

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10577

研究課題名(和文) 過酸化された情報伝達物質である脂質の気管支喘息への関与および環境化学物質の影響

研究課題名(英文) Involvement of oxidized lipids which are signal transduction substances in bronchial asthma and the effect of environmental chemicals on it

研究代表者

神林 康弘 (Kabayashi, Yasuhiro)

岡山理科大学・獣医学部・教授

研究者番号：20345630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：大気粉塵に含まれる多環芳香族炭化水素類による気管支喘息の症状悪化への酸化ストレスの関与を証明するために実施する予定であった。大学の異動により使用する予定の機器がすぐに使用できる環境でなくなった。他大学で実施する予定であった実験も新型コロナウイルス感染症の影響で実施できなかった。必要な機器は譲り受けて揃えることはできたが、新設学部での講義や委員会等に時間を取られることにより実験は実施できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

越境汚染や幹線道路沿線の大気粉塵による呼吸器への影響が問題となっている。本研究では、大気粉塵中に含まれる多環芳香族炭化水素類による気管支喘息の症状悪化に酸化ストレスが関与することを示し、酸化ストレスを抑制することにより気管支喘息の症状悪化の予防ができるのではないかと提案する予定であったが、諸事情により実験を実施することができなかった。酸化ストレスの関与として、脂質が酸化されて生成するジアシルグリセロール過酸化物質や酸化物質がPKCを活性化し、制御されない細胞内情報伝達が起こり気管支喘息の症状が悪化するという仮説を考えていた。

研究成果の概要(英文)：This study was to be conducted to elucidate the involvement of oxidative stress in the exacerbation of bronchial asthma symptoms by polycyclic aromatic hydrocarbons which is contained in ambient dust. Due to a change of university, the instruments to be used could not be available. The experiment that was to be conducted at another university could not be carried out due to the coronavirus disease 2019 (COVID-19). Although we were able to acquire the necessary instruments, we were unable to conduct the experiments due to the time required for lectures and meetings at the newly established department.

研究分野：予防医学

キーワード：大気粉塵 多環芳香族炭化水素類 気管支喘息 酸化ストレス 環境化学物質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 大陸からの微小粒子状物質 (PM_{2.5}) や黄砂などの大気粉塵の越境汚染による健康影響が懸念されている。また、PM_{2.5} は国内でも発生しており、特に幹線道路沿いでの呼吸器などへの健康影響が考えられ、環境省の SORA プロジェクトなどで疫学調査が行われてきた。

(2) 研究代表者らは、大気粉塵中の多環芳香族炭化水素類に着目して慢性咳嗽患者 (咳喘息、気管支喘息、アトピー咳) の症状への影響を検討し、多環芳香族炭化水素類が慢性咳嗽患者の咳症状^{1, 2)} と関連のあることを報告した。また、喘息モデルマウスを用いた研究で、多環芳香族炭化水素類が喘息の症状を悪化させることも報告されている³⁾。

(3) 多環芳香族炭化水素類は酸化ストレスと関連している。その機構の1つとして、多環芳香族炭化水素類の代謝過程でフリーラジカルが発生することが報告されている。フリーラジカルにより細胞膜のリン脂質が酸化されることが考えられる。ジアシルグリセロールはプロテインキナーゼ C を活性化することにより、細胞内情報伝達に重要な役割を果たしている情報伝達物質である。研究代表者らは、酸化ストレス下で生成する過酸化ジアシルグリセロールが異常な細胞内情報伝達を引き起こして傷害を与え、疾患につながるのではないかと提唱し、検討してきた^{4, 5)}。

2. 研究の目的

今まで過酸化ジアシルグリセロールの喘息への関与は報告されていない。多環芳香族炭化水素類による喘息の悪化に、過酸化ジアシルグリセロールの生成を含む酸化ストレスが関与し得るか明らかにすることが本研究の目的である。環境化学物質である多環芳香族炭化水素類により引き起こされる酸化ストレスが生体膜リン脂質を酸化し、ホスホリパーゼ C により加水分解されることにより過酸化ジアシルグリセロールが生成し、異常な細胞情報伝達を引き起こし、喘息の症状を悪化させると考え、検討することとした。

3. 研究の方法 (予定していた方法)

1-パルミトイル-2-リノレオイルグリセロール過酸化物 (PLG-00H) の合成

1-パルミトイル-2-リノレオイル-ホスファチジルコリン (PLPC) をリポキシゲナーゼを用いて酸化し、PLPC 過酸化物 (PLPC-00H) を生成する。必要ならば、ソディウムボロハライドを加え、PLPC-OH に還元する。PLPC、PLPC-OH、PLPC-00H を逆相高速液体クロマトグラフィーを用いてそれぞれ分取する。ロータリーエバポレーターを用いて濃縮後、それぞれホスホリパーゼ C を用いて加水分解し、PLG、PLG-OH、PLG-00H を生成する。クロロフォルム/メタノールで抽出後、HPLC を用いて精製する。

ジアシルグリセロールによる好酸球様培養細胞の活性化 (スーパーオキシドの産生)

培養細胞 HL-60 clone15 を好酸球様に分化させる。好酸球様培養細胞を、種々の濃度の PLG や PLG-OH や PLG-00H で刺激し、スーパーオキシドの産生をチトクロム c を用いて測定する。好酸球様培養細胞からのスーパーオキシドの産生を確認するためにホルボールエステルを用いる。スーパーオキシドが産生していることはスーパーオキシドディスムターゼを用いて確定する。基本的にマイクロプレートリーダーを用いて測定を行う予定であるが、生成機構の詳細な検討を行う場合は分光光度計を使用する。必要なら、スーパーオキシドの検出に化学発光試薬 MCLA を用いる。

