

34. PM2.5 成分による気管支喘息の増悪と分子機構の解明

高野 裕久

Key words : PM2.5, 気管支喘息, 金属, 呼吸器系, 免疫系

京都大学 大学院工学研究科
都市環境工学専攻 環境衛生学講座

緒 言

近年, 我が国では, 国内起源の大気汚染のみならず国外の発生源に由来する「越境大気汚染」の問題がクローズアップされている。中でも, 大気中の $2.5 \mu\text{m}$ 以下の微小粒子状物質 (PM2.5) は, 粒径が小さいため, 吸気により細気管支や肺胞へと達しやすいことから, 健康影響の発現や増悪の可能性が強く危惧されている。これまでの疫学的研究によると, PM2.5 を含めた粒子状物質の健康影響は, 循環器系と共に呼吸器系や免疫・アレルギー系に出現しやすいことが示されており, 呼吸器系のアレルギー疾患である気管支喘息は, 粒子状物質に脆弱性を示す代表的な疾患・病態であると考えられている¹⁾。

PM2.5 の発生源は多様であり, その粒径, 形状, 成分等も種々異なる。加えて, 光化学反応等による二次的な生成や変化も存在する。しかし, こうした成分や要因の相違・変化による健康影響の具体的な相違・変化や健康影響を決定する成分・要因の探索, 同定に関する研究は, ほとんど進んでいない。そのため, PM2.5 のいかなる成分あるいは要因が, いかなる分子機構により, 粒子状物質に脆弱性を示す気管支喘息を増悪するか, 早急に明らかにする必要がある。そこで, 本研究では, PM2.5 の成分である金属が呼吸器・免疫系に及ぼす影響と, その相違を評価し, 健康影響決定成分の絞り込みとその分子機構の解明を目指した。

方 法

1. PM2.5 含有各種金属成分

今回使用した PM2.5 含有各種金属成分は, 大気中に比較的多く存在し, かつ, その健康影響が危惧されているものから選出し, V, Cr, Mn, Ni, Zn, Pb を検討対象とした。V と Cr については, 価数の相違も評価した。また, 本研究において, 大気中に存在している微小汚染粒子の中でも水溶性成分に注目しているため, 水溶性の高い硝酸塩や硫酸塩を選択した。具体的には, V_2O_5 , $\text{VOSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{MnSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ を使用した。

2. プロトコル

呼吸器系の細胞として, ヒト気道上皮細胞株 (BEAS-2B 細胞) を用いた。ヒト気道上皮細胞は, コラーゲン I コートされたプレートに細胞懸濁液を播種し, LHC-9 培地を用いて semi-confluent な状態まで培養後, $0 \sim 500 \mu\text{M}$ の各種金属を曝露した。その 24 時間後, 細胞障害性に及ぼす影響を Water soluble tetrazolium-1 (WST-1 法) により, 炎症性サイトカインである Interleukin (IL)-6, IL-8 を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA 法) によりそれぞれ解析した。

免疫系の細胞として, 雄性 NC/NgaTndCrlj マウスを頸椎脱臼にて安楽死させた後, 大腿骨を摘出し, 骨髓細胞を単離した。その後, rmGM-CSF 入り R10 培地を用いて 8 日間培養し, 骨髓由来抗原提示細胞を誘導した。骨髓由来抗原提示細胞に, $0 \sim 500 \mu\text{M}$ の各種金属を曝露し, その 24 時間後, 細胞障害性に及ぼす影響を WST-1 法, 細胞表面 Dendritic and epithelial cells (DEC) 205 分子, Cluster of differentiation (CD) 86 分子発現をフローサイトメトリーにより解析した。同様に, 雄性 NC/NgaTndCrlj マウスを頸椎脱臼にて安楽死させた後, 脾臓を摘出し, 脾細胞を単離し

