

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00567

研究課題名(和文) 大気粉塵中遷移金属による喘息患者の症状悪化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism for exacerbating symptoms of asthma patients by metals contained in ambient dust

研究代表者

道上 義正 (Michigami, Yoshimasa)

金沢大学・環境保全センター・准教授

研究者番号：90190678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：慢性咳嗽患者の血液を用いた好塩基球活性化試験の条件を決めた。この条件で気管支喘息患者のスギ花粉抗原による好塩基球活性化を多環芳香族炭化水素類でさらに活性化できることを確認できた。一方、重金属の効果は確認することができなかった。大気粉塵(総浮遊粒子状物質と微小粒子状物質(PM<sub>2.5</sub>))の粒径の違いで構成成分(多環芳香族炭化水素類と重金属)が異なることが確認できた。また、季節変動も確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好塩基球活性化試験を用いて大気粉塵やその構成成分である多環芳香族炭化水素類により症状が影響を受けやすい慢性咳嗽患者の特徴が分かれば、予防や治療に役立てることができる。  
大気粉塵の粒径の違いにより構成成分の違いがあることが分かったので、大気粉塵による健康影響についてもこの点を考慮して検討していく必要がある。

研究成果の概要(英文)：The condition to conduct basophil activation test with chronic cough patients were determined. Using this condition, more activation of basophil activated by cedar pollen antigen by polycyclic aromatic hydrocarbon could be confirmed. By contrast, the effect of heavy metals on activated basophil could not be observed. The difference of constituents (polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals) in ambient dust by the difference of particle size (total suspended particulate (TSP) and particulate matter 2.5 (PM<sub>2.5</sub>)) was observed. Seasonal variation of constituents in TSP or PM<sub>2.5</sub> was also observed.

研究分野：環境化学

キーワード：重金属 多環芳香族炭化水素類 大気粉塵 慢性咳嗽 気管支喘息 微小粒子状物質(PM<sub>2.5</sub>)

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2011年に中国の微小粒子状物質(PM<sub>2.5</sub>)濃度が非常に高いことが報道され、注目を集めた。また、気象庁のデータでは、1970年代や1980年代よりも2000年代の方が黄砂の飛来のべ日数が多い傾向にある。偏西風により大陸から運ばれてくるPM<sub>2.5</sub>や黄砂などの大気粉塵による大気汚染が社会問題となっている。国内でも交通量の多い幹線道路でのPM<sub>2.5</sub>濃度が問題となっている。2009年からPM<sub>2.5</sub>濃度のモニタリングが開始されたが、特に中国のPM<sub>2.5</sub>に関する報道の後、全国のPM<sub>2.5</sub>のモニタリングサイトが年々増加している。

大気粉塵による健康影響が起こるのは、主に呼吸器と循環器である。また、脳の発達にも障害を与えることが報告されている。わが国においても、黄砂やPM<sub>2.5</sub>などの大気粉塵による呼吸器疾患に対する影響に関する疫学研究が行われてきた。幹線道路の大気汚染の住民(成人、幼児、児童)の呼吸器への影響に関する疫学調査(環境省:SORAプロジェクト)なども実施されている。しかし、大気粉塵中重金属による呼吸器疾患への影響に関する報告は少ない。われわれは、大気粉塵中重金属が慢性咳嗽(気管支喘息、咳喘息、アトピー咳)患者の咳(カドミウム、鉄、マンガン)や目のかゆみ(カルシウム、カドミウム、クロミウム、鉄、マンガン、ニッケル、鉛)に関連することを示した。この影響は、血清IgEレベルの低い群で認められた。血清IgEレベルの高い群はアレルギー症状が強く、大気粉塵中重金属による影響を受けにくいことが示唆された。重金属がどのような機構で慢性咳嗽患者の症状を悪化させるのかは分かっていない。

