

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

黄砂とPM2.5による複合大気汚染の肺炎、
アレルギー疾患増悪作用とメカニズム解明に関する研究
(5-1457)

平成26年度～平成28年度

Aggravating Effects of the Combined Air Pollution by Asian Dust and PM2.5 on Lung Inflammation and
Allergy Disease, and Elucidation of the Mechanism

大分県立看護科学大学
京都大学
産業医科大学
東京女子医科大学

〈研究協力機関〉
国立環境研究所
国立保健医療科学院
東京理科大学
金沢医科大学
中国医科大学

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

黄砂とPM2.5による複合大気汚染の肺炎、
アレルギー疾患増悪作用とメカニズム解明に関する研究
(5-1457)

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粒子と吸着成分の相互作用による肺炎・ アレルギー喘息増悪作用とそのメカニズム解明 （大分県立看護科学大学）	・・・・・・・・・・ 1
要旨	・・・・・・・・・・ 1
1. はじめに	・・・・・・・・・・ 2
2. 研究開発目的	・・・・・・・・・・ 2
3. 研究開発方法	・・・・・・・・・・ 2
4. 結果及び考察	・・・・・・・・・・ 6
5. 本研究により得られた成果	・・・・・・・・・・ 3 5
6. 国際共同研究等の状況	・・・・・・・・・・ 3 8
7. 研究成果の発表状況	・・・・・・・・・・ 3 8
8. 引用文献	・・・・・・・・・・ 4 2
（2）黄砂とPM2.5の肺炎・アレルギー喘息増悪機構における細胞ダメージ関連分子の 関与に関する研究 （産業医科大学）	・・・・・・・・・・ 4 3
要旨	・・・・・・・・・・ 4 3
1. はじめに	・・・・・・・・・・ 4 4
2. 研究開発目的	・・・・・・・・・・ 4 4
3. 研究開発方法	・・・・・・・・・・ 4 4
4. 結果及び考察	・・・・・・・・・・ 4 6
5. 本研究により得られた成果	・・・・・・・・・・ 6 3
6. 国際共同研究等の状況	・・・・・・・・・・ 6 4
7. 研究成果の発表状況	・・・・・・・・・・ 6 4
8. 引用文献	・・・・・・・・・・ 6 7
（3）気道上皮細胞と免疫担当細胞を用いた黄砂とPM2.5の肺炎・ アレルギー増悪因子の探索とその増悪分子機構の解明 （京都大学）	・・・・・・・・・・ 6 8
要旨	・・・・・・・・・・ 6 8
1. はじめに	・・・・・・・・・・ 6 9
2. 研究開発目的	・・・・・・・・・・ 6 9
3. 研究開発方法	・・・・・・・・・・ 6 9
4. 結果及び考察	・・・・・・・・・・ 7 0
5. 本研究により得られた成果	・・・・・・・・・・ 8 9

6. 国際共同研究等の状況	89
7. 研究成果の発表状況	90
8. 引用文献	91
(4) 黄砂とPM2.5のアレルギー性結膜炎の増悪作用とそのメカニズム解明 (東京女子医科大学)	92
要旨	92
1. はじめに	93
2. 研究開発目的	93
3. 研究開発方法	93
4. 結果及び考察	94
5. 本研究により得られた成果	103
6. 国際共同研究等の状況	104
7. 研究成果の発表状況	104
8. 引用文献	106
III. 英文Abstract	107

課題名	5-1457 黄砂とPM2.5による複合大気汚染の肺炎、アレルギー疾患増悪作用とメカニズム解明に関する研究
課題代表者名	市瀬 孝道（公立大学法人 大分県立看護科学大学 看護学部 人間科学講座 生体反応学研究室 教授）
研究実施期間	平成26～28年度
累計予算額	151,685千円（うち平成28年度：46,325千円） 予算額は、間接経費を含む。
本研究のキーワード	黄砂、PM2.5、複合曝露、炎症、肺のアレルギー、免疫、気管支喘息、アレルギー性結膜炎、化学物質、LPS(微生物成分)

研究体制

- (1)黄砂・PM2.5粒子と吸着成分の相互作用による肺炎・アレルギー喘息増悪作用とそのメカニズム解明（大分県立看護科学大学）
- (2)黄砂とPM2.5の肺炎・アレルギー喘息増悪機構における細胞ダメージ関連分子の関与に関する研究（産業医科大学）
- (3)気道上皮細胞と免疫担当細胞を用いた黄砂とPM2.5の肺炎・アレルギー増悪因子の探索とその増悪分子機構の解明（京都大学）
- (4)黄砂とPM2.5のアレルギー性結膜炎の増悪作用とそのメカニズム解明（東京女子医科大学）

研究協力機関

東京理科大学、国立環境研究所、国立保健医療科学院、中国医科大学、金沢医科大学

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

近年の中国大都市における人為起源のPM2.5濃度は周知のごとく凄まじく、呼吸器疾患患者が急増し中国国内でも深刻な問題となっている。黄砂に関しても大規模化しており周辺諸国へはPM2.5と共に越境粒子状物質として飛来し、多大な健康被害をもたらす可能性が高い。事実、PM2.5濃度の上昇時や黄砂飛来時に呼吸器系を始めとする様々な疾患（特に日本ではアレルギー疾患の増悪(ぞうあく)）が発生していることも周知のごとくであり、健康被害を防ぐ為の対策が喫緊の課題となっている。しかし、このような黄砂とPM2.5の単一、これらの複合曝露による生体影響に関しては十分なデータは得られておらず、その影響解明が急がれている。

本プロジェクト研究では黄砂とPM2.5の肺の炎症・アレルギー喘息への影響比較を行うと共に、それら粒子に含まれる成分のうち、粒子との相互作用によって肺の炎症やアレルギー疾患（気管支喘息・アレルギー性結膜炎）の増悪作用を引き起こす成分を見出し、その増悪メカニズムを明らかにすると共に、これらの吸着成分の複合曝露による影響を評価することを目的としている。図1に東アジア一帯の黄砂やPM2.5の健康問題の現状と研究の必要性を示した。

研究背景

黄砂の発生回数の増加・大規模化
中国大都市における人為起源のPM2.5濃度上昇



周辺諸国への黄砂とPM2.5の飛散
による東アジアの大気汚染の拡大



多大な健康被害が想定
(上部気道・下気道、眼などへの影響)

健康被害を防ぐ為の対策が喫緊の課題

研究目的

黄砂、PM2.5、粗大粒子、これらの複合影響を炎症やアレルギー増悪の面から解明し、影響評価とメカニズム解明を行う

図1. 研究背景と研究目的

2. 研究開発目的

サブテーマ（1）では細胞培養実験における黄砂とサイズの異なる粒子（PM2.5、coarse PM（CPM：粒径2.5～10μm）、>PM10）の単一曝露による炎症反応、マウスを用いた動物実験によるこれらの粒子の肺における炎症誘導やアレルギー炎症（気管支喘息）の増悪作用メカニズムを付着微生物成分や吸着化学物質の面から調べて明らかにすること、また、PM2.5と黄砂の複合曝露による肺の炎症誘導とアレルギー炎症増悪作用について調べ、その要因と作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

サブテーマ（2）では黄砂或いはその大きさに精製した粒子およびPM2.5の化学的・物理的性状を究明し、それらに単独、あるいは同時に複合曝露されたマウスの生体影響評価を行うことを目的とした。具体的には、粒子状物質を曝露したマウスのリンパ組織から調製した免疫担当細胞を中心に解析し、細胞レベル・分子レベルで細胞内イベントを観察し、作用機序を解明することによって、疫学等の指標となる分子の発見を目的とした。

サブテーマ（3）ではPM2.5および黄砂の粒子自体（加熱粒子）と大気汚染化学物質、具体的には、多環芳香族炭化水素（PAH）であるベンゾ[a]ピレン（BaP）、9,10-フェナントレンキノン（9,10-PQ）または1,2-ナフトキノン（1,2-NQ）の複合曝露による呼吸器系や免疫系に及ぼす影響を、気道上皮細胞、骨髄抗原提示細胞や脾細胞を用いて解析し、それらによる複合影響の有無と影響発現メカニズムを明らかにするとともに、健康影響決定成分や要因の絞り込みとバイオマーカーの同定や予防対策の確立に役立てることを目的とした。

サブテーマ（4）では黄砂やPM2.5などの複合大気汚染物質による眼アレルギーの症状の増悪メカニズムを臨床研究、動物実験、培養細胞を用いた実験により解明することを目標とした。1)臨床研究ではアレルギー性結膜炎患者における、黄砂と、その関連物質の皮膚刺激テストによって黄砂とアレルギー反応との関連を調べた。2)動物実験ではPM2.5及び黄砂のスギ花粉誘導のアレルギー性結膜炎に対する増悪作用とそのメカニズムを調べた。3)大気中粒子状物質に付着した微生物成分がアレルギー性結膜炎を増悪させるメカニズムについて明らかにした。4)ヒト結膜上皮細胞を用いてPM2.5誘導の炎症反応について明らかにすることを目的とした。

3. 研究開発の方法

(1)黄砂・PM2.5粒子と吸着成分の相互作用による肺炎・アレルギー喘息増悪作用とそのメカニズム解明

1)粒子径の違いによる炎症誘導とアレルギー増悪作用

さまざまな大気中の粒子状物質の呼吸器系への影響を調べるために、北九州でサンプリングしたPM2.5と飛来黄砂、中国瀋陽市の大気中から採取したサイズの異なる粒子（PM2.5、CPM、>PM10）を試料として、粒子サイズや構成成分の違いによる肺の炎症やアレルギー炎症誘導の違いとその誘因について、マクロファージを用いた細胞培養実験とマウスを用いた動物実験によって調べた。

2)PM2.5の肺の炎症誘導

PM2.5の肺の炎症誘導について、マウスのマクロファージと肺胞II型上皮細胞を用いた細胞培養実験とマウスへの曝露実験を行い、そのメカニズムを詳しく調べた。

3)都市PM2.5のアレルギー増悪作用

都市由来PM2.5の気管支喘息増悪作用の誘導メカニズムを明らかにするために、微生物成分感知センサーのToll様レセプター（TLR）2欠損(-/-)マウス、TLR4(-/-)マウス、MyD88(-/-)マウスと野生型(WT)マウスを用いてPM2.5の気道曝露実験を行った。

4)PM2.5と黄砂に含まれる鉄(Fe)とアレルギー増悪作用

これまでの研究でPM2.5と黄砂のアレルギー増悪作用の主たる要因はリポポリサッカライド(LPS:グラム陰性菌の細胞壁成分)であることが明らかになったため、LPSを用いて都市由来PM2.5と黄砂のアレルギー増悪作用とこれらの粒子に含まれる鉄(Fe)との関連を鉄キレート剤のデフェロキサミン(DFO)を用いて調べた。PM2.5と黄砂は予め360℃加熱処理して吸着物を取除いた。

5)PM2.5に含まれる銅(Cu)と炎症反応・アレルギー増悪作用

PM2.5では鉄以外の遷移金属が炎症誘導やアレルギー炎症の増悪と関係している可能性が考えられた。銅は鉄と同じようにフェントン反応やハーバーワイズ反応類似の反応によって活性酸素のヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)を生じる。そこで、瀋陽で採取したPM2.5を銅(Cu)キレート剤のメタライト(MTL)で処置してマクロファージ様細胞(RAW264.7)に曝露して炎症反応を調べた。またMTL処置

PM2.5をマウスに投与してアレルギー増悪作用における銅の関与を調べた。

6) 黄砂とPM2.5の複合曝露による炎症誘導とアレルギー炎症への影響

黄砂とPM2.5の複合曝露の炎症反応と肺のアレルギー炎症への影響を明らかにするためにマクロファージを用いた細胞培養実験とマウスを用いた複合曝露実験を行った。全体の細胞への添加量やマウスへの投与量を一定量として、黄砂とPM2.5量に割合を変えた実験を行った。

(2) 黄砂とPM2.5の肺炎・アレルギー喘息増悪機構における細胞ダメージ関連分子の関与に関する研究

- 1) 粒子状物質の物理・化学的症状: 黄砂イベント時に黄砂を北九州市八幡西区折尾地区で捕集し、化学物質濃度測定及び粒子の形態特徴を検索した。瀋陽市で採取した大気粉塵(PM2.5、CPM、>PM10)の成分分析を行った。
- 2) 粒子状物質の細胞内イベント解析: 捕集した黄砂、瀋陽PM2.5やPM10の細胞への影響を細胞内イベントなどの解析により、影響を評価した。方法は粒子を曝露したマウスの脾臓から細胞を調製し、細胞内イベントをウエスタンブロット法などで解析した。

(3) 気道上皮細胞と免疫担当細胞を用いた黄砂とPM2.5の肺炎・アレルギー増悪因子の探索とその増悪分子機構の解明

BaP、9,10-PQ、1,2-NQとディーゼル排気微粒子(DEP: 国立環境研究所、日野自動車製J08Cエンジンを2000 rpm運転時に採取。PM2.5の代表的存在)、黄砂標準物質(国立環境研究所) CRM No.28 都市大気粉塵をPM2.5に精製した粒子、あるいは、CRM No.30 ゴビ黄砂(ASD)を、それぞれ360℃、30分間加熱処理した粒子を被検物質とした(H-DEP、H-PM2.5、H-ASDとした)。呼吸器系の最初の物理的接点であるヒト気道上皮細胞や、免疫応答の開始細胞である骨髄由来抗原提示細胞、複数の免疫担当細胞で構成される脾細胞に、H-DEP、H-PM2.5、H-ASDの存在下、非存在下において、BaP、9,10-PQ、あるいは、1,2-NQを曝露した。細胞活性、細胞増殖能、細胞死、活性酸素種(ROS)の産生、炎症性サイトカインの産生、細胞表面分子の発現等を評価した。

(4) 黄砂とPM2.5のアレルギー性結膜炎の増悪作用とそのメカニズム解明

- 1) アレルギー性結膜炎の患者数を1日毎に調査した。環境省ライダー観測結果より、大気中PM2.5、オキシダント、一酸化窒素、二酸化窒素、窒素酸化物、一酸化炭素、メタン、非メタン炭化水素、全炭化水素、風速、温度、湿度の1時間毎のデータから24時間の平均値を毎日、算出した。因子毎に1週間の平均値を求め、アレルギー性結膜炎患者来院数に対する各因子の相関ならびに多変量解析を行った。
- 2) アレルギー性結膜炎の患者において、黄砂抽出液、微生物を死滅させた加熱黄砂と、その関連物質により皮膚刺激テストを施行し、黄砂に含まれる因子によるアレルギー反応を調べた。
- 3) 黄砂のスギ花粉誘発性アレルギー性結膜炎モデルマウスへの影響を調べるために、マウス眼に生理食塩水、スギ花粉、PM2.5、黄砂、スギ+PM2.5、スギ+黄砂を曝露し、黄砂のスギ花粉症によるアレルギー性結膜炎の増悪作用を調べた。
- 4) 微生物成分とアレルギー性結膜炎の増悪作用との関連を明らかにするために、野生型(WT)のBALB/cマウスと MyD88欠損(-/-)マウスの眼にPM2.5とスギ花粉抗原を曝露し、アレルギー性結膜炎の増悪作用を比較し検討した。
- 5) ヒト結膜上皮細胞に0、1、10、50、100µg/mlの濃度になるようにPM2.5を添加し、12時間、24時間と48時間後の培養液中の炎症性サイトカインのIL-6と好酸球の遊走活性を持つRANTESの蛋白濃度をELISA法にて測定した。

4. 結果及び考察

(1) 黄砂・PM2.5粒子と吸着成分の相互作用による肺炎・アレルギー喘息増悪作用とそのメカニズム解明

1) 粒子径の違いによる炎症誘導とアレルギー増悪作用

粒子状物質の微生物成分(LPS、 β -glucan)量は粗大粒子(CPM:2.5-10µm、>PM10)の方がPM2.5より多く含んでいたが、逆に化石燃料燃焼由来の成分(硫酸塩、硝酸塩、多環芳香族炭化水素類(PAHs))はPM2.5の方が多く含んでいた。マクロファージによる細胞培養実験では、炎症反応(炎症性遺伝子発現)の強さは微生物成分が多い粗大粒子の方がPM2.5よりも強く発現した。一方、化学物質を多く含むPM2.5は粗大粒子よりも酸化的ストレスが強く誘導されていることがNrf2活性やHO-1発現から明らかとなった。経気道曝露したマウス肺の炎症やアレルギー炎症は、PM2.5よりも粗大粒子の方が強く誘導された。その主な要因は微生物成分によるものであった。黄砂由来の砂成分のPM2.5も化

学物質を多く含む瀋陽のPM2.5よりも微生物成分を多く含み、これらの影響が強かった。以上の結果から、呼吸器系への影響はPM2.5よりも粗大粒子の方が強いことが明らかとなった。

2) PM2.5の肺の炎症誘導

マクロファージにおけるPM2.5誘導の炎症反応に対してLPS阻害剤のPMBが抑制効果を示し、抗酸化剤のNACではさほど抑制効果を示さなかった。マクロファージ様細胞では微生物センサーのTLRsが発達していて、PM2.5に付着した微生物成分のLPS等をよく感知してLPS/TLR4/MyD88を介したシグナル伝達によって炎症反応が誘導されると考えられた。一方、肺胞II型上皮細胞ではNACで抑制効果を示し、PMBは抑制効果を示さなかった。肺胞II型上皮細胞ではPM2.5によって誘導される酸化ストレスによって炎症反応が起きていると考えられた。この酸化ストレスはPM2.5に存在するPAHsから生じるものと推察された。一方、マウスを用いた動物実験では、PM2.5誘導の好中球性の肺の炎症は抗酸化剤のNACで抑制され、PMBでは抑制されなかった。これは肺胞II型上皮細胞の反応と類似していた。実際のマウスの肺ではマクロファージ数よりも肺胞II型上皮細胞数の方が圧倒的に多いため、酸化ストレスによって起こる肺胞II型上皮細胞由来の炎症の方が、LPSをTLR4で感知しておこるマクロファージの炎症誘導よりも優位に起きているものと示唆された。

3) 都市PM2.5のアレルギー増悪作用

PM2.5曝露による肺のアレルギー炎症は野生型(WT)>TLR2欠損(-/-)>TLR4-/->MyD88-/-マウスの順に強く、増悪作用はTLR4-/-やMyD88-/-マウスで著しく抑制された。この結果から、TLR4/MyD88シグナル伝達経路を介して増悪作用が起こるものと思われた。TLR2やTLR4を刺激する微生物成分以外のものとして、TLR2を刺激する過酸化水素(H₂O₂)、TLR4を刺激するニッケル(Ni)や両方を刺激するチタン(Ti)などが知られているが、TLR4-/-マウスで著しい肺のアレルギー炎症が抑制されたことから、主にTLR4のリガンドであるLPSがPM2.5のアレルギー炎症増悪作用に重要な役割を果たしているものと考えられた。

4) PM2.5と黄砂に含まれる鉄(Fe)とアレルギー増悪作用について

都市PM2.5+LPSによる肺のアレルギー炎症では鉄キレート剤のDFOによる抑制効果は低かったが、黄砂+LPSによるアレルギー炎症では抑制効果を示した。この結果から、黄砂では鉄がアレルギー増悪作用に関与しているものと考えられた。炎症過程で発生するO₂⁻やH₂O₂が黄砂のFe³⁺と反応することによってよりアクティブな・OHが生じ、これらの活性酸素がアレルギーの増悪の一部に関与している可能性を示唆した。しかし、PM2.5はDFOの抑制効果が低いことから、Fe以外の黄砂には少ない遷移金属類が関与している可能性が推察された。

5) PM2.5に含まれる銅(Cu)と炎症反応・アレルギー増悪作用

銅(Cu)キレート剤のメタライト(MTL)で処置したPM2.5をマクロファージ様細胞(RAW264.7)に曝露すると炎症反応が著しく抑制され、この時に酸化ストレス反応指標のHO-1も著しく抑制された。この結果から、PM2.5の中のCuと酸化ストレスが炎症反応と関連していることが示唆された。PM2.5とMTLを前処置してマウスに曝露して肺のアレルギー増悪作用を調べた。一般の炎症で誘導される好中球はMTLによって抑制されたが、アレルギー炎症で誘導される好酸球は抑制されなかった。この結果から、好中球性炎症には銅の関与が考えられるが、好酸球性のアレルギー炎症には関与していないことが示唆された。このマウス実験に使用したPM2.5は細胞培養実験に使用した瀋陽のPM2.5とは異なり、国立環境研究所所有の北京降下煤塵をPM2.5に精製したもので、微生物成分のLPSやβ-glucanを沢山含んでいた。このため、アレルギー反応に微生物の反応が強く出た可能性が考えられた。今後、LPS等が少ないフレッシュなPM2.5を用いて銅との関連を明らかにする必要があると考えられた。

6) 黄砂とPM2.5の複合曝露による炎症誘導とアレルギー炎症への影響

細胞培養実験での炎症反応(炎症性遺伝子発現)はPM2.5より黄砂の方が強く起こり、複合曝露した時の炎症の強さは黄砂の割合が多いほど強かった。PM2.5に含まれる化学物質よりも黄砂に付着した微生物成分(LPS、β-glucan)の方が炎症誘導に強く働いていると考えられた。また、動物実験の肺のアレルギー炎症に関しても黄砂の影響が強く、複合曝露による影響はPM2.5と黄砂の相加的効果であることが分かった。しかし、黄砂の量が過剰になるとLPS量も多くなるために逆に免疫抑制が起き、アレルギー反応が抑制されることも分かった。

(2) 黄砂とPM2.5の肺炎・アレルギー喘息増悪機構における細胞ダメージ関連分子の関与に関する研究

- 1) Andersen Hi-volume air samplerを用いて捕集した粒子量は、日内変動が大きかった。また、2013年以降、春季の大気汚染の発生源は、石炭・バイオマス燃焼由来から石油系燃焼由来へと推移していることが示唆された。

瀋陽の2016年1月採取PM2.5のPAHs濃度は2013年11月のそれに比べて1/10以下と急激に低下していることが分かった。またPAHsはそれぞれ濃度差があり高濃度群、中濃度群、低濃度群に分類できるが、これらの濃度傾向は北九州地域とほぼ同様であった。なお、2013年11月のBaP濃度は、1975年の東京や北九州の大気中のBaP濃度の3倍以上の高値であった。しかし、瀋陽の2016年1月の時点でのPAHs濃度は1975年の日本のレベルまで低下していた。また、有機炭素(OC)1が少なくなり、無機炭素(EC)1が多くなってきている傾向が認められた。以上の結果より、明らかに中国・瀋陽の大気環境が改善されていることが示された。

- 2) 黄砂や都市大気から収集したPM10を曝露したマウスの脾臓細胞（免疫担当細胞）ではConAやLPSなどの増殖誘発因子の刺激に対して増強反応を示し、炎症誘導等に関係する細胞内分子NF- κ B（転写因子）の活性化を誘導（免疫の活性化）した。これらの反応は黄砂に付着したLPSによるものであるが、付着LPS量が多い場合には逆に抑制されることが分かった。

PM2.5に曝露した脾臓細胞ではConAやLPS刺激に対して抑制反応（免疫抑制）を示した。このPM2.5曝露の脾臓細胞の抑制効果は活性酸素阻害剤のN-アセチルシステイン(NAC)で阻止された。また、PM2.5曝露マウスの脾臓細胞では酸化ストレスのマーカーのHO-1発現も認められた。これらの結果から、その抑制反応には酸化ストレスが関与していることが明らかとなった。このHO-1発現の増加は、特にCD11b陽性細胞（好中球などが代表）で認められた。一方、細胞内分子NF- κ B（転写因子）の活性化はこの時、定常状態に近いものであった。活性化の亢進が見られない原因として粒子に付着している物質の関与が示唆された。特にLPSは反応のバランスをとるのに非常に重要な役割をしていると考えられた。

黄砂とPM2.5の複合曝露における脾臓細胞はConAやLPS刺激に対して増強反応を示したが、その反応は黄砂単独曝露時の増強反応からPM2.5単独曝露時の抑制反応をマイナスした反応に等しかった。このようにPM2.5と黄砂の複合曝露では、脾臓細胞の活性化が維持され、PM2.5の効果よりも黄砂の効果が強いことが示された。粒子のサイズに注目すると、より大きなもの（PM2.5より黄砂）が免疫系に対する影響力を持つことが示唆された。

(3) 気道上皮細胞と免疫担当細胞を用いた黄砂とPM2.5の肺炎・アレルギー増悪因子の探索とその増悪分子機構の解明

- 1) BaPは、ヒト気道上皮細胞や脾細胞よりむしろ、抗原提示細胞に作用した。H-DEP、H-ASDは、それぞれ気道上皮細胞に対する障害性や、僅かな抗原提示細胞の活性化作用を示した。BaPとH-DEPやH-ASDとの複合曝露は、相加的に、細胞表面分子CD86の発現を増加させた。以上、BaPとPM2.5やASDの粒子自体（加熱粒子）の複合曝露は、相加的に抗原提示細胞を活性化させることから、気管支喘息や肺炎等の呼吸器系、免疫系疾患を増悪しうることが示された。
- 2) 9, 10-PQ、あるいは、1, 2-NQは、H-PM2.5、H-ASDの存在下、非存在下において、何れも、抗原提示細胞を活性化させなかった。一方、9,10-PQあるいは、1,2-NQは、気道上皮細胞に障害性、催炎症性反応、ROS産生を誘導した。H-PM2.5、H-ASD、H-PM2.5+H-ASDは、気道上皮細胞に対する障害性やROS産生を示した。また、化学物質との複合曝露では、H-ASDよりもH-PM2.5の方が気道上皮細胞の細胞死を誘導した。9,10-PQや1,2-NQは、H-PM2.5と共存した時に、細胞存在下あるいは非存在下において、最も高いROS産生を示した。以上、9,10-PQや1,2-NQなどの化学物質とPM2.5やASDの複合曝露は、細胞内ROS産生や細胞外の酸化反応を介して、呼吸器疾患を増悪しうることが示された。

(4) 黄砂とPM2.5のアレルギー性結膜炎の増悪作用とそのメカニズム解明

1) 大気中PM2.5浮遊濃度とアレルギー性結膜炎患者数の変動の相関

5～8月の花粉の少ない時期ではPM2.5のみがアレルギー性結膜炎患者数と相関し、多変量解析によりアレルギー性結膜炎患者数の説明変数としてPM2.5が選択された。PM2.5はアレルギー性結膜炎の発症要因の一つとなっている可能性が示唆された。

2) 黄砂のアレルギー性結膜炎患者への影響

臨床研究において、アレルギー性結膜炎患者では、黄砂抽出液にはアレルギー反応を示すが、加熱黄砂では低下した。またカテゴリカル解析により、黄砂反応は花粉4種、カビ系3種と相関するが、食物3種や動物2種、ハウスダスト2種と相関しないことから、黄砂に付着した花粉や微生物の死骸などのアジュバント効果（抗原作用を高める作用）が、アレルギー症状を引き起こすことが分かった。

3) PM2.5と黄砂のスギ花粉誘発性アレルギー性結膜炎への影響

マウス眼にスギ、PM2.5、黄砂、スギ+PM2.5、スギ+黄砂を点眼したところ、いずれも1時間後

に結膜浮腫と充血が見られるが、24時間後にはスギとPM2.5では低下し、黄砂あるいはスギ + 黄砂では結膜浮腫ならびに充血が持続し、角膜上皮びらんが見られた。これらの結果は大気中浮遊物が物理的刺激により結膜炎を引き起こし、その効果はPM2.5より黄砂の方が強いことを示している。大気中浮遊物はスギによるアレルギー性結膜炎を増悪させている可能性が示唆された。これらの結果から、黄砂飛来時期に結膜嚢内の黄砂成分を洗うことが、結膜炎症状の軽減につながると考えられる。

4) 大気中浮遊物に含まれる微生物成分によるアレルギー性結膜炎増悪作用

野生型(WT)マウスではスギ花粉単独よりもPM2.5と黄砂を加えた方が、眼症状（眼擦過回数）と結膜内の炎症は増悪し、重症度はPM2.5よりも黄砂の方が強かった。一方、MyD88(-/-)マウスではWTマウスと比較して、PM2.5や黄砂による眼炎症の増悪が減弱した。結膜組織中の炎症性サイトカインであるIL-6も同様の結果を示した。これらの結果により、大気中浮遊物は物理的刺激が大きい黄砂の方がPM2.5より結膜炎を強く引き起こすことが示唆された。また組織学的検討では、WTマウスではスギ単独点眼よりもPM2.5や黄砂を加えた方が結膜浮腫が強くなるが、MyD88(-/-)マウスではWTと比較すると結膜浮腫が減弱した。これらの結果から、大気中浮遊物に含まれる微生物成分がTLR/MyD88を介してアレルギー性結膜炎を悪化させている可能性が示唆された。

5) PM2.5によるヒト結膜上皮細胞における炎症反応

結膜上皮細胞をPM2.5により刺激をすると、培養上清中の炎症性サイトカインのIL-6と好酸球の遊走活性を持つRANTESは濃度依存性に増加した。この結果から、アレルギー炎症に必須な炎症性蛋白がPM2.5刺激により産生され、アレルギー性結膜炎を悪化していることが示唆された。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

サブテーマ (1) :

- 1) これ迄の報告では粗大粒子よりもPM2.5の方が呼吸器への影響が強いとされてきたが、同一重量で比較すると粗大粒子（黄砂、CPM、>PM10）の方がPM2.5より影響が強いことが明らかとなった。
- 2) これ迄PM2.5による肺の炎症誘導メカニズムは明らかでなかったが、肺胞の炎症に関してはマクロファージによるLPS/微生物センサー(TLR4)を介した炎症誘導よりも、肺胞II型上皮細胞における酸化的ストレスによる炎症誘導の方が優勢であることを新たに発見した。
- 3) これ迄PM2.5によるアレルギー炎症増悪作用は明らかではなかったが、TLR4/MyD88シグナル伝達経路を介して増悪作用が起こり、主にTLR4のリガンドであるLPSがPM2.5のアレルギー炎症増悪作用に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。
- 4) 黄砂のアレルギー増悪作用に鉄(Fe)が、PM2.5のアレルギー増悪作用には鉄以外の金属が関与していることが明らかとなった。
- 5) PM2.5の炎症反応の一部には銅(Cu)と酸化的ストレスが関与しているが、アレルギー炎症の増悪作用には関与していないことが分かった。
- 6) 黄砂とPM2.5の複合影響は相加効果を示し、複合曝露時の炎症反応やアレルギー炎症増悪作用は黄砂量に依存するが、過剰になるとアレルギー反応は逆に抑制されることが明らかとなった。その増悪・抑制要因はLPSであることを見出した。

サブテーマ (2) :

- 1) 2014年以降、黄砂の飛来回数は非常に少なくなってきた。2013年以降、春季の大気汚染の発生源は、石炭・バイオマス燃焼由来から石油系燃焼由来へと推移してきていることが示唆された。また、中国・瀋陽のPM2.5の成分分析から、明らかに大気環境の改善が認められて来ている。
- 2) 黄砂や都市大気PM10が免疫担当細胞を活性化することは、アレルギーなど生体が過剰な状態を呈する疾患において、その過剰反応を更に高めることを意味している。その影響は、分子レベルでの解析で予測を立てることが可能であり、転写因子NF- κ Bの活性化はその評価指標の一つとなり得る。このNF- κ Bは生体のホメオスタシスを維持する上でも重要な分子であり、次の外部刺激を受けると増強反応や抑制反応に働くことが示唆された。
- 3) 粒子に付着している微生物由来のLPSが生体影響の一端を担っていることが示唆された。一方、粒子サイズが小さいPM2.5は免疫系を抑制することが示唆された。その抑制には酸化ストレスが深く関与していることが明らかとなった。また、酸化ストレスマーカー(HO-1)を調べることで影響評価が可能であることを示唆した。PM2.5と黄砂に付着している物質は影響誘導に強く関与しており、リンパ組織への影響の違いにこれらの物質が関与していることが示された。酸化ストレスマーカーの一つは、細胞ダメージ関連分子として捉えることができ、この分子は種々の粒子の生体影響を評価す

る上で重要な分子であることが分かった。

サブテーマ（3）：

- 1) PM2.5やASDの粒子自体（加熱粒子）やPAHs、特に、BaP、9,10-PQ、1,2-NQの単独曝露は呼吸器系や免疫系に影響を及ぼすこと、これらが、気管支喘息、肺炎等の悪化要因として重要であることを明らかにした。具体的には、気道上皮細胞に対しては、障害性や催炎症性反応を、抗原提示細胞に対しては、細胞表面分子CD86発現等の増加を介した活性化を誘導することを示した。
- 2) BaPと加熱PM2.5や加熱ASDとの複合曝露は、相加的に細胞表面分子CD86発現等の増加を介して抗原提示能を活性化させた。9,10-PQや1,2-NQとの複合曝露の場合、加熱ASDよりも加熱PM2.5の方が相加・相乗的に細胞内ROS産生や細胞外酸化反応を誘導し、気道上皮細胞の障害性を増強することが明らかとなった。
- 3) 抗原提示細胞の細胞表面分子CD86発現や、PM2.5やASDの細胞内ROS産生や細胞外酸化反応が影響発現メカニズムとして重要であり、かつ、バイオマーカーとして有用であることを示した。

サブテーマ（4）：

- 1) PM2.5はアレルギー性結膜炎の発症要因の一つであることを疫学調査で明らかにした。
- 2) 粒子状物質による直接的な物理的刺激や結膜炎によりアレルギー性結膜炎が増悪されることを初めて明らかにした。
- 3) その作用はPM2.5より粒子径が大きい黄砂の方が強いことが明らかになった。
- 4) 粒子状物質に付着した生物成分がTLR/MyD88シグナル経路を介して、アレルギー性結膜炎を増悪させていることを見出した。

（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＞

サブテーマ（1）：

- 1) 日本へ飛来が予測される中国都市大気の粒子状物質について、粒径の違い（PM2.5、CPM、>PM10）による影響を比較すると、肺の炎症やアレルギー炎症への影響は、粒子サイズが大きいほど影響が強く、影響は付着微生物成分量と相関していることを提示した。また、黄砂由来の砂粒子のPM2.5は都市由来PM2.5より影響が強いことを提示した。
- 2) PM2.5の肺の炎症誘導、特に肺胞を中心とした炎症はPM2.5から発生する活性酸素が肺胞II型上皮細胞に作用して誘導されることを提示した。
- 3) PM2.5と黄砂の炎症誘導とアレルギー増悪要因は粒子に付着した微生物成分、特にLPSが重要であり、黄砂はこれに加えて鉄(Fe)の存在も重要であることを提示した。また、PM2.5では銅(Cu)が炎症誘導に関与している可能性を提示した。これらのLPSや金属類の知見は粒子状物質の疫学研究においても重要な指標となりうると考えられる。
- 4) 黄砂とPM2.5の複合曝露による肺の炎症誘導やアレルギー増悪作用は相加的であり、その強さは黄砂の量に依存するが、過剰になるとアレルギー反応が逆に抑制されることを提示した。
- 5) 肺の炎症やアレルギー炎症のような一過性の影響は黄砂の方がPM2.5より強いことが分かるが、慢性閉塞肺疾患(COPD)や発がんなどの慢性影響に関しては常時発生が見られる都市PM2.5の長期曝露による慢性影響を調べるのが今後重要であることを提言する。
- 6) 本研究の基礎的な成果は、行政によるPM2.5や黄砂の健康影響や健康被害を見極めるための知見となり、また原因物質を軽減するための基礎資料となり、更に、環境基準値や健康被害の未然防止策などに関連する環境政策に役立てることができる。と考える。
- 7) これらの研究成果を多くの科学雑誌に公表することで、粒子状物質の健康影響に関する国際的共通理解を形成し、粒子状物質の危険性を警鐘し、国際的なPM2.5や黄砂発生の低減策の取組みに役立てることができる。

サブテーマ（2）：

- 1) 粒子状物質曝露によるダメージ・ストレス関連分子(NF- κ B・HO-1等)を標的・観察することで、ヒトでの健康影響評価に応用できることを提示する。例えば末梢血のマーカー分子を標的として粒子

の生体影響を間接的に予測することができれば、その応用範囲も拡大する。

- 2) 付着物の性質（化学物質・微生物成分）によりその影響度に差異が生じることが示唆されたことから、その含有量とマーカー分子のプロファイルを作成することで、ヒトでの健康影響評価（アレルギー性炎症やCOPD）への予測ができると思う。

サブテーマ（3）：

- 1) 呼吸器疾患の悪化の要因を絞り込んだことから、PM2.5や黄砂全体のモニタリングだけでなく、BaPのほかに、新たに、9,10-PQや1,2-NQを有害大気汚染物質として、モニタリング対象物質の候補として挙げることを提案する。
- 2) 抗原提示細胞の細胞表面分子CD86発現や、PM2.5やASDの細胞内ROS産生や細胞外酸化反応が影響発現メカニズムとして重要であり、かつ、バイオマーカーとして有用であることを示したことから、これらの指標を黄砂やPM2.5の疫学調査指標の候補や、黄砂やPM2.5の簡易健康影響評価の指標候補として挙げる事ができた。これらの成果は国内や国際的なPM2.5問題を解決するための政策上の基礎資料として役立てることができる。

サブテーマ（4）：

- 1) 黄砂やPM2.5は直接的な眼刺激作用を持つのみならず、物理的刺激による結膜上皮バリアーの破壊や、花粉や付着微生物などの作用により、花粉症を悪化させることを提示した。
- 2) 粒子状物質による眼障害を予防するためには、保護眼鏡やゴーグルなどによる黄砂の回避や洗眼行為が有効であることを提言する。また、これらの成果は治療や予防などに関連する環境政策に貢献できる基礎資料となりうると考える。

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) Y. REN, T. ICHINOSE, M. HE, K. ARASHIDANI, Y. YOSHIDA, S. YOSHIDA, M. NISHIKAWA, H. TAKANO, G. SUN, T. SHIBAMOTO: *Environ Health*. 13, 83 (2014)
“Aggravation of ovalbumin-induced murine asthma by co-exposure to desert-dust and organic chemicals: an animal model study”
- 2) T. MIMURA, S. YAMAGAMI, H. FUJISHIMA, H. NOMA, Y. KAMEI, M. GOTO, A. KONDO, M. MATSUBARA: *Environmental Research*. 132, C, 220-225 (2014)
“Sensitization to asian dust and allergic rhinoconjunctivitis”
- 3) T. MIMURA, T. ICHINOSE, S. YAMAGAMI, H. FUJISHIMA, Y. KAMEI, M. GOTO, S. TAKADA, M. MATSUBARA: *Science of the Total Environment*. 487, C, 493-499 (2014)
“Airborne particulate matter (PM2.5) and the prevalence of allergic conjunctivitis in Japan”
- 4) M. HE, T. ICHINOSE, Y. REN, Y. SONG, Y. YOSHIDA, K. ARASHIDANI, S. YOSHIDA, M. NISHIKAWA, H. TAKANO, G. SUN: *Inhal Toxicol*. 28:1-13 (2015)
“PM2.5-rich dust collected from the air in Fukuoka, Kyushu, Japan, can exacerbate murine lung eosinophilia.”
- 5) M. HE, T. ICHINOSE, Y. SONG, Y. YOSHIDA, F. KOBAYASHI, T. MAKI, S. YOSHIDA, H. TAKANO, T. SHIBAMOTO, G. SUN: *Int Arch Allergy Immunol* 8;168(2):96-106 (2015)
“The Role of Toll-Like Receptors and Myeloid Differentiation Factor 88 in *Bjerkandera adusta*-Induced Lung Inflammation.”
- 6) M. HE, T. ICHINOSE, B. LIUL, Y. SONG, Y. YOSHIDA, F. KOBAYASHI, T. MAKI, S. YOSHIDA, M. NISHIKAWA, H. TAKANO, G. SUN: *Environ Toxicol*. 31(1):93-105 (2016)
“Silica-carrying particulate matter enhances *Bjerkandera adusta*-induced murine lung eosinophilia.”
- 7) M. HE, T. ICHINOSE, S. YOSHIDA, F. SHIBA, K. ARASHIDANI, H. TAKANO, G. SUN, T. SHIBAMOTO: *Inhal Toxicol*. 28: 706-718 (2016)
“Differences in allergic inflammatory responses in murine lungs: Comparison of PM2.5 and coarse PM collected during the hazy events in a Chinese city”
- 8) M. HE, T. ICHINOSE, Y. SONG, Y. YOSHIDA, K. BEKKI, K. ARASHIDANI, S. YOSHIDA, M. NISHIKAWA, H. TAKANO, T. SHIBAMOTO, G. SUN: *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 296:61-72 (2016)

- “Desert dust induces TLRs signaling to trigger Th2-dominant lung allergic inflammation via a MyD88-dependent signaling pathway”
- 9) M. HE, T. ICHINOSE, M. KOBAYASHI, K. ARASHIDANI, S. YOSHIDA, M. NISHIKAWA, H. TAKANO, G. SUN, T. SHIBAMOTO: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 297:41-55 (2016)
“Differences in allergic inflammatory responses between urban PM2.5 and fine particle derived from desert-dust in murine lungs”
 - 10) S. YOSHIDA, T. ICHINOSE, K. ARASHIDANI, M. HE, H. TAKANO and T. SHIBAMOTO: *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 13:1173 (2016)
“Effects of Fetal Exposure to Asian Sand Dust on Development and Reproduction in Male Offspring”
 - 11) K. BEKKI, T. ITO, Y. YOSHIDA, C. HE, K. ARASHIDANI, M. HE, G. SUN, Y. ZENG, H. SONE, N. KUNUGITA, T. ICHINOSE: *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 45:362-369 (2016)
“PM2.5 collected in China causes inflammatory and oxidative stress responses in macrophages through the multiple pathways”
 - 12) Y. SONG, T. ICHINOSE, M. HE, C. HE, K. MORITA, Y. YOSHIDA: *Toxicology Research*. 5;1445 – 1452(2016)
“Lipopolysaccharide attached to urban particulate matter 10 suppresses immune responses in splenocytes while particulate matter itself activates NF- κ B”
 - 13) M. HE, T. ICHINOSE, S. YOSHIDA, T. ITO, C. HE, Y. YOSHIDA, K. ARASHIDANI, H. TAKANO, G. SUN, T. SHIBAMOTO: *J. Appl. Toxicol.* doi:10.1002/jat.3482 (2017)
“PM2.5-induced lung inflammation in mice: Differences of inflammatory response in macrophages and type II alveolar cells”
 - 14) A. HONDA, T. SAWAHARA, T. HAYASHI, K. TSUJI, W. FUKUSHIMA, M. OISHI, G. KITAMURA, H. KUDO, S. ITO, S. YOSHIDA, T. ICHINOSE, K. UEDA, H. TAKANO: *J Appl Toxicol.* 37, 5, 583-590 (2017)
“Biological factor related to Asian sand dust particles contributes to the exacerbation of asthma”
 - 15) P.H. CHOWDHURY, G. KITAMURA, A. HONDA, T. SAWAHARA, T. HAYASHI, W. FUKUSHIMA, H. KUDOU, S. ITO, S. YOSHIDA, T. ICHINOSE, K. UEDA, H. TAKANO: *Environ Toxicol* (2017)
“Synergistic effect of carbon nuclei and polyaromatic hydrocarbons on respiratory and immune responses” (in press)

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) 市瀬孝道: 専門医のためのアレルギー学講座. XVI. 環境因子とアレルギー. 日本アレルギー学会、63, (8), 1085-1094 (2014)
「3. 大気汚染(PM2.5, 黄砂等)とアレルギーに関する研究の進展」
- 2) 本田晶子: 専門医のためのアレルギー学講座. XVI. 環境因子とアレルギー. 日本アレルギー学会、63, (9), 1205-1215 (2014)
「4. 環境化学物質とアレルギーに関する研究の進展」
- 3) 三村達哉: 専門医のためのアレルギー学講座. XVI. 環境因子とアレルギー. 日本アレルギー学会、63, (7), 901-906 (2014)
「専門医のためのアレルギー学講座: 眼科領域におけるアレルギーと環境因子」
- 4) 三村達哉: 眼を取り巻く環境因子. 日本眼アレルギー学会学術誌. 年次報告 (2014)
- 5) 三村達哉: PM2.5 Allergy Specialist's Voice 1-2 (2014)
- 6) 三村達哉: 特集: 眼アレルギー診療のminimal essential アレルギーの臨床、北隆館／ニュー・サイエンス社. 35(7):No.473:645-648, (2015)
「PM2.5及び黄砂の眼疾患との関連」
- 7) 市瀬孝道: 日本小児呼吸器学会雑誌. 総説. 日本小児呼吸器学会、28, (1), 1-7 (2017)
「大気中の粒子状物質の肺の炎症とアレルギーへの影響」
- 8) 三村達哉: わかりやすい臨床講座. 日本の眼科. 88, (3), 13-25 (2017)
「環境因子とアレルギー性結膜炎」

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 市瀬孝道、M. HE、吉田成一、定金香里、高野裕久: 第 55 回大気環境学会年会(2014)

- 「中国瀋陽市における PM2.5 と PM10 のマウスのアレルギー性気道炎症への影響」
- 2) Y. YOSHIDA, Y. SONG, T. ICHINOSE: World asthma, NY, USA, (2014)
“Asian sand dust causes acute lung inflammation and subacute peripheral events”
 - 3) 吉田成一、賀森、三浦早織、市瀬孝道: 日本薬学会第 135 年会 (2015)
「微小粒子状物質 PM2.5 によるマウスマクロファージ細胞の遺伝子発現に対する影響」
 - 4) 戸次加奈江、伊藤智彦、吉田安宏、C. HE、M. HE、平野靖史郎、樺田尚樹、市瀬孝道: 日本薬学会第 135 年会 (2015)
「中国の PM2.5 を暴露したマウスマクロファージにおける酸化ストレスおよび炎症反応の誘導」
 - 5) 本田晶子、澤原隆紘、林智裕、辻堅志、福嶋渉、大石瑞貴、北村岳、工藤仁美、伊藤翔、吉田成一、市瀬孝道、上田佳代、高野裕久: 第22回日本免疫毒性学会 (2015)
「黄砂に付着する生物的・化学的成分が呼吸器・免疫系に及ぼす影響」
 - 6) 本田晶子、高野裕久: 第56回大気環境学会 (2015)
「微小粒子状物質成分の健康影響～実験研究的アプローチからの知見～」
 - 7) 三村達哉、山上聡、亀井裕子、五嶋摩理、近藤亜紀、松原正男、市瀬孝道: 第2回城北眼科フォーラム (2015)
「大気中PM2.5濃度のアレルギー性結膜炎患者数に与える影響」
 - 8) 市瀬孝道、吉田成一、定金香里、嵐谷奎一、M. HE: 第 57 回大気環境学会年会 (2016)
「PM2.5のTLR2, 4とMyD88シグナル経路を介した肺のアレルギー増悪作用」
 - 9) C. HE, T. ICHINOSE, Y. SONG, D. WANG, K. MORITA, T. KANAZAWA, and Y. YOSHIDA: 16th International congress of Immunology, Melbourne, Australia, (2016)
“PM2.5 induces oxidative stress in splenic CD11b+ cells in mouse”
 - 10) Y. YOSHIDA, Y. SOMG, C. HE, D. WANG, K. MORITA, T. ICHINOSE: 第39回日本分子生物学会 (2016)
“Immune negative modulation of environmental pollutant”
 - 11) Y. SONG, T. ICHINOSE, Y. YOSHIDA: 第39回日本分子生物学会 (2016)
「PM10によるTLR-MyD88経路を介した脾臓細胞でのNF-κB活性化」
 - 12) 三村達哉: 第 70 回日本臨床眼科学会 (2016)
「アレルギー性結膜炎における環境因子と上皮バリアー」
 - 13) Y. YOSHIDA, C. HE, Y. SONG, D. WANG, K. MORITA, T. ICHINOSE: 第16回分子予防環境医学研究会 (2017)
「環境汚染物質の免疫細胞に対する修飾作用」
 - 14) 市瀬孝道、吉田成一: 日本薬学会第 137 年会 (2017)
「PM2.5と黄砂の単一及び複合曝露がアレルギー気道炎症に与える影響」

7. 研究者略歴

課題代表者: 市瀬 孝道

麻布獣医科大学獣医学部卒業、獣医学博士、現在、大分県立看護科学大学看護学部教授

研究分担者

1) 吉田 安宏

広島大学大学院医学研究科修了、博士(医学)、現在、産業医科大学准教授

2) 高野 裕久

京都府立医科大学医学部卒業、博士(医学)、現在、京都大学教授

3) 三村 達哉

山梨医科大学医学部卒業、博士(医学)、現在、東京女子医科大学准教授

5-1457 黄砂とPM2.5による複合大気汚染の肺炎、アレルギー疾患増悪作用とメカニズム解明

(1) 黄砂・PM2.5粒子と吸着成分の相互作用による肺炎・アレルギー喘息増悪作用とそのメカニズム解明

大分県立看護科学大学 看護学部

市瀬 孝道・吉田 成一・定金 香里

〈研究協力者〉

東京理科大学 環境安全センター

西川 雅高

国立環境研究所

環境リスク・健康研究センター

伊藤 智彦

国立保健医療科学院 生活環境研究部

戸次 加奈江

中国医科大学 公共衛生学院

賀 森

金沢医科大学 医学部

小林 誠（平成26～27年度）

平成26～28年度累計予算額：76,506千円（うち平成28年度：25,160千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

サブテーマ（1）では、細胞培養実験やマウスを使った動物実験によって、黄砂とPM2.5のそれぞれの肺の炎症誘導やアレルギー炎症の増悪メカニズムについて明らかにすると共に、これらの複合曝露による影響について調べた。その結果、粒径が小さいPM2.5よりも大きい粒子（黄砂、coarse PM:CPM）の方が、微生物成分のリポポリサッカライド（LPS:グラム陽性菌の細胞壁成分）等の量が多く炎症反応が強く起こること、また、この炎症はマクロファージ等の微生物成分を感知するセンサーのToll様レセプター（TLR）2、TLR4とそのアダプター蛋白のMyD88を介して誘導されることが分かった。しかし、PM2.5は、酸化ストレス反応が大きな粒子よりも強く起こり、特に肺胞上皮細胞に対して酸化ストレス誘導による炎症反応を引き起こすことが明らかとなった。また、PM2.5の炎症誘導に銅が、黄砂のアレルギー増悪作用には鉄が関与していることも明らかとなった。一方、気管支喘息におけるアレルギー炎症増悪作用に関しても黄砂やPM2.5に付着した微生物成分（LPS、 β -glucan）が深く関わっており、微生物センサーのTLR4、TLR2 / MyD88を介してアレルギー反応が高まることが明らかとなった。黄砂とPM2.5複合曝露では、炎症やアレルギー炎症に相加効果が認められ、これらの強さは黄砂量に依存するが、黄砂が過剰になると、アレルギー反応が抑制されることが明らかとなった。

[キーワード]

黄砂、PM2.5、肺の炎症誘導、喘息、アレルギー増悪作用、複合曝露

1. はじめに

近年の中国大都市における人為起源のPM2.5濃度は周知のごとく凄まじく、呼吸器疾患患者が急増し中国国内でも深刻な問題となっている。黄砂に関しても大規模化しており周辺諸国へはPM2.5と共に越境粒子状物質として飛来し、多大な健康被害をもたらす可能性が高い。PM2.5（粒径が2.5 μm 以下の粒子）の健康影響はPM10（粒径が10 μm 以下の粒子）よりも大きいといわれ、疫学研究においては肺がん、慢性呼吸器疾患、循環器疾患やアレルギー疾患との関連が示唆されている。一方、黄砂もPM2.5同様に疫学研究において呼吸器疾患、心血管疾患やアレルギー疾患との関連が示唆されている。しかしこれまでに、PM2.5と黄砂の複合曝露による肺の炎症誘導やアレルギーへの影響についての実験研究は行われていない。

2. 研究開発目的

サブテーマ（1）では、細胞培養実験やマウスを用いた動物実験によって、黄砂とPM2.5のそれぞれの肺の炎症誘導や肺のアレルギー炎症（気管支喘息）の増悪作用メカニズムを付着微生物成分や吸着化学物質の面から調べて明らかにすること、また、これらの複合曝露による肺の炎症誘導と肺のアレルギー炎症増悪作用について調べ、その作用メカニズムについて言及することを目的とした。

3. 研究開発方法

1) 黄砂及び都市大気粒子状物質の種々の細胞における炎症反応と酸化ストレスの比較

本実験は北九州で採取した黄砂、国立環境研究所の標準黄砂（砂漠の砂）やPM2.5、中国瀋陽市で採取した粒子状物質（PM2.5、coarse PM、>PM10）を用いて、粒子の大きさの違いや構成成分の違いによる炎症反応と酸化ストレスの違いを細胞培養実験において明らかにすることを目的とした。方法としては、2011年4月に北九州で採取した黄砂とPM2.5について、ヒト由来のマクロファージ（U937細胞）と気道上皮細胞（BEAS-2B細胞）を用いて炎症性遺伝子（IL-1 β 、COX2、RANTES、TNF- α 、Eotaxin）と多環芳香族炭化水素類（PAHs）等に反応するCYP1A1発現を調べた。また、2014年3月に中国瀋陽市においてサンプリングした粒子状物質（PM2.5、CPM、>PM10）を用いてマウスマクロファージ様細胞（RAW264.7細胞）に対する炎症誘導性遺伝子発現を調べると共に、LPSの阻害剤 Polymyxin B (PMB)を用いて炎症性遺伝子発現の阻害効果を調べ、炎症誘導とLPSとの関連を調べた。更に、気道上皮細胞（BEAS-2B細胞）を用いて、北九州で採取した黄砂とPM2.5、瀋陽の粒子状物質（PM2.5、coarse PM、>PM10）の酸化ストレスマーカーのNrf2活性と炎症反応のマーカーのNF- κ B 活性化発現を調べ、酸化ストレスや粒子中の微生物成分量と炎症反応との関連を調べた。

2) 都市由来PM2.5の肺の炎症誘導メカニズム

ーマクロファージと肺胞II型上皮細胞の炎症反応の違いー

この実験は、細胞培養実験とマウスの動物実験によって中国瀋陽市で採取したPM2.5の肺の炎症誘導とそのメカニズムを、LPSの阻害剤 PMBと抗酸化剤のN-Acetyl-L-cysteine（NAC）を用いて、LPSと酸化ストレスの面から明らかにすることを目的とした。

<細胞培養実験>

a. RAW264.7細胞を用いた実験：

2014年4月に中国瀋陽市で採取した都市由来PM2.5のマウスのマクロファージ様培養細胞（RAW264.7細胞）における炎症性サイトカイン誘導過程（カスケード）を調べた。RAW264.7細胞に中国瀋陽市のPM2.5を添加（最終濃度30μg/ml）した。またこれに加えてLPS阻害剤のPMB、あるいは抗酸化剤のNACを前処置、PMBとNACの両方を前処置し、1時間後のRAW 264.7 細胞におけるMAPK（Erk、p38、JNK）とNF-κB発現をSDS-PAGEで電気泳動し、ウエスタンブロット法によって調べた。また3時間後の炎症性サイトカイン（MCP-1、MIP-1α等）遺伝子発現と酸化的ストレス指標のHemox1（HO-1）を調べた。なお、実験群は対照群（PBS）、PM2.5群、PM2.5+PMB群、PM2.5+NAC群、PM2.5+PMB+NAC群とした。

b. 骨髄由来マクロファージ（BMDM）を用いた実験：

前記PM2.5曝露による野生型（WT）マウスとMyD88欠損(-/-)マウスの骨髄由来マクロファージ（BMDM）における炎症誘導に関わるサイトカイン発現を、同じようにPMBとNACを用いて調べた。PM2.5とPMBあるいはNACを前記同様に前処置して、12時間後の培養液中の炎症性サイトカイン類を調べた。なお、実験群は対照群（PBS）、PM2.5群、PM2.5+PMB群、PM2.5+NAC群、PM2.5+PMB+NAC群とした。

c. マウス肺胞II型上皮細胞（MLE-12 cells）を用いた実験：

前記PM2.5曝露によるマウス肺胞II型上皮細胞（MLE-12 cells）における炎症誘導に関わるサイトカイン遺伝子発現をPMBとNACを用いて調べた。PM2.5とPMB、NACを前記同様に前処置して、3時間後の肺胞II型上皮細胞における炎症性サイトカイン遺伝子発現を調べた。実験群は対照群（PBS）、PM2.5群、PM2.5+PMB群、PM2.5+NAC群とした。

<動物実験>

2014年4月に中国瀋陽市において採取したPM2.5、LPS阻害剤PMBと抗酸化剤のNACを用いて炎症惹起メカニズムを調べた。動物はBALB/c系雄マウスの野生型（WT）とMyD88-/-マウスを用い、WT マウスの実験群は対照群、PM2.5群、PM2.5+PMB群、PM2.5+NAC群、PM2.5+PMB+NAC群とし、MyD88-/-マウスは対照群、PM2.5群、PM2.5+NAC群とした。PM2.5の投与量は0.2mgとして1回、経気道曝露して、その24時間後に屠殺して肺の炎症誘導メカニズムを調べた。なお、PMBは0.2mgのPM2.5当たり20μg添加して経気道投与し、NACは20 mg /0.2mlをPM2.5投与5時間前に経口投与した。