た。マウス脾細胞に、0~500 μ M の各種金属を曝露し、その24時間後に、細胞障害性に及ぼす影響を WST-1 法により解析し、72時間後に、細胞増殖能を Bromodexyuridine (BrdU) 法により解析した。なお、本研究における、動物実験は、京都大学動物実験委員会の承認を受け、十分な動物擁護の配慮下で行った。

3. 統計処理

実験データは、n=3~4 とし、実験の平均値 \pm 標準誤差を代表例として示した。また、統計解析手法は、非曝露群に対する各曝露群の差について Dunnett の多重比較検定を行い、 $P < 0.05$ を有意とした。

結 果

1. PM2.5 含有金属成分が呼吸器系に及ぼす影響

呼吸器系の気道上皮に対する細胞障害性は、金属曝露群と非曝露群を比較すると、濃度依存的に細胞障害性が増加するものや、ある濃度で活性化するもの、大きな細胞障害性がないものなど、金属によって影響が異なることが確認された(表1)²⁾。具体的には、V (5価, 4価), Cr (3価, 6価), Mn は、濃度依存的に細胞障害性が増加する傾向を示し、特に Cr (6価) は 50 μ M の曝露で顕著に細胞障害性が増加するなど、同じ Cr でも 3価よりも 6価の方が細胞障害性は強く認められた。さらに、Zn は曝露濃度が上昇する中で急激に細胞障害性が増加し、臨界濃度の存在が示唆された。また、Ni は 5, 50 μ M で細胞障害性が認められたが、500 μ M の曝露で細胞を活性化した。Pb については大きな細胞障害性は認められなかった。次に、催炎症反応に関与するサイトカインである IL-6, IL-8 の産生量を調べたところ、増加するもの減少するものなど金属によってその影響は異なった(表2, 3)²⁾。Mn, Ni は 500 μ M の曝露によって IL-6, IL-8 の産生量が増加した。その他の金属については、IL-6, IL-8 の産生量が減少する傾向を示した。

表1. PM2.5 含有各種金属成分の24時間曝露がヒト気道上皮細胞に及ぼす細胞障害性

(μ M)	Exposure/Control (%)			
	V(5価)	V(4価)	Cr(3価)	Cr(6価)
0	100.0 \pm 1.3	100.0 \pm 1.3	100.0 \pm 0.9	100.0 \pm 0.9
0.5	87.2 \pm 0.7 *	84.6 \pm 0.9 *	86.9 \pm 0.4 *	88.4 \pm 0.5 *
5	79.2 \pm 1.0 *	80.1 \pm 4.7 *	84.6 \pm 1.6 *	68.3 \pm 0.7 *
50	43.5 \pm 2.5 *	61.0 \pm 0.7 *	85.6 \pm 1.7 *	0.4 \pm 0.1 *
500	7.8 \pm 0.4 *	14.9 \pm 0.3 *	81.2 \pm 1.3 *	0.1 \pm 0.04 *

(μ M)	Exposure/Control (%)			
	Mn	Ni	Pb	Zn
0	100.0 \pm 0.4	100.0 \pm 2.0	100.0 \pm 0.8	100.0 \pm 0.8
0.5	72.0 \pm 1.0 *	92.5 \pm 0.5	96.7 \pm 0.5	95.3 \pm 1.3 *
5	43.4 \pm 0.5 *	90.3 \pm 0.9 *	101.6 \pm 1.6	94.4 \pm 1.2 *
50	17.5 \pm 0.5 *	89.0 \pm 0.6 *	103.9 \pm 1.7	102.4 \pm 1.7
500	5.0 \pm 0.7 *	126.5 \pm 5.0 *	105.6 \pm 2.8	1.5 \pm 0.1 *

* $P < 0.05$ versus 0 μ M (Dunnett's multiple comparison test).

