

平成22年 5月27日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790122

研究課題名（和文）

バイオエタノールから生産されるガソリン添加剤ETBEの免疫応答に与える影響

研究課題名（英文）

The effect of ethyl tertiary-butyl ether, a bioethanol-derived fuel oxygenate, on immune responses

研究代表者

八巻 耕也 (YAMAKI KOUYA)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00351768

研究成果の概要（和文）：

バイオエタノールから生産されるガソリン添加剤 ETBE の免疫応答に与える影響について解析するために、ETBE のアジュバント作用について検討した。抗原である卵白アルブミンおよび 0.1、0.3、1 および 3 % ETBE を含む生理食塩水を腹腔内投与した結果、3 % ETBE の腹腔内投与はマウスに対して致死的な毒性を示すことが明らかとなった。また抗原投与の 21 日後に血清中の抗卵白アルブミン IgG 量を測定した結果、0.1 から 1 % の ETBE はアジュバント作用を示さないことが明らかになった。そこで次に、ETBE の複数回腹腔内投与がアジュバント作用を示すか検討した。抗原および 1 % ETBE を腹腔内投与し、以後週 5 日、1 % ETBE を腹腔内投与した。その結果、卵白アルブミンのみを腹腔内投与したマウスの血清中の抗卵白アルブミン IgG レベルと比較して、卵白アルブミンを腹腔内投与し、複数回 ETBE を腹腔内投与したマウスの血清中の抗卵白アルブミン IgG レベルが上昇することが明らかとなった。このことから、ETBE は持続的な曝露によりアジュバント作用を示す可能性が考えられた。

また、免疫応答と関連が深い肥満細胞の脱顆粒反応に対する ETBE の影響についても解析した。その結果、1 % ETBE は肥満細胞の脱顆粒反応を抑制した。

これらのことから 1 % ETBE の生体への曝露は生体機能に影響を及ぼすことが示唆された。1 % という濃度は一般的な ETBE 曝露レベルより低いいため、通常生じうる ETBE の曝露がヒトの免疫系に影響を与える可能性は低いと思われるが、事故などによる高濃度の ETBE の曝露は、免疫応答に影響を及ぼすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

To determine the effect of ETBE, a bioethanol-derived fuel oxygenate, on immune response, the adjuvant effect of ETBE was investigated. First, we injected ovalbumin and 0.1 to 3 % ETBE in saline solution to mice. After 21 days, anti-OVA IgG levels in serum of the mice were measured. The mice injected with 3 % ETBE were dead within a day. ETBE at concentrations between 0.1 to 1 % did not affect anti-OVA IgG level, thus single injection of ETBE with the antigen was considered to have no adjuvant effect on the antibody production. Next, we injected 1 % ETBE 5 times per week from day 0 to day 20 to mice immunized with ovalbumin on day 0. The levels of anti-OVA IgG in serum of immunized mice with successive injection of 1 % ETBE were higher than those of immunized mice without injection of ETBE. This result indicated that the chronic exposure of ETBE might exert adjuvant activity.

In addition, 1 % ETBE treatment attenuated the degranulation of mast cell line RBL2H3.

These results indicated 1 % ETBE may potentially affect immune responses. Although low concentrations of ETBE evaporated from fuels might not affect human health, accidental exposure to a high concentration of ETBE is likely to affect immune responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	2,000,000	600,000	2,600,000
平成21年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：環境系薬学

科研費の分科・細目：6805

キーワード：ETBE、バイオエタノール、免疫、T細胞

1. 研究開始当初の背景

バイオエタノールから生産される ETBE は、ガソリン添加剤として使用することで、ガソリンの使用による地球温暖化の原因である CO₂ の排出を減少させる。そのため、多くの国で地球温暖化に対する対策の一つとして ETBE が使用されている。ETBE は、他のガソリン添加物候補であるエタノールと比較して、水との親和性が低く、ガソリンと混合しても蒸気圧を上昇させないことから、添加したガソリンの品質が良好に保たれる、さらに、ガソリンのオクタン価を高めるといった利点を持つ。そのため、ETBE は地球温暖化への対策に用いるガソリン添加物の中でも、特に有望な化合物であり、わが国でも地球温暖化対策の一つの柱として ETBE 添加ガソリンの使用が 2007 年から首都圏で開始された。ガソリン添加剤として用いられる場合、ETBE のヒトへの曝露は経気道的であるものが大部分であり、その絶対量は少ない (MA Medinsky, DC Wolf et al. Effects of thirteen-week inhalation exposure to ethyl tertiary butyl ether on Fischer-344 rats and CD-1 mice. *Toxicol. Sci.* 51(1), 108-118 (1999)) と考えられるが、今後は、首都圏以外にも供給が拡大される予定であり、その利用がさらに進むことが予想されるため、ヒトへの曝露量は増加していくものと考えられる。さらに、ETBE は「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法)」の「第二種監視化学物質」(生物の体内には蓄積し難いが、環境中で容易に分解せず、継続的に摂取される場合に人の健康を損なうおそれの疑いがある、との性質を有する化学物質) と判定され、また、神経系の働きに影響を及ぼす可能性がある化合物であることが報告されている (JV Martin, SV Iyer et al. Influence of oxygenated fuel additives

