

Environment Research and Technology Development Fund

環境省環境研究総合推進費終了研究等成果報告書

黄砂、PM2.5の組成別毒性評価に基づく大気モニタリングと
感受性者検査システムの構築
(5-1453)

平成26年度～平成28年度

A Study to Determine the Toxicity of Substances Contained in Asian Dust
and PM2.5, and Monitor Their Effect on Health

鳥取大学
京都薬科大学

平成29年5月

環境省
総合環境政策局総務課環境研究技術室
環境保健部環境安全課環境リスク評価室
地球環境局総務課研究調査室

黄砂、PM2.5の組成別毒性評価に基づく大気モニタリングと

感受性者検査システムの構築

(5-1453)

I. 成果の概要	・ ・ ・ ・ ・	i
1. はじめに（研究背景等）		
2. 研究開発目的		
3. 研究開発の方法		
4. 結果及び考察		
5. 本研究により得られた主な成果		
6. 研究成果の主な発表状況		
7. 研究者略歴		
II. 成果の詳細		
(1) 黄砂、PM2.5 の組成別でのヒト毒性について定量的評価 (国立大学法人鳥取大学、大学共同利用機関法人情報システム研究機構統計数理研究所)	・ ・ ・ ・ ・	1
要旨	・ ・ ・ ・ ・	2
1. はじめに	・ ・ ・ ・ ・	3
2. 研究開発目的	・ ・ ・ ・ ・	4
3. 研究開発方法	・ ・ ・ ・ ・	5
4. 結果及び考察	・ ・ ・ ・ ・	9
5. 本研究により得られた成果	・ ・ ・ ・ ・	5 4
6. 国際共同研究等の状況	・ ・ ・ ・ ・	5 4
7. 研究成果の発表状況	・ ・ ・ ・ ・	5 4
8. 引用文献	・ ・ ・ ・ ・	5 9
(2) 黄砂、PM2.5 のアレルギー毒性、炎症誘導および発がん性の評価 (国立大学法人鳥取大学)	・ ・ ・ ・ ・	6 1
要旨	・ ・ ・ ・ ・	6 1
1. はじめに	・ ・ ・ ・ ・	6 2
2. 研究開発目的	・ ・ ・ ・ ・	6 2
3. 研究開発方法	・ ・ ・ ・ ・	6 2
4. 結果及び考察	・ ・ ・ ・ ・	6 8
5. 本研究により得られた成果	・ ・ ・ ・ ・	8 0
6. 国際共同研究等の状況	・ ・ ・ ・ ・	8 2
7. 研究成果の発表状況	・ ・ ・ ・ ・	8 2
8. 引用文献	・ ・ ・ ・ ・	8 3
(3) 黄砂、PM2.5 の成分解析 (学校法人京都薬科大学)	・ ・ ・ ・ ・	8 6
要旨	・ ・ ・ ・ ・	8 6
1. はじめに	・ ・ ・ ・ ・	8 7
2. 研究開発目的	・ ・ ・ ・ ・	8 7
3. 研究開発方法	・ ・ ・ ・ ・	8 7
4. 結果及び考察	・ ・ ・ ・ ・	8 8
5. 本研究により得られた成果	・ ・ ・ ・ ・	1 0 5
6. 国際共同研究等の状況	・ ・ ・ ・ ・	1 0 6
7. 研究成果の発表状況	・ ・ ・ ・ ・	1 0 6
8. 引用文献	・ ・ ・ ・ ・	1 0 7
III. 英文Abstract	・ ・ ・ ・ ・	1 0 8

課題名 5-1453 黄砂、PM2.5の組成別毒性評価に基づく大気モニタリングと感受性者検査システムの構築

課題代表者名 渡部 仁成（国立大学法人鳥取大学 医学部附属病院 第三内科診療科群 講師）

研究実施期間 平成26～28年度

累計予算額 153,275千円（うち平成28年度：46,811千円）
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 黄砂、PM2.5、疫学調査、児童、炎症、発がん、アレルギー、成分解析、大気モニタリング

研究体制

- (1)黄砂、PM2.5 の組成別でのヒト毒性について定量的評価（国立大学法人鳥取大学）
- (2)黄砂、PM2.5 のアレルギー毒性、炎症誘導および発がん性の評価（国立大学法人鳥取大学）
- (3)黄砂、PM2.5 の成分解析（学校法人京都薬科大学）

研究協力機関

大学共同利用機関法人情報システム研究機構統計数理研究所
学校法人長崎国際大学

研究概要

1. はじめに（研究背景等）

黄砂、PM2.5などの浮遊粒子状物質のヒトへの健康影響が報告されている。我々も黄砂、PM2.5が喘息患者での呼吸機能や症状を増悪させることを明らかにしてきた。一方で、海外報告また我々のこれまでの調査においても、黄砂やPM2.5の呼吸器への影響は必ずしも同じではなく、時期や地域によって異なる可能性が示唆されている。さらに、感受性因子の存在も示唆されている。海外からも同様に地域や季節によってPM2.5の毒性が異なることが報告されるようになってきている。最近では、発生源によってPM2.5の循環器疾患への影響が異なり、循環器への影響は石炭燃焼によるPM2.5の影響が強いことも報告されている。以上のことから、PM2.5や黄砂などの粒子状物質の健康影響は組成によって異なる可能性が考えられる。しかし、黄砂やPM2.5を組成する物質のうちどのような物質がヒトへの毒性が強いのか詳細は明らかになっていない。さらに、黄砂、PM2.5が循環器疾患、呼吸器疾患、アレルギー疾患を増悪させ、発がん性があることが明らかになるなかで、そのメカニズムは不明なことが多い。黄砂やPM2.5の健康被害を予防するために、単に粉塵量をモニタリングするのではなく、黄砂、PM2.5に含まれる毒性の強い物質、さらには健康に影響するメカニズムを明らかにしていくことが重要と考えられる。

2. 研究開発目的

PM2.5、黄砂の健康影響について本邦でも関心が高いが、他国に比較して疫学調査は少ない。本研究では、まず疫学調査でPM2.5、黄砂の健康リスク評価を行うことを目的とした。特にPM2.5、黄砂の子供への短期曝露影響について関心は高く、小学校児童で呼吸機能、呼吸器症状、皮膚症状のモニタリングを行い、PM2.5、黄砂の短期曝露影響を評価した。PM2.5の健康影響の結果は、国や地域、季節によって乖離があり、発生源により健康リスクが異なることが考えられる。そこで、疫学調査を実施する期間に24時間毎にSPM、PM2.5を捕集し、24時間毎のSPM、PM2.5の毒性を評価することを試みた。この毒性の評価は、SPM、PM2.5の炎症誘導能を定量することで行った。従来のように疫学調査で得られたデータを、単にPM2.5、黄砂、SPMの質量との関連で評価するのではなく、SPM、PM2.5が持つ炎症誘導能との関連も検討し、組成の違いによる健康リスクについて解析を行った。捕集したSPM、PM2.5の炎症誘導能を評価するとともに、成分解析を行い、組成物のうち炎症やアレルギー、発がんへの関与が高い物質の同定を試みた。大気中あるいはSPM、PM2.5、黄砂にはエンドキシンが含まれることが報告されている。エンドキシンは強い炎症誘導能を持つことから、24時間毎に捕集したSPM、PM2.5に含まれるエンドキシン濃度を測定し、PM2.5、黄砂が健康に影響を及ぼす際に、エンドキシンの関与について疫学調査および基礎研究から検討を行った。PM2.5の健康リスクは臓器毎に異なっており、循環器疾患での影響が確認されやすく、呼吸器疾患では結果が異なることも多い。PM2.5の影響が臓器毎に異なる原因

を検討するために、採取した同一のPM2.5をヒトから抽出したprimaryな血管内皮細胞、気道上皮細胞、白血球単球に曝露させ、産生されるタンパクの違いを比較した。また、黄砂に対する感受性者、非感受性者がいるか検討するために、喘息患者の血液に黄砂時の粉塵を添加し、アレルギー反応を評価した。

このような検討から本課題は、黄砂、PM2.5の健康リスクについて、炎症、発がん性、アレルギーという観点から明らかにすることを目指した。その過程で、黄砂、PM2.5の組成物のうちヒトへの毒性が高い物質の同定を試みた。また、得られた研究成果を活用して、黄砂、PM2.5への高感受性者を血液で判定できる検査システムの構築や、黄砂、PM2.5の健康リスクを単に質量ではなく毒性で評価できる観測方法の開発へ繋げていくこと目指した。

3. 研究開発の方法

(1) 黄砂、PM2.5 の組成別でのヒト毒性について定量的評価

黄砂、PM2.5、SPMの短期曝露による健康リスクを評価するために、小学校児童を対象に疫学調査を実施した。2015年2月と10月は児童400名、2016年9月から10月は児童300名を対象にした。2015年2月の調査では、ピークフローメーターによる毎日の呼吸機能測定と皮膚症状(かゆみ、発赤)について、なし=0点、少し=1点、多い=2点で記録し、2015年10月に呼吸器症状(咳、痰)について、なし=0点、少し=1点、多い=2点で記録した。2016年9月から10月は、毎日の呼吸機能測定と呼吸器症状の記録を行った。2015年の調査期間には24時間毎にSPMを、2016年の調査期間にはPM2.5の捕集を同時に行った。捕集したSPM、PM2.5でヒト由来単球、気道上皮細胞を刺激培養し、培養上清中の炎症性サイトカイン濃度を測定し、その濃度を各日のSPM、PM2.5の炎症誘導能と定義し、ヒトへの毒性とした。また、SPM、PM2.5のエンドトキシン濃度の測定も行った。2015年2月にはSPMに含まれる(あるいは付着する)真菌量の定量を行った。

スギ花粉症合併成人喘息患者から2ccの全血採血を行い、2013年の黄砂時に採取した大気粉塵懸濁液上清を添加し、好塩基球表面のCD203cの発現をflow cytometryで測定し、黄砂時大気粉塵中に即時型アレルギー反応を起こすタンパクが存在するか評価した。

PM2.5に反応してヒトがどのようなタンパクを産生分泌するか、1000種類のタンパクについて網羅的に解析を行った。この際、PM2.5で刺激する細胞はヒトから直接摘出された、気管支上皮細胞、単球、臍帯内皮細胞の3種類を用い、臓器毎にPM2.5への反応が異なっているか検討した。

(2) 黄砂、PM2.5 のアレルギー毒性、炎症誘導および発がん性の評価

越境飛来する大気汚染物質(黄砂、PM2.5ならびに大気粉塵等)の中でアレルギー・炎症誘導ならびに細胞がん化を誘発する原因物質の推定は、サブテーマ①ならびにサブテーマ③の大気汚染物質採集調査結果ならびに文献検索調査等をもとに行った。

飛来する大気汚染物質(黄砂、PM2.5ならびに大気粉塵等)が、実験動物個体(生体)においてアレルギーや炎症反応を誘導するか否かは、5週齢以降のC57BL/6雌マウスを用いた。マウスに生理食塩水に溶解した焼灼大気汚染物質(NIES CRM, No. 28, 1,700 mg/kgあるいは170 mg/kg)を腹腔内投与して、滲出細胞数、炎症細胞の種類の決定ならびにアレルギー・炎症反応に関連する遺伝子発現をリアルタイムPCRによって解析した。

大気汚染物質の発がん性評価には、発がん感受性の退縮型マウス線維肉腫細胞(QR-32細胞)と、焼灼大気汚染物質ならびにこれに付着する金属等を用いた。48穴プレートに細胞を 2×10^3 個播種し、週2回の頻度で越境大気汚染物質(金属等を含む)を含む新たな培地に交換し、1週間毎に細胞を回収して播種し直した。持続添加培養30日毎に処理細胞の一部を分取し、これを正常マウス皮下に 1×10^7 個移植して致死増殖(がん化)を獲得したか否かを評価した。

(3) 黄砂、PM2.5 の成分解析

黄砂及びPM2.5の飛散と喘息増悪に関与すると考えられているエンドトキシン及びタンパクとの関係について明らかにするため、2014年5月から2016年5月まで長崎県佐世保市と京都府京都市において大気粉塵(PM2.5、粗大粒子)を1週間分ずつ捕集し、粉塵中に含まれるエンドトキシン、タンパク及びイオンを、それぞれリムルテスト、マイクロBCA法及びイオンクロマトグラフ法で分析した。また、2015年と2016年の3月から5月と2016年9月から11月に総大気粉塵(TSP)を1日分ずつ捕集し、同様の検討を行った。

越境大気汚染に関連する化学成分(タンパクなど)を探索するため、2014年4月から7月及び2015年3月から6月に佐世保市及び京都市において捕集した大気粉塵(PM2.5、粗大粒子、TSP)についてSDS-ポリアクリアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)と銀染色により解析を行った。また、2015年3月から5月と2015年9月から11月に両地点において捕集したPM2.5と粗大粒子について高速液体クロマトグラフ-質量分析により成分分析を行った。黄砂あるいはPM2.5が多く飛散した時期及び飛散が少なかった時期の大気粉塵の炎症性サイトカイン誘導能を評価するため、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として持つベクターにTNF- α 遺伝子プロモーター領域を組み込んだレポータープラスミドを作製し、これを導入した細胞試験系を構築した。本試験法を用い、2014年7

月から10月、2015年3月から6月及び2015年9月から11月に佐世保市及び京都市で捕集したPM2.5と粗大粒子の抽出物についてTNF- α 誘導能を試験した。

4. 結果及び考察

(1) 黄砂、PM2.5 の組成別でのヒト毒性について定量的評価

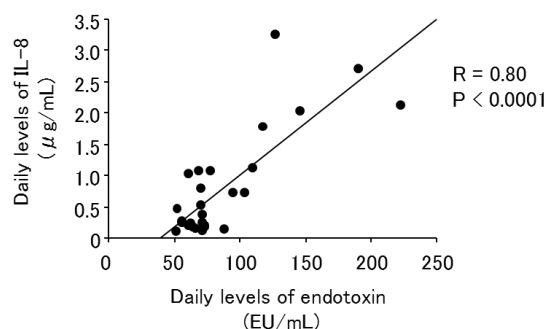
2015年2月に調査した小学校児童のうち、呼吸機能の記載が90%未満と同意撤回をした児童を除く339名について、SPM、PM2.5、エンドトキシン濃度、24時間毎に採取したSPM刺激により単球が産生した炎症性サイトカインであるIL-8濃度と呼吸機能の関連について線型混合モデルにより解析した(表(1)-1)。

表(1)-1 Multivariate analysis using linear mixed models of the association between peak expiratory flow (PEF) and SPM, PM2.5, IL-8, and endotoxin levels, by interquartile range (IQR)

Exposure metric	IQR	Change in PEF		
		(L/min)	95% CI	P value
SPM	12.0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	-1.36	-2.93 to 0.22	0.090
PM _{2.5}	10.0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	-1.72	-3.82 to 0.36	0.106
IL-8	0.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$	-1.07	-2.05 to -0.08	0.035
Endotoxin	35.9 EU/mL	-0.61	-1.40 to 0.14	0.105

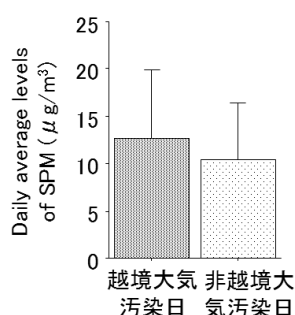
CI, confidence interval.

2012年、2013年に同様に児童で実施した調査では、SPM、PM2.5の濃度上昇によりピークフロー値は有意な低下を認めたが、2015年2月の調査では、関連を認めなかった。しかしながら、IL-8濃度上昇に伴い、ピークフロー値は有意な低下していた。この結果から、SPM、PM2.5の量ではなく、炎症惹起能が高い場合には児童の呼吸機能が低下することが示唆された。ヒトに実際に粒子状大気汚染物質を曝露させた場合に、気管支、肺内で増加することが確認されている炎症性サイトカインは、我々が調べたところIL-8のみであったことから、IL-8で評価を行っている。エンドキシン濃度とIL-8濃度は有意な正の相関を示し、さらに、その相関係数は0.8と極めて高値であった(図(1)-1)。エンドキシン濃度とピークフロー値に有意な関連はなかったが、IL-8濃度とは高い相関があり、SPM、PM2.5の組成物のうちエンドキシンはヒトの呼吸器システムに影響が高い物質と想定された。エンドキシン濃度とピークフロー値に有意な関連がなかった原因としては、エンドキシンは、SPM、PM2.5の重要な炎症惹起物質であるが、エンドキシンのみではなく、他の物質もSPM、PM2.5の炎症誘導に関わっていることが考えられた。今後は、エンドキシン以外の、SPM、PM2.5の炎症誘導に関わる物質を同定することが重要と思われた。

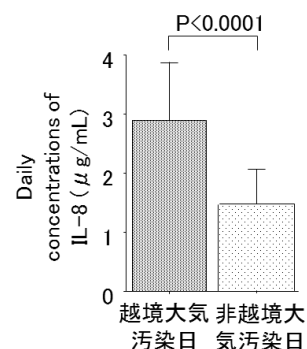


図(1)-1 Associations between daily levels of interleukin (IL)-8 and endotoxins.

2012年、2013年の調査結果とあわせ、PM2.5、SPMは小学校児童の呼吸機能と呼吸器症状を増悪させるが、その影響は組成によって異なると考えられた。山形大学理学部、柳澤文孝教授と共同研究を行うことで、Terra衛星とAqua衛星によるMODIS データを用いて、2015年2月と10月に山陰地区へ大陸からの大気汚染流入があると考えられた日を選定した。SPMの濃度は、越境大気汚染日が $12.6 \pm 7.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ と非越境大気汚染日が $10.5 \pm 5.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり差はなかった(図(1)-2)。しかし、IL-8濃度は、越境大気汚染日が $2.9 \pm 1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ と非越境大気汚染日が $1.5 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ とIL-6と同様に越境大気汚染日で有意に高かった(図(1)-3)。この結果から、大陸から越境大気汚染がある場合に、SPM濃度は上昇しないが、流入した汚染物質によりSPMの組成が影響を受け、炎症誘導能



図(1)-2 越境大気汚染日と非越境大気汚染日でのSPM濃度レベルの差異

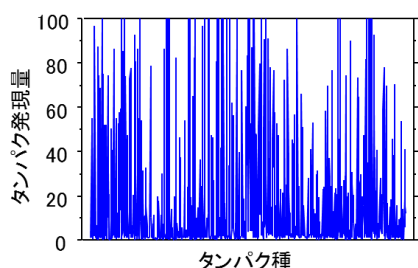


図(1)-3 越境大気汚染日と非越境大気汚染日でのIL-8濃度の差異

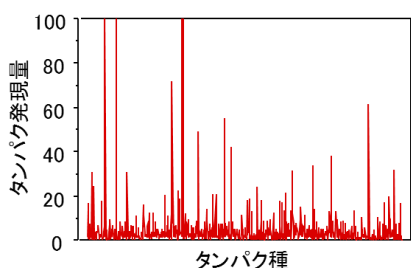
が上昇する可能性が示唆された。

2013年3月19日～20日の黄砂時に採取した大気粉塵の懸濁液上清を、スギ花粉特異的IgE抗体陽性喘息患者の全血に添加し、フローサイトメトリーで好塩基球表面のCD203cの発現を評価した。黄砂が飛来する時期にはスギ、ヒノキ花粉の飛散もあることから、対象をスギ花粉陽性患者とした。黄砂時粉塵により、好塩基球が活性化する症例と活性化しない症例が確認された。さらに、活性化した症例では、CD203cの発現は大気粉塵の濃度に依存して増強していた。このCD203cの発現増強は、抗原抗体反応の結果生じ、なんらかのタンパク成分により、アレルギー性炎症が惹起されたことを意味する。したがって、この時の黄砂時粉塵にはアレルギー反応を惹起するタンパクが含まれていることが示唆される。さらに、この時期はスギ花粉の飛散があるが、スギ花粉特異的IgE抗体陽性であっても、反応がある症例とない症例があることから、このアレルギー性炎症の増強がスギ花粉以外の物質に起因すると考えられる。したがって、黄砂時の粉塵にはスギ花粉以外のタンパクが含まれており、そのタンパクが一部の患者でアレルギー性炎症を増強させている。どのようなタンパクが大気粉塵に含まれているかについては、サブテーマ③で詳細な解析を行ったが、非常に低分子なタンパクしか検出されず、このCD203cの発現増強を説明できるものはなく、今後は解析方法を変えて検討する必要がある。

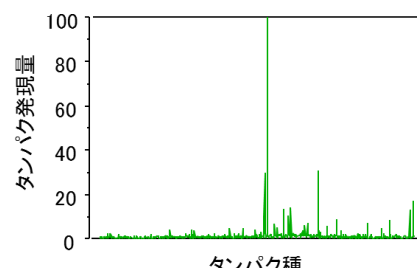
捕集したPM2.5でヒトから直接採取されたprimaryな気管支上皮細胞、単球、臍帯内皮細胞を24時間刺激培養し、それぞれの細胞が産生するタンパクについて1000種類の網羅的解析を行った。図(1)-4、5、6に各細胞がPM2.5の刺激に反応して産生したタンパクの分布を示す。横軸は1000種類のタンパク種、縦軸は発現量を示している。同一のPM2.5に対し気道上皮細胞、単球、血管内皮細胞が産生するタンパクはそれぞれで異なっており、同一のPM2.5であっても各臓器で影響が異なる可能性が示唆された。



図(1)-4 PM2.5の刺激によるhuman primary bronchial epithelial cellのタンパク産生



図(1)-5 PM2.5の刺激によるhuman primary monocyteのタンパク産生



図(1)-6 PM2.5の刺激によるhuman umbilical vein endothelial cellのタンパク産生

(2) 黄砂、PM2.5 のアレルギー毒性、炎症誘導および発がん性の評価

サブテーマ①の成果をもとに、大気汚染物質をマウスの体重当たり1,700 mg/kgあるいは170 mg/kgを腹腔内に投与した。陽性対照として、生体外異物であるゼラチンスポンジ(3×5×10 mm)を腹腔内に移入した。正常マウスの腹腔内細胞に比べて大気汚染物質を1,700 mg/kgあるいは170 mg/kg投与すると、それぞれ10.4倍あるいは6.9倍以上の炎症細胞の滲出を認めた(表(2)-1)。これは本系における標準炎症誘発異物(ゼラチンスポンジ)に比べて、顕著に滲出を誘導することが示された。次に、滲出細胞種の割合は、スポンジ移入による滲出細胞の割合ともほぼ同等であった(表(2)-2)。

表(2)-1 大気汚染物質により誘導される滲出炎症細胞数の比較

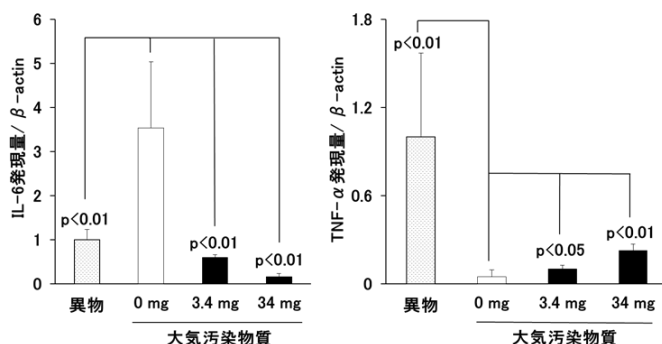
移入物質	解析個体数	滲出細胞数(×10 ⁶ 個)
移入無し	6	4.1 ± 0.2
大気汚染物質(1,700 mg/kg)	8	42.6 ± 5.6
大気汚染物質(170 mg/kg)	7	27.0 ± 7.8
ゼラチンスポンジ	5	11.1 ± 2.7

表(2)-2 大気汚染物質により誘導される滲出炎症細胞種の割合

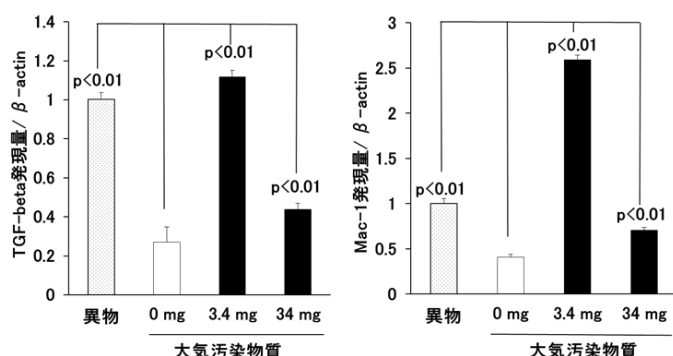
移入物質	単球・マクロファージ	顆粒球	リンパ球	その他
移入無し	77.0 ± 5.6%	3.0 ± 0.7%	15.0 ± 1.8%	7.0 ± 9.3%
大気汚染物質(1,700 mg/kg)	14.0 ± 2.9%	50.0 ± 4.0%	30.0 ± 5.5%	6.0 ± 4.3%
大気汚染物質(170 mg/kg)	10.9 ± 3.5%	50.8 ± 3.8%	33.2 ± 4.8%	5.2 ± 4.3%
ゼラチンスポンジ	12.0 ± 2.4%	51.0 ± 4.2%	27.0 ± 5.5%	10.0 ± 6.5%

次に滲出細胞に発現するアレルギー・炎症関連分子の発現様式を比較した(図(2)-1～図(2)-3)。その結果、大気汚染物質誘発の炎症細胞には、アレルギー・炎症関連の分子発現のうち、TNF- α 、TGF- β 、Mac-1、NOX₂の発現亢進と、IL-6の発現減少が特徴的であった。また、従来報告されている気管支喘息との関連が見いだされている一酸化窒素の合成酵素であるinducible nitric oxide (iNOS)は、ほとんど誘導されなかった。

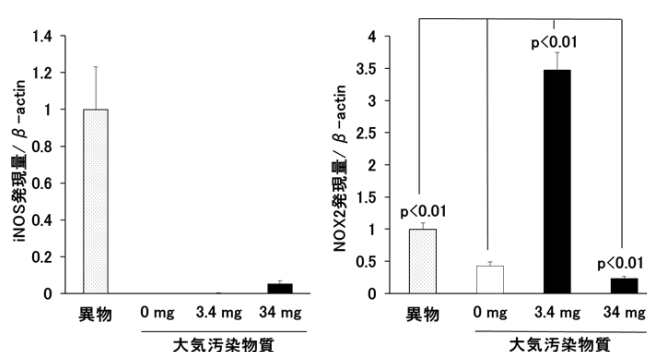
大気汚染物質ならびに付着金属等による発がん性評価を行った(表(2)-3)。大気汚染物質ならびにこれに付着している金属を長期間にわたり直接添加暴露した細胞ががん化するかを検討した。その結果、大気汚染物質を添加培養して180日を経過した細胞においても致死増殖する個体は観察されなかった。さらに、硫酸銅(Ⅱ)五水和物、塩化鉄(Ⅱ)四水和物、塩化鉄(Ⅲ)六水和物、酢酸カドミウム(Ⅱ)二水和物の添加においても同様であった。塩化亜鉛は、添加開始後120日目および180日目に9例中1例が腫瘍増殖した。酢酸鉛(Ⅱ)三水和物では、添加開始後150日目の細胞を移植した9例のマウスうち3例が腫瘍増殖した。また、180日目の細胞を移植した9例のマウスうち2例が腫瘍増殖した。陽性対照として想定していたタバコ煙水溶物の添加処理においても、腫瘍増殖をする個体は現在までに観察されなかった。一方で、酸化チタンの処理を施したQR-32細胞は、僅か30日間の処理によって10例中6例で有意な腫瘍増殖が観察された。



図(2)-1 大気汚染物質により誘導された滲出細胞に発現するアレルギー・炎症関連分子発現



図(2)-2 大気汚染物質により誘導された滲出細胞に発現するアレルギー・炎症関連分子発現



図(2)-3 大気汚染物質により誘導された滲出細胞に発現するアレルギー・炎症関連分子発現

表(2)-3 大気汚染物質ならびに金属等による発がん性評価

処理	致死増殖マウス / 移植マウス(添加培養日数)					
	30日	60日	90日	120日	150日	180日
非添加	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
大気汚染物質	0/15	0/9	0/9	0/12	0/9	0/9
硫酸銅(Ⅱ)五水和物	0/9	0/9	0/9	0/9	0/6	0/9
塩化鉄(Ⅱ)四水和物	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
塩化鉄(Ⅲ)六水和物	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
塩化亜鉛	0/9	0/9	0/9	1/9	0/9	1/9
酢酸カドミウム二水和物	0/9	0/9	0/9	0/9	0/6	0/9
酢酸鉛(Ⅱ)三水和物	0/9	0/8	0/9	0/9	3/9	2/9
タバコ煙	0/6	0/6	0/6	0/3	0/3	0/3
酸化チタン	6/10*	NT	NT	NT	NT	NT

*p<0.05 vs 非添加

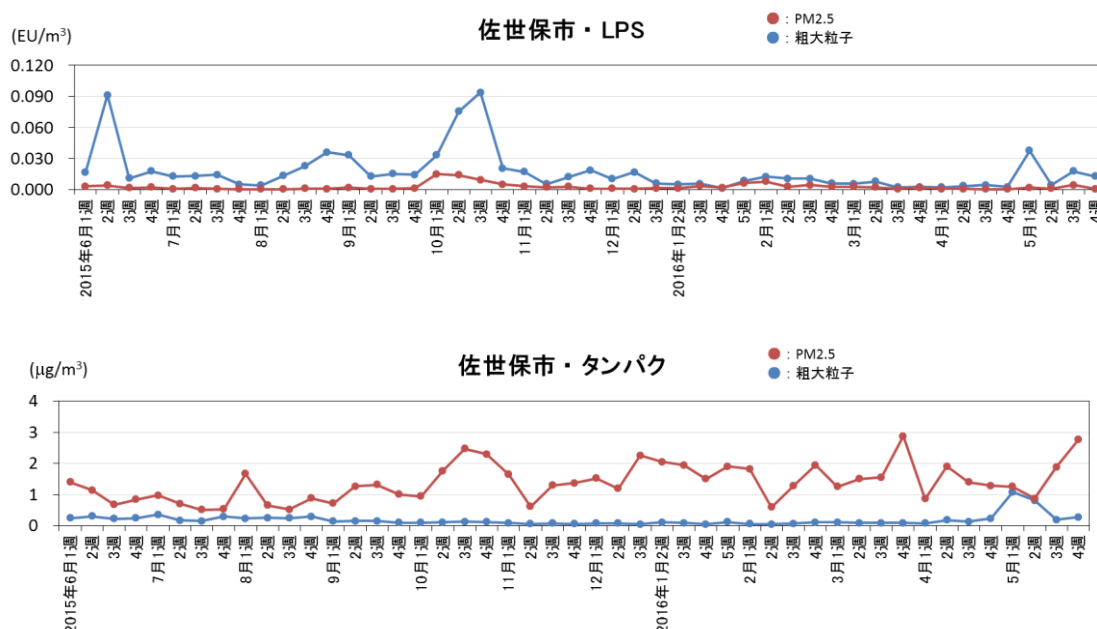
(3) 黄砂、PM2.5 の成分解析

黄砂及びPM2.5の飛散と大気中のエンドトキシン及びタンパクとの関係について明らかにするため、2014年5月から2016年5月まで長崎県佐世保市と京都府京都市においてPM2.5と粗大粒子を捕集し、粉塵中に含まれるエンドトキシン、タンパク及びイオンを分析した。2015年6月から2016年5月に佐世保市において捕集した大気粉塵(PM2.5、粗大粒子)中のエンドトキシン及びタンパクの濃度の推移を図(3)-1に示す。エンドトキシンはPM2.5より粗大粒子で高濃度であり、特に6月第2週、10月第2週、第3週、5月第1週で濃度が高かった。これらの週は粗大粒子中のCa²⁺濃度も高く、エンドトキシンが黄砂とともに飛散したと考えられた。一方、タンパクは粗大粒子よりPM2.5で濃度が高く、特に8月第1週、10月第2週から第4週、12月第3週から2月第1週、3月第4週、5月第3週、

第4週に高濃度であった。このようにエンドトキシンとタンパクは主に存在している粒子の大きさが異なり、季節的変動も一致しなかった。同期間に京都市において捕集した大気粉塵でも、エンドトキシンはPM2.5より粗大粒子において濃度が高く、6月第2週、10月第1週から第4週、5月第1週に濃度の上昇がみられ、これらの週では Ca^{2+} 濃度も高く、京都市においてもエンドトキシンが黄砂とともに飛散したと考えられた。タンパクは京都市においても、同期間を通じてPM2.5において高濃度であり、特に5月第3週と第4週に高濃度であり、タンパク濃度の季節的変動はエンドトキシンのそれと一致しなかった。6月第2週、10月第1週から第4週、5月第1週の佐世保市におけるエンドトキシン濃度と Ca^{2+} 濃度は京都市におけるそれらの3倍から8倍程度高く、エンドトキシンも黄砂と同様、越境輸送された可能性があると考えられた。これに対し、PM2.5中のタンパク濃度の年内変動は佐世保市と京都市のいずれにおいても $1\sim 2\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ 程度であり、2地点間において濃度に大きな差はみられず、タンパクの発生源がそれぞれの地域である可能性が考えられた。

2014年5月から2015年5月に佐世保市と京都市において捕集した大気粉塵(PM2.5、粗大粒子)についてもエンドトキシンはPM2.5より粗大粒子において濃度が高く、いずれの地点においても特に9月と10月に高濃度であり、佐世保市における濃度は、京都市におけるその3倍から4倍程度であった。一方、同期間の佐世保市及び京都市におけるタンパク濃度は粗大粒子よりPM2.5において高く、いずれの地点においても $1\sim 3\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ 程度であり、2地点間において濃度に大きな差はみられず、季節的な変動はみられなかった。

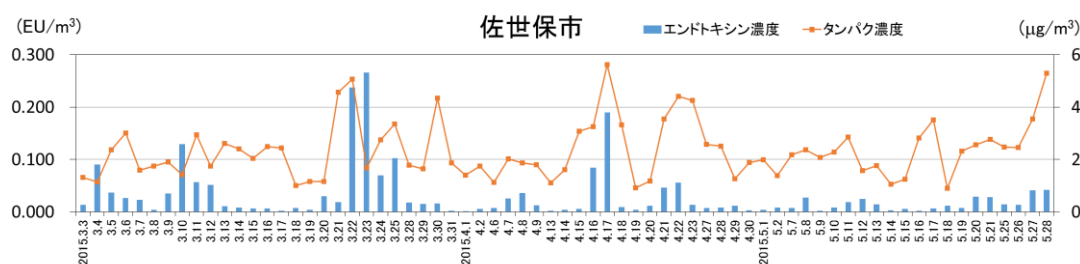
このように、いずれの地点においても調査期間の10月に共通して粗大粒子中のエンドトキシン濃度が顕著に上昇し、京都市より佐世保市において高濃度であった。一方、タンパクはいずれの地点においても濃度に季節的な変動はみられず、タンパク濃度は2地点において同程度であった。



図(3)-1 佐世保市の大気粉塵(PM2.5、粗大粒子)中のエンドトキシン(LPS)とタンパクの濃度の推移(2015年6月～2016年5月)

2015年3月から年5月に佐世保市において捕集したTSP中のエンドトキシン及びタンパクの濃度の推移を図(3)-2に示す。黄砂の飛散が観測された3月22、23日と4月17日にエンドトキシンは高濃度であった。また、タンパクも3月22日と4月17日に高濃度であった。これらの日には京都市でもエンドトキシン濃度が高く($0.084\sim 0.105\ \text{EU}/\text{m}^3$)、タンパク濃度も比較的高かった。このような黄砂飛散が観測された日のエンドトキシン濃度及びタンパク濃度の上昇は、2016年3月から年5月の佐世保市及び京都市における調査でもみられた。一方、2016年3月から5月には Ca^{2+} 濃度の上昇がみられない日に高濃度のエンドトキシンが観測された日があった。このことから春季の黄砂飛散は、エンドトキシン濃度の上昇と関連するものの、黄砂飛散以外にもエンドトキシン濃度の上昇に与する要因が存在すると考えられた。

2016年9月から年11月における調査の結果、高濃度のエンドトキシン($0.08\ \text{EU}/\text{m}^3$ 以上)は、佐世保市では10月と11月に多く、10月には9日間、11月には5日間(いずれの月も26日間調査)であった。一方、京都市では9月と10月に高濃度の日が多く、9月には14日間、10月には5日間(いずれの月も26日間調査)であった。エンドトキシンは喘息増悪作用を有することが知られていることから、秋季における濃度の上昇と喘息発作との関連性について詳細に検討する必要があると考えられる。



図(3)-2 佐世保市の総大気粉塵(TSP)中のエンドトキシン(LPS)とタンパクの濃度の推移(2015年3月～5月)

越境大気汚染に関連する化学物質(タンパクなど)を探索するため、黄砂が多く飛散する3月から5月を中心に佐世保市及び京都市において捕集した大気粉塵(PM2.5、粗大粒子、TSP)について電気泳動法により解析を行った。その結果、いずれの試料においても1.5 kDa付近にバンドが検出され、粉塵に含まれる主なタンパクは分子量が1.5 kDa程度の小さなものであると考えられた。さらに、黄砂あるいはPM2.5の飛散が観測された時期を含む2015年3月から5月と2015年9月から11月に両地点において捕集したPM2.5と粗大粒子について高速液体クロマトグラフ質量分析により成分分析を行った。その結果、いずれの試料においても複数のピークがクロマトグラム上にみられたが、それらの保持時間は大気粉塵の捕集地点ごとに類似しており、黄砂やPM2.5の飛散が観測された期間とそうでない期間に捕集した大気粉塵でクロマトグラム上、顕著な差はみられなかった。

黄砂及びPM2.5飛散時及び非飛散時の大気粉塵の炎症性サイトカイン誘導能を評価するためTNF- α の誘導能を評価する試験系を作製し、2014年7月から10月、2015年3月から6月及び2015年9月から11月に両地点で捕集したPM2.5と粗大粒子の抽出物の活性を試験した。その結果、エンドトキシン含量が多い粗大粒子の抽出物に強い誘導能がみられた。黄砂飛散時及び秋季の粉塵はエンドトキシンを多く含んでおり、炎症性サイトカインを誘導し、炎症反応及び喘息症状の増悪に関与する可能性があると考えられた。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

本邦でPM2.5の健康リスクについて疫学調査は極めて少ない。本研究は、黄砂、PM2.5の小学校児童の呼吸機能、呼吸器症状、皮膚症状に対する短期曝露影響を検討した数少ない研究である。これまでも同様に小学校児童を対象に疫学調査を行ってきた。本研究の成果と併せ、黄砂、PM2.5への短期曝露は小学校児童の呼吸機能と呼吸器症状を増悪させる。しかし、そのような影響が確認できる場合と確認できない場合がある。このような調査結果の乖離の原因として、黄砂、PM2.5のヒトへの健康影響は組成により異なることが挙げられる。黄砂、PM2.5の呼吸器システムへの影響は、黄砂、PM2.5の炎症性物質産生が多い場合に増強する。また、この炎症増強に黄砂、PM2.5に含まれるエンドトキシンが関与していると考えられた。さらに、大陸からの越境大気汚染が本邦のPM2.5の組成に影響し、PM2.5の炎症誘導能を増強させる可能性を示した。黄砂への感受性が患者毎に異なっていることも明らかにした。黄砂、PM2.5が炎症増強する場合にどのような物質を産生しているのか、異なる細胞で、1,000種類の検討を行った。この結果を論文で公表することにより、他の研究者がターゲットとする物質を選定することに貢献できる。

2013年にInternational agency for research on cancer(IARC)が大気汚染物質に対し、ヒトにおいて発がん性が認められるグループ1に認定した。これを受けて本研究は、PM2.5や付着金属類等を含む越境大気汚染物質にアレルギー・炎症惹起能があるか、ならびに発がん性があるのかに焦点を絞り、実験動物モデル等を確立して検証とそのメカニズム解析に当たった。大気汚染物質は、実験動物(マウス)において炎症反応を惹起することを検証した。その誘導活性は、本系で用いている標準炎症誘発物質である生体外異物(ゼラチンスポンジ)によって誘発される炎症滲出作用を遙かに上回るものであった。加えて、大気汚染物質によって滲出した炎症細胞の特性は、標準炎症誘発物質によって誘発された炎症細胞のそれとは質的に異なることを明らかにした。すなわち、大気汚染物質誘発炎症細胞には、アレルギー・炎症関連の分子発現のうち、TNF- α 、TGF- β 、Mac-1、NOX₂の発現亢進と、IL-6の発現減少が特徴的であった。また、従来報告されている気管支喘息との関連が見いだされている一酸化窒素合成酵素であるinducible nitric oxide(iNOS)は、ほとんど誘導されなかった。従って、大気汚染物質によって惹起されるアレルギー・炎症反応は、単なる生体外異物の曝露によって生じるものとは異なり、顕著な滲出炎症細胞とアレルギー・炎症関連分子の発現様式・機能が異なることを見いだした。大気汚染物質およびこれに付着する金属による細胞がん化能を評価した。これらの物質を添加培養した発がん感受性マウス細胞株のがん化は、少なくとも添加開始後180日を経過しても観察されなかった。現在も継続中であるが、大気汚染物質およびこれに付着する金属が細胞に対して直接発がん作用を発揮するとは少なくとも現時点では断定できない。むしろ前述のように大気汚染物質の誘発する著しいアレルギー・炎症の誘導が発がん過程を進

展させる可能性が考えられる。従来、微生物感染（肝炎ウイルス、ヘリコバクター・ピロリ菌や寄生虫）によって生じる遷延した慢性炎症環境下で発がんに至るいわゆる“炎症発がん”の要因の一つとしての大気汚染物質を捉え直すことも今後の検討課題と考えている。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

本邦でPM2.5の健康リスクに関する疫学調査は少ない。特に喘息がない子供でのPM2.5、黄砂の呼吸器システムへの短期曝露影響を評価した報告はない。PM2.5の短期曝露により小児の呼吸器システムにどのような影響があるか、現在のところエビデンスとなる研究結果は本課題のみである。PM2.5、黄砂への短期曝露による小児の呼吸機能、呼吸器症状への影響は、組成によって異なる。エンドトキシンなど、ヒトに炎症を惹起させやすい組成物が多いPM2.5、黄砂では、現在の環境基準以下であっても、小児の呼吸機能を低下させ、呼吸器症状を増悪させている。さらに、喘息がある小児は喘息がない小児に比較して、影響を受けやすい。PM2.5、黄砂のヒトへの炎症惹起能が高い場合に、短期曝露による健康リスクが高まるが、大陸からの大気汚染の流入がPM2.5、黄砂の炎症惹起能を増強させるリスク因子の可能性はある。

PM2.5や付着金属類等を含む大気汚染物質は、実験動物（マウス）において顕著な炎症反応を惹起することを検証した。大気汚染物質によって滲出した炎症細胞には、アレルギー・炎症関連の分子発現のうち、TNF- α 、TGF- β 、Mac-1、NOX₂の発現亢進と、IL-6の発現減少が特徴的であった。また、従来気管支喘息との関連が報告されている一酸化窒素の合成酵素であるinducible nitric oxide (iNOS)は、ほとんど誘導されなかった。従って、大気汚染物質によって惹起されるアレルギー・炎症反応は、単なる生体外異物の曝露によって生じるものとは質的に異なる可能性がある。また、大気汚染物質による細胞がん化能は、少なくとも現時点において大気汚染物質そのものが直接発がん性を発揮するとは断定できない。むしろ大気汚染物質の曝露によって誘発される著しい炎症環境によって発がん過程が進展する可能性が高く、“炎症発がん”を誘発する要因の一つとして捉え直すことも必要になると思われる。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) M. Watanabe, J. Kurai, H. Noma, T. Watanabe, S. Minato, H. Sano, F. Okada, A. Yamasaki, E. Shimizu: *Annals of Public Health and Research*, (2, 1), 1015 (2015)
Exposure to metals bound to particles and pulmonary function of school children in Western Japan.
- 2) M. Watanabe, H. Noma, J. Kurai, H. Sano, R. Saito, S. Abe, Y. Kimura, S. Aiba, M. Oshimura, A. Yamasaki, E. Shimizu: *Biomed Res Int*, (2015), 583293 (2015)
Decreased pulmonary function in school children in western Japan after exposures to Asian desert dusts and its association with interleukin-8.
- 3) M. Watanabe, J. Kurai, H. Sano, A. Yamasaki, E. Shimizu: *Int J Environ Res Public Health*, (12, 7), 7725-7737 (2015)
Difference in pro-Inflammatory cytokine responses induced in THP1 cells by particulate matter collected on days with and without Asian dust storms.
- 4) M. Watanabe, J. Kurai, S. Minato, H. Noma, H. Sano, R. Saito, S. Aiba, M. Oshimura, K. Hatakeyama, A. Yamasaki, E. Shimizu: *J Med Invest*, (62, 3-4), 145-148 (2015)
Difference in interleukin-8 transcriptional activity induced in THP-G8 cells by particulate matter collected in winter and summer in western Japan.
- 5) M. Watanabe, J. Kurai, H. Sano, E. Shimizu: *J Med Invest*, (62, 3-4), 233-237 (2015)
Effect of exposure to an Asian dust storm on fractional exhaled nitric oxide in adult asthma patients in Western Japan.
- 6) M. Watanabe, H. Noma, J. Kurai, A. Shimizu, H. Sano, K. Kato, M. Mikami, Y. Ueda, T. Tatsukawa, H. Ohga, A. Yamasaki, T. Igishi, H. Kitano, E. Shimizu: *Int J Environ Res Public Health*, (12, 10), 13038-13052 (2015)
Association of sand dust particles with pulmonary function and respiratory symptoms in adult patients with asthma in western Japan using light detection and ranging: A panel study.

- 7) M. Watanabe, H. Noma, J. Kurai, A. Shimizu, H. Sano, H. Kitano, R. Saito, Y. Kimura, S. Aiba, M. Oshimura, E. Shimizu: Int J Environ Res Public Health, (12, 11), 14229–14243 (2015)
Variation in the effect of particulate matter on pulmonary function in schoolchildren in Western Japan and its relation with interleukin-8.
- 8) M. Watanabe, H. Noma, J. Kurai, H. Sano, M. Mikami, H. Yamamoto, Y. Ueda, H. Touge, Y. Fujii, T. Ikeda, H. Tokuyasu, T. Konishi, A. Yamasaki, E. Shimizu: Allergol Int, (65, 2), 147–152 (2016)
Effect of Asian dust on pulmonary function in adult asthma patients in Western Japan: A panel study.
- 9) M. Watanabe, H. Noma, J. Kurai, K. Kato, H. Sano, T. Tatsukawa, H. Nakazaki, A. Yamasaki, E. Shimizu: Allergol Int, (65, 1), 56–61 (2016)
Association between pulmonary function and daily levels of sand dust particles assessed by light detection and ranging in schoolchildren in western Japan: A panel study.
- 10) M. Watanabe, H. Noma, J. Kurai, H. Sano, Y. Ueda, M. Mikami, H. Yamamoto, H. Tokuyasu, K. Kato, T. Konishi, T. Tatsukawa, E. Shimizu, H. Kitano H: Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, (11), 183–190 (2016)
Differences in the effects of Asian dust on pulmonary function between adult patients with asthma and those with asthma–chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome.
- 11) M. Watanabe, H. Noma, J. Kurai, D. Hantan, N. Burioka, S. Nakamoto, H. Sano, J. Taniguchi, E. Shimizu: Int J Environ Res Public Health, (13, 5), E452 (2016)
Association between outdoor fungal concentrations during winter and pulmonary function in children with and without asthma.
- 12) J. Kurai, M. Watanabe, H. Sano, D. Hantan, E. Shimizu: Int J Environ Res Public Health, (13, 6), E579 (2016)
The effect of seasonal variations in airborne particulate matter on asthma-related airway inflammation in mice.
- 13) J. Kurai, M. Watanabe, H. Sano, D. Hantan, Y. Tohda, E. Shimizu: Int J Environ Res Public Health, (13, 11), E1144 (2016)
Effects of Asian dust particles on the early-stage antigen-induced immune response of asthma in NC/Nga Mice.
- 14) M. Watanabe, H. Noma, J. Kurai, H. Sano, D. Hantan, M. Ueki, H. Kitano, E. Shimizu: Int J Environ Res Public Health, (13, 10), E983 (2016)
Effects of short-term exposure to particulate air pollutants on the inflammatory response and respiratory symptoms: A panel study in schoolchildren from rural areas of Japan.
- 15) M. Watanabe, H. Noma, J. Kurai, H. Sano, D. Hantan, M. Ueki, H. Kitano, E. Shimizu: Allergol Int, (66, 1), 52–58 (2017)
A panel study of airborne particulate matter composition versus concentration: potential for inflammatory response and impaired pulmonary function in children.
- 16) M. Watanabe, H. Noma, J. Kurai, H. Sano, K. Iwata, D. Hantan, Y. Tohda, E. Shimizu: Int J Environ Res Public Health, (14, 3), 299 (2017)
Association of short-term exposure to ambient fine particulate matter with skin symptoms in schoolchildren: A panel study in a rural area of western Japan.

