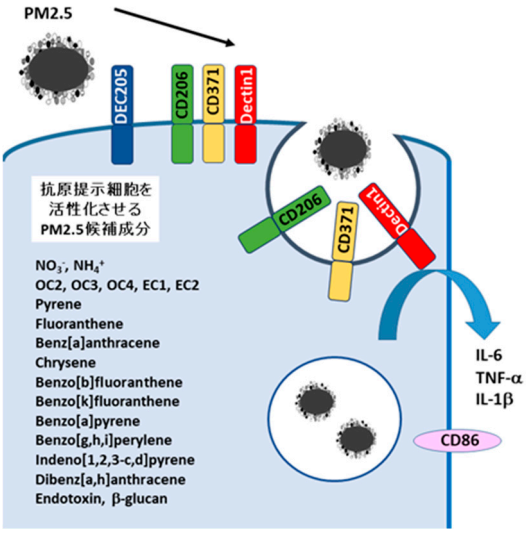
122　実環境中$PM_{2.5}$のアレルギー悪化機構と悪化成分の解明	本田　晶子

【目的】$PM_{2.5}$は、元素状炭素等の粒子や炭化水素や金属、イオン等の多くの化学物質から構成され、その健康影響は呼吸器系や免疫系に出現しやすい。中でも、気管支喘息等のアレルギー疾患の増加・悪化は、その代表的存在である。しかしながら、$PM_{2.5}$の多様性から、内在する作用メカニズムや、$PM_{2.5}$のいかなる成分が、呼吸器・免疫系に影響を及ぼすのか、については、十分に明らかにされていない。我々は、$PM_{2.5}$抽出物が、抗原提示細胞を活性化し、アレルギー疾患の増加・悪化に重要な役割を担っていることを見出している。しかしながら、この$PM_{2.5}$抽出物を利用した影響評価は、抽出操作によって一部消失後の成分の曝露影響評価のみにとどまり、かつサンプルの抽出効率の違いによる不確実要因も存在した。そこで、本研究では、抽出操作が不要な手法を用いて$PM_{2.5}$を回収し、実環境を反映する$PM_{2.5}$そのもの（粒子全体）が、抗原提示細胞に及ぼす影響を検討した。さらに、$PM_{2.5}$成分分析を行い、実環境中の$PM_{2.5}$そのものによるアレルギー悪化機構の解明と疾患悪化成分の同定を目指した。

【方法】$PM_{2.5}$を採取し、その成分の影響を調べるため、粒子を360℃、30分加熱することによって、$PM_{2.5}$成分を失活させた（H-$PM_{2.5}$）。$PM_{2.5}$と H- $PM_{2.5}$を抗原提示細胞に24時間曝露し、細胞活性を、Water soluble tetrazolium-1（WST-1）を用いた比色法により、細胞表面分子の発現に関する解析をフローサイトメトリーにより、炎症性サイトカインの産生量を Enzyme linked immuno sorbent assay により、解析した。粒子中の化学的成分として、イオンをイオンクロマトグラフィー法により、炭素成分をサーマルオプテカル・リフレクタンス法により、多環芳香族炭化水素を高速液体クロマトグラフ法により、無機元素成分を誘導結合プラズマ質量分析法により測定した。また、 生物成分として細菌、真菌成分であるエンドトキシンおよびβ-グルカンを limulus amebocyte lysate を用いた比色法により測定した。

【結果】非加熱 $PM_{2.5}$は、DEC205、CD206、CD371、Dectin1、CD86 等の細胞表面分子の刺激や TNF-α、IL-6、IL-1β等の炎症性サイトカインの産生により、抗原提示細胞を活性化したが、H-PM2.5 は、それらの影響を抑制した。非加熱 $PM_{2.5}$と H-$PM_{2.5}$の化学的および生物的成分を測定したところ、NO_3^-、NH_4^+、OC2、OC3、OC4、EC1、EC2、Pyrene 、 Fluoranthene 、 Benz[a]anthracene 、 Chrysene 、 Benzo[b]fluoranthene 、 Benzo[k]fluoranthene 、 Benzo[a]pyrene、Benzo[g,h,i]perylene、Indeno[1,2,3-c,d]pyrene、Dibenz[a,h]anthracene、Endotoxin、β-glucan が加熱によって減少していた。これらの熱易変性成分が、抗原提示細胞を活性化させ、アレルギー疾患の悪化に寄与する可能性が考えられた。

