

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460178

研究課題名(和文) 炎症・アレルギー性物質の長距離大気輸送及びその生物活性の解明

研究課題名(英文) Long-range transport and biological activity of inflammatory/allergic material

研究代表者

渡辺 徹志 (Watanabe, Tetsushi)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90182930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：炎症・アレルギー性物質の長距離大気輸送の実態を明らかにするため、大気粉塵の捕集法、粉塵中のエンドトキシンとタンパク質の抽出法及び分析法について検討した。また、検討した方法を用いて、中国大陸からの長距離輸送の影響が大きいと考えられる九州北部地域において大気粉塵を捕集し、エンドトキシン、タンパク質、水溶性イオンによる大気汚染に関する調査を行った。その結果、九州北部地域では黄砂飛散時にエンドトキシンの濃度が顕著に上昇することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To clarify the state of long-range transport of inflammatory/allergic materials from mainland China, we examined the methodologies for collection of airborne particles, extraction and analysis of endotoxin and protein. Then, we collected airborne particles in the northern Japan, where large effect from the long-range transport is expected, and analyzed endotoxin, protein, and water-soluble ions. Our results suggested that concentration of endotoxin increased when Asian dust events occurred in that region.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：エンドトキシン タンパク質 大気粉塵

1. 研究開始当初の背景

微小粒子状物質 (PM2.5) 及び黄砂が健康に及ぼす影響について強い社会的な関心が寄せられている。諸外国では PM2.5 が呼吸器や循環器に影響を与えることが報告されているが、国内では PM2.5 の全国的な測定がはじまったところであり、成分及び健康影響に関する知見を早急に得ることが求められている。また、黄砂についても付着する成分に関する情報は十分には得られていない。黄砂の健康影響については東アジア地域の国々から健康被害に関する報告が増えつつあり、国内でも黄砂飛散時に喘息患者で呼吸器症状の増悪がみられることが報告され、黄砂が喘息の増悪因子として日本アレルギー学会の「喘息予防・管理ガイドライン 2012」に掲載された。しかし、黄砂等の中の喘息の増悪・発症を引き起こす原因物質については十分には解明されていなかった。

エンドトキシンはグラム陰性細菌の細胞外膜成分であり、マクロファージなどにおいて炎症性サイトカインの産生を促進する。諸外国において大気粉塵抽出物中のエンドトキシンの定量分析結果が報告されていることから、PM2.5 や黄砂粒子を含む大気粉塵にエンドトキシンが付着していると推測されるが、国内の大気粉塵におけるエンドトキシンの分布についてほとんど明らかにされていなかった。一方、タンパク質はアレルギー反応の原因物質であり、喘息発症 (アレルギー反応) の原因が大気粉塵に付着するタンパク質である可能性がある。国内大気粉塵中のタンパク質含量に関する報告はなく、タンパク質の構造、生物活性など詳細については全く明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大気粉塵中のエンドトキシン及びタンパク質の量的・質的特徴と長距離輸送の関係並びにそれらの喘息の増悪・発症への関与の可能性を明らかにすることである。具体的には、PM2.5 及び黄砂高濃度飛来地点の大気粉塵について、エンドトキシン及びタンパク質の分布状況及び PM2.5・黄砂の飛来によるそれらの長距離輸送について明らかにする。PM2.5 による越境汚染発生時、黄砂飛散時及びそれらのない平常時の大気粉塵について、主要なタンパク質の化学的性状を解析する。さらに、大気粉塵の炎症・アレルギー関連作用を測定し、それらの喘息の増悪・発症への関与の可能性について明らかにする。

これまでの気象庁並びに環境省による調査により、西日本において高濃度の黄砂及び PM2.5 が高頻度に観測されていることから、それらの影響が大きいと予想される九州北部地域に位置する福岡県太宰府市と長崎県佐世保市において炎症・アレルギー性物質の長距離輸送について調査研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 大気粉塵の捕集方法

恒湿恒量化後に秤量したフィルターを加熱処理したのち、大気粉塵の捕集に使用した。大気粉塵は、PM2.5 用インパクターを装着したハイポリウムエアサンプラーを用いて、PM2.5 とそれ以外の粒子 (粗大粒子) に分けて 1 週間分ずつ捕集するかもしくはインパクター等を装着しないでハイポリウムエアサンプラーを用いて総粉塵 (TSP) を 1 日分ずつ捕集した。なお、PM2.5 と TSP の捕集には石英繊維製フィルターを、粗大粒子の捕集にはガラス繊維製フィルターを用いた。各フィルターは、大気粉塵の捕集の後にも恒湿恒量化したのち、秤量して、捕集前後の重量差を求め、積算空気吸引量で除すことで大気中の粉塵濃度を算出した。なお、粉塵は、いずれの場合も $1\text{ m}^3/\text{min}$ で大気を吸引して捕集した。

(2) 大気粉塵の捕集場所、捕集方法、捕集期間

福岡県太宰府市において、2014 年 5 月より 2015 年 11 月まで大気粉塵を PM2.5 と粗大粒子に分けて 1 週間分ずつ捕集した。なお、2014 年 10 月は捕集しなかった。また、中国北京市において、2013 年 12 月から 2014 年 3 月まで TSP を 1 日分ずつ各月 5 日間、捕集した。さらに、長崎県佐世保市において 2016 年 3 月から 2017 年 2 月まで TSP を 1 日分ずつ捕集した。但し、3 月から 5 月と 9 月から 11 月は原則として全平日、6 月から 8 月と 12 月から 2 月は平日 5 日分を捕集した。

(3) 大気粉塵の抽出条件、エンドトキシン、タンパク質及びイオンの分析

フィルター及び粉塵からのエンドトキシンとタンパク質の抽出は以下の 3 種類のうちいずれかの方法で行った。エンドトキシンフリーの精製水を用いる振とう抽出、エンドトキシンフリーの精製水を用いる超音波抽出、エンドトキシンフリーの 0.025% Tween 20 溶液を用いる超音波抽出。エンドトキシンはカプトガニの血球抽出成分より調製されたライセート試薬を用いたカイネティック - 比色法 (リムルスカラー KY、和光純薬工業製) を用いて測定した。なお、エンドトキシンの定量にはエンドトキシンフリーのプラスチック器具を使用した。タンパク質はマイクロ BCA 法 (Micro BCA Protein Assay Kit、Thermo Fisher Scientific 社製) により分析した。粉塵中の水溶性イオンは、精製水を用いて超音波抽出した。水溶性イオンとして Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 Cl^- をイオンクロマトグラフ法により定量した。

(4) 大気粉塵中のタンパク質の化学的性状

佐世保市において 2015 年 3 月から 5 月に捕集した TSP について精製水を用いて超音波

抽出して得た抽出液を凍結乾燥後、reducing sample buffer に再溶解し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。また、陽性対照として牛血清アルブミンの希釈溶液に reducing sample buffer を加え SDS-PAGE 行った。SDS-PAGE 後のゲルを銀染色しバンドを確認した。

(5) 大気粉塵の炎症性サイトカイン産生能の測定

ヒト HEK293 細胞から調製したゲノム DNA を鋳型に用いて TNF- α 遺伝子プロモーター領域を PCR 法により増幅・単離し、改良型ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子としてもつベクターに組み込みレポータープラスミドを作製した。このレポータープラスミドをヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞に導入後、ピューロマイシン耐性細胞を選択、単離し、炎症性サイトカイン誘導能を評価するための細胞 (THP-TNF- α 細胞) を作製し、本細胞を大気粉塵抽出液またはポジティブコントロールとしてエンドトキシンを 6 時間処理した。なお、2014 年 7 月から 10 月、2015 年 3 月から 6 月、2015 年 9 月から 11 月の期間に佐世保市において捕集した PM2.5 と粗大粒子の一定量についてエンドトキシンフリーの精製水を用いて超音波抽出して得た抽出物を凍結乾燥後、細胞培養液に再溶解し、大気粉塵抽出液とした。処理後の細胞は、PBS(-) で洗浄後、Glo lysis buffer (Promega 社) で溶解し、One Glo Luciferase assay substrate (Promega 社) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

(1) 大気粉塵の捕集条件、抽出条件等の検討

捕集に用いるフィルターのエンドトキシンによる汚染について試験するため、市販のフィルターとそれを加熱処理したフィルターからエンドトキシンフリーの精製水を用いて超音波抽出して得た抽出液についてエンドトキシンの分析を行った。その結果、市販フィルターではエンドトキシンが検出されるが、加熱処理することにより、エンドトキシンが検出限界以下まで低下することがわかった。

粉塵からエンドトキシン及びタンパク質を抽出する方法について検討するため、京都市において捕集した粉塵を用いて、3. 研究の方法(3)に記載した から の方法で抽出液を調製し、エンドトキシン及びタンパク質の分析を行った。その結果、いずれの試料からもエンドトキシンが検出され、 のエンドトキシンフリーの 0.025% Tween 20 溶液を用いる超音波抽出により得た抽出物から最も高い濃度のエンドトキシンが検出された。一方、 から の方法で調製した抽出液中タンパク質濃度はほとんど同じであり、タンパク質の抽出については から の方法で差がないことがわかった。そのため、エンドトキシ

ンとタンパク質分析用の試料溶液は の方法で調製することにした。イオンの分析については、以前より実施している方法、すなわち、大気粉塵から、精製水で抽出した抽出液を試料溶液とした。

(2) 大気粉塵中のエンドトキシン、タンパク質及び水溶性イオンの濃度

2014 年 5 月から 2015 年 11 月に太宰府市において捕集した PM2.5 と粗大粒子についてエンドトキシンとタンパク質の分析を行った。その結果、エンドトキシン濃度は、粗大粒子においては 1.0 ~ 28.3 mEU/m³ であった。一方、PM2.5 においては 0.1 ~ 13.2 mEU/m³ であり、ほとんどの週においてエンドトキシン濃度は PM2.5 より粗大粒子において高かった。粗大粒子におけるエンドトキシンの月別の平均値は 2014 年 5 月、9 月、11 月、12 月、2015 年 2 月、6 月、9 月、10 月に高く、8.8 ~ 14.7 mEU/m³ であった。(2015 年 10 月は PM2.5、粗大粒子とも捕集しなかった)。これらの月のうち 2014 年 5 月、2015 年 2 月、6 月には福岡県において高濃度の黄砂飛散が観測されており、これらの月に検出された高濃度エンドトキシンは黄砂とともに飛来したことによるものと推測された。一方、2014 年 9 月、11 月、2015 年 9 月、10 月にも高濃度のエンドトキシンが検出されたがこれらの月には高濃度の黄砂は観測されなかった。秋季に検出された高濃度のエンドトキシンの原因について今後さらに検討する必要があると考えられた。

タンパク質濃度は、粗大粒子においては 33 ~ 300 ng/m³ であり、PM2.5 においては 970 ~ 3391 ng/m³ であった。また、タンパク質は、ほぼすべての週において粗大粒子より、PM2.5 において高濃度であった。タンパク質濃度の月別の平均値では、エンドトキシンのように特に高い月はみられなかった。

中国北京市において捕集した TSP についてエンドトキシンとタンパク質を分析した。その結果、エンドトキシン濃度はほとんどが 200 mEU/m³ 以上であった。また、タンパク質濃度は 1.6 μ g/m³ 以上であった。このように風上域である中国において日本よりエンドトキシン、タンパク質とも濃度が高く、それらの日本への長距離輸送が起こる可能性があることが示唆された。

長崎県佐世保市において 2016 年 3 月から 2017 年 2 月までの 1 年間にわたり、ハイボリウムエアサンプラーを用いて大気粉塵を捕集し、大気粉塵中のエンドトキシン及びタンパク質を測定した。大気粉塵は、2014 年度と 2015 年度の福岡県太宰府市にける調査の結果、高濃度のエンドトキシンが検出された 9 月から 11 月と高濃度の黄砂が飛散することの多い 3 月から 5 月については、ほぼ毎日捕集し、それ以外の月は原則として各月の第 2 週目に 5 日間分ずつ捕集した。その結果、大気中のエンドトキシン濃度は 5、9、10 月に

高く、特に9月と10月に高濃度の日が多数みられた。また、各大気粉塵について黄砂の指標であるCa²⁺濃度を測定した結果、5月に高濃度のCa²⁺が検出され、黄砂が飛散したと考えられた日に高濃度のエンドトキシンが検出されたことから、エンドトキシン濃度の上昇に黄砂の飛散が関与した可能性が高いと考えられた。一方、タンパク質はエンドトキシンとは異なり、日間変動はみられるものの濃度変化は小さく、特に高濃度の日が多い月は見られなかった。

(3) 大気粉塵中のタンパク質の化学的性状

アレルギー性鼻炎の原因となる花粉由来のタンパク質が多く飛散したと予想される3月から5月に捕集した大気粉塵についてポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。牛血清アルブミン希釈溶液ではSDS-PAGE後の銀染色により約66 kDa付近に牛血清アルブミンのバンドが検出された。一方、試料溶液でははいずれも、1.4 kDa付近にバンドが検出され、含まれるタンパク質は低分子のものであることが示唆された。

(4) 大気粉塵の炎症性サイトカイン産生能

TNF- α 遺伝子プロモーター領域の発現を検出するヒト細胞試験系を用い、大気粉塵抽出物の活性を試験した結果、エンドトキシン濃度の高い抽出物において、TNF- α プロモーター活性が検出された。今後、秋季におけるエンドトキシン濃度の上昇のヒト健康への影響について検討する必要があると考えられた。

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)

[学会発表](計 9件)

クウリバリ・スレイマン、南嘉輝、山田真裕、小野遼、阿部真帆、久保裕希、北村重治、古川奈美、長谷井友尋、山岸伸行、出口雄也、渡部仁成、若林敬二、渡辺徹志：大気微小粒子(PM_{2.5})及び粗大粒子中のタンパク質及びリポポリサッカロイドの解析、日本薬学会第135年会、2015年3月28日、神戸学院大学(兵庫県・神戸市)

渡辺徹志、クウリバリ・スレイマン、北村重晴、久保裕希、古川奈美、阿部真帆、山田真裕、出口雄也、長谷井友尋：黄砂及び微小粒子状物質中のタンパク質及びLPSの解析、フォーラム2015 衛生薬学・環境トキシコロジー、2015年9月18日、神戸学院大学(兵庫県・神戸市)

北村重晴、久保裕希、クウリバリ・スレイマン、阿部真帆、古川奈美、長谷井友尋、出口雄也、渡辺徹志：佐世保市・京都市における大気粉塵中のエンドトキシン・タン

パク質の定量及び季節変動、第65回日本薬学会近畿支部総会・大会、2015年10月17日、大阪大谷大学(大阪府・富田林市)

久保裕希、クウリバリ・スレイマン、山田真裕、阿部真帆、北村重晴、古川奈美、長谷井友尋、出口雄也、渡辺徹志：佐世保市・京都市における大気粉塵中のイオンの定量及び季節変動、第65回日本薬学会近畿支部総会・大会、2015年10月17日、大阪大谷大学(大阪府・富田林市)

古川奈美、クウリバリ・スレイマン、阿部真帆、北村重晴、久保裕希、河瀬裕美、中大路友亮、長谷井友尋、出口雄也、渡辺徹志：黄砂飛散と大気中のタンパク及びエンドトキシン濃度の関係、日本薬学会第136年会、2016年3月29日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

渡辺徹志：越境大気汚染の実態と喘息への影響、第47回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会、2016年7月8日、近畿大学(大阪府・東大阪市)、

Mohammad Shahriar Khan, Maho Abe, Nami Furukawa, Yuuki Kubo, Shigeharu Kitamura, Yusuke Nakaoji, Kawase Yumi, Tomohiro Hasei, Takahiro Matsumoto, Yuya Deguchi, Nobuyuki Yamagishi, Tetsushi Watanabe: Seasonal Fluctuation of Lipopolysaccharide on Airborne Particles and Relation with Asian Dust. フォーラム2016 衛生薬学・環境トキシコロジー、2016年9月10日、昭和大学(東京都・品川区)

河瀬裕美、モハメド シャリアー カーン、阿部真帆、北村重晴、久保裕希、古川奈美、中大路友亮、松本崇宏、長谷井友尋、出口雄也、渡辺徹志：佐世保市・京都市における大気粉塵中のLPS、タンパク質、イオンの定量及び季節変動、第66回日本薬学会近畿支部総会・大会、2016年10月15日、大阪薬科大学(大阪府・高槻市)

中大路友亮、モハメド シャリアー カーン、阿部真帆、北村重晴、久保裕希、古川奈美、河瀬裕美、松本崇宏、長谷井友尋、出口雄也、渡辺徹志：黄砂期間中における佐世保市・京都市の総浮遊粒子状物質中のLPS、タンパク質、イオン濃度の比較、第66回日本薬学会近畿支部総会・大会、2016年10月15日、大阪薬科大学(大阪府・高槻市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 徹志 (WATANABE, Tetsushi)
京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90182930

(2)研究分担者

長谷井 友尋 (HASEI, Tomohiro)

京都薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：10388027

(3)連携研究者

山岸 伸行 (YAMAGISHI, Nobuyuki)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：60298685

(4)研究協力者

出口 雄也 (DEGUCHI, Yuya)