OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ネオニコチノイド系農薬が歯肉上皮のバリア機能に及ぼす影響
Author(s)	玉森, つかさ
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105348
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

ネオニコチノイド系農薬が歯肉上皮のバリア機能に及ぼす影響

大阪大学大学院歯学研究科
口腔科学専攻
口腔感染制御学系部門
予防歯科学講座
玉森　つかさ

本論文の内容の一部は，第 73 回日本口腔衛生学会学術大会（2024，盛岡），第 35 回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会・学術大会（2024，奈良），および第 73 回 JADR 総会・学術大会（2025，デリー，インド）において発表した.

＜要旨＞

タイトジャンクション（TJ）関連タンパクである coxsackievirus and adenovirus receptor（CXADR）は，歯肉上皮におけるバリア機能の発揮に重要な役割を担うことが報告されている．

ネオニコチノイド（neonicotinoid：NN）系農薬はクロロニコチニル系殺虫剤であり，世界中で最も広く使用されている農薬の 1 つである．NN は神経細胞に存在するニコチン性アセチルコリン受容体に結合して神経細胞を過剰に興奮させ，昆虫を死に至らしめる．一方，環境中への高い残留性による NN の生物濃縮が懸念されており，他国ではヒト血中および唾液中からも本農薬が検出されている．そのため，ヒトへの為害性および歯周病との関連も報告されているが，十分な知見は得られていない．そこで，本研究では，TJ 関連タンパク質である CXADR に焦点を当て，NN が歯肉上皮のバリア機能に及ぼす影響を調べた．

2024 年 7 月石川県志賀町にて採取した唾液サンプルから，液体クロマトグラフィー質量分析により 4 種類の NN（acetamiprid，clothianidin，imidacloprid，thiamethoxam）が検出された．次に，NN が歯肉上皮のバリア機能に及ぼす影響を調べるため，上記で検出された濃度の各 NN を混合したものを ΣNNs と定義し，ΣNNs の影響について検討した．不死化ヒト歯肉上皮細胞に ΣNNs を添加することにより，CXADR の発現が減少した．さらに，リソソーム阻害剤である bafilomycin A1 の添加により，ΣNNs による CXADR の発現減少は抑制された．また，ΣNNs を添加した三次元歯肉上皮モデルにおいて，リポ多糖およびペプチドグリカンの上皮透過量が増加した．この透過量の増加は，CXADR の過剰発現により抑制された．

本研究の結果より，ΣNNs は，CXADR のリソソームにおける過剰な分解を惹起し，歯肉上皮のバリア機能を低下させることが示唆された．

＜背景＞

歯周病は，口腔内バイオフィルム細菌により引き起こされる慢性炎症性疾患である．健康な歯周組織に接するバイオフィルムは，口腔微生物叢が宿主との調和を保った病原性の低い symbiosis の状態を維持している．しかし，バイオフィルム周囲の環境変化によって microbial shift が起こり，バイオフィルムが病原性の高い dysbiosis の状態へ移行すると，バイオフィルムの病原性と歯周組織の抵抗性の均衡の崩壊を引き起こすことにより，歯周病が発症すると考えられている[1)]．加えて，歯周病の宿主因子として，全身疾患[2-5)]および年齢[6, 7)]や局所因子の外傷性咬合[8)]および口呼吸[9)]，細菌因子として歯周病菌[10)]，環境因子としての生活習慣[11-13)]およびストレス[14)]など，様々なリスクファクターがその発症に関与すると考えられている．

ネオニコチノイド（neonicotinoid：NN）系農薬は，1990 年代から 2000 年代初頭に導入された農薬であり，穀物，油糧種子，果物，野菜を含む幅広い農作物の栽培に使用されている[15)]．日本では，アセタミプリド（acetamiprid：AcTP），クロチアニジン（clothianidin：CTN），ジノテフラン（dinotefuran：DTR），イミダクロプリド（imidacloprid：ICP），ニテンピラム（nitenpyram：NTP），チアクロプリド（thiacloprid：TCP），およびチアメトキサム（thiamethoxam：TMX）の 7 種類の NN の使用が認められている．NN は農作物に散布された後，残留農薬として作物の表面及び組織内に残り[16)]，昆虫に食べられることにより，その毒性を発揮する．具体的には，NN は神経細胞に存在するニコチン性アセチルコリン受容体に結合して，神経細胞を過剰に興奮させることにより，昆虫を死に至らしめる[15)]．NN はその環境への強い影響[17)]により，一部の国や地域では使用に関する規制や制限が導入されている[16)]．また，環境中への高い残留性[18)]による NN の生物濃縮が懸念されており，ヒトでは，血清，尿，脳脊髄液，精液，母乳，唾液，および抜歯窩の出血からも本農薬が検出され[19-24)]，ヒトへの為害性が指摘されている．例えば，CTN が気管支上皮細胞（BEAS-2B 細胞）に酸化ストレスと DNA 損傷を引き起こすこと[25)]や，ICP が線維芽細胞とアストロサイ

トにリソソーム機能不全とアポトーシスを引き起こすこと [26] が報告されている．さらに，口腔領域では歯周病との関連も報告されている [27] が，十分な知見は得られていない．

ヒト粘膜表面は，多様な微生物に曝露されている [28]．体の表面を覆う上皮は，体の外側と内側の境界面を形成しており，生体防御のバリアとして機能している．上皮のバリア機能の低下あるいは破綻は，外来病原因子の宿主内への侵入を促進し，免疫応答や炎症反応を過度に誘導する結果，感染症や炎症性疾患の発症・重症化に関与する [29]．そして，口腔内においても，歯肉上皮のバリア機能の破綻とそれに続く外来病原因子の侵入，そして過度な炎症応答の惹起が歯周病の発症および進行に関与することが報告されている [30-32]．病原微生物は病原体関連分子パターン（pathogen-associated molecular patterns：PAMPs）と呼ばれる微小な分子モチーフを産生する．PAMPs が細胞表面の Toll 様受容体（Toll-like receptors：TLRs）を活性化することで，炎症を引き起こすシグナル伝達経路が活性化される [33]．PAMPs が歯肉上皮下組織に侵入すると，上皮下組織に存在するマクロファージ，線維芽細胞，骨芽細胞，破骨細胞，抗原提示細胞などの TLRs が活性化される．その結果，様々な炎症性サイトカインにより歯周組織における炎症反応が惹起され，結合組織や歯槽骨の破壊が亢進し歯周病が進行することが知られている [34]．PAMPs の代表的なものとして，グラム陰性菌の内毒素であるリポ多糖（lipopolysaccharide：LPS）や細菌の細胞壁を構成するペプチドグリカン（peptidoglycan：PGN）等が挙げられる [35]．三次元歯肉上皮モデルを用いた研究により，歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis*（*P. gingivalis*）がタイトジャンクション（tight junction：TJ）関連タンパクである coxsackievirus and adenovirus receptor（CXADR）を選択的に分解し，LPS および PGN の歯肉上皮組織への透過量を増加させることが報告されている [36, 37]．この結果から，CXADR が歯肉上皮のバリア機能の発揮に重要な役割を果たしていると考えられる．

そこで本研究では，TJ 関連タンパクである CXADR に焦点を当て，NN が歯肉上皮のバリア機能に及ぼす影響について検討した．

＜材料と方法＞

1.　LC-MS/MS によるヒト唾液中の NN 類の分析

1）サンプル採取

2024 年 7 月に石川県志賀町が主催する特定健診を受診した住民を対象に，安静時唾液の採取を行った．この臨床研究は大阪大学研究倫理審査委員会の承認（R3-M1）を得て，ヘルシンキ宣言の原則および STROBE ガイドラインに基づいて実施された．参加者 177 名から書面によるインフォームドコンセントを得た．その内の参加者 20 名から唾液の採取の同意を得ることができなかったため, 157 名の参加者に, 氷上に置かれた 50 mL 遠沈管（430052, Corning，Corning，NY）に 10 分間安静時唾液を吐出させ，採取した．その後，157 サンプルを液体窒素で凍結し，分析まで-80℃で保存した．そして，その中から 16 サンプルを抽出した．そのうち男性が 7 名，女性が 9 名であり，年齢層は 43 歳から 78 歳だった．この 16 サンプルにおいて，AcTP，CTN，DTR，ICP，NTP，TCP，および TMX の 7 種類の NN に関連する物質を対象とした液体クロマトグラフィー質量分析（liquid chromatography-mass spectrometry：LC-MS/MS）を Infinity Lab（山形，https://www.infinity-lab.jp/index.html）にて実施した．同位体標識内部標準物質である AcTP-d3（39241，Sigma Aldrich，St.Louis，MO），CTN-d3（56816，Sigma Aldrich），DTR-d3（99053207，HAYASHI，大阪），ICP-d4（34170，Sigma Aldrich），TCP-d4（30673，Sigma Aldrich），TMX-d3（38176，Sigma Aldrich），および NTP 内部標準物質（CNLM-10545，Cambridge Isotope Laboratories，Tewksbury，MA）は，記載の会社から購入した．

2）サンプルの前処理

唾液サンプルは，先行研究のプロトコル [22, 38, 39] に若干の変更を加えた方法で抽出した．唾液サンプルを 6 つの内部標準物質を含む 0.025 ng/mL アセトニトリルに加え，ボルテックスで混和した．混和したサンプルは，20,389×g で 10 分間遠心分離を行い，得られた上清を等量ずつ 4 本の限外濾過フィルターに分注した．次に，各フィルターを用いて 14,000×g で

60 分間の遠心濾過を実施した．濾過後，4 本のチューブのうち 1 本の濃縮物を 50% アセトニトリルにより再溶解し，この再溶解液を残りの 3 本のチューブに添加した．添加した混合液は，同様の条件下で再度濃縮を行い，最終的に得られた再溶解液を測定用サンプルとして使用した．

3）LC-MS/MS 分析

LC-MS/MS 分析には，高速液体クロマトグラフィー（Agilent 1290 infinity LC system；Agilent Technologies，Santa Clara，CA）を三連四重極型質量分析計（triple quadrupole mass spectrometer：QqQMS，MS/MS，Agilent 6470B Triple Quadrupole Mass Spectrometer；Agilent Technologies）に接続したシステムを使用し，各パラメーターを以下のように設定した；drying gas temperature：300℃，drying gas flow：10 L/min，Nitrogen gas，nebulizer pressure：40psi，sheath gas temperature：200℃，sheath gas flow：12 L/min，capillary voltage：4000 V．対象となる分析物の同定にはエレクトロスプレーイオン化法，定量には多重反応モニタリング（Multiple Reaction Monitoring：MRM）モードを用いた．LC における分離には，内径 2.1mm，長さ 50mm，粒子径 1.8μm の Agilent ZORBAX SB-C18（Agilent Technologies）および Rapid Resolution HT（Agilent Technologies）を分析カラムとして使用した．注入量は 1μL とし，オーブン温度は 45℃に保った．移動相には 0.1% ギ酸，5 mM ギ酸アンモニウム，および水を混合した溶液（溶媒 A），およびメタノール（溶媒 B）を使用した．グラジエント溶離は流速 0.3 mL/min で，以下のように行った．0-0.5min，5% 溶媒 B；0.5-6min，5-62%，6-7min，62-100%，7-9min，100％，保持時間 4min．データの取得および解析は，MassHunter（Agilent MassHunter Workstation ver.10.1.733.0；Agilent Technologies）により行った．

