

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18040

研究課題名（和文）アレルギー性草本類花粉における大気汚染物質との反応及びその健康リスクへの評価研究

研究課題名（英文）Characterization of the allergic herbaceous pollen reacted with air pollutants and health risk

研究代表者

王 偉倩（WANG, WEIQIAN）

埼玉大学・理工学研究科・助教

研究者番号：20897631

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、主に、関東地区の草本類花粉とその花粉アレルゲンの飛散挙動に関して調査を行った。又は、気象要因（気温など）などの影響を受けていることが推察された。花粉と大気汚染物質の反応を分析し、アレルギー性への影響調査を行った。特に、室内暴露実験では、スギ花粉粒の破裂率、タンパク質溶出濃度の結果からは、イオン水溶液によるスギ花粉粒破裂の促進作用を確認できた。又は、執行型 Caspase-3 活性感知センサー分子、FRET 型バイオプローブを作製して、モデル細胞とした真皮細胞 NIH3T3 と子宮頸がん細胞 HeLa に導入し、大気汚染物質（に）暴露しそのアポトーシス誘導することを確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は関東地区大気中の草本類花粉とアレルゲン物質の飛散挙動、汚染物質による花粉の構造変化やアレルギー性変更、細胞実験で汚染物質粒子等の健康リスクに着目した研究を行った。それらの人体への健康影響が懸念されている。今後、大気環境化学、バイオエアロゾルの事例研究、大気中の反応プロセス及び健康リスクを継続していく必要がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, the scattering behavior of herbaceous pollen and pollen allergens in the Kanto area were investigated. And it could get some influence by meteorological factors (temperature, etc.) Otherwise, the interaction between pollen and air pollutants were studied and investigated their effects on allergenic properties. The model-exposure experiments between cedar pollen grains and typical air pollutants. It has confirmed that ionic components could promote the rupture of cedar pollen grains. Moreover, an executive Caspase-3 activity sensing sensor (FRET type bioprobe) was tried to import into model cells (dermal cell NIH3T3 and cervical cancer cell HeLa) via exposed air pollutants and confirmed their potentially induce apoptosis.

研究分野：環境化学 大気環境

キーワード：花粉 花粉アレルゲン バイオエアロゾル

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本での花粉症発生率は年々高くなっており、呼吸器系などへの健康影響が大きいと考えられる。関東都市部の秋季花粉飛散期は、通常毎年8月から10月であるが、これはブタクサ・ヨモギ・カナムグラ等の草本類植物に起因している。花粉アレルゲンは直径約20~40 μm の花粒子として飛散するだけでなく、微粒子のアレルゲン粒子で飛散することもある。同時に、汚染物質粒子は花粉症を促進するアジュバントとして作用する可能性がある。また汚染物質粒子が花粉表面に付着し、花粉の破裂と内部のアレルゲン粒子の放出を加速させることを確認した。花粉とアレルゲン粒子に含まれるアレルゲンは大気汚染物質からの影響を受けて変化し、花粉症リスクが高まる可能性がある。大気汚染物質は主に自動車排気ガスおよび石油燃料の燃焼に由来するガス、粒子状汚染物質「イオン成分(Ca^{2+} , NO_3^- , SO_4^{2-})、重金属成分、複数の芳香族炭化水素(PAHs)」に分類される。花粉に対する日射量、ガスによる花粉アレルゲンの影響は調査されているが、他の大気浮遊粒子状物質の影響と反応メカニズムに関する研究も重要となる。健康影響については細胞系試験システムによる生体毒性のリスク評価を含めて調査する研究も重要となる。

2. 研究の目的

本研究は大気中の草本類花粉と汚染物質に注目し、汚染物質による花粉アレルゲンの構造変化やアレルギー性変更の反応、汚染物質粒子と花粉アレルゲンの複合的健康リスクの評価を通じて、特に花粉アレルゲンの微小粒子移行プロセスの研究、並びにアレルギー性と汚染物質の関係・細胞実験による健康影響の把握を目的としている。