実環境中 PM2.5 による抗原提示細胞の活性化機構とその影響候補成分



122. 実環境中 $PM_{2.5}$ のアレルギー悪化機構と悪化成分の解明

本田　晶子

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

Key words：PM2.5，粒子，アレルギー，抗原提示細胞

緒　言

気管支喘息や花粉症をはじめとするアレルギー疾患が世界的に増加し、健康や社会経済に大きな損失をもたらしている。故に、この増加・悪化要因を解明し、適切な対策を講ずることが急がれている。ある疾患の発現、増加、悪化と関連する要因として、環境因子が挙げられる。中でも、アレルギー疾患患者が、環境化学物質・環境汚染物質の影響を受けやすい高感受性・脆弱性集団であることを示唆する知見は多く、環境化学物質・環境汚染物質が、アレルギー疾患の増加、悪化の原因の１つとして、考えられている［1］。

近年、アジア地域を中心とした世界の多くの国々において、大気中の粒径 2.5 μm 以下の微小粒子状物質（$PM_{2.5}$）の健康影響が危惧されている。$PM_{2.5}$ は、化石燃料の燃焼等によって産生し、元素状炭素等の粒子や炭化水素や金属、イオン等、多くの化学物質成分や、細菌や真菌等の生物由来成分から構成され、その組成割合は、地域や発生源によっても異なる。$PM_{2.5}$ の健康影響は呼吸器系や免疫系に出現しやすく、中でも、気管支喘息等のアレルギー疾患の増加、悪化は、その代表例である。しかしながら、$PM_{2.5}$ 成分の多様性から、内在する作用メカニズムや、$PM_{2.5}$ のいかなる成分が、呼吸器・免疫系に影響を及ぼすのか、については、十分に明らかにされていない。故に、$PM_{2.5}$ が増加、悪化させているアレルギー疾患の予防や治療に有効な手段の開発には至っていない。

我々は、公定法に準じ、フィルターを利用して $PM_{2.5}$ を日本で採取した後、抽出物を調製し、これらが、アトピー素因を有するマウスから単離した抗原提示細胞を活性化させることを示した。すなわち、$PM_{2.5}$ 抽出物に含有される成分が、免疫応答の開始細胞の活性化を介して、アレルギー疾患の増加、悪化に重要な役割を担うことを見出している［2］。しかし、$PM_{2.5}$ 抽出物を利用した影響評価は、煩雑な抽出操作を必要とする一方、抽出可能な成分のみの曝露影響評価にとどまり、かつ、抽出効率の違いによる不確実要因も存在する。本研究では、抽出操作が不要な新規手法を用いて $PM_{2.5}$ を回収し、実環境を反映する $PM_{2.5}$ そのもの（粒子全体）が、抗原提示細胞に及ぼす影響を検討した。さらに、$PM_{2.5}$ 成分分析を行い、実環境中の $PM_{2.5}$ そのものによるアレルギー悪化機構の解明と疾患悪化成分の同定を目指した。

方　法

1.　被検物質の調製

サイクロン法を用いて、大気汚染が深刻なタイ国バンコク大気中の $PM_{2.5}$ を採取した。また、$PM_{2.5}$ 成分の影響を調べるため、粒子を 360℃、30 分加熱することによって、$PM_{2.5}$ 成分を失活させた粒子（H-$PM_{2.5}$）を準備した。粒子を分散させるため、TOMY（Tokyo、Japan）UD-100 を用いて 3 分間超音波処理したのち、最終濃度 7.5 μg/mL、75 μg/mL になるよう培地を用いて調製した（1% Phosphate-Buffered Saline（PBS）、DMSO 0.1%）。

2.　動物

動物は、アトピー素因を有する NC/NgaTndCrlj 雄性マウス（9～11 週齢）を使用し、specific pathogen free（SPF）のマウスを日本チャールズリバーより購入した。動物実験は、当該施設の担当委員会の承認を得て、十分な動物擁護の配慮下で行った。

3. 骨髄由来抗原提示細胞の調製と曝露方法および検討項目

マウスを頸椎脱臼にて安楽死させた後、大腿骨を摘出した。70%エタノールに浸した後、RPMI1640 培地で洗浄した。この大腿骨の両端をカットし、RPMI1640 培地を注入して骨髄を押し出し、懸濁液を滅菌したナイロンメッシュに通して骨の破片等を除去した。次いで、溶血処理を行い、細胞懸濁液を調製した。