3) 都市由来PM2.5とcoarse PMの肺の炎症と気管支喘息増悪作用の比較

都市大気PM2.5画分とcoarse PM（CPM：粒径2.5～10μm）画分の肺の炎症と気管支喘息増悪作用の強さを比較することを目的とした。中国瀋陽市においてアンダーセン・エアサンプラーで採取したPM2.5画分とPM10画分（CPM）をBALB/c系雄マウスに経気道曝露して、肺の炎症とアレルギー性気管支喘息への影響を調べた。実験群は対照群、PM2.5群、CPM群、アレルギーを誘導する卵白アルブミン群（OVA）群、OVA+ PM2.5群、OVA+CPM群とし、2週間間隔で4回、こ

これらの粒子と抗原を経気道曝露した。PM2.5あるいはCPMの1回の投与量は0.1mg、OVAは4 μ gとした。

4) 都市大気由来PM2.5と黄砂由来微小粒子の肺の炎症誘導と気管支喘息増悪作用の比較

人為由来の都市大気PM2.5と黄砂由来（砂成分）の微小粒子の肺の炎症と気管支喘息増悪作用の強さを比較することを目的とした。中国瀋陽市において採取したPM2.5画分と2014年5月末の黄砂時に北九州折尾で採取した黄砂由来微小粒子をBALB/c系雄マウスに経気道曝露して、肺の炎症とアレルギー性気管支喘息への影響を比較した。実験群は対照群、瀋陽PM2.5群、黄砂PM2.5群、アレルギーを誘導する卵白アルブミン群（OVA）群、OVA+瀋陽PM2.5群、OVA+黄砂PM2.5群とし、2週間間隔で4回、これらの粒子と抗原を経気道曝露した。両粒子の1回の投与量は0.1mg、OVAは4 μ gとした。なお、この実験では曝露マウスの肺組織中のM1マクロファージとM2マクロファージのアレルギーへの影響についても検討した。

5) 北九州の煙霧時に採取したPM2.5の肺の炎症と気管支喘息増悪作用の検討

平成21年4月に北九州折尾の煙霧時に採取したPM2.5の肺の炎症誘導と気管支喘息増悪作用を、360℃で加熱したPM2.5と非加熱PM2.5によって比較し、PM2.5に含まれている成分と増悪作用との関連を調べた。BALB/c系の雄マウスを用い、実験群は対照群、加熱PM2.5群、PM2.5群、アレルギーを誘導する卵白アルブミン（OVA）群、OVA+加熱PM2.5群、OVA+PM2.5群とし、2週間間隔で4回、これらの粒子と抗原を経気道曝露した。PM2.5の1回の投与量は0.1mg、OVAは4 μ gとした。更に、PM2.5の炎症誘導と微生物成分との関連を調査するためにBALB/c系のマウスの野生型（WT）、微生物成分感知センサーのToll様レセプター（TLR）2欠損（-/-）、TLR4-/-、MyD88-/-マウスの骨髄由来マクロファージ系細胞（BMDM）を用いて、この培養系にこのPM2.5を添加して、12時間後の炎症性サイトカイン蛋白発現を調べた。

6) 都市大気由来PM2.5の肺におけるアレルギー増悪作用とそのメカニズム解明に関する研究

本実験は、中国瀋陽市で採取した都市由来PM2.5の気管支喘息増悪作用の誘導メカニズムを付着微生物成分面から明らかにする目的で行った。微生物成分感知センサーのTLR2-/-マウス、TLR4-/-マウス、MyD88-/-マウスを用い、それぞれの実験群は対照群、PM2.5群、OVA群、OVA+PM2.5群とした。PM2.5の1回投与量は0.1mg/80 μ l生食とした。これらを2週間間隔で4回、気管内投与した。最終投与翌日に屠殺して、肺洗浄液（BALF）中の炎症細胞数、炎症性サイトカイン・ケモカイン類と血清中の抗原特異的IgEとIgG1抗体を測定すると共に、肺の病理学的観察を行い、PM2.5によるアレルギー炎症増悪におけるTLRsのシグナル伝達の関与と微生物成分との関連を調べた。

7) PM2.5と黄砂曝露による肺のアレルギー増悪作用における酸化ストレスと鉄の関与

PM2.5と黄砂のアレルギー増悪作用は微生物成分のLPSがメインである。この実験はLPSによるアレルギー増悪系に酸化ストレスや粒子中の鉄が関与しているか否かを明らかにすることを目的とした。動物はBALB/c系雄マウスを用いた。LPSは市販の超高純度LPSを用い、PM2.5は国立環境研究所で都市大気ダストとして標準化した北京降下煤塵をPM2.5のサイズに精製した

もの、黄砂は中国の黄砂発生地から採取した砂を4 μ mサイズに精製した標準黄砂を用いた。これらは360°Cで加熱処理して有機物を取り除いた。これらの粒子と共にアレルギーを誘導する卵白アルブミン（OVA）4 μ gを混ぜてマウスに気管内投与した。これにNAC（抗酸化剤）あるいは鉄キレート剤のデフェロキサミン（DFO）を前処理してアレルギー増悪作用における酸化ストレスと鉄の関与を調べた。

8) PM2.5による炎症反応とアレルギー増悪作用における銅と活性酸素の関与

<細胞培養実験>

PM2.5の炎症反応と酸化ストレス反応における銅と活性酸素の役割についてマクロファージ細胞培養系において調べた。PM2.5は2016年1月に中国瀋陽市で採取したものをを用いた。培養細胞はBALB/c系マウスのマクロファージ様細胞（RAW264.7細胞）を用いた。PM2.5のRAW264.7細胞への総添加量を30 μ g/mlとした。PM2.5は銅キレート剤のメタライト（MTL）、抗酸化剤のN-Acetyl-L-cysteine（NAC）、あるいはLPS阻害剤のPolymyxin B（PMB）を1時間反応させて前処置で培養液に添加し、3時間後の炎症性遺伝子発現（TNF- α 、MCP-1、MIP-1 α 、COX2）と酸化ストレス反応の指標としてのHO-1遺伝子発現を調べた。なお、最終濃度がDFOは0.1mM、MTLは1mM、PMBは2 μ g/mlになるように調整した。

<動物実験>

この実験では、国立環境研究所で所有の北京降下煤塵を更にアンダーセン・エアサンプラーによってPM2.5に精製した試料を用いた。このPM2.5は、LPSが0.128ng/mg、 β -glucanは1119ng/mgで、瀋陽で採取したPM2.5よりも微生物成分を多く含んでいた。PM2.5の炎症、アレルギー炎症とPM2.5に含まれている金属成分（銅、鉄）との関連を明らかにするために行われた。このPM2.5と銅のキレート剤のメタライト（MTL）、もしくは鉄キレート剤のデフェロキサミン（DFO）をPM2.5と1時間反応させて、PM2.5内の銅や鉄を除いた。実験群は1群16匹とし、対照群、PM2.5群、卵白アルブミン（OVA）群、OVA+PM2.5群、OVA+PM2.5+MTL群、OVA+PM2.5+DFO群とした。これらを2週間間隔で4回、経気道曝露した。両粒子の1回の投与量は0.1mg、OVAは4 μ gとした。最終投与翌日に屠殺して、気管支肺胞洗浄液（BALF）中の炎症細胞数と炎症性サイトカイン・ケモカイン及び血清中のOVA特異的IgEとIgG1をELISA法で測定すると共に、肺の病理学的観察を行った。

9) マクロファージ細胞培養系における黄砂とPM2.5の複合曝露による炎症反応と酸化ストレス反応

黄砂とPM2.5の複合曝露による炎症反応と酸化ストレス反応をマクロファージ細胞培養系において調べた。黄砂（ASD）は国立環境研究所より入手したスタンダード黄砂を更に粒子径が4 μ mの大きさに精製したものをを用いた。PM2.5は2016年1月に中国瀋陽市で採取したものをを用いた。培養細胞はBALB/c系マウスのマクロファージ様細胞（RAW264.7細胞）を用いた。黄砂とPM2.5のRAW264.7細胞への総添加量を30 μ g/mlと統一して、PM2.5と黄砂を100対0、75対25、50対50、25対75、0対100のパーセンテージで混ぜて培養液に添加し、3時間後のTNF- α 等の炎症性遺伝子発現と酸化ストレス反応の指標としてのHO-1遺伝子発現を調べた。

1 0) 黄砂とPM2.5の単一及び複合曝露による肺の炎症誘導とアレルギー増悪作用

BALB/c系雄マウスを用いて黄砂とPM2.5の単一及び複合曝露の肺の炎症誘導とアレルギーへの影響を調べた。黄砂(ASD)とPM2.5は9)の細胞培養系で用いたものと同じ物を使用した。粒子の1回投与量を0.1mg/0.1mlとし、①対照群(Control)、②PM2.5(100 μ g)群、③ASD(100 μ g)群、④PM2.5(50 μ g)+ASD(50 μ g)群、⑤卵白アルブミン(OVA)群、⑥OVA+PM2.5(100 μ g)群、⑦OVA+ASD(100 μ g)群、⑧OVA+PM2.5(50 μ g)+ASD(50 μ g)群の計8群とした。これらの溶液を隔週計4回気管内投与し、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の炎症細胞数と炎症性サイトカイン・ケモカイン及び血清中のOVA特異的IgEとIgG1をELISA法で測定すると共に、肺の病理学的観察を行った。

1 1) 加熱・非加熱処理黄砂(ASD)とPM2.5を組合せた複合曝露の影響

この実験では10)と同じ黄砂とPM2.5を用いた。黄砂とPM2.5を360℃で加熱処理して微生物や化学成分を除去したものを用い、非加熱処理と加熱処理の組合せで、黄砂とPM2.5のどちら側にアレルギー増悪作用があるのかを調べた。動物はBALB/c系雄マウスを用いた。粒子の1回投与量を100 μ g/80 μ lとし、①対照群(Control)、②PM2.5(100 μ g)群、③ASD(100 μ g)群、④卵白アルブミン(OVA)群、⑤OVA+非加熱PM2.5(50 μ g)、⑥OVA+非加熱ASD(50 μ g)、⑦OVA+非加熱ASD(100 μ g)、⑧OVA+加熱PM2.5(50 μ g)+加熱ASD(50 μ g)群、⑨OVA+非加熱PM2.5(50 μ g)+加熱ASD(50 μ g)群、⑩OVA+加熱PM2.5(50 μ g)+非加熱ASD(50 μ g)群、⑪OVA+非加熱PM2.5(50 μ g)+非加熱ASD(50 μ g)群の計11群とした。これらの溶液を隔週計4回気管内投与し、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の炎症細胞数と炎症性サイトカイン・ケモカイン及び血清中のOVA特異的IgEとIgG1をELISA法で測定すると共に、肺の病理学的観察を行った。

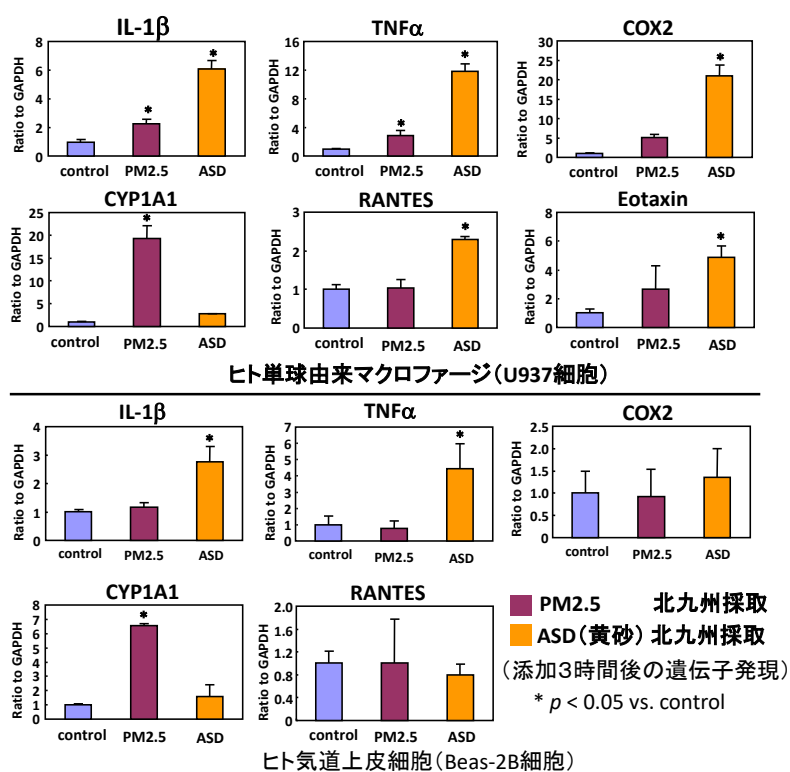
4. 結果及び考察

1) 黄砂及び都市大気粒子状物質の種々の細胞における炎症反応と酸化ストレスの比較

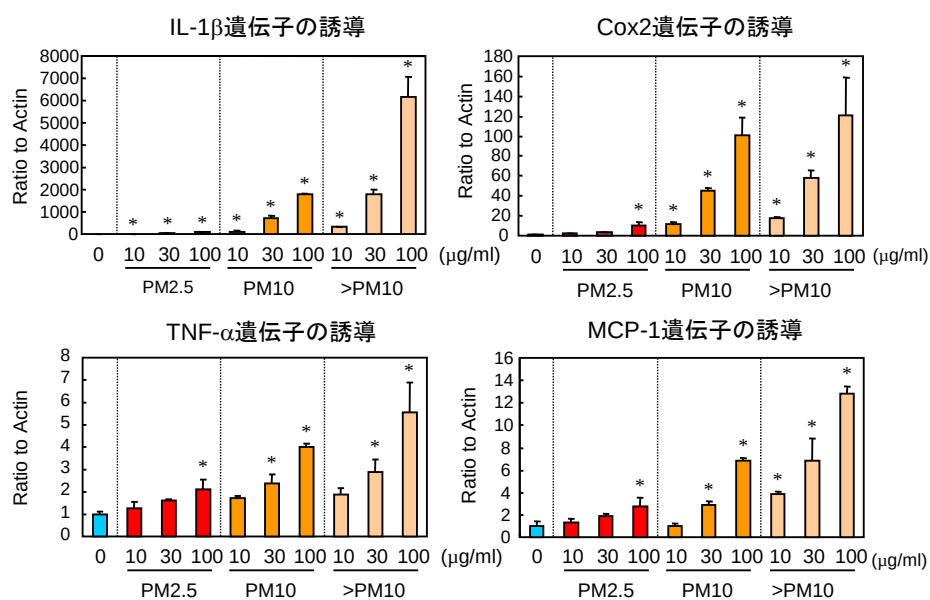
2011年5月1～3日に北九州で採取した黄砂と2011年4月8～11日に採取したPM2.5の微生物成分量(LPS、 β -glucan)は黄砂の方が多く含んでいた(Data示さず)。特に、黄砂はカビ成分の β -glucanを多く含んでいた。この黄砂とPM2.5について、ヒト単球由来マクロファージとヒト気道上皮細胞における炎症性遺伝子(IL-1 β 、TNF- α 、COX2、RANTES、Eotaxin)発現を比較した(図(1)-1)-1)。微生物成分量を多く含む黄砂の方がPM2.5よりこれらの炎症性遺伝子発現は強く誘導された。一方、化学物質受容体のAh(アリール炭化水素)受容体を介して発現するCYP1A1発現は化学物質の多環芳香族炭化水素類(PAHs)を多く含むPM2.5の方が高い値を示した。これらの結果から、化学物質を多く含むPM2.5よりは黄砂の方が、炎症誘導に対する影響が強いことが示唆された。

瀋陽市の都市大気粉塵(PM2.5、CPM、>PM10)の微生物成分量(LPS、 β -glucan)は粒子径が大きいものほど多く含んでいたが、逆に化石燃料燃焼由来の成分(硫酸塩やPAHs)は粒径が小さいPM2.5ほど多く含んでいた。マウスのマクロファージ系の培養細胞における炎症性遺伝子発現(IL-1 β 、COX-2、TNF- α 、MCP-1)は粒子径が大きいものほど強く誘導された(図(1)-1)-2)。

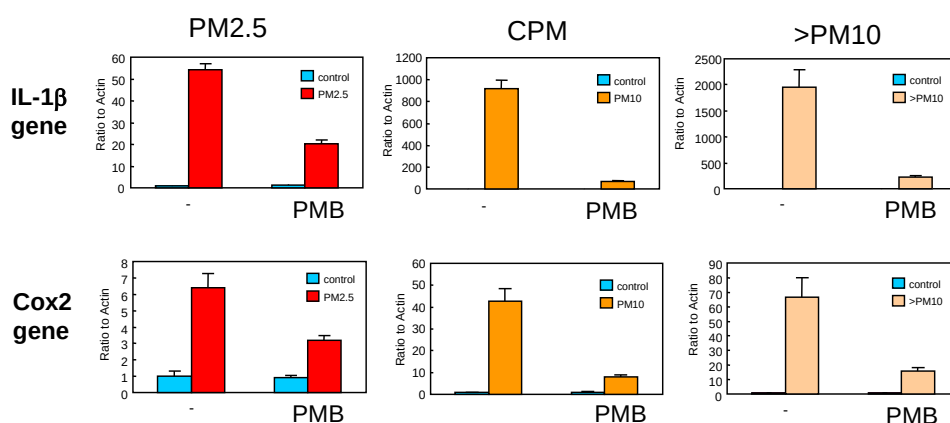
また、LPS阻害剤のPMBの事前処理によって炎症性遺伝子発現(IL-1 β 、Cox2)は著しく抑制された(図(1)-1)-3)。この結果から、粒子状物質の炎症誘導にLPSの関与を示唆した。



図(1)-1-1. ヒト単球マクロファージとヒト気道上皮細胞における炎症性遺伝子発現
図はControlを1とした時の値で示す。



図(1)-1-2. 中国都市大気からサンプリングした粒子状物質のサイズの違いによる
RAW264.7マクロファージでの炎症性遺伝子発現
図は0μg/ml(Control)を1とした時の値で示す。* $p < 0.05$ vs. Control



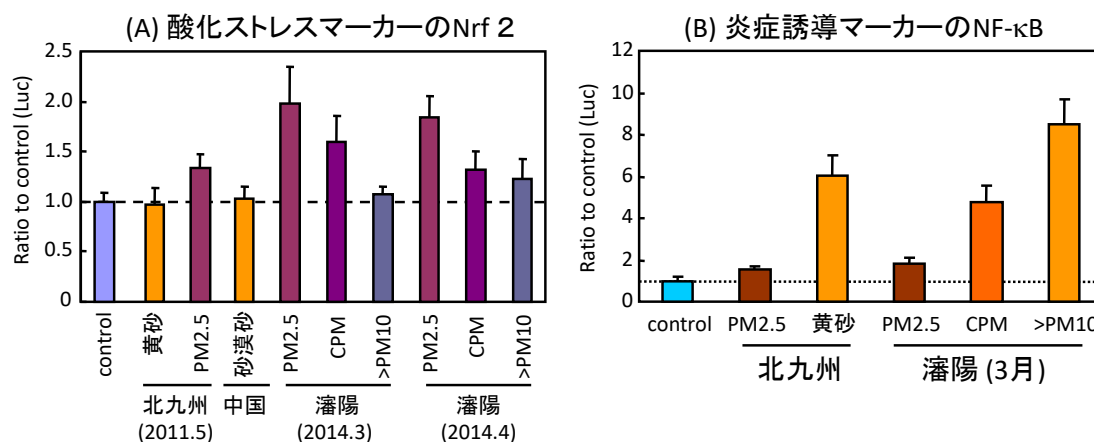
図(1)-1-3. 瀋陽市大気からサンプリングした粒子状物質の RAW264.7マクロファージにおける炎症性遺伝子発現のPMBによる抑制
図はControlを1とした時の値で示す。

図(1)-1-4 に日本と瀋陽で採取した粒子状物質曝露によるヒト気道上皮細胞 (BEAS-2B cell) における酸化ストレスマーカーのNrf2 と炎症マーカーの NF-κB 活性化を示した。粒子サイズが小さいPM2.5ほど酸化ストレスマーカーのNrf2の発現が高く、粗大粒子(黄砂、CPM、>PM10)では小さく、この発現は粒子のPAHsの含有量とよく対応していた(図(1)-1-4(A))。また、日本のPM2.5は瀋陽のPM2.5に比較するとNrf2発現が低かった。この結果から石炭暖房を使用している中国のPM2.5の方が使用していない日本のPM2.5より酸化ストレス活性が強いことが示唆された。

一方、炎症マーカーの NF-κB 活性化は粒子径が大きいほど高く、粒子径が小さいPM2.5ほど低く、粒子の微生物成分量とよく対応していた(図(1)-1-4(B))。

このNF-κB 活性化も日本で採取されたサンプルよりも中国瀋陽で採取されたサンプルの方が高かった。

これらの結果から、化学物質を多く含むPM2.5は酸化ストレスが強く誘導され、微生物成分量が多い粗大粒子ほど炎症反応が強く誘導されることが分かった。また、日本のサンプルよりは中国のサンプルの方がこれら酸化ストレスや炎症誘導活性が高いことが分かった。



図(1)-1-4. 日本と中国採取PMによるヒト気道上皮細胞におけるNrf2 および NF-κB活性化
(A) HO-1遺伝子を誘導する転写因子Nrf2の活性化. (B) 炎症性サイトカイン遺伝子を誘導する転写因子NF-κBの活性化 (ヒトBEAS-2B細胞,粒子曝露3時間後の変化)

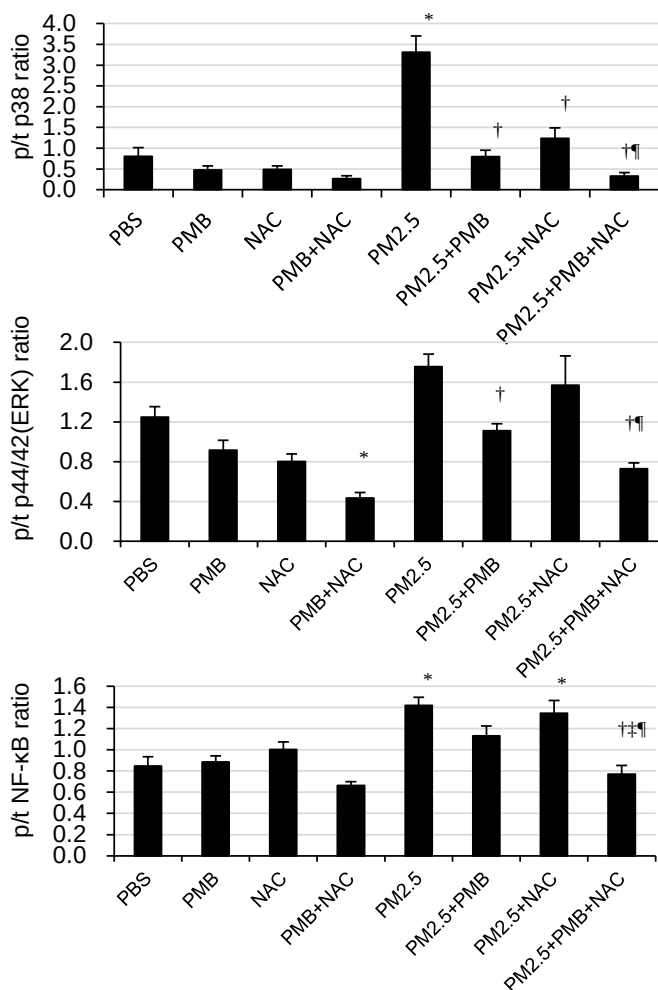
2) 都市由来PM2.5の肺の炎症誘導メカニズム

–マクロファージと肺胞II型上皮細胞の炎症反応の違い–

<細胞培養実験>

a. RAW264.7細胞を用いた実験：

PM2.5粒子を添加した1時間後のRAW264.7細胞では対照群に比べp38、ErkとNF-κBに有意な発現上昇が認められた。PMBを同時に添加すると特にp38とErkで上昇が抑えられていた(図(1)-2)-5)。



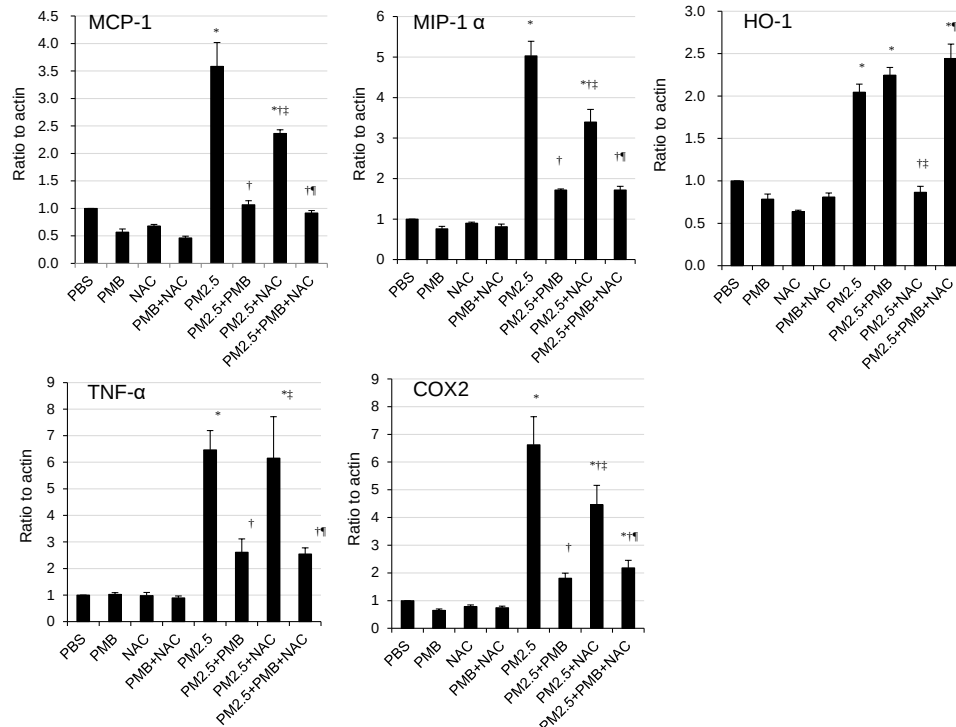
図(1)-2)-5. RAW264.7細胞にPM2.5を添加1時間後のMAPKとNF-κB発現

* $p < 0.05$ vs. PBS; † $p < 0.05$ vs. PM2.5; ‡ $p < 0.05$ vs. PM2.5+PMB;

§ $p < 0.05$ vs. PM2.5+NAC.

抗酸化剤のNACを添加した場合は、p38に上昇抑制が見られたが、ErkとNF-κBは抑制傾向を示した。PMB+NACではむしろ対照群（PBS）よりも低下する抑制効果を示した。PM2.5曝露3時間後のRAW264.7細胞における炎症性サイトカインの遺伝子発現を図(1)-2)-6に示した。PM2.5曝露は炎症性遺伝子のMCP-1、MIP-1α、TNF-α、COX2遺伝子をp38、Erk、NF-κB発現と同じように発現させた。これらの炎症性サイトカイン遺伝子発現はPMBで抑制されたが、NACではPMBほどの抑制効果を示さなかった。PMB+NACはPMBとほぼ同レベルの抑制効果を示した。一方、酸化ストレス指標のHO-1遺伝子発現もPM2.5の曝露によって上昇した。HO-1はPMBで抑制効

果を示さなかったが、NACで対照レベルに低下した。しかし、PMB+NACでは抑制効果を示さなかった。12時間後の培養液中の炎症性サイトカイン（MCP-1、MIP-1 α とTNF- α ）蛋白発現もp38、ErkとNF- κ Bや炎症性遺伝子発現と類似の変化を示した（データ示さず）。以上の結果から、PM2.5に付着したLPSがp38、ErkやNF- κ Bを活性化して炎症誘導を惹起させていることが示唆された。また、RAW264.7細胞ではPM2.5誘導の酸化的ストレスは炎症誘導過程にあまり関与（酸化的ストレスによるp38の活性化）していない可能性が示唆された。



図(1)-2)-6. RAW264.7細胞にPM2.5を添加3時間後の炎症性遺伝子発現と酸化的ストレスマーカーHO-1

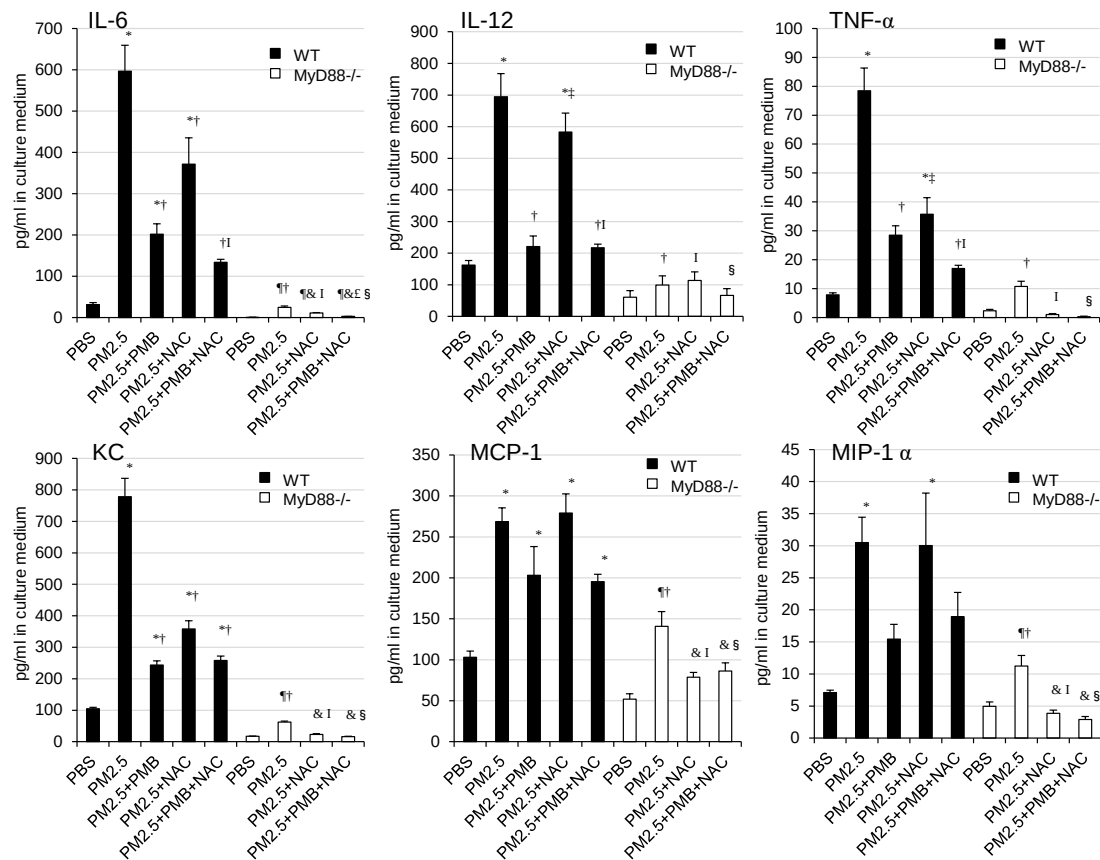
図はPBS群を1としたときの相対値で示す。M $\pm$ SE

* p < 0.05 vs. PBS; † p < 0.05 vs. PM2.5; ‡ p < 0.05 vs. PM2.5+PMB; § p < 0.05 vs. PM2.5+NAC

b. 骨髄由来マクロファージ（BMDM）を用いた実験：

BALB/c系の野生型マウス（WT）とMyD88欠損（-/-）マウスの骨髄由来マクロファージ（BMDM）にPM2.5を曝露した培養液中の炎症性蛋白発現の結果を図(1)-2)-7 に示した。PM2.5をWTマウスのBMDMに曝露すると炎症性サイトカイン（IL-6、IL-12、TNF- α 、KC、MCP-1、MIP-1 α ）発現は著しく増加した。これらの発現はLPS阻害剤のPMBで著しく抑制された。一方、抗酸化剤のNACではIL-6、TNF- α やKCは抑制されるものの、PMBほどではなく、IL-12、MCP-1やMIP-1 α に対しては抑制効果がなかった。PMB+NACではほぼPMBと同レベルの抑制効果を示した。このような結果からもPM2.5の炎症誘導はLPSが強く関与してことが示唆されるが、NACでもIL-6、TNF- α やKCに抑制効果を示していることから、LPSほどではないが酸化ストレスも炎症反応の一部に関与している可能性を示唆した。MyD88-/-マウスのBMDMではPM2.5曝露では測定した炎症性蛋白発現全て著しく抑制された。さらにNACとPMB+NACで抑制効果を示した。このようにTLRsのアダプター蛋白MyD88の欠損は炎症反応を著しく抑制することから、LPS/TLR4/MyD88のシグナル伝達によって炎症が誘導されていることが示唆された。またNACでも更なる抑制効

果を示すことから、このシグナル伝達系に酸化ストレスも少なからず関与している可能性が示唆された。



図(1)-2-7. BALB/c 系野生型マウスとMyD88欠損マウスの骨髄由来マクロファージにPM2.5曝露12時間後の培養液中の炎症性蛋白発現

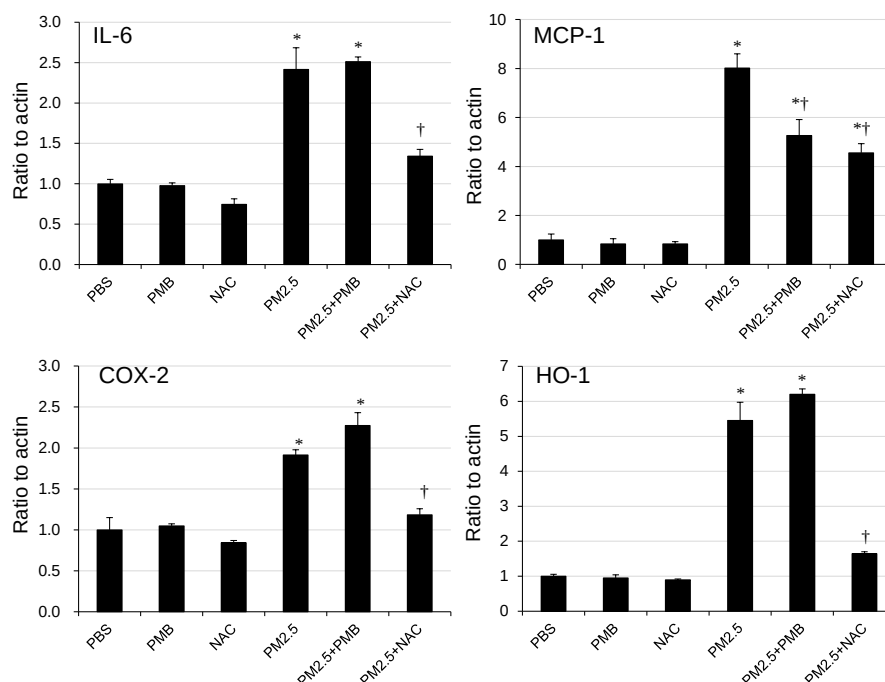
PMBとNACは細胞に曝露前に1時間PM2.5と反応させた。M ± SE.

*p < 0.05 vs. PBS; †p < 0.05 vs. PMB; ‡p < 0.05 vs. NAC; §p < 0.05 vs. PMB+NAC,

¶p < 0.05 vs. PM2.5; #p < 0.05 vs. PM2.5 + PMB; †p < 0.05 vs. PM2.5 + NAC.

c. マウス肺胞II型上皮細胞 (MLE-12 cells) を用いた実験：

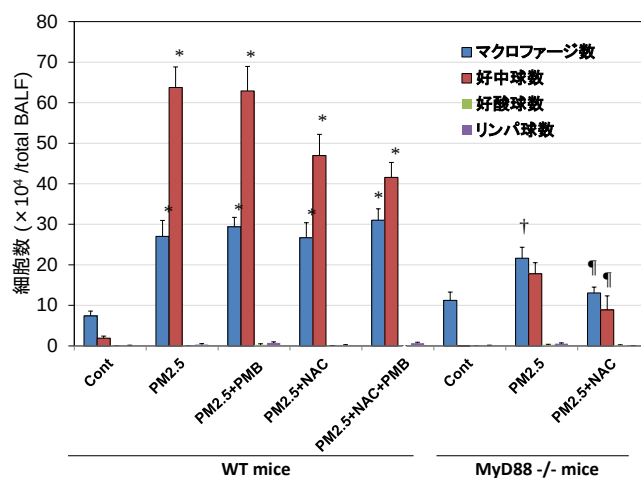
マウス由来の肺胞II型上皮細胞 (MLE-12 cells) にPM2.5を曝露した結果を図(1)-2-8 に示した。PM2.5曝露は肺胞II型上皮細胞に対してもIL-6、MCP-1やCOX2などの炎症性遺伝子発現を増加させた。LPS阻害剤のPMBはMCP-1発現に対しては若干の抑制効果を示したが、IL-6やCOX2遺伝子発現に対しては抑制効果を示さなかった。しかし、抗酸化剤のNACでは著しい抑制効果を示した。この抑制効果はマクロファージで見られた効果と逆の効果であった。すなわち、マクロファージではPMBがPM2.5誘導の炎症反応に対してよく抑制効果を示し、NACに対してはさほど効果を示さなかったが、肺胞II型上皮細胞ではNACで抑制効果を示し、PMBは抑制効果を示さないということになる。この結果から、肺胞II型上皮細胞ではPM2.5によって誘導される酸化ストレスによって炎症反応が起きている可能性が示唆される。一方、酸化ストレスマーカーのHO-1遺伝子発現はPMBでは効果を示さず、NACで抑制効果を示した。PM2.5によって誘導される酸化ストレスは付着した微生物のLPSによって誘導されるのではなく、PM2.5に存在するPAHsなどの化学物質によって誘導されるものと推察された。



図(1)-2-8. マウス肺胞II型上皮細胞にPM2.5を曝露した3時間後の培養液中の炎症性遺伝子発現
PMBとNACは細胞に曝露前に1時間PM2.5と反応させた.
データはPBS群を1としたときの相対値で示す. $M \pm SE$.
* $p < 0.05$ vs. PBS; † $p < 0.05$ vs. PM2.5

<動物実験>

瀋陽採取PM2.5を曝露したBALB/c系の野生型 (WT) マウスとMyD88欠損(-/-)マウスにおける気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症細胞数を図(1)-2-9 に示した。PM2.5曝露はBALF中の炎症細胞である好中球を増加させた。この炎症細胞はLPS阻害剤のPMBだけでは抑制できないが、抗酸化剤のNACでは26%、PMB+NACは35%程度の抑制効果を示した。TLRsのアダプター蛋白のMyD88-/-マウスではPM2.5による炎症細胞の誘導を71%、更にNACを処置すると86%の抑制効果を示した。

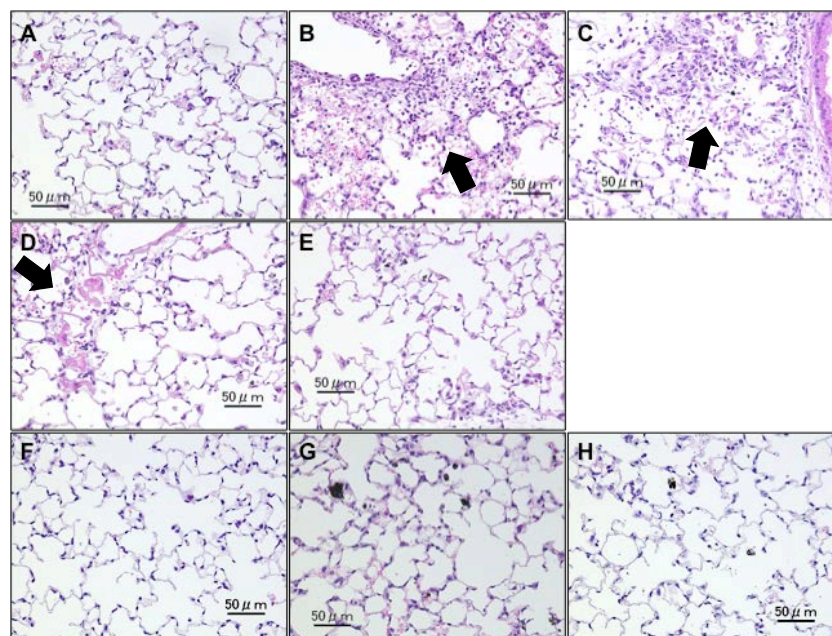


図(1)-2-9. PM2.5を投与したPMBとNAC処置マウス肺の炎症細胞の変化. $M \pm SE$.

* $P < 0.001$ vs. WT-Cont; † $P < 0.001$ vs. WT-PM2.5;

‡ $P < 0.001$ vs. WT-PM2.5+NAC; § $P < 0.05$ vs. WT-PM2.5+NAC

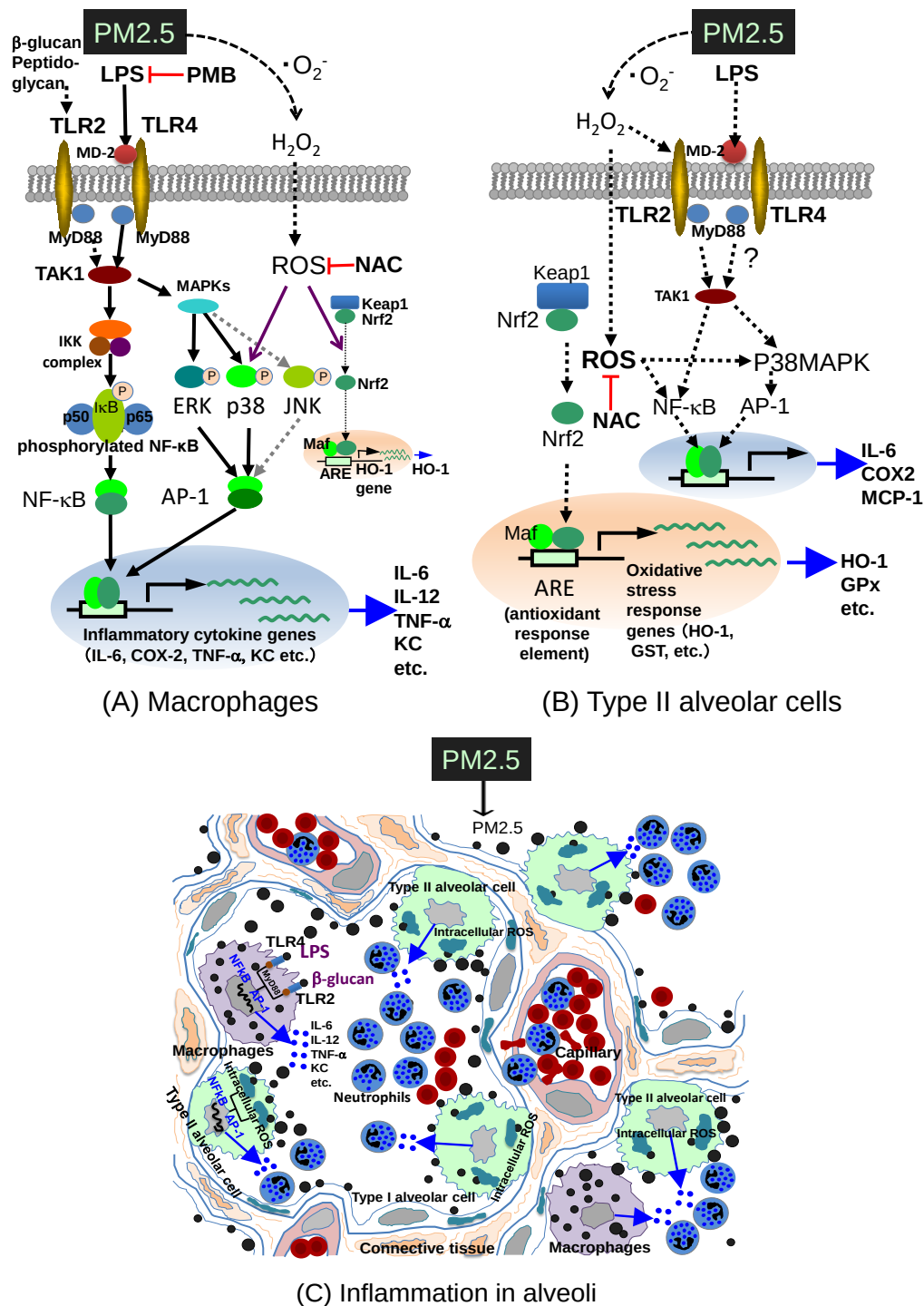
一方、BALF中のサイトカインはPMBで抑制されるものもあればNACで抑制されるものもあるが、総じてPMB+NAC投与によって抑制された。MyD88^{-/-}マウスではPM2.5によるサイトカイン産生が著しく抑制され、これにNACを投与した群では更に抑制された。図(1)-2)-10 に各群の肺胞の病理像を示した。WTマウスの PM2.5投与群(B)の肺胞では著しい炎症細胞（好中球）の浸潤が見られた（矢印）。WTマウスの PM2.5+PMB群(C)でも同様に肺胞に炎症細胞の浸潤が見られるが、NAC処置によって肺胞の炎症は著しく抑制された(D)。またPMB+NAC処置では更にこの炎症が抑制された(E)。MyD88^{-/-}マウスではPM2.5による肺胞の炎症は著しく抑制され、これにNACを処置することによって更に肺胞の炎症が抑制され、MyD88^{-/-}マウスの対照群(F)と変らない組織像を示した。これらの肺胞の病理像はBALF中の炎症細胞の変化とよく対応したものであった。この結果は、PM2.5誘導の肺胞の炎症にはLPS阻害剤のPMBに効果が無く、抗酸化剤のNACに効果があることを示している。このNACによる抑制効果はマウスの肺胞II型上皮細胞の培養実験のNACによる抑制効果と類似したものであった。これらの結果はPMBの抑制効果がマウスのマクロファージで見られた結果とは異なっていた。



図(1)-2)-10. PM2.5を投与したPMBとNAC処理マウスの肺胞炎の病理像
 A: WT control; B: WT PM2.5; C: WT PM2.5+PMB; D: WT PM2.5+NAC;
 E: WT PM2.5+PMB+NAC; F: MyD88^{-/-} control; G: MyD88^{-/-} PM2.5;
 H: MyD88^{-/-} PM2.5+NAC 矢印：肺胞の中の炎症細胞を示す。

2)の細胞培養と動物実験を総合してPM2.5の肺の炎症誘導を考察すると、マクロファージ系細胞では微生物センサーのTLRsが発達していて、PM2.5に付着した微生物成分のLPS等をよく感知してLPS/TLR4/MyD88を介したシグナル伝達によって炎症反応が誘導されるが、実際のマウスの肺ではマクロファージ数よりは肺胞II型上皮細胞数の方が圧倒的に多いため、酸化ストレスによって起こる肺胞上皮細胞の炎症の方がLPSを感知しておこるマクロファージ誘導の炎症反応よりも優位に起きているものと示唆された。従って、PM2.5によって起こる肺の炎症は、PM2.5から発生する活性酸素（ROS）が肺胞上皮細胞に作用して炎症性サイトカインを発現し

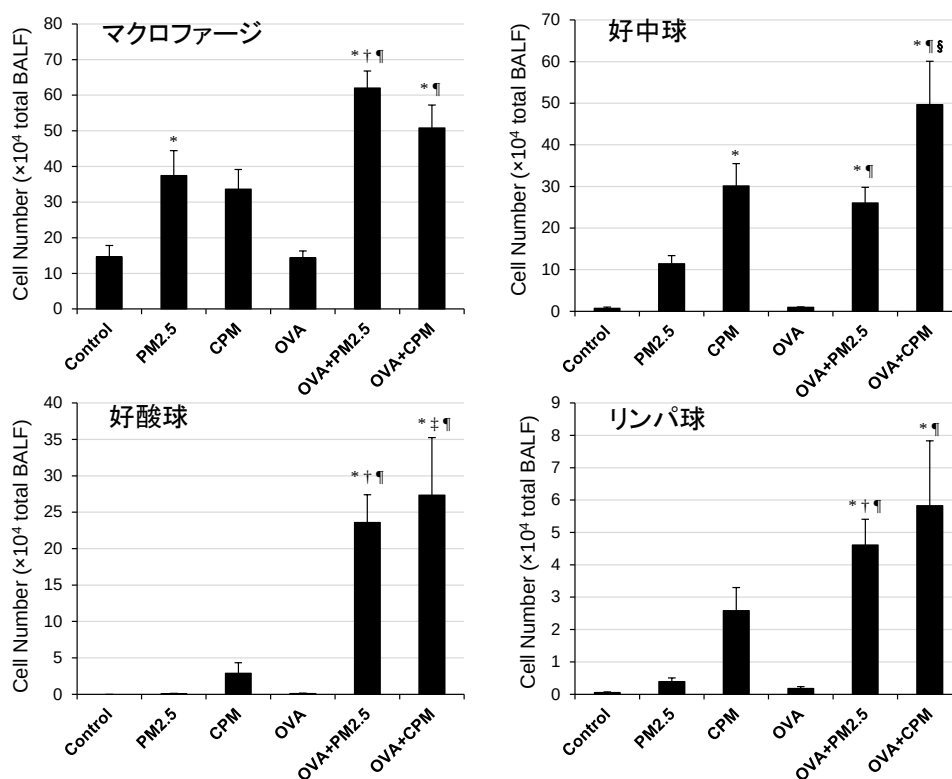
て好中球性の炎症が起きているものと示唆された。図(1)-2)-11(A) にPM2.5によるマクロファージ誘導の炎症反応と図(1)-2)-11(B) に肺胞II型上皮細胞誘導の炎症反応、図(1)-2)-11(C) にPM2.5曝露によってマウスの肺胞で誘導されている炎症反応の模式図を示した。



図(1)-2)-11. PM2.5によるマクロファージ誘導の炎症反応(A)、肺胞II型上皮細胞誘導の炎症反応(B)とPM2.5曝露によってマウスの肺胞で誘導されている炎症反応(C)の模式図

3) 都市由来PM2.5とcoarse PMの肺の炎症と気管支喘息増悪作用の比較

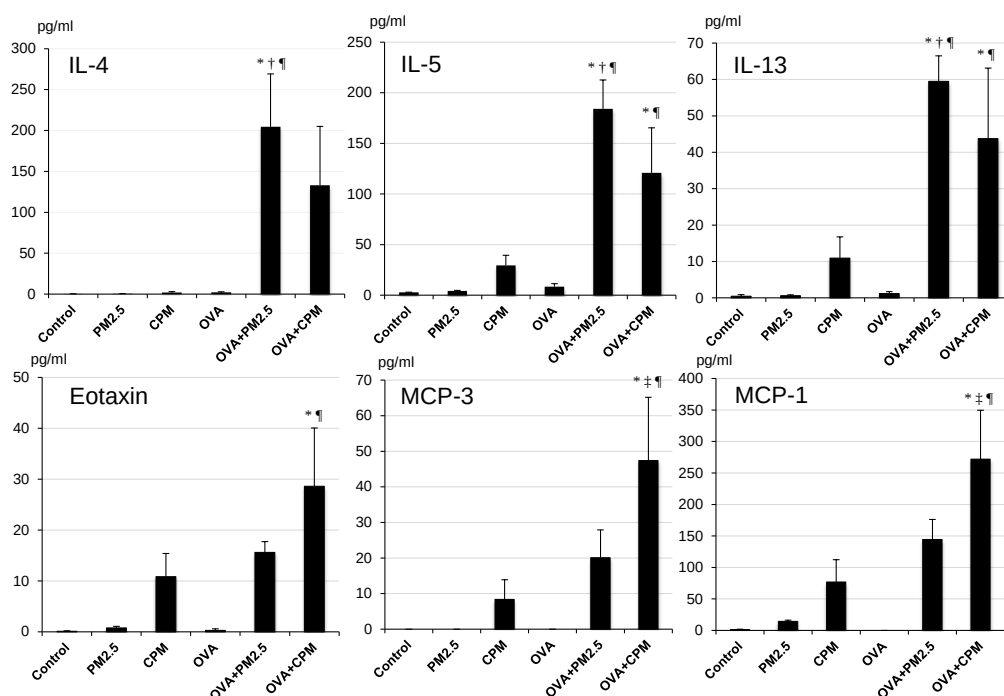
中国瀋陽市で採取したPM2.5画分とcoarse PM (CPM:2.5-10 μ m) 画分の肺の炎症誘導とアレルギー喘息悪化作用の強さを比較した。図(1)-3)-12 に気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症細胞数を示した。PM2.5とCPMの単独投与群ではCPMの方がPM2.5よりもBALF中の好中球数が高く、抗原のOVA処置群のOVA+CPM群の方がOVA+PM2.5群よりも好酸球数が高かった。またリンパ球も同様の変化を示していた。これらの炎症反応の強さは粒子に含まれている微生物成分 (LPS、 β -glucan) 量によく対応していた。図(1)-3)-13 にこの時のBALF中の好酸球誘導活性にあずかるサイトカイン・ケモカイン発現を示した。ケモカインのEotaxin、MCP-3とMCP-1発現はPM2.5曝露群よりもCPM曝露群の方が高く、BALF中の好酸球数とよく対応していた。これらの結果から、PM2.5とCPMの肺の炎症誘導やアレルギー炎症増悪作用は粒子中の微生物成分量に依存していることが示唆された。しかし、Th2サイトカインのIL-4、IL-5、IL-13はむしろCPM曝露群の方が低かったことから、LPS量が多いCPMではアレルギー反応に対して若干の免疫抑制が誘導されている可能性が示唆された。



図(1)-3)-12. 都市PM2.5とCPMを曝露したマウスの気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数. M $\pm$ SE.

*p < 0.05 vs. Control, †p < 0.05 vs. PM2.5, ‡p < 0.05 vs. CPM,

¶p < 0.05 vs. OVA, §p < 0.05 vs. OVA+PM2.5.



図(1)-3-13. 都市PM2.5とCPMを曝露したマウスの気管支肺胞洗浄液中の好酸球誘導・活性を誘導するサイトカイン・ケモカイン. M ± SE.

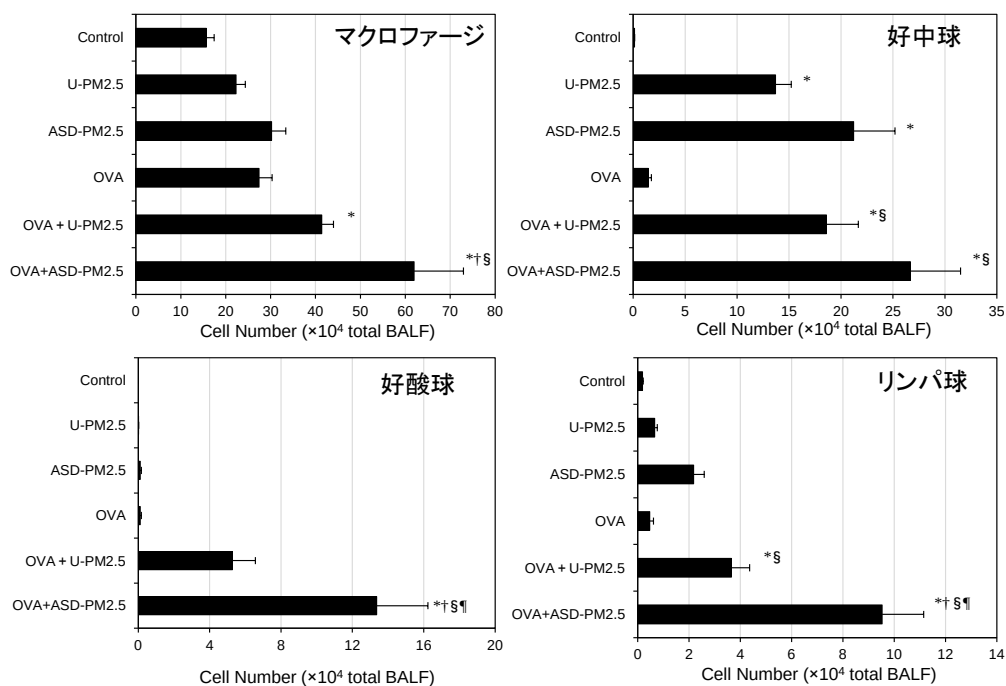
*p < 0.05 vs. Control, †p < 0.05 vs. PM2.5, ‡p < 0.05 vs. CPM, §p < 0.05 vs. OVA

4) 都市大気由来PM2.5と黄砂由来微小粒子の肺の炎症誘導と気管支喘息増悪作用の比較

瀋陽PM2.5（2014年3月）と黄砂イベント時に北九州折尾でサンプリングした黄砂（ASD）の微小粒子（砂成分のPM2.5）の肺の炎症誘導と気管支喘息増悪作用の強さを比較した。図(1)-4-14に気管支肺胞洗浄液（BALF）中の炎症細胞数を示した。肺の好中球数は黄砂（ASD）-PM2.5の方が都市（U）-PM2.5よりも高かった。また、抗原（OVA）投与群のアレルギー炎症の指標である好酸球数もASD-PM2.5の方がU-PM2.5よりも高かった。

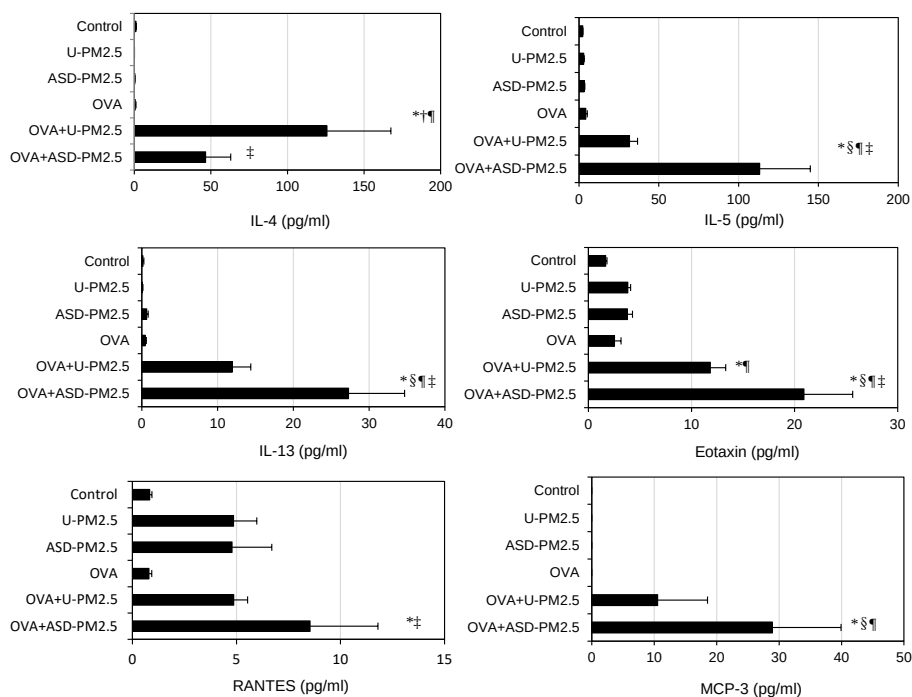
BALF中の好酸球誘導に関わるTh2サイトカインやケモカイン（IL-5、IL-13、MCP-3、Eotaxin、RANTES）発現(図(1)-4-15)、血中の抗原特異的IgEやIgG1産生もU-PM2.5よりもASD-PM2.5の方が高かった。肺組織中のM1マクロファージ（一般の炎症反応に関与するマクロファージ）とM2マクロファージ（アレルギー反応に関与するマクロファージ）をフローサイトメーターで測定したところ、ASD-PM2.5の方がU-PM2.5よりもM2マクロファージの発現量が高かった。U-PM2.5とASD-PM2.5のアレルギー反応の強さは粒子に含まれている微生物成分（LPS、β-glucan）量（ASD-PM2.5 > U-PM2.5）に対応していた。

これらの結果から、人為起源の都市PM2.5よりも自然起源の黄砂PM2.5の方が呼吸器系に悪影響を及ぼすことが示唆され、その誘因は付着している微生物成分（LPS、β-glucan）によるものであることが示唆された。



図(1)-4-14. 都市PM2.5と黄砂(ASD)のPM2.5を曝露したマウスの気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数
U-PM2.5：都市由来PM2.5; ASD-PM2.5：黄砂由来のPM2.5. M ± SE.