3. 研究の方法

(1) 秋季大気中の花粉と主なアレルゲン物質飛散観測

2022年~2023年の秋季(8月中旬~10月下旬)に埼玉県さいたま市荒川総合運動公園(河川敷)において、秋季花粉と花粉アレルゲンをそれぞれ異なる装置でサンプリングした。花粉捕集には Durham sampler を、アレルゲン捕集には High Volume Air Sampler Andersen Type (AHV と称す)を使用した。

Durham sampler は重力法で花粉をスライドガラスで捕集する装置である。Burkard sampler Burkard sampler は吸引型花粉捕集器であり、サンプラー内部にあるドラムに巻き付けたワセリンを塗ったメリネックステープに風を吹き付けることで花粉を捕集する。捕集後のスライドガラスやメリネックステープは回収し、花粉の染色を行い、カバーガラスをかけて光学顕微鏡で計数する。AHV は 566 L/min で吸引し、5段階分級(第一段 $>7.0 \mu\text{m}$, 第二段 $3.3 \sim 7.0 \mu\text{m}$, 第三段 $2.0 \sim 3.3 \mu\text{m}$, 第四段 $1.1 \sim 2.3 \mu\text{m}$, 第五段 $<1.1 \mu\text{m}$)し、大気中の浮遊粒子を捕集する装置である。ブタクサ花粉アレルゲン Amb a 1 濃度分析に使用した。フィルター中のタンパク質を抽出し、ELISA法(酵素結合免疫吸着測定法)でその中の Amb a 1 の分析を行った。

(2) イオン成分による花粉アレルゲン性への影響調査

イオン成分がスギ花粉にどのような影響を与えるのか調査を行った。 KNO_3 , NaNO_3 , Na_2SO_4 , K_2SO_4 (イオン水溶液の陽イオン当量を 0.1 N) を調製した。スギ花粉 2mg を各溶液 1.5ml に加え、40 rpm で攪拌した。攪拌開始から 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h 時点でプレパラートを作成し、10 分後に顕微鏡で観察した。攪拌時間、イオン種、pH による破裂率の変化を調べた。表面プラズモン共鳴 (SPR) 法で花粉溶出されたのアレルゲン Cry j1 の分析を行った。

(3) カスパーゼ-3 センサー法によるベンゾ[a]ピレンの健康リスク評価

蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)型バイオプローブのドナー分子は caspase3 認識配列挿入緑色蛍光タンパク質(GFP)変異体、アクセプター分子は蛍光色素マレイミド誘導体とした。複数の色素で作製した FRET 型バイオプローブを 2.5 μM 、12 時間それぞれの細胞培養上清に添加し、細胞への取り込み効率の良かった色素を選択しアポトーシス誘導実験のバイオプローブとして作製した。選択された FRET 型バイオプローブを 2.5 μM 、12 時間それぞれの細胞培養上清に添加し、細胞への導入を行った。FRET 型バイオプローブが導入された細胞へコントロールアポトーシス誘導試薬として 2mg/mL cycloheximide (CHX) 及び 100ng/mL TNF- α を、モデル大気汚染物質として Benzo[a]pyrene (B[a]P)、を複数の濃度で培養上清に 24 時間添加する事で暴露し、その後回収した細胞をフローサイトメトリー (:FACS)にて caspase3 活性化の有無を解析した。

4. 研究成果

(1) さいたま市大気中の秋季花粉と Amb a1 捕集結果と考察

2022 年度、2023 年度のさいたま市荒川総合公園での Durham sampler による花粉捕集結果を表 1 に示す。2022 年のさいたま市における花粉飛散開始は 8 月 19 日であり、花粉飛散終了は 10 月 16 日で花粉飛散期間は 59 日間であった。飛散開始、飛散終了も早まっていることから、ブタ

