

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590559

研究課題名（和文） 黄砂による肺細胞障害特に酸化損傷に関する実験研究

研究課題名（英文） Research about the damage of lung exposed by Asian sand dust.

研究代表者

井上 純子（INOUE SUMIKO）

鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：20378657

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、吸入された黄砂の肺細胞への影響とその作用機構の解明であった。炎症を介した酸化損傷機構の関与を予測した。黄砂などのマウスへの投与は生理食塩水に懸濁させ点鼻で行った。週1回4回投与後取り出した肺組織に黄砂投与群で炎症が認められ、ニトログアニン、8-oxodGの生成が示唆された。8-oxodGをHPLCで定量し、黄砂投与群での有意な増加が認められた。これらの結果から、黄砂吸入による肺の炎症と酸化損傷の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The potential pulmonary toxicity by Asian sand dust was investigated. ICR mice were given suspended Asian sand dust with saline by intranasal droplet application once/a week, totally 4 times. Histologically examined lungs showed inflammation by Asian sand dust and association of oxidative stress. Quantitative study by HPLC showed 8-oxodG in lung of mice exposed by Asian sand dust increased significantly. These results suggest that Asian sand dust induces the formation of oxidative species in the lung and leads to inflammation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学 衛生学・公衆衛生学

キーワード：（1）黄砂 （2）肺細胞 （3）ICRマウス （4）炎症

（5）8-ニトログアニン （6）8-oxodG

1. 研究開始当初の背景

（1）中国大陸内陸部から飛来する黄砂は、古来からの自然現象の一部であったが、最近地球上で進んでいる砂漠の広域化に伴い、飛来の頻度や地域が増加していることが、環境

庁・気象庁の調査でも明らかになってきている。

（2）日本では中国・韓国に比べると飛来する黄砂の濃度が低いこともあり健康上の影

響についてはまだ重要視されていない。黄砂による健康被害の疫学調査や黄砂の生体影響研究も多くは報告されていなかった。

(3) 日本でも黄砂の飛来が花粉の飛びやすい春に多いことや、花粉症などのアレルギー人口が増加していることから、子供や高齢者など感受性の高い人口層を中心に、黄砂の健康被害が拡大していく可能性は十分考えられた。

(4) 黄砂はSiO₂を最も多く含むが、他にもいろいろなミネラルが含まれ、また土壌中の微生物に由来する成分や大気汚染物質を吸着した成分など多くの混合物であることが環境庁などで調査されている。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、近年日本への飛来が増加しているといわれる黄砂の生体への影響、特に肺での作用機構を知ることを目的とする。

(2) 黄砂の微粒子が肺胞内に進入し炎症を起こす過程で、活性窒素種・活性酸素種によるニトロ化・酸化DNA損傷の寄与が関係すると予想される。本研究では、動物実験で黄砂とその成分を投与して、肺組織の変動タンパク質のプロテオーム解析を行い、8-ニトログuaninと8-oxodG測定を組み合わせることにより、黄砂の生体内障害作用とその本体がどこから生じるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 黄砂の数種の成分(SiO₂, Al₂O₃)、付着微生物を高温で不活化させた黄砂、黄砂そのものを生理食塩水に超音波処理にて懸濁させ、ICRマウス(5週令、雄、各群N=5)に点鼻投与(各3滴)した。粒子の濃度は10mg/mLとした。他に生理食塩水群、OVA(卵白アルブミン、7.5ug/mL)群、OVA+黄砂群、OVA+加熱黄砂群、OVA+SiO₂群についても同様の投与を行ったが、点鼻投与のみのスト

レスを考慮し、何も投与しないコントロール群を設け、これについても試験した。投与は週1回、全4回とした。黄砂は連携研究者より供与された中国本土由来のものである(直径平均5um)。動物実験は予備的なものを含めて3回行った。

(2) マウスの肺を取り出し、組織観察用、8-oxodG測定用、プロテオーム解析用に分けた。

(3) 組織観察用の肺組織をホルマリン固定し、切片を作ってHE染色(ヘマトキシリン・エオジン染色)および免疫染色(8-nitroguanine, 8-oxodG, iNOS)に供し、顕微鏡観察した。

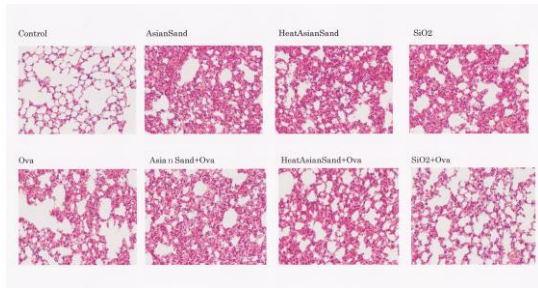
(4) 8-oxodG測定用の肺組織から8-oxodG測定用のキットによってDNAを抽出し、これを酵素処理(ヌクレアーゼP1、アルカリフォスファターゼ)して、ECD付HPLCにかけた。8-oxodG生成量はピーク面積からdGに対する比として求めた。

(5) プロテオーム解析用の肺組織からタンパク質を抽出し、蛍光標識2次元ディフアレンスゲル電気泳動(2D-DIGE法)によって発現変動の解析を行った。別に2次元電気泳動を行い、CBB染色して切り取ったスポットからタンパク質を抽出して、トリプシンによって消化処理し、ペプチドをMALDI/TOF/TOFにかけて、ペプチドマスフィンガープリンティング法による同定を行った。

