

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：27501
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23710046
 研究課題名（和文）黄砂のスギ花粉症増悪作用を明らかにするためのカビ標品を用いた
 検査研究
 研究課題名（英文）Experimental study for clarifying the aggravating effects of Asian
 sand dust on Japanese cedar pollinosis using β -glucan of a mold.
 研究代表者
 賀 ビョウ（HE MIAO）
 大分県立看護科学大学・看護学部・研究員
 研究者番号：70600675

研究成果の概要（和文）：

最近の疫学調査では黄砂現象時にスギ花粉症や気管支喘息等のアレルギー疾患に悪化が見られることが報告されている。黄砂には様々な微生物が付着しているが、カビもその一つである。カビに含まれる β -グルカンがアレルギー炎症を悪化する可能性が考えられるため、本研究では黄砂に付着していたベルカンデラ菌（真菌： β -グルカンを含む）のスギ花粉症増悪作用を、マウスのスギ花粉症モデルを用いて調べた。その結果、ベルカンデラ菌(*Bjer*)自身にアレルギー性鼻炎を起こす作用が有ること、またスギ花粉抗原によって惹起されるアレルギー炎症が黄砂+*Bjer*の混合曝露を受けると著しく悪化することが明らかとなった。この結果から、黄砂のスギ花粉症悪化作用の一部は黄砂に付着していた真菌成分が重要な役割を果たしている可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

Epidemiologic studies have shown that Asian sand dust (ASD) events coincided with an increase in child and adult asthma, and allergic rhinitis including Japanese cedar pollinosis. The wind-borne ASD contains various microbial agents, such as bacteria, fungi, fungal spores, and viruses. However, it is unclear the effects of microbial materials like β -glucan derived from fungi on Japanese cedar pollinosis. Recently *Bjerkandera adusta*, which is a fungus, was isolated from ASD aerosol. In this study, the exacerbating effects of the fungus, *Bjerkandera* (*Bjer*) and heated (H)-ASD on Japanese cedar pollen (Cryj1)-induced allergic rhinitis were investigated in BAL/c female mice. *Bjer*, itself caused allergic rhinitis. The Cryj1-induced allergic rhinitis was enhanced by co-exposure of *Bjer*+H-ASD. These results suggest that β -glucan together with ASD may play an important role in the aggravation of Japanese cedar pollinosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

 キーワード：スギ花粉症・ β -グルカン・黄砂・アレルギー性鼻炎・マウス・Cryj1・
 ベルカンデラ・好酸球

1. 研究開始当初の背景

春先に飛来する黄砂は年々拡大する傾向にあり、大気汚染物質も加わった黄砂エアロゾルによる健康影響が危惧されている。最近の疫学調査では黄砂現象時にスギ花粉症や気管支喘息の病態に悪化が見られることが

学術論文に報告され、そのメカニズム解明が急がれている。一方、黄砂のどの様な成分が花粉症を増悪させるのか不明であり、またそのメカニズムも明らかではない。黄砂には多種類の微生物が付着しているが、特にカビ成分である β -グルカンの含有量が多いことが

ら、その増悪因子には黄砂に付着したカビ成分による可能性が示唆されている。そこで、本申請課題では、カビの成分であるβ-グルカンとアスペルギルス抽出標品を用いて、これらの成分の花粉症に対する増悪作用とその増悪メカニズムを明らかにし、黄砂に付着したカビ成分の影響をモデル実験的に検証する。

2. 研究の目的

1) スギ花粉症に対する黄砂付着真菌(β-グルカン)のアレルギー増悪作用の検討

黄砂付着真菌(β-グルカン)にアレルギー性鼻炎を惹起する作用があるか否か、また、黄砂付着真菌のスギ花粉症への影響を評価し、またその増悪メカニズムを明らかにすることを目的とする。

2) スギ花粉症に対する黄砂と付着真菌(β-グルカン)のアレルギー増悪作用の検討

黄砂付着真菌(β-グルカン)に黄砂が加わった時のアレルギー性鼻炎への影響と、また、付着真菌と黄砂が加わった時のスギ花粉症への影響を明らかにすること、またその増悪メカニズムを明らかにすることを目的とする。この研究は真菌が付着した黄砂を想定して、この付着黄砂がスギ花粉症を増悪するか否かを再現するものである。

3. 研究の方法

1) スギ花粉症に対する黄砂付着真菌(β-グルカン)のアレルギー増悪作用の検討

図1に示すごとく、動物はBALB/c雌マウス84匹を用いた。本実験では、β-グルカンの標準品ではなく、実際に金沢大学の小林らによって石川県珠洲市の400m上空で係留気球にて黄砂日に採取された黄砂エアロゾルから分離・培養されたベルカンデラ(Bjer: Bjerkantera adusta)を用いた。このBjerを1%ホルマリンで1時間不活化し、注射用の生理食塩水で洗浄、ソニケーションによって菌体を破碎・洗浄し、12,000回転で遠心分離したペレットをBjer試料とした。このBjer中のβ-グルカン量は32.8ng/mgであった。スギ花粉症モデルを作成するためのスギ花粉抗原は、ITEA株式会社東京環境アレルギー研究所から購入Cryj1を使用した。

マウスは各群14匹(肺洗浄用:8匹;肺病理観察用:6匹)とし、対照群、Bjer 4μg群、Bjer 8μg群、Cryj1群、Cryj1+Bjer 4μg群、Cryj1+Bjer 8μg群の計6群とした(図1)。Cryj1の投与量はマウス1匹あたり4μgとした。これらは全て注射用生理食塩水で懸濁した。対象群は生理食塩水を点鼻投与試料とした。これらを2週間毎に4回点鼻し、4回以降は2日ごとに3回Cryj1を投与し、最終投与8回目には再びCryj1もしくはBjeを点鼻

投与した。点鼻直後25分間鼻かき回数を観察した。また、最終点鼻(8回目)5時間後にマウスを屠殺した。8匹のマウスから鼻腔

に洗浄液(NCLF)を採取し、NCLF中の各炎症細胞数とマクロファージ数、サイトカイン(IL-1β, IL-5, IL-6, IL-13)、ケモカイン(Eotaxin, KC)、鼻組織中のサイトカイン(IL-5, IL-6, IL-13, IL-33)、ケモカイン(Eotaxin, KC, MCP-1, RANRES)を測定した。6匹のマウスから鼻の病理標本作製しPAS染色・HE染色を行い、鼻粘膜上皮の粘液産生細胞や好酸球を観察した。

2) スギ花粉症に対する黄砂と付着真菌(β-グルカン)のアレルギー増悪作用の検討

実験プロトコルを図2に示すごとく、動物はBALB/c雌マウス140匹を用いた。β-グルカンとして、実際に黄砂に付着していた真菌(ベルカンデラ菌)を用いた。ここで使用した黄砂は2011年5月1~3日に北九州で採取した黄砂を用いた。黄砂は付着微生物や化学物質を取り除くために360℃、30分加熱した黄砂(H-SDA: heated ASD)を用いた。またスギ花粉抗原は、ITEA株式会社東京環境アレルギー研究所から購入したCryj1を用いた。これらは全て注射用生理食塩水で懸濁して投与試料とした。

マウスは各群14匹(肺洗浄用:8匹;肺病理観察用:6匹)とし、①対照群、②Bjer(0.2μg)と③Bjer(2μg)の単独群、360℃30分加熱処理した④黄砂(H-ASD)10μg単独群、⑤スギ花粉抗原(Cryj1:4μg)単独群、⑥Cryj1+Bjer 0.2μg群、⑦Cryj1+Bjer 2μg群、⑧Cryj1+H-ASD10μg群、⑨Cryj1+Bjer0.2μg+H-ASD10μg群、⑩Cryj1+Bjer2μg+H-ASD10μg群の10群とし、これらを2週間おきに3回点鼻投与し、その2週間後からCryj1を投与している群ではCryj1のみを4回点鼻投与し、最後の5回目には再びCryj1, Bjer, 或はH-ASDを混ぜた点鼻液を投与した。点鼻直後25分間鼻かき回数を観察した。また、最終点鼻(8回目)5時間後にマウスを屠殺した。8匹のマウスから鼻腔洗浄液(NCLF)を採取し、NCLF中の各炎症細胞数とマクロファージ数、サイトカイン、ケモカインを測定した。6匹のマウスから鼻の病理標本作製しPAS染色・HE染色を行い、鼻粘膜上皮の粘液産生細胞や好酸球を観察した。

4. 研究成果

1) スギ花粉症に対する黄砂付着真菌(β-グルカン)のアレルギー増悪作用の検討

図3に示すごとく、ベルカンデラ単独群の

鼻洗浄液中の炎症細胞の好中球数や好酸球数は投与量に依存して増加した。一方、Cryj1単独群では弱いながらも鼻洗浄液中に好中球数や好酸球数の増加が見られたが、Cryj1+ベルカンデラ併用群ではこれらの炎症細胞数は増加傾向を示すものの、ベルカンデラ単独投与群のBjer 4 μ g群、Bjer 8 μ g群よりも低く、鼻洗浄液中ではむしろ併用投与では低減効果が見られた。

表1に示すごとく、鼻洗浄液中の炎症性サイトカイン・ケモカインは、ベルカンデラの単独投与のIL-1 β 、IL6、KCとEotaxinに増加傾向が見られ、Bjer 8 μ g群のIL-5は対象群より有意に増加した。Cryj1単独投与群ではIL-6に有意な増加が見られ、Eotaxin、KCは増加傾向を示した。一方、Cryj1+Bjer併用投与群ではCryj1+Bjer 4 μ g群のIL-6が対象群より有意に増加し、Cryj1+Bjer 4 μ gと8 μ g群のEotaxinはBjer単独群より増加し、これらは対照群との間に有意な増加が見られた。しかしIL-13とIL-33には発現が見られなかった。鼻の組織中の(IL-5、IL-6、IL-13)、ケモカイン(Eotaxin、KC、MCP-1、RANTES)は、IL-5とIL-13がBjer 8 μ g単独投与群で対照群より有意にした。他の項目は増加するものの、有意差を示すには至らなかった。Cryj1+Bjer併用投与群ではKCのCryj1+Bje 8 μ g群のみが対象群、Cryj1単独群より有意に増加したが、併用群の他の項目のサイトカイン・ケモカイン発現はBjer単独群よりむしろ低い傾向を示した。

病理組織学的観察において、Bjer単独投与群の鼻粘膜上皮細胞の肥厚、粘膜下の好酸球浸潤等アレルギー性鼻炎の病態が観察された。

Cryj1単独投与群でも鼻粘膜上皮細胞の肥厚、粘膜下の好酸球浸潤が観察された。しかし、併用群の鼻粘膜の病理組織学的変化はBjer単独投与群やCryj1単独群より減弱傾向を示していた。

以上の結果から、黄砂に付着した真菌自身にアレルギー性鼻炎を惹起する作用があることを見出した。しかし、スギ花粉との併用投与ではスギ花粉誘導性アレルギー性鼻炎を悪化させる作用は観察されなかった。併用投与による低減効果は今回投与したCryj1の投与量が多い可能性が考えられ、今後はCryj1の投与量を減らして、スギ花粉のアレルギー増悪作用を調べる必要があると考えられる。

2) スギ花粉症に対する黄砂と付着真菌(β -グルカン)のアレルギー増悪作用の検討

図5に示すごとく、⑥Cryj1単独群の鼻洗浄液中の炎症細胞数(好中球・好酸球)は対照群より増加し、更に⑦Cryj1+Bjer 2 μ g群では⑤Cryj1単独群よりも炎症細胞数が増加する

傾向が見られた。

しかし⑥Cryj1+Bjer0.2 μ g群、⑧Cryj1+H-ASD10 μ g群、⑨Cryj1+Bjer0.2 μ g+H-ASD10 μ g群、⑩Cryj1+Bjer2 μ g+H-ASD10 μ g群の鼻洗浄液中の炎症細胞数はCryj1単独群と同レベルであった。

一方、Cryj1単独群の鼻洗浄液中のサイトカイン・ケモカインのIL-6やKCは表2に示すごとく対照群より有意に増加していた。

しかし、併用投与群ではBjerやH-ASDを添加した効果は見られなかった。鼻洗浄液中のIL-5、L-13、IL-33は検出できなかった。

しかし、表3に示すごとく、Bjer 0.2 μ g群、Bjer 2 μ g群の鼻組織中の炎症性サイトカインのIL-5とIL13は、対照群より増加し、Bjer 2 μ g群のIL-13は対照群より有意に増加していた。また、併用投与したCryj1+Bjer 0.2 μ g+H-ASD10 μ gとCryj1+Bjer2 μ g+H-ASD10 μ g群の鼻洗組織中の

IL1 β 、IL-6、MCP-1とKCはそれぞれの単独投与群と比較して、著しく増加していた。病理組織学的にもこの2群は他群と比較して鼻粘膜上皮細胞の肥大、粘膜下の好酸球等の炎症細胞浸潤等、アレルギー性鼻炎の病態が著しかった。

以上の結果から、スギ花粉+Bjer+黄砂の3者の曝露を受けるとTh2系のサイトカイン・ケモカインの誘導を介してアレルギー性鼻炎が著しく悪化することが明らかとなった。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

賀 Bioウ (HE MIAO)

大分県立看護科学大学・看護学部・研究員
研究者番号：70600675

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

動物: BALB/c 雌マウス: 84匹使用

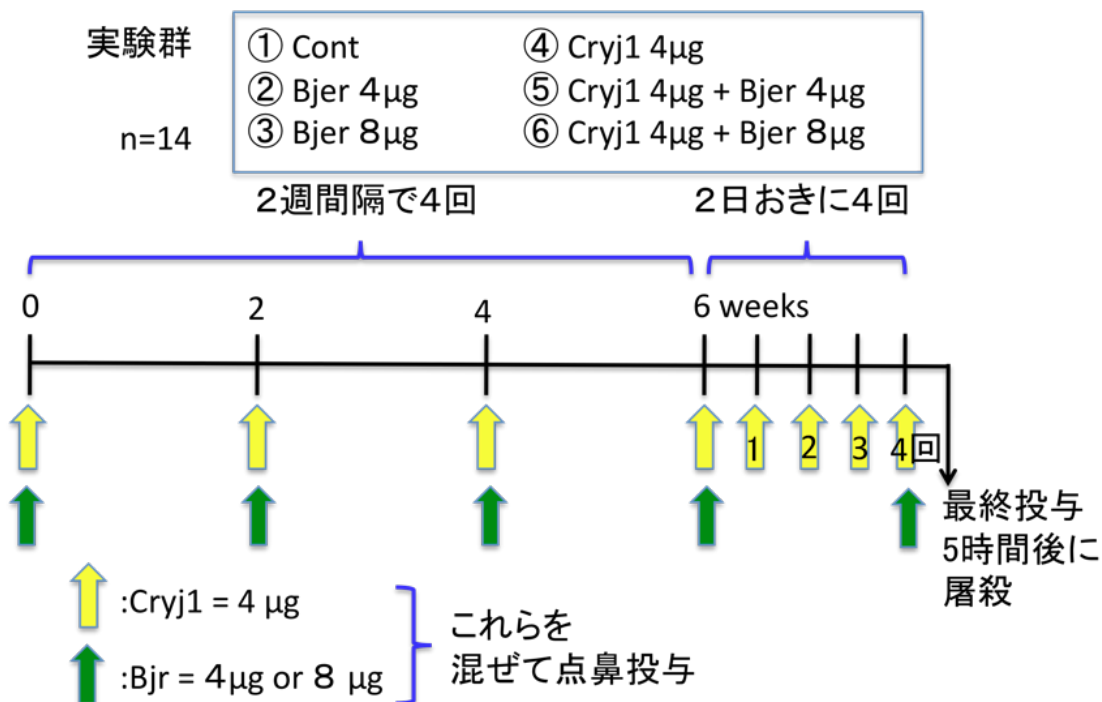


図1. 実験プロトコル

動物: BALB/c 雌マウス: 140匹使用

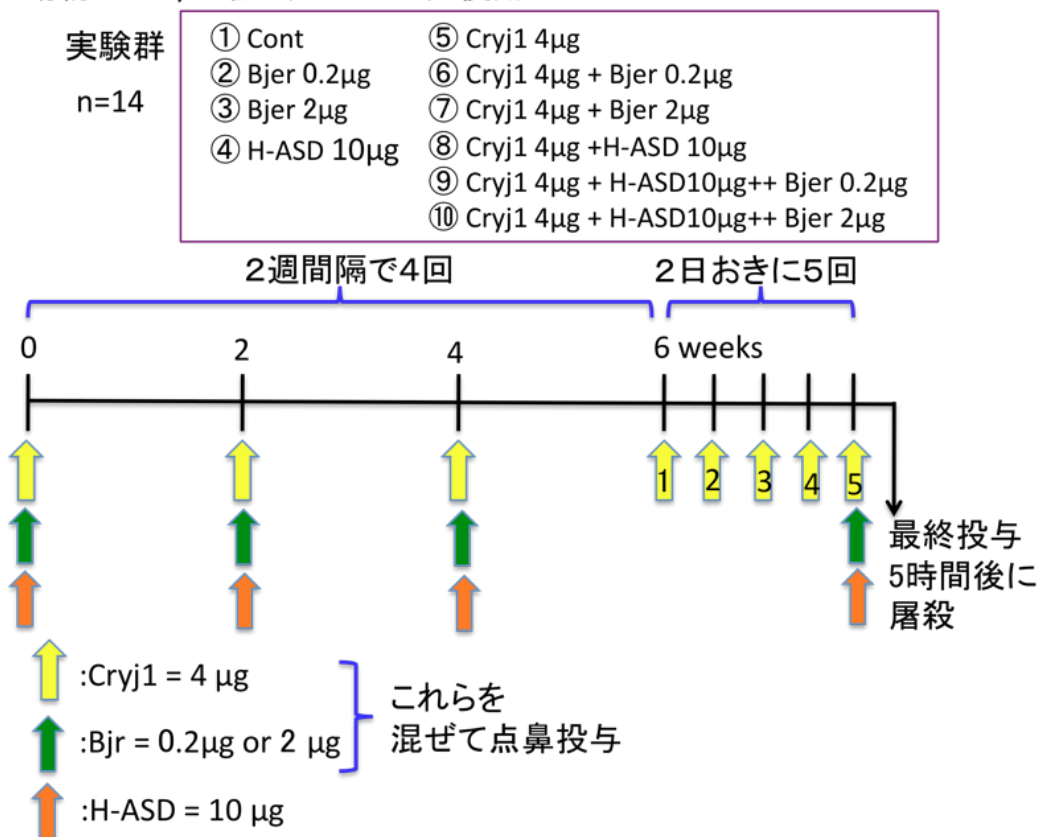


図2. 実験プロトコル

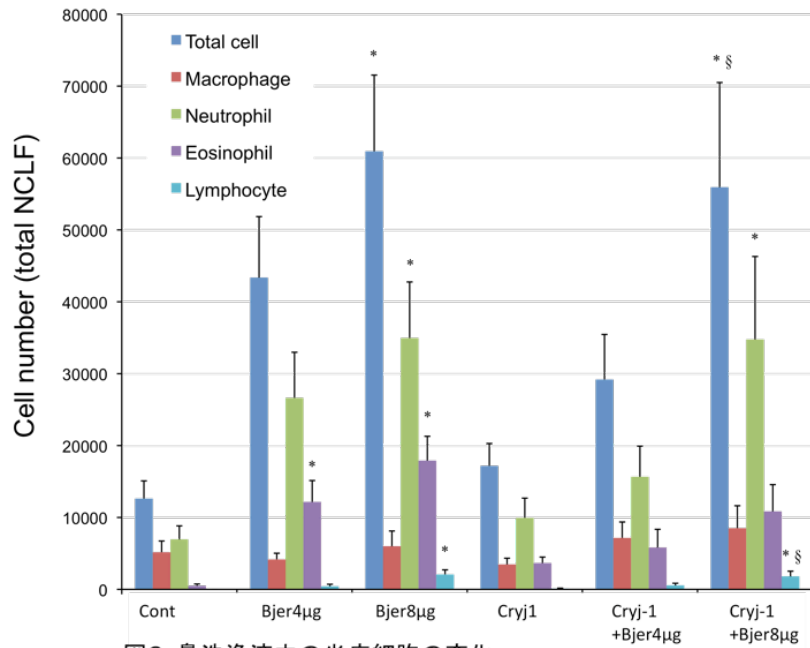


図3. 鼻洗浄液中の炎症細胞の変化

All values were expressed as mean ± SE (n= 8). *p < 0.05 vs. Cont; †p < 0.05 vs. Cryj1

表 1. ペルカンデラとスギ花粉抗原を点鼻投与したマウスの鼻洗浄液中のサイトカイン・ケモカンの変化

Group *	Animals (n)	Cytokines and chemokines (pg protein/ml)						
		IL-1β	IL-5	IL-6	IL-13	IL-33	Eotaxin	KC
Control	8	ND	ND	31.8 ± 6.02	ND	ND	ND	19.0 ± 4.21
Bjer 4 μ g	8	8.74 ± 2.71	1.83 ± 0.89	69.4 ± 14.9	ND	ND	37.9 ± 6.80	30.3 ± 7.28
Bjer 8 μ g	8	7.69 ± 2.52	2.27 ± 0.63 [†]	73.4 ± 12.5	ND	ND	40.1 ± 5.76	39.2 ± 5.28
Cryj1	8	ND	ND	186 ± 33.2 [‡]	ND	ND	26.1 ± 8.85	36.3 ± 5.50
Cryj1 + Bjer 4 μ g	8	8.90 ± 6.30	ND	142 ± 34.5 [†]	ND	ND	96.4 ± 18.8 ^{‡§†}	56.2 ± 14.5
Cryj1 + Bjer 8 μ g	8	7.96 ± 1.71	ND	58.8 ± 11.3	ND	ND	73.3 ± 17.6 [‡]	59.1 ± 14.3 [†]

*All values were expressed as mean ± SE. †p < 0.05 vs. Control ‡p < 0.001 vs. Control §p < 0.01 vs. Cryj1 †p < 0.05 vs. Bjer 4 μ g

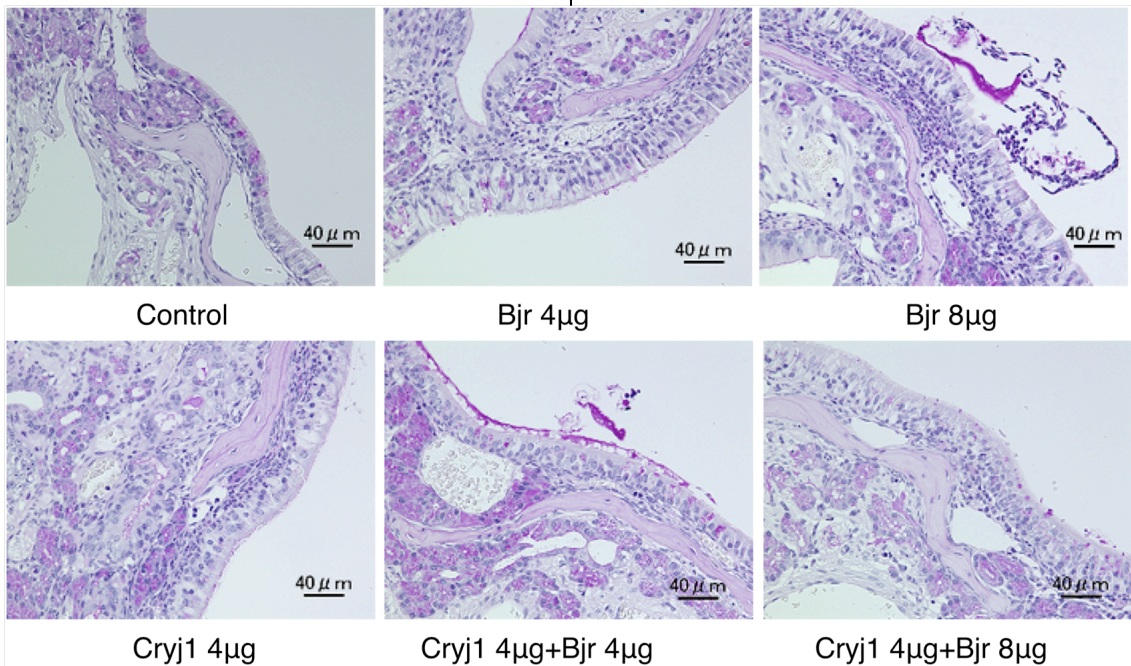


図4.ペルカンデラとスギ花粉抗原を点鼻投与したマウスの鼻粘膜の病理組織像 PAS stain

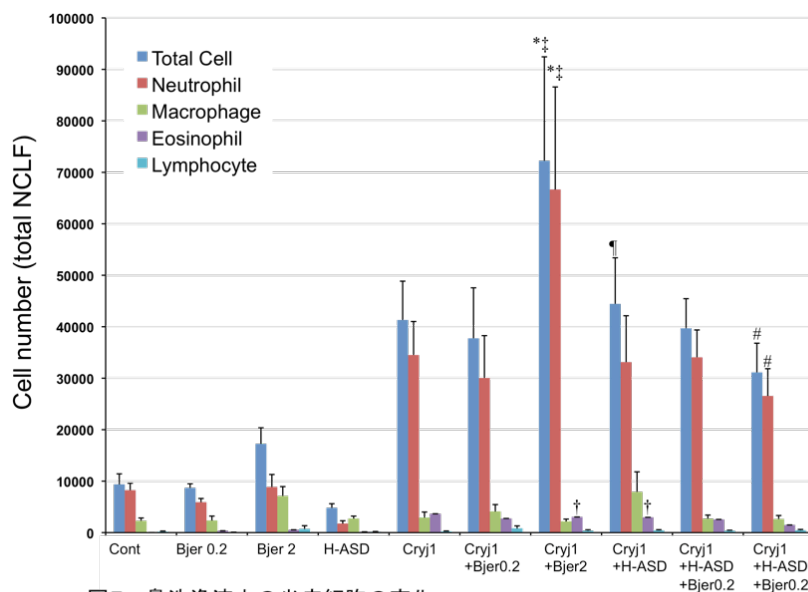


図5. 鼻洗浄液中の炎症細胞の変化

All values were expressed as mean±SE (n= 8).

*p<0.001 vs. Cont; †p<0.05 vs. Cont; ‡p<0.001 vs. Bjer2; ¶p<0.05 vs. H-ASD; #p<0.05 vs. Cryj1+Bjer2.

表2. ベルカンデラ、加熱黄砂、スギ花粉抗原を投与したマウスの鼻洗浄中の炎症性サイトカイン発現

Group *	Animals (n)	Cytokines and chemokines (pg protein/ml)						
		IL-1β	IL-5	IL-6	IL-13	IL-33	Eotaxin	KC
Control	8	1.85 ± 1.36	ND	3.37 ± 0.38	ND	ND	0.73 ± 0.73	13.5 ± 2.22
Bjer 2μg	8	4.06 ± 2.00	ND	81.2 ± 20.3	ND	ND	6.18 ± 2.82	36.9 ± 2.94
Bjer 20μg	8	1.34 ± 0.72	ND	197 ± 41.0	ND	ND	11.8 ± 3.46 [†]	54.2 ± 9.16
H-ASD	8	0.35 ± 0.19	ND	76.4 ± 20.8	ND	ND	0.18 ± 0.12	17.5 ± 1.26
Cryj1	8	6.93 ± 2.73	ND	405 ± 59.6 [†]	ND	ND	4.38 ± 1.45	207 ± 28.4 [†]
Cryj1 + Bjer 2μg	8	5.50 ± 1.70	ND	198 ± 63.6	ND	ND	6.08 ± 1.41	110 ± 29.4 [†]
Cryj1 + Bjer 20μg	8	6.21 ± 1.98	ND	354 ± 63.0 [†]	ND	ND	1.73 ± 0.69	170 ± 22.1 [†]
Cryj1 + H-ASD	8	2.94 ± 1.13	ND	187 ± 56.3	ND	ND	8.98 ± 2.87	108 ± 22.0 [†]
Cryj1 + H-ASD + Bjer 2μg	8	4.56 ± 1.03	ND	470 ± 52.6 ^{†§§}	ND	ND	10.6 ± 1.63 [†]	180 ± 21.7 ^{§§}
Cryj1 + H-ASD + Bjer 20μg	8	2.90 ± 1.31	ND	341 ± 63.8 [†]	ND	ND	5.71 ± 2.50	152 ± 19.1 ^{§§}