クサ花粉飛散の早期化が見られた。飛散数の割合はブタクサ(84.5%) > カナムグラ(12.4%) > ヨモギ(3.1%)の順になっていた。ブタクサ花粉数は2021年と比較して花粉総数、ピーク花粉飛散数共に40%の減少が見られた。ブタクサは成長期間中が高気温であった場合、花粉の生産量を減らす傾向があり成長期間の7月の平均気温が1.5 高かったことから花粉飛散数の減少が起こったと考えられる。2023年では、花粉飛散開始は8月24日であり、花粉飛散終了はサンプリング期間中に観測できなかった。したがって花粉飛散期間は70日間以上となった。花粉飛散数は、飛散数の割合はブタクサ(80.5%) > カナムグラ(15.1%) > ヨモギ(4.4%)の順になっていた。2021年、2022年よりもヨモギ、カナムグラの割合が大きくなり、カナムグラ花粉被害が拡大中であることが示された。

2022年度、2023年度のAHVによる捕集された花粉アレルゲン(Amb a1)分析結果を図1に示す。2022年ブタクサ花粉アレルゲン(Amb a1)総量は314.8pg/m³ですが、粒径分布は粗大粒子(>7.0 μm)(51%) > PM_{1.1}(31%) > PM_{3.3-7.0}(12%) > PM_{1.1-2.0}(4%) > PM_{2.0-3.3}(2%)の順になっていた。2023年ブタクサ花粉アレルゲン(Amb a1)総量は314.8pg/m³ですが、粒径分布はPM_{3.3-7.0}(37%) > 粗大粒子(>7.0 μm)(22%) > PM_{1.1}(21%) > PM_{1.1-2.0}(10%) > PM_{2.0-3.3}(10%)の順になっていた。花粉より、花粉アレルゲン物質の粒径は何分の1と考えられる。花粉が割れてアレルゲンを放出しやすい環境だった可能性があり、原因として考えられるのはやはり高気温である。今後は、ブタクサ花粉の破裂率に関して、高気温で育てる、大気汚染物質との反応などのモデル実験も必要であると考えられる。

表 1 さいたま市荒川での2022、2023年秋花粉飛散状況

	ブタクサ		ヨモギ		カナムグラ		秋花粉全体	
	2022	2023	2022	2023	2022	2023	2022	2023
花粉飛散開始日	8/19	8/24	9/12	9/21	9/14	9/23	8/19	8/24
花粉飛散ピーク日	9/8	9/17	9/21	9/21	10/4	10/5	9/8	9/17
花粉飛散終了日	9/27	9/25	10/5	10/16	10/16	-	10/16	-
花粉飛散期間(days)	40	33	24	26	33	29以上	59	70以上
ピーク飛散数(個/㎥)	99	90	4	2.8	6	15	100	91
花粉総飛散数(個/㎥)	564	551	21	30	83	103	667	685

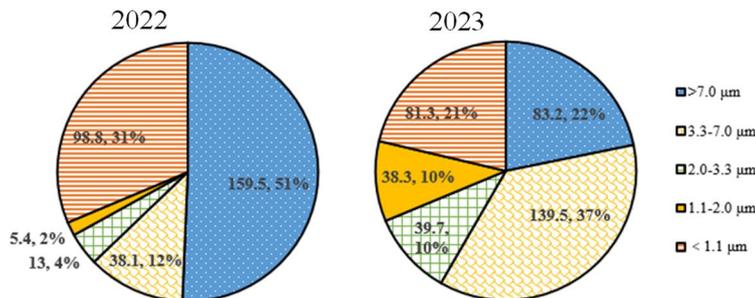


図 1 さいたま市での2022年、2023年ブタクサ花粉アレルゲン(Amb a1)総量(pg/m³, %)