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

(2)主な口頭発表(学会等)

- 1) 渡辺徹志、クウリバリ・スレイマン、北村重晴、久保裕希、古川奈美、阿部真帆、山田真裕、出口雄也、長谷井友尋:「黄砂及び微小粒子状物質中のタンパク質及びLPSの解析」、フォーラム2015 衛生薬学・環境トキシコロジー(2015)
- 2) Mohammad Shahriar Khan, Maho Abe, Nami Furukawa, Yuuki Kubo, Shigeharu Kitamura, Yusuke Nakaoji, Kawase Yumi, Tomohiro Hasei, Takahiro Matsumoto, Yuya Deguchi, Nobuyuki Yamagishi, Tetsushi Watanabe:「Seasonal Fluctuation of Lipopolysaccharide on Airborne Particles and Relation with Asian Dust」, フォーラム2016衛生薬学・環境トキシコロジー (2016)

7. 研究者略歴

課題代表者: 渡部 仁成

鳥取大学医学部卒業、博士(医学)、現在、鳥取大学医学部附属病院講師

研究分担者

1) 岡田 太

北海道大学水産学部卒業、医学博士、現在、鳥取大学医学部教授

2) 渡辺 徹志

京都薬科大学薬学部卒業、薬学博士、現在、京都薬科大学薬学部教授

5-1453 黄砂、PM2.5の組成別毒性評価に基づく大気モニタリングと感受性者検査システムの構築

(1) 黄砂、PM2.5の組成別でのヒト毒性について定量的評価

国立大学法人鳥取大学

医学部附属病院	第三内科診療科群	渡部 仁成・倉井 淳・山崎 章
総合内科学講座	分子制御内科学分野	清水 英治
生命科学科	染色体工学センター	押村 光雄
医学部附属病院	次世代高度医療推進センター	植木 賢
保健学科	病態検査学講座	鯉岡 直人

〈研究協力者〉

大学共同利用機関法人情報システム研究機構統計数理研究所 野間 久史

平成26～28年度累計予算額：93,798千円（うち平成28年度：29,811千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

PM2.5の健康リスクは、国際的には極めて多数の調査、研究が実施され、世界保健機構が発がん性を認めるなど、確立された事実になっている。しかしながら、本邦においてPM2.5の健康影響に関して疫学調査は極めて少なく、同様に黄砂についても十分とは言えない。一方、PM2.5などの粒子状物質の健康リスクについて、海外報告のメタアナリシスの結果では、臓器毎に影響が異なり、さらに、調査地域や季節によっても調査結果に乖離がある。この原因として、PM2.5の発生原因により健康リスクが異なることが報告されている。以上のことから黄砂、PM2.5の健康リスクについて、国外知見だけでは十分でなく、本邦での調査が重要である。本課題は、本邦での黄砂、PM2.5およびSPMの健康リスクについて知見を集積するために、小学校児童を対象に疫学調査を実施した。また、黄砂、PM2.5およびSPMの健康影響が組成によって異なるか評価し、組成物のうち毒性が高い物質の特定を試みた。これまでの調査では、PM2.5、SPMの濃度上昇により小学校児童の呼吸機能が低下していたが、本課題の調査では呼吸機能、呼吸器症状、皮膚症状への影響を確認できなかった。しかし、黄砂、PM2.5、SPMのヒトへの毒性を、炎症性サイトカインの測定で炎症誘導能として評価すると、PM2.5、SPMの炎症誘導能が高い場合には、PM2.5、SPMの濃度上昇により小学校児童の呼吸器症状は増悪し、呼吸機能は低下していた。この結果から、組成物の炎症誘導能が高い場合にのみ、PM2.5、SPMへの短期曝露によりヒトの呼吸器システムが影響を受けると考えられた。また、組成物のうちエンドトキシンが重要である可能性も見出した。さらに、PM2.5、SPMの炎症誘導能は大陸からの大気汚染流入が多い時に増強しており、越境大気汚染が本邦の重要な健康リスクであると考えられた。喘息患者の血液を用いた研究から、黄砂にはスギ花粉以外のアレルギーを惹起する物質が含まれており、黄砂によるアレルギー増悪には患者により感受性が異なることも明らかにした。

[キーワード]

黄砂、PM2.5、疫学調査、動物実験、炎症

1. はじめに

PM2.5による健康影響について国際的には極めて多数の調査、研究が報告されてきている。こうした膨大な調査結果が基となり、2013年に世界保健機構はPM2.5を含む大気汚染は発がんの重要なリスク因子であると認定しグループ1に分類している。この2013年に中国での大規模な大気汚染が大きく報道され、本邦でのPM2.5の認知度は急速に高くなり、その健康影響が懸念されるようになった。また、2013年以前から黄砂の健康影響も報告されるようになり、報道でも取り上げられたことから、PM2.5と同様に関心が集まっていた。しかし、黄砂、PM2.5のいずれの健康影響に関しても、本邦での調査、研究報告は他国に比較して少ない。我が国での黄砂、PM2.5の認知度、その健康影響に対する関心は最近になって高まっているが、その知見のほとんどを海外の成果に頼っているのが実情である。

海外からの多数の調査、研究に基づけば、PM2.5の健康リスクは発がんに加えて循環器疾患では確立された感がある¹⁾。一方で、呼吸器疾患、脳血管疾患、他の疾患については結果が異なることも多く、幾つかのメタアナリシスにおいて、PM2.5の影響が確認されないことも多い^{1),2)}。本邦で実施された大規模な疫学調査研究であるNippon data 80、90では、欧米とは異なりPM2.5など粒子状物質の循環器疾患への影響が確認されていない。さらに、この結果の乖離について必ずしも明確な原因は明らかになっていない。PM2.5の健康リスクが明らかになりつつあるものの、そのリスクは国や地域、疾患によって異なる可能性がある。

我々もこれまでに、黄砂およびPM2.5の上昇による煙霧によって喘息が増悪することを明らかにしてきた。現在、日本アレルギー学会による喘息の予防、治療ガイドラインでは黄砂が喘息の増悪因子であることが記載されているが、このevidence文献として我々の成果が引用されている。一方で、黄砂による喘息増悪への影響は、例え同一の対象であっても必ずしも同じではないことも確認してきた。PM2.5やSPMなどの粒子状大気汚染物質が健康リスクとなるメカニズムに、①遺伝子損傷、②酸化ストレス亢進、③炎症誘導が報告されている³⁾。黄砂、PM2.5の毒性を炎症誘導能で評価をすると、黄砂、PM2.5の毒性は必ずしも同一ではなく、採取時期によって異なることを明らかにした。このような結果からは、黄砂、PM2.5の組成物のうちヒトへの毒性が強い物質を同定することが重要であると考えられる。また、健康被害を予防するためには、現在のように黄砂やPM2.5、SPMを単に量でモニタリングするのではなく、黄砂、PM2.5に含まれる毒性の強い物質をモニタリングしていくことが重要と考えられる。

喘息などのアレルギー疾患の発症、増悪において、化学物質だけではなく、アレルゲンに代表されるようにタンパクは極めて重要である。これまでに黄砂、PM2.5について成分解析が多数の研究で試みられているが、タンパクを解析した研究はほとんどない。黄砂、PM2.5は喘息の重要な発症、増悪因子であり、喘息に強く関与するタンパクについても解析をしていくことは重要と考えられる。

PM2.5の健康影響を考える場合に、日本国内にもPM2.5の発生源はあるものの、大気汚染の知識が十分でない国民は、その全てが大陸に由来すると捉える傾向があることは否めない。一方で、世界保健機構、経済協力開発機構の報告に基づいても、中国でのPM2.5の濃度は世界的にも非常に高く、今後、2060年までは更に悪化が継続と予測しており、大陸から越境するPM2.5の健康影響を懸念する心情を否定できるものではない。本邦におけるPM2.5の健康リスク調査を進めながら、大陸から越境するPM2.5の影響を検討することも極めて重要と考えられる。

2. 研究開発目的

PM2.5、黄砂の健康影響について本邦でも関心が高いが、他国に比較して疫学調査は少ないと言わざるを得ない。本研究では、まず疫学調査でPM2.5、黄砂の健康リスク評価を行うことを目的とした。特にPM2.5、黄砂の子供への短期曝露影響について、保護者、教育機関の関心が高いこともあり、小学校児童を対象に呼吸機能、呼吸器症状、皮膚症状のモニタリングを行い、PM2.5、黄砂の短期曝露影響を評価した。これまでの研究でPM2.5、黄砂の健康影響は組成によって異なることが予測されていたため、疫学調査を実施する期間に24時間毎にSPM、PM2.5を捕集し、24時間毎のSPM、PM2.5の毒性を評価することを試みた。この毒性の評価は、SPM、PM2.5の炎症誘導能を定量することで行った。疫学調査で得られた呼吸機能について、従来のように単にPM2.5、黄砂の質量との関連を評価するだけでなく、SPM、PM2.5が持つ炎症誘導能の影響も検討した。大気中あるいはSPM、PM2.5、黄砂にはエンドキシンが含まれることが報告されている。エンドトキシンは強い炎症誘導能を持つことから、24時間毎に捕集したSPM、PM2.5に含まれるエンドトキシン濃度を測定し、エンドトキシン濃度と疫学調査で得られた呼吸機能との関連を解析した。また、SPM、PM2.5の炎症誘導能とエンドトキシン濃度との関連も評価した。真菌も大気中に単体あるいはSPM、PM2.5、黄砂に付着して存在している。捕集したSPMに含まれる真菌量を定量し、呼吸機能との関連について検討した。

PM2.5、黄砂に健康リスクがあることが報告されているが、そのメカニズムには不明な点が多い。本研究では、PM2.5、黄砂が呼吸器疾患を増悪させるメカニズムについても検討した。黄砂が喘息を増悪させる場合に、その機序としてアレルギー炎症の増悪、非アレルギー性炎症の増悪、気道上皮傷害が考えられる。黄砂がアレルギー性炎症を増悪させる能力があるのか、喘息患者の白血球に黄砂を曝露し評価した。この際、黄砂にアレルギー炎症を増悪させるタンパクに焦点をあてた。これまでの調査で、治療により喘息が完全にコントロールされている患者であっても、黄砂、PM2.5の曝露によって喘息が増悪することを確認してきた。この事実からは、既存の喘息治療薬では制御できない機序で、黄砂、PM2.5が喘息を増悪させている可能性が考えられる。喘息モデルマウスにPM2.5を曝露させ、どのような気道炎症が生じているか検討した。近年、黄砂の飛来をLIDARにより定量出来るようになっている。LIDARデータからは、特に2月から5月に、量の多寡はあるが黄砂が飛来している日が多いことが分かる。このことから、この期間には黄砂の慢性曝露があると考えられる。我々の報告を含め、これまでの黄砂の健康リスクに関する疫学調査は短期曝露影響調査がほとんどである。喘息モデルマウスの感作期に黄砂を曝露させることで、喘息発症における黄砂の慢性曝露影響を評価し、さらに発症予防方法についても検討を行った。これまでに、黄砂の健康影響が調査時期によって異なることを確認してきた。この原因を明らかにするために疫学調査では、呼吸機能とSPM、PM2.5の炎症誘導能、含まれる真菌、エンドトキシンとの関連を解析し、SPM、PM2.5の組成や質を焦点にして検討している。一方で、黄砂、SPM、PM2.5に対する感受性因子の存在の可能性も考えられるため、これまでに疫学調査を行ってきた成人喘息患者のデータを利用して、黄砂への高感受性因子の検討を行った。PM2.5の健康リスクは臓器毎に異なっており、循環器疾患での影響が確認されやすく、呼吸器疾患では結果が異なることも多い。PM2.5の影響が臓器毎に異なる原因を検討するために、採取した同一のPM2.5をヒトから抽出したprimaryな血管内皮細胞、気道上皮細胞、白血球単球に曝露させ、産生されるタンパクの違いを比

較した。

黄砂やPM_{2.5}の研究を行う場合の問題の一つとして、捕集できる量が微量であることが挙げられる。微量であっても、黄砂やPM_{2.5}の毒性を炎症誘導能により、低コストで評価することを可能にするために、染色体工学を応用して作成された細胞の有用性について検討した。

サブテーマ①では、前述した目的で研究を行い、最終的にはサブテーマ②、③の結果と併せ、黄砂、PM_{2.5}の健康リスクについて、炎症、発がん性、アレルギーという観点から明らかにすることを目指した。その過程で、黄砂、PM_{2.5}の組成物のうちヒトへの毒性が高い物質の同定を試みた。また、研究成果を活用して黄砂、PM_{2.5}への高感受性者を血液で判定できる検査システムの構築についても試みた。さらに、黄砂、PM_{2.5}の健康リスクを単に質量ではなく、その毒性で評価できる観測方法の開発を目指した。

3. 研究開発方法

(1) 大気中真菌およびエンドトキシン定量と大気粉塵炎症誘導能モニタリングを用いた黄砂、PM_{2.5}の健康影響評価

捕集したSPM、PM_{2.5}の炎症性サイトカイン産生量と含まれるエンドトキシン、真菌量を定量し、呼吸機能、喘息コントロールとの関連について解析を試みた。この結果をもとに、黄砂、SPM、PM_{2.5}の健康リスクが組成によって相違があるか検討した。また、黄砂、SPM、PM_{2.5}の呼吸器症状、皮膚症状への影響についても評価した。

1) 小学校児童での呼吸機能と症状モニタリング

2015年の2月と10月、2016年9月から10月に、毎日ピークフローメーター (Mini-Wright, Harlow, England, American Thoracic Society scale) を用いた呼吸機能の測定と、呼吸器症状と皮膚症状の有無を日誌形式で記録した。また、実施に際して、身長、体重、アレルギー疾患（喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、アレルギー性結膜炎、食物アレルギー）の有無も調査した。

2) 成人喘息患者での喘息コントロールモニタリング

2015年2月1日から5月30日に、鳥取大学医学部附属病院に通院中の軽症から中等症の成人喘息患者を対象に、喘息コントロール評価ツールであるAsthma control questionnaire 5 (ACQ5)を用いて喘息のコントロール状況についてモニタリングを行った。

3) 大気粉塵の採取と炎症性サイトカイン、エンドトキシン、真菌量の定量

児童で呼吸機能と呼吸器症状と皮膚症状のモニタリングを実施している2015年2月と10月に協力校の一つと2015年2月に鳥取大学にハイボリウムエアサンプラーを設置し、total suspended particles (TSP)を25cm x 20cmの石英繊維フィルター(2500QAT-UP; Tokyo Dylec, Tokyo, Japan)上に捕集した。フィルターは24時間毎に交換した。フィルターは、事前に240℃、30分間の乾熱滅菌を施し、エンドトキシンを除去した。TSPを捕集したフィルターのうち、4cm²を切り取り、4ccのエンドトキシン・フリーの蒸留水 (Sterile water endotoxin free; Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan)中に懸濁し、このうち500 μLを直径9cmのサブロー寒天培地に塗布した。このサブロー寒天培地への塗布は5つ行った。5日間培養し、それぞれのサブロー寒天培地発生したコロニー数を測定し、平均値を算出し、単位m³の平均のcolony stimulating factor (CFU)を1日の真菌量とし、単位をCFU/m³とした。4cm²を切り取った残りの石英フィルターを、40ccのエンドトキシン・フリーの蒸留水に浸し、超音波装置 (BRANSONIC2800; Emerson Japan, Atsugi, Japan)に1時間かけたの

ち、石英フィルターは残し、液体成分のみを抽出した。抽出した溶液を、10 μm のフィルター(pluriStrainer 10 μm ; pluriSelect, Leipzig, Germany)に通し、10 μm 以上の粒子を除去した。回収した懸濁液の中のエンドトキシン濃度を、Limulus color KY test (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan)を用いて測定した。測定したエンドトキシン濃度を1日のエンドトキシン濃度とした。SPMの懸濁液50 L μ で、THP1 human monocyte cellを24時間、37°Cで刺激培養した。培養後に、250×gで遠心分離し浮遊細胞を除去し、さらに2,500×gの遠心分離で残留しているSPMを除去した。浮遊細胞、SPMを除去した培養上清中のinterleukin (IL)-6、IL-8、tumor necrosis factor (TNF)- α 濃度を、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for IL-8 (R&D Systems, Minneapolis, USA)を用いて測定した。

2016年9月から10月に、松江市内でハイボリウムエアサンプラーにアンダーセンを併設し、1 μm 以下の粒子をフィルター上に捕集し、これを捕集PM2.5とした。フィルターは24時間毎に交換した。PM2.5を捕集したフィルターを、3ccのエンドトキシン・フリーの蒸留水中に懸濁し、PM2.5懸濁液とした。PM2.5の懸濁液でヒト気道上皮BEAS2B細胞を24時間、37°Cで刺激培養した。培養後に、250×gで遠心分離し細胞を除去し、さらに2,500×gの遠心分離で残留しているPM2.5を除去した。細胞、PM2.5を除去した培養上清中IL-1 β 、thymic stromal lymphopoietin (TSLP)の濃度をenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)により測定した。

(2) 黄砂およびPM2.5によって産生誘導される炎症性サイトカインの網羅的解析および炎症性サイトカイン産生における金属成分の関与

黄砂およびPM2.5によって産生誘導される炎症性サイトカインの網羅的解析および炎症性サイトカイン産生における金属成分の関与について検討した。黄砂時の大気粉塵として、2012年4月23日～25日、2013年3月5日～11日、2013年3月18日～22日に、鳥取県で黄砂時に捕集した粒径3～7 μm の大気粉塵を用いた。また、PM2.5として、2013年2月7日～3月7日、2013年4月8日～4月19日、2013年4月30日～5月5日、2013年5月18日～5月27日に、鳥取県で捕集した粒径3 μm 以下の大気粉塵を用いた。

捕集してあった大気粉塵でA549細胞、THP細胞を一定時間刺激培養し培養上清中の炎症性サイトカイン濃度を測定した。測定はbio-prex Th1/TH2キットを用いてTH1系サイトカインとしてIL-2、IL-13、GM-CSF、IFN- γ 、TNF- α を、TH2系サイトカインとしてIL-4、IL-5、IL-10、IL-12p70を測定した。また、IL-6とIL-8についてELISAキットにより測定した。IL-8は、THP細胞にIL-8およびglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)のプロモーターに制御される遺伝子を導入したTHP-G8細胞により転写活性を測定することで評価した。

使用した大気粉塵懸濁液中のaluminum (Al), arsenic (As), barium (Ba), calcium (Ca), cadmium (Cd), cobalt (Co), chromium (Cr), copper (Cu), iron (Fe), mercury (Hg), potassium (K), lanthanum (La), magnesium (Mg), manganese (Mn), sodium (Na), nickel (Ni), phosphorus (P), lead (Pb), strontium (Sr), titanium (Ti) and zinc (Zn)の濃度を測定し、各大気粉塵の炎症性サイトカイン誘導への金属元素の関与について検討した。

(3) 黄砂中に即時型アレルギー反応を起こす高分子タンパクの有無についての検討

ヒトが即時型のアレルギー反応を起こす物質は5kD～60kDの高分子タンパクであることが知ら

れている。ある物質に対して即時型アレルギー反応をおこすかは抗原特異的に好塩基球表面におけるCD203cの発現増強を評価することで可能である。対象から2ccの全血採血を行い2013年の黄砂時に採取した大気粉塵懸濁液上清で刺激培養を行い好塩基球表面のCD203cの発現をflow cytometryで測定し、黄砂時大気粉塵中に即時型アレルギー反応を起こすタンパクが存在するか評価した。

(4) SPM、黄砂による炎症性サイトカイン産生とメタン系炭化水素(CH₄)、非メタン系炭化水素(NMHC)、全炭化水素(THC)の関連について

SPMの炎症性サイトカインの定量結果とCH₄、NMHC、THCの関係について解析を行った。SPMが産生する炎症性サイトカインの定量は以下の方法で行った。

- 1) ハイボリウムエアサンプラーを用いて、total suspended particles (TSP)を25cm x 20cmの石英繊維フィルター(2500QAT-UP; Tokyo Dylec, Tokyo, Japan)上に捕集した。フィルターは午前6時に24時間毎に交換した。フィルターは、事前に240℃、30分間の乾熱滅菌を施し、エンドトキシンを除去した
- 2) 石英フィルターを、40ccのエンドトキシン・フリーの蒸留水に浸し、超音波装置(BRANSONIC2800; Emerson Japan, Atsugi, Japan)に1時間かけたのち、石英フィルターは残し、液体成分のみを抽出した。抽出した溶液を、10 μmのフィルター(pluriStrainer 10 μm; pluriSelect, Leipzig, Germany)に通し、10 μm以上の粒子を除去した。
- 3) SPMの懸濁液 50 Lμ で(1 × 10⁵ cells/450 μL/tube)のTHP1 human monocyte cellを24時間、37℃で刺激培養した。培養後に、250×gで遠心分離し浮遊細胞を除去し、さらに2,500×gの遠心分離で残留しているSPMを除去した。浮遊細胞、SPMを除去した培養上清中のIL-6、IL-8、TNF-α濃度をELISA法によって測定した。

(5) 黄砂の喘息発症への影響に関する検討

黄砂への慢性曝露が喘息の発症に影響するか動物実験で評価を行った。マウスは生物学的基礎データが多く存在し、同種実験において利用できる実験データが豊富に存在するため、本研究においてマウスが最適と考えられた。Takahashiらは、ダニ抗原(Dermatophagoides farina; Derf)に感作されたNC/Ngaマウスは、アジュバント作用をもつ薬剤を使用しなくても、肺内に強いアレルギー性炎症を惹起することを報告している⁴⁾。この報告に基づき、8週齢の雄NC/NgaマウスをDerf誘導喘息マウスモデルとして使用し、12群にわけ各群18匹として実験を行った。感作期に、黄砂(AD)をアジュバント作用誘導物質として用いた。さらに、この感作期間にはロイコトリエン拮抗薬(Pranlukast)の投与も同時に行い、黄砂が喘息発症に関与するとした場合のロイコトリエン拮抗薬の予防作用についても評価した。Derf感作群では、イソフルラン吸入麻酔下にDay0, 1, 2, 3, 4にDerf50ugとADを混合した溶液合計25ulを鼻腔内に合計5回投与して感作させた。Derf感作群に黄砂投与群(Derf/AD, 0.1mg)、コントロール群(Derf/NS)を設定した。ロイコトリエン拮抗薬の経口投与処置をしたうえで、ダニ抗原による再曝露を行う群(グループA)と、コントロール試薬を投与したうえで、ダニ抗原に再曝露を行う群(グループB)の2群に各群を無作為に振り分けた。ロイコトリエン拮抗薬の容量依存的アレルギー毒性抑制効果を確認するために、ロイコトリエン拮抗薬は5mg/kg群、25mg/kg群、50mg/kg群の3群を設定して⁵⁾、1匹あたり2回の

処置（抗原惹起1時間前と4時間後）を行った。上記から最終的に12群を作成し、それぞれの群間で気管支肺胞洗浄液中の炎症性サイトカインレベル、血清中の抗原特異的イムノグロブリン濃度、肺組織内の炎症細胞浸潤度などを検討した。得られた結果をもとに、黄砂の喘息発症への影響およびロイコトリエン拮抗薬の抑制効果を検討した。

（6）コントロールされた喘息においてもPM2.5、黄砂曝露により喘息増悪がおこるメカニズムについて動物モデルによる検討

OVA（卵白アルブミン）誘導気管支喘息モデルマウス（BALB/cマウス）に、PM2.5を点鼻投与し、気道炎症を増強させたのち、気管支喘息の第一選択薬として用いられる吸入ステロイド（ICS）を点鼻投与した。気管支肺胞洗浄（BAL）による気管支肺胞内の炎症細胞浸潤の評価と呼吸・肺機能評価システムによる気道抵抗評価を行い、ICSで治療されている喘息がPM2.5の曝露によって病態にどのような変化が生じるか検討した。

（7）PM2.5が誘導する炎症性サイトカインの臓器構成細胞間での差異

欧米の研究では、PM2.5は循環器への影響が他の臓器に比較して顕著であることが示されている。一方、本邦ではPM2.5の循環器疾患への影響を確認できないことが多く、この差異の原因はいまだに明らかでない。PM2.5への反応が臓器別に異なることを仮説とし、臓器細胞別にPM2.5に反応して産生される1000種類のタンパクについて網羅的解析を行った。PM2.5などの大気粉塵の毒性を炎症から評価する場合には、その多くでIL-6、IL-8、tumor necrosis factor (TNF)- α 、により評価が行われている⁶⁾。同時に、IL-6、IL-8、TNF- α 以外に、どのような炎症性サイトカインがPM2.5によって産生されているか評価した。

1) 細胞の刺激培養

ヒトから直接採取されたprimaryな気管支上皮細胞、単球、臍帯内皮細胞に、捕集したPM2.5を曝露させ24時間刺激培養し、培養上清を回収した。

2) アレイサンプルの調製（ビオチン化）

RayBio L-Series Antibody Array 1000 Glass Slide Kitに付属している試薬を用いて、細胞培養上清のビオチン化をkitのプロトコールに従って行った。ビオチン化前にセルロース膜チューブを用いたPBSによる透析を行い、培養液に含まれるタンパク以外の物質を除去した。ビオチン化後にも透析を行い、タンパクと結合していないビオチンの除去を行った。透析の前後でDC protein Assayによるタンパク定量を行ってタンパク濃度を測定した。

3) アレイスライドへのAplly（ハイブリダイゼーション）

RayBio L-Series Antibody Array 1000 Glass Slide Kitのプロトコールに従ってアレイスライドの抗体にビオチン化したタンパクを結合させ、ビオチンを蛍光標識した。

4) アレイスライドのスキャン（スライド画像の数値化）

蛍光標識したスライドをマイクロアレイスキャナInnoScan 710（INNOPSYS）を用いてスキャンし、蛍光強度を数値化した。測定で求められた数値をRAYBIO® ANALYSIS TOOLを用いてサイトカインの発現量に変換し、それぞれのサイトカインについて実験群間の発現量の差異を比較した。

（8）THPE8細胞による黄砂、PM2.5の炎症誘導能に基づく毒性評価

黄砂、PM2.5の毒性評価をTHP-G8細胞を用いてIL-8転写因子活性で行ってきた。THP-G8細胞は、ヒト由来単球にGAPDHプロモーター領域に赤色ルシフェラーゼを、IL-8プロモーター領域にオレンジルシフェラーゼを遺伝子導入し、発光により転写因子活性をできる細胞である。THP-G8細胞を使う最大の利点としては、高感度に、安価に、迅速に黄砂、PM2.5のIL-8産生を評価できることであつた。一方で、THP-G8細胞の欠点として継代培養を続ける中で機能低下が進むこと、安定的に作成ができないことがあつた。THP-G8細胞で見られた継代培養による機能低下および安定作成が出来ない欠点を改善した、新たなTHP-E8細胞について、黄砂、PM2.5の毒性評価における有用性を評価した。

4. 結果及び考察

(1) 大気中真菌およびエンドトキシン定量と大気粉塵炎症誘導能モニタリングを用いた黄砂、PM2.5の健康影響評価

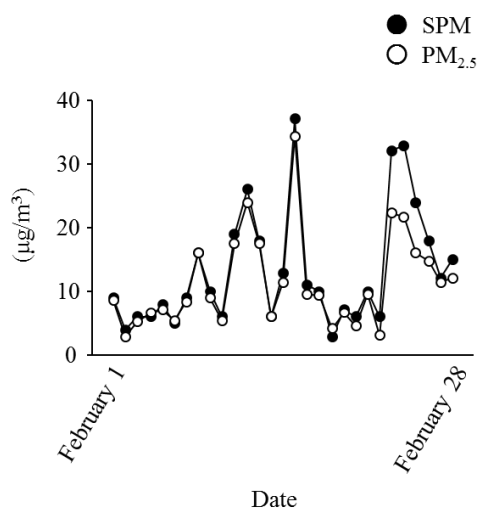
2015年2月に調査した小学校児童400名のうち、呼吸機能の測定、症状の記載が不十分な児童および同意を撤回した児童を除いた339名で解析した。339名の背景を表(1)-1に示す。2名で性別が、6名で身長、8名で体重の記載がなかった。

表(1)-1 児童背景

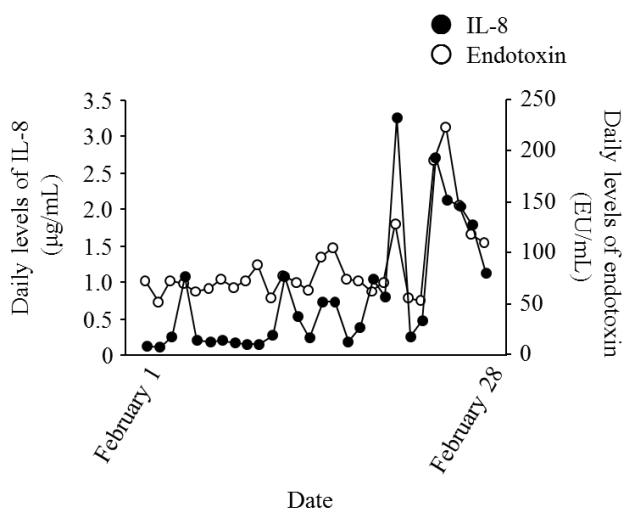
Boy/Girl (number)	170/167
Age (number)	
10-year old	42 (12.4)
11-year old	293 (86.4)
12-year old	1 (0.3)
Height (cm)	144.6 ± 7.07
Weight (kg)	36.4 ± 7.14
Allergic disease (number)	
Asthma	36 (10.6)
Allergic rhinitis	54 (15.9)
Allergic conjunctivitis	8 (2.4)
Atopic dermatitis	26 (7.7)
Food allergies	16 (4.7)

Data are shown as means ± SD in height and weight or the number (%).

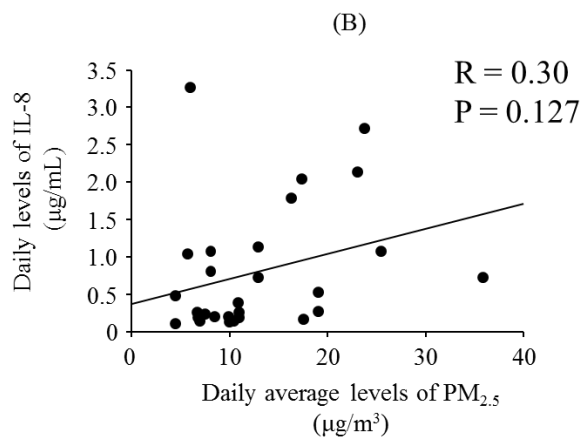
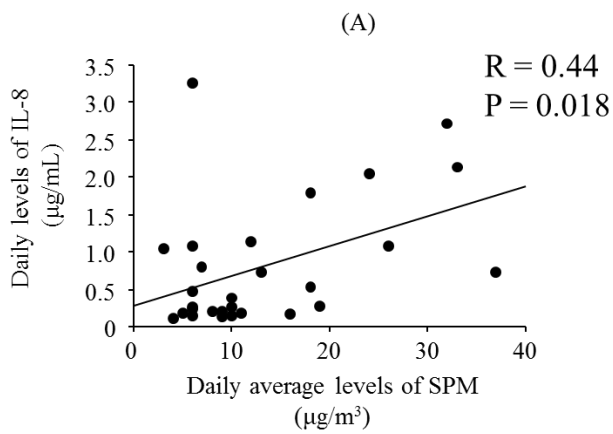
疫学調査を行った2015年2月1日から2月28日の松江市でのSPMとPM2.5の日平均値の推移（図(1)-1）、および採取したSPMから測定したIL-8とエンドトキシン濃度の推移（図(1)-2）を示す。また、SPMおよびPM2.5と測定したSPMが誘導するIL-8産生量の関連を示す（図(1)-3）。SPM濃度とIL-8濃度には有意な正の相関があつたが、PM2.5とは有意な関連はなかつた。SPMおよびPM2.5とエンドトキシン濃度の相関について解析を行うと、エンドトキシン濃度はSPM、PM2.5のいずれとも有意な正の相関が認められた（図(1)-4）。



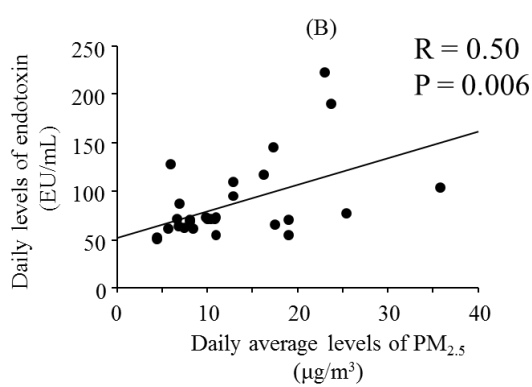
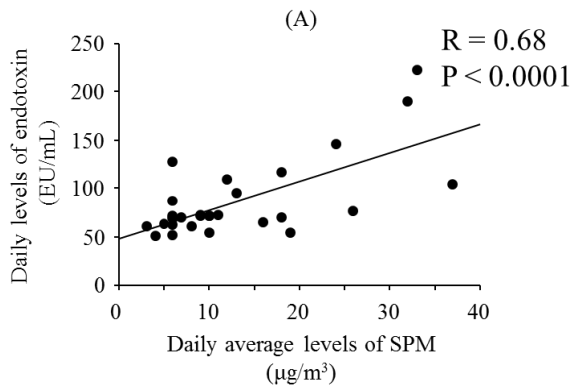
図(1)-1 SPM and PM2.5 levels from February 1 to February 28, 2015



図(1)-2 IL-8 and endotoxin levels from February 1 to February 28, 2015



図(1)-3 Associations between daily levels of interleukin (IL)-8 and (A) SPM and (B) PM2.5

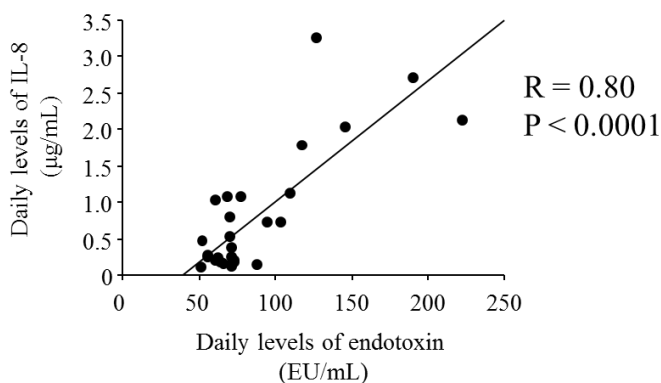


図(1)-4 Associations between daily levels of endotoxin and (A) SPM and (B) PM2.5

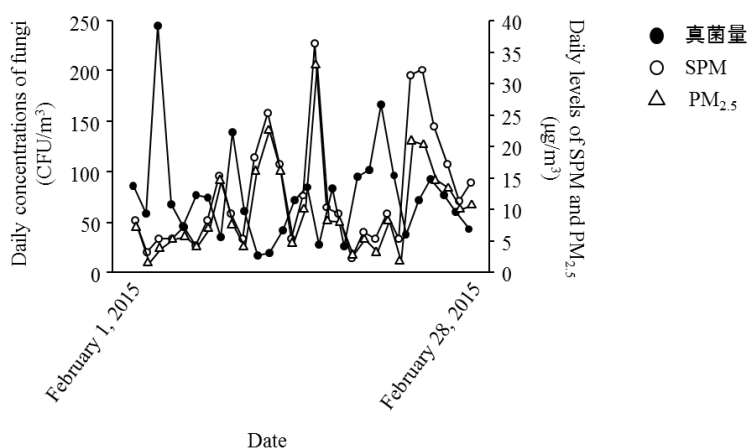
また、エンドトキシン濃度とIL-8濃度の相関についても解析した（図(1)-5）。エンドキシン濃度とIL-8濃度は有意な正の相関を示し、さらに、その相関係数は0.8と極めて高値であった。

真菌量の推移を（図(1)-6）に示す。また、SPMおよびPM_{2.5}と真菌量の相関についての解析結果を示す（図(1)-7）。大気中の粒子状物質に付着している真菌はPM_{2.5}と有意な負の相関があったが、SPMとは有意な相関はなかった。この結果から、大気中の真菌量は、IL-8やエンドトキシンと異なり、PM_{2.5}の濃度が高いほど少なくなると考えられた。

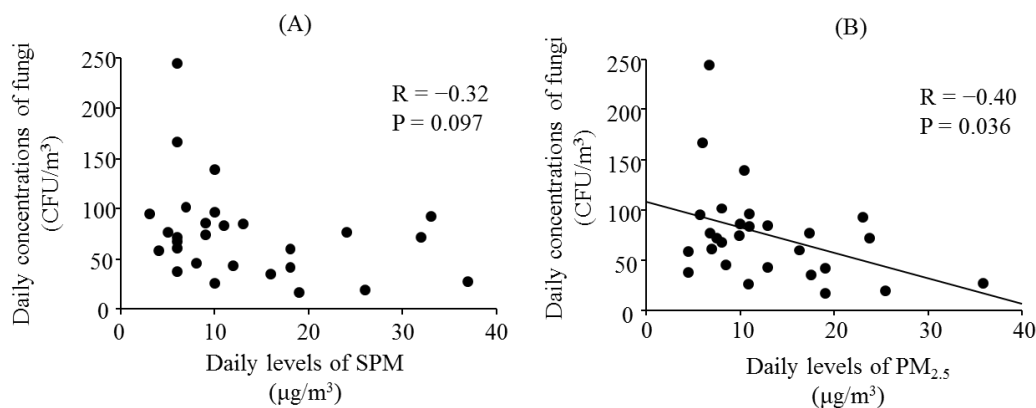
ピークフロー値とSPM、PM_{2.5}、IL-8、エンドトキシンとの関連について、linear mixed modelにより解析を行った。この際、年齢、性別、身長、体重、各アレルギー疾患、および気温、湿度、気圧、オゾン、NO₂、SO₂をrandom effectとした。解析の結果は、interquartile range (IQR)を用いて、ピークフロー値の変化量で表した（表(1)-2）。SPMが誘導するIL-8産生量とピークフロー値には有意な負の相関が認められた。一方で、SPM、PM_{2.5}、エンドトキシンの上昇によりピークフロー値が低下する傾向にあるものの、有意な相関はなかった。



図(1)-5 Associations between daily levels of interleukin (IL)-8 and endotoxins.



図(1)-6 Daily concentrations of fungi (closed circles) and average levels of suspended particulate matter (SPM) (open circles) and particulate matter smaller than 2.5 μm in diameter (PM_{2.5}) (open triangle) from February 1, 2015 to February 28, 2015.



図(1)-7 Associations between daily levels of fungi and (A) SPM and (B) PM_{2.5}

表(1)-2 Multivariate analysis using linear mixed models of the association between peak expiratory flow (PEF) and SPM, PM_{2.5}, and endotoxin levels, by interquartile range (IQR)

Exposure metric	IQR	Change in PEF		
		(L/min)	95% CI	P value
SPM	12.0 µg/m ³	-1.36	-2.93 to 0.22	0.090
PM _{2.5}	10.0 µg/m ³	-1.72	-3.82 to 0.36	0.106
IL-8	0.83 µg/mL	-1.07	-2.05 to -0.08	0.035
Endotoxin	35.9 EU/mL	-0.61	-1.40 to 0.14	0.105

CI, confidence interval.

大気中真菌量とピークフロー値の関連についても同様な解析を行った（表(1)-3）。ただし、大気中の真菌の増加により喘息の増悪による入院や救急受診が増加することが報告されているため、喘息がある児童とない児童での層別解析も追加して行った。大気中の真菌の増加により児童のピークフロー値は有意に低下していた。しかし、この低下は喘息がない児童では確認できなかった。

表(1)-3 Multivariate analysis using linear mixed models of the association between peak expiratory flow (PEF) and SPM, PM_{2.5}, and fungi concentrations, by interquartile range (IQR)

All children (n = 339)				
Exposure metric	IQR	Change in PEF		
		(L/min)	95% CI	P value
SPM	12.0 µg/m ³	-1.36	-2.93 to 0.22	0.090
PM _{2.5}	10.0 µg/m ³	-1.72	-3.82 to 0.36	0.106
Fungi	46.2 CFU/m ³	-1.18	-2.27 to -0.08	0.036
Children with asthma (n = 36)				
Exposure metric	IQR	Change in PEF		
		(L/min)	95% CI	P value
SPM	12.0 µg/m ³	-1.38	-2.99 to 0.23	0.092
PM _{2.5}	10.0 µg/m ³	-1.56	-3.70 to 0.58	0.153
Fungi	46.2 CFU/m ³	-1.44	-2.57 to -0.32	0.012
Children without asthma (n = 303)				
Exposure metric	IQR	Change in PEF		
		(L/min)	95% CI	P value
SPM	12.0 µg/m ³	-1.14	-7.22 to 4.96	0.715
PM _{2.5}	10.0 µg/m ³	-3.41	-11.72 to 4.91	0.422
Fungi	46.2 CFU/m ³	1.22	-2.96 to 5.41	0.567

CFU, colony forming units; CI, confidence interval.

これまでの研究で、黄砂やPM_{2.5}のヒトへの毒性を炎症惹起能で評価した場合に、組成によって毒

性が異なる可能性を見出していた。2015年2月の調査では、SPM、PM2.5と呼吸機能の間に有意な相関はないものの、SPMが誘導するIL-8の量の増加によって呼吸機能の有意な低下が認められていた。この結果から、SPM、PM2.5の曝露を受けた際の健康影響は、曝露量以上に、組成に基づいてSPM、PM2.5がどれだけの毒性を有しているかが極めて重要であることが示唆された。

SPM、PM2.5にエンドトキシンが含まれることは従来から報告されており、我々もこれまでに課題の中で確認してきた。エンドトキシンはIL-8産生能が高い物質である。今回の検討でもエンドトキシンとIL-8産生には高い相関が確認された。しかし、エンドトキシンの曝露量と呼吸機能の間には、IL-8と異なり、有意な関連は認められなかった。このことは、大気中のエンドトキシンはSPM、PM2.5のヒトへの毒性を左右する重要な物質であるものの、そのすべてがエンドトキシンに起因している訳ではないことを示唆していた。

屋外大気中の真菌の健康影響については不明な点も多く、これまでの研究のほとんどが喘息での入院、救急受診が評価項目と成っており、呼吸機能との関連を評価した研究は少ない。特に本邦ではそのような調査はない。今回の疫学調査の結果、屋外真菌量の増加により子供の呼吸機能が低下することを本邦で初めて明らかにした。特に、喘息のある児童では、喘息が無い児童に比較して、呼吸機能の低下が顕著であり、アレルギー機序を介している可能性が考えられる。

大気汚染物質の皮膚への影響について、症状との関連を検討した報告は少ない。2015年2月に毎日の皮膚のかゆみと発赤を、なし=0点、少し=1点、多い=2点で記録してもらい、2点の点数がついた日を皮膚症状がある日として、大気汚染物質の皮膚症状への影響をgeneralized estimating equation (GEE) logistic regressionで解析した。黄砂量はLIDARデータに基づいた。

表(1)-4 Multivariate analysis using GEE logistic regression models to assess the association between skin symptoms and IQR changes in the air contaminant concentrations

Exposure metric	Children (n = 339)			
	IQR	Odds ratio	95% CI	P value
PM _{2.5}	10.1 µg/m ³	1.03	0.80 to 1.33	NS
NO ₂	1.9 ppb	0.99	0.80 to 1.23	NS
Ozone	11.3 ppb	0.79	0.56 to 1.12	NS
SO ₂	2.5 ppb	1.07	0.85 to 1.35	NS
AD particles	0.01 km ⁻¹	0.99	0.92 to 1.06	NS

CI, confidence interval; NS, not significant.

PM2.5の皮膚症状への影響について、NO₂、ozone、SO₂の影響を除外するためにtwo-pollutant modelにより解析も行った（表(1)-5）。同様にLIDARデータにより黄砂粒子の皮膚症状への影響について、NO₂、ozone、SO₂の影響を除外するためにtwo-pollutant modelにより解析を行った（表(1)-6）。

表(1)-5 Estimated effects of PM_{2.5} on skin symptoms in the two-pollutant model after adjustment for NO₂, ozone, and SO₂

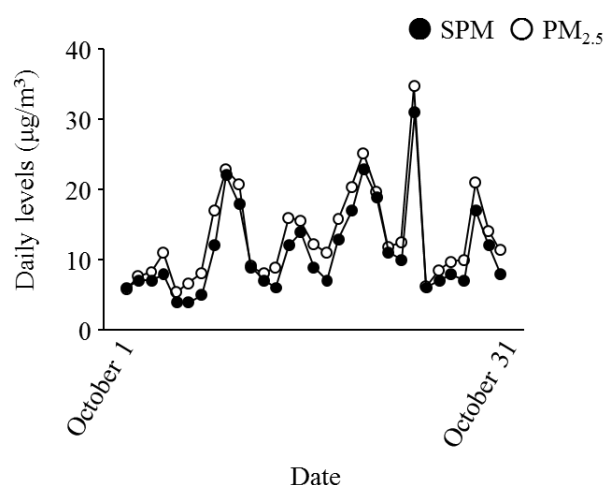
Adjustment	Odds ratio	95% CI	P value
Adjusted for NO ₂	1.20	0.65 to 2.24	NS
Adjusted for ozone	0.98	0.72 to 1.34	NS
Adjusted for SO ₂	1.05	0.83 to 1.33	NS

表(1)-6 Estimated effects of AD particles on skin symptoms in the two-pollutant model after adjustment for NO₂, ozone, and SO₂

Adjustment	Odds ratio	95% CI	P value
Adjusted for NO ₂	0.98	0.89 to 1.08	NS
Adjusted for ozone	0.95	0.88 to 1.03	NS
Adjusted for SO ₂	0.99	0.92 to 1.06	NS

基礎実験結果からは、PM_{2.5}はaryl hydrocarbon receptor (AhR)の活性化を介して痒みを引き起こすことが報告されている⁷⁾。しかし、大気汚染への短期曝露により皮膚症状が増悪することを報告した研究は少ない。成人では本邦から黄砂が皮膚症状を増悪させることが報告されている。しかし、今回の疫学調査では、黄砂、SPM、PM_{2.5}の短期曝露は児童の皮膚症状に影響をしていなかった。同様に、NO₂、ozone、SO₂も児童の皮膚症状とは関連がなかった。大気汚染の皮膚症状への短期曝露影響を評価する際に、現状では重要な問題がある。この問題とは皮膚症状を評価する確立された手法がないことである。皮膚症状は、痒み、発赤、痛みなど種々あるが、こうした症状のうちどの症状をターゲットにして、その程度をどのように判定すべきか不明である。今回の調査では、かゆみと発赤を3点のスコア化して評価を行った。確立されてはいないが、同様な方法で呼吸器症状では大気汚染の影響が評価されている。このようなlimitationのある調査であり、当然のことながら異なる皮膚症状の評価方法を用いた場合には、大気汚染が皮膚症状増悪に関連することを証明できた可能性がある。皮膚は大気汚染と直接に接しており、今後も調査を継続し、黄砂、PM_{2.5}をはじめとする大気汚染の皮膚への影響を明らかにしていく必要があると考えられた。

2015年10月に小学校児童を対象にし、毎日咳と痰の有無をなし=0点、少し=1点、多い=2点で記録を行った。また、この期間に24時間毎にSPMの捕集を行い、捕集したSPMでヒト単球を24時間刺激培養し、培養上清中のTNF- α 、IL-6、IL-8濃度を測定することで、



図(1)-8 Daily average levels of SPM (closed circles) and PM_{2.5} (open circles) in October, 2015.

日毎のSPMの炎症誘導能とした。2点の点数がついた日を呼吸器症状がある日として、SPM、PM2.5およびTNF- α 、IL-6、IL-8濃度と呼吸器症状の関連をGEE logistic regressionで解析した。記録を90%未満であった児童および同意を撤回した児童を除く、360名で解析を行った。児童背景を表(1)-7に示す。また、図(1)-8に、2015年10月のSPMとPM2.5の推移を示す。

表(1)-7 Characteristics of the 360 children included study in October, 2015

Characteristic	Value
Boy/girl	172/188
Age (years)	
11	139 (38.6)
12	220 (61.1)
13	1 (0.3)
Height (cm)	148.6 $\pm$ 7.4
Weight (kg)	39.0 $\pm$ 7.7
Allergic disease	
Asthma	39 (10.8)
Allergic rhinitis	72 (20.0)
Allergic conjunctivitis	10 (2.8)
Atopic dermatitis	26 (7.2)
Food allergies	15 (4.2)

Data are shown as the mean $\pm$ standard deviation or n (%). Data were missing for height (n = 7) and body weight (n = 3).

図(1)-9に2015年10月に24時間毎に捕集したSPMが誘導した炎症性サイトカインレベルを示す。

図(1)-10に、SPM濃度とTNF- α 、IL-6、IL-8濃度の関連を示す。SPMとTNF- α 、IL-6、IL-8濃度の間に有意な相関はなく、2015年10月の調査結果は2015年2月と異なり、SPM濃度が高いからといって必ずしも炎症性サイトカイン産生量が多いわけではなかった。この結果も、組成により毒性が異なることを示唆していた。

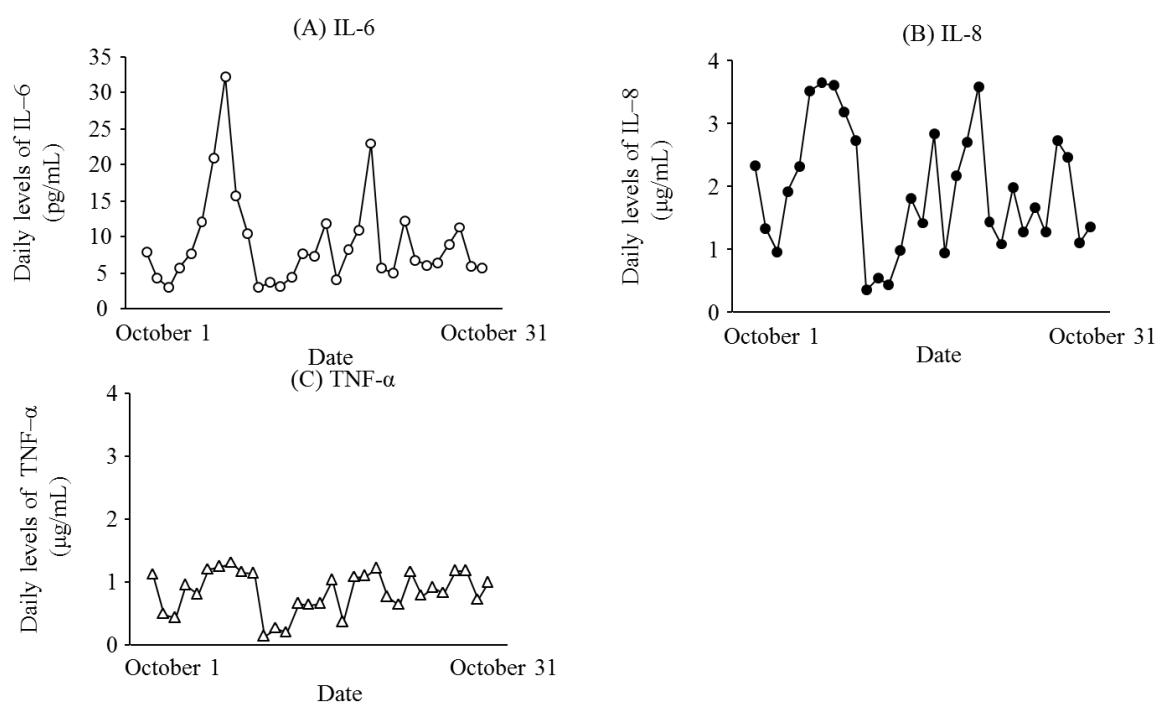


Figure 1-9 Daily levels of (A) interleukin (IL)-6 (open circles), (B) IL-8 (closed circles), and (C) tumor necrosis factor (TNF)-α (open triangle) for October 2015.

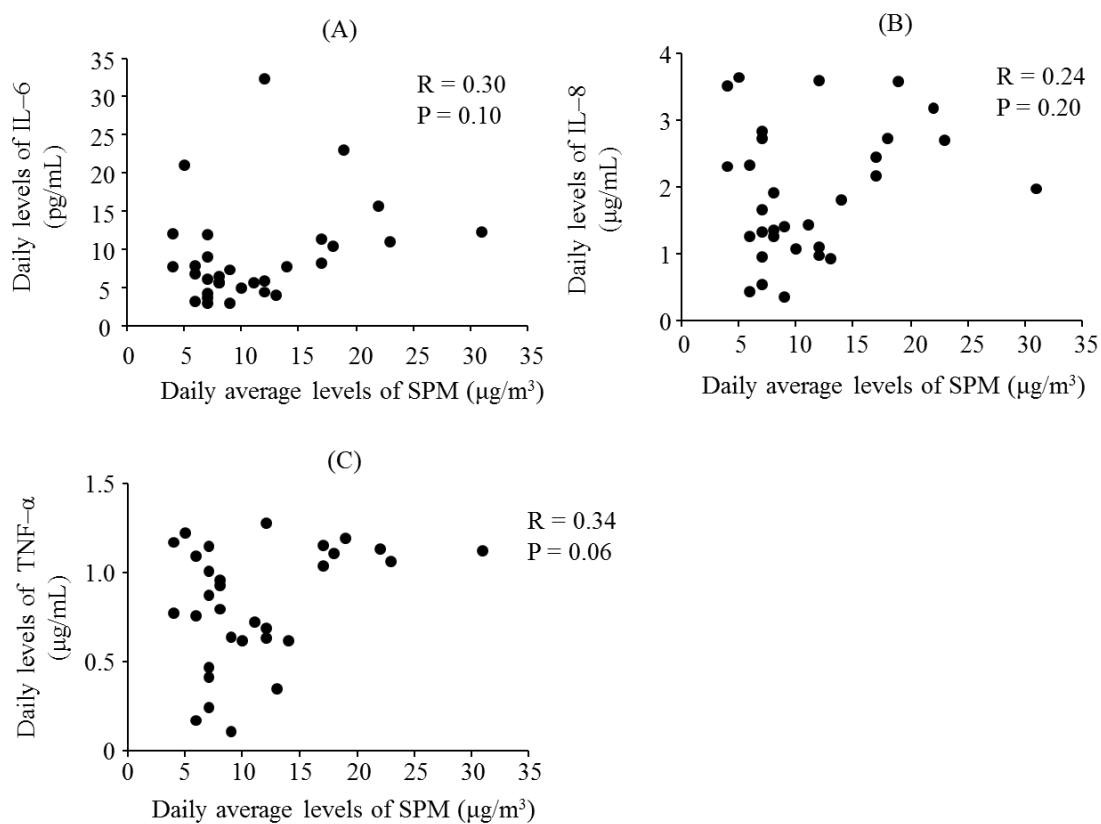
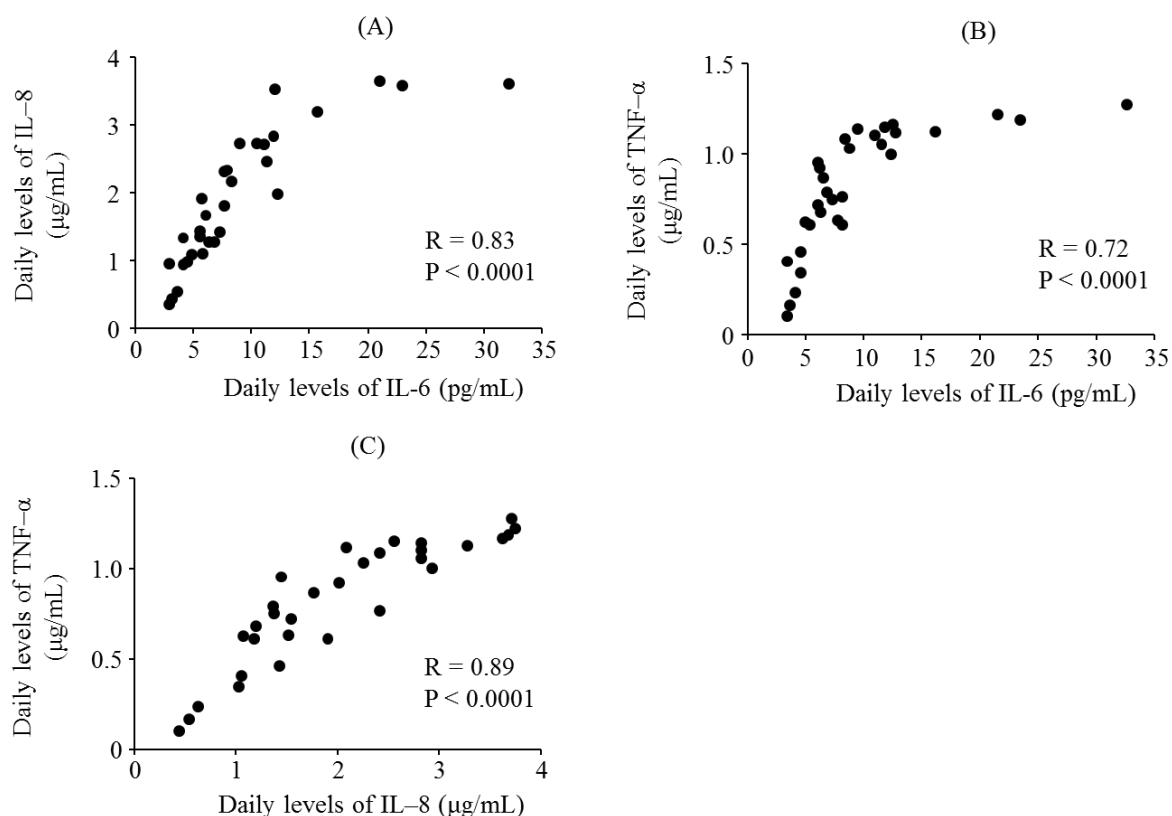


Figure 1-10 Associations between the daily levels of suspended particulate matter (SPM) and (A) interleukin (IL)-6, (B) IL-8, and (C) tumor necrosis factor (TNF)-α for October 2015.

