

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：37116

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893285

研究課題名(和文)PM2.5等の浮遊粒子状物質が1型糖尿病に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effect of suspended particulate matter (e.g., PM2.5, etc.) on type 1 diabetes

研究代表者

森田 健太郎 (MORITA, Kentaro)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：30533690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病患者は現在増大しており、その原因の1つに環境因子が考えられている。日本では2000年以降黄砂の飛来が急増している。黄砂は浮遊粒子状物質であり、大気環境基準物質に指定されているが、糖尿病発症の環境因子になりえるかどうかは未だに不明である。そこで、本研究では、発症機序の異なる2種類の1型糖尿病モデルマウスの系を用いて黄砂が1型糖尿病に及ぼす影響を検討した。その結果、黄砂は1型糖尿病モデルマウスの系に依存して増悪因子とも抑制因子ともなりえることが示唆された。しかし、どのようなメカニズムによってこのような相反する結果が生じたのかは不明であり、今後さらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Patients with type 1 diabetes are currently increasing, and environmental factors are thought to be one of its causes. Asian sand dust (ASD) is the suspended particulate matter. The events of ASD flying to Japan are increasing since 2000. Although ASD is designated as one of reference materials for air quality to protect public health, it is still unclear whether ASD can become the environmental factor of diabetes onset. In this study, we examined the effect of ASD on type 1 diabetes by using two systems of type 1 diabetes model mice with different pathogenesis. As a result, it was suggested that ASD may become either the exacerbating factor or suppressor for the diabetes onset depending on the system of the type 1 diabetes model mice. However, it is unknown what kind of mechanisms cause such conflicting results. Therefore, further examinations are required.

研究分野：免疫学

キーワード：浮遊粒子状物質 糖尿病 免疫学 黄砂

### 1. 研究開始当初の背景

日本における1型糖尿病の発症率は世界の中では低い、小児1型糖尿病患者を対象とした疫学データでは、1973年から1977年の発症率は0.90/10万人であったが、1988年から1992年では2.28/10万人となり、この20年間で発症率は増加している(Diabetes Care, vol. 21, pp.1632)。また、世界的に見ても1型糖尿病患者は年3%の割合で増加している(J Mol Endocrinol, vol. 51, pp. R1)。その要因の一つとして衛生仮説が挙げられる。すなわち、我々の体に侵入する異物が発症のキーになっているという説である(Nat Rev Immunol, vol. 10, pp. 501)。今までに報告されている異物の例としては、ウイルス、細菌、真菌、蠕虫などの微生物がある。一方、大気汚染の原因である浮遊粒子状物質(\*1)に関する報告例はほとんどない。

(\*1) 浮遊粒子状物質とは、環境基本法第16条第1項において「大気中に浮遊する粒子状物質であって、その粒径が10μm以下のもの」と定義されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、浮遊粒子状物質の一つとして黄砂に着目した。黄砂の飛来は2000年以降急増し(\*2)、呼吸器系及び循環器系疾患に対して増悪な作用を及ぼす可能性が多数の疫学調査や動物実験により示唆され(日衛誌, vol. 65, pp. 413)、大気汚染問題の一つとして社会的関心が高まっている。そこで、本研究では黄砂による1型糖尿病への影響を動物実験により評価することにした。

(\*2) <http://www.data.jma.go.jp/gmd/env/kosahp/aerosol.html>

### 3. 研究の方法

#### (1) 投与に用いた黄砂

日本に飛来し回収される黄砂を動物実験に使用するには、量及び質を安定に確保する必要がある。しかし、困難なため、本研究では、独立行政法人国立環境研究所において作製されたゴビ黄砂(NIES CRM No. 30)を購入して用いた。この黄砂はゴビ砂漠(北緯44度東経109度)の表土(0~5cm)から回収されたもので、さらに浮遊サイズの粒子を得るためにダスト発生チャンバーを用いて砂塵を生じさせ、浮遊しているものだけを選別、精製、分離したものである。また、この黄砂は、粒子サイズ(空気動力学径3.9μm)や元素成分において日本に飛来し回収されるものと類似していることが認証されたものである。ただ、海塩粒子や人間の活動により生じる粒子の付着がないものとなっている。

