

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670327

研究課題名(和文) 浮遊粒子中のエンドトキシン定量法の開発と喘息の病態との関連性の評価

研究課題名(英文) Determinants of endotoxin levels in suspended particles and their associations with asthma

研究代表者

島 正之 (Shima, Masayuki)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：40226197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：家屋内における微小粒子状物質(PM2.5)及び粗大粒子(PM10-2.5)に含まれるエンドトキシン濃度は、いずれも屋外の粒子中エンドトキシン濃度と関連があり、床が畳または絨毯の家庭はフローリングの家庭よりも高かった。PM2.5中のエンドトキシン濃度は、屋内でペットを飼育している家庭では高く、空気清浄機の使用によって低下した。

PM2.5及びPM10-2.5中のエンドトキシン濃度が増加すると、運動後に喘鳴症状がある者ではPEF及びFEV1は有意に低下した。一方、喘鳴症状のない者では、エンドトキシン濃度と肺機能との間に関連は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：The endotoxin levels in indoor fine particles (PM2.5) and coarse particles (PM10-2.5) were correlated with the levels in outdoor respective particles. The levels were higher in homes using tatami or carpet for floor than in homes of wooden flooring. The endotoxin levels in indoor PM2.5 were also higher in homes with pets, and lower in homes using air purifier. The increase in endotoxin levels in PM2.5 and PM10-2.5 were associated with significant decrease in PEF and FEV1 among subjects with wheezing after exercise. On the other hand, among subjects without wheezing, no association between endotoxin levels and pulmonary function was observed.

研究分野：環境疫学

キーワード：エンドトキシン 微小粒子状物質 粗大粒子 喘息 アレルギー 生活環境 空気清浄機 ペット

## 1. 研究開始当初の背景

エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞壁に存在しているリポ多糖 (LPS) であり、自然界に広く存在している。エンドトキシンは生体に様々な作用を引き起こすが、近年は喘息をはじめとするアレルギー性疾患との関連が注目されている。環境中のエンドトキシンへの曝露が喘息の発症リスクを高めるとする報告がある一方で、逆にアレルギー発症の抑制因子であるとしたものもあり、これまでにエンドトキシンとアレルギー疾患との関係についての一致した結論は得られていない。

家屋内外の空気中にはエンドトキシンを含む微小な粒子が浮遊しており、人は経気道的にこれらに曝露されることから、人への曝露を正しく評価するためには空気中のエンドトキシン量を測定することが望ましい。しかし、従来の研究は、家屋内において掃除機等で吸引・集塵したハウスダスト中のエンドトキシン量を測定したものが多く、空気中のエンドトキシン量を測定したものは少ない。近年は微小粒子の健康影響が懸念されていることから、浮遊している粒子中のエンドトキシン量を評価し、喘息の病態との関連を明らかにすることが重要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、空気中を浮遊する粒子状物質を無菌的に捕集して、粒子に含まれているエンドトキシンを抽出、定量する方法を確立する。それにより、人が生活している一般家屋内外における空気中のエンドトキシン量の実態を明らかにし、ペット飼育、床のタイプ、空気清浄機の使用等の生活環境因子とエンドトキシン量との関連を明らかにする。さらに、エンドトキシンへの曝露が喘息等のアレルギー性疾患の病態に与える影響を定量的に評価することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 家屋内外における浮遊粒子中エンドトキシン量とそれに影響する因子

### 対象者

兵庫県尼崎市に居住する妊娠中の女性に本調査の目的及び方法を文書及び口頭で説明し、書面による同意が得られた者を対象とした。

### 粒子状物質の捕集

粒子状物質は、対象者が居住する家屋の内外で、平日と週末の各 48 時間、ミニポンプ (MP-300N) に単項式多段インパクトのホルダー (ATPS-20H) を接続して 1.5 L/min で空気を吸引し、予め 250 で 2 時間乾熱滅菌した石英繊維フィルター上に粒径 2.5 μm 以下の粒子 (PM<sub>2.5</sub>) と 10 ~ 2.5 μm の粒子 (PM<sub>10-2.5</sub>) を分級捕集し、分析に供するまで -30 で保存した。