図(1)-11に、TNF- α 、IL-6、IL-8濃度の相関を示す。TNF- α 、IL-6、IL-8濃度は、いずれにおいても有意な相関を示していた。TNF- α については、SPMによる誘導に大きな差があり、ELISAキットでの測定に於いて同一の標準曲線で、すべての測定値を測定適正レンジに収めることができなかったことを考慮する必要がある。TNF- α 、IL-6、IL-8は互いに有意な相関を示していたが、前述した標準曲線に関する本研究でのlimitationを除いても、完全に一致しているわけではなかった。このことは、SPMの組成物において、TNF- α 、IL-6、IL-8をそれぞれ誘導しやすい物質があることを示唆していた。TNF- α 、IL-6は呼吸器疾患でも炎症で重要な役割を果たしているが、循環器疾患やリウマチと比較し、TNF- α 、IL-6が特異的である疾患はない。事実、リウマチではTNF- α 、IL-6を特異的に抑制する生物学的製剤の使用により、疾患コントロールが顕著に改善するが、呼吸器疾患では同様な効果が得られておらず、治療薬として承認を得られていない。このようなことから、SPMの組成によって細胞が反応して産生する炎症性物質が異なるために、SPM、PM2.5による健康影響について臓器毎に差が生じている可能性が考えられた。今後、黄砂、SPM、PM2.5の健康リスク調査では、組成を考慮して臓器毎に評価を行う必要があると考えられる。



図(1)-11 Associations among the daily levels of pro-inflammatory cytokines produced by THP1 human monocyte cells in response to stimulation with particulate matter. (A) Correlation of daily interleukin (IL)-6 and IL-8 levels. (B) Correlation of daily IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α levels. (C) Correlation of daily IL-8 and TNF- α .

表(1)-8に、SPM、PM2.5およびTNF- α 、IL-6、IL-8濃度と呼吸器症状の関連を示す。SPM、PM2.5と児童呼吸器症状の間に有意な関連はなかった。一方で、TNF- α 、IL-6、IL-8濃度の増加によって児童の呼吸器症状は有意な増悪を認めていた。この結果は、2015年2月に実施した呼吸機能検査

と同様の結果であった。SPM、PM2.5は様々な物質から構成されており、どのような物質が、どれだけ含まれているかによって、誘導する炎症性サイトカイン量が異なることはここまでの結果で示してきた通りである。呼吸機能だけでなく、呼吸器症状も単にSPM、PM2.5の質量だけで評価してはリスクを評価できないと考えられる。このことは呼吸器系だけではなく、循環器、脳血管でも同様と考えられる。今後の研究では、SPM、PM2.5の組成物のうち炎症誘導が高い物質を同定し、その物質の濃度を測定し、健康リスク評価を行うことが求められる。SPM、PM2.5のうちエンドトキシンがSPM、PM2.5の炎症誘導能を左右する重要な組成物である可能性を見出しており、今後、更に評価を続けていくことが重要と考えられた。

表(1)-8 Multivariate analysis using GEE logistic regression models to assess the association between respiratory symptoms and interquartile range (IQR) changes in the levels of suspended particulate matter (SPM), particulate matter <2.5 μm in diameter (PM_{2.5}), interleukin (IL) -6, IL-8, and tumor necrosis factor (TNF)- α .

Exposure metric	IQR	Odds ratio	95% CI	P-value
SPM	6.0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	0.97	0.91-1.02	NS
PM _{2.5}	7.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	0.96	0.91-1.02	NS
IL-6	6.16 pg/mL	1.05	1.01-1.09	0.02
IL-8	1.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.12	1.04-1.20	0.002
TNF- α	0.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.11	1.03-1.19	0.004

CI, confidence interval; NS, not significant.

2012年以降、児童での調査を行ってきたが、幾つか課題がある。調査期間を長くすることが研究の精度を高めるうえで有益であることは明らかなが、調査期間を長くした場合には脱落が非常に多くなることも経験している。このため2015年の調査では、調査期間を2月と10月にそれぞれ1ヶ月に限定した。このため調査期間が短いというlimitationがある。また、複数の項目を同時に調査することも、記録を継続できる児童が極端に少なくなる。このため、呼吸機能、皮膚症状、呼吸器症状などを同時に調査することは極めて難しいことを実感してきた。呼吸機能は客観的に評価が可能であるが、皮膚症状も含め児童が主観的に評価するものには、児童の気持ち、先入観が強く反映する。一方で、我々が行ってきた成人喘息患者での調査では、黄砂、SPM、PM2.5の呼吸器系への影響を評価する際に、呼吸機能より呼吸器症状が鋭敏であることを繰り返し確認してきた。同様に、喘息のコントロール、慢性閉塞性肺疾患の増悪予防においても、呼吸機能より症状が鋭敏であることが報告され、治療ガイドラインに反映されている。今後の調査では、主観的なものと客観的なものを併用して行うことが有用であるが、児童での調査は工夫も必要であると考えられた。この経験を考慮し、2016年に同様に児童を対象にして疫学調査を行った。

2015年の調査時には、24時間毎に捕集したPM2.5でヒト由来の細胞を刺激培養しても炎症性サイトカインを定量することができなかったために、SPMの捕集を行った。その後、捕集方法および実験方法を改良し、24時間毎に捕集したPM2.5でも、その炎症誘導能を評価できるようになったため、2016年には疫学調査の期間に、24時間毎にPM2.5を捕集し、その炎症誘導能を評価した。また、こ

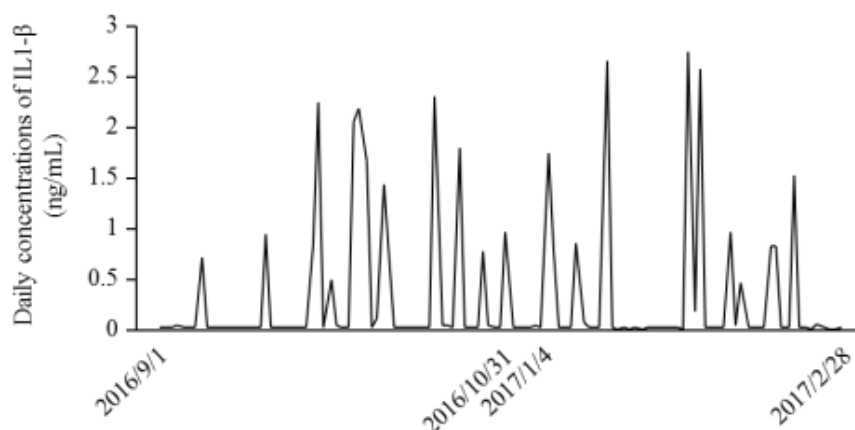
れまでは炎症性サイトカインの産生が多く、樹状細胞、マクロファージの代用が可能な単球を用いて行ってきた。ヒトが黄砂やSPM、PM_{2.5}の曝露を受けた際に、樹状細胞、マクロファージが抗原提示、炎症性サイトカイン産生、さらに、炎症のinitiatorとして極めて重要な役割を果たしているが、同様に上皮細胞も最初に曝露を受ける細胞であり、黄砂やSPM、PM_{2.5}の健康リスクを評価するうえで重要と考えられる。2016年の調査では、採取したPM_{2.5}を気道上皮細胞に曝露させ、炎症性サイトカインを測定することで毒性評価を行った。

2016年9月～10月、2017年1月～2月の期間に24時間毎に採取したPM_{2.5}で気道上皮細胞であるBEAS2B細胞を刺激し、産生されたIL-1 β の測定結果を図(1)-12に示す。PM_{2.5}によるIL-1 β 産生は、産生がある日と無い日に明確に分かれていた。一方、TSLPは、ほとんど産生を認めなかった。24時間毎に採取するPM_{2.5}は微量であり、質量を正確に測定することが出来なかった。したがって、PM_{2.5}の濃度が高い日には、細胞培養時に添加するPM_{2.5}の濃度も、それに比例して高くなっている。図(1)-13にPM_{2.5}の刺激により産生されるIL-1 β とPM_{2.5}の相関を示す。この結果から、PM_{2.5}の濃度が高ければIL-1 β の産生が増加するわけではないことが確認された。SPMと同様にPM_{2.5}でも、組成によって炎症誘導能が異なると考えられた。

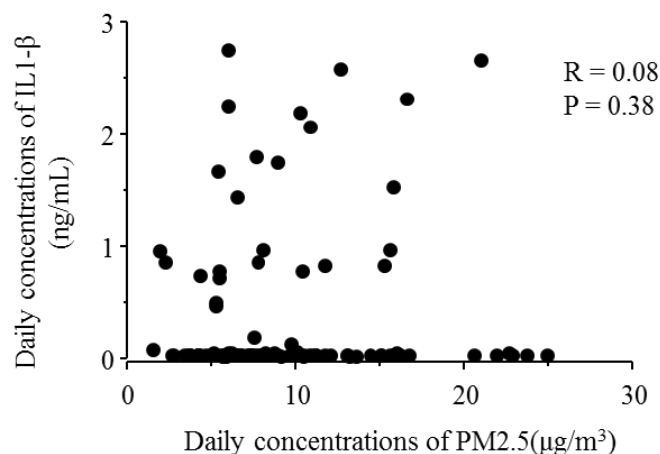
IL-1 β の値が0.1ng/mL以上の日をPM_{2.5}の炎症誘導が高い日、0.1ng/mL未満の日を低い日と定義した。2016年9月から10月に児童300名を対象に行ったピークフローモニタリングの結果について、PEFの値を炎症誘導が高い日と低い日で比較した。PM_{2.5}の炎症誘導が高い日のPEF値は361.2

L/min、低い日は360.4 L/minであり、両群に有意な差はなかった。ここまでの解析では、PM_{2.5}によるIL-1 β の誘導の多寡は児童の呼吸能に影響していなかった。

成人喘息患者を対象に、2015年2月1日から5月30日までACQ5により喘息コントロール状況のモニタリングを行った。101名を調査対象とし、記録を継続できた72名の結果について検討を試みた。



図(1)-12 2016年9月～10月、2017年1月～2月における採取PM_{2.5}の刺激によるBEAS2B細胞からのIL-1 β 産生量



図(1)-13 2016年9月～10月、2017年1月～2月における採取PM_{2.5}の刺激によるBEAS2B細胞からのIL-1 β 産生量とPM_{2.5}の相関

ACQ5の評価では喘息のコントロールが良好な場合にスコアがゼロとなるが、56名において調査期間中のスコアがすべてゼロとなっていた。ほとんどの症例でコントロールスコアがゼロであったことから、黄砂やPM2.5の影響について解析を実施できなかった。同様に、大気中エンドトキシン濃度と真菌量が成人喘息患者の喘息コントロールに与える影響について解析を実施することもできなかった。このような結果になった原因として、以前より調査を行っていることから大気汚染による喘息増悪に対する患者の認識が高くなり予防・回避行動をとるようになってきたこと、喘息治療の急速な進歩によって、特に軽症から中等症で患者では喘息コントロールが非常に良好であることが挙げられた。また、“（3）黄砂中に即時型アレルギー反応を起こす高分子タンパクの有無についての検討”に記載するが、成人喘息患者における大気汚染への感受性因子に鼻炎の合併があることが分かってきた。鼻炎の合併は喘息コントロールを妨げる重要な因子であることが、one airway one diseaseの概念で知られるようになっており、この結果はこうした概念とも合致する。鼻炎を合併する喘息患者では、鼻炎治療を並行して行うことで、黄砂や煙霧、PM2.5の上昇による喘息増悪を高い確率で制御することが可能となってきた。患者の黄砂、PM2.5の認知度の上昇、大気汚染による喘息増悪リスク因子の解明に基づいた治療介入と、喘息治療薬の進歩により、成人喘息患者の10%~15%とされる難治性喘息を除き、山陰で観測される程度の黄砂や大気汚染では、以前のように喘息が悪化することが少なくなっていると考えられる。

（2）黄砂およびPM2.5によって産生誘導される炎症性サイトカインの網羅的解析および炎症性サイトカイン産生における金属成分の関与

9種類のサイトカイン、IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-13, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α を測定した。TNF- α , IL-2, IL-10, IL-12p70はサイトカインを検出することができたが、GM-CSFではポジティブコントロールのLPSとスタンダードで検出され、それ以外のサイトカインはスタンダードでのみ検出することができた。検出感度は、pg/mlから検出されていることを考えると感度が低いために検出されなかったというより、全く分泌されなかったと考えられる。粒径別に採取した粉塵のうち、PM2.5を反映する3 μ m以下の粉塵で、THP1細胞を刺激培養し、bio-prex Th1/TH2キットにより検出された、TNF- α , IL-2, IL-10, IL-12p70の濃度の測定結果を図(1)-14に示す。最も興味深い結果を示したのがTNF- α の分泌であった。採取時期の異なるPM2.5を、それぞれ同一の200 μ g/mLの濃度で刺激培養しているにも関わらず、そのTNF- α は採取時期によって大きく異なっていた。このことは同量のPM2.5であっても、組成によって大きく炎症性サイトカイン産生量に変化することを示唆した。疫学調査と同時に、24時間毎に採取したSPM、PM2.5の炎症性サイトカイン測定による炎症誘導能評価では、採取する量が少なく質量を測定できていないことは既述したとおりである。このことは同一量のSPM、PM2.5で、その毒性を比較できないという欠点はあったが、SPM、PM2.5の濃度が高い日には、ヒトの曝露量も当然増量しており、細胞曝露量にもそれが反映される利点もある。既に結果を記しているが、SPM、PM2.5の濃度が高くないにも関わらず、炎症性サイトカイン産生量が多い日があった。同一量のPM2.5で刺激した場合でも、時期によって炎症性サイトカイン産生量が異なることがあった事実と併せると、PM2.5による炎症は組成が極めて重要であることを示唆すると考えられた。この基礎研究での結果は、既述してきた疫学調査結果とも矛盾しないものであった。

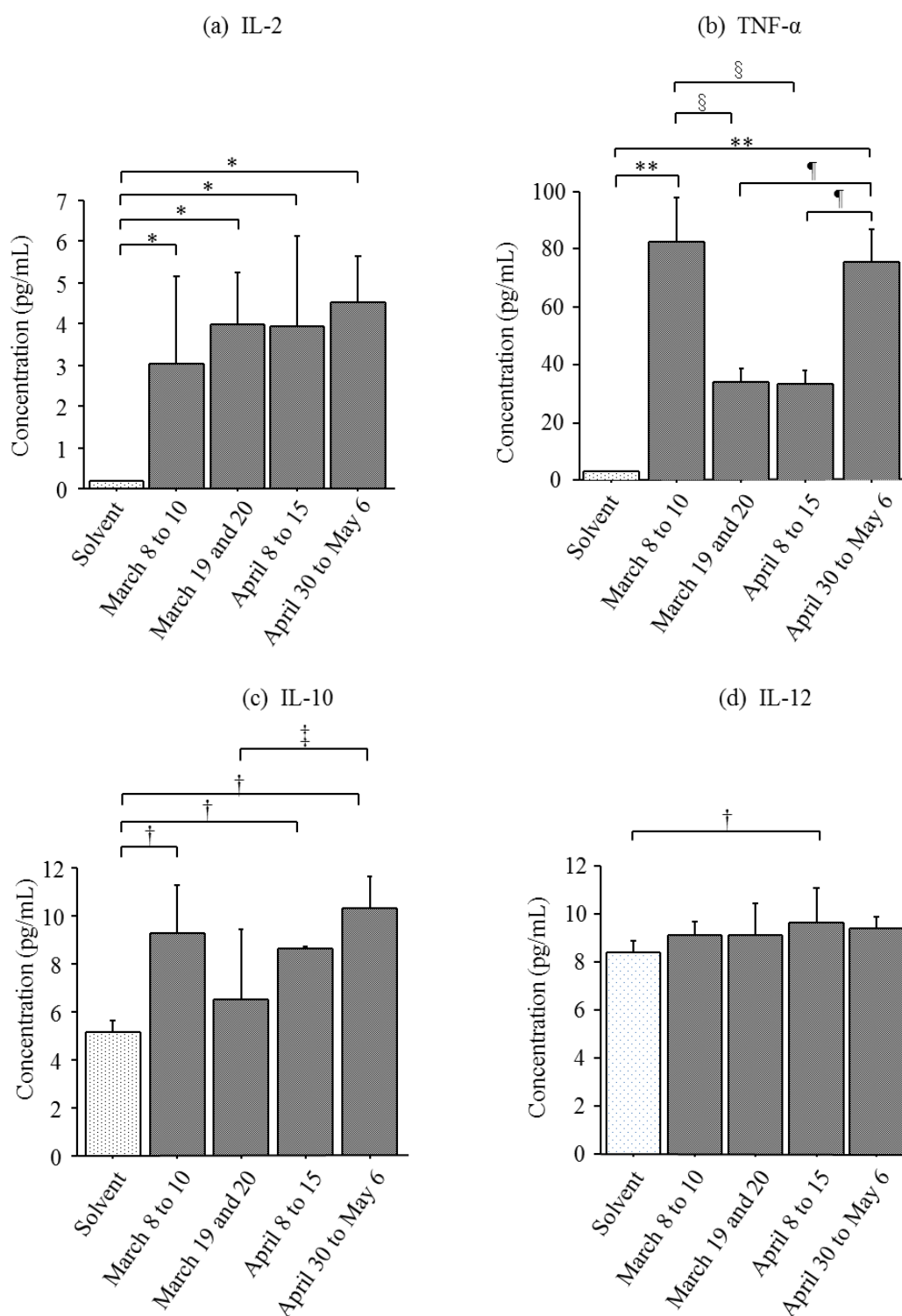
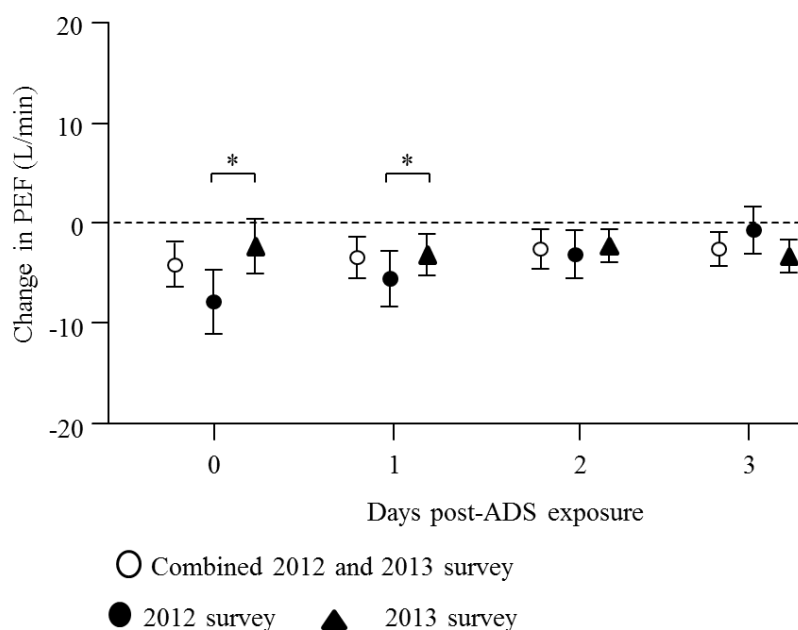


Figure 1-14 The levels of (a) interleukin (IL)-2, (b) tumor necrosis factor (TNF)- α , (c) IL-10, and (d) IL-12 were measured in a THP1 cell line using a Bio-Plex Human Cytokine Th1/TH2 Assay. Particulate matter was collected in 2013 from March 8 to 10, on March 19 and 20, from April 8 to 15, and from April 30 to May 6. Particulate matter collected from March 8 to 10 and on March 19 and 20 was defined as the Asian dust storm (ADS) particles, whereas matter collected from April 8 to 15 and from April 30 to May 6

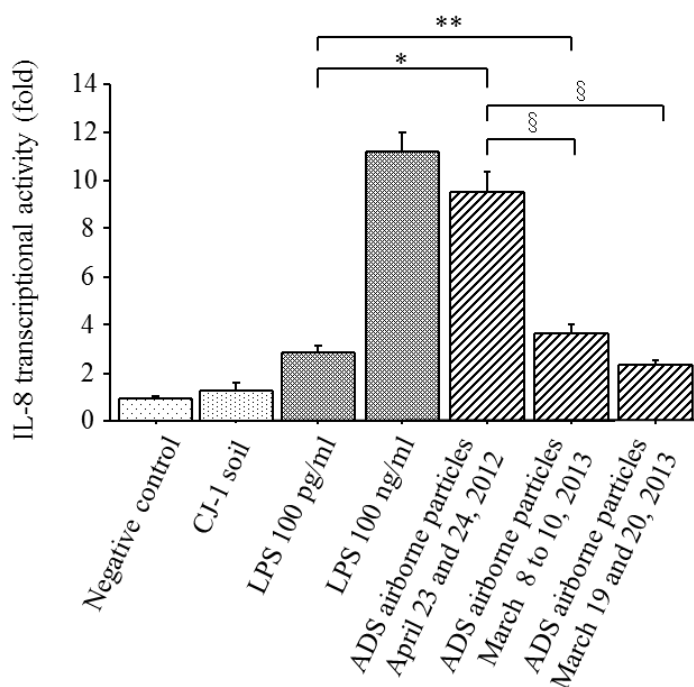
represented the non-ADS particles. Cells were treated with solvent only ($n = 4$, negative control) and particulate matter (all $n = 4$; $200 \mu\text{g/mL}$). $*P < 0.05$ versus solvent, $**P < 0.0005$ versus lipopolysaccharide (LPS) at 100 pg/mL , $\dagger P < 0.05$ versus solvent, $\S P < 0.01$ versus particulate matter collected from March 8 to 10, $\P P < 0.05$ versus particulate matter collected from April 30 to May 6, $\ddagger P < 0.03$ versus particulate matter collected from April 30 to May 6.

これまでの検討で繰り返し確認ができたように黄砂、SPM、PM_{2.5}の健康影響は組成によって異なる可能性が考えられる。2012年4月から5月と2013年に3月から5月に、8～10歳の児童400名を対象に、2015年、2016年と同様にピークフローメーターを用いた呼吸機能モニタリングを行っていた。黄砂の児童呼吸機能への影響について、黄砂毎に差異があるか検討するために2012年と2013年に既に実施してあった疫学調査を追加解析した。黄砂日を気象庁の発表に基づいて解析を行った。2012年には4月23日と4月24日、2013年には3月8日から3月10日、3月19日と3月20日が黄砂日であった。追加解析の結果、2012年、2013年の黄砂時に児童の呼吸機能は有意に低下していたが、その低下の程度には有意な差があり、2012年の黄砂日より顕著に低下していた（図(1)-15）。この結果をもとに2012年と2013年の黄砂時大気粉塵および黄土高原土壌のIL-8誘導能を比較し、さらにその金属成分を解析した。



図(1)-15 PEF changes caused by an ADS event from 0 (ADS day) to 3 days post-ADS exposure in combined 2012 and 2013 (open circles), 2012 (black circles) and 2013 (triangles), with 95% confidence intervals (error bars). Data are controlled for age, gender, height, weight, and presence of asthma, allergic rhinitis, allergic conjunctivitis, atopic dermatitis, and food allergies; meteorological variables such as daily temperature, humidity, and atmospheric pressure; and the linear time trend. There are significant differences in the decrement of PEF on days 0 and 1 between 2012 and 2013 ($*P < 0.02$).

黄砂発生源土壌である黄土高原土壌（CJ-1）にIL-8誘導能は認めないものの、黄砂時に捕集した大気粉塵ではIL-8誘導能が確認された（図(1)-16）。さらに、2012年の黄砂時の大気粉塵のIL-8誘導能は2013年の黄砂時大気粉塵に比較して有意に高く、疫学調査の結果とあわせ大気粉塵の炎症誘導能の強さが呼吸機能を悪化と関連があることが示唆された。大気粉塵の炎症誘導能に対する金属成分の関与を評価するために、実験に使用した大気粉塵中の金属成分解析を行った（表(1)-9）。大気粉塵中の金属成分解析の結果、IL-8誘導能が最も高い2012年黄砂時大気粉塵が他の大気粉塵に比較して多く含む金属成分がなく、さらに黄土高原土壌に金属成分が含まれるもののIL-8誘導が全く認められないことから、今回の大気粉塵のIL-8誘導能評価に関し金属成分は関与していないことが推察された。このことは大気粉塵の曝露によって生じる呼吸機能低下は金属成分ではなく別の成分が極めて重要であることを示唆していた。



図(1)-16 IL-8 transcriptional activity measured using an IL-8 luciferase assay in a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line. Cells were treated with solvent only ($n = 6$, negative control), LPS ($n = 6$, 100 pg/ml, positive control), LPS ($n = 6$, 100 ng/ml, positive control), and ADS airborne particles collected on April 23 and 24, 2012 ($n = 6$, 1 mg/ml), March 8 to 10, 2013 ($n = 6$, 1 mg/ml), and March 19 and 20, 2013 ($n = 6$, 1 mg/ml). * $P < 0.01$ versus LPS at 100 pg/ml, ** $P < 0.02$ versus LPS at 100 pg/ml, § $P < 0.01$ versus ADS airborne particles from April 23 and 24, 2012.

表(1)-9 黄土高原土壌、2012年および2013年黄砂時大気粉塵中に含まれる金属成分

Metals ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	CJ-1 soil	ADS airborne particles in April 23 and 24, 2012	ADS airborne particles in March 8 to 10, 2013	ADS airborne particles in March 19 and 20, 2013
Al	68.00	28.80	22.40	14.80
As	ND	ND	ND	ND
Ba	0.44	0.12	0.18	0.10
Ca	68.00	29.60	44.00	31.20
Cd	ND	ND	ND	ND
Co	0.01	ND	ND	ND
Cr	0.05	ND	ND	ND
Cu	0.03	0.12	ND	0.07
Fe	26.00	22.00	20.80	14.40
Hg	ND	ND	ND	ND
K	0.19	0.38	0.33	0.30
La	0.03	ND	ND	ND
Mg	18.00	14.00	16.80	14.40
Mn	0.70	0.52	0.56	0.40
Na	0.44	33.60	56.00	64.00
Ni	0.03	0.14	0.15	0.11
P	0.68	ND	ND	ND
Pb	0.02	0.06	0.12	0.06
Si	260.00	140.00	108.00	72.00
Sr	0.26	0.16	0.22	0.16
Ti	2.40	0.96	0.92	0.52
Zn	0.07	0.52	0.64	0.60

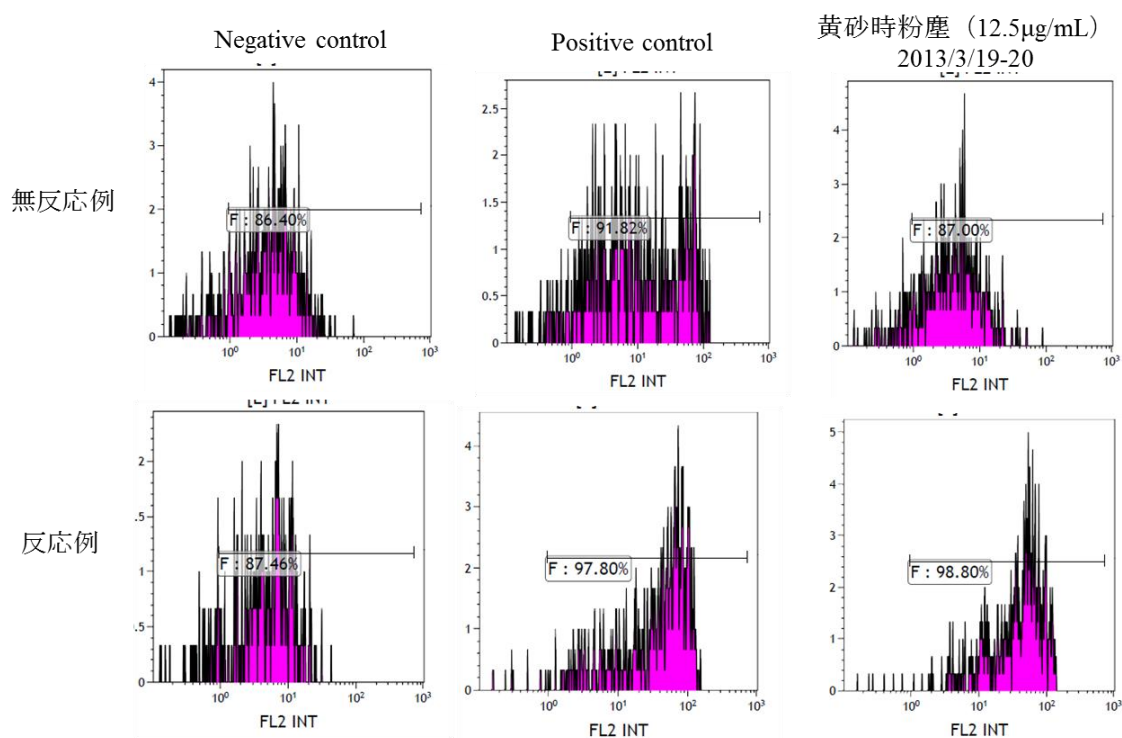
ADS; Asian dust storm, CJ-1 soil; Soil from the China Loess Plateau, the original ADS soil in the Tengger Desert and Huining located in Gansu Province, and ND; not detected.

この検討では黄砂時に大気粉塵の捕集を行っているが、当然のことながら黄砂粒子とそれに付着する物質のみを分別して捕集できているわけではなく、その他のSPMやPM_{2.5}も含まれている。PM_{2.5}の原因として、石炭や石油などの化石燃料の焼灼物が重要である。このため炭素成分も重要であるが、今回の検討では手技的に難しく、炭素濃度の測定が行えていない。この点、今後は炭素濃度の測定が可能な系を検討する必要がある。この問題を解決するための次善の策として、松江市では大気中の全炭素濃度、メタン系炭化水素濃度、非メタン系炭化水素濃度の測定が実施されており、別項（４）「SPM、黄砂による炎症性サイトカイン産生とメタン系炭化水素（CH₄）、非メタン系炭化水素（NMHC）、全炭化水素（THC）の関連について」において松江市で捕集したSPM

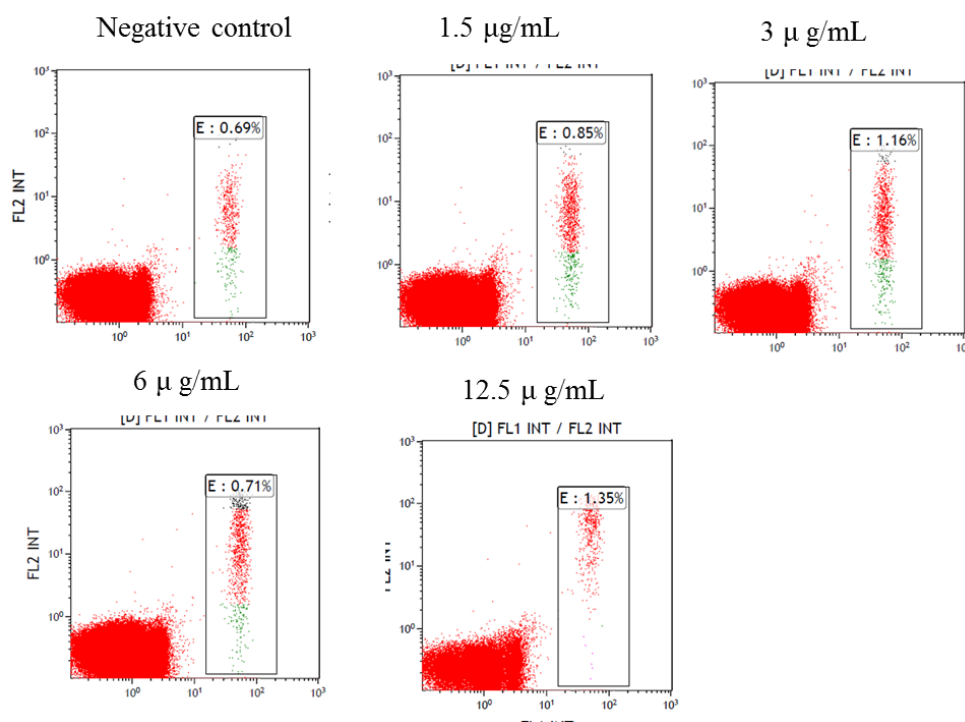
を用いて実施した炎症性サイトカイン産生量と全炭素濃度、メタン系炭化水素濃度、非メタン系炭化水素濃度との関連を検討した。黄砂、SPM、PM2.5に含まれる金属成分以外の組成物で、炎症性サイトカイン産生に関与する可能性がある物質として、既にエンドトキシンと真菌を考慮した検討は行っており、その結果は既に示したとおりである。また、タンパク成分の解析はサブテーマ③で行っている。

(3) 黄砂中に即時型アレルギー反応を起こす高分子タンパクの有無についての検討

2013年3月19日～20日の黄砂時に採取した大気粉塵の懸濁液上清を、スギ花粉特異的IgE抗体陽性喘息患者の全血に添加し、フローサイトメトリーで好塩基球表面のCD203cの発現を評価した。黄砂が飛来する時期にはスギ、ヒノキ花粉の飛散もあることから、対象をスギ花粉陽性喘息患者とした。黄砂時粉塵により、好塩基球が活性化する症例と活性化しない症例が確認された(図(1)-17)。さらに、活性化した症例では、CD203cの発現は大気粉塵の濃度に依存して発現が増強していた(図(1)-18)。



図(1)-17 黄砂時大気粉塵をスギ花粉特異的IgE抗体陽性喘息血液に添加した時のCD203c発現の変化



図(1)-18 黄砂時大気粉塵により好塩基球表面CD203c発現が増強した患者での濃度依存性反応

この結果から、黄砂時大気粉塵中には即時型アレルギー反応を起こす高分子タンパクが含まれていることが示された。さらに、スギ花粉陽性患者において活性化する症例と活性化しない症例が存在することから、このタンパクがスギ花粉以外であることが示唆された。これまで、黄砂、SPM、PM2.5で喘息が増悪することが報告され、その組成物に基づいて、メカニズムの検討がされているが、そのほとんどは金属成分であり、それ以外ではニトロ芳香族炭化水素（nitropolycyclic aromatic hydrocarbon; PAH）などに限られている。SPM、PM2.5の健康影響におけるメカニズムとして、遺伝子損傷、酸化ストレス亢進、炎症増強があるが、我々の検討では、炎症という観点からは金属成分はほとんどその能力を有していない。エンドトキシンなどの糖鎖、あるいはタンパクは炎症誘導が証明されている物質も多く、黄砂、SPM、PM2.5の健康影響のメカニズムを明らかにするためにはタンパクの検討も重要であることが示唆された。

黄砂にはアレルギー炎症を惹起するタンパクが含まれている可能性が示唆されたことから、サブテーマ③を中心に黄砂、SPMのタンパク解析を進めたが、課題終了時点で低分子のタンパクのみしか検出することができなかった。しかしながら、患者血液を用いた実験からは、アレルギー炎症を惹起するタンパクが含むと考えられ、黄砂、SPM、PM2.5に含まれるタンパクの検出について、タンパク研究の専門家と共同研究を行うことが有用と考えられた。

黄砂粉塵を用いた好塩基球活性化の検討結果からは、喘息患者に於いて黄砂への感受性者と非感受性者が存在する可能性が示唆された。2012年3月から5月に231名の喘息患者を対象に、ピークフローメーターを用いて呼吸機能モニタリングを行い、黄砂の影響評価を行っていた。この疫学調査結果を用いて、成人喘息でどのような患者背景が黄砂への感受性を示すか追加解析を行った。成人喘息では、慢性閉塞性疾患を合併するケースが多く、実地診療ではその治療において重要な意

味を持つ。高齢になるほど合併する頻度は高くなり、解析する年齢により異なるが20%~60%で合併が報告されている⁸⁾。追加解析では、喘息単独患者と慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive pulmonary disease; COPD）を合併する患者（asthma COPD overlap syndrome）での差異を検討した。また、喘息の難治性に関わる因子として低肺機能、アレルギー性鼻炎の合併があることから、低肺機能、アレルギー性鼻炎の合併が黄砂への感受性因子となるか解析した。表(1)-10に、調査が行ってあった成人喘息231名の患者背景を示す。喘息患者は、発作性の咳、喘鳴の既往があり、気道過敏性の亢進および気道可逆性のいずれか、あるいは双方があるものと定義してある。ACOS患者は、喘息と定義された患者のうち、10-pack year以上の喫煙歴があり、気管支拡張薬使用後の呼吸機能に於いて1秒率が70%未満の患者とした。喘息単独患者は190名、ACOS患者は41名であった。

表(1)-10 患者背景

	Patients with asthma alone	Patients with ACOS	P-value
Number, n	190	41	
Age (years)	59.6 ± 16.3	71.9 ± 10.5	<0.001
Sex; male/female, n	55/135	38/3	<0.001
Smoking status			<0.001
Never, n (%)	156 (82.1)	0 (0)	
Former, n (%)	29 (15.2)	33 (80.5)	
Pack-year history	33.5 ± 22.3	41.2 ± 22.8	
Current, n (%)	5 (2.7)	8 (19.5)	
Pack-year history	21.1 ± 11.9	51.2 ± 32.7	
ACT score			
Mean	22.7 ± 3.2	23.2 ± 2.3	0.314
25, n (%)	70 (36.8)	18 (43.9)	
20 to 24, n (%)	81 (42.6)	19 (46.3)	
20>, n (%)	39 (20.6)	4 (9.8)	
Pulmonary function			
FVC (L)	3.12 ± 0.97	3.35 ± 0.68	0.155
FEV ₁ (L)	2.39 ± 0.84	1.95 ± 0.61	0.002
%FEV ₁ (%)	105.7 ± 24.7	85.7 ± 23.2	<0.001
FEV ₁ /FVC	0.76 ± 0.10	0.57 ± 0.11	<0.001
Rhinosinusitis, n (%)	89 (46.8)	5 (12.2)	<0.001
Treatment step			0.022
Step 1, n (%)	3 (1.6)	0 (0)	
Step 2, n (%)	29 (15.3)	2 (4.9)	
Step 3, n (%)	40 (21.1)	6 (14.6)	

Step 4, n (%)	112 (58.9)	29 (70.7)	
Step 5, n (%)	9 (3.1)	1 (9.8)	
ICS dose			0.019
Low dose, n (%)	49 (25.8)	2 (4.9)	
Medium dose, n (%)	93 (48.9)	25 (61.0)	
High dose, n (%)	48 (25.3)	11 (26.8)	
LABA use, n (%)	130 (68.4)	41 (100)	0.023
Leukotriene receptor antagonist use, n (%)	96 (50.5)	13 (31.7)	0.152
Theophylline use, n (%)	14 (7.4)	9 (22.0)	0.094
Oral corticosteroid use, n (%)	7 (3.7)	1 (2.4)	0.694
Omalizumab use, n (%)	2 (1.1)	1 (2.4)	0.479

Data are expressed as mean $\pm$ SD or the number (%).

ACOS: asthma–chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome, ACT: Asthma Control Test, FEV₁: forced expiratory volume in 1 s, %FEV₁: percentage of predicted FEV₁, FVC: forced vital capacity, ICS: inhaled corticosteroids, LABA: long-acting β_2 -agonists

黄砂日は気象庁発表に基づき、2012年4月23日と4月24日とした。2015年に小学校児童で行った疫学調査と同様な解析方法により、ピークフロー（peak expiratory flow; PEF）値とLIDARによる黄砂粒子、SPM、PM_{2.5}の関連と、非黄砂日に比較した黄砂日のPEF値の変動を線型混合モデルにより解析を行った。表(1)-11、12に結果を示す。喘息患者では黄砂粒子の増加により有意にPEF値が低下していたが、ACOS患者では有意な関連はなかった。SPM、PM_{2.5}とは、喘息単独患者、ACOS患者のいずれのPEF値も有意な関連はなかった。黄砂日に喘息単独患者では有意にPEF値は低下し、5日後まで低下は遷延していた。一方で、ACOS患者では飛来量が多い黄砂の日であっても呼吸機能は影響を受けていなかった。喘息患者であっても、COPDを合併していない場合に、黄砂への感受性が高いことが示唆された。

表(1)-11 Associations of PEF with exposure to AD particles, spherical particles, SPM, and PM_{2.5} according to linear mixed models after adjustment for individual characteristics and meteorological variables

Patients with asthma alone (n = 190)						
Exposure	IQR	Change in PEF		95% CI		P-value
		(L/min)				
AD particles	0.018 km ⁻¹	−0.50	−0.98	to	−0.02	0.042
SPM	11.8 μ g/m ³	−0.25	−0.66	to	0.15	0.227
PM _{2.5}	6.9 μ g/m ³	−0.02	−0.45	to	0.41	0.927

Patients with ACOS (n = 41)						
Exposure	Change in PEF					P-value
	IQR	(L/min)	95% CI			
AD particles	0.018 km ⁻¹	−0.11	−1.06	to	0.85	0.825
SPM	11.8 µg/m ³	0.27	−0.54	to	1.10	0.508
PM _{2.5}	6.9 µg/m ³	0.29	−0.57	to	1.15	0.513

AD: Asian dust, ACOS: asthma–chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome, CI: confidence interval, IQR: interquartile range, PEF: peak expiratory flow, PM_{2.5}: particulate matter smaller than 2.5 µm in diameter, SPM: suspended particle matter.

The linear mixed models included a random intercept for subjects in the analysis, individual characteristics, meteorological variables, gaseous air pollutants (nitrogen dioxide, ozone, and sulfur dioxide), and other parameters related to AD particles, SPM, and PM_{2.5} that deviated from the evaluation.

表(1)-12 Association between PEF changes and exposure to heavy AD

Patients with asthma alone (n = 190)					
Lag time	Change in PEF				
(days)	(L/min)	95% CI			P-value
Lag 0	−2.11	−4.28	to	−0.15	0.036
Lag 0–1	−1.94	−3.64	to	−0.23	0.026
Lag 0–2	−1.80	−3.31	to	−0.30	0.019
Lag 0–3	−1.79	−3.17	to	−0.43	0.010
Lag 0–4	−1.45	−2.72	to	−0.19	0.025
Lag 0–5	−1.31	−2.50	to	−0.13	0.030
Patients with ACOS (n = 41)					
Lag time	Change in PEF				
(days)	(L/min)	95% CI			P-value
Lag 0	−2.76	−6.86	to	1.35	0.188
Lag 0–1	−1.66	−5.07	to	1.76	0.342
Lag 0–2	−1.64	−4.63	to	1.36	0.285
Lag 0–3	−1.20	−3.92	to	1.53	0.389
Lag 0–4	−0.73	−3.25	to	1.79	0.570
Lag 0–5	−0.18	−2.53	to	2.18	0.883

AD: Asian dust, CI: confidence interval, PEF: peak expiratory flow

Calculated for an interquartile change in heavy AD exposure and adjusted for individual characteristics and meteorological variables.

A heavy AD day was determined according to the information provided by the Japan Meteorological Agency.

鼻炎の合併、低呼吸機能のリスク評価を行った（表(1)-13）。鼻炎を合併する喘息患者では黄砂により呼吸機能が低下しやすかった。一方、低肺機能は関連がなかった。成人喘息では、COPDの合併、鼻炎の合併が黄砂への感受性因子と考えられた。この差異の原因に、組成毎に感受性が存在するかについては明らかにできていない。鼻炎の合併では、鼻閉のために口呼吸となり黄砂が直接下気道に流入するために呼吸機能が低下しやすかったと考えられた。黄砂、PM2.5の健康リスクでは、組成とともに調査対象での感受性因子の存在も考慮に入れなければ、正確なリスク評価が行えないと思われた。

表(1)-13 Association between daily PEF values after exposure to heavy AD and patient characteristics

	Change in PEF				P-value
	(L/min)	95% CI			
Patients with rhinosinusitis (n = 88)	-3.25	-5.51	to	-0.98	0.005
Patients without rhinosinusitis (n = 143)	-0.77	-3.93	to	2.38	0.632
%FEV ₁ ≥ 80% (n = 181)	-1.60	-3.78	to	0.57	0.149
%FEV ₁ < 80% (n = 50)	-0.38	-5.06	to	4.30	0.873

Estimates and 95% confidence intervals for changes in PEF (L/min) in all patients after adjustment for meteorological variables

AD: Asian dust, AR: allergic rhinitis, CI: confidence interval, CS: chronic sinusitis, %FEV₁: percentage of predicted forced expiratory volume in 1 second, PEF: peak expiratory flow

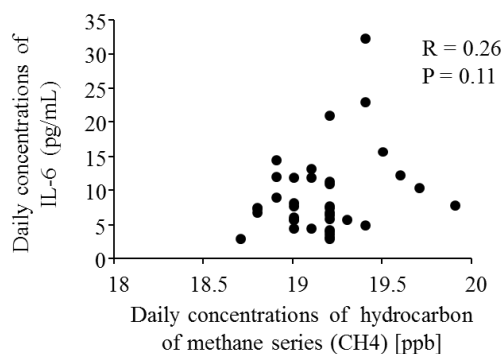
A heavy AD day was determined according to the definition recommended by the Japan Meteorological Agency.