表2. PM2.5 含有各種金属成分の24時間曝露がヒト気道上皮細胞のIL-6産生に及ぼす影響

(μM)	IL-6 (pg/mL)			
	V(5価)	V(4価)	Cr(3価)	Cr(6価)
0	38.7 ± 1.2	38.7 ± 1.2	38.7 ± 1.2	38.7 ± 1.2
0.5	25.0 ± 1.1 *	17.4 ± 1.6 *	13.0 ± 1.3 *	17.8 ± 2.3 *
5	30.2 ± 0.6 *	32.3 ± 5.1	22.3 ± 2.1 *	8.7 ± 0.5 *
50	12.4 ± 1.9 *	19.2 ± 0.6 *	39.7 ± 1.0	1.5 ± 0.1 *
500	8.2 ± 0.3 *	24.9 ± 0.3 *	12.5 ± 0.2 *	1.8 ± 0.3 *

(μM)	IL-6 (pg/mL)			
	Mn	Ni	Pb	Zn
0	36.4 ± 2.8	36.4 ± 2.8	34.1 ± 0.8	34.1 ± 0.8
0.5	10.0 ± 1.9 *	16.8 ± 1.6 *	19.7 ± 2.1 *	21.5 ± 2.7 *
5	16.9 ± 1.1 *	14.3 ± 1.8 *	21.8 ± 2.7 *	18.4 ± 1.3 *
50	27.6 ± 2.4	12.5 ± 1.3 *	19.7 ± 1.5 *	15.7 ± 1.8 *
500	75.9 ± 6.5 *	242.8 ± 7.7 *	7.9 ± 0.9 *	ND

* $P < 0.05$ versus 0 μM (Dunnett's multiple comparison test). ND: not detected.

表3. PM2.5 含有各種金属成分の24時間曝露がヒト気道上皮細胞のIL-8産生に及ぼす影響

(μM)	IL-8 (pg/mL)			
	V(5価)	V(4価)	Cr(3価)	Cr(6価)
0	218.5 ± 8.5	218.5 ± 8.5	218.5 ± 8.5	218.5 ± 8.5
0.5	175.5 ± 1.5 *	173.8 ± 5.2 *	169.9 ± 5.3 *	142.3 ± 9.2 *
5	182.6 ± 9.4 *	199.4 ± 10.9 *	190.1 ± 7.0 *	23.3 ± 2.0 *
50	58.0 ± 4.9 *	104.0 ± 7.4 *	163.7 ± 5.9 *	12.8 ± 0.4 *
500	34.5 ± 1.5 *	43.1 ± 1.5 *	138.5 ± 6.7 *	23.2 ± 3.3 *

(μM)	IL-8 (pg/mL)			
	Mn	Ni	Pb	Zn
0	221.7 ± 9.6	221.7 ± 9.6	221.7 ± 9.2	221.7 ± 9.2
0.5	177.6 ± 10.2	185.9 ± 7.7	186.9 ± 2.9 *	188.1 ± 5.1 *
5	194.5 ± 12.4	166.1 ± 6.7	191.7 ± 7.9	187.9 ± 2.3 *
50	219.5 ± 8.8	188.6 ± 8.3	160.2 ± 4.9 *	185.0 ± 3.4 *
500	461.2 ± 45.0 *	3196.6 ± 70.4 *	221.1 ± 11.6	7.4 ± 0.9 *

* $P < 0.05$ versus 0 μM (Dunnett's multiple comparison test).

2. PM2.5 含有各種金属成分が免疫系に及ぼす影響

免疫応答の開始細胞として重要な役割を担うマウス骨髄由来抗原提示細胞に各種金属を曝露したところ、細胞障害性への影響は金属によって異なった(表4)。具体的には、V(5価, 4価)、Cr(6価)、Mn、Niは、曝露によって細胞障害性は増加した。Pbは、50、500 μMの曝露によって細胞が活性化した。Znは、50 μMの曝露によって細胞が活性化し、500 μMの曝露によって細胞障害性が増加した。Cr(3価)は、大きな細胞障害性は無かった。ヒト気道上皮細胞に対する細胞障害性と同様に、Crは、6価の方が3価より強く、ここでも価数による相違が確認された。次に、細胞障害を50%以上引き起こさない濃度の各種金属を、骨髄由来抗原提示細胞に曝露し、その24時間後、抗原の取り込みや抗原提示に関わる細胞表面分子DEC205およびCD86に対する影響について検討を行った。DEC205の発現についてはCr(3価)の50、500 μMの曝露によって増加した。しかし、それ以外の全ての金属は影響を示さなかった(表5)。CD86の発現については、500 μMのNiの曝露によって減少し、それ以外の金属には影響がなかった(データ未掲載)。