*p < 0.05 vs. Control, †p < 0.05 vs. ASD-PM2.5, §p < 0.05 vs. OVA, ¶p < 0.05 vs. OVA+U-PM2.5.



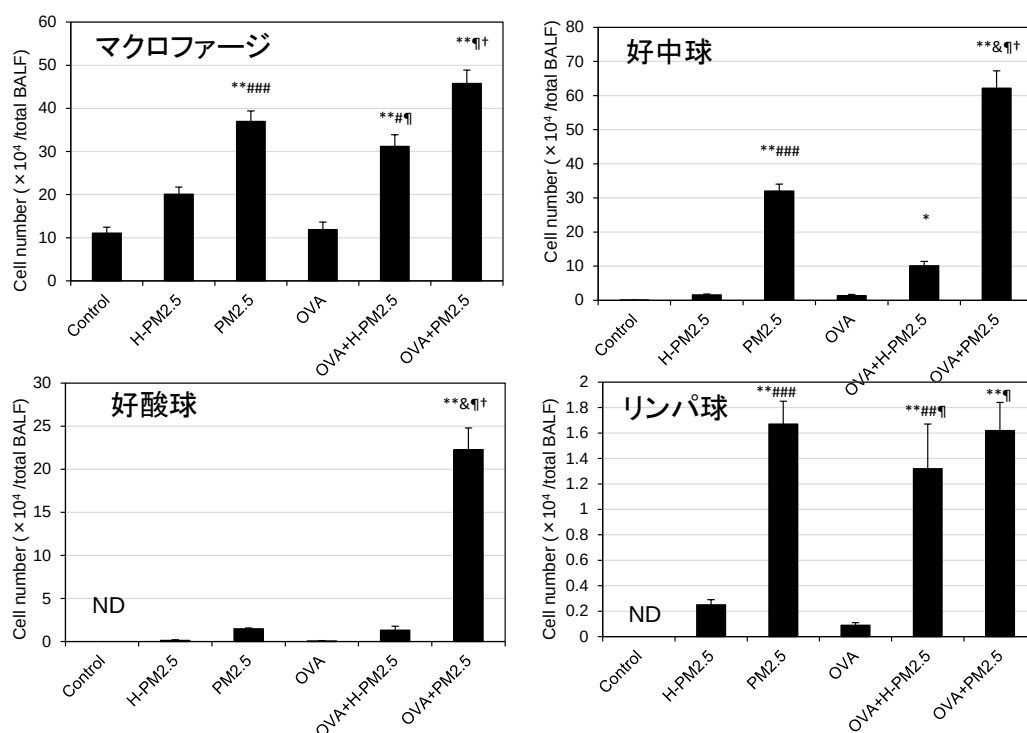
図(1)-4-15. 都市PM2.5と黄砂(ASD)のPM2.5を曝露したマウスの気管支肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン・ケモカイン発現
U-PM2.5：都市由来PM2.5; ASD-PM2.5：黄砂由来のPM2.5. M ± SE.

*p < 0.05 vs. Control, †p < 0.05 vs. U-PM2.5, §p < 0.05 vs. ASD-PM2.5,

¶p < 0.05 vs. OVA, ‡p < 0.05 vs. OVA+U-PM2.5.

5) 北九州の煙霧時に採取したPM2.5の肺の炎症と気管支喘息増悪作用の検討

中国瀋陽市のPM2.5の呼吸器系への影響について検討してきたが、ここでは北九州の4月の煙霧時に採取したPM2.5について、肺の炎症と気管支喘息増悪作用を検討した。試料は360°Cで加熱したPM2.5とクルードな非加熱のPM2.5とを比較し、PM2.5に含まれている成分と炎症誘導や増悪作用との関連を調べた。このPM2.5を曝露したマウスの気管支肺胞洗浄液（BALF）中の炎症細胞数を図(1)-5)-16 に示した。PM2.5単独投与群では好中球数が増加したが、360°Cで加熱したH-PM2.5では好中球数の増加はわずかであった。BALF中の好中球誘導・活性化するTNF- α 、IL-1 β 、IL-12やRANTESなどはPM2.5によって増加したが、H-PM2.5では低かった。アレルギーを誘導するための抗原OVAを処置した群ではPM2.5投与によって好酸球数の著しい増加が見られた。しかし、加熱H-PM2.5を投与したマウスでは好酸球数の増加はわずかであった。またPM2.5投与によってBALF中の好酸球を誘導・活性化するサイトカイン（IL-5）・ケモカイン（MCP-3、Eotaxin）粘液細胞の増生にあずかるTh2サトカインの IL-13に著しい増加が見られた。しかし、加熱H-PM2.5ではこれらの誘導はほとんどみられなかった。肺の病理像ではPM2.5単独投与によって気管支炎や肺炎が見られたが加熱H-PM2.5ではこれらの炎症はわずかなものであった。抗原OVAと非加熱のPM2.5を投与した肺では気道上皮の粘液細胞化や気道粘膜下の著しい好酸球浸潤が見られた。しかし、OVAと加熱H-PM2.5を投与したマウスの気道では上皮の粘液細胞化や粘膜下の好酸球浸潤は見られるものの、非加熱PM2.5よりは弱かった。加熱したPM2.5によって肺の炎症誘導やアレルギー増悪作用が減弱することから、PM2.5の成分や付着した微生物成分によってこれらが誘導されることが示唆された。

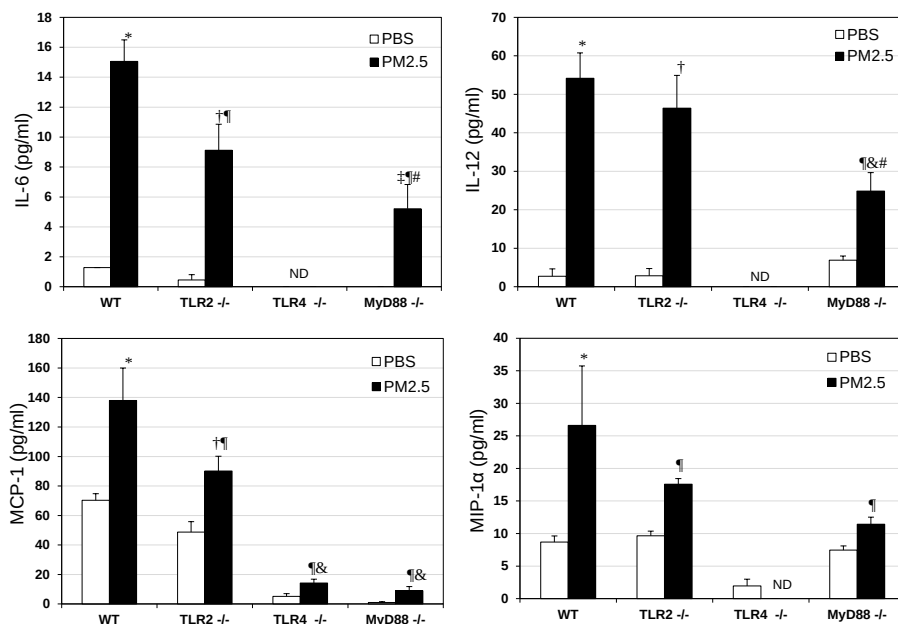


図(1)-5)-16. 北九州の煙霧時に採取したPM2.5を曝露したマウスの気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数
H-PM2.5：360°Cで加熱したPM2.5；PM2.5：非加熱のPM2.5。M $\pm$ SE.

*p<0.05 vs. control, **p<0.001 vs. control; #p<0.05 vs. H-PM2.5, ##p<0.01 vs. H-PM2.5, ###p<0.001 vs. H-PM2.5; &p<0.001 vs. PM2.5; ¶p<0.001 vs. OVA; †p<0.001 vs. OVA+H-PM2.5.

野生型 (WT)、TLR2欠損(-/-)、TLR4(-/-)、MyD88(-/-)マウスの骨髄マクロファージ (BMDM) に北九州のPM2.5を添加した細胞培養実験の結果を図(1)-5)-17 に示した。PM2.5を曝露したWTマウスの細胞培養液中の炎症性サイトカイン発現 (IL-6、IL-12、MCP-1、MIP-1 α) は著しく増加した。しかし、TLR2(-/-)細胞ではWT細胞よりも低く、TLR4(-/-)細胞ではこれらの発現が著しく低かった。MyD88(-/-)細胞ではTLR4(-/-)細胞ほどではないがTLR2(-/-)細胞よりは低かった。これらの結果から、TLR4のリガンドである微生物成分のLPSがPM2.5の極めて強い炎症誘導要因である可能性を示唆した。

しかしながら、MyD88(-/-)細胞でもIL-6やIL-12に誘導が見られていることから、これらの炎症性サイトカイン発現にはMyD88を介さない経路がある可能性を示唆した。PM2.5から発生した活性酸素 (ROS) がそれらのサイトカイン誘導に関与しているのかも知れない。



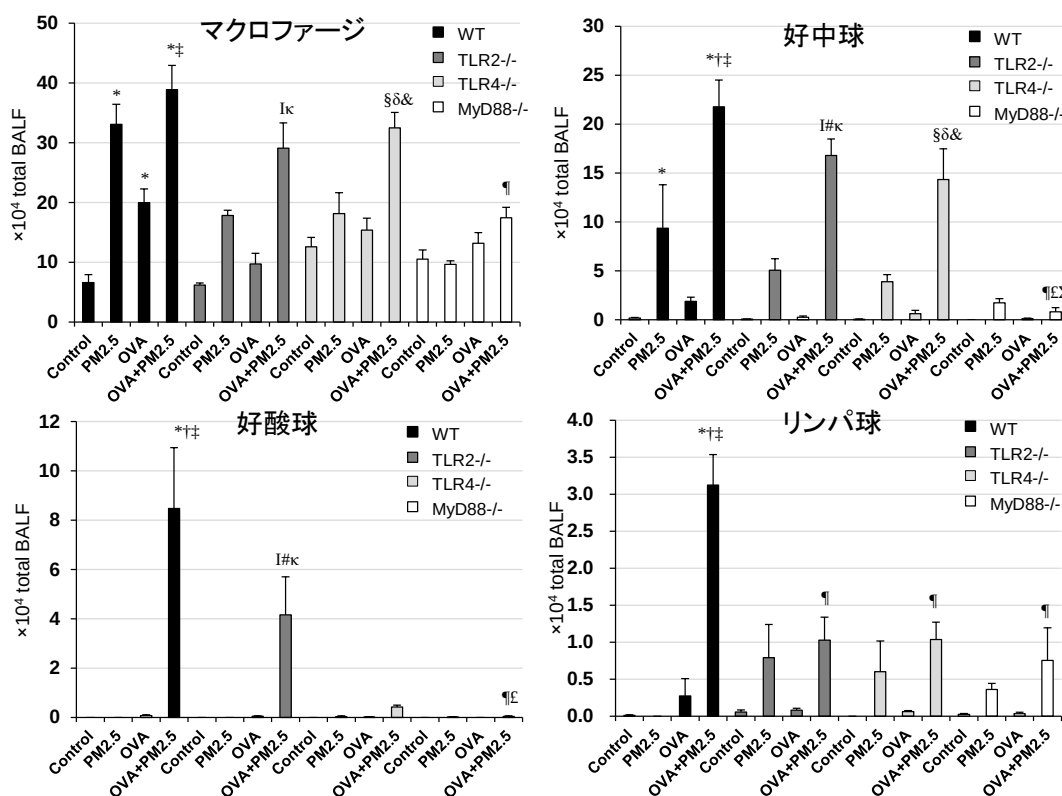
図(1)-5)-17. 北九州の煙霧時に採取したPM2.5をToll様レセプター欠損マウスとMyD88欠損マウスの骨髄マクロファージに曝露した時の培養液中の炎症性サイトカイン発現
PBS : PBS buffer. WT: 野生型マウス. M $\pm$ SE.

*p < 0.05 vs. WT Control, †p < 0.05 vs. TLR2^{-/-} Control, ‡p < 0.05 vs. MyD88^{-/-} Control,
‡p < 0.05 vs. WT PM2.5, &p < 0.05 vs. TLR2^{-/-} PM2.5, #p < 0.05 vs. TLR4^{-/-} PM2.5.

6) 都市由来PM2.5の肺におけるアレルギー増悪作用とそのメカニズム解明に関する研究

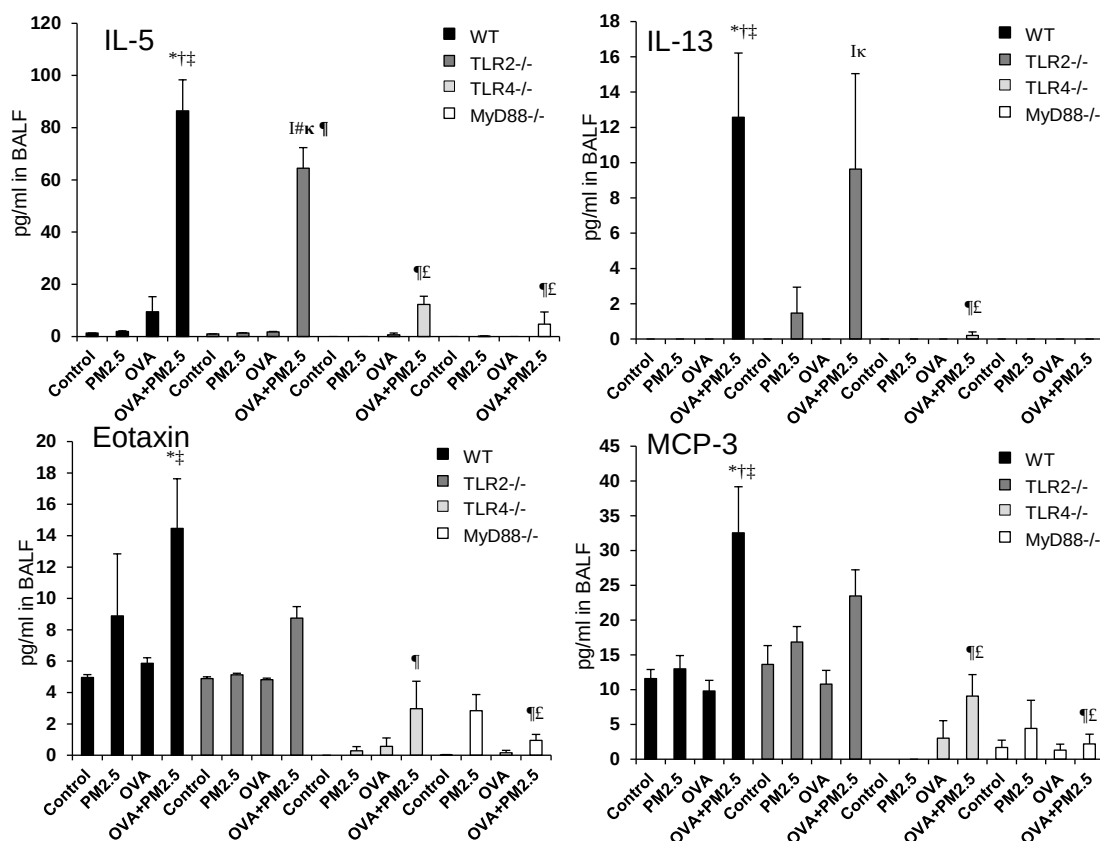
中国瀋陽市の都市由来PM2.5を気管内投与した野生型 (WT)、TLR2欠損(-/-)、TLR4(-/-)、MyD88(-/-)マウスの肺洗浄液 (BALF) 中の炎症細胞数を図(1)-6)-18 に示した。PM2.5単独投与群のWTマウスの好中球数は対照群より有意に高かったが、TLR2(-/-)、TLR4(-/-)、MyD88(-/-)マウスでは有意な増加を示さず、MyD88(-/-)マウス群の誘導が最も低かった。OVA+PM2.5投与群の好中球数はPM2.5単独投与群よりも著しく増加し、その増加順はWT > TLR2(-/-) > TLR4(-/-) > MyD88(-/-)であり、MyD88(-/-)マウスのBALF中の好中球数はわずかであった。BALF中の好酸球に関して、PM2.5単独投与ではWT、TLR2(-/-)、TLR4(-/-)、MyD88(-/-)マウスでは誘導は認められなかったが、OVA+PM2.5投与群のWTマウスでは著しく増加した。好酸球の増加順はWT > TLR2(-/-) > TLR4(-/-) > MyD88(-/-)であり、好中球数と同様にMyD88(-/-)マウスではほとんど誘導が認められなかった。

PM2.5単独のBALF中の好中球誘導にあずかるサイトカイン・ケモカインはWTマウスのKCのみに有意な増加が認められたが、IL-6、IL-12、MCP-1等で誘導が認められるものの有意な変化ではなかった。OVA+PM2.5投与群でもこれらのサイトカイン・ケモカインはWTマウス、TLR2^{-/-}、TLR4^{-/-}マウスでも誘導が見られたが、MyD88^{-/-}マウスの誘導は著しく低かった(データ示さず)。一方、BALF中の好酸球誘導・活性化にあずかるサイトカイン・ケモカインを図(1)-6)-19に示した。WTマウスのPM2.5単独投与群のEotaxinで対照群よりも若干増加が見られるが有意なものではなかった。他のIL-5、IL-13、MCP-3も対照群レベルであった。TLR2^{-/-}、TLR4^{-/-}、MyD88^{-/-}マウスのPM2.5単独投与群のIL-5、IL-13、Eotaxin、MCP-3はそれぞれの対照群レベルであった。OVA+PM2.5を投与したWTマウスのBALF中の好酸球誘導・活性化にあずかるIL-5、IL-13、MCP-3、EotaxinはPM2.5単独群、OVA単独群に比較して相乗的な増加が見られた。TLR2^{-/-}マウスでも誘導が見られたが、WTマウスよりも低く、TLR4^{-/-}マウスではTLR2^{-/-}マウスよりも更に低かった。MyD88^{-/-}マウスではほとんど誘導が見られなかった。これらのサイトカイン・ケモカイン誘導はWT>TLR2^{-/-}>TLR4^{-/-}>MyD88^{-/-}の順であった。BALF中の好酸球誘導・活性化にあずかるサイトカイン・ケモカインの変化はBALF中の好酸球数とよく対応していた。同様に血清中の抗原特異的IgE、IgG1抗体もBALF中の好酸球数やTh2系サイトカイン(IL-5、IL-13)発現とよく対応していた。



図(1)-6)-18. 瀋陽市PM2.5をWTマウス、TLR2、TLR4、MyD88 欠損マウス曝露した時の気管支・肺胞洗浄液中の炎症細胞の変化。M ± SE.

* p<0.05 vs. WT Control; † p<0.05 vs. WT PM2.5; ‡ p<0.05 vs. WT OVA; £ p<0.05 vs. WT OVA+PM2.5;
 # p<0.05 vs. TLR2^{-/-} PM2.5; κ p<0.05 vs. TLR2^{-/-} OVA; I p<0.05 vs. TLR2^{-/-} Control;
 £ p<0.05 vs. TLR2^{-/-} OVA+PM2.5; § p<0.05 vs. TLR4^{-/-} Control; δ p<0.05 vs. TLR4^{-/-} PM2.5;
 & p<0.05 vs. TLR4^{-/-} OVA; Σ p<0.05 vs. TLR4^{-/-} OVA+PM2.5.



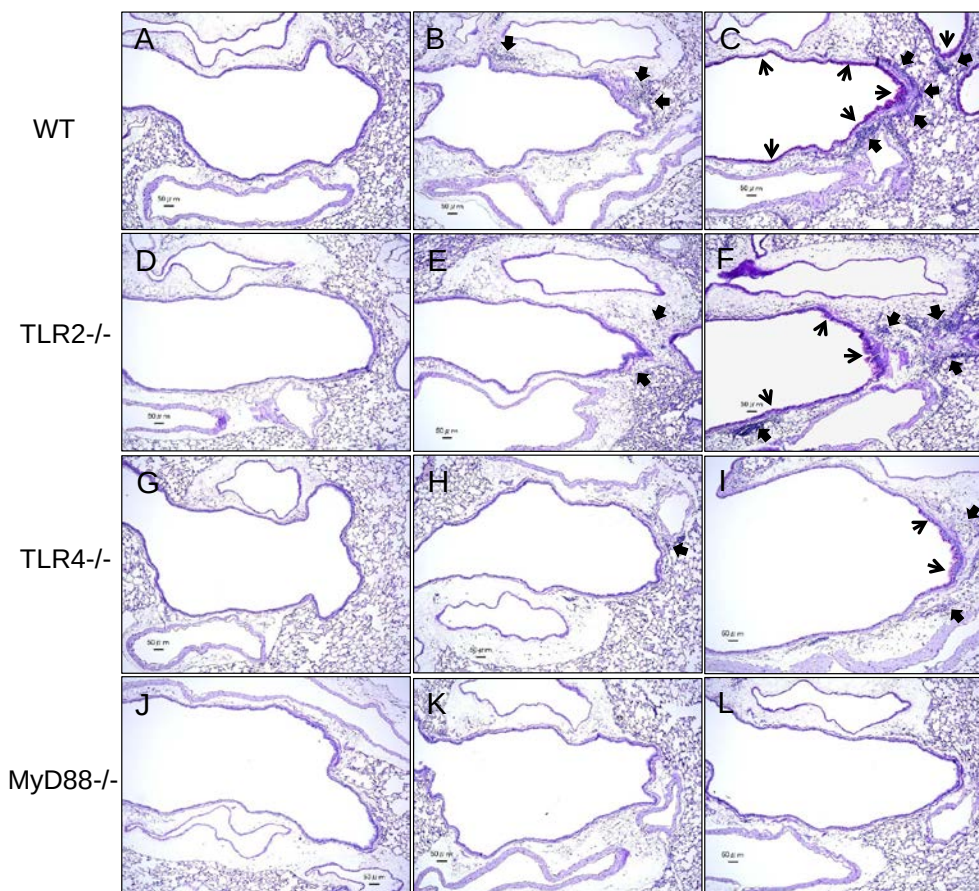
図(1)-6)-19. 瀋陽市PM2.5をWTマウス, TLR2, TLR4, MyD88 欠損マウス曝露した時の気管支・肺胞洗浄液中の炎症細胞の変化。M ± SE.

*p<0.05 vs. WT Control; †p<0.05 vs. WT PM2.5; ‡p<0.05 vs. WT OVA; §p<0.05 vs. WT OVA+PM2.5;

¶p<0.05 vs. TLR2^{-/-} Control; #p<0.05 vs. TLR2^{-/-} PM2.5; *p<0.05 vs. TLR2^{-/-} OVA; ‡p<0.05 vs. TLR2^{-/-} OVA+PM2.5.

肺の病理学的変化を図(1)-6)-20 に示した。PM2.5単独投与群のWTマウスの気道では上皮の粘液細胞化は見られなかったが、気道周囲の粘膜下に軽度の炎症細胞浸潤（気管支炎：太矢印）がみられた。この気道炎症はTLR2^{-/-}>TLR4^{-/-}>MyD88^{-/-}マウスの順に減弱していた。OVA+PM2.5群のWTマウスの気道上皮では粘液細胞化（細矢印）がみられ、気道周囲の粘膜下にも著しい好酸球性の炎症細胞浸潤（アレルギー炎症）がみられた。このような気道の病態はTLR2^{-/-}>TLR4^{-/-}>MyD88^{-/-}マウスの順に減弱しており、MyD88^{-/-}マウスでは対照群とほとんど変わらなかった。

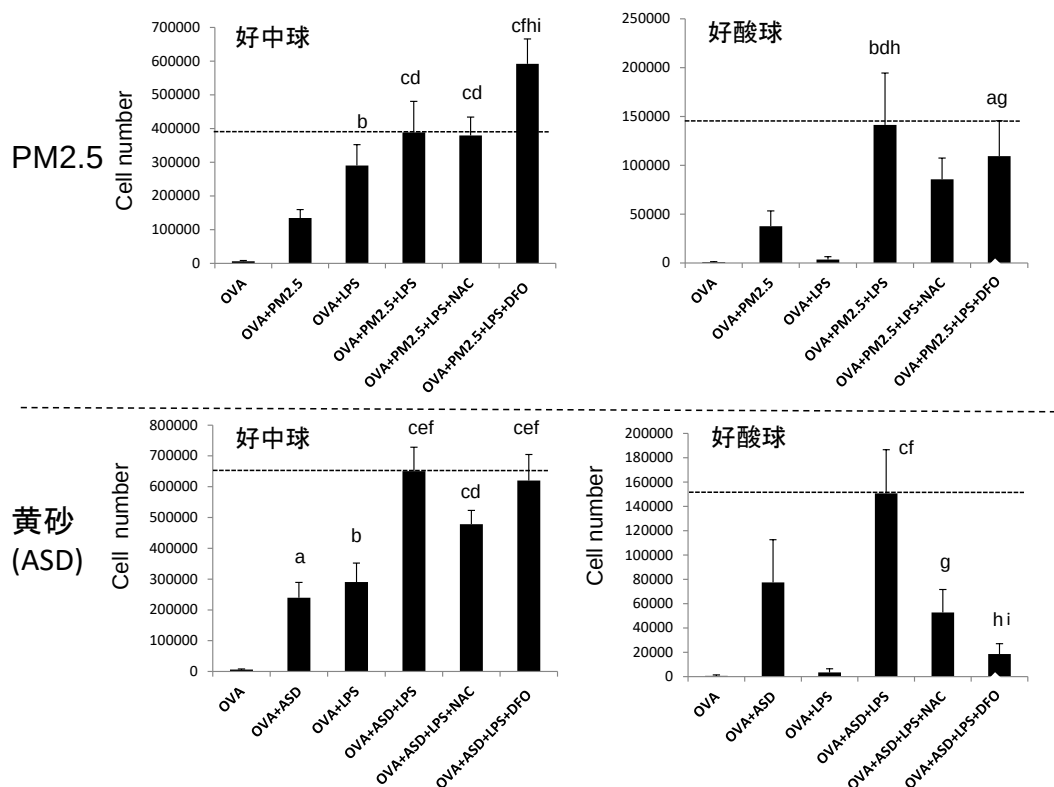
これらの結果から、PM2.5曝露による肺の好中球性の炎症誘導や好酸球性のアレルギー炎症増悪作用はTLR2、TLR4やMyD88シグナル伝達経路が重要であり、この伝達経路を介して起こるものと思われた。TLR2やTLR4を刺激する微生物成分以外のものとして、TLR2を刺激する過酸化水素(H₂O₂)¹⁾、TLR4を刺激するニッケル(Ni)²⁾やTLR2とTLR4を刺激するTiO₂ナノ粒子³⁾などが知られている。これらの活性酸素や金属の関与も考えられるが、本実験ではTLR4^{-/-}マウスで著しい炎症やアレルギー炎症抑制効果を示したことから、主にTLR4のリガンドであるLPSがアレルギー増悪作用に重要な役割を果たしていることが示唆された。



図(1)-6)-20. PM2.5をWTマウス, TLR2, TLR4, MyD88 欠損マウスに曝露した時の肺の病理学的な変化
 (A) WT Control ; (B) WT PM2.5 ; (C) WT OVA+PM2.5 ; (D) TLR2-/- Control ; (E) TLR2-/- PM2.5 ;
 (F) TLR2-/- OVA+PM2.5 ; (G) TLR4-/- Control ; (H) TLR4-/-PM2.5 ; (I) TLR4-/- OVA+PM2.5 ;
 (J) MyD88-/- Control ; (K) MyD88-/-PM2.5 ; (L) MyD88-/- OVA+PM2.5.
 細矢印：気道上皮の粘液細胞化を示す。太矢印：気道周囲の炎症細胞を示す。

7) PM2.5と黄砂曝露による肺のアレルギー増悪作用における酸化ストレスと鉄の関与

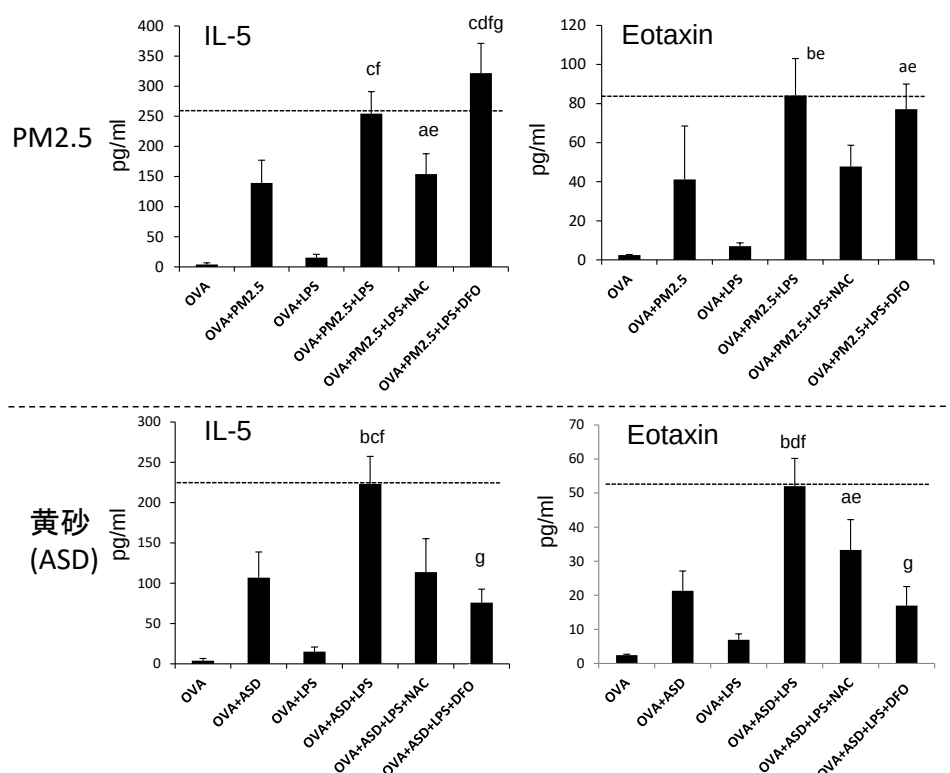
これまでの研究で、PM2.5や黄砂の肺の炎症誘導やアレルギー増悪作用にはこれら粒子に付着している微生物成分のリポポリサッカライドが重要な役割を果たしていることが分かった。そこで、LPSによる炎症から発生する活性酸素と粒子内の遷移金属の鉄とアレルギー炎症増悪作用との関連を、市販のLPSとOVAを用いて喘息の増悪のモデル実験を行った。この実験では抗酸化剤のNACと鉄キレート剤のデフェロキサミン (DFO) が用いられた。図(1)-7)-21 にPM2.5とASD投与マウスの肺洗浄液中の炎症細胞数を示した。PM2.5と黄砂(ASD)はLPSと抗原(OVA)との複合曝露 (OVA+PM2.5+LPS; OVA+ASD+LPS) によって好中球数も好酸球数も著しく増加した。PM2.5投与群の好中球数はNACやDFOによって抑制効果を示さなかった。しかし、好酸球数はNACやDFO投与によって低下する傾向を示した。ASD投与群の好中球数はNACで抑制傾向を示し、DFOでは抑制効果を示さなかった。しかし、好酸球数はNACやDFO投与によって著しく低下した。



図(1)-7-21. PM2.5 とASD 投与マウスの気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数. M ± SE.

a:p<=0.05 vs OVA, b:p<=0.01 vs OVA, c:p<=0.001 vs OVA, d:p<0.05 vs OVA+ASD,
e:p<=0.001 vs OVA+ASD,f:p<=0.001 vs OVA+LPS, g:p<=0.05vs OVA+ASD+LPS,
h:p<=0.01 vs OVA+ASD+LPS, i:p<=0.001 vs OVA+ASD+LPS.

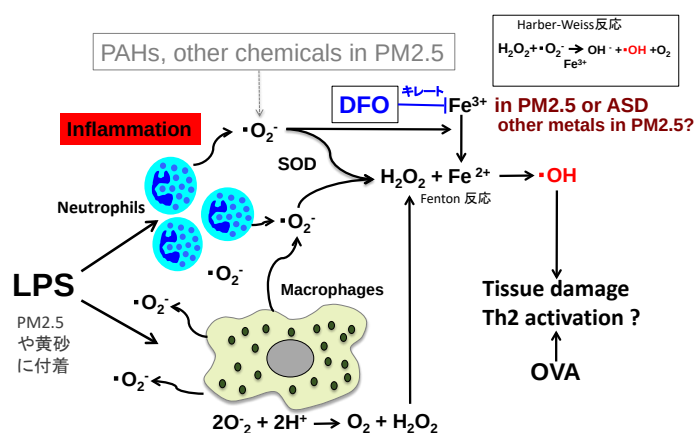
PM2.5と黄砂投与群気管支肺胞洗浄液（BALF）中の好酸球誘導・活性化にあずかるTh2サイトカインのIL-5とEotaxinの変化を図(1)-7-22 に示した。PM2.5投与群ではNAC処置によってIL-5もEotaxinも低下したが、DFO処置ではIL-5もEotaxinも低下しなかった。黄砂投与群ではNAC処置でもDFO処置でもIL-5とEotaxinを著しく低下させた。特にDFO処置での抑制効果は著しかった。肺の病理学的な観察においてもPM2.5投与群ではNACが好酸球性のアレルギー気道炎症を抑制し、黄砂投与群ではNACとDFOの両方に抑制効果が認められた。このPM2.5と黄砂試料中の鉄（Fe）の含有量はPM2.5が34 μ g/mg、ASDは37 μ g/mgで、ほぼ同レベルであった。他の金属の含有量として、PM2.5はZn (1.9 μ g/mg)、Pb(780ng/mg)、Cu(180ng/mg)、As(150ng/mg)、Mo(46ng/mg)、Ba(1200ng/mg)、Cd(9.5ng/mg)が含まれていた。一方、黄砂のこれらの金属の含有量はZn (0.11 μ g/mg)、Pb(25ng/mg)、Cu(41ng/mg)、As(16ng/mg)、Mo(1.4ng/mg)、Ba(540ng/mg)、Cd(<0.39ng/mg)であった。PM2.5と黄砂を比較すると、これらの金属は黄砂よりもPM2.5の方が著しく高かった。以上の結果より、黄砂は鉄キレート剤のDFOに抑制効果があることから、鉄から生じる活性酸素（ROS）がアレルギー炎症の増悪と関連している可能性を示唆した。一方、PM2.5ではDFOに効果を示さなかったが、抗酸化剤（NAC）に効果が認められた。PM2.5と黄砂の鉄含有量はほぼ同じであるが、Zn、Pb、Cu、As、Mo、Ba、Cdは黄砂の含有量より著しく高かったことから、PM2.5は鉄以外のこれらの遷移金属から生じるROSがアレルギー炎症の増悪と関連している可能性が推察された。



図(1)-7)-22. PM2.5とASD 投与マウスの気管支肺胞洗浄液中の好酸球誘導サイトカイン. $M \pm SE$.

a: $p < 0.05$ vs OVA, b: $p < 0.001$ vs OVA, c: $p < 0.05$ vs OVA+ASD, d: $p < 0.01$ vs OVA+ASD, e: 0.05 vs OVA+LPS, f: $p < 0.001$ vs OVA+LPS, g: $p < 0.01$ vs OVA+ASD+LPS.

LPSによる炎症から生じる活性酸素（ROS）生成、遷移金属の鉄とアレルギー炎症増悪との関係の模式図を図(1)-7)-23 に示した。LPSによって好中球性の炎症が起こると、炎症から生じるスーパーオキシドラジカル（ $\cdot O_2^-$ ）が、体内のスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）によって H_2O_2 に変換される。PM2.5や黄砂中の3価鉄は炎症から生じる $\cdot O_2^-$ によって2価鉄に還元され、この2価鉄と前記の H_2O_2 とのフェントン（Fenton）反応によってヒドロキシラジカル（ $\cdot OH$ ）が生成される。黄砂ではDFO処置によってアレルギー炎症に抑制効果が認められたことから、 $\cdot OH$ がアレルギーの増悪と関連しているかも知れない。すなわち、DFOによって3価鉄を失うとフェントン反応が起こらず $\cdot OH$ の生成が起こらないためにアレルギー増悪作用が抑制されたと考えられた。



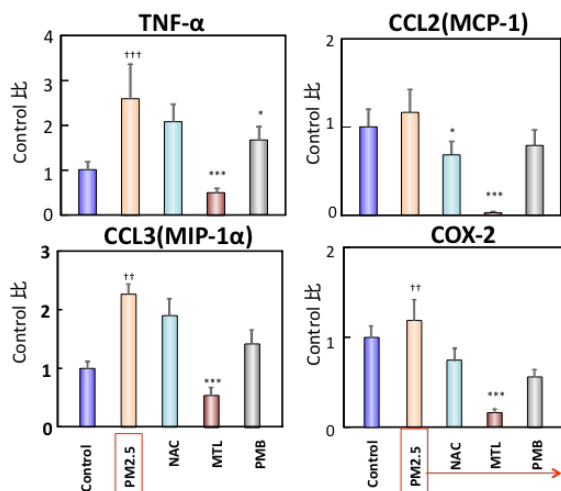
図(1)-7)-23. PM2.5と黄砂のアレルギー増悪作用におけるLPS、活性酸素と鉄の役割

8) PM2.5による炎症反応とアレルギー増悪作用における銅と活性酸素の関与

7)の実験において、PM2.5の炎症反応や肺のアレルギー増悪作用に鉄以外の金属が関与している可能性が考えられた。そこで、PM2.5の炎症反応や肺のアレルギー増悪作用における銅(Cu)と活性酸素の役割を明らかにするために、銅のキレート剤であるメタライト(MTL)と抗酸化剤のNACを用いて細胞培養実験とマウスを用いた動物実験を行った。

<細胞培養実験>

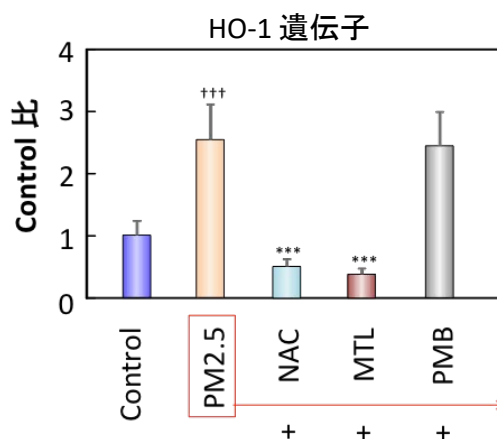
細胞培養実験結果を図(1)-8)-24 に示した。RAW264.7細胞に瀋陽で採取したPM2.5を添加すると、炎症性遺伝子のTNF- α 、MCP-1、MIP-1 α とCOX2に発現増加が見られた。以前の実験同様にLPS阻害剤のPMBによってその発現は抑制された。しかし、NACでは抑制効果が弱かった。銅のキレート剤のMTLを処置するとこれらの遺伝子発現は著しく抑制された。このときの酸化ストレスマーカーのHO-1遺伝子発現を図(1)-8)-25 に示した。HO-1遺伝子発現はPMBでは抑制できなかったが、NACとMTLによって著しく抑制された。ここで誘導された酸化ストレスはPM2.5に存在するPAHs由来のものであると考えられた。これらの結果から、PM2.5による炎症誘導の一部はLPS誘導によるものであるが、銅(Cu)処置によっても酸化ストレス反応が低下し、炎症性遺伝子発現も低下していることから、炎症反応の一部に銅と活性酸素が関与している可能性が示唆された。



図(1)-8)-24. PM2.5とNAC, MTL, PMB 処理3時間後の炎症性遺伝子発現. M $\pm$ SE.

††p<0.01 vs Control; †††p<0.001 vs Control;

*p<0.05 vs PM2.5; ***p<0.001 vs PM2.5.

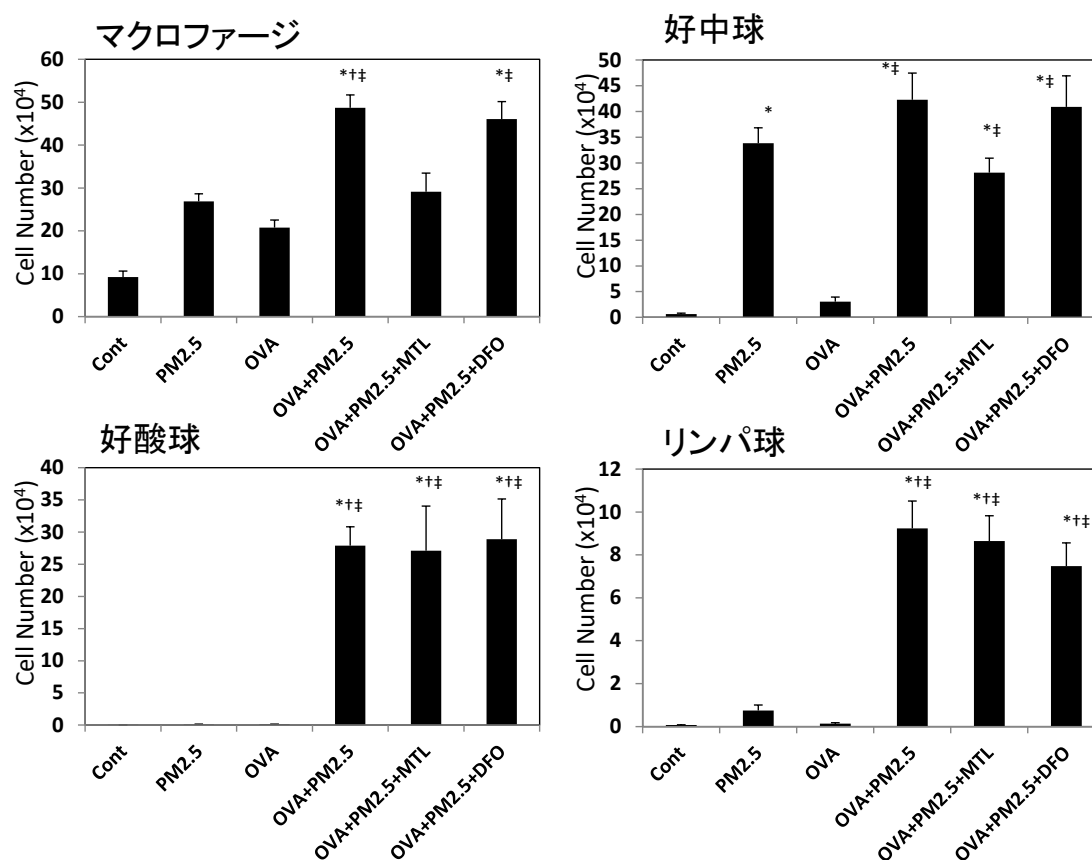


図(1)-8)-25. PM2.5とNAC, MTL, PMB 処理3時間後のHO-1遺伝子発現. M $\pm$ SE.

†††p<0.001 vs Control; ***p<0.001 vs PM2.5.

<動物実験>

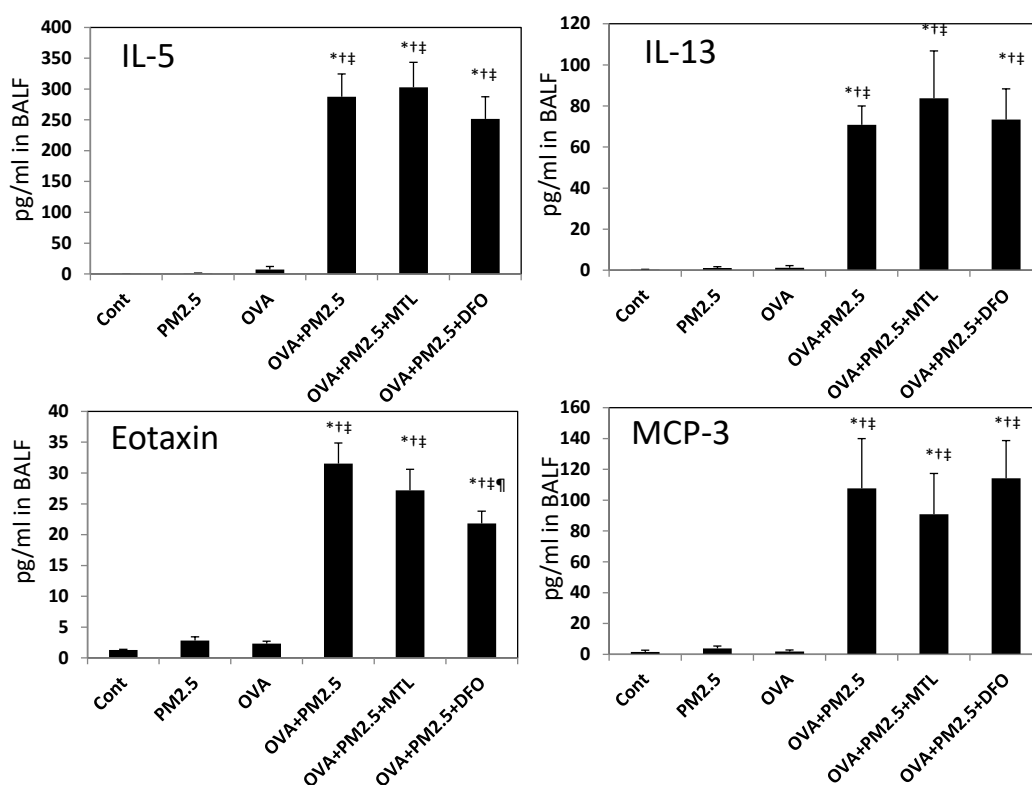
マウスの実験では国立環境研究所所有の北京降下煤塵を更にアンダーセン・エアサンプラーを用いてPM2.5に精製したPM2.5を用いた。このPM2.5はLPS等の微生物成分を多く含んでいた。このPM2.5と銅のキレート剤 MTL、もしくは鉄キレート剤 DFOをマウスに曝露した時の気管支肺胞洗浄液（BALF）中の炎症細胞数の結果を図(1)-8)-26 に示した。好中球数はPM2.5投与によって著しく増加した。OVA+PM2.5群の好中球数はPM2.5単独投与よりも若干高かった。この好中球数はMTLの処置で抑制傾向を示したが、DFO処置では変化を示さなかった。同様の変化はマクロファージにも認められた。アレルギー炎症の指標である好酸球数はPM2.5単独、OVA単独投与では誘導が見られなかったが、OVA+PM2.5投与によって著しく増加した。しかし、MTLやDFOの処理による抑制効果は認められなかった。リンパ球もほぼ好酸球と同様の変化を示していた。



図(1)-8)-26. PM2.5とMTL, DFOを曝露したマウスの
気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数. M ± SE.

*: p<0.05 vs Control; †: p<0.05 vs PM2.5; ‡: p<0.05 vs OVA; ¶: OVA+PM2.5.

BALF中の好酸球誘導・活性化にあずかるIL-5、IL-13、Eotaxin、MCP-3の発現を図(1)-8)-27に示した。MTL処置ではこれらの発現に抑制効果は認められなかった。DFO処置ではEotaxinに低下傾向が見られるものの、IL-5、IL-13、MCP3はDFO無処置群と変わらなかった。この実験からMTLは好中球性の炎症を抑える作用は若干あるが、好酸球性のアレルギー炎症を抑える作用が無いものと思われた。しかし、ここで使用したPM2.5は通常の大気中から採取されるフレッシュなPM2.5よりLPSやカビ成分が多く含まれていることから、鉄や銅の金属成分よりも微生物成分の方がアレルギー反応に強く影響しているのかも知れない。今後は細胞培養実験と同様に大気中から採取されたフレッシュなPM2.5を使用して動物実験を行う必要があるのかも知れない。

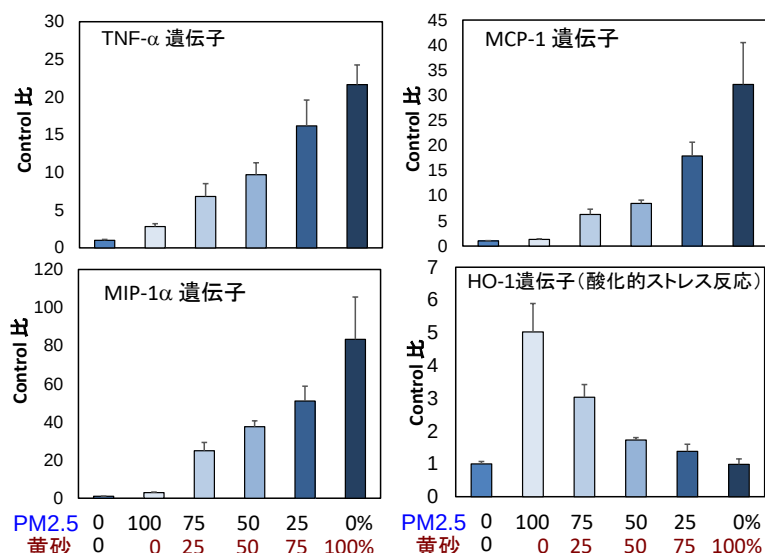


図(1)-8)-27. PM2.5とMTL, DFOを曝露したマウスの気管支肺胞洗浄液中の好酸球誘導・活性化にあずかるサイトカイン・ケモカインの変化
*: p<0.05 vs Control; †: p<0.05 vs PM2.5; ‡: p<0.05 vs OVA; ¶: OVA+PM2.5. M ± SE.

9) マクロファージ細胞培養系における黄砂とPM2.5の複合曝露による炎症反応と酸化ストレス反応

RAW264.7細胞を用いてPM2.5と黄砂の複合曝露による炎症反応と酸化ストレス反応への影響について調べた(図(1)-9)-28)。炎症性遺伝子(TNF- α 、MCP-1、MIP-1 α)は黄砂の添加量に依存して増加した。他にCOX2も同様の変化を示していた。しかし、PM2.5ではほとんどこれらの炎症性遺伝子に増加が見られなかった。一方、酸化ストレス反応の指標であるHO-1遺伝子はPM2.5の添加量に依存して増加したが、黄砂ではほとんど増加しなかった。過酸化水素(H₂O₂)の分解にあずかるカタラーゼの遺伝子発現もHO-1遺伝子発現と類似の変化を示した。以上の結果が

ら、マクロファージ系の細胞におけるPM2.5と黄砂の複合曝露では黄砂の添加量に依存して炎症反応が強くなり、酸化的ストレスが最も誘導されたPM2.5の100%では炎症反応が最も弱かったことから、酸化ストレスは炎症反応と関連していないことが明らかとなった。黄砂量依存性の炎症反応の増加は黄砂に付着した微生物成分のLPSや β -glucanによるものと示唆された。



図(1)-9)-28. PM2.5と黄砂の複合曝露によるRAW264.7細胞における炎症性遺伝子と酸化的ストレス反応遺伝子(HO-1)発現の変化

1 0) 黄砂とPM2.5の単一及び複合曝露による肺の炎症誘導とアレルギー増悪作用

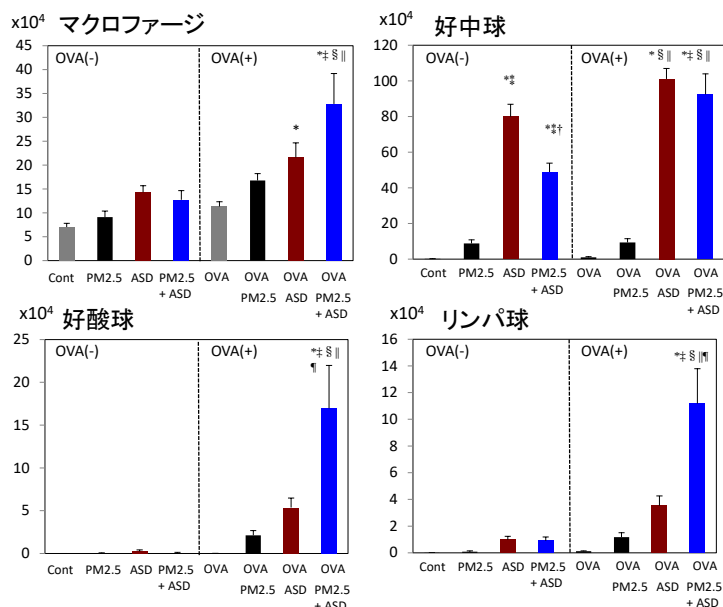
PM2.5と黄砂を複合曝露したマウスの気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症細胞数を図(1)-10)-29 に示した。OVA(-)群では、好中球性の肺の炎症の強さはASD群>PM2.5+ASD群>PM2.5群の順であり、ASD群の肺の炎症が最も強かった。これに関連するBALF中の炎症性サイトカイン・ケモカイン (KC、IL-12、IFN- γ 、TNF- α) 誘導も図(1)-10)-30 に示すごとく炎症の強さに対応していた。

一方、OVA(+)群では、好酸球性の肺のアレルギー炎症の指標である好酸球数はOVA+PM2.5+ASD群>OVA+ASD群>OVA+PM2.5群の順であり、複合曝露群の好酸球数が最も高かった(図(1)-10)-29)。好酸球誘導・活性化に關与するBALF中のTh2サイトカインのIL-5、IL-13や Eotaxin の誘導も図(1)-10)-31 に示すごとく、OVA+PM2.5+ASD群>OVA+ASD群>OVA+PM2.5群の順であり、BALF中の好酸球数とよく対応していた。また、肺の病理学的な観察ではOVA+PM2.5+ASDの複合曝露群では、気道の粘液細胞増生や気道粘膜下の好酸球浸潤がOVA+PM2.5群やOVA+ASD群よりも著しかった(図(1)-10)-32)。OVA+ASD群はOVA+PM2.5群と比較して好酸球性の気道炎症は強いが複合曝露群ほどではなかった。血清中のOVA特異的なIgEも複合曝露群が最も高く、IgG1はOVA+ASD群が最も高かった。今回の実験では、PM2.5+黄砂 (50 μ g+50 μ g) の複合曝露は、同じ投与量 (100 μ g) のPM2.5や黄砂の単一曝露と比較して、OVA誘導のアレルギー性気道炎症を著しく悪化させる結果となった。

一方、OVAを処置していない黄砂単一曝露は複合曝露よりも肺の炎症を強く誘導した。その原因として、単一曝露の黄砂100 μ gの方が複合曝露時の黄砂50 μ gよりも含まれるLPS量が多いた

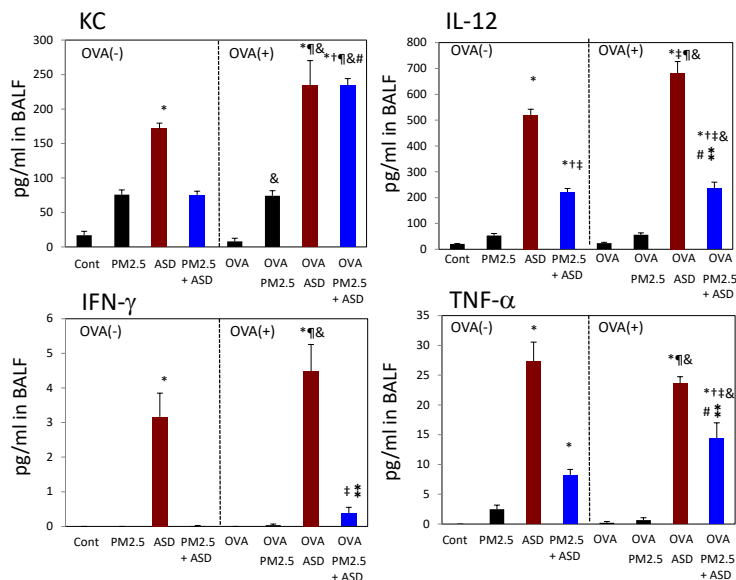
めと考えられた。LPS濃度が高い場合やIFN- γ が誘導されている場合は免疫抑制が起こる可能性がある。本実験のASD群やOVA+ASD群ではIFN- γ が誘導されていた(図(1)-10)-30)。

この結果から、OVA+ASD群ではアレルギー反応が抑制されている可能性が考えられ、その結果として、複合曝露群が最もアレルギー反応が増悪されているように見えた可能性も考えられる。そこで、次に、ASD量を50 μ gと100 μ gで単一曝露してアレルギーへの影響を比較する実験を行った。



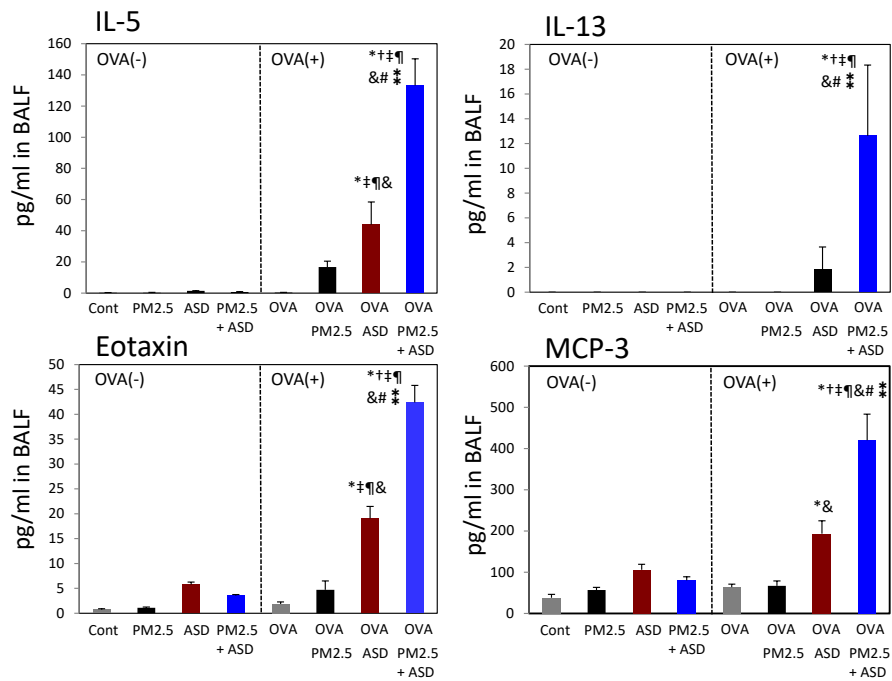
図(1)-10)-29. 気管支肺胞洗浄液(BALF)中のマクロファージ数と炎症細胞数

*p<0.05 vs. Control; † p<0.05 vs. ASD; ‡ p<0.05 vs. PM2.5+ASD;
§ p<0.05 vs. OVA; ¶ p<0.05 vs. OVA+PM2.5; ¶ p<0.05 vs. OVA+ASD.