（４）SPM、黄砂による炎症性サイトカイン産生とメタン系炭化水素（CH₄）、非メタン系炭化水素（NMHC）、全炭化水素（THC）の関連について

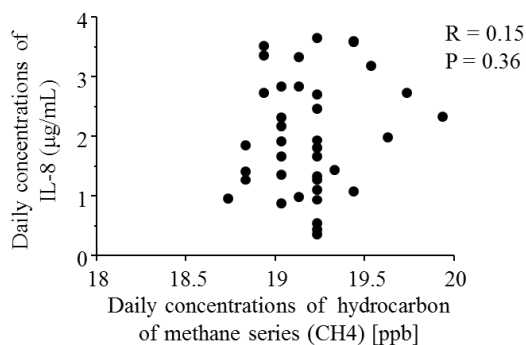
これまでに黄砂、SPM、PM2.5と成人喘息患者、小児の呼吸機能および呼吸器症状との関連について疫学調査を行ってきた。その結果、黄砂の飛来、SPM、PM2.5の上昇に伴い成人喘息患者、小児の呼吸機能および呼吸器症状が増悪することを確認した。しかし、黄砂、SPM、PM2.5への曝露による成人喘息患者、小児の呼吸機能および呼吸器症状の増悪程度は常に同一ではなく、例え同一集団で調査を行っても結果が一致しないことがあった。一方で、SPMを24時間毎に捕集し、ヒト単球細胞を刺激培養し産生される炎症性サイトカインを定量し、その濃度を各日のSPMの炎症誘導能と定義し小児の呼吸機能との関連を解析した。その結果では、SPMと呼吸機能に有意な関係がなかったが、炎症誘導能の指標として測定したIL-8濃度との間には有意な相関を認めた。また、黄砂時に大気粉塵を捕集し、同様に炎症誘導能を測定すると、黄砂による呼吸機能増悪、呼吸器症状の増悪も炎症誘導能が高いほど顕著であった。以上のことから黄砂、SPM、PM2.5のヒトの呼吸系への影響は、組成に基づく炎症誘導能が重要であることが示唆される。また、炎症誘導能が高い物質を同定できれば、黄砂、SPM、PM2.5の健康影響を評価する際に有用と考えられる。これま

での検討では、黄砂、SPM、PM2.5に含まれるエンドトキシン濃度は炎症誘導能と高い相関を示すことが確認された。一方で、SPM中のエンドトキシン濃度と呼吸機能の間には有意な相関は確認できなかった。このことからエンドトキシン以外の炎症誘導能に影響する物質の検索が必要と考えられる。

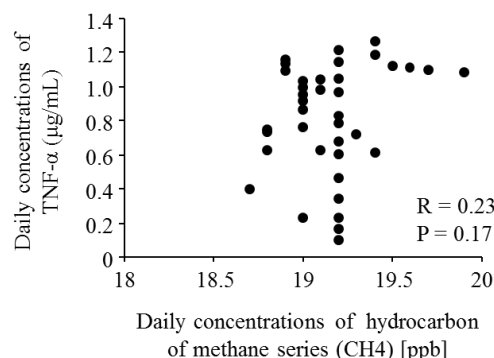
2015年9月24日から10月31日までのCH₄、NMHC、THCの濃度とSPMが産生するIL-6、IL-8、TNF- α 濃度との関係について検討した。CH₄濃度とIL-6、IL-8、TNF- α 濃度の相関係数はそれぞれIL-6 [R=0.26, P=0.11] (図(1)-19)、IL-8 [R=0.15, P=0.36] (図(1)-20)、TNF- α [R=0.23, P=0.17] (図(1)-21)であった。同様にNMHCは、IL-6 [R=0.07, P=0.67] (図(1)-22)、IL-8 [R=0.12, P=0.47] (図(1)-23)、TNF- α [R=0.27, P=0.10] (図(1)-24)であった。また、THCではIL-6 [R=0.22, P=0.18] (図(1)-25)、IL-8 [R=0.18, P=0.28] (図(1)-26)、TNF- α [R=0.33, P=0.04] (図(1)-27)であった。THC濃度のみTNF- α 濃度と有意な相関を認めていた。IL-6、IL-8、TNF- α 濃度は、IL-6とIL-8がR=0.84 (P<0.0001)、IL-6とTNF- α がR=0.72 (P<0.0001)、IL-8とTNF- α がR=0.88 (P<0.0001)と高い相関があるものの完全には一致していなかった。この違いは組成が原因と考えられる。炭素成分が多い場合、あるいは炭素成分と連動する組成物によりTNF- α 濃度は高くなりやすく、ヒトへの健康影響が高いことが推察された。呼吸器疾患に比較し血管内皮傷害を伴う循環器疾患などでは、TNF- α が病態形成に強く関与することが知られている。最近、石炭燃焼による微小粒子状大気汚染物質は、他の発生源から生じるものより、虚血性心疾患発症に与える影響が強いことが報告されている⁹⁾。今回の結果は、こうした知見に矛盾しない結果と考えられる。ただし、この結果はSPMで行った評価であり、炭素成分はPM2.5あるいは更に小さいPM0.1の重要な構成成分であることから、より小さい粒子状大気汚染物質でも評価することが重要と考えられた。



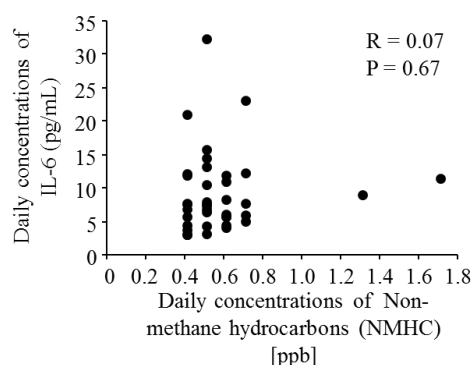
図(1)-19 IL-6濃度とメタン系炭化水素濃度との関連



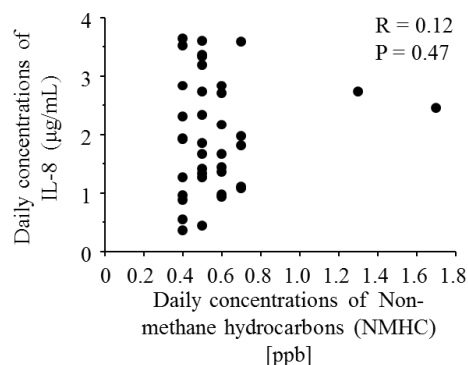
図(1)-20 IL-8濃度とメタン系炭化水素濃度との関連



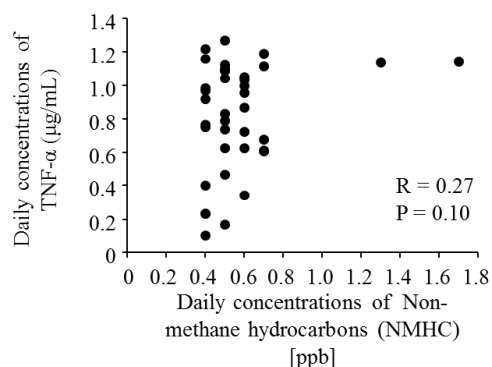
図(1)-21 TNF- α 濃度とメタン系炭化水素濃度との関連



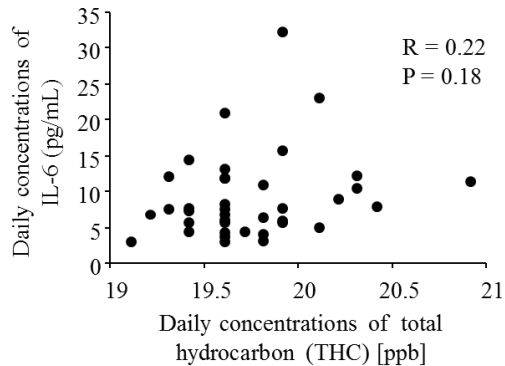
図(1)-22 IL-6濃度と非メタン系炭化水素濃度との関連



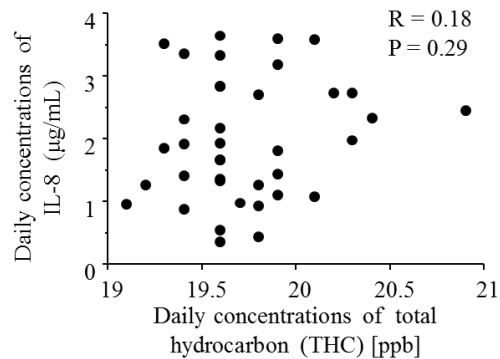
図(1)-23 IL-8濃度と非メタン系炭化水素濃度との関連



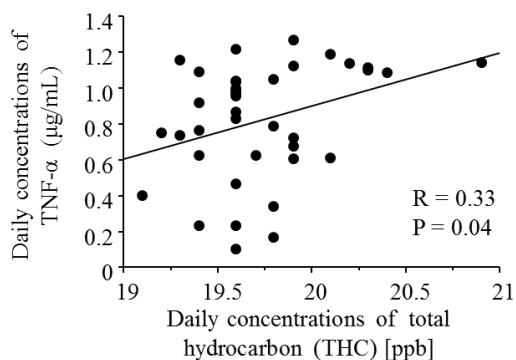
図(1)-24 TNF-α濃度と非メタン系炭化水素濃度との関連



図(1)-25 IL-6濃度と全炭化水素濃度との関連

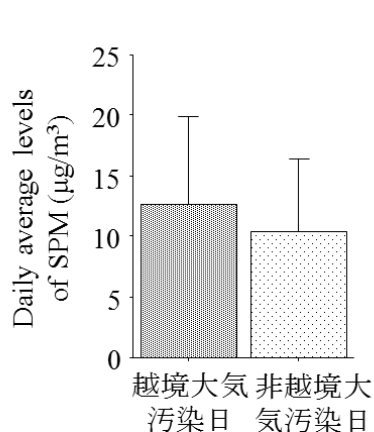


図(1)-26 IL-8濃度と全炭化水素濃度との関連

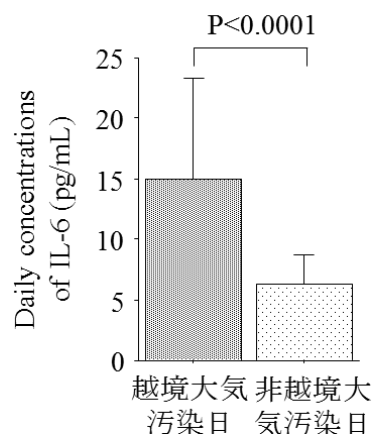


図(1)-27 TNF-α濃度と全炭化水素濃度との関連

2015年2月、10月の期間にSPMを捕集し、各日毎の炎症性サイトカイン産生量を測定した結果を用いて、越境大気汚染の関与についてpreliminaryに検討を行った。現在のところ大陸から本邦への大気汚染の流入を明確に定義することは出来ない。山形大学理学部、柳澤文孝教授と共同研究を行うことで、Terra衛星とAqua衛星によるMODISデータを用いて山陰地区への大陸からの大気汚染流入があると考えられる日を選定した。越境大気汚染があったと考えられる日と無かったと考えられる日で、IL-6、IL-8、TNF- α 濃度の差を比較した。SPMの濃度は、越境大気汚染日が $12.6 \pm 7.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ と非越境大気汚染日が $10.5 \pm 5.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり差はなかった（図(1)-28）。IL-6濃度は、越境大気汚染日が $14.9 \pm 8.4 \text{ pg}/\text{mL}$ と非越境大気汚染日が $6.3 \pm 2.4 \text{ pg}/\text{mL}$ と越境大気汚染日で有意に高かった（図(1)-29）。IL-8では、越境大気汚染日が $2.9 \pm 1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ と非越境大気汚染日が $1.5 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ とIL-6と同様に越境大気汚染日で有意に高かった（図(1)-30）。さらにTNF- α においても、 $1.0 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ と $0.7 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ と越境大気汚染日で有意に高かった（図(1)-31）。あくまでもpreliminaryな検討であり、MODISデータによる越境大気汚染日の定義が妥当か今後検証する必要があるが、今回の結果からは、大陸からの越境大気汚染がある日にはSPMのサイトカイン産生量が高くなる可能性が示唆された。このことから、本邦に越境大気汚染が流入した場合のSPM、PM2.5の健康影響はより増悪される可能性が考えられた。今回、他の大気汚染モニタリングシステムではなく、このTerra衛星とAqua衛星によるMODISデータを活用したのは、他の衛星を利用したシステムがシミュレーションデータであることとは異なり、実測値であることにあった。



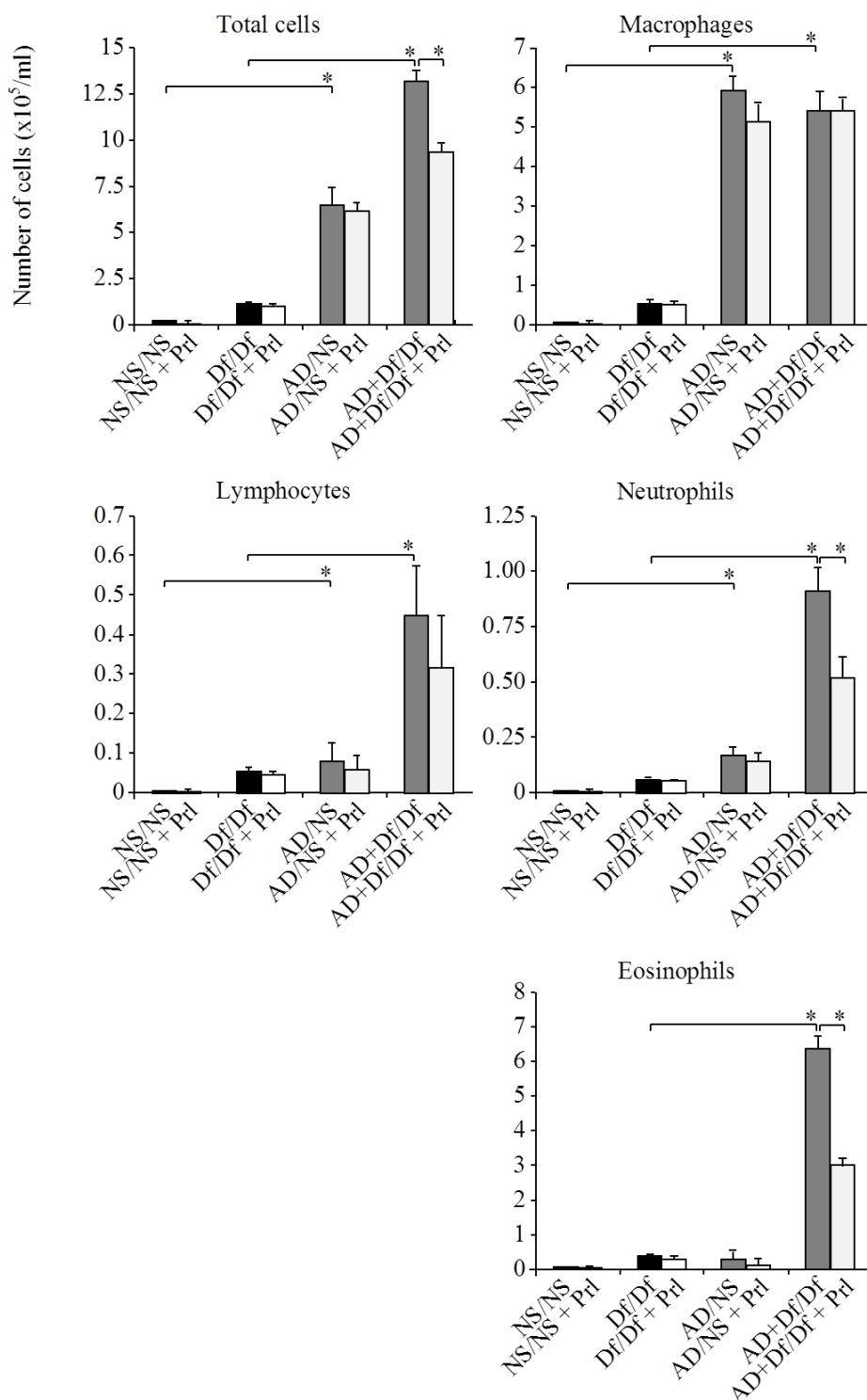
図(1)-28 越境大気汚染日と非越境大気汚染日でのSPM濃度レベルの差異



図(1)-29 越境大気汚染日と非越境大気汚染日でのIL-6濃度の差異

1) 気管支肺胞洗浄中の細胞分画解析 (図(1)-33)

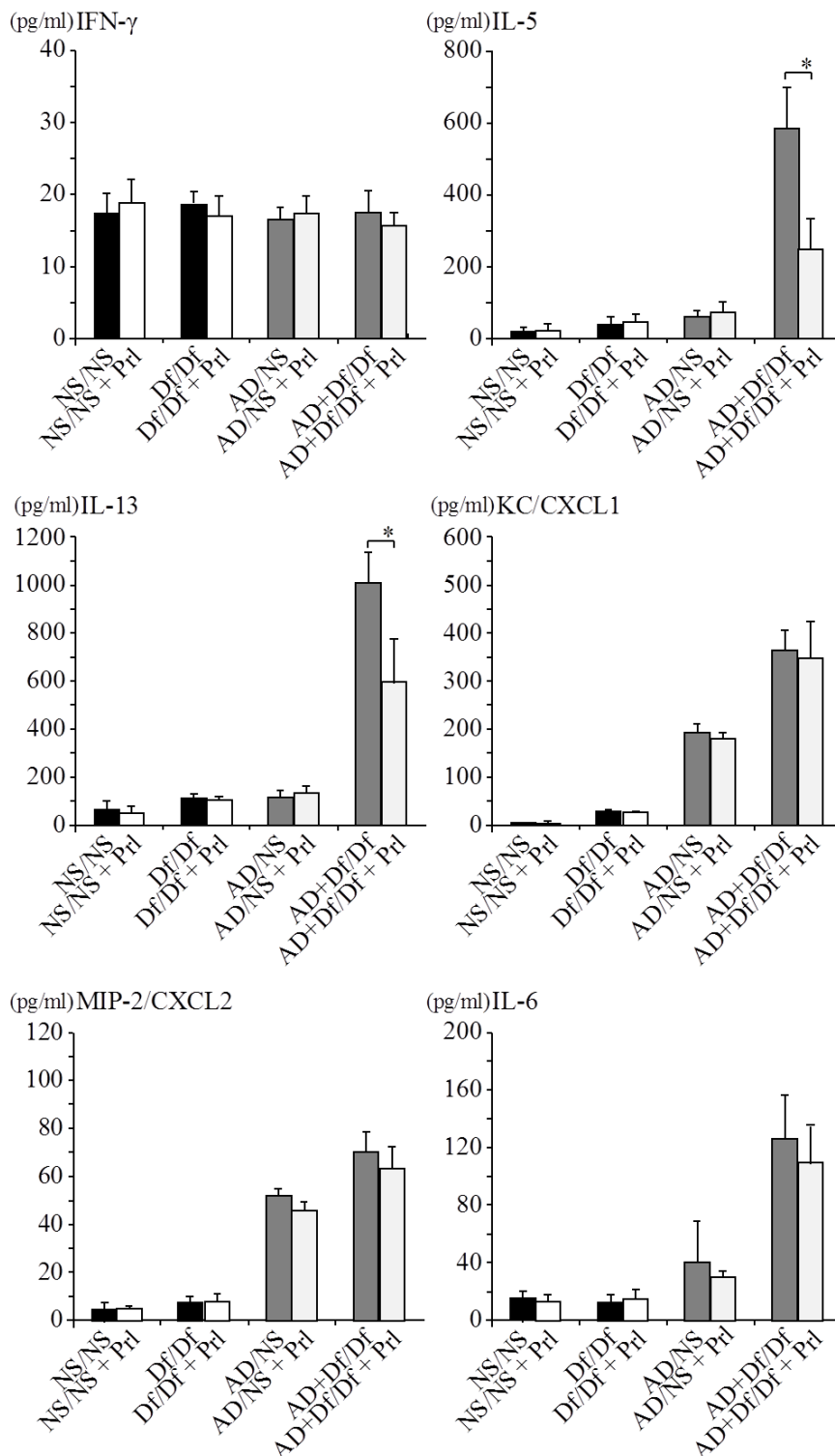
陽性コントロール群であるDf/Df群は、陰性コントロール群であるNS/NS群と比較して有意に気管支肺胞洗浄液中の総細胞数の増加を認めた。ダニ抗原 (Df) と黄砂粉塵 (AD) を共に感作させたAD+Df/Df群はDf/Df群と比較して気道炎症が増強し、11.2倍の総細胞数増加を認めた。細胞分画では、マクロファージ、リンパ球、好中球、好酸球ともに、AD+Df/Df群はDf/Df群と比較して細胞数の増加を認めたが、特に好中球の増加率が20.2倍と最も顕著であった。細胞増加を認めたAD+Df/Df群にロイコトリエン拮抗薬の投与をおこなったところ (AD+Df/Df+Pr1群)、総細胞数は29.6%有意に減少した。減少した細胞のうち、特に好酸球数減少 (52.4%) と好中球減少 (43.1%) が顕著であった。



図(1)-33 気管支肺胞洗浄液中細胞分画

2) 気管支肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン濃度の評価 (図(1)-34)

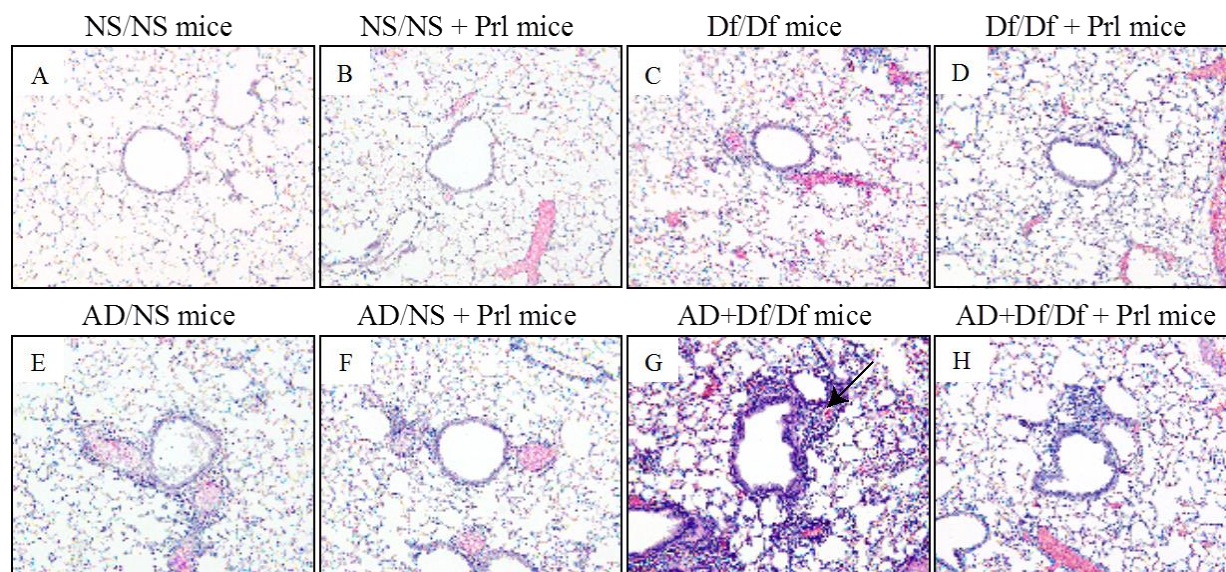
ダニ抗原誘発喘息モデルマウスにおける黄砂粉塵が誘導するアレルギー性気道炎症を、ロイコトリエン拮抗薬がどのようなメカニズム減少させるのかを検討する目的で、気管支肺胞洗浄液中の各種サイトカイン濃度を評価した。図(1)-2で示した気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数増加に一致して、黄砂粉塵曝露は喘息病態に関して重要な生物学的意義のある各種サイトカインを誘導していた。AD+Df/Df群では、喘息病態に関与するinterleukin (IL)-5やIL-13などのTh-2サイトカインが上昇をしていたが、ロイコトリエン拮抗剤の投与により有意に減少していた (AD+Df/Df+Prl群)。一方で、interferon (IFN)- γ 、IL-6、MIP-2/CXCL2、KC/CXCL1などのサイトカインはロイコトリエン拮抗剤の投与では減少を示さなかった。したがって、ロイコトリエン拮抗剤の投与が、黄砂粉塵曝露により増悪した気道炎症を抑制するメカニズムとして、IL-5、IL-13などのサイトカイン分泌を抑制することが関与していると考えられた。



図(1)-34 気管支肺胞洗浄液中サイトカイン濃度

3) 組織学的検討 (図(1)-35)

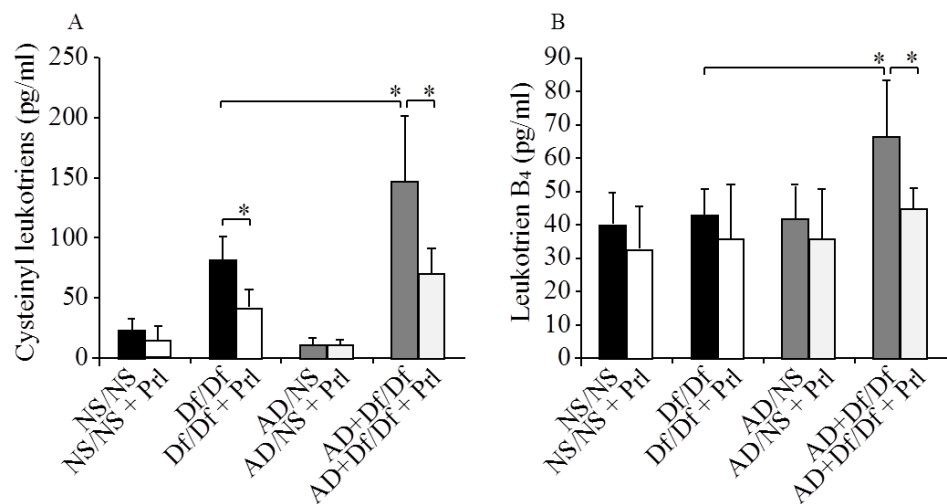
ロイコトリエン拮抗薬の投与効果をマウス肺組織検体の病理組織検体で評価検討した。Df/Df群では陰性コントロール群と比較して、気管支周囲や血管周囲に炎症細胞の浸潤を認め、黄砂粉塵の共感作をすることで、誘導される炎症細胞はさらに顕著となっていた (AD+Df/Df群)。AD+Df/Df群が示す黄砂粉塵の曝露により誘導された炎症細胞浸潤は、図(1)-2に示した気管支肺胞洗浄液中の細胞分画解析結果と同じようにロイコトリエン拮抗剤の投与により明らかに減少していた (AD+Df/Df+Prl群)。



図(1)-35 マウス肺組織像

4) 気管支肺胞洗浄液中のシステイニルロイコトリエン濃度とロイコトリエンB 4 濃度評価 (図(1)-36)

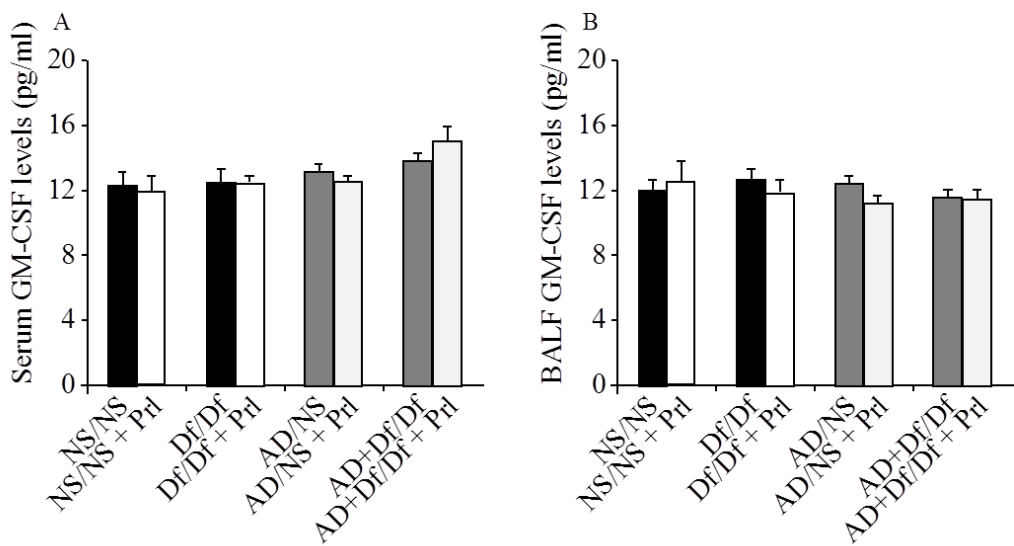
AD+Df/Df群とDf/Df群は、AD/NS群とNS/NS群と比較して、気管支肺胞洗浄液中のシステイニルロイコトリエン濃度は有意に高かった。さらに興味深いことに、AD+Df/Df群はDf/Df群よりも、より高いシステイニルロイコトリエン濃度を示していた。AD+Df/Df群とDf/Df群において高く誘導されていたシステイニルロイコトリエン濃度は、ロイコトリエン拮抗薬の投与により有意に減少していた。また、好中球の誘導に深く関与しているロイコトリエンB 4 濃度についても検討をおこなったところ、AD+Df/Df群はDf/Df群よりも高いロイコトリエンB 4 濃度を示し、ロイコトリエン拮抗薬の投与により有意に抑制されることが判明した。以上の結果から、ロイコトリエン拮抗薬の投与は、黄砂曝露により増悪された気道炎症をシステイニルロイコトリエンやロイコトリエンB 4 濃度を減少させることで抑制する可能性が示唆された。



図(1)-36 気管支肺胞洗浄液中のシステイニルロイコトリエン濃度とロイコトリエンB 4濃度

5) 血清中と気管支肺胞洗浄液中のGM-CSF濃度評価 (図(1)-37)

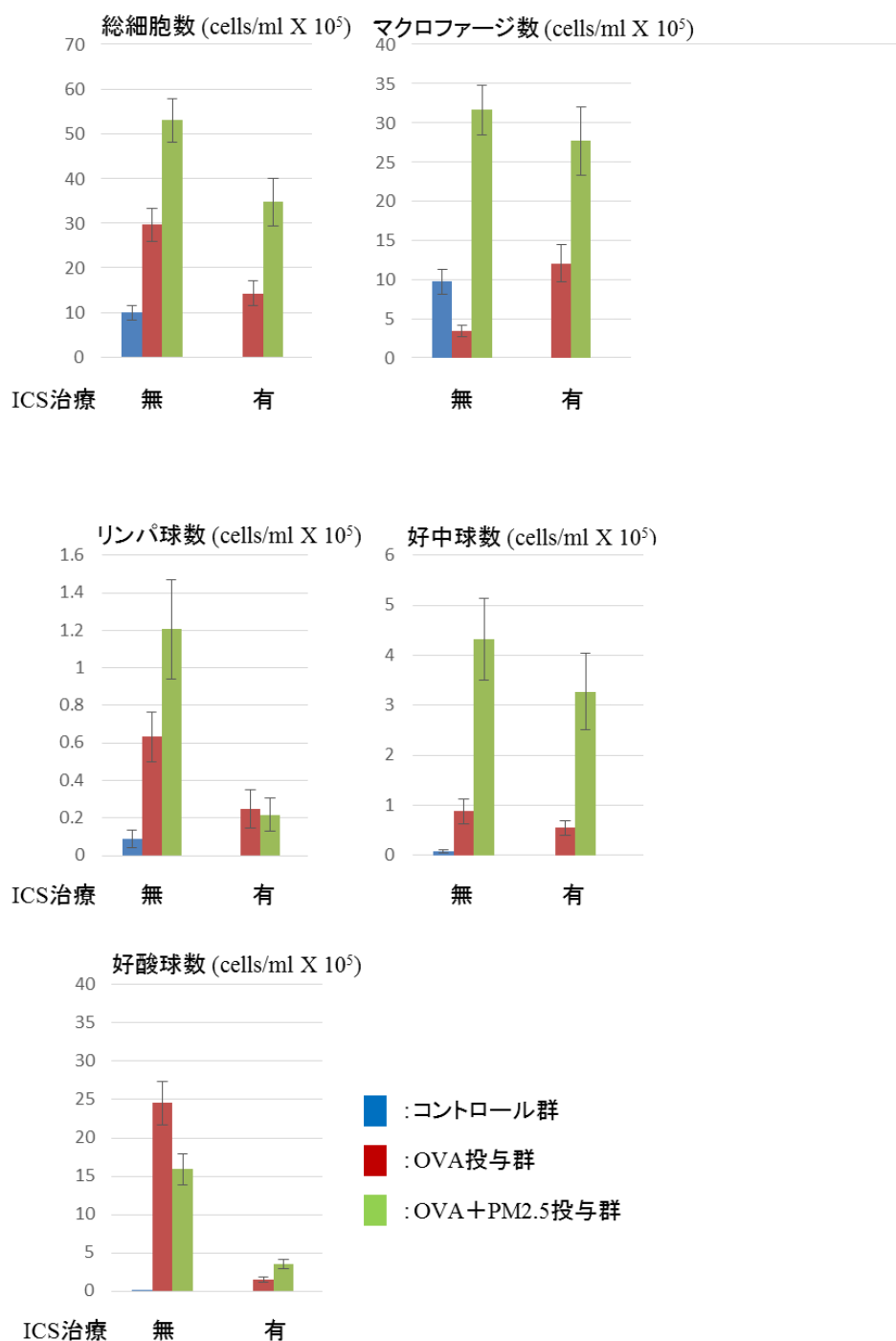
黄砂粉塵曝露により増加した気管支肺胞洗浄液中の好中球数とロイコトリエンB 4濃度が、ロイコトリエン拮抗薬の投与により減少したメカニズムについて、好酸球や好中球の強力な遊走因子であるGM-CSFが関与している可能性を考え、血清中と気管支肺胞洗浄液中のGM-CSF濃度を測定した。血清中、気管支肺胞洗浄液中のいずれにおいてもロイコトリエン拮抗薬の前処理によりGM-CSF濃度の有意な低下はなかった。



図(1)-37 血清中と気管支肺胞洗浄液中のGM-CSF濃度

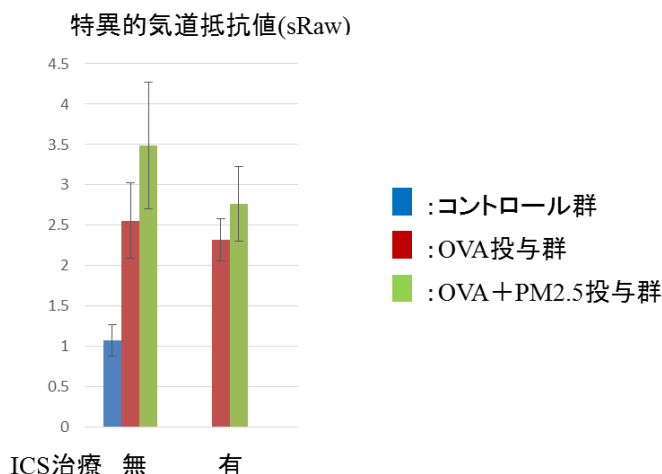
(6) コントロールされた喘息においてもPM2.5、黄砂曝露により喘息増悪がおこるメカニズムについて動物モデルによる検討

コントロール群と比較して、OVA投与群では気管支喘息の病態を反映し、気管支肺胞洗浄液中の総細胞数の増加を認め、特に好酸球数の増加を有意に認めた。OVAに加え、PM2.5を経鼻併用投与させたOVA+PM2.5投与群では、OVA単独投与群と比較して、総細胞数、マクロファージ数、リンパ球数、好中球数が増加していたが、特に好中球数の増加率が顕著であった(図(1)-38)。



図(1)-38 気管支肺胞洗浄液中細胞数

一方、喘息治療薬であるICSを投与することで、総細胞数、マクロファージ数、リンパ球数、好酸球数は有意に低下をしていたが、好中球数の減少は乏しかった。同様に、喘息増悪の指標となる気道抵抗値は、OVA投与群、OVA+PM2.5投与群の両群ともに増加し、ICS投与でも有意な改善は認められなかった（図(1)-39）。アレルゲンへの曝露による喘息増悪では、通常は好酸球性気道炎症増悪が主体である。今回の結果では、アレルゲン曝露時と異なり、PM2.5曝露に伴う気道炎症増悪は好中球性炎症が主体であった。疫学調査や他の基礎実験から、



図(1)-39マウス気道抵抗

ら、黄砂、PM2.5、SPMに含まれる組成物中のエンドトキシンが、呼吸器系の健康影響に関与する可能性を見出している。エンドトキシンは喘息の好酸球性気道炎症ではなく好中球性気道炎症を増悪させることが知られており、今回の喘息モデルマウスの実験は矛盾しない結果であった。また、これまでの疫学調査の結果では、治療によりコントロールされている喘息患者であっても、黄砂やPM2.5の曝露によって呼吸機能の低下と呼吸器症状が増悪し、時に喘息発作により救急受診が必要になることを確認している。好中球性気道炎症は現在の喘息治療薬ではほとんど制御ができない。治療により十分な喘息コントロールが達成されていれば、黄砂やPM2.5による喘息増悪を軽減できるが、好中球性気道炎症の増悪を阻止する新たな治療薬がなければ完全には黄砂やPM2.5による喘息増悪を阻止できないことが示唆された。

(7) PM2.5が誘導する炎症性サイトカインの臓器構成細胞間での差異

捕集したPM2.5で、ヒトから直接採取されたprimaryな気管支上皮細胞、単球、臍帯内皮細胞を24時間刺激培養し、それぞれの細胞が産生するタンパクについて1000種類を網羅的に解析した。心臓の冠動脈内皮細胞は予備実験の段階で、このアッセイでの評価が難しく、血管内皮細胞への影響として臍帯内皮細胞を用いた。測定した1000種類のターゲットタンパクは以下のものであった。11b-HSD1, 2B4, 4-1BB, 6CKine, A1BG, A2M, ABL1, ACE, ACE-2, ACK1, ACPP, ACTH, Activin A, Activin B, Activin C, Activin RIA / ALK-2, Activin RIB / ALK-4, Activin RII A/B, Activin RIIA, ADAM-9, ADAMTS-1, ADAMTS-10, ADAMTS-13, ADAMTS-15, ADAMTS-17, ADAMTS-18, ADAMTS-19, ADAMTS-4, ADAMTS-5, ADAMTS-L2, Adiponectin / Acrp30, Adipsin, Afamin, AFP, AgRP, ALBUMIN, ALCAM, Aldolase A, Aldolase B, Aldolase C, ALK, Alpha 1 AG, Alpha 1 Microglobulin, Alpha Lactalbumin, ALPP, AMICA, AMPKa1, Amylin, Angiogenin, Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, Angiopoietin-4, Angiopoietin-like 1, Angiopoietin-like 2, Angiopoietin-like Factor, Angiostatin, ANGPTL3, ANGPTL4, Annexin A7, APC, APCS, Apelin, Apex1, APJ, APN, ApoA1, ApoA2, ApoA4, ApoB, ApoB100, ApoC1, ApoC2, ApoC3, ApoD, ApoE, ApoE3, ApoH, ApoM, APP, APRIL, AR (Amphiregulin), Artemin, ASPH, Attractin, Ax1, B3GNT1, B7-1 / CD80, BACE-1, BAF57, BAFF, BAFF R / TNFRSF13C, BAI-1, bax, BCAM, BCMA / TNFRSF17, BD-1, BDNF, Beta 2M, Beta Defensin

4, Beta IG-H3, beta-Catenin, beta-NGF, Biglycan, BIK, BLAME, BLC / BCA-1 / CXCL13, BMP-15, BMP-2, BMP-3, BMP-3b / GDF-10, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMPR-IA / ALK-3, BMPR-IB / ALK-6, BMPR-II, BMX, BNIP2, BNP, BTC, Btk, C2, C3a, C5/C5a, C7, C8B, C9, CA125, CA15-3, CA19-9, CA9, Cadherin-13, Calbindin, Calbindin D, Calcitonin, Calreticulin, Calsyntenin-1, Cardiotrophin-1 / CT-1, CART, Caspase-3, Caspase-8, Cathepsin B, Cathepsin D, Cathepsin L, Cathepsin S, CBP, CCK, CCL14 / HCC-1 / HCC-3, CCL28 / VIC, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD 163, CD14, CD200, CD23, CD24, CD27 / TNFRSF7, CD30 / TNFRSF8, CD30 Ligand / TNFSF8, CD36, CD38, CD40 / TNFRSF5, CD40 Ligand / TNFSF5 / CD154, CD44, CD45, CD46, CD47, CD55, CD59, CD61, CD71, CD74, CD79 alpha, CD90, CD97, CEA, CEACAM-1, Cerberus 1, Ceruloplasmin, CFHR2, Chem R23, Chemerin, CHI3L1, Chordin-Like 1, Chordin-Like 2, Chromogranin A, Chymase, cIAP-2, Ck beta 8-1, CK-MB, Claudin-3, Claudin-4, CLC, CLEC3B, Clusterin, CNDP1, CNTF R alpha, CNTF, Coagulation Factor III / Tissue Factor, Coagulation Factor X/Xa, COCO, Complement factor H, Contactin-1, Contactin-2, Corticosteroid-binding globulin, COX-2, C-peptide, CPN2, Creatinine, CRIM 1, Cripto-1, CRP, CRTAM, CRTH-2, Cryptic, CSH1, Csk, CTACK / CCL27, CTGF / CCN2, CTLA-4 / CD152, cTnT / Troponin T, CutA, CV-2 / Crossveinless-2, CXCL14 / BRAK, CXCL16, CXCR1 / IL-8 RA, CXCR2 / IL-8 RB, CXCR3, CXCR4 (fusin), CXCR5 / BLR-1, CXCR6, Cyclin D1, Cystatin A, Cystatin B, Cystatin C, Cytochrome C, Cytokeratin 8, Cytokeratin18, Cytokeratin19, D6, DAN, DANCE, DBI, DCBLD2, DcR3 / TNFRSF6B, D-Dimer, Decorin, DEFA1/3, Defensin, Desmin, Dkk-1, Dkk-3, Dkk-4, DLL1, DLL4, DMP-1, DPPIV, DR3 / TNFRSF25, DR6 / TNFRSF21, Dtk, E-Cadherin, EDA-A2, EDAR, EDG-1, EGF, EGF R / ErbB1, EG-VEGF / PK1, EMAP-II, ENA-78, Endocan, Endoglin / CD105, Endorphin Beta, Endostatin, Endothelin, Endothelin Receptor A, Enolase 2, ENPP2, EN-RAGE, Eotaxin / CCL11, Eotaxin-2 / MPIF-2, Eotaxin-3 / CCL26, EpCAM, EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, EphB6, Epiregulin, ErbB2, ErbB3, ErbB4, ERRa, Erythropoietin R, Erythropoietin, ESAM, E-Selectin, EV15L, EXTL2, FABP1, FABP2, FABP3, FABP4, Factor XIII A, Factor XIII B, FADD, FAK, FAM3B, FAP, Fas / TNFRSF6, Fas Ligand, Fc RIIB/C, Fen 1, FER, Ferritin, Fetuin A, Fetuin B, FGF Basic, FGF R3, FGF R4, FGF R5, FGF-10 / KGF-2, FGF-11, FGF-12, FGF-13 1B, FGF-16, FGF-17, FGF-18, FGF-19, FGF-20, FGF-21, FGF-23, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7 / KGF, FGF-8, FGF-9, FGF-BP, FGFR1, FGFR1 alpha, FGFR2, Fibrinogen, Fibrinopeptide A, Fibronectin, Ficolin-3, FIH, FLRG, Flt-3 Ligand, Follistatin, Follistatin-like 1, FOLR1, FOXN3, FoxO1, FoxP3, Fractalkine, Frizzled-1, Frizzled-3, Frizzled-4, Frizzled-5, Frizzled-6, Frizzled-7, FRK, FSH, Furin, Fyn, GADD45A, Galanin, Galectin-1, Galectin-3, Galectin-3BP, Galectin-7, gamma-Thrombin, Gas1, GASP-1 / WFIKKNRP, GASP-2 / WFIKKN, Gastrin, GATA-3, GATA-4, GCP-2 / CXCL6, GCSF, G-CSF R / CD 114, GDF1, GDF11, GDF-15, GDF3, GDF5, GDF8, GDF9, GDNF, Gelsolin, GFR alpha-1, GFR alpha-2, GFR alpha-3, GFR alpha-4, Ghrelin, GITR / TNFRF18, GITR Ligand / TNFSF18, GLO-1, GLP-1, Glucagon, Glut1, Glut2, Glut3, Glut5, Glypican 3, Glypican 5, GM-CSF, GM-CSF R alpha, GMNN, GPBB, GPI, GPR-39, GPX1, GPX3, Granzyme A, Grb2, GREMLIN, GRO, GRO-a, Growth Hormone (GH), Growth Hormone R (GHR), GRP, GRP75, GRP78, GSR, GST, HADHA, HAI-1, HAI-2, Haptoglobin, HB-EGF, HCC-4 / CCL16,

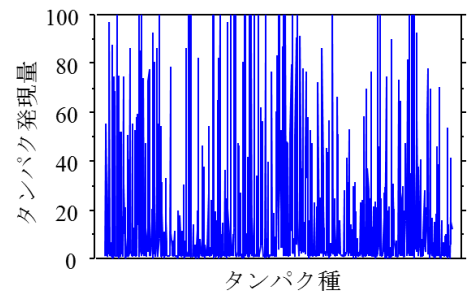
hCG alpha, hCGb, Hck, HCR / CRAM-A/B, HE4, Hemopexin, Hepassocin, Hepcidin, HGF, HGFR, HOXA10, HRG-alpha, HRG-beta 1, HSP10, HSP20, HSP27, HSP32, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSPA8, HTRA2, HVEM / TNFRSF14, I-309, IBSP, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 (CD50), ICAM-5, IFN-alpha / beta R1, IFN-alpha / beta R2, IFN-beta, IFN-gamma, IFN-gamma R1, IGF2BP1, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, IGFBP-6, IGFBP-rp1 / IGFBP-7, IGF-I, IGF-I SR, IGF-II, IGF-II R, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-1 F10 / IL-1HY2, IL-1 F5 / FIL1delta, IL-1 F6 / FIL1 epsilon, IL-1 F7 / FIL1 zeta, IL-1 F8 / FIL1 eta, IL-1 F9 / IL-1 H1, IL-1 R3 / IL-1 R AcP, IL-1 R4 /ST2, IL-1 R6 / IL-1 Rrp2, IL-1 R8, IL-1 R9, IL-1 ra, IL-1 sRI, IL-1 sRII, IL-10, IL-10 R alpha, IL-10 R beta, IL-11, IL-12 p40, IL-12 p70, IL-12 R beta 1, IL-12 R beta 2, IL-13, IL-13 R alpha 1, IL-13 R alpha 2, IL-15, IL-15 R alpha, IL-16, IL-17, IL-17B, IL-17B R, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F, IL-17R, IL-17RC, IL-17RD, IL-18 BPa, IL-18 R alpha /IL-1 R5, IL-18 R beta /AcPL, IL-19, IL-2, IL-2 R alpha, IL-2 R beta /CD122, IL-2 R gamma, IL-20, IL-20 R alpha, IL-20 R beta, IL-21, IL-21 R, IL-22, IL-22 BP, IL-22 R, IL-23, IL-23 R, IL-23p19, IL-24, IL-26, IL-27, IL-28A, IL-29, IL-3, IL-3 R alpha, IL-31, IL-31 RA, IL-33, IL-34, IL36RN, IL-4, IL-4 R, IL-5, IL-5 R alpha, IL-6, IL-6 R, IL-7, IL-7 R alpha, IL-8, IL-9 , INSL3, INSRR, Insulin, Insulin R, Insulysin / IDE, Integrin alpha V, IP-10, I-TAC / CXCL11, Itk, ITM2B, Kallikrein 10, Kallikrein 11, Kallikrein 14, Kallikrein 2, Kallikrein 5, Kallikrein 6, Kallikrein 7, Kallikrein 8, KCC3, KCTD10, KIF3B, Kininostatin / kininogen, KLF4, Kremen-1, Kremen-2, LAG-3, Latent TGF-beta bpl, Layilin, LBP, Lck, LDL R, LECT2, Lefty - A, Legumain, Leptin (OB), Leptin R, LFA-1 alpha, LH, LIF R alpha, LIF, LIGHT / TNFSF14, LIMPII, LIN41, Lipocalin-1, Livin, LOX-1, LPS, LRG1, LRP-1, LRP-6, L-Selectin (CD62L), LTF, LTK, Luciferase, Lumican, Lymphotactin / XCL1, Lymphotoxin beta / TNFSF3, Lymphotoxin beta R / TNFRSF3, Lyn, LYRIC, LYVE-1, LZTS1, MAC-1, Mammaglobin A, Marapsin, MATK, MBL, MBL-2, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 / CCL13, M-CSF, M-CSF R, MDC, Mer, Mesothelin, MFG-E8, MFRP, MICB, Midkine, MIF, MIG, MINA, MIP 2, MIP-1a, MIP-1b, MIP-1d, MIP-3 alpha, MIP-3 beta, MMP-1, MMP-10, MMP-11 /Stromelysin-3, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16 / MT3-MMP, MMP-19, MMP-2, MMP-20, MMP-24 / MT5-MMP, MMP-25 / MT6-MMP, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MSHa, MSP alpha Chain, MSP beta-chain, MTUS1, Musk, Myoglobin, NAIP, Nanog, NAP-2, NCAM-1 / CD56, NELL2, NEP, Nesfatin, Nestin, NET1, Netrin G2, Netrin-4, Neuritin, NeuroD1, Neurokinin-A, Neuropeptide Y, Neuropilin-2, Neurturin, NF1, NGF R, NM23-H1/H2, Notch-1, NOV / CCN3, NPTX1, NPTXR, NR3C3, NRG1 Isoform GGF2, NRG1-alpha / HRG1-alpha, NRG1-beta1 / HRG1-beta1, NRG2, NRG3, NT-3, NT-4, Ntn1, OCT3/4, Omentin, Orexin A, Orexin B, OSM, Osteoactivin / GPNMB, Osteocalcin, Osteocrin, Osteopontin, Osteoprotegerin / TNFRSF11B, OX40, OX40 Ligand / TNFSF4, p21, p27, p53, PAI-1, PAK7, Pancreastatin, Pancreatic Polypeptide, Pappalysin-1, PARC / CCL18, PARK7, P-Cadherin, PCAF, PD-1, PD-ECGF, PDGF R alpha, PDGF R beta, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-C, PDGF-D, PDX-1, PECAM-1 /CD31, PEDF , Pentraxin3 / TSG-14, PEPSINOGEN I, PEPSINOGEN II, Peroxiredoxin 6 (Prdx6), Persephin, PF4 / CXCL4, PGRP-S, PI 16, PI 3Kinase p85 beta, PIM2, PKM2, Plasminogen, PlGF, PLUNC, Podocalyxin, POMC, PON1, PON2, PPARg2, PPP2R5C, Pref-1, Presenilin 1, Presenilin 2, Pro-BDNF, Procalcitonin, Pro-Cathepsin B, Progesterone, pro-Glucagon,

Progranulin, Prohibitin, Prolactin, Pro-MMP-13, Pro-MMP-7, Pro-MMP-9, ProSAAS, Prostatin, Protein p65, PSA-Free, PSA-total, P-selectin, PSP, PTH, PTHLP, PTN, PTPRD, PYK2, PYY, RAGE, RANK / TNFRSF11A, RANTES, Ras, RBP4, RECK, RELM alpha, RELM beta, RELT / TNFRSF19L, Resistin, RET, RIP1, ROBO4, ROCK1, ROCK2, ROR1, ROR2, ROS, RYK, S100 A8/A9, S100A10, S100A4, S100A6, S100A8, S-100b, SAA, SART1, SART3, SCF, SCF R / CD117, SCG3, SDF-1 / CXCL12, Selenoprotein P, SEMA3A, Serotonin, Serpin 1, Serpin A1, Serpin A12, Serpin A3, Serpin A4, Serpin A5, Serpin A8, Serpin A9, Serpin B5, Serpin D1, Serpin I1, SERTAD2, sFRP-1, sFRP-3, sFRP-4, sgpl30, SHBG, SIGIRR, Siglec-5/CD170, Siglec-9, SLPI, SMAC, Smad 1, Smad 4, Smad 5, Smad 7, Smad 8, SNCG, Soggy-1, Somatotropin, Sonic Hedgehog (Shh N-terminal), SOST, SOX17, SOX2, SPARC, SPARCL1, Spinesin, SPINK1, SRMS, SSEA-1, SSEA-4, SSTR2, SSTR5, Survivin, SYK, Syndecan-1, Syndecan-3, TACE, TACI / TNFRSF13B, TAF4, Tarc, TCCR / WSX-1, Tec, TECK / CCL25, TFF1, TFF3, TFPI, TGF-alpha, TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3, TGF-beta 5, TGF-beta RI / ALK-5, TGF-beta RII, TGF-beta RIII, Thrombin, Thrombomodulin, Thrombopoietin (TPO), Thrombospondin-1, Thrombospondin-2, Thrombospondin-4, Thymidine Kinase-1, Thymopoietin, Thyroglobulin, Thyroid Peroxidase (TPX), Tie-1, Tie-2, TIM-1, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4, TL1A / TNFSF15, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TMEFF1 / Tomoregulin-1, TMEFF2, TNF RI / TNFRSF1A, TNF RII / TNFRSF1B, TNF-alpha, TNF-beta, TNK1, TOPORS, TPA, TPM1, TRA-1-60, TRA-1-81, TRADD, TRAIL R1 / DR4 / TNFRSF10A, TRAIL R2 / DR5 / TNFRSF10B, TRAIL R3 / TNFRSF10C, TRAIL R4 / TNFRSF10D, TRAIL / TNFSF10, TRANCE, Transferrin, Trappin-2, TREM-1, TRKB, Troponin C, Troponin I, TROY / TNFRSF19, TRPC1, TRPC6, TRPM7, Trypsin 1, TSG-6, TSH, TSLP, TSLP, TWEAK / TNFSF12, TWEAK R / TNFRSF12, TXK, Tyk2, TYR010, Ubiquitin+1, uPA, uPAR, Uromodulin, Vasopressin, Vasorin, VCAM-1 (CD106), VDUP-1, VE-Cadherin, VEGF, VEGF R1, VEGF R2 (KDR), VEGF R3, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGI / TNFSF15, VGF, VIP Receptor 2, Visfatin, Vitamin D Receptor, Vitamin D-BP, Vitamin K-dependent protein S, Vitronectin, VWF, WIF-1, Wilms Tumor 1, WISP-1 / CCN4, XEDAR, XIAP, ZAG, ZAP70。

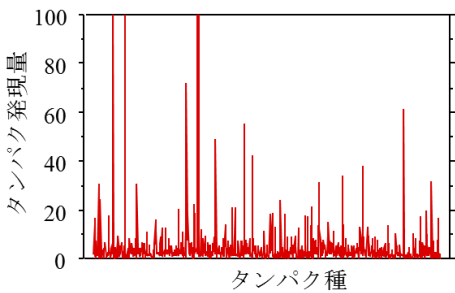
図(1)-40、41、42に各細胞がPM2.5の刺激に反応して産生したタンパクの分布を示す。横軸は1000種類のタンパク種、縦軸は発現量を示している。同一のPM2.5に対し気道上皮細胞、単球、血管内皮細胞が産生するタンパクはそれぞれで異なっており、同一のPM2.5であっても各臓器で影響が異なる可能性が示唆された。

表(1)-14、15、16に、気道上皮細胞、単球、血管内皮細胞でそれぞれ発現が多かったタンパク100種を示す。タンパク発現量は、negative controlに対する比で表してある。図(1)-40、41、42の結果と同様に、同一のPM2.5に曝露されても発現するタンパクが細胞種間で極めて異なっていることが示唆される。また、炎症性サイトカインだけではなく、血液凝固に関わるタンパクなど多様なタンパクがPM2.5に反応して分泌されていることが分かる。コストおよび実験に要する時間のために、今回は、一種類のPM2.5でしか実験を行えていないが、当然のことながら組成の違いによって結果が変わることが予測される。実験技術の進歩により、こうした網羅的な解析が可能になってきているが、PM2.5や黄砂について、今回のような報告は我々が調べた限りでは確認できない。今後黄砂やPM2.5の毒性を評価する場合に、気道上皮細胞、単球、血管内皮細胞をターゲットにして、どのような物質を測定するのが有用であるか参考になるデータと思われる。

