

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06422

研究課題名(和文)PM2.5による喘息様気道炎症発症因子の同定に関する研究

研究課題名(英文)Study on asthma-like airway inflammation by composition of PM 2.5

研究代表者

長岡 憲次郎(NAGAOKA, KENJIRO)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40752374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、地域や時期によるPM2.5組成の変化がどのような影響を及ぼすかを検討した。PM2.5の捕集を行い、成分分析を行い、地域によって組成が異なることが分かった。細胞曝露では、PM2.5濃度依存的にサイトカインmRNA量に増加が認められた。また、有意差はなかったが、地域間で遺伝子発現量の変化傾向がみられた。アレルギー性気道炎症の発症には地域あるいは時期による組成の違いが影響している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined how the change of the composition of PM 2.5 by region and time affects. PM 2.5 was collected in various regions and periods, and component analysis was conducted. It was found that the composition varies depending on the area. In the cell exposure, an increase in cytokine mRNA amount was observed depending on PM 2.5 concentration. Although there was no significant difference, there was a tendency for gene expression to change between regions. The occurrence of allergic airway inflammation may be influenced by differences in composition by area or time.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：浮遊粒子状物質 PM2.5 大気汚染 アレルギー性気道炎症 健康影響

1. 研究開始当初の背景

大気中に存在している浮遊粒子状物質 (Particulate Matter, PM) には大陸から飛来する黄砂や火山排出物などの自然起源や、火力発電所、工場、家庭、ディーゼルエンジンなどによる人為的に生成される微小粒子が含まれる。

PM は、生体内に侵入し、生体影響を及ぼす粒径として、PM10 (50%が 10 μm の粒径) あるいは PM2.5 に分類され、粒子径 10 μm 以下の微粒子は大気中に長く浮遊することから大気汚染の原因のひとつとなっている。これら PM はアジア諸国の経済発展とともに増加しており、アジア大陸で発生した汚染物質は大陸の風下に位置している日本列島に運ばれる。化石燃料の燃焼によって生じる PM は主に窒素酸化物や硫黄酸化物、重金属及び揮発性有機化合物 (VOC) などの多様な化学成分から成り、健康に悪影響を及ぼすと考えられている。

疫学研究では、PM2.5 の短期的な暴露により喘息、慢性閉塞性肺疾患、呼吸器感染症などの呼吸器疾患との関連があり、PM2.5 濃度の増加がこれら疾患に対するリスクを増大させていることを示している [Environ Health 2009]。長期的な暴露においても呼吸器疾患、循環器疾患、肺がんによる死亡との関連が指摘されている。

我々は、マウスに全粒径を含む PM である total suspended particulate matter (TSP) を経鼻投与し、気道抵抗の上昇、肺組織の炎症等の喘息様病変を認めたと [Environ Toxicol 2012]。この TSP をさらにタンパク質分解処理することにより、TSP によるマウスの気道抵抗の上昇を抑制したことから、TSP 中に喘息様症状を引き起こすタンパク質が存在することを示唆した。

さらに、国内で初めて平成 25 年、1-3 月に収集した PM2.5 の可溶性分画と非可溶性分画を同時に投与して、気道抵抗、肺胞洗浄液中の好酸

球増加、肺組織の Th2 サイトカインの発現増強、肺組織の炎症細胞浸潤を認め、PM2.5 単独による喘息様病態の発症に成功している [PLoS One 2014]。

当研究室では最近、新たにサイクロン型集塵機を導入し、PM2.5 の捕集を行っている。これまで動物実験に用いられ、喘息症状を引き起こす PM は、フィルター方式によって捕集されており、粒子径 2.5 μm を 50%含む幅広い径の粒子が含まれている。一方、サイクロン型集塵機は 0.1 から 2.5 μm に限定した高純度の粒子が得られる。この方式で異なる地域において捕集した PM2.5 をマウスに投与したとき、一方では喘息症状を認めたと、もう一方では認められなかった。そのことから、喘息症状に影響を与える成分が地域間で異なっている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

PM は季節や地域によって組成が変化していることから、PM 中の喘息様気道炎症発症に特に寄与する因子を同定することを目的とする。

本研究では以下の3つの項目について検討を行う。

- (1) 異なる時期及び地域で捕集された PM2.5 を用い、PM2.5 の組成を調べる
- (2) マウスに (1) で捕集した PM2.5 を投与し、PM2.5 の成分の違いによる喘息様病態の発症の程度を比較する
- (3) 培養細胞に PM2.5 を添加し、細胞毒性を評価する

3. 研究の方法

- (1) 地域及び時期による PM2.5 の組成の同定
PM2.5 の捕集はサイクロン型集塵装置を用いる。当研究室では、これまでに一般的に用いら

れている石英フィルターを用いた PM2.5 の捕集を行い、バッファー抽出することで PM2.5 を得ていた。この問題点として、集塵量が少ないために動物実験に用いるには長い期間の集塵を必要とすること、抽出過程で一部の成分の損失の可能性があることが挙げられる。