2.　細胞の培養条件および三次元歯肉上皮モデルの作製

ヒト不死化歯肉上皮細胞[40]［Immortalized Human gingival epithelial cells：IHGE 細胞（epi 4 cell）］は，大阪大学 大学院歯学研究科 村上伸也教授より供与され，表皮角化細胞増殖無

血清液体培地（Humedia-KG2，Kurabo，大阪）を用いて培養した．

三次元歯肉上皮モデルは Nishiguchi らの細胞集積法で作製した [41]．トリプシン処理後に遠心分離して回収した IHGE 細胞を，phosphate buffered saline（PBS，pH7.4）に溶解した 0.2 mg/mL フィブロネクチン（Sigma-Aldrich）で 1 分間反応させた．その後，180×g で 2 分間の遠心分離を行い，吸収されなかったポリマーを除去した．次に，細胞を 0.1 mg/mL ゼラチン液（Nacalai Tesque，京都）にて 1 分間反応させ，180×g で 2 分間の遠心分離を行い，吸収されなかったポリマーを除去した．これらの処理を 3 回繰り返し，IHGE 細胞上にフィブロネクチンおよびゼラチンを交互に薄膜上に積層させた. そして, PBS に溶解した 0.2 mg/mL フィブロネクチンを底面に塗布した 24 ウェルプレート（Iwaki，東京）に設置したカバースリップ上に，IHGE 細胞を 2×10^6 個播種し，36 時間培養することで三次元歯肉上皮モデルを作製した．

3.　NN の調整

1）各 NN の調整

LC-MS/MS によるヒト唾液中の NN 類の分析の結果より, AcTP（Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Germany），CTN（Tokyo Chemical Industry，東京），ICP（Tokyo Chemical Industry），および TMX（Tokyo Chemical Industry）を，Humedia-KG2 を用いて，4.11 pg/mL，22.3 pg/mL，16.7 pg/mL，8.46 pg/mL の濃度に希釈調整し，実験に使用した．

2）ΣNNs の調整

ΣNNs は，AcTP，CTN，ICP，および TMX を，Humedia-KG2 を用いて上記の濃度に希釈調整したものを混合して実験に使用した．

4.　CXADR 過剰発現株の作製

pCMV-HA-CXADR を，pMRX-IRES-Puro（大阪大学 大学院歯学研究科 古田信道助教より供与）に，制限酵素 BamHI および NotI を用いて挿入し，pMRX-IRES-Puro-CXADR を作製した．FuGENE 6 Transfection Reagent（Promega，Madison，WI）を用い，pMRX-IRES-Puro-CXADR プラスミドを IHGE 細胞に形質導入した．形質導入から 3 日後，CXADR を安定発現する IHGE 細胞を Puromycin（2 μg/mL，InvivoGen，San Diego，CA）にて選択培養し，CXADR 過剰発現株として用いた [36]．

5. ウェスタンブロット法

ウェスタンブロット法は Takeuchi らの方法で行った [42]．IHGE 細胞を 10%（v/v）トリクロロ酢酸（Nacalai Tesque）で処理し，0.1% Tween-20 含有 8M 尿素液にて変性・溶解し，遠心分離により上清を回収して試料とした．抽出した試料を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis（SDS-PAGE）で分離し，ニトロセルロースメンブレン（0.2 μm，Bio-Rad，Hercules，CA）に転写した．転写後，3%（w/v）スキムミルクを添加した 0.1% Tween-20 含有 PBS（phosphate buffered saline with Tween 20：PBST）にメンブレンを移し，室温で 15 分振盪してブロッキングを行った．次に，PBST で 5000 倍希釈した一次抗体液にメンブレンを移し，室温で 1 時間振盪した．一次抗体として以下のものを使用した；mouse monoclonal anti-β-ACTIN（A2228，Sigma-Aldrich），rabbit monoclonal anti-CXADR（10799-R271，Sino Biological，Beijing，China）．メンブレンを PBST で 3 回洗浄後，PBST で 5000 倍希釈した horseradish peroxidase（HRP）標識二次抗体液に移し，室温で 1 時間振盪した．二次抗体として goat anti-mouse antibody conjugated to HRP（7076，Cell Signaling Technology，Danvers，MA），および goat anti-rabbit antibody conjugated to HRP（7074，Cell Signaling Technology）を使用した．メンブレンを PBST で 3 回洗浄後，免疫反応を示したバンドのタンパク量を Pierce ECL Western Blotting Substrate（Thermo Fisher Scientific，Waltham，MA），ChemiDoc XRS（Bio-

Rad), Quantity One software package (Bio-Rad), および ImageJ ソフトウェア ver.1.54p (National Institutes of Health, Bethesda, MD, https://imagej.net/ij/) にて解析した.

6. 免疫染色

免疫染色は Tekeuchi らの方法で行った[42]. IHGE 細胞を, PBS に溶解した 0.2 mg/mL フィブロネクチン (Sigma-Aldrich) を底面に塗布した 12 または 24 ウェルプレート (Iwaki) 内のカバーガラス (松浪硝子工業, 大阪) 上に, 培養した. IHGE 細胞の固定は, 4% paraformaldehyde phosphate buffer solution (WAKO, 大阪) を使用した. 透過処理は, PBS に Triton X-100 (WAKO) を濃度 0.1% (v/v) で溶解したものを使用した. ブロッキングには, PBS に gelatin (1631-92, Sigma-Aldrich) を濃度 0.1% (w/v) で溶解させたものを使用した. 次に, 固定した細胞サンプルを PBS で 500 倍希釈した一次抗体液と室温で 1 時間反応させた. 一次抗体として以下のものを使用した; rabbit monoclonal anti-CXADR (10799-R271, Sino Biological), mouse monoclonal anti-HA (3724, Cell Signaling Technology), および mouse monoclonal anti-lysosomal associated membrane protein 1 (LAMP1 ; sc-20011, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). さらに細胞サンプルを PBS で 3 回洗浄した後, 二次抗体反応を室温で 1 時間行った. 二次抗体として以下のものを使用した ; fluorescein isothiocyanate (FITC) -conjugated goat anti-mouse IgG (A-11001, MBL, 名古屋), Alexa Fluor 555-conjugated goat anti-rabbit IgG (ab150078, Invitrogen, Carlsbad, CA), および Alexa Fluor 555-conjugated goat anti-mouse IgG (ab150114, Invitrogen). IHGE 細胞の核染色には 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI ; D1306, Invitrogen), アクチン染色には Alexa Fluor 633-conjugated phalloidin (A22284, Invitrogen) を使用した. 細胞サンプルを PBS で 3 回洗浄した後, VECTASHIELD Mounting Medium (VECTOR LABORATORIES, Burlingame, CA) を用いてスライドガラス (松浪硝子工業) に試料を封入した. 細胞の観察は開口数 1.4 の 64× 油浸対物レンズを用

いて共焦点顕微鏡（TCS SP8；Leica Microsystems，Wetzlar，Germany）にて行い，Application Suite X ソフトウェアパッケージ ver.4.5.0.25531（Leica Microsystems）にて解析した．

7.　リアルタイム PCR 法

RNeasy Micro キット（Qiagen, Hilden, Germany）を用い, IHGE 細胞から messenger ribonucleic acid（mRNA）を抽出し，ReverTra Ace qPCR RT Master Mix（Toyobo，大阪）を用いて complementary deoxyribonucleic acid（cDNA）を合成した．遺伝子の増幅は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix（Toyobo）を用い，増幅の測定は Rotor Gene Q（Qiagen）を用いた．本研究で使用したプライマーを表 1 に示す．各サンプルにおける増幅産物は，ΔΔCt 法により，*β-ACTIN* mRNA 含有量と比較して定量化した．

8.　IHGE 細胞のバリア機能の評価

三次元歯肉上皮モデルの透過性実験は，Takeuchi らの方法で行った[42]．FITC-*P. gingivalis* LPS および FITC-*Streptoccocus aureus*（*S. aureus*）PGN は，*P. gingivalis* LPS（InvivoGen）および *S. aureus* PGN（Sigma-Aldrich）を Fluorescein Labeling Kit-NH2（LK01，DOJINDO，熊本）で標識し作製した. IHGE 細胞を細胞培養インサート（12-well cell culture insert，Corning）上で，NN を含む培養培地で 3 日間培養した．さらに，各種トレーサーを含む培地で 6 時間培養後，上皮細胞層を透過したトレーサー量を 1420 ARVO X（PerkinElmer，Waltham，MA）および WorkOut Plus software（PerkinElmer）を用いて測定した．

9.　統計学的解析

各サンプル群間の有意差は *t* 検定で検討した. 解析には Excel application ver.2205（Microsoft, Redmond，WA）を用いた．$p < 0.05$ を有意差ありとした．

＜結果＞

1. ヒト唾液中に存在する NN の検出

本研究で採取した 16 のヒト唾液サンプルにおいて，AcTP，CTN，DTR，ICP，NTP，TCP，および TMX の 7 種類の NN に関連する物質を対象とした LC-MS/MS 分析を行った．その結果，この 16 サンプルから最も多く検出された TMX は 81.3%，次いで AcTP は 56.3%，ICP は 43.8%，CTN は 18.6%の割合で，それ以外の物質は定量下限値以下のピークしか検出されなかった（表 2）．NN が検出された唾液サンプルの AcTP，CTN，ICP，および TMX の陽性者の平均濃度は，4.11 pg/mL，22.3 pg/mL，16.7 pg/mL，および 8.46 pg/mL であった．

2. 各 NN が IHGE 細胞における CXADR の発現に及ぼす影響

各 NN が IHGE 細胞における CXADR の発現に及ぼす影響について調べた．AcTP，CTN，ICP，および TMX の 4 種類の各 NN を濃度 4.11 pg/mL，22.3 pg/mL，16.7 pg/mL，および 8.46 pg/mL に調整し，IHGE 細胞を，各 NN を含む培養培地で培養した．1 日，2 日，および 3 日間の培養後，細胞を CXADR 抗体で免疫染色し，共焦点顕微鏡で観察した．AcTP あるいは TMX の添加により，細胞膜上に局在する CXADR は 2 日目まで時間依存的に減少し，その後も緩やかな減少が続いた（図 1A・D）．CTN では 1 日目に大きく減少し，その後は緩やかな減少に移行し（図 1B），ICP では 3 日目まで時間依存的に減少した（図 1C）．これらの結果から，各 NN の添加により，細胞膜上に局在する CXADR が減少することが示された（図 1）．

3. ΣNNs が IHGE 細胞における CXADR の発現に及ぼす影響

先行文献では，複数の NN が抜歯窩からの出血および唾液から検出された [22]．本研究では，4.11 pg/mL の AcTP，22.3 pg/mL の CTN，16.7 pg/mL の ICP，および 8.46 pg/mL の TMX を混合したものを ΣNNs と定義し，ΣNNs が歯肉上皮のバリア機能に及ぼす影響を調べた．

まず，ΣNNs が IHGE 細胞における CXADR の発現に及ぼす影響について調べた．IHGE 細胞を，ΣNNs を含む培養培地で 1 日，2 日，および 3 日間培養した．その結果，細胞膜上に局在する CXADR が時間依存的に減少した（図 2）．次に，ΣNNs が IHGE 細胞における CXADR のタンパク量に及ぼす影響について調べた．IHGE 細胞を，ΣNNs を含む培養培地で 3 日間培養した．その結果，CXADR のタンパク量が有意に減少した（図 3）．さらに，ΣNNs が IHGE 細胞における *CXADR* の mRNA 発現量に及ぼす影響について調べた．IHGE 細胞を，ΣNNs を含む培養培地で 3 日間培養した．その結果，*CXADR* の mRNA 発現量は有意に増加した（図 4）．これらの結果から，ΣNNs による細胞膜上の CXADR の減少は，遺伝子発現の減少ではなく，翻訳後のタンパク量の減少によることが示唆された．