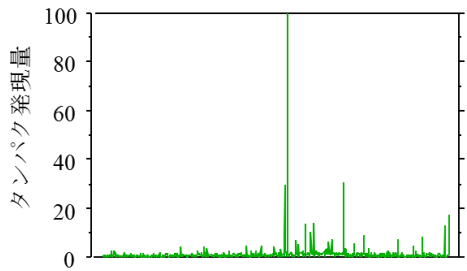
PM2.5の影響が臓器間で異なる原因の一つとして、臓器構成細胞で同一のPM2.5であっても反応が異なる可能性が示唆される。また、同一の炎症性物質であっても疾患毎に重要度が異なることは広く知られている。PM2.5の組成が異なることによって、傷害を受けやすい臓器も異なってくる可能性も考えられた。PM2.5が循環器疾患、脳血管疾患のリスクと



図(1)-40 PM2.5の刺激によるhuman primary bronchial epithelial cellのタンパク産生



図(1)-41 PM2.5の刺激によるhuman primary monocyteのタンパク産生



図(1)-42 PM2.5の刺激によるhuman umbilical vein endothelial cellのタンパク産生

なる機序として、PM2.5を構成する非常に微小な粒子（ナノパーティクル）が直接血中に移行し、血管内皮細胞を傷害し、炎症性物質を分泌する機序が想定されている。今回の結果からは、異なる視点も考えられた。一例として、GDF15が挙げられる。GDF-15は、近年、循環器疾患で重要な役割を果たすことが報告されるようになってきている。一方で、GDF-15の呼吸器疾患への関与についてはほとんど報告がない。今回の結果でも、血管内皮細胞からの分泌が確認されたが、同様に気道上皮細胞からも分泌は多かった。黄砂やPM2.5の曝露により気道上皮細胞から産生されたGDF-15が血中に移行し、循環器疾患に影響する可能性も挙げられる。同様な機序、すなわち異なる部位で惹起された炎症により、血中に炎症性物質が移行し全身性あるいは他臓器に影響することは、アレルギー性鼻炎と喘息、あるいはリウマチや急性呼吸窮迫症候群などで言われている。PM2.5の健康影響評価において、曝露を受けた臓器での反応が他臓器に影響することなど、全身性に検討をして行く必要があるように思われた。

表(1)-14 気道上皮細胞で発現が多いタンパク

No	タンパク種	気道上皮
1	Activin RII A/B	1342.2
2	NT-3	1325.3
3	Serpin D1	658.2
4	MBL	500.5
5	HAI-2	437.2

6	IL-22 BP	352.5
7	SOX2	285.3
8	Podocalyxin	279.6
9	SART3	271.8
10	CD47	213.7
11	Galectin-3	171.6
12	IL-28A	163.0
13	PDGF-AB	149.3
14	NET1	148.7
15	Cytochrome C	143.2
16	BTC	131.3
17	CD30 / TNFRSF8	127.6
18	AR (Amphiregulin)	119.2
19	AgRP	118.4
20	BCMA / TNFRSF17	114.6
21	A2M	114.0
22	GRP78	113.5
23	RIP1	111.3
24	PARC / CCL18	108.2
25	RELM alpha	104.2
26	CCK	102.9
27	Cardiotrophin-1 / CT-1	102.4
28	TPA	101.0
29	PTH	100.0
30	Pancreatic Polypeptide	97.1
31	ADAMTS-1	96.7
32	C8B	92.8
33	PF4 / CXCL4	92.6
34	TOPORS	91.6
35	CLC	91.0
36	CCR7	90.8
37	MAC-1	90.1
38	Adipsin	87.4
39	Angiostatin	87.2
40	gamma-Thrombin	86.5
41	Biglycan	86.4
42	FGF R5	86.3

43	GPI	86.3
44	CD38	85.4
45	SEMA3A	84.1
46	Activin C	83.3
47	Nesfatin	82.4
48	IL-33	82.3
49	NOV / CCN3	81.6
50	PYY	80.7
51	Contactin-1	80.6
52	BMP-15	79.7
53	EphB4	78.6
54	CRTN-2	78.2
55	EphB6	78.1
56	Prdx6	78.1
57	Claudin-4	77.6
58	IL-17B R	76.8
59	CXCR2 / IL-8 RB	76.7
60	TFF1	76.7
61	Amylin	75.0
62	LECT2	74.6
63	IL-36RN	74.5
64	ApoB	74.4
65	CD90	74.0
66	MMP-2	73.2
67	Claudin-3	72.7
68	ErbB4	72.3
69	CSH1	71.3
70	TLR4	70.4
71	IL-10 R alpha	69.7
72	TECK / CCL25	69.5
73	Aldolase B	68.6
74	Sonic Hedgehog (Shh N-terminal)	68.6
75	CLEC3B	68.5
76	GFR alpha-2	66.0
77	NELL2	65.3
78	MMP-11 /Stromelysin-3	64.8
79	CD44	64.8

80	Adiponectin / Acrp30	63.7
81	FGF R3	61.8
82	SYK	61.7
83	Soggy-1	60.9
84	Activin A	60.4
85	Cathepsin S	59.5
86	Smad 8	59.2
87	CXCR3	59.0
88	Artemin	58.5
89	IL-6 R	58.2
90	Ck beta 8-1	58.1
91	Cathepsin B	57.8
92	CXCR6	57.6
93	Follistatin-like 1	56.8
94	SCG3	56.8
95	TACE	56.4
96	PLUNC	56.2
97	Cystatin A	55.3
98	CA 9	55.3
99	ACE	55.1
100	Axl	54.9

表(1)-15 単球で発現が多いタンパク

No	タンパク種	単球
1	ApoE	225.08
2	LPS	214.01
3	Caspase-3	138.54
4	IGF2BP1	71.93
5	PDGF-C	61.30
6	SERTAD2	55.38
7	PAK7	49.01
8	TFF3	41.97
9	IL-17RD	38.17
10	IGF-I	33.73
11	TRAIL / TNFSF10	31.81
12	Frizzled-4	31.42
13	Claudin-3	30.90

14	ADAMTS-L2	30.60
15	ADAMTS-18	24.64
16	BMPR-IB / ALK-6	24.19
17	KIF3B	22.21
18	FGF-6	21.12
19	ROCK2	20.87
20	PYK2	20.79
21	GST	20.32
22	TIMP-2	19.75
23	APRIL	18.99
24	pro-Glucagon	18.67
25	CCR9	18.39
26	Angiopoietin-1	18.03
27	Eotaxin-2 / MPIF-2	17.84
28	IL-34	17.61
29	Annexin A7	17.54
30	FADD	17.40
31	TGF-beta 2	17.12
32	4-1BB	16.90
33	VEGF-B	16.75
34	EphA1	16.31
35	KLF4	16.16
36	IGFBP-5	15.70
37	Glut2	14.96
38	2B4	14.63
39	IGF-II	14.02
40	PPP2R5C	13.85
41	FGF R4	13.75
42	MMP-7	13.75
43	Follistatin-like 1	13.70
44	IL-17C	13.08
45	IL-24	13.03
46	BDNF	13.00
47	FABP1	12.66
48	Dkk-3	12.56
49	FGFR2	12.47
50	IL-23	12.40

51	LZTS1	12.05
52	HSPA8	11.98
53	Frizzled-5	11.91
54	HB-EGF	11.57
55	PDGF-BB	11.53
56	XIAP	11.35
57	HOXA10	11.09
58	Cystatin A	11.04
59	EphA3	10.70
60	Nidgen-1	10.48
61	Frizzled-1	10.37
62	SIGIRR	10.32
63	Frizzled-3	10.03
64	TIMP-4	10.02
65	ROCK1	9.90
66	Glucagon	9.79
67	Follistatin	9.54
68	Ras	9.50
69	Beta IG-H3	9.45
70	IL-28A	9.33
71	CCR7	9.25
72	CXCR2 / IL-8 RB	9.20
73	MTUS1	9.12
74	CRTH-2	9.08
75	IL-18 R alpha /IL-1 R5	8.89
76	Erythropoietin R	8.86
77	CD 163	8.84
78	Angiopoietin-2	8.82
79	Lefty - A	8.75
80	Osteopontin	8.70
81	APJ	8.68
82	CHI3L1	8.52
83	IL-23p19	8.47
84	TIM-1	8.47
85	Angiopoietin-like 1	8.46
86	CD45	8.44
87	FGF-9	8.39

88	INSL3	8.36
89	SSTR2	8.34
90	IL-17D	8.29
91	Kininostatin / kininogen	8.27
92	IL-1 F10 / IL-1HY2	8.24
93	Plasminogen	8.24
94	Smad 5	8.17
95	FOXP3	8.17
96	Mesothelin	8.15
97	VEGF	8.01
98	Frizzled-6	7.97
99	Lipocalin-2	7.89
100	FGF-17	7.86

表(1)-16 血管内皮細胞で発現が多いタンパク

No	タンパク種	血管内皮細胞
1	BMP-6	1459.41
2	GLO-1	30.55
3	beta-NGF	29.79
4	WIF-1	17.44
5	EN-RAGE	14.23
6	CXCR6	13.45
7	Ubiquitin+1	13.08
8	Bax	10.34
9	EGF R / ErbB1	10.19
10	IL-10 R alpha	8.96
11	sgp130	8.13
12	G-CSF R / CD 114	7.48
13	MMP-10	7.13
14	CD40 / TNFRSF5	6.68
15	Frizzled-5	6.47
16	IL-1 F6 / FIL1 epsilon	5.94
17	CLC	5.09
18	PECAM-1 /CD31	4.71
19	S100A6	4.68
20	Tyk2	4.58
21	Galectin-1	4.11

22	Layilin	4.07
23	Activin A	3.92
24	IL-17B	3.79
25	LPS	3.70
26	HGFR	3.52
27	Follistatin-like 1	3.47
28	FGF-23	3.11
29	ICAM-2	3.07
30	APJ	2.87
31	CV-2 / Crossveinless-2	2.84
32	Integrin alpha V	2.71
33	ErbB4	2.68
34	Serpin A8	2.59
35	ALBUMIN	2.59
36	SOX17	2.56
37	LRP-6	2.52
38	Frizzled-4	2.51
39	FGF-17	2.47
40	Frizzled-7	2.46
41	CD30 / TNFRSF8	2.42
42	Progranulin	2.42
43	Alpha 1 Microglobulin	2.42
44	BLC / BCA-1 / CXCL13	2.40
45	PEPSINOGEN II	2.38
46	Growth Hormone R (GHR)	2.32
47	FGF Basic	2.31
48	IL-6	2.28
49	EGF	2.25
50	MCP-1	2.22
51	MMP-25 / MT6-MMP	2.20
52	Angiopoietin-2	2.20
53	FGF-18	2.15
54	Glypican 3	2.13
55	IL-17RD	2.12
56	GDF1	2.12
57	MMP-1	2.12
58	GFR alpha-4	2.11

59	TGF-beta 1	2.08
60	IL-10	2.07
61	Endocan	2.07
62	Erythropoietin	2.06
63	FGF-20	2.05
64	Chordin-Like 2	2.04
65	MIF	2.04
66	APP	2.03
67	GDF8	2.02
68	Legumain	2.02
69	PYK2	2.02
70	BIK	2.00
71	Frizzled-1	2.00
72	EMAP-II	2.00
73	Endothelin	1.98
74	D-Dimer	1.97
75	Siglec-9	1.94
76	Cryptic	1.93
77	E-Selectin	1.93
78	CRTN-2	1.93
79	Dkk-3	1.91
80	CCL28 / VIC	1.90
81	IL-2	1.90
82	GASP-1 / WFIKKNRP	1.89
83	Kallikrein 11	1.86
84	IL-20 R alpha	1.84
85	Angiopoietin-like Factor	1.84
86	OX40	1.83
87	Activin RIA / ALK-2	1.83
88	IL-15	1.82
89	Flt-3 Ligand	1.82
90	IFN-gamma	1.82
91	Pro-MMP-9	1.82
92	FGF-13 1B	1.82
93	IL-8	1.81
94	PAI-1	1.81
95	FGF-16	1.80

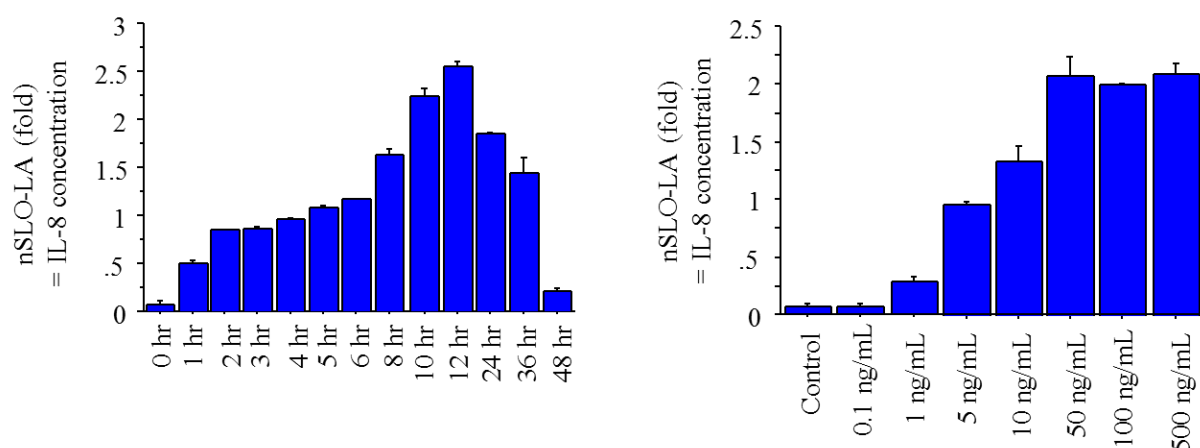
96	Fibronectin	1.79
97	MIG	1.79
98	CXCR1 / IL-8 RA	1.79
99	GM-CSF	1.79
100	IL-21	1.78

(8) THPE8細胞による黄砂、PM2.5の炎症誘導能に基づく毒性評価

これまで黄砂、PM2.5を、IL-8とglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)のプロモーター領域にそれぞれオレンジルシフェラーゼとレッドルシフェラーゼを挿入しTHP-1細胞にベクター導入し確立された細胞であるTHPG8細胞を用いて行ってきた。ルシフェリンを基質とし色分離測定により、IL-8とGAPDHのレポーター酵素活性を測定することが可能であり¹⁰⁾、安価に、短時間で黄砂、PM2.5のIL-8産生を評価ができる。THPG8細胞は細胞劣化が早く、継代培養回数が多くなると過小評価につながる可能性がある。人工染色体を用いて同様の機序を持つTHPE8細胞の有用性を評価した。

THPE8細胞をエンドトキシンで刺激培養し、IL-8の測定が可能か評価した(図(1)-43)。THPE8細胞をエンドトキシンで刺激培養すると濃度依存性にIL-8の発現は増強した。発現のピークは12時間であった。ELISAによる測定では、刺激培養時間は多くが24時間～36時間である。THPE8細胞では、刺激時間を短くすることができ、また、条件を揃えれば6時間での評価も可能であり、黄砂、PM2.5の毒性を簡便に評価するうえで有用な細胞と考えられた。

一方で、THPG8細胞、THPE8細胞はいずれも転写活性でIL-8産生を評価しており、遺伝子増幅、タンパク発現を迅速に評価できるものではない。この点を考慮して、本課題での黄砂、SPM、PM2.5の炎症性サイトカインの産生については最終的にすべてをELISAで行った。



図(1)-43 THP-E8 細胞によるIL-8評価

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

欧米を中心にPM2.5の健康影響について非常に多くの知見が集積されている。一方で、本邦でPM2.5の健康リスクについて疫学調査は極めて少ない。本研究は、黄砂、PM2.5の小学校児童の呼吸機能、呼吸器症状、皮膚症状に対する短期曝露影響を検討した数少ない研究である。これまでも同様に小学校児童を対象に疫学調査を行ってきており、本研究の成果と併せ、黄砂、PM2.5への短期曝露は小学校児童の呼吸機能と呼吸器症状を増悪させるが、増悪が確認できる場合と確認できない場合があることを示した。このような乖離の原因として、黄砂、PM2.5のヒトへの健康影響は組成により異なる可能性があることを見出し、黄砂、PM2.5の呼吸器システムへの影響は、黄砂、PM2.5の炎症性物質の産生が多い場合に強くなることが考えられた。黄砂、PM2.5の炎症性物質産生を高める原因物質としてエンドトキシンが重要と考えられることも示した。また、黄砂への感受性が患者毎に異なっていることも明らかにした。

黄砂の健康影響について、その多くが短期曝露影響であり、疾患の発症への影響について検討は少ない。黄砂への慢性曝露により喘息発症リスクがあることを、動物実験ではあるが、明らかにした。

黄砂、PM2.5が健康に影響する機序として、遺伝子損傷、酸化ストレス亢進、炎症増強が報告されている。今後も、黄砂、PM2.5が健康に影響を及ぼすメカニズムを解明していく必要があるが、黄砂、PM2.5が炎症増強する場合にどのような物質を産生しているのか、異なる細胞で、1,000種類の検討を行った。この結果を活用することで、ターゲットとする物質の選定が容易になる。

大陸からの越境大気汚染が本邦のPM2.5の組成に影響し、PM2.5の炎症誘導能を増強させる可能性を示した。

（２）環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

本邦でPM2.5の健康リスクに関する疫学調査は少なく、本邦でのPM2.5への曝露が本当に健康リスクとなるのか不明な点は多い。本研究の成果で、本邦のPM2.5への短期曝露による小学校児童の呼吸器システムへの健康リスクについて新たなエビデンスの提供が可能となった。同様に、黄砂への短期曝露による小学校児童の呼吸器システムへの健康リスクについてもエビデンスの提供が可能である。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

（１）誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) M. Watanabe, J. Kurai, H. Noma, T. Watanabe, S. Minato, H. Sano, F. Okada, A. Yamasaki,

- E. Shimizu: *Annals of Public Health and Research*, (2, 1), 1015 (2015)
Exposure to metals bound to particles and pulmonary function of school children in Western Japan.
- 2) M. Watanabe, H. Noma, J. Kurai, H. Sano, R. Saito, S. Abe, Y. Kimura, S. Aiba, M. Oshimura, A. Yamasaki, E. Shimizu: *Biomed Res Int*, (2015), 583293 (2015)
Decreased pulmonary function in school children in western Japan after exposures to Asian desert dusts and its association with interleukin-8.
 - 3) M. Watanabe, J. Kurai, H. Sano, A. Yamasaki, E. Shimizu: *Int J Environ Res Public Health*, (12, 7), 7725-7737 (2015)
Difference in pro-Inflammatory cytokine responses induced in THP1 cells by particulate matter collected on days with and without Asian dust storms.
 - 4) M. Watanabe, J. Kurai, S. Minato, H. Noma, H. Sano, R. Saito, S. Aiba, M. Oshimura, K. Hatakeyama, A. Yamasaki, E. Shimizu: *J Med Invest*, (62, 3-4), 145-148 (2015)
Difference in interleukin-8 transcriptional activity induced in THP-G8 cells by particulate matter collected in winter and summer in western Japan.
 - 5) M. Watanabe, J. Kurai, H. Sano, E. Shimizu: *J Med Invest*, (62, 3-4), 233-237 (2015)
Effect of exposure to an Asian dust storm on fractional exhaled nitric oxide in adult asthma patients in Western Japan.
 - 6) M. Watanabe, H. Noma, J. Kurai, A. Shimizu, H. Sano, K. Kato, M. Mikami, Y. Ueda, T. Tatsukawa, H. Ohga, A. Yamasaki, T. Igishi, H. Kitano, E. Shimizu: *Int J Environ Res Public Health*, (12, 10), 13038-13052 (2015)
Association of sand dust particles with pulmonary function and respiratory symptoms in adult patients with asthma in western Japan using light detection and ranging: A panel study.
 - 7) M. Watanabe, H. Noma, J. Kurai, A. Shimizu, H. Sano, H. Kitano, R. Saito, Y. Kimura, S. Aiba, M. Oshimura, E. Shimizu: *Int J Environ Res Public Health*, (12, 11), 14229-14243 (2015)
Variation in the effect of particulate matter on pulmonary function in schoolchildren in Western Japan and its relation with interleukin-8.
 - 8) M. Watanabe, H. Noma, J. Kurai, H. Sano, M. Mikami, H. Yamamoto, Y. Ueda, H. Touge, Y. Fujii, T. Ikeda, H. Tokuyasu, T. Konishi, A. Yamasaki, E. Shimizu: *Allergol Int*, (65, 2), 147-152 (2016)
Effect of Asian dust on pulmonary function in adult asthma patients in Western Japan: A panel study.
 - 9) M. Watanabe, H. Noma, J. Kurai, K. Kato, H. Sano, T. Tatsukawa, H. Nakazaki, A. Yamasaki, E. Shimizu: *Allergol Int*, (65, 1), 56-61 (2016)
Association between pulmonary function and daily levels of sand dust particles assessed by light detection and ranging in schoolchildren in western Japan: A panel study.
 - 10) M. Watanabe, H. Noma, J. Kurai, H. Sano, Y. Ueda, M. Mikami, H. Yamamoto, H. Tokuyasu,

K. Kato, T. Konishi, T. Tatsukawa, E. Shimizu, H. Kitano H: Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, (11), 183-190 (2016)

Differences in the effects of Asian dust on pulmonary function between adult patients with asthma and those with asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome.

- 11) M. Watanabe, H. Noma, J. Kurai, D. Hantan, N. Burioka, S. Nakamoto, H. Sano, J. Taniguchi, E. Shimizu: Int J Environ Res Public Health, (13, 5), E452 (2016)

Association between outdoor fungal concentrations during winter and pulmonary function in children with and without asthma.

- 12) J. Kurai, M. Watanabe, H. Sano, D. Hantan, E. Shimizu: Int J Environ Res Public Health, (13, 6), E579 (2016)

The effect of seasonal variations in airborne particulate matter on asthma-related airway inflammation in mice.

- 13) J. Kurai, M. Watanabe, H. Sano, D. Hantan, Y. Tohda, E. Shimizu: Int J Environ Res Public Health, (13, 11), E1144 (2016)

Effects of Asian dust particles on the early-stage antigen-induced immune response of asthma in NC/Nga Mice.

- 14) M. Watanabe, H. Noma, J. Kurai, H. Sano, D. Hantan, M. Ueki, H. Kitano, E. Shimizu: Int J Environ Res Public Health, (13, 10), E983 (2016)

Effects of short-term exposure to particulate air pollutants on the inflammatory response and respiratory symptoms: A panel study in schoolchildren from rural areas of Japan.

- 15) M. Watanabe, H. Noma, J. Kurai, H. Sano, D. Hantan, M. Ueki, H. Kitano, E. Shimizu: Allergol Int, (66, 1), 52-58 (2017)

A panel study of airborne particulate matter composition versus concentration: potential for inflammatory response and impaired pulmonary function in children.

- 16) M. Watanabe, H. Noma, J. Kurai, H. Sano, K. Iwata, D. Hantan, Y. Tohda, E. Shimizu: Int J Environ Res Public Health, (14, 3), 299 (2017)

Association of short-term exposure to ambient fine particulate matter with skin symptoms in schoolchildren: A panel study in a rural area of western Japan.

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 渡部仁成、第55回日本呼吸器学会学術講演会、学術講演会（学術部会賞）選考講演会、大気中

土壌性ダスト、大気汚染物質が小学校児童の呼吸機能に与える影響、2015年4月17日、東京

- 2) Hisashi Noma, The 48th Society for Epidemiologic Research Annual Meeting, Desert dust exposure and risk of acute myocardial infarction in Western Japan: a case-crossover study, June 16, 2015.
- 3) 渡部仁成、フォーラム2015 衛生薬学・環境トキシコロジー、浮遊粒子状物質の呼吸器システムへの影響、2015年9月17日

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 鳥取県医師会公開講座「PM2.5の健康への影響とその対応」（主催：鳥取県医師会、2014年4月17日、鳥取市、観客約200名）にて講演
- 2) 就將公民館健康講座「PM2.5の健康への影響とその対応」（主催：米子市、2014年4月23日、米子市、観客約100名）にて講演
- 3) 看護の日とりだい病院市民公開健康ミニ講座「鳥取県のPM2.5ってどのくらい危ないの？」（主催：鳥取大学、2014年5月12日、米子市、観客約20名）にて講演
- 4) 鳥取大学サイエンスアカデミー「黄砂、PM2.5の影響評価を経た知財創出」（主催：鳥取大学、2014年8月23日、鳥取市、観客約80名）にて講演
- 5) 平成26年度鳥取県小児科医会「黄砂、PM2.5、大気汚染物質の小学校児童への影響」（主催：鳥取県小児科医会、2014年9月15日、倉吉市、観客約20名）にて講演
- 6) 平成26年度鳥取県学校薬剤師会「山陰での調査に基づくPM2.5の児童への影響」（主催：鳥取県学校薬剤師会、2014年11月9日、倉吉市、観客約100名）にて講演
- 7) 米子市民公開講座「黄砂、PM2.5などの環境因子と健康影響、発がんについて鳥取大学発の最新知見」（主催：鳥取大学、2015年1月29日、米子市、観客約100名）にて講演
- 8) 第24回鳥取県医師会学校医・園医研修会、鳥取県学校保健会研修会「PM2.5の子どもへの健康影響」（主催：鳥取県医師会、2015年2月1日、倉吉市、観客120名）にて講演
- 9) 第6回山口市喘息市民公開講座「黄砂とPM2.5の健康影響～越境大気汚染との関わりについて～」（主催：山口市喘息死ゼロ作戦研究会、2015年4月11日、山口市、観客150名）にて講演
- 10) 美作呼吸器疾患研究会「PM2.5の呼吸器システムへの影響」（主催：美作医師会、2016年3月15日、津山市、観客20名）にて講演
- 11) 境港市立の全7小学校の校長と養護教諭を対象にした講演「大気汚染が児童に与える影響」（2016年6月27日、境港市立渡小学校、聴講者13名）
- 12) 境港市健康まつり市民公開講座「鳥取県の空気に潜む健康影響」（主催：境港市、2016年7月2日、境港市、観客約200名）にて講演
- 13) 第47回日本職業環境アレルギー学会総会・学術大会市民公開講座「今、話題のPM2.5や黄砂はどんなもの？アレルギーを悪くしますか？」（主催：日本職業環境アレルギー学会、2016年7月10日、大阪市、観客200名）にて講演
- 14) 鳥取大学医学部附属病院市民公開健康ミニ講座「PM2.5の健康影響を防ごう」（主催：鳥取大

学、2016年4月27日、米子市、観客30名）にて講演

- 15) 米子商工会議所・鳥取大学医学部附属病院合同市民公開講座「越境大気汚染の現状と対策」
（主催：米子市商工会議所・鳥取大学、2017年3月22日、観客約50名）にて講演

（５）マスコミ等への公表・報道等

- 1) 朝日新聞（2016年9月30日、近畿版、18頁）

（６）その他

- 1) 黄砂とPM2.5の児童への影響調査の成果を活用して、松江市立古志原の教職員に大気汚染について現状を説明し、調査協力の継続について検討会を行った。2015年1月14日、於：松江市立古志原小学校
- 2) 黄砂とPM2.5の児童への影響調査の成果を活用して、松江市立津田小学校の教職員に大気汚染について現状を説明し、調査協力の継続について検討会を行った。2015年1月16日、於：松江市立津田小学校
- 3) 黄砂とPM2.5の児童への影響調査の成果を活用して、松江市立中央小学校の教職員に大気汚染について現状を説明し、調査協力の継続について検討会を行った。2015年1月16日、於：松江市立中央小学校
- 4) 黄砂とPM2.5の児童への影響調査の成果を活用して、松江市立城北小学校の教職員に大気汚染について現状を説明し、調査協力の継続について検討会を行った。2015年1月23日、於：松江市立城北小学校
- 5) 黄砂とPM2.5の児童への影響調査の結果について、松江市立津田小学校の教職員に報告し、調査協力の継続について検討会を行った。2015年11月4日、於：松江市立津田小学校
- 6) 黄砂とPM2.5の児童への影響調査の結果について、松江市立中央小学校の教職員に報告し、調査協力の継続について検討会を行った。2015年11月6日、於：松江市立中央小学校
- 7) 黄砂とPM2.5の児童への影響調査の結果について、松江市立城北小学校の教職員に報告し、調査協力の継続について検討会を行った。2015年11月11日、於：松江市立城北小学校
- 8) 黄砂とPM2.5の児童への影響調査の結果について、松江市立古志原小学校の教職員に報告し、調査協力の継続について検討会を行った。2015年11月18日、於：松江市立古志原小学校
- 9) 黄砂とPM2.5の児童への影響調査の成果を活用して、境港市教育委員会の職員に大気汚染について現状を説明した。2016年5月10日、於：境港市教育委員会
- 10) 黄砂とPM2.5の児童への影響調査の結果について、松江市立中央小学校の教職員に報告した。2016年5月11日、於：松江市立中央小学校
- 11) 黄砂とPM2.5の児童への影響調査の結果について、津田小学校の教職員に報告した。2016年5月11日、各小学校で実施、於：松江市立津田小学校
- 12) 黄砂とPM2.5の児童への影響調査の結果について、古志原小学校の教職員に報告した。2016年5月11日、於：松江市立古志原小学校
- 13) 黄砂とPM2.5の児童への影響調査の結果説明と調査継続について、松江市立津田小学校の教職員と検討会を行った。2016年8月3日、於：松江市立津田小学校。
- 14) 黄砂とPM2.5の児童への影響調査の結果説明と調査継続について、松江市立中央小学校の教

職員と検討会を行った。2016年8月5日、於：松江市立中央小学校。

- 15) 黄砂とPM2.5の児童への影響調査の結果説明と調査継続について、松江市立古志原小学校の教職員と検討会を行った。2016年8月16日、於：松江市立古志原小学校。
- 16) 黄砂とPM2.5の児童への影響調査の成果を活用して、松江市立川津小学校の教職員に大気汚染について現状を紹介した。また、今後の調査への参加、協力について検討会を行った。2016年9月2日、於：松江市立川津小学校。
- 17) 第67回日本結核病学会中国四国支部会ランチョンセミナー5「PM2.5の呼吸器への影響」、2016年12月23日、岡山市、参加者50名。

8. 引用文献

- 1) R.W. Atkinson, S. Kang, H.R. Anderson, I.C. Mills, H.A. Walton: Thorax, (69, 7), 660-665 (2014)
Epidemiological time series studies of PM2.5 and daily mortality and hospital admissions: a systematic review and meta-analysis.
- 2) G. Weinmayr, E. Romeo, M. De Sario, S.K. Weiland, F. Environ Health Perspect, (118, 4), 449-457 (2010)
Forastiere: Short-term effects of PM10 and NO2 on respiratory health among children with asthma or asthma-like symptoms: a systematic review and meta-analysis.
- 3) J. Øvrevik, M. Refsnes, M. Låg, J.A. Holme, P.E. Schwarze: Biomolecules, (5, 3), 1399-1440 (2015)
Activation of Proinflammatory Responses in Cells of the Airway Mucosa by Particulate Matter: Oxidant- and Non-Oxidant-Mediated Triggering Mechanisms.
- 4) N. Takahashi, K. Ogino, K. Takemoto, S. Hamanishi, D.H. Wang, T. Takigawa, M. Shibamori, H. Ishiyama, Y. Fujikura: Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, (299, 1), L17-24 (2010)
Direct inhibition of arginase attenuated airway allergic reactions and inflammation in a Dermatophagoides farinae-induced NC/Nga mouse model.
- 5) K. Okunishi, M. Dohi, K. Nakagome, R. Tanaka, K. Yamamoto: J Immunol, (173, 10), 6393-6402 (2004)
A novel role of cysteinyl leukotrienes to promote dendritic cell activation in the antigen-induced immune responses in the lung.
- 6) S. Mitschik, R. Schierl, D. Nowak, R.A. Jörres: Inhal Toxicol, (20, 4), 399-414 (2008)
Effects of particulate matter on cytokine production in vitro: a comparative analysis of published studies.
- 7) T. Hidaka, E. Ogawa, E.H. Kobayashi, T. Suzuki, R. Funayama, T. Nagashima, T. Fujimura, S. Aiba, K. Nakayama, R. Okuyama, M. Yamamoto: Nat Immunol, (18, 1), 64-73 (2017)
The aryl hydrocarbon receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of the neurotrophic factor artemin.
- 8) Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease: GOLD 2017 Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of chronic obstructive pulmonary disease (2017)

- report). Fontana, Wisconsin, USA, 2017.
- 9) G.D. Thurston, R.T. Burnett, M.C. Turner, Y. Shi, D. Krewski, R. Lall, K. Ito, M. Jerrett, S.M. Gapstur, W.R. Diver, C.A. Pope: Environ Health Perspect, (124, 6), 785-794 (2016)
Ischemic Heart Disease Mortality and Long-Term Exposure to Source-Related Components of U.S. Fine Particle Air Pollution.
- 10) T. Takahashi, Y. Kimura, R. Saito, Y. Nakajima, Y. Ohmiya, K. Yamasaki, S. Aiba: Toxicol Sci, (124, 2), 359-369 (2011)
An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8.

(2) 黄砂、PM2.5 のアレルギー毒性、炎症誘導および発がん性の評価

国立大学法人鳥取大学

医学部病態生化学分野 岡田 太、尾崎充彦、小沼邦重

平成 26(開始年度)～28 年度累計予算額：29,605 千円（うち平成 28 年度：8,500 千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

大気汚染物質は、2013 年 International agency for research on cancer (IARC) がヒトにおいて発がん性が認められるグループ 1 として認定した。そこで本研究は、PM2.5 や大気汚染物質およびこれに付着する金属類等にアレルギーや炎症を惹起する作用ならびに発がん性について実験動物モデル等を確立して検証することと、作用が認められた際にはその機構の解析を行った。その結果、大気汚染物質にはマウスにおいて著しい炎症反応を惹起することを検証した。その炎症誘導活性は、既に報告済みの標準となる起炎性異物（ゼラチンスポンジ）によって誘発される炎症滲出細胞数を著しく上回るものであった。加えて、大気汚染物質によって滲出した炎症細胞の特性は、標準起炎性異物によって誘発された滲出炎症細胞のものとはアレルギー・炎症関連の分子発現において質的に大きく異なることを明らかにした。従って、大気汚染物質によって惹起されるアレルギー・炎症反応は、一般的な生体外異物の暴露によって生じるものとは異なり、顕著な滲出炎症細胞数の誘導ならびにアレルギー・炎症に関連する分子発現様式が異なることを見いだした。さらに、大気汚染物質およびこれに付着する金属による細胞がん化能の評価には、発がん感受性のマウス細胞株を用いた。この細胞株に大気汚染物質およびこれに付着する金属類を継続添加培養した。経時的に一部の細胞を取り出して、マウス生体内での致死増殖性の獲得の有無を評価することで大気汚染物質等が細胞がんに関与するかどうかについて検討した。少なくとも添加培養開始後 180 日を経過しても致死増殖を示す処理細胞株は観察されなかった。現時点において、大気汚染物質が培養細胞に対して直接細胞発がんを発揮する可能性は低いという結論を得た。大気汚染物質による発がんの主となる機構は、大気汚染物質による著しい炎症・アレルギー反応の誘導が生じた組織において、炎症を背景とした二次的な発がん過程（炎症発癌）を進展させる可能性が高いものと考えられた。

[キーワード]

大気汚染物質、PM2.5、炎症、アレルギー、発がん

1. はじめに

黄砂、PM2.5 などの大気汚染物質は、ヒトにおいて確実に発がん性があるものと認定されて以来、各種の報道を介して国民の大きな関心と呼ぶことになった。しかしながら、大気汚染物質そのものは様々な複合要因の結果生じた物質であるが故に、原因物質としての大気汚染物質とこれによって生じる疾患について、その実態解明には至っていないのが現状である。一方で大気汚染物質にはアレルギー反応を引き起こす作用のあることがヒト成人ならびに児童においても見いだされている。しかし、その機構に関しても十分な知見が蓄積されているとはいえない。こういった現状を鑑みて、当該研究は実験動物等を駆使した病態解析モデルや、培養細胞を活用した評価系を整えて、PM2.5 や付着金属類等を含む大気汚染物質が有するアレルギー・炎症惹起能や発がん性を検証・評価し、その作用機構を明らかにすることにした。

2. 研究開発目的

2013 年 International agency for research on cancer (IARC) によって大気汚染物質がグループ 1 のヒトに対して確実に発がん性ありと公表されて以来¹⁾、黄砂や PM2.5 などの越境大気汚染物質を含む大気中浮遊物質に関する健康影響について国内のみならず海外においても関心が高まった。しかしながら、国際的にも関心の高い大気汚染物質による健康影響に対しては、発生・発症に関する機構の解明がなされなければ、具体的な対策や予防の措置が講じられないことになる。そこで本研究は、黄砂や PM2.5 などの大気汚染物質とその付着金属類にアレルギーや炎症反応の惹起能をどの程度有するのかに関して、既に報告済みの起炎物質（生体外異物）との対比検討を実施した。炎症反応を数値として定量解析する方法論ならびに滲出炎症細胞の質的な特徴を炎症性サイトカイン等の分子発現量を指標として提示することを試みた。さらに、発がん性に関しては、マウスに由来する細胞で発がん感受性の極めて高い細胞株を用いて、大気汚染物質やその付着金属類が直接的に細胞がん化に関わるのか否かについて培養条件下で持続添加する実験系で検討した。なお、当該研究には研究成果の比較検討を可能にするために、同一の大気汚染物質を用いることにした。標品として入手可能な大気汚染物質として焼灼大気汚染物質(NIES CRM, No. 28)をすべての研究に使用した。黄砂、PM2.5 などの越境大気汚染物質を含む大気中の浮遊物質による健康影響の中で、炎症・アレルギー反応の惹起能ならびに発がん性の有無、そしてそれらの機構を明らかにすることで、健康影響に対する明確な提言の提示に繋げることを最終目標とした。

3. 研究開発方法

(1) アレルギー・炎症誘導ならびに細胞がん化に関わる大気汚染物質、黄砂や PM2.5 に付着する候補原因物質の推定

越境飛来する大気汚染物質（黄砂、PM2.5 ならびに大気粉塵等）の中でアレルギー・炎症誘導ならびに細胞がん化を誘発する原因物質の推定は、サブテーマ①ならびにサブテーマ③の大気汚染物質採集調査結果ならびに文献検索調査等をもとに行った。さらに、本研究に使用する濃度等の条件設定は、既報文献等に従って定めた。

当該研究の中心である大気汚染物質の発がん性評価には、発がん感受性の退縮型マウス線維肉腫細胞(QR-32 細胞)ならびにヒト気道上皮細胞株(BEAS-2B 細胞)を用いた検証実験を計画し、

いずれもこれらの細胞に対して長期間にわたる継続添加培養を計画した。実験を実施する前に、大気汚染物質、黄砂やPM2.5に付着する候補原因物質等による直接的な細胞傷害性を評価した。この評価には、生体内におけるアレルギー、炎症およびがん化に共通する要因である組織に与える損傷の程度に関して細胞傷害活性を指標とした評価を行った。その評価方法には、生細胞のみが有する還元能を指標とした細胞傷害活性と、細胞の核を染色することによる細胞傷害活性の2系を構築した。前者は cytotoxic な傷害に加えて cytostatic な細胞傷害性を加味した評価が可能となる。また、後者は cytotoxic な細胞傷害を反映する評価法として使用した。さらに、アレルギー反応ならびに遷延した炎症反応の誘導に伴って滲出する活性化した炎症細胞や免疫担当細胞が生成する活性酸素あるいは一酸化窒素を測定した。これらはゲノムに対する遺伝毒性物質であり、かつタンパク質・脂質等の生体高分子に対する翻訳後修飾に関わる。さらに活性酸素や一酸化窒素は、細胞増殖を促す要因としても作用することから、これらが過剰に生成されることを目安として、生体に生じる炎症反応もしくはアレルギー反応の惹起能を類推することができる。従って、これらの生成の程度を精緻に定量測定できる解析系の構築を行った。

a 大気汚染物質とこれに付着している金属等の含有量

アレルギー・炎症誘導ならびに細胞がん化を誘発する大気汚染物質（黄砂、PM2.5ならびに大気粉塵等）として、標準大気汚染物質（焼灼大気汚染物質、50 mg/mL : NIES CRM, No. 28）を使用した。また、大気汚染物質に付着している金属等に相当する試薬の選択に関しては、文献学的な調査を施行して下記の6種類を選んだ。なお、これら金属の使用濃度は結果及び考察の項目に記載の文献等に基づく推計と、次の既報論文のそれぞれを参照して決定した。硫酸銅（Ⅱ）五水和物（ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ）²⁾、塩化鉄（Ⅱ）四水和物（ $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ）²⁾、塩化鉄（Ⅲ）六水和物（ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ）²⁾、塩化亜鉛（ ZnCl_2 ）³⁾、酢酸カドミウム（Ⅱ）二水和物（ $\text{C}_4\text{H}_6\text{CdO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）⁴⁾、酢酸鉛（Ⅱ）三水和物（ $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ）⁴⁾。なお、本研究に使用した焼灼大気汚染物質（NIES CRM, No. 28）の試料1 mL中に含まれる各種金属成分量は下記の通りである。鉛（19 $\mu\text{g/mL}$ ）、クロム（2.4 $\mu\text{g/mL}$ ）、マンガン（32 $\mu\text{g/mL}$ ）、ニッケル（2.7 $\mu\text{g/mL}$ ）、カドミウム（0.35 $\mu\text{g/mL}$ ）、銅（4.1 $\mu\text{g/mL}$ ）、亜鉛（53 $\mu\text{g/mL}$ ）、鉄（1,200 $\mu\text{g/mL}$ ）、カルシウム（3,200 $\mu\text{g/mL}$ ）、アルミニウム（2,700 $\mu\text{g/mL}$ ）、ケイ素（6,400 $\mu\text{g/mL}$ ）、ヒ素（3.8 $\mu\text{g/mL}$ ）、マグネシウム（760 $\mu\text{g/mL}$ ）、ナトリウム（140 $\mu\text{g/mL}$ ）、カリウム（11 $\mu\text{g/mL}$ ）、チタン（110 $\mu\text{g/mL}$ ）、ストロンチウム（21 $\mu\text{g/mL}$ ）、バリウム（40 $\mu\text{g/mL}$ ）、リン（64 $\mu\text{g/mL}$ ）、スカンジウム（0.47 $\mu\text{g/mL}$ ）、コバルト（0.65 $\mu\text{g/mL}$ ）、ランタン（0.8 $\mu\text{g/mL}$ ）、トリウム（0.28 $\mu\text{g/mL}$ ）、ウラン（検出限界以下）、水銀（検出限界以下）。

b アラマーブルー法による細胞毒性ならびに細胞生存・増殖性の測定

96穴プラスチックプレートにQR-32細胞を 1×10^3 個播種し、計7プレート分（7日間用）を用意した。播種後1日目に大気汚染物質あるいはこれに含まれることが想定されるアレルギー・炎症誘導ならびに細胞がん化を誘発する候補物質を添加して、その時点をも0日目として設定した。その後、1～7日まで連日培養液にアラマーブルー溶液を最終濃度が原液の40倍になるように希釈添加した。その後、37℃インキュベーター内に1時間静置した。プラスチックプレートを攪拌して均一な濃度になるように調整後、励起波長570 nm、測定波長590 nmにて細胞の還元能を指標とした細胞生存・増殖性を測定した。

c クリスタルバイオレット法による細胞増殖の測定

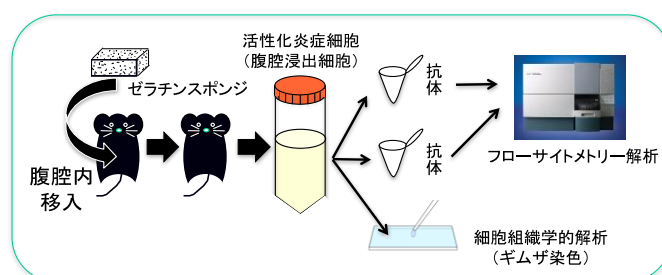
上記に記した方法と同様に 96 穴プレートに QR-32 細胞を播種し、7 日間観察用のプレートを準備した。播種後 1 日目に大気汚染物質等を添加し、その後、1 日毎に以下の操作を施した。培養液を捨て、プレートに接着している細胞を 2.5% グルタルアルデヒド溶液で 30 分間の細胞固定処理を行った。その後にプレートを風乾させた。次に 0.1% クリスタルバイオレット染色液 (0.2% クリスタルバイオレットと 100 mM CAPS バッファー pH9.4 を等量比で用事混合して使用) を 1 穴当たり 50 μ L 添加して 30 分間室温にて核染色した。その後、水道水でプレートを洗浄した後に再びプレートを風乾させた。その後に 100% の氷酢酸溶液を各穴に 50 μ L 添加してから数分間振盪培養し、クリスタルバイオレットを完全に溶出させた。その後、励起波長 495 nm、測定波長 510 nm にて細胞核の染色性を指標とした細胞増殖性を測定した。

d 活性酸素の生成量の定量評価

QR-32 細胞を 96 穴プレートに 1×10^3 個播種した。細胞が培養プレートに付着したことを確認した後に、次の 2 種類の異なる活性酸素検出用プローブを添加して測定した。細胞の内外に生成した総活性酸素量を検出することのできる 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2-DCF) と、細胞内に生成した活性酸素のみを検出することのできる 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H2DCFDA) を使用した。CM-H2DCFDA (50 μ g) を使用する際には、プローブを室温に戻した後に、Dimethyl sulfoxide (50 μ L)、メタノール (50 μ L)、2M 水酸化カリウム (25 μ L) を順に添加した後に室温にて 1 時間静置した。これらの前処理を施した後に、2N 塩酸 (20 μ L) を加えてから使用した。それぞれのプローブは、最終濃度 10 μ M になるように細胞維持培地にて希釈してから細胞に添加した。その後、37°C インキュベーター内に 1 時間静置して反応させた。H2-DCF は、励起波長 495 nm、測定波長 530 nm にて、また CM-H2DCFDA は励起波長 485 nm、測定波長 535 nm にてそれぞれの蛍光量を検出測定した。非添加プレートの蛍光量をすべての穴の蛍光量から差し引いた値を播種細胞数当たりの蛍光量として活性酸素生成量を評価した。

e 一酸化窒素生成量の定量評価

活性酸素生成量の定量評価法と同様に、QR-32 細胞を 96 穴プレートに播種後に細胞内に生成する一酸化窒素 (NO) 検出用のプローブ diaminofluorescein-FM DA (DAF-FM DA) を最終濃度 20 μ M となるように培地で希釈してから添加した。そのプレートは、37°C のインキュベーター内に 1 時間静置し反応させた。その後に励起波長 485 nm、測定波長 510 nm にて蛍光量を測定した。DAF-FM DA を添加していないプレートの蛍光量をブランク値として、すべての穴の蛍光量から差し引いた数値を播種細胞当たりの蛍光量として一酸化窒素生成量を評価した。



図(2)-1 炎症細胞の細胞種の定量・組織学的解析系

(2) 大気汚染物質、黄砂や PM2.5 に付着する候補原因物質のアレルギー・炎症誘導に関する検討

飛来する大気汚染物質（黄砂、PM2.5 ならびに大気粉塵等）が、実験動物個体（生体）において炎症やアレルギー反応を誘導するか否かについて検討した。大気汚染物質をマウス体内に投与・接種し、一定時間後に滲出細胞の数を測定した。回収した細胞の種類（炎症細胞種）ならびにアレルギー・炎症反応に関連する分子発現を定量的に解析した。

a 滲出炎症細胞数の測定

アレルギー・炎症反応を担う細胞種等の特定は、5 週齢以降の C57BL/6 雌マウスを用いた。マウスに生理食塩水に溶解した大気汚染物質（1,700 mg/kg あるいは 170 mg/kg）を腹腔内投与した。5 日後にヘパリンナトリウムを含む氷温生理食塩水（10 U/mL）10 mL にて腹腔内を計 3 回洗浄して腹腔滲出細胞を回収した。1,200 rpm、5 分間の遠心操作後の細胞ペレットに 37℃に温めたトリス-塩化アンモニウムバッファー液を添加し、1 分間処理して滲出細胞に混入した赤血球のみを破裂処理した。その後に再び遠心処理と細胞洗浄を繰り返して腹腔滲出細胞を得た。この細胞をアレルギー・炎症細胞として、以降の研究で使用した。陽性対照としては、既報にて報告済みの起炎性異物であるゼラチンスポンジに反応する炎症細胞を用いた⁵⁾。回収方法は、マウスの皮膚ならびに腹膜を 1 cm 程度切開し、ゼラチンスポンジ（10×5×3 mm）を腹腔内に移入後、腹膜切開部をナイロン糸で縫合した。皮膚は、無菌クリップで閉じた。移入 5 日後に上述と同様の方法でヘパリンナトリウム添加生理食塩水にて腹腔滲出細胞を回収して実験に用いた。

b 滲出炎症細胞の種類の決定

アレルギー・炎症細胞の細胞種の特定には、フローサイトメトリーによる定量解析ならびにギムザ染色による解析を施行した。炎症反応を惹起するために起炎性異物のゼラチンスポンジをマウス腹腔内に移入し、5 日目の腹腔滲出細胞を用いた（図(2)-1）。なお、フローサイトメトリー解析には、下記の各種免疫担当細胞に対する特異的な抗体を使用した。好中球・単球には Ly-6G 抗体を、好中球・顆粒球・マクロファージ・樹状細胞・NK 細胞には CD-11b 抗体を、T 細胞には CD-3e 抗体を、B 細胞には CD-19 抗体を、NK 細胞・LAKT 細胞には NKG2 抗体をそれぞれ使用した。なお、対照には上記の抗体に対応するイムノグロブリンを用いた。定法に従い滲出細胞に抗体を処理し、フローサイトメトリー（FACS Aria）を用いて測定した。細胞種の解析には FlowJo ソフトを用いた。さらに、回収した炎症細胞はスライドグラス上に滴下し、スメア状に薄塗した後に風乾させた。その後にギムザ染色を施して、検鏡にて各細胞種を特定した。なお、各群 200～300 個の滲出細胞を測定して滲出細胞種の割合を算出した。

c アレルギー・炎症反応に関連する遺伝子発現

滲出炎症細胞から total RNA を TRIzol 試薬にて抽出した。この RNA から逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。次いで、Express SYBR GreenER qPCR SuperMix キットを用いて、ABI7900HT Fast リアルタイム PCR システムに従い、定量的 PCR（qPCR）を行いアレルギーや炎症反応に関連する分子の発現を比較した。なお、各遺伝子の内部標準遺伝子（ β -actin）に対する相対的な発現量は、Delta-Delta CT 法に基づき算出した。使用したプライマー配列は、以下の通りである。IL-6 upstream、5' -aagcgagagtccttcagagaga-3'；IL-6 downstream、

5' -gagcattggaaattggggta-3' ; *TNF- α* upstream、5' -acggcatggatctcaaagac-3' ; *TNF- α* downstream 、 5' -agatagcaaatcggtgacg-3' ; *TGF- β 1* upstream 、 5' -attcctggcggttaccttgg-3' ; *TGF- β 1* downstream、5' -agccctgtattccgtctcct-3' ; *Mac-1* upstream 、 5' -ggctttggacagagtgtggt-3' *Mac-1* downstream 、 5' -agagggcacctgtctgttga-3' ; *iNOS* upstream、 5' -tcttgtgttgagggtgacca-3' *iNOS* downstream 、 5' -acccacctccagtagcatgt-3' ; *Nox2* upstream 、 5' -caagatggaggtgggacagt-3' ; *Nox2* downstream 、 5' -gcttatcacagccacaagca-3' ; *β -actin* upstream 、 5' -tgaggagcacctgtgct-3' ; *β -actin* downstream 、 5' -acatggctgggggtgttgaag-3' 。

(3) 大気汚染物質（黄砂やPM2.5等）やこれに付着する候補原因物質による細胞がん化に関する検討

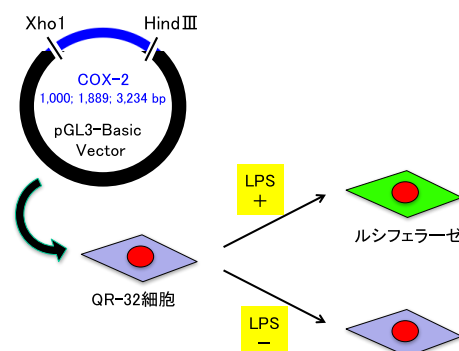
a 大気汚染物質等の発がん性を評価するための処理濃度の決定

国際専門雑誌あるいは著書などの文献に記載された情報を広く収集し、それらの知見を基に添加処理濃度を決定した。

b 発がん関連分子の発現誘導を指標にした細胞がん化の評価系の構築

QR-32 細胞の発がん関連分子には、cyclooxygenase 2 (COX-2) を選択した。COX-2 プロモーターの活性化を発光シグナルによって識別検出する改良型 QR-32 細胞株の作製は、下記の通りである。マウス COX-2 プロモーターの配列情報を元に、塩基長 1,000 bp (COX-2S)、1,889 bp (COX-2M)、3,234 bp (COX-2L) が得られる特異的プライマーを設定した。なお、プライマー配列末端には、