気管支喘息において、好塩基球が重要な役割を果たしている。好塩基球は、血小板活性化因子やヒスタミンなどを放出し、即時型喘息反応にも遅延型喘息反応にも関わっている。金属アレルギーにも好塩基球は関わっており、重金属による気管支喘息の悪化に好塩基球が関連あるかもしれない。

### 2. 研究の目的

重金属による気管支喘息患者の症状悪化に関連する機構として、重金属により好塩基球が活性化されることを明らかにすることを目的とする。また、血清IgEレベルにより気管支喘息患者の重金属への反応が違うのか、好塩基球活性化試験を用いて明らかにする。

総浮遊粒子状物質(TSP)とPM<sub>2.5</sub>の慢性咳嗽患者への影響を成分の違いに着目して研究するための基礎データとして、TSPとPM<sub>2.5</sub>の成分の違いについて把握することも目的とした。

### 3. 研究の方法

大気粉塵中重金属により慢性咳嗽の症状が悪化する患者のスクリーニング法として好塩基球活性化試験を検討することにした。蛍光ラベルした抗体(PE-抗CD203c抗体とFITC-抗CD63抗体)を用いたフローサイトメトリーで、CD203cの平均蛍光強度(MFI)とCD63の陽性割合を指標とした。スギかダニにアレルギーがある者の血液を用いて、慢性咳嗽患者の血液を用いた好塩基球活性化試験を行うための条件検討を行った。まずは、多環芳香族炭化水素類(PAH)を行い、その後重金属を用いた検討を行った。

TSPはハイボリュームエアサンプラーを用いて捕集した。PM<sub>2.5</sub>はハイボリュームサンプラーとインパクターを用いて捕集した。TSPとPM<sub>2.5</sub>に含まれるPAHはジクロロメタンを用いて抽出し、濃縮した後、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィーを用いて分析した。TSPとPM<sub>2.5</sub>に含まれる重金属は原子吸光法を用いて分析した。

### 4. 研究成果

#### 4-1. 好塩基球活性化試験を実施する条件の検討

##### 4-1-1. 採血に使用するヘパリン量の検討

IgEによる好塩基球活性化へのヘパリンの影響を検討した。シリンジにヘパリン1mlを入れて採血すると好塩基球の活性化が認められなかった。ヘパリン採血管を用いた場合は好塩基球の活性化が認められた。採血量が10mlよりも5mlの方がCD203c MFIもCD63+(%)も高く、ヘパリンの影響が示唆された。

##### 4-1-2. 採血後試験開始までの時間の検討

患者の血液を採血後すぐに入手できない可能性があるため、採血後好塩基球活性化試験を開始するまでの時間をIgEやスギ花粉抗原(Cj)による好塩基球活性化を用いて検討した。採血後1時間ごとに、好塩基球活性化試験を開始した結果を、図1A(CD203c MFI)と1B(CD63+(%))に示した。スギ花粉症者、ダニアレルギーのない者では採血後1時間での値がその後と比較して低かった。また、5時間以降IgE添加で反応は低下し、Cj添加で上昇していた。採血後4時間まで使用できることが分かった。

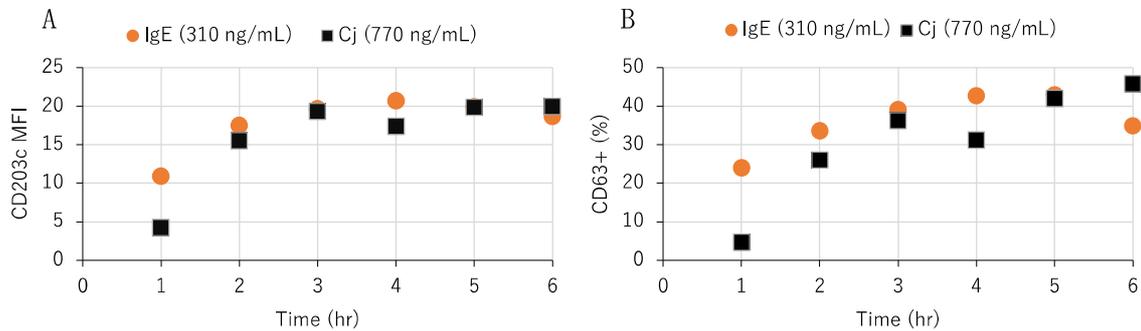


図1 採血後好塩基球活性化試験を開始するまでの時間の影響  
A: CD203c MFI、B: CD63+(%)