and their metabolites on gamma-aminobutyric acid A (GABA) receptor function in rat brain synaptoneuroosomes. *Toxicol. Lett.* 147(3), 209-217, (2004))。このように、ETBE が生理活性を有すること、また、そのヒトへの曝露量が今後増加すると考えられることから、ガソリン添加剤として使用される ETBE の生体に与える影響が懸念されている。しかし、その社会的関心の高さにもかかわらず、ETBE の曝露が免疫応答に与える影響や、免疫応答と関係が深いアレルギーおよび自己免疫疾患に与える影響についての報告はなされていなかった。

2. 研究の目的

ETBE が Th1/Th2/Th3/Tr1 免疫応答に与える影響について解析する。さらに、Th1/Th2/Th3/Tr1 免疫応答と関連が深いアレルギーおよび自己免疫疾患に対する ETBE の影響についても、花粉症モデルや関節炎モデルを用いて解析する。これらの解析により明らかとなる ETBE の免疫応答に与える影響から ETBE の無毒性量を推定するとともに、無毒性量以上の ETBE の曝露により、免疫応答およびそれに関連したアレルギー疾患モデル、自己免疫疾患モデルがどのような影響を受けるか解析し、ヒトが何らかの事故により大量の ETBE に曝露された場合の症状の推定や対処法の策定に有用な知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

ETBE の摂取が免疫反応の成立にどのような影響を及ぼすか、自己免疫疾患である関節リウマチなどにおいて重要な役割を果たすと考えられている Th1 免疫応答、アレルギー疾患である花粉症および気管支喘息など

において重要な役割を果たすと考えられている Th2 免疫応答、および免疫抑制を担う Th3、Tr1 免疫応答、これら 4 種の免疫応答のバランスに与える影響という点に着目して解析する。ETBE に曝露されたマウスと ETBE に曝露されていないマウスを抗原で免疫し、血清中の抗原に対する IgG、Th1 依存性抗体である IgG2a および Th2 依存性抗体である IgE、IgG1 量を経時的に比較することにより、免疫系に対してアジュバント作用を示す ETBE の曝露量、曝露経路（経口、腹腔内、気道曝露）および摂取期間などの条件を明らかにする。その条件を用いて、ETBE の曝露が、脾臓およびリンパ節 T 細胞の免疫抗原に対する増殖反応、Th1 サイトカイン interleukin (IL)-2 および interferon (IFN)- γ 、Th2 サイトカイン IL-4、Th3 サイトカイン transforming growth factor (TGF)- β 、および Tr1 サイトカイン IL-10 の産生に与える影響について検討する。また、ETBE の曝露が、免疫されたマウスの足蹠への抗原の注入により即時型に引き起こされる Th2 依存型、および遅延型に引き起こされる Th1 依存型のアレルギー性足浮腫モデルにどのような影響を及ぼすか検討する。さらに、Th1 免疫応答依存性の疾患モデルであるコラーゲン誘導関節炎、および Th2 免疫応答依存性のアレルギー疾患モデルである花粉症モデルに対する ETBE の曝露の影響について検討し、これらのモデルにおいて ETBE の曝露が Th1/Th2/Th3/Tr1 バランスへ与える影響、すなわち炎症局所への Th1/Th2/Th3/Tr1 細胞の遊走、浸潤、および活性化、また Th1/Th2/Th3/Tr1 細胞の発生、分化に与える影響などを免疫染色法、フローサイトメトリー法を用いて明らかにする。

4. 研究成果

本研究により、ガソリン添加剤である ETBE の慢性的な曝露が、ヒトの免疫応答に影響を及ぼす可能性が示唆された。

まず、ETBE のアジュバント作用の検討を行うに先立ち、ETBE の腹腔内投与による急性毒性を明らかにすることを試みた。種々の濃度の ETBE と生理食塩水を混和し、腹腔内に投与することにより、マウスが耐えうる ETBE の濃度について検討したところ、3% の ETBE を含む生理食塩液 500 μ l の腹腔内投与は、マウスに対して急性毒性を示すことが明らかとなった (Table 1)。一方、1% 以下の ETBE を含む生理食塩液は体重減少などの毒性を示さなかった。