4．ΣNNs による CXADR の細胞膜からリソソームへの局在の移行

リソソームは細胞内分解の主要な場として機能し，膜タンパク質の恒常性の維持に重要な分解機構を担っている [43]．そこで，NN の添加により，CXADR がリソソームへ過剰に輸送された結果，本タンパク質の過剰な分解および細胞膜上における発現の減少に繋がっている，という仮説を立てた．この仮説を検証するため，リソソームの機能を阻害する薬剤として知られる bafilomycin A1[44] を用いた実験を実施した．

Bafilomycin A1 が ΣNNs を添加した IHGE 細胞における CXADR の局在に及ぼす影響を調べた．まず，IHGE 細胞を，ΣNNs を含む培養培地で 2 日間培養した．5 nM の bafilomycin A1 を添加して 1 日後，bafilomycin A1 を添加した細胞では，ΣNNs による細胞膜上の CXADR の減少は抑制された（図 5）．次に，IHGE 細胞を，ΣNNs を含む培養培地で 2 日間培養した．5 nM の bafilomycin A1 を添加して 1 日後，CXADR 抗体とリソソームのマーカーである LAMP1 抗体で免疫染色し，共焦点顕微鏡で観察した．その結果，ΣNNs と bafilomycin A1 で処理した細胞では，コントロール群および ΣNNs 単独処理群と比較し，CXADR と LAMP1 の顕著な共局在を認めた（図 6）．これらの結果から，ΣNNs による細胞膜上の CXADR の減

少は，CXADR のリソソームでの過剰な分解によるものであることが示唆された．

5．ΣNNs による CXADR タンパクの減少が三次元歯肉上皮モデルの異物透過性に及ぼす影響

次に，歯肉上皮のバリア機能を評価するため，40 kDa dextran，LPS，および PGN を用いた異物透過性実験を行った．ΣNNs が三次元歯肉上皮モデルの異物透過性へ及ぼす影響に，CXADR が関与しているかを調べるため，HA タグタンパクを挿入した CXADR を過剰発現させた IHGE 細胞を作製した[36]．免疫染色の結果，CXADR の強制発現細胞における，HA 抗体に陽性のシグナルが確認された（図 7）．加えて，ΣNNs を含む培養培地で 3 日間培養した IHGE 細胞（野生株あるいは CXADR 過剰発現株）を CXADR 抗体で免疫染色した．その結果，CXADR の過剰発現株では，野生株の IHGE 細胞と比較し，ΣNNs による細胞膜上の CXADR の減少は抑制された（図 8）．

次に，ΣNNs による CXADR タンパクの減少が三次元歯肉上皮モデルの異物透過性に及ぼす影響を調べた．細胞集積法にて三次元歯肉上皮モデル（野生株あるいは CXADR 過剰発現細胞株）を作製した．作製した三次元歯肉上皮モデル（野生株あるいは CXADR 過剰発現細胞株）の重層扁平上皮構造は，DAPI および phalloidin で免疫染色し，共焦点顕微鏡で観察した（図 9）．そして，三次元歯肉上皮モデル（野生細胞株あるいは CXADR 過剰発現細胞株）を，細胞培養インサート上にて，ΣNNs を含む培養培地で 3 日間培養した．さらに，蛍光トレーサーを含む培養培地で 6 時間培養後，40 kDa dextran，LPS，および PGN の組織透過量を分光光度計で測定した．その結果，ΣNNs を添加した三次元歯肉上皮モデルでは，非添加のモデルと比較し，40 kDa dextran の透過量が 503.9%，LPS の透過量が 42.0%，PGN の透過量が 77.1%増加した（図 10）．また，CXADR を過剰発現させた三次元歯肉上皮モデルでは，野生細胞株のモデルと比較し，ΣNNs による 40 kDa dextran，LPS，および PGN の透過量の増加が抑制された（図 10）．さらに，CXADR を過剰発現させた三次元歯肉上皮モデ

ルでは，野生細胞株のモデルと比較し，40 kDa dextran，LPS，および PGN の透過が抑制された（図 10）. これらの結果から, ΣNNs による歯肉上皮組織の異物透過性の増加には CXADR タンパクの減少が関与している可能性が示された.

＜考察＞

本研究では，NN の LC-MS/MS を用いた超精密定量分析法を確立するにあたり，予備検討を含む条件の最適化に多くの時間を要した．その結果，十分な数の臨床サンプルを測定することが難しく，歯周炎症表面積（periodontal inflamed surface area：PISA）など歯周病の臨床指標と NN の検出濃度との相関を統計的に検出する N 数を設定することができなかった．今回の *in vitro* での実験結果を踏まえ，今後はサンプル数を増やし，統計的な信頼性を求めた関連解析を行うことが可能と考えられる．

CXADR の細胞内ドメイン（intracellular domain：ICD）には，S-アシル化によるパルミトイル化を受けるシステイン残基（Cys259 および Cys260）が存在しており，これらの修飾は膜結合型 CXADR の細胞内移行およびリサイクルに不可欠であることが報告されている[45]．パルミトイル化は，脂肪酸であるパルミチン酸がシステイン残基に共有結合する翻訳後修飾であり，タンパク質の疎水性を高めることで細胞膜への結合性を促進する．さらに，この修飾は可逆的であるため，細胞内での CXADR の局在や輸送経路を動的に制御する機能も担っている．加えて，CXADR の ICD には PDZ 結合モチーフが含まれており，このモチーフを介して複数の PDZ ドメイン含有タンパク質と相互作用する．PDZ ドメインは，他のタンパク質の C 末端に存在する特定の配列を認識して結合する構造モチーフであり，細胞膜近傍においてシグナル伝達複合体の形成や細胞接着構造の安定化，細胞極性の維持などに重要な役割を果たす．CXADR と結合する代表的な PDZ ドメイン含有タンパク質[46]としては，ZONULA OCCLUDENS-1（ZO-1）[47]，membrane-associated guanylate kinase with inverted domain structure-1（MAGI-1）[48]，protein interacting with C kinase 1（PICK1）[46]，postsynaptic density protein 95（PSD-95）[46]，multi-PDZ domain protein-1（MUPP-1）[49]，および ligand-of-numb protein-X（LNX）[50]などが挙げられる．これらの PDZ ドメイン含有タンパク質との相互作用は，CXADR の細胞内局在および機能的維持に重要な役割を果たしており，これらの結合が阻害されることで CXADR の細胞内輸送経路が変化し，リソソームへの過剰な輸送

が誘導される可能性がある．NN への曝露によって CXADR のパルミトイル化が阻害され，さらに PDZ ドメイン結合タンパク質の機能不全が誘導される場合，これらの分子機構が CXADR の細胞内輸送の異常に関与している可能性が示唆される．

オートファジーは，障害を受けたタンパク質やオルガネラをオートファゴソームに隔離し，リソソームと融合させて分解することで細胞内恒常性を維持する主要な分解経路であり，酸化ストレスや栄養飢餓などの細胞内ストレス応答の制御にも重要な役割を果たすことが知られている[51, 52]．オートファジーが障害されると，分解されるべき基質が細胞内に蓄積し，リソソーム負荷の増大や機能不全を引き起こすことが報告されている[53]．加えて，エンドソーム-リソソーム系は，膜タンパク質が内在化された後，初期エンドソームから後期エンドソームを経てリソソームへと輸送され分解される経路を指し，リサイクルとのバランスによって膜タンパク質の恒常性の維持に重要な役割を担っている[54]．一方，ICP はアストロサイトおよび線維芽細胞においてオートファジー障害を誘導することが報告されている[26]．これらの知見から，NN 曝露に伴うオートファジー障害が，分解されるべきタンパク質やオルガネラの蓄積を介して，リソソーム負荷を増大させる可能性がある．リソソームはオートファジーだけではなく，エンドソーム-リソソーム系における細胞内分解にも共通して利用されるため，オートファジー障害に伴うリソソーム負荷の増大は，膜タンパク質のリサイクルと分解のバランスにも影響を及ぼす可能性がある．その結果として，膜タンパク質の輸送に影響を及ぼしている可能性がある．

NN は歯周病菌・喫煙・糖尿病などの既知の歯周病のリスクファクターと比較して，全世代に広く曝露されている[55]．これまでの報告では，小児の脳脊髄液・血漿・尿から複数の NN が検出されたとの報告があり[21, 56]，発達期における NN の曝露の影響が懸念されている．また，各食品に残留している NN の量が個別には基準値以下であっても，一日の累積量では過剰となっている可能性が指摘されている．さらに，NN は主に肝酵素およびアルデヒドオキシダーゼによって代謝されることが知られ[57, 58]，その代謝産物は全身に分布する[19–

[24]．実際に，NN の代謝産物が唾液および抜歯窩からの出血から検出されることが報告されている [22]．加えて，NN は，脂質異常症 [59]・グルコース恒常性の破綻 [60]・小児の神経発達障害 [61] など，多様な全身疾患に関連することが報告されている．今回のヒト代替組織を用いた研究が，各臓器や組織における NN の影響についての解析に繋がる可能性がある．

生体は常に外界からの物理的・化学的・生物学的刺激にさらされており，これらの有害因子から組織や器官を保護するため，複数のバリア機構を備えている．これらのバリアは，選択的透過性・免疫調節・シグナル伝達などの高度な機能を有しており，個々の組織の恒常性維持に不可欠である [53-66]．代表的なバリアとして，血液脳関門・血液脳脊髄液関門・血液精巣関門・血液乳関門・胎盤関門・腸管バリアなどが挙げられる．これらは主に TJ を介した上皮細胞または内皮細胞の接着構造によって形成され，分子量・電荷・脂溶性・炎症性などに基づいて物質の通過を制御する．TJ の構成要素としては，OCCLUDIN・CLAUDIN-1・ZO-1 などのタンパク群に加え，CXADR の発現が確認されている [67]．CXADR は，血液脳脊髄液関門・精巣・乳腺・腸管上皮などにおいて TJ の構造的安定性を支えるとともに，ウイルス受容体やシグナル伝達分子としての機能も併せ持つことが報告されている [68]．これらのバリア機能の破綻は，神経疾患・不妊症・炎症性疾患・感染症など多岐にわたる病態の発症に関与する可能性がある [23, 27, 69, 70]．近年，哺乳類において NN が腸管から吸収され，血液脳関門および胎盤関門を通過することが示されている [71]．また，卵胞液中から複数の NN が検出されており，特に AcTP，ICP，および TMX の濃度は，成熟卵母細胞数および良好胚数の減少と関連していると報告されている [70]．さらに，精液中からも複数の NN が検出され，ICP の濃度は精子の運動率の低下と関連していると報告されている [23]．このように，NN が各関門における TJ 関連タンパクに及ぼす影響の解析が上記疾患の病態理解に繋がる可能性がある．

本研究の結果は，NN が歯肉上皮組織のバリア機能を阻害する可能性を示しており，NN と歯周病発症との詳細な関連解析に繋がると考えている．農薬の実用化に際しては安全域

の確立が不可欠であり，ヒトの健康への影響が少ない NN の閾値濃度を定義する必要があるが，これに対するヒト組織を用いた研究はほとんど行われていない．農薬の使用は，農業生産性の維持に不可欠な手段である一方，ヒトの健康や周辺環境への影響を最小限に抑えるための適正化が重要である．今後は，*in vitro* におけるヒト組織を用いた形態学的解析および歯周病を中心とした歯科疾患の臨床疫学的調査を組み合わせ，NN の生体への影響について評価を行う必要がある．

＜結論＞

本研究の結果より，唾液中に検出された濃度の AcTP，CTN，ICP，および TMX により構成される ΣNNs は，歯肉上皮細胞において，CXADR のリソソームにおける過剰な分解を引き起こすことが示された．また，ΣNNs による歯肉上皮組織の異物透過性の増加に，CXADR タンパクの減少が関与している可能性が示された．本研究は，NN による歯肉上皮のバリア機能低下の分子メカニズムについての初めての検討である．

＜謝辞＞

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えていただき，終始にわたりご懇篤なるご指導とご教授を賜りました大阪大学 大学院歯学研究科 予防歯科学講座 久保庭雅恵教授に深甚なる謝意を表します．また，本研究を進めるにあたり，直接のご指導とご鞭撻を賜りました同予防歯科学講座 竹内洋輝講師に深謝いたします．最後に，本研究に際し，幅広いご援助とご協力をいただきました予防歯科学講座の諸先生方に厚く御礼を申し上げます．

＜参考文献＞

1) Lamont, R. J., Koo, H. and Hajishengallis, G. (2018) : The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol*, **16**, 745-759.