### エンドトキシンの分析

粒子中のエンドトキシン量は、Limulus

amebocyte lysate assay 法によりカプトガニ血球抽出物から作られたライセート試薬を用いて分析した。分析に使用する器具はすべて 250 で 2 時間滅菌処理を行い、チューブなどはエンドトキシンの汚染や吸着のないエンドトキシンフリーのものを使用した。

抽出方法は、石英フィルターをチューブに入れ、エンドトキシンフリー水にエンドトキシン抽出液を加えて 10 秒間攪拌させた。その後超音波照射を 20 分を行い、常温で 40 分静置した後、遠心分離 (3000rpm で 5 分、4 ) によって石英繊維と抽出物を分離した。上澄み液をトキシノメーター (ET-6000, 和光純薬工業) を用いて測定し、結果は採気量当たりのエンドトキシン量 (EU/m<sup>3</sup>) で表した。

### 解析方法

エンドトキシン濃度は、対数正規に近似した分布であったため、対数に変換して解析を行った。屋内と屋外における粒子中エンドトキシン濃度の関係を評価し、線形混合モデルを用いて気温と相対湿度を調整した上で、子どもの数、屋内でのペット飼育の有無、家屋及び床の構造、空気清浄機の使用等との関連を解析した。

(2) エンドトキシンが呼吸器系に及ぼす短期的影響

### 対象者

瀬戸内海の離島にある高等専門学校の 1 クラスの学生全員に本調査の目的及び方法等を文書及び口頭で説明し、書面による同意が得られた者を対象とした。

### エンドトキシン量の測定

教室の内外にミニポンプを設置し、(1) と同じ方法で、24 時間毎に粒子状物質を PM<sub>2.5</sub> と PM<sub>10-2.5</sub> に分級捕集し、それぞれよりエンドトキシンを抽出し、分析した。

### 肺機能検査

電子式ピークフローメーター (Electronic PEF/FEV<sub>1</sub> Diary, Vitalograph 社製) を対象者に 1 台ずつ渡して、平成 27 年 5 月 7 日から 6 月 8 日の約 1 か月間、月曜日から金曜日まで毎日朝の始業前に最大呼気流量 (PEF) と 1 秒量 (FEV<sub>1</sub>) の自己測定を実施した。

### 解析方法

毎日測定した肺機能値は、対象者ごとに求めた平均値に対する % 値で表し、線形混合モデルを用いて気温、湿度、対象者の性別を調整して、測定前 24 時間のエンドトキシン濃度との関連を解析した。結果は、教室内外のエンドトキシン濃度の測定期間中の四分位範囲 (interquartile range; IQR) 増加あたりの変化率を求めた。

## 4. 研究成果

(1) 家屋内外における浮遊粒子中エンドトキシン量とそれに影響する因子

調査への同意が得られたのは 55 世帯であり、屋内と屋外でそれぞれ 2 回ずつ、合わせて 110 回の測定を行った。なお、PM<sub>10-2.5</sub> のフ

フィルターのうち1つは異物が混入した可能性があったため、解析から除いた。

測定期間中の粒子状物質のエンドトキシンを表1に示した。PM<sub>2.5</sub>及びPM<sub>10-2.5</sub>中のエンドトキシン濃度は、屋内、屋外ともに平日よりも週末のほうが高く、PM<sub>10-2.5</sub>中濃度の差は有意であった。

表1 屋内外における粒子状物質中エンドトキシン濃度(EU/m<sup>3</sup>)

	平日			週末			p
	n	GM	(95% CI)	n	GM	(95% CI)	
屋内PM <sub>2.5</sub>	55	0.13	(0.10-0.16)	55	0.16	(0.13, 0.20)	0.112
屋外PM <sub>2.5</sub>	55	0.09	(0.08-0.11)	55	0.12	(0.10, 0.15)	0.052
屋内PM <sub>10-2.5</sub>	55	0.09	(0.07-0.11)	54	0.13	(0.10, 0.16)	0.022
屋外PM <sub>10-2.5</sub>	55	0.07	(0.06-0.09)	55	0.10	(0.08, 0.11)	0.014