#### 4-1-3 . 非特異反応の検討

フローサイトメーターを用いて好塩基球活性化を評価する際に非特異的反応が認められたので、レセプターブロック剤として牛血清アルブミン (BSA) を使用することにして至適濃度の検討を行った。BSA 濃度が高くなるにつれ、平均蛍光強度が強くなった。BSA0.05%を使用した時に、BSAなしの時と平均蛍光強度が近く非特異的反応を抑えることができた。

#### 4-1-4 . 気管支喘息患者の血液を用いた好塩基球活性化試験の応用 (PAH)

好塩基球活性化試験は、ヘパリン採血管に血液 10 ml を採取し、PE-抗 CD203c 抗体と FITC-抗 CD63 抗体を各 5 μl 使用し、BSA 濃度を 0.05% とし、採血後 2 から 4 時間以内に開始することにした。この条件で気管支喘息患者のスギ花粉抗原による好塩基球活性化 (J2: 32.71%) を修飾された PAH の 1 種であるフェナントレンキノンでさらに活性化 (J2: 46.65%) できることが確認できた (図 2)。

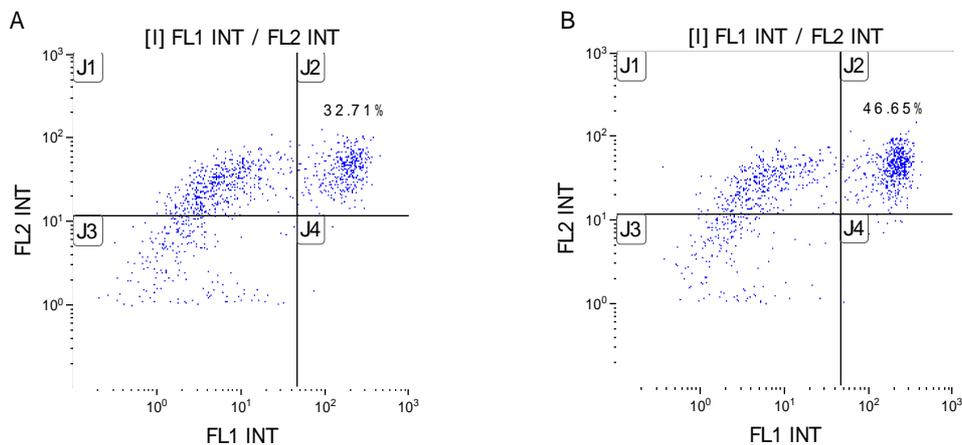


図2 気管支喘息患者の血液を用いた好塩基球活性化試験  
A: 77 ng/ml Cj、B: 77 ng/ml Cj + 77 nM フェナントレンキノン

#### 4-1-5 . 気管支喘息患者の血液を用いた好塩基球活性化試験の応用 (重金属)

スギかダニにアレルギーのある者の血液を用いて、抗原による好塩基球活性化への重金属の影響を検討した。PAH の場合と異なり、重金属では抗原による好塩基球活性化への影響が認められなかった。

#### 4-2 . TSP と PM2.5 の成分の違い

TSP とそれに含まれる PM2.5 の成分 (PAH と重金属) の違いについて 1~6 月のデータを用いて検討した。TSP と同様に、PM2.5 濃度も 3~5 月でその他の月より高かった (図 3)。

