 抗体で感作したときにヒスタミン遊離を促進し、この遊離の促進は抗原のない場合や Calcium Ionophore (A23187)、Compound 48/80 による誘導では観察されなかった。また、PCA 反応を試験したところ、フェントエート、パラコートが PCA 反応を促進した。これらの実験結果から、農薬類はアレルギー疾患を悪化させるかもしれないと結論している。また、佐藤らはフェントエート以外の有機リン剤では、フェニトロチオン (fenitrothion) 及びダイアジノン (diazinon) でそれぞれ 10 $\mu\text{mol/L}$ の用量で肥満細胞内のヒスタミン遊離促進を観察している。しかし、著者らの実験結果では、この 3 有機リン剤とも 200 $\mu\text{mol/L}$ の用量で RBL-2H3 細胞内の β -HEX 遊離促進を認めなかった (Table 1)。この結果の相違は、*in vitro* におけるアッセイ方法、特に用いた細胞の違いに起因しているものと考えられた。

以上、本実験結果から、一部の農薬類が即時型アレルギー反応を亢進してアレルギー疾患を悪化させる可能性が示唆された。今後は残留基準値⁹⁾が設定されている農薬類の中から、できるだけ多数の農薬についてアレルギー反応に及ぼす影響について検討する必要があると考える。

文 献

- 1) Singh, K. K., Jha, G. J., Effect of chlonic fenvalerate (synthetic pyrethroid) intoxication on the immune response of goats to *Brucella abortus* strain 19 vaccine. J. Comp. Pathol., **115**, 229-303 (1996).
- 2) Kunimatsu, T., Kamita, Y., Isobe, N., Kawasaki, H., Immunotoxicological insignificance of fenitrothion in mice and rats. Fundam. Appl. Toxicol., **33**, 246-253 (1996).
- 3) Kowalczyk-Bronisz, S. H., Kotz, J., Bubak, B., Pregiel, M., Studies on the effects of organophosphorus pesticide phosalone on mouse immune system. Arch. Vet. Pol., **34**, 221-230 (1994).
- 4) Sato, T., Taguchi, M., Nagase, H., Kito, H., Niikawa, M., Augmentation of allergic reaction by several pesticides. Toxicology, **126**, 41-53 (1998).
- 5) 食品衛生法 “食品、添加物等の規格基準 第一 食品 (D 各条) 穀類, 豆類, 果実, 野菜, 種実類, 茶及びホップ”.
- 6) Barsumian, E. L., Isersky, C., Petrino, M. G., Siraganian, R. P., IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and non-releasing clones. Eur. J. Immunol., **11**, 317-323 (1981).
- 7) Schwartz, L. B., Austen, K. F., Wasserman, S. I., Immunologic release of β -hexosaminidase and β -glucuronidase from purified rat serosal mast cells. J. Immunol., **123**, 1,445-1,450 (1979).
- 8) Schwartz, L. B., Lewis, R. A., Seldin, D., Austen, K. F., Acid hydrolases and tryptase from secretory granules of dispersed human lung mast cells. J. Immunol., **126**, 1,290-1,294 (1981).
- 9) Tanaka, Y., Takagaki, Y., Nishimune, T., Effects of metal elements on β -hexosaminidase release from rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3). Chem. Pharm. Bull., **39**, 2,072-2,076 (1991).
- 10) Liu, F-T., Bohn, J. W., Ferry, E. L., Yamamoto, H., Molinaro, C. A., Sherman, L. A., Klinman, N. R., Katz, D. H., Monoclonal dinitrophenyl-specific murine IgE antibody: preparation, isolation, and characterization. J. Immunol., **124**, 2,728-2,737 (1980).
- 11) Nihon Soshikibaiyo Gakkai ed., “Soshikibaiyo No Gijutu (Technique of tissue culture)”, 2nd Ed., Tokyo, Asakura Shoten, 1988, p. 26-28. (ISBN 4-254-30031-X)
- 12) Shore, P. A., Burkhalter, A., Cohn, V. H., A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. J. Pharmacol. Exp. Ther., **127**, 182-186 (1959).
- 13) Tanaka, Y., Konishi, Y., Takagaki, Y., Effect of spices on β -hexosaminidase release from rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3). Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **38**, 7-11 (1997).