(2) イオン成分によるスギ花粉アレルゲン性への影響調査

図2(a)には、各イオン水溶液によるスギ花粉の破裂率推移を示す。各溶液において、48時間経過時に特に大きく破裂率が上昇していた。また、48時間攪拌時以外において、イオン水溶液はH₂Oと比較すると高い破裂率を記録していた。48時間攪拌時のH₂Oの破裂率がイオン水溶液とあまり変わらなかった理由としては、数えたスギ花粉総数が少なく、破裂率が上振れした可能性が挙げられる。また、KNO₃水溶液とNaNO₃水溶液、K₂SO₄水溶液とNa₂SO₄水溶液を比較してもあまり違いがなく、K⁺、Na⁺による差は見られないと考えた。さらに、KNO₃水溶液、NaNO₃水溶液はK₂SO₄水溶液、Na₂SO₄水溶液と比較して少しだけ破裂率が高く、NO₃⁻はSO₄²⁻よりもスギ花粉に与える物理的影響が大きい可能性があると考えた。

図2(b)に各イオン水溶液によるスギ花粉粒からのCry j1溶出濃度を示す。KNO₃水溶液、NaNO₃水溶液、K₂SO₄水溶液、Na₂SO₄水溶液はH₂Oと比較して高いCry j1濃度を記録しており、イオン種によるCry j1への影響を示唆している。それぞれの溶液を攪拌時間別に見てみると、1時間攪拌時点では溶液によるCry j1濃度の差が少なく、イオン成分による影響は6時間以上かかることが分かる。また、NaNO₃水溶液、K₂SO₄水溶液の24時間から48時間攪拌時点には、Cry j1濃度がほとんど変わらない上、KNO₃水溶液、Na₂SO₄水溶液では24時間から48時間攪拌時点にCry j1濃度が減少している。よって、Cry j1の濃度上昇には上限があり、それが24

時間付近であると考えられる。次に、 KNO_3 水溶液と NaNO_3 水溶液、 K_2SO_4 水溶液と Na_2SO_4 水溶液を比較するが、ほとんど差は見られない。ゆえに、 K^+ 、 Na^+ による差は少ないと考えた。また、 KNO_3 水溶液と K_2SO_4 水溶液を比較すると、 K_2SO_4 水溶液の方が Cry j 1 濃度が高く、 NaNO_3 水溶液と Na_2SO_4 水溶液を比較すると、 Na_2SO_4 水溶液の方が Cry j 1 濃度が高い。以上のことから、 NO_3^- よりも SO_4^{2-} の方が Cry j 1 濃度上昇に大きく寄与していると考えられる。

(3) カスパーゼ-3 センサー法によるベンゾ[a]ピレン「B[a]P」の健康リスク評価

アポトーシス未誘導の際には、バイオプローブの導入のみを行った際とほぼ同等の FRET 効率を示した。CHX によるアポトーシス誘導によって、FRET 効率が減少する方向への NIH3T3、Hela 細胞集団の移動が確認され、アポトーシスが誘導されたことが確認された。又、いずれの B[a]P の濃度においても、カスパーゼ 3 活性化の増加方向への細胞集団の移動が確認された(図 3)。さらに、図 3 から濃度依存的に相対 Caspase-3 活性化率の値が増加していることから、B[a]P によって濃度依存的にアポトーシスが誘導されたことが示唆された。両細胞 (NIH3T3、Hela) においてカスパーゼ 3 活性化能が確認された。

真皮細胞 NIH3T3 及び子宮頸がん細胞 HeLa に大気汚染物質を暴露したところ、プログラム細胞死、アポトーシス誘導時に活性化される細胞内プロテアーゼ、Caspase-3 の活性化が確認された。その活性化は大気汚染物質濃度依存的であったが、大気汚染物質種、細胞種により異なる程度を示した。大気汚染物質の中には、皮膚及びその他の臓器に対しプログラム細胞死、アポトーシスを誘導する可能性が示唆された。

今後、汚染物質だけでなくアレルゲン物質の健康リスク評価も着目しながらブタクサ花粉の破裂、タンパク質の物理化学変化の発生プロセスについてさらに評価を行う必要がある。