同様に、複数種の免疫細胞で構成されているマウス脾細胞に対する影響としては、各種金属を曝露することによる細胞障害性への影響は金属によって異なった（表6）。具体的には、V（4価）、Cr（6価）、Mn、Znは、曝露によって細胞障害性は増加した。V（5価）、Niは細胞が活性化する濃度と障害性が増加する濃度がそれぞれ存在した。Cr（3価）とPbは、大きな細胞障害性は無かった。マウス脾細胞に対してもCrの細胞障害性は、6価の方が3価より強かった。さらに、マウス脾細胞の細胞増殖能に対する影響を検討した（データ未掲載）。V（5価、4価）の0.5 μ M曝露によって細胞増殖能は増加したが、それ以外の濃度では低下した。Cr（6価）、Ni、Znは曝露によって細胞増殖能が低下した。Cr（3価）、Mn、Pbは、マウス脾細胞の増殖能に影響を及ぼさなかった。

表4. PM2.5含有各種金属成分の24時間曝露がマウス骨髄由来抗原提示細胞に及ぼす細胞障害性

(μ M)	Exposure/Control (%)			
	V(5価)	V(4価)	Cr(3価)	Cr(6価)
0	100.0 \pm 2.0	100.0 \pm 2.0	100.0 \pm 3.9	100.0 \pm 3.9
0.5	86.8 \pm 3.1 *	71.9 \pm 4.5 *	88.4 \pm 5.2	99.9 \pm 4.2
5	68.2 \pm 5.2 *	69.9 \pm 4.3 *	97.7 \pm 2.0	25.7 \pm 2.7 *
50	2.8 \pm 0.6 *	7.8 \pm 0.4 *	93.3 \pm 3.2	1.8 \pm 0.4 *
500	2.1 \pm 0.2 *	2.5 \pm 0.1 *	87.0 \pm 5.9	1.1 \pm 0.4 *

(μ M)	Exposure/Control (%)			
	Mn	Ni	Pb	Zn
0	100.0 \pm 1.4	100.0 \pm 2.4	100.0 \pm 2.4	100.0 \pm 3.0
0.5	64.6 \pm 1.8 *	96.1 \pm 0.9	100.9 \pm 3.6	102.5 \pm 4.5
5	41.9 \pm 5.7 *	93.5 \pm 3.9	112.5 \pm 8.1	99.6 \pm 2.7
50	32.0 \pm 6.0 *	70.4 \pm 2.5 *	146.1 \pm 15.7 *	119.3 \pm 2.9 *
500	5.7 \pm 0.5 *	44.4 \pm 1.7 *	162.9 \pm 10.6 *	26.8 \pm 2.8 *

* $P < 0.05$ versus 0 μ M (Dunnett's multiple comparison test).

表5. PM2.5含有各種金属成分の24時間曝露がマウス骨髄由来抗原提示細胞の細胞表面(DEC205)分子発現に及ぼす影響

(μ M)	DEC205 positive cells (%)			
	V(5価)	V(4価)	Cr(3価)	Cr(6価)
0	12.6 \pm 1.5	12.6 \pm 1.5	15.2 \pm 1.4	15.7 \pm 1.8
0.005				16.3 \pm 2.0
0.05	12.0 \pm 1.6	12.8 \pm 1.9		15.6 \pm 1.6
0.5	13.2 \pm 1.4	12.7 \pm 1.5	15.9 \pm 1.0	12.1 \pm 1.6
5	9.7 \pm 1.4	11.0 \pm 1.2	16.9 \pm 1.9	
50			22.3 \pm 1.3 *	
500			33.8 \pm 1.7 *	