2) Löe, H. (1993) : Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **16**, 329-334.

3) Faria, C. C., Almeida, R. S. F., Evangelista, C. D., Lopes, D. K., Ribeiro, L. C. and Almeida, R. R. (2016) : Salivary Periodontopathic Bacteria in Children and Adolescents with Down Syndrome. *PLoS One*, **11**, e0162988.

4) Tanigaki, K., Tamamori, T., Sasaki, N., Matsumura, R., Yamaga, S., Sakanaka, A., Amano, A., Matsusaki, M., Takeuchi, H. and Kuboniwa, M. (2025) : *HAX1*, gene responsible for Kostmann syndrome, regulates gingival epithelial barrier function via intracellular trafficking of JAM1. *Front Cell Dev Biol*, **13**, 1624718.

5) Tanigaki, K., Matsumura, R., Sasaki, N., Kato, Y., Tamamori, T., Yamaga, S., Nakamura, E., Sakanaka, A., Kuboniwa, M., Matsusaki, M., Amano, A. and Takeuchi, H. (2024) : *SLC37A4*, gene responsible for glycogen storage disease type 1b, regulates gingival epithelial barrier function via JAM1 expression. *Sci Rep*, **14**, 24797.

6) Li, S., Wen, C., Bai, X. and Yang, D. (2024) : Association between biological aging and periodontitis using NHANES 2009-2014 and mendelian randomization. *Sci Rep*, **14**, 10089.

7) Zhu, L., Tang, Z., Hu, R., Gu, M. and Yang, Y. (2023) : Ageing and Inflammation: What Happens in Periodontium? *Bioengineering (Basel)*, **10**, 1274.

8) Passanezi, E. and Sant'Ana, A. C. P. (2019) : Role of occlusion in periodontal disease. *Periodontol 2000*, **79**, 129-150.

9) Bhatia, A., Sharma, R. K., Tewari, S. and Narula, S. C. (2015) : A randomized clinical trial of salivary substitute as an adjunct to scaling and root planing for management of periodontal

inflammation in mouth breathing patients. *J Oral Sci*, **57**, 241-247.

10) Holt, S. C., Ebersole, J., Felton, J., Brunsvold, M. and Kornman, K. S. (1987) : Implantation of Bacteroides gingivalis in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. *Science*, **239**, 55-57.

11) Bergström, J. (1989) : Cigarette smoking as risk factor in chronic periodontal disease. *Community Dent Oral Epidemiol*, **17**, 245-247.

12) Ojima, M., Hanioka, T., Tanaka, K., Inoshita, E. and Aoyama, H. (2006) : Relationship between smoking status and periodontal conditions: findings from national databases in Japan. *J Periodontal Res*, **41**, 573-579.

13) Tonetti, M. S., Greenwell, H. and Kornman, K. S. (2018) : Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*, **89**, S159-S172.

14) Spector, A. M., Postolache, T. T., Akram, F., Scott, A. J., Wadhawan, A. and Reynolds, M. A. (2020) : Psychological Stress: A Predisposing and Exacerbating Factor in Periodontitis. *Curr Oral Health Rep*, **7**, 208-215.

15) Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M. and Elbert, A. (2011) : Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J Agric Food Chem*, **59**, 2897-2908.

16) Wood, T. J. and Goulson, D. (2013) : The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. *Environ Sci Pollut Res Int*, **24**, 17285-17325.

17) Tsvetkov, N., Samson-Robert, O., Sood, K., Patel, H. S., Malena, D. A., Gajiwala, P. H., Maciukiewicz, P., Fournier, V. and Zayed, A. (2017) : Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. *Science*, **356**, 1395-1397.

18) Stehle, S., Ovcharova, V., Wolfram, J., Bub, S., Herrmann, L. Z., Petschick, L. L. and Schulz, R. (2023) : Neonicotinoid insecticides in global agricultural surface waters - Exposure, risks

and regulatory challenges. *Sci Total Environ*, 867, 161383.

19) Chen, Q., Zhang, Y., Li, J., Su, G., Chen, Q., Ding, Z. and Sun, H. (2021) : Serum concentrations of neonicotinoids, and their associations with lipid molecules of the general residents in Wuxi City, Eastern China. *J Hazard Mater*, 413, 125235.

20) Zhao, Y., Zhu, Z, Xiao, Q., Li, Z., Jia, X., Hu, W., Liu, K. and Lu, S. (2022) : Urinary neonicotinoid insecticides in children from South China: Concentrations, profiles and influencing factors. *Chemosphere*, 291, 132937.

21) Laubscher, B., Diezi, M., Renella, R., Mitchell, E. A. D., Aebi, A., Mulot, M. and Glauser, G. (2022) : Multiple neonicotinoids in children's cerebro-spinal fluid, plasma, and urine. *Environ Health*, 21, 10.

22) Zhang, H., Zhang, N., Zhou, W., Zeng, X., Wang, X., Zhan, M., Xu, W., Huang, Y., Lu, L., Li, Z. and Gao, Y. (2021) : Profiles of neonicotinoid insecticides and their metabolites in paired saliva and periodontal blood samples in human from South China: Association with oxidative stress markers. *Ecotoxicol Environ Saf*, 212, 112001.

23) Wang, A., Wan, Y., Zhou, L., Xia, W., Guo, Y., Mahai, G., Yang, Z., Xu, S. and Zhang, R. (2022) : Neonicotinoid insecticide metabolites in seminal plasma: Associations with semen quality. *Sci Total Environ*, 811, 151407.

24) Chen, D., Liu, Z., Barrett, H., Han, J., Lv, B., Li, Y., Li, J., Zhao, Y. and Wu, Y. (2020) : Nationwide Biomonitoring of Neonicotinoid Insecticides in Breast Milk and Health Risk Assessment to Nursing Infants in the Chinese Population. *J Agric Food Chem*, 68, 13906-13915.

25) Atlı, Şekeroğlu. Z., Şekeroğlu, V., Aydın, B., Kontaş, Yedier. S. and İlkun, E. (2020) : Clothianidin induces DNA damage and oxidative stress in bronchial epithelial cells. *Environ Mol Mutagen*, 61, 647-655.

26) Eriksson, I., Ward, L. J., Vainikka, L., Sultana, N., Leanderson, P., Flodin, U., Li, W. and Yuan,

X. M. (2023) : Imidacloprid induces lysosomal dysfunction and cell death in human astrocytes and fibroblasts-environmental implication of a clinical case report. *Cells*, **12**, 2772.

27) Zhang, N., Wang, B., Zhang, Z., Chen, X., Huang, Y., Liu, Q. and Zhang, H. (2021) : Occurrence of neonicotinoid insecticides and their metabolites in tooth samples collected from south China: Associations with periodontitis. *Chemosphere*, **264**, 128498.

28) Sender, R., Fuchs, S. and Milo, R. (2016) : Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *Plos Biology*, **14**, e1002533.

29) Ahmad, R., Sorrell, M. F., Batra, S. K., Dhawan, P. and Singh, A. B. (2017) : Gut permeability and mucosal inflammation: bad, good or context dependent. *Mucosal Immunol*, **10**, 307-317.

30) Takahashi, N., Sulijaya, B., Yamada-Hara, M., Tsuzuno, T., Tabeta, K. and Yamazaki, K. (2019) : Gingival epithelial barrier: regulation by beneficial and harmful microbes. *Tissue Barriers*, **7**, e1651158.

31) Theodoro, L. H., Garcia, V. G., Ervolino, E., Holcroft, J., McCulloch, C. A. and Ganss, B. (2023) : Role of junctional epithelium in maintaining dento-gingival adhesion and periodontal health. *Front Dent Med*, **4**, 1144537.

32) Vitkov, L., Singh, J., Schauer, C., Minnich, B., Krunić, J., Oberthaler, H., Gamsjaeger, S., Herrmann, M., Knopf, J. and Hannig, M. (2023) : Breaking the Gingival Barrier in Periodontitis. *Int J Mol Sci*, **24**, 4544.

33) Kawai, T. and Akira, S. (2011) : Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, **34**, 637-650.

34) Hans, M. and Hans, V. M. (2011) : Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. *J Oral Sci*, **53**, 263-271.

35) Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006) : Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, **124**, 783-801.

36) Takeuchi, H., Yamaga, S., Sasaki, N., Kuboniwa, M., Matsusaki, M. and Amano, A. (2021) : *Porphyromonas gingivalis* induces penetration of lipopolysaccharide and peptidoglycan through the gingival epithelium via degradation of coxsackievirus and adenovirus receptor. *Cell Microbiol*, **23**, e13388.

37) Takeuchi, H., Nakamura, E., Yamaga, S. and Amano, A. (2022) : Infection induces lipopolysaccharide and peptidoglycan penetration through gingival epithelium. *Front Oral Health*, **3**, 845002.

38) Song, S., He, Y., Zhang, B., Gui, M., Ouyang, J. and Zhang, T. (2019) : A novel extraction method for simultaneous determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in human urine. *Anal Methods*, **11**, 2571-2578.

39) Yeter, O. and Aydın, A. (2014) : Determination of acetamiprid and IM-1-2 in postmortem human blood, liver, stomach contents by HPLC-DAD. *J Forensic Sci*, **59**, 287-292.

40) Murakami, S., Yoshimura, N., Koide, H., Watanabe, J., Takedachi, M., Terakura, M., Yanagita, M., Hashikawa, T., Saho, T., Shimabukuro, Y. and Okada, H. (2022) : Activation of adenosine-receptor-enhanced iNOS mRNA expression by gingival epithelial cells. *J Dent Res*, **81**, 236-240.

41) Nishiguchi, A., Yoshida, H., Matsusaki, M. and Akashi, M. (2011) : Rapid construction of three-dimensional multilayered tissues with endothelial tube networks by the cell-accumulation technique. *Adv Mater*, **23**, 3506-3510.

42) Takeuchi, H., Sasaki, N., Yamaga, S., Kuboniwa, M., Matsusaki, M. and Amano, A. (2019) : *Porphyromonas gingivalis* induces penetration of lipopolysaccharide and peptidoglycan through the gingival epithelium via degradation of junctional adhesion molecule 1. *PLoS Pathog*, **15**, e1008124.