制限酵素 Xho-I あるいは HindIII の切断配列を挿入し、pGL3-basic ベクター内のマルチクロニングサイトへの組換えを行った。各プライマー配列は、以下の通りである。COX-2S-XhoI upstream: 5' -ttctcgagacagtaggaagatatccaac-3' 、 COX-2M-XhoI upstream: 5' -ttctcgagcctcagagatctgcttagac-3' 、 COX-2L-XhoI upstream: 5' -ttctcgaggttttattgttctgcctca-3' 、 COX-2S/M/L-HindIII (downstream 共通) : 5' -ttaagcttgactgactcctgaagctct-3' を用いた。ベクターは、Firefly luciferase 遺伝子が連結されている pGL3-basic ベクターを用いた。上記の各プライマーで増幅した COX-2S、COX-2M、COX-2L のプロモーター配列を pGL3-basic ベクターに組み込んだ (図(2)-2)。その後、大腸菌 (XL1-Blue) に形質転換導入を行った。導入大腸菌に含まれる各 COX-2 プロモーターの有無を PCR 法にてスクリーニング解析し、目的の導入コンストラクトを選択した。その後、COX-2S、COX-2M、COX-2L を含むそれぞれのベクターコンストラクト (380 ng) と NEO 耐性遺伝子を持つ PC-DNA3 ベクター (170 ng) を QR-32 細胞に Lipofectamine 2000 を用いて共導入した。ネオマイシン (300 μ g/mL) 添加培地にて遺伝子導入クローン細胞を選択した。目的の遺伝子が

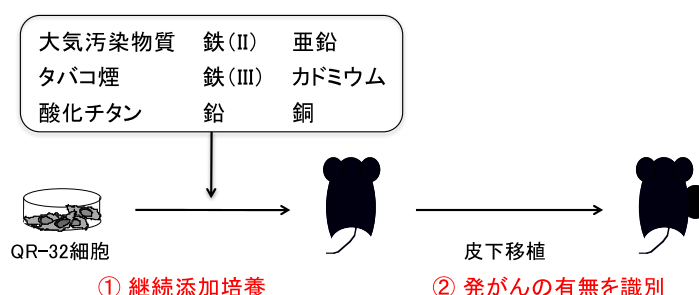


図(2)-2 発がん関連分子によるがん化能の評価系

導入されているか否かは PCR 法にて検証した。COX-2 の誘導が起きるかに関しては、リポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS ; 10 $\mu\text{g/mL}$) を添加した後に、ルシフェリンを添加培養してルシフェラーゼを介した細胞発光の有無を指標として下記の手順により解析した。遺伝子導入 QR-32 細胞を 1×10^4 個 48 穴プレートに播種した。その翌日に細胞を 500 μL の生理食塩水で 2 回洗浄した後に、細胞溶解液を 100 μL 添加し、室温で 15 分間軽く振盪させた。その後にウェル内の細胞を数回ピペッティングして完全に溶解させた。この細胞懸濁液を発光検出用の 96 穴ホワイトプレートに 20 μL 入れた後に、100 μL の発光基質液を加えた。基質 (ルチフェリン、0.7 mg/mL) は測定直前に発光基質液に加えた。その後、経時的 (数十秒から 120 分間まで) にマイクロプレートリーダーを用いて発光強度を測定した。

c 培養細胞を用いた発がん評価系の構築

細胞は、正常同系宿主 (C57BL/6 マウス) に移植すると自然退縮する QR-32 細胞株を使用した (図 (2)-3 左)。この細胞の特徴は、培養条件下で維持される QR-32 細胞株の培養液中に被検物質の継続的な添加暴露処理を行うことができる点にある⁶⁾。従って、サブ



図(2)-3 大気汚染物質ならびに付着金属類によるがん化能の評価・解析系

テーマ①ならびに③の研究成果から提案される物質 (大気汚染物質、化学物質、金属等) が決定され次第、順次添加培養の実験系に追加した。

細胞がん化を起こしたか否かの評価は、培養環境下と動物個体内の2つの実験系を用いた。培養環境条件下のもとで細胞のがん化を簡易的に評価する方法として、アノイキスによる細胞死 (細胞が基質との接着が妨げられることを契機として生じる細胞死) に対する抵抗性を獲得する能力がある (がん化の獲得) か否か (がん化の獲得には至っていない) を検討した⁷⁾。アノイキスの誘導には、1%アガロースで培養プラスチックプレート表面を被覆した上に細胞を重層培養する方法を用いた。細胞とプラスチックプレート基質との直接接着を阻害 (3次元培養条件) することで、アガロースの上で播種した細胞が凝集して増殖 (細胞凝集塊、スフェア形成能) することができるか否かを評価した。また、一部は正常組織もしくはその対照として遺伝子改変動物から得た組織由来の細胞を3次元培養条件下で再構成 (オルガノイド培養) した後のがん化能の評価を試みた。

具体的には、QR-32 細胞株がサブコンフルエントに達した時点で無血清培地に置換し、一週間培養維持する。3 日間に一度の割合で培地を交換した。24 穴プレートに 250 μL の 1% Ager を敷き、この上に処理細胞 1×10^5 個を播種して、さらに 2 日間無血清培地で培養する。その後、細胞を回収して 20 μm のナイロンメッシュを通して単一細胞を分取した。この細胞株を 1.5 mL エッペンドルフチューブ内に回収し、1,500 rpm、室温で遠心した後に細胞ペレットを 30 μL の無血清培地で再懸濁し、 2×10^5 個/mL になるように細胞調整した。この細胞懸濁液 500 μL を 1% Ager 上に重層し、9 日間 37°C インキュベーター内で培養した。細胞が凝集塊 (ス

フェア）を形成した場合には、その直径とスフェア形成数を測定した。その後、1%Ager 上のすべての細胞を回収し、1 穴あたり 100 μ L の培地に再懸濁し、全播種細胞当たりの生細胞数をトリパンブルー染色の有無による細胞生存率を測定した。

d マウス個体を用いた発がん評価系の構築

添加暴露処理した細胞は、正常同系マウスの皮下に移植し、本来自然退縮する細胞の特性が致死増殖するように転換することを指標として、QR-32 細胞が発がん化能を獲得したか否かを識別評価した（図(2)-3 右）⁶⁾。

QR-32 細胞は、8%ウシ胎仔血清と 2 mM L-グルタミンを含む Eagle's minimal essential medium 培地を用い、37°C、5%CO₂ のインキュベーター内で維持した。焼灼大気汚染物質 (NIES CRM, No. 28) やこれに付着する金属等は、培養液に溶解して QR-32 細胞に添加した。細胞は、48 穴プレートに 2×10^3 個播種し、週 2 回の頻度で越境大気汚染物質（金属等を含む）を含む新たな培地に交換し、1 週間毎に細胞を回収して播種し直した。持続添加培養 30 日毎に処理細胞の一部を分取し、これを正常マウス皮下に 1×10^7 個移植して致死増殖（がん化）を獲得したか否かを評価した⁶⁾。また、QR-32 細胞が大気汚染物質等の添加培養にてがん化能を獲得した際に備えて、ヒト気道上皮細胞株 (BEAS-2B 細胞) を用いた発がんの検証実験系を準備した。BEAS-2B 細胞は、10%のウシ胎仔血清と 2 mM L-グルタミンを含む Dulbecco's Modified Eagle Medium 培地を用いて維持した。

4. 結果及び考察

(1) アレルギー・炎症誘導ならびに細胞がん化に関わる大気汚染物質、黄砂や PM2.5 に付着する候補原因物質の推定

越境飛来する大気汚染物質、黄砂、PM2.5 ならびに大気粉塵に含まれるもしくは付着している物質の中で、アレルギー・炎症の誘導や細胞がん化を誘発する物質の推定は、サブテーマ①ならびにサブテーマ③の採集調査対象地である佐世保市および京都市に加え、福岡県太宰府市、鳥取県湯梨浜町ならびに中国北京市の調査結果ならびに論文調査等をもとに推定し⁸⁻¹⁰⁾、原因物質の推定と本試験に使用する濃度等の条件設定を決めた。これらの諸条件をもとにアレルギー・炎症反応の誘導が起きるのか否かを実験動物 (C57BL/6 マウス) にて検証した。また、発がん感受性を簡便にスクリーニングできるマウス線維肉腫細胞 (QR-32 細胞) に発がん関連分子発現 (cyclooxygenase 2) の誘導の有無や、アノイキス抵抗性の獲得の有無（細胞が基質との接着を妨げられることを契機として生じる細胞死を回避する能力でがん化能を計る方法のひとつ）によるがん化能の評価系を新たに構築して検討した。さらに QR-32 細胞に大気汚染物質あるいはこの付着金属等を継続添加培養し、一定処理期間ごとにマウス生体内における致死増殖の有無を確認することで発がん性を獲得することを継続評価している。加えて、ヒト気道上皮細胞株 (BEAS-2B 細胞) を用いた発がんの検証実験系を準備した。

1) 大気汚染物質および黄砂等に付着している物質と添加培養濃度の算出根拠（図(2)-4)

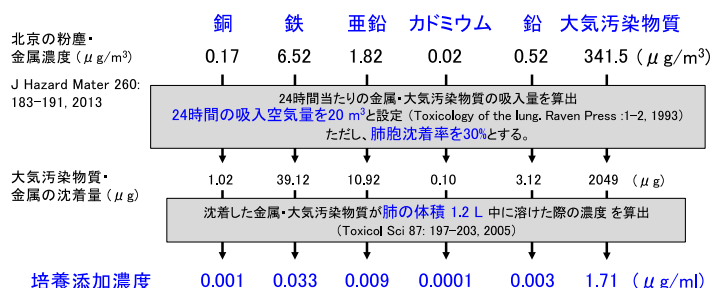
サブテーマ①の調査結果より、PM2.5 に含まれるエンドトキシン、銅、鉄、亜鉛、カドニウム、鉛がヒト健康に影響を与える因子であることが見いだされた。この成果に基づき、日本国内 4 地点（佐世保市、太宰府市、鳥取県湯梨浜町、京都市）ならびに海外 1 地点（中国北京市）の

大気粉塵・金属濃度のデータを参照した。その中でも最も汚染濃度が高値であった北京市の結果⁸⁾をもとに、以下に述べる根拠に基づいて添加濃度を決定した。

24 時間当たりの粉塵・金属のヒト吸入量は、24 時間の吸入空気量を Raven Press 社刊行の Toxicology of the lung (1993 年) に記載の 20 m³ と設定した⁹⁾。また、吸入物質の粒子径毎のヒト肺胞内への沈着率を推計する際に、PM2.5 に相当する粒径 2.5 μm の肺胞沈着率は約 30% 程度であるという報告に準拠した¹¹⁾。さらに、肺胞内に沈着した粉塵・金属の溶出濃度（培養細胞への添加濃度）は、肺の体積

1.2 L と想定し、既報論文¹⁰⁾に従って、銅、鉄、亜鉛、カドニウム、鉛、大気汚染物質の培養添加濃度の最小量をそれぞれ 0.001 μg/mL、0.033 μg/mL、0.009 μg/mL、0.0001 μg/mL、0.003 μg/mL、1.71 μg/mL とし

て用いることにした（図(2)-4）。また、本研究の陽性対照には、肺扁平上皮がんの発生原因として考えられているタバコ煙に含まれる微粒子の水溶性物質を加えた。その添加濃度の算出根拠としては、International Organization for Standardization (ISO) 法が定めた喫煙法にて捕集されるタバコ (Seven Stars) の主流煙に含まれる粒子 (粗タール) 重量として、1 本当たり 80 mg を使用した。タバコ煙粒子のヒト肺胞内への沈着率を 50% と設定して算定した¹²⁾。さらに上記と同様に、肺胞内に沈着した物質の溶出濃度を肺容積 1.2 L と想定して、タバコ煙抽出物の培養添加濃度を 33 μg/mL とした。なお、算出した培養添加濃度は、アレルギー・炎症反応の解析等にも使用している。



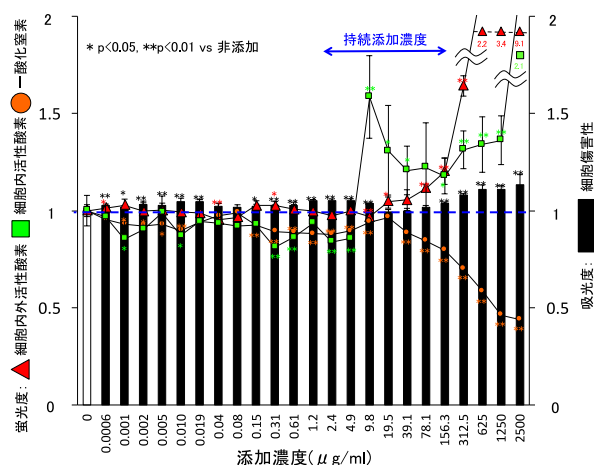
図(2)-4 大気汚染物質および付着金属の最終濃度の算出方法

2) 大気汚染物質および黄砂等に着している金属物質による細胞傷害活性 (図(2)-5～図(2)-9)

大気汚染物質ならびにこれに着している金属等の物質による細胞傷害性を評価した。細胞はマウス線維肉腫細胞 (QR-32 細胞) を用いた。生細胞の還元作用を指標とする細胞毒性ならびに生存・細胞増殖を評価するアラマーブルー法のほかに、細胞の核染色を指標とする細胞増殖を評価するクリスタルバイオレット法を用いて評価した。

大気汚染物質は 0.0006 から 2,500 μg/mL まで 23 段階に希釈して添加培養した。添加後 4 日目に細胞毒性、細胞生存・増殖性を対照の非添加培養群と比較して評価した。その結果、大気汚染物質を 0.0006 μg/mL 添加培養しても僅かな値ではあるが

QR-32 細胞の増殖を有意に促進した。このことは、大気汚染物質には少なくとも培養細胞に対して直接的な毒性や細胞傷害活性を持つことは認められなかった。長期間の持続処理添加濃度で



図(2)-5 大気汚染物質の添加により生成される活性酸素・一酸化窒素量

ある 2.4~156.3 $\mu\text{g/mL}$ の範囲内においては、処理濃度が低い場合に QR-32 細胞の増殖を若干促す効果が認められた (図 (2)-5)。

次に大気汚染物質に付着している金属として、硫酸銅 (II) 五水和物 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、塩化鉄 (II) 四水和物 ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、塩化鉄 (III) 六水和物 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、酢酸カドミウム (II) 二水和物 ($\text{C}_4\text{H}_6\text{CdO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) を代表例としてその成績を報告する。

硫酸銅 (II) 五水和物は、0.00001 から 23.4 $\mu\text{g/mL}$ まで 23 段階に希釈して添加した。その結果、硫酸銅 (II) 五水和物を添加したすべての濃度において QR-32 細胞の増殖を有意に促進した。このことは、硫酸銅 (II) 五水和物には少なくとも培養細胞に対して直接的な毒性や細胞傷害活性を持つことは認められなかった。長期間の処理添加濃度である 0.001~0.2 $\mu\text{g/mL}$ の範囲内においては、0.02 $\mu\text{g/mL}$ 処理までは QR-32 細胞の増殖を若干促進する容量依存的な傾向が観察された (図 (2)-6)。

塩化鉄 (II) 四水和物は、0.003 から 11.929 $\mu\text{g/mL}$ まで 23 段階に希釈して添加した。その結果、塩化鉄 (II) 四水和物は 0.7 ~ 23 $\mu\text{g/mL}$ を添加培養した際に QR-32 細胞の増殖を有意に促進した。一方で、186 $\mu\text{g/mL}$ 以上の添加培養では QR-32 細胞の増殖を阻害し、直接的な毒性を示す濃度が存在することを明らかにした。長期間の持続添加濃度である 0.05~6.0 $\mu\text{g/mL}$ の処理範囲内においては、処理濃度が高くなるに従って QR-32 細胞の増殖を若干促す作用が観察された (図 (2)-7)。

塩化鉄 (III) 六水和物は、0.003 から 11,929 $\mu\text{g/mL}$ まで 23 段階に希釈して添加した。その結果、塩化鉄 (III) 六水和物は 0.01 $\mu\text{g/mL}$ あるいは 746~1,491 $\mu\text{g/mL}$ を添加培養した際に QR-32 細胞の

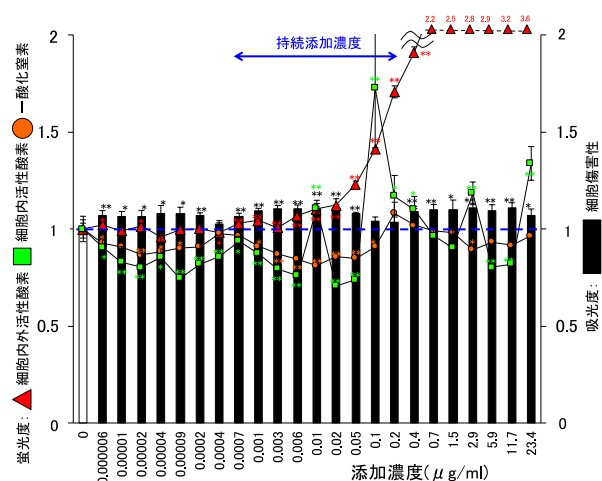


図 (2)-6 硫酸銅 (II) 五水和物の添加により生成される活性酸素・一酸化窒素量

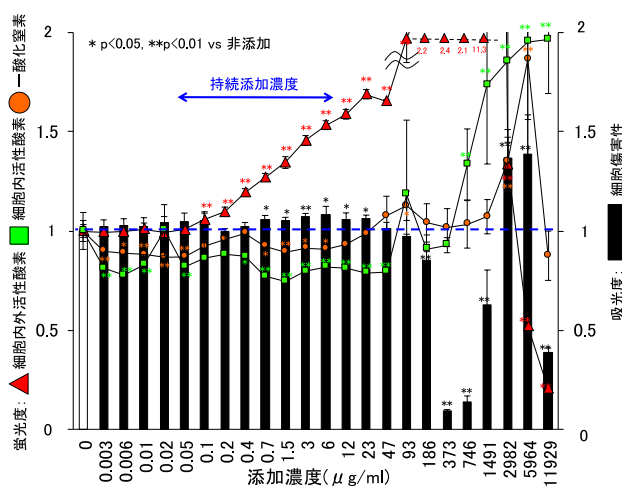


図 (2)-7 塩化鉄 (II) 四水和物の添加により生成される活性酸素・一酸化窒素量

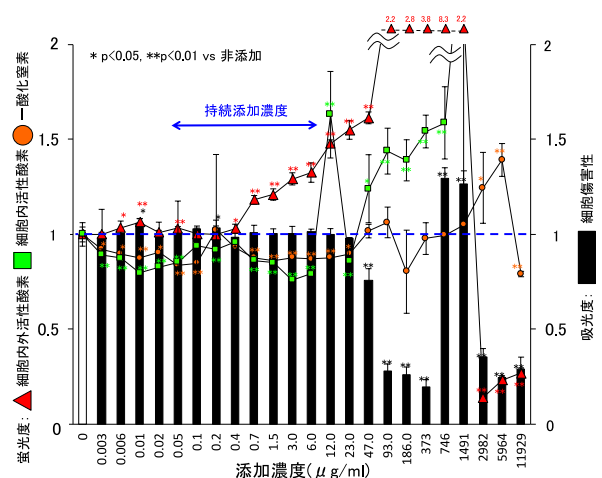
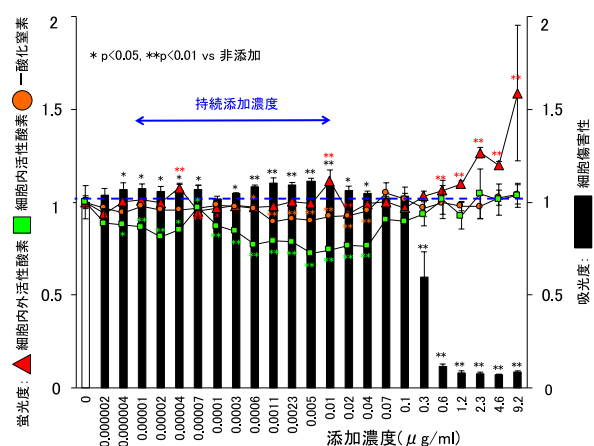


図 (2)-8 塩化鉄 (III) 六水和物の添加により生成される活性酸素・一酸化窒素量

増殖を有意に促進したが、添加濃度が増加するに従って増殖促進作用は見られなくなり、47 μ g/mL 以上の処理によって細胞増殖は著しく抑制され、直接的な毒性が現れることが明らかになった。長期間の持続添加濃度である 0.05~6.0 μ g/mL の範囲内においては、QR-32 細胞の増殖には直接的な影響をもたらさないことが観察された（図(2)-8）。

酢酸カドミウム（II）水和物は、0.000002 から 9.2 μ g/mL まで 23 段階に希釈して添加した。その結果、酢酸カドミウム（II）水和物は 0.000004 ~0.04 μ g/mL を添加培養した際に QR-32 細胞の増殖を有意に促進した。一方で、0.3 μ g/mL 以上の添加培養では QR-32 細胞の増殖を阻害し、直接的な毒性を示すことが明らかになった。長期間の持続添加濃度である 0.00001~0.01 μ g/mL の範囲内においては、いずれの処理濃度においても QR-32 細胞の増殖を若干促す作用が観察された（図(2)-9）。



図(2)-9 酢酸カドミウム(II)水和物の添加により生成される活性酸素・一酸化窒素量

3) 大気汚染物質および黄砂等に付着している金属物質による活性酸素ならびに活性窒素の生成（図(2)-5~図(2)-9）

発がんの共通要因として、活性酸素ならびに活性窒素の過剰生成が考えられている⁶⁾。活性酸素ならびに活性窒素は、第一義的にゲノム情報の改変（突然変異原性やメチル化等）に関わる遺伝毒性物質であるだけでなく、細胞増殖のシグナル分子としての伝達因子としての作用も持つ¹⁴⁾。この活性酸素や一酸化窒素に着目し、大気汚染物質および黄砂等に付着している金属物質の暴露を受けた細胞内外における生成量を測定した。

活性酸素の陽性対照には過酸化水素水を、一酸化窒素の陽性対照には一酸化窒素供与体（NOC-18）それぞれ用いた。その結果、過酸化水素あるいは一酸化窒素供与体の添加は、濃度依存的に 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate あるいは diaminofluorescein-FM DA の蛍光量が増加した。ただし、過酸化水素では 200 μ M 以上、一酸化窒素供与体では 500 μ M 以上の添加によって細胞傷害による細胞死が誘導され、活性酸素および一酸化窒素の検出試薬由来の蛍光量も消失した。従って、活性酸素もしくは一酸化窒素が過剰に生成される限量までは、その産生量に応じて検出試薬による蛍光量が増加し、定量検出可能な評価系であることが判明した。しかしながら、細胞内に生成される活性酸素もしくは一酸化窒素の検出は、細胞傷害を起こす直前までの濃度であることも明らかになった。

図(2)-5 に示すように、大気汚染物質を添加した QR-32 細胞では、細胞内外に放出される活性酸素は、持続添加濃度の範囲を含む 19.5 μ g/mL 以上を処理した際に活性酸素が急激に、かつ過剰に生成されることを見いだした。一方で、細胞内に生成される活性酸素は、9.8 μ g/mL 以上を目安として過剰な活性酸素が生成されることを見いだした。また、9.8 μ g/mL 以下の大気汚染物質を添加した QR-32 細胞では、一酸化窒素の生成量は逆に減る傾向を示した。大気汚染物質の影響を受けた際の細胞内に生じる活性酸素の生成は、処理濃度に依存するが、一定量（9.8

$\mu\text{g/mL}$) 以上の添加によっては細胞内活性酸素が増加することを見いだした。一方の一酸化窒素は、全ての添加濃度において生成量は非添加群と比べて有意に少なかった。特に、 $19.5\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度による処理では、大気汚染物質の添加濃度依存的に一酸化窒素の生成が抑制された。従って、本研究で使用した持続添加濃度の範囲内においては、細胞内あるいは細胞外に生成される活性酸素量は増加するが、一酸化窒素は非添加処理よりも少ない生成量であることが示された。

硫酸銅 (II) 五水和物を $0.0007\mu\text{g/mL}$ 以上を添加した QR-32 細胞では、細胞内外に放出される活性酸素は過剰に生成されることを見いだした (図 (2)-6)。一方で、細胞内に生成される活性酸素は、 $0.01\mu\text{g/mL}$ あるいは $0.1\mu\text{g/mL}$ の添加で一過性に細胞内活性酸素が過剰に生成された。しかし、 $0.1\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度を添加すると非添加細胞よりも生成量が減少することを見いだした。また、 $0.1\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度を添加した際にも概ね非添加細胞よりも生成量が減少した。一方で、一酸化窒素は全体的に非添加群に比べて生成量が低く、特に $0.2\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度による処理では全般的に抑制された。従って、本研究で使用した持続添加濃度の範囲内においては、細胞内あるいは細胞外に生成される活性酸素は $0.1\mu\text{g/mL}$ 以上の高濃度処理においては増加するが、一酸化窒素は非添加処理よりも少ない生成量であることが示された (図 (2)-6)。

塩化鉄 (II) 四水和物を添加した QR-32 細胞では、細胞内外に放出される活性酸素は添加濃度を含む $0.05\mu\text{g/mL}$ 以上を添加した際には過剰に生成されることを見いだした。一方で、細胞内に生成される活性酸素は、 $93\mu\text{g/mL}$ 以上の処理を目安として活性酸素が過剰に生成されることを見いだした。また、 $47\mu\text{g/mL}$ 以下の塩化鉄 (II) 四水和物を添加した QR-32 細胞では、逆に細胞内に生成される活性酸素が減少する傾向を示した。塩化鉄 (II) 四水和物の影響を受けた際の細胞内に生じる活性酸素の生成は、濃度に依存して一定量以上の添加によって細胞内の活性酸素量が増加することを見いだした。また、一酸化窒素の生成パターンは細胞内活性酸素の生成とほぼ等しく、 $23.0\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度による処理では抑制され、また $23.0\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では増加傾向にあった (図 (2)-7)。従って、本研究で使用した長期間の持続添加濃度の範囲内においては、細胞外に生成される活性酸素は増加するが、細胞内に生成される活性酸素と一酸化窒素は、非添加処理よりも少ない生成量であることが示された (図 (2)-7)。

塩化鉄 (III) 六水和物を添加した QR-32 細胞では、細胞内外に放出される活性酸素は持続添加濃度を含む $0.4\mu\text{g/mL}$ 以上を添加した際には過剰に生成されることを見いだした。一方で、細胞内に生成される活性酸素は、 $12\mu\text{g/mL}$ 以上を目安として過剰に生成されることを見いだした。また、 $6\mu\text{g/mL}$ 以下の塩化鉄 (III) 六水和物を添加した QR-32 細胞では、非添加細胞に比べて細胞内に生成される活性酸素が減少する傾向を示した。また、一酸化窒素の生成は $23\mu\text{g/mL}$ 処理以下では非添加処理のそれよりも少ない生成量であった。しかし、 $47\mu\text{g/mL}$ の処理濃度から強い細胞傷害活性が顕在化してくる $2,982\mu\text{g/mL}$ 以上の処理を行うと著しい一酸化窒素の生成が観察された (図 (2)-8)。従って、本研究で使用した持続添加濃度の範囲内においては、細胞外に生成される活性酸素は増加するが、細胞内に生成される活性酸素と一酸化窒素は、非添加処理よりも少ない生成量であることが示された (図 (2)-8)。

酢酸カドミウム (II) 水和物を添加した QR-32 細胞において細胞内外に放出される活性酸素は、持続添加濃度の範囲内において僅かに一部の濃度で非処理細胞に比べて有意な生成を認め

たが、その生成量は極めて軽微なものであった。一方で、細胞傷害性が現れる 0.3 $\mu\text{g/mL}$ 以上を添加した際には、細胞内外に放出される活性酸素は酢酸カドミウム（Ⅱ）水和物の添加濃度依存的に過剰に生成されることを見いだした。一方で、細胞内に生成される活性酸素は、すべての濃度において非処理細胞に比べて有意に増加することにはなかった。また 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 以上の添加を行っても非処理細胞に見られる活性酸素の生成を超えることはなく、ほぼ同等の生成量であった。また、一酸化窒素の生成パターンは、細胞内活性酸素の生成パターンとほぼ等しく、どの添加濃度においても非処理細胞の生成量を超えることはなく、ほぼ同等であるか、もしくは若干抑制されていた（図(2)-9）。従って、長期間に渡り持続的に酢酸カドミウム（Ⅱ）水和物の処理を行う範囲内においては、細胞内外に生成される活性酸素ならびに一酸化窒素は、非添加処理よりも少ない生成量であることが示された（図(2)-9）。

（2）原因物質のアレルギー・炎症誘導に関する検証

サブテーマ①の調査結果をもとに発表された論文成果¹⁴⁾より、PM2.5 等を含む大気汚染物質が地方都市の学童においても炎症反応を惹起し、呼吸器症状の増悪に至ることが見いだされた。そこで、その機構を明らかにするために、大気汚染物質をマウス体内に移入した際においてもヒトにおいて観察された炎症滲出反応が同じように生じるのか否かを検討した。さらに、大気汚染物質によって滲出した炎症細胞を回収して、その性状の違い（炎症細胞種の同定ならびにアレルギー・炎症関連分子の発現解析）の解析を行い、大気汚染物質に特徴的な特性について検討した。

1）大気粉塵の体内移入により滲出する細胞種の同定（表(2)-1、表(2)-2）

サブテーマ①の成果をもとに、大気汚染物質によるアレルギー・炎症反応の惹起がマウスの体内においても観察されるか否かの検証を行った。大気汚染物質をマウスの体重当たり 1,700 mg/kg あるいは 170 mg/kg を腹腔内に投与した。陽性対照として、起炎性異物であるゼラチンスポンジ（3×5×10 mm）を腹腔内に移入した⁵⁾。投与もしくは移入後 5 日目に腹腔内を生理食塩水にて洗浄して腹腔滲出細胞を回収した。正常マウスの腹腔内細胞（常在性の免疫担当細胞）の総数は、平均 $4.1 \pm 0.2 \times 10^5$ 個であったのに対し、大気汚染物質を 1,700 mg/kg あるいは 170 mg/kg 投与すると、それぞれ平均 $42.6 \pm 5.6 \times 10^5$ 個あるいは $27.0 \pm 7.8 \times 10^5$ 個と、それぞれ 10.4 倍あるいは 6.9 倍以上の炎症細胞の滲出を認めた（表(2)-1）。陽性対照で用いたゼラチンスポンジを移入した場合においては、平均 $11.1 \pm 2.7 \times 10^5$ 個と非移入マウスに対して約 2.7 倍の滲出細胞数であった。外科手術の際の止血用に用いられる低刺激性の異物（ゼラチンスポンジ）移入に比べて、大気汚染物質を移入した場合には腹腔滲出細胞数が 2.5 倍以上に著しく増加した。大気汚染物質は生体外異物のゼラチンスポンジと同様に、あるいはそれ以上顕著に炎症様反応を生体内に惹起することが確認された（表(2)-1）。

表(2)-1 大気汚染物質により誘導される滲出炎症細胞数の比較

移入物質	解析個体数	滲出細胞数 (×10 ⁵ 個)
移入無し	6	4.1 ± 0.2
大気汚染物質 (1,700 mg/kg)	8	42.6 ± 5.6
大気汚染物質 (170 mg/kg)	7	27.0 ± 7.8
ゼラチンスポンジ	5	11.1 ± 2.7

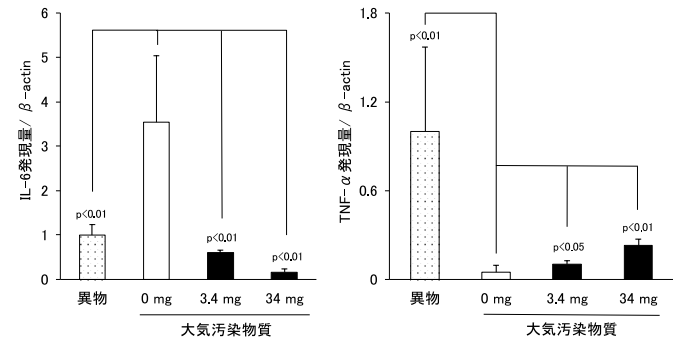
次に、表(2)-1にて回収した腹腔滲出細胞の細胞種を同定した。正常マウスの腹腔内細胞は常在性の免疫担当細胞であるが、その約77%が単球・マクロファージであり、残り15%がリンパ球、3%が顆粒球で占められていた。一方の大気汚染物質の投与によって滲出した炎症細胞のうち、約50%が好中球を主体とする顆粒球であり、30%がリンパ球、14%が単球・マクロファージであった。大気汚染物質によって誘発される炎症細胞種の割合は、移入量(1,700 mg/kgもしくは170 mg/kg)に関わらずほぼ同等であった(表(2)-2)。さらに、この滲出細胞種の割合は、ゼラチンスポンジの腹腔内移入によって滲出した炎症細胞の割合ともほぼ同等であった(表(2)-2)。従って、生体外異物によって誘発される炎症細胞の数は、異物の種類によって異なる。しかし、炎症細胞種別の割合はほぼ同等であることを明らかにした(表(2)-1、表(2)-2)。

表(2)-2 大気汚染物質により誘導される滲出炎症細胞種の割合

移入物質	単球・マクロファージ	顆粒球	リンパ球	その他
移入無し	77.0 ± 5.6%	3.0 ± 0.7%	15.0 ± 1.8%	7.0 ± 9.3%
大気汚染物質 (1,700 mg/kg)	14.0 ± 2.9%	50.0 ± 4.0%	30.0 ± 5.5%	6.0 ± 4.3%
大気汚染物質 (170 mg/kg)	10.9 ± 3.5%	50.8 ± 3.8%	33.2 ± 4.8%	5.2 ± 4.3%
ゼラチンスポンジ	12.0 ± 2.4%	51.0 ± 4.2%	27.0 ± 5.5%	10.0 ± 6.5%

2) 大気汚染物質の体内移入により滲出した炎症細胞に発現誘導されるアレルギー・炎症関連分子発現 (図(2)-10～図(2)-12)

大気汚染物質によるアレルギー・炎症の誘導は、当初の計画においては従来の生体外異物等の起炎物質によるものとは異なる誘導パターンを呈するものとして想定していた。従って、大気汚染物質によるアレルギー・炎症誘導に関わる未知の分子機構を見いだすためにアレイ解析を計画し、包括的に大気汚染物質によるアレルギー・炎症誘導に関わる機構を探る予定であった。しかしながら、平成28年度の研究成果より大気汚染物質によるアレルギー・炎症誘導には、報告者がこれまで研究してきた起炎性異物(ゼラチンスポンジ)と比較して、少なくとも誘導される炎症細胞種に違いを見いださなかったことなどから、これまでサブテーマ②において蓄積してきたゼラチンスポンジによって誘導される炎症細胞に発現誘導される炎症性サイトカインネットワークの知見をもとにして、大気汚染物質によって誘導される滲出炎症細胞との質的な違いを評価することにした。炎症性サイトカインネットワークに関わるサイトカインネットワークには、ゼラチンスポンジの移入によって誘導される炎症性サイトカイン¹⁵⁾と、平成28年度にサブテーマ①によって明らかにされた研究結果との間に共通するサイトカインを中心に抽出した。さらに、既報文献の調査からPM2.5などの大気汚染物質による毒性の程度を評価する際に用いられる炎症性サイトカインの中で、特に炎症反応誘起能を解析する場合に用いられている初期誘導型炎症性サイトカインであるInterleukin-6 (IL-6)、IL-8、tumor



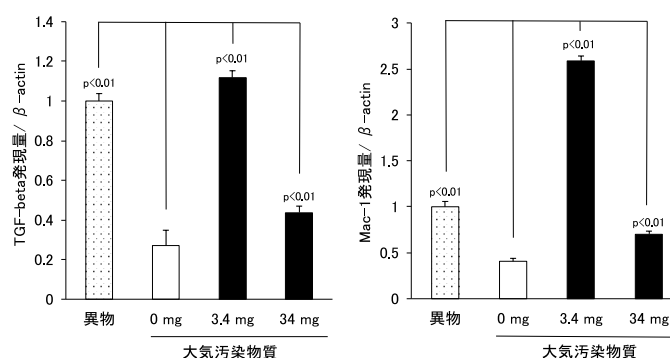
図(2)-10 大気汚染物質により誘導された滲出細胞に発現するアレルギー・炎症関連分子発現

necrosis factor- α (TNF- α)等の発現あるいは産生量をもって評価されている¹⁶⁾ことを勘案し、以下の炎症性サイトカインの発現を評価した。

初期炎症反応に関わる Interleukin-6 (IL-6)¹⁷⁾ の発現は、正常マウスにおける常在性の腹腔細胞（大気汚染物質 0 mg 投与群）において最も高値であり、大気汚染物質の投与により滲出した腹腔細胞において最も低値であった。しかも IL-6 の発現は、大気汚染物質の添加濃度に依存的な抑制が生じることを観察した。IL-6 の発現低下の現象は、ゼラチンスポンジの腹腔内移入による滲出炎症細胞においても同様に観察された（図(2)-10）。

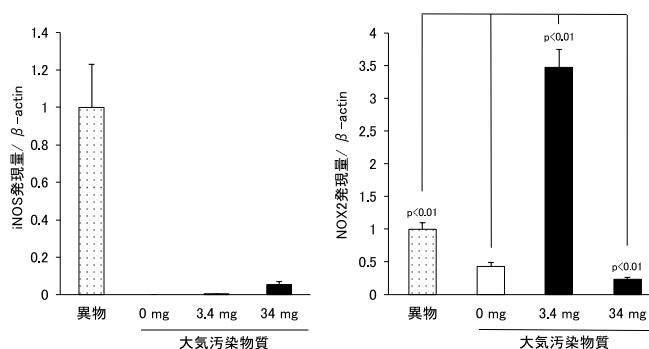
初期の炎症反応のメディエーターであり、代表的な炎症性サイトカインである Tumor necrosis factor (TNF- α)¹⁷⁾ は、炎症細胞が局所に滲出する際に必須な細胞接着分子の発現誘導等にも関わる。この TNF- α 発現は、大気汚染物質の添加により容量依存的に有意に増加することを認めた。しかしながら、その発現量は異物（ゼラチンスポンジ）の移入によって誘発される滲出炎症細胞に比べて著しく低い値であった。このことは、生体外異物であっても質的に異なる異物が体内に吸収された際に惹起される炎症反応は、少なくとも前述の滲出炎症細胞数においても差を認め、また炎症関連分子の発現レベルにおいても誘導される TNF- α などの炎症性サイトカインなどに質的な違いがあるものと考えられた（図(2)-10）。

強力な免疫抑制あるいは抗炎症性サイトカインとして作用する Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1)¹⁷⁾ の発現は、大気汚染物質の存在によって著しく誘導された。しかしながら、その発現において容量依存性は観察されず、低濃度暴露の際に発現が顕著に誘導された。その発現量は、陽性対照であるゼラチンスポンジを移入した際に滲出する炎症細胞の有する発現とほぼ同等であった。大気汚染物質による TGF- β 1 の発現誘導には、暴露の際の指摘濃度が存在するものと考えられた（図(2)-11）。



図(2)-11 大気汚染物質により誘導された滲出細胞に発現するアレルギー・炎症関連分子発現

炎症刺激を受けて白血球表面に発現される接着分子のひとつである Mac-1 (CD18)¹⁷⁾ の発現は、TGF- β 1 とほぼ同様に大気汚染物質の暴露によって著しく誘導されるが、その発現は低濃度暴露の際に顕著に誘導され、高濃度では非投与に比べて有意に増加しているが低濃度暴露に比べて著しく低値であることから、指摘濃度が存在するものと考えられた（図(2)-11）。その発現量は陽性対照のゼラチンスポンジによる滲出炎症細胞の発現よりも高値であることから、大気汚染物質によ



図(2)-12 大気汚染物質により誘導された滲出細胞に発現するアレルギー・炎症関連分子発現

って誘導される炎症性サイトカインとして Mac-1 は特徴ある分子と考えられた。

炎症刺激によって誘導される一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)¹⁷⁾ から生成される一酸化窒素は、ゲノムに対する突然変異原性のほかに、生体高分子のニトロ化やニトロシル化を介して感染防御に関わることが知られている¹³⁾。この iNOS 発現は、大気汚染物質を高濃度暴露することにより僅かに誘導されるが、これは非暴露群に比べて有意な発現量の誘導ではなかった。また、低濃度の暴露ではほとんど iNOS が誘導されないことも示された。一方で、ゼラチンスポンジの移入によって惹起される滲出炎症細胞では、iNOS 発現が著しく誘導された。このことは、体内に暴露され、吸収される異物であっても、その種類によって滲出炎症細胞に発現する iNOS 発現に大きな違いがあるものと考えられる (図(2)-12)。

好中球を含む食食細胞を中心とした殺菌作用の中心を担うケミカルメディエーターとして、活性酸素 (スーパーオキシド) がある¹⁸⁾。このスーパーオキシドの生成を司る主要な酵素である NADPH oxidase 2 (NOX2)¹⁷⁾ の発現は、大気汚染物質の暴露によって顕著に誘導された。しかし、その発現に容量依存性は認められず、低濃度暴露の際に著しく発現が誘導された。また、大気汚染物質の添加によって誘導される NOX2 の発現量は、陽性対照のゼラチンスポンジ移入の際の滲出細胞に比して著しく増加していた。さらに、高濃度の汚染物質を暴露した際には NOX2 の発現誘導が生じないことから、指摘濃度が存在するものと考えられた (図(2)-12)。

(3) 原因物質等による細胞がん化に関する検証

1) 発がん関連分子の発現誘導による細胞がん化能の評価系の構築

大気汚染物質、黄砂やそれに付着する化学物質等によるがん化の有無を発がん関連分子の発現によって予め推定する評価系の構築を試みた (図(2)-2)。発がん関連分子の候補としては、QR-32 細胞が炎症の存在下にごん化するモデル¹⁹⁾に報告した成果をもとにした。すなわち、第一に QR-32 細胞と炎症細胞との混合培養によりプロスタグランジン E2 の産生が亢進していたこと²⁰⁾。第二に、生体内におけるプロスタグランジン E2 の産生増加がもたらす影響として、がん細胞に対する細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocytes) の誘導期ならび傷害期を強力に抑制することで、生体内におけるがん細胞の増殖性の獲得 (がん化) を担うこと²¹⁾を見いだしている。これらの研究成果をもとに、プロスタグランジン E2 の合成酵素である cyclooxygenase-2 (COX-2) を QR-32 細胞の細胞がん化能を評価する候補遺伝子発現とした (図(2)-2)。QR-32 細胞の細胞がん化を規定する COX-2 の発現の誘導があったか否かを簡便に評価できる系を構築し、大気汚染物質・黄砂やそれに付着する多数の化学物質等によるがん化能の有無を短期間に鋭敏に解析・評価できるシステム作りを行った。この目的のために、マウス COX-2 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、発光ルシフェラーゼ遺伝子に連結した発現ベクターを構築し、発光を指標にした発がん性の評価系の構築を試みた (図(2)-2)。

COX-2 プロモーターの活性化の程度を発光シグナルによって検出する改良型 QR-32 細胞株は、COX-2 のプロモーターの長さの違いによって 3 種類の遺伝子をクローニングし、その塩基長別に 1,000 bp (COX-2S)、1,889 bp (COX-2M)、3,234 bp (COX-2L) と設定した。COX-2S、COX-2M、COX-2L と発光ルシフェラーゼ遺伝子に連結した発現ベクターコンストラクトを、それぞれ QR-32 細胞に遺伝子導入し、クローン細胞株を得た (図 (2)-13~図 (2)-15)。なお、陽性細胞クローンは、COX-2 の誘導因子であり、かつ炎症環境下のシグナル伝達 (NF- κ B や MAP キナーゼ) の活性化を引き起こし、これらの伝達経路を介して種々の炎症性サイトカインの分泌を促進する作用を持つ起炎症リポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) を添加培養した²²⁾。LPS 刺激により、COX-2 プロモーターが駆動され、その結果としてルシフェラーゼ遺伝子発現による発光量の増加を指標として選択した。

COX-2S コンストラクトを遺伝子導入した QR-32 細胞からは、24 系のクローンを得た。そのうち、起炎剤 LPS (10 μ g/mL) を添加した後に発光強度が増加したクローンは 1 系 (COX-2S-7) であった (図 (2)-13)。また、COX-2M コンストラクトを遺伝子導入した QR-32 細胞からは、24 系のクローンを得た。そのうち、LPS を添加した後に発光強度が増加したクローンは COX-2M-24 と

COX-2M-26 の 2 系であった (図 (2)-14)。COX-2L コンストラクトを遺伝子導入した QR-32 細胞からは、8 系のクローンを得た。そのうち、LPS を添加した後に発光強度が増加したクローンは COX-2L-38 と COX-2L-48 の 2 系であった (図 (2)-15)。以上より、LPS の添加培養により炎症様の反応を与えた COX-2 コンストラクト導入 QR-32 細胞株において、ルシフェラーゼによる発光量として QR-32 細胞のがん化能を評価することのできる候補細胞株 5 系を得ることができた。LPS 刺激を加えた後の発光に関する安定性を確認するとともに、発光量をより鋭敏・高感度に検

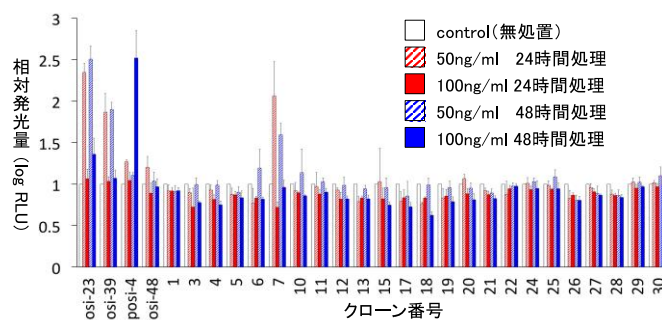


図 (2)-13 大気汚染物質による発がんを予測する発がん関連分子COX-2Sの評価系構築

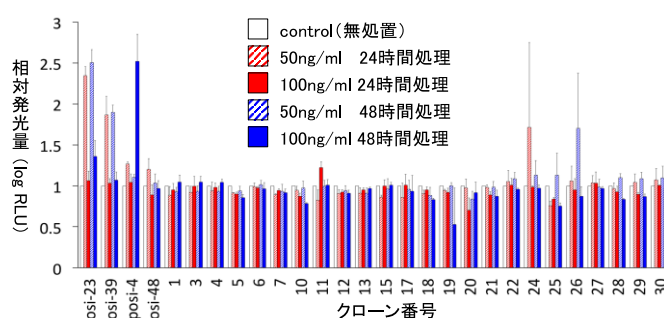


図 (2)-14 大気汚染物質による発がんを予測する発がん関連分子COX-2Mの評価系構築

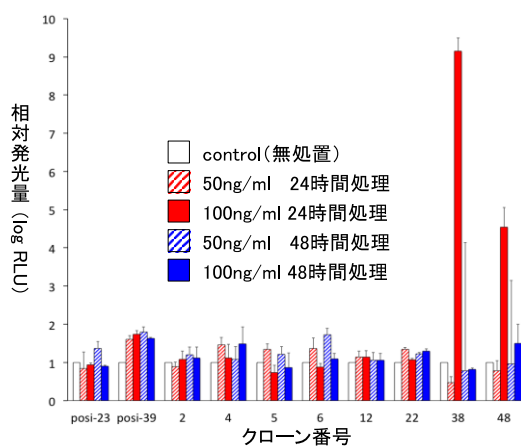


図 (2)-15 大気汚染物質による発がんを予測する発がん関連分子COX-2Lの評価系構築

出するための改良を試みて、大気汚染物質ならびにこれに付着する金属等の発がん性の予測に用いる予定である。

2) 大気汚染物質ならびに金属等による発がん性評価 (図(2)-16 ; 表(2)-3～表(2)-4)

サブテーマ①の調査結果より、大気汚染物質・黄砂、PM2.5に付着している銅、鉄、亜鉛、カドニウム、鉛が主としてヒト健康に影響を与える因子であったことから、これらの物質の作用を長期間にわたり直接添加暴露した細胞が発がん化するか否かを検討した。この目的を達成するために培養細胞に上記の大気汚染物質あるいは金属等を添加継続培養する研究手法を選択した。細胞は、マウスのクローン線維肉腫細胞 (BMT-11 c1-9) を突然変異原物質で処理した後に得たクローン細胞で、培養条件下では増殖維持できるが、これを正常同型宿主の体内に移植した際には自然退縮する退縮型がん細胞 (QR-32 細胞) を用いた。この QR-32 細胞のマウス個体内における増殖性の回復を発がん化と見立てて、これまでに種々の発がん要因の特定を行ってきた。特定に至った環境発がん物質の中から陽性対照として酸化チタン²³⁾を選んだ。また、タバコ煙の水溶物も陽性対照として用いた。加えて、QR-32 細胞の発がん性が確認された際には、次の検証実験として、ヒト気道上皮細胞株 (BEAS-2B) を用いた実験条件の検討も併行して進めた。

QR-32 細胞に大気汚染物質、硫酸銅 (II) 五水和物 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、塩化鉄 (II) 四水和物 ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、塩化鉄 (III) 六水和物 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、塩化亜鉛 (ZnCl_2)、酢酸カドミウム (II) 二水和物 ($\text{C}_4\text{H}_6\text{CdO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、酢酸鉛 (II) 三水和物 ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) を添加培養した。陽性対照には、タバコ煙水溶液や酸化チタンを同じく長期間連続添加培養した。濃度はそれぞれ、1,700 $\mu\text{g/mL}$ 、0.34 $\mu\text{g/mL}$ 、11.73 $\mu\text{g/mL}$ 、1.60 $\mu\text{g/mL}$ 、1.91 $\mu\text{g/mL}$ 、0.02 $\mu\text{g/mL}$ 、0.48 $\mu\text{g/mL}$ 、33.0 $\mu\text{g/mL}$ 、312.0 $\mu\text{g/mL}$ を用いた。陰性対照には培地添加のみとした。

発がん性の獲得の有無は、以下の 2 つの方法により評価した。第一に、培養条件下でのがん化能獲得を評価することのできる 3 次元培養 (スフェア形成能の有無) と、マウス生体内に接種することで致死増殖能を獲得したか否かを用いた。

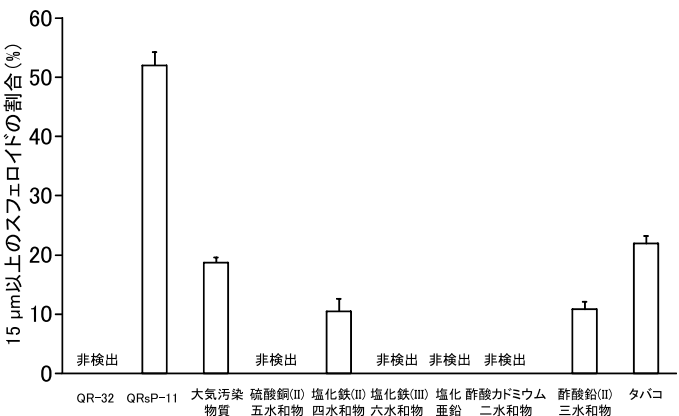
前者の 3 次元培養下で細胞凝集塊 (スフェア) 形成能による発がん性評価は、がん細胞においてはアノイキス (細胞が基質との接着が妨げられることを契機として生じる細胞死) を回避する能力があること、逆に正常細胞にはアノイキス抵抗性が獲得されていない特性を利用した評価系である²⁴⁾。培養プラスチックプレートの細胞接着面をアガロースで覆い、細胞がプラスチックプレート基質に接することを妨げた際の細胞生存率や、スフェア (3 次元的に細胞凝集塊を形成して増殖) を形成した長径ならびにスフェア形成の有無によっ

