

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590607

研究課題名(和文)ディーゼル排ガス中の鉱物油の免疫学的影響とそのメカニズムに関する研究

研究課題名(英文)The evaluation of mineral oil immunological effects included in diesel fuel and of mechanism of the immunological effect

研究代表者

黒田 嘉紀(KURODA YOSHIKI)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：50234620

研究成果の概要(和文): 鉱物油(プリステン)を腹腔内に投与すると非特異的炎症が腹腔内に発生し、その炎症により、アルジニン代謝酵素が活性化、その結果として生体内のアルジニンが減少し、同時に T 細胞レセプター CD3 発現も低下した。このようにアルジニンの減少と CD3 発現の低下には関連性が見られたが、そのメカニズムは判明していない。その解明のために CD3 の代謝酵素の活性を mRNA レベルで考察した。結果として CD3 代謝酵素の mRNA が低下すると同時に、CD3 合成 mRNA も低下することから、CD3 の低下は合成 mRNA の低下から起こるものと考えられたが、アルジニンの影響がどのレベルで起こっているのかは判明していない。この点についてはさらなる研究が必要であると思われた。

研究成果の概要(英文): In our study, The serum arginine was decreased in mouse with peritoneal injection of pristane. The cause of this reduction is inflammation in peritoneal cavity. At the same time, CD3 of T-cell was decreased. We evaluated the metabolic system of CD3 to analyze the mechanism of CD3 reduction. We concluded that the mechanism of CD3 reduction is due to decline of mRNA of CD3. But I have not known about the influence of arginine to CD3 reduction. We need more study to clear the relationship between CD3 reduction and decreased arginine.

交付決定額

(金額単位: 円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2009年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：産業中毒、自己抗体、鉱物油

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は今まで鉱物油の免疫学的影響について長年研究してきた(Kuroda *et al.*, *Toxicol Sci*, 2004; Kuroda *et al.*, *Biomed Pharmacother*, 2004)。我々は研究で鉱物油

が自己抗体を誘導することを明らかにした。

また我々の共同研究者である米国フロリダ大学免疫学教室でもすでにプリステンという鉱物油の1成分がマウスに自己抗体を誘導することを突き止め(Satoh *et al.*,

Proceeding of the National Academy of Science USA, 1995:Satoh *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1995)、その自己抗体はヒト SLE 患者に特有の自己抗体と同様なものであることを指摘している。

鉱物油の用途は多岐にわたり、我々の生活に切っても切れない物質である。例えばワックスとして果物に使用され、工場労働者においては、全身鉱物油まみれで就業していることはまれではない。また多くの化粧品にも使われており、国によっては鉱物油を便秘薬に使用する場合もある。従って鉱物油の生体影響を的確に評価することは非常に重要と思われるが、我々の研究以外には鉱物油の生体影響についてほとんど報告はなく、そのため環境基準も示されていない。そこで我々は環境中の鉱物油に対するさらなる検討が必要だと考えた。

我々は鉱物油の影響についてH18 H19 年の科学研究費補助金の補助を受けてヘキサデカンの影響を検討した。なぜなら、ヘキサデカンは航空燃料に含まれその健康影響が危惧され、またディーゼル排ガス中にも多量に検出され(連携研究者平野靖史郎より)、ヘキサデカンが日常生活に無縁ではない物質であると考えたからである。検討の結果、ヘキサデカンをマウスの腹腔内に直接投与した場合、プリステンと同様に自己抗体を誘導し、その抗体はヒトSLEに特有の自己抗体であった(Kuroda *et al.*, Toxicology, 2006)。

このように、鉱物油によって自己抗体が誘導されることがわかったが、自己抗体誘導のメカニズムは不明である。このメカニズムが判明すれば、ヒト自己免疫疾患(SLE)の発生メカニズム解明の手がかりにもなる可能性があるため、我々はH20年度から自己抗体の誘導メカニズムについて鉱物油投与マウスを使用して検討した

## 2. 研究の目的

ヒト自己免疫疾患(SLE)の病態は T 細胞の機能不全と考えられている。その T 細胞の機能不全に T 細胞レセプターである CD3 が関与している可能性が示唆されている。さらに自己免疫疾患患者においては血清成分のアルジニンが低下することもわかっている。そ