43) De, Duve. C. and Wattiaux, R. (1966) : Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol*, **28**, 435-492.

44) Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M. and Tashiro, Y. (1991) : Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem*, **266**, 17707-17712.

45) van't, Hof. W. and Crystal, R. G. (2002) : Fatty acid modification of the coxsackievirus and adenovirus receptor. *J Virol*, **76**, 6382-6386.

46) Excoffon, K. J., Hruska-Hageman, A., Klotz, M., Traver, G. L. and Zabner, J. (2004) : A role for the PDZ-binding domain of the coxsackie B virus and adenovirus receptor (CAR) in cell adhesion and growth. *J Cell Sci*, **117**, 4401-1109.

47) Raschperger, E., Thyberg, J., Pettersson, S., Philipson, L., Fuxe, J. and Pettersson, R. F. (2006) : The coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) is an in vivo marker for epithelial tight junctions, with a potential role in regulating permeability and tissue homeostasis. *Exp Cell Res*, **312**, 1566-1580.

48) Yan, R., Sharma, P., Kolawole, A. O., Martin, S. C., Readler, J. M., Kotha, P. L., Hostetler, H. A. and Excoffon, K. J. (2015) : The PDZ3 domain of the cellular scaffolding protein MAGI-1 interacts with the Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR). *Int J Biochem Cell Biol*, **61**, 29-34.

49) Coyne, C. B., Voelker, T., Pichla, S. L. and Bergelson, J. M. (2004) : The coxsackievirus and adenovirus receptor interacts with the multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) within the tight junction. *J Biol Chem*, **279**, 48079-48084.

50) Sollerbrant, K., Raschperger, E., Mirza, M., Engstrom, U., Philipson, L., Ljungdahl, P. O. and Pettersson, R. F. (2003) : The Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) forms a complex

with the PDZ domain-containing protein ligand-of-numb protein-X (LNX). *J Biol Chem*, 278, 7439-7444.

51) Birgisdottir, Å. B. and Johansen, T. (2020) : Autophagy and endocytosis - interconnections and interdependencies. *J Cell Sci*, 133, jcs228114.

52) Ke, P. Y. (2024) : Molecular Mechanism of Autophagosome-Lysosome Fusion in Mammalian Cells. *Cells*, 13, 500.

53) Fraser, J., Simpson, J., Fontana, R., Kishi-Itakura, C., Ktistakis, N. T. and Gammoh, N. (2019) : Targeting of early endosomes by autophagy facilitates EGFR recycling and signalling. *EMBO Rep*, 20, e47734.

54) Toshima, J. Y. and Toshima, J. (2024) : Transport mechanisms between the endocytic, recycling, and biosynthetic pathways via endosomes and the trans-Golgi network. *Front Cell Dev Biol*, 12, 1464337.

55) Harada, K. H., Tanaka, K., Sakamoto, H., Imanaka, M., Niisoe, T., Hitomi, T., Kobayashi, H., Okuda, H., Inoue, S., Kusakawa, K., Oshima, M., Watanabe, K., Yasojima, M., Takasuga, T. and Koizumi, A. (2016) : Biological Monitoring of Human Exposure to Neonicotinoids Using Urine Samples, and Neonicotinoid Excretion Kinetics. *PLoS One*, 11, e0146335.

56) Ikenaka, Y., Miyabara, Y., Ichise, T., Nakayama, S., Nimako, C., Ishizuka, M. and Tohyama, C. (2019) : Exposures of children to neonicotinoids in pine wilt disease control areas. *Environ Toxicol Chem*, 38, 71-79.

57) Shi, X., Dick, R. A., Ford, K, A. and Casida, J. E. (2009) : Enzymes and inhibitors in neonicotinoid insecticide metabolism. *J Agric Food Chem*, 57, 4861-4866.

58) Dick, R. A., Kanne, D. B. and Casida, J. E. (2005) : Identification of aldehyde oxidase as the neonicotinoid nitroreductase. *Chem Res Toxicol*, 18, 317-323.

59) Li, P., Ann, J. and Akk, G. (2011) : Activation and modulation of human α4β2 nicotinic acetylcholine receptors by the neonicotinoids clothianidin and imidacloprid. *J Neurosci Res*, **89**, 1295-1301.

60) Sun, J., He, P., Wang, R., Zhang, Z. Y., Dai, Y. Q., Li, X. Y., Duan, S. Y., Liu, C. P., Hu, H., Wang, G. J., Zhang, Y. P., Xu, F., Zhang, R., Zhao, Y. and Yang, H. F. (2023) : Association between urinary neonicotinoid insecticide levels and dyslipidemia risk: A cross-sectional study in Chinese community-dwelling elderly. *J Hazard Mater*, **459**, 132159.

61) Vuong, A. M., Zhang, C. and Chen, A. (2022) : Associations of neonicotinoids with insulin and glucose homeostasis parameters in US adults: NHANES 2015-2016. *Chemosphere*, **286**, 131642.

62) Knox, E. G., Aburto, M. R., Clarke, G., Cryan, J. F. and O'Driscoll, C. M. (2022) : The blood-brain barrier in aging and neurodegeneration. *Mol Psychiatry*, **27**, 2659-2673.

63) Johanson, C. E., Stopa, E. G. and McMillan, P. N. (2011) : The blood-cerebrospinal fluid barrier: structure and functional significance. *Methods Mol Biol*, **686**, 101-131.

64) Mruk, D. D. and Cheng, C. Y. (2015) : The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocr Rev*, **36**, 564-591.

65) Vähäkangas, K. and Myllynen, P. (2009) : Drug transporters in the human blood-placental barrier. *Br J Pharmacol*, **158**, 665-678.

66) Wang, K., Wu, L. Y., Dou, C. Z., Guan, X., Wu, H. G., Liu. H. R. (2016) : Research Advance in Intestinal Mucosal Barrier and Pathogenesis of Crohn's Disease. *Gastroenterol Res Pract*, **2016**, 9686238.

67) Cohen, C. J., Shieh, J. T., Pickles, R. J., Okegawa, T., Hsieh, J. T. and Bergelson, J. M. (2001) : The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 15191-15196.

68) Gene Cards, *CXADR* Gene - CXADR Cell Adhesion Molecule. Available from, https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CXADR

69) Keil, A. P., Daniels, J. L. and Hertz-Picciotto, I. (2014) : Autism spectrum disorder, flea and tick medication, and adjustments for exposure misclassification: the CHARGE (CHildhood Autism Risks from Genetics and Environment) case-control study. *Environ Health*, **13**, 3.

70) Liu, Z., Li, N., Xu, L., Huang, R., Xu, Z., Liu, G., Liang, X. and Yang, X. (2024) : Associations between neonicotinoid insecticide levels in follicular fluid and serum and reproductive outcomes among women undergoing assisted reproductive technology: An observational study. *Heliyon*, **10**, e35618.

71) Taira, K. (2014) : Human neonicotinoids exposure in Japan. *Jpn J Clin Toxicol*, **23**, 14-24.

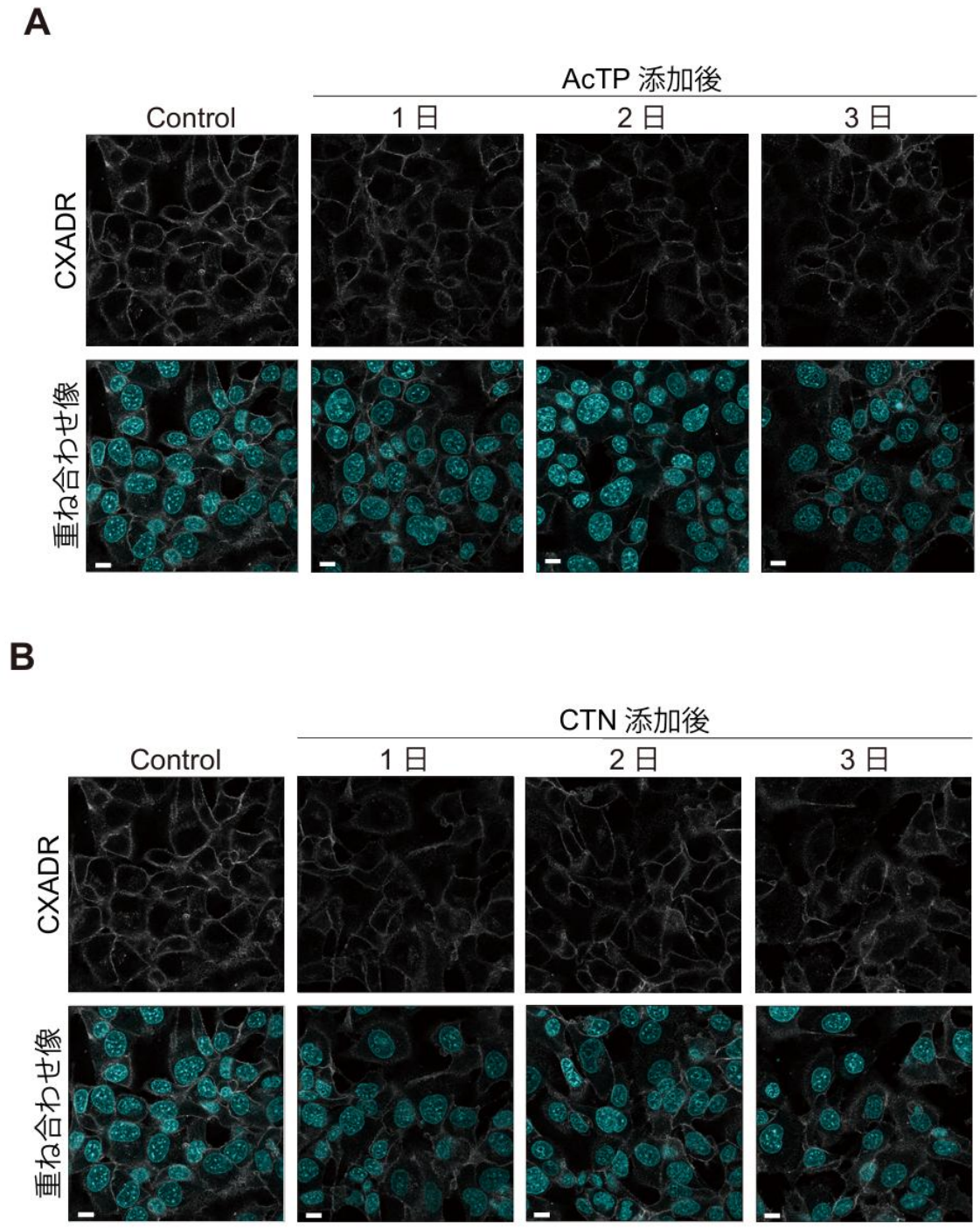
表 1. リアルタイム PCR で使用したプライマー

プライマーの名称		塩基配列（5'~3'）
β-ACTIN	forward	GCATGGGTCAGAAGGATTCCT
	reverse	TCGTCCCAGTTGGTGACGAT
CXADR	forward	CAGTGCCTGTTGCGTCTAAA
	reverse	CTTTGGAGGTGGCACATCTT