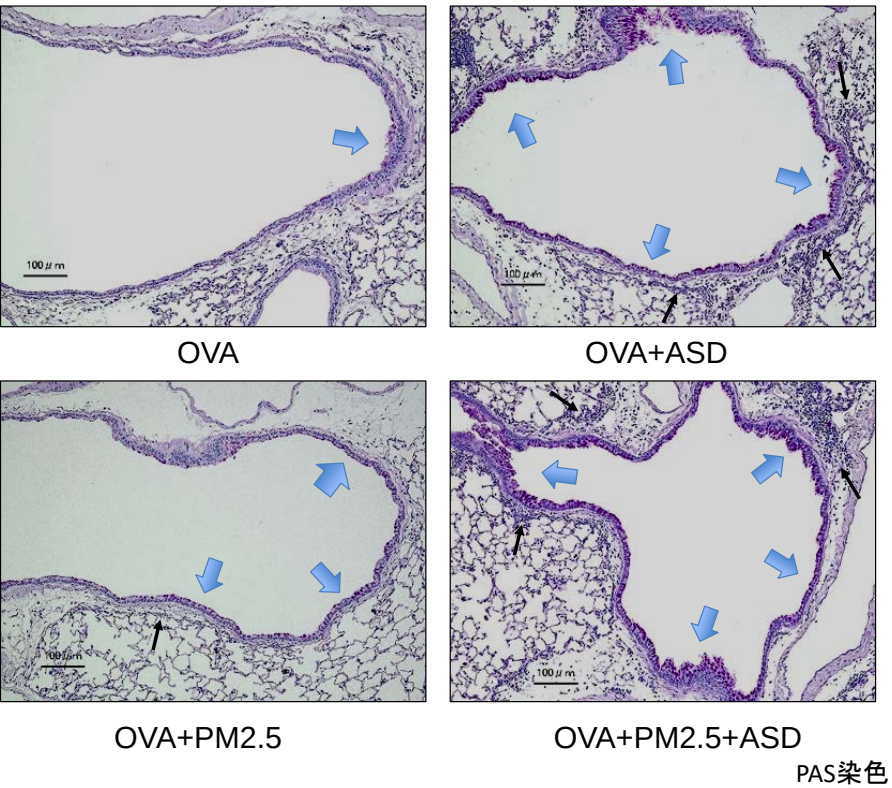


図(1)-10)-30. BALF中の好中球誘導・活性化に関与するサイトカイン・ケモカインの変化

* p<0.05 vs. Control; † p<0.05 vs. PM2.5; ‡ p<0.05 vs. ASD; ¶ p<0.05 vs. PM2.5+ASD;
& p<0.05 vs. OVA; # p<0.05 vs. OVA+PM2.5; § p<0.05 vs. OVA+ASD



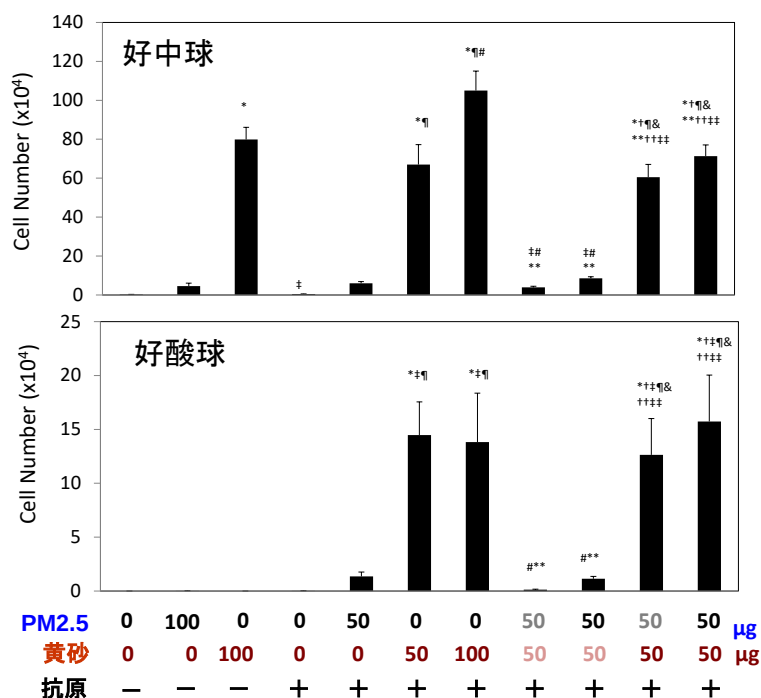
図(1)-10)-31. BALF中のTh2サイトカインと好酸球誘導・活性化ケモカインの変化
*p<0.05 vs. Control; †p<0.05 vs. PM2.5; ‡p<0.05 vs. ASD; ¶p<0.05 vs. PM2.5+ASD;
&p<0.05 vs. OVA; #p<0.05 vs. OVA+PM2.5; *p<0.05 vs. OVA+ASD



図(1)-10)-32. OVA (+)群の気道上皮の粘液細胞化
赤く染まった細胞が粘液細胞(太矢印).複合曝露群では著しい気道の粘液細胞化と気道周囲には炎症細胞(細矢印)が浸潤している.

1 1) 加熱・非加熱処理黄砂(ASD)とPM2.5を組合せた複合曝露の影響

肺洗浄液 (BALF) 中の炎症の指標である好中球数を図(1)-11)-33 に示した。抗原OVAを処置しないOVA(-)群の非加熱PM2.5 (100 μ g) 群と非加熱ASD (100 μ g) 群の好中球数を比較すると圧倒的にASD群の方が高かった。OVA+非加熱PM2.5 (50 μ g) とOVA+非加熱ASD (50 μ g) を比較すると同様の変化を示していた。OVA+非加熱ASD (50 μ g) とOVA+非加熱ASD (100 μ g) を比較すると、やはり投与量の多いASD100 μ g曝露の方が好中球数は高かった。OVA+加熱PM2.5+加熱黄砂群とOVA+非加熱PM2.5+加熱黄砂群の好中球数は非常に少なかった。OVA+加熱PM2.5 (50 μ g) +非加熱ASD (50 μ g) 群とOVA+非加熱PM2.5 (50 μ g) +非加熱ASD (50 μ g) 群を比較すると、若干後者の方が高かった。この値はOVA+非加熱PM2.5 (50 μ g) 群とOVA+加熱ASD (50 μ g) 群の値の和に等しかった (相加効果)。BALF中の好中球数は非加熱ASDが依存することによって著しく誘導・増加することが分かった。また、非加熱PM2.5には好中球誘導能力は非常に低いことが分かった。

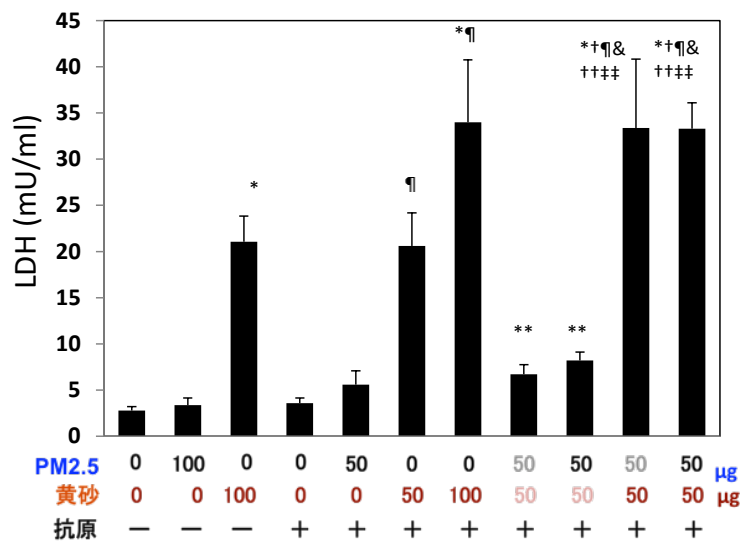


図(1)-11)-33. 加熱・非加熱黄砂とPM2.5の組合せ複合曝露によるマウスの気管支肺胞洗浄液(BALF)中の好酸球の変化(薄い数値は加熱処理した粒子を示す).
 *p<0.05 vs. Control; †p<0.05 vs. PM2.5(100 μ g); ‡p<0.05 vs. ASD(100 μ g); ¶p<0.05 vs. OVA;
 &p<0.05 vs. OVA+PM2.5(50 μ g); #p<0.01 vs. OVA+ASD(50 μ g); §p<0.05 vs. OVA+ASD(100 μ g);
 ††p<0.05 vs. OVA+H-ASD(50 μ g)+H-PM2.5(50 μ g); ‡‡p<0.05 vs. OVA+H-ASD(50 μ g)+PM2.5(50 μ g)

図(1)-11)-34 にBALF中の細胞傷害の指標である乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を示した。LDH活性はBALFの好中球数とよく対応しており、非加熱のASD100 μ g単独曝露やOVA処置群の非加熱ASD50 μ gと100 μ gで高く、またPM2.5の複合曝露によっても活性増加が見られ、これらの群では肺の著しい細胞傷害が起きていることが分かった。

BALF中のアレルギー炎症の指標である好酸球数をみると、抗原OVAが入らないOVA(-)群ではPM2.5 (100 μ g) 群とASD (100 μ g) 群共に好酸球の出現は見られなかった。OVA処置群のOVA+非加熱PM2.5 (50 μ g) とOVA+非加熱ASD (50 μ g) を比較するとASD曝露の方が好酸球を強く誘

導することが分かった。OVA+非加熱ASD（100 μ g）群の好酸球数はOVA+非加熱ASD（50 μ g）と同レベルであった。両粒子を加熱処理したOVA+加熱PM2.5（50 μ g）+加熱ASD（50 μ g）群では好酸球数が著しく減少した。非加熱PM2.5（50 μ g）+加熱ASD（50 μ g）群でも著しく好酸球数が低下し、OVA+非加熱PM2.5（50 μ g）群と同レベルであった。OVA+加熱PM2.5（50 μ g）+非加熱ASD（50 μ g）群の好酸球数は著しく増加し、OVA+非加熱ASD（100 μ g）群に類似した増加レベルであった。OVA+非加熱PM2.5（50 μ g）+非加熱ASD（50 μ g）群の好酸球数はOVA+非加熱PM2.5（50 μ g）群とOVA+非加熱ASD（50 μ g）群の好酸球数の和と同等であった。このような結果から、複合曝露におけるアレルギー炎症の程度はおおよそPM2.5と黄砂の相加効果であると考えられた。



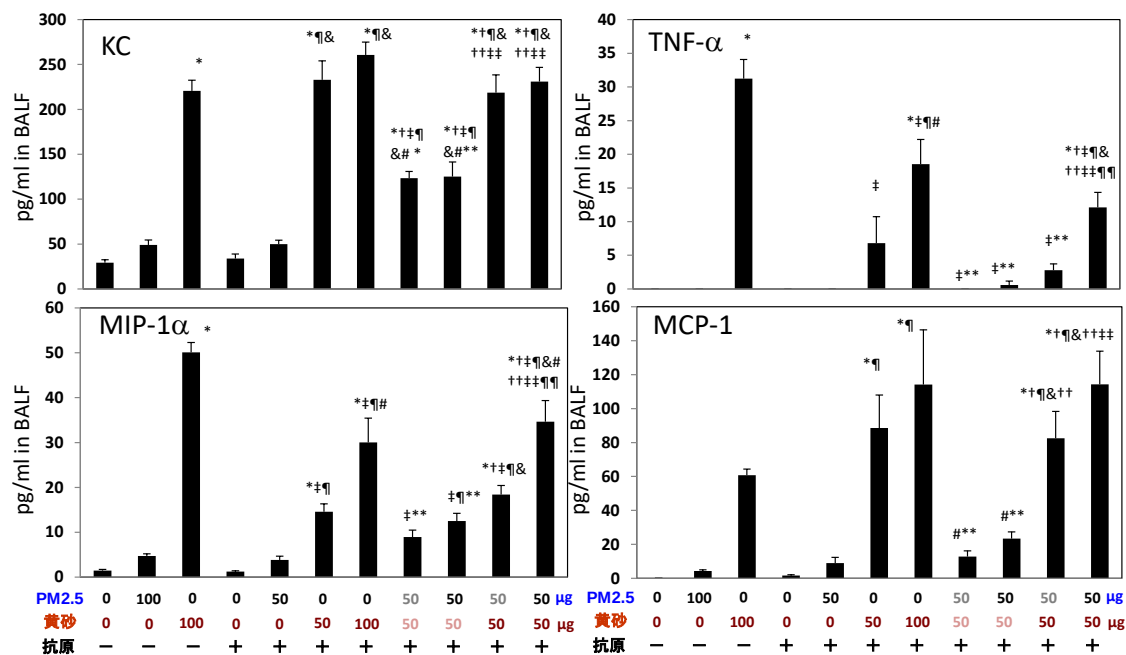
図(1)-11)-34. 加熱・非加熱黄砂とPM2.5の組合せ複合曝露によるマウスの気管支肺胞洗浄液(BALF)中のLDH (薄い数値は加熱処理した粒子を示す).

*: $p < 0.05$ vs. Control; †: $p < 0.05$ vs. PM2.5(100%); ¶: $p < 0.05$ vs. OVA; &: $p < 0.05$ vs. OVA+PM2.5(50%);

** : $p < 0.05$ vs. OVA+ASD(100%); ††: $p < 0.05$ vs. OVA+H-ASD(50%)+H-PM2.5(50%);

‡‡: $p < 0.05$ vs. OVA+H-ASD(50%)+PM2.5(50%); ¶¶: $p < 0.05$ vs. OVA+ASD(50%)+H-PM2.5(50%)

一方、好中球誘導にかかわるBALF中のサイトカイン・ケモカインを図(1)-11)-35 に示した。KC、TNF- α 、MIP-1 α 、MCP-1発現はBALF中の好中球数とよく対応していた。抗原OVAが入らないOVA(-)群のPM2.5（100 μ g）群とASD（100 μ g）群のこれらサイトカイン・ケモカインの発現を比較すると好中球と同じように圧倒的にASD群の方が高かった。OVA+非加熱PM2.5(50 μ g)とOVA+非加熱ASD（50 μ g）を比較すると圧倒的にOVA+非加熱ASD（50 μ g）群の方が高かった。また、OVA+非加熱ASD（50 μ g）とOVA+非加熱ASD（100 μ g）を比較すると、好中球と同様に投与量の多いASD100 μ g曝露の方がサイトカイン・ケモカインの発現量が高かった。また、OVA+加熱PM2.5+加熱黄砂群とOVA+非加熱PM2.5+加熱黄砂群の発現は非常に少なかった。OVA+加熱PM2.5（50 μ g）+非加熱ASD（50 μ g）群とOVA+非加熱PM2.5（50 μ g）+非加熱ASD（50 μ g）群を比較すると、KCを除いて、TNF- α 、MIP-1 α 、MCP-1は後者の群の方が高かった。この群の値はOVA+非加熱PM2.5（50 μ g）群とOVA+加熱ASD（50 μ g）群の値のおおよそ相加的な効果を示していた。



図(1)-11)-35. 加熱・非加熱黄砂とPM2.5の組合せ複合曝露によるマウスの気管支肺胞洗浄液(BALF)中の好中球誘導に関わるサイトカイン・ケモカイン (薄い数値は加熱処理した粒子を示す).

*: p<0.05 vs. Control; †: p<0.05 vs. PM2.5(100%); ‡: p<0.05 vs. ASD(100%);

¶: p<0.05 vs. OVA;&: p<0.05 vs. OVA+PM2.5(50%);#: p<0.05 vs. OVA+ASD(50%);

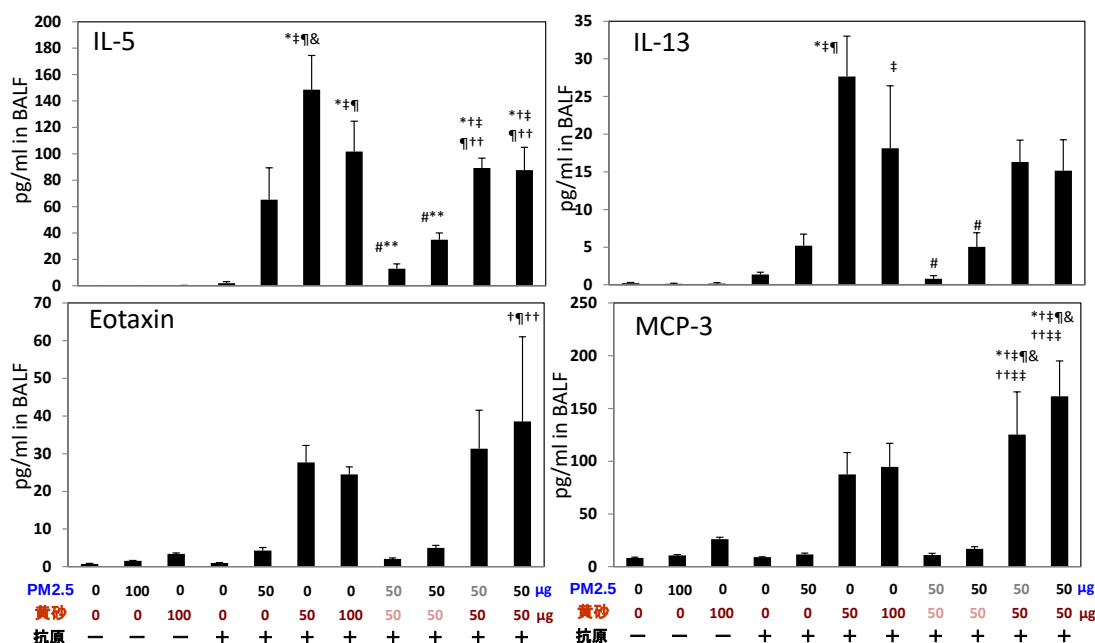
** : p<0.05 vs. OVA+ASD(100%); ††: p<0.05 vs. OVA+H-ASD(50%)+H-PM2.5(50%);

‡‡: p<0.05 vs. OVA+H-ASD(50%)+PM2.5(50%); ¶¶: p<0.05 vs. OVA+ASD(50%)+H-PM2.5(50%). M ± SE.

次に好酸球を誘導・活性化するケモカインを図(1)-11)-36 に示した。抗原OVAを処置しないOVA(-)群の非加熱PM2.5 (100μg) 群と非加熱ASD (100μg) 群のBALF中の好酸球を誘導・活性化するサイトカイン・ケモカインの発現は見られなかった。OVA+非加熱PM2.5 (50μg) とOVA+非加熱ASD (50μg) を比較すると、IL-5、IL-13、EotaxinとMCP-3の発現は好酸球数同様にOVA+非加熱ASD (50μg) 群の方が高かった。OVA+加熱PM2.5 (50μg) +加熱黄砂 (50μg) 群とOVA+非加熱PM2.5 (50μg) +加熱黄砂 (50μg) 群のこれらの発現は好酸球の誘導と同じように非常に低かった。

OVA+加熱PM2.5 (50μg) +非加熱ASD (50μg) 群とOVA+非加熱PM2.5 (50μg) +非加熱ASD (50μg) 群を比較すると、IL-5とIL-13の誘導は同レベルであったが、EotaxinとMCP-3は後者の方が若干高く、加熱PM2.5 (50μg) 群とOVA+加熱ASD (50μg) 群の相加的な増加であった。

OVA+非加熱ASD (50μg) とOVA+非加熱ASD (100μg) 群の好中球誘導のサイトカイン・ケモカインはおおよそOVA+非加熱ASD (100μg) 群の方がOVA+非加熱ASD (50μg) 群より高かったが、好酸球誘導のTh2サイトカイン・ケモカインIL-5やIL-13は投与量の低いOVA+非加熱ASD (50μg) 群の方が高く、EotaxinやMCP-3の誘導は同レベルであり、好酸球数と対応していた。このような結果から、OVA+非加熱ASD (100μg) 群では免疫抑制が起きており、アレルギー反応が抑制されている可能性が考えられた。



図(1)-11)-36. 加熱・非加熱黄砂とPM2.5の組合せ複合曝露によるマウスの気管支肺胞洗浄液(BALF)中の好酸球誘導に関わるサイトカイン・ケモカイン(薄い数値は加熱処理した粒子を示す).

*: $p < 0.05$ vs. Control; †: $p < 0.05$ vs. PM2.5(100%); ‡: $p < 0.05$ vs. ASD(100%); ¶: $p < 0.05$ vs. OVA;
 &: $p < 0.05$ vs. OVA+PM2.5(50%); #: $p < 0.05$ vs. OVA+ASD(50%); **: $p < 0.05$ vs. OVA+ASD(100%);
 ††: $p < 0.05$ vs. OVA+H-ASD(50%)+H-PM2.5(50%); †††: $p < 0.05$ vs. OVA+H-ASD(50%)+PM2.5(50%);
 ¶¶: $p < 0.05$ vs. OVA+ASD(50%)+H-PM2.5(50%). M ± SE.

この結果より、10)の実験において見られた複合曝露のOVA+PM2.5 (50µg) +ASD (50µg) 群の好酸球数がOVA+ASD (100µg) 群よりも著しく高かった現象は、OVA+ASD (100µg) 群では免疫抑制が起き、アレルギー反応が抑制されたものであると考えられた。この免疫抑制によって見かけ上、OVA+PM2.5 (50µg) +ASD (50µg) 群の影響の方がOVA+ASD (100µg) 群よりも強く見えたものと考えられた。

従って、PM2.5と黄砂の複合曝露によるアレルギー炎症への影響はそれぞれの単独曝露の相加効果であると考えられた。また、複合曝露による炎症誘導やアレルギーへの影響は黄砂濃度に依存し、黄砂の割合が多いほど影響が強い。しかし、黄砂量が過剰 (100µg) になるとアレルギー反応が逆に抑制されることがわかった。

今回使用した国立環境研究所の黄砂 (Standard ASD) は飛来する黄砂よりも微生物成分量、特にLPS量が多く含まれていた。おそらく、炎症やアレルギー増悪作用はこのLPSによるものと考えられる。高濃度のLPS曝露の場合はTh1系に傾き、むしろアレルギー反応が抑制されることはよく知られている。このようなことから、今回の黄砂100µg投与におけるアレルギー反応抑制作用はASD中のLPS量が多かったためと考えられた。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

1) 粒子径の違いによる炎症誘導とアレルギー増悪作用について

さまざまな大気中の粒子状物質の呼吸器系への影響を調べるために、北九州でサンプリングしたPM2.5と飛来黄砂、中国瀋陽市の大気中から採取したサイズの異なる粒子（PM2.5、CPM、>PM10）を試料として、粒子サイズや構成成分の違いによる肺の炎症やアレルギー炎症誘導の違いとその誘因について調べた。粒子状物質の微生物成分量（LPS、 β -glucan）は粒子サイズが大きいほど多く含んでいたが、逆に化石燃料燃焼由来の成分（硫酸塩、硝酸塩、多環芳香族炭化水素類(PAHs)）は粒子サイズが小さくなるほど多く含んでいた。経気道曝露した時の肺の炎症やアレルギー炎症の強さ、炎症性サイトカイン発現は、微生物成分量が多く含んだサイズが大きい粒子ほど強く発現した。これ迄の報告では微小粒子ほど呼吸器への影響が強いとされてきたが、同一重量の粒子で比較するとサイズが大きい粒子のcoarse PM（CPM:2.5-10 μ m）の方がサイズの小さい粒子（PM2.5）より影響が強いことが明らかとなった。その主な誘因は微生物成分（LPS、 β -glucan等）によるものであることが明らかとなった。黄砂由来の砂成分のPM2.5も化学物質を多く含む瀋陽のPM2.5よりも微生物含有量が多く、瀋陽のPM2.5よりも影響が強かった。これらの結果はこれ迄のPM2.5の方が呼吸器系への影響が強いといった報告と異なった新しい知見であり、科学的に意義があるものである。また、化学物質を多く含むPM2.5は粗大粒子よりも酸化的ストレスが強く誘導されていることがNrf2活性やHO-1発現増加から明らかとなった。

2) PM2.5の肺の炎症誘導について

PM2.5の肺の炎症誘導についてマクロファージを用いた細胞培養実験とマウスへの曝露実験を行い詳しく調べた。マクロファージではLPS阻害剤のPMBがPM2.5誘導の炎症反応に対して抑制効果を示し、抗酸化剤のNACに対してはさほど効果を示さなかったが、肺胞II型上皮細胞ではNACで抑制効果を示し、PMBは抑制効果を示さなかった。この結果から、肺胞II型上皮細胞ではPM2.5によって誘導される酸化ストレスによって炎症反応が起きている可能性が示唆され、この酸化ストレスはPM2.5に存在するPAHsなどの化学物質によって生じるものと推察された。一方、マウスを用いた動物実験では、PM2.5誘導の肺の炎症は抗酸化剤のNACで抑制され、PMBでは抑制効果が殆ど無く、肺胞II型上皮細胞の反応と類似していた。マクロファージ様細胞では微生物センサーのTLRsが発達していて、PM2.5に付着した微生物成分のLPS等をよく感知してLPS/TLR4/MyD88を介したシグナル伝達によって炎症反応が誘導されるが、実際のマウスの肺ではマクロファージ数よりも肺胞II型上皮細胞数の方が圧倒的に多いため、酸化ストレスによって起こる肺胞II型上皮細胞の炎症の方が、LPSを感知しておこるマクロファージ誘導の炎症反応よりも優位に起きているものと示唆された。従って、PM2.5によって起こる肺の炎症は、PM2.5から発生する活性酸素（ROS）が肺胞上皮細胞に作用して炎症性サイトカイン誘導を誘導して好中球性の炎症が起きているものと示唆された。このようにPM2.5の肺の炎症誘導について細胞培養実験と動物実験から世界で初めて明らかにした。

3) 都市PM2.5のアレルギー増悪作用について

都市由来PM2.5の気管支喘息増悪作用の誘導メカニズムを明らかにする目的で、微生物成分

感知センサーのToll様レセプター（TLR）2欠損(-/-)マウス、TLR4-/-マウス、MyD88-/-マウスを用いて動物実験を行った。その結果、PM2.5曝露による肺のアレルギー炎症増悪作用はTLR2、TLR4やMyD88シグナル伝達経路が重要であり、この伝達経路を介して起こるものと思われた。TLR2やTLR4を刺激する微生物成分以外のものとして、TLR2を刺激する過酸化水素（ H_2O_2 ）、TLR4を刺激するニッケル(Ni)やTLR2とTLR4を刺激するチタン(Ti)などが知られているが、TLR4-/-マウスで著しい肺のアレルギー炎症抑制効果を示したことから、主にTLR4のリガンドであるLPSがPM2.5のアレルギー炎症増悪作用に重要な役割を果たしていることを世界で初めて明らかにした。

4) PM2.5と黄砂に含まれる鉄（Fe）とアレルギー増悪作用について

これまでの研究でPM2.5と黄砂のアレルギー増悪作用の主たる要因はLPSであることが明らかになっているため、LPSを用いて都市由来PM2.5と黄砂のアレルギー増悪作用とこれらの粒子に含まれる鉄（Fe）との関連を調べた。都市由来PM2.5 + LPSによる肺のアレルギー増悪作用には鉄の関与は低い、黄砂 + LPSによるアレルギー増悪作用には鉄が関与していることが明らかとなった。おそらく炎症過程で発生する O_2^- や H_2O_2 が黄砂の Fe^{3+} と反応することによってよりアクティブな $\cdot\text{OH}$ が生じて、少なからずこれらの活性酸素がアレルギーの増悪の一部に関与している可能性を示唆した。しかし、PM2.5はFe以外の黄砂には少ない遷移金属がその増悪に関与していることが推察された。これらの知見は全てこれ迄の報告にない新しい知見であり、黄砂のアレルギー増悪メカニズムの中で鉄との関連性を明らかにすることができた。

5) PM2.5に含まれる銅（Cu）と炎症反応・アレルギー増悪作用について

PM2.5では鉄以外の遷移金属が炎症誘導やアレルギー炎症の増悪と関係している可能性が考えられた。銅は鉄と同じようにフェントン反応やハーバーワイズ反応類似の反応によってアクティブな $\cdot\text{OH}$ を生じる。瀋陽で採取したPM2.5を銅（Cu）キレート剤のメタライト（MTL）で処置してマクロファージ様細胞（RAW264.7）に添加すると炎症反応が著しく抑制され、この時に酸化ストレス反応指標のHO-1も著しく抑制された。この結果から、PM2.5の中の Cu^{2+} と酸化ストレスが炎症反応と関連している可能性を示唆した。そこで、PM2.5とMTLを前処置してマウスにおける肺のアレルギー増悪作用を調べた。一般の炎症で誘導される好中球はMTLによって抑制されたが、アレルギー炎症で誘導される好酸球は抑制されなかった。PM2.5の中のCuはアレルギー炎症の増悪と関係していないのかも知れない。このマウス実験に使用したPM2.5は細胞培養実験に使用した瀋陽のPM2.5とは異なり、国立環境研究所所有の北京降下煤塵をPM2.5に精製したもので、微生物成分のLPSや β -glucanを沢山含んでいたため、アレルギー反応に微生物の影響が強く出た可能性が考えられた。今後の課題としては、LPS等が少ないフレッシュなPM2.5を用いてCuとの関連を明らかにする必要があると考えられた。

6) 黄砂とPM2.5の複合曝露による炎症誘導とアレルギー炎症への影響について

黄砂とPM2.5の複合曝露の炎症、アレルギー炎症への影響を中心に実験を行った。細胞培養実験とマウスを用いた実験から、複合曝露による通常の肺の炎症（好中球性の炎症）はPM2.5より黄砂の方が強く起こり、この炎症の強さは黄砂の量に依存することが分かった。PM2.5と黄砂の炎症誘導メカニズムから言及すると、PM2.5に含まれる化学物質よりも黄砂に付着微生

物成分（LPS、 β -glucan）の方が炎症誘導に強く働いていることから、複合曝露の場合、黄砂の割合が多いほど炎症が悪化することが明らかとなった。また、肺のアレルギー炎症に関しても同様のことが言えるが、増悪作用はPM2.5と黄砂の相加効果であることがわかった。しかし、黄砂の量が多いと微生物成分のLPSも多く含まれているために免疫抑制が起き、アレルギー反応が抑制されることも分かった。

（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＞

基本的にはPM2.5と黄砂の単一曝露や複合曝露による肺の炎症誘導やアレルギー増悪作用のメカニズム等の基礎を知ることによって、さまざまな対策に役立てることができると考えている。

- 1) 日本へ飛来が予測される中国都市大気の粒子状物質について、粒径の違い（PM2.5、CPM、>PM10）による影響を比較すると、肺の炎症やアレルギー炎症への影響は、粒子サイズが大きいほど影響が強く、影響は付着微生物成分量と関連していることを提示した。また、黄砂由来の砂成分のPM2.5は都市由来PM2.5より影響が強いことを提示した。
- 2) PM2.5の肺の炎症誘導、特に肺胞を中心とした炎症はPM2.5から発生する活性酸素が肺胞II型上皮細胞に作用して誘導されることを提示した。
- 3) PM2.5と黄砂の炎症誘導とアレルギー増悪要因は粒子に付着した微生物成分、特にLPSが重要であり、黄砂はこれに加えての鉄（Fe）の存在も重要であることを提示した。また、PM2.5では銅（Cu）が炎症誘導に関与している可能性を提示した。これらのLPSや金属類の知見は粒子状物質の疫学研究においても重要な指標となりうると考えられる。
- 4) これまでの研究成果から粒子状物質の影響を評価すると、肺の炎症やアレルギー炎症のような一過性の影響は黄砂の方がPM2.5より強いことが分かるが、慢性閉塞肺疾患（COPD）や発がんなどの慢性影響に関しては常時発生が見られる都市PM2.5の長期曝露による慢性影響を調べるのが今後重要であることを提言する。
- 5) 黄砂とPM2.5の複合曝露による肺の炎症誘導やアレルギー増悪作用は相加的であり、その強さは黄砂の量に依存するが、黄砂量が過剰になるとアレルギー反応が逆に抑制されることを提示した。
- 6) 本研究の基礎的な成果は、行政によるPM2.5や黄砂の健康影響や健康被害を見極めるための知見となり、また原因物質を軽減するための基礎資料となり、更に、環境基準値や健康被害の未然防止策などに関連する環境政策に貢献できる基礎資料となりうると考える。

- 7) これらの研究成果を多くの科学雑誌に公表することで、粒子状物質の健康影響に関する国際的共通理解を形成することができる。今後、本推進費課題で得られた多くの成果を公表し、粒子状物質の危険性を警鐘して、国際的なPM2.5や黄砂発生の低減策の取組みに役立てたい。

6. 国際共同研究等の状況

研究代表者は中国瀋陽市にある中国医科大学、公共衛生学院の孫 貴范教授、賀 森准教授と PM2.5 及び黄砂の健康影響に関する共同研究を行っている。本プロジェクトでは越境粒子状物質の PM2.5 と黄砂を北九州の産業医科大学でサンプリングして使用しているが、北九州で採取される PM2.5 と黄砂だけではサンプリング量が少なく、それらの影響評価が難しい。そのため、中国医科大学の両氏と学生の協力を得て、瀋陽市の大気中から粒子状物質をサンプリングして頂いている。本研究の研究協力者となっている賀准教授がサンプリングされた試料を持って来学し、本学でこれらの粒子状物質の影響評価の共同研究を行っている。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) Y. REN, T. ICHINOSE, M. HE, K. ARASHIDANI, Y. YOSHIDA, S. YOSHIDA, M. NISHIKAWA, H.T AKANO, G. SUN, T. SHIBAMOTO: *Environ Health*. 13, 83 (2014)
“Aggravation of ovalbumin-induced murine asthma by co-exposure to desert-dust and organic chemicals: an animal model study”
- 2) M. HE, T. ICHINOSE, Y. REN, Y. SONG, Y. YOSHIDA, K. ARASHIDANI, S. YOSHIDA , M. NISHIKAWA, H. TAKANO, G. SUN: *Inhal Toxicol*. 28:1-13 (2015)
“PM2.5-rich dust collected from the air in Fukuoka, Kyushu, Japan, can exacerbate murine lung eosinophilia.”
- 3) M. HE, T. ICHINOSE, Y. SONG, Y. YOSHIDA, F. KOBAYASHI, T. MAKI, S. YOSHIDA, H. TAKANO, T. SHIBAMOTO, G. SUN: *Int Arch Allergy Immunol* 8;168(2):96-106 (2015)
“The Role of Toll-Like Receptors and Myeloid Differentiation Factor 88 in *Bjerkandera adusta*-Induced Lung Inflammation.”
- 4) M. HE, T. ICHINOSE, B. LIUL, Y. SONG, Y. YOSHIDA, F. KOBAYASHI, T. MAKI, S. YOSHIDA, M. NISHIKAWA, H. TAKANO, G. SUN: *Environ Toxicol*. 31(1):93-105 (2016)
“Silica-carrying particulate matter enhances *Bjerkandera adusta*-induced murine lung eosinophilia.”
- 5) M. HE, T. ICHINOSE, S. YOSHIDA, F. SHIBA, K. ARASHIDANI, H. TAKANO, G. SUN, T. SHIBAMOTO: *Inhal Toxicol*. 28:706-718 (2016)
“Differences in allergic inflammatory responses in murine lungs: Comparison of PM2.5 and coarse PM collected during the hazy events in a Chinese city”
- 6) M. HE, T. ICHINOSE, Y. SONG, Y. YOSHIDA, K. BEKKI, K. ARASHIDANI, S. YOSHIDA, M. NISHIKAWA, H. TAKANO, T. SHIBAMOTO, G. SUN: *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 296:61-72 (2016)

- “Desert dust induces TLRs signaling to trigger Th2-dominant lung allergic inflammation via a MyD88-dependent signaling pathway”
- 7) M. HE, T. ICHINOSE, M. KOBAYASHI, K. ARASHIDANI, S. YOSHIDA, M. NISHIKAWA, H. TAKANO, G. SUN, T. SHIBAMOTO: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 297:41-55 (2016)
“Differences in allergic inflammatory responses between urban PM2.5 and fine particle derived from desert-dust in murine lungs”
 - 8) S. YOSHIDA, T. ICHINOSE, K. ARASHIDANI, M. HE, H. TAKANO and T. SHIBAMOTO: *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 13, 1173 (2016)
“Effects of Fetal Exposure to Asian Sand Dust on Development and Reproduction in Male Offspring”
 - 9) K. BEKKI, T. ITO, Y. YOSHIDA, C. HE, K. ARASHIDANI, M. HE, G. SUN, Y. ZENG, H. SONE, N. KUNUGITA, T. ICHINOSE: *Environ. Toxicol. Pharmacol.* Jul;45:362-369 (2016)
“PM2.5 collected in China causes inflammatory and oxidative stress responses in macrophages through the multiple pathways”
 - 10) M. HE, T. ICHINOSE, S. YOSHIDA, T. ITO, C. HE, Y. YOSHIDA, K. ARASHIDANI, H. TAKANO, G. SUN, T. SHIBAMOTO: *J. Appl. Toxicol.* doi:10.1002/jat.3482 (2017)
“PM2.5-induced lung inflammation in mice: Differences of inflammatory response in macrophages and type II alveolar cells”

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) 市瀬孝道：専門医のためのアレルギー学講座．XVI.環境因子とアレルギー．日本アレルギー学会、63, (8), 1085-1094 (2014)
「3. 大気汚染(PM2.5、黄砂等)とアレルギーに関する研究の進展」
- 2) 市瀬孝道：日本小児呼吸器学会雑誌．総説．日本小児呼吸器学会、28, (1), 1-7 (2017)
「大気中の粒子状物質の肺の炎症とアレルギーへの影響」

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 市瀬孝道、戸次加奈江、伊藤智彦：PM2.5 の炎症誘導とアレルギーへの影響．保健の科学、58, 9, 601-606 (2016)
「特集 微小粒子状物質 PM2.5 -基礎を知り,対策を考える-」

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 市瀬孝道：第 45 回日本職業・環境アレルギー学会、基調講演「煙霧（黄砂を含む）などの越境粒子状物質 PM2.5 が健康に与える影響」(2014)
「越境粒子状物質の生体影響」
- 2) 市瀬孝道、吉田成一、M. HE：フォーラム 1014・衛生薬学・環境トキシコロジー (2014)
「PM2.5 と PM10 の気管支喘息モデルマウスへの影響」
- 3) 市瀬孝道、M. HE、吉田成一、定金香里、高野裕久：第 55 回大気環境学会年会 (2014)
「中国瀋陽市における PM2.5 と PM10 のマウスのアレルギー性気道炎症への影響」

- 4) 市瀬孝道、M. HE、吉田安広、嵐谷奎一、吉田成一、高野裕久：第 55 回大気環境学会年会、シンポジウム (2014)
「黄砂のアレルギー性気道炎症増悪メカニズム」
- 5) 市瀬孝道、M. HE、嵐谷奎一：第 9 回バイオエアロゾルシンポジウム (2014)
「大気中の粒子状物質による肺の炎症と気管支喘息増悪作用 —微生物成分との関わり—」
- 6) 市瀬孝道、M. HE、戸次加奈江、吉田安広、吉田成一：日本薬学会 (2015)
「中国瀋陽において収集した PM2.5 によって誘導される肺の炎症とその誘因」
- 7) 吉田成一、市瀬孝道：フォーラム 2014・衛生薬学・環境トキシコロジー (2014)
「黄砂付着微生物由来成分の LPS による雄性生殖機能への影響」
- 8) 吉田成一、嵐谷奎一、市瀬孝道：第 55 回大気環境学会年会 (2014)
「越境 PM2.5 によるマウス雄性生殖機能の悪化」
- 9) 吉田成一、三浦早織、市瀬孝道：第 9 回バイオエアロゾルシンポジウム (2015)
「浮遊粒子状物質による免疫修飾作用のスクリーニング系の確立と適用」
- 10) 吉田成一、賀森、三浦早織、市瀬孝道：日本薬学会第 135 年会 (2015)
「微小粒子状物質 PM2.5 によるマウスマクロファージ細胞の遺伝子発現に対する影響」
- 11) 戸次加奈江、伊藤智彦、吉田安宏、C. HE、M. HE、平野靖史郎、樺田尚樹、市瀬孝道：第 9 回バイオエアロゾルシンポジウム (2015)
「中国の都市大気汚染が示す毒性影響における生物由来活性物質の関与」
- 12) 戸次加奈江、伊藤智彦、吉田安宏、C. HE、M. HE、平野靖史郎、樺田尚樹、市瀬孝道：日本薬学会第 135 年会 (2015)
「中国の PM2.5 を暴露したマウスマクロファージにおける酸化的ストレスおよび炎症反応の誘導」
- 13) 定金香里、市瀬孝道、吉田安弘：第 9 回バイオエアロゾルシンポジウム (2015)
「菌体成分と黄砂によるアレルギー性気道炎症増悪作用」
- 14) 定金香里、市瀬孝道、吉田安弘：第 85 回日本衛生学会学術総会 (2015)
「真菌由来成分β-グルカンと黄砂によるアレルギー性気道炎症増悪作用」
- 15) 市瀬孝道、賀森、吉田安宏、高野裕久：第 64 回日本アレルギー学会 (2015)
「由来の異なる PM2.5 のアレルギー性気道炎症増悪作用の比較」
- 16) 市瀬孝道：第 42 回日本毒性学会、シンポジウム 環境毒性学の新たな潮流 (2015)
「PM2.5、粗大粒子と黄砂による肺の炎症とアレルギーの増悪」
- 17) 吉田成一、三浦早織、賀森、市瀬孝道：第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015)
「微小粒子状物質 PM2.5 による免疫修飾作用の評価」
- 18) 市瀬孝道、高野裕久：第 22 回日本免疫毒性学会、シンポジウム“毒性”影響から“かく乱”影響 (2015)
「黄砂と PM2.5 による肺の炎症とアレルギーの増悪」
- 19) 市瀬孝道、M. HE、吉田成一、定金香里、高野裕久：第 56 回日本大気環境学会年会 (2015)
「中国瀋陽市における PM2.5 と PM10 のマウスアレルギー性気道炎症への影響」
- 20) 定金香里、市瀬孝道、吉田安宏：第 56 回大気環境学会年会 (2015)
「微生物由来成分ペプチドグリカンと黄砂によるアレルギー性気道炎症増悪作用について」

- 21) 吉田成一、嵐谷奎一、市瀬孝道：第 56 回大気環境学会年会 (2015)
「越境微小粒子(PM2.5)のマウス雄性生殖機能に与える影響」
- 22) 市瀬孝道、吉田成一、戸次加奈江、吉田安宏、M. HE、C. HE：フォーラム 2015・衛生薬学・環境トキシコロジー (2015)
「PM2.5 による肺の炎症とアレルギー炎症増悪作用における酸化ストレスの関与」
- 23) 吉田成一、嵐谷奎一、市瀬孝道：フォーラム 2015・衛生薬学・環境トキシコロジー (2015)
「微小粒子 PM2.5 の胎仔期曝露が出生仔の雄性生殖機能に与える影響」
- 24) 市瀬孝道、吉田成一：日本薬学会第 136 年会 (2016)
「PM2.5 と黄砂のアレルギー喘息増悪作用における LPS と活性酸素の役割」
- 25) 吉田成一、嵐谷奎一、市瀬孝道：日本薬学会第 136 年会 (2016)
「微小粒子 PM2.5 の胎仔期曝露が出生仔の免疫系に与える影響」
- 26) 市瀬孝道：第 86 回日本衛生学会 (2016)
「シンポジウムPM2.5生体影響研究の最前線.粒子状物質全般の呼吸器系への影響(実験系)」
- 27) 吉田成一、嵐谷奎一、市瀬孝道：第 43 回日本毒性学会学術年会 (2016)
「微小粒子PM2.5の胎仔期曝露が出生仔の雄性生殖機能に与える影響とその影響発現メカニズムの解析」
- 28) 市瀬孝道、吉田成一、定金香里、嵐谷奎一、M. HE：第 57 回大気環境学会年会 (2016)
「PM2.5のTLR2, 4とMyD88シグナル経路を介した肺のアレルギー増悪作用」
- 29) 定金香里、市瀬孝道、西川雅孝、高野裕久：第 57 回大気環境学会年会 (2016)
「微生物由来成分LPSと β -グルカン及び黄砂の複合曝露によるアレルギー性気道炎症増悪作用」
- 30) 吉田成一、村木直美、伊藤剛、嵐谷奎一、市瀬孝道：第 57 回大気環境学会年会 (2016)
「微小粒子PM2.5の胎児期曝露による雄性出生仔の生殖機能への影響メカニズムの解析」
- 31) 市瀬孝道、吉田成一：フォーラム 2016・衛生薬学・環境トキシコロジー (2016)
「PM2.5による炎症反応におけるLPSと酸化ストレスの関与」
- 32) 吉田成一、村木直美、伊藤剛、嵐谷奎一、市瀬孝道：フォーラム 2016・衛生薬学・環境トキシコロジー(2016)
「微小粒子 PM2.5 の胎児期曝露による出生仔免疫系への影響解析」
- 33) 市瀬孝道：第 49 回日本小児呼吸器学会 (2016)
「シンポジウム1.大気環境と子どもの呼吸. S1-2.大気中の粒子状物質の肺の炎症とアレルギーへの影響」
- 34) 市瀬孝道：第 39 回日本分子生物学会 (2016)
シンポジウム.環境物質がもたらす健康影響.アレルギーなのかガンなのか！？「黄砂とPM2.5の肺の炎症とアレルギーへの影響」
- 35) 市瀬孝道：第 46 回大気汚染公害認定研究会 (2017)
「大気中の粒子状物質の肺の炎症誘導とアレルギー増悪作用」
- 36) 市瀬孝道、吉田成一：日本薬学会第 137 年会 (2017)
「PM2.5と黄砂の単一及び複合曝露がアレルギー気道炎症に与える影響」

(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) 公開講座「PM2.5 と黄砂の健康への影響」（主催：大分県立看護科学大学、2015 年 12 月 17 日、日田市 パトリア日田、観客 30 名）にて講演

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) RKB 福岡放送「今日感ニュース」（2016 年 2 月 23 日、国境を越える黄砂・PM2.5 について紹介）

(6) その他

「特に記載すべき事項はない。」

8. 引用文献

- 1) Frantz S, Kelly RA, Bourcier T: J Biol Chem. 276(7):5197-203 (2001)
Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappa B by oxidative stress in cardiac myocytes.
- 2) Tsou T. C, Liou S. H, Yeh S. C, Tsai F. Y, Chao H. R: Toxicol. Appl. Pharmacol. 15;273(3): 492-499 (2013)
Crucial role of Toll-like receptors in the zinc/nickel-induced inflammatory response in vascular endothelial cells.
- 3) Ze Y, Sheng L, Zhao X, Hong J, Ze X, Yu X, Pan X, Lin A, Zhao Y, Zhang C, Zhou Q, Wang L, Hong F: PLoS. One. 9(3):e92230 (2014)
TiO₂ nanoparticles induced hippocampal neuroinflammation in mice.

