| | |
|---|---|
| 課題名 | 5C-1155 黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質の生体影響とそのメカニズム解明に関する研究 |
| 課題代表者名 | 市瀬 孝道 （大分県立看護科学大学 看護学部 人間科学講座 生体反応学研究室 教授） |
| 研究実施期間 | 平成23～25年度 |
| 累計予算額 | 115,612千円（うち25年度34,322千円）<br>予算額は、間接経費を含む。 |
| 本研究のキーワード | 黄砂、アレルギー疾患、雄性生殖器、免疫担当細胞、気管支上皮細胞、バイオエアロゾル、生物分析、毒素遺伝子検出、多環芳香族炭化水素、免疫細胞毒性反応 |

研究体制

(1)黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による呼吸器系・生殖器系・免疫系への影響とそのメカニズム解明（大分県立看護科学大学、(独)国立環境研究所、京都大学）

(2)黄砂付着微生物の解析とその毒性物質の検出に関する研究（金沢大学）

(3)黄砂エアロゾルに含まれる化学物質の計測とその細胞毒性に関する研究（産業医科大学）

<研究協力機関>

(独)労働安全衛生総合研究所、東京理科大学環境安全センター、中国医科大学

## 研究概要

### 1. はじめに（研究背景等）

黄砂は古来より春の風物詩として空が黄色に霞む自然現象として認識されていた。しかし、温暖化や中国内陸部の土壌の荒廃によって砂漠化が進むにつれてその発生回数が増加すると共に大規模化し、以前では九州や西日本で多く見られた黄砂現象が近年では北日本や北海道までも見られるようになった。中国はもとより日本や韓国でも、大規模黄砂による交通機関や精密機器等の産業、牧畜、農業生産への被害が発生している他、中国由来の大気汚染物質が加わった汚れた黄砂による健康被害も報告され、現在、黄砂は東アジア一帯の国境をまたぐ環境問題となっている。

近隣諸国の疫学調査では、黄砂現象時に呼吸器系感染症、心血管疾患、心筋梗塞や脳卒中の増加、気管支喘息、アレルギー性鼻炎や結膜炎等による来院患者数の増加等が報告されている。日本へ飛来する黄砂は、濃度は低いが粒子が細かく、また、黄砂の飛来時期とスギやヒノキの花粉の飛散時期が重なること、更に、小児等の気管支喘息が増加していることから、アレルギー疾患への影響に社会的な関心が向けられている。事実、黄砂現象時に花粉症や気管支喘息の症状や病態に悪化が見られること、小児喘息における入院リスクが上昇することが学術論文に報告され、行政的な対応が迫られている。

### 2. 研究開発目的

本プロジェクト研究では、黄砂エアロゾル及び分離微生物や化学物質を用い、細胞毒性、呼吸器系、免疫・アレルギー系への影響、雄性生殖器系等への影響を評価し、黄砂エアロゾルによる種々の生体影響を生物学的・化学的・物理的側面から多角的に解析して、その発生メカニズムを解明することを目的とする。

（１）サブテーマ1

サブサブテーマ１)の呼吸器系においては①黄砂分離微生物の炎症性サイトカイン誘導能を抗原提示細胞によって調査すること、②イベントの異なる黄砂のアレルギー喘息への影響を評価すること、③黄砂に付着している微生物成分（LPS、真菌）や化学物質（タール成分）のアレルギー喘息や花粉症への影響を評価すること、④アレルギー喘息等の増悪メカニズムを、病原体分子パターン認識受容体（Toll様レセプター：TLRs）ノックアウトマウスを用いて解明することを目的とした。

サブサブテーマ２)の生殖器系では①複数のイベント時の黄砂による雄性生殖機能への影響を評価すること、②黄砂粒子本体あるいは黄砂に付着する黄砂構成成分による影響を評価することにより、影響規程因子の絞り込みを行うこと、③胎仔期黄砂曝露による雄性出生仔の生殖機能への影響を解明することを目的とした。

サブサブテーマ３)の免疫担当細胞と気管支上皮細胞の評価系では①複数のイベント時の黄砂を気道上皮細胞や免疫応答を担う免疫担当細胞に曝露し、健康影響の異同を評価すること、②黄砂に付着する熱易変性の生物学的要因や化学的要因の役割を評価すること、③黄砂関連生物成分である真菌の影響を評価することにより、影響規定要因の絞り込みと影響発現メカニズム解明を図ることを目的とした。

（2） サブテーマ2

上空のバイオエアロゾルを直接採集し、生物分析から人に影響を及ぼす微生物の検索を行うこと、直接採集サンプルを用いてアレルギーに関係のある微生物由来物質の定量および毒素遺伝子の検出を行うこと、サブテーマ1と連携し、直接採集した黄砂バイオエアロゾルをサブテーマ1に提供し、微生物の生体影響とメカニズム解明をサポートすることを研究開発目的とした。

（3） サブテーマ3

中国大陸から飛来する黄砂エアロゾルの化学的・物理的性状を究明するために、黄砂の元素成分、イオン類、多環芳香族炭化水素（PAHs）、ニトロ多環芳香族炭化水素(nitro-PAHs)等の分析、微生物成分、粒径分布や形態観察を行い、ヒトへの健康影響のリスク評価を行う有用な指標の探索をおこなう。また、黄砂エアロゾル及び抽出化学成分（タール）の免疫担当細胞に対する毒性試験によって影響評価を行うことを目的とした。

**3. 研究開発の方法**

（1）黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による呼吸器系・生殖器系・免疫系への影響とそのメカニズム解明

（1）−1）黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による呼吸器・免疫系への影響とそのメカニズム解明

① サブテーマ２の小林らが石川県珠洲市上空で採取した黄砂から分離した微生物の炎症性サイトカイン誘導能を調査するためのスクリーニング試験を、マウスマクロファージを用いて行った。② マウス気管支喘息モデルを用いて増悪作用を起こす微生物を特定するためのスクリーニング試験を行った。③ *Bjerkandera*（*Bjer*）真菌が肺のアレルギー炎症を高めたことが明らかになったことから、気管支喘息をモデルとしたアレルギー炎症に対す*Bjer*の量-反応関係を調べた。④ 発生地や輸送経路の異なる２つの風送黄砂について気管支喘息モデルマウスを用いてアレルギーへの影響を調べた。⑤ 黄砂付着微生物由来の炎症起因物質を明らかにする目的で、微生物の分子パターン認識センサーであるToll様レセプター(TLRs)の欠損マウスの骨髄由来マクロファージを用いて、培養液中に放出された炎症性サイトカイン量を比較した。⑥ 黄砂に吸着した有機化学物質（Tar）のアレルギー喘息増悪作用の量-反応関係について喘息モデルマウスを用いて調べた。⑦ *Bjer*真菌と黄砂のスギ花粉症に対する増悪作用の量-反応関係を調べた。⑧ 黄砂のアレルギー炎症増悪作用の起因物質を明らかにする目的で、Toll様レセプター(TLRs)欠損マウスを用いて、喘息モデルにてアレルギー増悪作用を比較した。⑨ 日本に飛来した黄砂がどのTLRsによって認識されるのかを、C57BL/6の野生型マウス(WT)、とTLR2欠損（KO）、TLR4KO、TLR2/4KO、TLR7/9KOとMyD88KOマウスの骨髄由来マクロファージ（BMDMs）を用いて培養液中に放出された炎症性サイトカイン量を比較した。⑩ 黄砂に付着した化石燃料燃焼由来タール成分のスギ花粉症増悪作用の量-反応関係を，マウスを用いて調べた。⑪ 黄砂に付着したLPSのアレルギー炎症増悪作用メカニズムを明らかにするために、BALB/c系の野生型（WT）とTLR2KO、TLR4KO、MyD88KOマウスを用いてアレルギー喘息モデルにて調べた。⑫ LPSが黄砂のアレルギー増悪因子であることが確証するための再現実験として、市販のLPSと滅菌黄砂を用いてマウスの喘息モデルにて調べた。

（1）−2）黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による生殖器系への影響とそのメカニズム解明

① 黄砂による雄性生殖機能への影響：2011年に発生した2つの黄砂イベント時に採取した風送黄砂(ASD1およびASD2)を用いた。雄性マウスに黄砂を気管内曝露し、造精機能解析や精子性状解析、血中ホルモン濃度測定などを行った。② 黄砂の構成成分による雄性生殖機能への影響：雄性マウスに黄砂の各種構成因子を気管内投与した。加熱処理し、付着物質を除去した黄砂粒子（加熱黄砂）、黄砂付着微生物、微生物構成成分（LPS）および黄砂付着有機化合物（Tar）を用いた。影響評価は造精機能、精子性状解析などである。③ 胎仔期黄砂曝露による雄性出生仔生殖機能への影響：妊娠マウ

スに黄砂 (ASD1)の気管内投与を行い、出生した雄性仔マウスの生殖機能を評価した。評価項目は、造精機能、精子性状解析などである。

(1)−3)免疫担当細胞と気管支上皮細胞における黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質の影響解明

① 黄砂が気道上皮細胞に及ぼす影響：2011/5/1～3に採取した無処理の黄砂（ASD1）、5/12～14に採取した無処理の黄砂(ASD2)、5/1～3に採取した黄砂を360℃、30分間加熱処理した黄砂(H-ASD1)を被検物質とした。ヒト気道上皮細胞に被検物質を24時間曝露した後、細胞活性とIL-6、IL-8の産生を解析した。② 黄砂が免疫担当細胞に及ぼす影響：10週齢の雄性NC/NgaTndCrljマウスを安楽死させた後、大腿骨および脾細胞を摘出した。大腿骨は、骨髄細胞を摘出し、GM-CSF刺激により分化誘導した骨髄由来樹状細胞（BMDC）に、黄砂を24時間曝露した後、細胞表面分子DEC205の発現を解析した。一方、脾細胞は、黄砂を72時間曝露後、細胞増殖能を解析した。③ 黄砂関連生物成分*Bjerkandera*（*Bjer*）が気道上皮細胞と免疫担当細胞に及ぼす影響：*Bjer*および360℃、30分間加熱処理した標準黄砂（H-ASD）を被検物質とした。ヒト気道上皮細胞に*Bjer*、あるいは、*Bjer*とH-ASDを24 時間曝露した後、細胞活性、IL-6、IL-8の産生を解析した。別に、分化誘導したBMDCは、*Bjer*、あるいは、*Bjer*+H-ASDを24時間曝露後、細胞表面分子DEC205の発現を解析した。脾細胞は、*Bjer*、あるいは、*Bjer*+H-ASDを72時間曝露後、細胞増殖能を解析した。

(2)黄砂付着微生物の解析とその毒性物質の検出に関する研究

上空のバイオエアロゾルサンプリングは、係留気球や航空機を用いて能登半島珠洲市上空で行った。定点観測は、2011年、2012年と2013年の3年にわたり黄砂の飛来する春季（3月、4月、5月）に金沢市において実施した。毒素遺伝子の検出は、定点観測のDNAライブラリーから種々の毒素遺伝子をプローブとしたリアルタイムPCRを用いて行った。

(3)黄砂エアロゾルに含まれる化学物質の計測とその細胞毒性に関する研究

黄砂イベント時における風送黄砂の捕集は、産業医科大学（北九州市八幡西区折尾)で3月中旬～5月の黄砂飛来時期に行った。捕集装置は分粒特性を有するHi-volume及びLow-volume air samplerを用いた。捕集用フィルターはテフロンフィルターと石英フィルターを用いた。4段階のフィルターで得られた粒子状物質は生物特性、化学的及び物理的性状の検索に用いた。黄砂は主に2011年5月1日～3日と5月12日～14日の黄砂イベント時に捕集した黄砂を分析した。前者の黄砂日の黄砂をASD1, 後者の黄砂日のものをASD2とした。黄砂粒子を含む全粉じん濃度、黄砂粒子の金属成分、付着するイオン類、また有機化学物質の多環芳香族炭化水素(PAHs)とニトロ多環芳香族炭化水素(nitro-PAHs)を測定した。PAHsは高速液体クロマトグラフ法、ニトロ多環芳香族炭nitro-PAHsはGC/MS/MS法を用いて計測した。また、粒子の形態は走査型電子顕微鏡、元素分析はICP-AESを用いて行った。

一方、捕集された黄砂の細胞毒性評価は、黄砂曝露マウスのリンパ組織の細胞群を回収し、細胞活性化能を増殖活性により測定し、また細胞死のイベントが起きる際に役割を持つNF-$\kappa$Bに着目し、その変化をウエスタンブロット法により評価した。

**4. 結果及び考察**

(1)黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による呼吸器系・生殖器系・免疫系への影響とそのメカニズム解明

(1)−1)黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による呼吸器・免疫系への影響とそのメカニズム解明

1)黄砂付着微生物の中からアレルギーを増悪する真菌(*Bjerkandera*:*Bjer*)が見出され、またこの菌種自身がアレルギー炎症を引き起こす抗原となりうることが明らかとなった。また、黄砂と抗原存在下で、*Bjer*真菌の曝露を受けると気道のリモデリング(不可逆的な気道障害)へと進行することか分かった。

2)熱処理によって付着有機物を除去した黄砂本体にもアレルギー反応を高める作用があることが明らかとなった。

3)イベントの異なる黄砂はアレルギー反応に違いがあることが分かった。アレルギー増悪作用の違いはシリカ($SiO_2$)が多い黄砂よりも、リポポリサッカライド(LPS)が多い黄砂の方が、増悪作用が強いことが分かった。

4)黄砂バイオエアロゾルの中の真菌*Bjer*にスギ花粉症を増悪する作用が見出された。更に黄砂はスギ花粉やこの真菌のアレルギー炎症を悪化することを見出した。

5)黄砂に吸着した有機化合物(タール成分)が気道のアレルギー炎症を増悪することが分かった。しかし、その曝露量が多ければアレルギー炎症に対して抑制的に働くことも明らかとなった。またタール成分には抗体産生(抗原特異的-IgE)を高める作用が有ることも分かった。

6）微生物の分子パターンを認識するToll様レセプター(TLRs)欠損（KO）マウスの骨髄由来マクロファージを用いたin vitro実験から、黄砂はTLR2よりもTLR4を介したシグナル伝達経路によって炎症性サイトカイン産生を高めることが分かり、TLR4リガンドであるLPSが炎症惹起に関与していることが分かった。

7）TLR KOマウスの*in vivo*実験では、黄砂のアレルギー増悪作用にはアダプター分子のMyD88が必修であり、TLR2とTLR4のリガンド（LPS、β-グルカン、ペプチドグリカン）が黄砂の増悪因子として見出された。

8）TLR2欠損（KO）,TLR4KO, TLR2/4KO, TLR7/9KOマウスとMyD88KOマウスの骨髄由来マクロファージを使った実験で、日本に飛来した黄砂は抗原提示細胞（マクロファージ）のTLR4やTLR2に認識されることが分かった。

9）黄砂に含まれる微量のタール成分がスギ花粉症のアレルギー性鼻炎を悪化することを見出した。

10）TLR2KOと4KOマウスによる市販のLPSを用いた喘息再現実験で、LPSはTLR4を介してTh2への誘導を起こすことを確証した。また、TLR4欠損マウスのOVA+H-ASD+LPS群でもTh2への弱い誘導（IL-5発現、IgE抗体産生、好酸球増加）が起きたが、OVA+H-ASD群でも同じレベルで弱いTh2への誘導が起きた。この誘導は、LPSが作用するというよりは、むしろ滅菌黄砂によって起こる細胞障害によるデインジャーシグナル等がTLR2等を介してTh2への誘導を起こしている可能性が示唆された。

11）市販のLPSを用いた喘息再現実験で、微量のLPSが抗原（OVA）と滅菌黄砂の存在下、Th2を活性化してアレルギー炎症（アレルギー喘息）を悪化させることを突き止め、微量のLPSがアレルギー増悪に関わっていることを確証した。

（1）−2）黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による生殖器系への影響とそのメカニズム解明

1）造精機能を検討したところ、ASD1でコントロール群と比較して、低下が認められたが、ASD2では認められず、黄砂発生源により、造精機能への影響が異なることが示唆された。また、精子性状の一項目である精子運動率や血中テストステロン濃度もASD1でのみ有意な変動が認められ、ASD2はコントロールと同程度であった。

2）加熱黄砂は造精機能を低下させ、また、黄砂付着微生物 (*Nocardiopsis*)、微生物由来成分 (LPS)および黄砂付着有機化合物 (Tar)も造精機能を低下させた。しかし、LPS、Tarによる造精機能の低下は加熱黄砂の共存下では認められず、黄砂による造精機能の低下にLPSやTarの寄与は小さいと考えられた。

3）妊娠マウスにASD1黄砂を気管内投与し、雄性出生仔への影響を評価したところ、出生仔の性比が小さくなり、出生した雄性仔マウス数が少なくなった。胎仔期に黄砂曝露を受けた雄性仔マウスは造精機能の低下や精細管障害などが観察され、生殖機能の低下を認めた。

（1）−3）免疫担当細胞と気管支上皮細胞における黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質の影響解明

1）気道上皮細胞の細胞活性を検討したところ、何れの黄砂曝露群もコントロール群と比較して、濃度依存的に細胞活性の低下が確認された。一方、同濃度の黄砂間で比較を行うと、30および90μg/mL曝露群において、ASD2は、ASD1より高い細胞活性を示した。ASD1およびASD2を曝露した気道上皮細胞の培養上清中のIL-6およびIL-8量は、曝露濃度依存的に増大した。一方、H-ASD1曝露は、明らかな変化をきたさなかった。また、90μg/mLにおいて、ASD2曝露によるこれらのサイトカイン産生誘導は、ASD1曝露に比較し、有意に低かった。ASD1と比較し、H-ASD1曝露時のサイトカイン産生は有意に低値を示した。

2）ASD1及びASD2を曝露したBMDCのDEC205陽性細胞率は、曝露濃度依存的に増大した。一方、加熱黄砂であるH-ASD1曝露時は、コントロールと比べ、発現量の明らかな変化が認められなかった。同様に、ASD1及びASD2を曝露したマウス脾細胞の細胞増殖能は増大した。一方、加熱黄砂であるH-ASD1曝露時は、コントロールと比べ、細胞増殖能の明らかな変化は認められなかった。

3）気道上皮細胞に、*Bjer*単独および*Bjer*+H-ASDを曝露したところ、何れの曝露群においても、コントロールと比較して、細胞活性、IL-6、IL-8の産生に著しい変化は確認されなかった。BMDCに、*Bjer*単独および*Bjer*+H-ASDを曝露したところ、*Bjer*単独曝露では、コントロールと比較して、濃度依存的にDEC205の増加が認められた。同様に、*Bjer*+H-ASD曝露においても、*Bjer*単独曝露と同程度のDEC205陽性細胞率の増加が確認された。一方、脾細胞では、何れの曝露においても、コントロールと比較して、脾細胞増殖能の増加は認められなかった。以上より、気道上皮細胞が被る影響作用は、黄砂イベントによって異なることが明らかとなった。また、気道上皮細胞や免疫担当細胞に関する多くの影響指標の変化は、加熱処理により有意な軽減を示したことから、影響作用は黄砂に付着した様々な熱易変性の生物学的要因や化学的要因が関与していることが示された。さらに、黄砂関連生物成分である*Bjer*は、気道上皮細胞や脾細胞ではなく、免疫応答の開始細胞である、BMDCに影響を及ぼすことも示された。

（２） 黄砂付着微生物の解析とその毒性物質の検出に関する研究

1）石川県珠洲市上空のバイオエアロゾルを係留気球や航空機を用いて直接採集し、種々の生物分析法を駆使して、菌種の高度分布から沈着する菌株と通り過ぎる菌株を明らかにした。
2）サブテーマ1と連携し、直接採集した黄砂バイオエアロゾルをサブテーマ1に提供し、生体影響とメカニズム解明をサポートした。アレルギー起因の真菌ビルカンデラ（*Bjrukandera*）の大気中濃度、原因物質であるβ-グルカン濃度測定、大気中DNA濃度および黄砂イベント前後の種組成変化を測定した。
3）黄砂イベントASD1(2011年5月2日)およびASD2(2011年5月13日)における大気DNA濃度、細菌種組成、リアルタイムPCRを用いて2つの黄砂イベントDNAライブラリーを作成し、バチルス・スタフィロコッカス遺伝子、セレウス菌毒素セレウリド合成酵素遺伝子（CRS遺伝子）、黄色ブドウ球菌毒素性ショック症候群毒素遺伝子（TSST-1）、O-157（ベロ毒素）遺伝子、および呼吸器系感染症起因菌遺伝子の検出・定量を実施した。ほとんどの毒性遺伝子は検出されなかったが、バチルス・スタフィロコッカス遺伝子に関しては多くの遺伝子が検出・定量された。
4）2011年の5月初旬の黄砂イベント時にはアレルギー喘息の増悪因子となりうるリポポリサッカライド（LPS）を菌体成分にもつグラム陰性菌やペプチドグリカンを菌体成分にもつグラム陽性菌が大気中に著しく増加することが明らかとなった。更に真菌関連慢性咳漱を起こす*Bjer*真菌も黄砂日に増加し、黄砂と挙動を共にすることを明らかにした。

（３）黄砂エアロゾルに含まれる化学物質の計測とその細胞毒性に関する研究
１）2011年5月1日～3日（ASD1）と5月12日～14日(ASD2)の黄砂を分析した。ASD2は2μm付近の細かな粒子の含有量が多い。ASD2の黄砂はASD1の黄砂に比較して大気汚染物質由来の硝酸イオン（$NO_3^-$）や硫酸イオン（$SO_4^{2-}$）量が多く、海塩由来と思われる$Na^+$や$Cl^-$イオンもかなり多く混入していた。また微生物由来のLPSやβ-グルカンの微生物由来の毒素成分量もASD2の方が多かった。その分、ASD2の方がASD1よりも黄砂粒子の主成分である二酸化ケイ素（$SiO_2$）や三酸化アルミ($Al_2O_3$)等のミネラル含有量が少なかった。また主要多環芳香族炭化水素（PAHs）含有量についてもASD1よりもASD2の方が多かった。
２）黄砂日に採取した全粉じん濃度は、黄砂日以外の全粉じん濃度に比べて明らかに高濃度を認めた。また、黄砂の粒径は0.88μm以上で、不定形であり、微粒子には認められなかった。X線回折法で黄砂特有のSi、Mg、Ca、Fe、Naが認められた。PAHsとnitro-PAHsは粒径1.1μm以下の微粒子に90%以上が含有し、黄砂粒子の含有は少ない事が認められた。
３）黄砂の免疫系における細胞毒性に関す研究では、黄砂曝露した脾臓細胞はマイトジェン（LPS等の刺激）に対する相対反応が低かった。しかし、無刺激の状態では黄砂投与による若干の細胞の増殖活性化が認められた。その現象は単回黄砂投与の脾臓細胞でも観察された。これらの結果は、黄砂投与後の体内イベントが、肺と脾臓では異なったタイミングで起こっていることを示唆している。また、それは細胞内分子で、様々な細胞内イベントに関与する転写因子NF-*κ*Bの動向と同じであった。

## 5. 本研究により得られた主な成果

### (1)科学的意義

(1)黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による呼吸器系・生殖器系・免疫系への影響とそのメカニズム解明

(1)−1)黄砂エアロゾル及び付着微生物･化学物質による呼吸器･免疫系への影響とそのメカニズム解明

イベントが異なる2つの黄砂を比較するとシリカの多い黄砂よりもPM2.5や微生物成分（LPS、β-グルカン）の多い黄砂の方がアレルギー炎症を増悪することが明らかになり、黄砂イベントによって健康影響が異なる可能性を示したことは科学的に意義が大きい。黄砂エアロゾルに含まれる真菌（*Bjerkandera*）がアレルギー炎症を誘導し、黄砂と共同してアレルギー喘息や花粉症を増悪することを突きとめた。黄砂と挙動をともにする*Bjerkandera*担子菌は真菌関連慢性咳漱との関連が示唆されていることから、今回の結果は健康問題を考える上では科学的な意義が大きい。また、黄砂に付着している化石燃料燃焼由来のタール（Tar）成分がアレルギー喘息や鼻炎を悪化する因子であることを突きとめ、微生物以外の有機化学物質もアレルギーの増悪に関わっていることを明らかにしたことは科学的意義が大きい。飛来黄砂は抗原提示細胞の病原体分子パターン認識受容体（TLRs）のTLR2とTLR4によって認識され、黄砂のアレルギー増悪作用はTLRのアダプター分子MyD88を介して起こり、TLR2とTLR4のリガンドであるLPSやβ-グルカンが増悪因子である可能性を示した。この黄砂のアレルギー増悪メカニズムを解明できたことは一連の研究の中では最も価値ある科学的な知見である。また、市販のLPSを用いた再現実験からも黄砂に含まれる微量レベルのLPSがアレルギー喘息を増悪することを確認できたことは科学的価値が高い。この一連の実験の中で、付着物を除いた黄砂粒

子本体にもアレルギー反応を高める作用があることを見出したことも価値ある科学的知見である。

（1）−2）黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による生殖器系への影響とそのメカニズム解明
イベントの異なる黄砂は雄性生殖機能への影響に相違があること、影響因子として黄砂粒子本体や、各種構成成分が関与することを明らかにした。さらに、妊娠期に黄砂に曝露されると、雄の出生率を低下させると共に雄の生殖機能を低下させることを科学的明らかにしたことは、次世代を考える上で意義が大きい知見である。

（1）−3)免疫担当細胞と気管支上皮細胞における黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質の影響解明
熱易変性の黄砂付着微生物や化学物質の含有量の相違が健康影響の相違に寄与する可能性を、呼吸器系と黄砂の最初の物理化学的接点である気道上皮細胞、樹状細胞や脾臓細胞などの免疫担当細胞を用いた実験研究によって明らかにできた。この結果は、黄砂イベントによって健康影響に相違がある可能性を示唆するもので、学術的に価値ある知見である。また、黄砂と挙動を共にする*Bjerkandera*真菌が健康影響に関与する可能性を、その作用点である細胞・分子レベルで明らかにすることができた。この真菌が黄砂日のバイオマーカー候補として上げられたことは、人の健康影響を考える上で価値ある。

（2）黄砂付着微生物の解析とその毒性物質の検出に関する研究
健康影響評価が難しかった黄砂バイオエアロゾルに関して、係留気球や航空機を用いた直接採集と多角的生物分析により、黄砂日には微生物種や微生物数が増大し、黄砂イベントによって微生物数が異なること、また、アレルギーに影響するLPSをもつグラム陰性菌やペプチドグリカンを持つグラム陽性菌、β-グルカンを持つ*Bjerkandera*真菌が大気中に著しく増加することを証明することができた。この成果は、定点観測、大気DNA濃度測定やリアルタイムPCRを用いた毒素遺伝子検出によって、これまでの大気中の微生物解析になかった健康影響評価が可能になったことを意味し、人の健康影響を考える上で学術的に価値ある。

（3）黄砂エアロゾルに含まれる化学物質の計測とその細胞毒性に関する研究
黄砂イベントごとに黄砂に吸着した有機化学物質（PAHs）濃度に違いがあり、また、これらが黄砂日に大気中に著しく増加することから、PAHsがヒトへの健康影響評価を行う有用な指標となりうることを提示した。また、黄砂が体内のリンパ組織に対し影響を及ぼすことが示唆され、特に末梢血リンパ球のNF-*κ*B活性をヒトの影響評価指標として活用できるエビデンスは学術的に価値あるものである。

**（2）環境政策への貢献**

**＜行政が既に活用した成果＞**

特に記載すべき事項はない。

**＜行政が活用することが見込まれる成果＞**

（１）黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による呼吸器系・生殖器系・免疫系への影響とそのメカニズム解明

（１）－１）黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による呼吸器・免疫系への影響とそのメカニズム解明

１）アレルギー喘息や花粉症における黄砂のアレルギー増悪要因が黄砂に付着した微生物成分（LPS、β-グルカン，ペプチドグリカン）や大気汚染物質由来の有機化学物質であること、黄砂から有機成分を取り除いた黄砂粒子本体にアレルギー反応を高める作用があることを提示した。これらのエビデンスは、黄砂現象時にアレルギー疾患が悪化するという疫学調査の結果に生物学的妥当性を付与するものであり、行政による黄砂の健康影響や健康被害を見極めるための科学的な根拠資料として役立てることができると考える。

２）黄砂付着微生物のアレルギー増悪メカニズムを解明し、提示することができた。この成果は健康被害の未然防止策・軽減策に関連する環境政策の基礎資料として貢献できると考える。

３）黄砂と挙動を共にするビルカンデラ真菌はアレルギー抗原と増悪因子なりうることを提示することができたことから、国民に黄砂の危険性を警鐘・周知することで、黄砂飛来時の自己防衛に繋げると共に、国民の安全と安心に寄与することがきる。

４）これらの研究成果を多くの科学雑誌に講評したことで、健康影響に関する国際的共通理解を形成することができたと考える。今後も多くの成果を公表し黄砂の危険性を警鐘して、国際的な黄砂発

生の低減策の取組みに繋げたい。また、本研究の成果は国内や国際的な黄砂問題を解決するための環境政策上の基礎資料として役立てることができると考える。

（１）−２）黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による生殖器系への影響とそのメカニズム解明
１）これまで黄砂の健康影響として、呼吸器系、循環器系や免疫系への影響を中心に評価が進んできたが、それ以外に、雄性生殖系に影響を与えることを明らかにした。
２）胎仔期に黄砂曝露を受けると雄性出生仔の生殖機能が低下することを明らかにした。
３）これらの実験研究の知見をもとに、ヒトにおける健康影響評価を行い、次世代影響を含めた健康被害予防対策や関連する政策の立案等に役立てたい。

（１）−３）免疫担当細胞と気管支上皮細胞における黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質の影響
１）細胞・分子レベルにおける研究成果から、イベントの異なる黄砂や成分の相違が、健康影響の相違や変動に寄与する可能性を提示した。この成果は、分子･細胞レベルから疫学調査結果に生物学的妥当性を付与するものである。
２）この研究において*Bjerkandera*真菌がヒトの健康影響要因であることを明らかにしたが、今後も免疫担当細胞や気管支上皮細胞を用いて影響要因を絞り込み、明らかにできれば、黄砂に付着した成分の健康影響要因を決定することができ、今後の予防対策の確立等にも役立てることができる。さらに、国内や国際的な黄砂問題を解決するための政策上の基礎資料としても役立つと考える。

（２）黄砂付着微生物の解析とその毒性物質の検出に関する研究
１）黄砂日には微生物種や微生物数が大気中に増大し、黄砂イベントごとにこれらが異なること、また、アレルギー増悪に関わるLPSを菌体成分にもつグラム陰性菌やペプチドグリカンを持つグラム陽性菌、慢性咳漱に関わる*Bjerkandera*真菌が大気中に著しく増加することを見出した。これらの微生物が黄砂と挙動を共にすることはアレルギー疾患にとっては不利益な問題であり、黄砂付着菌や黄砂の発生を抑えるなどの健康被害予防対策が必要である。
２）今後、中国大陸から運ばれて来る種々多様な微生物や人畜の健康に影響をおよぼす微生物を解析・毒素遺伝子を検出することが出来れば、黄砂付着微生物による健康被害を予測・防止することができ、行政ニーズに答えることができると考えられる。我々は黄砂に付着した微生物の侵入を防ぐための黄砂付着微生物用マスクを開発した。

（３）黄砂エアロゾルに含まれる化学物質の計測とその細胞毒性に関する研究
１）黄砂イベントによって黄砂の物理学的、化学的、生物学的な性状に違いがあること、特にアレルギー増悪や発がん性がある多環芳香族炭化水素類のPAHsやnitro-PAHsが吸着していること、これらが黄砂日に大気中に著しく増加することから、黄砂日には行政による注意喚起や個人レベルでの予防対策が必要と考えられる。
２）免疫毒性の面からは、末梢血リンパ球のNF-*k*Bなどの分子レベルの指標を測定することで黄砂曝露のリスク評価ができる可能性が考えられ、このパラメーター値が環境行政や政策に活用できるかも知れない。

全体としては、
1. 黄砂の健康影響の科学的知見を行政や国民に提示することができた。
2. 本成果は疫学調査結果に対する生物学的な妥当性を証明するものであり、行政による健康影響の見極めの基礎資料となるものである。
3. 黄砂の増悪因子や増悪メカニズムの一部が解明できたことは、健康被害の未然防止策・軽減策に関連する環境政策、SPM濃度上昇時の注意喚起や行動指針などの基礎資料として貢献できると考える。
4. 国際的な黄砂問題を解決するための日中韓三カ国環境大臣会合や三カ国黄砂局長会合等の基礎資料として役立てることができると考えられる。

**６．研究成果の主な発表状況**

**(1)主な誌上発表**

＜査読付き論文＞

1)　T. MAKI, A. ISHIKAWA, F. KOBAYASHI, M. KAKIKAWA, K. AOKI, T. MATSUNAGA, H. HASEGAWA,

Y. IWASAKA: Effects of Asian dust (KOSA) deposition event on bacterial and microalgal communities. in the Pacific ocean. Asian Journal of Atmospheric Environment, 2011, 5, 157-163.

2) F. KOBAYASHI, S. MOROSAWA, T. MAKI, M. KAKIKAWA, M. YAMADA, Y. TOBO, C-S. HON, S. MATSUKI, Y. IWASAKA: “Atmospheric bioaerosol, Bacillus sp., at an altitude of 3,500 m over the Noto Peninsula: Direct sampling via aircraft” Asian Journal of Atmospheric Environment, 2011, 5, 164-171.
3) B. CHEN, F. KOBAYASHI, M. YAMADA, Y-H. KIM, Y. IWASAKA, AND G-Y. SHI: Identification of cultureable bioaerosols collected over dryland in Northwest China: Observation using a tethered balloon. Asian Journal of Atmospheric Environment, 2011, 5, 172-180.
4) 牧輝弥、青木一真、小林史尚、柿川真紀子、松木篤、木野恵太、長谷川浩、岩坂泰信:立山積雪層に保存される黄砂バイオエアロゾルの集積培養と系統分類学的解析.エアロゾル研究、24, 332-340.
5) M. HE, T. ICHINOSE, S. YOSHIDA, H. TAKANO, M. NISHIKAWA, I. MORI, G. SUN, T. SHIBAMOTO: Aggravating effects of Asian sand dust on lung eosinophilia in mice immunized beforehand by ovalbumin. Inhal Toxicol, 2012. 24(11):751-761.
6) S. YOSHIDA, H. TAKANO, M. NISHIKAWA, H. MIAO, T. ICHINOSE: Effects of fetal exposure to urban particulate matter on the immune system of male mouse offspring. Biol Pharm Bull. 2012;35(8):1238-43.
7) M. HE, T. ICHINOSE, S. YOSHIDA, S. YAMAMOTO, K. INOUE, H. TAKANO, R. YANAGISAWA, M. NISHIKAWA, I.MORI, G. SUN, T. SHIBAMOTO: Asian sand dust enhances murine lung inflammation caused by *Klebsiella pneumoniae*. Toxicol Appl Pharmacol, 2012. 15, 258(2), 237-247.
8) 吉田成一、西川雅高、押尾茂、賀淼、市瀬孝道:日本で採取した風送黄砂がマウス造精機能および精子運動能に与える影響, 大気環境学会誌, 2013.48 (4),175-180.
9) M. HE, T. ICHINOSE, S. YOSHIDA, H. TAKANO, M. NISHIKAWA, G. SUN, T. SHIBAMOTO: Induction of immune tolerance and reduction of aggravated lung eosinophilia by co-exposure to Asian sand dust and ovalbumin for 14 weeks in mice. Allergy Asthma Clin Immunol. 2013. 9:19 (3 June 2013).
10) M. HE, T. ICHINOSE, Y. SONG, Y. YOSHIDA, K. ARASHIDANI, S. YOSHIDA, B. LIU, M. NISHIKAWA, H. TAKANO, G. SUN: Effects of two Asian sand dusts transported from the dust source regions of Inner Mongolia and northeast China on murine lung eosinophilia. Toxicol Appl Pharmacol. 2013. Nov 1;272(3):647-655.
11) Y. SONG, T. ICHINOSE, K. MORITA, T. NAKANISHI, T. KANAZAWA, Y. YOSHIDA: Asian sand dust causes subacute peripheral immune modification with NF-κB activation. Environ Toxicol. 2013. Dec 5. doi: 10.1002/tox.21931. [Epub ahead of print]
12) T. MAKI, F. KOBAYASHI, M. YAMADA, H. HASEGAWA, Y. IWASAKA: NaCl-amendment assay targeting airborne bacteria in tropospheric bioaerosols transported by westerly wind over Noto Peninsula ansported by westerly wind over Noto Peninsula. Aerobiologia, 2013, 9, 341-354.
13) T. MAKI, M. KAKIKAWA, F. KOBAYASHI, M. YAMADA, A. MATSUKI, H. HASEGAWA, Y. IWASAKA: Assessment of composition and origin of airborne bacteria in the free troposphere over Japan. Atmospheric Environment, 2013, 74, 73-82.
14) 牧輝弥、福島理英、小林史尚、山田丸、長谷川浩、岩坂泰信:大気中を風送される細菌叢の16S rDNA-クローンライブラリー解析.分析化学, 2013, 62, 12, 1095-1104.
15) 牧輝弥、原和崇、山田丸、小林史尚、長谷川浩、岩坂泰信:バイオエアロゾルの蛍光顕微鏡観察」:エアロゾル研究,2013,28, 3, 201-207.
16) T. HIGASHI, Y. KAMBAYASHI, N. OHKURA, M. FUJIMURA, S. NAKANISHI, T. YOSHIZAKI, K. SAIJOH, K. HAYAKAWA, F. KOBAYASHI, Y. MICHIGAMI, Y. HITOMI, H. NAKAMURA: Exacerbation of daily cough and allergic symptoms in adult patients with chronic cough by Asian Dust: A hospital-based study in Kanazawa. Atmos. Environ. 2014, (in press)
17) A. HONDA, Y. MATSUDA, R. MURAYAMA, K. TSUJI, M. NISHIKAWA, E. KOIKE, S. YOSHIDA, T. ICHINOSE, H. TAKANO: Effects of Asian sand dust particles on the respiratory and immune system. J Appl Toxicol, 2014. Mar 34(3):250-257.
18) B. LIU, T. ICHINOSE, M. HE, K. KOBAYASHI, T. MAKI, S. YOSHIDA, K. ARASHIDANI, S. YOSHIDA, M. NISHIKAWA, H. TAKANO, G. SUN. T. SHIBAMOTO: Lung inflammation by fungus,

*Bjerkandera adusta* isolated from Asian sand dust (ASD) aerosol and enhancement of ovalbumin -induced lung eosinophilia by ASD and the fungus in mice. Allergy, Asthma & Clinical Immunology, 2014. Feb 5;10(1):10.doi:10. 1186/1710-1492-10-10.

19) Y. REN, T. ICHINOSE, M. HE, Y. SONG, Y. YOSHIDA, S. YOUSHIDA, M. NISHIKAWA, H. TAKANO, G. SUN, T. SHIBAMOTO: Enhancement of OVA-induced murine lung eosinophilia by co-exposure to contamination levels of LPS in Asian sand dust and heated dust. Allergy, Asthma & Clinical Immunology 2014, (accepted at May 4) in press.

**（2）主な口頭発表（学会等）**

1) M. HE, T. ICHINOSE, S. YOSHIDA,M. NISHIKAWA: 第 52 回大気環境学会年会（2011）.「Effect of Asian sand dust on expression of cytokine and chemokine induced by *Klebsiella pneumoniae* in mouse macrophage」
2) T. MAKI, F. KOBAYASHI, M. KAKIKAWA, M. ATSUSHI, Y. IWASAKA: 2011 International Union of Geodesy and Geophysics General Assembly (IUGG), Melbourne, Australia (2011)「Phylogenetic analysis of long-range transported bacteria isolated from Asian dust (KOSA) bioaerosols」
3) 吉田成一、押尾茂、西川雅孝、賀淼、森育子、市瀬孝道：第 52 回大気環境学会年会（2011）「風送黄砂によるマウス精子性状への影響」
4) 市瀬孝道、高野裕久、井上健一郎、柳沢利枝：第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会（2011）.「黄砂の肺炎桿菌誘発性肺炎に対する増悪作用」
5) T. ICHINOSE, M. HE: The 42 nd Annual meeting of Japanese Society of Ocupational and Environmental Allergy. Environmental Air Contaminations Influencing on Airway Allergy - Especially Asian Sand Dust – (2011).「Asian dusts and allergy」
6) B. LIU, S. YOSHIDA, M. HE, T. ICHINOSE: フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー（2011）「Effect of microorganisms attached onto yellow dust on inflammatory cytokines and TLRs expression in mouse macrophages」
7) 吉田成一、賀淼、嵐谷奎一、市瀬孝道：第53回大気環境学会年会（2012）「発生地の異なる黄砂による雄性生殖機能低下に関する比較研究」
8) M. HE, T. ICHINOSE, S. YOSHIDA, M. NISHIKAWA, H. TAKANO: 第53回大気環境学会年会（2012）.「Effects of long-term exposure to Asian sand dust and ovalbumin on murine lung eosinophilia」
9) M. HE, T. ICHINOSE, S. YOSHIDA, H. TAKANO, M. NISHIKAWA, G. Sun: American College of Toxicology 33rd Annunal Meeting, Orlando, American (2012).「Effect of Asian sand dust on lung allergic inflammation in mice immunized beforehand by ovalbumin」
10) 吉田成一、賀淼、小林史尚、市瀬孝道：フォーラム 2012：衛生薬学・環境トキシコロジー（2012）「黄砂付着微生物による雄性生殖機能への影響」
11) 賀淼、劉博瑩、吉田成一、尾立翠、市瀬孝道：第 132 回薬学会（2012）「成分組成の異なる黄砂の気管支喘息増悪作用の比較」
12) 松田悠吾、本田晶子、村山留美子、辻堅志、西川雅高、小池英子、吉田成一、市瀬孝道、高野裕久：第19回日本免疫毒性学会 (2012)「黄砂がヒト気道上皮細胞に及ぼす影響」
13) 嵐谷奎一、山根裕一、原愁花里、秋山幸雄、楢崎幸範、市瀬孝道：第53回大気環境学会(2012)「最近の北九州地域の多環芳香族炭化水素濃度の特徴」
14) Y. SONG, T. ICHINOSE, T. KANAZAWA, Y. YOSHIDA: 15th International congress of Immunology. Milan, Italy, Aug（2013）「Intratracheally administration of Asian sand dust activates NF-κB in immune cells.
15) Y. SONG, T. ICHINOSE, K. MORITA, T. NAKANISHI, T. KANAZAWA, .Y YOSHIDA: 第 36 回日本免疫学会（2013）「TLR4 is involved in Asian sand dust-induced peripheral inflammation」
16) 吉田成一、嵐谷奎一、賀淼、市瀬孝道：フォーラム2013：衛生薬学環境トキシコロジー（2013）：黄砂に付着した有機化合物による雄性生殖機能への影響
17) 吉田成一、嵐谷奎一、賀 淼、市瀬孝道：第54回大気環境学会年会（2013）「胎仔期黄砂曝露による雄性胎仔および出生仔生殖機能への影響」
18) 市瀬孝道、賀 淼、高野裕久：第63回日本アレルギー学会秋季学術大会（2013）.「Toll様レセプターKO喘息モデルマウスを用いた黄砂のアレルギー増悪作用の検討」
19) 牧輝弥、小林史尚、柿川真紀子、岩坂泰信：第29回日本微生物生態学会 (2013)「自由対流圏を風送されるバイオエアロゾルの細菌種組成解析」

20) T. MAKI, F. KOBAYASHI, B. CHEN, F. PUSPITASARI, M. KAKIKAWA, A. MATSUKI, G. SHI, H. HASEGAWA, Y. IWASAKA: 7th International Workshop on Sand/Duststorms and Associated Dustfall (2013)「Diversity and structure dynamics of airborne bacteria (bioaerosols) in Dunhuang City during a dust event」
21) 山田丸、中村香耶、亀田貴之、小林史尚、松木篤、築城寿長、檜垣誠吾、早川和一、岩坂泰信:第30回エアロゾル科学・技術研究討論会 (2013)「黄砂用マスクの開発と評価」
22) M. HE, T. ICHINOSE, S. YOSHIDA, H. TAKANO, M. NISHIKAWA, G. SUN, T. SHIBAMOTO: Respirology. 18. Suppl 4, (2013).「Role of atmospheric samples collected from Asian sand dust storm in allergic airway inflammation and immune tolerance」

**7. 研究者略歴**

課題代表者:市瀬　孝道
麻布獣医科大学獣医学部卒業、獣医学博士、現在、大分県立看護科学大学看護学部教授

研究分担者:
（１）−１） 市瀬　孝道　　（同上）
（１）−２） 吉田　成一
東京理科大学薬学部卒業、博士（薬学)、現在、大分県立看護科学大学准教授
（１）−３） 高野　裕久
京都府立医科大学医学部卒業、博士（医学)、現在、京都大学教授
（２） 小林　史尚
金沢大学工学部卒業、博士（工学)、現在、金沢大学准教授
（３） 吉田　安宏
広島大学大学院医学研究科修了、博士（医学)、現在、産業医科大学准教授

# 5C-1155　黄砂エアロゾル及び付着微生物･化学物質の生体影響とそのメカニズム解明に関する研究

## （１）黄砂エアロゾル及び付着微生物･化学物質による呼吸器系･生殖器系･免疫系への影響とそのメカニズム解明

大分県立看護科学大学　看護学部　市瀬孝道・吉田成一・定金香里
京都大学　工学研究科　都市環境工学専攻　高野裕久
（独）国立環境研究所　環境健康研究センター　小池英子

＜研究協力者＞
中国医科大学　公共衛生学院　賀　ミョウ
京都大学　工学研究科　都市環境工学専攻　本田　晶子
東京理科大学　環境安全センター　西川　雅高

平成23～25年度累計予算額：83,994千円
（うち、平成25年度予算額：24,936千円）
予算額は、間接経費を含む。

［要旨］

呼吸器系への影響としては、イベントが異なる2つの黄砂を比較するとシリカの多い黄砂よりもPM2.5や微生物成分（LPS、β-グルカン）の多い黄砂の方がアレルギー炎症を増悪することを明らかにした。黄砂エアロゾルに含まれる真菌（*Bjerkandera*）がアレルギー炎症を誘導し、黄砂と共同してアレルギー喘息や花粉症を増悪することを突きとめた。黄砂に付着している化石燃料燃焼由来のタール（Tar）成分がアレルギー喘息や鼻炎を悪化する因子であることを突きとめた。飛来黄砂は抗原提示細胞の病原体分子パターン認識受容体（TLRs）のTLR2とTLR4によって認識され、アレルギー増悪作用はTLRのアダプター分子MyD88を介して起こる。またTLR2とTLR4のリガンドであるLPSやβ-グルカンが増悪因子である可能性を示した。市販のLPSを用いた再現実験から、黄砂に含まれるレベルの微量のLPSがアレルギー喘息を増悪することを確認した。また付着物を除いた黄砂本体にもアレルギー反応を高める作用があることを見出した。

生殖器系への影響としては、黄砂は雄マウスの造精機能を低下させ、精巣組織障害や精子性状を変化させる等の雄性生殖機能に影響を及ぼしていることを明らかにした。これらの影響は黄砂粒子本体のほか黄砂に付着した微生物成分や有機化合物が関与していることを突きとめた。また、妊娠マウスに黄砂曝露すると雄性出生仔数が低下し、雄性造精機能も低下することを突きとめた。

免疫系への影響としては、黄砂イベントにより、気道上皮細胞、抗原提示細胞、脾細胞等の免疫担当細胞が被る催炎症性作用や免疫応答活性化作用などの影響が異なること、その影響には黄砂に付着した熱易変性物質が関与している可能性が示された。さらに、黄砂エアロゾルに含まれる*Bjerkandera*は免疫応答開始細胞の抗原提示細胞に影響を及ぼすが、気道上皮細胞や脾細胞には影響しないことが示された。*Bjerkandera*を含む熱易変性成分が、気管支喘息などの呼吸器・免疫疾患の増加や悪化に関与する可能性を示唆した。

［キーワード］
黄砂、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、雄性生殖器、免疫担当細胞、気管支上皮細胞

## １．はじめに

黄砂は古来より春の風物詩として空が黄色に霞む自然現象として認識されていた。しかし、温暖化や中国内陸部の土壌の荒廃によって砂漠化が進むにつれてその発生回数が増加すると共に大規模化し、以前では九州や西日本で多く見られた黄砂現象が近年では北日本や北海道までも見られるようになった。中国はもとより日本や韓国でも、大規模黄砂による交通機関や精密機器等の産業、牧畜、農業生産への被害が発生している他、中国由来の大気汚染物質が加わった汚れた黄砂による健康被害も報告され、現在、黄砂は東アジア一帯の国境をまたぐ環境問題となっている。

近隣諸国の疫学調査では、黄砂現象時に呼吸器系感染症、心血管疾患、心筋梗塞や脳卒中の増加、気管支喘息、アレルギー性鼻炎や結膜炎等による来院患者数の増加等が報告されている[1)~6)]。日本へ飛来する黄砂は、濃度は低いが粒子が細かく、また、黄砂の飛来時期とスギやヒノキの花粉の飛散時期が重なること、更に、小児等の気管支喘息が増加していることから、アレルギー疾患への影響に社会的な関心が向けられている。事実、黄砂現象時に花粉症[7)]や気管支喘息[8)]の症状や病態に悪化が見られること、小児喘息における入院リスクが上昇することが学術論文に報告[9)]され、行政的な対応が迫られている。

そこで、本プロジェクト研究のサブテーマ（１）では、黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による呼吸器系・生殖器系・免疫系への影響とそのメカニズムを解明することを目的とし、アレルギー喘息やスギ花粉症モデルマウスを用いて黄砂本体、黄砂付着微生物成分や有機化学物質（タール成分）のアレルギーへの影響とその発生メカニズムを調べた。またこれらの雄性生殖器への影響、更に免疫担当細胞（樹状細胞・リンパ球）や気管支上皮細胞へのこれらの影響を調べた。

本研究成果が黄砂問題を解決するための基礎資料となり、黄砂の健康被害の未然防止や軽減策に関連する環境政策に役に立てることを期待する。

## ２．研究開発目的

（１）黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による呼吸器・免疫系への影響とそのメカニズム解明

本研究では、①黄砂分離微生物の炎症性サイトカイン誘導能を抗原提示細胞によって調査すること、②イベントの異なる黄砂のアレルギー喘息への影響を評価すること、③黄砂に付着している微生物成分（LPS、真菌）や化学物質（タール成分）のアレルギー喘息や花粉症への影響を評価すること、④アレルギー喘息等の増悪メカニズムを、病原体分子パターン認識受容体（Toll様レセプター：TLRs）ノックアウトマウスを用いて解明することを目的とした。

（２）黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による生殖器系への影響とそのメカニズム解明

本研究では、①複数のイベント時の黄砂による雄性生殖機能への影響を評価すること、②黄砂粒子本体あるいは黄砂に付着する黄砂構成成分による影響を評価することにより、影響規程因子

の絞り込みを行うこと、③胎仔期黄砂曝露による雄性出生仔の生殖機能への影響を解明することを目的とした。

（３）免疫担当細胞と気管支上皮細胞における黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質の影響解明

本研究では、①複数のイベント時の黄砂を、呼吸器系と黄砂の最初の物理化学的接点である気道上皮細胞や免疫応答を担う免疫担当細胞に曝露し、健康影響の異同を評価すること、②黄砂に付着する熱易変性の生物学的要因や化学的要因の役割を評価すること、③黄砂関連生物成分である真菌の影響を評価することにより、影響規定要因の絞り込みと影響発現メカニズム解明を図ることを目的とした。

## ３．研究開発方法

（１）黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による呼吸器・免疫系への影響とそのメカニズム解明

１）黄砂分離微生物の炎症性サイトカイン誘導能を調査するためのスクリーニング試験

培養細胞はマウスマクロファージ様株細胞(RAW264.7)を用いた。使用微生物は小林らが石川県珠洲市上空で採取した黄砂に付着していた7種類の微生物（*Nocardiopsis*の4種、*Bacillus*、*Streptmyces*、*Bjerkandera*）を用いた。培地から分離したこれらの微生物を1%ホルマリンにて1時間不活化した。その後、LPSフリーの蒸留水を加えてソニケーターにて粉砕後、12,000回転にて遠心し、この過程を3回繰り返して蒸留にて水洗浄した菌体成分を得た。先ずRAW264.7細胞（$4 \times 10^5$ cell）を24時間培養後、前述した黄砂付着微生物7種の菌体を30μg/ml培養液濃度になるように添加し、24時間後のRAW264.7細胞におけるIL-1、MIP-1α、MCP-1、TNF-αのmRNA発現と培養液中のこれらのタンパク発現を測定した。

２）マウス気管支喘息モデルを用いたアレルギー増悪作用を起こす微生物のスクリーニング試験

本実験には１）で用いた7種の微生物を用いた。本実験では、サブテーマ（３）で採取した風送黄砂を付着有機化合物や微生物などを除去するために360℃、30分間処理した加熱黄砂（H-ASD）を用いた。動物は6週齢のICR系雄マウスを用いた。実験群はOVA (卵白アルブミン)群、OVA+ASD群、OVA + ASD + No.1～4 (*Nocardiopsis*の4種)群、OVA+ASD+No.5 (*Bacillus*)群、OVA + ASD + No.6 (*Streptmyces*)群、OVA + ASD+No.7 (*Bjerkandera*)群の計9群とし、使用したマウスの数は1群1匹～5匹とした。OVAの1回当たりの投与量は1μg/body、ASDは0.1mg/bodyとした。各不活化微生物の1回投与量は一匹当たり5μgとした。これらを生理食塩水に懸濁し、1週間間隔で計4回、気管内投与した。全てのマウスは最終投与翌日に心採血にて屠殺した。各群のマウスから気管支・肺胞洗浄液(BALF)を採取し、炎症細胞数と炎症性サイトカイン・ケモカインを測定した。各群のマウスから肺の病理標本を作製し、気道上皮の粘液産生細胞や好酸球等の炎症細胞を観察した。

３）*Bjerkandera* 真菌のアレルギー喘息増悪作用に対する量-反応関係の関する研究

(1)-2の実験によってアレルギー増悪作用を起こす微生物が*Bjerkandera* (*B. ad*)であることが特

定された。*B. ad* の低濃度実験では0.2μgと0.8μg投与量とし、加熱風送黄砂（H-ASD）は0.1 mg、アレルギー喘息を誘導するための卵白アルブミン(OVA)は1μgとし、これらの組み合わせによって肺への影響とアレルギー喘息への影響を調べた。各グループは対照群 (Control)、*B. ad* 0.2μg群、*B. ad* 0.8μg群、H-ASD群、H-ASD ＋ *B. ad* 0.2μg群、H-ASD ＋ *B. ad* 0.8μg群の6群、卵白アルブミン (OVA)群、OVA + *B. ad* 0.2μg群、OVA + *B. ad* 0.8μg群、OVA + H-ASD群、OVA + H-ASD＋ *B. ad* 0.2μg群、OVA + H-ASD ＋ *B. ad* 0.8μg群の合計12群とした。

*B. ad* の高濃度実験では2μgと8μg投与量とし、各グループは対照群 (Control)、*B. ad* 2μg群、*B. ad* 8μg群、H-ASD群、H-ASD ＋ *B. ad* 2μg群、H-ASD ＋ *B. ad* 8μg群の6群、卵白アルブミン (OVA)群、OVA + *B. ad* 2μg群、OVA + *B. ad* 8μg群、OVA + H-ASD群、OVA+H-ASD ＋ *B. ad* 2μg群、OVA + H-ASD ＋ *B. ad* 8μg群の合計12群とした。これらを2週間に1回、4回投与して、最終投与の翌日にマウスを屠殺して肺への影響とアレルギー喘息への影響を調べた。炎症の指標としては肺洗浄液中の炎症細胞や炎症性サイトカイン・ケモカイン類を調べた。

４）発生地の異なる２種類の黄砂の気管支喘息モデルマウスへの影響

黄砂は北九州折尾にて採取した2種類の風送黄砂を用いた。動物は6週齢のICR系雄マウスを用い、実験群は1群16匹として対照群、黄砂1（ASD1：2011年5月1～3日採取）群、黄砂2（ASD2：2011年5月12～14日採取）群、OVA群、OVA ＋ ASD1群、OVA ＋ ASD2群の計6群とした。気管支喘息病態の誘発のためのOVAはマウス1匹あたり1μgとし、黄砂の投与量は0.1mgとして生理食塩水に混濁した。これらの溶液を2週間おきに計4回気管内投与し、最終投与翌日にマウスを屠殺した。8匹のマウスから気管支・肺胞洗浄液（BALF）を採取して、各炎症細胞数とマクロファージ数を測定し、また、BALF中の炎症性サイトカインやケモカインを測定した。残りの8匹のマウスから肺病理標本を作製し、気道上皮の粘液細胞化や気管支粘膜下における好酸球等の炎症細胞を観察した。

５）Toll様レセプターノックアウト（TLRs KO）マウスの骨髄由来マクロファージを用いた黄砂の炎症増悪因子のスクリーニング試験

培養細胞は野生型（WT）BALB/c雄マウス、TLR2 KO、TLR4 KOとMyD88KOマウスの4種類の骨髄由来マクロファージ（BMDM）細胞を用いた。黄砂は2011年5月1～3日にサブテーマ（３）グループによって北九州市折尾で採取した風送黄砂を用いた。培養液にGM-CSF（10 ng/ml）を添加してBMDM細胞を7日間培養後、1 wellあたり$3\times10^5$ cellになるように細胞を蒔き、前述した黄砂を20μg/ml培養液濃度になるように添加し、24時間後の培養液中のIL-1β、IL-12、MCP-1、IL-6、TNF-αとMIP-1αのタンパク発現量を測定した。

６）黄砂から抽出した有機化合物質（Tar）のアレルギー喘息増悪作用に関する研究

本実験には2010年11月13～15日の大規模黄砂に採取した黄砂から有機溶媒で抽出した有機化合物（タール成分：Tar）を用いた。動物は6週齢のICR系雄マウスを用いた。実験群は対照群、Tar 0.2μg、Tar 1.0μg、Tar 5μg、加熱黄砂（H-ASD）、H-ASD+Tar 0.2、H-ASD+Tar 1.0、H-ASD+Tar 5μg、OVA (卵白アルブミン)群、OVA+Tar 0.2μg、OVA+Tar 1.0μg、 OVA+Tar 5μg、OVA+H-ASD、OVA+H-ASD+Tar 0.2μg、OVA+H-ASD+Tar 1.0μg、OVA+H-ASD+Tar 5μg群の計16群とし、マウスの数は1群14匹とした。OVA の1回当たりの投与量は1 μg/body、加熱処理H-ASDは0.1 mg/bodyと

した。タール成分の1回投与量は一匹当たり0.2、1.0、5μgとした。これらを0.01%Tweenを含む生理食塩水に懸濁し、1週間間隔で計4回、気管内投与した。全てのマウスは最終投与翌日に心採血にて屠殺した。各群のマウスから気管支・肺胞洗浄液 (BALF)を採取し、炎症細胞数と炎症性サイトカイン・ケモカインを測定した。各群のマウスから肺の病理標本を作製し、気道上皮の粘液産生細胞や好酸球等の炎症細胞を観察した。

7）黄砂から分離した真菌成分のスギ花粉症増悪作用に対する量-反応関係に関する研究

本研究では黄砂から分離したベルカンデラ真菌（*B. ad*）を用いてスギ花粉症への影響を調べた。各グループは対照群 (Control)、*B. ad* 0.2 μg群、*B. ad* 2 μg群、H-ASD群、スギ花粉抗原（Cryj1）群、Cryj1+*B. ad* 0.2μg群、Cryj1+*B. ad* 2μg群、Cryj1+H-ASD群、Cryj1+H-ASD＋*B. ad* 0.2μg群、Cryj1+H-ASD＋*B. ad* 2 μg群の合計10群とした。*B. ad*の1回点鼻投与量は0.2 μgと2 μg投与量、H-ASDは10μg投（与量、Cryj1は4 μg投与量とした。これらを2週間に1回、3回点鼻投与して、その2週間後から2日おきに4回、Cryj1のみを投与し、5回目に再びCryj1+黄砂+*B. ad*を点鼻投与した。Cryj1、黄砂、あるいは*B. ad*を投与しない群はこれらの代わりに生理食塩水を点鼻投与した。最終投与の5時間後にマウスを屠殺してスギ花粉症への影響を調べた。炎症の指標としては肺洗浄液中の炎症細胞や炎症性サイトカイン・ケモカイン類と鼻の病理形態学的変化を調べた。

8）Toll様レセプターノックアウト（TLRs KO）マウスを用いた黄砂のアレルギー喘息増悪作用に関する研究

動物は6週齢のBALB/c系マウスの野生型(WT)、TLR2KO、TLR4KO、MyD88KOの4種の雄マウスを用いた。黄砂はサブテーマ（3）によって2011年5月1～3日に採取した風送黄砂を用いた。1種類のマウス実験群は1群6匹として対照群、黄砂（ASD）群、OVA群、OVA＋ASDの計4群の24匹とし、4種のマウスの合計16群（96匹）とした。OVAはマウス1匹あたり1μgとし、黄砂投与量は0.1mgとして生理食塩水に懸濁した。これらの溶液を2週間おきに計4回気管内投与し、最終投与翌日にマウスを屠殺した。6匹のマウスから気管支・肺胞洗浄液 (BALF)を採取して、各炎症細胞数とマクロファージ数を測定し、また、BALF中の炎症性サイトカインやケモカインを測定した。肺胞洗浄後のマウスから肺病理標本を作製し、気道上皮の粘液細胞化や気管支粘膜下における好酸球等の炎症細胞を観察した。

9）日本に飛来した黄砂のToll様レセプターノックアウト（TLRs KO）マウスの骨髄由来マクロファージを用いた炎症増悪因子のスクリーニング試験

培養細胞は野生型（WT）C57BL/6雄マウス、TLR2KO、TLR4KO、TLR2/4KO、TLR7/9KOとMyD88KOマウスの6種類の骨髄由来マクロファージ（BMDM）細胞を用いた。黄砂は2011年5月1～3日にサブテーマ（3）のグループによって北九州市折尾で採取した風送黄砂を用いた。培養液にGM-CSF（10 ng/ml）を添加してBMDM細胞を7日間培養後、1 wellあたり$3\times10^5$ cellになるように細胞を蒔き、前述した黄砂を20μg/ml培養液濃度になるように添加し、12時間後の培養液中のIL-6、IL-12、TNF-α、MCP-1とMIP-1αのタンパク発現量を測定した。

１０）スギ花粉症モデルを用いた有機化合物質（Tar）のアレルギー増悪作用に関する研究

本実験には2010年11月13～15日の大規模黄砂に採取した黄砂から有機溶媒で抽出した有機化

合物（タール成分：Tar）を用いた。動物は6週齢のBALB/c系雌マウスを用いた。実験群は①対照（Control）群、②Tar 0.1μg群、③Tar 1.0μg群、④Cryj1（スギ花粉抗原）群、⑤Cryj1 + Tar0.1μg群、⑥Cryj1 + Tar1.0μg群、⑦Cryj1 + H-ASD（加熱処理黄砂）群、⑧Cryj1 + H-ASD + Tar0.1μg群、⑨Cryj1 + H-ASD + Tar1.0μg群の計9群とし、マウスの数は1群14匹とした。Cryj1の1回当たりの投与量は4μg/body、H-ASDは10μg/bodyとした。タール成分の1回投与量は一匹当たり0.1、1.0μgとした。これらを0.01%Tween 80を含む生理食塩水に懸濁した。これらを2週間に1回、3回点鼻投与して、その2週間後から2日おきに4回のCryj1のみを投与し、5回目に再びCryj1 + H-ASD + Tarを点鼻投与した。Cryj1、黄砂、あるいはTarを投与しない群はこれらの変わりに生理食塩水を点鼻投与した。最終投与の5時間後にマウスを屠殺してスギ花粉症への影響を調べた。炎症の指標としては鼻洗浄液中の炎症細胞や炎症性サイトカイン・ケモカイン類と鼻の病理形態学的変化を調べた。

１１）Toll様レセプターノックアウト（TLRs KO）マウスを用いた黄砂と細菌毒素成分LPSのアレルギー喘息増悪作用に関する研究

動物は6週齢のBALB/c系マウスの野生型 (WT)、TLR2欠損 (KO)、TLR4KO、MyD88KOの4種類の雄マウスを用いた。黄砂は中国ゴビ砂漠の砂から4μm前後の粒径に精製した黄砂粒子を用いた。1種類のマウス実験群は1群4〜5匹として①対照（Control）群、②LPS50ng群、③H-ASD（加熱黄砂）群、④H-ASD+LPS群、⑤OVA群、⑥OVA＋LPS50ng群、⑦OVA+H-ASD群、⑧OVA+H-ASD+LPS50ng群の計8群とし、1種類のマウスの総匹数は34匹とした。4種類のマウスの合計は136匹であった。OVAはマウス1匹あたり4μgとし、H-ASD投与量は0.1mg、LPSは50ngとして生理食塩水に懸濁した。これらの溶液を2週間おきに計4回気管内投与し、最終投与翌日にマウスを屠殺した。4〜5匹のマウスから気管支・肺胞洗浄液 (BALF)を採取して、各炎症細胞数とマクロファージ数を測定し、また、BALF中の炎症性サイトカインやケモカインを測定した。肺胞洗浄後のマウスから肺病理標本を作製し、気道上皮の粘液細胞化や気管支粘膜下における好酸球等の炎症細胞を観察した。屠殺時に心採血後、血清を分離してOVA特異的-IgG1とIgE抗体を測定した。

１２）黄砂付着レベルの細菌感染毒素成分LPSの肺炎増悪作用と抗原併用曝露によるアレルギー増悪作用に関する研究

本実験では中国ゴビ砂漠の砂から4μm前後の粒径に精製した黄砂粒子を用いた。動物は6週齢のBALB/c系雄マウスを用い、実験群は①対照（Control）群、②LPS1ng群、③LPS10ng群、④加熱黄砂（H-ASD）群、⑤LPS1ng + H-ASD群、⑥LPS10ng + H-ASD群、⑦OVA (卵白アルブミン) 群、⑧OVA + LPS1ng群、⑨OVA + LPS10ng群、⑩H-ASD + OVA群、⑪H-ASD + OVA + LPS1ng群、⑫H-ASD + OVA + LPS10ng + H-ASD群の計12群とし、マウスの数は1群14匹とした。OVAの1回当たりの投与量は2μg/body、加熱処理H-ASDは0.1mg/bodyとした。LPSの1回投与量は一匹当たり1ngと10ngとした。これらを生理食塩水に懸濁し、1週間間隔で計4回、経気道曝露した。全てのマウスは最終投与翌日に心採血にて屠殺した。各群のマウスから気管支・肺胞洗浄液 (BALF)を採取し、炎症細胞数と炎症性サイトカイン・ケモカインを測定した。各群のマウスから肺の病理標本を作製し、気道上皮の粘液産生細胞や好酸球等の炎症細胞を観察した。屠殺時に心採血後、血清を分離してOVA特異的-IgG1とIgE抗体を測定した。

（２）黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による生殖器系への影響とそのメカニズム解明

１）黄砂イベントの異なる２種類の風送黄砂の雄性生殖機能への影響

6週齢のICR系雄性マウスを用いた。黄砂は1匹当たり0.1mgのASD1あるいはASD2の黄砂を、2週間で4回気管内投与した。最終投与の翌日、心臓採血屠殺後に精巣及び精巣上体を摘出し、組織重量を測定した。右精巣を造精機能測定用に-80℃で保存した。右精巣上体尾部を精子性状解析用とした。

２）黄砂に付着した微生物の雄性生殖機能への影響

黄砂による影響発生因子を検討するため黄砂付着微生物の一つである*Nocardiopsis* (微生物群)を用いて雄性生殖器への影響を検討した。*Nocardiopsis*の投与量は、0.1と1μgとし、黄砂はASD1の加熱処理したものを0.1mgとした。これらを2週間に1回、4回気管内投与し、マウス雄性生殖機能を検討した。

３）黄砂付着生物成分LPSの雄性生殖機能への影響に関する研究

本実験には黄砂は国立環境研究所より譲渡された中国内の砂漠の砂から精製した粒子経が5μm前後の標準黄砂を用いた。黄砂は360℃30分間加熱し、付着有機物を取り除いた黄砂 (H-ASD)を用いた。LPSは市販の大腸菌由来の標準品LPS-EB (0111：B4)用いた。動物は6週齢のICR系雄マウスを用いた。実験群は対照群、LPS-1ng投与群、LPS-10ng群、加熱黄砂（H-ASD）群、H-ASD+LPS-1ng群、H-ASD+LPS-10ng群の計6群とし、マウスの数は1群8-14匹とした。H-ASDの1回当たりの投与量は0.1 mg/bodyとした。LPSの1回投与量は一匹当たり1、10ngとした。これらを生理食塩水に懸濁し、1週間間隔で計4回、気管内投与した。全てのマウスは最終投与翌日に心採血にて屠殺した。各群のマウスから精巣および精巣上体尾部を採取し、一日精子産生能および精子性状解析を行った。また、精巣で発現する遺伝子解析を行った。

上記１）～３）の実験から採取した精巣上体尾部中精子について、精子性状解析装置を使用し精子性状解析を行った。解析項目は、精子運動率、直進運動率、非直進運動率、精子曲線地点移動速度の平均値 (VCL)、精子直線地点移動速度の平均値 (VSL)、精子進行方向性速度の平均値 (VAP)、精子の直線性の平均値 (LIN)、直線係数の平均値 (STR)、曲線軌道係数の平均値 (WOB)、精子頭部の平均振幅値 (ALH)、精子頭部が1秒間に振る回数 (BCF)である。また、右精巣を1ml のライシスバッファーの中でホモジナイズ後、溶液中の細胞数 (精子数)を測定し、DSP (1日に精巣1個あたりで作られる精子数)を算出した。血清中のTestosterone (T)、Estradiol ($E_2$)、LH、FSH濃度をELISAにて測定した。

４）黄砂から抽出した有機化合物質の雄性生殖機能への影響に関する研究

本実験には2010年11月13～15日の大規模黄砂に採取した黄砂から有機溶媒で抽出した有機化合物（タール成分：Tar）を用いた。動物は6週齢のICR系雄マウスを用いた。実験群は対照群、Tar 0.04 μg群、Tar0.2 μg群、Tar 1.0μg、加熱黄砂（H-ASD）、H-ASD+Tar 0.04μg群、H-ASD+Tar 0.2μg群、H-ASD+Tar 1.0μg群の計8群とし、マウスの数は1群14匹とした。加熱黄砂（H-ASD）の1回当たりの投与量は0.1mg/bodyとした。タール成分の1回投与量は一匹当たり0.04、0.2、1.0μgとした。

これらを0.01%Tween 80を含む生理食塩水に懸濁し、1週間間隔で計4回、気管内投与した。全てのマウスは最終投与翌日に心採血にて屠殺した。各群のマウスから精巣および精巣上体尾部を採取し、一日精子産生能および精子性状解析を行った。

５）運動精子に対する黄砂の影響

粒子状物質による運動精子性状の悪化に関し、評価系を確立するために、黄砂を多く含む、中国北京市のビルの換気フィルターに付着した北京降下煤塵 (BP)を使用した。左右精巣上体尾部を採取し、一方を対照群、他方を処理群とし、対照群には精子運動解析用培地 (10% FBS-M199)を添付し、処理群にはBPを含む10% FBS-M199 1mlを添加した。試験は1試験につき5匹のマウスを用いた。処理、10分後より10分間隔で4回、精子性状をコンピュータ画像解析法 (SCA)にて解析した。上記の方法で、粒子状物質による精子性状への影響評価が可能となったため、黄砂、加熱黄砂および黄砂付着タール成分を同様に処理し、精子性状解析を行った。

６）胎仔期風送黄砂曝露による雄性出生仔マウスの生殖機能への影響

黄砂の胎仔期曝露による出生仔雄性生殖機能への影響を明らかにするために、ICR系妊娠マウスに0.2 mgのASD1黄砂を妊娠7日目及び14日目に気管内投与した。出生仔は対照群とASD群に分け、それぞれ5週齢（5wk対照群、5wk ASD)、10週齢（10wk対照群、10wk ASD群）で雄性生殖機能を検討した。

（３）免疫担当細胞と気管支上皮細胞における黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質の影響解明

１）黄砂が気道上皮細胞に及ぼす影響

2011年5月1～3日に採取した無処理の黄砂（ASD1)、2011年5月12～14日に採取した無処理の黄砂（ASD2)、2011年5月1～3日に採取した黄砂を360℃、30分間加熱処理した黄砂（H-ASD1)、以上3種類の黄砂を被検物質とした。正常ヒト気道上皮細胞株BEAS-2B細胞を使用し、無血清培地LHC-9 Mediumを用いて培養した。コラーゲンIコートされたプレートに細胞を播種し、semi-confluentな状態まで培養後、被検物質（0-90 μg/mL）を添加して、4あるいは24時間曝露した。4時間曝露後に、細胞接着分子ICAM-1と粘液関連物質Mucin-1の遺伝子発現をリアルタイムRT-PCR法により検討した。また、24時間曝露後に、細胞活性、IL-6、IL-8、sICAM-1等の液性因子の産生、細胞表面分子ICAM-1の発現を、WST-1を用いた比色法、ELISA法およびフローサイトメトリーにより、それぞれ解析した。

２）黄砂が免疫担当細胞に及ぼす影響

ASD1、ASD2、H-ASD1を被検物質とした。10週齢の雄性NC/NgaTndCrljマウスを頸椎脱臼にて安楽死させた後、大腿骨および脾細胞を摘出した。大腿骨は、骨髄細胞を摘出し、GM-CSF刺激により分化誘導した骨髄由来樹状細胞（BMDC）に、黄砂（0-90μg/mL）を24時間曝露した。その後、細胞表面分子DEC205の発現をフローサイトメトリーにより解析した。一方、脾細胞は、黄砂（0-90μg/mL）を72時間曝露後、細胞増殖能および細胞表面分子TCRの発現を、Bromodeoxyuridine（BrdU）法およびフローサイトメトリーにより、それぞれ解析した。

３）黄砂関連生物成分 *Bjerkandera* が気道上皮細胞と免疫担当細胞に及ぼす影響

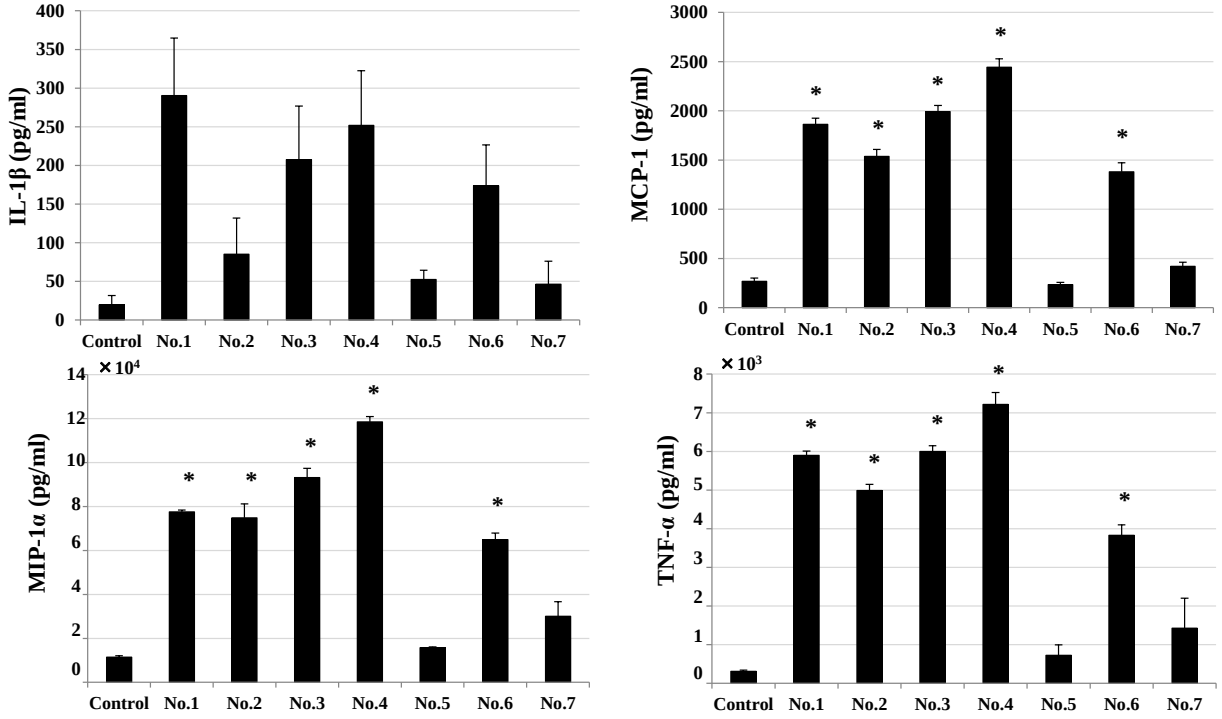
*Bjerkandera* および360℃、30 分間加熱処理した標準黄砂（H-ASD）を被検物質とした。ヒト気道上皮細胞に*Bjerkandera*（0-25 μg/mL）、あるいは、*Bjerkandera*とH-ASD（50 μg/mL）を24時間曝露した後、細胞活性、IL-6、IL-8、sICAM-1、IL-25、IL-33等の液性因子の産生および細胞表面分子Dectin1の発現を、WST-1を用いた比色法、ELISA法およびフローサイトメトリーによりそれぞれ解析した。別に、10 週齢の雄性NC/NgaTndCrlj マウスを頸椎脱臼にて安楽死させた後、大腿骨および脾臓を摘出した。骨髄細胞よりGM-CSF 刺激により分化誘導したBMDCは、*Bjerkandera*、あるいは、*Bjerkandera*+H-ASDを24 時間曝露後、細胞表面分子DEC205、CD86、TLR2、TLR4、Dectin1の発現を解析した。脾細胞は、*Bjerkandera*、あるいは、*Bjerkandera*+H-ASD を72 時間曝露後、細胞増殖能および細胞表面分子TCRの発現を解析した。

## ４．結果及び考察

（１）黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による呼吸器・免疫系への影響とそのメカニズム解明

１）黄砂分離微生物の炎症性サイトカイン誘導能を調査するためのスクリーニング試験

サブテーマ（２）の小林らが石川県珠洲市上空で採取した黄砂から分離した微生物の炎症性サイトカイン誘導能を調査するためのスクリーニング試験を、マウスマクロファージを用いて行った。その結果、マウスマクロファージにおける炎症性サイトカイン類（IL-1β、MCP-1、MIP-1α、TNF- α）のmRNA発現は黄砂に付着していた7種類の微生物のうちNo1～No4の*Nocardiopsis*菌体成分が他の*Bacillus*、*Streptmyces*や*Bjerkandera*の菌体成分に比較して高く、細胞培養液中のこれらのサイトカインタンパク発現 (図(1)-1)-1)も同様に高い発現が見られた。No1～No4の*Nocardiopsis*菌体成分の中で比較するとNo4の*Nocardiopsis*菌体成分のサイトカインmRNA発現やサイトカインタンパク発現が高かった。これらの結果から黄砂附着細菌の中では*Nocardiopsis*類が黄砂による炎症惹起と関連している可能性が示唆された。また、このNo4のマウスマクロファージ上にあるToll様レセプター (TLRs)を測定した結果、TLR4の発現は低下したが、TLR2の発現を高めた。この結果から、TLR2を介して炎症性サイトカインの発現を高め、肺に炎症を惹起される可能性が示唆された。




図(1)-1)-1.7種の黄砂分離微生物の炎症性サイトカイン誘導能の違い

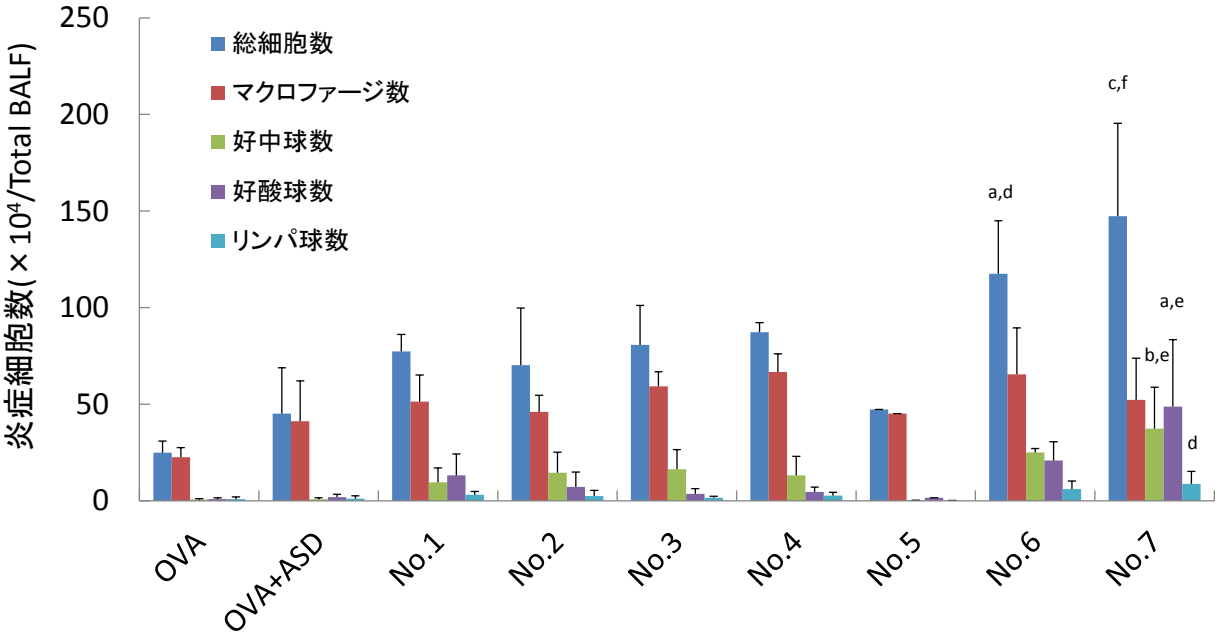
細胞培養液中の炎症性サイトカインの発現量の変化を示す。

No1～No4.Nocardiopsisの4種、No5.Bacillus、No6.Streptmyces、No7.Bjerkandera.

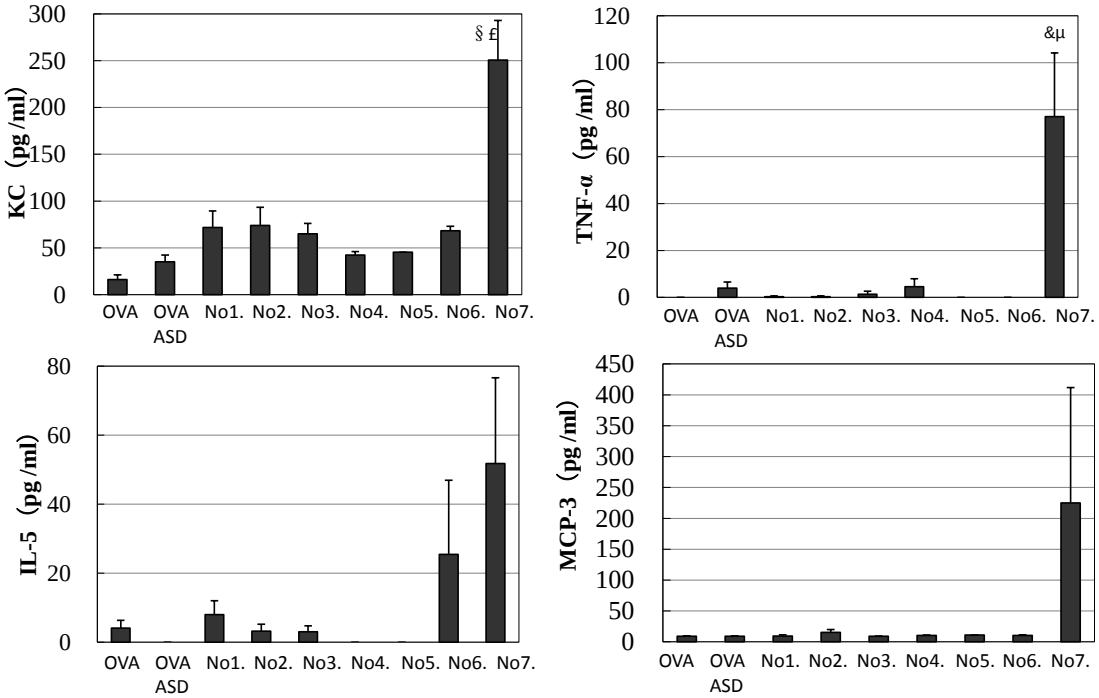
DataはM ± SEMで示す。*$p < 0.001$ vs. Control

２）マウス気管支喘息モデルを用いたアレルギー増悪作用を起こす微生物のスクリーニング試験

マウス気管支喘息モデルを用いて増悪作用を起こす微生物を特定するためのスクリーニング試験を行った。その結果、7種類の微生物のうち*Bjerkandera* (No. 1) 投与群のBALF中の好酸球数がOVA群やOVA+ASD群と比較して著しく増加していた (図(1)-1)-2)。BALF中の好酸球遊走・活性化に関与するTh2型炎症性サイトカインのIL-5やMCP-3 (図(1)-1)-3)も、*Bjerkandera*投与群で著しく増加していた。また好中球誘導にあずかるKCやTNF-α も増加していた (図(1)-1)-3)。*B. ad* 投与群に続いて好酸球数やこれらの炎症性サイトカインが多く誘導されたものは*Streptmyces*投与群であった (図(1)-1)-2; 図(1)-1)-3)。肺病理組織変化としては、*Bjerkandera*投与群のマウスでは他の微生物を投与した群に比較して、気道粘膜下への好酸球浸潤や気道上皮の粘液細胞化が著しく悪化していた。*Streptmyces*投与群にも同様の変化が認められたが軽度であった。以上の結果から、7種類の微生物のなかでも、*Bjerkandera*のアレルギー炎症増悪作用が最も強いことが明らかとなった。このことから黄砂に付着している*Bjerkandera*のような真菌類が気管支喘息増悪作用に関与しているものと示唆された。



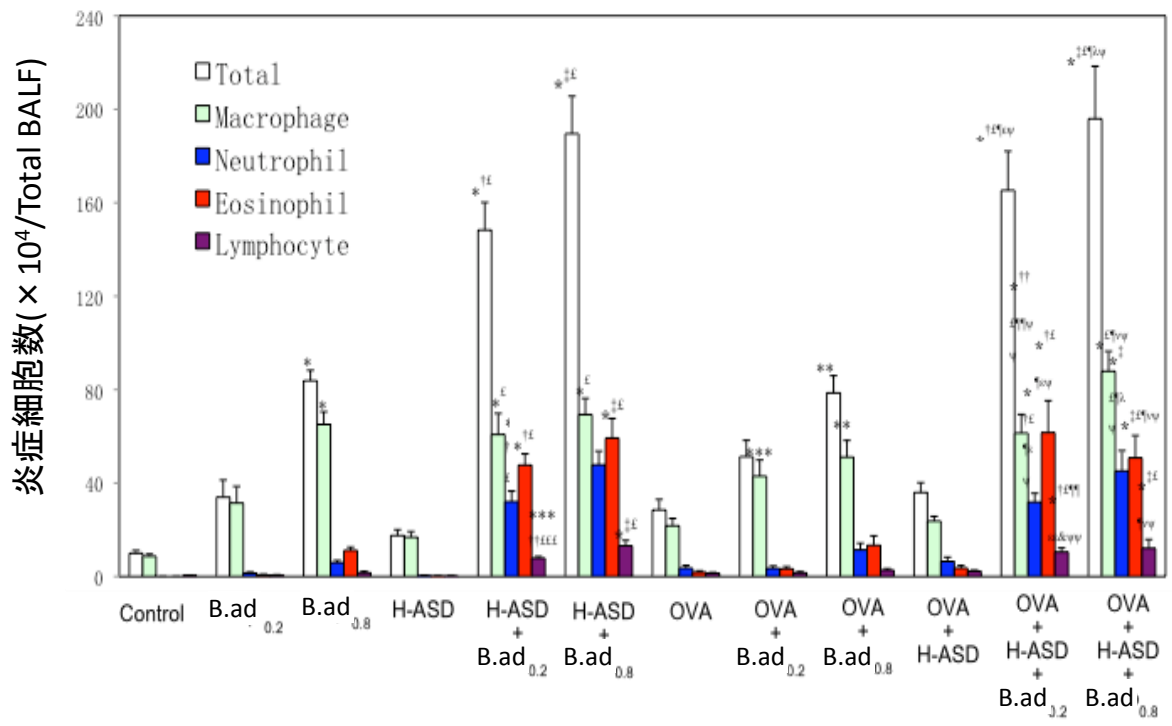

図(1)-1)-2. 気管支喘息モデルマウスにおける７種の微生物の肺洗浄液中の炎症細胞数
No1～No4.Nocardiopsis 4種、No5.Bacillus、No6.Streptmyces、No7.Bjerkandera.
これらの微生物はOVAとASDと共に気管内に投与した。DataはM ± SEMで示す。
a:p<0.05vsOVA, b:p<0.01vsOVA, c:p<0.001vsOVA, d:p<0.05vsOVA+ASD,
e:p<0.01vsOVA+ASD　f:p<0.001vsOVA+ASD




図(1)-1)-3. 7種の微生物の肺洗浄液中のサイトカイン・ケモカイン発現
No1～No4. Nocardiopsis 4種, No5.Bacillus, No6.Streptmyces, No7.Bjerkandera.
これらの微生物はOVAとASDと共に気管内に投与した。DataはM ± SEMで示す。
$^{\mu}p$<0.01 vs. OVA, $^{\&}p$<0.01 vs. OVA+H-ASD, $^{\S}p$<0.001 vs. OVA, $^{£}p$<0.001 vs. OVA+H-ASD

３）*Bjerkandera* 真菌のアレルギー喘息増悪作用に対する量-反応関係の関する研究

２）の実験によって*Bjerkandera* (*B. ad*)が肺のアレルギー炎症を高めたことが明らかになったことから、気管支喘息をモデルとしたアレルギー炎症に対す*B. ad*の量-反応関係を調べた。その結果、*B. ad* 0.2μg単独投与群の肺洗浄液（BALF）中の炎症細胞数は増加しなかったが、0.8μg群では若干の好中球と好酸球に増加が認められ (図(1)-1)-4)、更にこれに熱処理黄砂0.1mgを加えた群では*B. ad*の投与量に依存して相乗的な増加が認められた (図(1)-1)-4)。これら炎症細胞を誘導活性するサイトカイン類（KC、IL-5、Eotaxin、MPC-3）も相乗的に増加していた。これらの結果はH-ASDが*B. ad* 誘導のアレルギー炎症を増悪させることを示す。

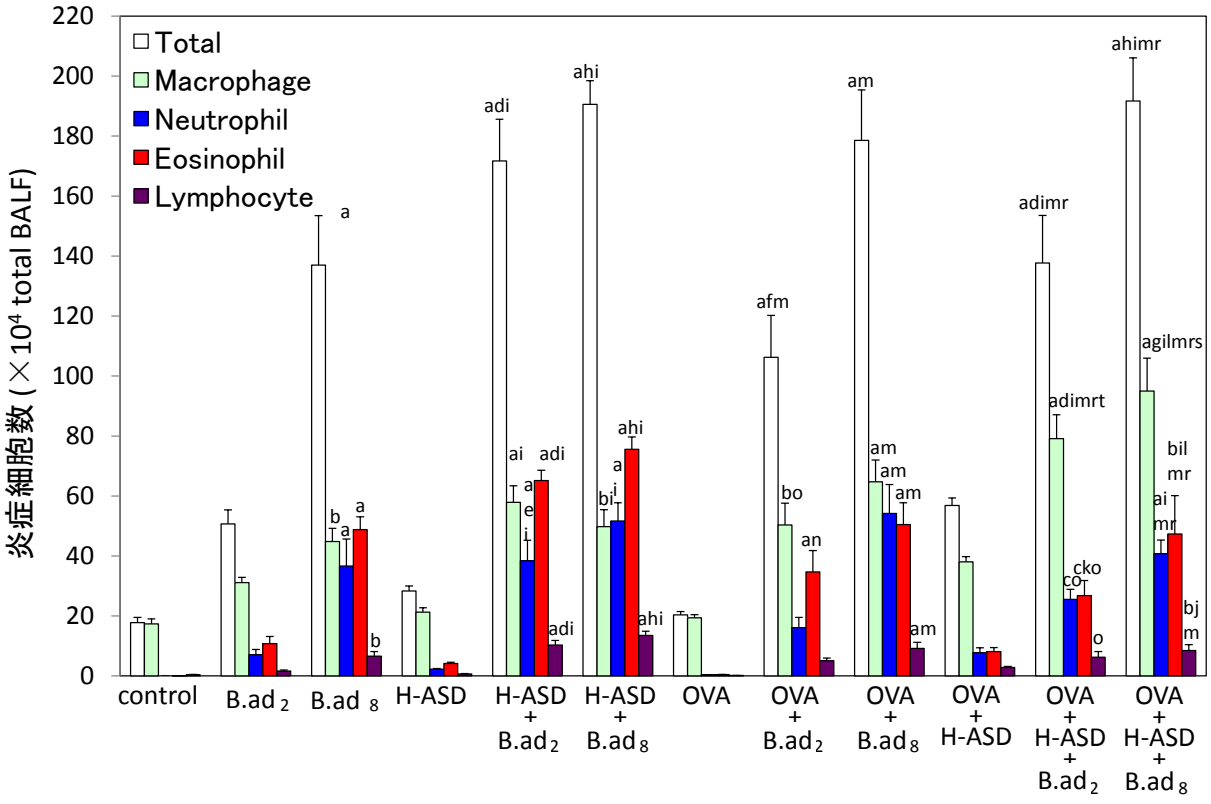



図(1)-1)-4. *Bjerkandera*、熱処理黄砂、OVAを気管内投与したマウスの肺洗浄液中の炎症細胞数
*Bjerkandera* (*B. ad*)投与量：0.2μg or 0.8μg; 熱処理黄砂(H-ASD):0.1 mg; OVA:1μg.
DataはM ± SEで示す。
*$p$<0.001 vs Control; **$p$<0.01 vs Control; ***$p$<0.05 vs Control; $^{\dagger}p$<0.001 vs *B. ad*. 0.2; $^{\dagger\dagger}p$<0.05 vs *B. ad*.0.2; $^{\ddagger}p$<0.001 vs *B. ad*.0.8; $^{\ddagger\ddagger}p$<0.01 vs *B. ad*.0.8; $^{£}p$<0.001 vs H-ASD; $^{£££}p$<0.05 vs H-ASD; $^{¶}p$<0.001 vs OVA; $^{¶¶}p$<0.01 vs OVA; $^{\Psi}p$<0.001 vs OVA+H-ASD; $^{\Psi\Psi}p$<0.01 vs OVA+H-ASD; $^{\&}p$<0.05 vs OVA+H-ASD; $^{\varepsilon}p$<0. 001 vs OVA+*B. ad*. 0.2;
$^{\varepsilon\varepsilon}p$<0. 01 vs OVA+*B. ad*. 0.2; $^{\lambda}p$<0. 001 vs OVA+ *B. ad*. 0.8; $^{\nu}p$<0. 01 vs OVA+ *B. ad*. 0.2

OVA存在下では、OVA+H-ASD+*B. ad* 0.2μg群の炎症細胞数はOVA単独群とH-ASD+*B. ad* 0.2μg群の値の相加的増加を示したが、OVA+H-ASD+*B. ad* 0.8μg群ではH-ASD+*B. ad* 0.8μg群と同レベルであった。OVA+H-ASD+*B. ad* 0.2μg群のBALF中のIL-5とMCP-3 はH-ASD+*B. ad* 0.2μg群と比較し

て著しく増加していたが、OVA+H-ASD+*B. ad* 0.8μg群のIL-5はH-ASD+*B. ad* 0.8μg群と同レベルであり、MCP-3は2倍程度高かった。これらの結果はOVAに H-ASDと*B. ad* 0.2μgが加わるとアレルギー炎症が更に悪化されることを示すが、*B. ad*量が0.8μgになるとその反応が鈍ることが明らかとなった。血清中のOVA-特異的IgG1抗体産生に対する*B. ad*とH-ASDのアジュバント作用が認められたが、*B. ad*+H-ASDの添加(OVA+H-ASD+*B. ad*)によって抗体産生能が更に増強した。

*B. ad* 2μgと8μgの曝露実験おけるBALF中の炎症細胞数は、*B. ad*低濃度曝露実験と同じように熱処理黄砂0.1mgを加えると*B. ad*の投与量に依存して著しい増加が認められた (図(1)-1)-5)。OVA + *B. ad* 2μgとOVA + *B. ad* 8μg群のBALF中の炎症細胞数（好中球、好酸球）はOVA、*B. ad* 2μg、*B. ad* 8μgの単独投与群に比較して相乗、相加的に増加していた。しかし、3者を加えたOVA + H-ASD + *B. ad* 2μg群やOVA + H-ASD + *B. ad* 8μg群ではむしろ低下する傾向を示していた。




図(1)-1)-5. *Bjerkandera*、熱処理黄砂（H-ASD）、OVAを気管内投与したマウスの肺洗浄液中の炎症細胞数

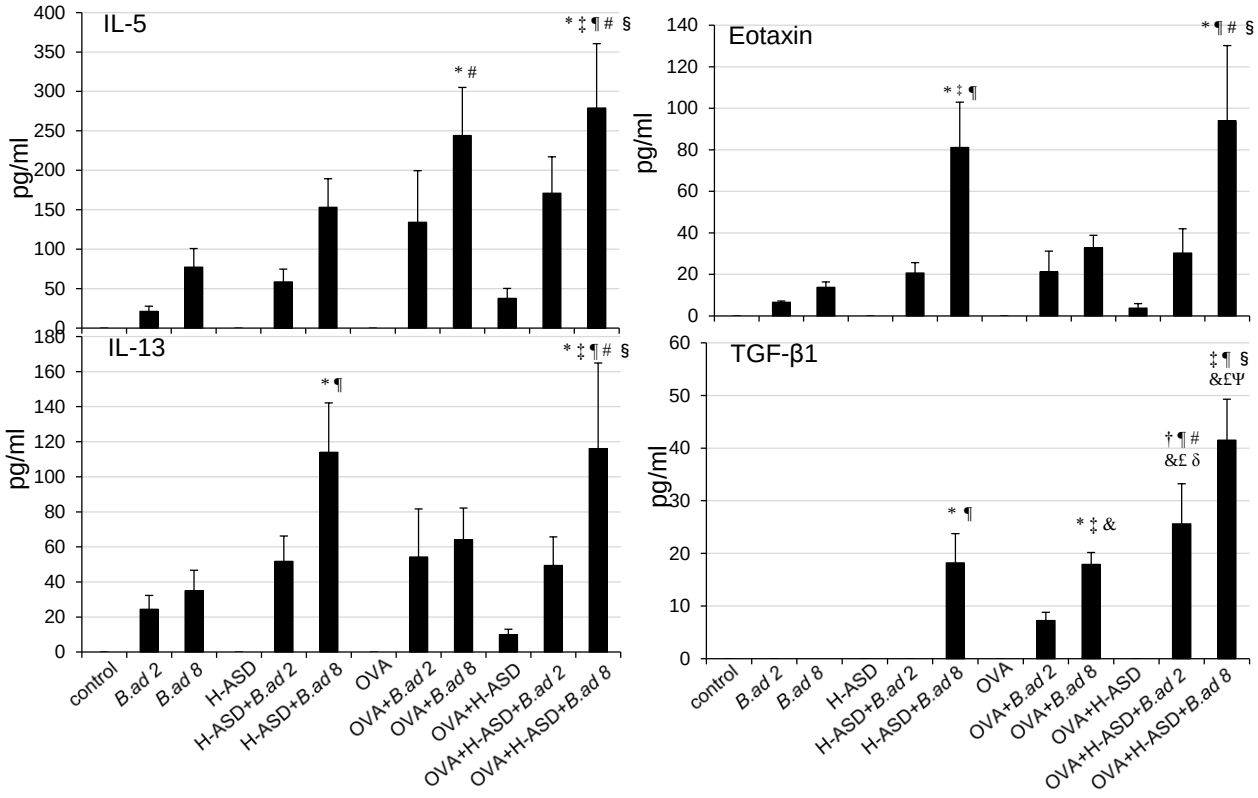
*Bjerkandera* (*B. ad*)投与量：2μg or 8μg; 熱処理黄砂(H-ASD):0.1 mg; OVA:1μg.

DataはM ± SEで示す。

[a]$p$<0.001 vs Control; [b]$p$<0.01 vs Control; [c]$p$<0.05 vs Control; [d]$p$<0.001 vs *B. ad.*$_2$; [e]$p$<0.01 vs *B. ad.*$_2$; [f]$p$<0.05 vs *B. ad.*$_2$; [g]$p$<0.001 vs *B. ad.*$_8$; [h]$p$<0.05 vs *B. ad.*$_8$; [i]$p$<0.001 vs H-ASD; [j]$p$<0.01 vs H-ASD; [k]$p$<0.001 vs H-ASD+*B. ad.*$_2$; [L]$p$<0. 05 vs H-ASD+*B. ad.*$_8$; [m]$p$<0.001 vs OVA; [n]$p$<0.01 vs OVA; [o]$p$<0.05 vs OVA; [r]$p$<0.001 vs OVA+H-ASD; [t]$p$<0. 05 vs OVA+*B. ad.*$_2$; [s]$p$<0. 05 vs OVA+ *B. ad.*$_8$

一方、BALF中のTGF-$\beta_1$(抗炎症性サイトカイン、修復時の線維芽細胞や平滑筋の増生を誘導)はこの3者を加えた群で著しく増加していた (図(1)-1)-6)。この結果から、3者を加えた2グループのBALF中の炎症細胞数の低下はTGF-$\beta_1$の増加によって起こるものと考えられる。しかし、気管支粘膜下の線維芽細胞の増生による肥厚はTGF-$\beta_1$の増加によって気道のリモデリング(気道の不可逆的修復反応)が進行していると思われる。この3者を加えた気道粘膜下の好酸球・リンパ球浸潤、気道粘膜上皮の粘液細胞増生は特にOVA + H-ASD + *B. ad* 8μg群 (図(1)-1)-7)で著しく、好酸球誘導にあずかるIL-5やMCP-3 (図(1)-1)-6)も他のグループよりも著しく増加していた。

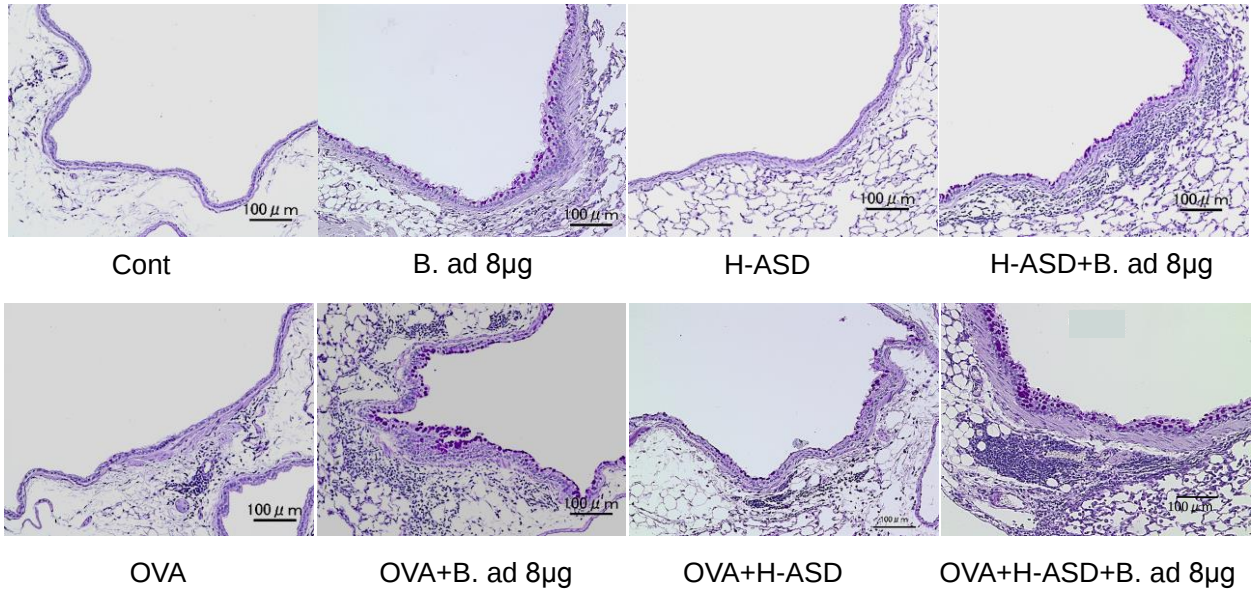
これらの結果からOVA抗原と共に、黄砂と比較的濃度の高い*B. ad*曝露を受けるとBALF中の炎症細胞数は減るものの気道のリモデリングへと進行して行くことが示唆された。血清中のOVA-特異的IgG1抗体産生に関しては低濃度*B. ad*の結果と同様、*B. ad*のアジュバント作用が認められた。




図(1)-1)-6. 肺洗浄液中のTh2サイトカインと好酸球誘導性ケモカインの変化

*Bjerkandera* (*B. ad*)投与量：2 μ g or 8 μ g; 熱処理黄砂(H-ASD):0.1 mg; OVA:1 μ g. DataはM ± SEで示す (n = 8)。

$^{*}p$<0.05 vs. Control; $^{\dagger}p$<0.05 vs. *B. ad* 2; $^{\ddagger}p$<0.05 vs. *B. ad* 8; $^{\P}p$<0.05 vs. H-ASD; $^{\#}p$<0.05 vs. OVA; $^{\S}p$<0.05 vs. OVA+H-ASD; $^{\&}p$<0.05 vs. OVA+ *B. ad* 8.

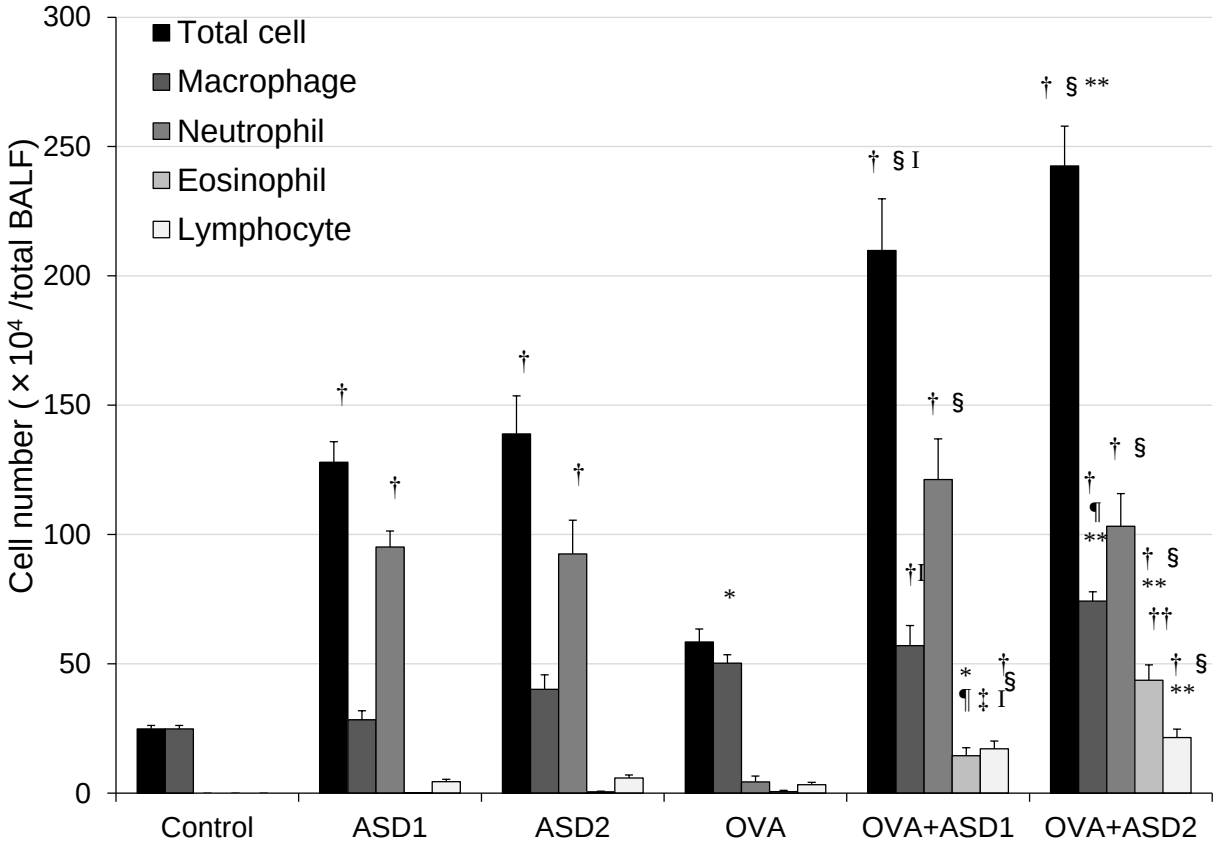



図(1)-1)-7. *Bjerkandera* (*B. ad*)、加熱黄砂とOVAを投与したマウスの気道の病理組織学的変化 (PAS染色)

４）発生地の異なる2種類の黄砂の気管支喘息モデルマウスへの影響

発生地や輸送経路の異なる2つの風送黄砂について気管支喘息モデルマウスを用いてアレルギーへの影響を調べた。その結果、OVAとASDの併用投与群において、BALF中の好酸球数 (図(1)-1)-8) は各々の単独投与群と比較して相乗的に増加し、特にOVA ＋ ASD2群でその増加が著しかった。また、好酸球の活性化に関与する肺洗浄液中のIL-5、MCP-3やEotaxin等も各々の単独投与群と比較して相乗的に増加した (表(1)-1)-1)。しかし、併用投与群間での差はみられなかった。病理学的な観察では、OVAとASDの併用投与群において気管支粘膜下への好酸球浸潤や気道上皮の粘液細胞化がみられ、その変化はOVA ＋ ASD1群よりもOVA ＋ ASD2群で著しかった (図(1)-1)-9)。

以上の結果から、両黄砂によって気管支喘息病態は悪化するが、ASD2においてその作用が強いことが明らかになった。ASD1はASD2よりもシリカを多く含むが、ASD2の付着物は大気汚染物質の硫酸塩（$SO_4^{2-}$）や硝酸塩（$NO_3^-$）、多環芳香族炭化水素（PAHs）、更にはグラム陰性菌のリポポリサッカライド（LPS）やβ-グルカンをASD1よりも多く含み、粒径もASD1と比較して小さい（PM2.5を多く含む）ことから、これらの成分や粒径の大きさがアレルギー反応の増悪と関連している可能性が示唆された。とくに次の５）の実験結果では、黄砂はTLR4を強く認識していることが明らかとなったことから、そのリガンドである微量のリポサッカライド（LPS）がアレルギーの増悪に関わっている可能性が示唆された。

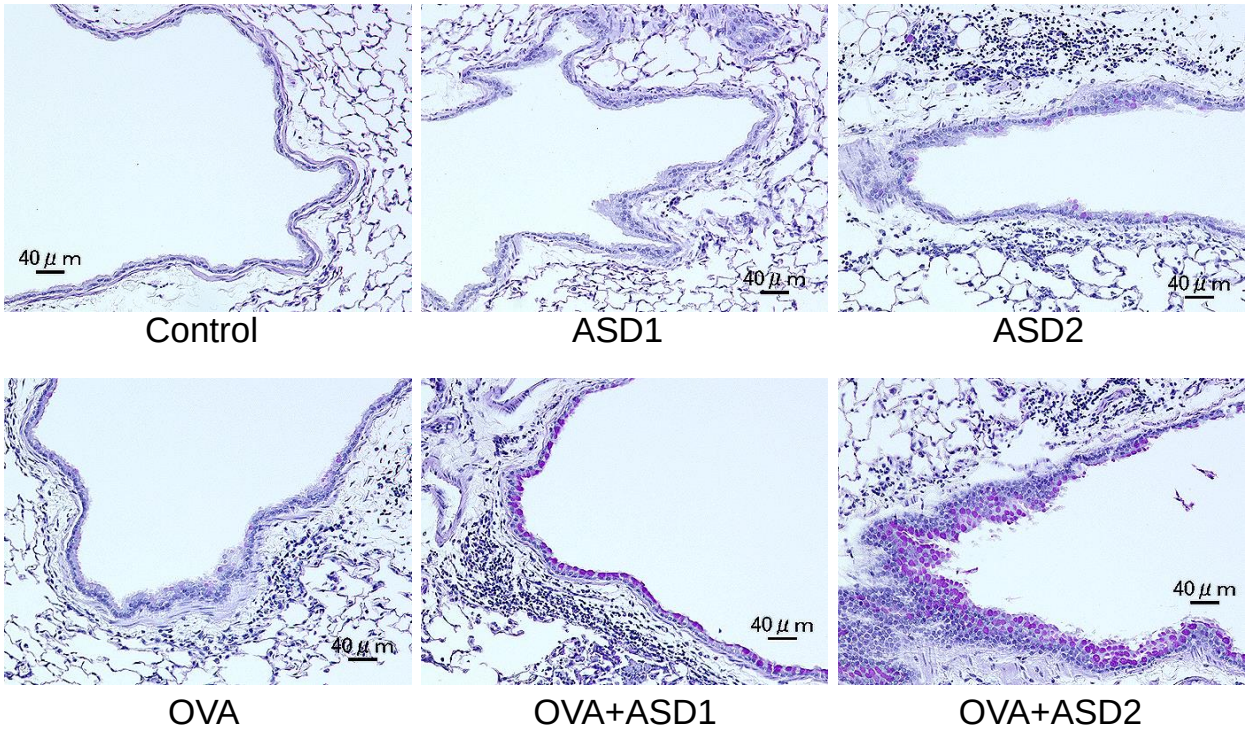



図(1)-1)-8. イベントの異なる2つの黄砂の肺洗浄液中の炎症細胞の変化
All values were expressed as mean ± SE. † $p < 0.001$ vs. Control, * $p < 0.01$ vs. Control, § $p < 0.001$ vs.OVA, ¶ $p < 0.01$ vs. OVA, I $p < 0.001$ vs. ASD1, ‡ $p < 0.01$ vs. ASD1, ** $p < 0.001$ vs. ASD2, †† $p < 0.001$ vs. OVA+ASD1

表(1)-1)-1. 2種類の黄砂の肺洗浄液中のサイトカイン発現の比較

| Group * | Animals (n) | Cytokines (pg protein/ml) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | IL-1β | IL-4 | IL-5 | IL-6 | IL-12 | IL-13 | IFN-γ |
| Control | 8 | ND | 3.40 ± 0.29 | ND | ND | ND | ND | ND |
| ASD1 | 8 | 33.7 ± 2.55¶ | 1.97 ± 1.05 | ND | 24.9 ± 3.44§ | 280 ± 34.9† | ND | ND |
| ASD2 | 8 | 37.9 ± 6.79§ | 1.91 ± 0.68 | 20.8 ± 10.6 | 33.8 ± 9.19† | 225 ± 36.3† | 5.19 ± 2.44 | ND |
| OVA | 8 | ND | 1.17 ± 0.42 | 6.75 ± 3.49 | ND | 28.5 ± 16.0 | ND | ND |
| OVA+ASD1 | 8 | 39.6 ± 11.0§‡ | 5.01 ± 1.99 | 163 ± 40.5†I§§ | 32.6 ± 6.25†I | 274 ± 50.0†I | 36.5 ± 11.1¶††¶¶ | ND |
| OVA+ASD2 | 8 | 43.3 ± 9.79†I | 7.11 ± 1.50‡II | 160 ± 25.4†I‡‡ | 19.4 ± 2.78 | 300 ± 38.8†I | 55.1 ± 15.8†I‡‡ | ND |

*All values were expressed as mean ± SE. †$p < 0.001$ vs. Control, §$p < 0.01$ vs. Control, ¶$p < 0.05$ vs. Control, I$p < 0.001$ vs. OVA, ‡$p < 0.01$ vs. OVA, † †$p < 0.05$ vs. OVA, §§$p < 0.001$ vs. ASD1, ¶¶$p < 0.05$ vs. ASD1, ‡‡$p < 0.001$ vs. ASD2, II$p < 0.05$ vs. ASD2



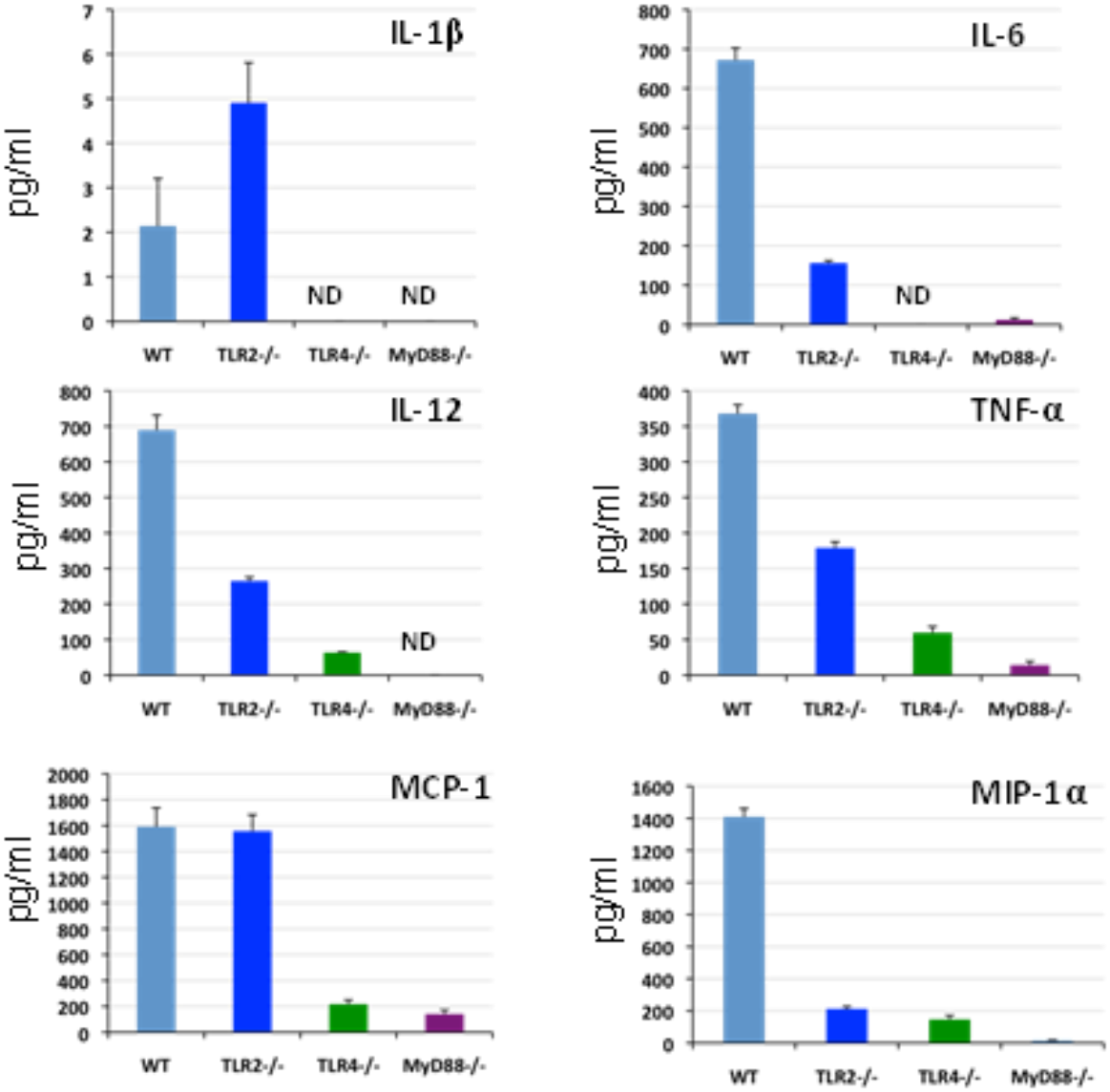

図(1)-1)-9. イベントが異なる２つの黄砂の肺の病理学的な変化 (PAS染色)
ASD単独投与ではADSD1群よりASD2群において気道炎症が強く発現している。
ASDを投与した群ではOVA+ASD1群よりもOVA+ASD2の方が気管支上皮の粘液細胞増生が強い。

５）Toll様レセプターノックアウト（TLRs KO）マウスの骨髄由来マクロファージを用いた黄砂の炎症増悪因子のスクリーニング試験

黄砂付着微生物由来の炎症起因物質（グラム陰性菌のリポポリサッカライド（LPS）・カビ成分のβ-グルカン）を明らかにする目的で、微生物の分子パターン認識センサーであるToll様レセプター(TLRs)ノックアウト（KO）マウス（TLR2KO、TLR4KO、MyD88KO）3種と野生型(WT)マウスの骨髄由来マクロファージを用いて、培養液中に放出された炎症性サイトカイン量を比較した。

その結果、野生型マウス(WT)、TLR2KO、TLT4KO、MyD88KOマウス髄由来マクロファージ（BMDMs）を黄砂で刺激した時の培養液中に放出された炎症性サイトカインのIL-1β、IL-12、MCP-1、IL-6、TNF-α発現はTLR4（LPSの受容体）KOマウスよりTLR2（β-グルカンの受容体）KOマウスで高く、MIP-1αは同レベルであった (図(1)-1)-10)。一方、TLR2やTLR4のアダプター分子MyD88KOマウスではこれらの炎症性サイトカイン発現は見られなかった (図(1)-1)-10)。

以上の結果から、黄砂はTLR2よりもTLR4を強く認識していることが明らかとなり、TLR2のリガンドのβ-グルカン（カビ成分）やペプチドグリカン（グラム陽性菌）よりはTLR4のリガンドであるグラム陰性菌のリポポリサッカライド（LPS）が炎症性サイトカインの発現に関わっている可能性が示唆された。




図(1)-1)-10. 黄砂刺激骨髄細胞由来マクロファージ (BMDMs)の培養液中のサイトカイン発現量

６）黄砂から抽出した有機化学物質（Tar）のアレルギー喘息増悪作用に関する研究

黄砂に吸着した化石燃焼由来の有機化学物質（タール成分：Tar）のアレルギー喘息増悪作用の量-反応関係を明らかにする目的で、喘息モデルマウスに黄砂と共にTar 1μgと5μgの経気道曝露して、アレルギー炎症への影響を比較検討した。使用したTar中に含まれるPAHs濃度は 表(1)-1)-2に示す。

その結果、肺洗浄液中の好中球はOVA + H-ASD群、これにTarを加えたOVA + H-ASD + Tar1μg群とOVA + H-ASD + Tar5μg群は変わらなかったが、好酸球はOVA + H-ASD + Tar1μg群で高い傾向を示し、OVA + H-ASD + Tar 5μg群ではむしろ抑制傾向を示した (図(1)-1)-11)。アレルギー炎症を誘導するTh2サイトカインのIL-5やIL-13、好酸球誘導ケモカインのEotaxinはOVA + H-ASD + Tar 5μg群よりOVA + H-ASD + Tar1μg群で誘導された (図(1)-1)-12)。一方、気道の粘液細胞化や炎症細胞浸潤もOVA + H-ASD + Tar 5μg群よりOVA + H-ASD + Tar 1μg群で著しかった (図(1)-1)-13)。血中の抗体産生

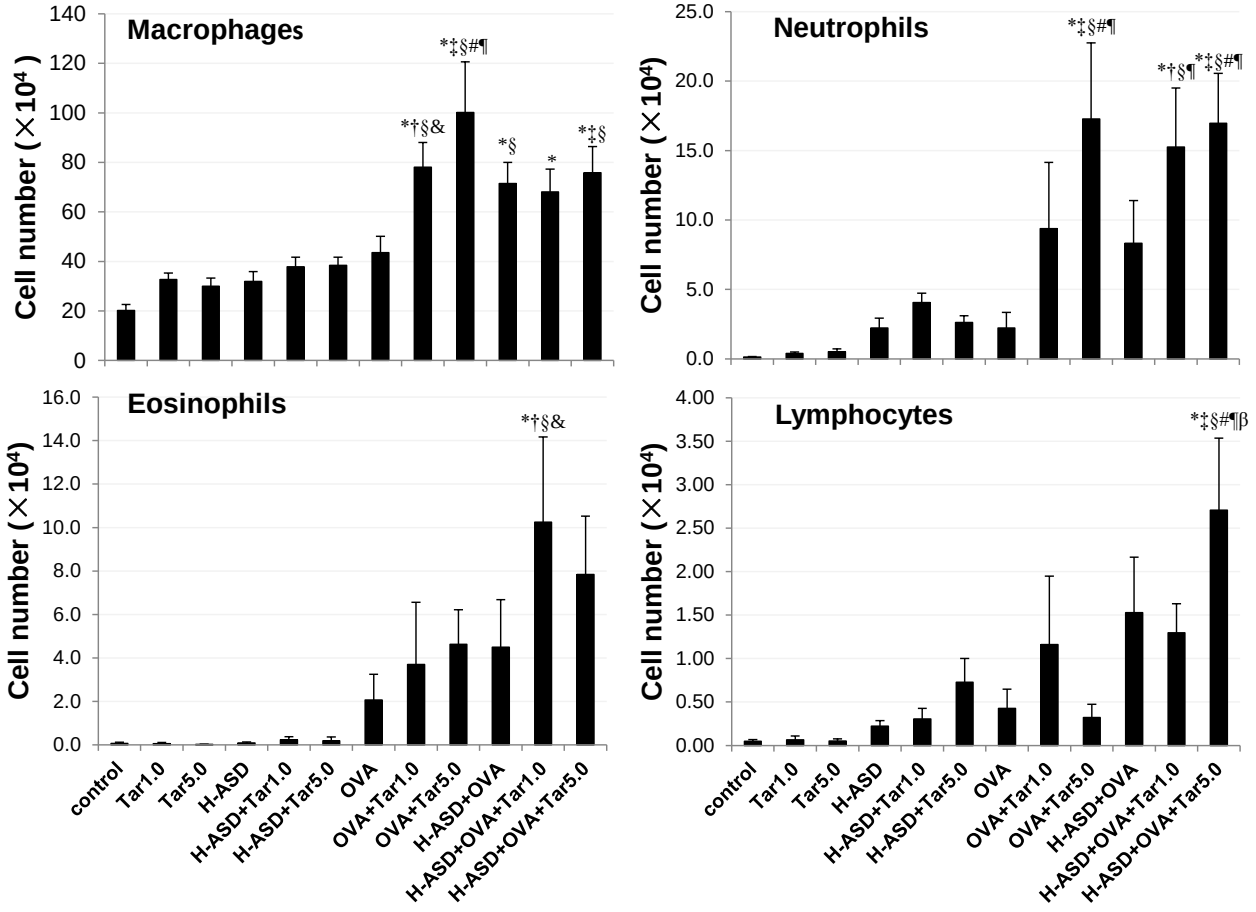
に関しては、OVA + H-ASD + Tar 1μg群とOVA + H-ASD + Tar 5μg群ではOVA + H-ASD群より高いことからTarにはアジュバント作用があることが示された。

表(1)-1)-2. Tar中のPAHs含有量

| Components | Concentration（ng/m$^3$） | Concentration of ASD(μg/m$^3$) | PAHs(μg/g ASD) | PAHs(μg/g Tar) |
|---|---|---|---|---|
| BaP | 0.17 | 15.34 | 10.81 | 34.59 |
| BkF | 0.13 | 15.34 | 8.54 | 27.34 |
| BghiP | 0.25 | 15.34 | 16.29 | 52.11 |
| BbF | 0.10 | 15.34 | 6.49 | 20.77 |
| BaA | 0.29 | 15.34 | 18.79 | 60.14 |
| BeP | 0.84 | 15.34 | 54.52 | 174.48 |
| BjF | 0.44 | 15.34 | 28.80 | 92.16 |
| Chr | 0.26 | 15.34 | 17.11 | 54.76 |
| Coronene | 0.31 | 15.34 | 20.03 | 64.09 |
| DaA | 0.21 | 15.34 | 13.53 | 43.31 |
| Flu | 1.04 | 15.34 | 67.95 | 217.44 |
| Indeno | 0.59 | 15.34 | 38.20 | 122.25 |
| Perylene | 0.04 | 15.34 | 2.85 | 9.12 |
| Pyr | 0.35 | 15.34 | 22.84 | 73.08 |

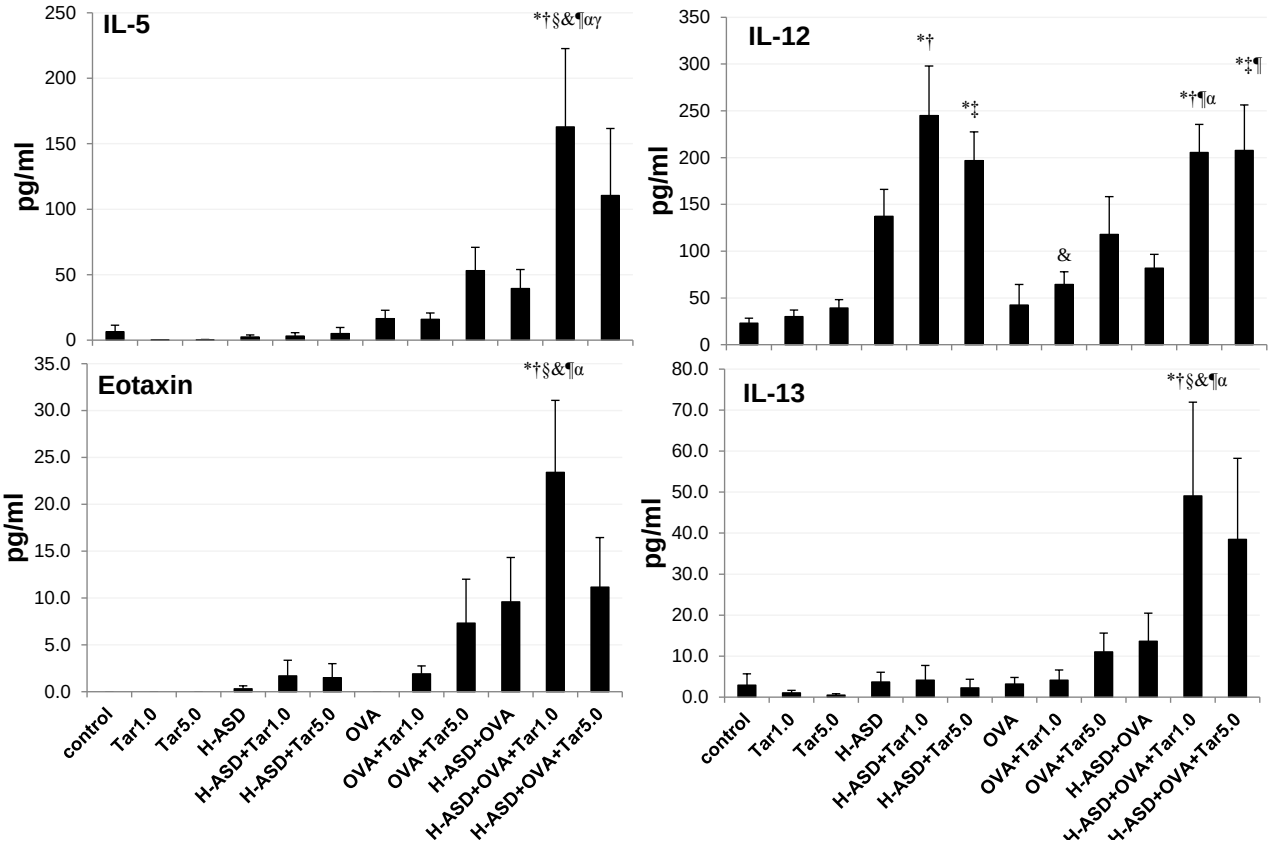
BaP: Benzo(a)pyrene, Chr: Chrysene, BkF: Benzo(k)fluoranthene, Coronene,
BghiP: Benzo(ghi)perylene, DaA: Dibenzo(a,h)anthracene,
BbF: Benzo(b)fluoranthene, Flu: Fluoranthene, BaA: Benz(a)anthracene,
IdP: Indeno(1,2,3-cd)pyrene, BeP: Benzo(e)pyren, Perylene,
BjF: Benzo(j)fluoranthene, Pyr: Pyrene

以上の結果より、抗原と黄砂粒子にTar成分の3者が加わった時にアレルギー炎症が増悪されることが明らかとなった。しかし、Tar 成分が多い場合（5μg）は、むしろアレルギー炎症が抑制される結果を得た。この結果から、黄砂に含まれている微量の化学物質もアレルギーの増悪に関わっている可能性が示唆された。



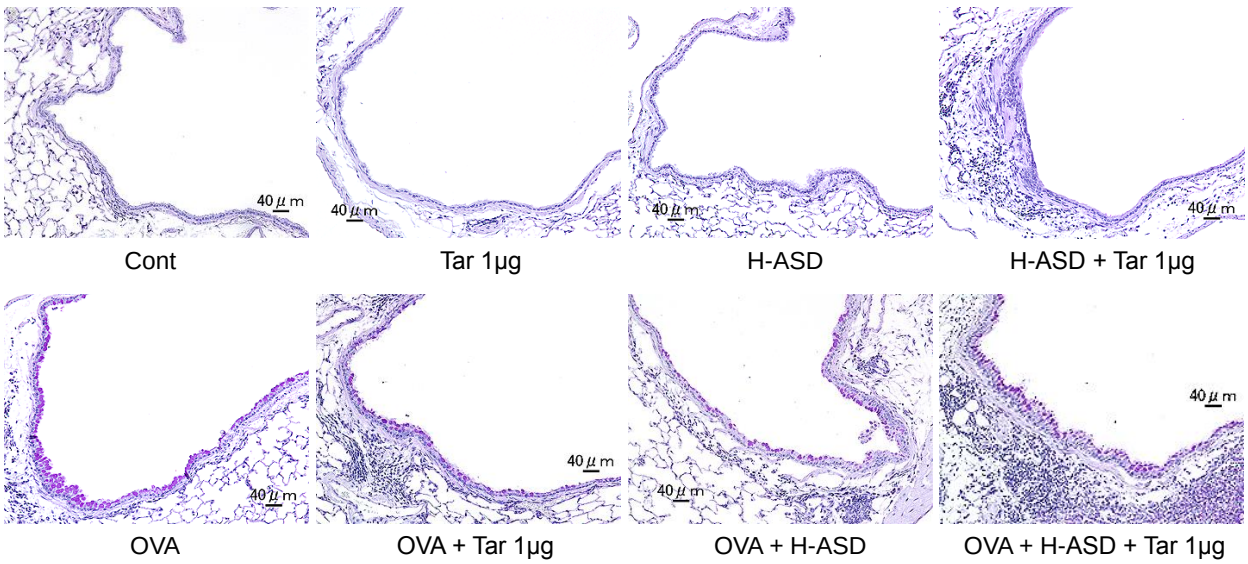

図(1)-1)-11. タール成分を投与したマウスの肺洗浄液中の炎症細胞数の変化

All values were expressed as mean ± SE. † $p < 0.001$ vs. Control,
* $p < 0.01$ vs. Control, § $p < 0.001$ vs.OVA, ¶ $p < 0.01$ vs. OVA, I $p < 0.001$ vs. ASD1,
‡ $p < 0.01$ vs. ASD1, ** $p < 0.001$ vs. ASD2, †† $p < 0.001$ vs. OVA+ASD1




図(1)-1)-12. タール成分を投与したマウスの肺洗浄液中のサイトカイン・ケモカインの変化

All values were expressed as mean ± SE. *$p$<0.05 vs. control; †$p$<0.05 vs. Tar 1.0; ‡$p$<0.05 vs. Tar 5.0; §$p$<0.05 vs. H-ASD; &$p$<0.05 vs. H-ASD + Tar 1.0; #$p$<0.05 vs. H-ASD + Tar 5.0; ¶$p$<0.05 vs. OVA; α$p$<0.05 vs. OVA + Tar 1.0; γ$p$<0.05 vs. H-ASD + OVA; £$p$<0.05 vs. H-ASD + OVA + Tar 1.0.




図(1)-1)-13. 黄砂と付着タール成分を投与したマウス気道粘膜上皮の粘液細胞増生

OVA + H-ASD + Tar 1μg群では気道上皮の著しい粘液細胞増生と気道粘膜下に著しい炎症細胞浸潤が認められる。

7）黄砂から分離した真菌成分のスギ花粉症増悪作用に対する量-反応関係に関する研究

黄砂から分離した*Bjerukandera*真菌のスギ花粉症増悪作用の量-反応関係を明らかにする目的で、スギ花粉モデルマウスに*Bjerukandera*の低濃度～高濃度を点鼻投与して、その増悪作用を比較した。その結果、表(1)-1)-3に示すごとく、*Bjerukandera*真菌（*B. ad*）2μg 量は鼻粘膜組織のIL-13を誘導し、加熱滅菌したH-ASDにはIL-1β、IL5、IL-6等の炎症性サイトカインを誘導する作用が認められた。スギ花粉抗原のCryj1は鼻粘膜組織のIL-6、IL-13、MCP-1やKCを誘導する作用が認められた。これら*B. ad*、H-ASD、Cryj1単独投与ではそれらのサイトカイン誘導は限られているが、*B. ad* + H-ASD + Cryj1の3者が加わると、鼻粘膜組織中のIL-1β、IL-6、MCP-1、KC産生が著しく誘導されることが明らかとなった。更に、鼻の病理学的な変化としは、これらの3者を加えた群では鼻粘膜上皮細胞の増生や上皮細胞の丈が長くなる変化が認められた。これらの結果より、黄砂（H-ASD）に*Bjerukandera*が加わるとスギ花粉によるアルギー性鼻炎が増悪されることが明らかとなった。

表(1)-1)-3. *Bjerkandera*、加熱黄砂、スギ花粉抗原を投与したマウスの鼻組織中の炎症性サイトカイン発現

| Group * | Animals | Cytokines and chemokines (pg protein/100mg) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | (n) | IL-1β | IL-5 | IL-6 | IL-13 | MCP-1 | Eotaxin | KC |
| Control | 8 | 28.8 ± 13.4 | 8.93 ± 2.38 | 23.3± 4.80 | 3.25 ± 1.18 | 31.1± 8.91 | 45.8 ± 20.2 | 164± 32.9 |
| Bjer 0.2μg | 8 | ND | 14.9 ± 4.24 | 29.9 ± 4.67 | 63.4± 16.3 | 35.7± 4.25 | 35.7 ± 9.69 | 185 ± 28.1 |
| Bjer 2μg | 8 | 23.1 ± 20.6 | 28.9 ± 4.47 | 42.5 ± 7.87 | 91.2± 17.4† | 38.1± 2.61 | 27.6± 4.64 | 184 ± 21.3 |
| H-ASD | 7 | 147 ± 24.0 | 36.9± 6.67† | 57.8 ± 11.9 | 13.1± 3.31 | 36.9± 6.31 | 40.0± 6.25 | 167± 25.3 |
| Cryj1 | 8 | 18.3 ± 5.44 | 10.6± 2.57 | 67.3 ± 14.9 | 118 ± 22.9† | 83.8± 16.8 | 22.8±5.47 | 1025± 207 |
| Cryj1 + Bjer 0.2μg | 8 | 142± 114 | 8.30 ± 2.04 | 56.3± 17.3 | 91.3± 14.9 | 40.8± 8.79 | 28.0 ± 4.11 | 401 ± 69.6 |
| Cryj1 + Bjer 2μg | 8 | 45.2 ± 20.7 | 11.5 ± 2.43 | 75.3 ± 11.6 | 106± 22.9† | 71.9 ± 10.3 | 19.3± 2.88 | 867± 107 |
| Cryj1 + H-ASD | 8 | 33.8 ± 13.4 | 7.31± 1.81 | 36.4 ± 8.88 | 74.2± 17.0 | 51.1± 13.5 | 18.8 ± 3.54 | 434 ± 102 |
| Cryj1 + H-ASD + Bjer 0.2μg | 8 | 505 ± 308 | 31.1± 12.6 | 376 ± 184†‡§††‡‡§§ | 128± 37.0†§ | 128 ± 40.8 | 49.6 ± 15.5 | 1791 ± 653†‡§‡‡§§ |
| Cryj1 + H-ASD + Bjer 2μg | 8 | 702 ± 239†§††¶¶§§ | 26.7 ± 6.61 | 362 ± 90.5†§††¶¶§§ | 66.1± 10.2 | 132 ± 56.3 | 58.8± 15.2 | 1611 ± 565†¶§§ |

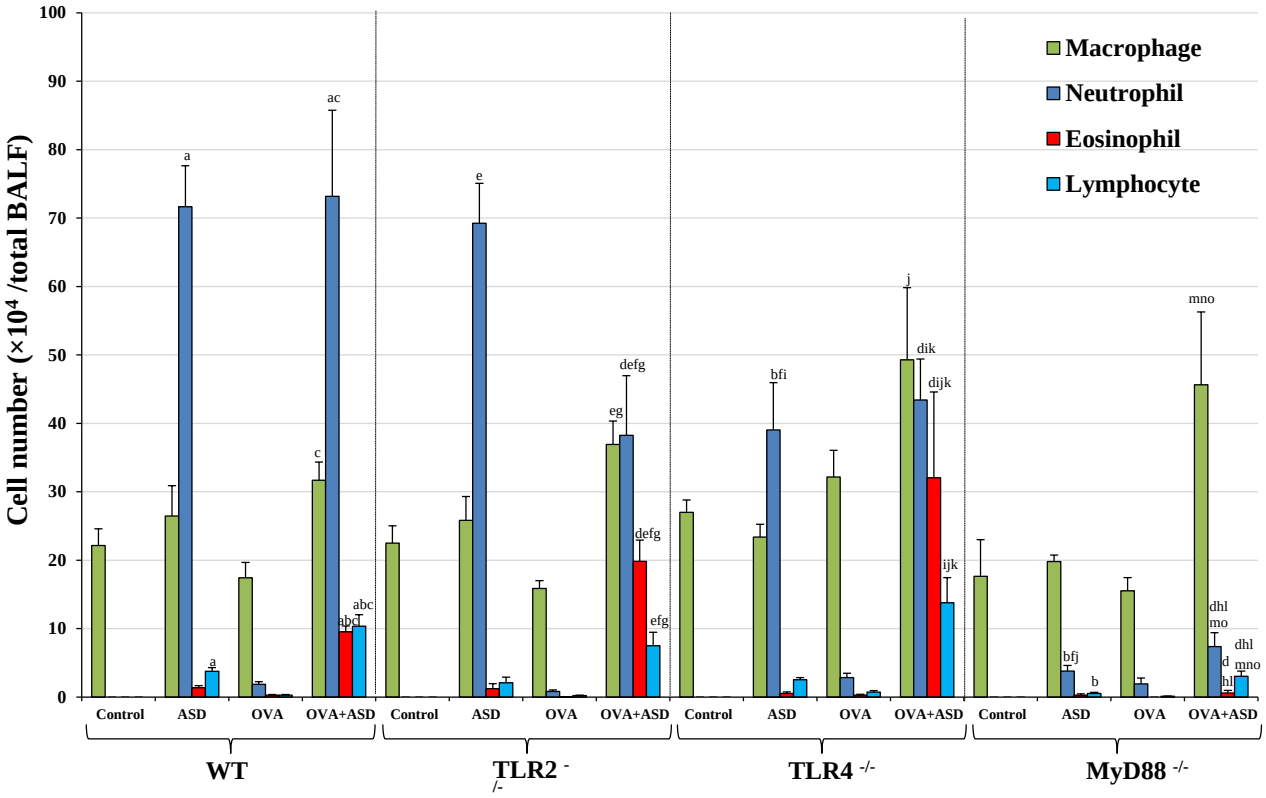
*All values were expressed as mean ± SE.

†p < 0.05 vs. Control ‡p < 0.05 vs. Bjer 2μg ¶p < 0.05 vs. Bjer 20μg §p < 0.05 vs. H-ASD

††p < 0.05 vs. Cryj1 ‡‡p < 0.05 vs. Cryj1+Bjer 2μg ¶¶p < 0.05 vs. Cryj1+Bjer 20μg §§p < 0.05 vs. Cryj1+ H-ASD

8）Toll様レセプターノックアウト（TLRs KO）マウスを用いた黄砂のアレルギー喘息増悪作用に関する研究

黄砂のアレルギー炎症増悪作用の起因物質（グラム陰性菌のリポポリサッカライド（LPS）・カビ成分のβ-グルカン）とそのメカニズムを明らかにする目的で、BALB/c系の野生型（WT）とTLR2KO、TLR4KO、MyD88KOマウスの4種のマウスを用いて、喘息モデルにてアレルギー増悪作用を比較した。その結果、TLR2KOマウスとTLR4KOマウスにはOVA (抗原)+黄砂投与によるアレルギー炎症増悪作用を抑制する効果は無く肺洗浄液中に好酸球が増加し、TLR4KOマウスはWTマウスよりもむしろ高かった (図(1)-1)-14)。しかし、TLR2やTLR4アダプター分子のMyD88 KOマウスでは好酸球や好中球の誘導が見られなかった (図(1)-1)-14)。

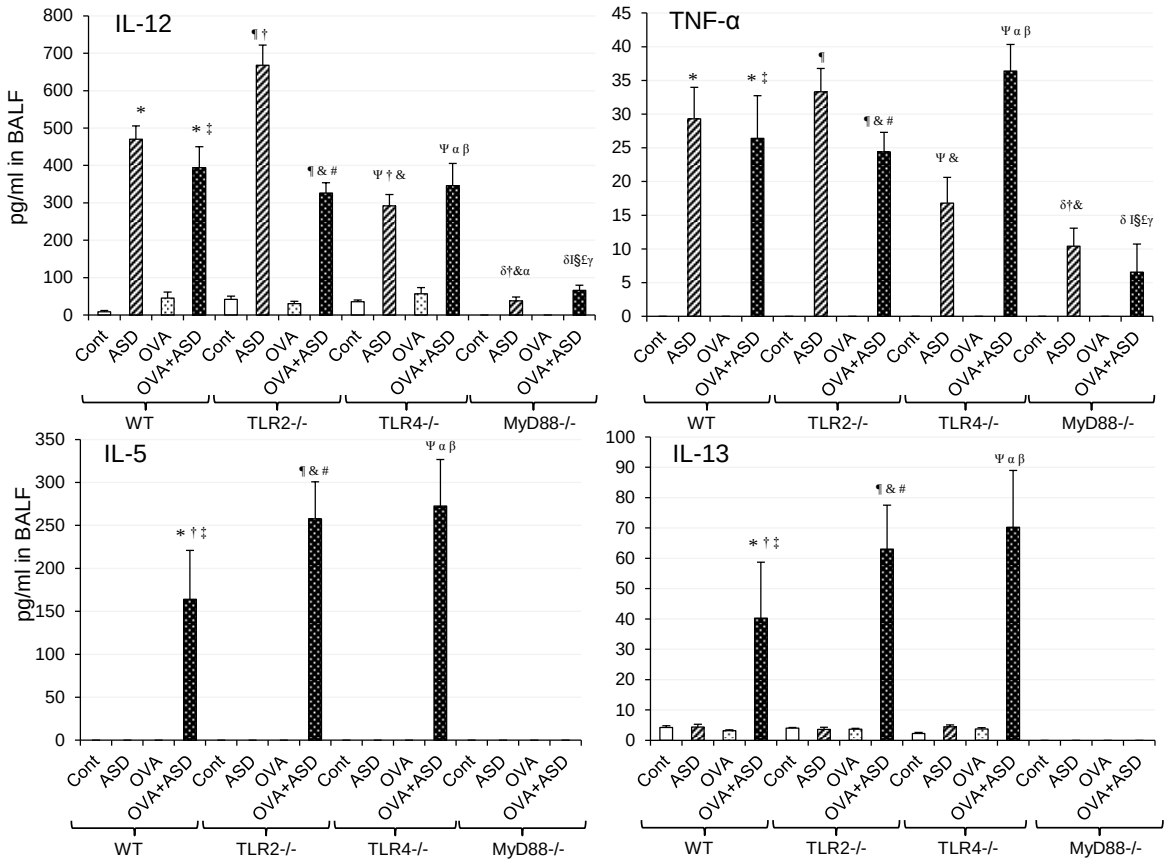



図(1)-1)-14. Toll様レセプターKOマウスの肺洗浄液中の炎症細胞の変化

All values expressed as mean ± SE.

[a]$p < 0.05$ vs. WT Control, [b]$p < 0.05$ vs. WT ASD, [c]$p < 0.05$ vs. WT OVA,
[d]$p < 0.05$ vs. WT OVA+ASD; [e]$p < 0.05$ vs. TLR2$^{-/-}$ Control, [f]$p < 0.05$ vs. TLR2$^{-/-}$ ASD,
[g]$p < 0.05$ vs. TLR2$^{-/-}$ OVA, [h]$p < 0.05$ vs. TLR2$^{-/-}$ OVA+ASD; [i]$p < 0.05$ vs. TLR4$^{-/-}$ Control,
[j]$p < 0.05$ vs. TLR4$^{-/-}$ ASD, [k]$p < 0.05$ vs. TLR4$^{-/-}$ OVA, [l]$p < 0.05$ vs. TLR4$^{-/-}$ OVA+ASD;
[m]$p < 0.05$ vs. MyD88$^{-/-}$ Control, [n]$p < 0.05$ vs. MyD88$^{-/-}$ ASD, [o]$p < 0.05$ vs. MyD88$^{-/-}$ OVA.

またTLR2KとTLR4KOマウスはアレルギー炎症（好酸球）を誘導するサイトカイン・ケモカインのIL-5、IL-13、Eotaxon、MCP-3、IL-12、KC (IL-8)に誘導が見られたが、MyD88KOでは殆ど誘導がなかった (図(1)-1)-15)。また野生型（WT）、TLR2KO、TLR4KOマウスでは血中の抗原特異的-IgE、IgG1が産生されているにも関わらず (図(1)-1)-16)、MyD88 KOマウスでは全く誘導されなかった。肺の病理学的変化に関して、WT、TLR2KOとTLR4KOマウスの気道は粘液細胞が著しく増加し(図(1)-1)-17)、気管支粘膜下にも著しい好酸球やリンパ球の浸潤 (図(1)-1)-18)が見られたが、炎症性サイトカインの誘導が見られなかったMyD88KOマウスは対照群の気道と殆ど変わらなかった (図(1)-1)-18)。これら結果から、黄砂のアレルギー増悪作用にはTLR2、TLR4とこれらのアダプター分子MyD88が非常に重要であること、TLR4のリガンドのLPSと共にTLR2のリガンドのβ-グルカンやペプチドグリカン（PGN）がアレルギーの増悪に関わっている可能性を示唆した (図(1)-1)-19)。更に、この結果から、Alumアジュバントが関わるNalp3 inflammasome系もこの増悪作用に関与していない可能性が示唆された。５）の細胞培養実験でも、黄砂はTLR2とTLR4を認識することは明らかであり、これらのリガンドがアレルギーの増悪に深く関わっていることが示唆された。




図(1)-1)-15. TLRs KOマウスの肺洗浄液中のサイトカインの変化.

All values were expressed as mean ± SE (n = 6),

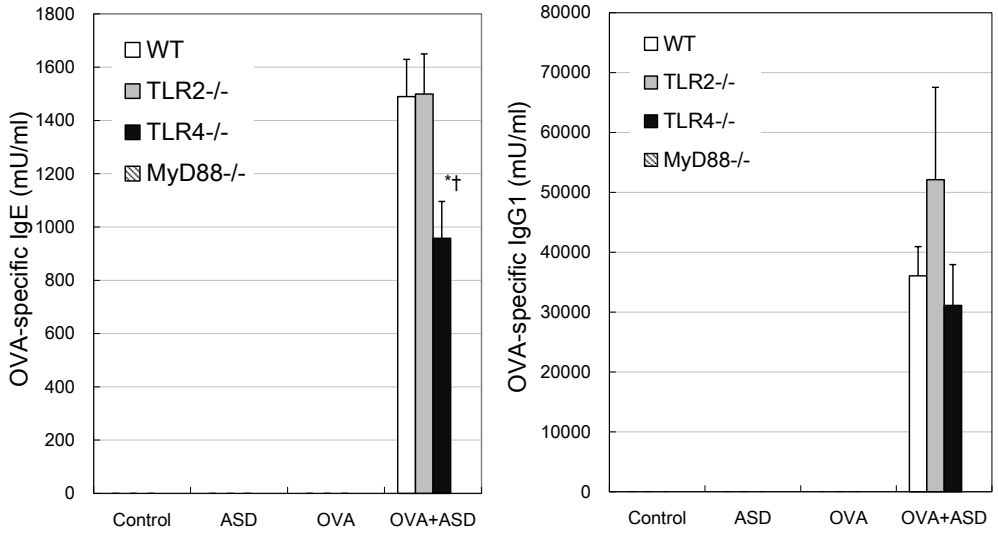
*$p$<0.05 vs. WT Control; $^{\dagger}p$<0.05 vs. WT ASD; $^{\ddagger}p$<0.05 vs. WT OVA;

$^{\S}p$<0.05 vs. WT OVA+ASD; $^{\P}p$<0.05 vs. TLR2-/-Control; $^{\&}p$<0.05 vs. TLR2-/-ASD;

$^{\#}p$<0.05 vs TLR2-/-OVA; $^{£}p$<0.05 vs. TLR-/-OVA+ASD; $^{\Psi}p$<0.05 vs. TLR4-/-Contro;

$^{\alpha}p$<0.05 vs. TLR4-/-ASD; $^{\beta}p$<0.05 vs. TLR4-/-OVA; $^{\gamma}p$<0.05 vs. TLR4-/-OVA+ASD;

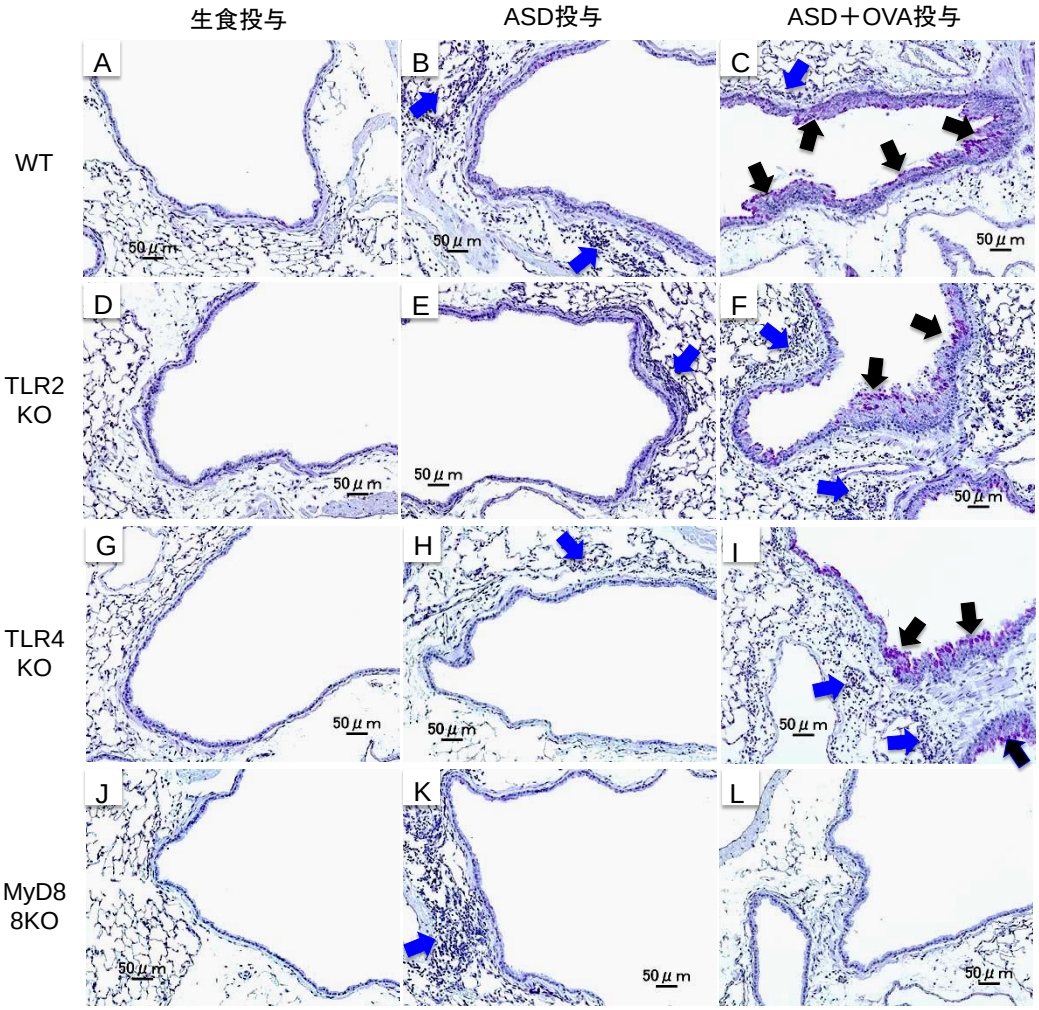
$^{\delta}p$<0.05 vs. MyD88 Control; $^{\lambda}p$<0.05 vs. MyD88-/-ASD; $^{I}p$<0.05 vs. MyD88-/-OVA.



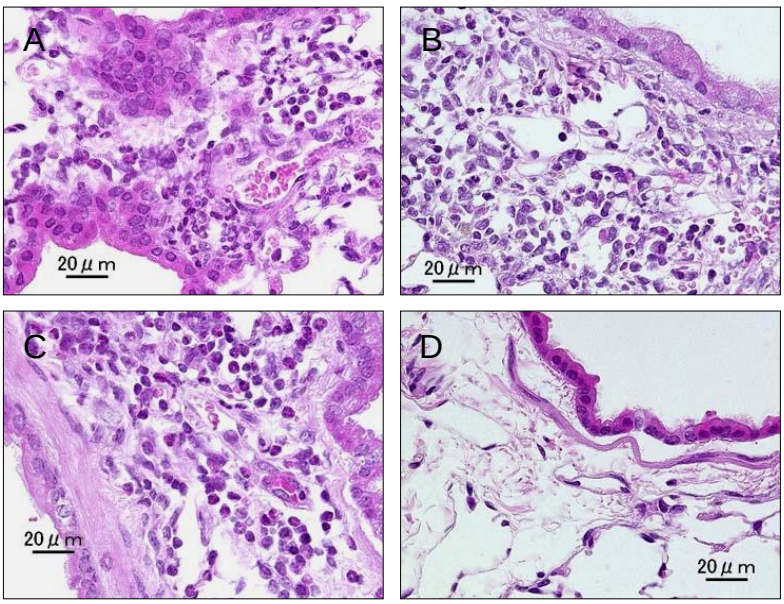

図(1)-1)-16. TLRs KOマウスの血清中の抗原特異的-IgEとIgG1の発現.

All values were expressed as mean ± SE (n = 6)

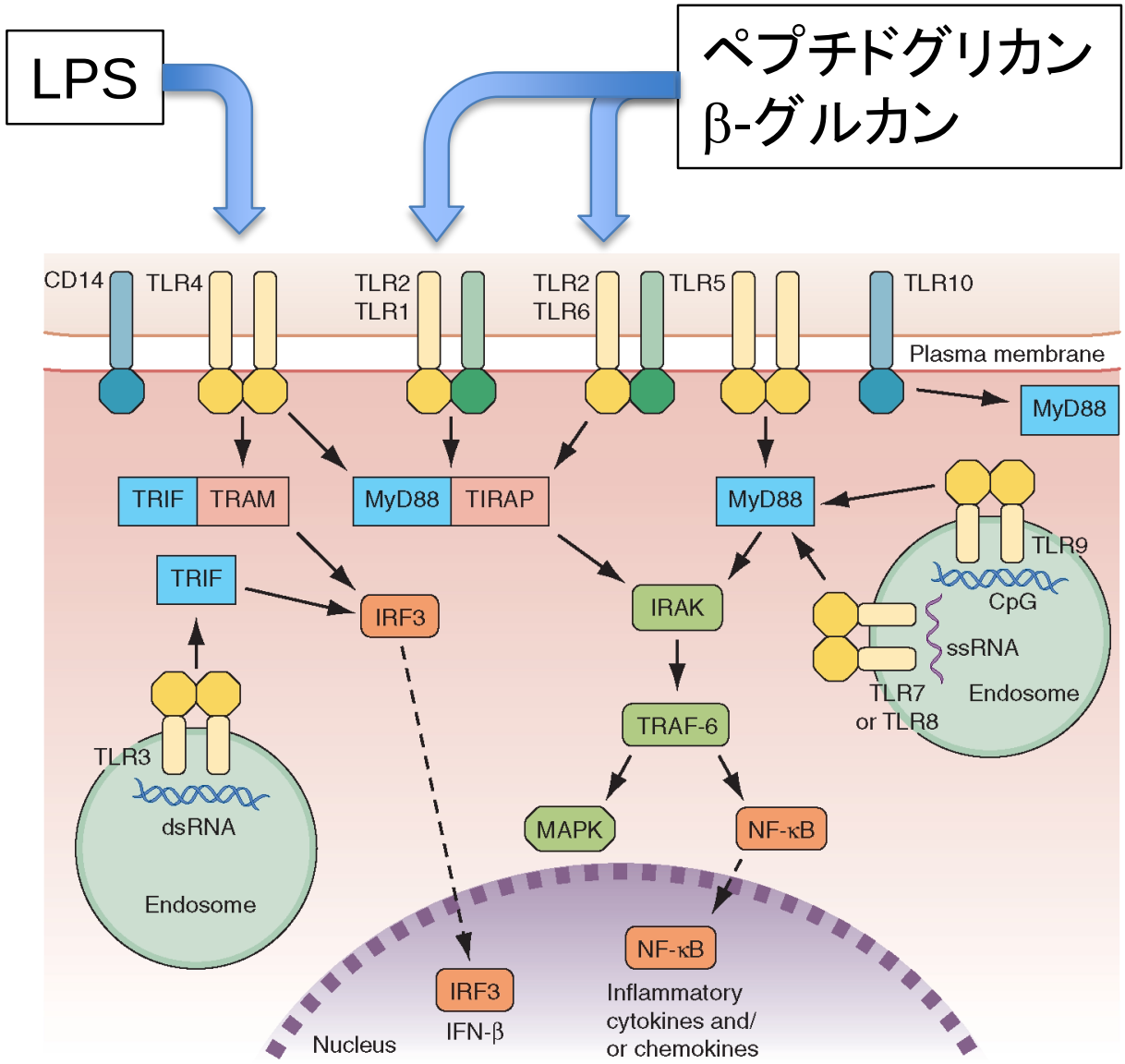
*$p$ < 0.05 vs. WT OVA+ASD, $^{\dagger}p$ < 0.05 vs. TLR2-/- OVA+ASD.




図(1)-1)-17. WT, TLR KO, MyD88 KOマウスに生食, ASD単独, ASD+OVAを投与した気道
ASD+OVA投与したWT, TLR2KO, TLR4KOの気道上皮は著しい粘液細胞(黒矢印)
が見れが, MyD88 KO マウスでは認められなかった。青矢印は気道粘膜下の炎症
細胞浸潤を示す。



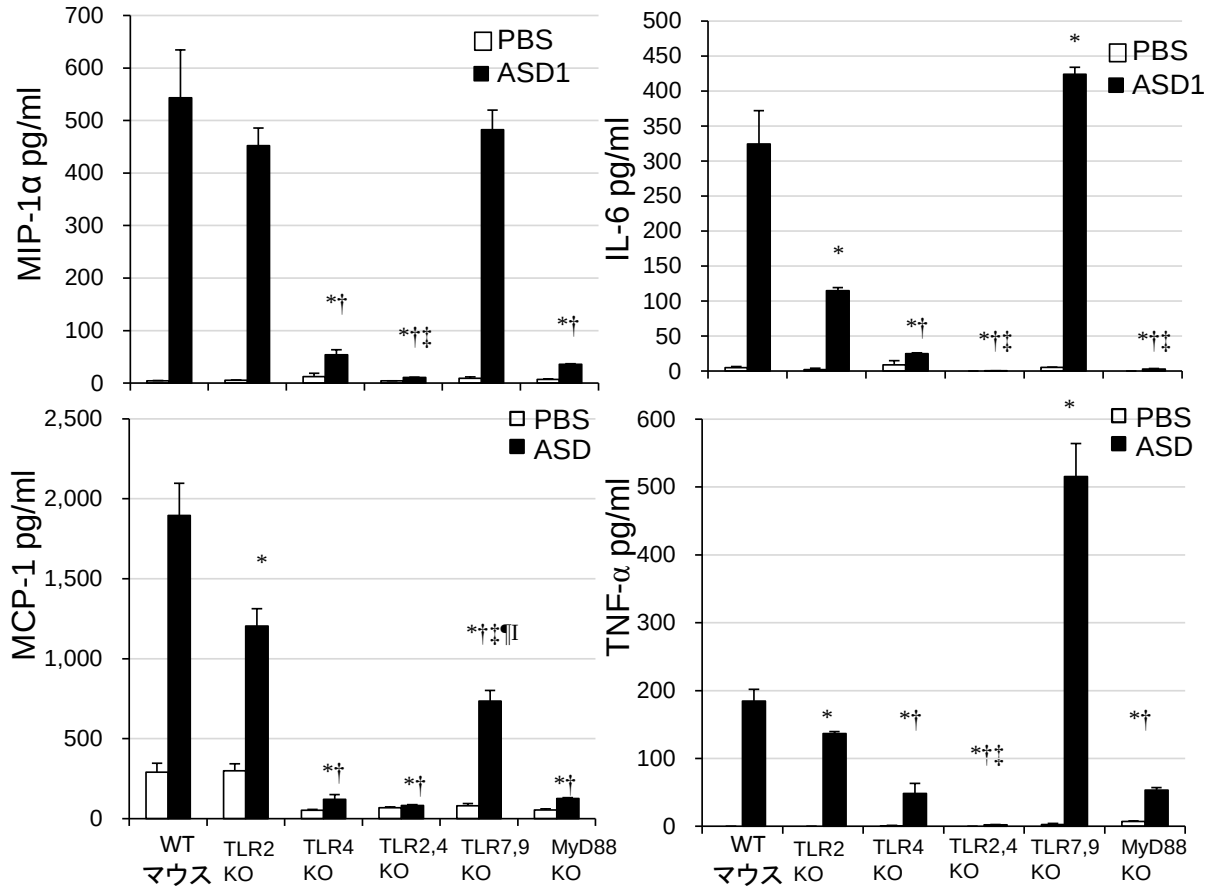

図(1)-1)-18. OVA+ASDを投与した
WT, TLR KO, MyD88KO
マウスの気道粘膜下の変
化
(A) WT:OVA+ASD,
(B) TLR2KO: OVA+ASD,
(C) TLR4KO: OVA+ASD,
(D)MyD88KO:OVA+ASD.
(D)は気道粘膜下に好酸
球浸潤が見られない.
A–D H&E stain.




図(1)-1)-19. Toll様受容体 (TLRs)による各種微生物成分 (LPS、ペプチドグリカン、β-グルカン)の認識

9）日本に飛来した黄砂のToll様レセプターノックアウト（TLRs KO）マウスの骨髄由来マクロファージを用いた炎症増悪因子のスクリーニング試験

日本に飛来した黄砂がどのTLRs（微生物由来の炎症起因物質に反応するセンサー：TLR4はリポポリサッカライド（LPS）；TLR2はβ-グルカンやペプチドグリカン）によって認識されるのかを、C57BL/6の野生型マウス(WT)、とTLR2欠損（KO）マウス、TLR4KOマウス、TLR2,4KOマウス、TLR7,9KOマウスとMyD88KOマウスの骨髄由来マクロファージ（BMDMs）を用いて培養液中に放出された炎症性サイトカイン量を比較した。マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞の細胞表面や細胞質エンドゾームには病原体分子パターン認識受容体（TLRs）が存在し、様々な微生物（ウイルス、細菌、真菌等）の構成成分を認識し、シグナル伝達を介して炎症性サイトカインを産生すると共に獲得免疫を誘導する。MyD88はTLR3以外のTLRsのアダプター分子として有し、TLR3以外のTLRsシグナル経路により共有されている。TLR2はグラム陽性菌のペプチドグリカン (PG)や真菌のβ-グルカンを認識し、TLR4はグラム陰性菌のLPSを認識し、エンドゾームにあるTLR7やTLR9はウイルスRNAやDNAを認識する。これらのBMDMsを黄砂で刺激すると図(1)-1)-20に示すように、培養液中の炎症性サイトカイン（IL-6、MCP-1、MIP-1α等）発現はMIP-1α、

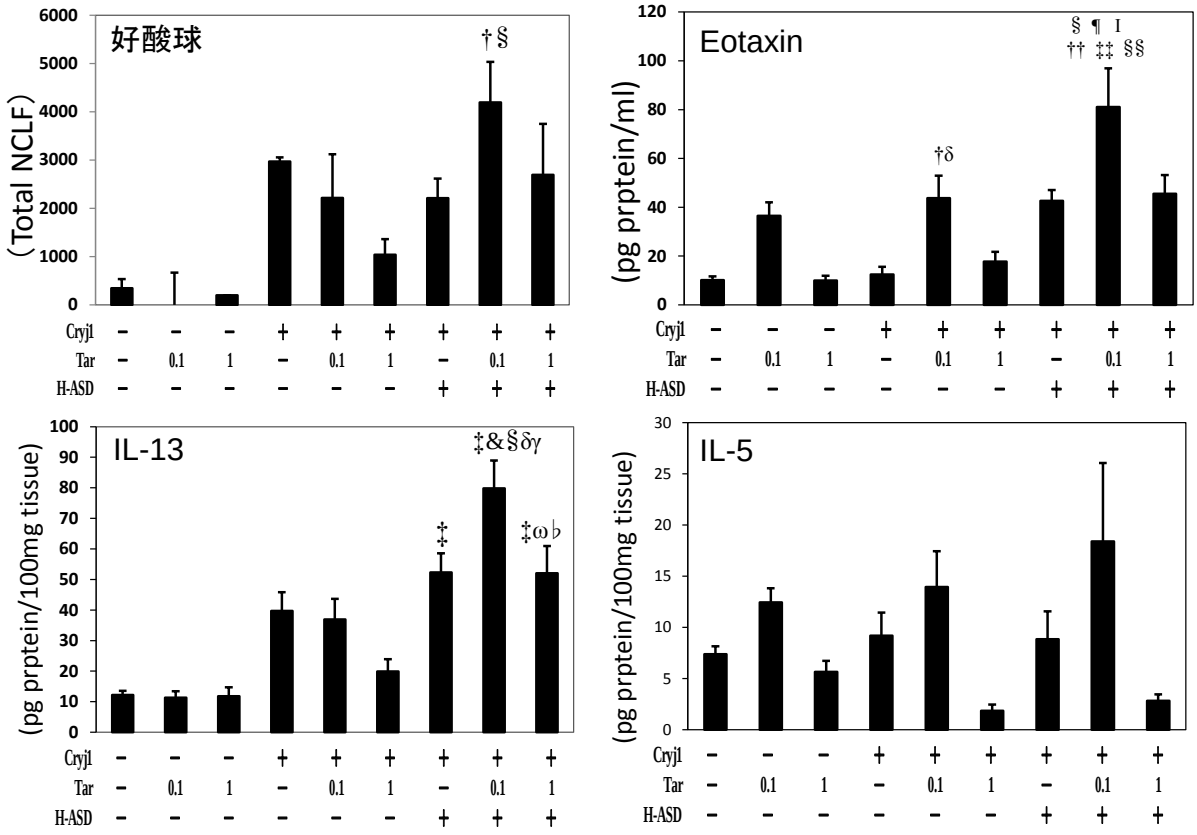



図(1)-1)-20. TLR KO BMDMsの細胞培養液の炎症性サイトカイン発現
TLRs KOマウスの骨髄由来マクロファージに日本に飛来した黄砂を添加。
12時間後の値　M ± SE.
*$p < 0.05$ vs. WT ASD, $^{\dagger}p < 0.05$ vs. TLR2-/- ASD, $^{\ddagger}p < 0.05$ vs. TLR4-/- ASD,
$^{\P}p < 0.05$ vs. TLR2,4-/- ASD, $^{I}p < 0.05$ vs. MyD88-/- ASD.

IL-6、MCP1とTNF-αが示すようにβ-グルカン受容体のTLR2欠損と、LPSの受容体のTLR4が欠損したBMDMsでは野生型(WT)マウスのBMDMsに比べて減少し、β-グルカン+LPS受容体のTLR2,4の両方が欠損したBMDMsでは殆ど発現が見られなかった。またTLR2とTLR4のアダプター分子でもあるMyD88欠損したBMDMsでも発現が誘導されなかった。一方、β-グルカンやLPS受容体が働くことができるWTマウスやTLR7,9KOマウスのBMDMsのサイトカイン発現はそれらよりも高かった。この結果から、黄砂はマクロファージのTLR2やTLR4によって認識され、MyD88を介して炎症性サイトカイン類の発現が誘導されるものと考えられ、それらのリガンドである黄砂に付着したβ-グルカンやLPSがその誘導に係っていることが強く示唆された。

１０）スギ花粉症モデルを用いた有機化合物質（Tar）のアレルギー増悪作用に関する研究

黄砂に付着した化石燃料燃焼由来タール成分のスギ花粉症増悪作用の量-反応関係を明らかにする目的で、スギ花粉とタール成分の低濃度と高濃度をマウスに点鼻曝露して増悪作用を比較した。その結果、抗原投与後20分間観察した鼻の掻痒感としての鼻かき回数は、対照群と比較して、どの群においても統計的に有意差は見られなかったが、Cryj1 + Tar 0.1μg群とCryj1 + H-ASD＋Tar 0.1μg群で増加傾向を示した。NCLF（鼻腔洗浄液）中の好酸球数は、Cryj1＋H-ASD＋Tar 0.1μg群で最も増加し、好酸球の遊走に関与するNCLF中のEotaxinと鼻の組織中のIL-13発現もこの群で最



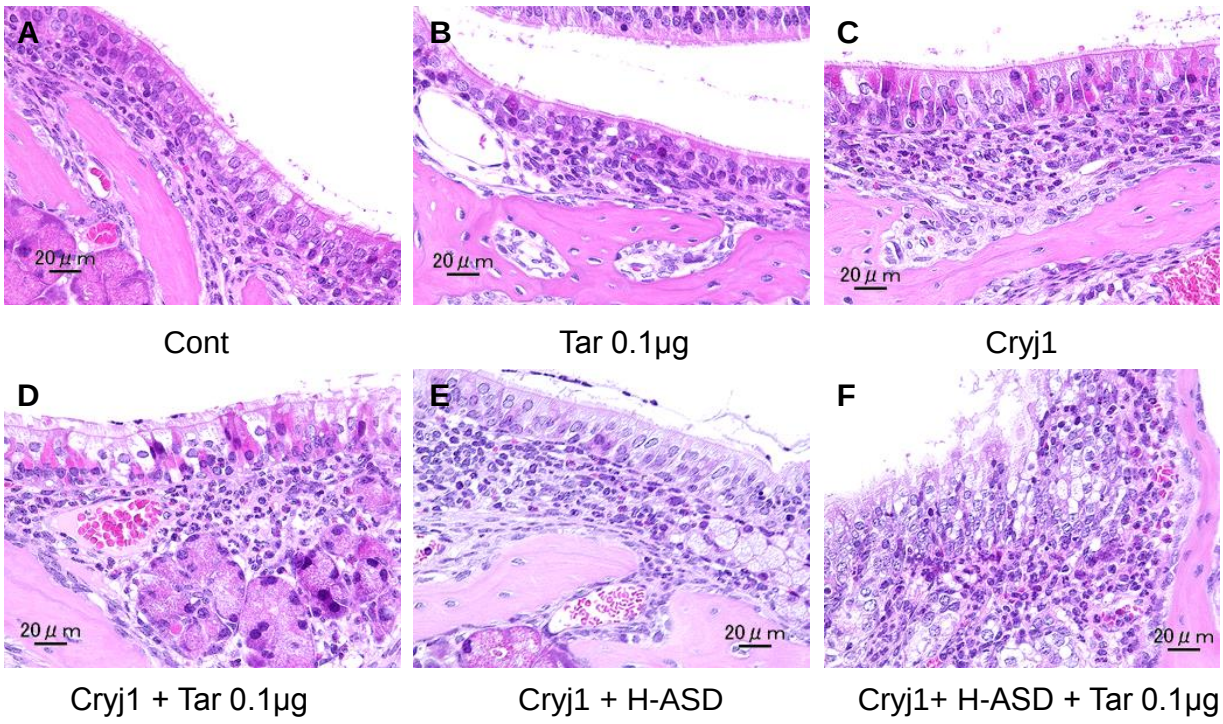

図(1)-1)-21. 鼻腔洗浄液中の好酸球数とEotaxinの発現（上段）と鼻組織中のIL-13とIL-5の発現（下段）

M± SE. $^{\dagger}p < 0.05$ vs. 対照群; $^{\S}p < 0.001$ vs. 対照群; $^{\P}p < 0.01$ vs. Cryj1;
$^{\delta}p < 0.05$ vs. Tar; $^{I}p < 0.001$ vs. Tar 0.1μg; $^{\dagger\dagger}p < 0.05$ vs. Cryj1 + Tar 0.1μg;
$^{\ddagger\ddagger}p < 0.05$ vs. Cryj1 + ASD; $^{\S\S}p < 0.05$ vs. Cryj1+H-ASD + Tar 1μg

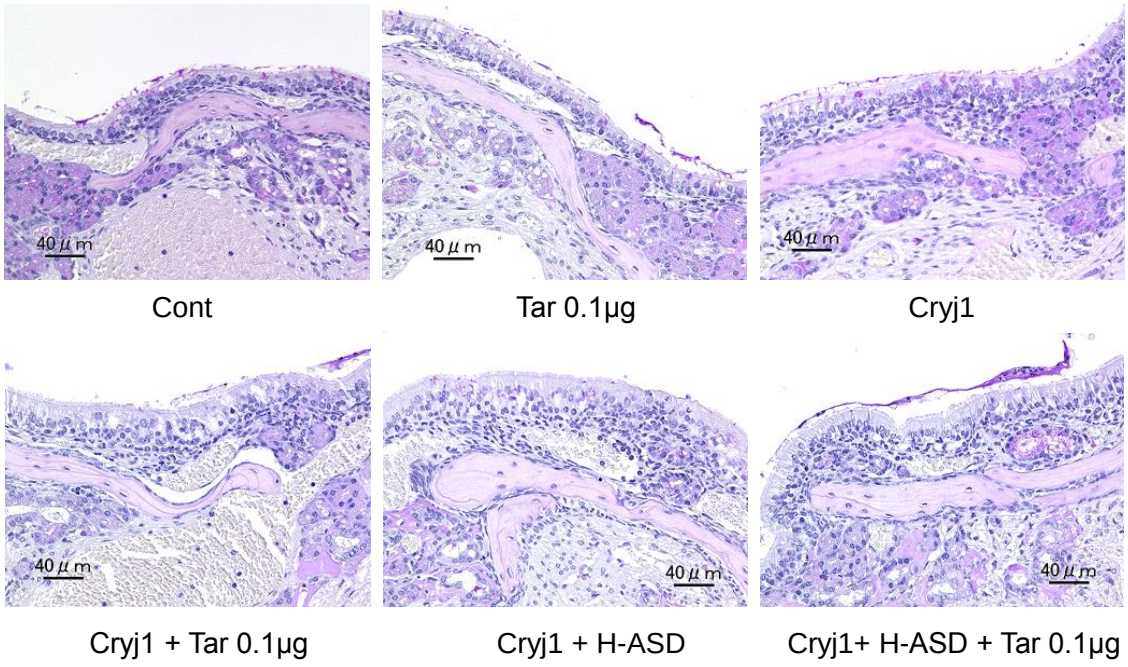
も増加していた (図(1)-1)-21)。

鼻組織中のIL-5もこの群で増加傾向を示した。鼻の病理学的変化として、対照群、Tar 0.1μg群とTar 1μg群では、鼻粘膜下に好酸球や好中球の浸潤は認められなかった (図(1)-1)-22)。これに対し、Cryj1を投与したマウスでは、粘膜下組織や粘膜上皮内に好酸球の浸潤が見られた。その中でも特にCryj1 + H-ASD＋Tar 0.1μg群における鼻粘膜下への好酸球浸潤が著しかった (図(1)-1)-22)。しかし、Cryj1 + H-ASD + Tar 0.1μgの鼻粘膜下への好酸球浸潤はCryj1 + H-ASD + Tar 0.1μg群よりも軽度であった。Cryj1を投与したマウスでは、鼻粘膜上皮細胞の増生や上皮細胞の丈が長くなる変化が認められ、特にCryj1 + H-ASD群やCryj1 + H-ASD + Tar 0.1μg群で著しかった (図(1)-1)-22)。さらにPAS染色では、Cryj1 + H-ASD＋Tar 0.1μg群における鼻粘膜上皮細胞の肥大が認められ、粘膜下層において浮腫性変化も認められた。また、Cryj1 + H-ASD＋Tar 0.1μg群では鼻粘膜上皮細胞に粘液栓も認められた (図(1)-1)-23)。

これらの結果より、Cryj1 + H-ASD + Tar 0.1μg群のスギ花粉症が強く起こっていたことから、加熱黄砂（H-ASD）に大気汚染物質由来のタール成分が加わるとスギ花粉によるアルギー性鼻炎が増悪されることが明らかとなった。




図(1)-1)-22. スギ花粉症マウスモデルにおける黄砂と付着タール成分の鼻腔粘膜の変化
C~Fは鼻粘膜下に好酸球浸潤を認める. Cryj1+HASD+0.1μg群では好酸球浸潤が著しい。HE染色

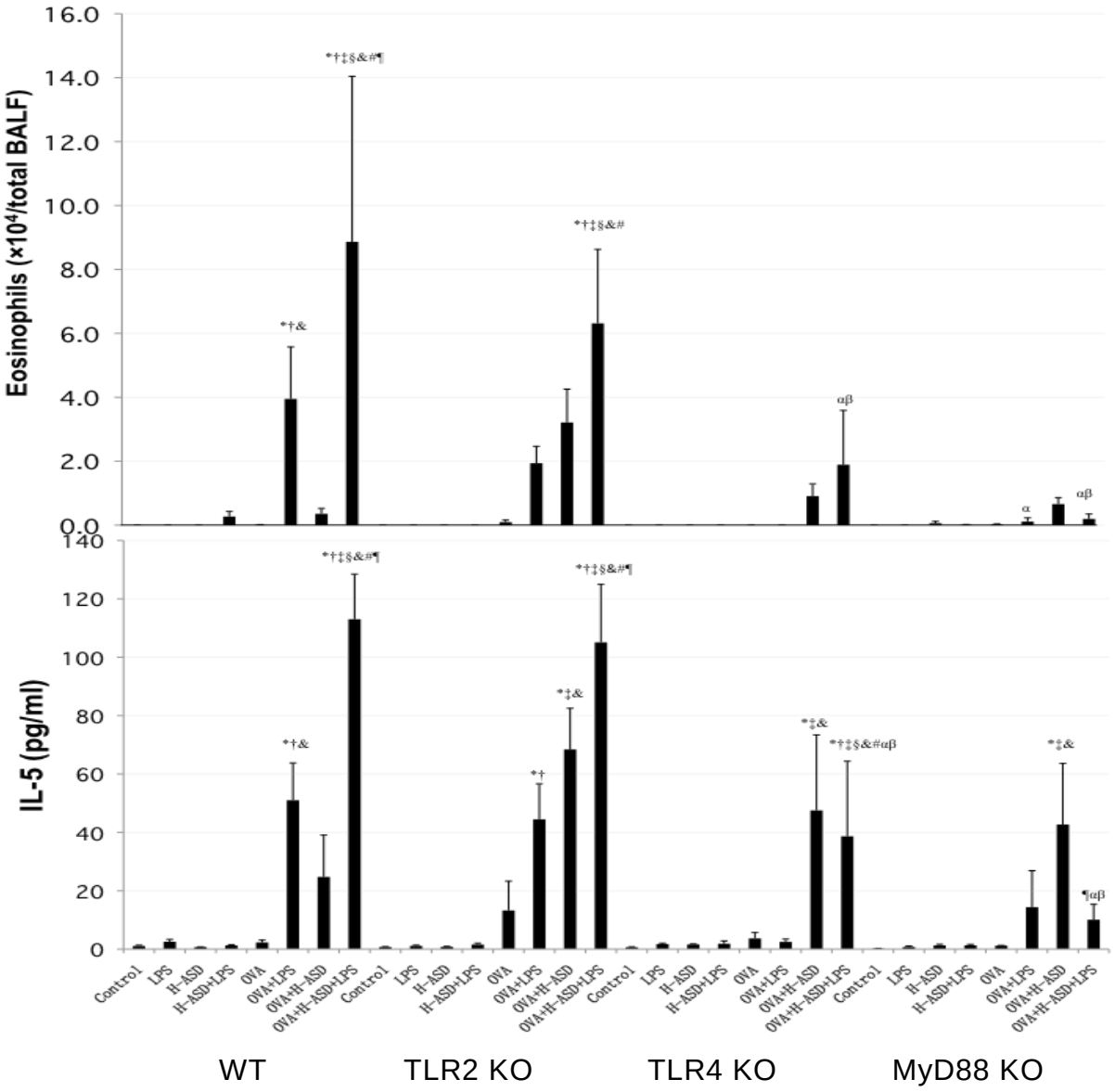



図(1)-1)-23. スギ花粉症マウスモデルにおける黄砂と付着タール成分の影響
Cryj1, H-ASDとTar 投与群では鼻粘膜上皮細胞の肥大と粘膜下層の浮腫性変化が認められる。PAS染色

１１）Toll様レセプターノックアウト（TLRs KO）マウスを用いた黄砂と細菌毒素成分LPSのアレルギー喘息増悪作用に関する研究

黄砂に付着したLPSのアレルギー炎症増悪メカニズムを明らかにするために、BALB/c系の野生型（WT）とTLR2欠損（KO)、TLR4KO、 MyD88KOマウスを用いて、アレルギー喘息モデルにて調べた。その結果、気管支・肺胞洗浄液（BALF）中の好中球数は野生型（WT）とTLR2KOマウスのLPS単独投与群では対照群に比較して有意な増加を示したが、H-ASD + LPS群とOVA + H-ASD + LPS群で著しい増加を示した。しかし、TLR4KOマウスは僅かであり、MyD88KOマウスでは殆ど増加が見られなく、好中球性の炎症は抑えられていた。OVAを投与した群では図(1)-1)-24に示すごとく、WTマウスではOVA + LPS群で好酸球数が増加し、OVA + H-ASD + LPS群では著しい好酸球数の増加が認められた。TLR2KOマウスのOVA + H-ASD + LPS群では好酸球数の増加を示したが、WTマウスのOVA + H-ASD + LPS群に比較して40％低かった。TLR4KOマウスではTLR2KOマウスの1/3程度となり、MyD88KOマウスは、殆ど好酸球誘導は認められなかった (図(1)-1)-24)。リンパ球に関しても好酸球と同様の傾向を示した。

4種類のマウスの鼻洗浄液中の好酸球誘導に係るケモカインのEotaxinや同誘導に係るTh2サイトカインIL-5発現 (図(1)-1)-24)も、好酸球数とおおよそ対応していた。しかし、TLR4KOマウスやMyD88KOマウスのOVA+H-ASD群でもWTやTLR2KOマウスほどではないがそれらの発現が認められた。一方、血清中のOVA特異的IgEとIgG1の誘導はIL-5の発現と類似しており (図(1)-1)-25)、OVA+H-ASD群でもWTやTLR2KOマウスほどではないが誘導が見られた。

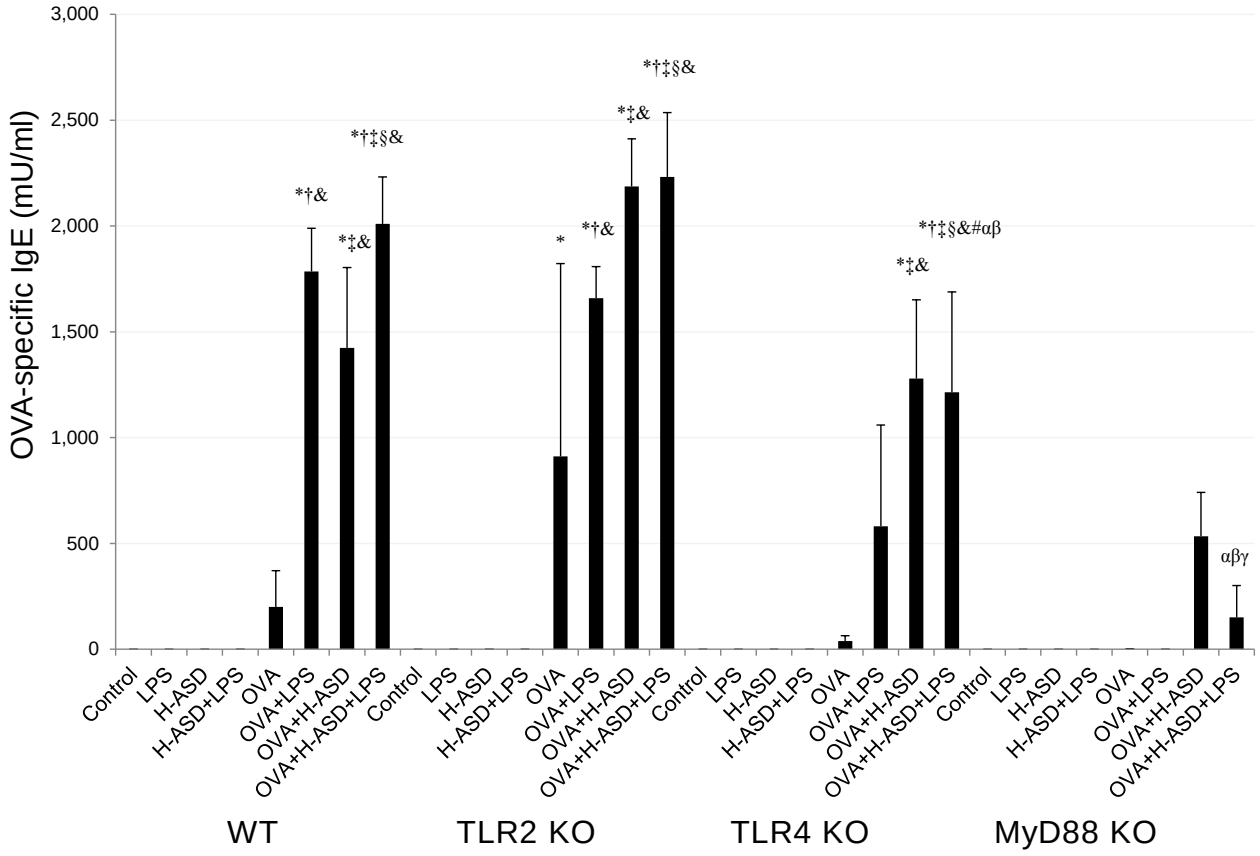



図(1)-1)-24. WT, TLR2KO, TL4KO, MyD88KOマウスの肺洗浄液中の好酸球数とIL-5の発現
M ± SE. A：好酸球数；B：IL5の発現
*$p$<0.05 vs. control; $^{\dagger}p$<0.05 vs. LPS;$^{\ddagger}p$<0.05 vs. H-ASD; $^{\S}p$<0.05 vs. H-ASD+LPS;
$^{\&}p$<0.05 vs. OVA; $^{\#}p$<0.05 vs. OVA+LPS; $^{\P}p$<0.05 vs. OVA+H-ASD; $^{\alpha}p$<0.05 vs. WT;
$^{\beta}p$<0.05 vs. TLR2;$^{\gamma}p$<0.05 vs. TLR4

肺の病理学的な観察では、WTとTLR2KOマウスのOVA+H-ASD+LPS群では気道上皮の粘液細胞増生や気道粘膜下の好酸球浸潤が顕著にみられたが、TLR4KOマウスではそれよりも弱く、MyD88KOマウスでは軽微、もしくは病態の発現が観察されなかった。

これらの結果から、WTやTLR2KOマウスでは、LPSは（OVA+H-ASDの存在下）TLR4を介してTh2の誘導と抗体産生を高めるが、TLR4KOマウスのOVA+H-ASD+LPS群でも弱いながらもTh2への誘導（IL-5、IL-13増加）と抗体産生が見られ、また、MyD88KOマウスでは更に弱い誘導が認められた。TLR4欠損マウスのOVA+H-ASD群を見ると、弱いながらもTh2へのシフトと抗体産生

が見られていることから、TLR4KOマウスのOVA+H-ASD+LPS群のTh2への誘導はLPSの作用というよりは、むしろOVA+H-ASDによるTh2への誘導かも知れない。MyD88KOマウスを見ると、おおよそTh2への誘導が抑えられることから、H-ASDによる細胞障害がデインジャーシグナルとなってTLR4やTLR2を介してTh2への誘導を起こしている可能性を示唆した。

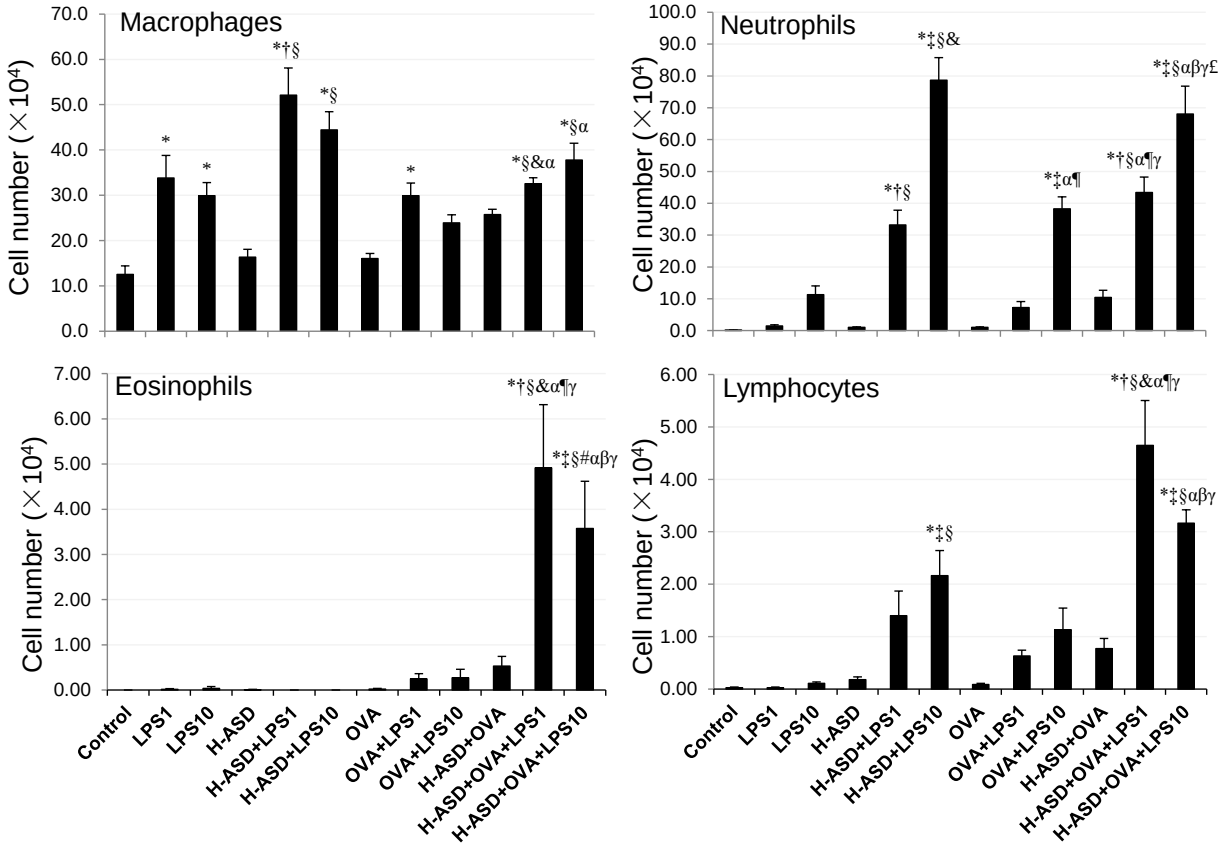



図(1)-1)-25. OVAと加熱黄砂とLPSをTLRKOマウスに投与したマウスの血清中の抗原特異的-IgEの変化.
M± SE. OVA=4μg; LPS=50ng投与
*$p$<0.05 vs. control; †$p$<0.05 vs. LPS; ‡$p$<0.05 vs. H-ASD; §$p$<0.05 vs. H-ASD+LPS; &$p$<0.05 vs. OVA; #$p$<0.05 vs. OVA+LPS; ¶$p$<0.05 vs. OVA+H-ASD; α$p$<0.05 vs. WT; β$p$<0.05 vs. TLR2; γ$p$<0.05 vs. TLR4

１２）黄砂付着レベルの細菌感染毒素成分LPSの肺炎増悪作用と抗原併用曝露によるアレルギー増悪作用に関する研究

LPSが黄砂のアレルギー増悪因子であることが確証するための再現実験として、滅菌黄砂（360℃30分加熱滅菌黄砂：H-ASD）、LPS+滅菌黄砂+卵白アルブミン（OVA）を気道曝露して、それぞれの増悪作用をマウス喘息モデルにて調べた。気管支・肺胞洗浄液（BALF）中の炎症細胞数に関して、LPS1ngは好中球の誘導を起こさず、LPS10ngでは若干の好中球数の誘導を認めた。H-ASD群も好中球数の増加は認められなかった。しかし、H-ASD+LPS1ng群では対照群比較して好中球の有意な増加を認め、H-ASD+LPS10ng群では著しい増加を認めた。OVA+LPS群や

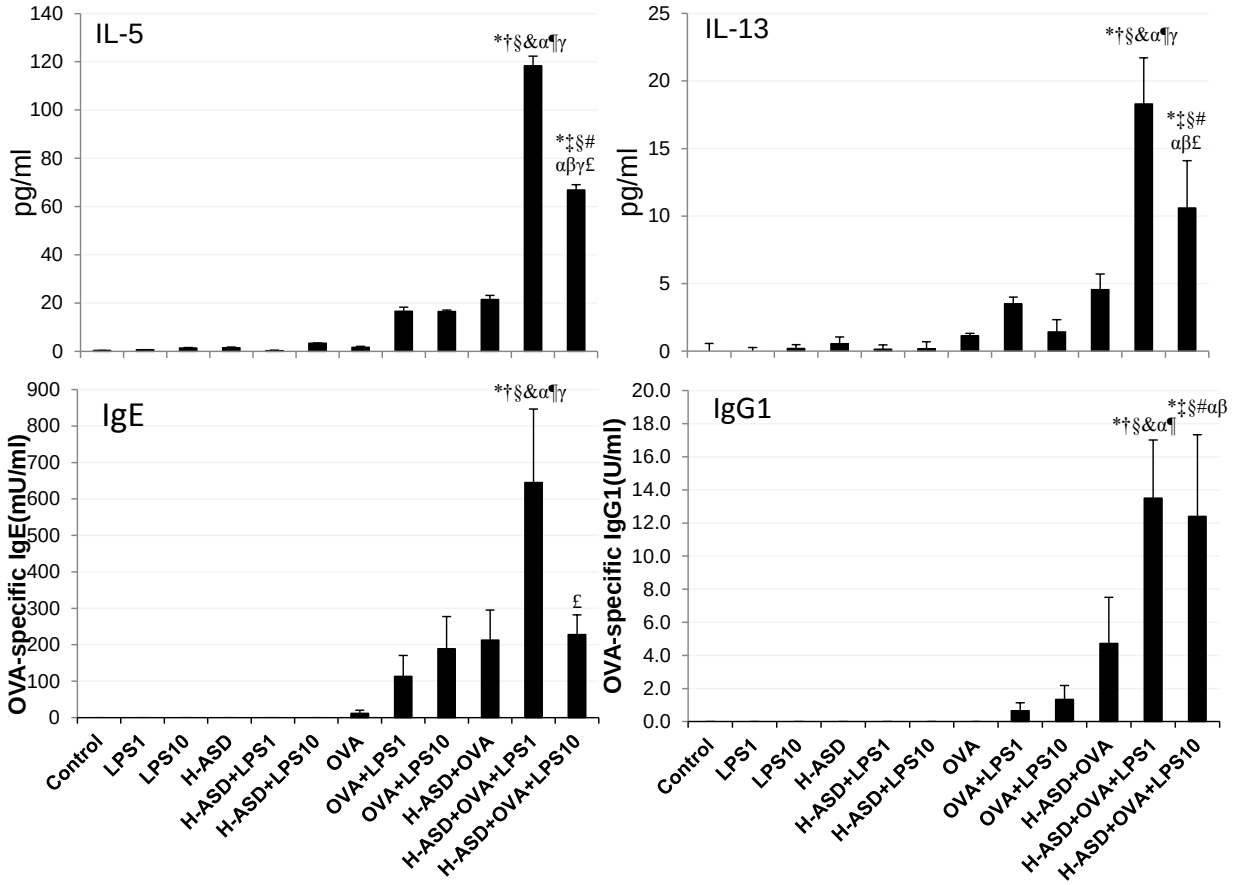
OVA+H-ASD+LPS群のBALF中の好酸球数はOVA単独群と比較して有意な増加が見られ (図(1)-1)-26)、特にOVA+H-ASD+LPS1ng群で顕著であった。BALF中のサイトカイン類はLPS群ではLPS10ng群においてIL-12の有意な増加を認めたのみで、他のサイトカイン類の誘導は認めらなかった。しかし、LPS10ngにH-ASDが加わるとIL-6、IL-12、TNF-αやRANTESが著しく誘導された。一方、OVA+H-ASD+LPS1ng群の好酸球遊走活性にあずかるIL-5やIL-13 (図(1)-1)-27)の発現、血清中のOVA特異的IgE抗体産生量は他のOVA投与群と比較すると最も高かった (図(1)-1)-27)。肺の病理学的な観察においてもOVA+H-ASD+LPS1ng群では気道上皮の粘液細胞化や気道粘膜下の好酸球浸潤が顕著にみられた (図(1)-1)-28)。しかし、LPSを増量して投与したOVA+H-ASD+LPS10ng群ではOVA+H-ASD+LPS1ng群に比較すると、好酸球数やサイトカイン発現、抗体産生量はむしろ低下傾向を示した (図(1)-1)-26、27)。また、肺の病態も減じられていた (図(1)-1)-27)。




図(1)-1)-26. 黄砂, OVAとLPSを投与したマウスの肺洗浄液中の炎症細胞の変化

All values were expressed as mean ± SE (n = 8).

*$p$<0.05 vs. control; $^{\dagger}p$<0.05 vs. LPS 1; $^{\ddagger}p$<0.05 vs. LPS 10; $^{\S}p$<0.05 vs. H-ASD; $^{\&}p$<0.05 vs. H-ASD + LPS 1; $^{\#}p$<0.05 vs. H-ASD + LPS 10; $^{\alpha}p$<0.05 vs. OVA; $^{\P}p$<0.05 vs. OVA + LPS 1; $^{\beta}p$<0.05 vs. OVA + LPS 10; $^{\gamma}p$<0.05 vs. H-ASD + OVA; $^{£}p$<0.05 vs. H-ASD + OVA + LPS 1




図(1)-1)-27. 肺洗浄液中のth2サイトカインIL-5とIL13の変化と血中OVA-特異的IgEとIgG1の変化

All values were expressed as mean ± SE (n = 8).

*$p$<0.05 vs. control; $^{\dagger}p$<0.05 vs. LPS 1; $^{\ddagger}p$<0.05 vs. LPS 10;

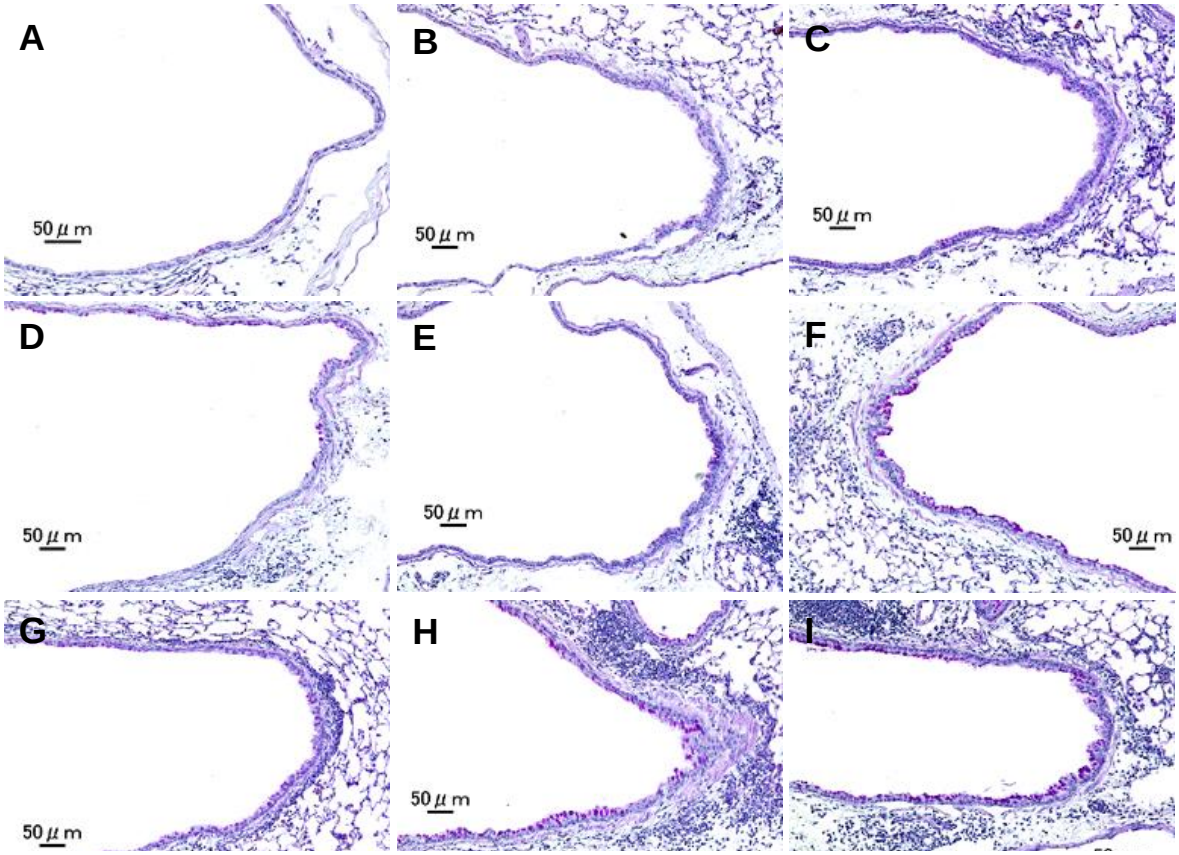
$^{\S}p$<0.05 vs. H-ASD; $^{\&}p$<0.05 vs. H-ASD + LPS 1;

$^{\#}p$<0.05 vs. H-ASD + LPS 10; $^{\alpha}p$<0.05 vs. OVA;

$^{\P}p$<0.05 vs. OVA + LPS 1; $^{\beta}p$<0.05 vs. OVA + LPS 10;

$^{\gamma}p$<0.05 vs. H-ASD + OVA; $^{£}p$<0.05 vs. H-ASD + OVA + LPS 1.

以上の結果より黄砂に付着しているレベルのLPS量は黄砂と共同することで、好中球性の肺炎を著しく悪化し、これに抗原（OVA）が加わることで好酸球性気道炎症（喘息様病態）を著しく悪化し、LPS量が10ngになるとその反応が抑制されることが明らかとなった。




図(1)-1)-28. 黄砂、LPSとOVAを経気道曝露したマウスの気管支の病理学的変化
(**A**)Control; (**B**) H-ASD + LPS 1 alone; (**C**) H-ASD + LPS 10; (**D**) OVA alone;
(**E**) OVA + LPS 1; (**F**) OVA + LPS 10; (**G**) H-ASD + OVA;
(**H**) H-ASD + OVA + LPS 1; (**I**) H-ASD + OVA + LPS 10.
(**A**–**I**) PAS stain; bar = 50 μm.

（２）黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による生殖器系への影響とそのメカニズム解明

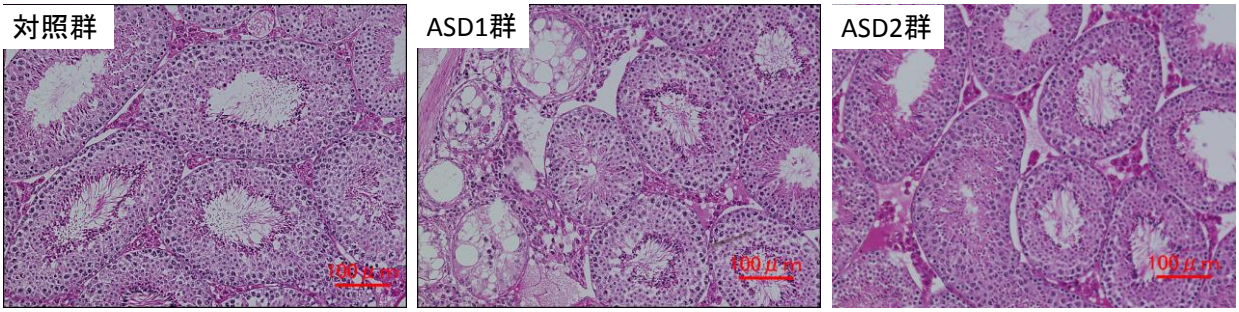
１）砂イベントの異なる２種類の風送黄砂の雄性生殖機能への影響

複数の黄砂イベントにおける雄性生殖機能への影響を明らかにすることを目的に、2011 年に発生した 2 つの黄砂イベント時に採取した風送黄砂を成獣に経気道曝露して、精子形成や精子性状、性ホルモン等への影響を比較検討した。その結果、黄砂曝露による造精機能に対する影響を検討したところ、DSP が対照群と比較して、ASD1 群で 24%減少した (表(1)-2)-1)。ASD2 群の造精機能に有意な変動は認められなかった。また、精細管の一部空胞化が ASD1 群で生じ、さらに精細間質水腫が ASD1 群および ASD2 群で認められた (図(1)-2)-1)。これらのことから、ASD1 による DSP の低下は精細管の空胞化が関与する可能性が示唆された。

表(1)-2)-1. 成獣の黄砂曝露による造精機能への影響

| | 対照群 | ASD1群 | ASD2群 |
|---|---|---|---|
| DSP(×$10^6$) | 12.3±4.00 | 9.4±2.10* | 11.9±3.98 |
| DSP/g(×$10^6$) | 19.2±5.72 | 16.1±4.05 | 19.6±6.11 |

平均値±標準偏差　　*: $p$ <0.05




図(1)-2)-1. 黄砂曝露による精巣組織への影響
ASD1群において精細管の空胞化、精巣間質の水腫が認められる。
ASD2群において精巣間質の水腫が認められる。
HE染色; bar = 100 μm.

黄砂曝露による精子性状に対する影響を検討したところ、精子運動率が対照群と比較して ASD1 群で 17%減少した (表(1)-2)-2)。一方、ASD2 群の精子性状に有意な変動は認められなかった。黄砂曝露による血清ホルモンに対する影響を検討したところ、血清テストステロン濃度

表(1)-2)-2. 成獣の黄砂曝露による精子運動率への影響

| | 対照群 n=16 | ASD1群 n=16 | ASD2群 n=16 |
|---|---|---|---|
| Motility | 0.62 ±0.11 | 0.52 ±0.15* | 0.54 ±0.10 |
| Progressive | 0.28 ±0.07 | 0.24 ±0.09 | 0.24 ±0.06 |
| Non-Progressive | 0.33 ±0.06 | 0.27 ±0.06** | 0.30 ±0.05 |

平均値±標準偏差　　*: $p$ <0.05, **: $p$<0.01

は対照群と比較して ASD1 群で約 3 倍増加した。一方 ASD2 群の血清テストステロン濃度に有意な変動は認められなかった (表(1)-2)-3)。

表(1)-2)-3. 成獣の黄砂曝露による血清ホルモンへの影響

| | 対照群 | ASD1群 | ASD2群 |
|---|---|---|---|
| | n=8 | n=8 | n=8 |
| T (ng/ml) | 10.65±7.46 | 33.05±24.65* | 8.61±7.89 |
| LH (ng/ml) | 1.73±3.34 | 4.91±4.47 | 1.32±3.16 |
| FSH (ng/ml) | 0.03±0.07 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 |

平均値±標準偏差　　*: $p$ <0.05

２）黄砂に付着した微生物の雄性生殖機能への影響

黄砂に付着した微生物の雄性生殖機能への影響を明らかにすることを目的に、熱処理黄砂と微生物（*Nocardiopsis*）をマウスに経気道曝露して精子形成や精子性状、性ホルモンへの影響を検討した。その結果、黄砂の影響因子の解明を行うため、ASD1により変動が認められた造精機能について黄砂付着微生物の*Nocardiopsis*を用い検討した結果、DSPが対照群と比較して*Nocardiopsis*群で35%減少した (表(1)-2)-4)。

表(1)-2)-4. 成獣に対する黄砂付着微生物による造精機能への影響

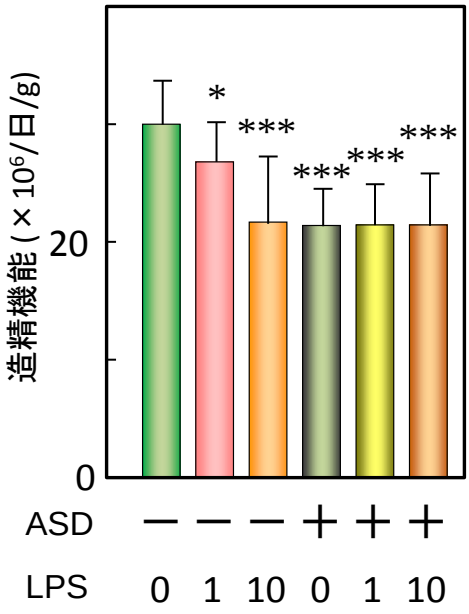
| | 対照群 | 微生物群 |
|---|---|---|
| | n=14 | n=12 |
| DSP(×$10^6$) | 14.9±4.9 | 9.6±3.9** |
| DSP/g(×$10^6$) | 22.9±7.6 | 16.5±5.9* |

平均値±標準偏差 *: $p$ <0.05　**: $p$<0.01

３）黄砂付着生物成分LPSの雄性生殖機能への影響に関する研究

黄砂に付着している微生物 (グラム陰性桿菌)の構成成分による雄性生殖機能への影響に関する量-反応関係を明らかにする目的で、マウスにLPSを経気道曝露して、造精機能、精子性状への影響を比較検討した。その結果、加熱黄砂 (H-ASD)投与あるいはLPS投与により、対照群と比較して精細管障害割合が有意に増加した。特にLPS-100ngを投与したLPS-100ng群およびH-ASD+LPS-100ngでその増加割合が高かった (図(1)-2)-2)。また、造精機能はLPS投与により、濃度依存的に低下した。H-ASDもこれまでの知見通り、造精機能を低下させたが、H-ASDとLPSを併用処

理しても造精機能の低下はH-ASDによる低下効果に対し相乗、相加効果を示すものではなかった。精子性状はLPSにより有意な影響は生じなかった。

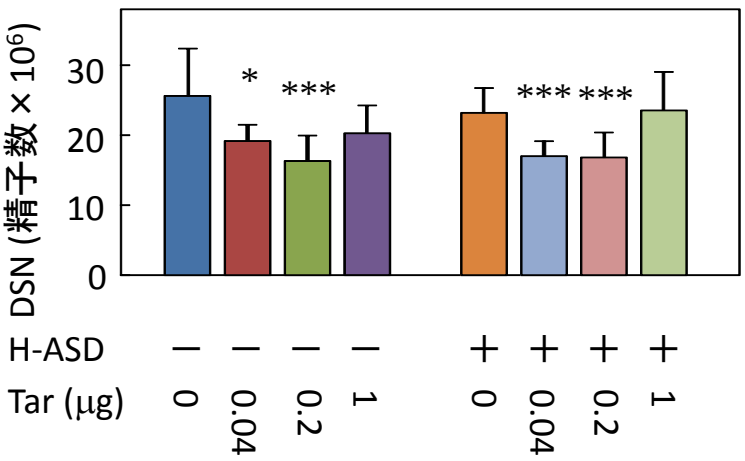



* :$p$<0.05, ** :$p$<0.01, *** : $p$<0.001

図(1)-2)-2. 微生物構成成分LPSおよび加熱黄砂による造精機能への影響

４）黄砂から抽出した有機化合物質の雄性生殖機能への影響に関する研究

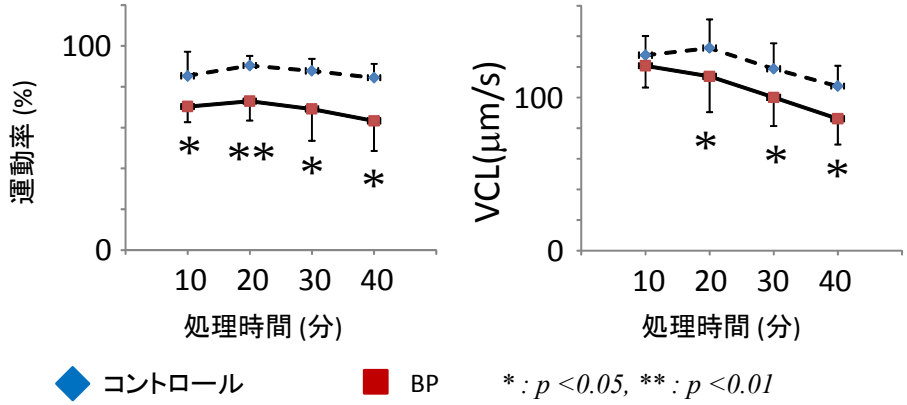
黄砂に吸着した化石燃焼由来の有機化合物（タール成分）の雄性生殖機能への影響に関する量-反応関係を明らかにする目的で、マウスにタール成分の超低濃度～高濃度経気道曝露して、造精機能、精子性状への影響を比較検討した。その結果、精巣一日精子産生能 (DSN)はTar0.04μg群、Tar0.2μg群、Tar1μg群、H-ASD+Tar0.04μg群及びH-ASD+Tar 0.2μg群で対照群と比較して、それぞれ27.3%、43.2%、21.6%、33.8%、36.7%有意に低下した ($p$<0.01、$p$<0.001、$p$<0.01、$p$<0.001、$p$<0.001) (図(1)-2)-3)。それ以外の項目で有意な変動は認められなかった。黄砂付着有機化合物の投与による精子性状に対する影響を検討したところ、精子性状の悪化は認められなかった。以上より、黄砂付着タール成分は、黄砂による造精機能の低下に関与するが、精子性状の悪化には関与しないことが明らかになった。




図(1)-2)-3. 黄砂付着タール成分による造精機能への影響

５）運動精子に対する黄砂の影響

黄砂が精子性状を悪化させることが昨年度示されたが、その影響は、黄砂が直接精子性状を悪化させるのか、精子形成過程等に影響し間接作用で悪化させるのか明らかにする目的で、マウス精巣上体尾部から運動精子を調整し、黄砂及びタール成分を曝露し、精子性状への影響を検討した。その結果、BP処理により、運動率はBP処理20～40分後においてコントロール群と比較して有意に低下した (図(1)-2)-4)。精子平均移動速度 (VCL)も処理20～40分後においてコントロール群と比較して有意に低下した (図(1)-2)-4)。その他、VSL (直線速度)、VAP (進行方向速度)、LIN (直線移動性)の項目においても有意な低下が認められた。




図(1)-2)-4. 北京降下煤塵 (BP) によるin vitro精子性状への影響

以上より、本評価系を用い、黄砂及び構成成分による運動精子に対する精子性状の評価が可能であると考えられた。そこで、本評価系を用い、黄砂、加熱黄砂及び黄砂付着タール成分による精子性状への影響を評価したところ、黄砂処理により運動率などの項目で精子性状の悪化が認められたが、加熱黄砂やタール成分では認められなかった。このことから、黄砂は直接精子性状を悪化させるが、その寄与因子として、黄砂本体やタール成分以外の構成成分であることが示唆された。

６）胎仔期風送黄砂曝露による雄性出生仔マウスの生殖機能への影響

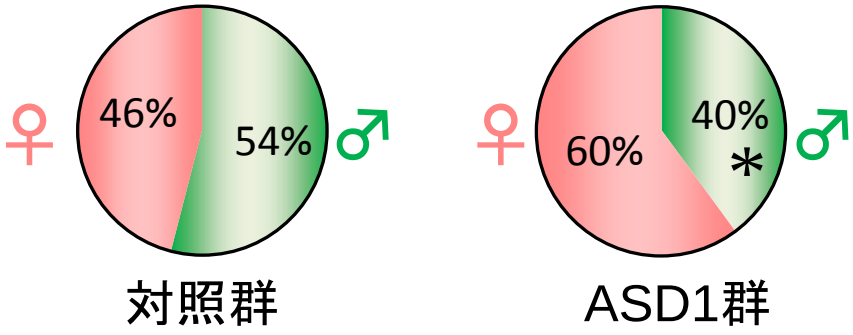
黄砂の胎仔期曝露による出生仔雄性生殖機能への影響を明らかにするために、ICR系妊娠マウスに0.2 mgのASD1黄砂を妊娠7日目及び14日目に気管内投与した。出生仔は対照群とASD群に分け、それぞれ5週齢（5wk対照群、5wk ASD)、10週齢（10wk対照群、10wk ASD群）で雄性生殖機能を検討した。その結果、出産率、出産仔数に有意な変動は認められなかったが (表(1)-2)-5)、出生仔の性比は対照群と比較してASD1群において雄の出生比が0.54から0.40に減少

表(1)-2)-5. 黄砂曝露による出産率・出生仔数・性比への影響

| | 対照群 n=16 | ASD群 n=12 |
|---|---|---|
| 出産率 | 19/20 | 16/20 |
| 出生仔数 | 277 (♂150 ♀127) | 212 (♂91 ♀121) |

平均値±標準偏差

した（図(1)-2)-5)。

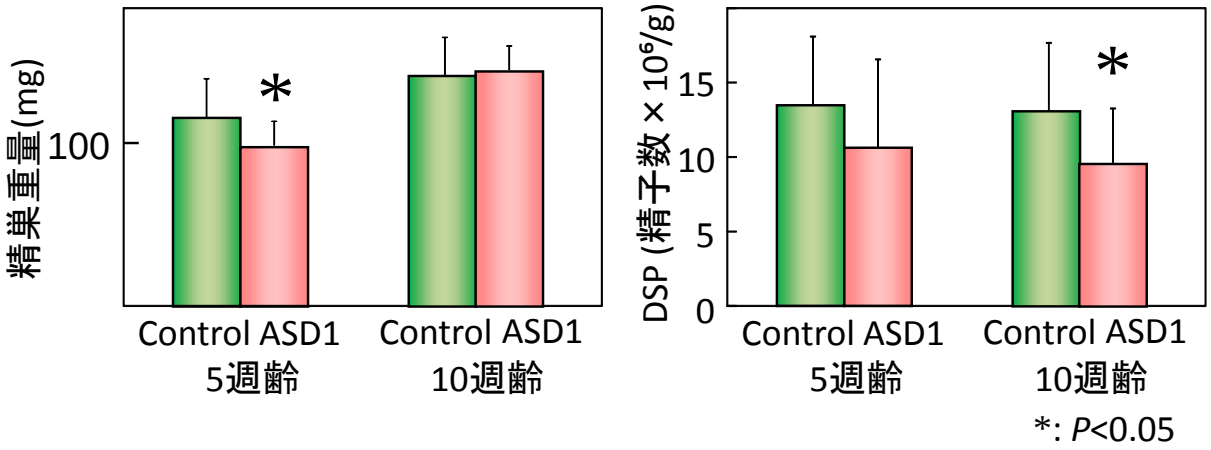



図(1)-2)-5. 胎仔期黄砂曝露による出生仔性比への影響
妊娠マウスに黄砂を曝露すると出生仔の性比は有意に雄が小さくなった。
*: $p < 0.05$

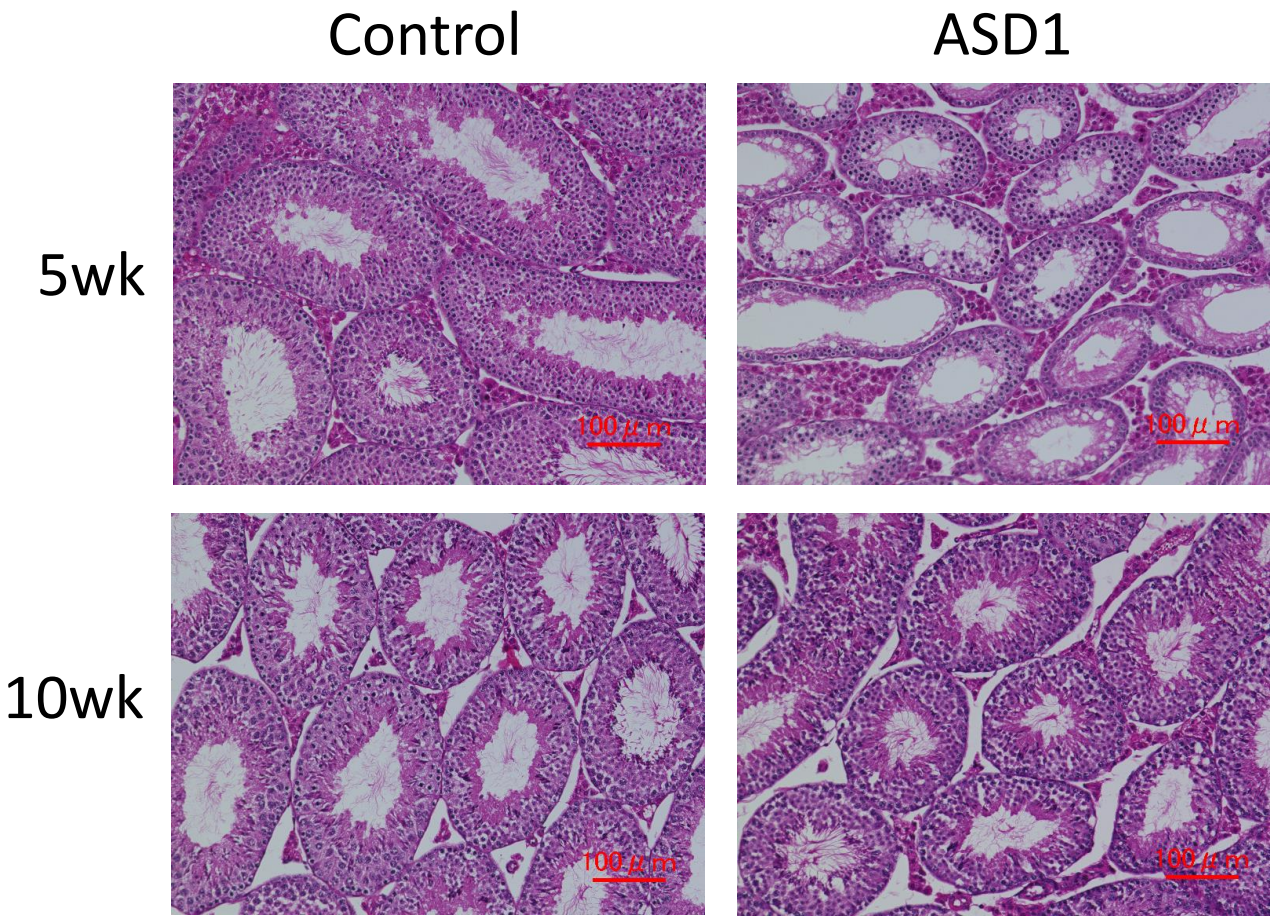
精巣重量及び精巣上体重量を測定し、黄砂曝露による影響を検討した。精巣重量は5wk対照群と比較して、5wk ASD群の精巣重量が15%減少した。また、精巣上体重量は5wk対照群と比較して、5wk ASD群の精巣上体重量が17%減少した。それ以外の項目では有意な変動は認められなかった。出生仔の造精機能への影響を検討したところ、DSPは10wk対照群と比較して10wk ASD群で31%減少した。それ以外の項目で有意な変動は認められなかった（図(1)-2)-6)。一方、精巣組織像は5wkの出生仔において、精細管の空胞化や10wkの出生仔において、精上皮の離脱などが確認され、造精機能に影響が生じる所見が認められた（図(1)-2)-7)。

精子性状に対する影響を検討したところ、5wk ASD群では、精巣上体尾部中で精子は観察されなかったため、10wk ASD群のみ行った。10wk対照群と比較して10wk ASD群でVSL、LIN、STRがそれぞれ有意に13%、9%、5%低下した。それ以外の項目で有意な変動は認められなかった。

血清ホルモンに対する影響を検討したところ、血清T値、LH値、FSH値に有意な変動は認められなかった。




図(1)-2)-6. 胎仔期黄砂曝露による精巣重量および造精機能への影響



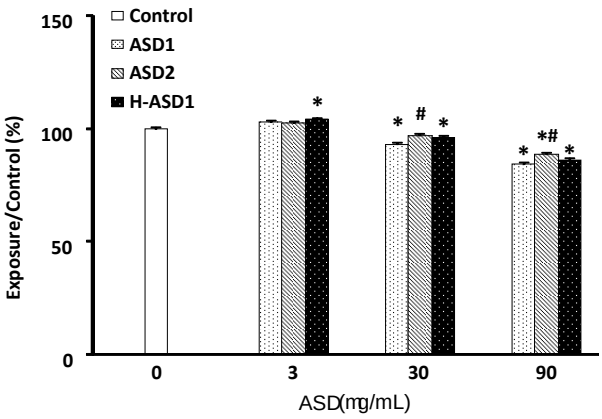

図(1)-2)-7. 胎仔期黄砂曝露による雄性出生仔の精巣組織への影響
ASD1群において精細管の空胞化、精巣間質の水腫が認められる。
また、精上皮の離脱なども認められる。

以上、黄砂は雄性マウスの造精機能の低下や精子性状を悪化させ、雄性生殖機能に悪影響を与えることを見いだした。造精機能の低下は黄砂付着微生物やその構成成分、あるいは黄砂付着有機化合物によっても生じることが明らかになった。しかし、その影響は、黄砂粒子単独でも認められ、今後より詳細な造精機能の低下に寄与する因子の探索・同定が必要である。一方、精子性状への影響に関して、黄砂粒子本体では影響が生じないことから、黄砂に付着している何らかの成分が影響因子と考えられたが、今回検討した微生物由来成分や有機化合物では影響が認められず、今後、確立した精子性状への影響解析のスクリーニング手法を用いて影響因子の解明が必要である。また、黄砂を妊娠マウスに投与し、雄性出生仔に与える影響を評価したところ、黄砂の胎仔期曝露により、雄性出生仔数が低下し、さらに、出生した雄性仔マウスの生殖機能も精巣重量、精巣上体重量の低下、造精機能の低下、精子性状の悪化が認められ、黄砂胎仔期曝露が出生仔雄性生殖機能を低下させることを見いだした。

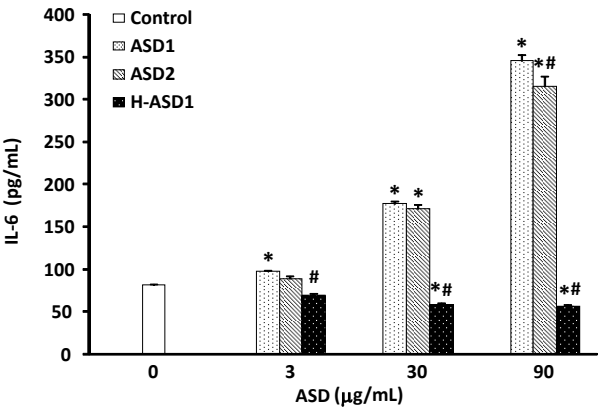
（３）免疫担当細胞と気管支上皮細胞における黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質の影響解明

１）黄砂が気道上皮細胞に及ぼす影響

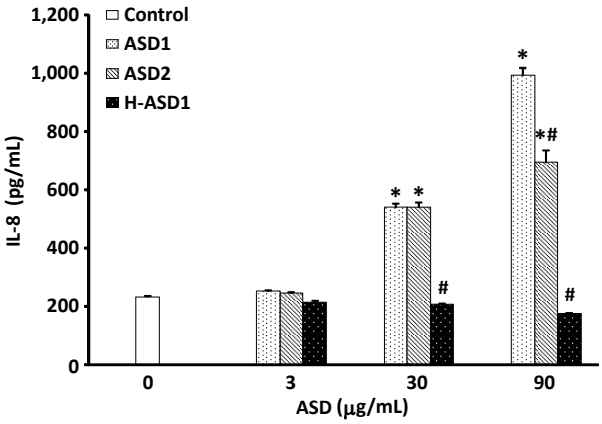
3種類の黄砂を、それぞれ曝露した後、気道上皮細胞の細胞活性を検討した。何れの黄砂曝露群もコントロール群と比較して、濃度依存的に細胞活性の低下が確認された。一方、同濃度の黄砂間で比較を行うと、30および90 μg/mL曝露群において、ASD2は、ASD1より高い細胞活性を示し、各黄砂イベントにより影響が異なる可能性が示唆された (図(1)-3)-1)。次に、各黄砂を曝露した後、気道上皮細胞のIL-6、IL-8の液性因子産生に及ぼす影響について検討した。ASD1およびASD2を曝露した気道上皮細胞の培養上清中のIL-6およびIL-8量は、曝露濃度依存的に増大した。一方、H-ASD1曝露は、明らかな変化をきたさなかった。また、90 μg/mLにおいて、ASD2曝露によるこれらのサイトカイン産生誘導は、ASD1曝露に比較し、有意に低かった。ASD1と比較し、H-ASD1曝露時のサイトカイン産生は有意に低値を示した (図(1)-3)-2、図(1)-3)-3)。次に、ICAM-1発現量を検討したところ、黄砂曝露後のmRNA量は、ASD1およびASD2の曝露によって、濃度依存的に増




図(1)-3)-1. 黄砂の24時間曝露が気道上皮細胞の細胞活性に及ぼす影響
* Significantly different from control group ($p$<0.05)
# Significantly different from the same concentration of ASD1 group ($p$<0.05).




図(1)-3)-2. 黄砂の24時間曝露が気道上皮細胞のIL-6産生に及ぼす影響
* Significantly different from control group ($p$<0.05)
# Significantly different from the same concentration of ASD1 group ($p$<0.05).

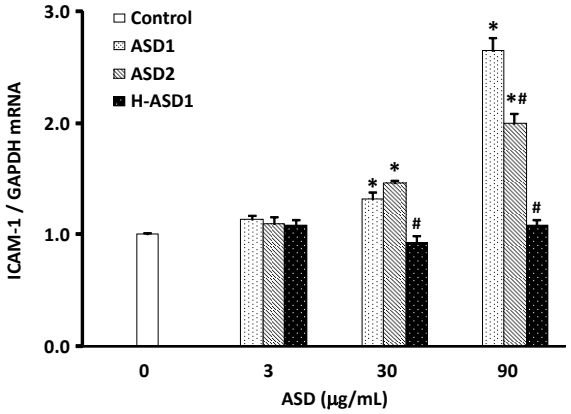



図(1)-3)-3. 黄砂の24時間曝露が気道上皮細胞のIL-8産生に及ぼす影響
* Significantly different from control group ($p$<0.05)
# Significantly different from the same concentration of ASD1 group ($p$<0.05).

大したが、その増加率はASD1 の方が有意に大きかった。一方、H-ASD1を曝露した細胞のICAM-1 mRNAには変化は認められなかった (図(1)-3)-4)。細胞表面分子ICAM-1の発現は、ASD1およびASD2の曝露によって、コントロールと比較して、その増加が確認されたが、H-ASD1曝露では、誘導は認められなかった(data not shown)。培養上清中のsICAM-1量は、ASD1及びASD2の90 μg/mL曝露群において、コントロールと比較して発現量が有意に増加した。同濃度の黄砂間を比較すると、90 μg/mL曝露においてH-ASD 1がASD1より低値を示した (図(1)-3)-5)。

Mucin-1 mRNA量は、90 μg/mL ASD1曝露群においてコントロールと比較して僅かに増加したが、ASD2およびH-ASD1では有意な変化は認められなかった（data not shown)。

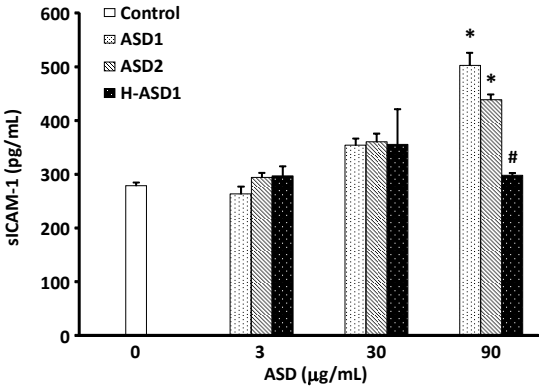
以上より、各黄砂イベントにより、気道上皮細胞が被る影響作用は、異なることが明らかとなった。また、多くの影響指標の変化は、加熱処理により有意な軽減を示したことから、その影響は黄砂に付着した様々な熱易変性の生物学的要因や化学的要因が関与している可能性も示された。一方、IL-6、IL-8、ICAM-1等の炎症性分子は、健康影響をきたす内在メカニズムとして重要な役割を演じていることが示唆されると共に、健康影響のバイオマーカーとしても有用である可能性が示された。




図(1)-3)-4. 黄砂の4時間曝露が気道上皮細胞のICAM-1遺伝子発現に及ぼす影響

* Significantly different from control group ($p$<0.05)

# Significantly different from the same concentration of ASD1 group ($p$<0.05).




図(1)-3)-5. 黄砂の24時間曝露が気道上皮細胞のsICAM-1産生に及ぼす影響

* Significantly different from control group ($p$<0.05)

# Significantly different from the same concentration of ASD1 group ($p$<0.05).

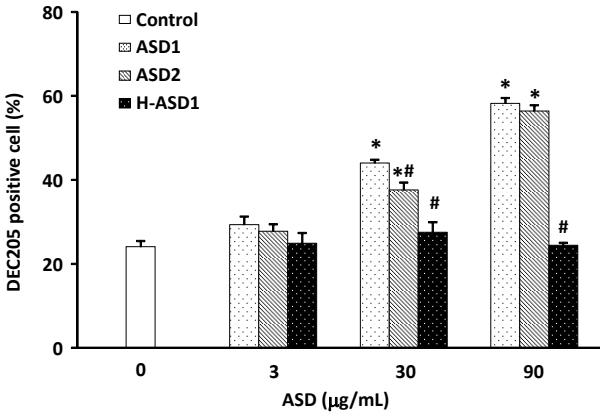
２）黄砂が免疫担当細胞に及ぼす影響

3 種類の黄砂を、それぞれ曝露した後、BMDC の細胞表面分子 DEC205 の発現について評価した。ASD1 及び ASD2 を曝露した BMDC の DEC205 陽性細胞率は、曝露濃度依存的に増大した。一方、加熱黄砂である H-ASD1 曝露時は、コントロールと比べ、発現量の明らかな変化が認められなかった (図(1)-3)-6)。

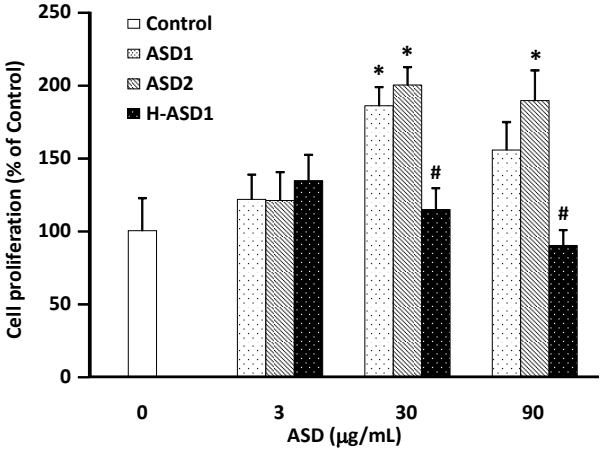
3 種類の黄砂を、それぞれ曝露した後、マウス脾細胞の細胞増殖能について検討したところ、ASD1 及び ASD2 を曝露したマウス脾細胞の細胞増殖能は増大した。一方、加熱黄砂である

H-ASD1 曝露時は、コントロールと比べ、細胞増殖能の明らかな変化は認められなかった(図(1)-3)-7)。次に、細胞増殖の認められる細胞種を検討するため、T 細胞マーカーTCR の発現を検討したところ、ASD1 および ASD2 の曝露によって TCR 陽性細胞率の増加は認められなかった（data not shown)。従って、T 細胞以外の細胞が増殖している可能性が考えられた。

以上より、各黄砂イベントにより、免疫担当細胞が被る影響作用は、異なることが明らかとなった。 また、影響指標の変化は、加熱処理により有意な軽減を示したことから、その影響は黄砂に付着した熱易変性の様々な生物学的要因や化学的要因が関与している可能性も示された。一方、DEC205 といった異物認識に関与する分子は、健康影響をきたす内在メカニズムとして重要な役割を演じていることが示唆されると共に、健康影響のバイオマーカーとしても有用である可能性が示された。




図(1)-3)-6. 黄砂の24時間曝露がBMDCの細胞表面分子DEC205発現に及ぼす影響
* Significantly different from control group ($p$<0.05)
# Significantly different from the same concentration of ASD1 group ($p$<0.05).




図(1)-3)-7. 黄砂の24時間曝露が脾細胞の細胞増殖に及ぼす影響
* Significantly different from control group ($p$<0.05)
# Significantly different from the same concentration of ASD1 group ($p$<0.05).

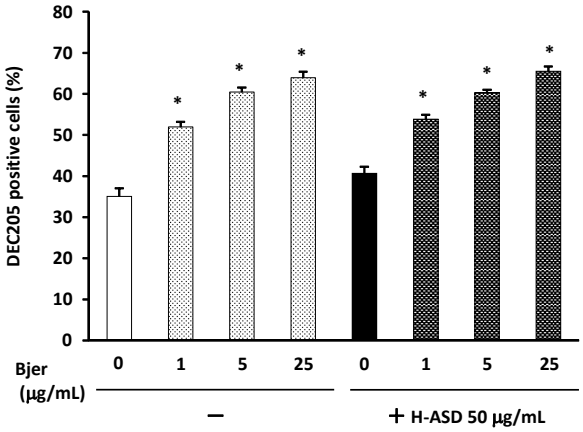
３）黄砂関連生物成分 *Bjerkandera* が気道上皮細胞と免疫担当細胞に及ぼす影響

気道上皮細胞に、*Bjerkandera* (Bjer) 単独およびBjer+H-ASDを曝露したところ、何れの曝露群においても、コントロールと比較して、細胞活性、液性因子IL-6、IL-8、sICAM-1（IL-25、IL-33は検出限界以下）の産生、細胞表面分子Dectin-1の発現に著しい変化は確認されなかった（data not shown)。

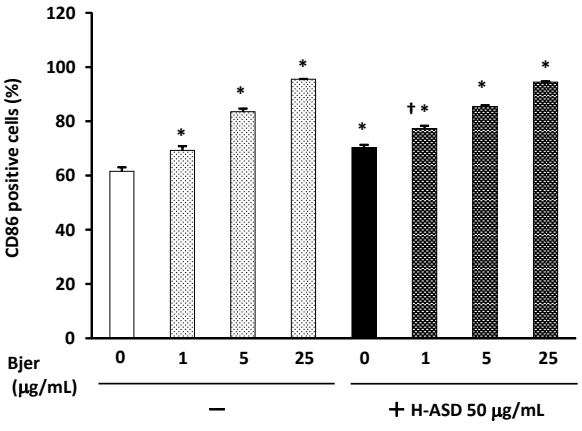
BMDCに、Bjer単独およびBjer + H-ASDを曝露したところ、Bjer単独曝露では、コントロールと比較して、濃度依存的に細胞表面分子DEC205およびCD86陽性細胞率の増加が認められた。同様に、Bjer +H-ASD曝露においても、Bjer単独曝露と同程度のDEC205およびCD86陽性細胞率の増加が確認された (図(1)-3)-8、図(1)-3)-9)。一方、その他の分子に関しては、有意な増加は認められなかった。

脾細胞に、Bjer単独、Bjer + H-ASDを曝露したところ、何れの曝露においても、コントロールと比較して、脾細胞増殖能の増加は認められなかった。また、TCR陽性細胞率の変化も認められなかった（data not shown）。

以上より、黄砂関連生物成分であるBjerは、気道上皮細胞や脾細胞ではなく、免疫応答の開始細胞である、BMDCに影響を及ぼすことが示された。




図(1)-3)-8. *Bjerkandera*およびH-ASDの24時間曝露がBMDC細胞の細胞表面分子DEC205発現に及ぼす影響
* Significantly different from control group ($p$<0.05)




図(1)-3)-9. *Bjerkandera*およびH-ASDの24時間曝露がBMDC細胞の細胞表面分子CD86発現に及ぼす影響
* Significantly different from control group ($p$<0.05)
† p<0.05 versus *Bjerkandera*-exposed group at the same concentration.

## ５．本研究により得られた成果

### （１）科学的意義

（１）黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による呼吸器・免疫系への影響とそのメカニズム解明

１）黄砂付着微生物の中からアレルギーを増悪する真菌（*Bjerkandera*：*Bjer*）が見出され、またこの菌種自身がアレルギー炎症を引き起こす抗原となりうることが明らかとなったことは科学的意義が大きい。また、黄砂と抗原存在下で、*Bjer*真菌の曝露を受けると気道のリモデリング（不可逆的な気道障害）へと進行することか分かった。最近この*Bjer*真菌は真菌関連慢性咳漱との関連性が報告されており、この真菌と共存する黄砂の役割が注目されていることから、本成果の意義は大きいものと考える。

２）熱処理によって付着有機物を除去した黄砂本体にもアレルギー反応を高める作用があることが明らかとなったことは科学的に意義あるものである。

３）イベントの異なる黄砂はアレルギー反応に違いがあることが分かった。アレルギー増悪作用の違いはシリカが多い黄砂よりも、リポポリサッカライド (LPS)が多い黄砂の方が、増悪作用が強いことが分かったことは科学的に意義あるものである。

４）黄砂バイオエアロゾルの中の真菌*Bjerkandera*にスギ花粉症を増悪する作用が見出された。更に黄砂はスギ花粉やこの真菌のアレルギー炎症を悪化することを見出した。黄砂飛来時期にはスギ花粉や真菌関連慢性咳漱を起こす*Bjerkandera*担子菌も飛散するため、今回の結果は健康問題を考える上では科学的な意義が大きい。

５）黄砂に吸着した有機化合物（タール成分）が気道のアレルギー炎症を増悪することが分かった。しかし、その曝露量が多ければアレルギー炎症に対して抑制的に働くことも明らかとなった。またタール成分には抗体産生（抗原特異的-IgE）を高める作用が有ることも分かったことは科学的意義が大きい。

６）微生物の分子パターンを認識するToll様レセプター（TLRs）ノックアウト（KO）マウスの骨髄由来マクロファージを用いたin vitro実験から、黄砂はTLR2よりもTLR4を介したシグナル伝達経路によって炎症性サイトカイン産生を高めることが分かり、TLR4リガンドであるLPSが炎症惹起に関与していることが分かった。

７）TLR KOマウスのin vivo実験では、黄砂のアレルギー増悪作用にはアダプター分子のMyD88が必修であり、TLR2とTLR4のリガンド（LPS、β-グルカン、ペプチドグリカン）が黄砂の増悪因子として見出さられたことは科学的に非常に意義がある。

８）TLR2KO、TLR4KO、TLR2/4KO、TLR7/9KOマウスとMyD88KOマウスの骨髄由来マクロファージを使った実験で、日本に飛来した黄砂は抗原提示細胞（マクロファージ）のTLR4やTLR2に認識されることが分かったことは科学的意義が大きい。

９）黄砂に含まれる微量のタール成分がスギ花粉症のアレルギー性鼻炎を悪化することを見出した。

10）市販のLPSを用いた喘息再現実験で、微量のLPSが抗原（OVA）と滅菌黄砂の存在下、Th2を活性化してアレルギー炎症（アレルギー喘息）を悪化させることを突き止めた。この実験で黄砂に付着した微量のLPSがアレルギー増悪に関わっていることを確証できたことは意義が大きい。

11）TLR2KOとTLR4KOマウスによる市販のLPSを用いた喘息再現実験で、LPSはTLR4を介してTh2への誘導を起こすことを確証した。また、TLR4欠損マウスのOVA+H-ASD+LPS群でもTh2への弱い誘導（IL5発現、IgE抗体産生、好酸球増加）が起きたが、OVA+H-ASD群でも同じレベルで弱いTh2への誘導が起きた。この誘導は、LPSが作用するというよりは、むしろ滅菌黄砂によって起こる細胞障害によるデインジャーシグナル等がTLR2等を介してTh2への誘導を起こしている可能性が考えられ、黄砂のアレルギー増悪作用を今後検討する上では科学的に意義が大きい。

12）LPSが黄砂のアレルギー増悪因子であることが確証できたことから、黄砂エアロゾル中のLPSは疫学研究による増悪因子の指標としても活用できると考える。

（２）黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による生殖器系への影響とそのメカニズム解明

１）黄砂イベントことの黄砂の違い（付着物や成分の違い）により、雄性生殖機能に生じる影響が大きく異なること、付着微生物や微生物構成成分 (LPS)、黄砂付着有機化合物 (Tar)がこれらに寄与している可能性を見いだした。

２）タール成分の量-反応試験で、タール成分が黄砂中に0.04%～0.2%含まれていれば雄性生殖機能の悪化が生じる可能性があることが分かった。しかし、その量が多い場合、雄性生殖機能に影響を与えない、逆U字効果があることも示唆された。

３）運動精子を用いた*in vitro*実験から、黄砂が直接精子性状を悪化させることを示したが、その原因物質の同定には至っておらず、今後解明が必要である。また、より低濃度の黄砂で検討する必要もある。

４）妊娠マウスに黄砂を曝露すると、雄性出生仔数が低下すること、また、出生した仔マウスの雄性生殖機能も低下することを初めて見いだし、この学術的意義は大きなものである。

（３）免疫担当細胞と気管支上皮細胞における黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質の影響解明

１）熱易変性の黄砂付着微生物や化学物質の含有量の相違が健康影響の相違に寄与する可能性を、呼吸器系と黄砂の最初の物理化学的接点である気道上皮細胞、樹状細胞や脾臓細胞などの免疫担当細胞を用いた実験研究によって明らかにできた。この結果は黄砂イベントによって健康影響に相違がある可能性を示唆するもので、学術的に価値ある知見である。

２）黄砂と挙動を共にする*Bjerkandera*真菌が健康影響に関与する可能性を、その作用点である細胞・分子レベルで明らかにすることができた。この真菌が黄砂日のバイオマーカー候補として上げられたことは、人の健康影響を考える上で価値ある。

**（２）環境政策への貢献**

**＜行政が既に活用した成果＞**

特に記載すべき事項はない。

**＜行政が活用することが見込まれる成果＞**

（１）黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による呼吸器・免疫系への影響とそのメカニズム解明

１）アレルギー喘息や花粉症おける黄砂のアレルギー増悪要因が黄砂に付着した微生物成分（LPS、β-グルカン、ペプチドグリカン）や大気汚染物質由来の有機化学物質（タール）であること、黄砂から有機成分を取り除いたミネラル粒子本体にアレルギー反応を高める作用があることを提示した。これらのエビデンスは、黄砂現象時にアレルギー疾患が悪化するという疫学調査の結果に生物学的妥当性を付与するものであり、行政による黄砂の健康影響や健康被害を見極めるための科学的な根拠資料として役立てることができると考える。

２）黄砂付着微生物のアレルギー増悪メカニズムを解明し、提示することができた。この成果は健康被害の未然防止策・軽減策に関連する環境政策の基礎資料として貢献できると考える。

３）黄砂と挙動を共にするビルカンデラ真菌はアレルギー抗原と増悪因子なりうることを提示することができたことから、国民に黄砂の危険性を警鐘・周知することで、黄砂飛来時の自己防衛に繋げると共に、国民の安全と安心に寄与することがきる。

４）これらの研究成果を多くの科学雑誌に公表することで、健康影響に関する国際的共通理解を形成することができたと考える。今後も多くの成果を公表し黄砂の危険性を警鐘して、国際的な黄砂発生の低減策の取組みに繋げたい。また、本研究の成果は国内や国際的な黄砂問題を解決するための環境政策上の基礎資料として役立てることができると考える。

（２）黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質による生殖器系への影響とそのメカニズム解明

１）これまで黄砂の健康影響として、呼吸器系、循環器系や免疫系への影響を中心に評価が進んできたが、それ以外に、雄性生殖系に影響を与えることを明らかにした。

２）胎仔期に黄砂曝露を受けると雄性出生仔の生殖機能が悪化することを明らかにした。

３）これらの実験研究の知見をもとに、ヒトにおける健康影響評価を行い、次世代影響を含めた健康被害予防対策や関連する政策の立案等に役立てたい。

（３）免疫担当細胞と気管支上皮細胞における黄砂エアロゾル及び付着微生物・化学物質の影響

１）細胞・分子レベルにおける研究成果から、広域・越境汚染に由来するイベントの異なる黄砂や成分の相違が、健康影響の相違や変動に寄与する可能性を提示した。この成果は、疫学調査結果に生物学的妥当性を付与するものである。

２）この研究において*Bjerkandera*真菌がヒトの健康影響要因であることを明らかにしたが、今後も免疫担当細胞や気管支上皮細胞を用いて影響要因を絞り込み、明らかにできれば、黄砂に付着した成分の健康影響要因を決定することができ、今後の予防対策の確立等にも役立てることができる。さらに、国内や国際的な黄砂問題を解決するための政策上の基礎資料としても役立つと考える。

## ６．国際共同研究等の状況

黄砂の健康影響やそのメカニズム、種々の健康問題を解決するには中国側の協力が不可欠である。サブテーマ（1）の研究代表者（市瀬）は中国瀋陽市にある中国医科大学公共衛生学院、院長の孫 貴范教授と黄砂や PM2.5 の健康影響に関する共同研究を進めている。瀋陽市でサンプリングした黄砂や PM2.5 を日本で分析し、健康への影響も実験研究によって調べており、お互いの協力により中国との関係も極めてよい状況にある。研究代表者の研究室において孫 教授の研究室の博士課程（前期課程および後期課程）の学生２名の研究指導にあたった。また、黄砂の健康影響のテーマで中国医科大学博士課程にて博士号を取得したリサーチフェロー1 名がサブテーマ（1）の研究分担者として本研究に従事して、その成果を多くの学会や学術誌に発表した。

## ７．研究成果の発表状況

### （１）誌上発表

＜論文（査読あり）＞


1) M. HE, T. ICHINOSE, S. YOSHIDA, S. YAMAMOTO, K. INOUE, H. TAKANO, R. YANAGISAWA, M. NISHIKAWA, I. MORI, G. SUN, T. SHIBAMOTO: Asian sand dust enhances murine lung inflammation caused by *Klebsiella pneumoniae*. Toxicol Appl Pharmacol, 2012. 15, 258(2), 237-247.
2) M. HE, T. ICHINOSE, S. YOSHIDA, H. TAKANO, M. NISHIKAWA, I. MORI, G. SUN, T. SHIBAMOTO: Aggravating effects of Asian sand dust on lung eosinophilia in mice immunized beforehand by ovalbumin. Inhal Toxicol, 2012. 24(11):751-761.
3) S. YOSHIDA, H. TAKANO, M. NISHIKAWA, H. MIAO, T. ICHINOSE: Effects of fetal exposure to urban particulate matter on the immune system of male mouse offspring. Biol Pharm Bull. 2012;35(8):1238-43.
4) 吉田 成一、西川 雅高、押尾 茂、賀 淼、市瀬 孝道：日本で採取した風送黄砂がマウス造精機能および精子運動能に与える影響, 大気環境学会誌, 2013.48 (4),175-180.
5) M. HE, T. ICHINOSE, S. YOSHIDA, H. TAKANO, M. NISHIKAWA, G. SUN, T. SHIBAMOTO:

Induction of immune tolerance and reduction of aggravated lung eosinophilia by co-exposure to Asian sand dust and ovalbumin for 14 weeks in mice. Allergy Asthma Clin Immunol. 2013. 9:19 (3 June) .

6) M. HE, T. ICHINOSE, Y. SONG, Y. YOSHIDA, K. ARASHIDANI, S. YOSHIDA, B. LIU, M. NISHIKAWA, H. TAKANO, G. SUN: Effects of two Asian sand dusts transported from the dust source regions of Inner Mongolia and northeast China on murine lung eosinophilia. Toxicol Appl Pharmacol. 2013. Nov 1;272(3):647-655.
7) A. HONDA, Y. MATSUDA, R. MURAYAMA, K. TSUJI, M. NISHIKAWA, E. KOIKE, S. YOSHIDA, T. ICHINOSE, H. TAKANO: Effects of Asian sand dust particles on the respiratory and immune system. J Appl Toxicol, 2014. Mar 34(3):250-257.
8) B. LIU, T. ICHINOSE, M. HE, K. KOBAYASHI, T. MAKI, S. YOSHIDA, K. ARASHIDANI, S. YOSHIDA, M. NISHIKAWA, H. TAKANO, G. SUN. T. SHIBAMOTO: Lung inflammation by fungus, *Bjerkandera adusta* isolated from Asian sand dust (ASD) aerosol and enhancement of ovalbumin -induced lung eosinophilia by ASD and the fungus in mice. Allergy, Asthma & Clinical Immunology, 2014. Feb 5; 10-10.
9) Y. REN, T. ICHINOSE, M. HE, Y. SONG, Y. YOSHIDA, S. YOUSHIDA, M. NISHIKAWA, H. TAKANO, G. SUN, T. SHIBAMOTO: Enhancement of OVA-induced murine lung eosinophilia by co-exposure to contamination levels of LPS in Asian sand dust and heated dust. Allergy, Asthma & Clinical Immunology 2014, (accepted at May 4) in press.

＜その他誌上発表（査読なし）＞

1) 市瀬孝道.「黄砂の気道アレルギーに与える影響」 アレルギーの臨床, 2012. 32. 10, 17～21.
2) 市瀬孝道.「実験研究による黄砂の毒性評価」医学のあゆみ. 2013. 247(8), 998～1003.
3) 市瀬孝道.「PM2.5とその健康影響」健康教室.2013. 753. 64-67.
4) 市瀬孝道.「黄砂の呼吸器系への影響.PM2.5と健康」–大気汚染Update.医学のあゆみ.2012.247.8. 689-693.
5) 本田晶子、高野裕久.「エアロゾルの健康影響に関する実験的研究, 微小粒子状物質と黄砂による呼吸器系・循環器系への影響」クリーンテクノロジー in press.
6) 本田晶子、高野裕久.「実験研究によるPM2.5の健康影響」大気汚染Update. 医学のあゆみ. 2012. 247. 8. 684-688.
7) 本田晶子、柳澤利枝、小池英子、井上健一郎、高野裕久、「環境化学物質とアレルギー」アレルギーの臨床、2013, 33. 8. 18-22.
8) 市瀬孝道.「ヤケイロタケのアレルギー学的基礎研究」アレルギーの臨床, 2014.(6 月号).
9) 市瀬孝道.「4.黄砂アレルギー」呼吸器内科, 特集号. 2014.印刷中.

（２）口頭発表（学会等）

1) M. HE, T. ICHINOSE, S. YOSHIDA,M. NISHIKAWA: 第 52 回大気環境学会年会（2011）.「Effect of Asian sand dust on expression of cytokine and chemokine induced by Klebsiella pneumoniae

2) 吉田成一、押尾　茂、西川雅高、賀　淼、森育子、市瀬孝道：第 52 回大気環境学会年会（2011）「風送黄砂によるマウス精子性状への影響」
3) 市瀬孝道、高野裕久、井上健一郎、柳沢利枝：第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会（2011）.「黄砂の肺炎桿菌誘発性肺炎に対する増悪作用」
4) T. ICHINOSE, M. HE: The 42 nd Annual meeting of Japanese Society of Ocupational and Environmental Allergy. Environmental Air Contaminations Influencing on Airway Allergy - Especially Asian Sand Dust – (2011). 「Asian dusts and allergy」
5) B. LIU, S. YOSHIDA, M. HE, T. ICHINOSE: フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー（2011）「Effect of microorganisms attached onto yellow dust on inflammatory cytokines and TLRs expression in mouse macrophages」
6) 市瀬孝道：福岡県保険医協会講演会（2011）「黄砂の健康影響」（招待講演）
7) 市瀬孝道：京都府立医科大学公開講座「子どもの健康と化学物質」（2011）「黄砂とアレルギー」（招待講演）
8) 市瀬孝道、賀淼、吉田成一、嵐谷奎一、高野裕久：第53回大気環境学会年会（2012）.「卵白アルブミン誘発性の好酸球性肺炎対する黄砂とビルカンデラ真菌の影響」p179.
9) 吉田成一、賀淼、嵐谷奎一、市瀬孝道：第53回大気環境学会年会（2012）「発生地の異なる黄砂による雄性生殖機能低下に関する比較研究」p177.
10) M. HE, T. ICHINOSE, S. YOSHIDA, M. NISHIKAWA, H. TAKANO: 第53回大気環境学会年会（2012）.「Effects of long-term exposure to Asian sand dust and ovalbumin on murine lung eosinophilia」p321.
11) 市瀬孝道：第62回日本アレルギー学会秋季学術集会（2012）. シンポジウム２ 黄砂のアレルギー疾患への影響.「黄砂の生物学的影響因子の解析」p1319.
12) 市瀬孝道：第62回日本アレルギー学会秋季学術集会（2012）.「黄砂粒子と付着微生物によるアレルギー増悪作用」p1147.
13) 松田悠吾、本田晶子、村山留美子、辻堅志、西川雅高、小池英子、吉田成一、市瀬孝道、高野裕久：第 19 回日本免疫毒性学会 (2012)「黄砂がヒト気道上皮細胞に及ぼす影響」
14) 松田悠吾、本田晶子、村山留美子、辻堅志、西川雅高、小池英子、吉田成一、市瀬孝道、高野裕久：フォーラム 2012　衛生薬学・環境トキシコロジー (2012)「黄砂が呼吸器・免疫系に及ぼす影響」
15) M. HE, T. ICHINOSE, S. YOSHIDA, H. TAKANO, M. NISHIKAWA, G. SUN: American College of Toxicology 33rd Annunal Meeting, Orlando, American (2012). 「Effect of Asian sand dust on lung allergic inflammation in mice immunized beforehand by ovalbumin」p101.
16) 吉田成一、賀淼、小林史尚、市瀬孝道：フォーラム2012：衛生薬学・環境トキシコロジー（2012）「黄砂付着微生物による雄性生殖機能への影響」
17) 市瀬孝道、賀淼、吉田成一、定金香織、西川雅高、森育子、高野裕久：第 52 回大気環境学会年会（2011）.「黄砂が卵白アルブミン誘発性の肺の好酸球性炎症に与える影響」
18) M. HE, T. ICHINOSE, S. YOSHIDA, S. YAMAMOTO, K. INOUE, H. TAKANO, R. YANAGISAWA, M. NISHIKAWA, I. MORI, G. SUN, T. SHIBAMOTO: 51th Society of Toxicology (2012)「Asian Sand Dust Enhances Murine Lung Inflammation Caused by *Klebsiella*

*Pneumoniae*」
19) 賀淼、劉博瑩、吉田成一、尾立翠、市瀬孝道：第 132 回薬学会（2012）「成分組成の異なる黄砂の気管支喘息増悪作用の比較」
20) 市瀬孝道、賀淼、吉田成一：第 132 回本薬学会（2012）「黄砂のスギ花粉症増悪作用」
21) 市瀬孝道：第 11 回東海アレルギーフォーラム(2012)「黄砂アレルギーと微生物の役割」
22) 市瀬孝道：第 17 回那須ティーチイング学術集会（2012）「黄砂はアレルギー増悪因子となりうるか？」（招待講演）
23) 吉田成一：第 24 回生殖・発生毒性学東京セミナー（2012）「黄砂による雄性生殖機能の低下」（招待講演）
24) 市瀬孝道：兵庫 Allergy Meeting 2012（2012）「黄砂アレルギーと微生物」（招待講演）
25) 市瀬孝道：第 128 回山口県医師会生涯研修セミナー．平成 25 年度第 1 回日本医師会生涯教育講座.2013 年.「アレルギー疾患に及ぼす黄砂の微生物学的影響因子の解析」（招待講演）
26) 市瀬孝道：大分大学医学部総合内科学第三講座 第 3 回 Meet The Experts（2013）「アレルギー疾患に及ぼす黄砂の生物学的影響因子の解析」（招待講演）
27) 吉田成一：染色体学会第 63 回年会 市民公開講座（2012）「自動車排ガスや黄砂などの大気汚染物質とマウス精子形成・精子性状の悪化」（招待講演）
28) 市瀬孝道：第7回バイオエアロゾルシンポジウム（2013）「黄砂に付着した *Bjerkadera* 菌の気管支喘息増悪作用」
29) M. HE: 第7回バイオエアロゾルシンポジウム（2013）「Comparison of the aggravating effects of Asian sand dusts contained different quantities of β-glucan and lipopolysaccharid on murine lung eosinophilia」
30) 吉田成一、嵐谷奎一、賀淼、市瀬孝道：フォーラム2013：衛生薬学環境トキシコロジー（2013）：黄砂に付着した有機化合物による雄性生殖機能への影響
31) 吉田成一、嵐谷奎一、賀淼、市瀬孝道：第54回大気環境学会年会（2013）「胎仔期黄砂曝露による雄性胎仔および出生仔生殖機能への影響」
32) 吉田成一、嵐谷奎一、小林史尚、賀淼、市瀬孝道：第58回日本生殖医学会 学術講演会（2013）「黄砂エアロゾルによる精子形成・精子運動能への影響因子の探索」
33) 吉田成一：第32回日本アンドロロジー学会学術大会（2013）「越境大気汚染物質「黄砂」と雄性生殖機能の低下」
34) 市瀬孝道、賀淼、吉田成一、吉田安宏、嵐谷奎一：フォーラム2013：衛生薬学環境トキシコロジー（2013）： フォーラム1. 古くて新しいPM2.5問題を考える．「PM2.5を多く含む黄砂と含まない黄砂のアレルギー性気道炎症への影響」
35) 市瀬孝道、賀淼、高野裕久：第63回日本アレルギー学会秋季学術大会（2013）．「Toll様レセプターKO喘息モデルマウスを用いた黄砂のアレルギー増悪作用の検討」
36) 市瀬孝道、He Miao、吉田成一、嵐谷奎一、高野裕久：第54回大気環境学会年会（2013）「発生源の異なる２つの黄砂の好酸球性気道炎症の増悪作用」
37) M. HE, T. ICHINOSE, S. YOSHIDA, H. TAKANO, M. NISHIKAWA, G. SUN, T. SHIBAMOTO: Respirology. 18. Suppl 4, (2013).「Role of atmospheric samples collected from Asian sand dust

storm in allergic airway inflammation and immune tolerance」

38) 市瀬孝道：平成25年度 地域衛生組織リーダー研修会．第8回環境と健康を考えるつどい 2013年「黄砂と越境大気汚染物質の健康影響」（招待講演）

### （３）出願特許

特に記載すべき事項はない。

### （４）シンポジウム、セミナー等の開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

### （５）マスコミ等への公表・報道等

1) NHK福岡放送「熱烈発信 福岡ＮＯＷ」（平成25年3月7日（木）18：10～19:00）
2) NHK福岡放送「特報フロンティア」〔本放送〕（平成25年3月8日（金）19：30～19：55）
3) NHK福岡放送「特報フロンティア」〔再放送〕（平成25年3月10日（日）7：45～8:10）
4) 朝日新聞グローブ（平成25年1月6日朝刊，全国版：G-1頁）
5) 東京新聞 くらし「どうするPM2.5対策」（平成25年3月19日朝刊、21項）

### （６）その他

特に記載すべき事項はない。

## ８．引用文献


1） KWON *et al.*: Effects of the Asian dust events on daily mortality in Seoul, Korea. Environ. Res. 90, 1–5. (2002)

2） CHEN *et al.*: Effects of Asian dust storm events on daily mortality in Taipei, Taiwan. Environ. Res. 95, 151–155. (2004)

3） YANG *et al.*: Effects of Asian dust storm events on daily admissions for asthma in Taipei, Taiwan. Inhal Toxicol. 17, 817-821. (2005)

4） YANG,: Effects of Asian dust storm events on daily clinical visits for conjunctivitis in Taipei, Taiwan. J Toxicol Environ Health A. 69, 1673-80. (2006)

5） CHEN & YANG: Effects of Asian dust storm events on daily hospital admissions for cardiovascular disease in Taipei, Taiwan. J Toxicol Environ Health A. 68, 1457-64. (2005)

6） CHANG *et al.*: Correlation of Asian dust storm events with daily clinic visits for allergic rhinitis in Taipei, Taiwan. J Toxicol Environ Health A. 69, 229-235. (2006)

7） 佐藤達明：黄砂現象時のアレルギー性鼻炎症状の変化.耳鼻臨床.102：831～839. (2009)

8） WATANABE *et al.*: Correlation between Asian dust storms and worsening asthma in western Japan. Allergology International. (2011)

9） KANATANI *et al.*: Desert dust exposure is associated with increased risk of asthma hospitalization in children. Am J Respir Crit Care Med. 182(12):1475-1481. (2010)

## （２）黄砂付着微生物の解析とその毒性物質の検出に関する研究

金沢大学
理工研究域自然システム学系　小林　史尚
理工研究域物質化学系　牧　輝弥
環日本海域環境研究センター　柿川　真紀子
医薬保健研究域医学系　東　朋美

〈研究協力者〉
労働安全衛生総合研究所
環境計測管理研究グループ　山田　丸

平成23(開始年度)～25年度累計予算額：23,296千円
（うち、平成25年度予算額：6,916千円）
予算額は、間接経費を含む。

［要旨］
近年の黄砂現象の頻発化・大規模化にともない、健康をはじめとする種々の影響評価が注目されているが、黄砂バイオエアロゾルに関する健康影響はいまのところ明らかになっていない。
そこで本研究では、黄砂沈着地域である石川県珠洲市上空のバイオエアロゾルを係留気球や航空機を用いて直接採集し、生物分析結果から人に影響を及ぼす微生物の検索を行った。種々の生物分析法を駆使して、菌種の高度分布から沈着する菌株と通り過ぎる菌株を明らかにした。次に、サブテーマ1と連携し、直接採集した黄砂バイオエアロゾルをサブテーマ（１）に提供し、生体影響とメカニズム解明をサポートした。アレルギー起因の真菌*Bjerkandera*の大気中濃度、原因物質であるβ-グルカン濃度測定、大気中DNA濃度および黄砂イベント前後の種組成変化を測定した。さらに、黄砂イベントASD1 (2011年5月2日)およびASD2 (2011年5月13日)における大気DNA濃度、細菌種組成、リアルタイムPCRを用いて2つの黄砂イベントDNAライブラリーを作成し、バチルス・スタフィロコッカス遺伝子、セレウス菌毒素セレウリド合成酵素遺伝子 (*CRS*遺伝子)、黄色ブドウ球菌毒素性ショック症候群毒素遺伝子 (TSST-1)、O-157 (ベロ毒素)遺伝子、および呼吸器系感染症起因菌遺伝子の検出・定量を実施した。ほとんどの毒性遺伝子は検出されなかったが、バチルス・スタフィロコッカス遺伝子に関しては多くの遺伝子が検出・定量された。定点捕集・DNAライブラリーを用いた大気DNA濃度計測、リアルタイムPCRによる毒素遺伝子検出法を提案するとともに、波及効果として、国民の健康阻害防止のために、黄砂付着微生物、黄砂バイオエアロゾル用マスクの開発を実施した。

［キーワード］
黄砂、バイオエアロゾル、直接採集、生物分析、毒素遺伝子検出

## １．はじめに

近年の黄砂現象の頻発化・大規模化にともない、ヒトの健康をはじめとする種々の影響評価が注目されている。黄砂の健康影響に関しては、これまでにいくつかの報告があり、発生源を持つ中国では黄砂現象時に呼吸器感染症、心血管疾患、心筋梗塞や脳卒中の発生率が高かったことが新聞等で報道されている[1)]。動物実験等により、黄砂に付着した微生物由来のリボ多糖 (LPS)やβ-グルカンなどが影響しているとの報告もある[2)]。著者らは2006年8月に黄砂発生源の敦煌市において係留気球を用いた上空の黄砂粒子の直接採集を行い、その生物分析結果から黄砂粒子に微生物が付着していることを発見した[3)]。その後種々の黄砂バイオエアロゾルの研究が行われてきたが[4,5)]、黄砂バイオエアロゾルの健康影響についてはまだほとんど明らかになっていない。

## ２．研究開発目的

黄砂沈着地域である能登半島石川県珠洲市上空のバイオエアロゾルを係留気球や航空機を用いて直接採集し、生物分析から人に影響を及ぼす微生物の検索を行う。また、直接採集サンプルを用いてアレルギーに関係のある微生物由来物質の定量および毒素遺伝子の検出を行う。さらに、サブテーマ（１）と連携し、直接採集した黄砂バイオエアロゾルをサブテーマ（１）に提供し、生体影響とメカニズム解明をサポートすることを目的とする。

## ３．研究開発方法

（１）沈着地域能登半島珠洲市における黄砂バイオエアロゾル直接採集・生物分析

黄砂沈着地域における調査は、日本石川県珠洲市（金沢大学里山里海自然学校）において、航空機と係留気球を用いた上空の黄砂バイオエアロゾル直接採集を2011年3月および2012年3月に実施した。航空機は高度約2,900 m（9,500 FT）にて1時間吸引した。係留気球を用いた直接採集については、発生源にて行った方法とほぼ同じく1時間吸引した。これらのサンプル及びこれまでに採集したサンプルの生物分析は、１）分離培養・同定法、２）メタゲノム法、３）耐塩性細菌培養法などを行った。2012年3月1日、石川県珠洲市において航空機（3,000 m）、係留気球（1,000 m）、地上（10 m）の異なる高度で同時サンプリングを実施した。採集方法は、雑菌汚染のないように独自に開発した大気バイオエアロゾルサンプラーを用いて行った。持ち帰ったメンブランフィルターサンプルから直接DNA抽出を行い、16S rDNAクローンライブラリーを用いて細菌種組成を解析した。

（２）直接採集され分離培養された菌株のサブテーマ（１）への提供および提供菌の大気濃度

大型の黄砂が発生した日に金沢市地上10m（金沢大学自然科学研究棟5階：捕集期間2011年5月1日～7日）において、メンブランフィルター上に黄砂鉱物粒子を含むエアロゾル試料を12時間ごとに捕集した。また，2012年3月上旬に、能登半島珠洲市において、係留気球および航空機を組み合わせ、高度3000mまでの高高度サンプリングを施行した。試料をDAPIで染色した後、蛍光顕微鏡下でエアロゾル粒子を計数した。エアロゾル試料から直接抽出したゲノムDNAを鋳型に16S rRNA遺伝子（16S rDNA）をPCR増幅させ、クローンライブラリーを作成し、細菌種組成を系統分類学的に解析した。

健康影響を検討するために、金沢大学自然科学1号館4階ベランダにて（北緯36度32分、東経136度42分、海抜125 m、地上からの高さ15 m）平成23年3月17日から6月15日まで毎日6時間吸引ポンプと滅菌フィルターを用いて大気バイオエアロゾルを採集した。フィルターサンプルは、黄砂バイオエアロゾルのメタゲノム解析にために開発したDNA抽出法に従い直接DNAを抽出され、大気DNA濃度を測定した。また、アレルギーに悪影響を及ぼすとされる菌体成分のβ-グルカン濃度を測定した。

（３）黄砂バイオエアロゾルの健康影響評価

また、2011年、2012年と2013年の3年にわたり黄砂の飛来する春季（3月、4月、5月）に金沢市地上約10 m（金沢大学自然科学1号館4階ベランダ）にて日中6時間サンプリングを実施した。採集は、雑菌汚染のないようにあらかじめ滅菌処理されたメンブランフィルターに滅菌フィルターユニットを用いて36 L/minのダイヤグラムポンプなどを用いて吸引した。メンブランフィルターサンプルから直接DNAを抽出し、そのDNAライブラリーから大気DNA濃度測定、リアルタイムPCRを用いた毒素遺伝子検出を行った。

そのDNAをテンプレートとし、リアルタイムPCR法を用いたセレウリド産生性セレウス菌遺伝子(*CRS*遺伝子)やインフルエンザ菌、クラミジア菌、レジオネラ菌の各種毒素遺伝子の検出を行った。

（４）波及効果：黄砂バイオエアロゾル対策用マスクの開発

当初計画にはなかったが、黄砂バイオエアロゾルの体内への侵入防御策として、マスクの開発も提案、実施されている。黄砂付着微生物に対し抗菌性のあるマスク素材の開発に関しては、2009年能登半島上空3,500 mで直接採集・分離培養同定された*Bacillus sp* .BASZHN0901[5)]を用いて種々のフタロシアニン繊維の抗菌性を測定した。

## ４．結果及び考察

（１）沈着地域能登半島珠洲市における黄砂バイオエアロゾル直接採集・生物分析

黄砂バイオエアロゾルの直接採集・生物分析は、能登半島珠洲市を中心に、航空機、係留気球等を駆使して直接採集、分析方法としては、１）分離培養・同定、２）メタゲノム、３）耐塩性細菌などを実施した。以下にその生物分析方法を中心に示す。

１）分離培養・同定

航空機を用いた直接採集と分離培養・同定結果では、(a)2009年11月、(b)2010年3月、(c)2010年5月の3回のサンプリングから、それぞれ*Bacillus* sp.、*Bacillus* sp.、*Methylobacterium* sp.が単離された。それぞれ高度は(a)3,500 m、(b)2,900 m、(c)3,000 mであり、後方流跡線解析では、(a)ゴビ砂漠方面の西から、(b)ゴビ砂漠方面の西から、(c)シベリヤ方面の北からであった。黄砂現象の可否については、(a)非黄砂、(b)弱い黄砂、(c)ダストは多いが黄砂ではない、という結果であった。以上の結果から、西からの黄砂には*Bacillus* sp.が多く含まれ、黄砂ではない北からは*Bacillus* sp.ではなく*Methylobacterium* sp.などが含まれることがわかった。タクラマカン砂漠の砂から

*Bacillus* sp.が単離されていることから[1)]、砂漠から舞い上がる黄砂など西からは*Bacillus* 菌（枯草菌）が飛来すると考えられる。なお、この*Bacillus* 菌には、病原菌であるセレウス菌や炭疽菌なども含まれるため、黄砂とともに健康影響に関連する菌が飛来している可能性がある。他にも、2010年度および2011年度の係留気球・航空機を用いたサンプルから分離培養・同定法によって*Methlobacterium* sp.や*Staphyloccus* sp.など21菌株が新たに発見された。

２）メタゲノム解析

2010年5月の航空機を用いたサンプルのメタゲノム解析では*Variovorax*属菌株が54 %を占めることがわかった。優占種である*Variovorax* sp.の2種は2008年黄砂時の能登上空で検出された*Variovorax*の配列と100 %一致した。*Methylobacterium* sp.など15種の細菌（3種の新種を含む）が検出された。航空機ではなく同日の係留気球を用いた約1,000 mのサンプルからは*Sphingomonas* sp.や*Brevibacterium* sp.、*Ralstnia* sp.など17種の細菌（1種の新種を含む）が検出され、*Sphingomonas* とUncultured bacteriumの2種は、2009年非黄砂時の能登半島上空で検出された配列と100 %一致した。同じ日でも上空1 kmと3 kmでは浮遊しているバイオエアロゾルの生物種は異なることがわかった。2010年度および2011年度の係留気球・航空機を用いたサンプルからメタゲノム解析によって*Variovorax* sp.など107菌株が新たに発見された。

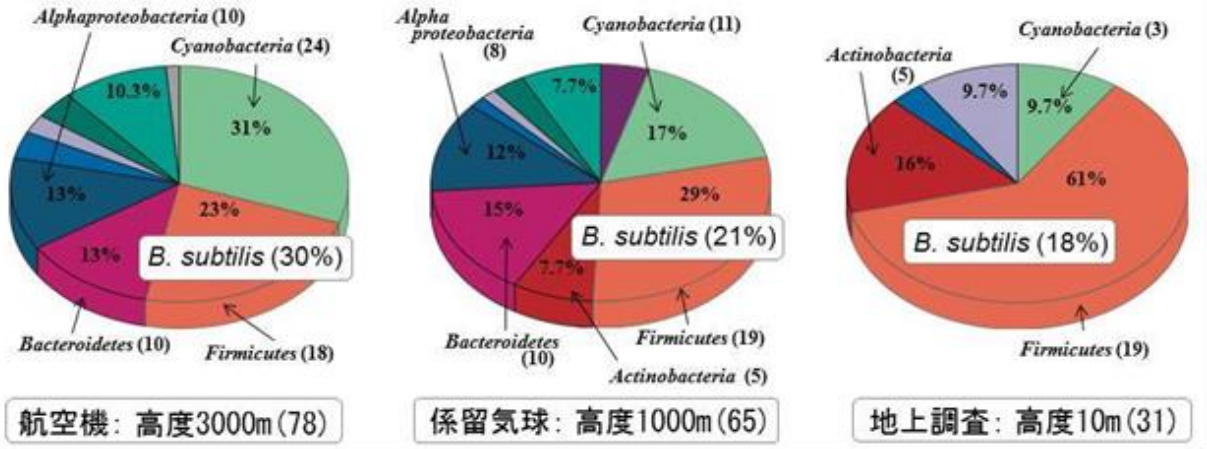
３）耐塩性細菌

航空機や係留気球サンプルの耐塩性細菌として単離された*Bacillus subtilis*グループの*gyrB*遺伝子配列を用いた系統学的分類によると黄砂とともに*Bacillus subtilis*が越境輸送された可能性が高いことがわかった。また、*Bacillus amyloliquefaciens*グループの*gyrB*遺伝子配列を用いた系統学的分類結果から、珠洲上空には特有の細菌群が存在することがわかった。2010年度および2011年度の係留気球・航空機を用いたサンプルから耐塩性細菌分析によって*Bacillus* sp.など39菌株が新たに発見された。

2012年3月1日に石川県珠洲市において航空機（3,000 m）、係留気球（1,000 m）、地上（10 m）の異なる高度で同時サンプリングを行った。 図(2)-1は、それぞれの高度の細菌種組成を示す。航空機（3,000 m）と係留気球(1,000 m)で検出され、地上（10 m）では検出されなかった*Alpha proteobacteria*や*Bacterioidetes*は、珠洲市上空を通り過ぎて、沈着しなかった細菌群と考えられる。また、係留気球(1,000 m)と地上（10 m）で検出され、航空機（3,000 m）で検出されなかった*Actinobacteria*などは地上が発生源で大気混合層を漂っている細菌群と思われる。航空機（3,000 m）、係留気球(1,000 m)と地上（10 m）のいずれの高度でも検出された*Firmicutes*や*Cyanobacteria*などは、石川県珠洲市に上昇流はほとんどないので、落下沈着している細菌群の可能性が高い。採集日は、黄砂観測日ではないのでバックグラウンド黄砂と考えられるが、日本を通り過ぎる細菌群や落下沈着する細菌群がわかった。落下沈着する細菌群の中で*Cyanobacteria*は、いわゆる藍藻とも呼ばれる真正細菌の1群であり、海洋起源と考えられる。黄砂付着微生物として注目される細菌群は*Firmicutes*であり、これまで黄砂付着微生物としてよく発見されている*Bacillus subtilis*を含む。黄砂付着微生物が通り過ぎ、落下沈着するメカニズムは不明であるが、気象条件や混合状態に大きく影響するものの黄砂付着微生物の種類や性状と大きく関与すると思われる。

黄砂沈着地域上空の係留気球や航空機を用いた直接採集および種々の生物分析結果から、黄砂

には非常に多種多様の微生物、黄砂バイオエアロゾルが含まれることがわかった。




図(2)-1. 16S rDNA クローンを用いた細菌種組成の垂直分布

（２）直接採集され分離培養された菌株のサブテーマ（１）への提供および提供菌の大気濃度

2008年5月7日に係留気球を用いて珠洲市において高度400mにて採集された*Norcardiopsis* sp. BASZUN0801、*Norcardiopsis* sp. BASZUN0802、*Norcardiopsis* sp. BASZUN0803、*Norcardiopsis* sp. BASZUN0804、および*Bjerkandera* sp. BASZUP0801、*Bjerkandera* sp. BASZUP0802など[4]の菌株を生体影響とメカニズム解明のためにサブテーマ（１）に提供した。

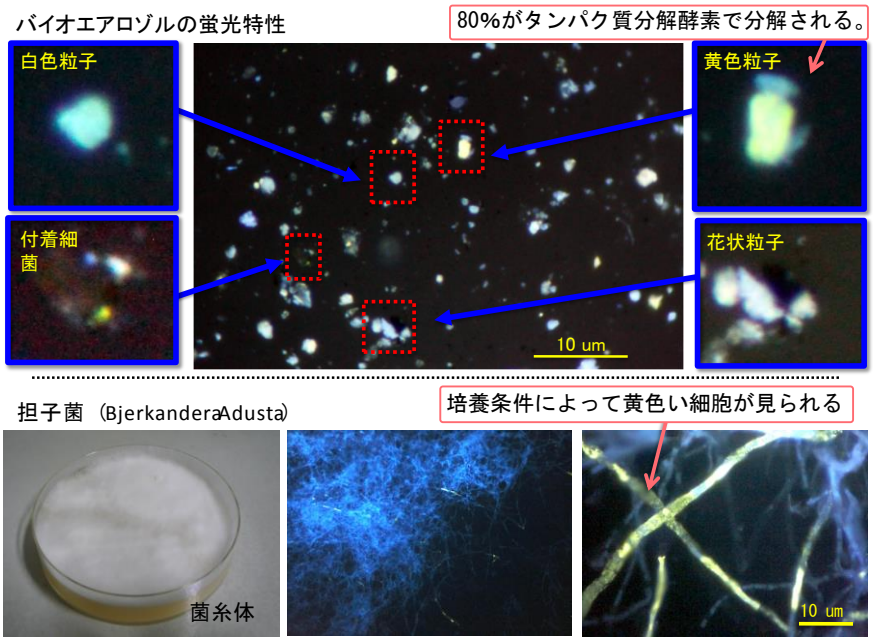
上記*Bjerkandera* sp.に関して、黄砂時における大気濃度等を実験的に検討した。黄砂発生時に採取した大気エアロゾル粒子を蛍光顕微鏡下で観察したところ、微生物細胞である青色粒子、鉱物粒子と見なせる白色粒子および有機物である黄色粒子が観察された。サブテーマ（１）でアレルギーを顕著に増悪させることが実証された真菌（*Bjerkandera*）は、黄色に呈する細胞も有し（図(2)-2)）、断片化して大気中に飛散すると考えられる。黄色粒子の粒子濃度は、黄砂が発生すると$10^5$ particles/$m^3$のオーダーの10倍に増大し、黄砂が続く限り高濃度を維持した (図(2)-3)。

黄砂発生時の細菌種組成の動態を示すクローンライブラリーでは、黄砂発生初期に海洋起源の藍藻が増え、黄砂時期の中盤において大陸に起因する細菌群が検出された (図(2)-4)。黄砂中盤で検出された特定細菌種（*Bacillus*）は、黄砂発生地（タクラマカン砂漠）および西風が卓越した珠洲上空1000mと3000mで採取した種と遺伝子レベルで100％の一致を示した。また，黄砂発生時には、アレルギーの増悪が懸念されるグラム陰性細菌が、100倍（$10^7$ particles/$m^3$）の細胞濃度にまで増え、全細菌数の10%から40%を占めた (図(2)-3)。

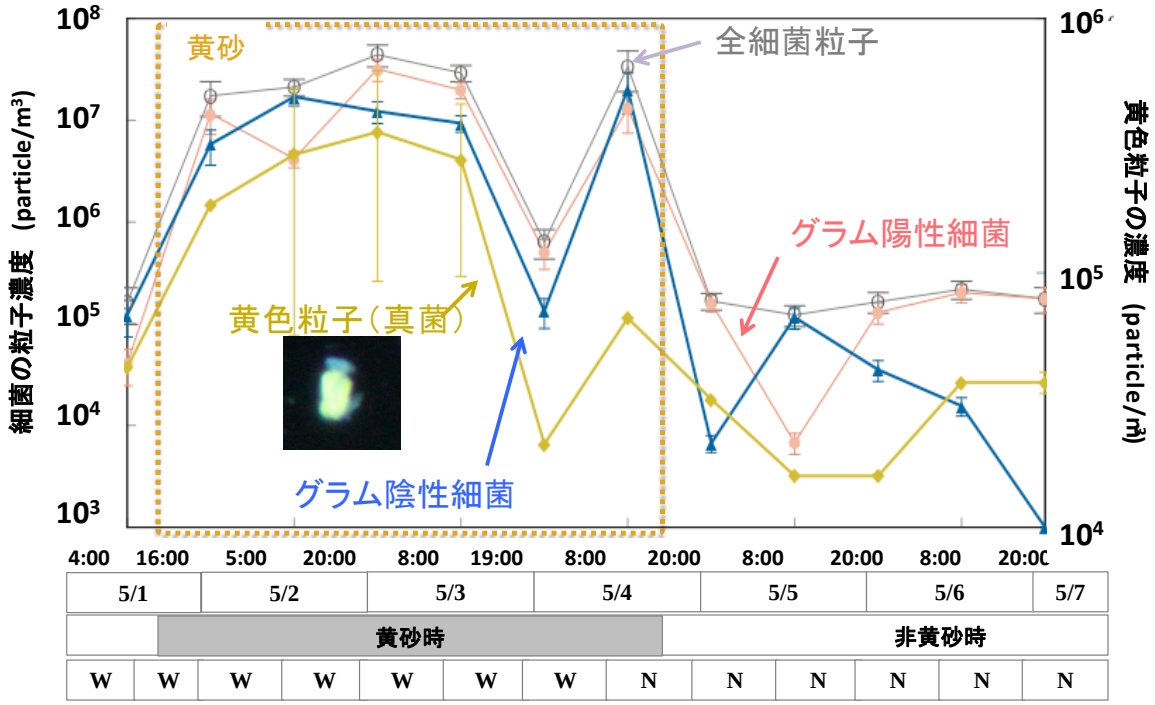
今回の結果によると、アレルギーを増悪させる微生物（担子のう菌、グラム陰性細菌）は、黄砂が発生すると10倍から100倍の細胞密度に増大し、2011年5月のように黄砂が長期化すると、その高い濃度を数日間維持する。

2011年3月17日から6月15日まで金沢大学で定点観測した大気DNA濃度を 図(2)-5に示す。種々ばらつきがあるものの、黄砂観測日（5月2、3、4、13日および6月4日）前後には大気DNA濃度が増加することがわかった。大気DNA濃度の定量性についてはまだ検討する余地があると思われる。黄砂観測日付近のサンプルからアレルギーを増幅させるといわれている微生物由来のβ-グルカン濃度を測定した結果、黄砂観測日に特異な濃度差がみられなかった。β-グルカンについては

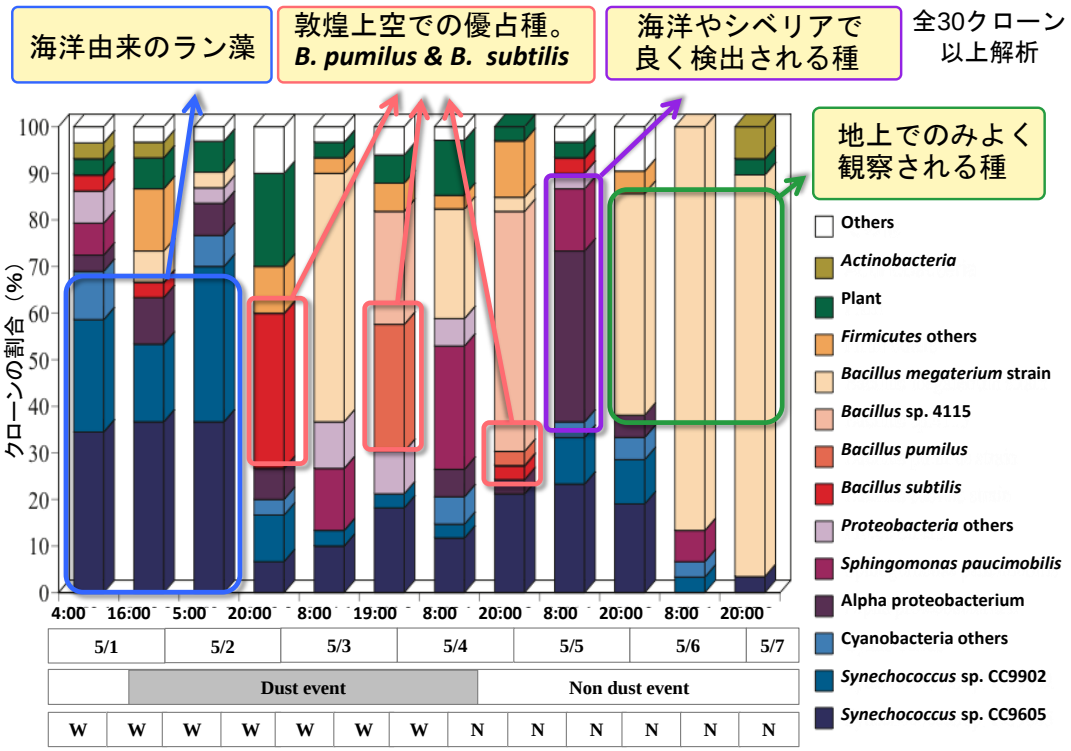
0.4μm以上のエアロゾル全てのサンプルを測定したので花粉や比較的大きい粒子に含まれるβ-グルカンが検出されてしまったと考えられる。まだ種々検討する必要があるものの、定点観測における大気DNA濃度およびそのサンプルからのDNA毒素遺伝子検出、β-グルカン濃度の測定が可能であることがわかった。



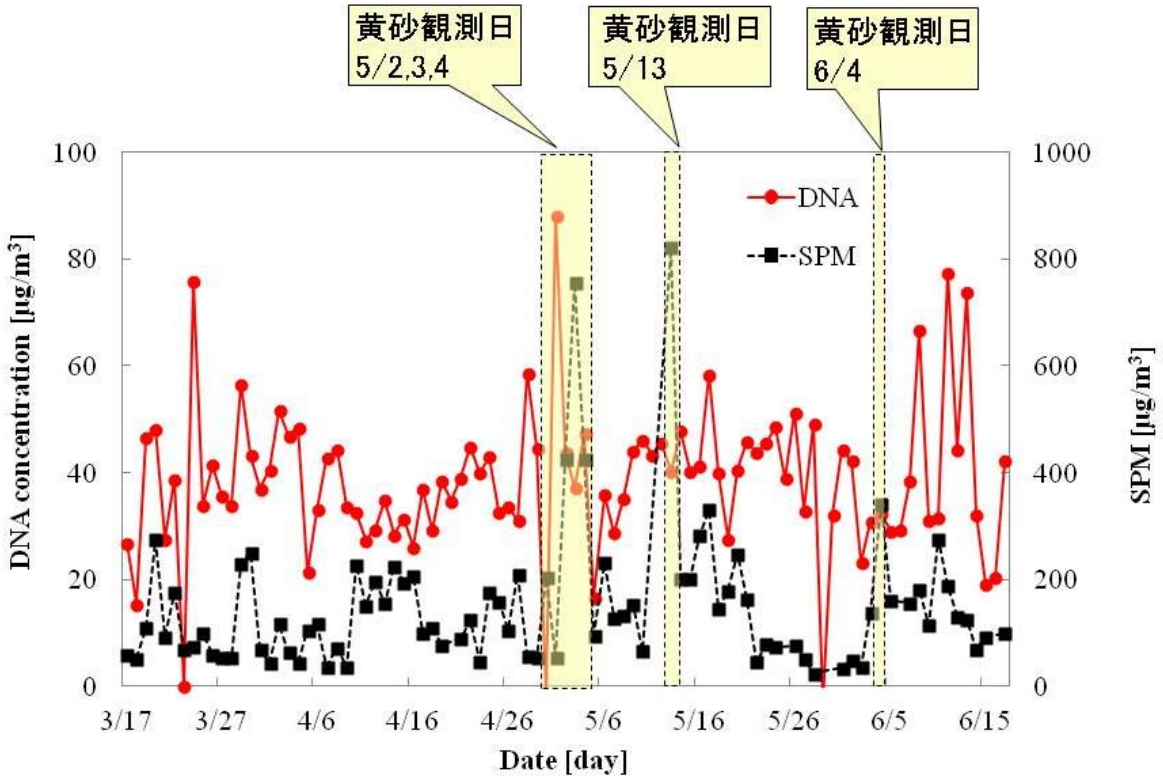

図(2)-2. *Bjerkandera*の顕微鏡観察




図(2)-3. 黄砂イベント時におけるバイオエアロゾル濃度の変化（顕微鏡観測）



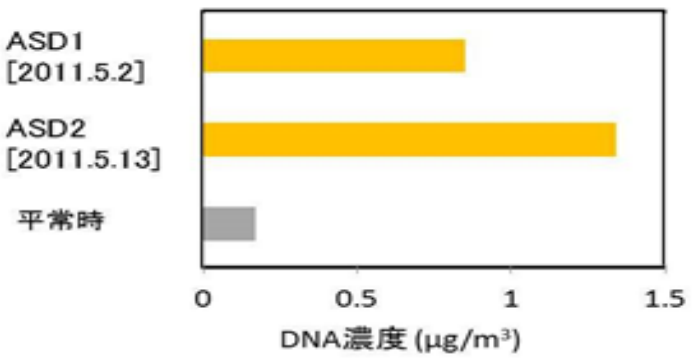

図(2)-4. バイオエアロゾルの種組成変化(2011年5月1日～7日)



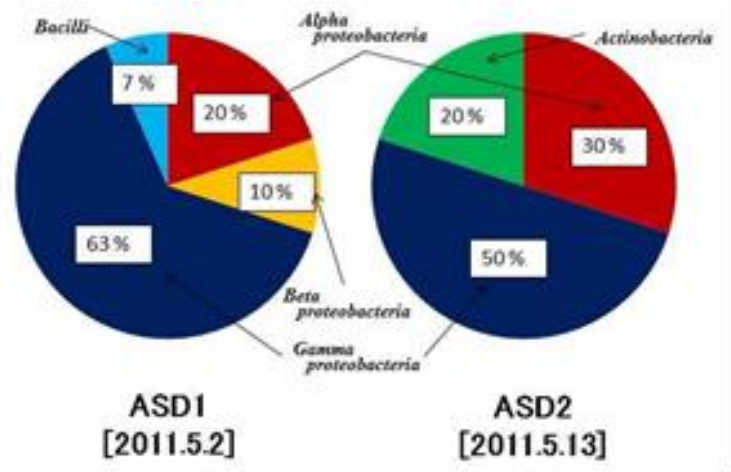

図(2)-5. 定点観測による大気DNA濃度

（３）黄砂バイオエアロゾルの健康影響評価

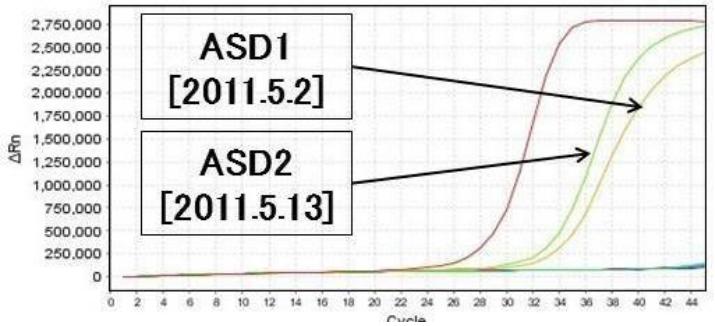
金沢市地上約10 mにおいて本年度も含め2011年、2012年と2013年の3年にわたり黄砂の飛来する春季（3月、4月、5月）にメンブランフィルターとポンプを用いて、毎日、金沢大学自然研１号館4階にて定点観測・採集を実施した。このサンプルの中で、2011年の黄砂イベントASD1（2011年5月2日）およびASD2（2011年5月13日）のDNAライブラリーサンプルに関して、大気DNA濃度の計測、16S rDNAクローンを用いた細菌種組成解析、およびリアルタイムPCRを用いた各種毒素遺伝子検出を行った。 図(2)-6は、黄砂イベントASD-1およびASD-2の大気DNA濃度を示す。この時のDNA抽出法は、経日変化を測定した 図(2)-5とは異なり、図(2)-6の方が正確と言える。ASD-2（2011年5月13日）の大気DNA濃度は、平常時の約8倍であり、ASD-1（2011年5月2日）の約1.5倍であった。黄砂によって多くの細菌が輸送され、黄砂イベントによって飛来する微生物量も異なることがわかった。図(2)-7は、黄砂イベントASD-1およびASD-2における16S rDNAクローンを用いた細菌種組成を示す。大気DNA濃度が低いASD-1は多様性が富み、黄砂イベントによって飛来する際菌種も異なることが分かった。黄砂イベントASD1もASD2も*Gammma proteobacteria*が優先した。*Gammma proteobacteria*には、サルモネラ（腸炎・腸チフス）、ビブリオ（コレラ）、緑膿菌（院内感染や嚢胞性線維症患者における肺感染症）など多くの病原菌を含んでいるので、黄砂付着微生物がヒトの健康に影響する可能性があると思われる。そこで、黄砂イベントASD-1およびASD-2のDNAライブラリーサンプルに対し、リアルタイムPCRを用いた毒素遺伝子検出を試みた。衛生指標菌としてバチルス属菌群と黄色ブドウ球菌を含むスタフィロコッカス属菌群および大腸菌やサルモネラ菌を含む腸内細菌群の遺伝子についてリアルタイムPCR検出を行った。図(2)-8は、バチルス属とスタフィロコッカス属遺伝子を用いたリアルタイムPCR検出結果を示す。閾値計算から、黄砂イベントASD-1は$1.64\times10^3$ copies/m$^3$、ASD-2は$5.29\times10^3$ copies/m$^3$の濃度で衛生指標菌バチルス属およびスタフィロコッカス属菌株を含むことがわかった。腸内細菌群遺伝子は検出されなかった。他にも、食中毒などの原因菌セレウス菌毒素セレウリド合成酵素遺伝子（CRS遺伝子）（図(2)-9)）、黄色ブドウ球菌毒素性ショック症候群毒素遺伝子（TSST-1）、O-157（ベロ毒素）遺伝子、および呼吸器系感染症起因菌遺伝子についても検出されなかった。図(2)-8から算出された菌数の健康影響評価のために、本黄砂イベント時にどれぐらい暴露された時に食品の微生物汚染が起こるか試算を行った。黄砂イベントASD-1およびASD-2の暴露限界時間はそれぞれ1.4hrsと49minとなった。食品微生物汚染として黄砂イベントASD-2は、ASD-1よりも約1.7倍危険な黄砂日であると言える。それぞれの黄砂イベントの健康影響に関する危険性を評価できた。



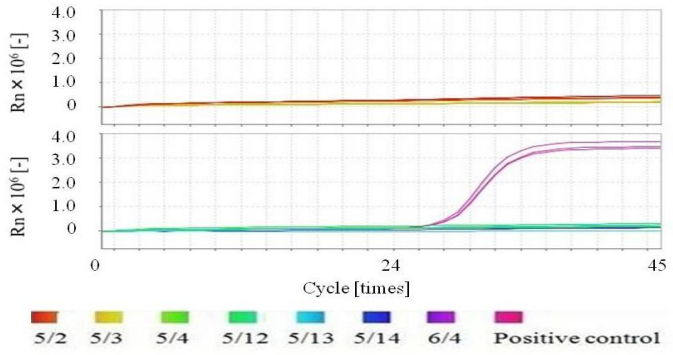

図(2)-6. 黄砂イベント時の大気DNA濃度




図(2)-7. 黄砂イベント時の16S rDNAクローンを用いた細菌種組成の比較




図(2)-8. 黄砂イベントのリアルタイムPCRを用いたバチルス・スタフィロコッカス遺伝子検出




図(2)-9. 黄砂イベントのリアルタイムPCRを用いたバチルスセレウス(CRS)毒素遺伝子検出

（４）波及効果：黄砂バイオエアロゾル対策用マスクの開発

これまで得られた知見を応用し、マスク素材の開発を試みた。これまでマスクの素材に関して、土壌菌などを対象に抗菌性などが試験されてきたが、実際に浮遊している黄砂バイオエアロゾルなどで試験する必要がある。そこで、実際の黄砂バイオエアロゾルに有効かどうか実験的に検討した。実験に使用された菌株は航空機を用いて直接された黄砂バイオエアロゾル*Bacillus* sp. BASZHN0901である。黄砂付着微生物対策用マスクの開発については、JIS L 1902の抗菌性試験方法の使用菌株を本研究で採集・分離培養同定された*Bacillus* sp.BASZHN0901を用いて検討した結果、静菌活性値および殺菌活性値のいずれにおいても、コバルト2 wt%担持フタロシアニンで効果があった。黄砂付着微生物、黄砂バイオエアロゾル対策用マスクとしては以上の繊維を用いればよいことがわかった。

## ５．本研究により得られた成果

### （１）科学的意義

これまでに健康影響評価が難しかった黄砂バイオエアロゾルに関して、係留気球や航空機を用いた直接採集と多角的な生物分析により、健康影響評価への可能性が導けるとともに、定点観測と大気DNA濃度測定、リアルタイムPCRを用いた毒素遺伝子検出によってこれまでなかった健康影響評価が可能になった。

黄砂時にはアレルギーを増悪するLPSを含むグラム陰性細菌やPGNを含むグラム陽性細菌，担子のう菌などの大気中の微生物濃度が10倍から100倍増加することを明らかにした。これまでよくわかっていなかった黄砂付着微生物の中で、日本上空を通り過ぎるものと落下沈着する細菌種が、航空機・係留気球・地上の高度別同時サンプリングとそのサンプルの細菌種組成解析で明らかになった。これまで簡易かつ精度の高い測定が難しかった黄砂イベント時おける黄砂付着微生物濃度の測定が、定点観測・捕集と直接DNA抽出・DNA測定法から可能になった。大気黄砂付着微生物濃度の指標となる大気DNA濃度は、黄砂イベントの時（ASD-2：2011年5月13日）には平時の約8倍であり、近日の黄砂イベント（ASD-1：2011年5月2日）の約1.5倍と全く異なることがわかった。これまで黄砂イベント時にどのような細菌種がいたか不明であったが、定点捕集DNAライブラリーの細菌種組成解析より明らかになった。さらに、新たに開発したリアルタイムPCRを用いた定点捕集DNAライブラリーからの毒素遺伝子検出法により、黄砂付着微生物として危険な黄砂イベントの程度測定法を提案できた。

### （２）環境政策への貢献

**＜行政が既に活用した成果＞**

特に特記すべき事項はない。

**＜行政が活用することが見込まれる成果＞**

係留気球や航空機を用いた黄砂バイオエアロゾルの直接採集・生物分析結果より黄砂に付着している微生物の健康影響評価が可能になると同時に定点観測からの大気DNA濃度測定、ダイレク

トな毒素遺伝子検出により将来的には大気監視項目の追加など環境政策への貢献の可能性が示された。

本研究での黄砂時の大気中におけるLPSやPGNを含む微生物濃度の増大から，黄砂時のアレルギー増悪の可能性を示唆した。環境省の黄砂問題検討会議における黄砂の危険性の検討において、本研究の成果である黄砂付着微生物の結果より、黄砂付着微生物としての危険性を提示できた。また、本研究の成果である定点捕集・DNAライブラリーを用いた大気DNA濃度計測、リアルタイムPCRによる毒素遺伝子検出法を、全国の気象台における観測に応用することによって、より緻密な黄砂の危険度を国民に情報発信できる。さらに、黄砂付着微生物用マスクの開発により、黄砂粒子のみならず黄砂付着微生物の防止すなわち、国民の健康阻害の防止に役立つと考えられる。

## ６．国際共同研究等の状況

本研究の直接的な業務ではないが、関連する業務として、黄砂発生点である中国北西部タクラマカン砂漠東端の敦煌市において毎年係留気球を用いた高高度や地上における黄砂の直接採集および生物分析を実施している。カウンターパートは、中国科学院大気物理研究所　石廣玉教授および陳彬助教である。

## ７．研究成果の発表状況

### （１）誌上発表

＜論文（査読あり）＞


1) T. MAKI, A. ISHIKAWA, F. KOBAYASHI, M. KAKIKAWA, K. AOKI, T. MATSUNAGA, H. HASEGAWA, Y. IWASAKA: Effects of Asian dust (KOSA) deposition event on bacterial and microalgal communities in the Pacific ocean. Asian Journal of Atmospheric Environment (2011) 5, 157-163.
2) F. KOBAYASHI, S. MOROSAWA, T. MAKI, M. KAKIKAWA, M. YAMADA, Y. TOBO, C.-SHON, S. MATSUKI, Y. IWASAKA: Atmospheric bioaerosol, Bacillus sp., at an altitude of 3,500 m over the Noto Peninsula: Direct sampling via aircraft. Asian Journal of Atmospheric Environment (2011) 5, 164-171.
3) B. CHEN, F. KOBAYASHI, M. YAMADA, Y-H. KIM, Y. IWASAKA, G-Y. SHi: Identification of cultureable bioaerosols collected over dryland in Northwest China: Observation using a tethered balloon. Asian Journal of Atmospheric Environment (2011), 5, 172-180.
4) 牧輝弥、青木一真、小林史尚、柿川真紀子、松木篤、木野恵太、長谷川浩、岩坂泰信：「立山積雪層に保存される黄砂バイオエアロゾルの集積培養と系統分類学的解析．エアロゾル研究(2011)，24, 332-340
5) F. KOBAYASHI, T. MAKI, AND Y. NAKAMURA: Biodegradation of phenol in seawater using bacteria isolated from the intestinal contents of marine creatures. International Biodeterioration and Biodegradation (2012), 69, 113-118.
6) T. MAKI, F. KOBAYASHI, M. YAMADA, H. HASEGAWA, Y. IWASAKA: NaCl-amendment assay targeting airborne bacteria in tropospheric bioaerosols transported by westerly wind over Noto Peninsula ansported by westerly wind over Noto Peninsula. Aerobiologia (2013), 9,

341-354.

7) T. MAKI, M. KAKIKAWA, F. KOBAYASHI, M. YAMADA, A. MATSUKI, H. HASEGAWA, Y. IWASAKA: Assessment of composition and origin of airborne bacteria in the free troposphere over Japan. AtmosphericEnvironment (2013) 74, 73-82.
8) 牧輝弥、福島理英、小林史尚、山田丸、長谷川浩、岩坂泰信：大気中を風送される細菌叢の 16S rDNA-クローンライブラリー解析. 分析化学 (2013), 62, 12, 1095-1104.
9) 牧輝弥、原和崇、山田丸、小林史尚、長谷川浩、岩坂泰信: バイオエアロゾルの蛍光顕微鏡観察. エアロゾル研究 (2013), 28, 3, 201-207
10) T. HIGASHI, Y. KAMBAYASHI, N. OHKURA, M. FUJIMURA, S. NAKANISHI, T. YOSHIZAKI, K. SAIJOH, K. HAYAKAWA, F. KOBAYASHI, Y. MICHIGAMI, Y. HITOMI, H. NAKAMURA: Exacerbation of daily cough and allergic symptoms in adult patients with chronic cough by Asian Dust: A hospital-based study in Kanazawa. Atmos. Environ (2014), in press.

＜その他誌上発表（査読なし）＞

1) 古本翔吾、牧輝弥、松木篤、原和崇、小林史尚、長谷川浩、岩坂泰信：日本分析化学会第 61 年会 展望とトピックス、p1 「氷晶核バイオエアロゾルの探索と定量化にむけた蛍光およびラマン顕微鏡観察法の確立」
2) 牧輝弥：ぶんせき(2014)印刷中 「PCR 法を併用した超並列シーケンサーによる環境微生物叢の群集構造解析」

（２）口頭発表（学会等）

1) 牧輝弥：黄砂現象の環境・健康影響、微生物および化学物質の長距離移動、総合地球環境学研究所中国環境問題研究拠点、地球研プロジェクト(2011)「黄砂バイオエアロゾルに含まれる細菌種組成」
2) 東朋美：黄砂現象の環境・健康影響、微生物および化学物質の長距離移動、総合地球環境学研究所中国環境問題研究拠点、地球研プロジェクト(2011)「黄砂バイオエアロゾルの健康影響調査」
3) T. MAKI, F. KOBAYASHI, M. KAKIKAWA, M. ATSUSHI, Y. IWASAKA: 2011 International Union of Geodesy and Geophysics General Assembly (IUGG), Melbourne, Australia (2011) 「Phylogenetic analysis of long-range transported bacteria isolated from Asian dust (KOSA) bioaerosols」
4) 山田丸、吉田翔太、亀田貴之、小林史尚、諸沢真治、中村香耶、松木篤、築城寿長、檜垣誠吾、岩坂泰信、早川和一：第20回環境化学討論会(2011)「環境中の多環芳香族炭化水素および細菌の除去を目的とした機能性繊維の開発及び評価」
5) 小林史尚、牧輝弥、柿川真紀子、岩坂泰信：第63回日本生物工学会大会(2011) 「黄砂バイオエアロゾルの植物生態系に及ぼす影響に関する萌芽的研究」
6) 牧輝弥、小林史尚、柿川真紀子、松木篤、山田丸、岩坂泰信：CIGR（国際農業工学会）国際シンポジウム2011，日本農業工学会第27 回シンポジウム・日本学術会議公開シンポジウム(2011)「黄砂バイオエアロゾルに含まれる微生物群種組成の特徴とその食文化への影響」

7) 岩坂泰信、山田丸、小林史尚、牧輝弥、柿川眞紀子、東朋美：CIGR（国際農業工学会）国際シンポジウム2011，日本農業工学会第27 回シンポジウム・日本学術会議公開シンポジウム(2011)「黄砂とともに長距離輸送する微生物」
8) 小林史尚、岩坂泰信、牧輝弥、柿川真紀子、山田丸、東朋美、長沼毅、松木篤：第5回南極観測シンポジウム(2011)「南極域の風送バイオエアロゾル実相調査」
9) F. KOBAYASHI, T. MAKI, M. KAKIKAWA, M. YAMADA, A. MATSUKI, T. NAGANUMA, AND Y. IWASAKA: The 2nd Symposium on Polar Science, Tachikawa, Japan (2011)「The research of atmospheric bioaerosols over Antarctica」
10) T. MAKI, F. KOBAYASHI, AND Y. IWASAKA: The 2nd Symposium on Polar Science, Tachikawa, Japan (2011)「Characteristics of cosmopolitan microbial communities transported by Asian desert dust (KOSA)」
11) T. MAKI, F. KOBAYASHI, M. KAKIKAWA, A. MATSUKI, M. YAMADA, Y. IWASAKA: The annual meeting of Sino-Japan S&T project, Hainan, China (2011)「Japanese fermented food produced by long-range transported bacteria in Asian dust (KOSA) bioaerosols」
12) M. KAKIKAWA, F. KOBAYASHI, T. MAKI, M. YAMADA, A. MATSUKI, Y. IWASAKA: The annual meeting of Sino-Japan S&T project, Hainan, China (2011)「The characteristics of airborne microorganisms in the atmosphere over an Asian dust arrival region, Noto peninsula, 2008-2010」
13) 山田丸、福山厚子、陳彬、張代州、小林史尚、牧輝弥、柿川真紀子、松木篤、早川和一、石広玉、岩坂泰信：日本気象学会2011年度秋季大会(2011)「OPCゾンデを用いた黄砂発生源上空の粒子数濃度 -粒径分布の鉛直分布観測：2010年9月15日の事例解析と過去の観測結果との比較」
14) 山田丸:第2回金沢大学若手研究者シーズ発表会(2011)「機能性マスク素材繊維の開発研究」
15) 小林史尚、牧輝弥、柿川真紀子、山田丸、長沼毅、松木篤、岩坂泰信：第6回大気バイオエアロゾルシンポジウム(2011)「南極域の風送バイオエアロゾル実相調査：気球等を使った先駆的生態系観測の展開」
16) 牧輝弥、小林史尚、青木一真、岩坂泰信：第6回大気バイオエアロゾルシンポジウム（2011）「黄砂によって長距離輸送される優占細菌種とその納豆発酵機能の解明」
17) 柿川真紀子、小林史尚、牧輝也、山田丸、松木篤、岩坂泰信：第6回大気バイオエアロゾルシンポジウム(2011)「非培養法による能登半島上空の生物種同定」
18) 山田丸、小林史尚、諸澤真治、吉田翔太、亀田貴之、中村香耶、松木篤、築城寿長、檜垣誠吾、早川和一、岩坂泰信：第6回大気バイオエアロゾルシンポジウム(2011)「環境中の細菌・有害有機化合物除去繊維の開発」
19) 松永智樹、牧輝弥、石川輝、青木一真、斎藤佑樹、岩坂泰信：第6回大気バイオエアロゾルシンポジウム(2011)「外洋船上実験を利用した黄砂が及ぼす海洋微生物生態系への影響の解明」
20) T. MAKI: Workshop on the persistent toxic substances (PTS) and persistent organic pollutants (POPs) ecological issues in the NOWPAP region (2011)「Phylogenetic analysis of bacterial communities included in free tropospheric bioaerosol over East Asia」
21) 東朋美、神林康弘、藤村政樹、大倉徳幸、吉崎智一、中西清香、西條清史、早川和一、人

見嘉哲、小林史尚、道上義正、朝倉大貫、山崎政美、三苫純子、岡田源作、中村裕之：東アジアにおけるエアロゾルの植物・人間系へのインパクト　第2回シンポジウム(2012)「黄砂による健康影響―慢性咳嗽の症状への影響―」

22) F. KOBAYASHI, T. MAKI, M. KAKIKAWA, M. YAMADA, A. MATSUKI, T. NAGANUMA, T. HIGASHI, Y. IWASAKA: 5th International Symposium on the Environment of the Rim-Japan Sea Regions (2012)「The research of atmosphere bioaerosol over Antarctica」

23) T. MAKI, F. KOBAYASHI, M. KAKIKAWA, K. AOKI, A. MATSUKI, M. YAMADA, Y. IWASAKA: 5th International Symposium on the Environment of the Rim-Japan Sea Regions (2012)「Japanese fermented food produced by long-range transported bacteria in Asian dust (KOSA) bioaerosols」

24) M. KAKIKAWA, F. KOBAYASHI, T. MAKI, A. MATSUKI, M. YAMADA, Y. IWASAKA: 5th International Symposium on the Environment of the Rim-Japan Sea Regions (2012) 「The characteristics of airborne microorganisms in the atmosphere over an Asian dust arrival region, Noto peninsula」

25) 牧輝弥、小林史尚、柿川真紀子、諸澤真治、山田丸、松木篤、岩坂泰信：第3回能登総合シンポジウム(2012)「能登半島上空に風送される大気バイオエアロゾル～西からの旅人と北からの旅人～」

26) 柿川真紀子：第3回能登総合シンポジウム(2012)「非培養法で同定した能登上空に浮遊する微生物，2008～2010春季」

27) 東朋美、神林康弘、藤村政樹、吉崎智一、早川和一、西條清史、人見嘉哲、小林史尚、道上義正、中村裕之：第82回日本衛生学会総会(2012)「黄砂による慢性咳嗽の症状への影響」

28) 牧輝弥:ニコニコ技術部金沢支部会（2012)「そらなっとう発売中;空の微生物を食べよう！」

29) T. MAKI, A. IAHIKAWA, F. KOBAYASHI, M. KAKIKAWA, K. AOKI, A. MATSUKI, H. HASEGAWA, Y. IWASAKA: Asia Oceania Geosciences Society (AOGS) General Assembly (2012)「Effects of Asian dust (KOSA) deposition event on microbial compositions in the Pacific Ocean」

30) 松永智樹、牧輝弥、石川輝、齋藤佑樹、堀内周、青木一真、長谷川浩、岩坂泰信：日本分析化学会第61年会（2012)「太平洋に沈着した黄砂鉱物粒子が及ぼす海洋微生物生態系への生化学的影響の解明」

31) 齋藤佑樹、牧輝弥、石川輝、松永智樹、青木一真、長谷川浩、岩坂泰信：日本分析化学会第61年会（2012)「黄砂鉱物粒子によって変動する海洋微生物群の核酸クローン解析」

32) 牧輝弥、小林史尚、柿川真紀子、松木篤、岩坂泰信:第35回極域気水圏シンポジウム（2012)「能登半島上空へと長距離輸送される大気バイオエアロゾル ～北極域および中国乾燥地帯～」

33) 牧輝弥、青木一真、小林史尚、柿川真紀子、松木篤、岩坂泰信：立山研究会2012,（2012)「黄砂バイオエアロゾルがもたらす発酵食品～「そらなっとう」から「やまなっとう」にむけて」

34) T. MAKI, M. KAKIKAWA, F. KOBAYASHI, M. YAMADA, A. MATSUKI, Y. IWASAKA：第7回大気バイオエアロゾルシンポジウム（2013)「Assessment of composition and origin of airborne

bacteria in the free troposphere over Japan」
35) 牧輝弥、小林史尚、柿川真紀子、山田丸、松木篤、岩坂泰信：第７回大気バイオエアロゾルシンポジウム（2013)「黄砂によって変動する大気バイオエアロゾル」
36) 牧輝弥、福島里英、小林史尚、岩坂泰信：第６回 環日本海域の環境シンポジウム（2013）「黄砂によって変動する大気バイオエアロゾル」
37) 牧輝弥、福島里英、小林史尚、岩坂泰信：第24 回日本沙漠学会学術大会 (2013)「沙漠で生まれる空の微生物」
38) 牧輝弥、柿川真紀子、小林史尚、山田丸、長谷川浩、岩坂泰信：第73回分析化学討論会(2013)「能登上空に風送される細菌群の16S rDNAクローンライブラリーを用いた種組成解析」
39) 小林史尚、牧輝弥、柿川真紀子、山田丸、松木篤、長沼毅、岩坂泰信：第65回日本生物工学会(2013)「南極域の風送バイオエアロゾル実相調査」
40) 早川遼、 岩田佳奈、 熊本洋平、 牧輝弥、 柿川真紀子、 岩坂泰信、 小林史尚：第65回日本生物工学会(2013)「黄砂バイオエアロゾルの種組成解析と影響評価」
41) T. MAKI, F. KOBAYASHI, M. KAKIKAWA, M. YAMADA, A. MATSUKI, Y. IWASAKA: American Association for Aerosol Research 32nd Annual Conference (2013)「Comparison of airborne bacterial compositions in bioaerosols collected at 3,000m, 1,000m, 10m over Japan」
42) 牧輝弥、北田悠、河合賢人、小林史尚、長谷川浩、岩坂泰信：第44回中化連秋季大会 (2013)「高度3000ｍで採取した納豆菌で製造した「そらなっとう」の機能評価」
43) 牧輝弥、小林史尚、松木篤、岩坂泰信：第19回大気化学討論会 (2013)「大気バイオエアロゾルとして選ばれる細菌種は？」
44) 牧輝弥、小林史尚、柿川真紀子、岩坂泰信：日本気象学会2013年度秋季大会 (2013)「高高度を風送されるバイオエアロゾルの細菌種組成解析」
45) 牧輝弥、小林史尚、柿川真紀子、岩坂泰信：第29回日本微生物生態学会 (2013)「自由対流圏を風送されるバイオエアロゾルの細菌種組成解析」
46) 小林史尚、牧輝弥、柿川真紀子、山田丸、松木篤、長沼毅、岩坂泰信：第16回南極エアロゾル研究会 (2013)「南極の風送バイオエアロゾル直接採集-第54次日本南極地域観測隊夏隊公開利用研究同行者実施報告-」
47) F. KOBAYASHI, T. MAKI, M. KAKIKAWA, M. YAMADA, A. MATSUKI, T. NAGANUMA, Y. IWAASAKA: The 4th Symposium on Polar Science (2013)「Direct sampling and bioanalysis of atmospheric bioaerosol on the Antarctic」
48) F. KOBAYASHI, T. MAKI, M. KAKIKAWA, M. YAMADA, A. MATSUKI, T. NAGANUMA, Y. IWAASAKA: The 4th Symposium on Polar Science (2013)「Direct sampling of atmospheric bioaerosol on the Antarctic using a tethered balloon」
49) F. KOBAYASHI, T. MAKI, M. KAKIKAWA, M. YAMADA, A. MATSUKI, T. NAGANUMA, Y. IWAASAKA: The 7th International Workshop on Sand/Duststorms and Associated Dustfall (2013)「Direct sampling of atmospheric bioaerosol using a tethered balloon on the Antarctic」
50) T. MAKI, F. KOBAYASHI, B. CHEN, F. PUSPITASARI, M. KAKIKAWA, A. MATSUKI, G. SHI, H. HASEGAWA, Y. IWASAKA: 7th International Workshop on Sand/Duststorms and Associated Dustfall (2013)「Diversity and structure dynamics of airborne bacteria (bioaerosols) in Dunhuang

City during a dust event」

51) 山田丸、中村香耶、亀田貴之、小林史尚、松木篤、築城寿長、檜垣誠吾、早川和一、岩坂泰信：第30回エアロゾル科学・技術研究討論会 (2013)「黄砂用マスクの開発と評価」
52) 小林史尚、牧輝弥、柿川真紀子、山田丸、松木篤、長沼毅、岩坂泰信：第8回大気バイオエアロゾルシンポジウム (2014)「南極域における大気バイオエアロゾル直接採集」
53) T. MAKI, F. KOBAYASHI, B. CHEN, F. PUSPITASARI, M. KAKIKAWA, A. MATSUKI, G. SHI, H. HASEGAWA, Y. IWASAKA: 8th Atmospheric Bioaerosol Symposium (2014)「Bacterial structures in atmosphere and sand dunes of Taklamakan Desert」
54) 東朋美、中村裕之：第5回サクラン研究会年次大会　第12回北陸先端科学技術大学院大学高資源循環ポリマーセンターシンポジウム　(2014)「黄砂の健康影響と予防法としてのサクランの活用」

**（３）出願特許**

1) 山田丸、亀田貴之、早川和一、岩坂泰信、小林史尚、松木篤、築城寿長、檜垣誠吾：金沢大学・ダイワボウノイ株式会社；特願2011－155806、平成23年7月14日「砂塵飛来有害物質及び微生物除去剤、砂塵飛来有害物質及び微生物除去セルロース繊維及び繊維構造物」

**（４）シンポジウム、セミナー等の開催（主催のもの）**

1) 第29回レーザセンシングシンポジウム：2011年9月8日-9日、石川県七尾市、約120名、実行委員(幹事)牧輝弥、実行委員(会計)小林史尚、実行委員柿川真紀子、山田丸など
2) 第6回大気バイオエアロゾルシンポジウム：2011年12月9日-10日、東京都立川市、約80名、実行委員(幹事)山田丸、実行委員小林史尚、牧輝弥、柿川真紀子、東朋美など
3) 第5回環日本海域の環境シンポジウム(5th International Symposium on the Environment of the Rim-Japan Sea Regions)：2012年2月3日-4日、石川県金沢市、約70名、実行委員小林史尚、牧輝弥、柿川真紀子、東朋美など
4) 第3回能登総合シンポジウム：2012年3月16日-17日、石川県珠洲市、約50名、実行委員　　小林史尚、牧輝弥、柿川真紀子など
5) 第７回大気バイオエアロゾルシンポジウム：2013年1月31日－2月1日、滋賀県彦根市、約70名、実行委員(幹事)牧輝弥、実行委員小林史尚、山田丸、柿川真紀子、東朋美など
6) 第6回環日本海域の環境シンポジウム：2013年3月2日－3月3日、石川県金沢市、約50名、実行委員牧輝弥、柿川真紀子、東朋美など
7) 第8回大気バイオエアロゾルシンポジウム：2014年1月21日～22日、大阪市、約70名、実行委員(幹事)牧輝弥、実行委員小林史尚、山田丸、柿川真紀子、東朋美など

**（５）マスコミ等への公表・報道等**

1) 北國新聞（2012年3月1日、石川県版、28頁）「上空3千メートルの細菌で納豆」
2) 北國新聞（2012年3月4日、一面）「黄砂の細菌　繊維で除去」
3) NHKワールドTV科学技術情報番組「Science View」（平成25年1月18日、大気バイオエアロゾルの顕微鏡観察の成果について5分間ほど紹介）

4) TOKYO FMエフエムラジオ番組「フロンティアーズ 明日への挑戦」（平成24年12月1日、大気バイオエアロゾル研究のこれまでの成果について30分間ほど紹介）
5) NHKニュース おはよう日本（NHK総合）（平成24年11月5日、大気バイオエアロゾルの観測調査の成果について10分間ほど紹介）
6) テレビ朝日「モーニングバード」（平成24年8月23日、大気バイオエアロゾルの観測調査の成果について10分間ほど紹介）
7) ニコニコ生放送（平成24年7月22日、大気バイオエアロゾルの観測調査の成果について10分間ほど紹介：20分間生放送、1万人が閲覧）
8) 朝日新聞グローブ（平成25年1月6日朝刊、全国版：G-1頁）
9) 毎日新聞（平成25年1月7日朝刊、地方版石川、21頁）
10) 朝日新聞（平成24年10月19日朝刊、地方版石川、27頁）
11) 中日新聞（平成24年9月13日朝刊、全国版総合、3頁）
12) AFPBBNews：Agence France-Presse(フランス通信社)（平成24年9月5日、国際）
13) 読売新聞（平成24年8月27日朝刊、地方版地域、29頁）
14) 日本経済新聞：共同通信社（平成24年8月16日夕刊、全国版社会、14頁）
15) 毎日新聞（Yahooニュース）（平成24年8月17日朝刊、全国版社会、25頁）
16) テレビ朝日「やじうまテレビ！」（2013年4月2日、黄砂付着微生物の納豆菌を使用した雲チェンバー実験について紹介）
17) 北陸朝日放送[ニュース]週刊Jチャンネル（2013年4月5日、ヘリコプターを使って高高度の黄砂付着微生物を採取する大気観測調査について紹介）
18) NHK「マサカメTV」（2013年4月13日、黄砂付着微生物の大気観測風景ともども、「そらなっとう」を15分間ほど紹介）
19) 日経サイエンス（平成25年5月号、40頁-47頁）
20) 朝日新聞（2013年5月17日、朝刊全国版教育、24頁）
21) BS朝日「ボクらの地球」（2013年5月24日、立山の積雪に含まれる微生物で作成した納豆と積雪を利用した黄砂付着微生物について5分ほど紹介）
22) 北陸朝日放送[ニュース]週刊Jチャンネル（2013年6月14日、黄砂付着微生物研究に取り組む牧輝弥について密着取材を行い、25分間ほど紹介）
23) 毎日新聞（2013年7月1日、朝刊地方版石川、22頁）
24) 北國新聞（2013年7月2日、朝刊かなざわ、28頁）
25) 北國新聞（2013年7月3日、朝刊社会1、29頁）
26) 北國新聞（2013年7月7日、朝刊地方社会、19頁）
27) 朝日新聞（2013年7月5日、夕刊全国版、1頁）
28) 北陸朝日放送[ニュース]週刊Jチャンネル（2014年1月29日、大気バイオエアロゾルシンポジウム紹介）

**（６）その他**

特に記載すべき事項はない。

## ８．引用文献


1) 岩坂泰信等：「黄砂」古今書店，ISBN978-4-7722-3125-1 (2009)
2) T. ICHINOSE *et al*.: Pulmonary toxicity induced by intratracheal instillation of Asian yellow dust (Kosa) in mice. Environmental Toxicology and Pharmacology, 20, 48-56 (2005)
3) 小林史尚等：黄砂発生源におけるバイオエアロゾル拡散に関する研究．エアロゾル研究，22, 218-227 (2007)
4) 小林史尚等：能登半島珠洲市上空における黄砂バイオエアロゾルの直接採集および分離培養・同定．エアロゾル研究、25, 23-28 (2010)
5) F. KOBAYASHI *et al*.: Atmospheric bioaerosol, Bacillus sp., at an altitude of 3,500 m over the Noto Peninsula: direct sampling via aircraft. Asian Journal of Atmospheric Environment, 5, 164-171 (2011)

## （３）黄砂エアロゾルに含まれる化学物質の計測とその細胞毒性に関する研究

産業医科大学
医学部　吉田　安宏
嵐谷　奎一
産業生態科学研究所　上野　晋

平成23(開始年度)～25年度累計予算額：8,322千円
（うち、平成25年度予算額：2,470千円）
予算額は、間接経費を含む。

［要旨］
黄砂粒子の化学的・物理的検索は、Andersen Hi-volume air samplerを用いて、黄砂粒子を捕集した。黄砂粒子を含む全粉じん濃度、黄砂粒子に付着する化学物質の多環芳香族炭化水素（PAHs）とニトロ多環芳香族炭化水素（nitro-PAHs）に注目し、高速液体クロマトグラフを用いて測定した。また、黄砂粒子の粒径と元素組成について、走査型電子顕微鏡により検索した。その結果、黄砂飛来時の全粉じん濃度は、それ以外の全粉じん濃度に比べて明らかに高濃度を認めた。また、黄砂粒子の粒径は0.88μm以上で、不定形であり、微粒子には認められなかった。X線回折法で黄砂特有のSi、Mg、Ca、Fe、Naが認められた。PAHsとnitro-PAHsは粒径1.1μm以下の微粒子に90%以上が含有し、黄砂粒子の含有は少ない事が認められた。捕集された黄砂の細胞への影響を毒性、言い換えれば細胞動態および細胞内イベントの解析により、評価した。方法は黄砂を頻回投与した曝露モデルマウスを作成し、そのマウスの細胞、特にリンパ組織の細胞群を回収し解析した。細胞への影響は、細胞の活性化能を増殖活性により、また細胞死のイベントが起きる際に役割を持つ分子に着目し、その変化をウエスタンブロット法により評価した。黄砂に曝露した群から採取した脾臓細胞はマイトジェンに対する相対反応が低かった。しかしながら、無刺激の状態では黄砂による若干の活性化が認められた。その現象は単回黄砂投与の脾臓細胞でも観察された。これらの結果は、黄砂投与後のイベントが、肺と脾臓では異なったタイミングで起こっていることを示唆している。またそれは細胞内分子で、様々な細胞内イベントに関与する転写因子NF-κBの動向と同じであった。
風送黄砂に付着している成分の情報提供ができ、それらをもとに毒性などの生体影響を調査する筋道を整える準備ができた。今後は得られた知見を発展させ、リスク評価パラメーター値などの策定などにも応用できるのではと考えている。

［キーワード］
黄砂、有機化学物質、多環芳香族炭化水素、免疫細胞毒性反応、転写因子NF-κB

## １．はじめに

黄砂は、中国大陸内陸部砂漠地帯や黄土地帯の土壌が大気攪乱によって数千メートルの高さまで巻き上げられて拡散し、その黄砂粒子は、中国の都市部や工業地帯を通過する中で、化石燃焼由来のガス状成分や有害成分を吸着して、日本に飛来して来る。この黄砂飛来により、呼吸器疾患やアレルギーなどの健康影響が危惧されるため、飛来する黄砂粒子による健康影響を評価する事が重要である。そこで中国大陸から飛来する黄砂エアロゾルの化学的・物理的性状の究明、細胞培養試験などによるそれらの毒性評価を行う。黄砂飛来時期を主にして、年間を通して粒子の捕集を実施する。黄砂は、元素成分、イオン類、多環芳香族炭化水素（PAHs）やニトロ多環芳香族炭化水素(nitro-PAHs)等の分析、これらに加えて微生物成分の分析と、粒径分布や形態観察を行う。また、黄砂エアロゾル及び抽出化学成分の免疫担当細胞に対する毒性試験を行う。

## ２．研究開発目的

本研究では中国大陸から飛来する黄砂エアロゾルの化学的・物理的性状を究明し、ヒトへの健康影響のリスク評価を行う有用な指標の探索をおこなう。また、それらの細胞毒性評価を行うことを主たる目的としている。細胞毒性は特に曝露モデルマウスのリンパ組織から調製した細胞内イベントを解析することで評価する。その際、曝露する物質の性質を変えながら、曝露評価を進めた。また、詳細な細胞内イベントの解析を行う目的で、レポーター細胞（HEK-TLR2-NF-*k*B細胞）株を用いた評価方法も行った。

## ３．研究開発方法

（１）黄砂エアロゾルの化学的・物理的性状の解明

黄砂イベント時における風送黄砂の捕集は、産業医科大学 (北九州市八幡西区折尾)で3月中旬～5月の黄砂飛来時期に行った。捕集装置は分粒特性を有するHi-volume及びLow-volume air samplerを用いた。捕集用フィルターはテフロンフィルターと石英フィルターを用いた。4段階のフィルターで得られた粒子状物質は生物特性、化学的及び物理的性状の検索に用いた。黄砂は主に2011年5月1日～3日と5月12日～14日の黄砂イベント時に捕集した黄砂を分析した。前者の黄砂日の黄砂をASD1、後者の黄砂日のものをASD2とした。黄砂粒子を含む全粉じん濃度、黄砂粒子の金属成分、付着するイオン類、また有機化学物質の多環芳香族炭化水素（PAHs）とニトロ多環芳香族炭化水素（nitro-PAHs）を測定した。金属類はプラズマ原子発光分析器（ICP-AES, 61E Trace and ICP-750, Thermo Jarrell-Ash, MA）によって測定した。PAHs分析は、超音波抽出→濃縮→高速液体クロマトグラフで分離し、強い発癌性のあるBenzo(a)pyreneを含む14種を定量した。nitro-PAHsはGC/MS/MSで、3-nitrofluoranthene、1-nitropyreneを測定した。黄砂粒子の形態検索は、走査型電子顕微鏡、元素分析は、X線-回析法によって行った。微生物成分のLPSとβ-グルカンは生化学工業のLPS and β-グルカン アッセイキットを用いて測定した。

一方、捕集された黄砂の細胞毒性評価は、黄砂曝露マウスのリンパ組織の細胞群を回収し、細胞活性化能を増殖活性により測定し、また細胞死のイベントが起きる際に役割を持つNF-*k*Bに着目し、その変化をウエスタンブロット法により評価した。

（２）毒性評価

１）黄砂のマウスへの気管内投与

実験動物には雄性ICRマウスを用い、黄砂（ASD）の曝露は4回気管内投与により行った。黄砂を加熱処理し、付着物を取り除いた黄砂（hASD）も準備し投与を行った。本実験はサブテーマ（１）のマウスを共用して行った。最終投与24時間後に、麻酔下にてマウスを屠殺し、脾臓を採取した。亜急性の反応を見るためのモデルマウスを作成し、黄砂1回気管内投与後、1日、3日で脾臓を採取した。また、有機化学物質の例としてTar 1μg、Tar 5μgを用いて、同様に気管内投与を行い、化学物質曝露モデルマウスを準備した。

２）細胞表面マーカーおよび脾臓細胞増殖反応、サイトカイン産生の解析

細胞表面マーカーは蛍光色素をラベルしたモノクローナル抗体で染色後、FACSを用いてCD3、CD19、CD11b、CD80、CD86、MHC classIIについて解析した。またマイトジェン（細胞分裂誘起物質）であるLPS、ConA刺激に対する脾臓細胞の増殖反応は、96ウエルプレートに$2 \times 10^5$/wellでまき、培養72時間後にプロメガのCell viability assay systemを用いて評価した。サイトカイン産生はELISA 法により、IL-2、TNF-α、IL-6の産生を測定した。

３）細胞内イベントの解析

細胞の生存に関与する因子 (p62、LC3-II、PARP)の発現量あるいは活性化は特異的抗体を用いたウエスタンブロット法により解析した。簡単に以下に方法を記す。マウスから採取した脾臓を細胞溶解緩衝液 (RIPA)中に入れ、細胞溶解液を調製した。脾臓細胞の場合、Tris-Ammonium液で赤血球を壊した後、調製した。その溶解液のタンパク量を、プロテインアッセイキット (Bio-Rad)で測定し、各サンプル10μgの細胞溶解液を準備した。それらをサンプル緩衝液とともに、3分間煮沸し、ready-madeゲル (ATTO)にアプライした。電気泳動 (20mA、80分)終了後、ゲルをニトロセルロースメンブランにウエット式トランスファー (200mA、70分)を行い、ウエスタンブロット用のメンブランを得た。そのメンブランを1%BSA含有PBS-Tween緩衝液でブロッキングしたのち、それぞれに特異的な1次抗体 (p62、LC-3、PARP、p-p65（NF-κBの構成成分の一つである分子)、β-actin)を用いて2時間反応させた。PBS-Tween緩衝液で洗浄後、HRP標識2次抗体で1時間反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼに対する基質を加え、化学発光をCCDカメラで撮影した。得られたウエスタンブロットの結果をImageJにてタンパク量を解析・数値化した。またハウスキーピング分子のβ-actinによりそれぞれのバンドのdensityを標準化し、グラフ化した。

４）レポーター細胞を用いた黄砂付着物による免疫担当細胞への影響評価

NF-*k*Bレポーター細胞（HEK-TLR2-NF-*k*B細胞）を用いて、加熱黄砂（hASD）もしくは、2011年5月に飛来したイベントの異なる2種の黄砂（ASD1、ASD2）を添加して、12時間後の転写因子NF-*k*B活性を調べた。

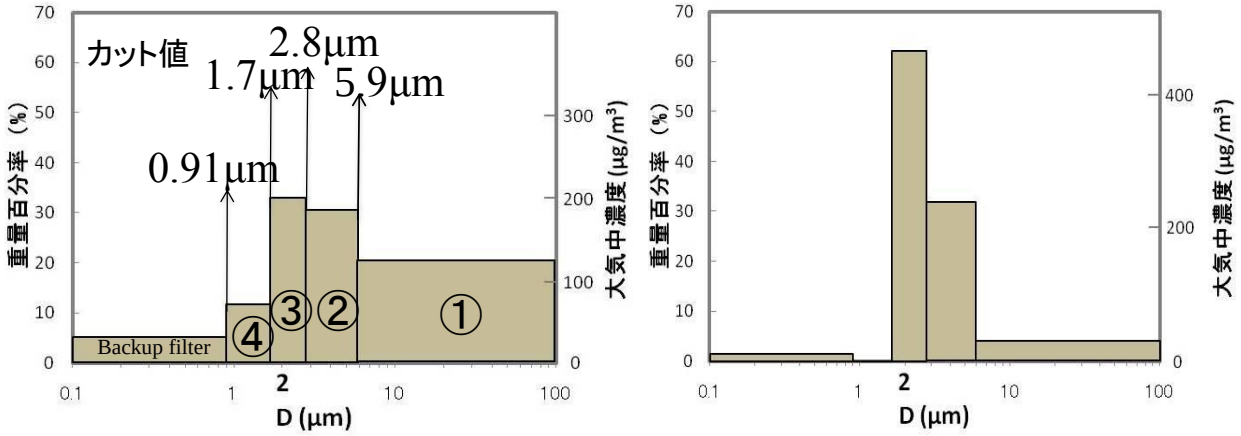
## ４．結果及び考察

（１）黄砂エアロゾルの化学的・物理的性状の解明

１）イベントが異なる２つの黄砂の成分分析と大気中のPAHs濃度

ａ　黄砂イベント時に採取した２種類の黄砂の粒子径と成分比較

ハイボリュームアンダーセンサンプラーで捕集したASD1（2011年5月1～3日採取黄砂）とASD2（2011年5月12～14日採取黄砂）の粒径別重量（%）分布を 図(3)-1に示した。図中にフィルターのカット値を示す。図に示すようにASD2は2 mm付近の細かな粒子の含有量が多い。次




**ASD1 (2011/5/1-3に飛来した黄砂)**　　**ASD2 (2011/5/12-14に飛来した黄砂)**

図(3)-1. 黄砂の粒径別重量 (%)分布

にアニオン・カチオン、ミネラル成分と微生物由来の成分含量を 表(3)-1に示した。ASD2の黄砂はASD1の黄砂に比較して大気汚染物質由来の硝酸イオン（$NO_3^-$）や硫酸イオン（$SO_4^{2-}$）量が多く、海塩由来と思われる$Na^+$や$Cl^-$イオンもかなり多く混入していた。またLPSやβ-グルカンの微生物由来の毒素成分量もASD2の方が多かった。その分、ASD2の方がASD1よりも黄砂粒子の主成分である二酸化ケイ素（$SiO_2$）や三酸化アルミ($Al_2O_3$)等のミネラル含有量が少なかった。また主要多環芳香族炭化水素（PAHs）含有量についても 表(3)-2に示すごとくASD1よりもASD2の方が多かった。フィルター別では 図(3)-1に示す④カット値（0.91～1.7μm）フィルターの粉じんのPAHs量が高く、BghiP（Benzo(ghi)perylene）やChrysene量が多かった（データ示さず）。

表(3)-1. ASD1とASD2黄砂のアニオン・カチオン、ミネラル成分と微生物由来の毒素成分量

| 成分 | 含有量(μg/mg) | |
|---|---|---|
| | ASD1(5/1-3) | ASD2(5/12-14) |
| $Cl^-$ | 11 | 54 |
| $NO_3^-$ | 13 | 50 |
| $SO_4^{2-}$ | 9.2 | 16 |
| $NH4^+$ | 0.96 | 0.023 |
| $Na^+$ | 72 | 35 |
| $Ca^{2+}$ | 14 | 23 |
| $Mg^{2+}$ | 1.5 | 5.2 |
| $SiO_2$ | 710 | 510 |
| $Al_2O_3$ | 130 | 94 |
| $Fe_2O_3$ | 54 | 43 |
| CaO | 25 | 14 |
| $CaCO_3$ | 35 | 58 |
| MgO | 30 | 27 |
| $TiO_2$ | 6 | 4.2 |
| LPS(ng/mg) | 0.061 | 0.214 |
| β-Glucan(ng/mg) | 0.355 | 28.16 |

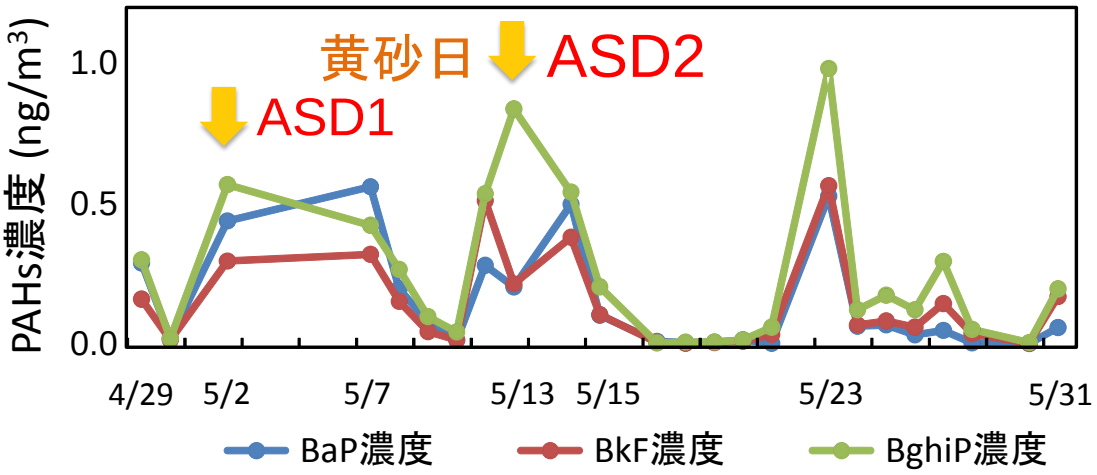
表(3)-2. 2種の黄砂の主要多環芳香族炭化水素 (PAHs)濃度

| 測定日 | PAHs濃度(ng/g,粉じん)濃度 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | BaP | BkF | BghiP | BbF | Indeno | Chrysene |
| ASD1 | 439 | 296 | 569 | 170 | 377 | 734 |
| ASD2 | 660 | 455 | 672 | 350 | 552 | 1122 |

(注)粒径0.9μm以上の黄砂粉じん中のPAHs濃度表示
BaP:Benzo(a)pyrene,BkF:Benzo(k)fluoranthene,BghiP:Benzo(ghi)perylene,
BbF:Benzo(b)fluoranthene,Indeno:Indeno(1,2,3-cd)pyrene.
ASD1:2011年5月1～3日採取黄砂;ASD2:2011年5月12～14日採取黄砂

b　2つの黄砂イベント時の大気中のPAHs濃度

2011年5月1～3日採取黄砂と2011年5月12～14日採取黄砂の大気中のPAHsの代表的なBaP、BkFとBghPの大気中濃度を (図(3)-2)に示した。5月上旬の黄砂日と中旬前期の黄砂日には明らかに大気中のこれらのPAHsに増加が見られた。BaPはアレルギー反応を増悪すること、強力な発がん作用があること、BkFとBghPにも発がん作用や発がん促進作用があることから、黄砂日にこれらのPAHs濃度が大気中に著しく増加することは人の健康を考える上でも重要な問題である。黄砂のアレルギーの増悪作用はこのようなPAHsの大気中の増加に原因するかも知れない。

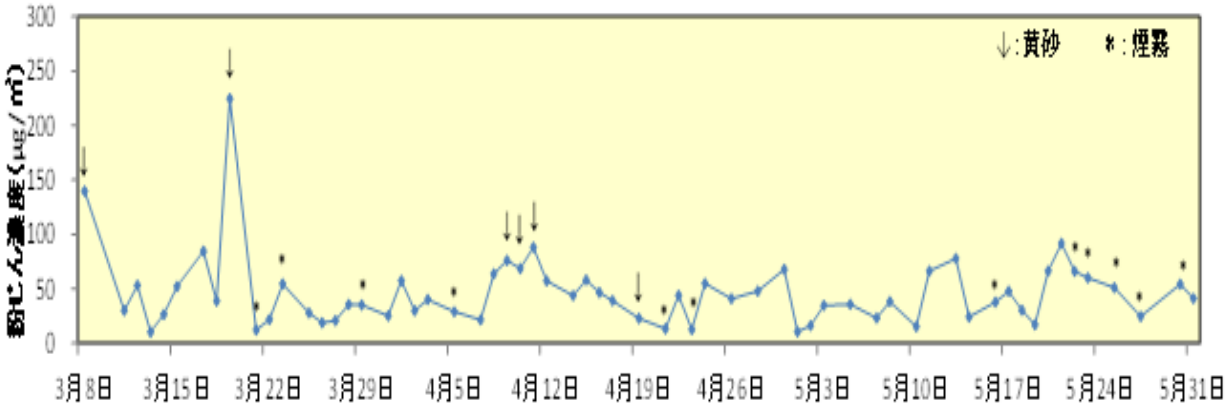



図(3)-2. 2011年4月末～5月　大気中のPAHs濃度の日変動（折尾）

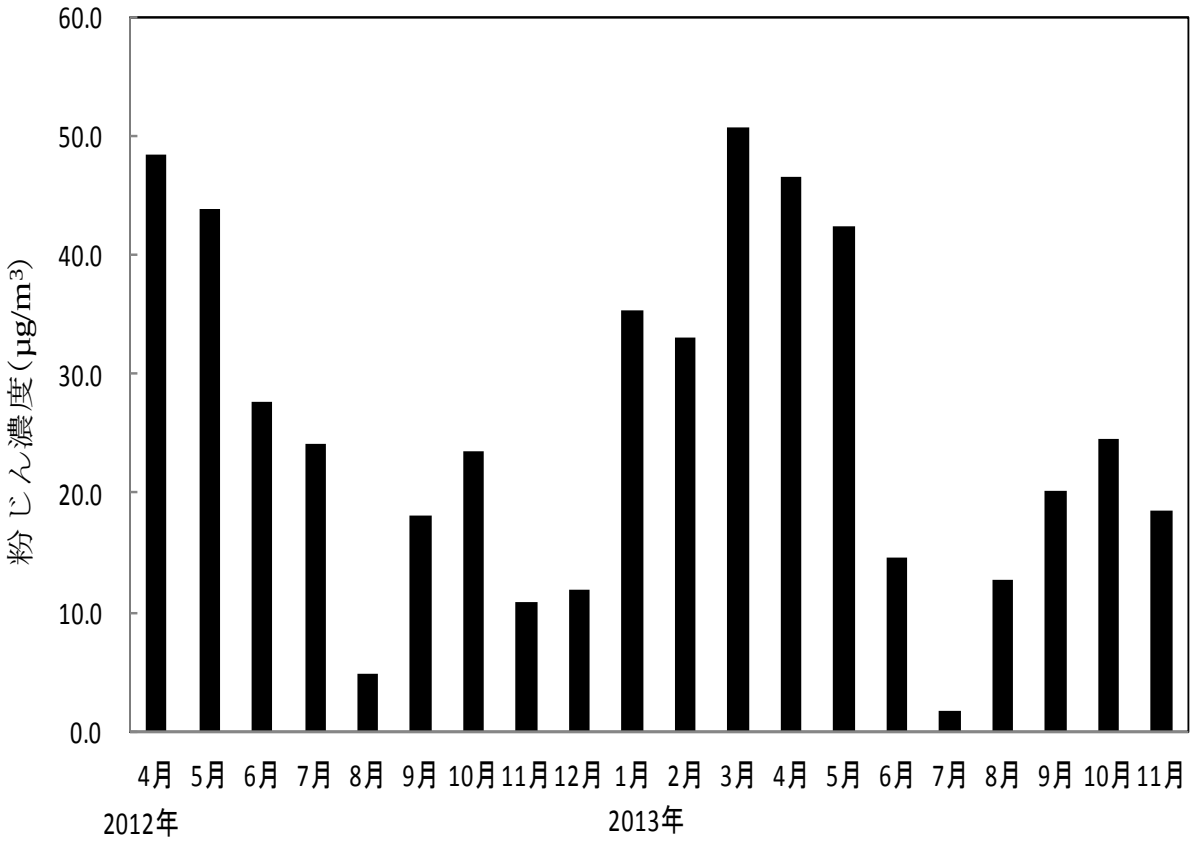
2）2012-2013の大気中の粉じん濃度

2013年3月中頃から5月にかけ、ほぼ連日の粉じん濃度 (図(3)-3)と2012年3月から2013年11月までの月中頃の3日間の平均粉じん濃度 (図(3)-4)を測定した。図(3)-3に示すように3月19日黄砂飛

来時は224μg/m3 と最大の値を得た。図(3)-4に示すように、月別平均濃度は夏季に最も低く、春から冬季に高値で、特に黄砂の影響を受けた春の5月が高い値であった。

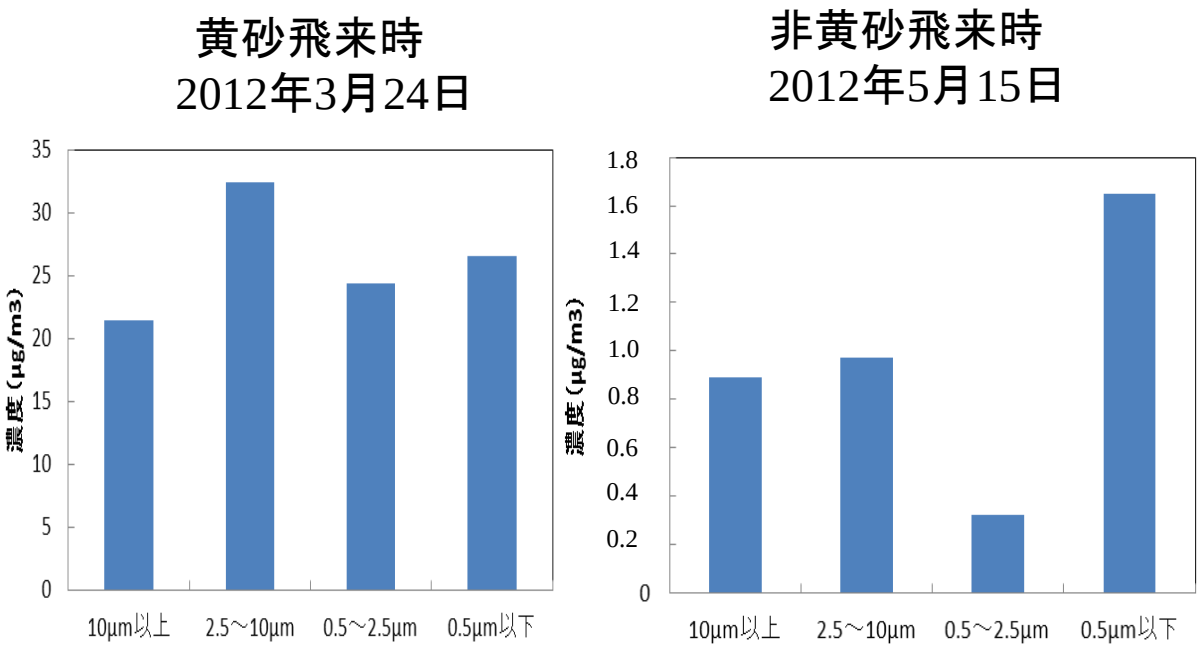



図(3)-3. 粉塵濃度の推移

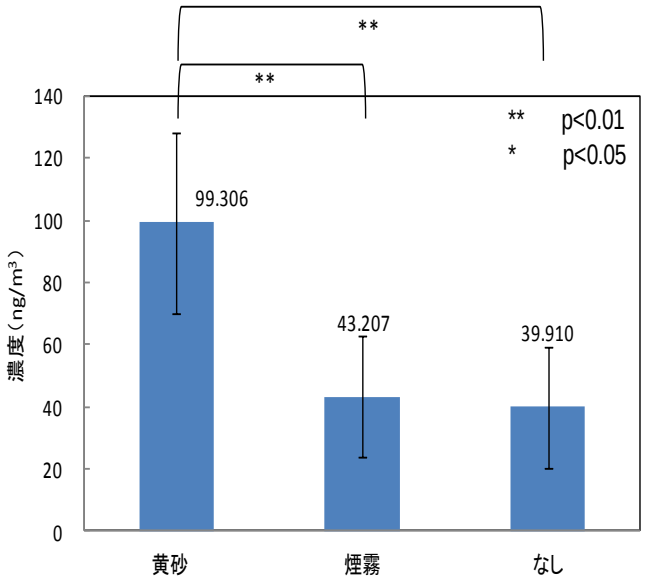



図(3)-4. 全粉塵濃度の月別濃度推移 (2012年4月～2013年11月)

大気中の浮遊粒子状物質の粒経特性は、図(3)-5に示すように、黄砂飛来時は2.5～10μmの粒経が最も濃度が高く、非黄砂飛来時は2.5μm以下の微小粒子濃度が高く、明らかに黄砂飛来時には粗大粒子が多い事が認められた。2013年3月～5月の期間で黄砂、煙霧飛来時の粉じん濃度の比較を行った。その結果、明らかに黄砂飛来時の粉じん濃度は煙霧や非黄砂・煙霧飛来時に比べ有意に高値であった (図(3)-6)。



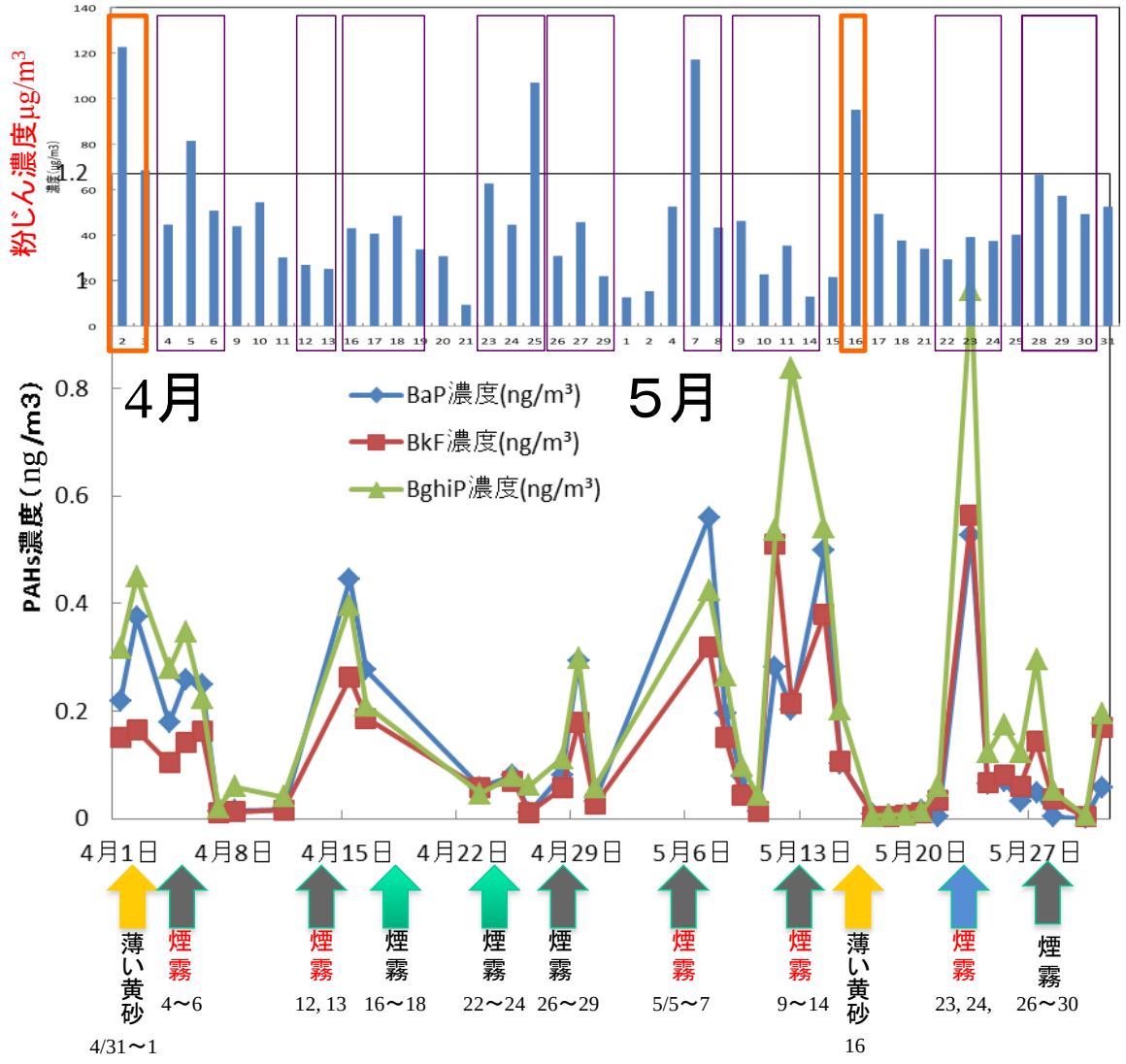

図(3)-5. 浮遊粒子状物質の粒径分布



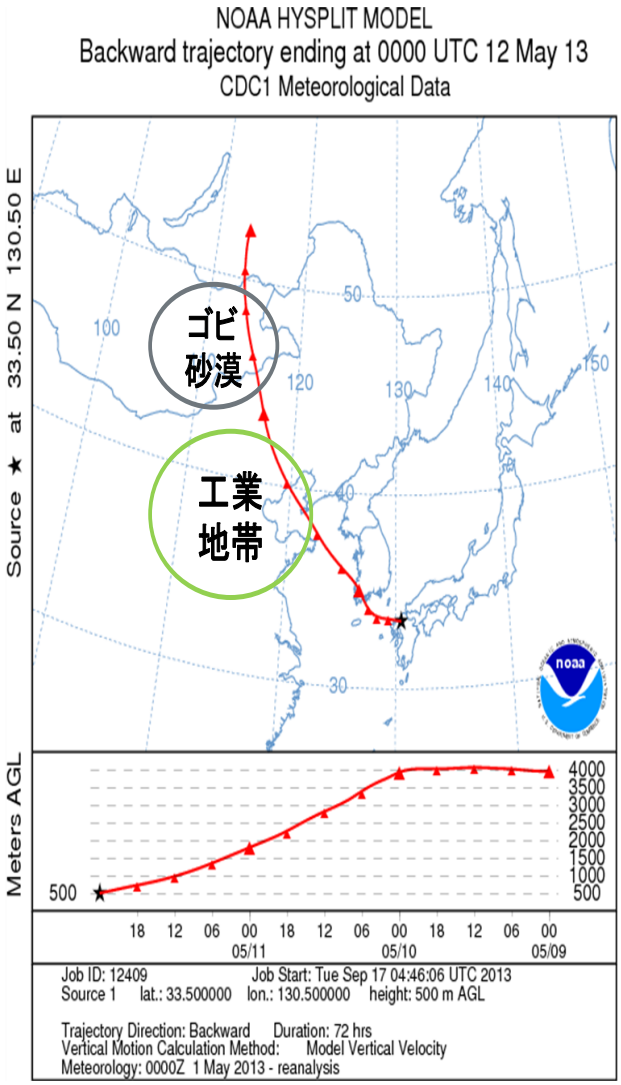

図(3)-6. 黄砂、煙霧、その他非飛来時の平均粉じん濃度比較（2013年3月～5月）

3）2013年3月−5月の大気中粉じん濃度とPAHs濃度

2013年4月から5月にかけて連日と2012年4月～2013年11月の約1年間の中頃3日間の大気中のPAHs濃度を測定した。図(3)-7に示すように2013年4月から5月にかけてのPAHs濃度も粉じん濃度の変動と同様に日間変動が認められ、黄砂、煙霧飛来時にそれ以外の日時に比べて高い濃度傾向が認められた。しかし黄砂・煙霧の影響を受けていない5月13日にPAHs濃度が極めて高い濃度が認められた。濃度の増加要因について後方流跡線解析を用いて汚染の起源を検討した。図(3)-8に示すように、この日は、モンゴル・ゴビ砂漠付近から発生した気塊が、北京などの工業地帯の化石燃料の燃焼により発生した高濃度のPAHsを含み、九州地方に到達した影響と考えられる。




図(3)-7. 大気中の粉じん濃度(上段）と代表的なPAHs濃度の日間変動(下段）

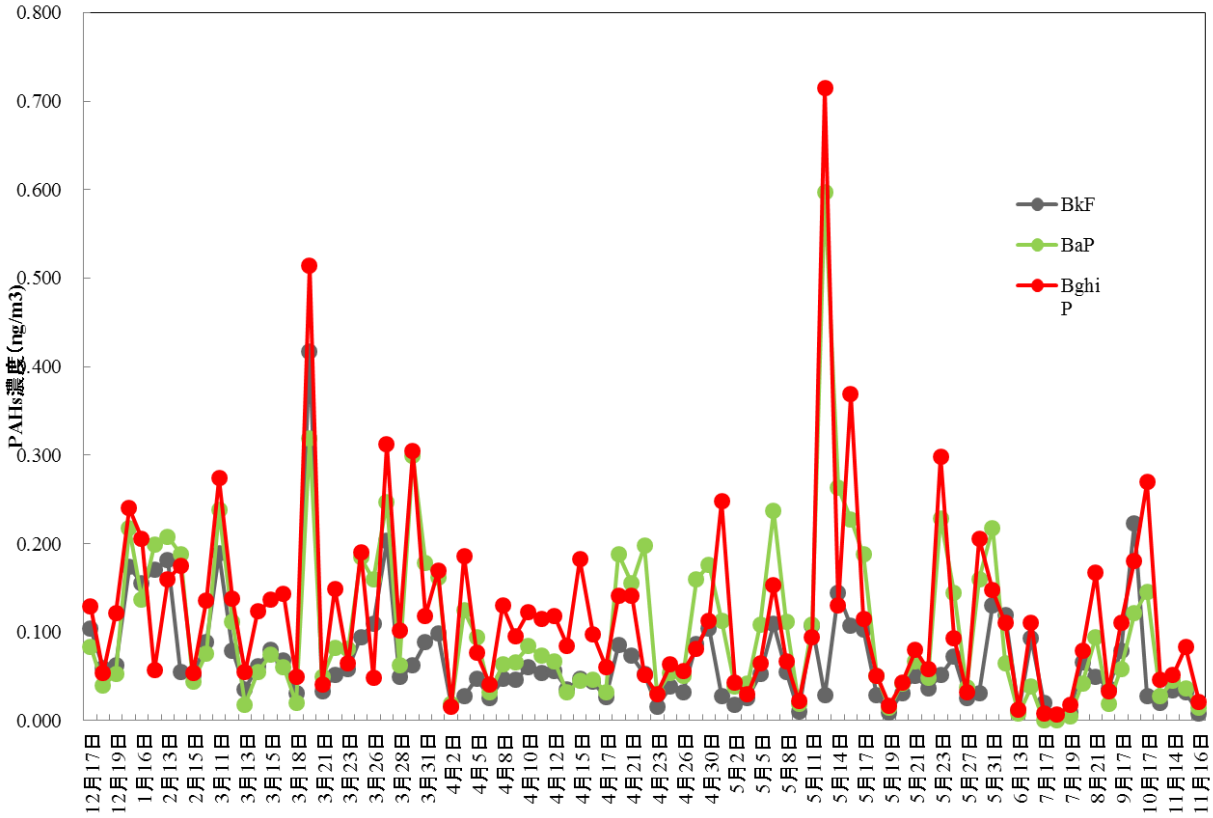



図(3)-8. 2013年5月13日の後方流跡線解析

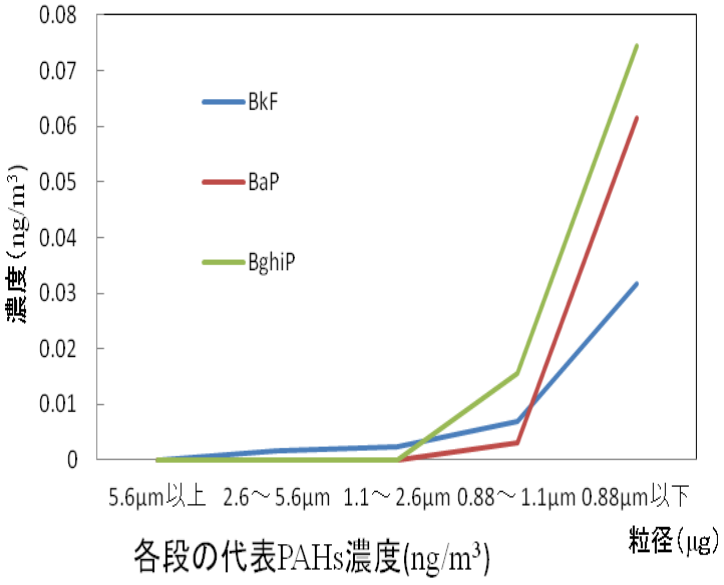
図(3)-9に示すように2012年4月～2013年11月のPAHsの月別濃度は粉じん濃度と同様に夏季に極めて低値、冬から春季にかけて高値であり、明らかに冬～春季節は大陸で暖房等に用いられる化石燃料の使用量が増加するためと考えられる。

2013年3月8～9日のPAHsおよびnitro-PAHs濃度の分粒特性を求めた。PAHs濃度は粒形1.1μm以上の粒子にほとんど認められず、1.1μm以下の微粒子に90%以上が含有していた (図(3)-10)。

また、nitro-PAHs濃度はPAHsと同様に0.88μm以下の微粒子にほぼ100%が含有していることが認められた。なお、nitro-PAHs濃度はPAHs濃度に比べ1/10以下であった (図(3)-11)。




図(3)-9. 多環芳香族炭化水素の経日変化（ng/m$^3$）2012年12月～2013年11月




図(3)-10. 各段の代表的なPAHs濃度2013年3月8～3月9日

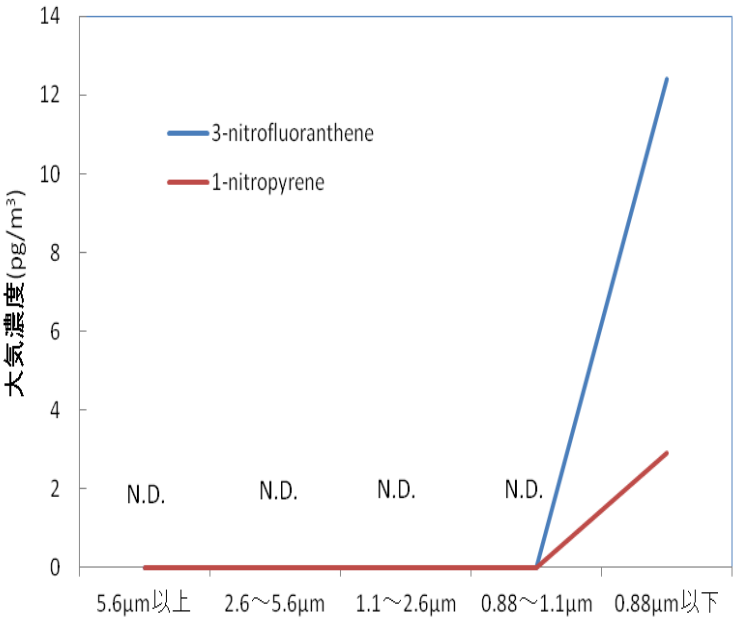
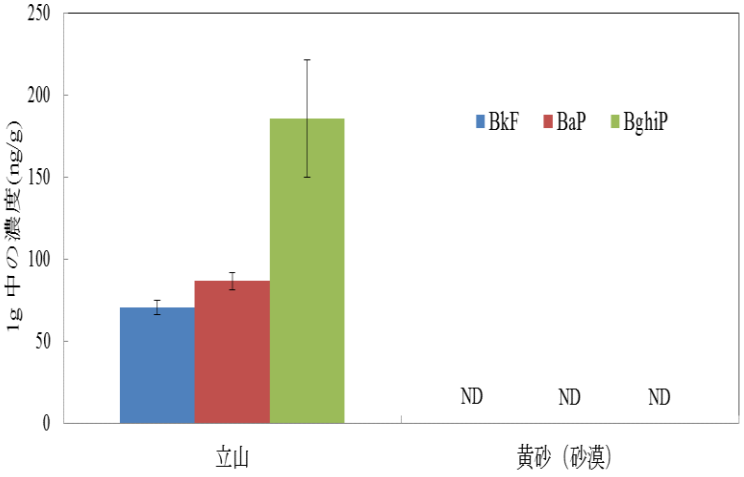



図 (3)-11. 各段の代表的な Nitro-PAHs濃度 2013年3月8～3月9日

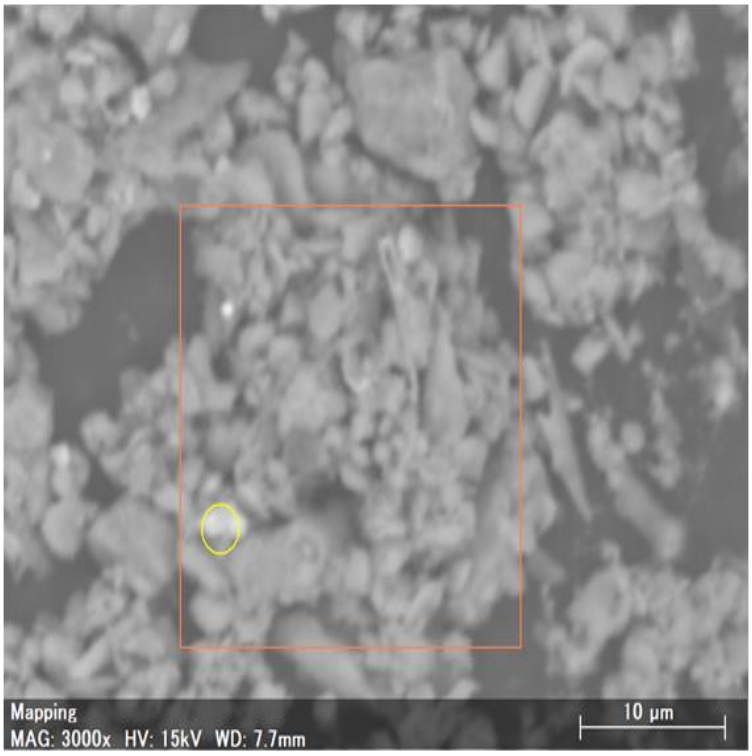
飛来する黄砂粒子にPAHsが含有しているかどうかについて、2009年3月13日に富山県立山・室堂平(2,450m)から採取した黄砂粒子のPAHs濃度を測定した (図(3)-12)。3種のPAHs濃度は50～200ng/gであり、黄砂発生源のモンゴルで採取した、黄砂粒子にはPAHsはほとんど含有していなかった。従って、日本に飛来する黄砂には中国の工場地帯で発生した汚染物質が含有されていることが示唆された。



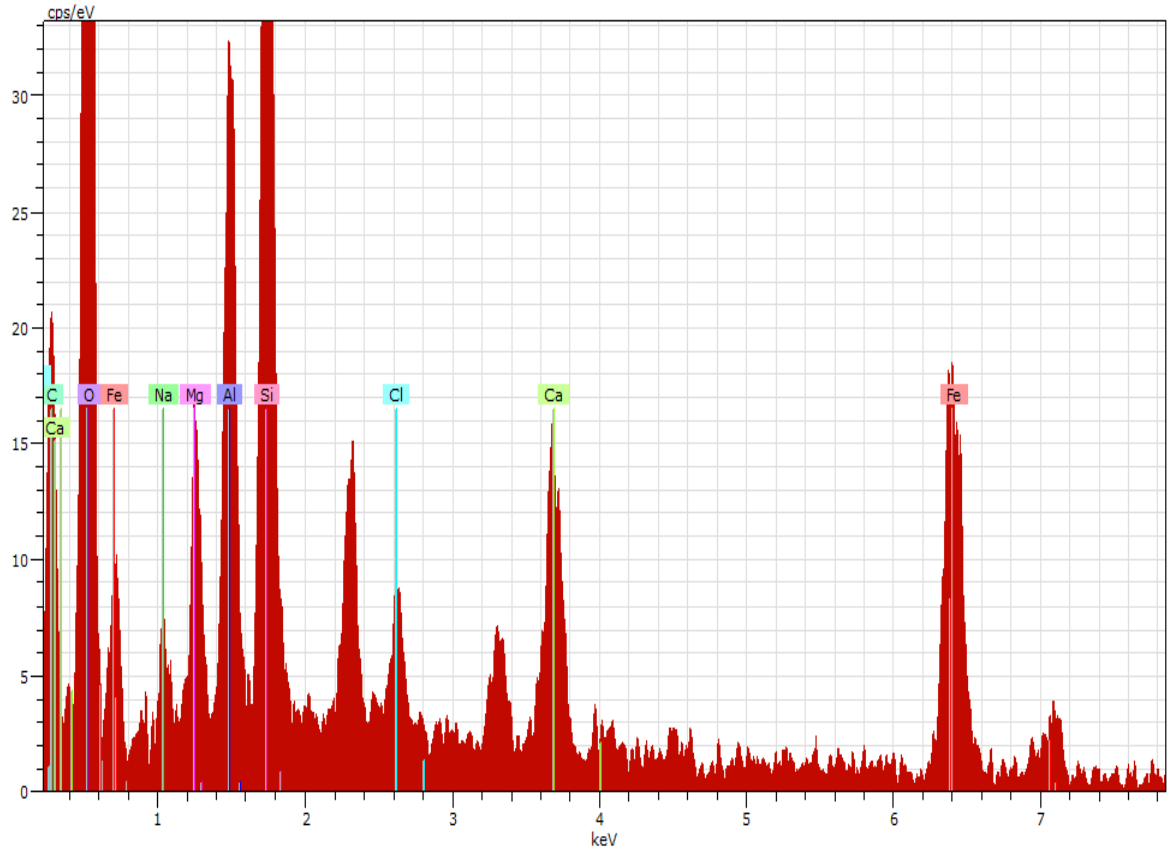

図(3)-12. 黄砂付着PAHs濃度比較

4）黄砂粒子の形態及び元素特性

黄砂粒子の形態及び元素特性Andersen Hi-vorume air samplerで粒子を捕集し、走査型電子顕微鏡を用い形態及び元素特性を調べた。その結果、0.88μm以上の各段のすべてから黄砂粒子が認められた。2段目（2.6～5.6μm）の粒子中の黄砂の電子顕微鏡像は不型形で (図(3)-13)、黄マーク)、X線回析スペクトルにより黄砂特有のSi、Mg、Al、Ca、Fe、Naが認められた (図(3)-14)。




図(3)-13. 電子顕微鏡写真（2段:2.6～5.6μm）

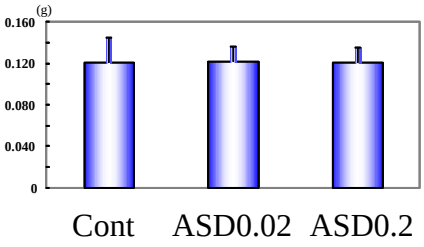



図(3)-14. クロマトグラム（2段目　2.6～5.6μm）

（２）毒性評価

１）脾臓細胞重量

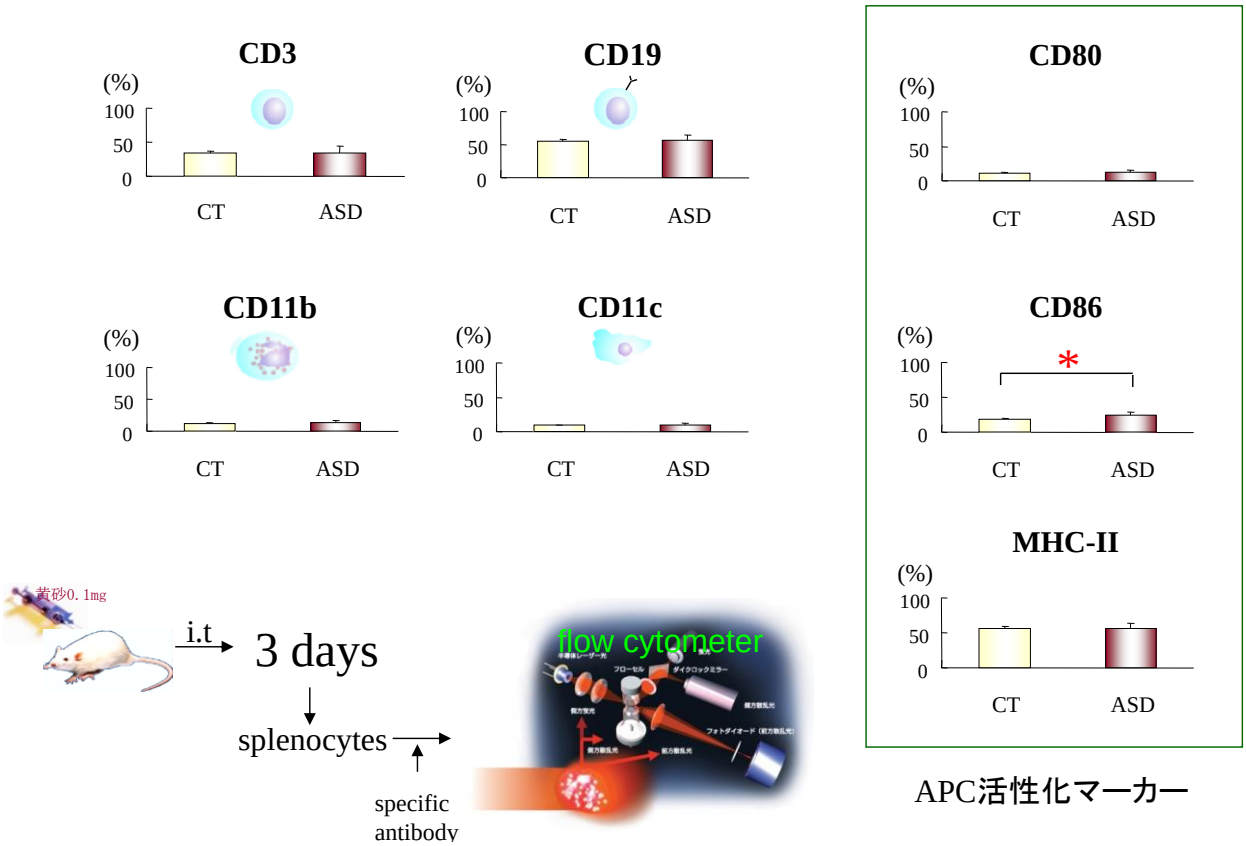
黄砂 (0.2 mg、0.02 mg/マウス)を4回気管内投与後、マウスの脾臓を取り出し、重量を測定した。図(3)-15に示すように黄砂の影響は統計学的な有意差は観察されなかった。またマウスの体重も黄砂の影響は認められなかった (data not shown)。黄砂 (0.2 mg、0.02 mg/マウス)を1回気管内投与後、1日、3日目に脾臓を取り出し、重量を測定したが、劇的な変化は認められなかった(data not shown)。




図(3)-15. 脾臓重量

２）細胞表面マーカーおよび脾臓細胞増殖反応の解析

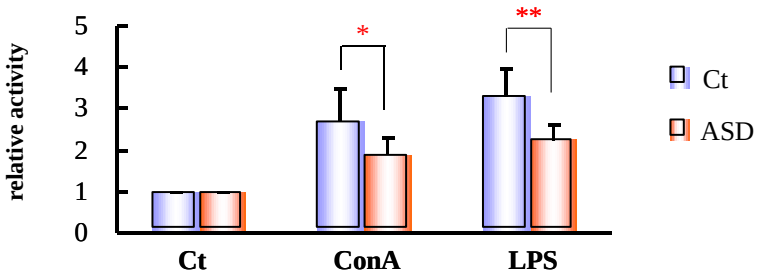
4回黄砂投与後、細胞種の識別として用いられる細胞表面マーカーであるCD3 (T細胞マーカー)、CD19 (B細胞マーカー)およびCD11b (マクロファージや顆粒球のマーカー)について解析した。図(3)-16 に示すように、全てのマーカーにおいて劇的な変化は認められなかった。また、抗原提示




図(3)-16. 細胞表面抗原の発現

細胞の活性化マーカーであるCD80、CD86、MHC classII についても劇的な変化は認められなかった。

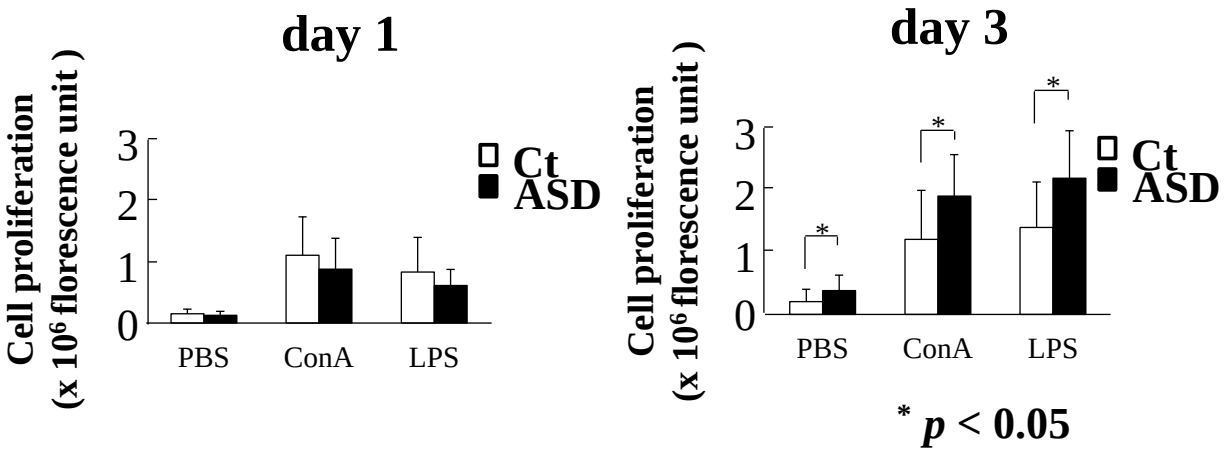
黄砂4回投与後、マウスより取り出した脾臓細胞をマイトジェン (LPS 1 μg/ml、ConA 5 μg/ml) で刺激し、その増殖能を測定した結果を、相対活性で表したものが、図(3)-17 である。黄砂に曝露した群から採取した脾臓細胞は対照群のマウスから採取した脾臓細胞に比べ、マイトジェンに




図(3)-17. 脾臓細胞の増殖反応

対する反応が低かった。しかしながら、無刺激の状態では黄砂による若干の活性化が認められた。

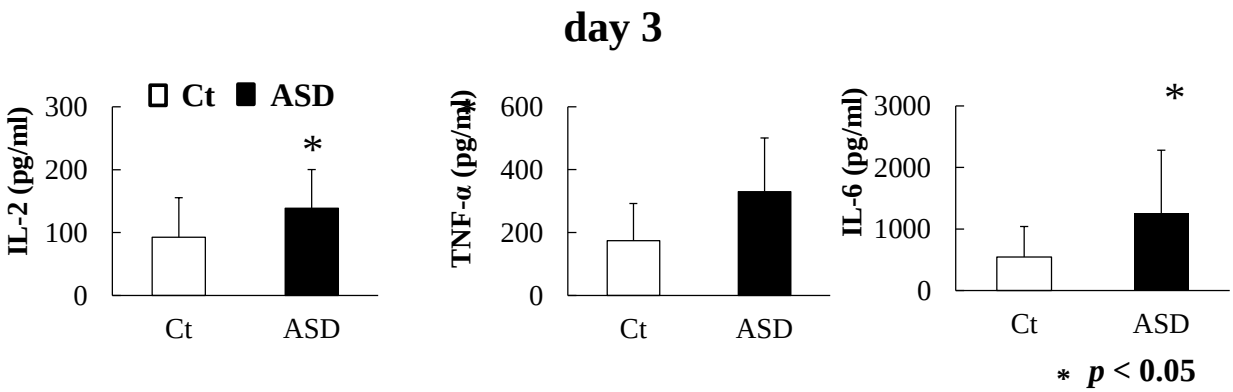
黄砂投与後1日での気管支・肺胞洗浄液（BALF）中炎症性サイトカイン（TNF-α）の産生が対照群と比べ著しく増加した。しかしながら、黄砂投与後3 日目では対照群と共に、BALF中TNF-α の産生は認められなかった（data not shown)。黄砂投与後3 日目に採取した脾臓細胞は対照群に比べ、マイトジェン（ConA、LPS）に対する反応が高かった (図(3)-18)。また、黄砂投与後3 日目の脾臓細胞では無刺激の状態でもATPレベルが高値であった。これらの結果は、黄砂投与後のイベントが、肺と脾臓では異なったタイミングで起こっていることを示唆している。




図(3)-18. マイトジェンに対する脾臓細胞の反応

加えて、その脾臓細胞のサイトカイン産生（IL-2、TNF-α、IL-6）は、対照群と比べ有意に高かった (図(3)-19)。一方、黄砂投与後1 日目の脾臓細胞ではマイトジェンにより誘導されるサイトカイン産生は対照群と有意な差は認められなかった。これらのことからも、脾臓では肺とは違った時間経過で影響が及ぼされることが推察された。

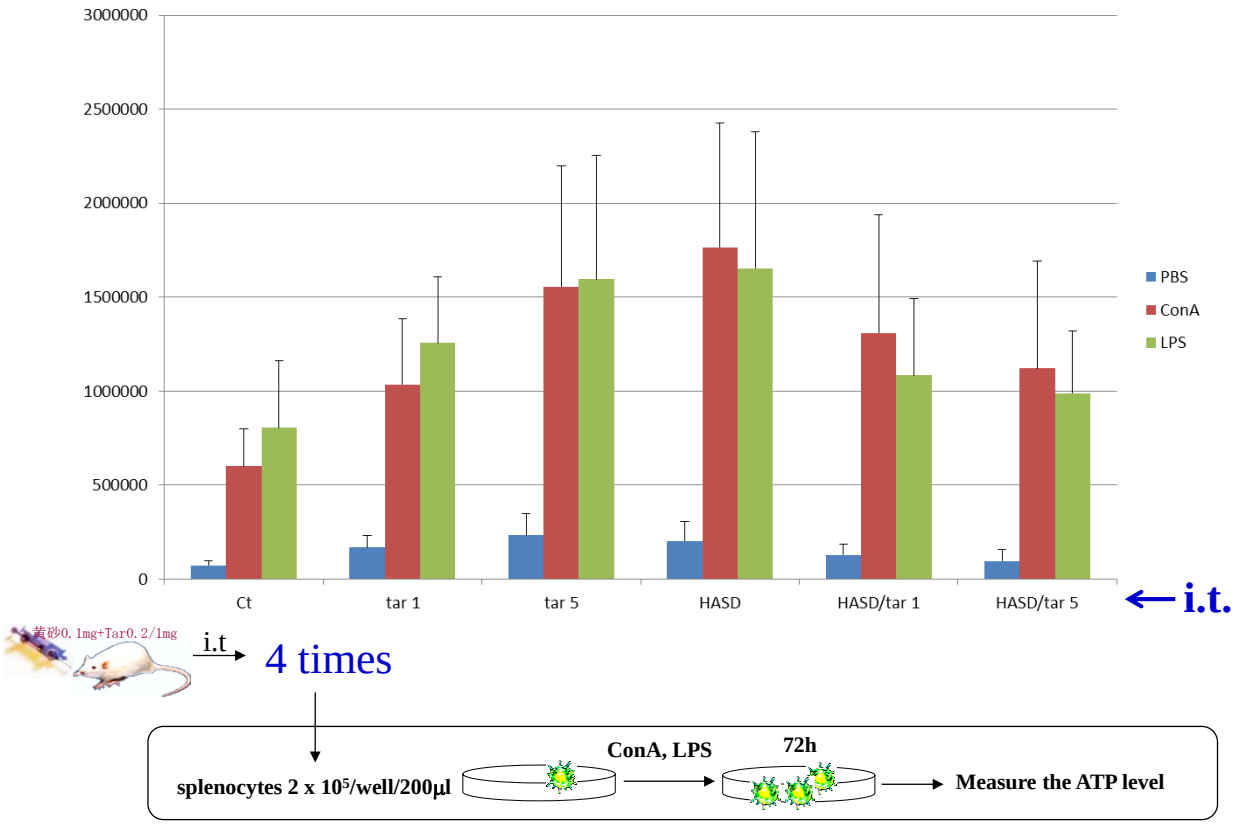
上記の結果を踏まえ、黄砂に付着している物質の影響に関して調べた。黄砂付着物質の代表と




図(3)-19. 脾臓細胞からのサイトカイン産生

してTarを用い、マウスに4回投与法で黄砂の曝露を行った。マウス脾臓より調製した脾臓細胞をマイトジェン（細胞分裂誘起物質：LPS 1μg/ml、ConA 5μg/ml）で刺激し、その増殖能を測定した結果を表したものが、図(3)-20 である。この図は各群12匹の平均を示している。Tarに曝露した群から採取した脾臓細胞は、対照群のマウスから採取した脾臓細胞に比べ、マイトジェンに対する反応が高かった。このことは、黄砂に吸着している化学物質が免疫細胞の反応を修飾（細胞分裂を誘起促進）する作用があることを示唆している。また、無刺激の状態でもその細胞活性化を示唆するデータが認められた。

一方、焼いた黄砂との共刺激ではマイトジェンに対する反応を抑制した。これらのことから、黄砂付着成分による免疫細胞への修飾作用が、共刺激、或いはその環境により双方向性の作用を

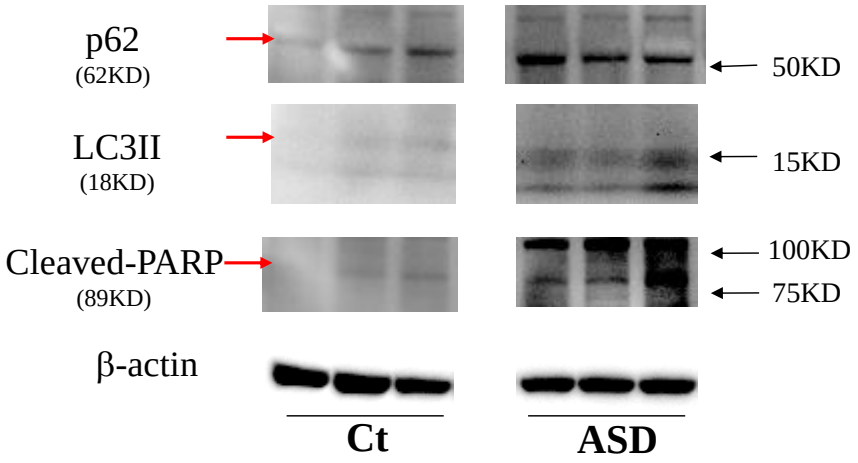



図(3)-20. 黄砂および付着物質投与後の脾臓細胞の増殖反応

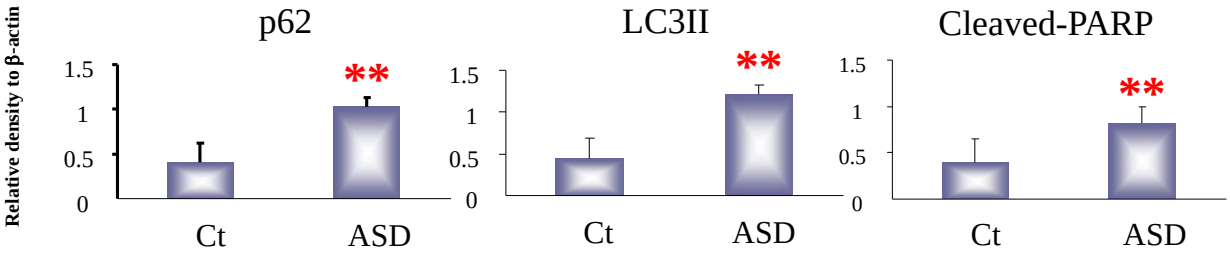
示すことが示唆された。興味深いデータとして、焼いた黄砂自体は、免疫反応を惹起する可能性があることを示唆するデータが得られた点である。これは、後述する黄砂の細胞活性化機構には、粒子それ自身が関与していることを示唆しているデータと解釈している。

３）細胞内イベントの解析

前項目において、細胞の増殖に何らかの影響が見られたので、細胞に影響があった場合の最終的な形状である細胞死の観点から、細胞内イベントの解析を行った。マウスから採取した脾臓細胞の細胞溶解液を用い、細胞内イベントをウエスタンブロットにより解析した。図(3)-21 が実際のウエスタンブロットの写真で、マウス3 匹の結果を載せている。Ctが対照群で、ASDが黄砂曝露群である。図(3)-22 がそれぞれのバンドの濃さをImageJソフトで解析し、β-actinで標準化後の、平均と標準偏差をグラフ化 (マウス8匹)したものである。p62とLC3IIは、細胞死のタイプの一つであるオートファジーの特徴的なマーカーである。またPARPはアポトーシスの際、活性化されるcaspase3により切断される分子である。つまり、Cleaved-PARPはアポトーシスの間接的なマーカーと言える。図から読み取れるように、黄砂曝露群の脾臓細胞では、これらのマーカーが発現あるいは活性化しており、何らかの細胞死の形態が細胞内で現れているものと推測できる。




図(3)-21. ウエスタンブロットによる蛋白発現解析

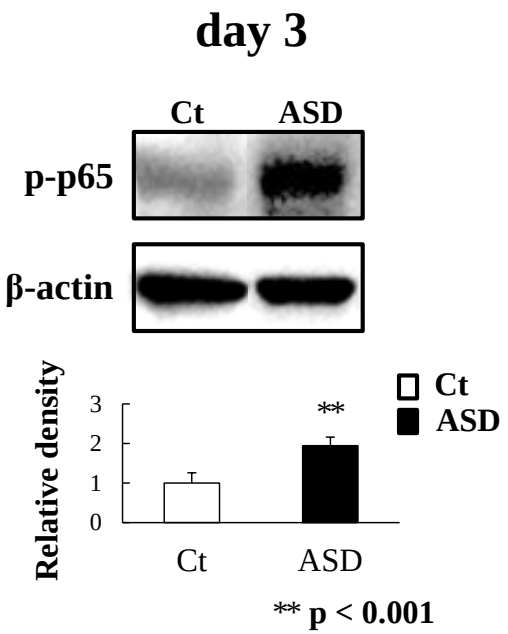



図(3)-22. タンパク発現量の数値化

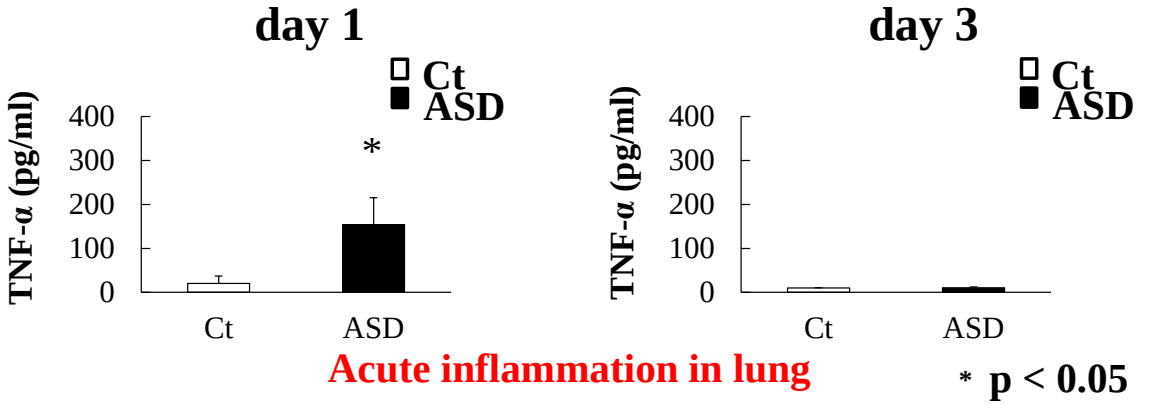
次に免疫担当細胞の亜急性活性化機構の解明として、細胞内イベントに着目し、その影響評価として転写因子であるNF-*k*Bに焦点を当てた。転写因子NF-*k*Bの構成成分で細胞生存に重要であ

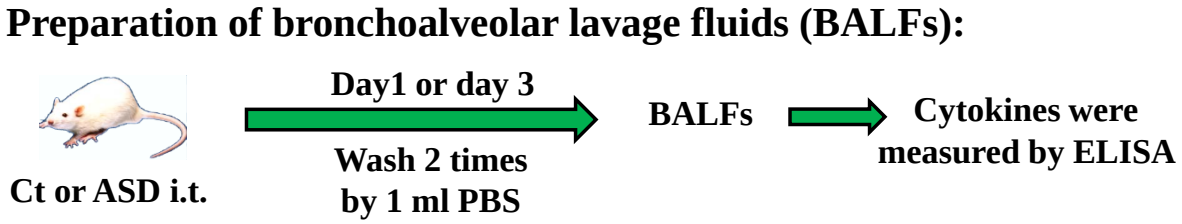
り、その活性化を司っているp65のリン酸化をウエスタンブロット法により評価した。黄砂を1回気管内投与したマウスから調製した脾臓細胞を細胞溶解液に懸濁し、試料とした。

黄砂投与後3日目に採取した脾臓細胞では対照群と比べて、リン酸化p65が亢進していた（図(3)-23)。図(3)-15で観察された脾臓への影響は、特に細胞内分子への影響まで及んでおり、その結果として炎症反応が惹起されていると考えられた。このように、脾臓では若干、肺の炎症時期とは異なったタイムポイントで炎症反応が起こっていることがわかった（図(3)-24)。




図(3)-23. NF-*k*Bのリン酸化の解析

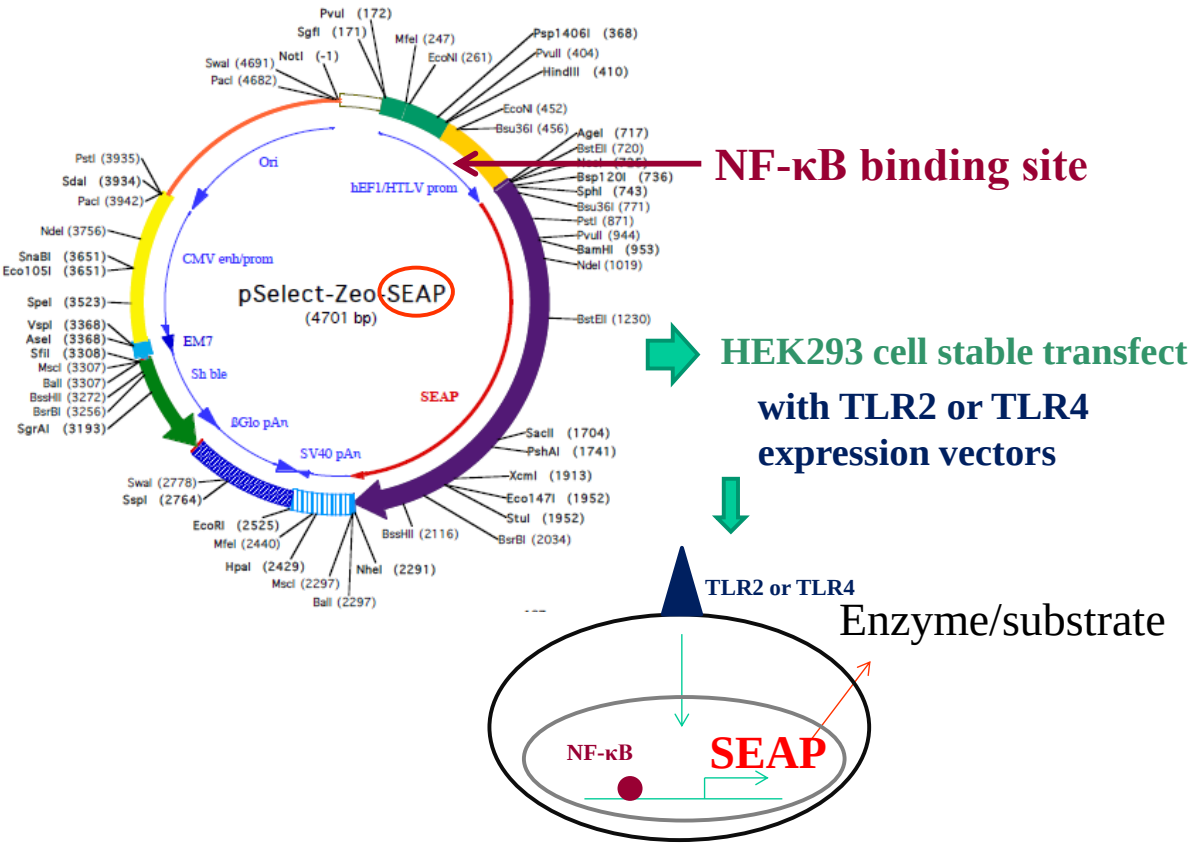



図(3)-24. 肺における急性炎症

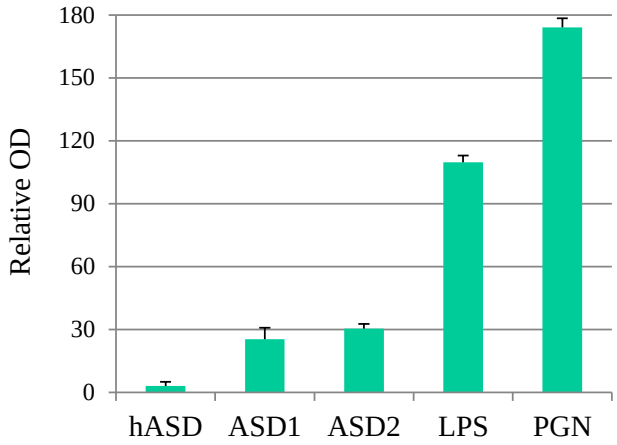
４）レポーター細胞を用いた黄砂付着物による免疫担当細胞への影響評価

遺伝子工学と分子生物学的手法を組み合わせると、細胞株を非常に魅力的なレポーターに作り上げることができる。ここでは通常、よくトランスフェクションなどで使われるHEK293細胞（ヒト腎臓ガン細胞株）に転写因子であるNF-*k*Bの結合サイトを組み込み、レポーター細胞を構築したものを、解析細胞 (図(3)-25)として用いた。




図(3)-25. NF-*k*Bレポーター株の構造

NF-*k*Bレポーター細胞を用いた解析から、黄砂付着有機化学物質が転写因子NF-*k*Bを活性化することが認められた(図(3)-26)。焼いた黄砂自身によるレポーター活性は非常に弱いものであったことから、黄砂付着化学物質自体がNF-*k*Bの活性を誘導していることが示唆された。NF-*k*Bと細胞死は密接に関連しており、詳細解明は今後の更なる検討課題である。図(3)-26 はNF-*k*Bの相対活性を示している。




図(3)-26. NF-*k*Bレポーターアッセイの
相対活性

## ５．本研究により得られた成果

### （１）科学的意義

黄砂イベントによって黄砂に吸着した有機化学物質（PAHs）濃度、形態や元素特性に違いがあり、これらがヒトへの健康影響のリスク評価を行うにあたり、非常に有用な指標となりうることを提示した。また、大陸から飛来する黄砂やPM2.5に吸着した有害化学物質（PAHs、nitro-PAHs）の特徴が明らかになった。特に、黄砂が中国にどの地域を通過し、またどの高度かにより、黄砂粒子、PM2.5に吸着しているPAHs、nitro-PAHs濃度に差がある事が認められた、これらの大気粉じんの形態や元素特性も明らかになった。全粉じんおよびPAHs 濃度は明らかに大陸からの汚染物質の影響を受けていることが認められた。ヒトへの健康影響のリスク評価を行うにあたり、得られた知見は非常に有用な指標となりうるため、科学的に大変意義あるものである。

黄砂の免疫毒性の研究では、2次リンパ組織に対する黄砂エアロゾルの影響は現在までほとんど解析されておらず、今回の結果から黄砂が体内のリンパ組織に対して影響を及ぼすことが示唆された。以上より、風送黄砂に付着している成分の情報の一部がわかり、それらをもとに毒性などの生体影響を鑑みる筋道を整える準備ができた。

### （２）環境政策への貢献

＜行政が既に活用した成果＞

特に記載すべき事項はない。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

黄砂イベントによって黄砂の物理学的、化学的、生物学的な性状に違いがあり、これらの性状が健康影響、特に化学物質がアレルギーの増悪因子となりうることから、黄砂中のこれらの性状

は、行政による健康影響の見極めとその予防対策に役立てられることができると考えられる。また、PAHsやnitro-PAHsが比較的多く吸着した黄砂は生体影響が強いことから、黄砂飛来時には行政による注意喚起や個人レベルでの予防対策が必要と考えられる。

毒性評価研究では、本成果を更に発展させ応用することで、黄砂のヒト曝露度合いを分子レベルで表現出来る可能性が考えられる。例えば、末梢血リンパ球のNF-*k*Bなどの分子レベルの指標を測定することで黄砂曝露のリスク評価ができる可能性が考えられ、パラメーター値が環境行政や政策に活用できるかも知れない。

## ６．国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

## ７．研究成果の発表状況

### （１）誌上発表

＜論文（査読あり）＞

1) Y. SONG, T. ICHINOSE, K. MORITA, T. NAKANISHI, T. KANAZAWA AND Y. YOSHIDA: Asian sand dust causes subacute peripheral immune modification with NF-*k*B activation. Environ Toxicol. 2013 Dec 5. doi:10.1002/tox.21931.

＜その他誌上発表（査読なし）＞

特に記載すべき事項はない

### （２）口頭発表（学会等）

1) 宋媛、市瀬孝道、吉田安宏：第34回日本分子生物学会（2011）「Intratracheal administration of Asian sand dust induces autophagic and apoptotic phenomena in splenocytes」
2) 嵐谷奎一、山根裕一、原愁花里、秋山幸雄、楢崎幸範、市瀬孝道：第53回大気環境学会(2012)「最近の北九州地域の多環芳香族炭化水素濃度の特徴」
3) 嵐谷奎一、原愁花里、山根裕一、秋山幸雄、楢崎幸範、市瀬孝道：第53回大気環境学会(2012)「最近の北九州地域の黄砂・煙霧飛来時の汚染物質濃度の特徴」
4) 中村志歩、嵐谷奎一、亀田貴之、鳥羽 陽、早川和一：第53回大気環境学会(2012)「多環芳香族炭化水素の光分解速度に元づく越境汚染指標の検討」
5) Y. YOSHIDA, Y. SONG, T. ICHINOSE: 99th American association of Immunology annual meeting, Boston, MA, USA, 2012 「Particle such as an Asian sand dust activate autophagic and apoptosis key molecules in CD11b positive cells」
6) Y. SONG, Y. YOSHIDA, T. NAKANISHI: 第41回日本免疫学会総会 (2012)「Asian sand dust induces autophagic and apoptotic event in peripheral lymphoid organ」
7) Y. SONG, T. ICHINOSE, T. KANAZAWA, Y. YOSHIDA: 100th American association of Immunology annual meeting. Honolulu, HI, USA, 2013 「Asian sand dust induces autophagic markers and activates NF-*k*B in immune cells」
8) Y. SONG, T. ICHINOSE, T. KANAZAWA, Y. YOSHIDA: 15th International congress of

Immunology, Milan, Italy, 2013 「Intratracheally administration of Asian sand dust activates NF-*k*B in immune cells.”

9) Y. SONG, T. ICHINOSE, K. MORITA, T. NAKANISHI, T. KANAZAWA, Y. YOSHIDA: 第42回日本免疫学会総会 (2013) 「TLR4 is involved in Asian sand dust-induced peripheral inflammation」

**（３）出願特許**

特に記載すべき事項はない。

**（４）シンポジウム、セミナー等の開催（主催のもの）**

特に記載すべき事項はない。

**（５）マスコミ等への公表・報道等**

特に記載すべき事項はない。

**（６）その他**

特に記載すべき事項はない。

**８．引用文献**

特に記載すべき事項はない。

# Studies on Biological Effects and Clarification of the Mechanisms of Asian Dust Aerosol, Attached Microorganisms and Chemical Substances

Principal Investigator: Takamichi ICHINOSE
Institution: Department of Health Sciences, Oita University of Nursing and Health Sciences, Oita, Japan

Cooperated by:
Environmental Health Division, Department of Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University, 615-8530, Kyoto, Japan.
Environmental Chemistry Division, National Institute for Environmental Studies, 305-8506, Ibaraki, Japan,
College of Science and Engineering, Kanazawa University, 920-1192, Ishikawa, Japan.
Department of Immunology and Parasitology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Japan, 807-8555, Fukuoka, Japan.

[Abstract]

Key Words: Asian sand dust, Allergic diseases, Airway epithelial cells, Immune cells, Splenocytes, Male reproductive function, Kosa bioaerosol

Asian sand dust (ASD) contains various air pollutants (heavy metals, $SO_4^{2-}$, $NO_3^-$, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)) and biological agents (spores, fungi, bacteria). Therefore, the aggravating effects and mechanism of microbial elements and chemical products on allergic diseases (asthma and allergic rhinitis) were investigated. Subtheme 1 presented that ASD-bound LPS, lipoproteins, β-glucan, *Bjercandera* fungus and chemical substances (Tar) may be strong candidate for the aggravating substances in ASD. Moreover, Toll like receptor (TLR) 2 and TLR4 may play an important role in disease enhancement by ASD and that MyD88 is the significant key adapter molecule in the downstream signaling pathway for Th2 generation. ASD also affected airway epithelial cells and immune cells such as bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) and splenocytes. The difference in ASD events and heat-sensitive components contained with ASD contribute to the health effects, especially *Bjerkandera* activates BMDC. On the other hand, the effects of ASD and fetal ASD exposure on reproductive function in male mice and male mice offspring were investigated. ASD reduced daily sperm production (DSP) and induced seminiferous tubules damage in male mice. Moreover, fetal ASD

exposure reduced DSP in male offspring. In subtheme 2, the direct sampling and bioanalysis over Suzu city in Noto Peninsula using a tethered balloon and an airplane were conducted in order to reveal the health effect of Kosa bioaerosol. Subtheme 2 presented gram-positive and gram-negative bacteria, and *Bjerkandera adusta* fungus were increased in the atmosphere during dust storm events. In subtheme 3, two kinds of ASD collected using a high-volume air sampler from the atmosphere at Kitakyushu, Fukuoka on 1–3 May, 2011 (ASD1) and 12-14 May, 2011 (ASD2), after dust storm events. ASD2 had higher levels of PAHs, LPS, and β-glucan, compared with ASD1, but SiO2 was rich in ASD1 than ASD2. The effects of ASD on splenocytes were investigated. The western blotting demonstrated that nuclear factor *k*B (NF-*k*B) was activated in splenocytes. These novel findings may serve as a warning about the ill effects of airborne desert dust on the human respiratory system.