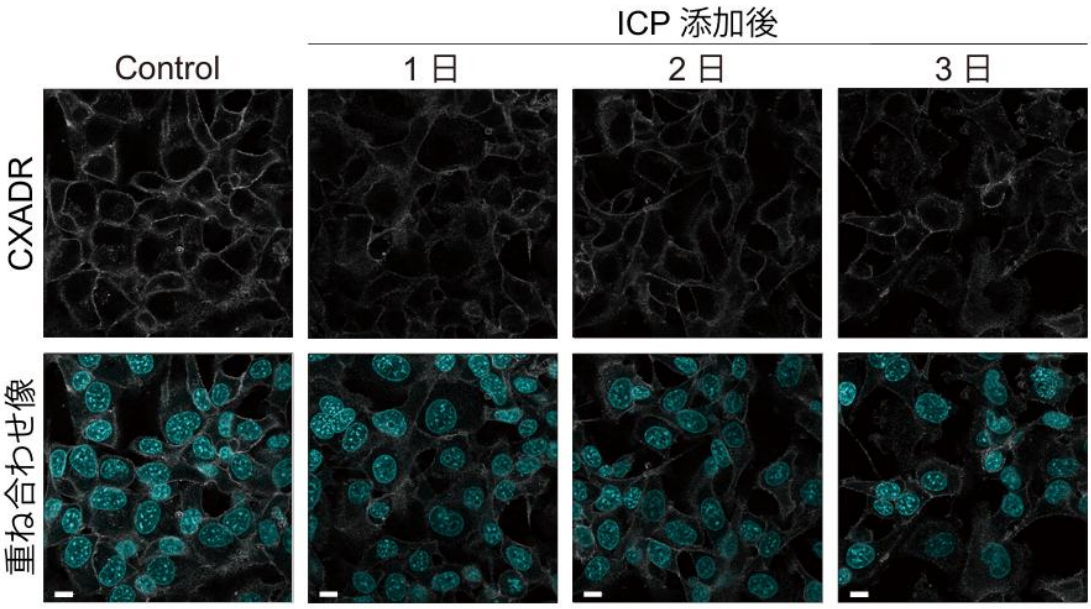
表 2. ヒト唾液中における NN 類の濃度

Sample	Neonicotinoid concentration (pg/mL)						
No.	AcTP	CTN	DTR	ICP	NTP	TCP	TMX
1	5.0	25.0	*N.D.	18.0	*N.D.	*N.D.	8.0
2	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	3.0
3	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.
4	*N.D.	26.0	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	27.0
5	3.0	*N.D.	*N.D.	30.0	*N.D.	*N.D.	6.0
6	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	4.0
7	7.0	*N.D.	*N.D.	17.0	*N.D.	*N.D.	6.0
8	4.0	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	9.0
9	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.
10	3.0	*N.D.	*N.D.	25.0	*N.D.	*N.D.	20.0
11	4.0	*N.D.	*N.D.	8.0	*N.D.	*N.D.	6.0
12	2.0	16.0	*N.D.	9.0	*N.D.	*N.D.	6.0
13	4.0	*N.D.	*N.D.	10.0	*N.D.	*N.D.	5.0
14	5.0	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	6.0
15	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.
16	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	*N.D.	4.0

*N.D.：Not detected


A
AcTP 添加後
Control
1 日
2 日
3 日
CXADR
重ね合わせ像
B
CTN 添加後
Control
1 日
2 日
3 日
CXADR
重ね合わせ像

C


ICP 添加後
Control
1 日
2 日
3 日
CXADR
重ね合わせ像

D

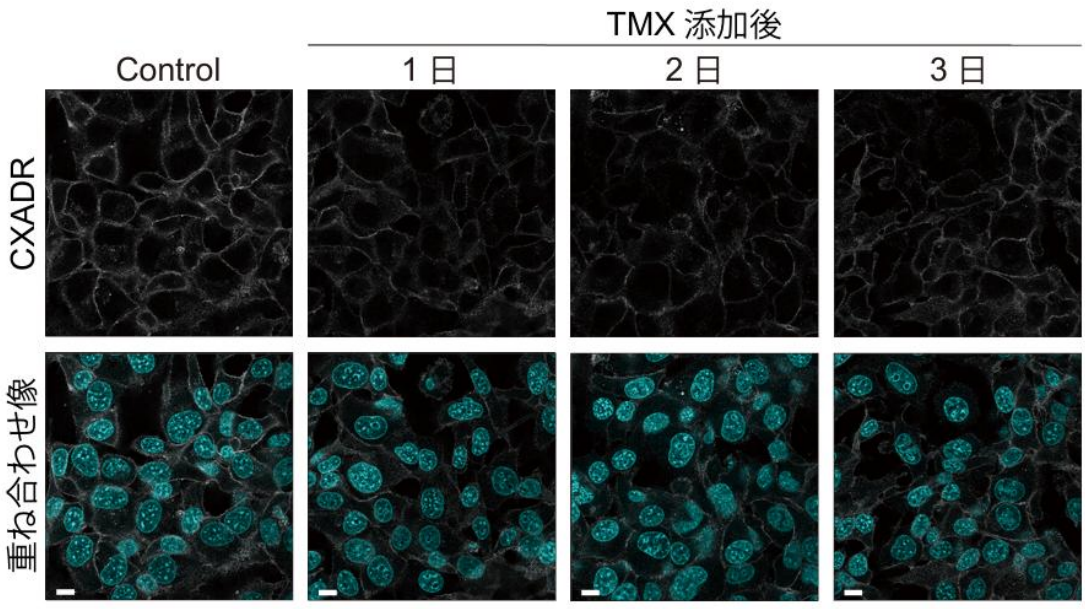

TMX 添加後
Control
1 日
2 日
3 日
CXADR
重ね合わせ像

図 1. 各 NN が IHGE 細胞における CXADR の発現に及ぼす影響

A-D) IHGE 細胞を，各 NN を含む培養培地で培養した．標記の培養後に細胞を固定し，DAPI（シアン色）および CXADR 抗体（白色）で免疫染色し，共焦点顕微鏡で観察した．スケールバーは 10 μm を示す．

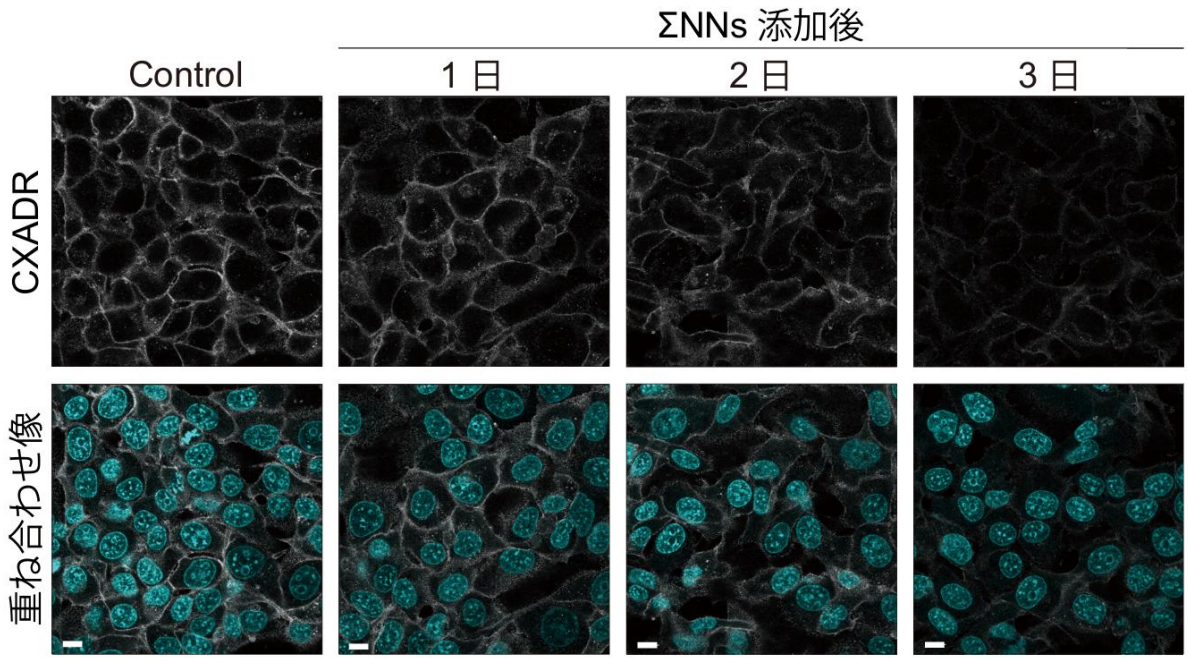


図 2. ΣNNs が IHGE 細胞における CXADR の発現に及ぼす影響

IHGE 細胞を，ΣNNs を含む培養培地で培養した．標記の培養後に細胞を固定し，DAPI（シアン色），CXADR 抗体（白色）で免疫染色し，共焦点顕微鏡で観察した．スケールバーは 10 μm を示す．

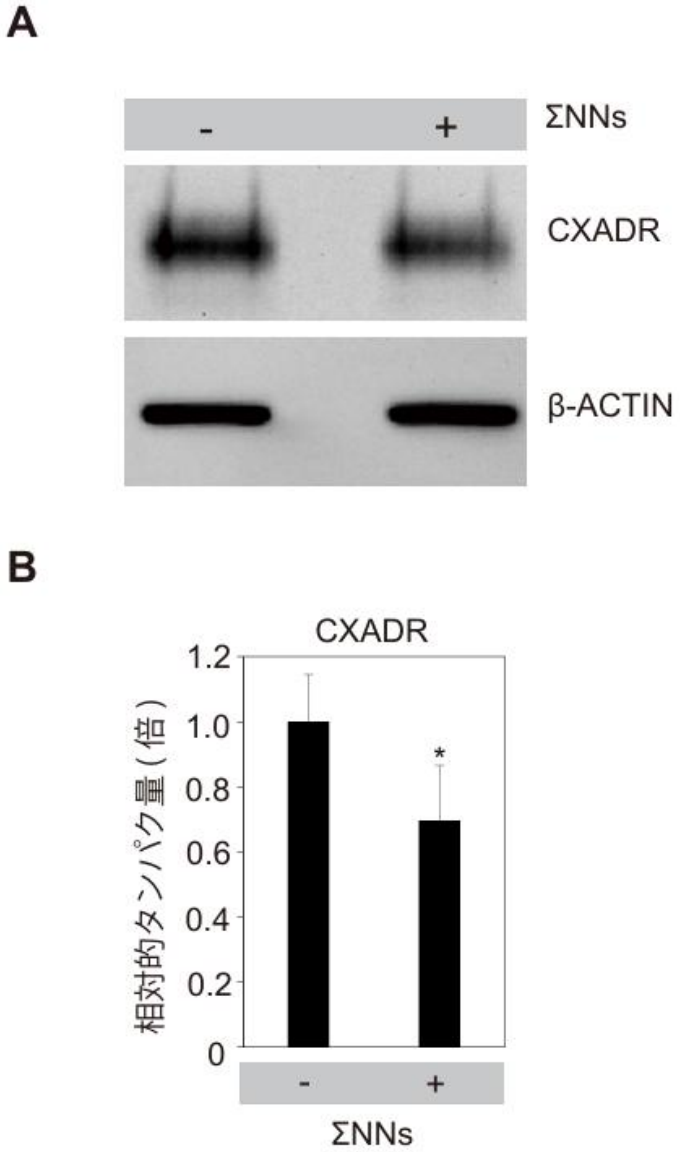


図 3．ΣNNs が IHGE 細胞における CXADR のタンパク量に及ぼす影響

A）IHGE 細胞を，ΣNNs を含む培養培地で培養した．3 日間の培養後にタンパクを回収し，CXADR のタンパク量をウェスタンブロット法にて解析した．コントロールとして β-ACTIN を用いた．

B）A）における CXADR のタンパク量を示す．グラフの縦軸は，ΣNNs 非添加におけるシグナル強度をコントロールとした倍数で示している．*$p < 0.05$（両側 t 検定），$n = 4$，bars：標準偏差．

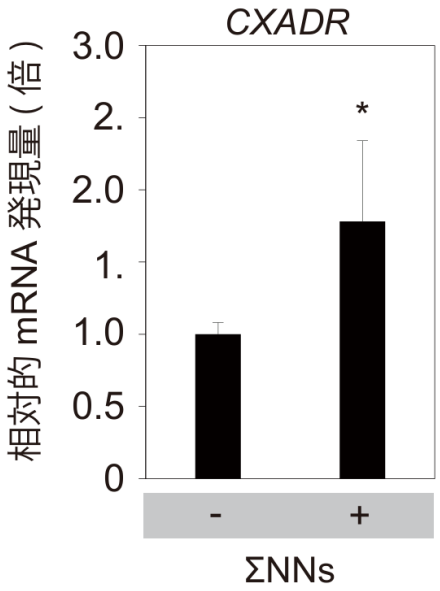


図 4. ΣNNs が IHGE 細胞における *CXADR* の mRNA 発現量に及ぼす影響

IHGE 細胞を，ΣNNs を含む培養培地で培養した．3 日間の培養後，mRNA の回収を行った．その後，逆転写 PCR を行って cDNA を精製し，*CXADR* の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて解析した．グラフの縦軸は，ΣNNs 非添加の IHGE 細胞における mRNA 発現量をコントロールとした倍数で示している．*$p < 0.05$（片側 *t* 検定），$n = 5$，bars：標準偏差.