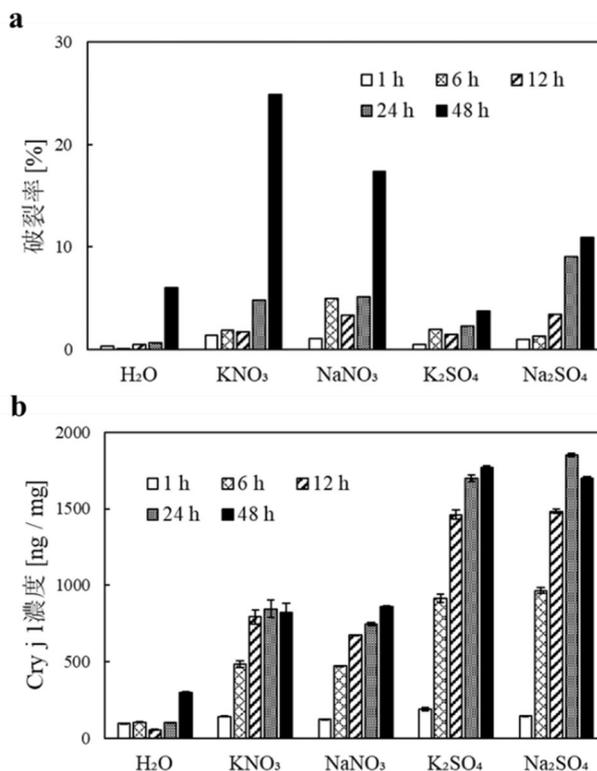


図 2 各イオン水溶液による攪拌時間別のスギ花粉粒の破裂率推移 [%] (a) Cry j 1 溶出濃度 [ng /mg] (b).

