

自己評価報告書

平成23年 5月17日現在

機関番号：82101

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)

独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究領域・領域長

研究者番号：60281698

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

キーワード：微小粒子、生体影響、免疫影響、呼吸器影響

1. 研究計画の概要

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・越境汚染に基づく微小粒子・エアロゾル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、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が、その詳細や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や黄砂、大気中微小粒子等の健康影響は、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、高感受性と考えられるこれらの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応答や微小粒子・エアロゾルと呼吸器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影響を明らかにする必要がある。

本研究課題では、発生源や成分等が異なる微小粒子・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、免疫応答を担う免疫担当細胞と気道上皮細胞への影響に注目し、実験的に評価することにより、健康影響を規定する要因を明らかにすること、また、メカニズムを分子レベルで解析することにより、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。

具体的には、免疫担当細胞については、アトピー素因を有する NC/Nga マウスに由来する脾細胞と骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を、気道上皮に関しては正常ヒト気道上皮細胞株である BEAS-2B 細胞を用いることとした。

大気汚染物質としては、微小粒子・エアロゾルに含有される化学物質であり、先行研究により呼吸器・免疫系への悪影響が指摘され

ているベンゾ[a]ピレン (BaP)、及び、フェナントレンキノン (PQ)、ナフトキノン (NQ) を主たる検討対象とし、PQ、NQ の基本骨格であるフェナントレン、ナフトレンとその酸化体や異性体についても検討を加えた。

免疫応答への影響は、脾細胞については、細胞表面分子 (抗原提示細胞の活性化マーカー：MHC class II, CD80, CD86, T 細胞マーカー：TCR, CD3, CD28、リンパ球の活性化マーカー：CD69 等) の発現と培養上清中のサイトカイン (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-18 等)、ダニ抗原 (アレルゲン) 存在下の細胞増殖等を評価した。BMDC については、成熟・活性化に関わる細胞表面分子 (MHC class II, CD80, CD86, DEC205, CD83, CCR7, CXCR4 等) の発現を検討し、活性化が認められた場合は、ダニ抗原特異的な抗原提示機能として、T 細胞増殖誘導を評価した。気道上皮への影響については、細胞増殖/生存率を WST-1 による発色法により、アポトーシスの指標である活性型 Caspase-3 の発現及び接着分子である ICAM-1 (CD54) とムチン-1 の発現等をフローサイトメトリーにより、炎症性サイトカイン・ケモカインと可溶性 ICAM-1 の産生等を ELISA 法により解析した。

2. 研究の進捗状況

(1) 2008 年度

BaP および 9, 10-PQ, 1, 2-NQ は、ある濃度において、脾細胞中の CD86, TCR, CD69 を発現する細胞の割合や IL-4 産生を増加させることが明らかとなった。これより、微小粒子・エアロゾルの含有成分である BaP, 9, 10-PQ, 1, 2-NQ は、抗原提示細胞やリンパ球の活性化を促進し、免疫影響を発揮する可能性が示唆

された。

(2) 2009 年度

免疫担当細胞に関しては、9,10-PQ と 1,2-NQ は、主としてリンパ球の活性化影響をもたらすのに対し、BaP は、リンパ球とともに抗原提示細胞の活性も修飾する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、粘液産生に関わる因子の発現を修飾することを見出した。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、骨髄由来樹状細胞の CD86、CD83、CCR7、CXCR4 の発現、BEAS-2B 細胞の IL-6 や可溶性 ICAM-1 等の炎症性因子の産生、ムチン-1 の発現等がバイオマーカー候補として有力である可能性が示唆された。また、微小粒子・エアロゾルの構成成分によって、影響を与える細胞や性質、反応性が異なる可能性も示唆された。

(3) 2010 年度

今年度は、これまでに検討した影響評価指標を用いて、フェナントレンと 9,10-PQ、1,4-PQ、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 の曝露が、マウスの脾細胞と骨髄由来樹状細胞、ヒト気道上皮細胞に及ぼす影響を比較検討した。その結果、基本骨格であるフェナントレンとナフタレンの活性は低く、化学物質の影響には、官能基の存在が大きく寄与すること、また、細胞種だけでなく、その分化・成熟過程により、化学物質に対する感受性が異なることが示唆された。いくつかの影響においては、9,10-PQ よりも 1,4-PQ、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や 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が異なる可能性も考えられた。

3. 現在までの達成度

②概ね順調に進展している

微小粒子・エアロゾルの健康影響を実験的に評価し、影響を規定する要因を明らかにし、メカニズムを分子レベルで解析する目標を達成しつつ、予定通りに計画が進んでいる。

4. 今後の研究の推進方策

免疫担当細胞および気道上皮細胞の傷害や活性化を指標とした検討は、微小粒子・エアロゾルの生体影響の評価手法として有用であることが示された。バイオマーカーとして、脾細胞の CD86、TCR、CD69 の発現や BMDC の CD86、CCR7、CXCR4 の発現、BEAS-2B 細胞のムチン-1 の発現や IL-6、sICAM-1 の産生等が有用であると考えられた。今後、更なる有用なバイオマーカーが存在するか否か、継続

して検討を進めたい。

一方、微小粒子・エアロゾルに含まれる化学物質の健康影響をもたらす活性には、官能基の有無やその種類と配置が大きく寄与していること、化学物質の影響は、細胞種だけでなく、その分化・成熟過程でも異なる可能性があることも示唆された。一般的に官能基の配置は、オルト体の方がパラ体よりもラジカルを発生しやすいため毒性や活性が強いと考えられているが、これまでの我々の結果からは、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の関係は必ずしも一致しなかった。これより、今後、ラジカル以外の要因や化学物質の細胞内代謝などを考慮した検討も企図したい。

さらに、微小粒子・エアロゾルによる免疫影響、呼吸器影響の分子メカニズムについて、更なる解明を企図し、予防対策の確立への応用を目指すことも重要と考えている。

5. 代表的な研究成果

(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 3 件)

- ① 高野裕久、PM2.5 の健康影響 (毒性学的見地より)、クリーンテクノロジー、48、32-35、2010、査読無

[学会発表] (計 4 件)

- ① 小池英子、柳澤利枝、高野裕久、ベンゾピレンおよびキノ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 (2010 年 11 月 25 日)、東京国際フォーラム (東京)
- ② 小池英子、井上健一郎、柳澤利枝、高野裕久、キノン系化合物が *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 (2009 年 11 月 6 日)、沖縄コンベンションセンター (沖縄)
- ③ 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 (2009 年 8 月 27 日)、旭川市民文化会館 (北海道)

[図書] (計 2 件)

- ① 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
- ② 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