表(2)-3 大気汚染物質ならびにその付着金属等による暴露処理細胞の3次元スフェア培養下での生存率

処理	生存率 (%)	p値 vs QR-32
QR-32(非添加)	3.2 ± 1.0	
QRsP-11	69.9 ± 4.3	p=0.0001
大気汚染物質	13.6 ± 5.5	p=0.0326
硫酸銅(II)五水和物	3.5 ± 2.2	p=0.8577
塩化鉄(II)四水和物	9.3 ± 4.4	p=0.0819
塩化鉄(III)六水和物	5.0 ± 2.2	p=0.2912
塩化亜鉛	4.8 ± 2.8	p=0.4294
酢酸カドミウム二水和物	4.9 ± 2.3	p=0.3315
酢酸鉛(II)三水和物	3.5 ± 2.3	p=0.8624
タバコ煙水溶液	14.8 ± 5.0	p=0.0175

て細胞がん化を類推した。

はじめに、非添加の QR-32 細胞ならびに大気汚染物質やその付着金属等の持続添加培養を行った際の細胞株を 3 次元培養した際の細胞生存率を調べた。なお、評価に用いた細胞は、いずれも添加培養後 180 日以降の処理を行ったものを使用した。表(2)-3 に示すように 3 次元培養下では、非処理細胞の QR-32 細胞は僅かしか生存していないが、陽性対照細胞である QR-32 細胞由来のがん化株 (QRsP-11 癌細胞) では有意に細胞が生存していた。一方の、大気汚染物質とタバコ煙水溶液の添加培養を施した細胞株では、いずれも有意に細胞の生存率が増加していた。しかしながら、硫酸銅 (Ⅱ) 五水和物、塩化鉄 (Ⅱ) 四水和物、塩化鉄 (Ⅲ) 六水和物、塩化亜鉛、酢酸カドミウム (Ⅱ) 二水和物、酢酸鉛 (Ⅱ) 三水和物の長期間暴露を受けた細胞株においては、いずれも細胞の生存率が非添加細胞に比べて有意に増加することは観察されなかった。このことは、少なくとも大気汚染物質とタバコ煙水溶液には、細胞がん化を促す作用があることが推定された。次に、これらの処理細胞が細胞凝集塊 (スフェア) を形成する能力を獲得したか否かを調べた (図(2)-16)。



図(2)-16 大気汚染物質等の継続添加培養した細胞のスフェア形成能

非添加培養を繰り返しただけではスフェア形成能を獲得しなかった。陽性対照細胞であるがん化株 (QRsP-11 癌細胞) は、播種細胞の中で半数以上がスフェアを形成した。QRsP-11 癌細胞の形成率には及ばないが、少なくとも大気汚染物質、塩化鉄 (Ⅱ) 四水和物、酢酸鉛 (Ⅱ) 三水和物とタバコ煙水溶液の長期間暴露を受けると細胞がん化を促進する作用のあることが推定された (図(2)-16)。

マウス個体を用いた発がん評価は、添加暴露処理した細胞を正常同系マウスに移植し、本来自然退縮する細胞特性が致死増殖するように転換することを指標として細胞がん化能を獲得したか否かを識別評価した (図(2)-3 右)。添加培養後 30 日ごとに処理細胞の一部を回収してマウス皮下に 1×10^7 個移植した。2017 年 3 月 21 日現在におけるマウス個体内における致死増殖能 (が

表(2)-4 大気汚染物質ならびに金属等による発がん性評価

処理	致死増殖マウス / 移植マウス (添加培養日数)					
	30日	60日	90日	120日	150日	180日
非添加	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
大気汚染物質	0/15	0/9	0/9	0/12	0/9	0/9
硫酸銅(Ⅱ)五水和物	0/9	0/9	0/9	0/9	0/6	0/9
塩化鉄(Ⅱ)四水和物	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
塩化鉄(Ⅲ)六水和物	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
塩化亜鉛	0/9	0/9	0/9	1/9	0/9	1/9
酢酸カドミウム二水和物	0/9	0/9	0/9	0/9	0/6	0/9
酢酸鉛(Ⅱ)三水和物	0/9	0/8	0/9	0/9	3/9	2/9
タバコ煙	0/6	0/6	0/6	0/3	0/3	0/3
酸化チタン	6/10*	NT	NT	NT	NT	NT

*p<0.05 vs 非添加

ん化)の有無を表(2)-4に纏めた。非添加群(培地の添加のみ)ではいずれの個体も腫瘍の形成を観察しなかった。また、大気汚染物質においても添加後180日を経過したが致死増殖する個体は観察されなかった。さらに、硫酸銅(Ⅱ)五水和物、塩化鉄(Ⅱ)四水和物、塩化鉄(Ⅲ)六水和物、酢酸カドミウム(Ⅱ)二水和物の添加においても同様であった。塩化亜鉛は、添加開始後120日目および180日目に9例中1例が腫瘍増殖した。酢酸鉛(Ⅱ)三水和物では、添加開始後150日目の細胞を移植した9例のマウスうち3例が腫瘍増殖した。また、180日目の細胞を移植した9例のマウスうち2例が腫瘍増殖した。陽性対照として想定していたタバコ煙水溶物の添加処理においても、腫瘍増殖をする個体は現在までに観察されなかった。一方で、酸化チタンの処理を施したQR-32細胞は、僅か30日間の処理によって10例中6例で有意な腫瘍増殖が観察された。なお、大気汚染物質やその他の金属類は現在も添加培養を継続し、発がんの有無を検討している。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

黄砂、SPM、PM_{2.5}等を含む大気汚染物質は、実験動物(マウス)において炎症反応を惹起させることを検証した。すなわち、大気汚染物質をマウス体内に暴露すると、炎症細胞の滲出を有意に増加させた。生体外異物として宿主に認識されるであろう大気汚染物質は、同じく生体外異物であるゼラチンスポンジの体内移入によって生じる炎症細胞の滲出の程度に比べて、明らかに滲出する炎症細胞を多数誘導し、しかも容量依存的な増加を指名した。非移入マウス(正常マウス)に存在する常在性の免疫担当細胞数に比べて、ゼラチンスポンジを移入すると約2.7倍の炎症細胞が滲出するのに対して、大気汚染物質を170 mg/kgもしくは1,700 mg/kg腹腔内に投与すると、それぞれ約6.9倍もしくは約10.4倍に増加した。生体にとっては同様の異物であっても、異物の種類により滲出する炎症細胞数に違いを与えることを見いだした。特に大気汚染物質の暴露を受けたマウス生体においては、顕著な炎症細胞の滲出が誘導されることを初めて実証した。さらに、いずれの異物の移入によっても滲出炎症細胞種は、顆粒球を主としており、滲出炎症細胞の種類とその割合には大気汚染物質とゼラチンスポンジの間には大きな差を認めなかった。

大気汚染物質によって誘発された滲出炎症細胞には、アレルギー・炎症反応に関連する分子のうち、大気汚染物質に特徴的なTNF- α 、TGF- β 、Mac-1、NOS2の発現亢進と、IL-6の発現減少が観察された。また、iNOSは大気汚染物質によってほとんど誘導されなかった。このiNOS遺伝子発現によって生成される一酸化窒素は、培養細胞株に大気汚染物質を添加培養した際にも非添加細胞に生成される一酸化窒素よりも低値であったことから、大気汚染物質は一酸化窒素の生成を促す作用は乏しいという事実は、おそらく普遍的で生理的な現象であると考えられる。加えて、一般にiNOSは通常の状態では発現しておらず、炎症やストレス刺激により広範囲の組織で強く誘導されることが知られている。事実、代表的な生体外異物であるゼラチンスポンジの挿入によって滲出した炎症細胞には、強いiNOSの誘導が観察された(図(2)-12)。このことから、暴露された大気汚染物質は、生体内においてはゼラチンスポンジと同様に生体外異物として認識されるが、炎症関連分子の発現レベルの違いから、炎症の内容(質)が大きく異なることも初めて明らかにした。一方の活性酸素は、その生成に関わる主要な酵素である

NOX2 の発現が大気汚染物質の暴露により著しく誘導され、さらに培養細胞に大気汚染物質を添加した際にも活性酸素の過剰な生成が確認されたことから、大気汚染物質は活性酸素の生成を著しく促す普遍的な物質であると考えられた。以上の成果より、培養細胞ならびに生体に暴露された大気汚染物質は、一酸化窒素の生成には大きく関わらず、一方の活性酸素の生成には促進的に関わることを初めて見いだした。

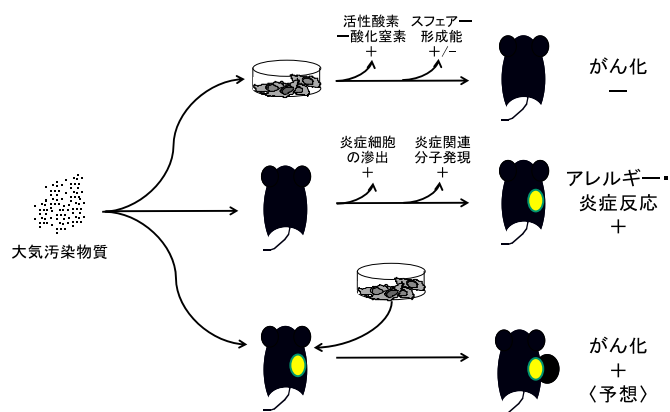
大気汚染物質およびこれに付着する金属を添加培養したマウス退縮型細胞の細胞がん化に関しては、3次元培養を施行した結果、長期間の培養添加処理細胞の一部においては細胞がん化に向かっている処理群（大気汚染物質とタバコ煙水溶液）もあることも示されたが、少なくとも添加処理を開始してから 180 日を経過した段階においては、マウス生体内において有意にがん化した処理群は一部を除き観察することはできなかった。現在も持続添加培養を継続しており、大気汚染物質およびこの付着金属等が直接細胞に対してがん化をもたらすか否かを決定する。しかしながら、報告者が今回使用した解析系と同様の系を駆使して証明した酸化チタンによる細胞がん化との間には明確な差異を認めている。すなわち、細胞に対して直接がん化させる能力を持つ酸化チタンに代表される生体外異物の場合は、比較的短期間内（おおよそ 1 ヶ月間）の添加培養のみでがん化に至っている²³⁾。この現象は、本研究においてもその短期間内の発がん性の獲得を検証することができた（表(2)-4）。従って、少なくとも現時点においては、大気汚染物質およびこれに付着する金属等が細胞がん化を直接誘導するという結論には至っていない。

当該研究にて明らかになったことは、大気汚染物質およびこれに付着する金属は、明らかに顕著な起炎物質となることがヒトだけでなく、実験動物のレベルに置いても検証することができた。従って、2013 年に

International agency for research on cancer (IARC)¹⁾ が大気汚染物質をヒトにおいて発がん性があるグループ 1 に認定したその直接的な発がん原因には、大気汚染物質およびこの付着金属等が誘発する遷延した炎症環境が正常細胞の発がん過程（炎症発がん）、あるいは前がん病変からがん化への進展、もしくはがん細胞の悪性化進展（転移・浸潤等の獲得）過程に関わる可能性が考えられ、

当該研究の最終結論を導く上で今後の重要な検討課題と捉えている。炎症を惹起させ、これを維持させて慢性化させる動物モデルや、自然転移を形成するモデル等幾系かの動物モデル等を準備していることから、今後は大気汚染物質およびこの付着金属等によって誘発された慢性炎症組織における発がん性ならびにがん細胞の悪性化進展の有無に焦点を当てた研究を進める予定である（図(2)-17）。

当該研究を施行した今後の懸念課題として、大気汚染物質は、培養添加実験を行うためにやむなく焼灼大気汚染物質（NIES CRM, No. 28）を使用した。しかしながら、大気汚染物質は越



図(2)-17 研究成果を踏まえた大気汚染物質による発がんの可能性

境飛来由来のものを含めて細菌、孢子等の付着も報告され、これら生菌微生物の及ぼす生物学的作用（発がん性）と焼灼した生体外異物のみの作用で及ぼす生体反応の差異も今後の研究課題と捉えている。

（２）環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

記載すべき事項は現時点においてない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

PM2.5を含む大気汚染物質がヒトにおいて発がん性が認められるグループ1に認定を受けたことは2013年に新聞・テレビ等の報道により広く国民に周知され、大きな反響は現在も続いている。しかしながら、大気汚染物質による発がんメカニズムの詳細は不明であり、このことが主な原因となって抜本的な対策を取ることが難しい状況にある。本研究結果により、少なくとも実験レベルにおいては、大気汚染物質およびこれに付着する金属等の物質には培養細胞に対してこれを直接がん化させる可能性は低いことを初めて示すことができた。一方で、大気汚染物質の暴露を受けたマウス生体においては、他の生体外異物に対するものと比べて顕著な炎症反応を惹起することも確認した。このことは、大気汚染物質の暴露によって誘発される慢性炎症環境を背景とする発がんを生じている可能性が高く、大気汚染物質を“炎症発がん”を誘発する新たな要因の一つとして捉え直して考えることも今後の重要な課題と思われる。

6．国際共同研究等の状況

記載すべき事項はない。

7．研究成果の発表状況

（１）誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) M. WATANABE, J. KURAI, H. NOMA, T. WATANABE, S. MINATO, H. SANO, F. OKADA, A. YAMASAKI and E. SHIMIZU: Ann. Public Health Res., (2, 1), 1015 (2015)
Exposure to Metals Bound to Particles and Pulmonary Function of School Children in Western Japan.
- 2) Y. KANDA, M. OSAKI and F. OKADA: Int. J. Mol. Sci., (18, 4), 867 (2017)
Chemopreventive Strategies for Inflammation-related Carcinogenesis: Current Status and Future Direction.

<査読付論文に準ずる成果発表>

記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表 (学会等)

- 1) 岡田 太：第23回日本がん予防学会総会 (2016)
「炎症発がん予防への実験的挑戦」 (シンポジウム「臓器・病態に応じたがん予防に向けて」)
- 2) 岡田 太：第25回日本がん転移学会学術集会 (2016)
「異物誘発炎症による発癌・悪性化進展」 (シンポジウム「炎症と転移～がんの進展と転移における炎症・微小環境の役割～」)

(3) 知的財産権

記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

記載すべき事項はない。

(6) その他

記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) D. LOOMIS, Y. GROSSE, B. LAUBY-SECRETAN B, El. F. GHISSASSE, V. BOUVARD, L BENBRAHIM-TALLAA, N GUHA, M. H. BAAN, H. MATTOCK, K. STRAIF and International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group IARC: Lancet Oncol., (13), 1262-1263 (2013)
The Carcinogenicity of Outdoor Air Pollution.
- 2) H. F. STICH, L. Wei and R. F. WHITING: Cancer Res., (39, 10), 4145-4151 (1979)
Enhancement of the Chromosome-damaging Action of Ascorbate by Transition Metals.
- 3) E. I. GONCHAROVA and T. G. ROSSMAN: Cancer Res., (54, 20), 5318-5323 (1994)
A Role for Metallothionein and Zinc in Spontaneous Mutagenesis.
- 4) Y. S. HWUA and J. L. YANG: Carcinogenesis, (19, 5), 881-888 (1998)
Effect of 3-aminotriazole on Anchorage Independence and Mutagenicity in Cadmium- and Lead-treated Diploid Human Fibroblasts.
- 5) F. OKADA, H. SHIONOYA, M. KOBAYASHI, T. KOBAYASHI, H. TAZAWA, K. ONUMA, Y. IUCHI, N. MATSUVARA, T. IJICHI, B. DUGAS and M. HOSOKAWA: Br. J. Cancer, (94, 6) 854-862 (2006)
Prevention of Inflammation-mediated Acquisition of Metastatic Properties of Benign Mouse Fibrosarcoma Cells by Administration of an Orally Available Superoxide Dismutase.
- 6) F. OKADA: Yonago Acta Med., (57), 65-72 (2014)
Inflammation-related Carcinogenesis: Current Findings in Epidemiological Trends,

Causes and Mechanisms.

- 7) H. TAZAWA, K. KAWAGUCHI, T. KOBAYASHI, Y. KURAMITSU, S. WADA, Y. SATOMI, N. NISHIO, M. KOBAYASHI, Y. KANDA, M. OSAKI, T. KIYTAGAWA, M. HOSOKAWA and F. OKADA: *Exp. Cell Res.*, (319), 2835-2844 (2013)
Chronic Inflammation-derived Nitric Oxide Causes Conversion of Human Colonic Adenoma Cells into Adenocarcinoma Cells.
- 8) S. WU, F. DENG, Y. HAO, M. SHIMA, X. WANG, C. ZHENG, H. WEI, H. LV, X. LU, J. HUANG, Y. QIN and X. GUO: *J. Hazard Mater* (260), 183-191 (2013)
Chemical Constituents of Fine Particulate Air Pollution and Pulmonary Function in Healthy Adults: the Healthy Volunteer Natural Relocation Study.
- 9) D. E. GARDNER, G. L. KENNEDY: (D. E. GARDNER, J. D. CRAPP and R. O. MCCLELLAN, Ed., In: *Toxicology of the lung*), Raven Press, New York, 1-2 (1993)
Methodology and Technology for Animal Inhalation Toxicology Studies.
- 10) S. GAO, K. CHEN, Y. ZHAO, C. B. RICH, L. CHEN, S. J. LI, P. TOSELLI, P. STONE and W. LI: *Toxicol Sci*, (87), 197-203 (2005)
Transcriptional and Posttranscriptional Inhibition of Lysyl Oxidase Expression by Cigarette Smoke Condensate in Cultured Rat Fetal Lung Fibroblasts.
- 11) U.S. Environmental Protection Agency. EPA/600/P-99/002bF; National Center for Environmental Assessment-RTP Office: Research Triangle Park, NC, (2), (2004)
Air Quality Criteria for Particulate Matter.
- 12) IARC Monograph, (38), 163-198 (1986)
Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans
- 13) Y. KANDA, M. OSAKI and F. OKADA: *Int. J. Mol. Sci.*, (18, 4): 867 (2017)
Chemopreventive Strategies for Inflammation-related Carcinogenesis: Current Status and Future Direction.
- 14) M. WATANABE, H. NOMA, J. KURAI, H. SANO, D. HANTAN, M. UEKI, H. KITANO and E. SHIMIZU: *Int. J. Environ. Res. Public Health*, (13, E983), (2016)
Effects of Short-term Exposure to Particulate Air Pollutants on the Inflammatory Response and Respiratory Symptoms: A Panel Study in Schoolchildren from Rural Areas of Japan.
- 15) K. ONUMA, Y. KANDA, I. SUZUKI IKEDA, R. SAKAKI, T. NONOMURA, M. KOBAYASHI, M. OSAKI, M. SHIKANAI, H. KOBAYASHI and F. OKADA: *Nutrients* (7, 12), 10237-10250 (2015)
Fermented Brown Rice and Rice Bran with *Aspergillus oryzae* (FBRA) prevents Inflammation-related Carcinogenesis in Mice, by Inhibiting Infiltration of Inflammatory Cells.
- 16) S. MITSCHIK, R. SCHIERL, D. NOWAK and R. A. JORRES: *Inhal. Toxicol.*, (20, 4), 399-414 (2008)
Effects of Particulate Matter on Cytokine Production In Vitro: a Comparative Analysis of Published Studies.

- 17) 西脇 徹、松島綱治：朝倉書店，1-572（2009）炎症・再生医学事典
- 18) F. OKADA, M. KOBAYASHI, H. TANAKA, T. KOBAYASHI, H. TAZAWA, Y. IUCHI, K. ONUMA, M. HOSOKAWA, M. C. DINAUER and N. H. HUNT: *Am. J. Pathol.* (169, 1), 294-302 (2006)
The Role of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase-derived Reactive Oxygen Species in the Acquisition of Metastatic Ability of Tumor Cells.
- 19) F. OKADA, M. HOSOKAWA, J. HAMADA, L. HASEGAWA, T. MIZUTANI, N. TAKEICHI and H. KOBAYASHI: *Jpn. J. Cancer Res.* (84), 1230-1236 (1993)
Progression of Weakly Tumorigenic Mouse Fibrosarcoma at the Site of Early Phase of Inflammation Caused by Plastic Plates.
- 20) F. OKADA, M. HOSOKAWA, J. HAMADA, J. HASEGAWA, M. KATO, M. MIZUTANI, J. REN. N. TAKEICHI and H. KOBAYASHI: *Br. J. Cancer* (66), 635-639 (1992)
Malignant Progression of a Mouse Fibrosarcoma by Host Cells Reactive to a Foreign Body (gelatin sponge).
- 21) F. OKADA, M. HOSOKAWA, J. HASEGAWA, M. ISHIKAWA, I. CHIBA, Y. NAKAMURA and H. KOBAYASHI: *Cancer Immunol. Immunother.*, (31), 358-364 (1990)
Regression Mechanisms of Mouse Fibrosarcoma Cells after In Vitro Exposure to Quercetin: Diminution of Tumorigenicity with a Corresponding Decrease in the Production of Prostaglandin E2.
- 22) M. GIROUX and A. DESCOTEAUX: *J. Immunol.*, 2000 (165, 7), 3985-3991 (2000)
Cyclooxygenase-2 Expression in Macrophages: Modulation by Protein Kinase C- α .
- 23) K. ONUMA, Y. SATO, S. OGAWARA, N. SHIRASAWA, M. KOBAYASHI, J. YOSHITAKE, T. YOSHIMURA, M. IIGO, J. FUJII and F. OKADA: *Am. J. Pathol.*, (175, 5), 2171-2183 (2009)
Nano-scaled Particles of Titanium Dioxide Convert Benign Mouse Fibrosarcoma Cells into Aggressive Tumor Cells.
- 24) J. Rak, Y. MITSUHASHI, V. ERDOS, S. N. HUANG, J. FILMUS and R. S. KERBEL: *J. Cell Biol.*, (131, 6 Pt 1), 1587-1598 (1995)
Massive Programmed Cell Death in Intestinal Epithelial Cells Induced by Three-dimensional Growth Conditions: Suppression by Mutant c-H-ras Oncogene Expression.

(3) 黄砂、PM2.5の成分解析

学校法人京都薬科大学

薬学部 公衆衛生学分野

渡辺徹志、若林敬二、山岸伸行、長谷井友尋

〈研究協力者〉

学校法人長崎国際大学 薬学部 衛生化学研究室 出口雄也

平成26(開始年度)～28年度累計予算額：29,873千円（うち平成28年度：8,500千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

黄砂及びPM2.5によるヒト健康影響が報告されており、その原因物質の解明が急がれている。本研究では、黄砂及びPM2.5の飛散と喘息増悪に関与すると考えられる大気中のエンドトキシン及びタンパクとの関係について明らかにするため、2014年5月から2016年5月まで長崎県佐世保市と京都府京都市において大気粉塵（PM2.5、粗大粒子）を捕集し、粉塵中に含まれるエンドトキシン、タンパク、イオンを分析した。また、2015年と2016年の3月から5月と2016年9月から11月に総大気粉塵（TSP）を捕集し、同様の検討を行った。その結果、佐世保市、京都市とも春季の黄砂飛散時にエンドトキシン濃度が上昇することがわかった。また、佐世保市では10月から11月、京都市では7月から10月に粗大粒子中のエンドトキシン濃度が著しく上昇することが明らかになった。一方、タンパクは、いずれの地点においてもPM2.5に多く存在し、季節的変動が少ないことがわかった。また、黄砂が多く飛散する春季を中心に佐世保市及び京都市において捕集した大気粉塵（PM2.5、粗大粒子、TSP）についてSDS-ポリアクリアミドゲル電気泳動により解析を行った。その結果、粉塵に含まれる主なタンパクは分子量が1.5 kDaあるいはそれ以下の小さなものであることが示唆された。さらに、春季及び秋季に両地点において捕集したPM2.5と粗大粒子について高速液体クロマトグラフ-質量分析により成分分析を行った。その結果、黄砂やPM2.5の飛散が観測された期間とそうでない期間に捕集した大気粉塵でクロマトグラム上、顕著な差がないことがわかった。TNF- α の誘導能を評価するための細胞試験系を作製し、春季及び秋季に両地点で捕集したPM2.5と粗大粒子の抽出物の活性を試験した。その結果、エンドトキシン含量が多い粗大粒子の抽出物に強い誘導能がみられた。以上の結果、黄砂飛散時及び秋季の粉塵はエンドトキシンが多く含んでおり、そのために炎症性サイトカインが誘導され炎症反応の増悪に関与する可能性があると考えられた。

[キーワード]

PM2.5、粗大粒子、エンドトキシン、リポポリサッカライド、タンパク

1. はじめに

黄砂は、中国大陸内陸部の乾燥地域において巻き上げられた土壌粒子が偏西風により中国東部や日本に輸送されたものであり、日本へは年間を通じて飛来するが、特に春季に高濃度の黄砂の飛散が多く観測される。PM2.5は、大気中に浮遊する粒子状物質のうち、粒径が $2.5\ \mu\text{m}$ の粒子を50%の割合で分離することができる分粒装置を用いて、より粒径の大きい粒子を除去した後に採取される粒子をさし、石炭や石油などの化石燃料や木材などの燃焼により大気中に放出されるガス状物質や塗装工場などにおいて溶剤類が蒸発して大気中に移行したガス状物質などが大気中で反応して生成する二次粒子と黄砂中の微細な粒子など発生源から直接大気中に移行する一次粒子から構成されている。中国では経済発展に伴い、PM2.5による深刻な大気汚染が発生し、これらが日本に飛来する越境大気汚染が発生している。一方、近年、黄砂に細菌、真菌等の微生物が付着し、長距離輸送されることが明らかになってきた。グラム陰性菌の外膜成分であるエンドトキシン（リポポリサッカライド、LPS）は、喘息増悪作用を有することが報告されており、真菌中のタンパク質はアレルゲンとして作用し、喘息の発症に関与すると考えられている。これらのことから、黄砂飛散時やPM2.5飛散時には大気中のエンドトキシンやタンパクが長距離輸送されることにより濃度が上昇し、健康影響が発生することが懸念されるが、エンドトキシンやタンパクの大気中の濃度に関する調査は日本ではこれまでほとんど行われてこなかった。

私達は、日本の最西端に位置し長距離輸送の影響が大きいと考えられる長崎県佐世保市とそこから約590 km東に位置し長距離輸送の影響が少ないと考えられる京都府京都市において大気粉塵捕集し、エンドトキシン、タンパク質、イオン類及びその他の成分について長期にわたって調査した。

2. 研究開発目的

これまでの研究成果から黄砂、PM2.5のヒトへの毒性に関与している可能性があるエンドトキシンとタンパクについて年間の大気中の濃度を明らかにするとともに、それらと黄砂及びPM2.5の飛散との関係について明らかにする。また、黄砂、PM2.5 飛来時に特有にみられる越境大気汚染の状況の判別に有効な化学成分（タンパク等）が存在するか検索する。さらに、炎症反応などと黄砂及びPM2.5の飛散との関連性について検討する。

3. 研究開発方法

（1）黄砂、PM2.5飛散時および非飛散時の大気粉塵中のエンドトキシン（LPS）、タンパク、イオン類の定量的評価

佐世保市及び京都市において2014年5月から2016年5月まで原則として1週間分ずつ、大気粉塵をPM2.5と粗大粒子（ $>PM2.5$ ）にわけてハイボリウムエアサンプラーを用いて捕集した。また、2015年と2016年の3月から5月と2016年9月から11月に佐世保市及び京都市において24時間分ずつ総大気粉塵（TSP）をハイボリウムエアサンプラーを用いて捕集した。PM2.5とTSPの捕集には石英繊維製フィルターを、粗大粒子の捕集にはガラス繊維製フィルターを用いた。なお、各フィルターは250℃で2時間加熱処理した後、捕集に用いた。各フィルターは恒湿恒量化した後、粉塵捕集前後に秤量し、重量差と積算空気吸引量から大気中の粉塵濃度を算出した。各フィルターの一定量を細切し、氷冷下、エンドトキシン・フリーの0.025% Tween 20溶液を用いて超音波抽出し、抽出液

中のエンドトキシンをリムルステストにより定量した。なお、エンドトキシンの定量にはエンドトキシン・フリーのプラスチック器具を使用した。同抽出液について、タンパクをマイクロBCA法により定量した。また、各フィルターの一定量を細切し、注射用水を用いて超音波抽出し、抽出液中の Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 、 Na^{+} 、 NH_4^{+} 、 NO_3^{-} 、 SO_4^{2-} 、 Cl^{-} をイオンクロマトグラフ法により定量した。

(2) 越境大気汚染に関連する化学成分の検索

佐世保市において2014年5月第1週、第5週及び同年7月第4週に捕集したPM2.5と粗大粒子並びに京都市において2014年4月第1週～5月第1週、5月第5週及び7月第4週に捕集したPM2.5と粗大粒子の一定量について注射用水を用いて超音波抽出して得た抽出物を凍結乾燥後、reducing sample bufferに再溶解しSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を行った。また、佐世保市と京都市の両地点において2015年3月から5月の3カ月にわたり捕集したTSPについても同様に試料を調製し、SDS-PAGEを行い、SDS-PAGE後のゲルを銀染色した。さらに、佐世保市と京都市の両地点において2015年3月から5月と2015年9月から11月の6カ月にわたり1週間分ずつ毎月4週間分（合計24週間）捕集した大気粉塵（PM2.5、粗大粒子）について注射用水を用いて超音波抽出して得た抽出物について高速液体クロマトグラフ-質量分析法（LC-MS）により成分分析を行った。分析条件は以下の通りとした。カラム：Shim-pack XR-ODS II（内径2.0 mm×150 mm、粒径2.2 μm ）、移動相：0～55 min、5～100%アセトニトリル（0.1%ギ酸）、55～75 min、100%アセトニトリル（0.1%ギ酸）、流速：0.2 ml/min、カラムオープン温度：40℃、イオン化法：ESI（ポジティブ及びネガティブ）、m/z範囲：500～2000、ネブライザーガス流量：1 l/min、ドラインガス流量：15 l/min、DL温度：250℃、ヒートブロック温度：200℃。

(3) 黄砂、PM2.5飛散時および非飛散時の大気粉塵の炎症性サイトカイン誘導能の評価

ヒトHEK293細胞から調製したゲノムDNAを鋳型に用いてTNF- α 遺伝子プロモーター領域（-1338～+79）をPCR法により増幅・単離し、改良型ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子としてもつpGL4.21[Luc2P/puro]ベクターに組込みレポータープラスミドを作製した。このレポータープラスミドをTHP-1細胞にリポフェクション法により導入後、ピューロマイシン耐性細胞を選択、単離し、炎症性サイトカイン誘導能を評価するための細胞（THP-TNF- α 細胞）を作製した。THP-TNF- α 細胞（ 1×10^5 cells/well）を96ウェルプレートに播種後、大気粉塵抽出液またはポジティブコントロールとしてエンドトキシン（1～50 EU）を6時間処理した。なお、2014年7月から10月、2015年3月から6月、2015年9月から11月の期間に佐世保市および京都市において捕集したPM2.5と粗大粒子の一定量について注射用水を用いて超音波抽出して得た抽出物を凍結乾燥後、細胞培養液に再溶解し、大気粉塵抽出液とした。処理後の細胞は、PBS(-)で洗浄後、Glo lysis buffer（Promega社）で溶解し、One Glo Luciferase assay substrate（Promega社）を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 結果及び考察

(1) 黄砂、PM2.5飛来時及び非飛来時の大気粉塵中のエンドトキシン（LPS）、タンパク、イオン類の定量的評価

佐世保市の2014年5月から2015年5月までの13カ月間の大気粉塵（PM2.5、粗大粒子）、エ

エンドトキシン、タンパク、 Ca^{2+} 及び SO_4^{2-} の濃度の推移を図(3)-1に、同期間の京都市におけるそれらの濃度の推移を図(3)-2に示す。佐世保市では2014年5月第4週と第5週にPM2.5と粗大粒子の濃度が高く $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 以上であった。また、これらの週には粗大粒子中の Ca^{2+} 及びPM2.5中の SO_4^{2-} の濃度が高く、黄砂並びに燃焼由来のPM2.5が飛散したと考えられた。京都市では2014年5月第5週に粗大粒子とPM2.5の各濃度は著しく上昇し、いずれも $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 程度と高く、同週の粗大粒子中の Ca^{2+} 及びPM2.5中の SO_4^{2-} の濃度が高く、佐世保市と同様、黄砂並びに燃焼由来のPM2.5が飛散したと考えられた。5月第5週には佐世保市、京都市ともPM2.5中のタンパク濃度がやや上昇していたが、エンドトキシン濃度の上昇はみられなかった。タンパク濃度は佐世保市、京都市とも、調査期間を通じて粗大粒子よりPM2.5中に高濃度であった。また、調査期間中のPM2.5中のタンパク濃度は、佐世保市と京都市のいずれにおいても $1\sim3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ で推移し、大きな変動は見られなかった。

一方、エンドトキシン濃度は、佐世保市と京都市のいずれにおいても、調査期間を通じてPM2.5より粗大粒子において高い傾向がみられた。佐世保市では特に9月第2週から11月第1週の粗大粒子で濃度が高く約 $0.04\sim0.161 \text{EU}/\text{m}^3$ であった。京都市では特に7月第4週から9月第1週までと9月第3、4週及び10月第2週の粗大粒子で濃度が高く約 $0.01\sim0.04 \text{EU}/\text{m}^3$ であった。10月第2週には佐世保市と京都市のいずれの地点においても高濃度であったが、佐世保市では $0.161 \text{EU}/\text{m}^3$ であり京都市の $0.04 \text{EU}/\text{m}^3$ より4倍高濃度であった。以上のように、いずれの地点においてもエンドトキシンは粗大粒子において高濃度であり、タンパクはPM2.5において高濃度であった。また、いずれの地点においてもタンパクが5月第5週の黄砂観測日を含む週に高濃度であったのに対し、エンドトキシンは10月第2週に高濃度であり、エンドトキシンとタンパクが高濃度である期間が異なっていた。また、エンドトキシン濃度は京都市より佐世保市において顕著に高く、タンパク濃度は2地点において大きな差は見られなかった。

佐世保市の2015年6月から2016年5月までの12カ月間の大気粉塵(PM2.5、粗大粒子)、エンドトキシン、タンパク、 Ca^{2+} 及び SO_4^{2-} の濃度の推移を図(3)-3に、同期間の京都市におけるそれらの各濃度の推移を図(3)-4に示す。佐世保市では6月第2週、10月第2週～第4週、12月第1週、2016年2月第3週～3月第1週、4月第2週から5月第1週に粗大粒子濃度と Ca^{2+} 濃度とも高く、黄砂が飛散したと考えられた。一方、PM2.5濃度と SO_4^{2-} 濃度は、7月第4週～8月第2週、10月第3週、第4週、2016年2月第4週、3月第1週、第4週、4月第2週から5月第1週、第3週、第4週で高く、燃焼由来のPM2.5が飛散したと考えられた。エンドトキシンは6月第2週、10月第2週、第3週、5月第1週の粗大粒子で高濃度であり、これらの週は Ca^{2+} 濃度が粗大粒子で高く、エンドトキシンが黄砂とともに飛散したと考えられた。タンパクは8月第1週、10月第2週～第4週、12月第3週～2月第1週、3月第4週、5月第3週、第4週のPM2.5で濃度が高く、これらの週の多くは、PM2.5と SO_4^{2-} の濃度が高く、タンパクが燃焼由来のPM2.5とともに飛散したと考えられた。京都市においても6月第2週、10月第1週から第4週、5月第1週にエンドトキシンと Ca^{2+} の濃度の上昇がみられ、エンドトキシンが黄砂とともに飛散したと考えられた。一方、京都市ではエンドトキシン濃度が7月第2週から9月第4週においても高かったが、これらの期間に Ca^{2+} 濃度の上昇がみられなかったことから、京都市におけるエンドトキシン濃度の上昇は黄砂飛散と関連しないものもあると考えられた。タンパクは年間を通じて粗大粒子よりPM2.5において高濃度であり5月第3週と第4週で比較的高かったが、それ以外の期間では $1\sim2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 程度であり、

エンドトキシンと比べて変動が小さかった。2014年5月から2015年5月と同様、エンドトキシン濃度は京都市より佐世保市において顕著に高く、タンパク濃度は2地点において大きな差は見られなかった。

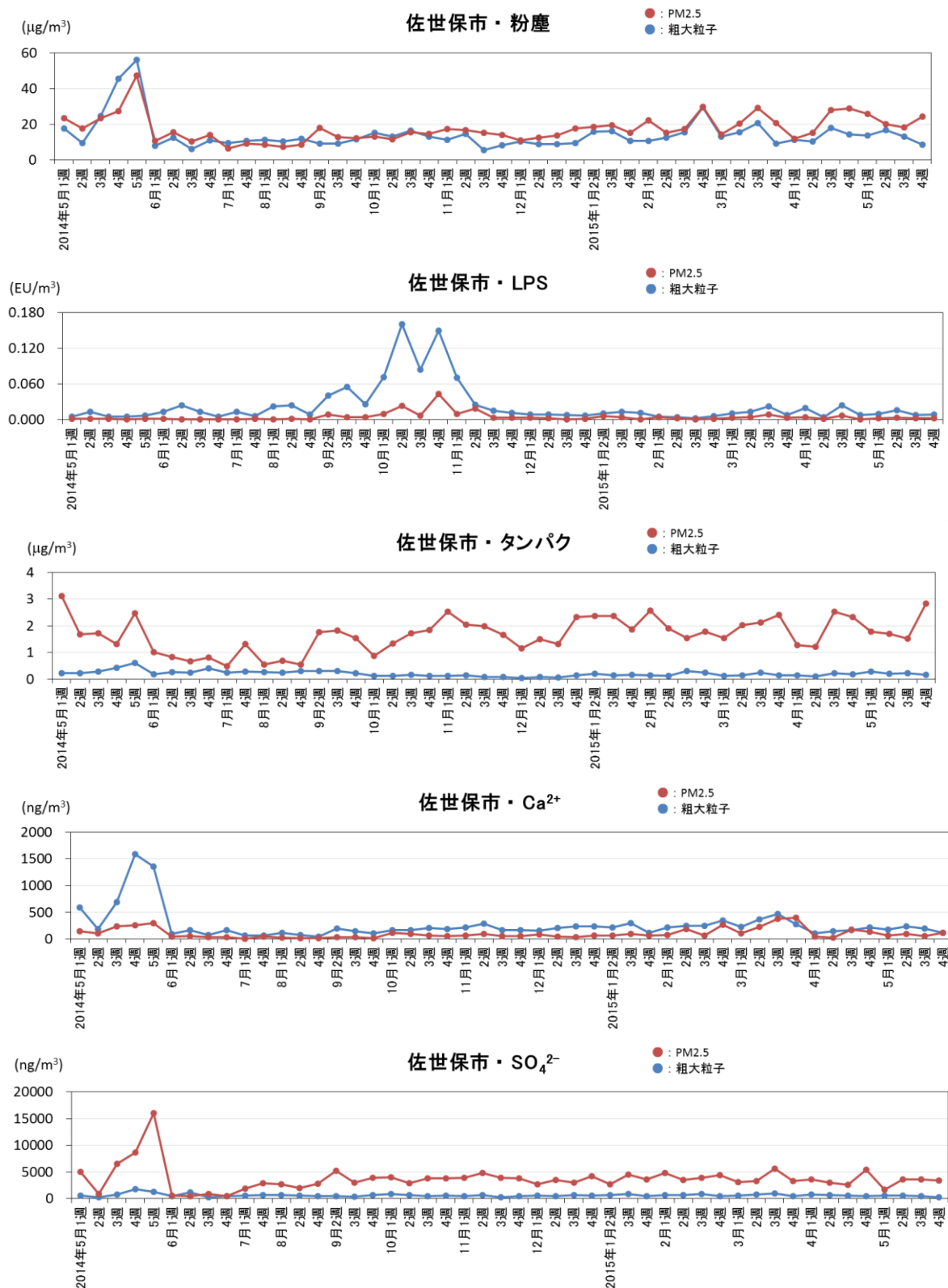
表(3)-1に佐世保市及び京都市の大気粉塵(PM_{2.5}、粗大粒子)並びにその中のエンドトキシン、タンパク、各イオンの濃度の間の相関係数を示す。佐世保市ではタンパク濃度と大気粉塵(PM_{2.5}及び粗大粒子)の各濃度と相関係数は、それぞれ0.624及び0.420であり、中程度の正の相関性を示した。また、京都市においてもタンパク濃度と大気粉塵(PM_{2.5}及び粗大粒子)の各濃度と相関係数は、それぞれ0.611及び0.434であり、中程度の正の相関性を示した。佐世保市と京都市のいずれにおいてもPM_{2.5}中のタンパク濃度は同粒子中のNH₄⁺濃度及びCa²⁺濃度と中程度の正の相関性を示した。

2015年3月から5月の佐世保市のTSP及びその中のエンドトキシン、タンパク、Ca²⁺、SO₄²⁻の濃度の推移を図(3)-5に、また、同期間の京都市におけるTSP及びその中の各成分の濃度の推移を図(3)-6に示す。佐世保市では3月22日、4月15、16日にTSPの濃度が高く80 µg/m³程度以上であった。エンドトキシン濃度は、佐世保市では3月4、10、22、23、25日、4月16、17日に高く0.08 EU/m³以上であった。特に3月22、23日、4月17日に濃度が高く、0.16 EU/m³以上であった。タンパク濃度は、佐世保市では3月21、22、30日、4月17、22、23日、5月28日に高く、4 µg/m³以上であった。京都市では3月21、22日、4月17日、5月13日にTSPの濃度が高く、80 µg/m³程度あるいはそれ以上であった。これらの日にはいずれの地点においてもCa²⁺の濃度が高く、黄砂が飛散していたと考えられた。エンドトキシン濃度は、京都市においても3月21、22日、4月17、18日、5月13、17、27日に高く、3月21、22日、4月17日には0.08 EU/m³以上であった。タンパク濃度は、京都市では3月15、21、22、30日、4月17～19、23、24日、5月27、29日に4 µg/m³程度あるいはそれ以上であった。タンパク濃度は、佐世保市と京都市で大きな差はみられず、濃度の変動は類似していた。

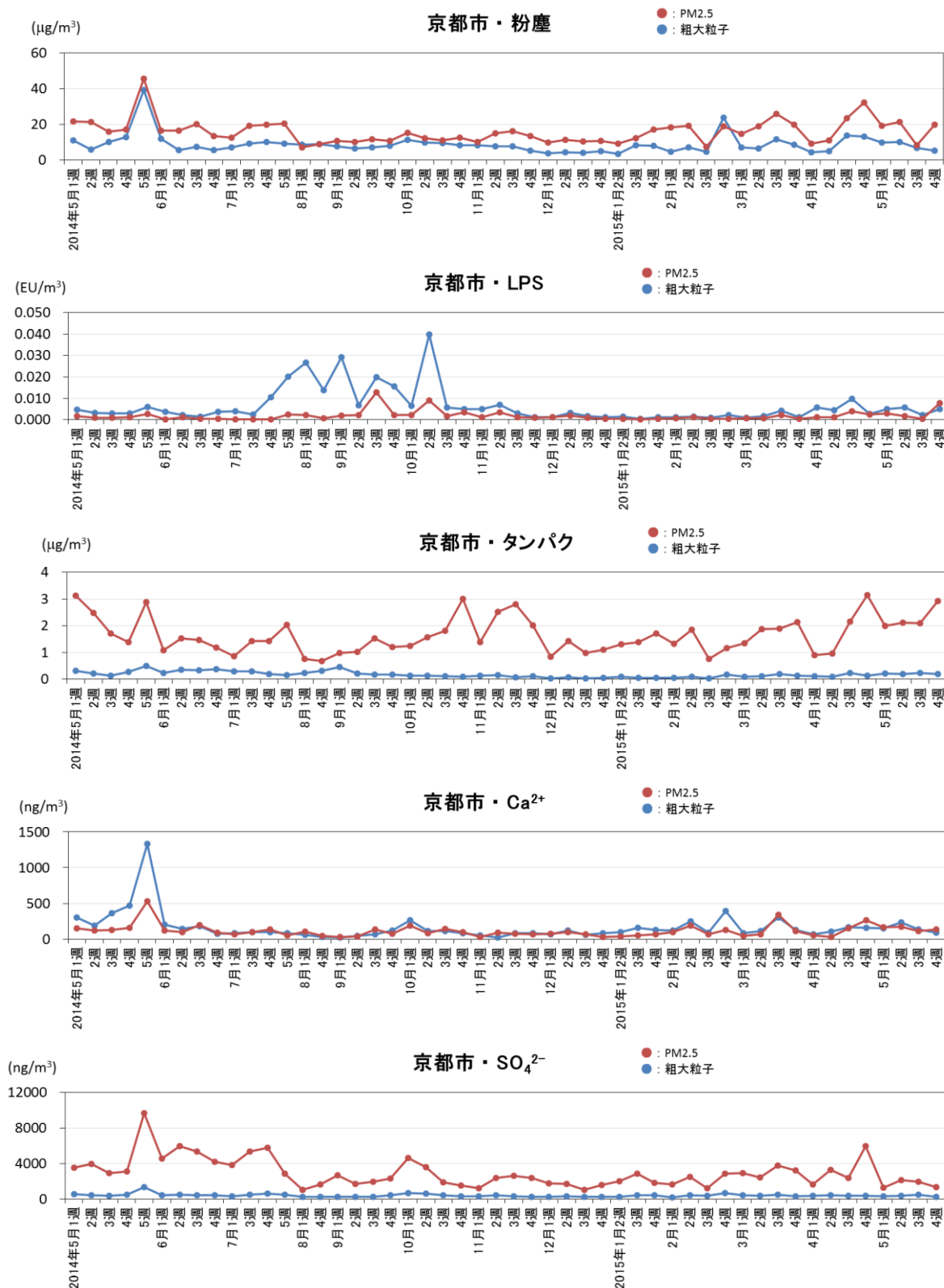
2016年3月から5月の佐世保市のTSP及びその中のエンドトキシン、タンパク、Ca²⁺、SO₄²⁻の濃度を図(3)-7に、同期間の京都市のTSP及びその中の各成分の濃度を図(3)-8に示す。佐世保市では3月5、8日、5月4、7日にTSPとCa²⁺の濃度が高く黄砂が飛来したと考えられた。エンドトキシン濃度は、佐世保市では5月4、7、10、16、17、19～21日に高く0.08 EU/m³以上であった。特に5月20日に濃度が高く、0.2 EU/m³以上であった。タンパク濃度は、佐世保市では5月19日に高く、4 µg/m³以上であった。京都市では4月24日、5月4、7、8日にTSPとCa²⁺の濃度が高く黄砂が飛来したと考えられた。エンドトキシン濃度は、京都市においても5月1、3、4、5、14、26、31日に濃度が高く0.08 EU/m³以上であった。特に5月4日に濃度が高く、0.7 EU/m³以上であった。タンパク濃度は、京都市では3月30日、4月15日、5月18～20、25日に4 µg/m³以上であった。エンドトキシン濃度は、日間変動が大きく、佐世保市と京都市のいずれにおいても5月に高濃度の日が多かった。タンパク濃度は、佐世保市より京都市において高濃度の日が多くみられたが、濃度には大きな差はみられず、変動は類似していた。佐世保市では5月4、7日に、京都市では5月4日にTSP、Ca²⁺、エンドトキシンの濃度が高くエンドトキシンが黄砂とともに飛来したと考えられた。一方、佐世保市では3月5、8日に、京都市4月24日にTSPとCa²⁺の濃度が高く黄砂が飛来したと考えられたがエンドトキシン濃度の上昇はみられなかった。また、佐世保市では5月19～21日に高濃度のエンドトキシンが観測された。これらのことからエンドトキシン濃度の上昇に黄砂の飛散は関連するものの、それ以外の要因によるものもあると考えられた。

2016年9月から11月の佐世保市並びに京都市のTSP及びその中のエンドトキシン及びタンパクの濃度を図(3)-9に示す。TSP濃度は、佐世保市では11月28日にやや高く $60.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。一方、京都市では11月5日にやや高く $52.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。佐世保市、京都市ともそれ以外の日には、TSP濃度が特に高い日はなかった。高濃度（ $0.08 \text{ EU}/\text{m}^3$ 以上）のエンドトキシンは、佐世保市では9月17、23日、10月5、10、13～15、17、19、21、24日、11月、2、5、7、10、12日にみられ、10月に多かった。特に10月15日及び10月10日に高く、それぞれ 0.864 及び $0.461 \text{ EU}/\text{m}^3$ であった。これに対し、京都市では9月1～3、5～7、10、12～15、19、24、26日、10月6～8、14、15日にエンドトキシン濃度が $0.08 \text{ EU}/\text{m}^3$ 以上であり、9月に高濃度の日が多かった。特に9月1、26日及び10月15日に高く、 $0.4 \text{ EU}/\text{m}^3$ 以上であった。タンパクは、佐世保市では10月15日、11月4、5、7、8、17、28日に高濃度（ $4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 以上）であった。京都市では9月16日、11月5、7日に高く、 $4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 以上であった。

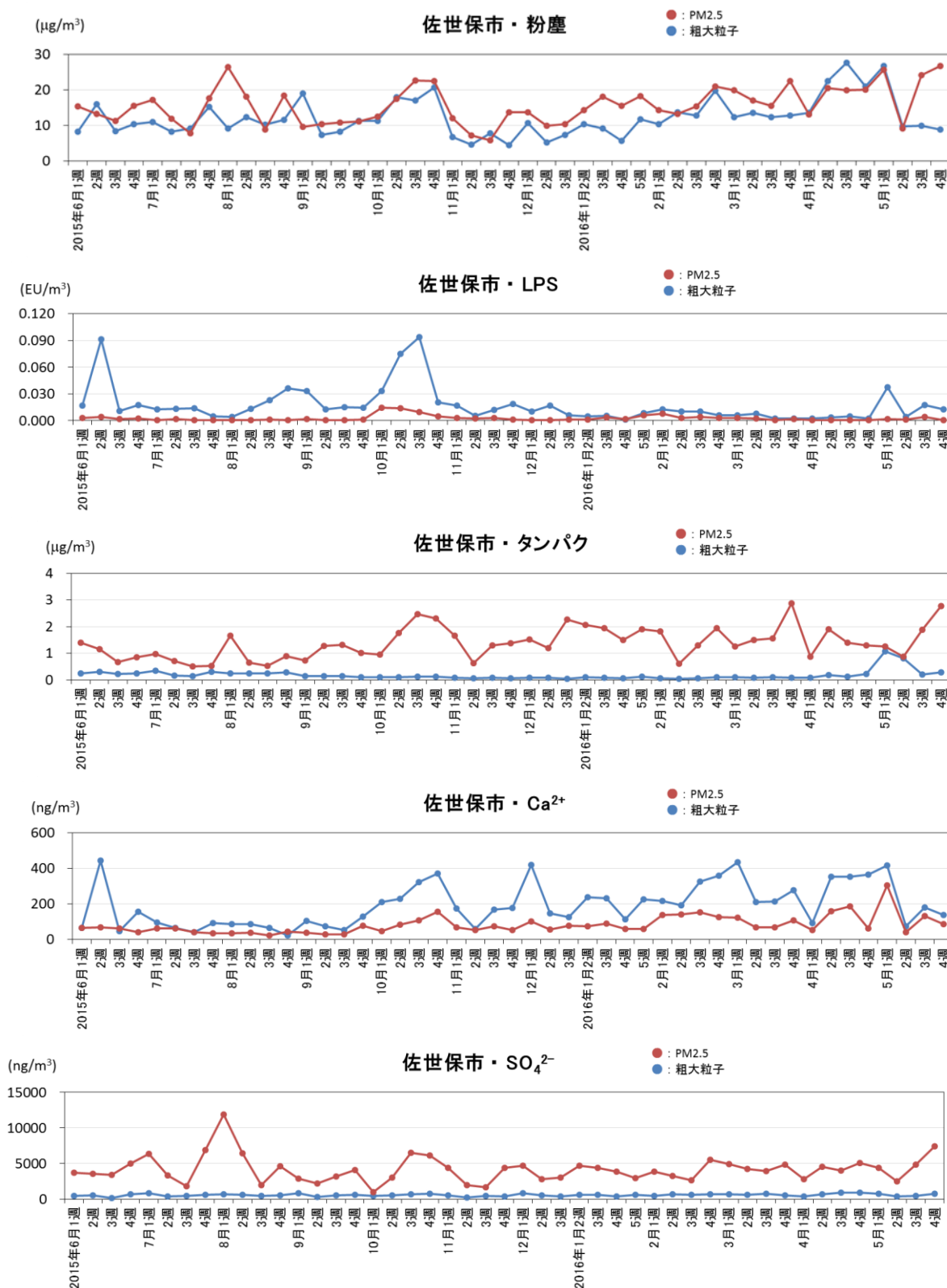
2015年3月から5月及び2016年3月から5月の佐世保市及び京都市のTSP及びその中のエンドトキシン、タンパク、各イオンの濃度の間の相関係数を表(3)-2に示す。いずれの期間においても佐世保市ではタンパク濃度-TSP濃度、タンパク濃度- SO_4^{2-} 濃度、タンパク濃度- NH_4^+ 濃度の間でそれぞれ中程度の正の相関関係がみられた。京都市においてもタンパク濃度-TSP濃度、タンパク濃度- SO_4^{2-} 濃度、タンパク濃度- NH_4^+ 濃度の間でそれぞれ中程度の正の相関関係がみられた。 SO_4^{2-} はPM2.5中の燃焼由来の主要な成分であり、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ として存在していることが知られている。タンパク濃度は SO_4^{2-} 濃度と相関しており大気中のタンパクの発生源として燃焼が関与している可能性が示唆された。エンドトキシン濃度は、2015年3月から5月には、佐世保市、京都市のいずれにおいても K^+ 、 Mg^+ 、 Ca^{2+} の濃度と中程度の正の相関関係がみられ、エンドトキシンの発生源として土壌に生息するグラム陰性菌の関与が予想されたが、2016年3月から5月には、いずれの地点においても K^+ 、 Mg^+ 、 Ca^{2+} の濃度と相関関係はみられず、大気中のエンドトキシンの発生源となるグラム陰性菌は複数存在すると予想された。