GM: 幾何平均、95% CI: 95% 信頼区間

屋内と屋外のエンドトキシン濃度の関係を図1、2に示した。PM<sub>2.5</sub>、PM<sub>10-2.5</sub>中のエンドトキシン濃度は、いずれも屋外濃度が高いと屋内濃度も高く、両者の間には有意な相関がみられたが、PM<sub>2.5</sub>のほうが関連は強かった(それぞれ  $r = 0.677$ ,  $0.444$ )。

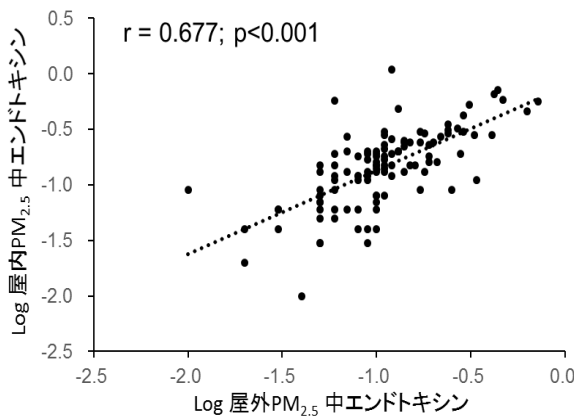


図1 屋内外のPM<sub>2.5</sub>中のエンドトキシン濃度の関係 (n=110)

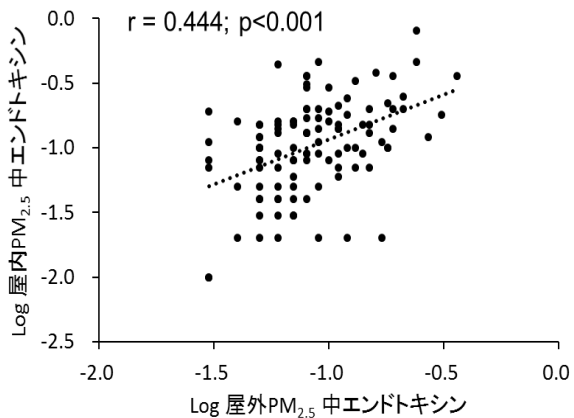


図2 屋内外のPM<sub>10-2.5</sub>中のエンドトキシン濃度の関係 (n=109)

屋内のPM<sub>2.5</sub>及びPM<sub>10-2.5</sub>中のエンドトキシン濃度と生活環境因子との関連を表2に示した。屋内PM<sub>10-2.5</sub>中エンドトキシン濃度は、子どもが2人以上いる家庭では子どもが1人のみまたは子どもがいない家庭よりも有意に高かった。床に畳または絨毯を使用している家庭はフローリングの家庭よりもPM<sub>10-2.5</sub>中エンドトキシン濃度が有意に高く、木造家

屋は鉄筋鉄骨家屋よりも高かった。屋内でのペット飼育及び空気清浄機使用の有無による差は有意ではなかった。屋内PM<sub>2.5</sub>中エンドトキシン濃度についても、PM<sub>10-2.5</sub>中の濃度とほぼ同様の傾向であったが、いずれの生活環境因子による差も有意ではなかった。

表2 生活環境と屋内粒子中エンドトキシン濃度の関係

	PM <sub>2.5</sub> 中エンドトキシン			PM <sub>10-2.5</sub> 中エンドトキシン		
	n	GM	(95% CI)	n	GM	(95% CI)
子どもの数						
2人以上	16	0.17	(0.03, 0.85)	16	0.18	(0.07, 0.52)
1人	48	0.14	(0.05, 0.44)	48	0.11	(0.02, 0.49)
なし	46	0.13	(0.02, 0.93)	45	0.08	(0.01, 0.48)
屋内のペット						
あり	16	0.17	(0.03, 1.16)	16	0.10	(0.02, 0.45)
なし	94	0.14	(0.03, 0.63)	93	0.11	(0.02, 0.56)
空気清浄機						
使用	35	0.13	(0.03, 0.66)	34	0.10	(0.02, 0.59)
非使用	75	0.15	(0.03, 0.70)	75	0.11	(0.02, 0.52)
床のタイプ						
畳、絨毯	46	0.17	(0.05, 0.63)	46	0.13	(0.03, 0.53) *
フローリング	64	0.13	(0.02, 0.70)	63	0.09	(0.02, 0.51)
家屋の構造						
木造	36	0.15	(0.04, 0.62)	36	0.13	(0.04, 0.42) *
鉄筋・鉄骨	74	0.14	(0.03, 0.73)	73	0.09	(0.02, 0.57)

GM: 幾何平均、95% CI: 95% 信頼区間

次に、混合効果モデルを用いて、屋内PM<sub>2.5</sub>中のエンドトキシン濃度と屋外PM<sub>2.5</sub>中の濃度、様々な生活環境及び気象因子等との関連を解析した(表3)。屋内PM<sub>2.5</sub>中エンドトキシン濃度は、屋外におけるPM<sub>2.5</sub>中濃度との関連が大きかった。生活環境因子では、屋内でペットを飼育している家庭は飼育していない家庭よりも22.1(95%信頼区間(CI): 6.4, 37.7)%高く、有意であった。床のタイプによる差も有意であり、畳または絨毯の家庭はフローリングの家庭よりも高かった。また、空気清浄機を使用する家庭のエンドトキシン濃度は有意に低いことが明らかとなった。子どもの数、建物の構造については有意な差はみられず、気温及び相対湿度との関連も有意ではなかった。

表3 屋内PM<sub>2.5</sub>中エンドトキシン濃度に関係する因子

	%変化	(95% CI)	p
子どもの数			
2人以上	9.5	(-7.1, 26.2)	0.259
1人	7.4	(-5.0, 19.7)	0.239
なし	-	-	-
屋内のペット(あり)	22.1	(6.4, 37.7)	0.006
空気清浄機(使用)	-15.4	(-27.9, 2.9)	0.016
床のタイプ(畳、絨毯)	11.4	(0.6, 22.1)	0.038
家屋構造(木造)	-1.4	(-13.6, 10.8)	0.826
気温(°C)	-0.1	(-0.9, 0.8)	0.890
相対湿度(%)	0.5	(-0.3, 1.3)	0.221
屋外PM <sub>2.5</sub> 中エンドトキシン	28.5	(22.2, 34.7)	<0.001

同様に、屋内PM<sub>10-2.5</sub>中のエンドトキシン濃度と様々な生活環境及び気象因子との関連

についての解析を行った(表4)。屋内PM<sub>10-2.5</sub>中のエンドトキシン濃度も、屋外におけるPM<sub>10-2.5</sub>中濃度との関連が大きかった。生活環境因子では、子供が2人いる家庭、1人いる家庭では子どものいない家庭よりもそれぞれ29.0(95%CI: 12.1, 45.9)%, 11.9(95%CI: -0.8, 24.5)%高く、2人以上の家庭では有意であった。また、PM<sub>2.5</sub>中濃度と同様に、床のタイプによる差も有意であったが、屋内でのペットの飼育、空気清浄機の使用の有無、建物の構造による差は有意ではなく、気温及び相対湿度との関連もみられなかった。

表4 屋内PM<sub>10-2.5</sub>中エンドトキシン濃度に関する因子

	%変化	(95%CI)	p
子どもの数			
2人以上	29.0	(12.1, 45.9)	0.001
1人	11.9	(-0.8, 24.5)	0.065
なし	-	-	-
屋内のペット(あり)	6.4	(-11.1, 23.9)	0.471
空気清浄機(使用)	-4.8	(-18.2, 8.6)	0.479
床のタイプ(畳、絨毯)	14.6	(3.0, 26.3)	0.015
家屋構造(木造)	6.9	(-5.8, 19.7)	0.284
気温(°C)	0.1	(-0.9, 1.0)	0.904
相対湿度(%)	0.3	(-0.6, 1.2)	0.546
屋外PM <sub>2.5</sub> 中エンドトキシン	15.4	(8.7, 22.1)	<0.001

以上より、家屋内におけるPM<sub>2.5</sub>及びPM<sub>10-2.5</sub>中のエンドトキシン濃度は、いずれも屋外における粒子中の濃度と関連があり、床が畳または絨毯の家庭はフローリングの家庭よりも有意に高かった。PM<sub>2.5</sub>中のエンドトキシン濃度は、屋内でのペットの飼育により上昇し、空気清浄機の使用により低下することが示された。子どもが2人以上いる家庭ではPM<sub>10-2.5</sub>中のエンドトキシン濃度が有意に高かった。

## (2) エンドトキシンが呼吸器系に及ぼす短期的影響

期間中の教室内外の粒子中エンドトキシン濃度の推移を図3に示した。PM<sub>2.5</sub>中のエンドトキシン濃度の幾何平均値は、教室内0.07(95%CI: 0.06, 0.10)EU/m<sup>3</sup>、教室外0.07(95%CI: 0.05, 0.10)EU/m<sup>3</sup>であり、ほぼ同じであった(図3a)。PM<sub>10-2.5</sub>中のエンドトキシン濃度は、それぞれ0.12(95%CI: 0.09, 0.17)EU/m<sup>3</sup>、0.15(95%CI: 0.12, 0.20)EU/m<sup>3</sup>であり、教室外濃度がやや高かった(図3b)。

肺機能検査には41名(男子27名、女子14名)の同意が得られた。期間中の肺機能検査の実施回数のはべ884回であり、PEF及びFEV<sub>1</sub>の測定値の平均±標準偏差は、それぞれ411.3±111.3L/min、2.28±0.67Lであった。検査前24時間の教室内外の粒子中エンドトキシン濃度とPEF及びFEV<sub>1</sub>の変化との関係を図4に示した。教室内PM<sub>2.5</sub>中のエンドトキシン濃度IQR増加当たりのPEF変化率は-0.05(95%CI: -1.11, 1.01)%、FEV<sub>1</sub>変化率は0.39

(95%CI: -0.91, 1.69)%であり、いずれも有意な関連は認められなかった。同様に、教室内のPM<sub>10-2.5</sub>、教室外のPM<sub>2.5</sub>、PM<sub>10-2.5</sub>中のエンドトキシン濃度とPEF及びFEV<sub>1</sub>の変化との関連は、いずれも有意ではなかった。

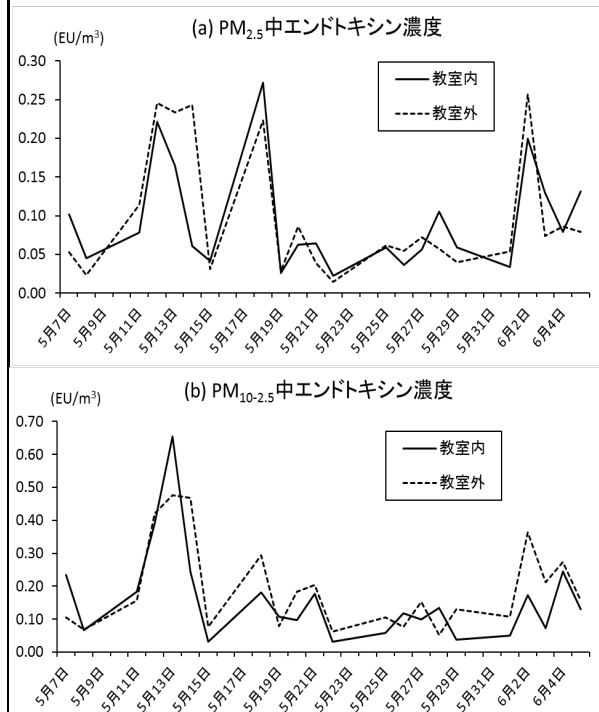


図3 教室内外における粒子状物質中エンドトキシン濃度の推移

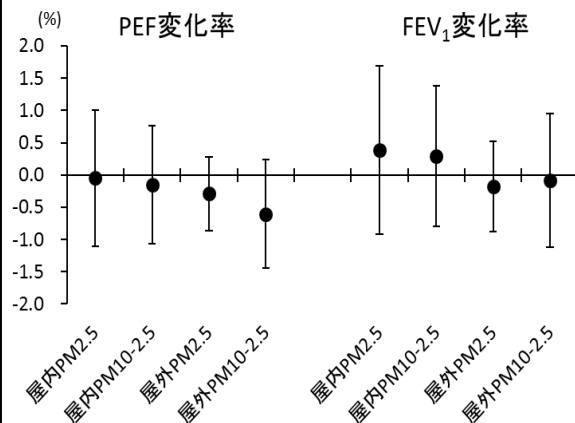


図4 教室内外における粒子状物質中エンドトキシン濃度と肺機能値との関連(検査前24時間のエンドトキシン濃度がIQR増加当たりの変化率)

次に、対象者を運動後に喘鳴症状がある者(10名)とない者(31名)の2群に分けて粒子中エンドトキシン濃度と肺機能の変化との関連を解析した。

検査前24時間の教室内外の粒子中エンドトキシン濃度とPEF変化率との関係を図5に示した。喘鳴症状がある者では、教室内PM<sub>2.5</sub>中エンドトキシン濃度がIQR増加当たりのPEF変化率は-1.46(95%CI: -3.45, 0.52)%であり、やや低下傾向がみられたが、有意ではなかった。教室内PM<sub>10-2.5</sub>中エンドトキシン

濃度については IQR 増加当たりの PEF 変化率が -2.38 (95%CI: -4.07, -0.67) %と有意であった。また、教室外 PM<sub>2.5</sub> 及び PM<sub>10-2.5</sub> 中エンドトキシン濃度の増加によっても PEF の有意な低下が認められた。一方、喘鳴症状がない者では、いずれのエンドトキシン濃度との関連も有意ではなかった。

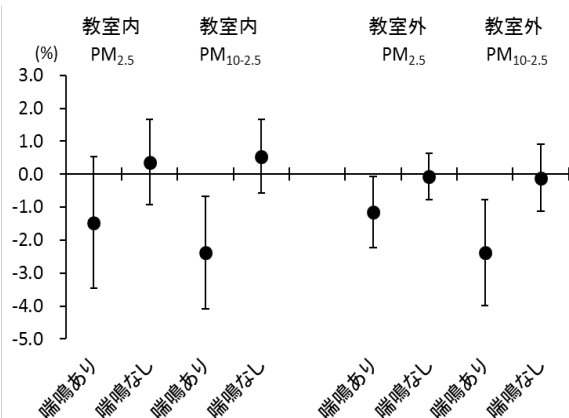


図5 教室内外における粒子状物質中エンドトキシン濃度と PEF との関連(喘鳴の有無別)

検査前 24 時間の教室内外の粒子中エンドトキシン濃度と FEV<sub>1</sub> の変化との関係を図 6 に示した。喘鳴症状がある者では、教室外の PM<sub>2.5</sub> 及び PM<sub>10-2.5</sub> 中のエンドトキシン濃度の IQR 増加あたりの FEV<sub>1</sub> 変化率は、それぞれ -1.71 (95%CI: -3.19, -0.22) %、 -2.25 (95%CI: -4.39, -0.11) %と有意であった。教室内の PM<sub>2.5</sub> 及び PM<sub>10-2.5</sub> 中エンドトキシン濃度の増加によっても FEV<sub>1</sub> は低下する傾向が見られたが、有意ではなかった。喘鳴症状がない者では、PEF と同様に、いずれの濃度との関連も有意ではなかった。

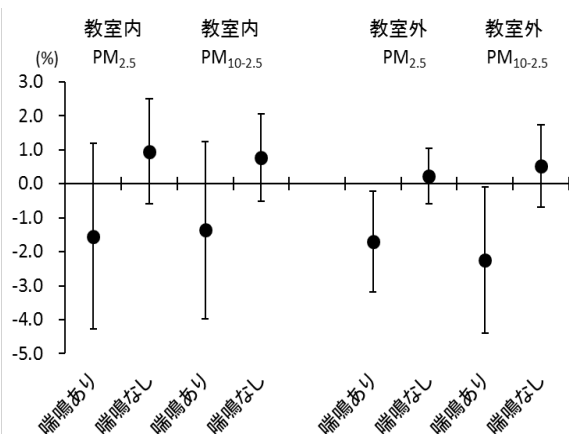


図6 教室内外における粒子状物質中エンドトキシン濃度と FEV<sub>1</sub> との関連(喘鳴の有無別)

