

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25740028

研究課題名(和文) 黄砂を含む越境大気汚染物質の長期影響としての発癌性評価

研究課題名(英文) Long term exposure to transboundary air pollution including Asian dust storm airborne particles may potentiate carcinogenesis

研究代表者

倉井 淳(KURAI, Jun)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70529396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：黄砂時粉塵の長期曝露が発癌に関与する可能性について、気道上皮構成細胞株を用いて検討を行った。その結果、比較的短時間の黄砂時粉塵による細胞株刺激でも、炎症発癌に関与するサイトカイン、酸化ストレスマーカーが誘導され、粉塵の長期曝露が発癌に関与する可能性が示唆された。また、鳥取県内に長期在住している非喫煙肺腺癌患者の術後肺標本における元素解析を蛍光X線法で行った。喫煙肺腺癌患者の標本でも同様の解析を行い両群間で元素成分について比較検討を行った。黄砂に付着する重金属などの非土壌成分について明らかな差異は認められなかった。長期粉塵曝露が肺組織へ与える影響については今後さらなる検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to examine the association of carcinogenesis with long term exposure of Asian dust storm (ADS) airborne particles in vitro. Our data showed that ADS airborne particles exposure to cultured tracheal epithelial cells induced inflammatory cytokines and oxidative stress within a relatively short time. These data imply a potentially important role for link between carcinogenesis and ADS airborne particles exposure. We also initiated studies aimed at analyzing the element of human lung tissue samples which was derived from lung cancer patients in West Japan. Tissue samples of smoking and never-smoking patients were analyzed by the X-ray fluorescence spectrometry method. We could not detect the difference of element distribution between smokers and never-smokers about the non-soil component attached on ADS airborne particle. Further studies are needed to reveal the adverse health effect of long term exposure for human lung tissue.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：黄砂 長期曝露 炎症発癌

1. 研究開始当初の背景

黄砂発生源の砂漠化の進行により、黄砂の飛来頻度および規模は増大している。また、アジア地域の経済発展に伴う工業化、自動車の普及に伴い大気汚染が増大し、その影響が他国へ越境する“越境大気汚染”が問題となっている。事実、本邦で黄砂飛来時の大気粉塵は、黄砂が飛来していない日に比較し、非土壌成分である重金属や真菌、Lipopolysaccharide (LPS)、様々な化学物質などが付着していることが報告されている。近年、発癌に關与する化合物が大気粉塵などから検出されており、越境大気汚染物質が発癌に關与している可能性が懸念される。また、アジア諸国では喫煙未経験者の肺腺癌の割合が増加しており、喫煙以外の原因として大気汚染の長期影響が指摘されており、今後検討が必要な課題となっている。

2. 研究の目的

近年、黄砂の健康被害が報告されている。黄砂の短期曝露に關する健康影響の報告はあるが、黄砂を含む越境大気汚染物質の長期曝露による健康影響に關する検討はなく不明な点が多い。本研究では黄砂、越境大気汚染物質の長期曝露が発癌に關与する可能性を基礎的実験で検討し、ヒト臨床検体で肺組織内の沈着物質を実際に評価することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 黄砂時大気粉塵が気道構成細胞に与える影響についての基礎的検討

気象庁が発表した黄砂飛散日(鳥取県)の2013年3月8日~3月11日、3月19日~3月20日に鳥取県内の高層ビル屋上でハイボリュームエアサンプラー(HV-1000R、柴田科学株式会社)を用いて集塵した大気粉塵および、同時期に同じ場所で集塵した黄砂時落下粉塵を実験に用いた。コントロールの大気粉塵として、黄土抗原土壌(CJ-1: China loess)を用いた。ハイボリュームエアサンプラーで集塵した黄砂粉塵は、実験に十分な量が確保できなかったため落下粉塵を主に使用して実験を行った。捕集した大気粉塵は、速やかに121℃、30分間滅菌処理後に-20℃で保管し細菌や真菌の増殖を防止した。気道構成細胞として、扁平上皮細胞に由来するA549細胞を用いた。

黄砂を含む大気粉塵により気道上皮障害が誘導される場合に気道上皮細胞がどのような反応を示すのか、すなわちどのような炎症性物質(炎症性サイトカイン)が分泌されるか、酸化ストレスが誘導されるかが発癌という観点からは重要になる。本実験では、A549細胞を用い、刺激はCJ-1と黄砂時落下粉塵と黄砂時大気粉塵で行った。最終粉塵濃度が、100ug/ml濃度になるように調整し、0時間、24時間、72時間共培養した。その際に、ポジティブコントロールとしてリポポリ

リサクライド(LPS)を100ug/ml濃度で用いて同様に細胞刺激を行った。刺激培養後に上清を採取した。気道上皮細胞が分泌するサイトカインのうち、特に炎症発癌の観点から重要な役割を果たすインターロイキン6(IL-6)、インターロイキン8(IL-8)、酸化ストレスマーカーの観点から8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)を各々ELISA法で測定し評価を行った。

(2) 黄砂時大気粉塵の長期曝露がヒト肺組織に与える影響についての臨床的検討

黄砂を含む大気粉塵を長期間にわたり吸入した場合に、ヒト肺組織にどのような物質が実際に沈着し、発癌、特に肺癌の誘導に關与するののかという点が重要である。

鳥取県または島根県に30年以上連続して居住している喫煙未経験の肺腺癌患者で、治療のために外科的切除された肺の癌周囲正常組織(組織乾燥重量5g相当)における元素解析を、蛍光X線分析(XRF)を用いて行った。また、喫煙未経験者に対する比較対象組織として、喫煙者(プリンクマン指数400以上)で肺癌に対する治療目的で外科的切除された肺の癌周囲正常組織(組織乾燥重量5g相当)も同様の手法による解析対象とした。被験者に対しては、当施設の倫理規定に基づき、研究内容を記載した説明文書にて、本研究の意義、目的、方法などについて十分に説明し、文書によるインフォームドコンセントを取得したうえで、正常肺組織提供に協力をしていただいた。喫煙未経験者の正常肺組織8検体と喫煙者の正常肺組織8検体について、エネルギー分散型蛍光X線分析装置(XRF)による元素解析を行った。XRFによる元素解析を行う前処置として、ポリエステルフィルム上に生体肺組織新鮮検体を置き、恒温炉を用いて60℃で約36時間乾燥させた後、フィルムから検体をはがしてXRFにて測定した。

4. 研究成果

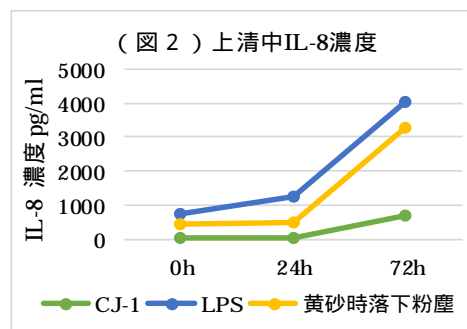
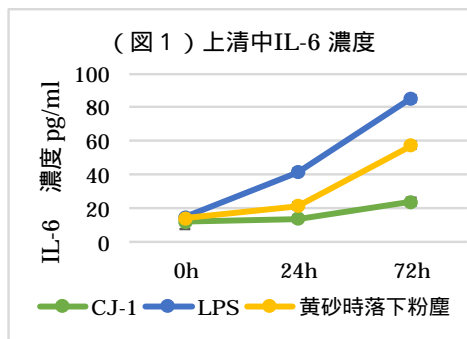
(1) 黄砂時大気粉塵が気道構成細胞に与える影響について

気道上皮細胞から分離培養されたA549細胞を、CJ-1と黄砂時落下粉塵(2013年3月8日~3月11日)で刺激し、上清中のIL-6(図1)とIL-8(図2)を測定した。

その結果、黄砂時落下粉塵刺激では刺激時間依存性にIL-6、IL-8ともに産生増加が認められた。一方、CJ-1でも、わずかに時間依存性に誘導される傾向が認められたが、産生能は落下粉塵と比較して低値であった。他の時期に黄砂時落下粉塵(2013年3月19日~3月20日)でも同様の実験を行ったが、IL-6、IL-8誘導能はおおむね同じであった。

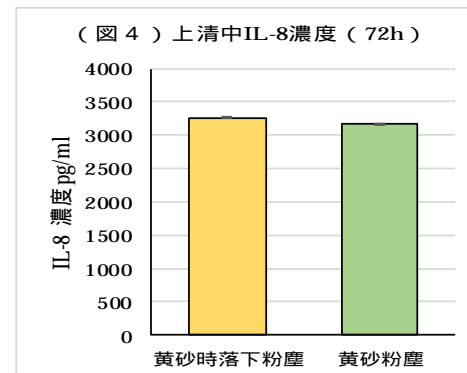
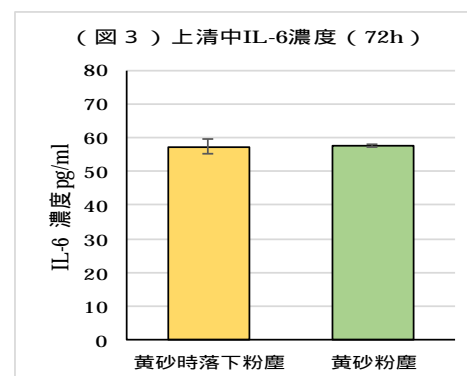
過去の報告から、採取時期の異なる大気粉塵のサイトカイン誘導能が、サイトカインの種類によっては異なることが報告されているが、今回の細胞株を用いた検討ではその差異は認められなかった。また、ハイボリューム

ムエアサンプラーで集塵した黄砂粉塵は、非常に微量なため、同じ条件下で 72 時間刺激時間における条件下のみで IL-6, IL-8 誘導能を確認した。その結果、黄砂時落下粉塵と同様のサイトカイン誘導能を有していること



が確認され (図 3 ; IL-6, 図 4 ; IL-8), 落下粉塵でのサイトカイン誘導能評価は、実際の黄砂粉塵のサイトカイン誘導能評価を反映しているものと推測された。

CJ-1, 黄砂時落下粉塵 (2013 年 3 月 8 日 ~ 3 月 11 日), 黄砂時落下粉塵 (2013 年 3 月 19 日 ~ 3 月 20 日) を用いて、同様の手法で刺激した A 5 4 9 細胞の上清中の 8-OHdG を測定した。時間依存性に 8-OHdG 濃度は上昇する



傾向が認められ, CJ-1 群より落下粉塵群で 8-OHdG 濃度が上昇する傾向が見られたが, 有意な上昇とは統計学的に判断できなかった。

近年, 発癌の新たなメカニズムの一つとして慢性的な持続的炎症により癌が誘導される炎症発癌が注目されている。基礎的実験において, この炎症発癌に関与するとされている代表的な IL-6, IL-8 のサイトカインは 72 時間という比較的短い刺激でも気道上皮構成細胞から分泌される可能性が示唆された。また, 黄土高原土壌である CJ-1 と比較して, 2 つの黄砂飛散時期に採取した黄砂時落下粉塵はともに, CJ-1 より強いサイトカイン誘導能を有していた。このことから, 土壌成分そのものより, 中国大陸から日本海上空を輸送されてくる過程で, 土壌成分からなる粒子表面に付着した様々な物質にこそ, サイトカイン誘導能があると考えられた。一方, 炎症発癌のもう一つの重要な因子として酸化ストレスの関与が報告されているが, その代表的なマーカーで, DNA 酸化損傷の程度を表す 8-OHdG については, 今回の実験系からは有意な上昇が認められなかった。より長期間にわたる曝露による検討などが必要と考えられた。

今後は粒子の表面付着する多種多様な物質のうち, 最もヒトの健康被害に影響を与えるものを可能な限り特定することが重要と考えられる。また, 付着物質に関する検討は, その時代の社会背景や経済活動の違いにより変化することも予想されるため, アジア諸国と連携しながら取り組むべき問題と考えられた。

(2) 黄砂時大気粉塵の長期曝露がヒト肺組織に与える影響について

鳥取県または島根県に 30 年以上連続して居住している喫煙未経験者 (女性 8 例), 喫煙者 (男性 8 例, ブリンクマン指数 400 以上) の肺腺癌患者で, 治療のために外科的切除された肺の癌周囲正常組織における元素解析を行った。粒子径により中枢側肺組織と末梢側肺組織において沈着物質に差異が生じる可能性もあるため, 切除された肺組織における中枢側 (区域気管支レベル) と末梢側 (呼吸細気管支レベル) の肺組織についてそれぞれ解析を行った。患者背景として, 平均年齢に差は認められなかったが, 近年の女性喫煙未経験者で肺腺癌が増加している疫学背景のとおり, 今回検討に用いた喫煙未経験者症例の 8 例は全例が女性であった。

土壌成分の主体である Si については, 喫煙未経験者, 喫煙者で有意な差を認められなかった。黄砂粉塵には, 非土壌成分の重金属が付着していることが報告されているが, 今回の検討では, そうした重金属の生体肺組織への沈着も確認できなかった。重金属と発癌の関係性については, 今後さらに解析症例を増やして検討するとともに, 他の解析方法との比較検討も必要と考えられた。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

発表者名：倉井 淳

発表標題：ダニ抗原誘発性気管支喘息モデルマウスを用いた捕集時期の異なる大気粉塵のアレルギー毒性評価

学会名：第 45 回日本職業・環境アレルギー学会

発表年月日：2014 年 6 月 28 日～6 月 29 日

発表場所：福岡県福岡市

6. 研究組織

(1)研究代表者

倉井 淳 (KURAI, Jun)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70529396