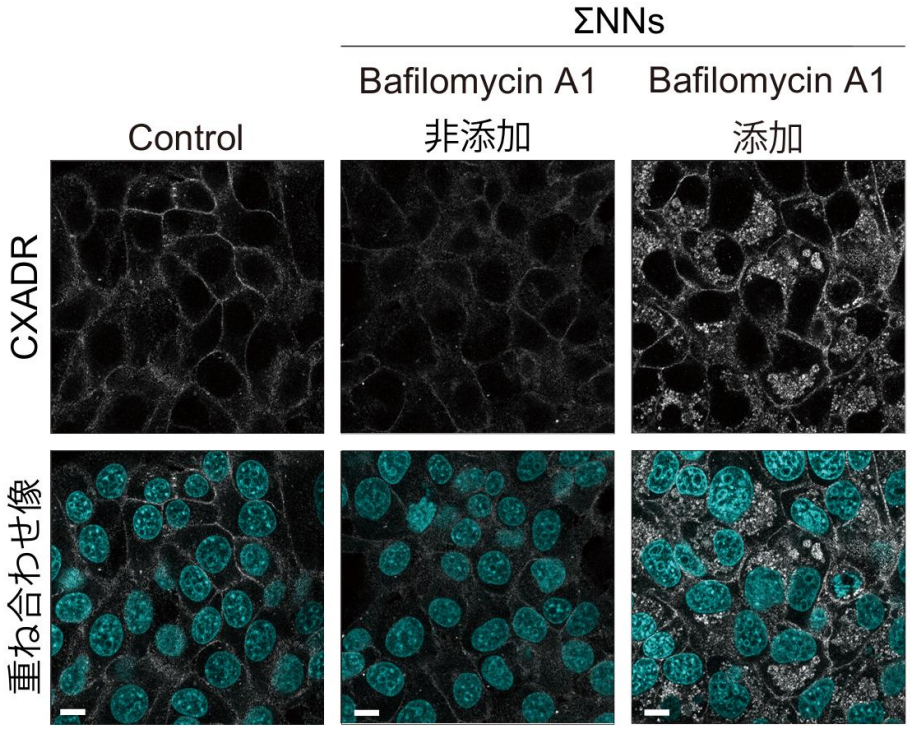


図 5. Bafilomycin A1 が ΣNNs を添加した IHGE 細胞における CXADR の局在に及ぼす影響

IHGE 細胞を，ΣNNs を含む培養培地で培養した．2 日間の培養後，bafilomycin A1（5 nM）を培養培地に添加した．さらに 1 日の培養後に細胞を固定し，DAPI（シアン色），および CXADR（白色）で免疫染色し，共焦点顕微鏡で観察した．スケールバーは 10 μm を示す．

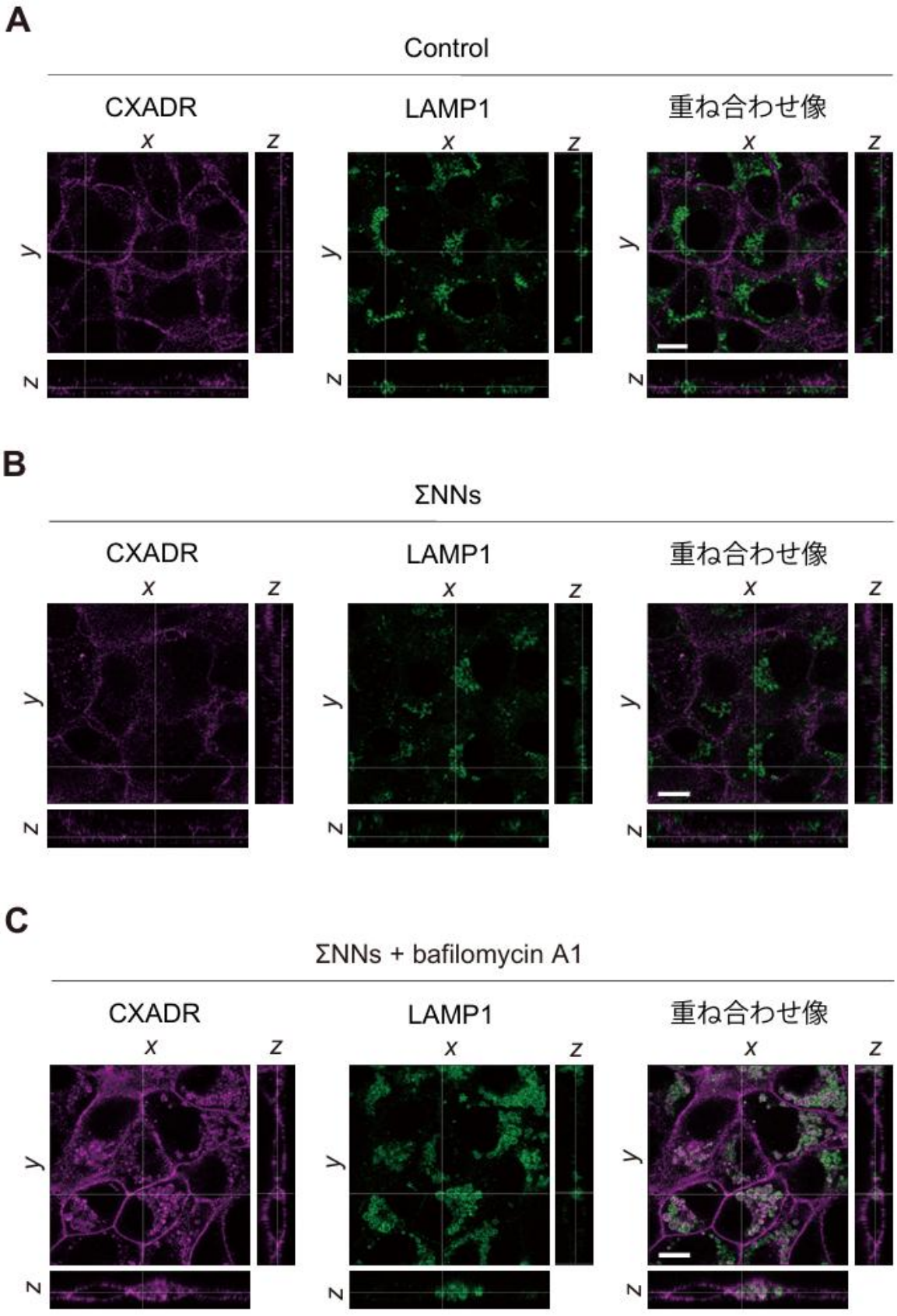

A
Control
CXADR
LAMP1
重ね合わせ像
x
z
y
z
B
ΣNNs
CXADR
LAMP1
重ね合わせ像
C
ΣNNs + bafilomycin A1
CXADR
LAMP1
重ね合わせ像

図 6. Bafilomycin A1 が ΣNNs を添加した IHGE 細胞における CXADR の局在に及ぼす影響
A-C）IHGE 細胞を，ΣNNs を含む培養培地で培養した．2 日間の培養後，bafilomycin A1（5 nM）を培養培地に添加した．さらに 1 日の培養後に細胞を固定し，CXADR（マゼンダ色）および LAMP1（緑色）で免疫染色し，共焦点顕微鏡で観察した．スケールバーは 10 μm を示す.

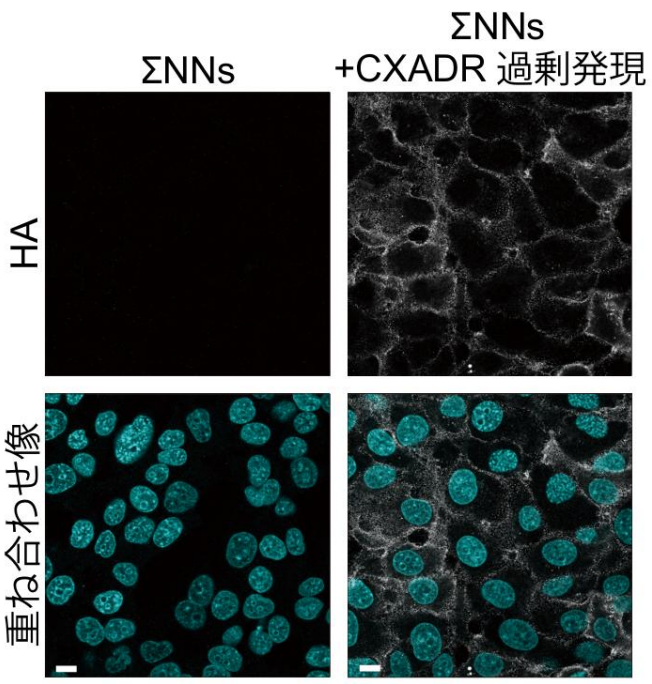


図 7. ΣNNs が CXADR を過剰発現させた IHGE 細胞における CXADR の発現に及ぼす影響

IHGE 細胞（野生細胞株あるいは CXADR 過剰発現細胞株）を，ΣNNs を含む培養培地で培養した．3 日間の培養後に細胞を固定し，DAPI（シアン色）および HA 抗体（白色）で免疫染色し，共焦点顕微鏡で観察した．スケールバーは 10 μm を示す．

