

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 5 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20120014

研究課題名（和文） エアロゾルによる生体影響の評価

研究課題名（英文） EVALUATION OF BIOLOGICAL EFFECTS OF AEROSOL

研究代表者

高野 裕久 (TAKANO HIROHISA)

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：60281698

研究成果の概要（和文）：粒子状物質・エアロゾルやそれらに含有される化学物質の健康影響について、免疫細胞と気道上皮細胞への影響に注目し、実験的に評価した。その影響は、微小粒子・エアロゾルに含有される化学物質種により異なること、また、ベンゼン環数、官能基の有無やその種類、配置、酸化活性等が健康影響を規定する要因として重要であることも明らかにした。併せて、健康影響評価に有用なバイオマーカーを探索・同定し、健康影響発現メカニズムを分子レベルで明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The present study investigated the effects of chemicals such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their derivatives, which are major chemical components in particulate matter (PM), on the immune cells and on the bronchial epithelial cells. First, we detected some biomarkers for the health effects of PM. Cytotoxicity and/or inflammatory responses were induced by some PAH derivatives containing hydroxyl, carbonyl, nitro, or amino groups, indicating that the toxicological and inflammatory effects of chemicals may be related to their structures such as functional group and isomer. We also elucidated the underlying molecular mechanisms for the health effects of these chemicals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
21年度	13,200,000	3,960,000	17,160,000
22年度	13,200,000	3,960,000	17,160,000
23年度	13,200,000	3,960,000	17,160,000
24年度	13,200,000	3,960,000	17,160,000
総計	63,000,000	18,900,000	81,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析学

キーワード：微小粒子、生体影響、免疫影響、呼吸器影響、メカニズム

1. 研究開始当初の背景

近年、国内起源の大気汚染物質の影響のみならず、黄砂を含めた広域・越境汚染に基づく大気汚染、中でも、微小粒子・エアロゾル汚染による健康影響を明らかにする必要性が増している。微小粒子・エアロゾルは、発

生源も多種多様であり、粒径、成分等の相違や二次生成・変化が存在するため、これらに起因する健康影響の変動や相違の存在が予想される。しかし、健康影響の具体的な変動・相違やその決定要因は明らかにされていない。

一方、ディーゼル排気微粒子、黄砂、微小粒子等のエアロゾルの健康影響は、疫学的にも実験的にも、アレルギー疾患や呼吸器疾患を有する集団に発現しやすい。そのため、微小粒子・エアロゾルに高感受性と考えられるアレルギー疾患の内在メカニズムにおいて重要な役割を演ずる免疫・アレルギー応答や、呼吸器と微小粒子・エアロゾルの第一の物理化学的接点である気道上皮にそれらが及ぼす健康影響をまず明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究課題では、「発生源や移動、成分等が異なる微小粒子・エアロゾルやそれらに含まれる成分、特に、多環芳香族炭化水素 (PAHs) とその誘導体の健康影響について、免疫応答と気道上皮への影響に注目し、実験的に評価すること。成分等による健康影響の相違を検討するとともに、それらの結果と健康影響の相関性を検討し、健康影響を規定する要因の絞り込みに資すること。加えて、増悪メカニズムを分子レベルで解析し、その結果をバイオマーカーの同定や予防対策の確立に役立てること。」を目的とした

3. 研究の方法

(1) 微小粒子・エアロゾル中の化学物質種による健康影響の相違とバイオマーカー

①免疫応答への影響評価

アトピー素因を有する NC/Nga マウスを使用し、免疫応答を担うリンパ球を主体とする複数の免疫細胞種より構成される脾細胞、および、免疫応答の開始細胞である抗原提示細胞の代表とも言える骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を採取、調製した。

化学物質は、微小粒子・エアロゾルに含有されることが報告されているベンゾ[a]ピレン (BaP) および 9, 10-フェナントレンキノン (9, 10-PQ)、1, 2-ナフトキノン (1, 2-NQ) を対象とし、これらをジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解した後、培地で希釈して実験に使用した。