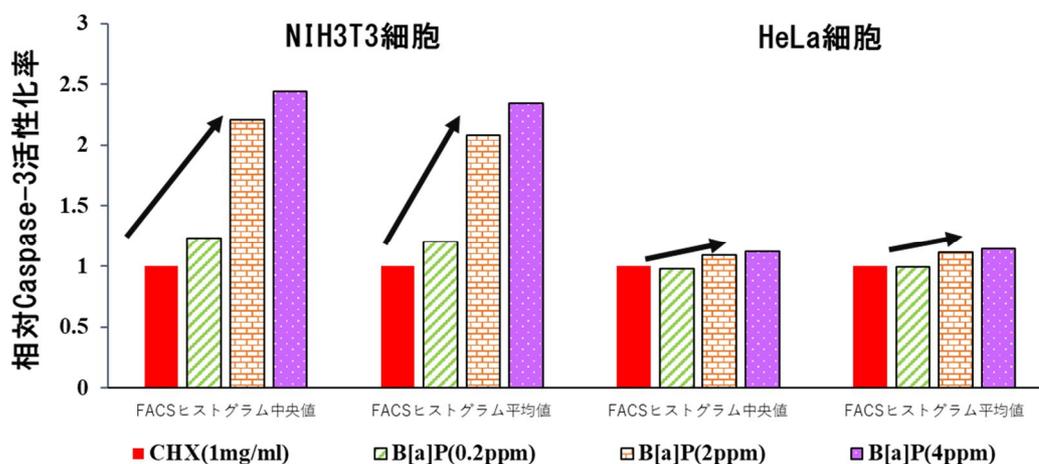


図 3 NIH3T3、HeLa 細胞における B[a]P の影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Weiqian Wang; Qingyue Wang; Senlin Lu; Yichun Lin; Miho Suzuki; Yuma Saito	4. 巻 14
2. 論文標題 Behavior of Autumn Airborne Ragweed Pollen and Its Size-Segregated Allergens (Amb a 1): A study in Urban Saitama, Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Atmosphere	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/atmos14020247	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Christian Ebere Enyoh, Prosper E. Ovuoraye; Qingyue Wang, Weiqian Wang	4. 巻 459
2. 論文標題 Examining the impact of nanoplastics and PFAS exposure on immune functions through inhibition of secretory immunoglobulin A in human breast milk	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Hazardous Materials	6. 最初と最後の頁 132103-1132112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jhazmat.2023.132103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yichun Lin; Kai Xiao; Weiqian Wang; Senlin Lu, Qingyue Wang	4. 巻 14
2. 論文標題 Study on Lowering the Group 1 Protease Allergens from House Dust Mites by Exposing to Todomatsu Oil Atmosphere	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Atmosphere	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/atmos14030548	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Christian Ebere Enyoh, Qingyue Wang, Weiqian Wang, Tanzin Chowdhury, Mominul Haque Rabin, Md. Rezwanul Islam, Guo Yue, Lin Yichun, Kai Xaio	4. 巻 1
2. 論文標題 Sorption studies of per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) using polyethylene (PE) microplastics as adsorbent: grand canonical monte carlo and molecular dynamics(GCMC-MD) studies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 17-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/03067319.2022.2070016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Mominul Haque Rabin, Qingyue Wang, Md Humayun Kabir, Weiqian Wang	4. 巻 30
2. 論文標題 Pollution characteristics and risk assessment of potentially toxic elements of fine street dust during covid-19 lockdown in Bangladesh	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Environmental Science and Pollution Research	6. 最初と最後の頁 4323-4345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11356-022-22541-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計11件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Wang Weiqian
2. 発表標題 木質バイオマス燃焼等由来の大気汚染物質とその毒性評価
3. 学会等名 1st smart wood forum (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Wang Weiqian, 王 青躍, 鈴木 美穂, 中島 大介
2. 発表標題 カスパーゼ-3センサー法によるベンゾ[a]ピレンの健康リスク評価に関する研究
3. 学会等名 第64大気環境学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 齊藤 悠真 王 青躍 Wang Weiqian
2. 発表標題 2022年さいたま市荒川河川敷の秋季花粉とアレルゲン粒子の飛散調査
3. 学会等名 日本花粉学会第64回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 王 青躍, 桐生 渚嵯, Wang Weiqian, 安部 文子
2. 発表標題 木炭塗料を塗布したモデルハウスによる微粒子の除去調査
3. 学会等名 日本花粉学会第64回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊山 茂輝, 王 青躍, Wang Weiqian
2. 発表標題 硝酸塩によるスギ花粉からの アレルゲン等の溶出挙動調
3. 学会等名 日本花粉学会第64回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上原 七海, 王 青躍, Wang weiqian, 落合 善美
2. 発表標題 2023年首都圏の春季花粉の 飛散挙動とアレルゲンの計測
3. 学会等名 日本花粉学会第64回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上原 七海, 王 青躍, 王 偉セイ, 落合善美
2. 発表標題 2022年首都圏の春季花粉の 飛散挙動とアレルゲンの計測
3. 学会等名 第64回 大気環境学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中晃成、王青躍、王偉倩
2. 発表標題 中国低品位炭-未利用バイオマス混合燃焼における多環芳香族炭化水素(PAHs)排出挙動の解析
3. 学会等名 第64回 大気環境学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Wang Weiqian, 王 青躍、島田 直季, 落合 善美
2. 発表標題 埼玉・東京の春季主要花粉とそのアレルゲン飛散の経年挙動解析
3. 学会等名 日本花粉学会第63回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤 悠真, 王 青躍, Wang Weiqian
2. 発表標題 さいたま市における 2021 年秋季花粉の飛散挙動の解析
3. 学会等名 第63回大気環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桐生 渚岐、王 青躍、Wang Weiqian、田中 晃成
2. 発表標題 廃棄木質バイオマスの熱分解処理と燃焼における粒子状物質の排出挙動
3. 学会等名 第 18 回バイオマス科学会議
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------