粒子当たりの PAH 量は PM2.5 の方が高く、PAH は PM2.5 にそれより粒径の大きい粒子よりも多く含まれていた。

一方、重金属 (カルシウム、コバルト、鉄、マンガン、鉛) の大気中濃度は、TSP の方が高い傾向にあった。特に、鉄 (図 4) とマンガンの濃度が高かった。黄砂期間中はほとんどの鉄が PM2.5 より大きい粒子に存在していた。銅とニッケル濃度は PM2.5 で高い傾向にあった。

大気成分の粒径により構成成分 (PAH や重金属) が異なっていた。大気粉塵による健康影響を検討する上で、大気粉塵の構成成分の粒径による違いを考慮しておくのが重要であることが分かった。

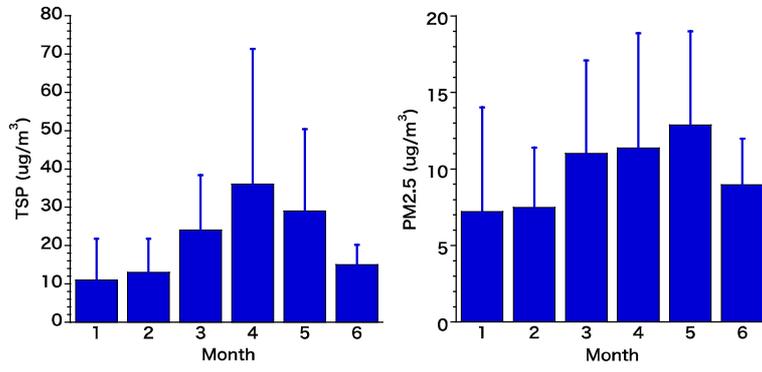


図3 TSP と PM2.5 の月変化

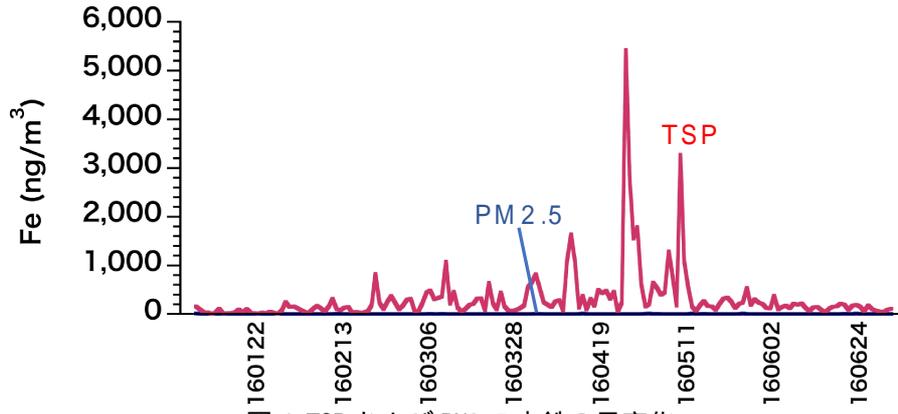


図4 TSP および PM2.5 中铁の日変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神林康弘、Anyenda Enoch Olando、Nguyen Thi Thu Thao、道上義正、中村 裕之
2. 発表標題 総浮遊粒子状物質（TSP）と微小粒子状物質（PM2.5）の成分（多環芳香族炭化水素類（PAH）と重金属）の季節変動
3. 学会等名 第17回日本予防医学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	辻口 博聖 (Tsuji guchi hiromasa) (00723090)	金沢大学・医学系・特任助教  (13301)	
研究分担者	神林 康弘 (kambayashi Yasuhiro) (20345630)	岡山理科大学・獣医学部・教授  (35302)	
研究分担者	中村 裕之 (Nakamura Hiroyuki) (30231476)	金沢大学・医学系・教授  (13301)	
研究分担者	原 章規 (Hara akinori) (70507045)	金沢大学・医学系・准教授  (13301)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	原 丈介  (Hara Johsuke)  (30710199)	金沢大学・大学病院・助教       (13301)	