以上より、浮遊粒子中のエンドトキシン濃度が増加すると、運動後に喘鳴症状がある者では肺機能値が低下する傾向が認められ、教室外の PM<sub>2.5</sub> 及び PM<sub>10-2.5</sub> 中のエンドトキシン濃度と PEF 及び FEV<sub>1</sub> の変化との関連は有意であった。教室内の PM<sub>10-2.5</sub> 中エンドトキシン濃度と PEF の変化との関連も有意であった。一

方、運動後に喘鳴症状のない者では、エンドトキシン濃度と肺機能との関連は認められなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Hasunuma H, Shima M, et al. (11 人中 11 番目) Association between traffic-related air pollution and asthma in preschool children in a national Japanese nested case-control study. *BMJ Open* 2016; 6: e010410. (査読有) DOI:10.1136/bmjopen-2015-010410

Tomiita M, Shima M, et al. (11 人中 3 番目) Interleukin-10 and interleukin-5 balance in patients with active asthma, those in remission, and healthy controls. *Asia Pac Allergy* 015; 5: 210-5. (査読有) DOI: 10.5415/apallergy.2015.5.4.210

Yamazaki S, Shima M, et al. (8 人中 2 番目) Patterns of sensitization to inhalant allergens in Japanese lower-grade schoolchildren and related factors. *Int Arch Allergy Immunol* 2015; 167: 253-63. (査読有) DOI:10.1159/000439534

余田佳子, 高木 洋, 若松純子, 大谷成人, 島 正之. 大気汚染物質が喘息およびアレルギー症状を有する者の肺機能に与える影響. *アレルギー* 2015; 64: 128-35. (査読有) DOI:10.15036/arerugi.64.128

Yoda Y, Otani N, Sakurai S, Shima M. Acute effects of summer air pollution on pulmonary function and airway inflammation in healthy young women. *J Epidemiol* 2014; 24: 312-20. (査読有) DOI:10.2188/jea.JE20130155

島 正之. 大気汚染のアレルギー疾患への影響に関する疫学的知見. *アレルギー* 2014; 63: 891-900. (査読有) <http://jja.jsaweb.jp/>

〔学会発表〕(計 10 件)

島 正之, 山崎新, 中館俊夫, 小野雅司, 大原利真, 大森崇, 佐藤俊哉, 新田裕史. 小学生のダニ・スギ特異 IgE と関連要因. 第 64 回日本アレルギー学会学術大会. 2015.5.26-28. グランドプリンスホテル新高輪(東京都)

余田佳子, 島 正之. 家屋内外におけるオゾンおよび二酸化窒素濃度と測定局濃度

の関係.第 24 回日本健康医学会総会  
2014.11.22. ホテル日航東京 (東京都)

余田佳子, 田村憲治, 澤木潤子, 島 正  
之. 都市部における妊婦の居住家屋内外  
の粒子状物質濃度. 第 55 回大気環境学  
学会年会 2014.9.17-19. 愛媛大学 (愛媛  
県・松山市)

余田佳子, 櫻井四郎, 大谷成人, 島 正  
之. 大気汚染物質への個人暴露濃度が呼  
吸機能に与える急性影響. 第 84 回日本衛  
生学会学術総会 2014.5.26-27. 岡山コン  
ベンションセンター (岡山市)

余田佳子, 高木 洋, 若松純子, 大谷成  
人, 島 正之. 大気汚染物質が喘息および  
アレルギー症状を有する者の肺機能に与  
える急性影響. 第 26 回アレルギー学会春  
季臨床大会 .2014.5.9-11. 国立京都国際  
会館 (京都市)

Shima M. Airborne particulate matter  
and respiratory diseases in Japan.  
18th Congress of the Asian Pacific  
Society of Respiriology, 2013.11.11-14.  
Pacifico Yokohama (Yokohama, Japan).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

島 正之 (SHIMA, Masayuki)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 4 0 2 2 6 1 9 7

### (2) 研究分担者

大谷 成人 (OTANI, Naruhito)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 1 0 5 6 1 7 7 2

### (3) 研究協力者

余田 佳子 (YODA, Yoshiko)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 8 0 7 4 8 4 3 4