(2) 黄砂とPM2.5の肺炎・アレルギー喘息増悪機構における細胞ダメージ関連分子の関与に関する研究

産業医科大学 医学部

吉田 安宏

嵐谷 奎一

平成26～28年度累計予算額：30,795千円（うち平成28年度：9,377千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

黄砂粒子などの捕集は、北九州市八幡西区折尾地区で、Hi-volume air sampler 及びAndersen Hi-volume air samplerを用いて行った。捕集時期は、2014年(平成26年)3～5月、2015年(平成27年)3～5月、2016年(平成28年)3～5月に行った。捕集した粒子の化学的・物理的解析は、黄砂粒子を含む全粉じん濃度、黄砂粒子に付着する化学物質の多環芳香族炭化水素（PAHs）、ニトロ多環芳香族炭化水素（nitroPAHs）及び水溶性イオン成分化合物に注目し、高速液体クロマトグラフとイオンクロマトグラフを用いて測定した。全粉じん濃度は、2014年に0.5～317 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、2015年は7.0～261 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、2016年は4.0～209 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ と計測され、日間変動が大きく、その他の化合物濃度も同様の変動傾向であった。飛来する黄砂粒子数 μm の径で不定形である。PAHs及びnitroPAHsはおよそ1 μm の微粒子に含有していることを認めた。また2013年以降、春季の大気汚染の発生源は、石炭・バイオマス燃焼由来から石油系燃焼由来へと推移してきていることが示唆された。捕集したPM10（黄砂を含む）およびPM2.5の細胞への影響を、増殖反応および細胞内で起きている分子のイベントを解析・観察した。方法は粒子を頻回投与した曝露モデルマウスを作成し、そのマウスのリンパ組織に常駐あるいは循環してくる細胞を回収し解析した。PM2.5を曝露した群から捕集した脾臓細胞は総じてマイトジェン(LPS、ConA)に対する相対反応が低く、黄砂で観察された細胞内分子NF- κ B（転写因子）の活性化も抑制されていた。その原因として粒子に付着している物質の関与が、種々の抗酸化剤やLPS阻害剤等の同時投与により示された。脾臓細胞の増殖活性細胞が抑制される機序には酸化ストレスが関係しており、そのマーカーである細胞内タンパク質HO-1の発現が認められた。脾臓細胞の中で特に異物を食する細胞群のマーカーの一つでもあるCD11b陽性細胞（好中球）でそのHO-1発現誘導が顕著であった。粒子のサイズに注目すると、より大きなものが免疫系への影響力を持つことが示唆された。今後は得られた知見を発展させ、アレルギーに対するリスク評価パラメータをPM10のデータから、免疫抑制の方向性のパラメータはPM2.5のデータから収集し、健康影響への予防・感知対策として応用できるのではと考えている。

[キーワード]

多環芳香族炭化水素、酸化ストレス、HO-1、免疫抑制

1. はじめに

越境汚染物質は、主に中国大陸から飛来し、多くの影響を日本国内に及ぼしている。その粒子が中国の都市部や工業地帯を通過する際に、化石燃焼由来のガス状成分や有害成分を吸着して、日本に飛来する。更には生物由来物質も付着することがわかってきており、これらが複雑に組み合わさって影響を及ぼすことが予想される。化学物質の分析（多環芳香族炭化水素、ニトロ多環芳香族炭化水素等）と共にそれらの細胞レベル、個体レベルでの影響を特に細胞にダメージを与えられた際に変動する分子に着目し、影響評価を行う。

毒性評価を行う上ではどのようなシステムを用い、どのような評価方法を行うかは非常に重要な検討課題である。我々は種々の物質の生体への影響を、個体レベル¹⁾、細胞レベル^{2,3)}、分子レベル⁴⁾において解析してきた。これらの経験則から導きだされるのは、まずは個体レベルでの解析は不可欠であり、その発展形に*in vitro*などのシステム応用が行われるのが評価法としてはヒトへの外挿が成立しやすい、ということであった。それ故、本研究課題においてもマウスを用いた曝露システムによる生体影響評価を採用している。

黄砂やPM2.5には、鉱物、化学物質、あるいは細菌やカビといった微生物などが付着している。特に微生物由来の物質に関しては、免疫学的側面から考えると、生体で非常にすばやくそれらを排除する機構が備わっているため、粒子と共に生体に侵入してきた際にはそれらのシステム（免疫学の言葉でいう、自然免疫）が総動員されることが予想された。いわゆる炎症が惹起されるおもとのイベントであり、その結果としてサイトカインなどが産生される⁵⁾。この観点から、粒子自身と粒子に付着している物質を分けて、また同時に投与された際の生体影響を調べる研究計画により遂行された。種々の遺伝子欠損マウスの使用はまさに上記の自然免疫に関係する分子の有無による影響を見ているものである。

2. 研究開発目的

サブテーマ（2）では、黄砂或いはその大きさに精製した粒子およびPM2.5の化学的・物理的性状を究明し、それらに単独、あるいは同時に複合曝露されたマウスの生体影響評価を行うことを目的としている。特に曝露マウスのリンパ組織から調製した免疫担当細胞を中心に解析し、細胞レベル・分子レベルで細胞内イベントを観察・機序解明していくことを目的としている。

3. 研究開発方法

1) 黄砂エアロゾルの化学的・物理的性状の解明

黄砂イベント時における風送黄砂の捕集は、北九州市八幡西区折尾地区で、2014年(平成26年)3～5月、2015年(平成27年)3～5月、2016年(平成28年)3～5月の黄砂飛来時期に粉じんを捕集して、化学物質濃度測定及び粒子の形態特徴を検索した。

2) 生体影響評価

a. マウス脾臓細胞の活性化能の評価

本実験はサブテーマ(1)のマウスを共用して行った。実験動物には雄性BALB/cマウスを用い、また細胞表面受容体(TLR2、TLR4)及びそれらのアダプター分子MyD88のノックアウトマウスを使用した。粒子はサブテーマ(1)に使用したのと同じものを使用した。黄砂(PM10)・

PM2.5を気管内投与したマウスから最終投与24時間後に、麻酔下にてマウスを屠殺し、脾臓細胞を調製し、Cell viability assay systemにより細胞内ATPレベル量を測定することで増殖反応を評価した。また脾臓細胞をin vitroで培養し、細胞分裂誘起物質であるLPS、ConA刺激に対する反応性を調べた。その際、影響を及ぼしている成分の探索のため、LPSの中和物質であるポリミキシンBや抗酸化剤であるN-アセチルシステイン(NAC)の同時投与を行い同様な評価を行った。また、付着物質の影響を取り除くため、PM2.5を加熱処理したものも投与に用いた。評価は液性因子(IL-2、TNF- α)の産生をサンドイッチELISA法により行った。

b. 細胞内イベントへの影響評価

細胞内イベントへの影響評価として粒子を気管内投与したマウスの脾臓細胞溶解液を調製し、細胞内タンパク質の活性化あるいは量的変化をウエスタンブロット法により評価した。着目した分子は特に転写因子の一つであるNF- κ B（構成成分の一つであるp65に着目）、酸化ストレスの指標タンパク質であるHO-1に着目した。またHO-1の誘導に関与することが知られているMAPK(Erk)、Nrf2に関しても、その活性化をウエスタンブロット法およびゲルシフト法により評価した。更に、PM2.5の標的細胞を調べるために、脾臓細胞からCD4、CD8、CD11b、B220陽性細胞をマグネットビーズ法により分離し、細胞溶解液を調製し、同様の解析を行った。簡単に以下に方法を記す。マウスから採取した脾臓を細胞溶解緩衝液(RIPA)の中に入れ、細胞溶解液を調製した。脾臓細胞の場合、Tris-Ammonium液で赤血球を壊した後、調製した。その溶解液のタンパク量を、プロテインアッセイキット(Bio-Rad)で測定し、各サンプル10 μ gの細胞溶解液を準備した。それらをサンプル緩衝液とともに、3分間煮沸し、ready-madeゲル(ATTO)にアプライし、電気泳動(20mA、80分)終了後、ニトロセルロースメンブランにウェット式トランスファー(200mA、70分)を行い、ウエスタンブロット用のメンブランを得た。そのメンブランを1%BSA含有PBS-Tween緩衝液でブロックしたのち、それぞれに特異的な1次抗体を用いて2時間反応させた。PBS-Tween緩衝液で洗浄後、HRP標識2次抗体で1時間反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼに対する基質を加え、化学発光をCCDカメラで撮影した。得られたウエスタンブロットの結果をImageJにてタンパク量を解析・数値化した。またハウスキーピング分子の β -actinによりそれぞれのバンドのdensityを標準化し、グラフ化した。Nrf2の活性化は転写因子である性質を利用し、活性化後の核移行を調べた。Nrf2の発現量を細胞質由来のたんぱく質溶解液と核抽出タンパク質溶解液をそれぞれ調製後、発現量の変化を観察することで評価した。その際、転写因子のもう一つの性質であるDNA結合能を利用し、AhR結合オリゴを用いたゲルシフトアッセイを行い、評価した。

c. モデル粒子と好中球を用いた細胞への影響評価

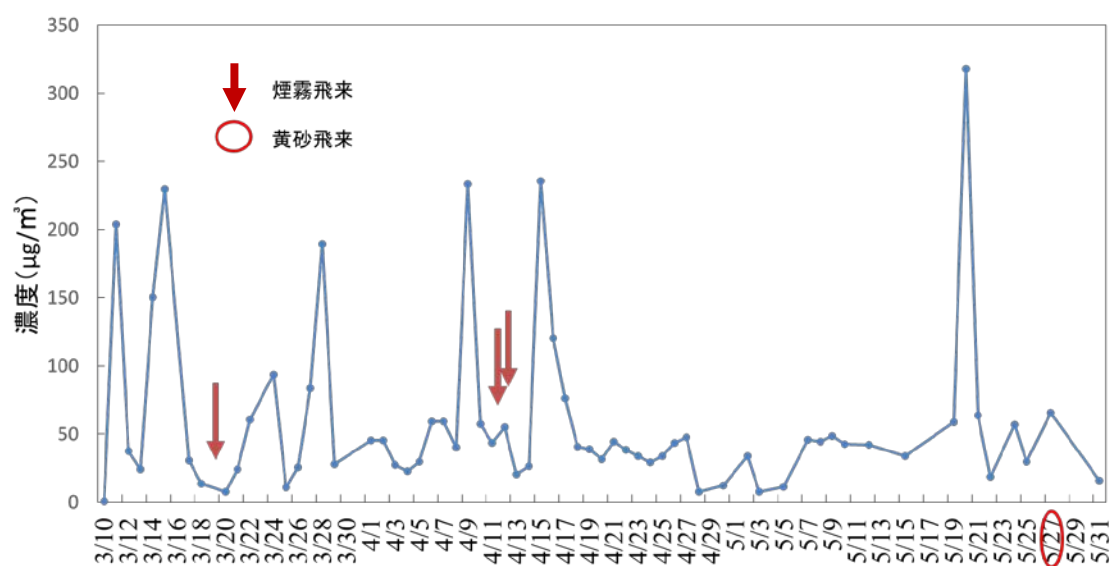
上記の方法論を踏まえて、研究遂行に当たり粒子が細胞に与える影響を一定評価するための、より簡易なシステムの確立も重要な検討項目になってきた。そこで炎症誘導性好中球を用いた球状粒子を用いた細胞影響評価法のセットアップを行った。まず、粒子が体内に侵入してきた際の、その処理班としての細胞として好中球に着目した。好中球の調整は6週齢雌のBALB/cマウスを用い、次のように行った。腹腔内に4%チオグリコレート2mlを注射し、4時間後にHANKsで腹腔内を洗浄して腹腔内洗浄液を採取した。遠心して得られた細胞に培養液RPMIを加えて細胞懸

濁液を作成した。得られた細胞の性質はフローサイトメトリーによる好中球表面マーカーを解析し、特にCD11bとGr-1の発現量を解析した。細胞を 2×10^5 個エッペンチューブにとり、 α -CD4/violet, CD11b/cy5.5, Gr1/FITC, F4/80/PEの4種の蛍光抗体で細胞を染色し、フローサイトメトリーで蛍光を分析し、大多数が好中球であることを確認した。得られた好中球の機能は粒子貪食能を解析することで評価した。好中球を 5×10^5 個ずつ24ウェルプレートにまき、異なる粒径(0.1 μm 、0.3 μm 、1 μm 、3 μm 、10 μm)のFITC蛍光シリカ粒子で刺激した。3時間後に貪食の様子を蛍光顕微鏡(BZ-X700、キーエンス社)で観察し、粒径、マウスによる貪食能の相違を観察した。

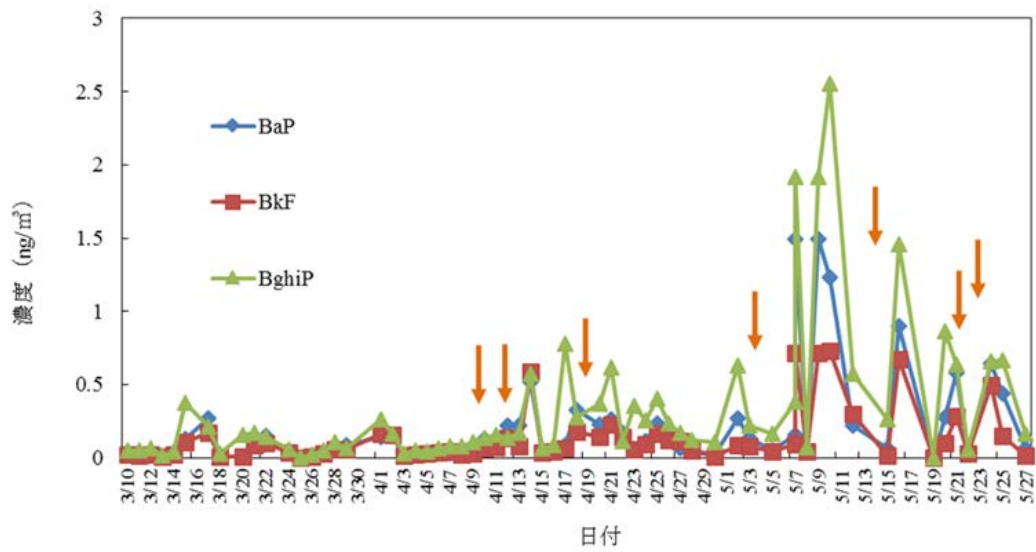
4. 結果及び考察

1) 黄砂エアロゾルの化学的・物理的性状の解明

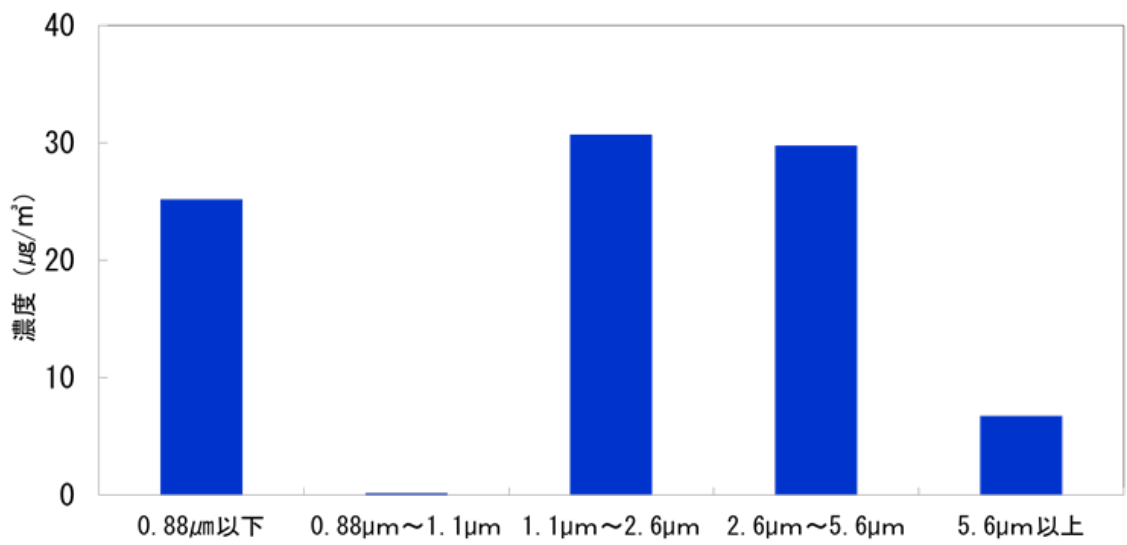
2014年3～5月の大気中の粉じん濃度を図(2)-1-1 に示す。粉じん濃度は $0.5 \sim 317 \mu\text{g}/\text{m}^3$ と変動が大きく、例年に比べて黄砂飛来の頻度は少なかった。5月27日の黄砂飛来時は $87 \mu\text{g}/\text{m}^3$ の濃度を認めた。粉じんに含有される14種の多環芳香族炭化水素類(PAHs)は日内変動があり、大陸からの気塊の移流により高値になる傾向が認められた(図(2)-1)-2)。黄砂粒子は不定形で、1.1～5.6 μm 範囲の大きさであった(図(2)-1)-3)。また、この時期の大気汚染の発生源について検討した結果、石炭燃料、バイオマス燃料由来であり、大陸からの汚染の影響が示唆された(図(2)-1)-4)。



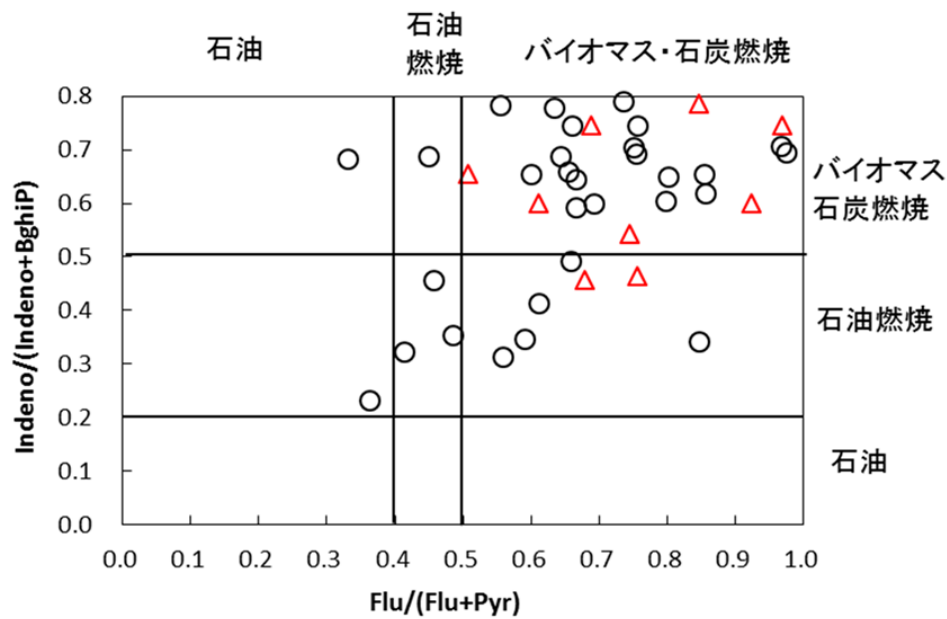
図(2)-1-1. 北九州 2014 年 3～5 月の連日の全粉じん濃度推移



図(2)-1)-2. PAHs の経日変化(2014 年北九州)

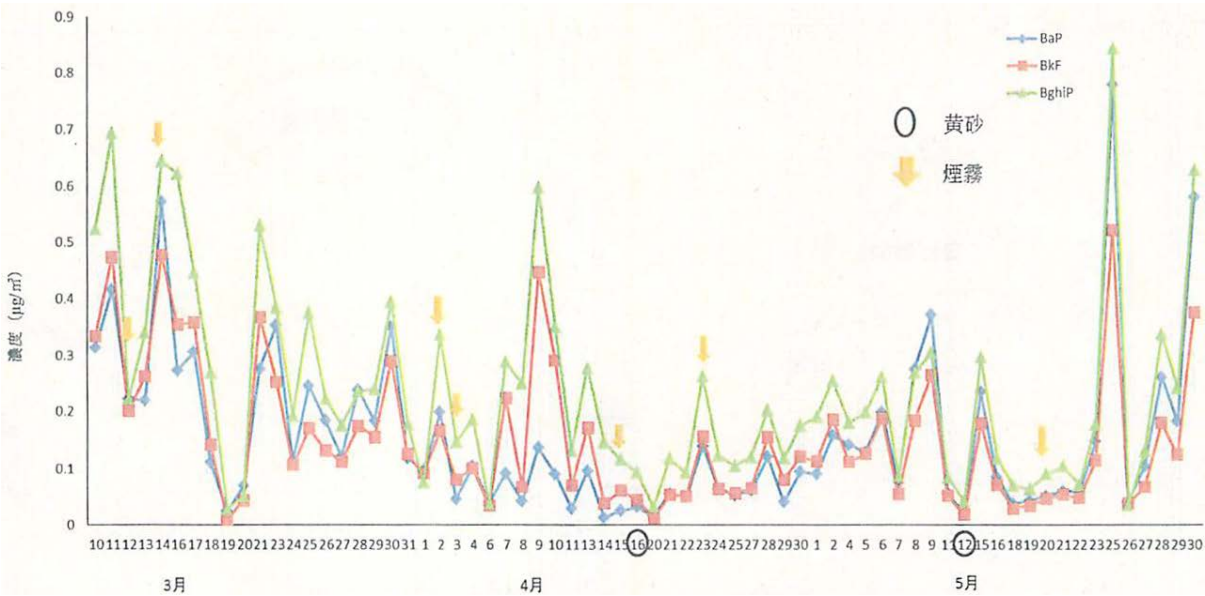


図(2)-1)-3. 黄砂飛来時(2014.5/27)の粉じん濃度粒径分布



図(2)-1)-4. 2014 年 3～5 月 発生源 寄与の 推定(Ross ら)

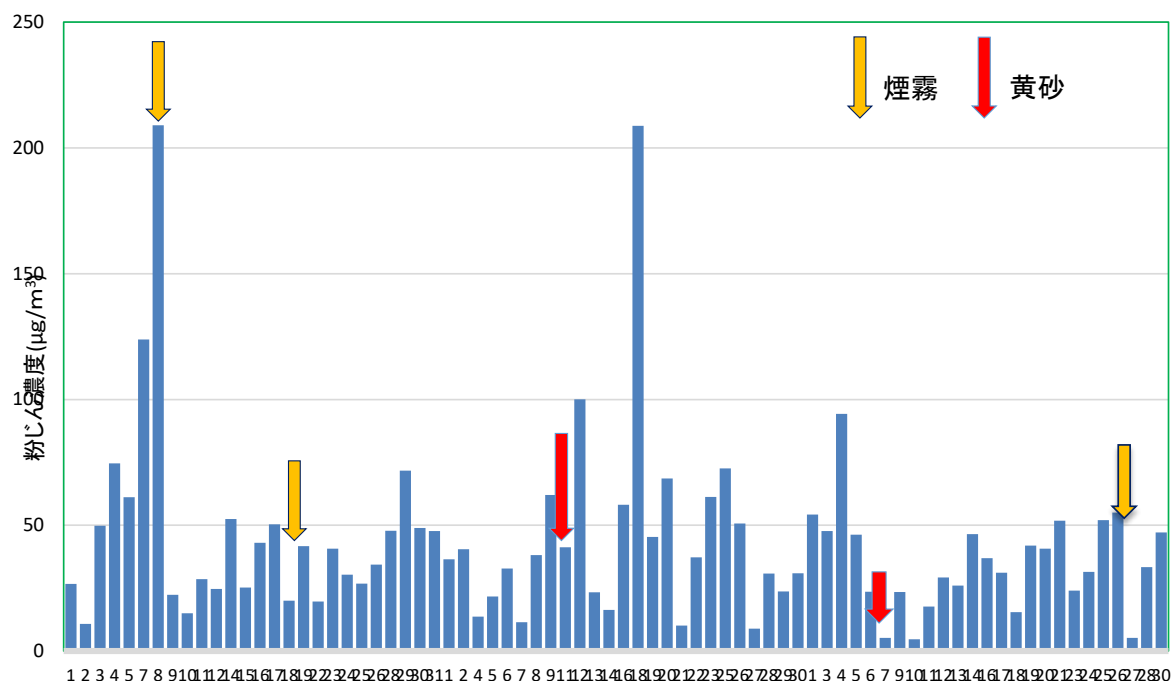
2015年3～5月の大気中の全粉じん濃度は7.0～261 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ と変動幅は大きかった。例年に比べ黄砂飛来の頻度は少なく、4月16日、5月12日の2日間で、全粉じん濃度はそれぞれ169 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、33.8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。粉じん中に含まれる14種のPAHsは日内変動があり、大陸からの気塊の移流により高値になる傾向が認められた(図(2)-1)-5)。黄砂粒子は明らかに不定形で、0.57～7.0 μm の範囲に多く認められた。2015年に飛来した黄砂の元素分析を行った結果、両日ともゴビ砂漠を起源とし、大陸と日本海を経由した結果、石油由来のF、S、海塩由来のClの含有を認めた。また、この時期の大気汚染の発生源について検討した結果、石油系の燃焼由来であり、大陸からの影響が示唆された。従来はバイオマス・石炭燃焼由来の汚染であったが、2015年は石油燃焼由来の汚染に変わってきていることが認められた。



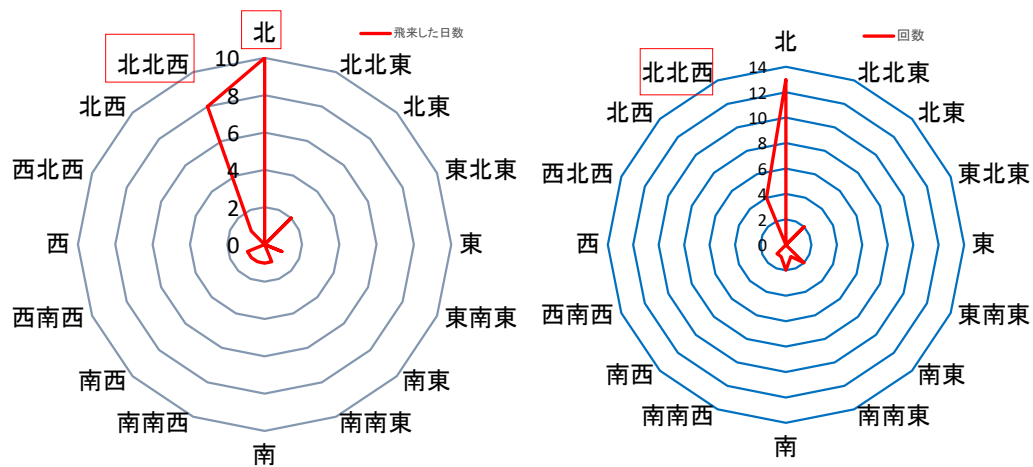
図(2)-1)-5. PAH s の 経日 変化(2015 年 北九州)

2016年3～5月の連日、大気浮遊粉じんを捕集し、PAHs及び水溶性イオン濃度を計測した。2016年春季の粉じん濃度は4～209 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ と濃度範囲が広く明らかに日間変動があり、約85%は50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下と低値であった(図(2)-1)-6)。2016年春季は、黄砂は2回、煙霧は3回と例年なく飛来が少なかったが、3月8日の煙霧飛来時は200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ を越す高値であった。全粉じん、PAHs、及びイオン成分濃度は例年と同程度の濃度レベルで、明らかに日間変動が認められた。汚染物質濃度はその時の風向に依存している事が考えられるため、汚染物質濃度の平均濃度を上回る日の風向との関係を調べた。関係を調べた結果、粉じん、PAHs及び水溶性イオン成分濃度とも北～北北西からの偏西風の日に高濃度であり、大陸からの汚染物質の関与が考えられた(図(2)-1)-7)。代表的な発がん性物質のBenzo(a)pyreneを含むPAHs濃度は、粉じん濃度の挙動とほぼ同様の傾向で濃度差があり、日間変動がある事が認められたが、黄砂・煙の飛来時にPAHs濃度への影響はあまり認められなかった。水溶性イオン成分は、3種の陰イオン (Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-}) と5種の陽イオン (Na^+ 、 NH_4^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) を検出・定量した。水溶性イオン成分で、陰イオンは硫酸イオン、硝酸イオン、陽イオンはアンモニウムイオンが比較高値であった(図(2)-1)-8)。陰イオンと陽イオン濃度の相関性を求めて、粉じん粒子に形成されている塩化合物の推定を行い、相関が認められた例を示す(図(2)-1)-9)。従って、 NaCl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 、 CaSO_4 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 K_2SO_4 の化合物が形成されていると推定された。また、2013年以降、春季の大気汚染の発生源は、石炭・バイオマス燃焼由来から石油系燃焼由来へと推移してきている(図(2)-1)-10)。

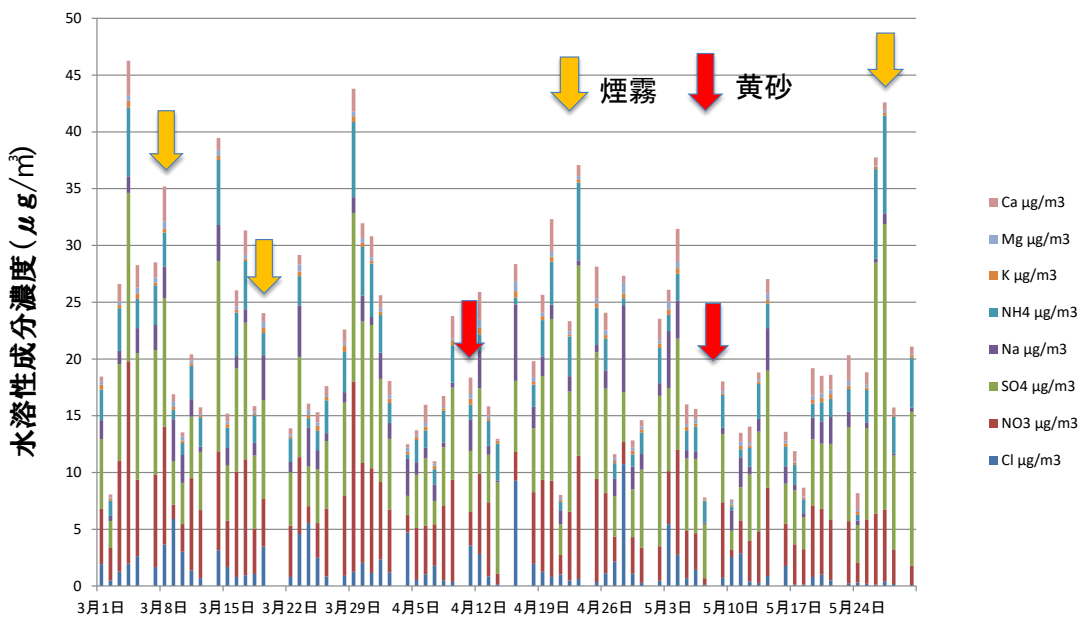
我が国の大気汚染は大陸からの影響を強く受けるため、長期間に渡り継続的に大気質、大気汚染物質濃度等の調査は極めて重要であると考えられる。この研究において、北九州地域の大気汚染の原因が、この三年間で、石炭系から石油系燃焼由来への変化が認められ、環境汚染の継続的な調査の必要性が強く示唆された。



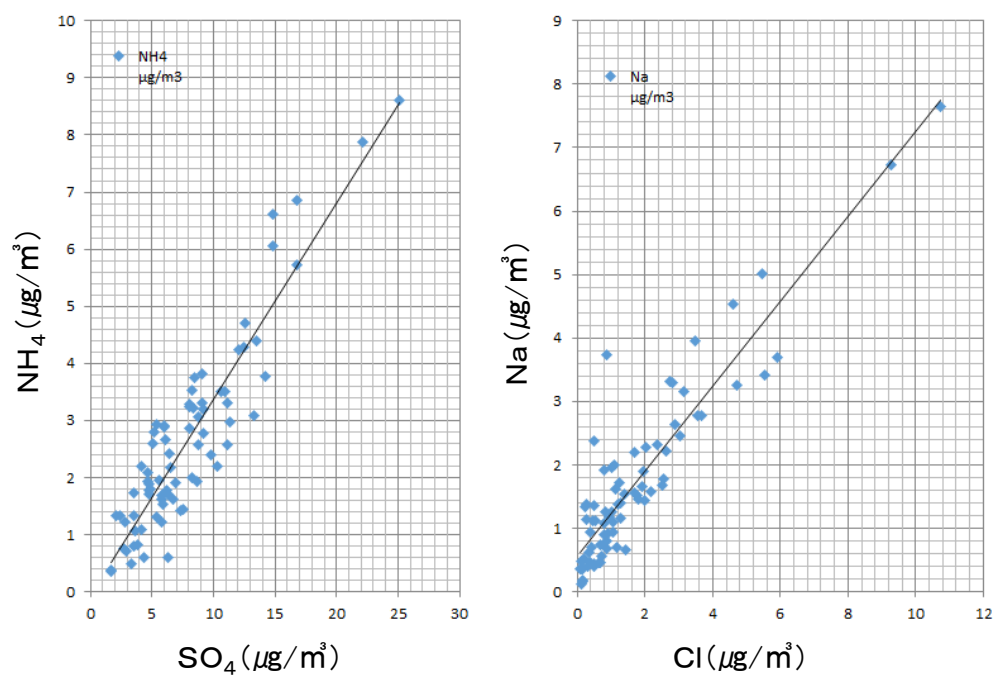
図(2)-1)-6. 2016年3月～5月全粉じん濃度推移



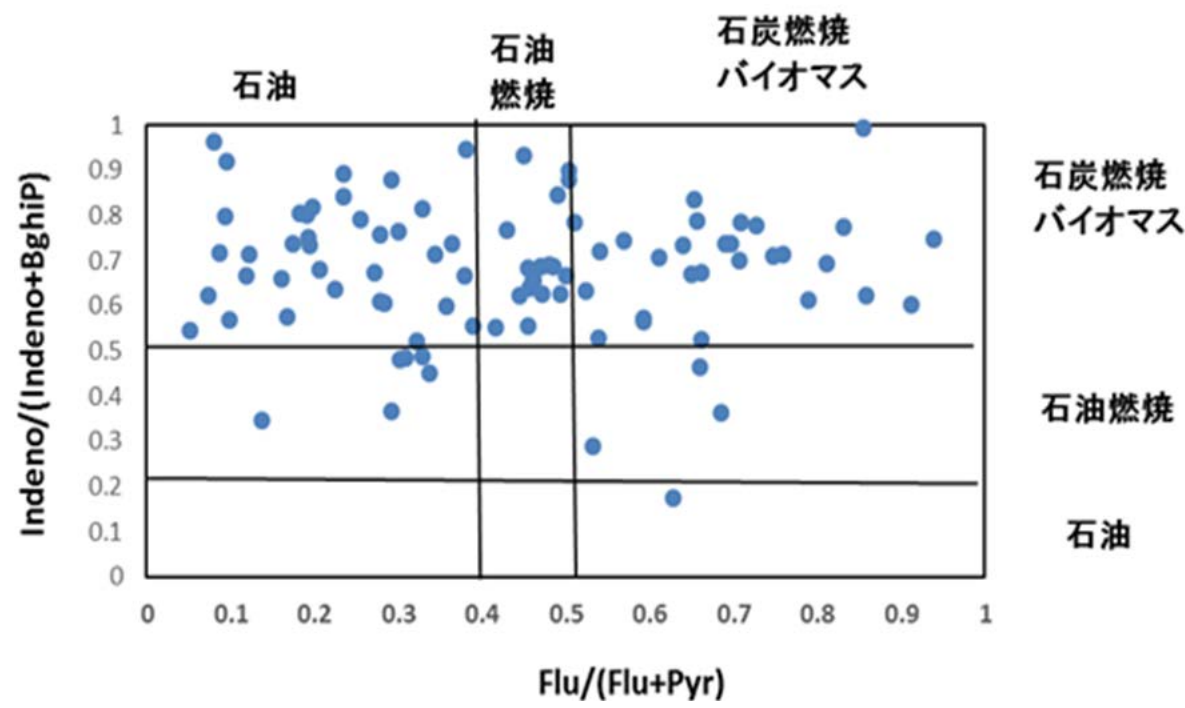
図(2)-1)-7. 2016 年度春季北九州の平均濃度を上回る粉じんが飛来した日数と風向(左)と
2016 年 3 月～5 月 BaP、BkF、BghiP 濃度の平均を上回った日数と風向



図(2)-1)-8. 2016 年 3 月～5 月水溶性イオン濃度推移(北九州市八幡西区折尾)



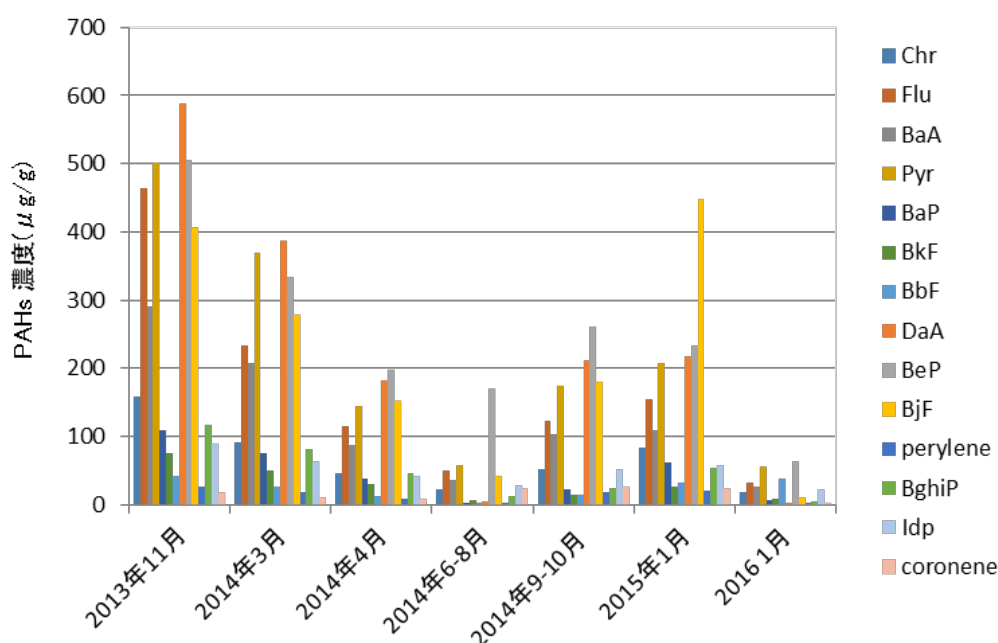
図(2)-1)-9. 2016 年 3 月～5 月の $\text{SO}_4(\mu\text{g}/\text{m}^3)$ と $\text{NH}_4(\mu\text{g}/\text{m}^3)$ の相関(左)
および $\text{Cl}(\mu\text{g}/\text{m}^3)$ と $\text{Na}(\mu\text{g}/\text{m}^3)$ の相関(北九州市八幡西区折尾)



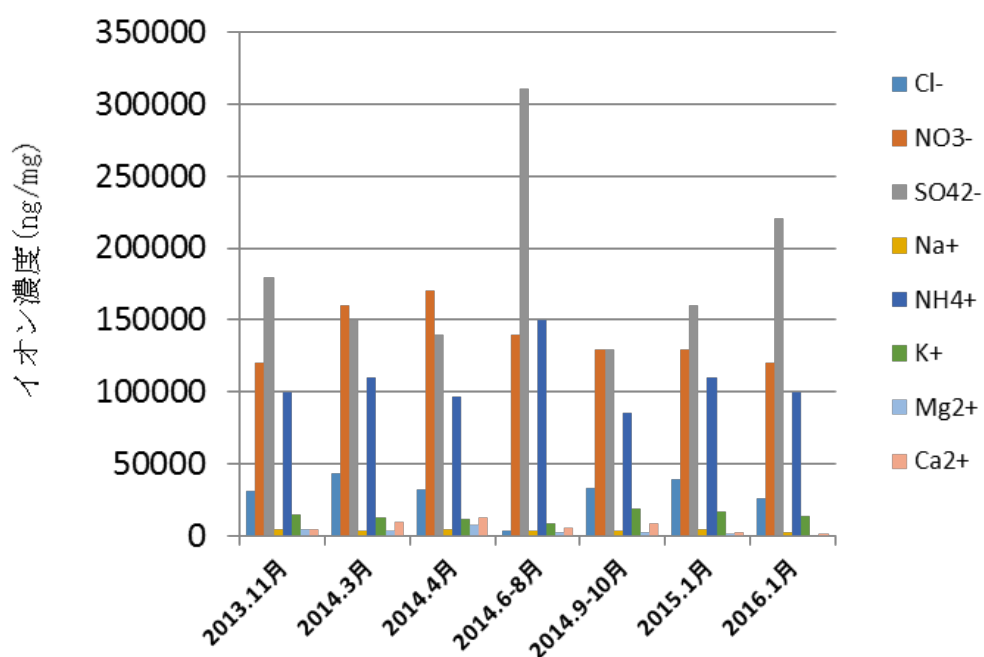
図(2)-1)-10. 2016 年 3～5 月、多環芳香族炭化水素濃度比を用いた発生源推定

2013～2016年にかけて、中国・瀋陽の大気中のPM2.5粒子を捕集し、14種のPAHs（Chrysene(Chr)、Fluoranthene(Flu)、Benz(a)anthracene(BaA)、Pyrene(Py)、Benzo(a)pyrene(BaP)、Benzo(k)fluoranthene(BkF)、Dibenz(a,h)anthracene(BaA)、Benzo(e)pyrene(BeP)、Benzo(j)fluoranthene(BjF)、Perylene、Benzo(ghi)perylene(BghiP)、Indeno(1,2,3-ch)pyrene(Ind)、Coronene)を測定した。このPAHsの中で、IARC（国際がん研究機関）の発がん性リスク評価で発がん性のリスクがあるのはBaP、BkF、Chr、BbF、BjF、BaA、DaA、Indの8種である。14種PAHs濃度は年次推移と共に明らかに濃度は減少し、2016年1月のPAHs濃度は2013年11月のそれに比べて1/10以下と急激に低下してきている。またPAHsはそれぞれ濃度差があり高濃度群は、DaA、BeP、Py、Flu、BjF、BaA、中濃度群は、BghiP、BaP、BkF、Ind、低濃度群は、BbF、Perylene、Coroneneであり、この濃度傾向は北九州地域とほぼ同様である。なお、2013年11月のPAHs濃度は、日本の大気汚染測定網で測定された1975年の大気中のBaP濃度は、東京で10.2 $\mu\text{g/g dust}$ 、北九州で35.5 $\mu\text{g/g dust}$ 、これと比べ3倍以上の高値である。しかし、2016年1月の時点でのPAHs濃度は1975年の日本のその濃度と同程度以下で、中国・瀋陽の大気環境の改善が明らかに認められて来ている(図(2)-1)-11)。

PAHs測定と同じ試料を用いて水溶性イオン成分を測定した。水溶性イオン成分は、3種の陰イオン (Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-}) と5種の陽イオン (Na^+ 、 NH_4^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) を検出・定量した。2013～2016年の期間、水溶性イオン成分濃度は、PAHs濃度の減少に比較して、イオン成分濃度変動はほとんど認められなかった。陰イオンは硫酸イオン、硝酸イオン、陽イオンはアンモニアイオン濃度が明らかに高値であった。なお、陰イオンと陽イオンの相関性などを検索した結果、 NaCl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 K_2SO_4 の化合物が形成されていると推定された(図(2)-1)-12)。

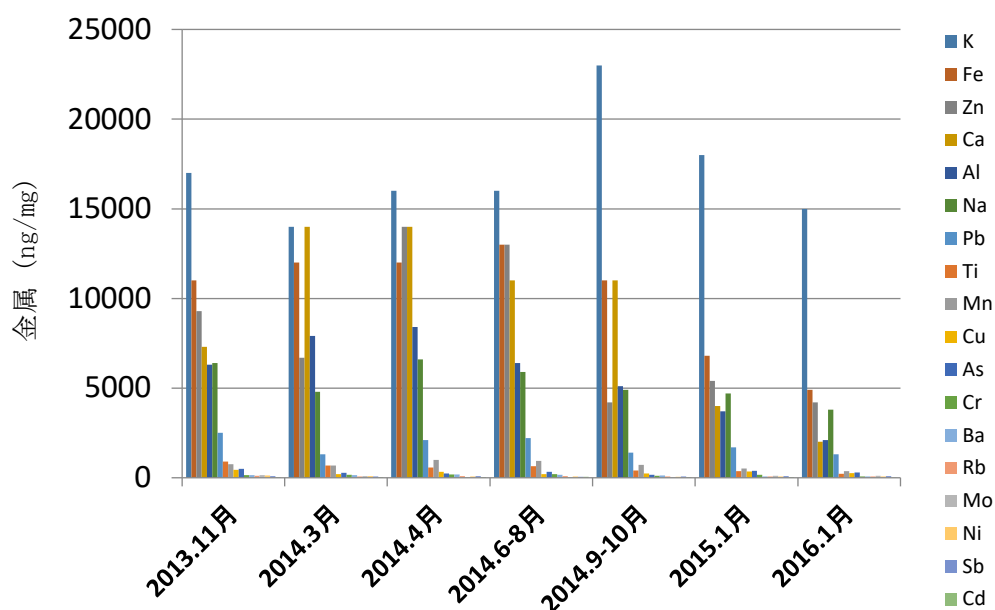


図(2)-1)-11. 瀋陽のPM2.5に含まれるPAHsの2013～2016年迄の変化



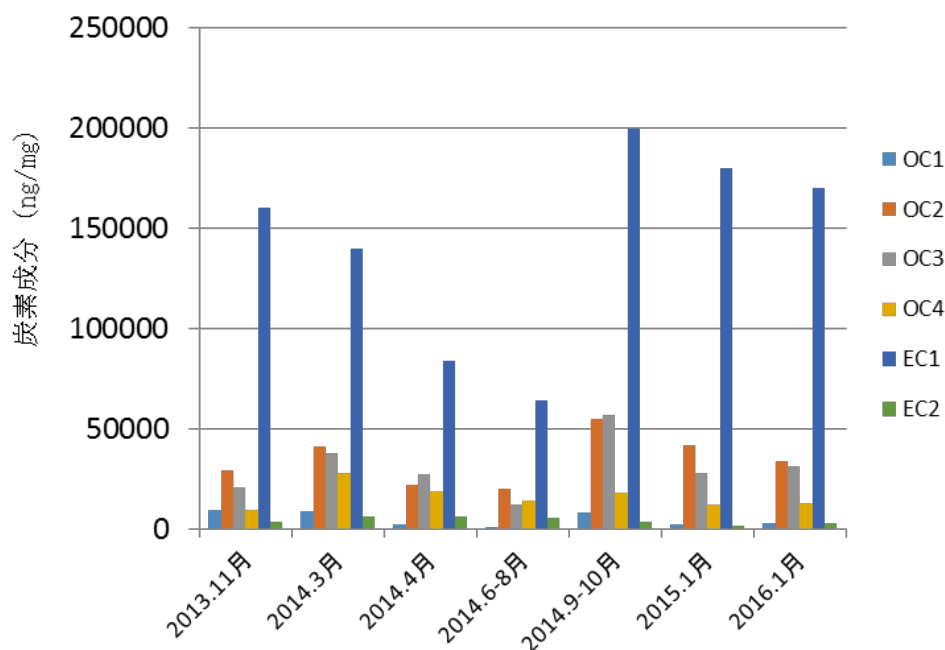
図(2)-1)-12. 瀋陽の PM2.5 に含まれるイオン類の 2013～2016 年迄の変化

PAHs測定と同じ試料を用いて金属類の測定をした。測定を行った金属成分は、Kを含む18種である。2013～2016年の期間、金属類の中で最も高濃度で、年次推移が同程度であるのはKであった。2014年まで、K、Fe、Zn、Ca、Al、Naの金属濃度は $50\mu\text{g/g}$ 以上の含有で、Kを除くこれらの金属濃度は徐々に減少し $5\mu\text{g/g}$ 以下に低減してきている。それ以外の金属類は極めて低値である。なお、高濃度である金属類で、KとZnは人為起源、Fe、Ca、Na及びAl自然起源の元素と主に認められている(図(2)-1)-13)。



図(2)-1)-13. 瀋陽の PM2.5 に含まれる金属類の 2013～2016 年迄の変化

最後にPAHs測定と同じ試料を用いて、炭素成分（有機炭素：OC、元素炭素：EC）を測定した。2013～2016年の期間、炭素濃度は、年による濃度変動があるが濃度減少傾向は認められなかった。有機炭素成分（OC1～4）濃度は100 $\mu\text{g/g}$ 以下で、特にOC1は低値であった。元素炭素濃度で、EC1はEC2に比べ極めて高く、50 $\mu\text{g/g}$ を越し、特に2014年10月の試料は200 $\mu\text{g/g}$ と極めて高い濃度であった。元素炭素は化石燃料中の炭化水素の不完全燃焼由来により発生する。工場、ボイラー、自動車等や家庭暖房で用いられる石炭を中心とした化石燃料の大量の使用と、燃焼効率の悪さなどに起因していると考えられる(図(2)-1)-14)。



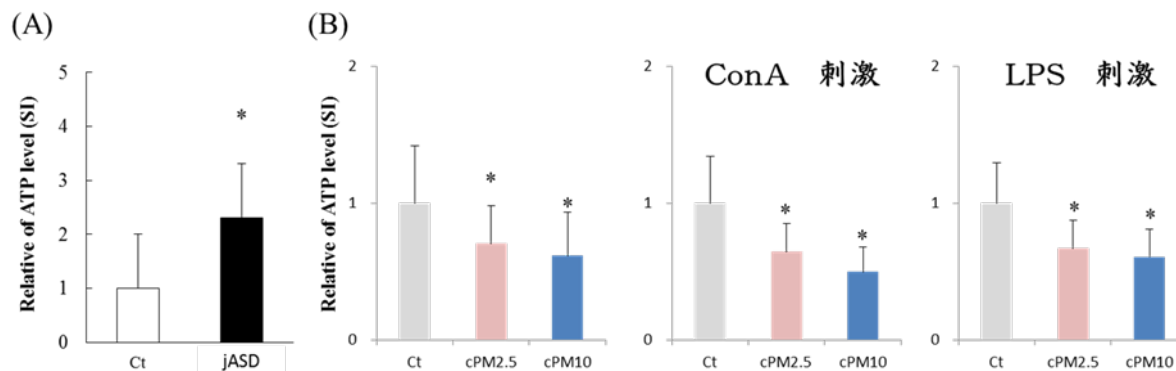
図(2)-1)-14. 瀋陽のPM2.5に含まれる炭素成分の2013～2016年迄の変化

2) 生体影響評価

a. マウス脾臓細胞の活性化能の評価

黄砂はPM10に分類される粒子である。先行研究から得られた知見では、黄砂は脾臓細胞を活性化する傾向がある。今回、北九州市の黄砂（jASD）と中国瀋陽市（cPM10）をマウスに4回投与後、脾臓細胞を調製し細胞活性化能を解析した。脾臓細胞をマイトジェン（LPS1 $\mu\text{g/ml}$ 、ConA5 $\mu\text{g/ml}$ ）で刺激し、その増殖能を測定した結果を、相対活性で表したものが、図(2)-2-15である。先行研究と同様、北九州市で収集したjASDの投与により、脾臓細胞では無刺激の状態でもATPレベルが高値であり細胞の活性化を示唆した(図(2)-2)-15A)。一方、瀋陽で収集したcPM10を投与した群は対照群に比べ、ATPレベルの亢進は認められず、逆に低値であった(図(2)-2)-15B青)。更に、cPM10を投与したマウス由来脾臓細胞のConAおよびLPSに対する反応は対照群に比べ、有意に低いものであった。これらの結果から収集地の違う粒子による細胞影響の違いが示唆された。また、瀋陽で同時期に収集されたcPM2.5のマウス投与により、細胞の抑制効果が認められた(図(2)-2)-15Bピンク)。使用した粒子の特徴の大きな違いに付着成分の相違が考えられ、その一つに微生物由来成分が考えられた。そこで次に投与の際、菌体成分LPSを中和するポリミ

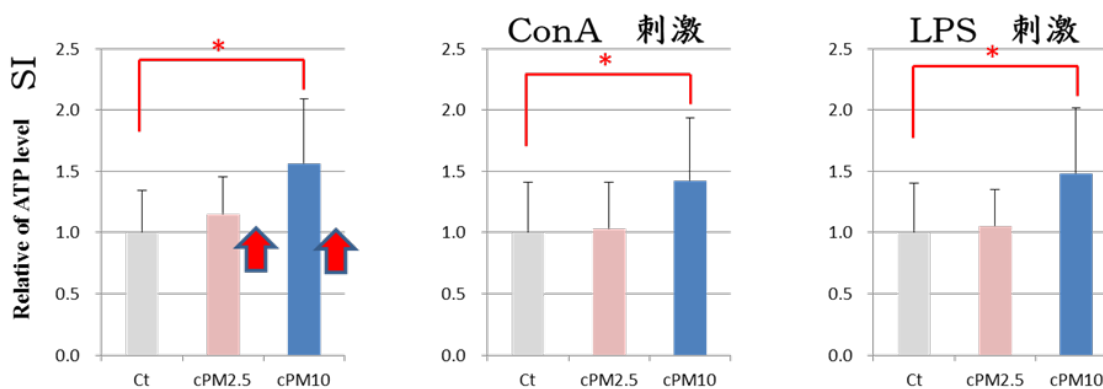
キシシンBを同時投与し、同様の実験を行った。図(2)-2)-16 に示すように、ポリミキシシンBの投与により、瀋陽由来粒子の細胞抑制効果を回復する傾向が認められた。



図(2)-2)-15. 粒子投与マウス由来脾臓細胞の活性化能

北九州市で収集した黄砂を投与したマウス(A)および瀋陽で収集した PM10、PM2.5 を投与したマウス(B)の脾臓細胞を調製し、細胞内 ATP レベルを測定した。マウス 16 匹の平均を示し、*はそれぞれの対照群(Ct)と比べ、有意差($P < 0.05$)があることを示す。

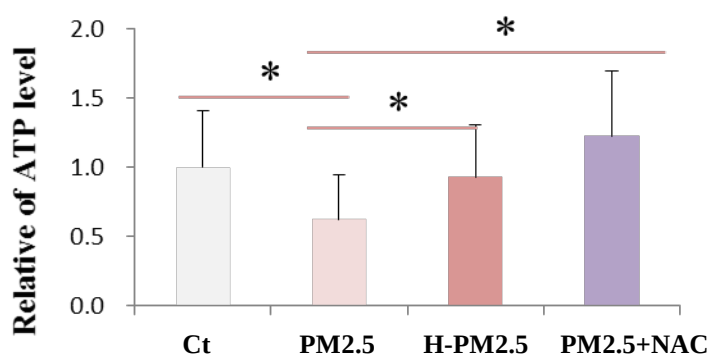
PMB投与マウスからの脾臓細胞



図(2)-2)-16. 脾臓細胞への粒子の影響に対する LPS の関与

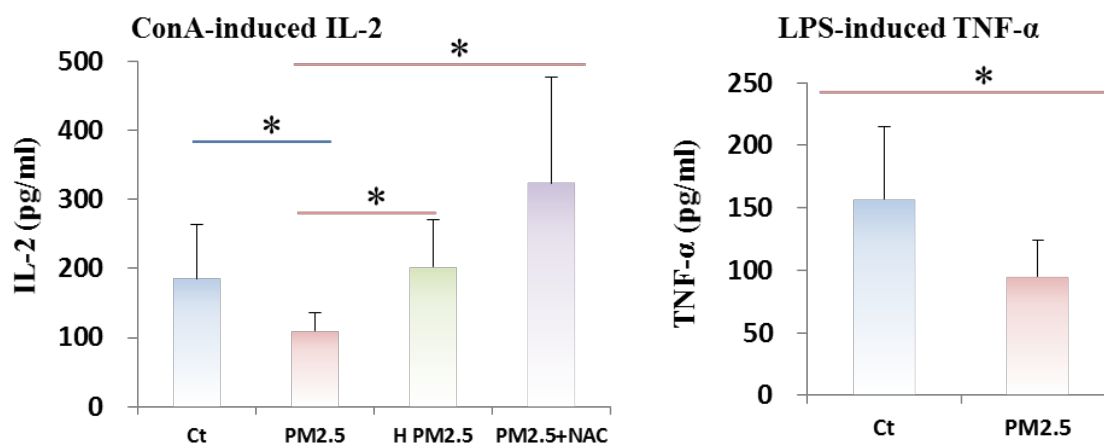
図(2)-2)-15 と同様の実験系で、ポリミキシシン B を投与したマウスから脾臓細胞を調製し、解析した。マウス 16 匹の平均を示し、*はそれぞれの対照群 (Ct) と比べ、有意差 ($P < 0.05$) があることを示す。

続いて、PM2.5の生体影響を更に詳しく解析した。上記とは違う時期に中国瀋陽市で収集されたPM2.5を用い、マウスに4回気管内投与後、脾臓細胞を調製し解析した。PM2.5は対照群に比べ抑制効果を呈し、収集時期の違いによる影響は認められなかった(図(2)-2)-17)。加えて、PM2.5を投与したマウス由来脾臓細胞のConAおよびLPSに対する反応をサイトカイン産生で評価したところ、対照群に比べ有意に低いものであった(図(2)-2)-18赤)。この際、抗酸化剤であるNACを同時投与することにより、その抑制効果は細胞増殖活性、サイトカイン産生共に解除され(図(2)-2)-18紫)、粒子の付着物質を取り除いた加熱粒子(H-PM2.5)でも同様に抑制効果の解除が認められた(図(2)-2)-18緑)。これらから、PM2.5に付着している物質、および活性酸素(ROS)が細胞増殖活性やサイトカイン産生の抑制効果に関与していることが示唆された。



図(2)-2)-17. 粒子投与マウス由来脾臓細胞の活性化能

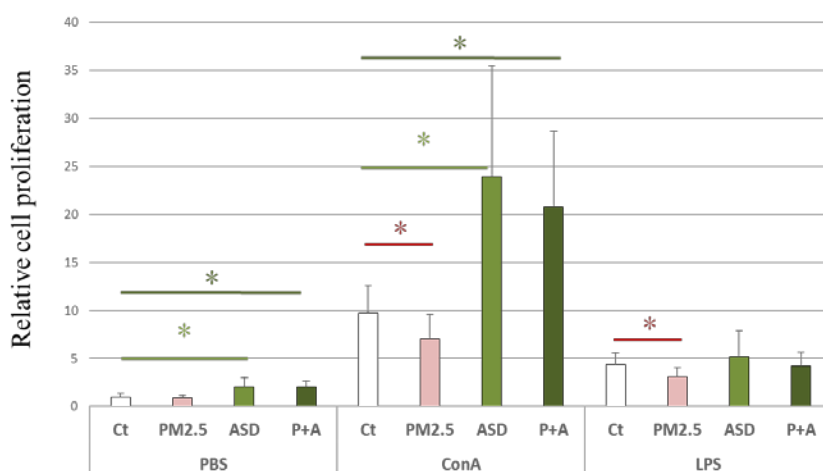
瀋陽市で収集した粒子を投与したマウスの脾臓細胞を調製し、細胞活性化能(細胞内 ATP レベル)を測定した。*は、有意差 ($P < 0.05$) があることを示す。



図(2)-2)-18. 粒子投与マウス由来脾臓細胞の活性化能

瀋陽市で収集した粒子を投与したマウスの脾臓細胞を調製し、培養上清中のサイトカイン産生を測定した。*は、有意差 ($P < 0.05$) があることを示す。

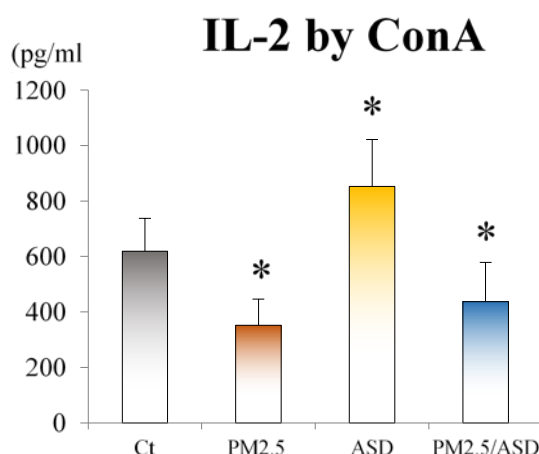
最後に、黄砂（ASD）とPM2.5のどちらが生体に影響力を持つのか、を調べるために複合曝露のシステムを用い、評価した。中国瀋陽市で2017年に新たに採取されたPM2.5と国立環境研究所の標準ASDを用い、マウスに4回気管内投与後、脾臓細胞を調製し解析した。前述の結果と一致して、ASDの投与により脾臓細胞では無刺激の状態でもATPレベルが高値であることが観察され、今回も黄砂による細胞の活性化が認められた。PM2.5は対照群に比べ抑制効果を呈した(図(2)-2)-19)。興味深いことに、PM2.5と黄砂の同時投与では、マウス由来脾臓細胞の活性化が維持され、PM2.5の効果よりも黄砂の効果が強いことが示唆された。また細胞増殖と関連の深いサイトカイン、IL-2の産生能をELISA法で調べた。PM2.5の投与で抑制され、ASD投与で亢進する傾向は既報の通り観察された¹⁾。PM2.5とASDの同時投与ではその中間値というよりはPM2.5の投与群に近い産生量を示したものの、黄砂投与群との間に有意差は認められなかった(図(2)-2)-20)。



図(2)-2)-19. それぞれの粒子投与マウス由来脾臓細胞の活性化能

瀋陽市で採取した粒子を投与したマウスの脾臓細胞を調整し、細胞内 ATP レベルを測定した。

*は、Ct に比べて、有意差(P<0.05)があることを示す。



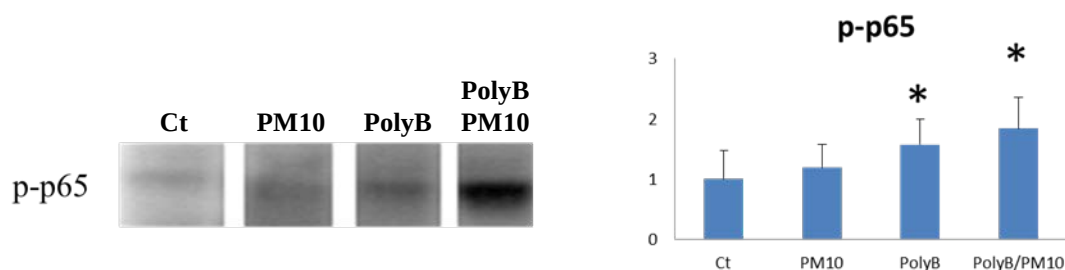
図(2)-2)-20. それぞれの粒子投与マウス由来脾臓細胞のサイトカイン産生能

採取した粒子を投与したマウスの脾臓細胞を調整し、24 時間 ConA で刺激後の培養上清中のサイトカイン量 (IL-2)を測定した。*は、Ct に比べて、有意差 (P<0.05) があることを示す。

b. 細胞内イベントへの影響評価

前項目において、細胞の増殖に何らかの影響が見られたので、その際の細胞内分子の量的、活性化の変化をウエスタンブロット法で解析した。瀋陽で収集した cPM10を投与されたマウスの脾臓細胞溶解液を調製した。それらをSDS-PAGEで電気泳動し、転写因子NF- κ Bの構成成分で細胞生存に重要であり、その活性化を司っているp65のリン酸化をウエスタンブロット法により評価した。cPM10粒子を投与したマウスの脾臓細胞と対照群とで有意な相違は認められなかった(図(2)-2)-21)。しかしながら、ポリミキシンBを同時投与されたマウスから調製した脾臓細胞では、活性化p65のレベルが亢進していた。図(2)-2)-21 右図は、実際のウエスタンブロットの写真のそれぞれのバンドの濃さをImageJソフトで解析し、 β -actinで標準化後の、平均と標準偏差をグラフ化(マウス8匹)したものである。

以上から、瀋陽で収集されたcPM10に含まれるLPSは、NF- κ Bの活性化を抑制していることが示唆され(ポリミキシンBの投与で回復されることから)、細胞全体としての活性化を抑制していることに関連していることが示唆された。