サイクロン型の場合、抽出操作を必要としないため、分離及び再構築操作を行う必要がなく、成分の変化や損失もほとんどない高純度な PM2.5 が大量に得られる。この集塵装置は当教室と慶應大学の 2 箇所でのみ稼働している。現在、当教室では慶應大学と共同で東京及び岡山で PM2.5 の捕集を行っている。また、得られた PM2.5 は、確立された方法である金属質量分析及び有機成分のガスクロマトグラフや HPLC により、組成分析を行う。それにより、岡山及び東京で検出される PM2.5 の時期及び地域間での組成の違いを比較する。

(2) 異なる時期及び地域で捕集された PM2.5 がマウスの喘息様症状に及ぼす影響

PM2.5 の成分は有機炭素 (PAHs、鎖状炭化水素、カルボン酸など)、無機炭素、金属などによって構成されていると考えられていた。そこで、1) で得られた PM2.5 を用い、異なる成分が喘息様症状にどのような影響を与えるかを検討する。また、PM2.5 にプロテアーゼ、キレート剤、限外ろ過処理を行い、PM2.5 中に含まれる成分の一部を除去し、それらをマウスに投与することにより PM2.5 中の呼吸器症状に寄与する成分を調べる。呼吸機能の評価は、気道過敏性試験、BALF 分析、肺組織の病理組織学的検査、Real-Time PCR 及び western blot 分析による生化学的手法を用いて評価する。

(3) 培養細胞を用いた PM2.5 暴露による影響

In vivo 実験のみでは困難である生体内での PM 粒子の作用機序を解明するために、ヒト気道上皮由来 BEAS-2B 細胞を用いて細胞における PM2.5 の影響を調べる。

PM2.5 暴露後に細胞を回収し、total RNA を抽出し、Real-Time PCR、細胞生存率について調べる。

4. 研究成果

(1) 東京から供与された PM2.5 と同時期に岡山で採取した PM2.5 の組成分析の比較では、複数の金属成分および炭素の量に違いが認められた。また、東京の PM2.5 を酸処理によって処理することにより、ケイ素と炭素を除く多くの金属成分量が著しく低下した。

(2) BALB/c マウスに対し、岡山と東京で採取した PM2.5 を経鼻的に投与し、アレルギー性気道炎症発症の有無を気道過敏性試験および BALF 中の細胞分画により検討した。結果として、気道抵抗および細胞数は東京 PM2.5 でわずかに増加したが、顕著ではなかった。この原因として、BALB/c マウスではアレルギー応答が弱いことが考えられる。より発症しやすい投与条件を検討する必要がある。

また、NC/Nga マウスに酸処理した場合、気道抵抗の低下および細胞数の低下が認められた。今後、さらに遺伝子変化や組織学的な評価について検討する必要がある。

(3) 2015 年 4 月に岡山で採取した PM2.5 をヒト気道上皮細胞由来 BEAS-2B に曝露し、その影響を評価した。PM2.5 濃度依存的に細胞生存率の低下および細胞傷害性の増加が認められた。また、サイトカイン IL-8 及び TSLP mRNA の増加が認められた。しかしながら、同じ時期の東京

PM2.5 および 2015 年 9 月に採取した岡山 PM2.5 を用いた場合の 3 つの群間では、同じ濃度で曝露したとき、mRNA 発現量に有意差は認められなかったが、東京で採取した PM2.5 では増加傾向がみられた (図 1)。

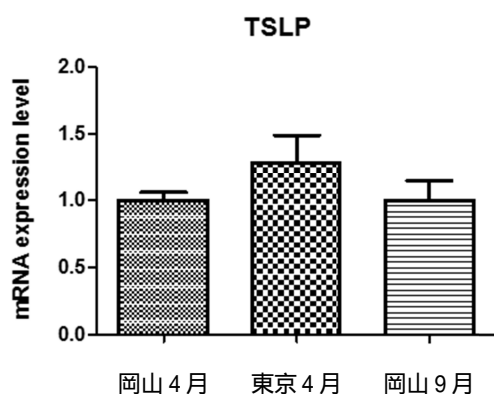


図 1: 時期による mRNA 発現量の比較

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[学術論文] (計 1 件)

Ogino K, Nagaoka K, Okuda T, Oka A, Kubo M, Eguchi E, Fujikura Y.: PM2.5-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in NC/Nga mice. Environ Toxicol. (2017) 32, :1047-1054. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

長岡憲次郎, 荻野景規, 伊藤達男, 本邦初の PM2.5 による喘息実験の成功とそのメカニズム-PM2.5 組成との関連性, 第 87 回日本衛生学会学術集会, 2017 年 3 月 27 日, フェニックス・シーガイア・リゾート(宮崎県宮崎市)
荻野景規, 長岡憲次郎, 伊藤達男, PM2.5 による喘息の発症～組成による発生機序～,

第 86 回日本衛生学会学術総会, 2016 年 5 月 12 日, 旭川市民文化会館(北海道旭川市)

[図書]

荻野景規他, メディカルレビュー社, THE LUNG perspectives (2015) 387-390.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長岡 憲次郎 (NAGAOKA, KENJIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 40752374

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

荻野 景規 (OGINO, KEIKI)

久保 正幸 (KUBO, MASAYUKI)

中山 祥嗣 (NAKAYAMA, SHOJI)