Table 1

Toxicity of intraperitoneal injection of ETBE to mice

ETBE (%)	Number of dead/number of tested
0	0 / 7
0.1	0 / 8
0.3	0 / 8
1.0	0 / 8
3.0	8 / 8

そこで、マウスに対して明らかな毒性を及ぼさない 1% までの濃度の ETBE にアジュバント作用があるか検討した。抗原である卵白アルブミンおよび 0.1 から 1% の ETBE を含む生理食塩水を単回腹腔内投与し、21 日後、血清中の抗卵白アルブミン IgG 量を測定した。しかし、卵白アルブミンのみを腹腔内投与したマウスの血清中の抗卵白アルブミン IgG 量と、卵白アルブミンを ETBE とともに腹腔内投与したマウスの血清中の抗卵白アルブミン IgG 量には違いは認められなかった (Figure 1)。このことから、抗原と同時に単回曝露された場合、ETBE にはアジュバント作用は認められないことが明らかとなり、ETBE の急性曝露がヒトの免疫系に影響を与える可能性は低いと考えられた。

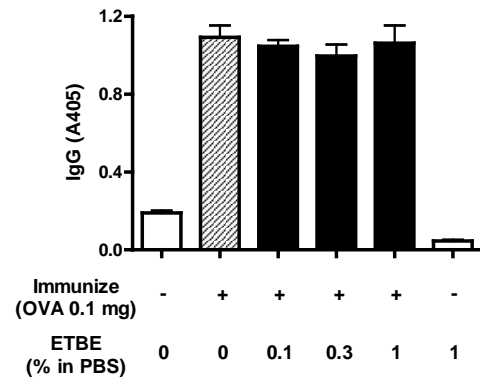


Figure 1 The effect of single ETBE exposure on anti-OVA IgG production in mice.

Mice were i. p. injected with 100 μ g of OVA with or without 0.1, 0.3, and 1% of ETBE (day 0). On day 21, anti-OVA IgG antibodies in sera were determined by ELISA. Values are expressed as mean + S.E.M. of 5 to 8 mice.

次に、ETBE の慢性曝露が免疫系に影響を与える可能性について検討した。抗原である卵白アルブミンおよび 1% の ETBE を含む生理食塩水を腹腔内投与あるいは経口投与し、以後週 5 日、1% ETBE 生理食塩水を腹腔内投与あるいは経口投与した。21 日後、血清中の抗卵白アルブミン IgG 量を測定し

た。その結果、卵白アルブミンのみを腹腔内投与したマウスの血清中の抗卵白アルブミン IgG レベルと比較して、卵白アルブミンを腹腔内投与し、複数回 ETBE を腹腔内投与したマウスの血清中の抗卵白アルブミン IgG レベルが上昇することが明らかとなった (Figure 2)。このことから、ETBE は持続的な曝露によりアジュバント作用を示す可能性が考えられた。なお、抗原と ETBE の経口投与は、マウスの免疫応答には影響を与えなかった (Figure 2)。今後、さらに ETBE が有するアジュバント作用を明らかにするために、Th1/Th2/Th3/Tr1 免疫応答それぞれに与える影響について、解析を続ける。

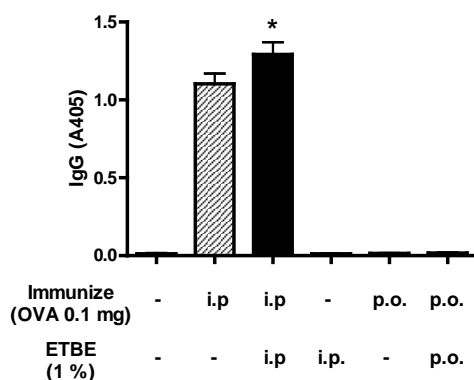


Figure 2 The effect of successive ETBE exposure on anti-OVA IgG production in mice.

Mice were i.p. injected or p.o. administered with 100 μ g of OVA on day 0. The mice were i.p. injected or p.o. administered everyday with or without 1% of ETBE till day 20. On day 21, anti-OVA IgG antibodies in sera were determined by ELISA. Values are expressed as mean + S.E.M. of 5 to 8 mice. * $p < 0.05$ vs i.p. immunized mice without ETBE injection.