多環芳香族炭化水素類刺激による好酸球様培養細胞中の PLG-00H の産生

ピレンやベンツ[a]ピレンなどの多環芳香族炭化水素類や、毒性が強いと言われる修飾を受けている水酸化体やニトロ化体などにより種々の濃度で好酸球様培養細胞を刺激する。好酸球様培養細胞からクロロフォルム/メタノールを用いて脂質を抽出し、高速液体クロマトグラフィーを用いて PLG-00H を分析する。

ダニ抗原 (Df) と PAH をマウスへ投与した時の PLG-00H の産生および症状や酸化ストレスのバイオマーカーとの関係

Balb/c マウスに、スケジュールに合わせて Df と多環芳香族炭化水素類 (ディーゼル排出ガス抽出物) を同時投与する。Df のみの投与と比較する。投与スケジュール終了後、採血と肺の摘出を行う。血液は血漿と白血球に分け、それぞれ脂質を抽出し、高速液体クロマトグラフィーを用いて PLG-00H を分析する。肺はホモジネートにしてからクロロフォルム/メタノールで脂質を抽出し、高速液体クロマトグラフィーを用いて PLG-00H を分析する。PLG-00H と肺への好酸球の浸潤や Th2 系サイトカインなどの気管支喘息に特徴的な指標を比較する。また、測定や免疫染色した酸化ストレスマーカーであるイソプロスタニンや好酸球活性化マーカーであるプロモチロシンとの比較を行う。必要なら個々の PAH や修飾された PAH や捕集した大気粉塵の抽出物も用いる。

4. 研究成果

大学の異動により、当初使用する予定だった機器がすぐには使えない状況となった。また、新設学部のため、多くの時間を講義（準備）や会議等に費やした。他大学で行う予定だった実験は新型コロナウイルス感染症の影響や上記の理由により実施できなかった。研究の準備等で行ったことを記す。

(1) 機器や試薬の準備

ジアシルグリセロール過酸化物や酸化物の合成時に使用するエバポレーターを購入した。ジアシルグリセロール過酸化物等合成時に使用する高速液体クロマトグラフィーや、好酸球用培養細胞からのスーパーオキシドアニオンの生成を測定する化学発光検出器は譲り受けた。用意した機器で行う実験に必要な試薬を購入した。

(2) 情報の収集

日本予防医学会や日本衛生学会に参加し、大気汚染と健康に関する発表やシンポジウムに参加し、情報を得た。また、参加している研究者と情報交換を行なった。

(3) 論文の検索

多環芳香族炭化水素類と気管支喘息等の呼吸器アレルギー疾患にどのように酸化ストレスが関与しているか論文検索した。ジアシルグリセロール過酸化物に関する報告も検索した。また、アレルギー疾患を含む脂質の酸化と疾患に関する総説の執筆を行なったが、受理には至らなかった。

<引用文献>

Enoch Orlando Anyenda, Tomomi Higashi, Yasuhiro Kambayashi, Thao Thi Thu Nguyen, Yoshimasa Michigami, Masaki Fujimura, Johsuke Hara, Hiromasa Tsujiguchi, Masami Kitaoka, Hiroki Asakura, Daisuke Hori, Yohei Yamada, Koichiro Hayashi, Kazuichi Hayakawa, Hiroyuki Nakamura. Association of cough prevalence in non-asthma adult patients with ambient polycyclic aromatic hydrocarbons, nitrogen and sulphur dioxide: A longitudinal study. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **13(8)** (2016) 800.

Enoch Orlando Anyenda, Tomomi Higashi, Yasuhiro Kambayashi, Nguyen Thi Thu Thao, Yoshimasa Michigami, Masaki Fujimura, Johsulke Hara, Hiromasa Tsujiguchi, Masami Kitaoka, Hiroki Asakura, Daisuke Hori, Yohei Yamada, Koichiro Hayashi, Kazuichi Hayakawa, Hiroyuki Nakamura. Exposure of daily ambient particulate polycyclic aromatic hydrocarbons and cough occurrence in adult chronic cough patients: A longitudinal study. *Atmospheric Environment* **140** (2016) 34-41.

Go Takahashi, Hiroyuki Tanaka, Keiko Wakahara, Reishi Nasu, Mikiko Hashimoto, Kosuke Miyoshi, Hirohisa Takano, Hirohisa Yamashita, Naoki Inagaki, Hiroichi Nagai. Effect of diesel exhaust particles on house dust mite-induced airway eosinophilic inflammation and remodeling in mice *Journal of Pharmacological Science* **112(2)** (2010) 192-202.

Susumu Takekoshi, Yasuhiro Kambayashi, Hidetaka Nagata, Tatsuo Takagi, Yorihiro Yamamoto, Keiichi Watabnabe.

Activation of protein kinase C by oxidized diacylglycerol.

Biochemical and Biophysical Research Communications **217(2)** (1995) 654-660.

Yasuhiro Kambayashi, Susumu Takekoshi, Yutaka Tanino, Keiichi Watanabe, Minoru Nakano, Yoshiaki Hitomi, Tomoko Takigawa, Keiki Ogino, Yorihiro Yamamoto. Various molecular species of diacylglycerol hydroperoxide activate human neutrophils via PKC activation.

Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition **41(1)** (2007) 68-75.

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、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	中村 裕之 (Nakamura Hiroyuki) (30231476)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------