こで我々はヒト自己免疫疾患で見られるこれらの現象が、鉱物油投与マウスでも見られるのではないかと考えて、以下の点について検討した。

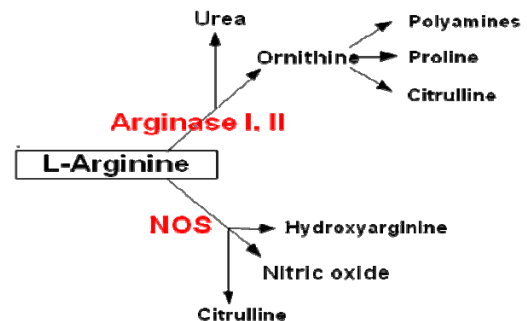
- (1) 鉱物油投与マウスでアルジニンが低下するか。
- (2) アルジニンの低下はどういう理由から起こるのか。
- (3) 鉱物油投与マウス T 細胞の CD3 は低下しているか。
- (4) CD3 が低下することと、自己抗体の誘導にはどのような関係があるか。
- (5) アルジニン低下と CD3 との関係はどのようなのか。
- (6) CD3 の低下メカニズム解明のため、CD3 代謝酵素である mTOR, Rab4A,Rab4B の mRNA と CD3 合成 mRNA を測定し検討した。

## 3. 研究の方法

我々は自己抗体誘導のメカニズム解析のために既に自己抗体誘導が判明しているプリステンを使用して検討した。

まず 3 ヶ月齢 BALB/c マウスにプリステンあるいは PBS を投与し、3 ヶ月後に安楽死させ、血清、腹腔細胞、脾臓細胞、リンパ節細胞を使用して上記検討項目について評価した。PBS 投与マウスはプリステン投与マウスのコントロールとして使用した。

- (1) 上記マウスから血清を採取し、血清中のアルジニンを測定し、プリステン投与マウスと PBS 投与マウスを比較検討した。
- (2) アルジニンの低下がなぜ起こるか検討す



るために、上図のアルジニン代謝に関与する Arginase1,2, iNOS、さらにアルジニンを運搬する CAT1,2 の活性を mRNA によって

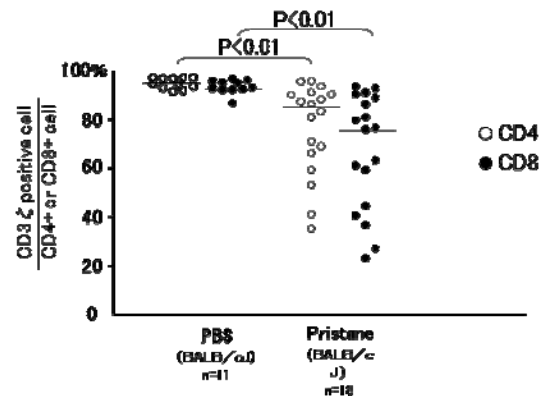
評価し、プリステン投与マウスとPBS投与マウスを比較検討した。

- (3) 上記マウスの脾臓細胞と腹腔細胞を使用し、核内染色の上FCM法によってT細胞CD3の発現を検討し、プリステン投与マウスとPBS投与マウスを比較検討した。
- (4) CD3の発現と自己抗体誘導との関係について検討した。自己抗体は上記マウスの血清を使用しサンドイッチELISA法にてssDNA抗体とクロマチン抗体を測定し、CD3の発現と比較検討した。
- (5) アルギニンとCD3の発現との関係を見るために、上記マウス腹腔細胞と脾臓細胞を培養し、その培養細胞にアルギニンを添加して、CD3の発現の変化を検討した。
- (6) 上記マウスの脾臓細胞を使用して、CD3の代謝酵素であるmTOR, Rab4A, Rab4BのmRNAを抽出しRT-PCRで定量し、プリステン投与マウスとPBS投与マウスの各mRNAを比較検討した。さらにCD3の合成に關与するmRNAも測定し、プリステン投与マウスとPBS投与マウスを比較検討した。

#### 結果

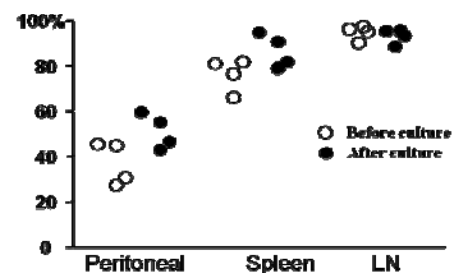
- (1) プリステン投与マウスの血清中のアルギニンは、コントロールであるPBS投与マウスと比較して減少した。このことは人自己免疫疾患と同様の現象であった。
- (2) 次にアルギニンの低下のメカニズム解明のため、代謝酵素活性を検討した。Arginase1,2, iNOSの活性が上昇していた。さらにCAT1,2(アルギニン運搬酵素)の活性も上昇していた。従ってアルギニンの低下は、アルギニンの代謝が進むことで起こっている可能性が考えられた。しかし酵素活性が上昇した理由は不明である。プリステンを投与したマウスの腹腔内には非特異的炎症が発生することがわかっており(腹水がたまる)、このことが何らかの影響を及ぼした可能性が考えられたが、明確でなく、さらなる検討が必要であると思われた。
- (3) プリステンあるいはPBS投与マウスの腹腔細胞と脾臓細胞内のT細胞CD3発現を評価した。コントロールのPBS投与マウス