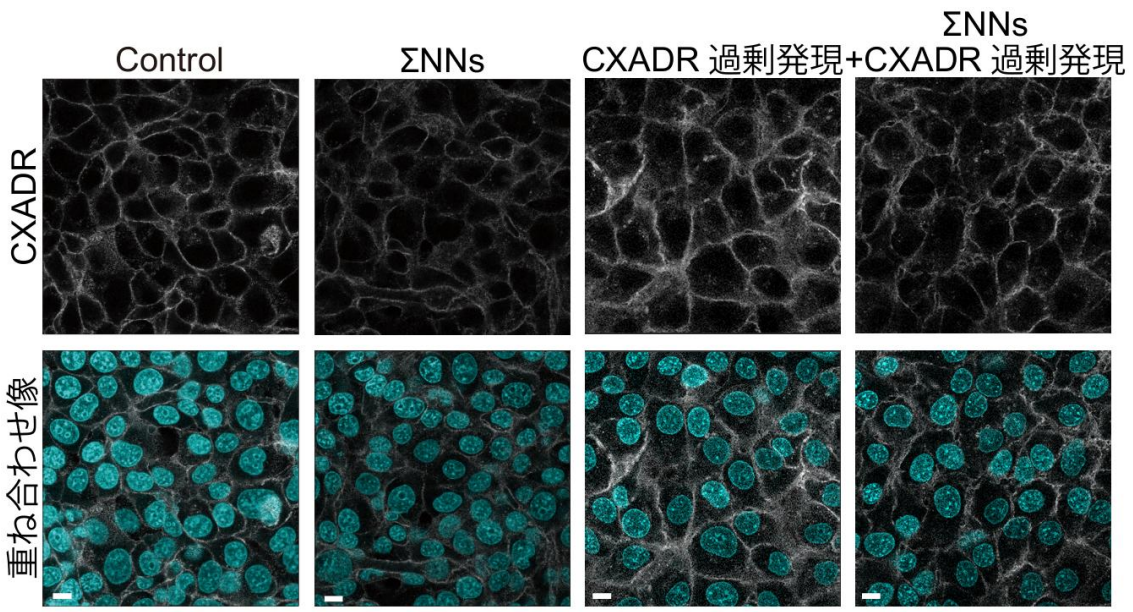


図 8. ΣNNs が CXADR を過剰発現させた IHGE 細胞における CXADR の発現に及ぼす影響

IHGE 細胞（野生細胞株あるいは CXADR 過剰発現細胞株）を，ΣNNs を含む培養培地で培養した．3 日間の培養後に細胞を固定し，DAPI（シアン色）および CXADR 抗体（白色）で免疫染色し，共焦点顕微鏡で観察した．スケールバーは 10 μm を示す．

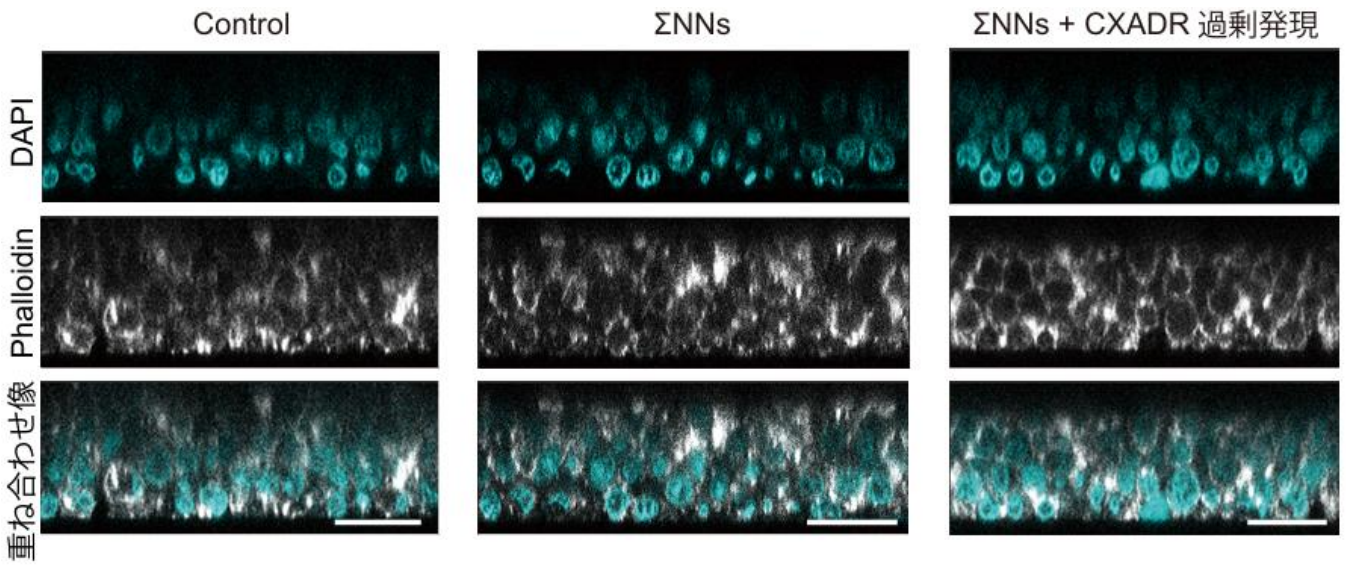
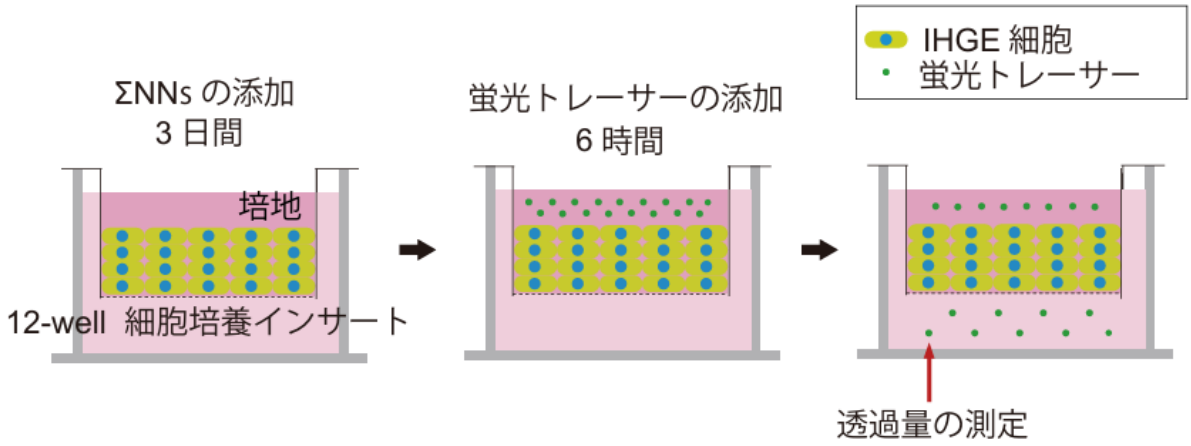


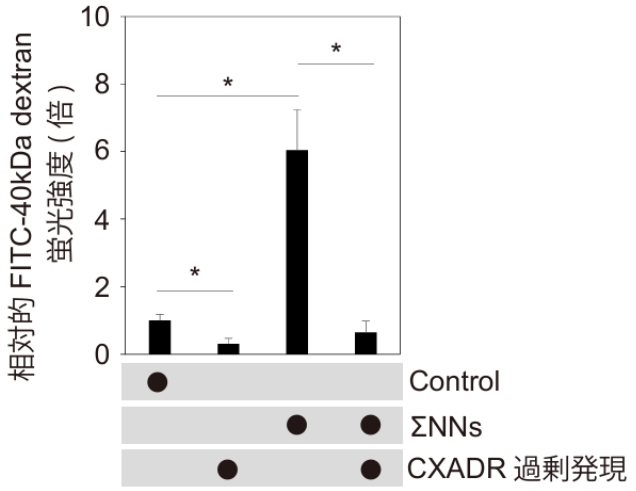
図 9. 三次元歯肉上皮モデル（野生細胞株あるいは CXADR 過剰発現細胞株）の作製

三次元歯肉上皮モデル（野生細胞株あるいは CXADR 過剰発現細胞株）を，ΣNNs を含む培養培地で培養した．3 日間の培養後に組織を固定し，phalloidin（白色），DAPI（青色）で免疫染色し，共焦点顕微鏡で観察した．スケールバーは 30 μm を示す．

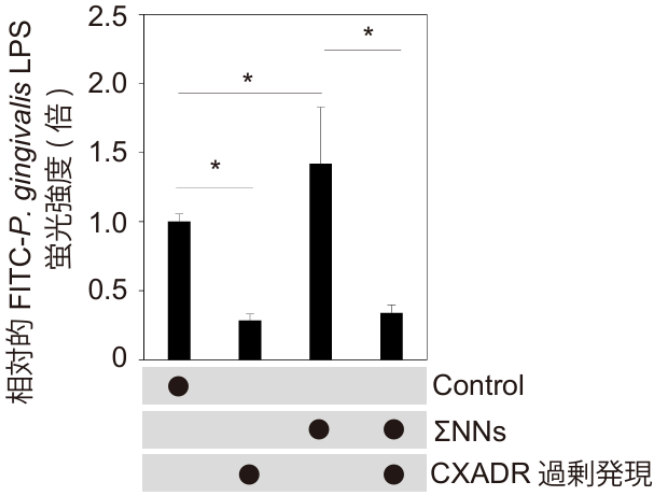
A


IHGE 細胞
蛍光トレーサー
ΣNNs の添加
3 日間
培地
12-well 細胞培養インサート
蛍光トレーサーの添加
6 時間
透過量の測定

B


相対的 FITC-40kDa dextran
蛍光強度 (倍)
10
8
6
4
2
0
*
*
*
Control
ΣNNs
CXADR 過剰発現

C


相対的 FITC-P. gingivalis LPS
蛍光強度 (倍)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
*
*
*
Control
ΣNNs
CXADR 過剰発現

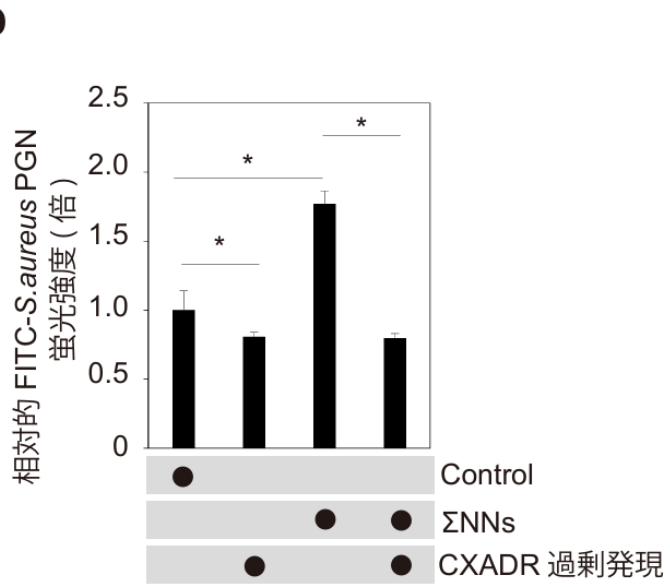


図 10. ΣNNs が三次元歯肉上皮モデルにおける異物透過性に及ぼす影響

A）本透過性実験の模式図．三次元歯肉上皮モデル（野生細胞株あるいは CXADR 過剰発現細胞株）を，細胞培養インサート上にて，ΣNNs を含む培養培地で培養した．3 日間の培養後，蛍光トレーサーを含む培養培地で 6 時間培養し，40 kDa dextran，LPS，および PGN の組織透過量を分光光度計で測定した．

B-D）ΣNNs の添加後に三次元歯肉上皮モデル（野生細胞株あるいは CXADR 過剰発現細胞株）を透過した 40 kDa dextran，LPS，および PGN の量を示す．グラフの縦軸は，ΣNNs 非添加の IHGE 細胞における透過量をコントロールとした倍数で示している．*$p < 0.05$（両側 *t* 検定，closed-testing procedure），$n = 8$，bars：標準偏差．