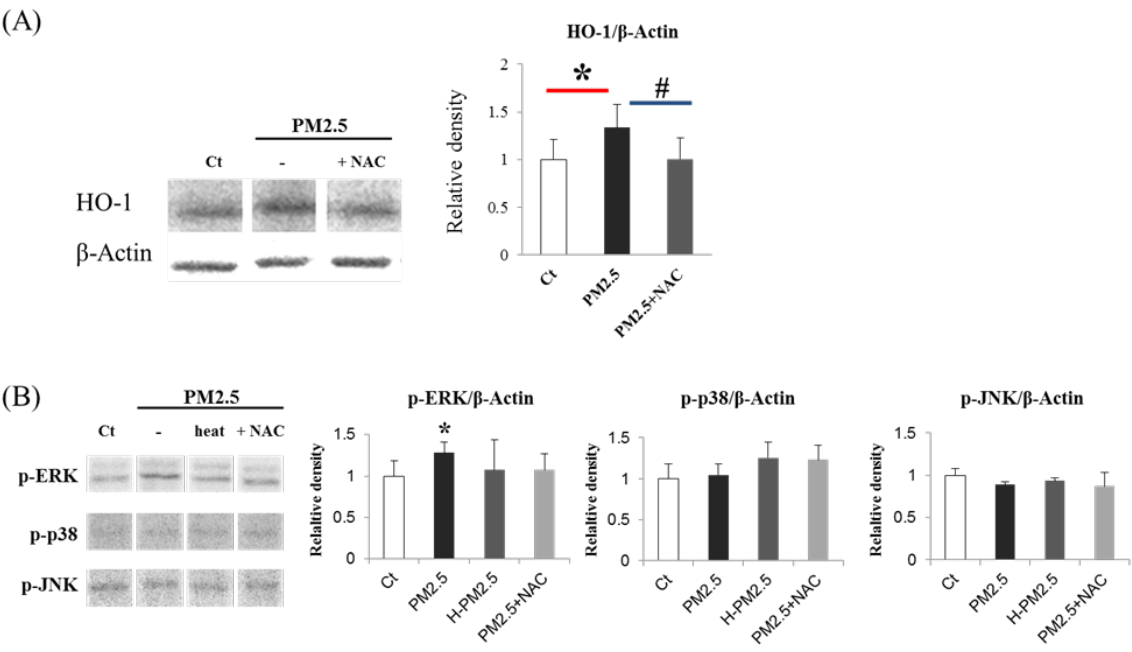


図(2)-2)-21 粒子の細胞内イベントに対する影響

図(2)-1)-5、図(2)-1)-6の際に細胞溶解液を調製し、細胞内活性化指標の一つであるNF- κ B複合体の構成成分p65のリン酸化をウエスタンブロットで解析した(左図)。右図はマウス8匹のバンドのdensityを β -actinで標準化後の相対値をグラフ化したものである。*は対照群(Ct)と比べ、有意差($P < 0.05$)があることを示す。

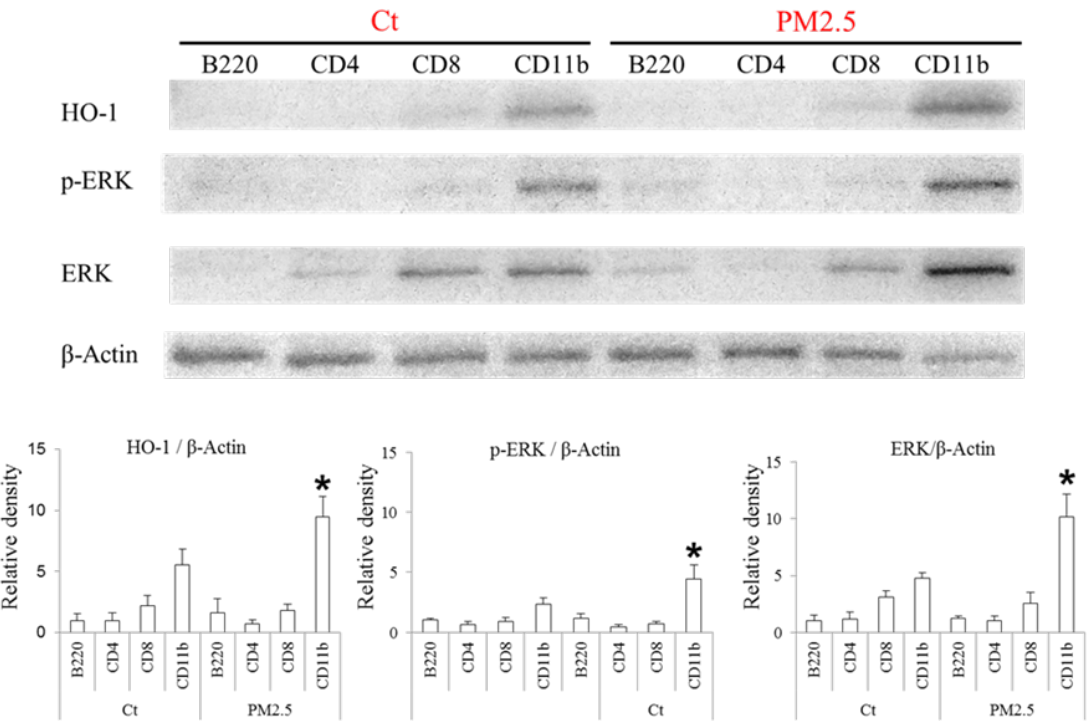
続いて、PM2.5による抑制効果の機序を調べるためにウエスタンブロット法で分子の変化を解析した。瀋陽で収集したPM2.5を投与したマウスの脾臓細胞溶解液を調製し、それらをSDS-PAGEで電気泳動後、酸化ストレスマーカー分子の代表であるHO-1に対するウエスタンブロットを行った。PM2.5粒子を投与したマウスの脾臓細胞では対照群に比べ有意な発現上昇が認められた(図(2)-2)-22A)。NACを同時投与したマウスから調製した脾臓細胞ではその上昇が抑えられていた(図(2)-2)-22A)。この際、MAPKの活性化を調べたところ、Erkのリン酸化が亢進しており、関与が示唆された。他のp38とJNKに変化は認められなかった(図(2)-2)-22B)。以上から、都市部瀋陽で収集されたPM2.5による細胞抑制効果には酸化物の関与が示唆され、MAPKがその誘導に関わっている可能性も示唆される結果となった。

次に、PM2.5が標的としている細胞を調べるため、PM2.5曝露マウスの脾臓細胞から幾つかの免疫担当細胞(CD4、CD8、CD11b、B220陽性細胞)を分離し、HO-1の発現を調べた。図(2)-2)-23が示すように、CD11b陽性細胞においてPM2.5によるHO-1の発現上昇が認められた。その際、Erkの活性化も認められた。



図(2)-22. 粒子投与マウス由来脾臓細胞の酸化ストレスマーカーの発現

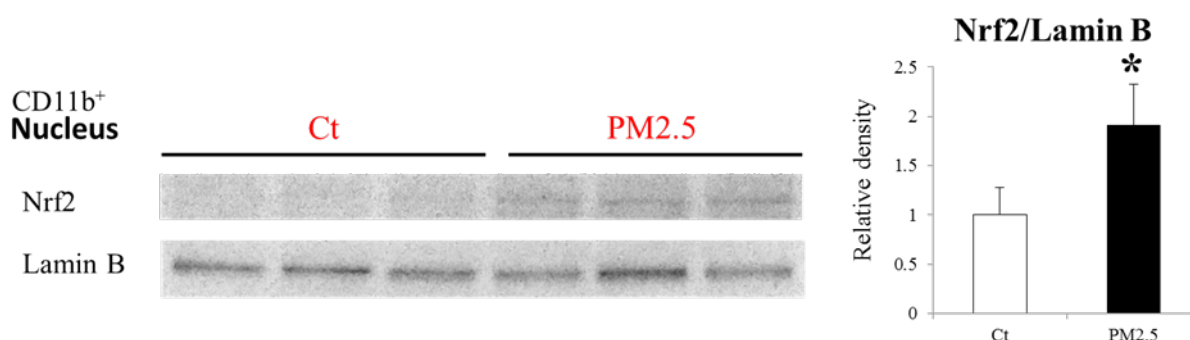
粒子を投与したマウスの脾臓細胞溶解液を調製し、HO-1(A)および MAPK 系(B)に対するウエスタンブロットを行った。*は、Ct に比べて、#は PM2.5 投与群に対して有意差(P<0.05)があることを示す。



図(2)-23. 粒子投与マウス由来貪食細胞における酸化ストレスマーカーの発現

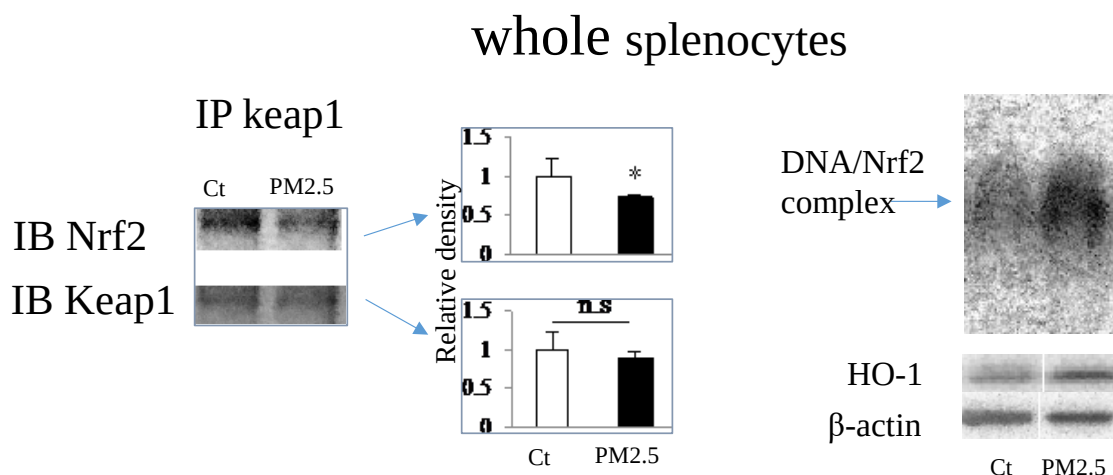
粒子投与マウス由来脾臓細胞から B 細胞、T 細胞、貪食細胞を分離し、酸化ストレスマーカーの発現をウエスタンブロットにより調べた。*は、Ct に比べて有意差(P<0.05)があることを示す。

HO-1の誘導には転写因子Nrf2が深く関与していることが知られている。しかしながらリン酸化などによる評価法は確立されていないため、細胞を細胞質と核に分離し、核内のNrf2量をウェスタンブロットにより調べた。核内に存在するNrf2が活性化Nrf2と考えられる。CD11b陽性細胞から核抽出物を調製し、Nrf2の発現を調べたところ、PM2.5の投与群で上昇が認められた(図(2)-2)-24)。更にNrf2の活性化を詳しく調べるために、通常(非活性化状態)ではKeap1というアダプター分子との会合を沈降ウェスタンブロット法で解析した。予想した通り、PM2.5で曝露したマウスの群では、Keap1との会合が減弱していた(図(2)-2)-25左)。また活性化状態ではDNA結合能をもつ性質を利用し、ゲルシフトアッセイを行った。図(2)-2)-25右に示す通り、PM2.5で曝露したマウスの群では、Nrf2とDNAの結合が観察された。これらから、PM2.5で曝露したマウスの群では、Nrf2の活性化が脾臓細胞で起きていることが示された。



図(2)-2)-24. 粒子投与マウス由来脾臓細胞における Nrf2 の活性化

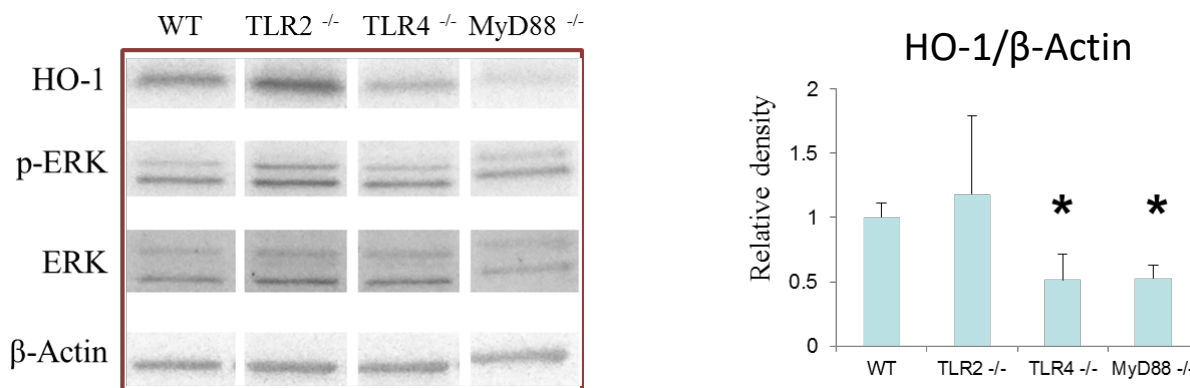
粒子投与マウス由来脾臓細胞から脾臓細胞を分離し、核抽出溶解液を調製し、HO-1 の誘導に重要な転写因子 Nrf2 の発現を調べた。*は、Ct に比べて有意差($P < 0.05$)があることを示す。



図(2)-2)-25. 粒子投与マウス由来脾臓細胞における Nrf2 の活性化

粒子投与マウス由来脾臓細胞の細胞溶解液を調製し、転写因子 Nrf2 と Keap1 の会合を調べた(左図)。また、Nrf2 が結合するオリゴを使用したゲルシフトアッセイを行った(右図) *は、Ct に比べて有意差($P < 0.05$)があることを示す。

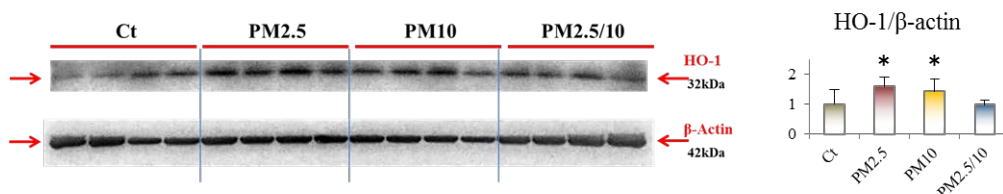
次に、これらの影響を引きこす際、どのような細胞表面受容体が関与するかを調べた。先行研究でPM10はTLR4-MyD88経路を使用して効果を発揮していることを報告している。そこでTLR2、TLR4、MyD88欠損マウスにPM2.5を投与し、CD11b陽性細胞を調製しHO-1とp-Erkに対するウェスタンブロットを行った。PM10の際と同様に、TLR4、MyD88欠損マウスではHO-1の発現上昇は認められなかった(図(2)-2)-26)。以上から、都市部瀋陽で収集されたPM2.5による酸化ストレス関連タンパクの誘導にはTLR4-MyD88経路が重要であることがわかった。



図(2)-2)-26. TLR およびそのアダプター分子 MyD88 欠損マウスにおける粒子による HO-1 の誘導能

TLR2、4、MyD88 欠損マウスに粒子を投与後、貪食細胞を分離し、酸化ストレスマーカーの発現をウェスタンブロットにより調べた。*は、Ct に比べて有意差(P< 0.05)があることを示す。

最後に複合曝露の影響を細胞内分子に着目し、解析した。曝露したマウスの脾臓細胞溶解液を調製し、SDS-PAGEで電気泳動後、HO-1に対するウェスタンブロットを行った。PM2.5粒子を投与したマウスの脾臓細胞では、前回の報告同様に対照群に比べ有意な発現上昇が認められた。更にPM10の投与でもHO-1の発現増強が認められ、複合曝露では減弱していた(図(2)-2)-27)。以上から、粒子により曝露されたマウスでは細胞障害を保護する目的のタンパク質が誘導されることが示唆された。



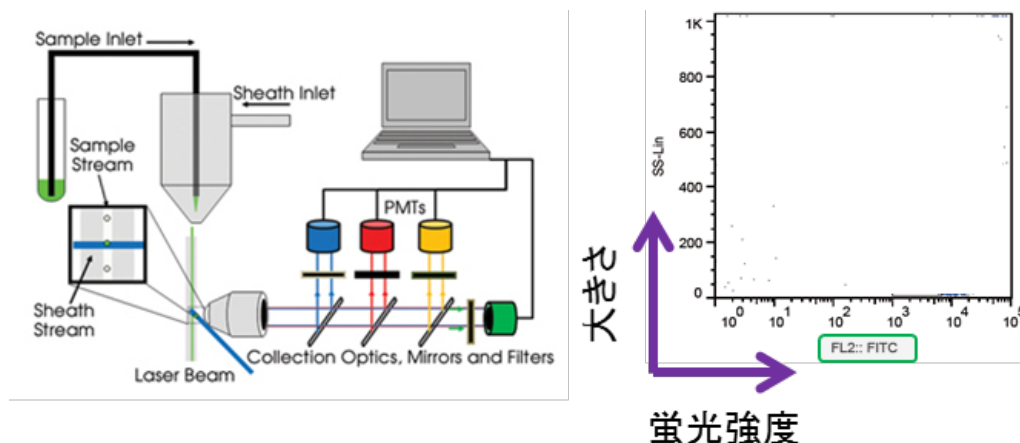
図(2)-2)-27. それぞれの粒子投与マウス由来脾臓細胞の HO-1 の発現

粒子を投与したマウス(それぞれ 4 匹)の脾臓細胞溶解液を調製し、HO-1 に対するウェスタンブロットを行った。右のグラフはバンドを数値化し、β-actin で補正後のそれぞれのグループの平均と標準偏差を表している。

*は、Ct に比べて、有意差(P< 0.05)があることを示す。

c. モデル粒子と好中球を用いた細胞への影響評価

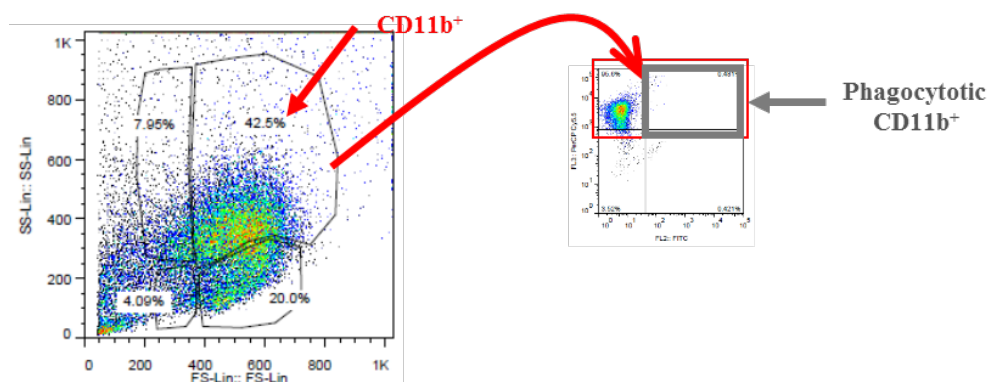
これらの生体影響をより簡便なシステムで評価できれば、より一層多くの情報が得られ、種々の解釈にフィードバックできるようになる。そこで肺での炎症でも重要な役割を担っている好中球を用いた粒子の影響評価を行った。解析するにあたり、定量解析を念頭に入れ、フローサイトメトリー解析を応用した。原理は図(2)-2)-28 の左図の通りで、蛍光物質を波長別に、同時に解析できるものである。細胞を用いた場合、その大きさも解析でき、非常に有用である(図(2)-2)-28右)。



図(2)-2)-28. フローサイトメトリーにより細胞の検出系

細胞を蛍光標識した抗体で染色し、それをフローサイトメトリーで解析すると1つの細胞上の種々の情報が同時に得られる。今回は食食細胞のマーカーのひとつであるCD11bとPE標識した粒子を用い、食食した細胞の割合を数値で表せるシステムをセットアップした。

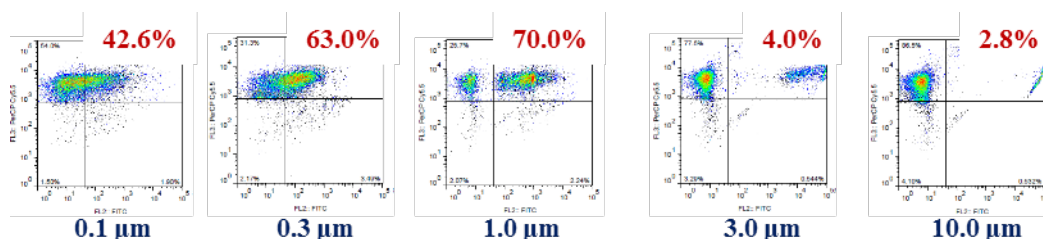
調製した好中球は比較的大きな、更に細胞内に顆粒を持つために、複雑さを反映した領域に分布した(図(2)-2)-29左)。その集団は多くが食食細胞のマーカーでもあるCD11bが陽性であった(図(2)-2)-29右)。蛍光粒子(FITC)を食食するとこの集団が右にシフトすることで、食食能を評価することができる。



図(2)-2)-29. 炎症誘導性好中球の分布

左図は細胞の大きさと複雑さの分布を表したもので、図の中の右上の領域に好中球が多く存在していることが左のCD11b陽性細胞の割合からわかる。

種々の大きさの粒子を好中球と培養し、3時間後の様子をフローサイトメトリーで解析した結果が図(2)-2-30 である。粒子サイズによって、その食食能に大きな違いがあることが示唆された。特に3 μm 以上の粒子の食食は観察されなかった。これらはPM2.5の粒径が1 μm 付近であることを鑑みると、好中球の食食が生体でも行われていることが予想される結果となった。



図(2)-2-30. 炎症誘導性好中球の食食能

図に示すそれぞれの大きさの粒子と一緒に培養し、3時間後の様子を表したものである。粒子の大きさによし食食能に差があることがわかる。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

2014年以降、黄砂の飛来回数は非常に少なくなってきた。2013年以降、春季の大気汚染の発生源は、石炭・バイオマス燃焼由来から石油系燃焼由来へと推移してきていることが示唆された。また、中国・瀋陽のPM2.5の成分分析から、明らかに大気環境の改善が認められて来ている。生体影響に関して先行研究において我々のグループでは黄砂が生体に対して大きな影響を及ぼすこと、特に免疫担当細胞を活性化することを報告してきた¹⁾。このことは、アレルギーなど生体が過剰な状態を呈する疾患において、その方向性を更に更新することを意味している。更にはその影響は、分子レベルでの解析で予測を立てることが可能で、転写因子NF- κ Bの活性化はその評価の一つとなることが示唆された。その分子は生体のホメオスタシスを維持する上でも重要な分子であり、次に外部刺激を受けた後、増強反応や、抑制反応に働くことが示唆される。また粒子に付着している微生物由来の物質であるLPSが生体影響の一端を担っていることが示唆された。一方、粒子サイズが小さい都市部由来PM2.5の生体への影響は、生体応答を負に調節する場合があることが示唆された。それには酸化ストレスが深く関与し、酸化ストレスマーカーを調べることで影響の有無を評価可能であることが示唆された。粒子に付着している物質は、PM2.5も黄砂と同様に影響誘導に強く関与していることも示唆された。以上からPM2.5と黄砂では、リンパ組織への影響に違いがあることが示された。酸化ストレスマーカーの一つは、細胞ダメージ関連分子として捉えることができ、この分子は種々の粒子の生体影響を評価する上で重要な分子であることがわかった。

(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>

上記で記したダメージ・ストレス関連分子を標的・観察することで、ヒトでの健康影響評価に応用できることが大いに期待できる。例えば、末梢血などを用いて上記のマーカー分子を標的としたアッセイをすることで、粒子などの生体影響を間接的に予測することができれば、その応用範囲も拡大していくものと考えられた。また付着物の性質によりその影響度に差異が生じることが示唆されていることから、その含有量とのプロファイルを作成することで、ヒトでの健康影響評価（アレルギー性炎症やCOPD）への予測に繋がるのではないかと考えている。

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) Y. SONG, T. ICHINOSE, M. HE, C. HE, K. MORITA, Y. YOSHIDA: *Toxicology Research*. 5;1445 – 1452 (2016)
“Lipopolysaccharide attached to urban particulate matter 10 suppresses immune responses in splenocytes while particulate matter itself activates NF-κB”

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 吉田安宏：日本免疫毒性学会ImmunoTox Letter.3-4 (2016)
「第23回学術年会年会賞を受賞して＝LPSを多く含む都市由来PM10による免疫反応の抑制」

（２）口頭発表（学会等）

- 1) Y. YOSHIDA, Y. SONG, T. ICHINOSE: World asthma. (2014)
“Asian sand dust causes acute lung inflammation and subacute peripheral events”
- 2) 河津直希、白石彩華、秋山幸雄、嵐谷奎一、市瀬孝道：第55回大気環境学会年会 (2014)
「最近の北九州地域の浮遊汚染物質濃度の特徴」
- 3) Y. SONG, T. ICHINOSE, K. MORITA, T. NAKANISHI, C. HE, T. KANAZAWA, Y. YOSHIDA:第43回日本免疫学会総会 (2014)
“Particulate matter influenced immune responses through TLR4 in vivo”
- 4) 吉田安宏、宋媛、何翠穎、嵐谷奎一、市瀬孝道：第9回大気バイオエアロゾルシンポジウム (2015)
「黄砂とPM2.5免疫応答の差異と微生物成分の関与に関する研究」
- 5) 吉田成一、嵐谷奎一、市瀬孝道：フォーラム2015：衛生薬学・環境トキシコロジー (2015)
「微小粒子PM2.5の胎仔期曝露が出生仔の雄性生殖機能に与える影響」
- 6) 宋媛、何翠穎、森田健太郎、馬場良子、森本影之、金澤保、吉田安宏：第33回産業医科大学学大会 (2015)

「都市部で採集されたPM2.5・PM10の生体影響の違いについて —PM2.5とPM10曝露モデルマウスの構築と解析から—」

- 7) K. MORITA, C. HE, T. MIYAKE, W. DUO, Y. SONG, T. NAKANISHI, T. KANAZAWA, Y. YOSHIDA : 第44回日本免疫学会総会 (2015)
“Effect of Asian sand dust (Kosa) on type 1 diabetes”
- 8) C. HE, T. ICHINOSE, Y. SONG, Y. YOSHIDA : 第38回日本分子生物学会総会 (2015)
“PM2.5 suppressed immune responses in spleen”
- 9) 吉田成一、嵐谷奎一、市瀬孝道 : 日本薬学会第136年会 (2016)
「微小粒子PM2.5の胎仔期曝露が出生仔の免疫系に与える影響」
- 10) 吉田成一、嵐谷奎一、市瀬孝道 : 第43回日本毒性学会学術年会 (2016)
「微小粒子PM2.5 の胎仔期曝露が出生仔の雄性生殖機能に与える影響とその影響発現メカニズムの解析」
- 11) C. HE, T. ICHINOSE, Y. SONG, D. WANG, K. MORITA, T. KANAZAWA, Y. YOSHIDA : 16th International congress of Immunology. (2016)
“PM2.5 induces oxidative stress in splenic CD11b+ cells in mouse”
- 12) T. MIYAKE, C. HE, Y. SONG, K. MORITA, T. KANAZAWA, Y. YOSHIDA : 16th International congress of Immunology. (2016)
“Particulate matters activated inflammation-induced neutrophils”
- 13) Y. YOSHIDA, Y. SONG, C. HE, K. MORITA, T. ICHINOSE, T. KANAZAWA : 第23回日本免疫学会学術年会 学会年会賞受賞演題 (2016)
“LPS-rich urban particulate matter 10 suppresses immune responses in splenocytes”
- 14) 市瀬孝道、吉田成一、定金香里、嵐谷奎一、M. HE : 第57 回大気環境学会 (2016)
「PM2.5 のTLR2, 4 とMyD88 シグナル経路を介した肺のアレルギー増悪作用」
- 15) 吉田成一、村木直美、伊藤剛、嵐谷奎一、市瀬孝道 : 第57 回大気環境学会 (2016)
「微小粒子PM2.5 の胎児期曝露による雄性出生仔の生殖機能への影響メカニズムの解析」
- 16) 古賀千紘、秋山幸雄、吉田成一、市瀬孝道、嵐谷奎一 : 第57 回大気環境学会 (2016)
「最近の北九州地域の汚染物質濃度の特徴」
- 17) 小原雅司、佐野圭亮、秋山幸雄、嵐谷奎一、吉田成一、市瀬孝道、唐寧、早川和一 : 第57 回大気環境学会 (2016)
「大陸由来黄砂の特徴及び北京と瀋陽の多環芳香族炭化水素濃度測定」
- 18) Y. YOSHIDA, C. HE : 第75回日本癌学会学術総会 (2016)
「PM2.5により誘導される酸化ストレスはCD11b陽性細胞が中心である」
- 19) Y. YOSHIDA, Y. SONG, T. ICHINOSE, M. HE, C. HE, K. MORITA, T. KANAZAWA : Prenatal Programming and Toxicity V. (2016)
“LPS-rich urban particulate matter 10 suppresses immune responses in splenocytes while particulate matter itself activates NF-kB”
- 20) Y. SONG, T. ICHINOSE, Y. YOSHIDA : 第39回日本分子生物学会 (2016)
「PM10によるTLR-MyD88経路を介した脾臓細胞でのNF-kB活性化」
- 21) Y. YOSHIDA, Y. SONG, C. HE, D. WANG, K. MORITA, T. ICHINOSE : 第39回日本分子生物学

会 (2016)

“Immune negative modulation of environmental pollutant”

- 22) C. HE, Y. YOSHIDA, K. MORITA : 第45回日本免疫学会総会 (2016)

“Nrf2 involved in PM2.5-induced oxidative stress in splenocytes”

- 23) K. MORITA, R. BABA, C. HE, T. MIYAKE, D. WANG, Y. SONG, T. NAKANISHI, T.

KANAZAWA, Y. YOSHIDA : 第45回日本免疫学会総会 (2016)

“Asian sand dust (Kosa) delays type 1 diabetes in NOD mice”

- 24) 嵐谷奎一、伊藤真滉、川波葵、木村遙香、島田遙香、高橋佳容、藺田理央、山村由貴、吉田成一、市瀬孝道 : 第17 回大気環境学会九州支部研究発表会 (2017)

「2016 年春季の北九州地域の汚染物質濃度の調査」

- 25) Y. YOSHIDA, C. HE, Y. SONG, D. WANG, K. MORITA, T. ICHINOSE : 第16回分子予防環境医学研究会 (2017)

「環境汚染物質の免疫細胞に対する修飾作用」

- 26) Y. YOSHIDA, C. HE, T. ICHINOSE : 日本薬学会第137年会 (2017)

「粒子状物質による免疫細胞に対する抑制効果の機序」

(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) 平成26年度大学間連携共同教育推進事業 地域連携による「ものづくり」継承支援人材育成協働プロジェクト 第1 回特別講演、吉田安宏「自然免疫と獲得免疫における次々と現れる免疫の役者たち」(主催：産学連携大学プロジェクト、2014年5月20日、北九州、観客約100名)
- 2) 平成28年度 第39回日本分子生物学会
Y. YOSHIDA, Y. SONG, T. ICHINOSE, C. HE, D. WANG, K. MORITA. Immune negative modulation of environmental pollutant (主催：日本分子生物学会、2016年12月2日、横浜、聴衆約100名、この会には無料で一般の高校生も招待されており、広い意味での出張講義に近いものである)

(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

- 1) 第23回日本免疫毒性学会学術年会賞 (2016年 9月)
受賞演題名「LPSを多く含む都市由来PM10による免疫反応の抑制」

8. 引用文献

- 1) Y. SONG, T. ICHINOSE, K. MORITA, T. NAKANISHI, T. KANAZAWA, Y. YOSHIDA. *Environ Toxicol.* 2015 May;30(5):549-58. doi: 10.1002/tox.21931. Epub 2013 Dec 5.
Asian sand dust causes subacute peripheral immune modification with NF- κ B activation.
- 2) NAKANISHI, Y. SONG, C. HE, D. WANG, K. MORITA, J. TSUKADA, T. KANAZAWA, Y. YOSHIDA. *PeerJ.* 2016 May 12;4:e2026. doi: 10.7717/peerj.2026.
Relationship between triterpenoid anticancer drug resistance, autophagy, and caspase-1 in adult T-cell leukemia.
- 3) T. NAKANISHI, Y. SONG, C. HE, D. WANG, K. MORITA, J. TSUKADA, T. KANAZAWA, Y. YOSHIDA. *Med Oncol.* 2016 Apr;33(4):30. doi: 10.1007/s12032-016-0743-y. Epub 2016 Feb 25.
Autophagy is associated with cucurbitacin D-induced apoptosis in human T cell leukemia cells.
- 4) N. DING, N. KUNUGITA, T. ICHINOSE, Y. SONG, M. YOKOYAMA, K. ARASHIDANI, Y. YOSHIDA. *J Hazard Mater.* 2011 Oct 30;194:324-30. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.07.101.
Intratracheal administration of fullerene nanoparticles activates splenic CD11b⁺ cells.
- 5) Y YOSHIDA, U YAMASHITA. *J UOEH.* 2003 Jun 1;25(2):237-48. Review
Interleukin 1 signal transduction.

ベンゾ[a]ピレン、9,10-フェナントレンキノン、1,2-ナフトキノン、粒子、複合影響

1. はじめに

越境汚染、黄砂やPM2.5の問題が顕在化し、その健康影響、特に、気管支喘息を代表とする呼吸器系、免疫系への健康影響が危惧されている。黄砂やPM2.5は、成分も多様であり、移送時の修飾による二次変化も存在するため、健康影響決定成分や要因は明らかにされていない。況や、黄砂、PM2.5やその構成成分の複合曝露が健康に及ぼす影響については未解明の状況にあり、これらの問題を早急に解明する必要がある。

2. 研究開発目的

サブテーマ (3) では、PM2.5および黄砂の粒子自体 (加熱粒子) と大気汚染化学物質、具体的には、多環芳香族炭化水素 (PAH) であるベンゾ[a]ピレン (BaP)、9,10-フェナントレンキノン (9,10-PQ) または1,2-ナフトキノン (1,2-NQ) の複合曝露が呼吸器系や免疫系に及ぼす影響を解析し、それらによる複合影響の有無と影響発現メカニズムを明らかにするとともに、健康影響決定成分や要因の絞り込みとバイオマーカーの同定や予防対策の確立に役立てることを目的とした。

3. 研究開発方法

1) BaPと加熱したディーゼル排気微粒子、あるいは、加熱した黄砂の複合曝露が気道上皮細胞と免疫担当細胞に及ぼす影響

BaP及びディーゼル排気微粒子 (DEP: 国立環境研究所、日野自動車製J08Cエンジンを2000 rpm 運転時に採取。PM2.5の代表的存在) を360°C、30分間加熱処理したもの (H-DEP)、あるいは、黄砂標準物質 (国立環境研究所) CRM No.30 ゴビ黄砂を同様の条件で加熱処理したもの (H-ASD) を被検物質とした。ヒト気道上皮細胞を用いた検討では、BaP (1-10μM)、H-DEP (50μg/ml)、BaP (1-10μM) + H-DEP (50μg/ml)、あるいは、H-ASD (50μg/ml)、BaP (1-10μM) + H-ASD (50μg/ml) を24時間曝露した後、細胞活性と炎症性分子としてInterleukin (IL) -6及びIL-8の産生を解析した。免疫担当細胞を用いた検討では、10-11週齢の雄性NC/NgaTndCrJ (アトピー体質) マウスより、大腿骨及び脾臓を摘出した。Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF) 刺激により分化誘導した骨髓由来抗原提示細胞は、BaP (1-10μM)、H-DEP (50μg/ml)、BaP (1-10μM) + H-DEP (50μg/ml)、あるいは、H-ASD (50μg/ml)、BaP (1-10μM) + H-ASD (50μg/ml) を24時間曝露し、細胞表面分子の発現 (DEC205、CD86) を解析した。脾細胞は、BaP (1-10μM)、H-DEP (50μg/ml)、BaP (1-10μM) + H-DEP (50μg/ml)、あるいは、H-ASD (50μg/ml)、BaP (1-10μM) + H-ASD (50μg/ml) を72時間曝露した後、細胞増殖能、細胞表面分子TCRの発現を解析した。

2) 9,10-PQとH-DEP、あるいは、1,2-NQとH-DEP の複合曝露が気道上皮細胞と免疫担当細胞に及ぼす影響

9,10-PQあるいは1,2-NQ及びH-DEPを被検物質とした。ヒト気道上皮細胞を用いた検討では、9,10-PQ (0.01-1μM)、H-DEP (50μg/ml)、9,10-PQ (0.01-1μM) + H-DEP (50μg/ml)、あるいは、1,2-NQ (0.01-1μM)、H-DEP (50μg/ml)、1,2-NQ (0.01-1μM) + H-DEP (50μg/ml) を24時間曝露した後、細胞活性とIL-6、IL-8の産生を解析した。免疫担当細胞を用いた検討では、10-11

週齢の雄性NC/NgaTndCrIj（アトピー体質）マウスより、大腿骨及び脾臓を摘出した。GM-CSF刺激により分化誘導した骨髄由来抗原提示細胞は、9,10-PQ（0.01-1 μ M）、H-DEP（50 μ g/ml）、9,10-PQ（0.01-1 μ M）+ H-DEP（50 μ g/ml）、あるいは、1,2-NQ（0.01-1 μ M）、H-DEP（50 μ g/ml）、1,2-NQ（0.01-1 μ M）+ H-DEP（50 μ g/ml）を24時間曝露し、細胞表面分子の発現（DEC205、CD86）を解析した。脾細胞を用いた検討では、9,10-PQ（0.01-1 μ M）、H-DEP（50 μ g/ml）、9,10-PQ（0.01-1 μ M）+ H-DEP（50 μ g/ml）、あるいは、1,2-NQ（0.01-1 μ M）、H-DEP（50 μ g/ml）、1,2-NQ（0.01-1 μ M）+ H-DEP（50 μ g/ml）を72時間曝露し、細胞増殖能、細胞表面分子の発現（TCR、CD19）を解析した。

3) 9,10-PQと加熱したPM2.5（H-PM2.5）、H-ASD、H-PM2.5+H-ASD、あるいは、1,2-NQと

H-PM2.5、H-ASD、H-PM2.5+H-ASDの複合曝露が気道上皮細胞と免疫担当細胞に及ぼす影響

9,10-PQあるいは1,2-NQと環境標準物質NIES（国立環境研究所）CRM No.28 都市大気粉塵をPM2.5に精製した粒子を360 $^{\circ}$ C、30分間で加熱処理したもの（H-PM2.5）、H-ASDを被検物質とした。ヒト気道上皮細胞を用いた検討では、9,10-PQ（0.1-10 μ M）、H-PM2.5（50 μ g/ml）、9,10-PQ（0.1-10 μ M）+ H-PM2.5（50 μ g/ml）、H-ASD（50 μ g/ml）、9,10-PQ（0.1-10 μ M）+ H-ASD（50 μ g/ml）、H-PM2.5（25 μ g/ml）+ H-ASD（25 μ g/ml）、9,10-PQ（0.1-10 μ M）+ H-PM2.5（25 μ g/ml）+ H-ASD（25 μ g/ml）あるいは、1,2-NQ（0.1-10 μ M）、H-PM2.5（50 μ g/ml）、1,2-NQ（0.1-10 μ M）+ H-PM2.5（50 μ g/ml）、H-ASD（50 μ g/ml）、1,2-NQ（0.1-10 μ M）+ H-ASD（50 μ g/ml）、H-PM2.5（25 μ g/ml）+ H-ASD（25 μ g/ml）、1,2-NQ（0.1-10 μ M）+ H-PM2.5（25 μ g/ml）+ H-ASD（25 μ g/ml）を2時間曝露した後、活性酸素種（ROS）の産生を、24時間曝露した後、細胞活性とIL-6、IL-8の産生を、それぞれ解析した。免疫担当細胞を用いた検討では、10-11週齢の雄性NC/NgaTndCrIj（アトピー体質）マウスより、大腿骨及び脾臓を摘出した。GM-CSF刺激により分化誘導した骨髄由来抗原提示細胞は、9,10-PQ（0.01-1 μ M）、H-PM2.5（50 μ g/ml）、9,10-PQ（0.01-1 μ M）+ H-PM2.5（50 μ g/ml）、H-ASD（50 μ g/ml）、9,10-PQ（0.01-1 μ M）+ H-ASD（50 μ g/ml）、H-PM2.5（25 μ g/ml）+ H-ASD（25 μ g/ml）、9,10-PQ（0.01-1 μ M）+ H-PM2.5（25 μ g/ml）+ H-ASD（25 μ g/ml）あるいは、1,2-NQ（0.01-1 μ M）、H-PM2.5（50 μ g/ml）、1,2-NQ（0.01-1 μ M）+ H-PM2.5（50 μ g/ml）、H-ASD（50 μ g/ml）、1,2-NQ（0.01-1 μ M）+ H-ASD（50 μ g/ml）、H-PM2.5（25 μ g/ml）+ H-ASD（25 μ g/ml）、1,2-NQ（0.01-1 μ M）+ H-PM2.5（25 μ g/ml）+ H-ASD（25 μ g/ml）を24時間曝露し、細胞表面分子の発現（DEC205）とTumor Necrosis Factor（TNF）- α 及びIL-6産生を解析した。

4. 結果及び考察

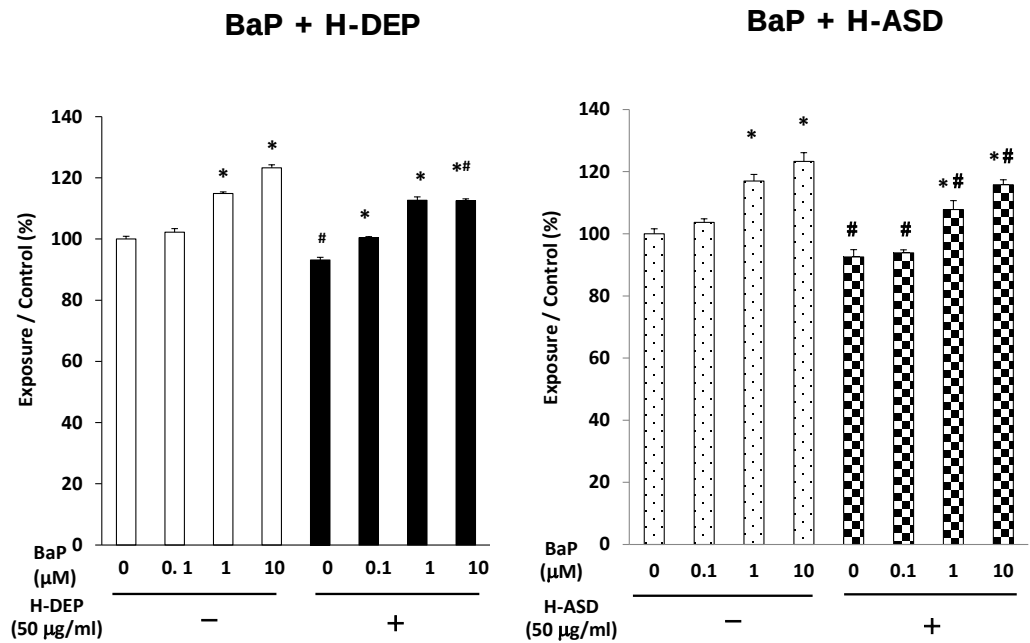
1) BaPと加熱したディーゼル排気微粒子、あるいは、加熱した黄砂の複合曝露が気道上皮細胞と免疫担当細胞に及ぼす影響

a. 気道上皮細胞に及ぼす影響

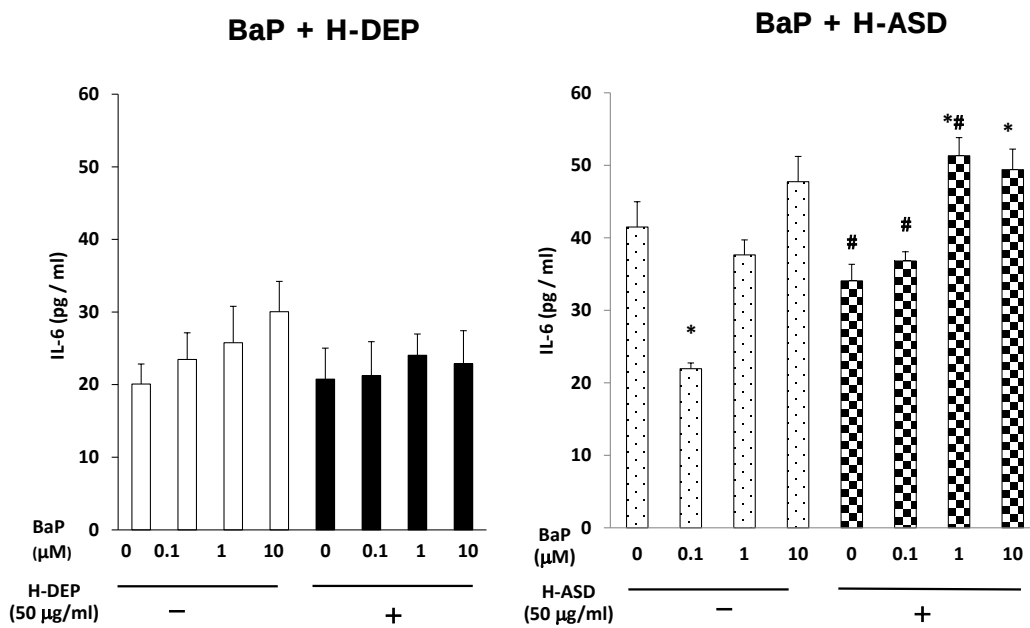
細胞活性について検討したところ、BaP単独曝露では、Controlと比較して、その上昇が確認された(図(3)-1)-1)。また、H-DEP単独曝露により、細胞活性の低下が認められた。BaP + H-DEP複合曝露では、H-DEP単独曝露と比較して、細胞活性の上昇が確認された。同濃度のBaP単独曝露と比較すると、低値を示した。

一方、H-ASD単独曝露では、細胞活性の低下が認められた(図(3)-1)-1)。BaP + H-ASD複合曝露では、H-ASD単独曝露と比較して、細胞活性の上昇が確認された。同濃度のBaP単独曝露と比較すると、低値を示した。

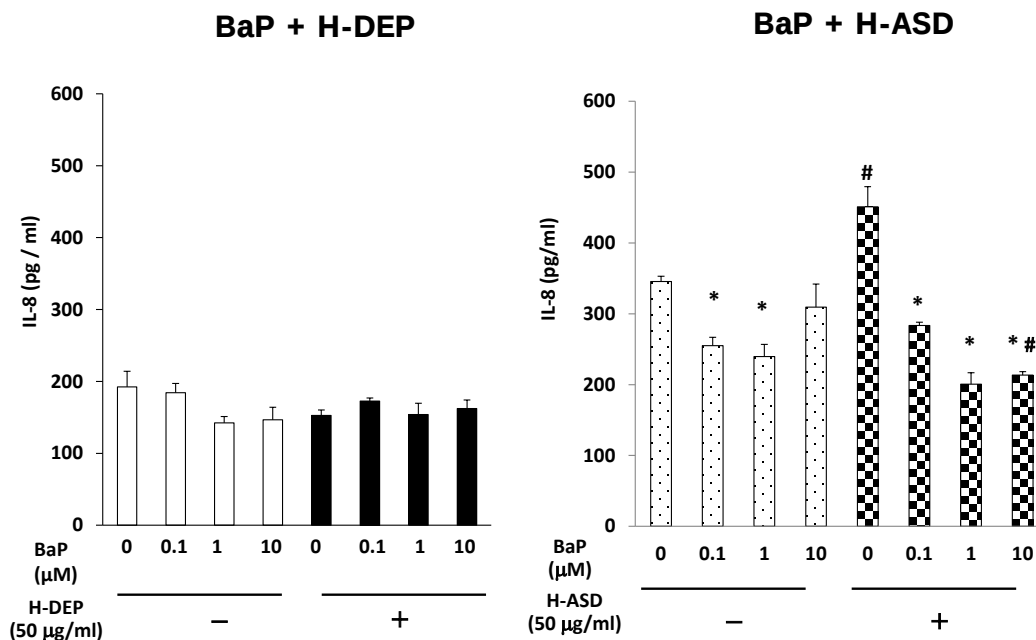
IL-6、IL-8の産生については、何れの曝露群においても、Controlと比較して、明らかな上昇は確認されず、催炎症性反応は認められなかった(図(3)-1)-2、(3)-1)-3)。



図(3)-1)-1. BaPとH-DEP、あるいは、H-ASDの複合曝露が気道上皮細胞の細胞活性に及ぼす影響
* $p < 0.05$ versus corresponding control. # $p < 0.05$ versus BaP at the same concentration.



図(3)-1)-2. BaPとH-DEP、あるいは、H-ASDの複合曝露が気道上皮細胞のIL-6産生に及ぼす影響
* $p < 0.05$ versus corresponding control. # $p < 0.05$ versus BaP at the same concentration.



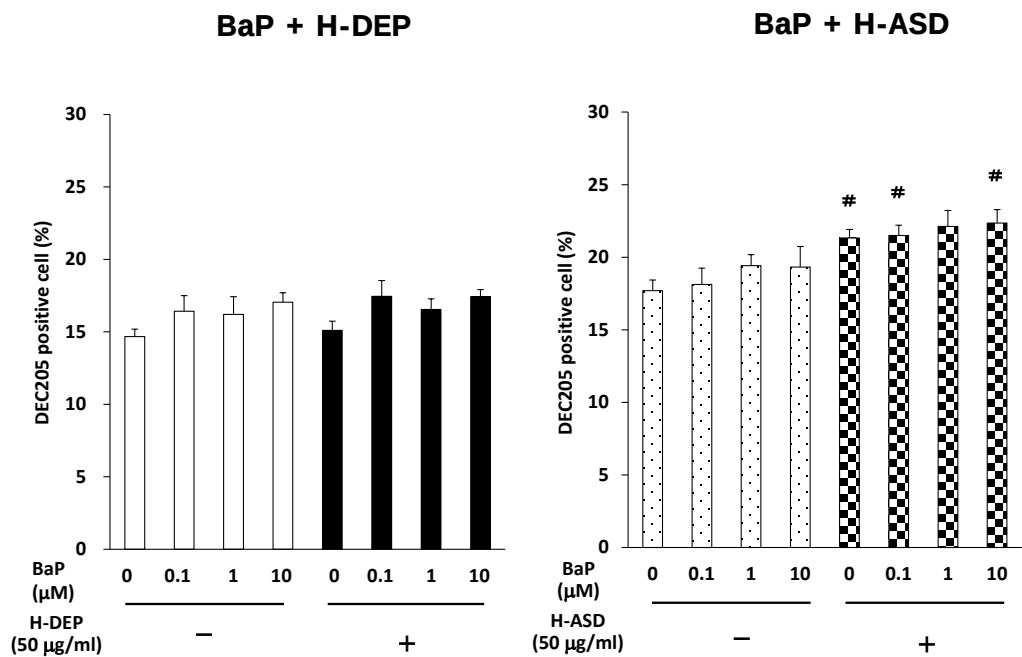
図(3)-1)-3. BaPとH-DEP、あるいは、H-ASDの複合曝露が気道上皮細胞のIL-8産生に及ぼす影響

* $p < 0.05$ versus corresponding control. # $p < 0.05$ versus BaP at the same concentration.

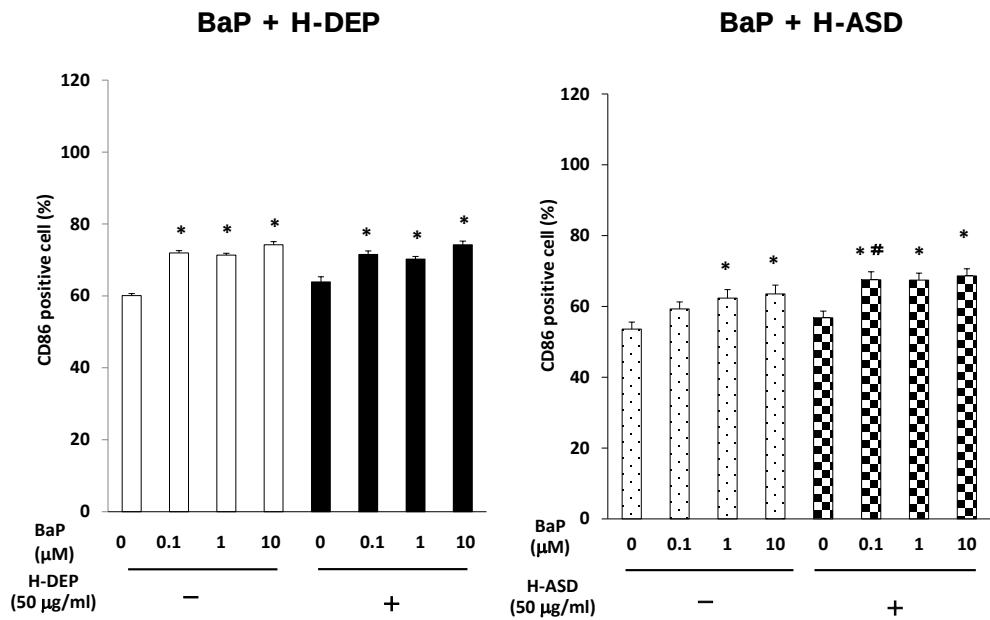
b. 骨髄由来抗原提示細胞に及ぼす影響

細胞表面分子DEC205陽性細胞率について検討したところ、BaP単独曝露、H-DEP単独曝露、BaP + H-DEP複合曝露の何れにおいても変化は認められなかった(図(3)-1)-4)。一方、H-ASD単独曝露では、軽微なDEC205陽性細胞率の増加が認められた。BaP + H-ASD複合曝露では、H-ASD単独曝露と比較して、変化は認められなかった。同濃度のBaP単独曝露と比較すると、僅かに高値を示した。

細胞表面分子CD86陽性細胞率について検討したところ、BaP単独曝露では、Controlと比較して、その上昇が確認された(図(3)-1)-5)。また、H-DEP単独曝露では、変化は認められなかった。BaP + H-DEPの複合曝露では、H-DEP単独曝露と比較して、CD86陽性細胞率の上昇が確認された。同濃度のBaP単独曝露と比較すると、変化はなかった。一方、H-ASDの単独曝露では、変化は認められなかった。BaP + H-ASD複合曝露では、H-ASD単独曝露と比較して、CD86陽性細胞率の増加が確認された。同濃度のBaP単独曝露と比較すると、0.1μMにおいて僅かに高値を示した。



図(3)-1)-4. BaPとH-DEP、あるいは、H-ASDの複合曝露が骨髄由来抗原提示細胞のDEC205発現に及ぼす影響
$p < 0.05$ versus BaP at the same concentration.

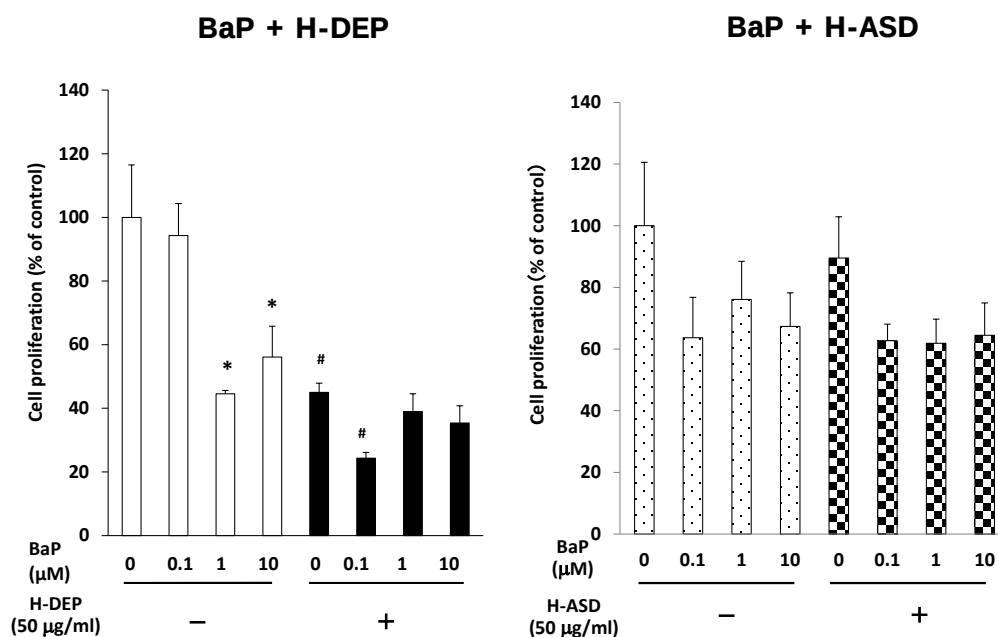


図(3)-1)-5. BaPとH-DEP、あるいは、H-ASDの複合曝露が骨髄由来抗原提示細胞のCD86発現に及ぼす影響
* $p < 0.05$ versus corresponding control. # $p < 0.05$ versus BaP at the same concentration.

c. 脾細胞に及ぼす影響

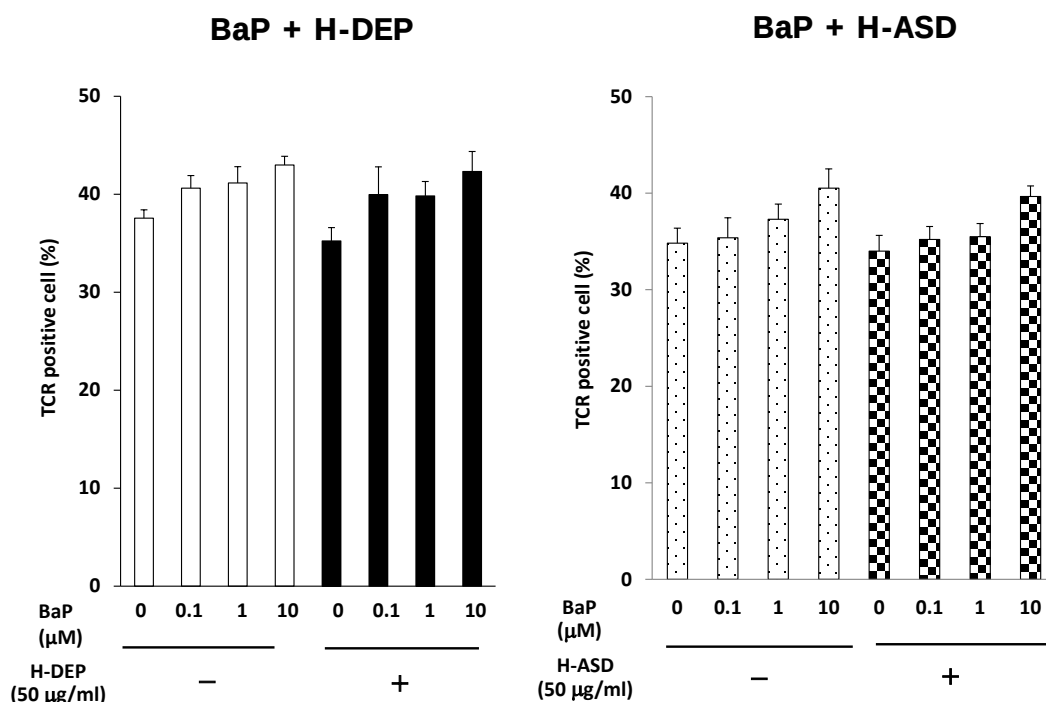
細胞増殖について検討したところ、BaP単独曝露では、Controlと比較して、その低下傾向が確認された(図(3)-1)-6)。また、H-DEP単独曝露により、細胞増殖の低下が認められた。BaP + H-DEP複合曝露では、H-DEP単独曝露と比較して、変化は認められなかった。同濃度のBaP単独曝露と比較すると、0.1 μ Mにおいて低値を示した。一方、H-ASD単独曝露では、変化はなかった。BaP + H-ASD複合曝露では、H-ASD単独曝露と比較して、細胞増殖の低下傾向が認められたが、有意な差はなかった。

細胞表面分子TCR陽性細胞率について検討したところ、何れの曝露群においても、変化は認められなかった(図(3)-1)-7)。



図(3)-1)-6. BaPとH-DEP、あるいは、H-ASDの複合曝露が脾細胞の細胞増殖能に及ぼす影響

* $p < 0.05$ versus corresponding control. # $p < 0.05$ versus BaP at the same concentration.