免疫担当細胞を、BaP (0. 1-100 μ M または 0. 1-1000 nM) もしくは 9, 10-PQ (0. 01-10 μ M または 0. 01-100 nM)、1, 2-NQ (0. 01-10 μ M または 0. 01-100 nM) またはコントロール (0. 1% DMSO) に曝露した。脾細胞は、当該物質に 24 時間曝露した後、細胞生存・増殖能および細胞表面分子 (脾細胞中の抗原提示細胞活性化マーカーである MHC class II、CD80、CD86 や T 細胞マーカーである TCR、CD28、CD3、リンパ球の活性化マーカーである CD69 等) の発現、培養上清中のサイトカイン (IL-4、

IL-18、IFN- γ 、IL-10 等) を測定した。また、これらの細胞をダニ抗原 (Dp) 存在下で当該物質に 72 時間曝露した後、細胞増殖を測定した。一方、骨髄細胞を顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) を添加した培地で 8 日間培養し、BMDC を分化誘導した。BMDC は、当該物質に 24 時間曝露した後、細胞生存・増殖能および細胞表面分子 (MHC class II、CD86、CD83、DEC205 やリンパ節への遊走に関わるケモカインレセプターである CCR7、CXCR4 等) の発現、サイトカイン (TARC、MDC、IL-12p40) の産生を測定した。

②気道上皮への影響評価

正常ヒト気道上皮細胞株である BEAS-2B 細胞を使用した。化学物質は、前項と同様に調製した。BEAS-2B 細胞を、コラーゲン I コートプレートに播種し、semi-confluent な状態まで培養した後、BaP (0. 01-10 μ M) もしくは 9, 10-PQ (0. 01-50 μ M)、1, 2-NQ (0. 01-50 μ M) またはコントロール (0. 1% DMSO) に曝露した。曝露 24 時間後に、細胞生存・増殖能および接着分子である ICAM-1 (CD54) の発現、炎症性サイトカイン (IL-8、IL-6 等) と可溶性 ICAM-1 (sICAM-1) の産生を測定した。

なお、細胞生存・増殖能は WST-1 による発色法により、細胞表面分子の発現はフローサイトメトリーにより、サイトカイン等液性因子の産生は ELISA 法により、Dp 刺激による脾細胞増殖は BrdU の取り込み量を ELISA 法により測定した。

(2) 微小粒子・エアロゾル中の化学物質の官能基、異性体種による健康影響の相違

まず、フェナントレンと 9, 10-PQ、1, 4-PQ、および、ナフタレンと 1, 2-NQ、1, 4-NQ、1, 2-ジヒドロナフタレン (DN)、1, 4-DN を評価対象とした (図 1)。

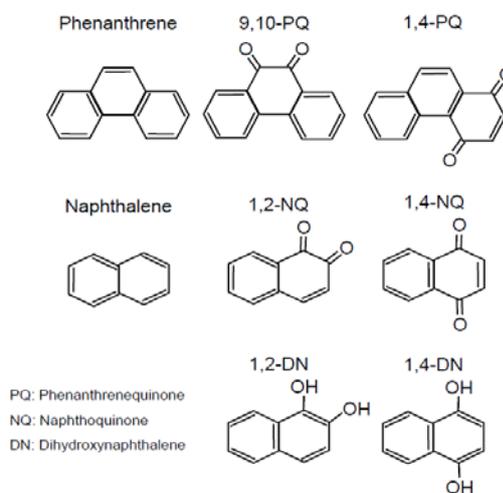


図 1

① 免疫応答への影響評価-1

脾細胞は、化学物質(0.001-10 μ M)またはコントロール(0.1% DMSO)に24時間曝露した後、前項と同様に、細胞生存・増殖能および細胞表面分子の発現、サイトカインの産生、Dp 刺激細胞増殖を測定した。BMDCは、当該化学物質(0.001-10 μ M)に24時間曝露した後、前項と同様に、細胞生存・増殖能および細胞表面分子の発現、サイトカインの産生を測定した。さらに、BMDCの分化・成熟に対する影響を明らかにするため、骨髄細胞からBMDCを分化誘導する6日間の培養過程でGM-CSFと化学物質(0.001-3 μ M)を共存させ、同様の指標について検討した。

② 気道上皮への影響評価-1

BEAS-2Bは、化学物質(0.01-10 μ M)またはコントロール(0.1% DMSO)に24時間曝露した後、前項と同様に、細胞生存・増殖能およびCD54の発現、炎症性サイトカイン等の産生を測定した。

次に、ピレンと1-ニトロピレン(1-NP)、1-アミノピレン(1-AP)、1-ニトロナフタレン(1-NN)、1-アミノナフタレン(1-AN)を評価対象とした(図2)。

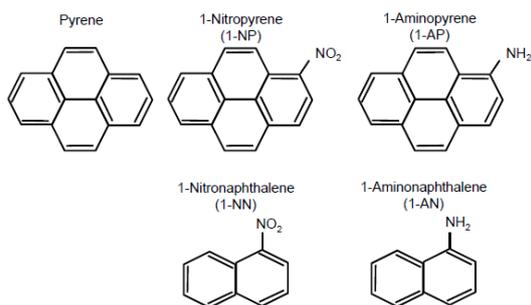


図2

③ 免疫応答への影響評価-2

脾細胞は、化学物質(0.01-50 μ M)またはコントロールメディウム(0.1% DMSO)に24時間曝露した後、前項と同様に、細胞生存・増殖能および細胞表面分子の発現、サイトカインの産生、Dp 刺激細胞増殖を測定した。

8日間の培養により分化誘導したBMDCは、当該化学物質(0.01-50 μ M)またはコントロールメディウム(0.1% DMSO)に24時間曝露した後、前項と同様に、細胞生存・増殖能および細胞表面分子の発現、サイトカインの産生を測定した。さらに、BMDCの分化・成熟に対する影響を明らかにするため、骨髄細胞からBMDCを分化誘導する6日間の培養過程でGM-CSFと化学物質(0.001-10 μ M)またはコントロールメディウム(0.1% DMSO)を共存させ、同様の指標について検討した。

④ 気道上皮への影響評価-2

BEAS-2Bは、化学物質(0.01-50 μ M)またはコントロールメディウム(0.1% DMSO)に24時間曝露した後、前項と同様に、細胞生存・増殖能およびCD54の発現、炎症性サイトカイン等の産生を測定した。

(3) 微小粒子・エアロゾル中の化学物質による健康影響の分子メカニズム

ナフタレン、1,2-NQ、1,4-NQ、1,2-DN、1,4-DN、フェナントレン、9,10-PQ、1,4-PQ、ピレン、1-NP、1-APを対象とした。

① 酸化活性

化学物質による酸化活性は、活性酸素(ROS)生成を蛍光プローブ 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)を用いて測定することにより評価した。無細胞およびBEAS-2B存在下において、DCFH-DAを添加し、DCFH-DAの酸化生成物であるdichlorofluorescein (DCF)の蛍光を経時的(0-100 min)に測定した。

一部の化学物質については、蛍光プローブ 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CMH₂DCF-DA)を用いて酸化活性を可視化した。BEAS-2B存在下において、CMH₂DCF-DAを添加し、インキュベート後、細胞を洗浄し、化学物質を曝露した。CMH₂DCF-DAの酸化生成物であるchloromethyl-2',7'-dichlorofluorescein (CMDCF)の蛍光を観察した。

② タンパクリン酸化経路の阻害

PAH誘導体がBEAS-2Bに及ぼす影響メカニズムにおけるタンパクリン酸化経路の役割を、各プロテインキナーゼの阻害剤を用いて検討した。BEAS-2Bは、p38分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)、MAPK/細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)キナーゼ(MEK)、上皮成長因子受容体(EGFR)チロシンキナーゼ、それぞれの阻害剤であるSB203580、PD98059、AG1478で1時間前処理した後、各阻害剤の存在下で当該化学物質またはコントロールに24時間曝露した。曝露後、CD54の発現とIL-6の産生を測定した。

③ 核内受容体の阻害

同様に、核内受容体の役割を各受容体の拮抗剤を用いて検討した。BEAS-2Bは、甲状腺ホルモン受容体(TR)、芳香族炭化水素受容体(AhR)、エストロゲン受容体(ER)、アンドロゲン受容体(AR)それぞれの拮抗剤である1-850、CH-223191、Fulvestrant (ICI

182,780)、Bicalutamide (CDX) で 1 時間前処理した後、各拮抗剤の存在下で化学物質またはコントロールに 24 時間曝露した。曝露後、CD54 の発現と IL-6 の産生を測定した。

4. 研究成果

(1) 微小粒子・エアロゾル中の化学物質種による健康影響の相違とバイオマーカー

まず、BaP および 9,10-PQ、1,2-NQ を評価対象として検討した。その結果、総じて、免疫担当細胞に対する影響は軽微であったが、BMDC よりも脾細胞の活性化(脾細胞中の抗原提示細胞および T 細胞の活性化)を促すことが明らかとなった。気道上皮細胞に関しては、BaP および 9,10-PQ、1,2-NQ が、炎症や傷害に関わる因子の発現を修飾することも見出した。これらの結果より、微小粒子・エアロゾルに含有される化学物質の影響は、細胞種によって反応性が異なることが示された。

また、微小粒子・エアロゾルの健康影響評価において、脾細胞の CD86、TCR、CD69 の発現や IL-4 産生、抗原刺激による脾細胞増殖、気道上皮細胞の IL-6 や可溶性 ICAM-1 等の炎症性因子の産生等がバイオマーカー候補として有力であることも示された。

(2) 微小粒子・エアロゾル中の化学物質の官能基、異性体種による健康影響の相違

次に、フェナントレンと 9,10-PQ、1,4-PQ、および、ナフタレンと 1,2-NQ、1,4-NQ、1,2-DN、1,4-DN を用いて、PM 中の化学物質の酸化体および異性体による影響の相違について検討した。その結果、総じて、フェナントレンとナフタレンの影響は他の物質に比較して小さく、化学物質の活性には、官能基の有無やその種類が大きく寄与していると考えられた。また、曝露対象となる細胞種により影響は異なることも明らかになった。

また、免疫担当細胞に対する細胞毒性など一部の影響において、1,2-NQ よりも 1,4-NQ、1,2-DN よりも 1,4-DN でより強い傾向がみられたこと、また、1,2-NQ と 1,2-DN、1,4-NQ と 1,4-DN の作用強度が一部類似していたことから、官能基の配置によって作用機構や影響が異なる可能性も考えられた。一般には、官能基の配置は、オルト体の方がパラ体よりもフリーラジカルを発生しやすいため、毒性が強いと考えられている。

ついで、ピレンと 1-NP、1-AP、1-NN、1-AN を用い、ニトロ体およびアミノ体の影響の相違の有無を検討した。これまでの実験で基本骨格の化学物質として検討したナフタレン(2 環)とフェナントレン(3 環)が、免疫担当

細胞にも気道上皮細胞にも毒性および炎症に関わる明らかな作用を示さなかったのに対し、ピレン(4 環)は、修飾作用が一部観察された。また、ニトロ体、アミノ体により修飾される影響指標も存在した(図 3)。一方、2 環の 1-NN と 1-AN は、4 環の 1-NP と 1-AP に比べると、免疫担当細胞と気道上皮細胞に及ぼす影響は弱いことも示された。

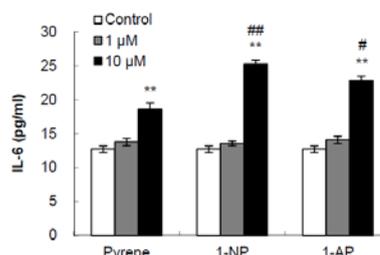


図 3 ピレンおよび 1-NP、1-AP が BEAS-2B の IL-6 産生に及ぼす影響 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Pyrene)

以上より、PAHs とその誘導体が免疫応答と気道上皮に及ぼす影響において、官能基の有無やその種類、ベンゼン環の数等が、影響を規定する要因となる可能性が示された。

(3) 微小粒子・エアロゾル中の化学物質による健康影響の分子メカニズム

続いて、ナフタレン、1,2-NQ、1,4-NQ、1,2-DN、1,4-DN、フェナントレン、9,10-PQ、1,4-PQ、ピレン、1-NP、1-AP を対象とし、それらの化学物質による健康影響の分子メカニズムを明らかにするため、酸化活性やシグナル伝達系への作用について検討した。

まず、化学物質そのものの酸化活性について検討した結果、基本骨格のナフタレンやフェナントレンには活性が見られなかったのに対し、NQ、DN、PQ には酸化活性が認められ、さらにオルトの配位の方がパラよりも活性が強いことも確認された。この結果は、いくつかの指標について、パラ配位の方がオルト配位より強い修飾効果が得られた前述の結果とは、必ずしも一致しなかった。

次に気道上皮細胞存在下で、化学物質の細胞に対する酸化活性を検討したところ、細胞非存在下で検討したときと概ね同様の結果を示したが、一部異なる傾向も示された。また、免疫担当細胞の結果も含めて解析したが、いくつかの PAH 誘導体が、その細胞毒性および炎症に関わる活性化マーカーの発現に与える影響と当該物質の酸化活性の間には、必ずしも一致した相関性は認められなかった。これらのことから、これらの物質による健康

影響発現のメカニズムには、酸化活性だけでなく、他の要因の存在も示唆された。

そこで、細胞内のシグナル伝達系（タンパク質リン酸化経路や核内受容体）に及ぼす影響について、気道上皮細胞の IL-6 産生を指標に検討を加えたところ、気道上皮細胞の IL-6 産生は、EGFR チロシンキナーゼから p38 MAPK の活性化を介したシグナル伝達が主要なメカニズムであり、ある種の化学物質はそれらを促進する可能性が想定された（図 4）。さらに、核内受容体の寄与について検討した結果、IL-6 産生の増強には、軽度ではあるが TR と ER 等の核内受容体の活性化が関与する可能性も示された。

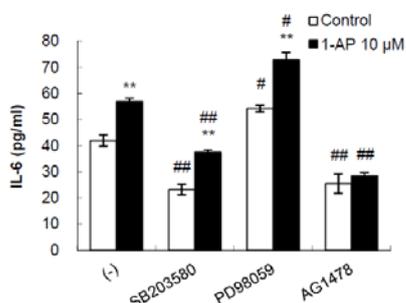


図 4 1-AP による BEAS-2B の IL-6 産生増加に対するプロテインキナーゼ阻害剤の効果 (*p<0.05, **p<0.01 v. s. Control; #p<0.05, ##p<0.01 v. s. w/o Inhibitor)

以上の結果から、ある種の PAH 誘導体は、標的細胞に対し、直接的、あるいは、ROS 生成による酸化ストレスを介して、タンパク質リン酸化経路を活性化することや核内受容体に作用することにより、転写因子を調節し、炎症や傷害に関わるタンパクの発現を誘導している可能性が示された（図 5）。

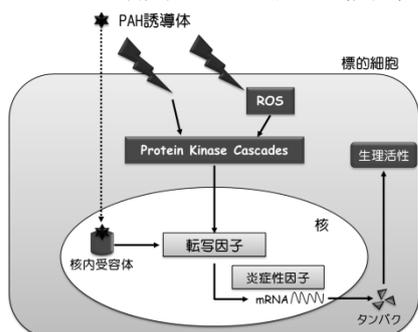


図 5 予想される PAH 誘導体の作用機序

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 9 件）

- ① 高野裕久：PM_{2.5}（大気汚染物質）の基礎知識と健康影響. Eneco 査読無し，

(in press).

- ② 高野裕久：環境ストレスとアレルギー. アレルギー 査読有り，(in press).
- ③ 小池英子：多環芳香族炭化水素と誘導体の毒性機序解明へのアプローチ. エアロゾル研究 査読有り，28：34-41 (2013).
- ④ 高野裕久、小池英子、柳澤利枝：環境化学物質とアレルギー疾患. チャイルドヘルス 査読無し 15：850-854, 2012.
- ⑤ Inoue K, Takano H: Biology of diesel exhaust effects on allergic pulmonary inflammation. Yakugaku Zasshi 査読有り 131：367-371, 2011.
- ⑥ 高野裕久：PM_{2.5} の健康影響（毒性学的見地より）. 空気清浄 査読無し 48：32-35, 2011.
- ⑦ Inoue K, Takano H: Particulate matter-induced health effects: who is susceptible? Environ Health Perspect 査読有り 119, 285, 2011. doi: 10.1289/ehp.1103846.
- ⑧ 高野裕久：アレルギーと室内環境，クリーンテクノロジー 査読無し，20，5-9.
- ⑨ Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Yoshikawa T: Airborne particles in pulmonary diseases. Curr Respir Med Rev 査読有り 5：69-72, 2009.

〔学会発表〕（計 15 件）

①招待講演

高野裕久

環境汚染物質による生活環境病、生活習慣病の増悪とその軽減対策

愛知学院大学薬学部附属医療生命薬学研究 所第 1 回サイエンスフォーラム 名古屋

2013年3月26日

②シンポジウム

高野裕久

室内、室外の環境汚染物質とアレルギー

第83回日本衛生学会学術総会 金沢2013年3月24日

③シンポジウム

高野裕久

実験的アプローチによる大気汚染物質の健康影響評価

金沢大学 薬学シンポジウム 一大気（空気）と健康 金沢 2013年1月22日

④教育講演

高野裕久

環境ストレスとアレルギー (EL17)

第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会

大阪 2012年11月29日-12月1日

⑤招待講演

Hirohisa Takano

Environmental pollution and allergic diseases

First Malaysian congress of toxicology, Kuala Lumpur, Malaysia, 2-3 October, 2012.

⑥特別講演

高野裕久

室内、室外の環境汚染物質による生活環境病、生活習慣病の増悪とその軽減対策

2012年室内環境学会第1回講演会 東京
2012年9月27日

⑦ 小池英子・柳澤利枝・高野裕久

フェナントレンおよびナフタレンとその誘導体がマウス免疫担当細胞に及ぼす影響

第82回日本衛生学会学術総会 京都 2012年3月24-26日

⑧ 小池英子・柳澤利枝・高野裕久

フェナントレンおよびナフタレンとその誘導体がヒト気道上皮細胞に及ぼす影響

第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京 2011年11月10-12日

⑨ 小池英子・柳澤利枝・高野裕久

ベンゾピレンおよびキノロン化合物の曝露がヒト気道上皮細胞に及ぼす影響

第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京 2010年11月25-27日

⑩招待講演

高野裕久

化学物質とアレルギー

第15回ラテックスアレルギー研究会 横浜
2010年7月11日

⑪シンポジウム

高野裕久

微小粒子状物質 PM2.5 のリスク評価を巡って

毒性学的研究から見たヒト健康影響のメカニズム

第80回日本衛生学会学術総会 仙台 2010年5月9-11日

⑫Special lecture

Takano H

Environmental chemicals enhance allergic diseases in mice

International Symposium on Occupational and Environmental Allergy and Immune Disease 2010, Kyoto, Japan, April 7-9, 2010.

⑬Invited speaker

Takano H

Environmental chemicals and allergy

Taiwan-Japan Joint Symposium on Indoor

Environmental Quality and Health, Taipei, Taiwan, Jan 13-14, 2010.

⑭ 小池英子・井上健一郎・柳澤利枝・高野裕久

キノロン系化合物が *in vitro* で免疫応答に及ぼす影響、フォーラム2009: 衛生薬学・環境トキシコロジー 沖縄 2009年11月6日

⑮ 小池英子・井上健一郎・柳澤利枝・高野裕久

ベンゾ[a]ピレンによるマウス免疫担当細胞の活性化

第16回日本免疫毒性学会学術大会 (旭川)
2009年8月27-28日

[図書] (計2件)

- ① 市瀬孝道、高野裕久、黄砂変質の影響：動物実験、「黄砂」、313-317、古今書院、東京、2009
- ② 高野裕久:ディーゼル車排出ガス、排気微粒子の呼吸器系、免疫系への影響、「クリーンディーゼル開発の要素技術動向」307-317、NTS、東京、2008

[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 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 裕久 (TAKANO HIROHISA)

京都大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：60281698

(2) 研究分担者

小池 英子 (KOIKE EIKO)

独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究センター・主任研究員
研究者番号：60353538

柳澤 利枝 (YANAGISAWA RIE)

独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究センター・主任研究員
研究者番号：70391167

井上 健一郎 (INOUE KENICHIROU)

国際医療福祉大学・保健医療学部・教授
研究者番号：20373219