(μ M)	DEC205 positive cells (%)			
	Mn	Ni	Pb	Zn
0	15.7 \pm 1.8	12.6 \pm 1.5	12.6 \pm 1.5	15.2 \pm 1.4
0.005	14.8 \pm 1.1			
0.05	15.0 \pm 1.2			
0.5	15.7 \pm 1.3	13.4 \pm 1.5	13.9 \pm 1.4	15.6 \pm 1.5
5		13.3 \pm 1.3	14.4 \pm 1.7	16.5 \pm 1.1
50		12.4 \pm 1.1	12.2 \pm 0.8	12.7 \pm 0.9
500			12.0 \pm 0.8	

* $P < 0.05$ versus 0 μ M (Dunnett's multiple comparison test). 骨髄由来抗原提示細胞に、細胞障害を50%以上引き起こさない濃度のPM2.5含有各種金属成分を、それぞれ24時間曝露した。

表 6. PM2.5 含有各種金属成分の 24 時間曝露がマウス脾細胞に及ぼす細胞障害性

(μ M)	Exposure/Control (%)			
	V(5価)	V(4価)	Cr(3価)	Cr(6価)
0	100.0 ± 3.2	100.0 ± 3.2	100.0 ± 3.1	100.0 ± 3.1
0.5	119.4 ± 6.6 *	97.6 ± 6.1	99.5 ± 3.5	90.8 ± 1.8 *
5	51.9 ± 7.9 *	110.1 ± 4.1	95.9 ± 2.4	20.6 ± 0.6 *
50	7.6 ± 2.1 *	6.9 ± 1.9 *	98.4 ± 4.0	2.0 ± 0.6 *
500	3.7 ± 1.0 *	1.8 ± 0.3 *	94.9 ± 1.9	0.7 ± 0.9 *

(μ M)	Exposure/Control (%)			
	Mn	Ni	Pb	Zn
0	100.0 ± 4.0	100.0 ± 1.8	100.0 ± 1.8	100.0 ± 3.4
0.5	88.4 ± 3.4 *	111.4 ± 4.0	95.4 ± 4.6	91.0 ± 3.1
5	21.5 ± 0.7 *	113.9 ± 2.7 *	94.6 ± 3.8	86.2 ± 2.0 *
50	3.4 ± 1.2 *	104.7 ± 3.2	95.2 ± 3.1	85.9 ± 2.3 *
500	3.6 ± 1.1 *	50.7 ± 3.7 *	85.5 ± 5.3	12.3 ± 1.0 *

* $P < 0.05$ versus 0 μ M (Dunnett's multiple comparison test).

考 察

PM2.5 成分である各種金属は、呼吸器系に対する細胞障害性や IL-6 や IL-8 産生などの催炎症性反応を介して気管支喘息を悪化させる可能性が示された。特に、Mn と Ni の影響は顕著であった。一方、免疫系に対しては、主に細胞障害性を示すのみで、免疫応答に関わる指標を増加させることはほとんど無かった。ただし、Cr (3 価) と Pb は、一部、細胞の活性化や DEC205 の発現増加も観察された。現在、気管支喘息モデルを用いて *in vivo* の影響評価を進めている。

文 献

- 1) Schwarze, P. E., Ovrevik, J., Låg, M., Refsnes, M., Nafstad, P., Hetland, R. B. & Dybing, E. : Particulate matter properties and health effects: consistency of epidemiological and toxicological studies. *Hum. Exp. Toxicol.*, **25** : 559-579, 2006.
- 2) Honda, A., Tsuji, K., Matsuda, Y., Hayashi, T., Fukushima, W., Sawahara, T., Kudo, H., Murayama, R. & Takano, H. : Effects of air pollution-related heavy metals on the viability and inflammatory responses of human airway epithelial cells. *Int. J. Toxicol.*, **34** : 195-203, 2015.