図(3)-1-7. BaPとH-DEP、あるいは、H-ASDの複合曝露が脾細胞のTCR発現に及ぼす影響

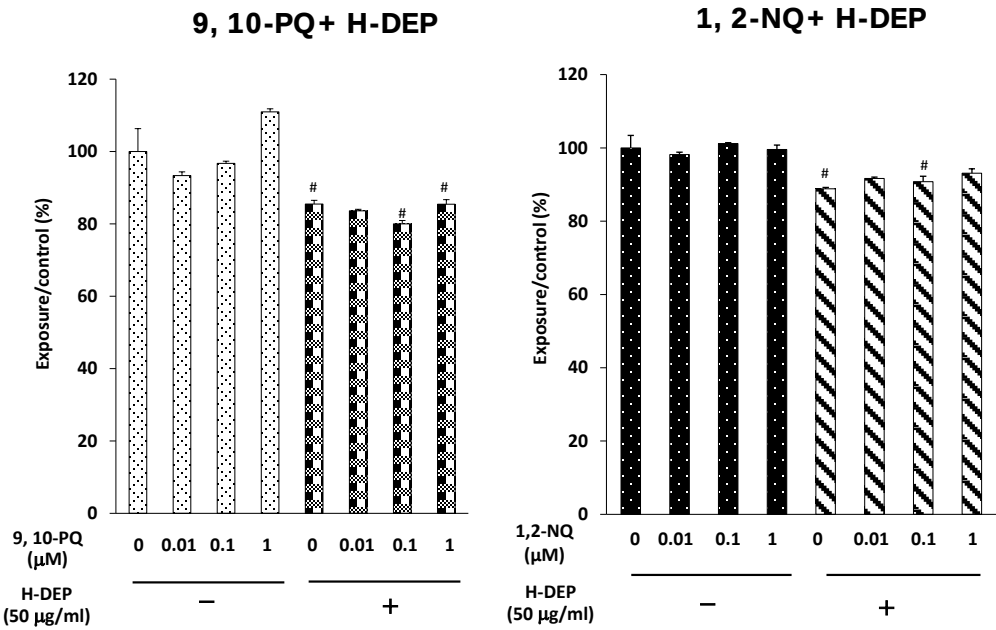
以上の結果より、BaPは、ヒト気道上皮細胞や脾細胞よりむしろ、抗原提示細胞に作用することが示唆された。H-DEP、H-ASDは、それぞれ、気道上皮細胞に対する障害性や、僅かな抗原提示細胞の活性化作用を示した。BaPとH-DEPやH-ASDとの複合曝露は、相加的に、細胞表面分子CD86を介して抗原提示能を活性化させることにより、気管支喘息、肺炎等の呼吸器系、免疫系疾患に複合影響を及ぼす可能性が示された。

2) 9,10-PQとH-DEP、あるいは、1,2-NQとH-DEP の複合曝露が気道上皮細胞と免疫担当細胞に及ぼす影響

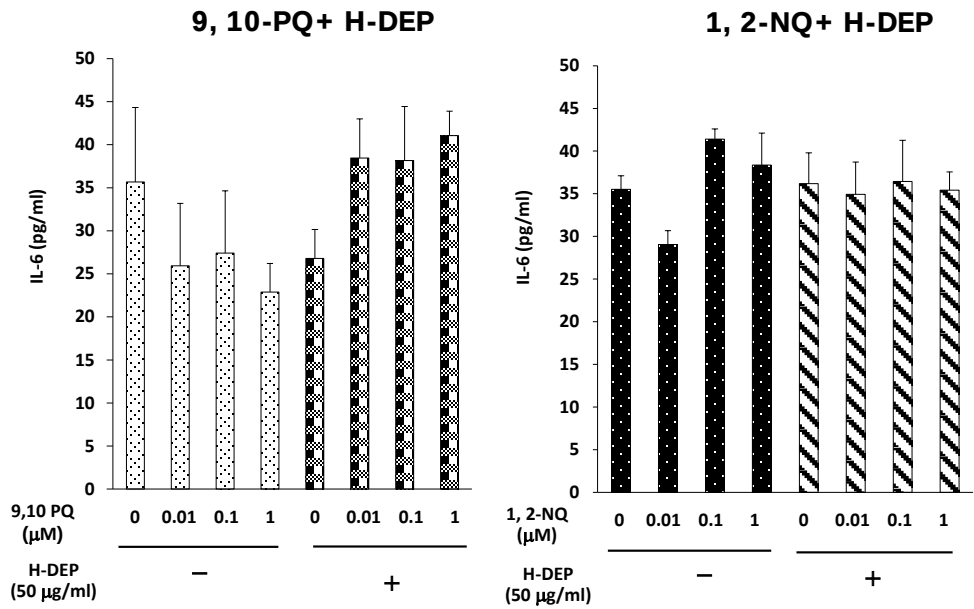
a. 気道上皮細胞に及ぼす影響

細胞活性について検討したところ、0.01-1μMの9,10-PQ単独曝露では、Controlと比較して、変化は認められなかった(図(3)-2)-8)。一方、H-DEP単独曝露により、細胞活性の低下が認められた。9,10-PQ + H-DEP複合曝露では、H-DEP単独曝露と比較して、変化はなかった。同濃度の9,10-PQ単独曝露と比較すると、低値を示した。一方、0.01-1μM 1,2-NQ単独曝露では、Controlと比較して、変化はなかった。H-DEP単独曝露により、細胞活性の低下が認められた。1,2-NQ + H-DEP複合曝露では、H-DEP単独曝露と比較して、変化はなかった。同濃度の1,2-NQ単独曝露と比較すると、0.1μMにおいて低値を示した。

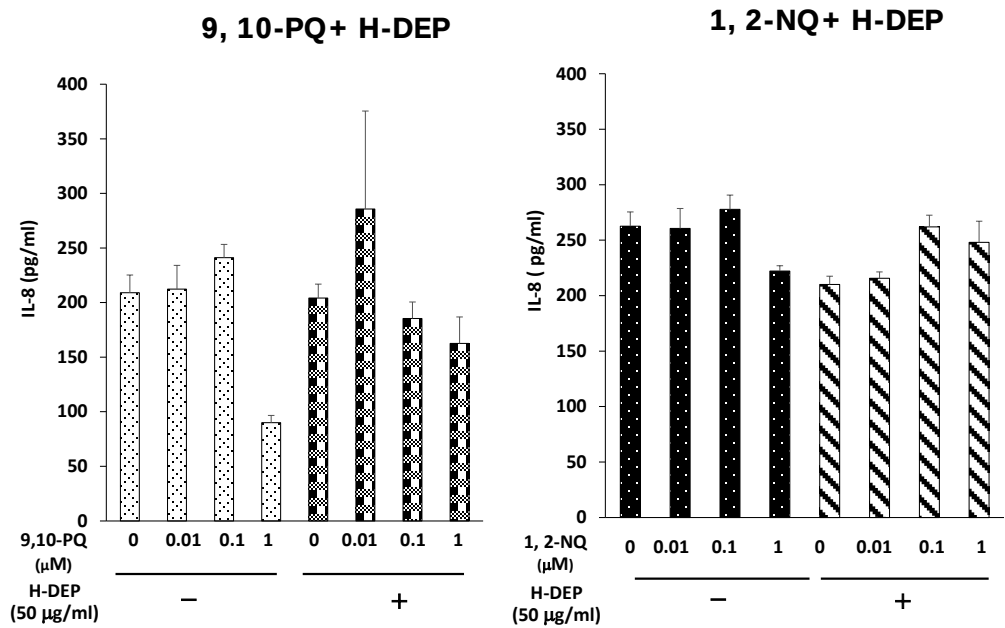
IL-6、IL-8の産生については、何れの曝露群においても、Controlと比較して、明らかな上昇は確認されず、催炎症性反応は認められなかった(図(3)-2)-9、図(3)-2)-10)。



図(3)-2)-8. 9,10-PQ、あるいは、1,2-NQとH-DEPの複合曝露が気道上皮細胞の細胞活性に及ぼす影響
$p<0.05$ versus 9,10-PQ or 1,2-NQ at the same concentration.



図(3)-2)-9. 9,10-PQ、あるいは、1,2-NQとH-DEPの複合曝露が気道上皮細胞のIL-6産生に及ぼす影響

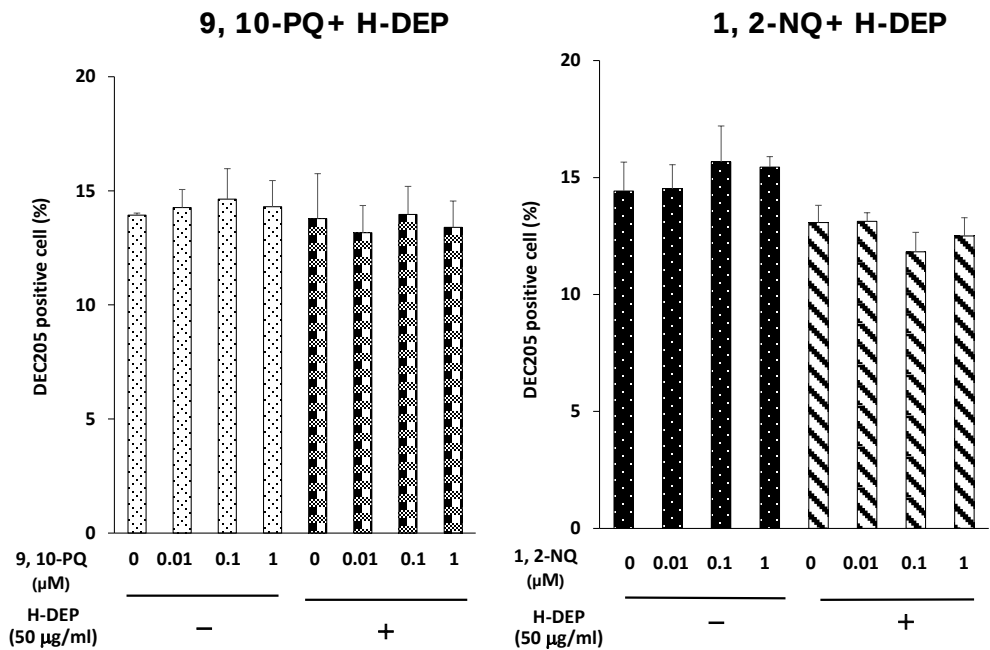


図(3)-2)-10. 9,10-PQ、あるいは、1,2-NQとH-DEPの複合曝露が気道上皮細胞のIL-8産生に及ぼす影響

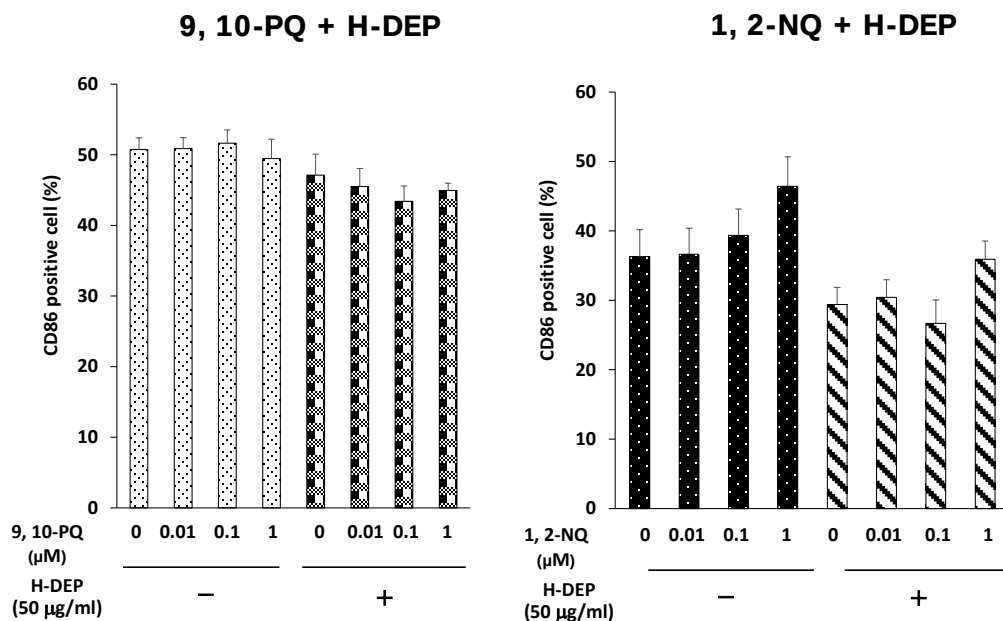
b. 骨髄由来抗原提示細胞に及ぼす影響

細胞表面分子DEC205陽性細胞率について検討したところ、何れの曝露群においても、変化は認められなかった(図(3)-2)-11)。

細胞表面分子CD86陽性細胞率について検討したところ、何れの曝露群においても、変化は認められなかった(図(3)-2)-12)。



図(3)-2)-11. 9,10-PQ、あるいは、1,2-NQとH-DEPの複合曝露が骨髄由来抗原提示細胞のDEC205発現に及ぼす影響



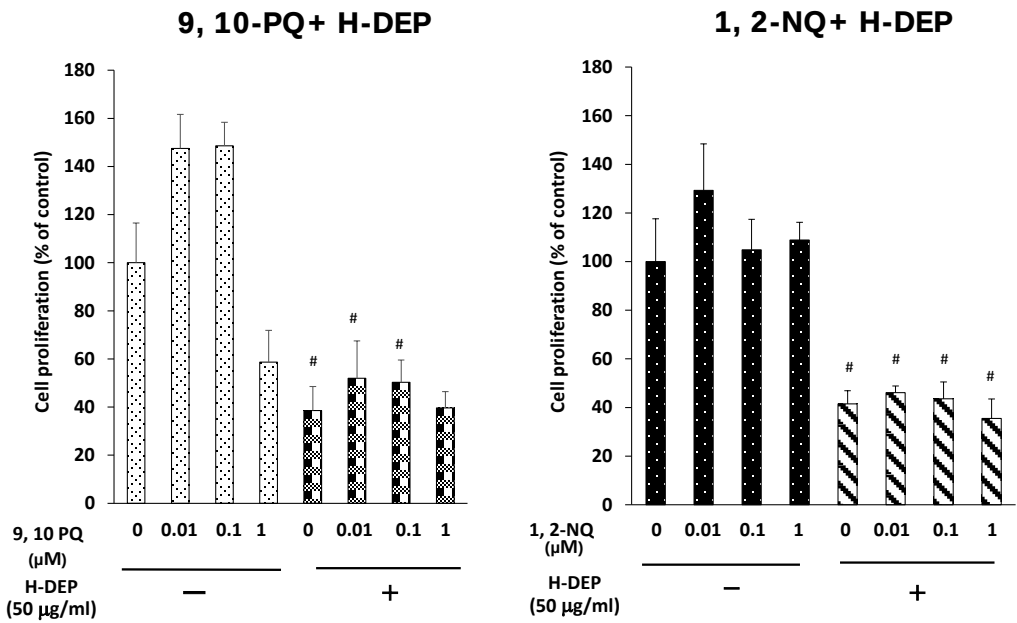
図(3)-2-12. 9,10-PQ、あるいは、1,2-NQとH-DEPの複合曝露が
骨髄由来抗原提示細胞のCD86発現に及ぼす影響

c. 脾細胞に及ぼす影響

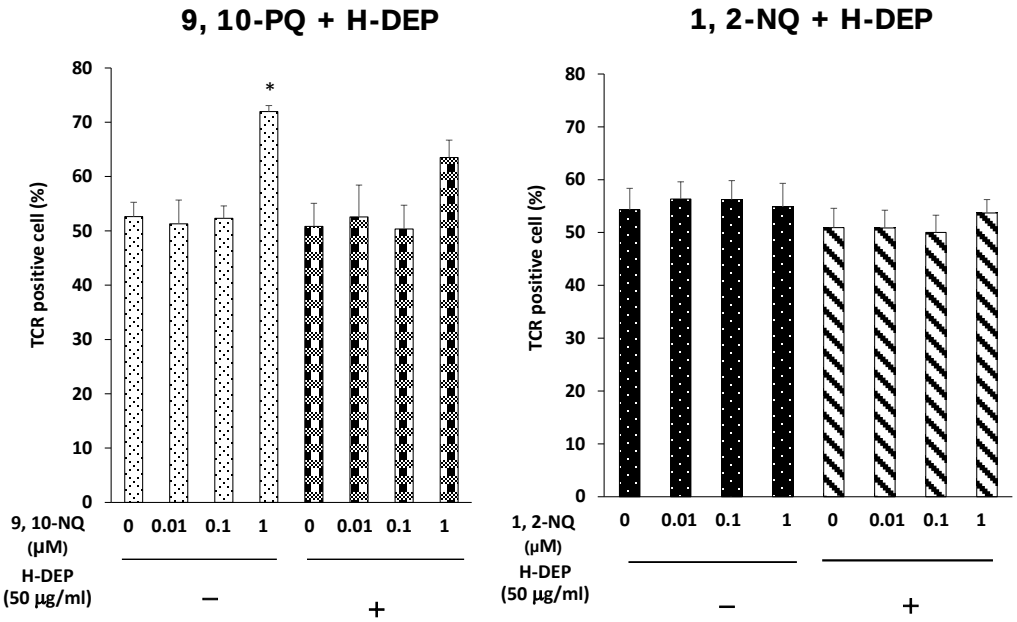
細胞増殖能について検討したところ、9,10-PQ単独曝露では、Controlと比較して、0.01, 0.1μMでは上昇、1μMでは、低下傾向が確認されたが、有意な変化は認められなかった(図(3)-2-13)。また、H-DEP単独曝露により、細胞増殖能の低下が認められた。9,10-PQ + H-DEP複合曝露では、H-DEP単独曝露と比較して、変化は認められなかった。同濃度の9,10-PQ単独曝露と比較すると、0.01, 0.1μMにおいて低値を示した。一方、0.01-1μMの1,2-NQ単独曝露では、Controlと比較して、変化はなかった。H-DEP単独曝露により、細胞増殖の低下が認められた。1,2-NQ + H-DEP複合曝露では、H-DEP単独曝露と比較して、変化はなかった。同濃度の1,2-NQ単独曝露と比較すると、低値を示した。

細胞表面分子TCR陽性細胞率について検討したところ、1μMの9,10-PQ単独曝露において、Controlと比較して増加を示した(図(3)-2-14)。その他の曝露に関しては、何れにおいても、変化は認められなかった。

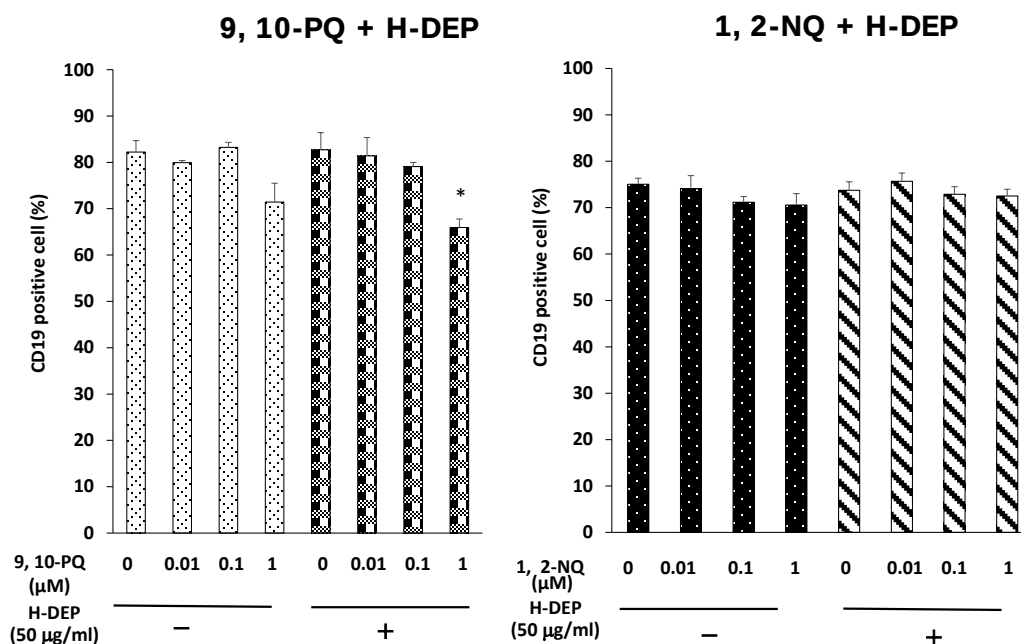
細胞表面分子CD19陽性細胞率について検討したところ、1μMの9,10-PQ単独曝露では、Controlと比較して、低下傾向が確認されたが、有意な変化は認められなかった(図(3)-2-15)。また、H-DEP単独曝露においても変化は認められなかった。1μMの9,10-PQ + H-DEP複合曝露では、H-DEP単独曝露と比較して、低値を示した。同濃度の9,10-PQ単独曝露と比較すると、変化は認められなかった。一方、1,2-NQにおいては、何れの曝露においても、変化は認められなかった。



図(3)-2)-13. 9,10-PQ、あるいは、1,2-NQとH-DEPの複合曝露が脾細胞の細胞増殖能に及ぼす影響
$p < 0.05$ versus 9,10-PQ or 1,2-NQ at the same concentration.



図(3)-2)-14. 9,10-PQ、あるいは、1,2-NQとH-DEPの複合曝露が脾細胞のTCR発現に及ぼす影響
* $p < 0.05$ versus corresponding control.



図(3)-2)-15. 9,10-PQ、あるいは、1,2-NQとH-DEPの複合曝露が脾細胞のCD19発現に及ぼす影響

* $p < 0.05$ versus corresponding control.

以上の結果より、何れの細胞においても、9,10-PQや1,2-NQ（0.01-1µM）は、明らかな催炎症性反応や、免疫応答の活性化を示さなかった。一方、9,10-PQや1,2-NQとH-DEPとの複合曝露では、主に、H-DEPの作用を介して、気道上皮細胞の細胞活性を低下させ、呼吸器疾患を増悪する可能性が考えられた。

3) 9,10-PQと加熱したPM2.5（H-PM2.5）、H-ASD、H-PM2.5+H-ASD、あるいは、1,2-NQと

H-PM2.5、H-ASD、H-PM2.5+H-ASDの複合曝露が気道上皮細胞と免疫担当細胞に及ぼす影響

a. 気道上皮細胞に及ぼす影響

i. 9,10-PQとH-PM2.5、H-ASD、H-PM2.5+H-ASD の複合曝露

細胞活性について検討したところ、10µMの9,10-PQ単独曝露では、Controlと比較して、著しい低下を示した(図(3)-3)-16)。また、Controlと比較して、H-PM2.5単独曝露、H-ASD単独曝露により、細胞活性の低下がそれぞれ認められたが、H-PM2.5+H-ASD曝露では、変化はなかった。9,10-PQ+H-PM2.5、9,10-PQ+H-ASD、あるいは、9,10-PQ+H-PM2.5+H-ASD複合曝露では、各粒子単独曝露と比較して、9,10-PQの濃度が10µMの時、著しい低下を示した。一部の濃度の9,10-PQ+H-PM2.5、9,10-PQ+H-ASD、あるいは、9,10-PQ+H-PM2.5+H-ASD複合曝露は、同濃度の9,10-PQ単独曝露と比較して、細胞活性の低下を示した。

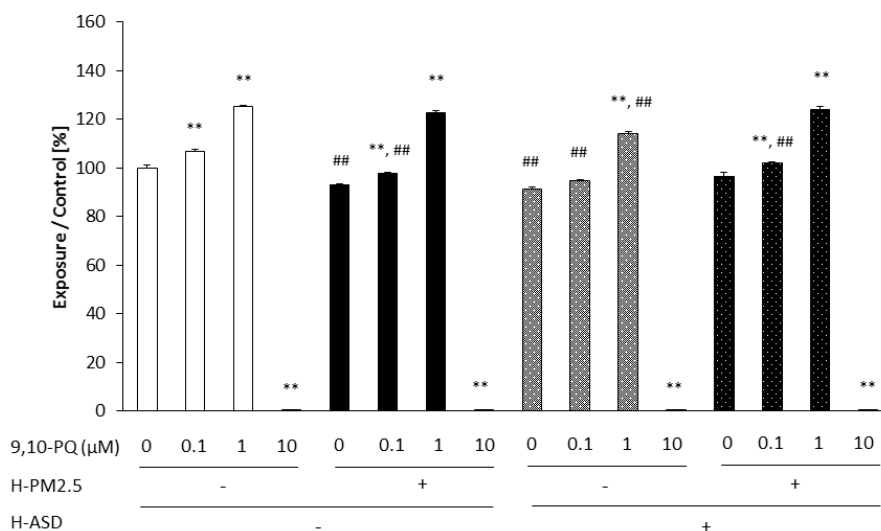
9,10-PQの濃度が1µMの時、細胞死について検討したところ、9,10-PQ単独曝露では、Controlと比較して、その減少が認められた(図(3)-3)-17)。また、Controlと比較して、H-ASD単独曝露、H-PM2.5+H-ASD曝露では、死細胞の増加が確認された。一方、9,10-PQ+各粒子の複合曝露では、9,10-PQ+H-PM2.5複合曝露が、最も強く死細胞を誘導した。

IL-6、IL-8の産生については、10 μ Mの9,10-PQ単独曝露では、Controlと比較して、著しい低下を示した(図(3)-3)-18、図(3)-3)-19)。また、H-PM2.5単独曝露、H-ASD単独曝露、H-PM2.5+H-ASD曝露では、変化はなかった。9,10-PQ+H-PM2.5、9,10-PQ+H-ASD、あるいは、9,10-PQ+H-PM2.5+H-ASDとの複合曝露では、各粒子単独曝露と比較して、9,10-PQの濃度が10 μ Mの時に、著しい低下を示した。

気道上皮細胞非存在下の活性酸素種の産生量について検討したところ、0.1-10 μ Mの9,10-PQ単独曝露では、変化は認められなかった(図(3)-3)-20)。また、Controlと比較して、H-PM2.5の単独曝露により、活性酸素種の増加が、H-ASDの単独曝露により、活性酸素種の軽微な増加が、それぞれ確認されたが、H-PM2.5+H-ASDの単独曝露では、変化が認められなかった。一方、9,10-PQ+H-PM2.5、あるいは、9,10-PQ+H-PM2.5+H-ASD複合曝露では、粒子単独曝露と比較して、活性酸素種の産生が増大した。9,10-PQ+各粒子の複合曝露では、同濃度の9,10-PQ単独曝露と比較すると、H-PM2.5>H-PM2.5+H-ASD>H-ASDの存在下の順で高値を示した。

気道上皮細胞存在下の活性酸素種の産生量について検討したところ、9,10-PQ単独曝露では、Controlと比較して、1 μ M及び10 μ Mで活性酸素種の増加が確認された(図(3)-3)-21)。また、Controlと比較して、H-PM2.5、H-ASD、H-PM2.5+H-ASDの単独曝露による変化はほとんど見られなかった。一方、9,10-PQ+H-PM2.5、9,10-PQ+H-ASD、9,10-PQ+H-PM2.5+H-ASD複合曝露においても、9,10-PQ単独曝露と同様に、粒子単独曝露と比較して、1 μ M及び10 μ Mで活性酸素種の増加がそれぞれ確認された。

9, 10-PQ + H-PM2.5 + H-ASD

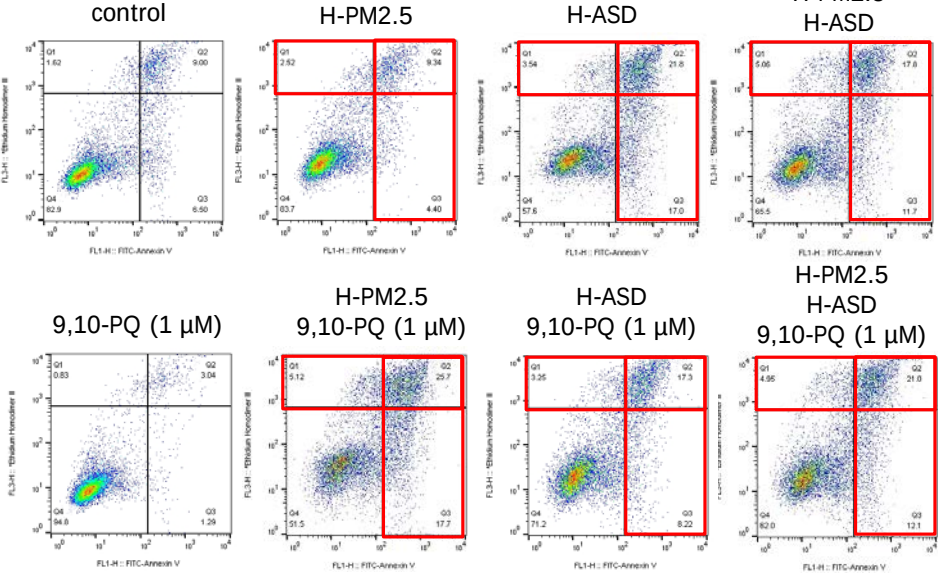


図(3)-3)-16. 9,10-PQとH-PM2.5、H-ASD、H-PM2.5+H-ASD の複合曝露が気道上皮細胞の細胞活性に及ぼす影響

** $p < 0.01$ versus corresponding control.

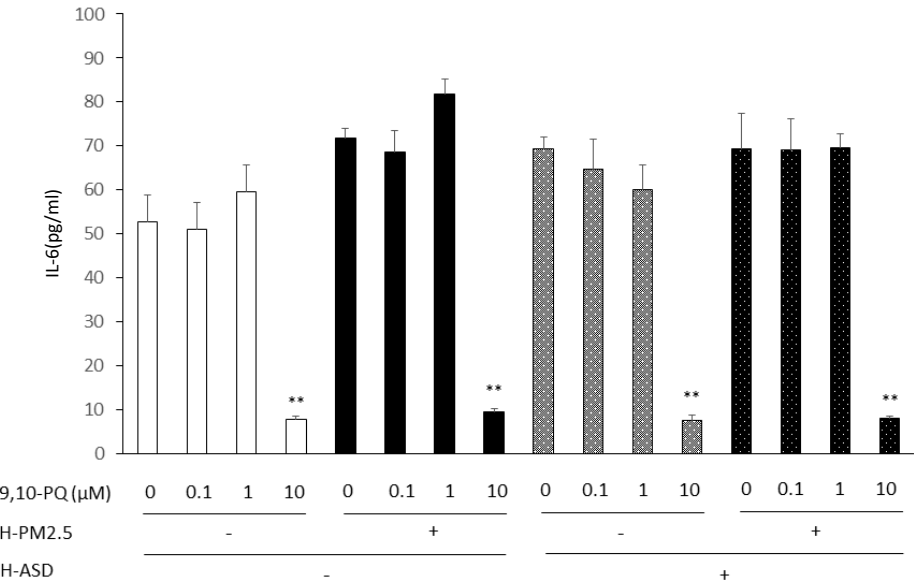
$p < 0.01$ versus 9,10-PQ at the same concentration.

9, 10-PQ (1 μ M)

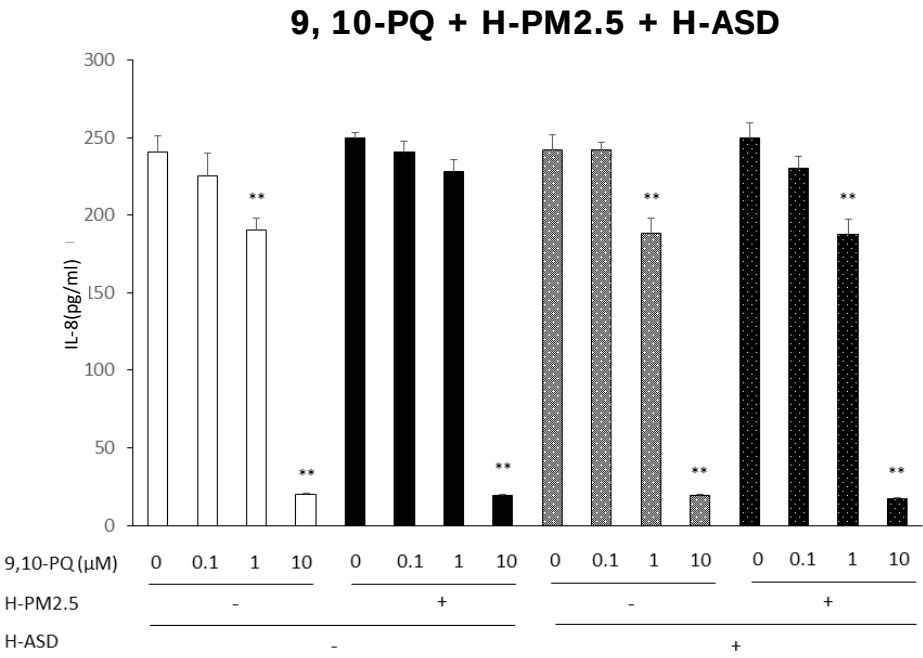


図(3)-3)-17. 9,10-PQとH-PM2.5、H-ASD、H-PM2.5+H-ASD の複合曝露が気道上皮細胞の細胞死に及ぼす影響
X軸：FITC-Annexin V 蛍光強度、Y軸：Ethidium Homodimer III

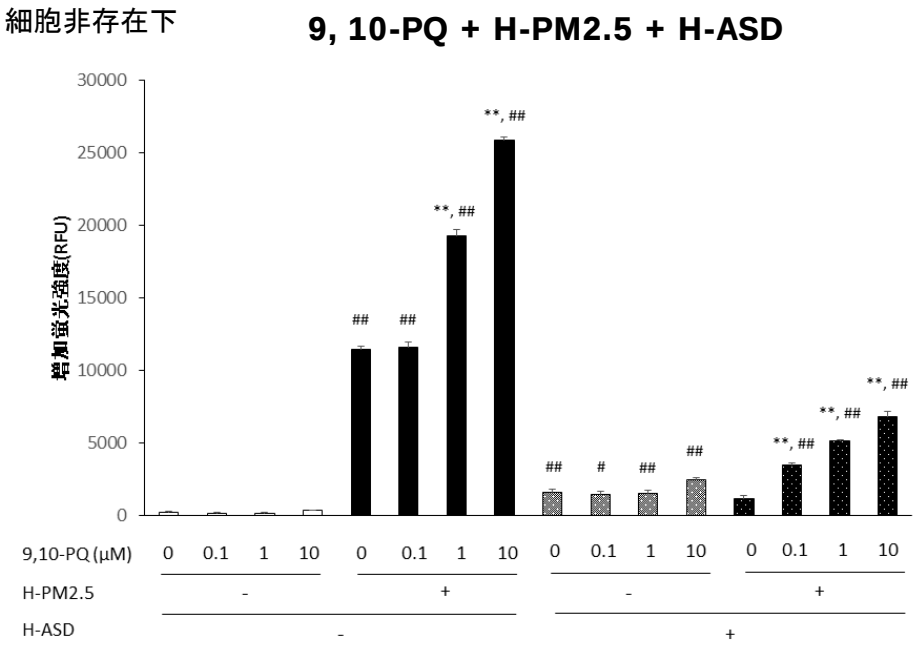
9, 10-PQ + H-PM2.5 + H-ASD



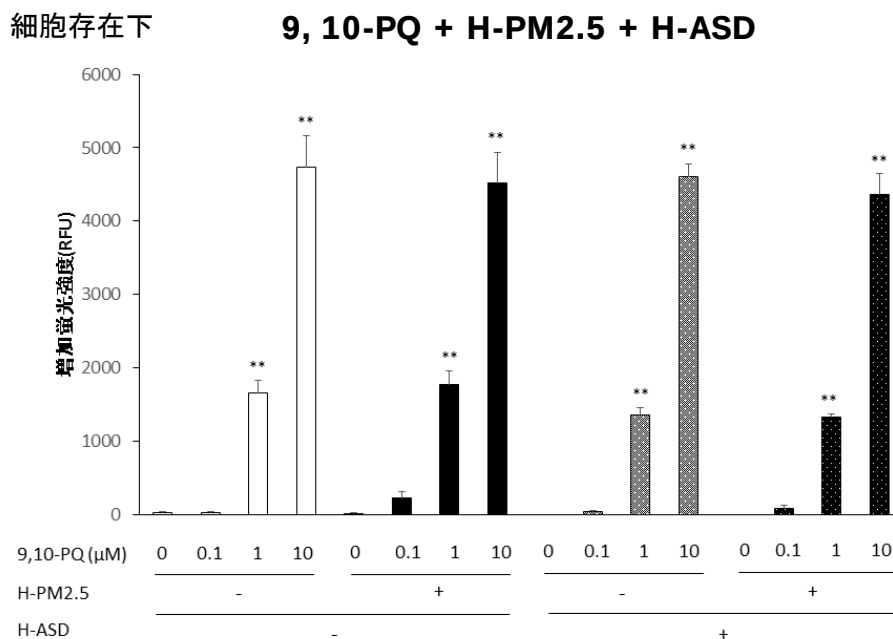
図(3)-3)-18. 9,10-PQとH-PM2.5、H-ASD、H-PM2.5+H-ASD の複合曝露が気道上皮細胞のIL-6産生に及ぼす影響
** $p < 0.01$ versus corresponding control.



図(3)-3)-19. 9,10-PQとH-PM2.5、H-ASD、H-PM2.5+H-ASD の複合曝露が気道上皮細胞のIL-8産生に及ぼす影響
** $p < 0.01$ versus corresponding control.



図(3)-3)-20. 9,10-PQとH-PM2.5、H-ASD、H-PM2.5+H-ASD の複合曝露が気道上皮細胞非存在下の活性酸素種産生に及ぼす影響
** $p < 0.01$ versus corresponding control.
$p < 0.01$, # $p < 0.05$ versus 9,10-PQ at the same concentration.



図(3)-3)-21. 9,10-PQとH-PM2.5、H-ASD、H-PM2.5+H-ASD の複合曝露が気道上皮細胞存在下の活性酸素種産生に及ぼす影響
** $p < 0.01$ versus corresponding control.

ii . 1,2-NQとH-PM2.5、H-ASD、H-PM2.5+H-ASD の複合曝露

細胞活性について検討したところ、10μMの1,2-NQ単独曝露では、Controlと比較して、細胞活性の上昇を示した(図(3)-3)-22)。また、Controlと比較して、H-PM2.5単独曝露、H-ASD単独曝露、H-PM2.5+H-ASD曝露では、細胞活性の低下傾向が認められたが、有意な変化はなかった。1, 2-NQ+H-PM2.5、1,2-NQ+H-ASD、あるいは、1,2-NQ+H-PM2.5+H-ASD複合曝露では、各粒子曝露と比較して、1,2-NQの濃度が10μMの時、細胞活性の上昇を示した。1,2-NQ+H-ASD、あるいは、1,2-NQ+H-PM2.5+H-ASD複合曝露は、同濃度の1,2-NQ単独曝露と比較して、細胞活性の低下を示した。

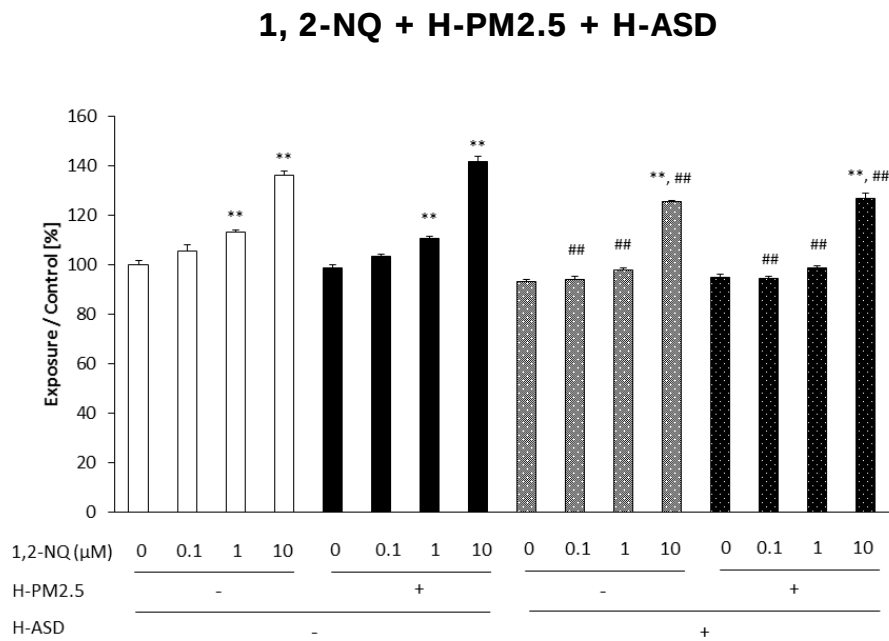
1,2-NQの濃度が10μMの時、細胞死について検討したところ、1,2-NQ単独曝露では、Controlと比較して、明らかな変化はなかった(図(3)-3)-23)。また、Controlと比較して、H-ASD単独曝露、H-PM2.5+H-ASD曝露では、死細胞の増加が確認された。一方、1,2-NQ+各粒子の複合曝露では、1,2-NQ+H-PM2.5複合曝露が、最も強く死細胞を誘導した。

IL-6の産生については、10μM 1,2-NQ単独曝露では、Controlと比較して、増加を示した(図(3)-3)-24)。また、H-PM2.5単独曝露、H-ASD単独曝露、H-PM2.5+H-ASD曝露では、変化はなかった。1,2-NQ+H-PM2.5、1,2-NQ+H-ASD、あるいは、1,2-NQ+H-PM2.5+H-ASDとの複合曝露では、各粒子単独曝露と比較して、1,2-NQの濃度が10μMの時に、増加を示した。IL-8の産生については、何れの曝露群においても、Controlと比較して、明らかな上昇は確認されなかった(図(3)-3)-25)。

気道上皮細胞非存在下の活性酸素種 (ROS) の産生量について検討したところ、1,2-NQ単独曝露では、Controlと比較して、10μMで活性酸素種の増加が確認された(図(3)-3)-26)。また、Controlと比較して、H-PM2.5の単独曝露により、活性酸素種の増加が、H-ASDの単独曝露により、活性

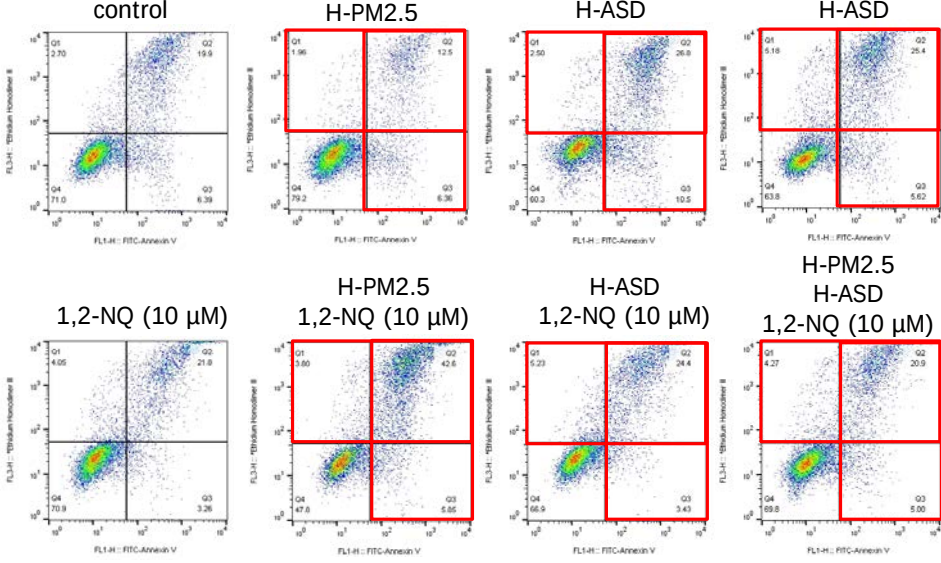
酸素種の軽微な増加が、H-PM2.5+H-ASDの単独曝露により、活性酸素種の増加がそれぞれ確認された。一方、1,2-NQとH-PM2.5の複合曝露では、粒子単独曝露と比較して、10μMで活性酸素種の産生が増大、H-ASDあるいは、H-PM2.5+H-ASDとの複合曝露では、1μM及び10μMで活性酸素種の増加が確認された。同濃度の1,2-NQ単独曝露と比較すると、1,2-NQ+各粒子の複合曝露は、高値を示した。

気道上皮細胞存在下の活性酸素種の産生量について検討したところ、1,2-NQ単独曝露では、Controlと比較して、10μMで活性酸素種の増加が確認された(図(3)-3)-27)。また、Controlと比較して、H-PM2.5、H-ASD、H-PM2.5+H-ASD単独曝露による変化は認められなかった。一方、1,2-NQとH-PM2.5、あるいは、H-ASD、H-PM2.5+H-ASDとの複合曝露では、粒子単独曝露と比較して、いずれも10μMで活性酸素種の増加が認められた。同濃度の1,2-NQ単独曝露と比較すると、特に、1,2-NQ + H-PM2.5複合曝露による活性酸素種の産生量が高値を示した。



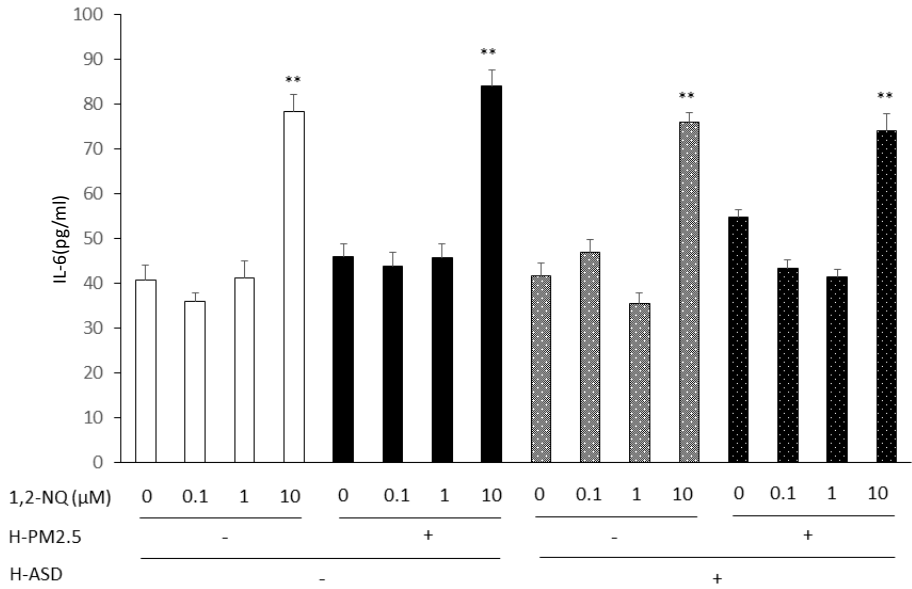
図(3)-3)-22. 1,2-NQとH-PM2.5、H-ASD、H-PM2.5+H-ASD の複合曝露が
気道上皮細胞の細胞活性に及ぼす影響
** $p < 0.01$ versus corresponding control.
$p < 0.01$ versus 1,2-NQ at the same concentration.

1, 2-NQ (10 μ M)

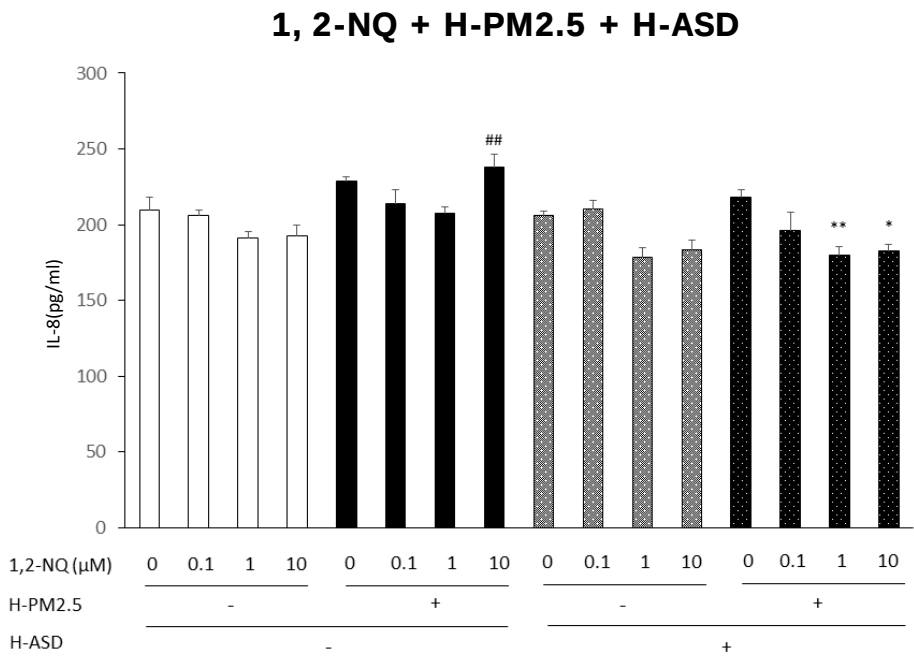


図(3)-3-23. 1,2-NQとH-PM2.5、H-ASD、H-PM2.5+H-ASD の複合曝露が
気道上皮細胞の細胞死に及ぼす影響
X軸：FITC-Annexin V 蛍光強度、Y軸：Ethidium HomodimerIII

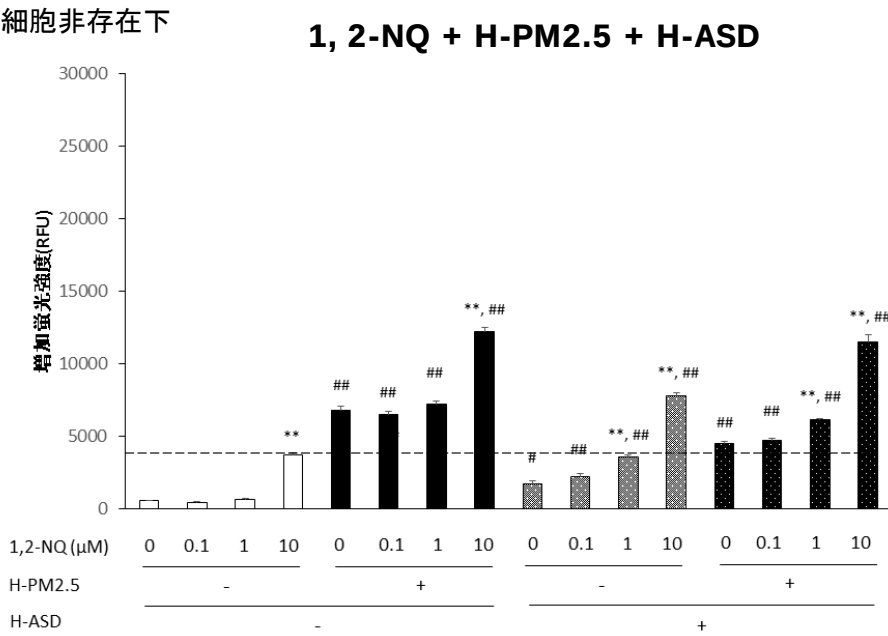
1, 2-NQ + H-PM2.5 + H-ASD



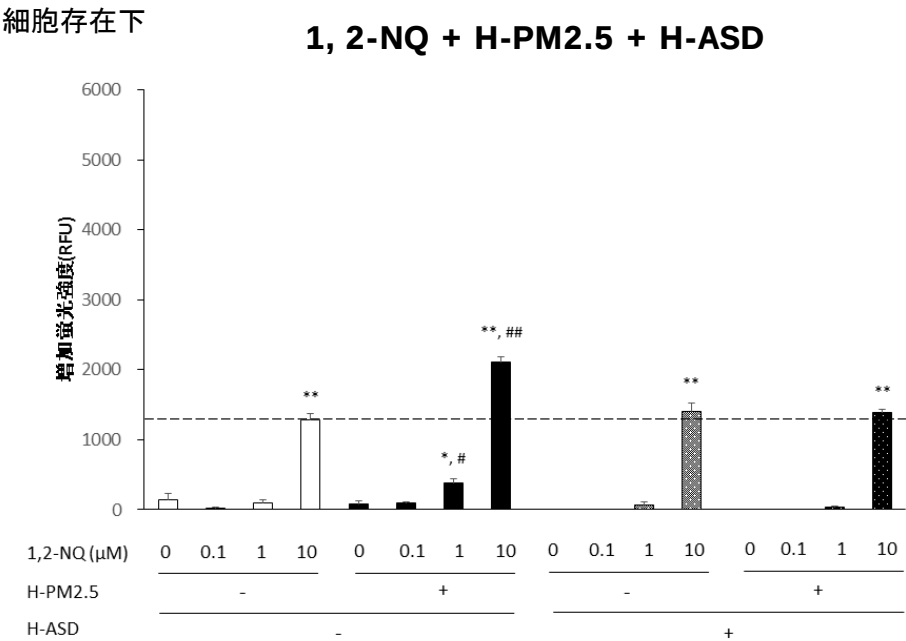
図(3)-3-24. 1,2-NQとH-PM2.5、H-ASD、H-PM2.5+H-ASD の複合曝露が
気道上皮細胞のIL-6産生に及ぼす影響
** $p < 0.01$ versus corresponding control.



図(3)-3)-25. 1,2-NQとH-PM2.5、H-ASD、H-PM2.5+H-ASD の複合曝露が気道上皮細胞のIL-8産生に及ぼす影響
** $p<0.01$, * $p<0.05$ versus corresponding control.
$p<0.01$ versus 1,2-NQ at the same concentration.



図(3)-3)-26. 1,2-NQとH-PM2.5、H-ASD、H-PM2.5+H-ASD の複合曝露が気道上皮細胞非存在下の活性酸素種産生に及ぼす影響
** $p<0.01$ versus corresponding control.
$p<0.01$, # $p<0.05$ versus 1,2-NQ at the same concentration.