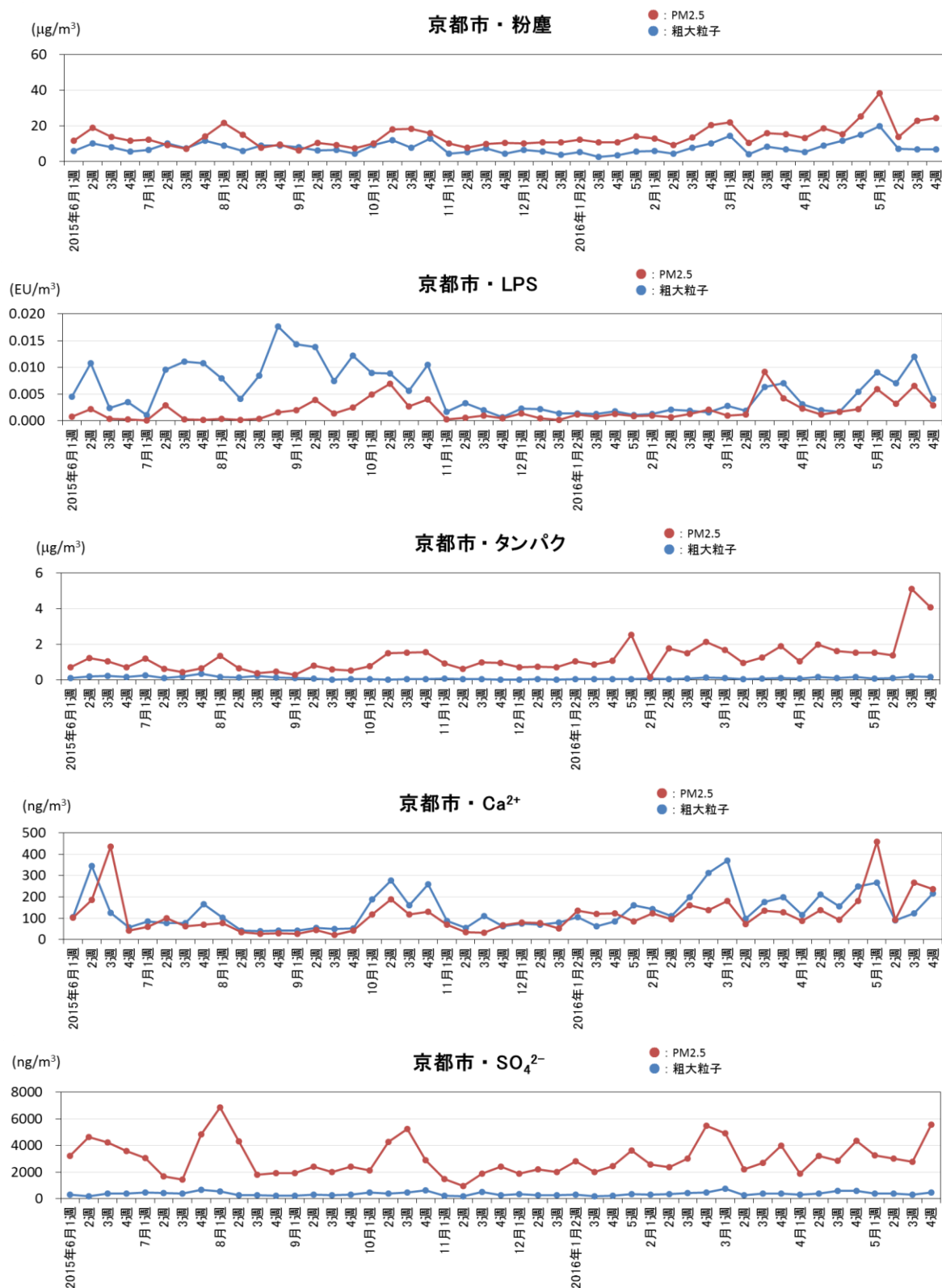
図(3)-1 佐世保市の大気粉塵（PM2.5、粗大粒子）並びにその中のエンドトキシン（LPS）、タンパク、Ca²⁺、SO₄²⁻の濃度の推移（2014年5月～2015年5月）



図(3)-2 京都市の大気粉塵（PM2.5、粗大粒子）並びにその中のエンドトキシン（LPS）、タンパク、 Ca^{2+} 、 SO_4^{2-} の濃度の推移（2014年5月～2015年5月）



図(3)-3 佐世保市の大気粉塵（PM2.5、粗大粒子）並びにその中のエンドトキシン（LPS）、タンパク、 Ca^{2+} 、 SO_4^{2-} の濃度の推移（2015年6月～2016年5月）



図(3)-4 京都市の大気粉塵（PM2.5、粗大粒子）並びにその中のエンドトキシン（LPS）、タンパク、 Ca^{2+} 、 SO_4^{2-} の濃度の推移（2015年6月～2016年5月）

表(3)-1 佐世保市及び京都市の大気粉塵(PM2.5、粗大粒子)並びにその中のエンドトキシン(LPS)、タンパク、イオンの濃度の相関係数

佐世保 PM2.5(2014年5月－2016年5月)

	PM2.5	LPS	タンパク	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
PM2.5	1.000										
LPS	-0.004	1.000									
タンパク	0.624	0.193	1.000								
Cl ⁻	0.006	-0.074	0.059	1.000							
NO ₃ ⁻	0.261	0.008	0.458	0.392	1.000						
SO ₄ ²⁻	0.706	-0.051	0.352	-0.276	0.015	1.000					
Na ⁺	-0.062	0.101	-0.065	0.162	0.256	-0.018	1.000				
NH ₄ ⁺	0.693	-0.058	0.415	0.115	0.217	0.734	-0.253	1.000			
K ⁺	0.465	0.050	0.414	0.074	0.448	0.404	0.369	0.236	1.000		
Mg ²⁺	0.456	0.004	0.147	-0.053	0.140	0.435	0.448	0.148	0.677	1.000	
Ca ²⁺	0.655	0.032	0.416	0.004	0.275	0.371	0.143	0.243	0.404	0.658	1.000

佐世保 粗大粒子(2014年5月－2016年5月)

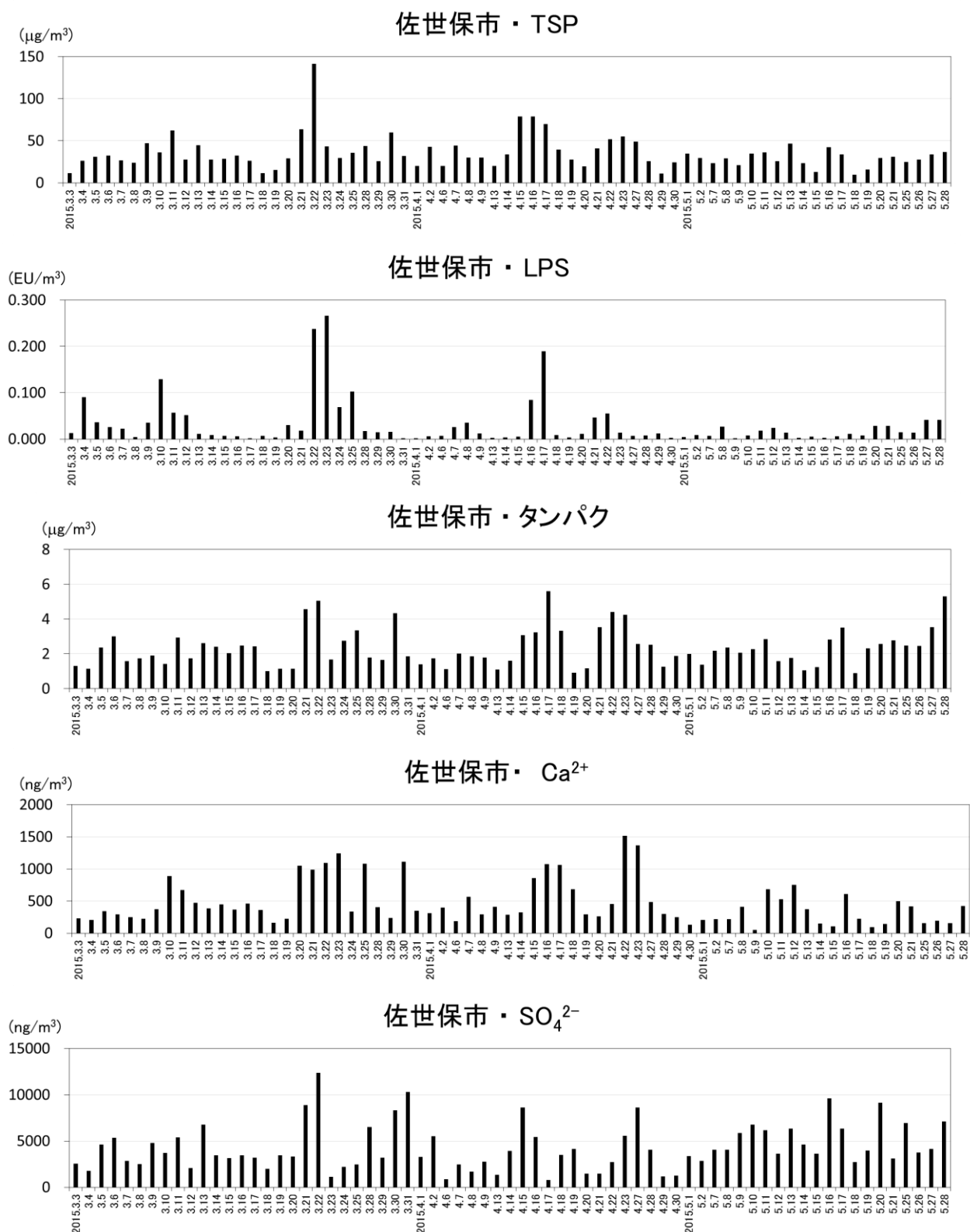
	粗大粒子	LPS	タンパク	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
粗大粒子	1.000										
LPS	0.023	1.000									
タンパク	0.420	-0.005	1.000								
Cl ⁻	0.146	0.216	-0.227	1.000							
NO ₃ ⁻	0.722	0.001	0.259	0.161	1.000						
SO ₄ ²⁻	0.718	-0.006	0.244	0.350	0.587	1.000					
Na ⁺	0.128	0.315	-0.175	0.876	0.206	0.344	1.000				
NH ₄ ⁺	0.356	-0.190	0.131	-0.168	0.380	0.461	-0.251	1.000			
K ⁺	0.423	0.205	0.249	0.494	0.257	0.526	0.450	-0.035	1.000		
Mg ²⁺	0.428	0.231	-0.147	0.816	0.457	0.582	0.749	0.043	0.539	1.000	
Ca ²⁺	0.848	-0.052	0.273	0.035	0.707	0.692	0.002	0.385	0.279	0.429	1.000

京都市 PM2.5(2014年5月－2016年5月)

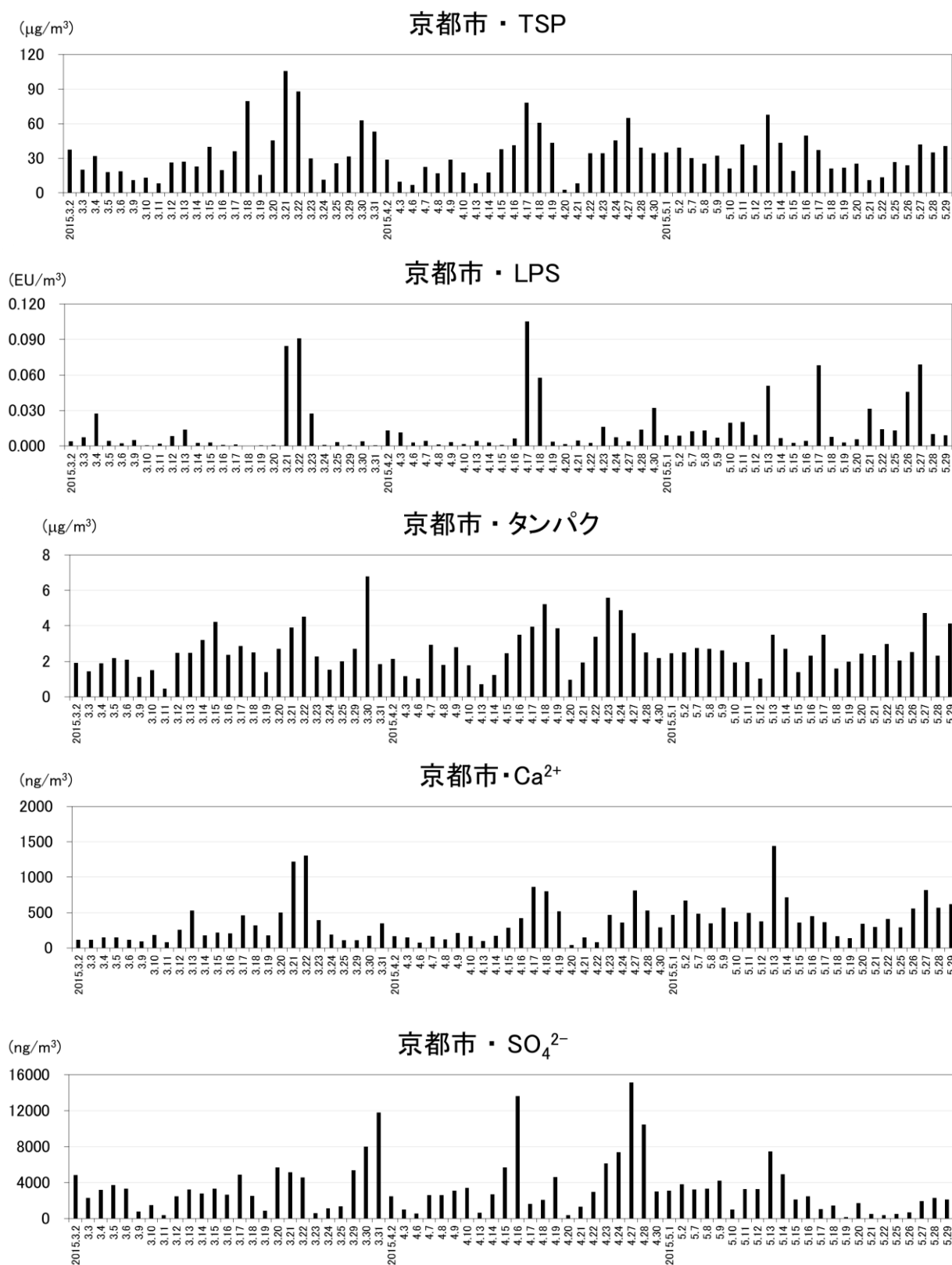
	PM2.5	LPS	タンパク	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
PM2.5	1.000										
LPS	0.200	1.000									
タンパク	0.611	0.302	1.000								
Cl ⁻	0.013	-0.031	0.011	1.000							
NO ₃ ⁻	0.031	-0.179	0.063	0.725	1.000						
SO ₄ ²⁻	0.672	-0.033	0.300	-0.131	-0.103	1.000					
Na ⁺	0.088	0.134	-0.062	0.332	0.308	-0.092	1.000				
NH ₄ ⁺	0.617	-0.134	0.400	0.148	0.175	0.811	-0.291	1.000			
K ⁺	0.277	0.210	0.200	0.202	0.410	0.235	0.515	0.108	1.000		
Mg ²⁺	0.548	0.213	0.299	0.258	0.116	0.340	0.316	0.300	0.352	1.000	
Ca ²⁺	0.773	0.271	0.456	0.068	0.014	0.517	0.209	0.390	0.410	0.645	1.000

京都市 粗大粒子(2014年5月－2016年5月)

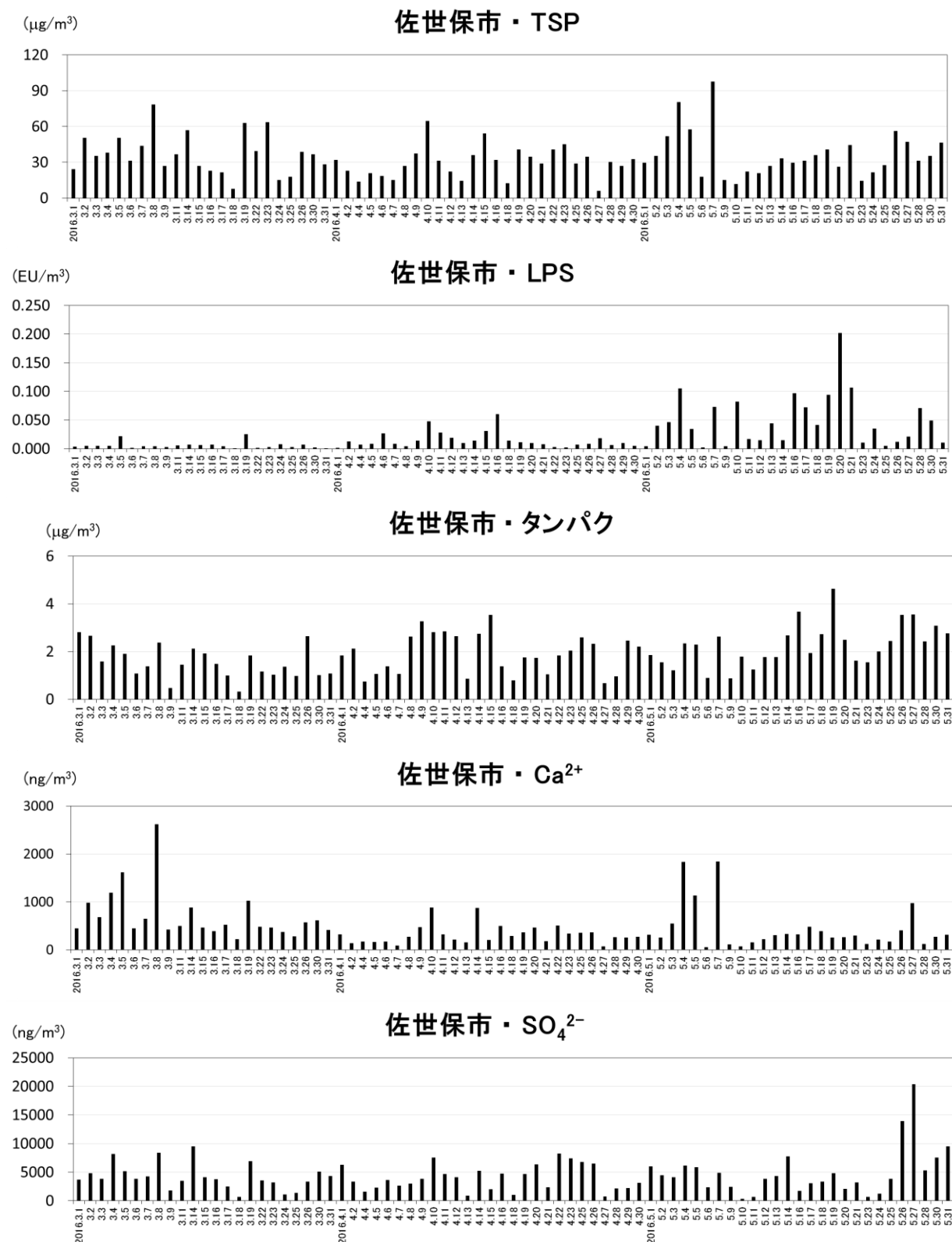
	粗大粒子	LPS	タンパク	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
粗大粒子	1.000										
LPS	0.140	1.000									
タンパク	0.434	0.246	1.000								
Cl ⁻	0.115	0.132	-0.408	1.000							
NO ₃ ⁻	0.630	0.177	0.151	0.291	1.000						
SO ₄ ²⁻	0.773	0.040	0.396	0.191	0.714	1.000					
Na ⁺	0.208	0.305	-0.262	0.776	0.464	0.344	1.000				
NH ₄ ⁺	0.408	-0.183	0.274	-0.142	0.458	0.504	-0.240	1.000			
K ⁺	0.411	0.527	0.501	0.106	0.314	0.387	0.299	-0.014	1.000		
Mg ²⁺	0.577	-0.023	0.029	0.571	0.700	0.698	0.504	0.416	0.172	1.000	
Ca ²⁺	0.833	-0.105	0.354	-0.014	0.633	0.751	0.029	0.631	0.180	0.616	1.000



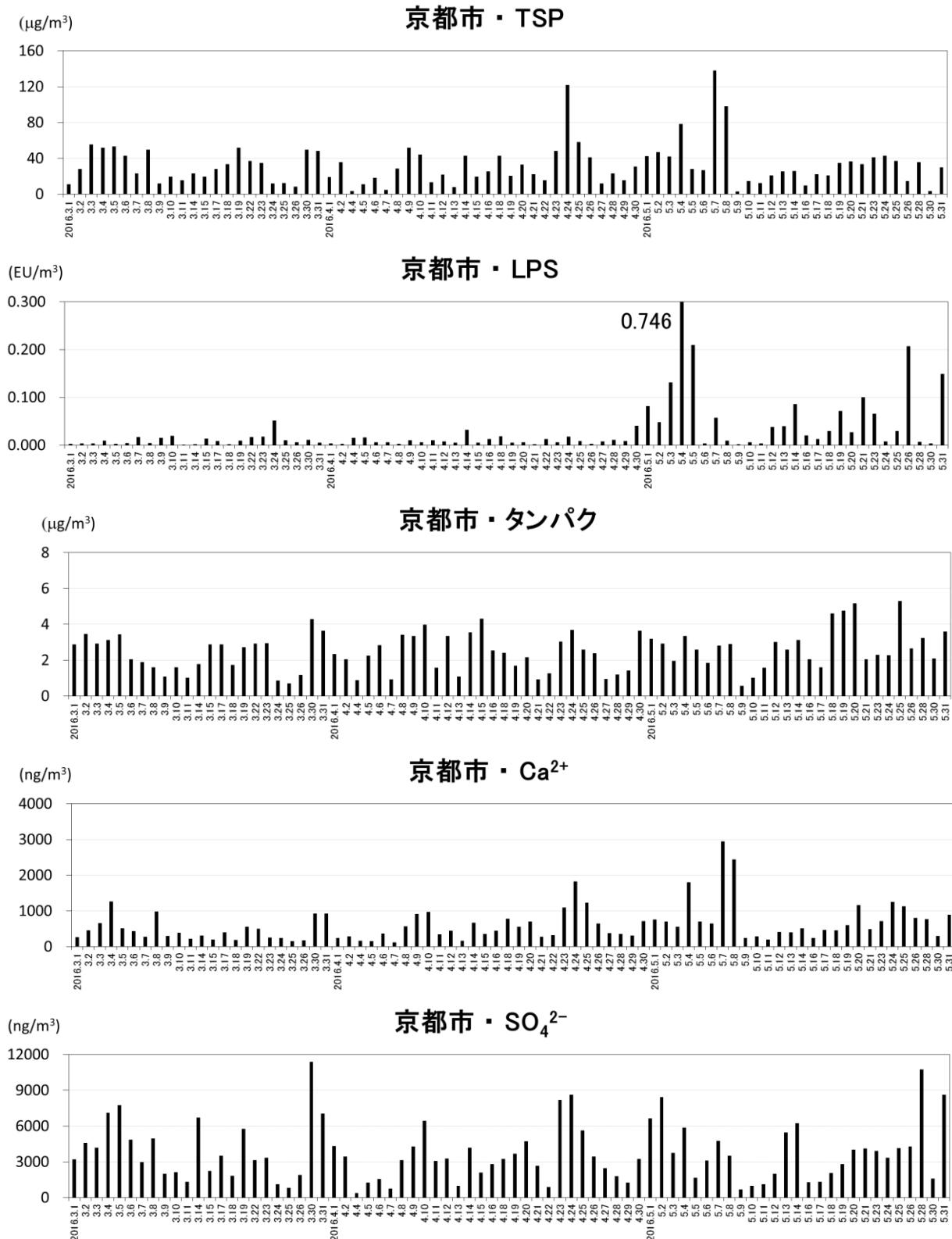
図(3)-5 佐世保市の大気中の総粉塵（TSP）並びにその中のエンドトキシン（LPS）、タンパク、 Ca^{2+} 、 SO_4^{2-} の濃度の推移（2015年3月～5月）



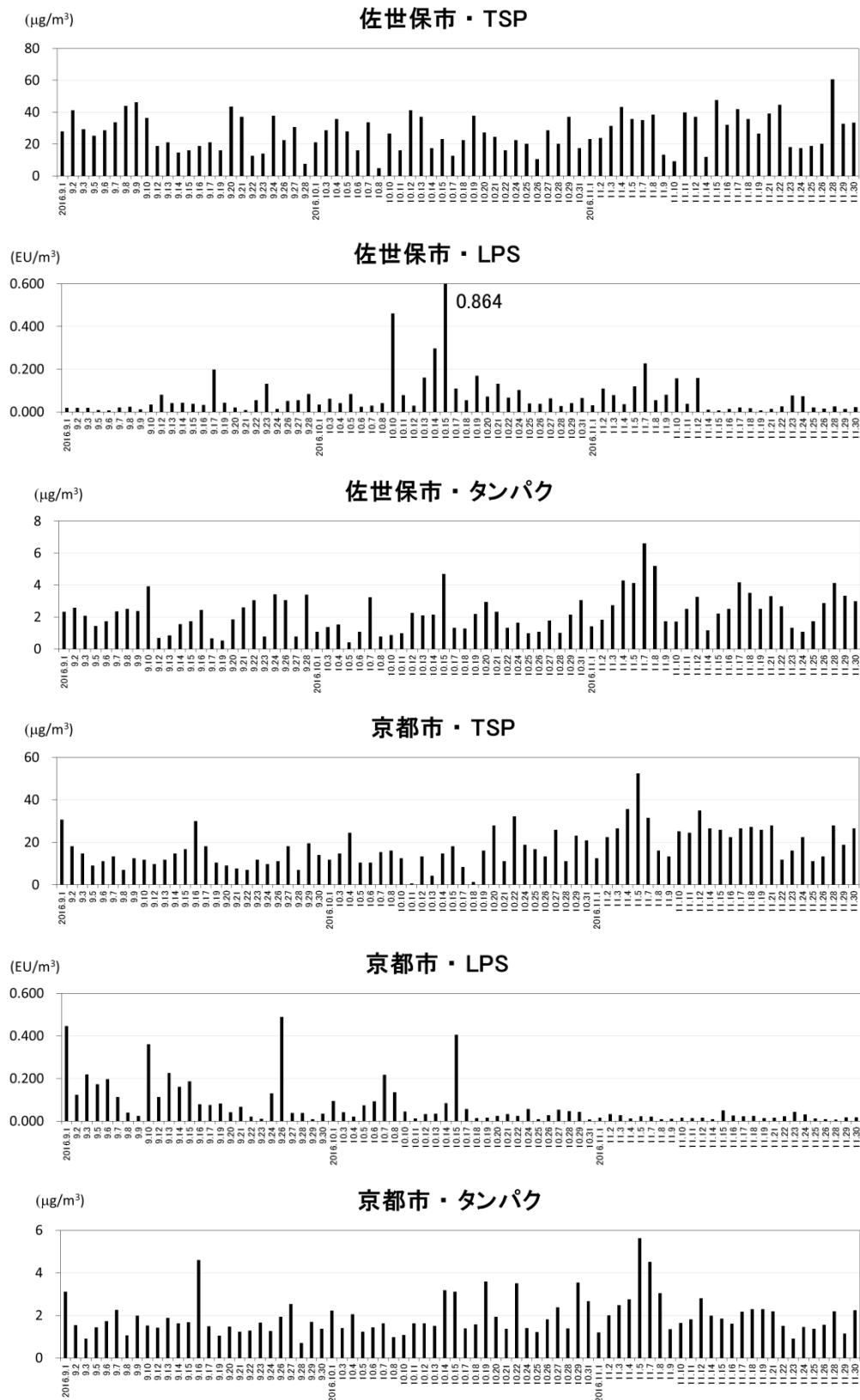
図(3)-6 京都市の大気中の総粉塵（TSP）並びにその中のエンドトキシン（LPS）、タンパク、Ca²⁺、SO₄²⁻の濃度の推移（2015年3月～5月）



図(3)-7 佐世保市の大気中の総粉塵（TSP）並びにその中のエンドトキシン（LPS）、タンパク、 Ca^{2+} 、 SO_4^{2-} の濃度の推移（2016年3月～5月）



図(3)-8 京都市の大気中の総粉塵（TSP）並びにその中のエンドトキシン（LPS）、タンパク、 Ca^{2+} 、 SO_4^{2-} の濃度の推移（2016年3月～5月）



図(3)-9 佐世保市及び京都市の大気中の総粉塵（TSP）並びにその中のエンドトキシン（LPS）、タンパクの濃度の推移（2016年9月～11月）

表(3)-2 佐世保市及び京都市の大気中の総粉塵(TSP)並びにそれらの中のエンドトキシン(LPS)、タンパク、イオンの濃度の相関係数

佐世保市 (2015年3月－5月)

	TSP	LPS	タンパク	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
TSP	1.000										
LPS	0.553	1.000									
タンパク	0.676	0.356	1.000								
Cl ⁻	0.254	0.328	-0.123	1.000							
NO ₃ ⁻	0.805	0.459	0.462	0.172	1.000						
SO ₄ ²⁻	0.556	-0.029	0.421	-0.083	0.548	1.000					
Na ⁺	0.424	0.430	-0.061	0.912	0.347	0.011	1.000				
NH ₄ ⁺	0.714	0.369	0.426	-0.014	0.905	0.663	0.184	1.000			
K ⁺	0.700	0.493	0.406	0.283	0.647	0.301	0.514	0.611	1.000		
Mg ²⁺	0.722	0.493	0.221	0.556	0.788	0.382	0.758	0.729	0.736	1.000	
Ca ²⁺	0.769	0.600	0.426	0.125	0.895	0.416	0.358	0.914	0.756	0.816	1.000

京都市 (2015年3月－5月)

	TSP	LPS	タンパク	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
TSP	1.000										
LPS	0.577	1.000									
タンパク	0.650	0.420	1.000								
Cl ⁻	-0.019	0.073	-0.091	1.000							
NO ₃ ⁻	0.434	0.110	0.383	0.090	1.000						
SO ₄ ²⁻	0.501	-0.069	0.402	-0.065	0.423	1.000					
Na ⁺	0.122	0.183	-0.059	0.785	0.140	-0.070	1.000				
NH ₄ ⁺	0.407	-0.167	0.454	-0.263	0.417	0.792	-0.349	1.000			
K ⁺	0.507	0.638	0.426	0.196	0.013	-0.124	0.426	-0.243	1.000		
Mg ²⁺	0.496	0.401	0.264	0.441	0.360	0.255	0.699	0.053	0.499	1.000	
Ca ²⁺	0.756	0.695	0.511	-0.090	0.345	0.336	0.168	0.193	0.618	0.537	1.000

佐世保市 (2016年3月－5月)

	TSP	LPS	タンパク	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
TSP	1.000										
LPS	0.191	1.000									
タンパク	0.422	0.342	1.000								
Cl ⁻	0.316	0.006	-0.114	1.000							
NO ₃ ⁻	0.799	0.045	0.286	0.150	1.000						
SO ₄ ²⁻	0.532	-0.065	0.494	-0.067	0.582	1.000					
Na ⁺	0.365	0.105	-0.088	0.957	0.221	0.008	1.000				
NH ₄ ⁺	0.488	-0.064	0.529	-0.215	0.598	0.929	-0.189	1.000			
K ⁺	0.518	-0.115	0.262	0.366	0.582	0.449	0.388	0.384	1.000		
Mg ²⁺	0.593	0.097	0.014	0.851	0.412	0.128	0.889	-0.070	0.440	1.000	
Ca ²⁺	0.778	0.073	0.213	0.195	0.729	0.422	0.240	0.307	0.402	0.576	1.000

京都市 (2016年3月－5月)

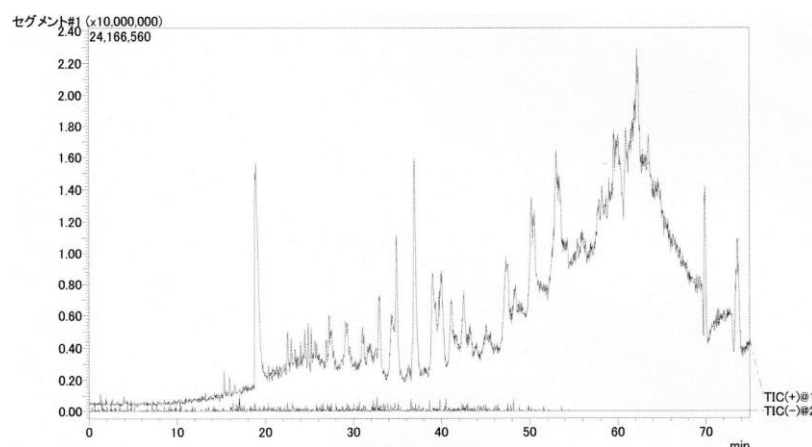
	TSP	LPS	タンパク	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
TSP	1.000										
LPS	0.222	1.000									
タンパク	0.428	0.153	1.000								
Cl ⁻	0.273	0.203	-0.092	1.000							
NO ₃ ⁻	0.618	0.027	0.436	0.312	1.000						
SO ₄ ²⁻	0.518	0.116	0.533	-0.058	0.482	1.000					
Na ⁺	0.314	0.201	0.094	0.752	0.361	0.060	1.000				
NH ₄ ⁺	0.402	-0.047	0.450	-0.074	0.655	0.882	-0.099	1.000			
K ⁺	0.602	0.341	0.445	0.058	0.208	0.627	0.295	0.333	1.000		
Mg ²⁺	0.666	0.131	0.240	0.642	0.706	0.367	0.625	0.352	0.181	1.000	
Ca ²⁺	0.893	0.310	0.440	0.215	0.497	0.456	0.266	0.285	0.676	0.508	1.000

（２）越境大気汚染に関連する化学成分の検索

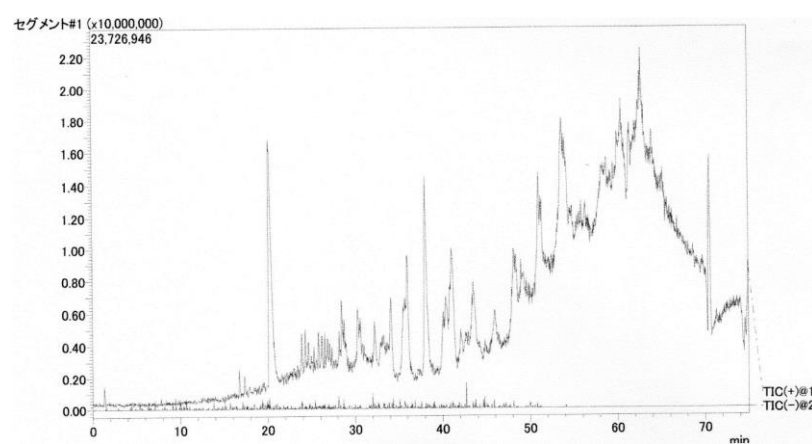
高いタンパク濃度がみられた大気粉塵、すなわち佐世保市において 2014 年 5 月第 1 週、第 5 週及び 7 月第 4 週に捕集した PM2.5 と京都市において 2014 年 4 月第 1 週～5 月第 1 週、5 月第 5 週及び 7 月第 4 週に捕集した PM2.5 の各水溶性抽出物について SDS-PAGE を行った。また、同期間に佐世保市と京都市において捕集した粗大粒子の各水溶性抽出物についても SDS-PAGE を行った。電気泳動後のゲルを銀染色した結果、両地点に試料において捕集した PM2.5 の各水溶性抽出物において 6.5 kDa 付近にバンドが検出された。特にタンパク濃度が高かった 4 月第 2 週の PM2.5 では 50 kDa 付近にも薄いバンドが検出された。同期間に両地点において捕集した粗大粒子の各水溶性抽出物においても 6.5 kDa 付近にバンドが検出された。以上のことから、いずれの地点でも PM2.5 と粗大粒子に含まれる主なタンパクは分子量が 6.5 kDa 付近の小さなものであると推測された。

また、佐世保市及び京都市において 2015 年 3 月から 6 月に捕集した TSP（各地点 77 日分）の抽出物について SDS-PAGE を行った結果、いずれの TSP においても 1.5 kDa 付近にバンドが検出され、主なタンパクは小さな分子量であることが示唆された。さらに、佐世保市及び京都市において 2015 年 3 月から 5 月に捕集した PM2.5、粗大粒子及び TSP の抽出物について SDS-PAGE を行った。その結果、京都市において 4 月第 1 週に捕集した粗大粒子で 66 kDa 付近に微かにバンドが検出された。一方、他の試料では銀染色しても明確なバンドは検出されず主なタンパクあるいはペプチドは小さな分子量であると考えられた。

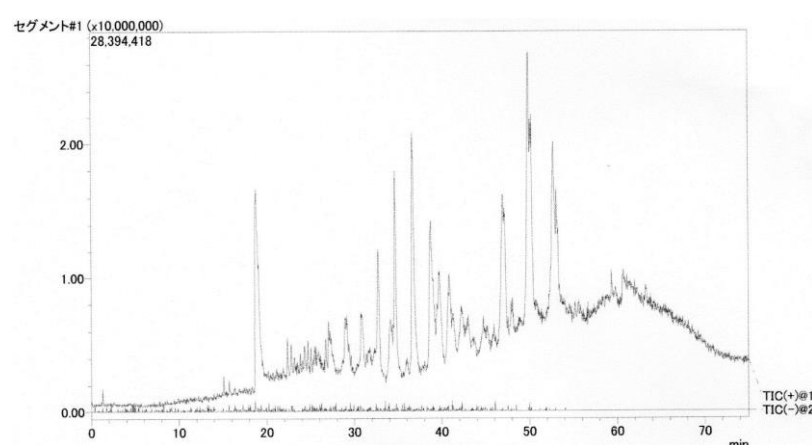
大規模な黄砂が観測された 2015 年 3 月第 3 週に佐世保市及び京都市において捕集した粗大粒子の抽出物の LC-MS による分析の結果をそれぞれ図 (3)-10 及び図 (3)-11 に示す。佐世保市の粗大粒子抽出物では保持時間 18.9、27.2、29.9、32.9、34.8、36.9、39.0、40.0、41.1、42.5、47.2、50.2、53.0、62.2、69.9 分に大きなピークがみられた。また、京都市の粗大粒子抽出物では保持時間 20.1、28.4、30.3、34.1、35.9、38.0、41.0、43.4、48.1、51.0、53.7、62.8、70.5 分に大きなピークがみられた。両地点で捕集した粗大粒子の抽出物では、佐世保市の試料における 18.9 分のピークと京都市の試料 20.1 分におけるピークの有無が異なっている以外はほぼ同じ保持時間にピークが観測された。佐世保市で他の週に捕集した粗大粒子の抽出物も図 (3)-10 に示したのとほぼ同じクロマトグラムであり、京都市で他の週に捕集した粗大粒子の抽出物も図 (3)-11 に示したのとほぼ同じクロマトグラムであった。また、佐世保市及び京都市において比較的高濃度の PM2.5 の飛散が観測された 2015 年 10 月第 3 週に捕集した PM2.5 の抽出物の LC-MS による分析の結果をそれぞれ図 (3)-12 及び図 (3)-13 に示す。佐世保市の PM2.5 抽出物では保持時間 18.8、27.0、29.0、30.7、32.7、34.6、36.6、38.7、39.7、40.8、46.9、49.9、52.7 分に大きなピークがみられた。また、京都市の PM2.5 抽出物では保持時間 32.5、34.5、36.5、38.5、39.6、40.7、42.7、44.6、46.9、49.9、52.7、54.7 分に大きなピークがみられた。佐世保市の試料では 18.8、27.0、29.0、30.7 分に、京都市では 42.7、44.6 分にそれぞれ特徴的なピークがみられた以外は、ほぼ同じ保持時間にピークが観測された。佐世保市で他の週に捕集した PM2.5 の抽出物も図 (3)-12 に示したのとほぼ同じクロマトグラムであり、京都市で他の週に捕集した PM2.5 の抽出物も図 (3)-13 に示したのとほぼ同じクロマトグラムであった。このように各採取地点において捕集した粗大粒子と PM2.5 の各抽出物のクロマトグラムで捕集時期による明確な違いはみられず、越境大気汚染の発生の有無と関連すると推測されるピークは認められなかった。



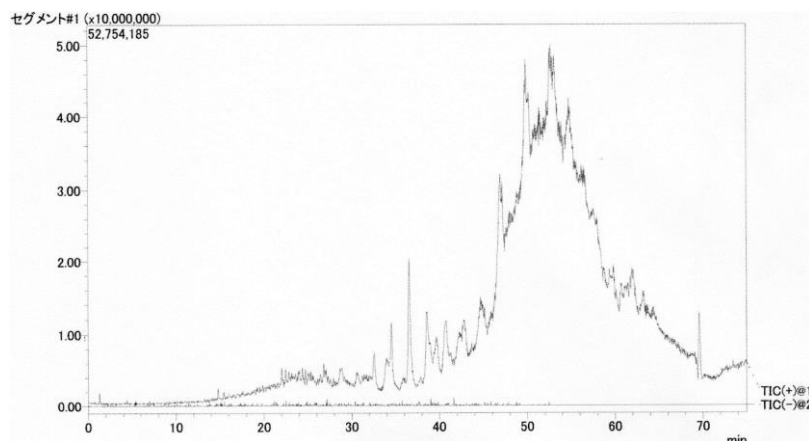
図(3)-10 佐世保市の大気粉塵（粗大粒子）抽出物の総イオンクロマトグラム（2015年3月第3週捕集）



図(3)-11 京都市の大気粉塵（粗大粒子）抽出物の総イオンクロマトグラム（2015年3月第3週捕集）



図(3)-12 佐世保市の大気粉塵（PM2.5）抽出物の総イオンクロマトグラム（2015年10月第3週捕集）



図(3)-13 京都市の大気粉塵（PM2.5）抽出物の総イオンクロマトグラム（2015年10月第2週捕集）

（３）黄砂、PM2.5 飛来時および非飛来時の大気粉塵による炎症性サイトカイン誘導能の評価

2014年7月から10月、2015年3月から6月、2015年9月から11月の3期間に佐世保市および京都市において捕集したPM2.5と粗大粒子の抽出物についてTNF- α 遺伝子プロモーター活性を測定した。その結果、佐世保市および京都市ともに、エンドトキシン含量が低くタンパク質含量の高いPM2.5抽出液ではなくエンドトキシン含量が高くタンパク質含量の低い粗大粒子抽出液においてTNF- α 遺伝子プロモーター活性化が検出され、その程度はエンドトキシン含有量が多いほど強い活性を示す傾向がみられた。これらの結果からTNF- α 遺伝子プロモーター活性化には大気粉塵中に含まれるエンドトキシンが関与していることが示唆された。

5. 本研究により得られた成果

（１）科学的意義

これまでに本邦で明らかにされていなかった大気中のエンドトキシン及びタンパク濃度の長期間にわたる推移を明らかにした。また、それらの濃度と黄砂及びPM2.5の飛散との関係について明らかにした。すなわち、エンドトキシンは、春季の黄砂飛散時に高濃度になることが多く、秋季には数週間にわたり高濃度になることが明らかになった。一方、タンパク濃度は、年間を通じて変動が小さく、PM2.5濃度と正の相関関係にあることが明らかになった。また、大気粉塵抽出物の炎症性サイトカイン誘導能はエンドトキシン濃度の高い粗大粒子において強いことが明らかになった。

（２）環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

ヒトにおいて喘息増悪作用が報告されているエンドトキシンの大気中の濃度が、喘息症状の悪化がみられると報告されている黄砂飛散時に高くなることが示唆された。また、エンドトキシン濃度が高い日が秋季に非常に多く存在することが明らかになった。秋季のエンドトキシン濃度の

上昇は、同時期に喘息症状が悪化する患者数が増加することと関連する可能性がある。エンドトキシンがヒト健康へ影響を及ぼす大気汚染物質である可能性を示唆するものと考えられる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) M. Watanabe, J. Kurai, H. Noma, T. Watanabe, S. Minato, H. Sano, F. Okada, A. Yamasaki, E. Shimizu: Annals of Public Health and Research, (2, 1), 1015 (2015)
Exposure to metals bound to particles and pulmonary function of school children in Western Japan.

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) クウリバリ・スレイマン、南嘉輝、山田真裕、小野遼、阿部真帆、久保裕希、北村重治、古川奈美、長谷井友尋、山岸伸行、出口雄也、渡部仁成、若林敬二、渡辺徹志：日本薬学会第135年会 (2015)
「大気微小粒子 (PM_{2.5}) 及び粗大粒子中のタンパク質及びリポポリサッカライドの解析」
- 2) 渡辺徹志、クウリバリ・スレイマン、北村重晴、久保裕希、古川奈美、阿部真帆、山田真裕、出口雄也、長谷井友尋：フォーラム2015 衛生薬学・環境トキシコロジー (2015)
「黄砂及び微小粒子状物質中のタンパク質及びLPSの解析」
- 3) 北村重晴、久保裕希、クウリバリ・スレイマン、阿部真帆、古川奈美、長谷井友尋、出口雄也、渡辺徹志：第65回日本薬学会近畿支部総会・大会 (2015)
「佐世保市・京都市における大気粉塵中のエンドトキシン・タンパク質の定量及び季節変動」
- 4) 久保裕希、クウリバリ・スレイマン、山田真裕、阿部真帆、北村重晴、古川奈美、長谷井友尋、出口雄也、渡辺徹志：第65回日本薬学会近畿支部総会・大会 (2015)
「佐世保市・京都市における大気粉塵中のイオンの定量及び季節変動」
- 5) 古川奈美、クウリバリ・スレイマン、阿部真帆、北村重晴、久保裕希、河瀬裕美、中大路友亮、長谷井友尋、出口雄也、渡辺徹志：日本薬学会第136年会 (2016)
「黄砂飛散と大気中のタンパク質及びエンドトキシン濃度の関係」
- 6) 渡辺徹志：第4回KPU-OHP臨床医薬カンファレンス (2016)

「大気汚染の現状と長距離輸送の影響」

- 7) 渡辺徹志：第47回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会(2016)

「越境大気汚染の実態と喘息への影響」

- 8) Mohammad Shahriar Khan, Maho Abe, Nami Furukawa, Yuuki Kubo, Shigeharu Kitamura, Yusuke Nakaoji, Kawase Yumi, Tomohiro Hasei, Takahiro Matsumoto, Yuya Deguchi, Nobuyuki Yamagishi, Tetsushi Watanabe: フォーラム2016衛生薬学・環境トキシコロジー (2016)

「Seasonal Fluctuation of Lipopolysaccharide on Airborne Particles and Relation with Asian Dust」

- 9) 河瀬裕美、モハメド シャリアー カーン、阿部真帆、北村重晴、久保祐希、古川奈美、中大路友亮、松本崇宏、長谷井友尋、出口雄也、渡辺徹志：第66回日本薬学会近畿支部総会・大会 (2016)

「佐世保市・京都市における大気粉塵中のLPS、タンパク質、イオンの定量及び季節変動」

- 10) 中大路友亮、モハメド シャリアー カーン、阿部真帆、北村重晴、久保祐希、古川奈美、河瀬裕美、松本崇宏、長谷井友尋、出口雄也、渡辺徹志：第66回日本薬学会近畿支部総会・大会 (2016)

「黄砂期間中における佐世保市・京都市の総浮遊粒子状物質中のLPS、タンパク質、およびイオン濃度の比較」

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

特に記載すべき事項はない。

A Study to Determine the Toxicity of Substances Contained in Asian Dust and PM_{2.5}, and Monitor Their Effect on Health

Principal Investigator: Masanari WATANABE

Institution: Tottori University

36-1, Nishichou, Yonago, Tottori 683-8504, JAPAN

Tel: +81-859-38-6537 / Fax: +81-859-38-6539

E-mail: watanabm@med.tottori-u.ac.jp

Cooperated by: Kyoto Pharmaceutical University

[Abstract]

Key Words: Air pollution monitoring, Allergy, Cancer, Component analysis, Epidemiological study, Inflammation, Asian dust, PM_{2.5}, Schoolchildren

A broad range of literature supports the association with airborne particulate matter (PM) and health disorders. The smaller the size of the PM the greater its potential to impact health. However, in Japan, the data on the relationship between health and PM_{2.5} is insufficient. Similarly, there is a lack of investigations into the effects of Asian dust (AD) on health. Various components of PM can influence the subsequent pro-inflammatory cytokine response, and the inflammatory potential of PM is heterogeneous. The discordant results between studies investigating the association between airborne PM and health may be attributable to the disparity of inflammatory responses to different compositions of PM. This study aimed to investigate the effects of PM_{2.5}, PM₁₀, and AD on the respiratory system in schoolchildren, and the inflammatory potential of PM.

Schoolchildren measured daily morning peak expiratory flow as a respiratory function and recorded respiratory symptoms in 2015. The inflammatory potential was assessed to measure cytokine production such as interleukin (IL)-8 in THP1 cells stimulated by daily collected PM₁₀ and PM_{2.5} during the epidemiology study. These IL-8 concentrations were determined as the daily inflammatory potential of PM₁₀ and PM_{2.5}. Our previous studies in 2012 and 2013 clearly demonstrated a significant negative association with respiratory function and short-term exposure to PM₁₀, PM_{2.5} and AD particles in schoolchildren. However, in this study, PM₁₀, PM_{2.5}, and AD particles levels were not significantly associated with respiratory function. In contrast, this study found a significant negative association between respiratory function and daily levels of IL-8 induced by PM₁₀ and PM_{2.5}. The association with respiratory symptoms and exposure to PM₁₀ and PM_{2.5} had the same results. These findings suggested that the effects of airborne

PM exposure on the respiratory system in schoolchildren differs with the types and sources of PM₁₀ and PM_{2.5}, and might depend more on the pro-inflammatory among the response to the PM composition rather than the PM mass concentration. According to our analysis, the components of collected PM, endotoxin is one of the important components in the worsening of the respiratory system by exposure to PM₁₀, PM_{2.5}, and AD particles.

Finally, this study also investigated the carcinogenicity of PM_{2.5} and AD particles in an *in vitro* study. This study was unable to identify PM_{2.5} and AD particles as carcinogenic. However, both PM_{2.5} and AD particles can augment inflammation in mice models. Augmentation of inflammation may accelerate cancer development.