(Anal. Methods, vol. 5, pp. 4088)。

#### (2) 黄砂の投与方法と投与量

##### ①投与方法

全身吸入曝露装置を用いた投与方法はコスト面において難しいと判断したため、生理

食塩水に懸濁した黄砂を用いた。その際、黄砂粒子の凝集を防ぐために冷却しながら超音波処理を行った。分散した黄砂懸濁液はすぐに気管内に投与した。気管内投与は4~5%のセボフルラン吸入麻酔下において22ゲージのカテーテルを気管内に挿入して行った。

##### ②投与量

投与量を決めるにあたり、環境基本法第16条第1項に規定されている環境基準値を参考にした。則ち、100μg/m<sup>3</sup>の黄砂浮遊環境下において1週間飼育したマウス(\*3)の肺には黄砂が約30μg入るものとし、本研究では環境基準値の約3.3倍量である100μgをマウスに投与した。これは約330μg/m<sup>3</sup>での飼育環境に匹敵するが、今までの黄砂(浮遊粒子状物質)の観測データでは例年最高濃度が400~800μg/m<sup>3</sup>程度で推移しており(\*4)、今回実験に使用した投与量は現実的なものと考えられる。

(\*3) 1回換気量0.15ml、呼吸数200回/分

(\*4) <http://www.env.go.jp/air/dss/past/index.html>

#### (3) 黄砂投与実験に用いたマウス

8~10週齢の雌のNODマウスを用いた。このマウスは1型糖尿病を自然発症するマウスとして知られている。

#### (4) 血糖値の測定

自己検査用グルコースキットを用いて、随時血糖値を測定した。

(5) 2種類の1型糖尿病モデルマウスの系を用いた黄砂投与実験

##### ①シクロホスファミド誘発の系

シクロホスファミドは抗癌剤及び免疫抑制剤として臨床において使用されている薬剤であるが、NODマウスに投与するとCD4陽性CD25陽性制御性T細胞の機能障害により1型糖尿病が誘発される(J Immunol, vol. 177, pp. 6603)。本研究では、8週齢のNODマウスを用いて、週1回、4週に渡って黄砂懸濁液を気管内に投与し、その後、シクロホスファミド(200mg/kg)を腹腔内に投与した(図1)。随時血糖値をモニタリングし、250mg/dl以上の値において糖尿病が発症したものと判断した。コントロール群は生理食塩水のみを投与した群とした。

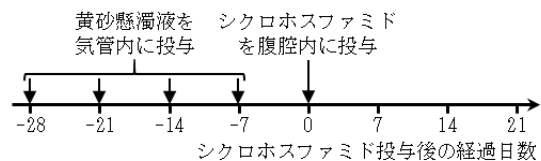


図1 黄砂投与実験プロトコール

##### ②自然発症の系

10週齢のNODマウスを用いて、週1回、7週に渡って黄砂懸濁液を気管内に投与した。そして、随時血糖値をモニタリングし、

150mg/dl 以上の値において糖尿病が発症したものと判断した。

#### (6) 1型糖尿病の累積発症率

1型糖尿病の発症率を計算し、累積発症率に基づいて Kaplan-Meier 曲線を作成した。そして、ログランク検定を用いて、黄砂投与群とコントロール群を比較した。P 値が 0.05 以下において有意差があると判断した。

#### 4. 研究成果

(1) シクロホスファミド誘発の系を用いた黄砂投与実験の結果

コントロール群、黄砂投与群、それぞれ 9 匹の NOD マウスを用いて、シクロホスファミド投与 18 日後までの随時血糖値をモニタリングし、1型糖尿病の累積発症率を示す Kaplan-Meier 曲線を作成した (図 2)。その結果、黄砂投与群において 1型糖尿病の発症が抑制されることが明らかになった。

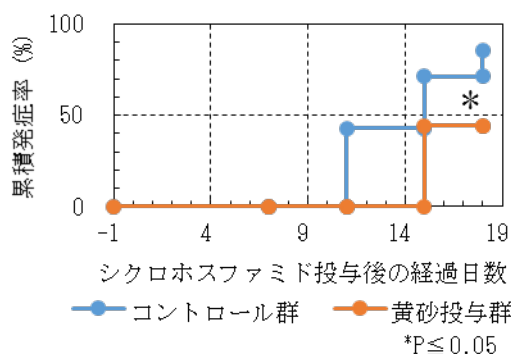


図2 シクロホスファミド誘発の系における1型糖尿病累積発症率を示す Kaplan-Meier 曲線

(2) 自然発症の系を用いた黄砂投与実験の結果

コントロール群 8 匹、黄砂投与群 9 匹の NOD マウスを用いて、黄砂投与 67 日後まで随時血糖値をモニタリングし、1型糖尿病の累積発症率を示す Kaplan-Meier 曲線を作成した (図 3)。その結果、統計的な有意差はなかったが、黄砂投与群において 1型糖尿病の発症が悪化する傾向が見られた。(現在、統計的な有意差を得るために再試験を行っている。)

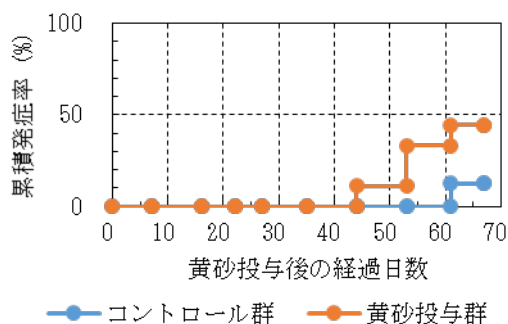


図3 自然発症の系における1型糖尿病累積発症率を示す Kaplan-Meier 曲線

上記 2 種類の 1 型糖尿病モデルマウスの系において、黄砂による 1 型糖尿病発症への効果がそれぞれ相反する結果となったが、それは個々の系において 1 型糖尿病の発症機序が異なることが起因するものと考えられる。予備的な検討ではあるが (ここにはデータとして示していない)、免疫細胞の活性化マーカーの一つである CD86 の発現が黄砂投与群の脾臓組織において低下することを見出しており、このような現象が 1 型糖尿病の発症機序に複雑に関与しているものと推測している。今後、さらなる検討が必要である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Yuan Song, Takamichi Ichinose, Kentaro Morita, Tsukasa Nakanishi, Tamotsu Kanazawa and Yasuhiro Yoshida. Asian sand dust causes subacute peripheral immune modification with NF- $\kappa$ B activation. Environ Toxicol. 2015; 30(5):549-58. doi: 10.1002/tox.21931. 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- ① Kentaro Morita, Yuan Song, Cuiying He, Tsukasa Nakanishi, Yasuhiro Yoshida. Effect of Asian sand dust (kosa) on type 1 diabetes. 第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 10 日、国立京都国際会館 (京都府・京都市)
- ② Yuan Song, Takamichi Ichinose, Kentaro Morita, Tsukasa Nakanishi, Cuiying He, Tamotsu Kanazawa, Yasuhiro Yoshida. Particulate matter influenced immune responses through TLR4 in vivo. 第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 10 日、国立京都国際会館 (京都府・京都市)
- ③ Kentaro Morita, Yuan Song, Cuiying He, Tsukasa Nakanishi, Yasuhiro Yoshida. Analysis of type 1 diabetes model mice administered Asian sand dust (kosa). 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 健太郎 (MORITA Kentaro)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：30533690

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし