

## 【5-1453】黄砂、PM<sub>2.5</sub>の組成別毒性評価に基づく大気モニタリングと感受性者検査システムの構築 (H26~H28)

渡部 仁成 (鳥取大学)

### 1. 研究開発目的

黄砂やPM<sub>2.5</sub>などの浮遊粒子状物質が循環器疾患、呼吸器疾患、アレルギー疾患の発病・増悪に関与し、発がん性があることが明らかになっている。しかし、浮遊粒子状物質を組成する物質のうちどの物質がヒトの健康により強く影響し、さらにどのような発病・増悪メカニズムであるかは不明な点が多い。3年の期間に本課題は、採取した黄砂、PM<sub>2.5</sub>のヒトへの毒性の強さを定量的に評価し、粉塵の成分解析の結果をもとに黄砂、PM<sub>2.5</sub>に含まれる物質のうち特にヒトへの毒性が強いと考えられる物質の候補を選定する。また、その物質について発がん性、炎症惹起能を評価し発病・増悪メカニズムの解明を図る。さらに、越境大気汚染の定量に有用な物質を明らかにすることを目指す。

上記目的を達成するために研究開始からこれまでに、サブテーマ①では採取した黄砂およびPM<sub>2.5</sub>にヒトが反応して分泌するサイトカインについて網羅的に解析し同定した。また、金属組成を解析し黄砂およびPM<sub>2.5</sub>による炎症性サイトカイン産生への関与を検討した。さらに、好塩基球を介したアレルギー反応を誘導する高分子タンパクが含まれるか評価した。サブテーマ②は、サブテーマ①および③によってヒトへの影響が強いと考えられる黄砂、PM<sub>2.5</sub>に含まれる候補物質のアレルギー毒性あるいは発がん性を評価できる細胞および実験動物の系の構築を目指した。サブテーマ③は、黄砂、PM<sub>2.5</sub>飛来時及び非飛来時に大気粉塵を捕集し、それらの中のタンパク、リポポリサッカライド (LPS) 等の含量を評価した。

### 2. 研究の進捗状況

#### (1)黄砂、PM<sub>2.5</sub>の組成別でのヒト毒性について定量的評価

黄砂日と非黄砂日に捕集した粒径3~7μmの大気粉塵を用いて気管支構成細胞であるA549細胞、白血球由来細胞であるTHP1細胞を刺激培養し、TH1系サイトカインとしてIL-2、IL-6、IL-8、IL-13、GM-CSF、IFN-γ、TNF-αを、TH2系サイトカインとしてIL-4、IL-5、IL-10、IL-12p70を測定した。さらに、使用した大気粉塵中の金属元素濃度を測定した。TNF-α、IL-2、IL-10、IL-12p70はサイトカインを検出することができたが、それ以外のサイトカインの分泌はなかった。特にTNF-αの分泌は大気粉塵毎に大きく異なり必ずしも黄砂時の粉塵が強い誘導を示すわけではなかった。また、IL-6、IL-8でも同様の結果であった。このサイトカイン分泌に最も関連していた金属は鉄であり、鉄の含有量が多いとヒトへの傷害が高くなる可能性が示唆された。

黄砂時に採取した大気粉塵の水溶液上清でスギ花粉特異的IgE抗体陽性患者の好塩基球を刺激するとCD203cの発現が増強する症例としない症例が確認された。さらに、黄砂時大気粉塵に陽性を示した症例においてCD203cの発現は濃度依存性に増強していた。この結果から黄砂時大気粉塵中には即時型アレルギー反応を起こす高分子タンパクが含まれていることが示唆された。

松江市で2015年1月22日から2015年2月28日まで大気粉塵を捕集し大気粉塵中のLPS濃度、真菌量、IL-8の産生量を測定した。また、同市の児童の呼吸機能・症状モニタリングを同一の期間で実施した。大気粉塵のIL-8を用いた炎症誘導能はSPMとは相関しておらず10μm以下の粉塵の量が多いことが必ずしもヒトへの影響が強いことを意味していなかった。一方で、黄砂時の大気粉塵の炎症誘導能は非黄砂時に比較して高く、黄砂日にヒトへの影響が強いことが示唆された。大気粉塵の炎症誘導能、LPS濃度について他の大気汚染物質と同様に呼吸機能、呼吸器症状との関連について統計解析を進めている。