また、免疫応答と関連が深い肥満細胞の脱顆粒反応に対する ETBE の影響についても解析した。その結果、1% ETBE は肥満細胞のモデル細胞であるラット好塩基球性白血病細胞株 RBL2H3 細胞の抗卵白アルブミン IgE と抗原である卵白アルブミンに依存的な脱顆粒反応を抑制することが明らかとなった (Figure 3)。なお、この脱顆粒抑制作用には、ETBE のチロシンキナーゼ、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼの活性化の抑制作用および細胞内カルシウム濃度上昇に対する抑制作用が関与していることも併せて明らかにした (data not shown)。

これらのことから 1% ETBE の生体への曝露は生体機能に影響を及ぼすことが示唆された。1% という濃度は一般的な ETBE 曝露

レベルより低いため、通常生じうる ETBE の曝露がヒトの免疫系に影響を与える可能性は低いと思われるが、事故などによる高濃度の ETBE の曝露は、免疫応答に影響を及ぼすと考えられる。

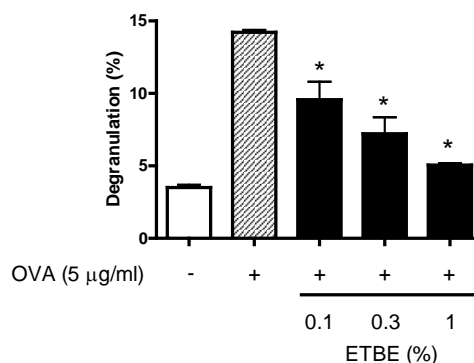


Figure 3 Effect of ETBE on the release of β -hexosaminidase from RBL2H3 cells.

Anti-ovalbumin IgE-sensitized RBL2H3 cells were pre-incubated with the indicated concentrations of ETBE for 15 min. The cells were then stimulated with ovalbumin (5 μ g/ml) in the presence or absence of ETBE. The quantity of β -hexosaminidase is expressed as the percentage of total β -hexosaminidase. Bars show means and S.E.M. of six cultures. * $p < 0.05$ vs absence of compound.

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 6 件)

Yamaki K, Yoshino S
Comparison of inhibitory activities of zinc oxide ultrafine and fine particulates on IgE-induced mast cell activation
Biometals 2009, 22, 1031-1040

Yamaki K, Yoshino S
Inhibition of IgE-induced mast cell activation by ethyl tertiary-butyl ether, a bioethanol-derived fuel oxygenate
Journal of Pharmacy and Pharmacology 2009, 61, 1243-1248

Hutamekalin P, Saito T, Yamaki K, Mizutani N, Brand DD, Waritani T, Terato K, Yoshino S
Collagen antibody-induced arthritis in mice: development of a new arthritogenic

5-clone cocktail of monoclonal anti-type II collagen antibodies
Journal of Immunological Methods 2009, 343, 49-55

Huang F, Yamaki K, Tong X, Fu L, Zhang R, Cai Y, Yanagisawa R, Inoue K, Takano H, Yoshino S.

Inhibition of the antigen-induced activation of RBL-2H3 cells by sinomenine
International Immunopharmacology 2008, 8, 502-507

Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Sakurai M, Shimada A, Satoh M, Yoshino S, Yamaki K, Yoshikawa T.

Antioxidative role of interleukin-6 in septic lung injury in mice
International Journal of Immunopathology and Pharmacology 2008, 21, 501-507

Noya Y, Mikami Y, Taneda S, Mori Y, Suzuki AK, Ohkura K, Yamaki K, Yoshino S, Seki K. Improvement of an efficient separation method for chemicals in diesel exhaust particles: analysis for nitrophenols
Environmental Sciences and Pollution Research International 2008, 15, 318-321

[学会発表] (計3件)

八巻 耕也、吉野 伸
Zinc Oxide ナノ粒子がラット好塩基球性白血球細胞株 RBL2H3 の活性化に与える影響
第115回 日本薬理学会近畿部会
2009年6月26日、金沢

八巻 耕也、吉野 伸
ラット好塩基球性白血球細胞株 RBL2H3 細胞の Fc ϵ RI 依存的な活性化に対するバイオエタノールから生産されるガソリン添加物 ETBE の影響
日本薬学会 第129年会
2009年3月27日、京都

八巻 耕也、吉野 伸
I型アレルギー反応のブチルヒドロキシトルエン (BHT) による増強
日本薬学会 第128年会
2008年3月28日、横浜

[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]
ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
八巻 耕也 (YAMAKI KOUYA)
研究者番号: 00351768

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号: