

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：27501

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25241015

研究課題名(和文)大陸に由来するアジアンスモッグ(煙霧)の疫学調査と実験研究による生体影響解明

研究課題名(英文)Epidemiological and experimental studies for evaluation of biological effects by Asian smoke (hazy events) derived from Chinese continent.

研究代表者

市瀬 孝道 (ICHINOSE, TAKAMICHI)

大分県立看護科学大学・看護学部・教授

研究者番号：50124334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,500,000円

研究成果の概要(和文)：煙霧時の救急搬送・小児の呼吸症状への影響、呼吸器疾患患者の呼吸器症状を調べた結果、PM2.5と呼吸器による救急搬送と関連がみられた。PM2.5による小児の呼吸器・アレルギー症状との関連は見られなかったが、PM2.5濃度の増加により、有意にマスクの着用が増加した。呼吸器疾患患者では新患の23%が悪化し、鼻炎・花粉症・喘息の悪化が見られた。実験研究では煙霧時採取したPM2.5はマウスの喘息モデルを悪化させた。増悪要因としてLPSや金属、酸化ストレスが示唆された。PM2.5のタール(化学成分)は免疫担当細胞の活性化を誘導、またPM2.5はマウスのスギ花粉によるアレルギー性結膜炎を悪化させた。

研究成果の概要(英文)：Exposure to particulate matter (PM) 2.5 and coarse PM (PM2.5-PM10) during hazy events in Fukuoka City was positively associated with ambulance dispatches by respiratory disorder. Exposure to PM2.5 was negatively associated with respiratory and allergic symptoms in children, whereas wear of mask was positively associated with PM2.5 concentration. In patients with respiratory disorder in Fukuoka City, PM2.5 in hazy events exacerbated allergic rhinitis, pollinosis by cedar pollen and asthma in 23% new patients. PM2.5 exacerbated lung inflammation and allergic asthma in mice. Lipopolysaccharide (LPS), oxidative stress and metals were associated with the exacerbation of their lung diseases. Tar (organic chemicals) in PM2.5 activated immunocytes along with activated NF-AT. Sensitization to PM2.5 and cedar pollen exacerbated allergic rhinoconjunctivitis in mice.

研究分野：環境毒性学

キーワード：煙霧 PM2.5 疫学調査 アレルギー増悪 喘息 アレルギー性結膜炎

## 1. 研究開始当初の背景

西日本では2月～5月にかけて空が霞む現象が頻繁に起こり、これをアジアンスモッグと呼んでいる。この現象は黄砂によるものと煙霧によるものである。煙霧とは「乾いた微粒子によって視界(視程)が10km未満となった場合」の気象用語であるが、大陸に由来する人為的固定・移動発生源の一次的、二次的生成物の硫酸エアロゾルや黒色微小粒子(PM2.5)等によるものである。そのため黄砂や煙霧の健康影響に関する懸念が高まっている。そこで本研究では大陸由来の煙霧が飛来する福岡地域を中心として、身体の発達期の子どもや呼吸器疾患患者を対象として疫学調査を行うと共に、PM2.5の肺や眼のアレルギーへの影響を実験研究によって明らかにする。

## 2. 研究の目的

### (1)PM2.5 への曝露が救急搬送や小児の自覚症状に及ぼす影響

大陸由来の煙霧(PM2.5)の健康影響を評価するために、北部九州において、救急搬送のデータを用い、日々のPM2.5濃度と救急搬送数との関連について検討した。小学生の日々の呼吸器症状とPM2.5濃度との関連について検討した。

### (2)福岡市の呼吸器疾患患者の呼吸器症状に与える煙霧の影響と予防行動調査

福岡市のアレルギー・呼吸器疾患患者における煙霧の影響を明らかにする。

### (3)気管支炎/気管支喘息モデルに対する黒色微小粒子の影響

#### 北九州の煙霧時におけるPM2.5の肺の炎症と気管支喘息増悪作用

北九州の煙霧時に採取したPM2.5の肺の炎症と気管支喘息増悪作用を加熱PM2.5と非加熱PM2.5によって比較し、PM2.5に含まれている成分と増悪作用との関連を明らかにする。

#### 煙霧時PM2.5によるアレルギー増悪作用における酸化ストレスの関与に関する研究

都市大気が発生した煙霧時に採取したPM2.5による肺の炎症とアレルギー増悪作用を酸化ストレスの面から明らかにすることを目的とした。

#### LPSとPM2.5曝露による肺のアレルギー増悪作用における酸化ストレスと鉄の関与

PM2.5とLPSのアレルギー増悪系における酸化ストレスと鉄の関与を検討。

### (4)免疫担当細胞に及ぼす黒色微小粒子の影響

黒色微小粒子の免疫系への影響を明らかに

するために、黒色微小粒子中の化学成分であるTar(タール)の脾臓リンパ球への影響を細胞・分子レベルで解析した。

### (5)アレルギー性結膜炎に対する黒色微小粒子の影響 -マウス実験・結膜細胞実験-

アレルギー性結膜炎のマウスモデルを用いて煙霧由来の黒色微小粒子(PM2.5)や黄砂の影響を明らかにすると共に、ヒト結膜細胞を用いてPM2.5による結膜炎増悪メカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)PM2.5 への曝露が救急搬送や小児の自覚症状に及ぼす影響

2000年代の福岡における救急搬送や喘息のデータとPM2.5および気象データを結合し、ケースクロスオーバーデザインを用いてPM2.5単位濃度(10 $\mu$ g/m<sup>3</sup>)増加当たりの救急搬送のオッズ比を推定した。2014年、2015年の5月の約1か月間、福岡市内小学校の高学年児童を対象として、アンケートや呼吸器症状の情報を収集し、一般化推定方程式を用いて、交絡因子(気温、湿度、曜日、調査年)を調整し、PM2.5単位濃度増加当たりの症状のオッズ比を推定した。

### (2)福岡市の呼吸器疾患患者の呼吸器症状に与える煙霧の影響と予防行動調査

福岡市内の病院にて2009年～2011年の3年間、アレルギー・呼吸器症状で初めて来院した新患者を対象に、問診で煙霧の影響を調査した結果をまとめた。2010年と2015年に定期治療中の慢性呼吸器アレルギー疾患患者への影響調査を外来診療で受診した患者を対象に1,000名にアンケート調査して比較した。

### (3)気管支炎/気管支喘息モデルに対する黒色微小粒子の影響

#### 北九州の煙霧時におけるPM2.5の肺の炎症と気管支喘息増悪作用

2011年4月北九州の折尾で煙霧時に採取したPM2.5をBALB/c系雄マウスに経気道曝露して肺の炎症とアレルギー性気管支喘息への影響を調べた。マウスを対照群、加熱によって毒性成分を除いたH-PM2.5群、PM2.5群、卵白アルブミン(OVA)群、OVA+H-PM2.5群、OVA+PM2.5群に分け、経気道曝露した。また、PM2.5の炎症誘導と微生物成分との関連を調査するために野生型(WT)、TLR2ノックアウト(KO)、TLR4KO、MyD88KOマウスの骨髄由来マクロファージ細胞(BMDM)を用いて炎症性サイトカイン発現を調べた。

### 煙霧時PM2.5によるアレルギー増悪作用における酸化的ストレスの関与に関する研究

抗酸化剤のN-アセチルシステイン(NAC)を用いてアレルギー抑制効果を調べた。マウスは対照群、加熱PM2.5群(H-PM2.5)、PM2.5群、PM2.5+NAC群、OVA群、OVA+H-PM2.5群、OVA+PM2.5群、OVA+PM2.5+NAC群の8群とし、経気道曝露した。

LPSとPM2.5曝露による肺のアレルギー増悪作用における酸化的ストレスと鉄の関与 BALB/c系雄マウスに市販の超高純度LPSと加熱処理したPM2.5とOVAを混ぜてマウスに気管内投与した。これにNACあるいは鉄キレート剤のDFOを前処理してアレルギー増悪作用における酸化的ストレスと鉄の関与を調べた。

### (4)免疫担当細胞に及ぼす黒色微小粒子の影響

Tarをマウスに1μgと5μg気管内投与し、24時間後に脾臓を摘出して脾臓細胞を調製後in vitroで培養し、ConAとLPS刺激して反応性をCell viability assay systemにより調べた。炎症性サイトカイン産生はサンドイッチELISA法により測定し、細胞内イベントへの影響は転写因子NF-ATとNF-κBの活性化をウエスタンブロット法で調べた。

### (5)アレルギー性結膜炎に対する黒色微小粒子の影響 -マウス実験・結膜細胞実験-

マウス眼に生理食塩水、スギ、PM2.5、黄砂により結膜刺激を行い、PM2.5と黄砂のスギ花粉増悪作用について調べた。培養ヒト結膜細胞の3代目の培養細胞に、無血清培養を行い、PM2.5を0、1、10、50、100μg/mlの濃度で添加した。培養後、12、24、48時間後に培養上清中の炎症性サイトカインやケモカインの濃度を測定した。

## 4. 研究成果

### (1)PM2.5への曝露が救急搬送や小児の自覚症状に及ぼす影響

PM2.5単位濃度増加に対する外因を除く救急搬送(当日~翌日)のオッズ比は1.008(95%CI: 1.002, 1.014)であった。疾患別では、呼吸器による救急搬送と関連がみられた。(オッズ比1.027, 95%CI: 1.007, 1.048)循環器疾患との関連はみられなかった。また、18歳以下の喘息入院のデータを用いた解析では、PM2.5単位濃度あたりのオッズ比は1.05(95%CI: 1.00, 1.11)であり、6~18才の就学児は0~5才の未就学児よりオッズ比が大きかった。小児の日々の症状と大気汚染物質との関連について検討した解析では、PM2.5濃度は、呼吸器・アレルギー症状と有意な関連は見られなかったが、PM2.5濃度の増加によ

り、有意にマスク着用が増えることが観察された。また、有意ではなかったものの、息苦しさや頭痛が増える傾向がみられた(図1)。

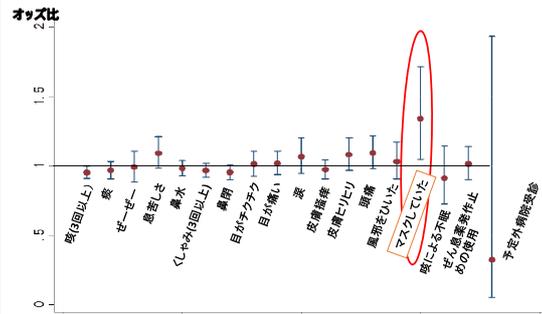


図1. PM2.5(当日から2日後までの間の影響, per 10μg/m3) 曜日、年、気温、湿度で調整

### (2)福岡市の呼吸器疾患患者の呼吸器症状に与える煙霧の影響と予防行動調査

煙霧により新患4,583名中987名(23%)が悪化、鼻炎・花粉症・喘息悪化が見られた。

定期治療中の患者2010年1,007名、2015年987名の黄砂・煙霧の影響は、2015年の頻度がいずれも高く、呼吸器・咽喉頭・鼻・眼症状は50%が何らかの影響を感じていた。2010年に比較して症状を感じやすくまた予防対策など自己管理の頻度も高かった。以上より症状は気道・眼に感じやすく、自己管理が可能であることが分かった。

### (3)気管支炎/気管支喘息モデルに対する黒色微小粒子の影響

#### 北九州の煙霧時におけるPM2.5の肺の炎症と気管支喘息増悪作用

PM2.5は肺の炎症と気管支喘息(好酸球性気道炎症)増悪作用を示したが、加熱PM2.5はその作用が消失した。肺洗浄液(BALF)中の好酸球誘導に関わるTh2サイトカインやケモカイン(図2)血中の抗原特異的-IgEやIgG1等もアレルギー炎症の悪化に伴って増加した。

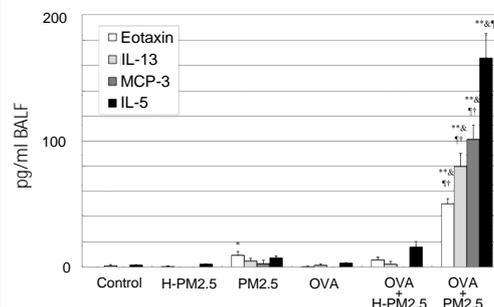


図2. PM2.5と卵白アルブミン(OVA)を気管内投与した肺洗浄液中のTh2/好酸球誘導サイトカイン・ケモカイン \*p<0.05 vs. control, \*\*p<0.001 vs. control; †p<0.001 vs. PM2.5; ‡p<0.001 vs. OVA; ††p<0.001 vs. OVA+H-PM2.5.

in vitro実験では、TLR4KO, MyD88KO細胞の培養液中の炎症性サイトカイン発現が著しく低下した。これらの結果からPM2.5に含まれているLPS（グラム陰性菌成分）が極めて強い炎症やアレルギー増悪要因である可能性を示唆した。

### 煙霧時PM2.5によるアレルギー増悪作用における酸化的ストレスの関与に関する研究

加熱PM2.5（H-PM2.5）群では肺の炎症やアレルギー炎症を増悪しなかった。非加熱PM2.5は肺の炎症やアレルギー炎症を増悪したが、抗酸化剤のNACは抑制した。BALF中のTh2サイトカイン・ケモカイン（IL-5, Eotaxin等）もNACによって抑制された。以上、酸化的ストレスが肺の炎症やアレルギー炎症を増悪している可能性を示唆した。

### LPSとPM2.5曝露による肺のアレルギー増悪作用における酸化的ストレスと鉄の関与

OVA+PM2.5+LPS投与マウスは肺のアレルギー炎症が著しく増悪したが、事前にNAC処置群では抑制効果を示した。

しかし、OVA+PM2.5+LPS+DFO投与マウスでは若干の抑制効果を示した。以上の結果から、PM2.5のアレルギー増悪作用に鉄と共に他の金属に加えて活性酸素の関与も示唆された。

### (4)免疫担当細胞に及ぼす黒色微小粒子の影響

Tarを投与群で、ConAとLPSに対する反応が亢進していた（図3）。24時間後の培養上清中のサイトカイン量は、ConA誘導IL-2およびLPS誘導IFN- $\gamma$ の産生がTar投与群で高かった（図4）。またNF- $\kappa$ Bのリン酸化に群間で差は認められなかったが、NF-ATのリン酸化はTar投与群で減弱していた（図5）。NF-ATの脱リン酸化は活性化を示すことからTarの細胞活性化におけるNF-ATの関与が想起された。以上から、化学成分のTarがNF-ATを活性化すると同時に細胞活性化を生体内で誘導していることが示唆された。

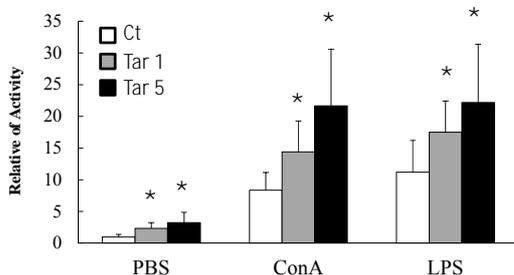


図3. Tarは細胞増殖反応を増強する

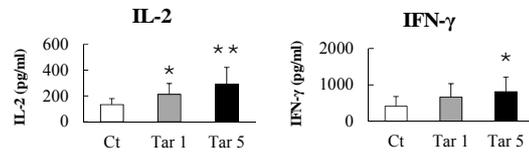


図4. Tarはサイトカイン産生を増強する

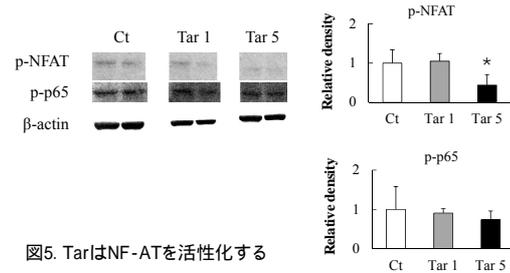


図5. TarはNF-ATを活性化する

### (5)アレルギー性結膜炎に対する黒色微小粒子の影響 -マウス実験・結膜細胞実験-

スギ+PM2.5とスギ+黄砂点眼群では単独投与群に比較して、より強い結膜炎が見られ、その増悪作用はPM2.5より黄砂の方が強かった（図6）。培養結膜細胞では炎症性サイトカインのIL-6とRANTESがPM2.5刺激後によって増加した。以上、PM2.5はアレルギー性結膜炎の増悪に関与していることが示唆された。

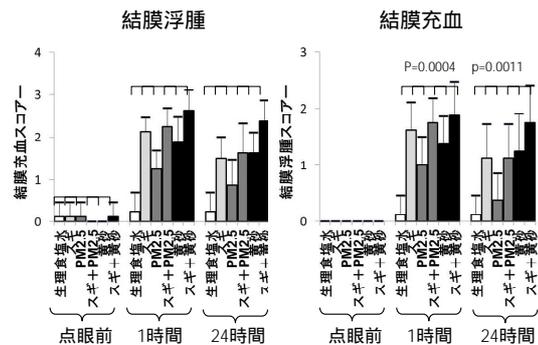


図6. 動物眼に対するPM2.5と黄砂粒子の影響 Kruskal-Wallis検定

### 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12件)

1. He M, Ichinose T, Kobayashi M, Arashidani K, Yoshida S, Nishikawa M, Takano H, Sun G, Shibamoto T. Differences in allergic inflammatory responses between urban PM2.5 and fine particle derived from desert-dust in murine lungs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 査読有.2016, Apr 15; 297:41-55.

2. He M, Ichinose T, Song Y, Yoshida Y, Bekki K, Arashidani K, Yoshida S, Nishikawa M, Takano H, Shibamoto T, Sun, G. Desert dust induces TLRs signaling to trigger Th2-dominant lung allergic inflammation via a MyD88-dependent signaling pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 査読有.2016, Apr 1; 296:61-72.
  3. He M, Ichinose T, Ren Y, Song Y, Yoshida Y, Arashidani K, Yoshida S, Nishikawa M, Takano H, Sun G. PM2.5-rich dust collected from the air in Fukuoka, Kyushu, Japan, can exacerbate murine lung eosinophilia. *Inhal Toxicol.* 査読有.2015 May 28:1-13.
  4. Song Y, Ichinose T, Morita K, Nakanishi T, Kanazawa T, Yoshida Y. Asian sand dust causes subacute peripheral immune modification with NF- $\kappa$ B activation. *Environ Toxicol.* 査読有.2015 May;30(5):549-58.
  5. 三村達哉.PM2.5及び黄砂の眼疾患との関連 特集:眼アレルギー診療のminimal essential.アレルギーの臨床(北隆館/ニユー・サイエンス社、東京) 査読無.2015, No.473, Vol135(7) 645-648.
  6. Michikawa T, Ueda K, Takeuchi A, Tamura K, Kinoshita M, Ichinose T, Nitta H. Coarse particulate matter and emergency ambulance dispatches in Fukuoka, Japan: a time-stratified case-crossover study. *Environ Health Prev Med.* 査読有.2015 Mar;20(2):130-136.
  7. Michikawa T, Ueda K, Takeuchi A, Kinoshita M, Hayashi H, Ichinose T, Nitta H. Impact of short-term exposure to fine particulate matter on emergency ambulance dispatches in Japan. *J Epidemiol Community Health.* 査読有.2015 Jan;69(1):86-91.
  8. Ren Y, Ichinose T, He M, Arashidani K, Yoshida Y, Yoshida S, Nishikawa M, Takano H, Sun G, Shibamoto T. Aggravation of ovalbumin-induced murine asthma by co-exposure to desert-dust and organic chemicals: an animal model study. *Environ Health.* 査読有.2014 Oct 18;13:83.
  9. Mimura T, Ichinose T, Yamagami S, Fujishima H, Kamei Y, Goto M, Takada S, Matsubara M. Airborne particulate matter (PM2.5) and the prevalence of allergic conjunctivitis in Japan. *Sci Total Environ.* 査読有.2014 Jul 15;487:493-499.
  10. Mimura T, Yamagami S, Fujishima H, Noma H, Kamei Y, Goto M, Kondo A, Matsubara M. Sensitization to asian dust and allergic rhinoconjunctivitis. *Environ Res.* 査読有.2014 May 7;132C:220-225.
- 〔学会発表〕(計 14 件)
1. 市瀬孝道, He Miao, 吉田成一, 定金香里, 高野裕久.中国瀋陽市における PM2.5 と PM10 のマウスアレルギー性気道炎症への影響. 第 56 回日本大気環境学会. 2015 年 9 月 16 日.早稲田大学西早稲田キャンパス(東京)
  2. 上田佳代, 笠岡俊志, Tasmin Saira, 道川武紘, 新田裕史, 吉野彩子, 三澤健太郎, 高見昭憲. PM2.5 の短期曝露と急病による救急搬送との関連:複数都市における検討. 第 56 回大気環境学会年会. 2015 年 9 月 16 日.早稲田大学西早稲田キャンパス 52-103 (東京都新宿区)
  3. 市瀬孝道, 高野裕久. 黄砂と PM2.5 による肺の炎症とアレルギーの増悪. 第 22 回日本免疫毒性学会, シンポジウム“毒性”影響から“かく乱”影響. 2015 年 9 月 10 日.京都大学百周年時計台記念館 (京都)
  4. 市瀬孝道. PM2.5, 粗大粒子と黄砂による肺の炎症とアレルギーの増悪. 第 42 回日本毒性学会, シンポジウム 環境毒性学の新たな潮流.2015 年 6 月 30 日.ホテル日航金沢 (金沢)
  5. 市瀬孝道, 賀森, 吉田安宏, 高野裕久. 由来の異なる PM2.5 のアレルギー性気道炎症増悪作用の比較. 第 64 回日本アレルギー学会. 2015 年 5 月 27 日.グランドプリンスホテル新高輪 (東京)
  6. 三村達哉, 山上聡, 亀井裕子, 五嶋摩理, 近藤亜紀, 松原正男, 市瀬孝道.「大気中 PM2.5 濃度のアレルギー性結膜炎患者数に与える影響」. 第 2 回城北眼科フォーラム. 2015 年 5 月 23 日.東京ドームホテル(東京)
  7. 市瀬孝道. 煙霧 (黄砂を含む) などの越境粒子状物質PM2.5が健康に与える影響. 第45回日本職業・環境アレルギー学会. 2014年6月28日福岡県医師会館(福岡)
  8. 市瀬孝道, 吉田成一, He M. PM2.5とPM10の気管支喘息モデルマウスへの影響. フォーラム2014・衛生薬学・環境トキシコロジー. 2014年9月20日.つくば国際会議場(つくば市)
  9. 道川武紘, 上田佳代, 竹内文乃, 木下 誠, 林 宏巳, 市瀬孝道, 新田裕史. 微小粒子状物質 (PM2.5) と救急搬送との関連: ケースクロスオーバー研究. 日本疫学会学術総会第 24 回大会. 2014 年 1 月. 長陵会館(仙台)

10. 市瀬孝道、賀森、吉田成一、吉田安宏、嵐谷奎一：フォーラムI. 古くて新しいPM2.5問題を考える。「PM2.5を多く含む黄砂と含まない黄砂のアレルギー性気道炎症への影響」フォーラム2013：衛生薬学環境トキシコロジー. 2013年9月.九州大学医学部百年講堂(福岡)

〔図書〕(計6件)

1. 三村達哉. 南江堂(東京). 眼科疾患最新の治療 2016-2018 (大橋裕一、白神史雄、村上晶編集)・アレルギー性結膜炎、I. 前眼部疾患- 結膜疾患-A. 結膜炎-6. p104. 2016年(1ページ)
2. 岸川禮子. 日本臨床社(大阪). 大気汚染物質とアレルギー・喘息、黄砂 pp564~567、別冊日本臨床、免疫症候群(第2版). 2016年(4ページ)
3. 岸川禮子. ホット 98号. 黄砂とPM2.5の違いは? 越境性微粒子による健康に対する影響を考える. 呼吸不全友の会. 2015年(13ページ)
4. 上田佳代、新田裕史. 中外医学社 Annual Review 呼吸器. II. 4. PM2.5と呼吸器疾患. 2015年(5ページ)
5. 市瀬孝道. アレルギー学会誌. 専門医のためのアレルギー学講座: 3. 大気汚染(PM2.5, 黄砂等)とアレルギーに関する研究の進展. 2014年(10ページ)
6. 三村達哉. アレルギー学会誌. 専門医のためのアレルギー学講座: 眼科領域におけるアレルギーと環境因子. 2014年(6ページ)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

市瀬 孝道 (ICHINOSE, Takamichi)  
大分県立看護科学大学・看護学部・教授  
研究者番号：50124334

### (2)研究分担者

上田 佳代 (UEDA, Kayo)  
京都大学・工学研究科・准教授  
研究者番号：60444717

岸川 禮子 (KISHIKAWA, Reiko)  
独立行政法人国立病院機構福岡病院  
准教授  
研究者番号：50450945

嵐谷 奎一 (ARASHIDANI, Keiichi)  
産業医科大学・名誉教授  
研究者番号：10141748

鶴野 伊津志 (UNO, Itsushi)  
九州大学・応用力学研究所・教授  
研究者番号：70142099

清水 厚 (SHIMIZU, Atsushi)  
国立研究開発法人国立環境研究所・地域環境研究センター・主任研究員  
研究者番号：90332238

山本 重一 (YAMAMOTO, Shigekazu)  
福岡県保健環境研究所・環境科学部大気課・研究員  
研究者番号：60446862

吉田 成一 (YOSHIDA, Seiichi)  
大分県立看護科学大学・看護学部・准教授  
研究者番号：40360060

定金 香里 (SADAKANE, Kaori)  
大分県立看護科学大学・看護学部・助教  
研究者番号：20322381

吉田 安宏 (YOSHIDA, Yasuhiro)  
産業医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10309958

三村 達哉 (MIMURA, Tatsuya)  
東京女子医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：70463867

藤本 正典 (FUJIMOTO, Masanori)  
福岡市保健環境研究所・所長  
研究者番号：10646350

中島 亜矢子 (NAKASHIMA, Ayako)  
福岡市保健環境研究所・主任研究員  
研究者番号：90755563

### (3)連携研究者

西川 雅高 (NISHIKAWA, Masataka)  
東京理科大学・環境安全センター・副センター長  
研究者番号：80228171

新田 裕史 (NITTA, Hiroshi)  
国立研究開発法人国立環境研究所・環境健康研究センター・フェロー  
研究者番号：40156138

道川 武紘 (MICHIKAWA, Takehiro)  
国立研究開発法人国立環境研究所・環境健康研究センター・研究員  
研究者番号：80594853