と比較して、明らかにプリステン投与マウスではCD3発現が低下していた。



注) 腹腔細胞のCD3発現をFCMを使用して評価した。CD4陽性、CD8陽性細胞ともにプリステン投与マウスでCD3発現の低下が見られた。

- (4) CD3発現の低下と自己抗体誘導の関係を検討した。CD3発現の低下と自己抗体の誘導には負の相関関係が見られた。さらに、腹腔細胞数とCD3発現との関係にも負の相関関係が見られた。腹腔細胞が増加することは、非特異的炎症が強い事を意味しており、炎症の強さとCD3発現の低下が関係し、さらにそのことが自己抗体誘導に關与する可能性が考えられた。
- (5) CD3発現低下とアルギニンの減少との関係を評価するために、プリステン投与マウスの腹腔細胞と脾臓細胞を使用し、まずCD3発現を評価した。その上でCD3発現の低下した細胞を培養し、アルギニンを添加し、その影響を見ると、CD3発現は上昇していた。CD3発現低下にアルギニンが關与している可能性が考えられた。



注) プリステン投与マウスの腹腔細胞、脾臓細胞、リンパ節細胞を使用し、CD3発現

現が低下した細胞にアルジニンを添加しその影響を見た。CD3 発現の上昇が見られた。

- (7) CD3 発現低下はどのようにして起こるか検討するため、CD3 の代謝酵素である mTOR, Rab4A, Rab4B の mRNA と CD3 の合成 mRNA を抽出し、RT-PCR 法で定量し、プリステン投与マウスと PBS 投与マウスを比較検討した。CD3 の代謝酵素である mTOR, Rab4A, Rab4B の mRNA と CD3 の合成 mRNA 共に低下していた。この結果から、CD3 発現低下は CD3 の合成が低下したために起こった可能性が考えられた。

以上の結果から、プリステンを投与した場合腹腔内に非特異的炎症が惹起され、それば原因でアミノ酸の1つであるアルジニンが低下する。それが何らかの経緯をたどって、CD3 の合成を阻害し、その結果自己抗体が誘導されるのではないかという仮説が考えられるが、この仮説には幾つか明確になっていない点があり、今後この点について検討する必要があると思われる。すなわち以下の点を今後検討する予定である。

- (1) アルジニンの低下がなぜ CD3 の合成を阻害するのか。  
(2) 他に自己抗体誘導のパスウエーがないのか

特に(2)については、現在自己免疫疾患の主要原因として考えられている TNF の関与について今後検討する必要があると思われる。

今までの研究で、プリステン投与マウスに見られる現象はヒト自己免疫疾患のそれと酷似していた。今後この動物モデルを使用して、自己抗体誘導のメカニズムを検討すれば、自己免疫疾患の原因あるいはメカニズムに迫れるのではないかと考えられる。

#### 4 . 研究成果

前述したようにこの研究でプリステン投与マウスはヒト自己免疫疾患に酷似した現象を示した。我々の検討の結果、鉱物油投与マウスにおける自己抗体誘導のメカニズムがある程度わかってきた。鉱物油投与マウスを使用した研究は我々以外には極めて限られた研究者し

か行っていない。しかし前述したように、その研究で得られる成果は、自己免疫疾患の病因を解明するに重要な情報を与える可能性が考えられる。今後もさらなる研究を行っていきたい。

#### 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2件)

黒田嘉紀、竹内昌平、鉱物油の免疫学的影響、宮崎県医師会医学会誌、査読なし、33(1)、2009、1-6

黒田嘉紀、山内武紀、竹内昌平、鉱物油の生態影響、産業医学レビュー、査読なし、24(1)、2011、1-11

[学会発表](計2件)

黒田嘉紀、他、鉱物油の危険性について(免疫学的観点から)産業衛生学会バイオマーカ研究会、2008年6月25日、札幌

黒田嘉紀、他、ホルムアルデヒドの免疫学的影響、日本産業衛生学会、2009年5月20日、福岡

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他](計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒田 嘉紀 (KURODA YOSHIKI)  
宮崎大学・医学部・教授  
研究者番号：50234620

### (2) 研究分担者

研究者番号：

### (3) 連携研究者

櫛田 尚樹 (KUNUGIDA NAOKI)  
産業医科大学・産業保健学部・准教授  
研究者番号：90178020

平野 靖史郎 (HIRANO SEISIRO)  
独立行政法人国立環境研究所・環境リスク  
研究センター・室長  
研究者番号：20150162