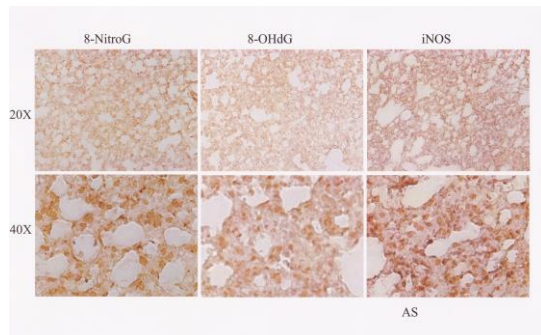
4. 研究成果

(1) 予備実験ではマウス肺組織のHE染色により、SiO₂+OVA群>OVA群で肺組織に炎症が認められた。次の2回の実験で黄砂によって肺胞間質に炎症が起こったことがHE染色により示された。加熱黄砂群でもほとんど同様の結果が得られ、我々の実験では加熱による微生物不活化の効果が認められな

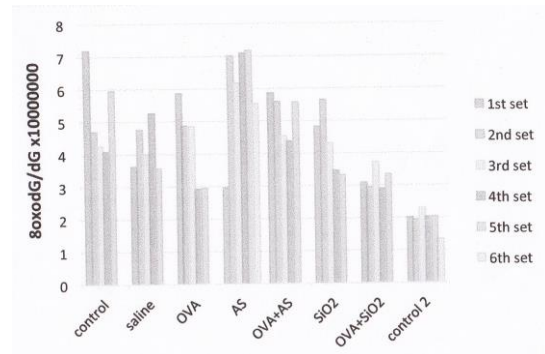
った。またアレルギー誘因物質となる OVA では OVA 自身で弱い炎症が認められたものの、黄砂+OVA の効果は黄砂のみに比べてあまり増強が認められなかった。これは投与方法によるものなのか、OVA の濃度が不足していたのか不明である。生理食塩水のみでの投与では炎症はほとんどなかった。黄砂に比して弱かったが SiO₂による炎症も認められた。



(2) 2回の動物実験の肺組織標本の免疫染色により、黄砂投与によって 8-ニトログアニンと 8-oxodG が生成していることが示された。また iNOS の発現も弱いながら認められた。



(3) 最後の動物実験で、肺組織から抽出した DNA の 8-oxodG 定量分析によって、肺組織中の 8-oxodG の黄砂投与による有意な増加が示された。OVA の効果はここでも明らかでなかった。SiO₂による 8-oxodG の生成増加はわずかであった。



これらの結果から黄砂によって肺組織中で 8-ニトログアニンと 8-oxodG などの活性酸素種が生成し、炎症発生をもたらすことが示唆された。

我々の用いた投与方法（懸濁液の点鼻）は気管内に直接投与する方法に比して、ヒトの黄砂への曝露に近いと考えたが、正確な投与量がわかりにくい欠点とともに、実際に肺に届く量は投与量に比してわずかである可能性が考えられた。また肺組織の変化とともに鼻粘膜や気管内の変化もさらに検討が必要と考えられた。しかし、肺に届く黄砂の量が少なくても、肺における活性酸素類の生成と炎症が確認されたことは、アレルギーを持つ人、喫煙者、気管支の疾患を持つ人などハイリスクの者にとって、黄砂を繰り返し吸入することは健康被害に結びつくことが十分予想される。

(4) 肺組織から抽出したタンパク質の 2D-DIGE 蛍光二次元電気泳動法による解析によって、黄砂投与群で発現の有意差がみられるタンパク質は数十個示された。しかし、その後の MALDI/TOF/TOF によるプロテオーム解析で、炎症関係、活性酸素関係の有力なタンパク質は見つかっておらず、未だ解析途中である。今後、ウェスタンブロットの併用によって酸化的損傷タンパク質についても検討する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

小泉昭夫、井上純子 家族性脳動静脈奇形と遺伝子 *Clinical Neuroscience* 29, pp1147-1150, 2011

Hiraku Y, Kawanishi S, Ichinose T, Murata, M, The role of iNOS-mediated DNA damage in infection- and asbestos-induced carcinogenesis, *Ann. NY Acad. Sci.* 1203:15-22. (2010)

Hiraku, Y., Formation of 8-nitroguanine, a nitrative DNA lesion, in inflammation-related carcinogenesis and its significance, *Environ. Health Prev. Med.* 15: 63-72 (2010).

Murata M, Thanan R, Ma N, Kawanishi S. Role of nitrative and oxidative DNA damage in inflammation-related carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol.* 2012:623019. (2012).

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 2 件)

Hiraku, Y., Kawanishi, S., Prognostic significance of nitrative DNA damage in infection- and inflammation-related carcinogenesis, In: *Nitric Oxide and Cancer: Prognosis, Prevention and Therapy*, Springer, New York, NY, USA, 6: 341-357 (2010).

Ma N, Murata M, Ohnishi S, Thanan R, Hiraku Y, Kawanishi S. 8-Nitroguanine: A potential biomarker to evaluate the risk of inflammation-related carcinogenesis. In: *Biomarker*. Khan TK (ed.). InTech, 201-224 (2012)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 純子 (INOUE SUMIKO)

研究者番号 : 20378657

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

平工 雄介 (HIRAKU YUUSUKE)

研究者番号 : 30324510

連携研究者

川西 正祐 (KAWANISHI SHOUSUKE)

研究者番号 : 10025637