*All values were expressed as mean ± SE.

[†]p < 0.05 vs. Control [§]p < 0.05 vs. Bjer 2μg [†]p < 0.05 vs. Bjer 20μg [§]p < 0.05 vs. Cryj1+ H-ASD

表3. ベルカンデラ、加熱黄砂、スギ花粉抗原を投与したマウスの鼻組織中の炎症性サイトカイン発現

Group *	Animals (n)	Cytokines and chemokines (pg protein/100mg tissue)						
		IL-1β	IL-5	IL-6	IL-13	MCP-1	Eotaxin	KC
Control	8	28.8 ± 13.4	8.93 ± 2.38	23.3 ± 4.80	3.25 ± 1.18	31.1 ± 8.91	45.8 ± 20.2	164 ± 32.9
Bjer 0.2μg	8	ND	14.9 ± 4.24	29.9 ± 4.67	63.4 ± 16.3	35.7 ± 4.25	35.7 ± 9.69	185 ± 28.1
Bjer 2μg	8	23.1 ± 20.6	28.9 ± 4.47	42.5 ± 7.87	91.2 ± 17.4 [†]	38.1 ± 2.61	27.6 ± 4.64	184 ± 21.3
H-ASD	7	147 ± 24.0	36.9 ± 6.67 [†]	57.8 ± 11.9	13.1 ± 3.31	36.9 ± 6.31	40.0 ± 6.25	167 ± 25.3
Cryj1	8	18.3 ± 5.44	10.6 ± 2.57	67.3 ± 14.9	118 ± 22.9 [†]	83.8 ± 16.8	22.8 ± 5.47	1025 ± 207
Cryj1 + Bjer 0.2μg	8	142 ± 114	8.30 ± 2.04	56.3 ± 17.3	91.3 ± 14.9	40.8 ± 8.79	28.0 ± 4.11	401 ± 69.6
Cryj1 + Bjer 2μg	8	45.2 ± 20.7	11.5 ± 2.43	75.3 ± 11.6	106 ± 22.9 [†]	71.9 ± 10.3	19.3 ± 2.88	867 ± 107
Cryj1 + H-ASD	8	33.8 ± 13.4	7.31 ± 1.81	36.4 ± 8.88	74.2 ± 17.0	51.1 ± 13.5	18.8 ± 3.54	434 ± 102
Cryj1 + H-ASD + Bjer 0.2μg	8	505 ± 308	31.1 ± 12.6	376 ± 184 ^{†§§†††§§§}	128 ± 37.0 ^{§§}	128 ± 40.8	49.6 ± 15.5	1791 ± 653 ^{†§§††§§}
Cryj1 + H-ASD + Bjer 2μg	8	702 ± 239 ^{†§§†††§§§}	26.7 ± 6.61	362 ± 90.5 ^{†§§†††§§§}	66.1 ± 10.2	132 ± 56.3	58.8 ± 15.2	1611 ± 565 ^{†§§§}

*All values were expressed as mean ± SE. Bjer : ベルカンデラ ; H-ASD : 加熱黄砂 ; Cryj1 : スギ花粉抗原

[†]p < 0.05 vs. Control [†]p < 0.05 vs. Bjer 2μg [†]p < 0.05 vs. Bjer 20μg [§]p < 0.05 vs. H-ASD

^{††}p < 0.05 vs. Cryj1 ^{††}p < 0.05 vs. Cryj1+Bjer 2μg ^{††}p < 0.05 vs. Cryj1+Bjer 20μg ^{§§}p < 0.05 vs. Cryj1+ H-ASD