#### (2)黄砂、PM<sub>2.5</sub>のアレルギー毒性、炎症誘導および発がん性の評価

黄砂、PM<sub>2.5</sub>のアレルギー毒性、炎症誘導を評価するために、活性酸化窒素生成の定量および細胞傷害活性の定量ができる実験系の構築を行った。アレルギー反応ならびに炎症反応の亢進に伴い主とし

て免疫担当細胞あるいは炎症細胞より過剰に生成される活性酸素あるいは活性窒素によってアレルギー反応局所もしくは炎症局所の細胞が傷害される。活性酸素や活性窒素を精緻に定量測定できる系を構築できれば、黄砂、PM<sub>2.5</sub>のアレルギー毒性、炎症誘導が可能となる。多数検体について96穴プレートで同時に活性酸素および一酸化窒素の生成能を測定できる系を構築した。さらに、活性酸化窒素の測定後に、そのプレートを用いて細胞傷害（細胞死）を評価する系も構築した。また、黄砂やPM<sub>2.5</sub>のアレルギー毒性、炎症誘導および発がん性のメカニズムを明らかにするためには、どのような炎症細胞が関与しているのか同定する必要がある。このために炎症細胞の細胞種に特異的な抗体を用いて細胞を標識し、これを定量評価（FACS解析）する系も構築した。

従来、一つの物質の発がん性を評価するには数年が必要である。黄砂、PM<sub>2.5</sub>の発がん性を数ヶ月で評価する新規の定量システムを構築している。マウス線維肉腫細胞（QR-32細胞）の発がんを規定するcyclooxygenase-2（プロスタグランジンE2合成酵素、COX-2）およびthymosin B4の発現亢進を簡便に評価できる系が当初予定通り作成が進んでいる。

採取した黄砂、PM<sub>2.5</sub>のみならず、サブテーマ①で黄砂、PM<sub>2.5</sub>中のエンドトキシン、銅、鉄、亜鉛、カドニウム、鉛がヒト健康に影響を与える重要な因子であることが明らかになってきており、今後それらのアレルギー毒性、炎症誘導および発がん性も個別評価する予定である。また、黄砂、PM<sub>2.5</sub>の毒性は分かりにくい面もあり、それらがどれだけ有害であるかタバコと比較検討し、より分かりやすく黄砂、PM<sub>2.5</sub>の毒性を示す予定である。

### (3) 黄砂、PM<sub>2.5</sub>の成分解析

佐世保市及び京都市において2014年5月1日から2015年3月30日まで原則として1週間分ずつ、大気粉塵を粗大粒子(>PM<sub>2.5</sub>)とPM<sub>2.5</sub>にわけてハイボリウムエアサンプラーを用いて捕集し、黄砂、PM<sub>2.5</sub>飛来時及び非飛来時の大気粉塵中のタンパク、LPS、イオン類を定量した。タンパク濃度は粗大粒子よりPM<sub>2.5</sub>において高かった。一方、LPS濃度はPM<sub>2.5</sub>より粗大粒子において高い傾向がみられた。今後、タンパク及びLPSを多く含む大気粉塵についてサイトカインの誘導能について検討し、サイトカイン誘導に対するタンパクとLPSの関与を評価する。

京都市において2014年3月17～24日に捕集したTSPの水溶性抽出物についてアミノ酸分析を行った。グリシンなど14種のアミノ酸が検出され、チロシンは検出されなかった。高いタンパク濃度がみられた大気粉塵についてSDS-PAGEを行った。その結果、PM<sub>2.5</sub>と粗大粒子に含まれる主なタンパクは分子量が6.5 kDa付近の小さなものであると推測された。今後、黄砂時に特異的なタンパク、ペプチド等の探索を進めていく。

## 3. 環境政策への貢献（研究代表者による記述）

アレルギー反応や炎症反応など種々の生体反応を誘発することが知られているLPSの濃度が通常より非常に高濃度になる日が存在することがわかった。今後これらの濃度のLPSが生体に与える影響について明らかにすることで健康影響を未然に防ぐための資料となる可能性があると考えられる。

## 4. 委員の指摘及び提言概要

発がん性の評価に結びつけられれば有用である。エンドトキシン測定系の早期確立と普及が期待する。しかし、現在解析中で具体的なデータが示されていなかったり、評価手法が構築された段階にあって、黄砂やPM<sub>2.5</sub>の成分と生理増悪作用との関係を考察する段階に達していない課題が多いように見受けられる。また、研究全体の構造が見え難く、大気モニタリングシステムとしてどのようなものができるのか不明である。今後、相当な努力と迅速な展開が期待される。

## 5. 評点

総合評点： A