図(3)-3)-27. 1,2-NQとH-PM2.5、H-ASD、H-PM2.5+H-ASD の複合曝露が
気道上皮細胞存在下の活性酸素種産生に及ぼす影響
** $p<0.01$, * $p<0.05$ versus corresponding control
$p<0.01$, # $p<0.05$ versus 1,2-NQ at the same concentration

b. 骨髓由来抗原提示細胞に及ぼす影響

9,10-PQ、あるいは、1,2-NQは、 H-PM2.5, H-ASD, H-PM2.5+H-ASDの存在下、非存在下において、何れも、細胞表面分子DEC205陽性細胞率やIL-6の産生を増加させることはなく、TNF-αは、検出限界以下であった（データ未掲載）。

以上、9,10-PQあるいは、1,2-NQ（0.1-10μM）は、気道上皮細胞に障害性、催炎症性反応、活性酸素種（ROS）産生を誘導した。H-PM2.5、H-ASD、H-PM2.5+H-ASDは、気道上皮細胞に対する障害性やROS産生を示した。また、粒子自体（加熱粒子）との複合曝露では、H-ASDよりも、H-PM2.5との複合曝露により、気道上皮細胞の細胞死を誘導し、呼吸器疾患を増悪しうることが示された。同様に、9,10-PQや1,2-NQは、H-PM2.5と共存した時に、細胞存在下あるいは非存在下において最も高いROS産生を示したことから、気道上皮細胞の細胞死には、9,10-PQや1,2-NQとH-PM2.5の細胞内ROS産生や細胞外酸化反応が深く関与する可能性が示唆された。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

- 1) PM2.5やASDの粒子自体（加熱粒子）、および、PAH、特に、BaP、9,10-PQ、1,2-NQがその単独曝露により呼吸器系や免疫系に影響を及ぼしうることを指摘し、これらが、気管支喘息、肺炎等の悪化要因として重要であることを指摘した。具体的には、気道上皮細胞に対しては、障害性や催炎症性反応を、抗原提示細胞に対しては、細胞表面分子CD86発現等の増加を介した活性化を誘導することを示した。
- 2) PM2.5やASDの粒子自体（加熱粒子）とBaP、9,10-PQ、1,2-NQの相加・相乗的な複合影響の存在を世界で初めて指摘した。具体的には、BaPと加熱PM2.5や加熱ASDとの複合曝露は、相加的に、細胞表面分子CD86発現等の増加を介して抗原提示能を活性化させた。9,10-PQや1,2-NQは、加熱ASDよりも、加熱PM2.5との複合曝露により、相加・相乗的な細胞内ROS産生あるいは細胞外酸化反応を誘導し、気道上皮細胞の障害性を増強することを指摘した。
- 3) 抗原提示細胞の細胞表面分子CD86発現や、PM2.5やASDの細胞内ROS産生や細胞外酸化反応が影響発現メカニズムとして重要であり、かつ、バイオマーカーとして有用であることを示した。

(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>

PM2.5やASDの健康影響要因を絞り込んだことや、PM2.5やASDの粒子自体とBaP、9,10-PQ、1,2-NQの相加・相乗的な複合影響の存在を世界で初めて指摘したことにより、国内や国際的なPM2.5問題を解決するための政策上の基礎資料として役立てる。具体的には、

- 1) 呼吸器疾患の悪化の要因を絞り込んだことから、PM2.5や黄砂全体のモニタリングだけでなく、BaPのほかに、新たに、9,10-PQや1,2-NQを有害大気汚染物質として、モニタリング対象物質の候補として挙げる事ができた。
- 2) 抗原提示細胞の細胞表面分子CD86発現や、PM2.5やASDの細胞内ROS産生や細胞外酸化反応が影響発現メカニズムとして重要であり、かつ、バイオマーカーとして有用であることを示したことから、これらの指標を黄砂やPM2.5の疫学調査指標の候補や、黄砂やPM2.5の簡易健康影響評価の指標候補として挙げる事ができた。

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) A. HONDA, T. SAWAHARA, T. HAYASHI, K. TSUJI, W. FUKUSHIMA, M. OISHI, G. KITAMURA, H. KUDO, S. ITO, S. YOSHIDA, T. ICHINOSE, K. UEDA, H. TAKANO: *J Appl Toxicol.* 37, 5, 583-590 (2017)
“Biological factor related to Asian sand dust particles contributes to the exacerbation of asthma”
- 2) P.H. CHOWDHURY, G. KITAMURA, A. HONDA, T. SAWAHARA, T. HAYASHI, W. FUKUSHIMA, H. KUDOU, S. ITO, S. YOSHIDA, T. ICHINOSE, K. UEDA, H. TAKANO: *Environ Toxicol* (2017)
“Synergistic effect of carbon nuclei and polyaromatic hydrocarbons on respiratory and immune responses” (in press)

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) 本田晶子：専門医のためのアレルギー学講座．XVI.環境因子とアレルギー．日本アレルギー学会、63, (9), 1205-1215 (2014)
「4. 環境化学物質とアレルギーに関する研究の進展」

<その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 本田晶子、高野裕久：炎症と免疫、24、6、10-14 (2016)
「気道炎症と環境汚染物質」

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 本田晶子、澤原隆紘、林智裕、辻堅志、福島渉、大石瑞貴、北村岳、工藤仁美、伊藤翔、吉田成一、市瀬孝道、上田佳代、高野裕久：第22回日本免疫毒性学会 (2015)
「黄砂に付着する生物的・化学的成分が呼吸器・免疫系に及ぼす影響」
- 2) 本田晶子、高野裕久：第56回大気環境学会 (2015)
「微小粒子状物質成分の健康影響～実験研究的アプローチからの知見～」
- 3) P.H. CHOWDHURY, G. KITAMURA, A. HONDA, T. SAWAHARA, T. HAYASHI, W. FUKUSHIMA, H. KUDOU, S. ITO, K. UEDA, H. TAKANO: 第38回京都大学環境衛生工学研究会シンポジウム (2016)
“Effects of Benzo(a)pyrene, 9,10-phenanthraquinone and 1,2-naphthoquinone on respiratory and immune responses.”

(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。」

(4) 黄砂とPM2.5のアレルギー性結膜炎の増悪作用とそのメカニズム解明

東京女子医科大学東医療センター 眼科学教室

三村達哉

平成26～28年度累計予算額：13,589千円（うち平成28年度：2,411千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

環境変化に伴い、様々な環境因子がアレルギーを誘発・増悪させることがわかってきた。自然由来の火山粉塵や土壌粒子、黄砂などの越境粒子、人為起源の排気ガス、工場煤煙、シックハウス、受動喫煙などが環境因子となり、生体内に影響を及ぼす。眼表面は外気に接するために、直接的に大気中の環境因子の影響を受ける。アレルギー性結膜炎を引き起こす屋外抗原としては花粉が最も重要であるが、大気中粒子もアレルギー性結膜炎の増悪に関与していると考えられる。

本研究では、大気中粒子のうちPM2.5と黄砂に焦点を絞り、花粉性アレルギー性結膜炎の増悪と大気中粒子との関係について調べた。その結果、以下の5点について、明らかにした。1) 疫学調査では大気中PM2.5の濃度とアレルギー性結膜炎の患者数が相関することが明らかになった。2) 臨床研究では、アレルギー性結膜炎の患者について、花粉や真菌類に対する反応と、黄砂による反応が相関することが明らかになり、黄砂から花粉や微生物を除くと、反応が低下することから、黄砂に含まれる植物や微生物に対するアジュバント（抗原性を高める作用）としてアレルギー症状を悪化させている可能性が示唆された。3) スギ花粉誘発性アレルギー性結膜炎のマウスモデルでは、PM2.5と黄砂によりスギ花粉症が悪化した。またPM2.5と比較して粒子の大きい黄砂は角膜上皮や結膜上皮を物理的に損傷し、上皮バリアーを障害することで、結膜炎症状が悪化すると考えられた。4) Toll like Receptor (TLR) のアダプター蛋白であるMyD88の欠損(-/-)マウスを用いた実験では、WTマウスと比較してMyD88-/-マウスではPM2.5と黄砂によるアレルギー性結膜炎の増悪作用が減弱した。このことから大気中粒子中の因子がTLRを介して、アレルギー症状を誘発していると考えられた。5) 培養ヒト結膜上皮細胞を用いた研究ではPM2.5による刺激により炎症系サイトカインが増加し、直接的にも結膜上皮細胞を刺激することにより炎症が誘導する効果があると考えられた。これらの研究結果は、大気中粒子を含む環境因子が花粉性アレルギー性結膜炎を増悪させる作用があることを示唆している。その対策としては、特に黄砂飛来時において、大気中粒子の眼瞼結膜への侵入を防御することと、結膜嚢内に入った場合には結膜嚢内の黄砂成分を洗い流すことが大事であると考えられる。

[キーワード]

アレルギー性結膜炎、花粉、環境因子、黄砂、PM2.5

1. はじめに

眼表面は常に外部からの抗原にさらされており、我々は侵入してきた抗原に対して自分の体を守るために、免疫応答を働かせて排除しようとする。しかし、侵入してきた抗原に対して、免疫システムが過剰に反応してしまうと、アレルギー性結膜炎が発症する。アレルギー性結膜炎の原因としてはハウスダストや動物の毛などの屋内抗原と、花粉などの屋外抗原が主要な抗原として考えられている。一方、花粉症やハウスダストなどでは説明のつかないアレルギー性結膜炎の中で、大気中の環境因子がアレルギーの誘発や増悪に関与することが分かってきた。大気中には、ディーゼル（排気）微粒子、PM2.5、黄砂を始めとする粒子状物質が浮遊しており、これらの粒子状物質は呼吸器に取り込まれるだけでなく、眼表面粘膜にも付着し、眼炎症を引き起こすと考えられる。本サブテーマでは粒子状物質の代表であるPM2.5と黄砂がアレルギー性結膜疾患の発症および重症化に及ぼす影響について調査する。

2. 研究開発目的

サブテーマ（4）では、黄砂やPM2.5などの複合大気汚染物質による眼アレルギーの症状の増悪メカニズムを疫学研究、臨床研究、動物実験、培養細胞を用いた実験により解明することを目的とする。1) 疫学研究では大気中のPM2.5の濃度の変動とアレルギー性結膜炎患者数の変動の相関を調べる。2) 臨床研究ではアレルギー性結膜炎患者における、黄砂と、その関連物質の皮膚刺激テストを施行し、黄砂によるアレルギー反応を調べる。3) 動物実験ではマウス眼のスギ花粉症モデルにPM2.5あるいは黄砂を加えることによりスギ花粉症増悪のメカニズムを調べる。4) 微生物成分によるアレルギー増悪の影響を調べるために、MyD88欠損(-/-)マウスを用いて、大気中粒子状物質の微生物成分がTLRを介して眼アレルギー症状を増悪させるメカニズムについて調べる。5) 培養細胞を用いた実験では培養ヒト結膜上皮細胞の培養液中にPM2.5を添加し、PM2.5による刺激により炎症が増悪するか調べる。

3. 研究開発方法

1) 疫学調査：大気中PM2.5浮遊濃度とアレルギー性結膜炎患者数の変動の相関

アレルギー性結膜炎の症状を主訴に東京都練馬区の眼科クリニックを来院した患者数を1日毎に調査した。環境省ライダー観測結果より、練馬区の大気中PM2.5、オキシダント、一酸化窒素、二酸化窒素、窒素酸化物、一酸化炭素、メタン、非メタン炭化水素、全炭化水素、風速、温度、湿度の1時間毎のデータから24時間の平均値を毎日、算出した。更に、因子毎に1週間（全44週間）の平均値を求め、アレルギー性結膜炎患者来院数に対する各因子の相関ならびに多変量解析を行った。また、花粉の少ない5-7月と秋の花粉シーズン8-10月に分けて解析をした。

2) 黄砂のアレルギー性結膜炎患者への刺激テスト

臨床研究では黄砂、黄砂抽出液、加熱黄砂と、その関連物質の皮膚刺激テスト（SPT）を施行し、大気汚染物質によるアレルギー症状の変化を調べた。健常者（コントロール群：N=10）、春季発症アレルギー性結膜炎患者（アレルギー群：N=10）、および春季発症アレルギー性結膜炎とアトピー性皮膚炎合併患者（アトピー群：N=3）を対象とした。SPTに用いた誘発抗原は①

黄砂からの抽出液（黄砂以外の微生物、花粉、大気汚染物質を含む）、②抽出後残存黄砂（黄砂単独）、③黄砂主成分である二酸化珪素、④スギ花粉の4種とした。更に、黄砂以外の抗原として次の14種類を用いた。その抗原の種類としては、花粉（スギ、カモガヤ、ブタクサ、ヨモギ）、ハウスダスト（ヤケヒョウヒダニ、コナヒョウヒダニ）、動物（ネコ、イヌ）、真菌（アルテルナリア、カンジダ、アスペルギルス）、食べ物（牛乳、卵白、小麦）などである。

SPTの方法は次の手順に従って行った。①アルコール綿で清拭、乾燥させた被験者の前腕屈側皮膚上に1滴を滴下。②25ゲージの注射針で滴下部分を出血しない程度に穿刺。③穿刺1-2分経過後、滴下液をガーゼで軽く抑えて吸い取る。判定は15分後にテスト部位の皮膚状態を観察し、以下の基準に従って判定した。陽性：膨疹径が4mm以上あるいは対照の2倍以上、又は発赤径が15mm以上。陰性：陽性の基準を満たさないもの。膨疹、発赤があっても対照と差異のないものは陰性と判定した。各群におけるSPTの膨疹径/発赤径を測定し、陽性率を調べた。

3) PM2.5と黄砂のスギ花粉誘発性アレルギー性結膜炎モデルマウスへの影響

マウス点眼モデルを使用し、マウス眼に生理食塩水、スギ花粉、PM2.5、黄砂、スギ+PM2.5、スギ+黄砂により結膜刺激を行った。各群はN=8とした。結膜刺激1時間後と24時間後に、結膜充血と浮腫の重症度を調べた。結膜を撮影し、Image Jソフトを用いて、血管占有面積を測定した。また結膜を採取し、結膜中のTotal IgE量や炎症性サイトカインの濃度を測定した。更に結膜組織の組織学的検討を行った。各項目において点眼前、点眼後の比較、更に点眼後の各群の比較をすることにより、黄砂のスギ花粉症増悪作用について調べた。

4) MyD88欠損(-/-)マウスを用いたPM2.5と黄砂のスギ花粉症増悪効果

MyD88-/-マウスを用いて、スギ花粉と粒子状物質を点眼し、結膜組織中の炎症性分子を調べた。WTのBALB/cA Jcl マウスと MyD88-/-マウスに①生理食塩水、②スギ花粉抗原、③PM2.5、④スギ+PM2.5、⑤黄砂、⑥スギ+黄砂を点眼し、点眼24時間後の眼症状（浮腫、眼擦過回数）と結膜の炎症性分子の発現を調べ、組織学的検討を行った。

5) 培養ヒト結膜上皮細胞を用いたPM2.5による炎症効果

培養ヒト結膜上皮細胞を用いて増悪候補因子のアレルギー増悪との関連を調べた。ヒト結膜上皮細胞を 5×10^4 cells/well in a 24-well plateの密度で培養し、confluentとなった時点で、24時間無血清培養し、培養液中に0、1、10、50、100 μ g/mlの濃度になるようにPM2.5を添加した。PM2.5による刺激後、12時間、24時間、48時間培養し、培養上清を採取し、炎症性サイトカインのIL-6濃度と好酸球の遊走活性を持つRANTESの濃度をELISAにより測定した。

4. 結果及び考察

1) 疫学調査：大気中PM2.5浮遊濃度とアレルギー性結膜炎患者数の変動の相関

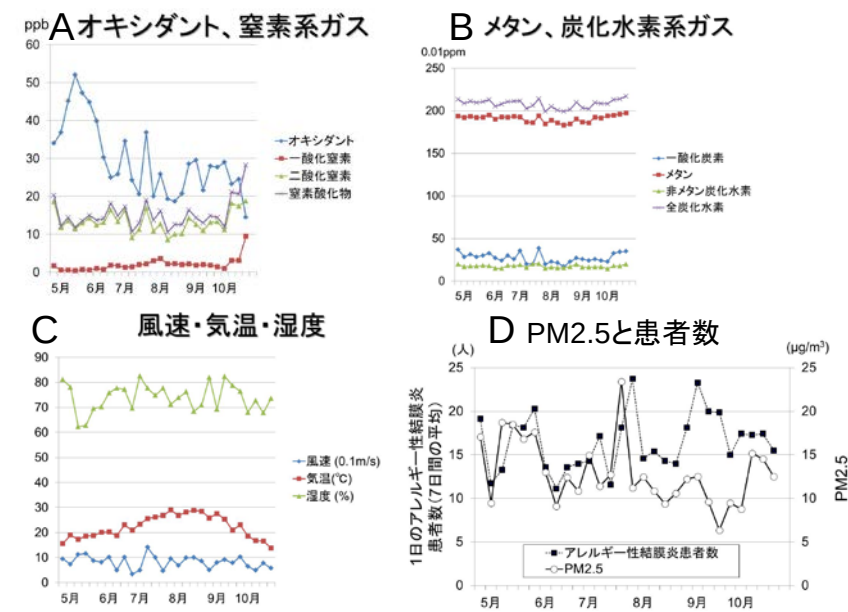
期間中のアレルギー性結膜炎の全患者来院数は5,255人であった。期間中のアレルギー性結膜炎の患者数の変動と大気中の各因子の変動を図(4)-1)-1 に示す。5-8月の花粉の少ない時期ではPM2.5のみがアレルギー性結膜炎患者数と相関した（ $r=0.62$ 、 $p=0.0177$ 、表(4)-1)-1）。一方、8-10月の秋の花粉シーズンでは相関する因子がなかった。多変量解析により5-7月のアレルギー性結

膜炎患者数の説明変数としてPM2.5が選択されたが（オッズ比=9.05、 $p=0.0463$ ）、8-10月は有意な説明変数はなかった。8-10月は秋の花粉や屋内抗原による通年性アレルギーの影響によりアレルギー性結膜炎の患者数が増加するため、PM2.5のアレルギー性結膜炎への関与は少ないと考えられる。

では大気中のPM2.5を始めとする大気浮遊物質濃度はなぜアレルギー性結膜炎の患者の変動と相関するのであろうか。PM2.5が増える時期にはアレルギー疾患の症状が悪化しやすいということは良く知られており、大気汚染物質が間接的にもアレルギー症状を悪化させていると考えられる。花粉は水分を吸収すると破裂することは以前より知られているが、PM2.5や黄砂などに含まれる大気汚染物質の硫酸塩や硝酸塩が水分のある状態で花粉に接着すると、花粉の皮殻が損傷し、花粉が更に水分を吸収することにより破裂することが分かっている。すなわち、花粉は郊外から都市部に移行する程、大気汚染物質により花粉の皮殻が破壊され、内部のアレルゲンが大気中に飛散すると考えられる。地上に舞い降りた花粉が自動車に踏まれて破裂することにも影響している。スギ花粉では花粉表面に付着する分子量約40,000の塩基性タンパク質であるCryj 1とスギ花粉内部のデンプン粒および花粉内膜に局在する分子量約37,000の塩基性タンパク質であるCryj 2が、花粉の破裂により飛散することが知られている。従って、PM2.5などの大気中粒子にふくまれる成分によって、花粉の中のアレルゲンが放出されやすくなるために、間接的にアレルギーの患者数の変動に影響している可能性が考えられる。

PM2.5と光化学オキシダントとの関係も影響している可能性がある。本研究において、PM2.5と大気中の他の因子との相関を調べると、PM2.5は二酸化窒素（ $r=0.59$ 、 $p=0.0213$ ）、一酸化炭素（ $r=0.74$ 、 $p=0.0016$ ）と相関した。また、アレルギー性結膜炎の罹患率はオキシダント（ $r=0.45$ ）、二酸化窒素（ $r=0.26$ ）、窒素酸化物（ $r=0.24$ ）、一酸化炭素（ $r=0.41$ ）、メタン（ $r=0.41$ ）、全炭化水素（ $r=0.43$ ）と相関した。光化学スモッグの要因となる酸化性物質は粘膜を傷害するため、大気中の酸化性物質濃度が高くなる程、外気に暴露されやすい粘膜の一つである結膜が直接的に障害されている可能性も考えられる。光化学オキシダントは、窒素酸化物と炭化水素とが紫外線による光化学反応を起こして生成された二次的汚染物質で、強力な酸化作用を持ち、光化学スモッグの原因となる。これらの強力な光化学オキシダントの酸化作用により花粉の皮殻が破壊され、内部のアレルゲン放出が誘導されることで、間接的にアレルギー罹患率を上げている可能性も考えられる。

またPM2.5は5-7月において風速と相関し（ $r=0.32$ ）、逆に湿度とは負に相関した（ $r=-0.53$ ）。これは風が強い日はPM2.5が大気中に漂い、更に湿度が低い程、PM2.5が増える可能性を示唆している。このことから、風の強い日や湿度が低い日にはPM2.5による眼障害に注意を要すると考えられる。



図(4)-1-1. アレルギー性結膜炎患者数(7日間の平均)と大気各因子の変動(7日間の平均)

(A)オキシダント、窒素系ガスは季節変動が大きい。
(B)メタン系ガス、炭化水素系ガスは変動が少ない。
(C)大気中の風速、気温、湿度は季節変動をするが、アレルギー性結膜炎の患者数との相関はない。
(D)PM2.5の浮遊濃度(µg/m³、7日間の平均)とアレルギー性結膜炎の患者数の変動。似た変動パターンを示す。

表(4)-1-1. アレルギー性結膜炎患者数と大気中因子との相関

Variable	相関係数			
	5月-7月		8月-9月	
	R	P Value	R	P Value
オキシダント	0.45	0.1096	0.26	0.3433
一酸化窒素	-0.06	0.8479	-0.18	0.5132
二酸化窒素	0.26	0.3703	-0.01	0.9710
窒素酸化物	0.24	0.4179	-0.10	0.7192
一酸化炭素	0.41	0.1452	0.03	0.9247
メタン	0.41	0.1475	-0.09	0.7427
非メタン炭化水素	0.18	0.5381	-0.14	0.6116
全炭化水素	0.43	0.1271	-0.12	0.6651
風速	0.12	0.6721	-0.01	0.9822
気温	-0.45	0.1057	0.12	0.6588
湿度	-0.30	0.2901	0.08	0.7858
PM2.5	0.62	0.0177	0.03	0.9069

2) 黄砂のアレルギー性結膜炎患者への刺激テスト

黄砂単独、黄砂抽出液、加熱黄砂に対するSPTの陽性率はいずれもコントロールの健常者と比較して、アレルギー性結膜炎患者（アレルギー群）およびアトピー性角結膜炎（アトピー群）の患者において有意に高かった（表(4)-2)-2、 $p<0.05$ ）。アレルギーグループにおいてはSPTの陽性率は黄砂単独が70%、黄砂抽出液が50%、加熱黄砂が20%、二酸化珪素が20%、PBSが0%であり、4群間に有意差が見られた（ $p=0.0068$ ）。花粉から植物や微生物を取り除くことにより、主成分である二酸化珪素とほぼ同様の反応に低下することから、この結果は黄砂に含まれる植物や微生物がアレルギー反応を引き起こしている可能性が考えられる。

アレルギー群において、4種類の花粉ならびに真菌類に対するSPTの発赤の大きさは、黄砂に陰性反応を示す患者（ $N=3$ ）よりも陽性反応を示す患者（ $N=7$ ）において、有意に大きかった（ $p<0.05$ ）。一方、ハウスダスト、動物、食べ物の抗原では両群間に差は無かった。黄砂に対するSPTの反応は、花粉4種（ $r=0.71$ 、 $p=0.0104$ ）と真菌類3種（ $r=0.57$ 、 $p=0.0426$ ）に対するSPTの反応と有意に相関した。多変量解析では、4種類の花粉（オッズ比=2.54、 $p=0.0138$ ）と3種の真菌類（オッズ比=1.84、 $p=0.0273$ ）が黄砂に対するSPTの反応の有意な説明変数として選択された（表(4)-2)-3）。カテゴリカル解析により、黄砂反応は花粉系4種、カビ（真菌）3種と相関する一方で、食物系3種や動物系2種、ハウスダスト系2種と相関しないという結果から、黄砂に付着した花粉や微生物の死骸などのアジュバント効果が、アレルギー症状を増悪させていると考えられる。またこれまでの研究により黄砂は様々な微生物や花粉を含むことが証明されており、黄砂を防御することが、アレルギー症状の緩和につながると考えられる。

表(4)-2)-2. 黄砂抽出液による刺激テストの陽性反応

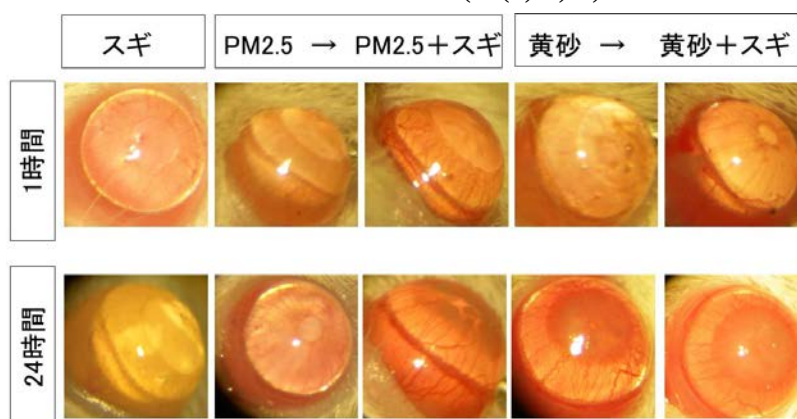
皮膚刺激テスト	SiO ₂	花粉	微生物	健常者 N=10	アレルギー N=10	アトピー N=3	P value 3群比較
黄砂単独	○	○	○	0 (0%)	7 (70%)	3 (100%)	0.0007
黄砂抽出液	○	-	○	0 (0%)	5 (50%)	3 (100%)	0.0025
加熱黄砂	○	-	-	0 (0%)	2 (20%)	2 (67%)	0.0270
SiO ₂	○	-	-	0 (0%)	2 (20%)	1 (33%)	0.2214
生理食塩水	-	-	-	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-
P value 5群比較				-	0.0068	0.5194	

表(4)-2)-3. 黄砂に対する反応に対する、各因子のカテゴリカル解析を用いた相関と多変量解析

	相関係数		多変量解析	
因子	相関係数	P値	オッズ比	P値
花粉4種	0.71	0.0104	2.54	0.0138
ハウスダスト2種	0.27	0.2294	1.35	0.2400
動物2種	0.24	0.2484	0.48	0.0598
カビ3種	0.57	0.0426	1.84	0.0273
食べ物3種	-0.09	0.5933	1.26	0.3926

3) PM2.5と黄砂のスギ花粉誘発性アレルギー性結膜炎モデルマウスへの影響

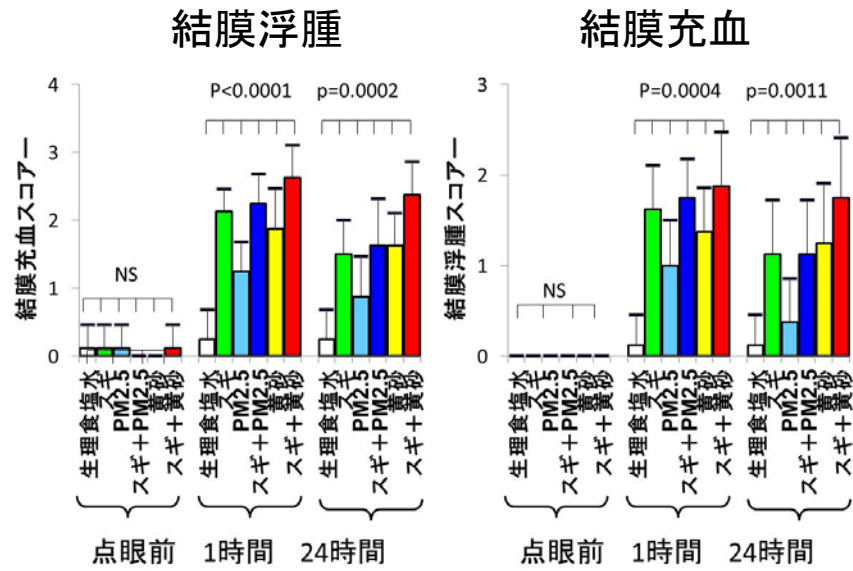
黄砂がアレルギー性結膜炎症状を悪化させることを直接的に証明するためには、結膜刺激テスト（眼粘膜誘発試験：conjunctival provocation test）を行う必要がある。これは皮膚テストと同様に、各アレルゲンを含んだ溶液を、結膜に点眼することにより、点眼後の結膜充血や浮腫などを指標にアレルギー増悪作用、あるいは治療効果を調べる方法である。我々は、マウスモデルを使って、黄砂によるスギ花粉誘導結膜炎の増悪作用を調べたマウス眼球にスギ、PM2.5、黄砂、スギ+PM2.5、スギ+黄砂を点眼したところ、いずれも1時間後に結膜浮腫と充血が見られるが、24時間後にはスギとPM2.5では低下し、黄砂あるいはスギ+黄砂では結膜浮腫ならびに充血が持続し、角膜上皮びらんが見られた。これらの結果はPM2.5や黄砂などの大気中浮遊物質による結膜炎増悪メカニズムとして、アレルギー免疫応答による影響だけでなく、黄砂の物理的刺激が、結膜炎症状を増悪させていると考えられる(図(4)-3)-2)。



図(4)-3)-2. マウス眼におけるPM2.5と黄砂の眼粘膜誘発試験

各群8眼。スギ単独、PM2.5単独、スギ+PM2.5、黄砂単独、スギ+黄砂の点眼後、1時間後と24時間後に観察。スギ単独点眼では1時間後に充血が見られるが、24時間で改善する。PM2.5および黄砂点眼によりスギ花粉によるアレルギー性結膜炎の増悪作用が見られ、その作用はPM2.5よりも黄砂の方が強い。24時間後では黄砂単独点眼でも粒子の結膜刺激作用による充血が見られる。

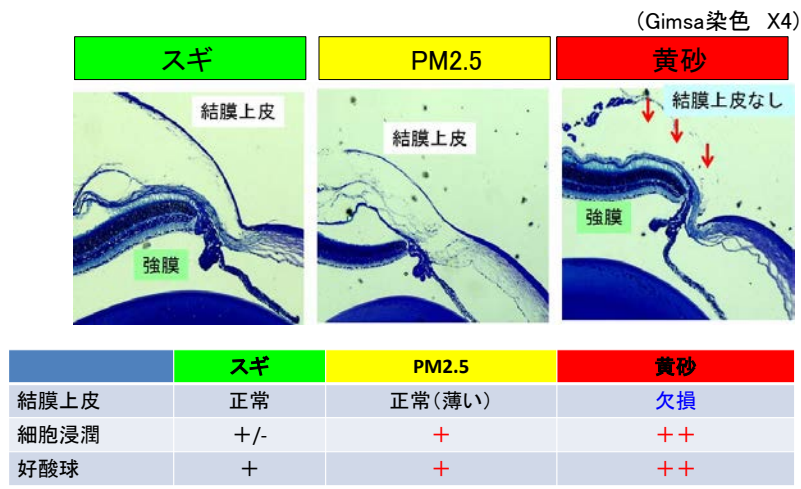
結膜充血スコアと結膜浮腫スコアも同様に、スギ花粉単独よりも、PM2.5あるいは黄砂をスギ花粉に加えることにより、スコアが悪化した(図(4)-3)-3)。一部のマウスでは眼球を擦過することにより、結膜下出血ならびに、眼球破裂をきたした。結膜内の Total IgE 量はスギ+黄砂を点眼した群で最も高かった。



図(4)-3-3. マウス眼における黄砂の眼粘膜誘発試験による結膜充血と浮腫のスコア

スギ単独、PM2.5単独、スギ+PM2.5、黄砂単独、スギ+黄砂の点眼後、1時間後と24時間後のスコアの平均値±標準偏差を示す(n=8)。1時間と24時間値ともに、スギ単独よりもPM2.5と黄砂を加えると、スコアが悪化する。

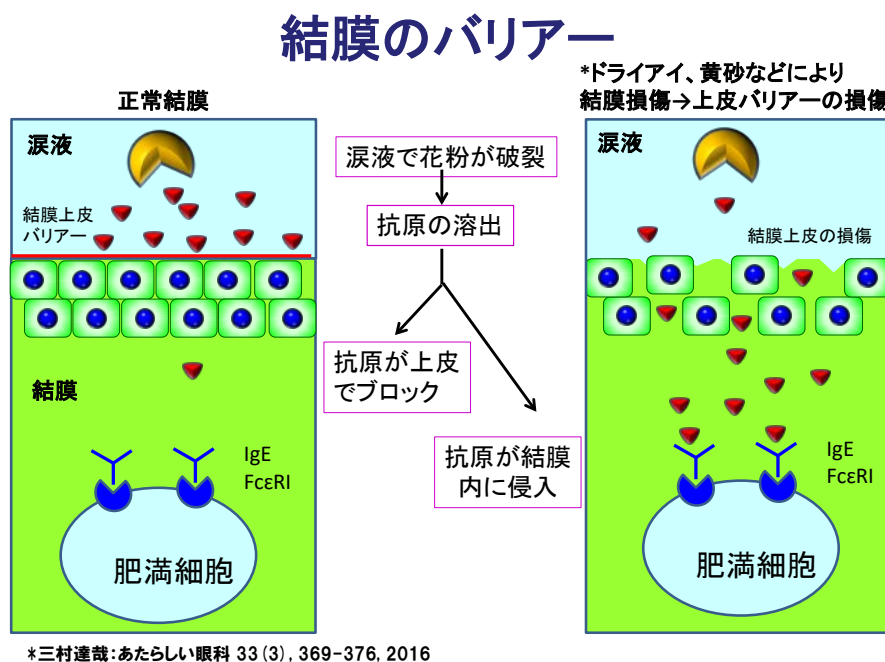
また、いずれの群においても組織学的に結膜内への好酸球の浸潤が見られた(図(4)-3)-4)。その効果は PM2.5 より黄砂の方が強く、粒子の大きい方がより強い作用を引き起こすと考えられる。



図(4)-3-4. マウス眼にスギ花粉、PM2.5、黄砂を点眼して24時間後の組織切片

PM2.5では結膜上皮が薄くなり、黄砂では結膜上皮が欠損している。上皮障害によるバリアー機能の低下が、細胞浸潤を増加させている。

これらの結果から、大気中の浮遊粒子による結膜炎発症のメカニズムとして考えられるのは次の二点である。一つ目は、曝露後早期のスギ花粉による結膜炎の増悪作用で、二つ目は結膜嚢内に残留した浮遊粒子が、瞬目時の結膜擦過などにより物理的に結膜に刺激を与えることで、結膜炎症状を引き起こす作用である(図(4)-3)-5)。これらの結果から、黄砂飛来時期に結膜嚢内の黄砂成分を洗い流すことが、結膜炎症状の軽減につながると考えられる。



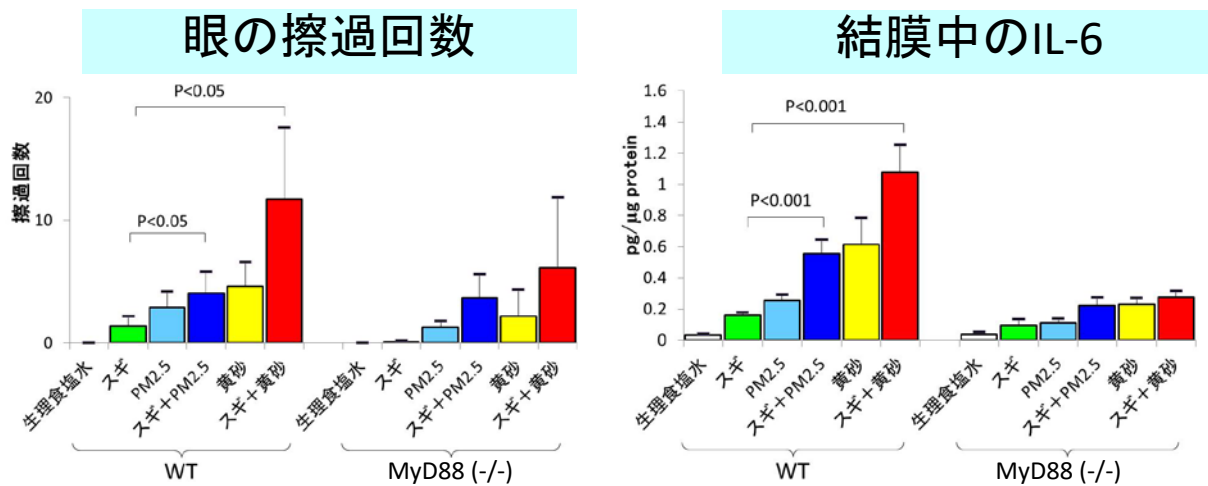
図(4)-3)-5. 結膜の上皮バリアーの模式図

(左)正常の結膜では上皮バリアーにより抗原の結膜下への侵入を防御している。
 (右)黄砂などの異物により結膜上皮びらんが生じると、結膜上皮障害によるバリアー機能が低下し、抗原が結膜下へ侵入しやすくなるため、アレルギー性結膜炎が増悪する可能性がある。

4) MyD88欠損(-/-)マウスを用いたPM2.5と黄砂のスギ花粉症増悪効果

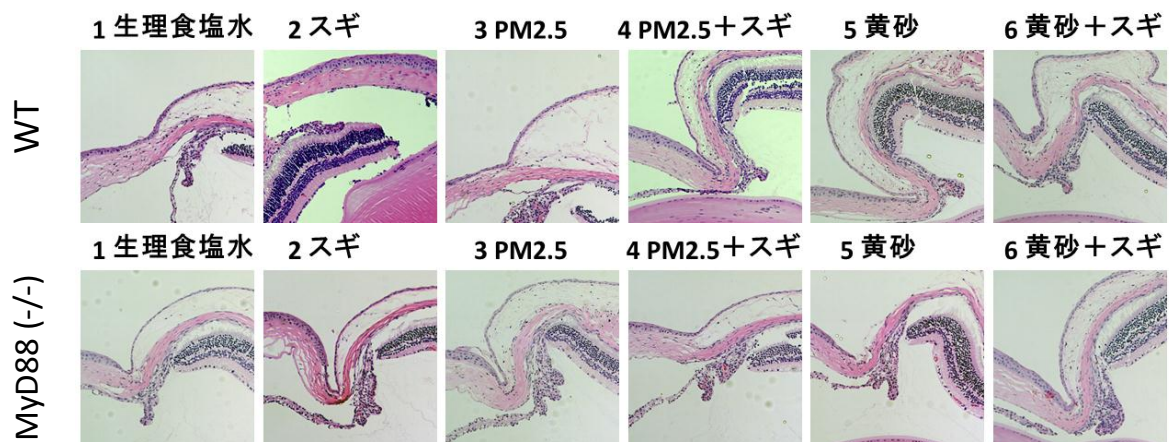
WTマウスとMyD88^{-/-}マウスに、スギ花粉、PM2.5、黄砂単独、あるいはスギとPM2.5、スギと黄砂を点眼し、その効果を各群で比較した。WTマウスではスギ花粉単独よりもPM2.5と黄砂を加えた方が、眼症状(眼擦過回数)と結膜内の炎症は増悪し、重症度はPM2.5よりも黄砂を加えた方が強かった(図(4)-4)-6)。

一方、MyD88^{-/-}マウスを用いた実験ではWTマウスと比較して、PM2.5や黄砂による眼炎症の増悪が減弱した。結膜組織中の炎症系分子であるIL-6も同様の結果を示した(図(4)-4)-6)。これらの結果により、大気中浮遊物は物理的刺激により結膜炎を引き起こし、その効果はPM2.5よりも黄砂の方が強いことが示唆された。また組織学的検討では、WTマウスではスギ単独点眼よりもPM2.5や黄砂を加えた方が、結膜浮腫が強くなり、一方、MyD88^{-/-}マウスではWTと比較して結膜浮腫が減弱した(図(4)-4)-7)。従って、大気中浮遊物に含まれる微生物成分などがTLRを介してスギ花粉症を悪化させていると考えられる。



図(4)-4)-6). WTマウスとMyD88(-/-)マウスを用いた、PM2.5と黄砂のスギ花粉症モデルへの影響

PM2.5と黄砂を加えることにより、擦過回数の増加、結膜中の炎症性サイトカインIL-6濃度が増加し、スギ花粉性アレルギー性結膜炎の増悪作用が見られた。花粉性アレルギー性結膜炎の増悪効果はPM2.5よりも黄砂の方が強かった。WTマウスよりもMyD88(-/-)マウスで、増悪作用が減弱することから、黄砂やPM2.5によって誘導される結膜炎増悪作用はTLRを介していると考えられる。

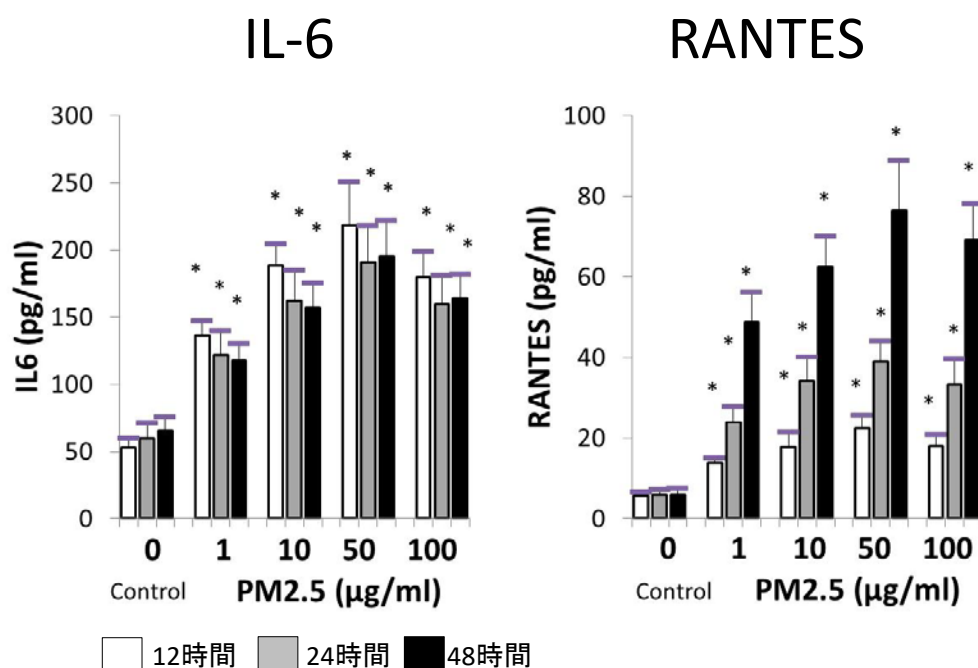


図(4)-4)-7). PM2.5と黄砂のWTマウスとMyD88(-/-)マウスのスギ花粉症モデルへの組織学的影響

PM2.5と黄砂を加えることにより、組織学的に結膜浮腫の悪化が見られた。結膜浮腫はMyD88(-/-)マウスよりもWTマウスの方が強い傾向がある。

5) 培養ヒト結膜上皮細胞を用いたPM2.5による炎症効果

培養結膜上皮細胞にPM2.5を0、1、10、50、100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で加えて、12、24、48時間培養後の培養上清を採取し、炎症性サイトカインのIL-6濃度と好酸球の遊走活性を持つRANTESの濃度をELISAにより測定した。培養上清中のIL-6濃度およびRANTESはPM2.5の刺激後に、濃度依存性に増加した。IL-6はPM2.5濃度が50 $\mu\text{g/ml}$ で最高濃度に達し、刺激後早期の12時間後をピークに増加し、その後、24時間、48時間後は減弱した。RANTESはPM2.5濃度が50 $\mu\text{g/ml}$ で最高濃度に達し、刺激後、12時間、24時間、46時間と経時的に増加し、48時間後が最も高かった(図(4)-5)-8)。



図(4)-5)-8). PM2.5刺激による培養ヒト結膜上皮細胞の培養上清中のIL-6とRANTES濃度
PM2.5刺激により、濃度依存性にIL-6とRANTESの増加が見られる。
* $p < 0.001$ vs. Control

これらのことより、PM2.5により、まず早期に炎症性サイトカインが結膜上皮細胞から産生され、RANTESは時間とともに増加することから、好酸球の誘導が後から生じる可能性が示唆された。これまでの臨床研究は動物実験による結果から考える黄砂やPM2.5によるアレルギー性結膜炎の増悪メカニズムはアジュバント(抗原性を高める作用)効果や、結膜上皮の物理的な損傷によるバリアー損傷、黄砂に含まれる因子のTLRを経由したアレルギー炎症の増悪作用などが考えられたが、培養細胞を用いた本研究により、PM2.5はアレルギー炎症に必須な蛋白を産生することにより、生理活性あるいは化学的にアレルギー性結膜炎の増悪に関与しているという新しい機序が示唆された。この結果から、アレルギー性結膜炎の治療として消炎治療が有効であると考えられ、とりわけステロイド薬や抗ヒスタミン薬やケミカルメディエーター遊離抑制薬などの点眼治療を中心に効果が期待できると考えられる。

最後に、これまでの研究や今回の研究結果から大気中粒子がアレルギー性結膜炎を誘導する機序をまとめると、1) 花粉からのアレルゲンの飛散増加作用：花粉の皮殻を破壊してアレルゲンを放出させる、2) アジュバント(抗原性を高める作用)効果：黄砂やPM2.5に含まれる微生物によるアレルギー、3) 大気汚染物質に含まれるディーゼル排気微粒子による結膜刺激作用、4) 大気汚染物質の角膜上皮と結膜上皮に対する物理的刺激、5) 結膜上皮バリアーの障害による花粉抗原などの結膜下への浸透、6) 大気汚染物質中の硫酸炎や硝酸塩の酸性力による結膜炎などと考えられる。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

これまでに大気中の黄砂やPM2.5が増えると、喘息患者が増えることや、呼吸器症状が悪化することが報告されていたが、眼炎症との関わりについては不明であった。今回の研究により、まず明らかになったのは疫学調査により、大気中のPM2.5の変動に伴い、アレルギー性結膜炎の患者数が変動することが初めて明らかになった。また、大気中因子によりアレルギー性結膜炎がどのように増悪するのか調べるために、臨床検査とマウスの研究を行い、黄砂による結膜炎発症のメカニズムを調べた。その結果、①黄砂に付着した花粉や微生物の死骸などの間接的なアジュバント効果、②黄砂の直接的な物理的刺激による上皮バリアーの損傷によるアレルギー性結膜炎の増悪作用、③化学物質が多く成分に含まれるPM2.5が結膜上皮細胞を刺激することで、アレルギー性結膜炎に必須な蛋白の増加作用、の三つの作用が結膜炎の増悪メカニズムの一因になりうる可能性が証明された。また粒子による直接的な物理的刺激や結膜炎効果はPM2.5より粒子が大きい黄砂の方が強いことが分かった。またアレルギーの機序としては大気中粒子中の成分がTLRを介して、アレルギー性結膜炎を増悪させている可能性が考えられた。

これらの結果により、大気中粒子のバリアー損傷に対しては、上皮粘膜を保護するムチンの産生を促すことが重要であり、今後のムチンをターゲットとした点眼薬の開発に結び付くと考えられる。また、眼内に滞留する粒子は眼粘膜に付着し、長期的に物理的刺激を引き起こすことから、異物を吸着しやすいヒアルロン酸などを配合した洗眼液が有効と考えられる。

(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>

黄砂の直接的刺激に対しては、保護眼鏡やゴーグルなどによる黄砂の回避治療が有効となり、間接的な大気浮遊物中の微生物や化学物質によるアレルギー反応には抗アレルギー点眼治療が有効となりうることを提言することが可能となる。

黄砂やPM2.5の飛来の予報に対し、事前に浮遊物質の回避や早期点眼治療が花粉性結膜炎の増悪の防御になることなどを啓蒙することが大事であると考えられる。

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) T. MIMURA, S. YAMAGAMI, H. FUJISHIMA, H. NOMA, Y. KAMEI, M. GOTO, A. KONDO, M. MATSUBARA. *Environmental Research*, 132, C, 220-225 (2014)
“Sensitization to asian dust and allergic rhinoconjunctivitis”
- 2) T. MIMURA, T. ICHINOSE, S. YAMAGAMI, H. FUJISHIMA, Y. KAMEI, M. GOTO, S. TAKADA, M. MATSUBARA. *Science of the Total Environment*, 487, C, 493-499 (2014)
“Airborne particulate matter (PM2.5) and the prevalence of allergic conjunctivitis in Japan”

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) 三村達哉：専門医のためのアレルギー学講座. XVI.環境因子とアレルギー. 日本アレルギー学会、63, (7), 901-906 (2014)
「専門医のためのアレルギー学講座：眼科領域におけるアレルギーと環境因子」
- 2) 三村達哉：眼を取り巻く環境因子. 日本眼アレルギー学会学術誌. 年次報告 (2014)
- 3) 三村達哉：PM2.5 Allergy Specialist's Voice 1-2 (2014)
- 4) 三村達哉：特集：眼アレルギー診療のminimal essential アレルギーの臨床、北隆館／ニュー・サイエンス社. Vol35(7)：No.473:645-648, (2015)
「PM2.5及び黄砂の眼疾患との関連」
- 5) 三村達哉：わかりやすい臨床講座. 日本の眼科. Vol88, (3), 13-25 (2017)
「環境因子とアレルギー性結膜炎」

<その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 三村達哉：眼科アレルギー診療、24:p25-29 (2015)
「アレルギー性結膜炎 福島敦樹編集」
- 2) 三村達哉：眼科グラフィック誌、Vol.5(1):p49-58 (2016)
「特集 眼科アレルギー疾患治療の今 点眼薬整理整頓」
- 3) 三村達哉：あたらしい眼科、Vol.33 No.03 p369-376 (2016)
「特集<眼瞼・結膜アレルギー>眼科と皮膚科の境界領域に対するそれぞれの見解 4)花粉性結膜炎：眼科の立場から」
- 4) 三村達哉：眼科疾患最新の治療2016-2018、p104 (2016)
「アレルギー性結膜炎、I. 前眼部疾患-②結膜疾患-A. 結膜炎-6、大橋裕一、白神史雄、村上晶編集」
- 5) 三村達哉：アレルギーの臨床2016年8月号、Vol36(8)：No.480:733-738 (2016)
「特集：眼アレルギーの最新診療 涙液総IgE および特異的IgE 抗体検査」
- 6) 三村達哉：フォーサム2016東京 ランチョンセミナー記録集、p4-6 (2016)

「アレルギー疾患におけるバリアの重要性～皮膚科から、眼科から～ 眼科からみたアレルギー疾患における上皮バリアー」

- 7) 三村達哉：アレルギーの臨床、Vol37(6)：No.492:535-539 (2017)
「特集:アレルギー症状に対する洗眼と防御の役割 洗眼とアレルギー除去」

(2) 口頭発表 (学会等)

- 1) 三村達哉：第3回日本眼科アレルギー研究会講習会 (2014)
「環境因子とアレルギー性結膜炎、シンポジウム2 黄砂による影響2」
- 2) 高田幸子、三村達哉、松原正男、藤島浩、市瀬孝道：第68回日本臨床眼科学会 (2014)
「アレルギー性結膜炎患者数と大気中SPMの関係」
- 3) 三村達哉、山上聡、亀井裕子、五嶋摩理、近藤亜紀、松原正男、市瀬孝道：第2回城北眼科フォーラム (2015)
「大気中PM2.5濃度のアレルギー性結膜炎患者数に与える影響」
- 4) 三村達哉：第4回アルコンサマーセミナー (2015)
「大気中浮遊粒子とアレルギー性結膜炎」
- 5) 三村達哉：ABCの会 (2015)
「アレジオン点眼液0.05%とアレルギー性結膜炎」
- 6) 三村達哉：江戸川区耳鼻科医会講演会 (2016)
「アレルギー性結膜炎の最近の話題」
- 7) 三村達哉：第21回秋田県眼科学術講演会 (2016)
「環境とアレルギー性結膜炎」
- 8) 三村達哉：日本眼炎症学会 (2016)
「眼科からみたアレルギー疾患における上皮バリアー」
- 9) 三村達哉：静岡県東部耳鼻科集談会 (2016)
「耳鼻科の先生から見た、アレルギー性結膜炎の対処法と最近の話題」
- 10) 有本大、高良太、三村達哉、林政彦、林英之、内尾英一、野崎学、矢野博子：日本エアロゾル学会第33回エアロゾル科学・技術研究討論会 (2016)
「洗眼液より採取した黄砂の解析と臨床所見の関連」
- 11) 三村達哉：第70回日本臨床眼科学会 (2016)
「アレルギー性結膜炎における環境因子と上皮バリアー」
- 12) 深山杏里、三村達哉、藤島浩：第70回日本臨床眼科学会 (2016)
「眼アレルギー症状に対するカップ式市販洗眼薬の有用性」
- 13) 三村達哉：町田市耳鼻咽喉科部会学術講演会 (2016)
「眼アレルギーの環境要因と診療フロー」
- 14) 三村達哉：北多摩耳鼻咽喉科医会学術講演会 (2016)
「アレルギー性結膜炎の簡単な見分け方と点眼治療」
- 15) 三村達哉：日本分子生物学会公募シンポジウム『環境汚染物質がもたらす健康影響 アレルギーなのかガンなのか！？』(2016)
「環境汚染物質の眼炎症に及ぼす影響」

- 16) 三村達哉：板橋区耳鼻咽喉科医会学術講演会 (2016)
「春の黄砂と花粉症にむけた点眼治療」
- 17) 三村達哉：杉並区耳鼻咽喉科専門医会例会 (2016)
「明日から役立つ、眼アレルギー疾患の治療法」
- 18) 三村達哉：Tokushima Ophthalmic Seminar (2017)
「環境因子が及ぼす眼アレルギー疾患」
- 19) 三村達哉：K-ネットカンファレンス (2017)
「アレルギー性結膜疾患の治療 2017」
- 20) 三村達哉：アレルギーセミナー in 千葉 (2017)
「環境要因からみたアレルギー性結膜炎」
- 21) 三村達哉：アレルギーセミナー in 佐倉 (2017)
「花粉シーズンの眼アレルギーの対処法」
- 22) 三村達哉：福島アレルギーセミナー (2017)
「花粉と大気汚染物質の眼アレルギーへの影響～点眼の効果～」
- 23) 三村達哉：北九州耳鼻科専門医会講演会 (2017)
「耳鼻科の先生から見たアレルギー性結膜炎の診断と治療」
- 24) 三村達哉、藤島浩、市瀬孝道：角膜カンファレンス2017、第41回日本角膜学会総会、第33回日本角膜移植学会 (2017)
「黄砂のアレルギー性結膜炎の増悪作用」
- 25) 三村達哉：八戸眼科医会学術講演会 (2017)
「複合型大気汚染によるアレルギー性結膜炎」

(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

- 1) Medical Tribune (2016年12月22日、21頁)
「問題となる花粉症:花粉性結膜炎 黄砂やPM2.5が症状をより悪化させる可能性」

(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。」

Aggravating Effects of the Combined Air Pollution by Asian Dust and PM_{2.5} on Lung Inflammation and Allergy Disease, and Elucidation of the Mechanism

Principal Investigator: Takamichi ICHINOSE

Institution: Department of Health Sciences, Oita University of Nursing and Health Sciences, Oita, Japan

Cooperated by:

Department of Immunology and Parasitology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Japan, 807-8555, Fukuoka, Japan.

Environmental Health Division, Department of Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University, 615-8530, Kyoto, Japan.

Tokyo Women's Medical University Medical Center East, 116-8567, Tokyo, Japan.

[Abstract]

Key Words: PM_{2.5}, Asian sand dust, Combined exposure, Inflammation, Immune response, Lung allergy, Asthma, Allergic conjunctivitis, Quinone, PAHs, Microbial elements, LPS(Lipopolysaccharide)

Subtheme (1) found the following results. The amounts of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were higher in PM_{2.5} than in large size PM (PM₁₀, ASD: Asian sand dust). Conversely, microbial elements (LPS and β -glucan) were much higher in large size PM than in PM_{2.5}. Concentrations of Al and Fe in large size PM were greater than in PM_{2.5}, while Pb and Cu concentrations were lower than in PM_{2.5}. The oxidative stress response was associated with PAHs levels in PM. Type II alveolar cells reacted sensitively to oxidative stress induced by PM_{2.5} and caused inflammatory response. However, the inflammatory responses and the exacerbating effects of allergic lung inflammation were greater in microbial element-rich large size PM than in PAHs-rich PM_{2.5}. In addition, PM_{2.5} and ASD exacerbated allergic lung inflammation *via* a microbial sensor (TLR2/TLR4) /MyD88-signaling pathway. Furthermore, Cu present in PM_{2.5} was associated with PM_{2.5}-induced lung inflammation and Fe present in ASD was associated with ASD-induced lung allergy exacerbation. Co-exposure to PM_{2.5} and ASD caused the additive effect compared to each single exposure-induced allergic lung inflammation. However, the excess exposure to ASD caused suppressive effects on allergic lung inflammation.

Subtheme (2) presented the following results. Urban PM₁₀ (ur-PM₁₀) included abundant LPS and suppresses immune responses and NF- κ B activation. Heated ur-PM₁₀ did not show obvious suppressive effects on splenocytes, and LPS neutralization by

polymyxin B rescued ur-PM10-induced immune suppression. Concanavalin A-induced proliferation and interleukin 2 (IL-2) production were decreased in splenocytes from PM2.5-administrated mice. PM2.5 effects on splenocytes were rescued by antioxidant N-acetylcysteine. Expression of heme oxygenase 1 (HO-1, oxidative stress marker) was increased after PM2.5 administration. These data suggest that particulate matters can modulate immune responses, and HO-1 and NF- κ B are good markers for assessment of effects of particulate matters on immune responses.

Subtheme (3) found that heated-diesel exhaust particle (H-DEP), H-PM2.5 and H-ASD individually induced dysfunction or reactive oxygen species (ROS) production in airway epithelial cells or slightly increased surface molecule on antigen presenting cells (APC). Benzo(a)pyrene (BaP) in the presence of H-DEP or H-ASD additively activated APC. 9,10-phenanthroquinone (9,10-PQ) and 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ) in the presence of H-PM2.5 than of H-ASD additively/synergistically induced dysfunction *via* intracellular/extracellular ROS production in airway epithelial cells. BaP, 9,10-PQ and 1,2-NQ with core particle of ASD or PM2.5 additively/synergistically contributed to the exacerbations of respiratory diseases such as lung inflammation and asthma.

Subtheme (4) found the following results. Epidemiologic survey demonstrated a significant association between the number of outpatient visits for allergic conjunctivitis and the PM2.5 level. In the experimental studies, ASD acted as an adjuvant to promote allergic disease induced by allergens such as pollen and fungi. Also, PM2.5 and ASD promoted pollen-induced allergic inflammation by conjunctival epithelial damage. Furthermore, particle-bound microbial element caused pollen-induced allergic conjunctivitis exacerbation *via* a TLRs/MyD88-signaling pathway. In an *in vitro* study PM2.5 increased the level of inflammatory molecule from cultured human conjunctival epithelial cells.