骨髄由来抗原提示細胞は、リコンビナントマウス顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子を含む R10 培地で 8 日間培養することにより、分化誘導した。培養の間は、3 日目に等量の培地を加え、6 日目に半量の培地を新しい培地と交換し、8 日目に浮遊細胞と弱い接着細胞を未熟・成熟骨髄由来抗原提示細胞として回収した。被検物質を抗原提示細胞に添加して、24 時間曝露した。

細胞活性を、Water soluble tetrazolium-1（WST-1）を用いた比色法により、細胞表面マーカーに関する解析をフローサイトメトリーにより、炎症性サイトカインの産生量を Enzyme linked immuno sorbent assay（以下 ELISA）法により、それぞれ解析した。

4. 細胞活性の測定（WST-1 法）

ノントリートメントの 96 穴プレートに細胞懸濁液を播種し、被検物質添加 23.5 時間後に WST-1 試薬を培地量の 10 分の 1 になるように 20μL/well ずつ添加し、0.5 時間 37℃でインキュベートした後、吸光度の測定を行った（測定波長 450 nm、参照波長 630 nm）。

5. 細胞表面分子の発現（フローサイトメトリー法）

共刺激分子 CD86、異物認識に関わる DEC205、CD206、CD209a、CD282（TLR2）、CD284（TLR4）、CD301、CD371、CLEC2、Dectin1、Dectin-2 の発現を Phycoerythrin 蛍光標識抗体を用いて解析した。

フローサイトメトリーに使用する細胞は、5 分遠心（4℃、400 g）した後、上清をアスピレーターで廃棄し、FACS Buffer（0.3% ウシ血清アルブミンと 0.05% アジ化ナトリウムを含む PBS）に懸濁した。各サンプルの細胞は、ブロッキング抗体（Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™)、BD Biosciences Pharmigen、San Jose、CA、USA）を加え、15 分反応させた後、蛍光標識抗体を加えて遮光し、4℃で 45 分放置した。細胞は、遠心洗浄した後、FACS Buffer に再懸濁し、蛍光を FACS Calibur（Becton、Dickinson and Company、Franklin Lakes、NJ、USA）により、無染色、Isotype Control 染色、蛍光染色サンプルの順で測定した。各サンプルにおいて約 1 万個の生細胞の蛍光データを取得し、陽性細胞率（%）を指標に解析した。

6. 炎症性サイトカインの産生（ELISA 法）

被検物質曝露 24 時間後に上清を回収し、5 分遠心（4℃、300 g）した。Mouse TNF-alpha Quantikine ELISA Kit（R&D、Minneapolis、 MN、USA）、Mouse IL-6 Platinum ELISA Kit（Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA）、Mouse IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine ELISA Kit（R&D）を用い、製造元のプロトコルに従って吸光度（測定波長は全て 450 nm、参照波長は 550 nm）を測定することにより、TNF-α、IL-6、IL-1β を定量した。TNF-α、IL-6、IL-1β の検出限界は、それぞれ 4.4 pg/mL、8.5 pg/mL、6.5 pg/mL とした。

7. PM2.5 中の化学的および生物的成分の定量

粒子中の化学的成分として、イオン（Cl^-、NO_3^-、SO_4^{2-}、Na^+、NH_4^+、K^+、Mg^{2+}、Ca^{2+}）はイオンクロマトグラフィー法により、炭素成分（organic carbon1-4 および elemental carbon 1-3）はサーマルオプテカル・リフレクタンス法により、多環芳香族炭化水素（Fluoranthene、Pyrene、Chrysene、Benz[a]anthracene、Benzo[b]fluoranthene、Benzo[k]fluoranthene、Benzo[a]pyrene、Benzo[g,h,i]perylene、Indeno[1,2,3-c,d]pyrene、Dibenz[a,h]anthracene）は高速液体クロマトグラフ法により、無機元素成分（Na、Al、K、Ca、Sc、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Se、Rb、Mo、Sb、Cs、Ba、La、Ce、Sm、Hf、W、Ta、Th、Pb、Cd）は誘導結合プラズマ質量分析法により測定した。また、 生物成分として細菌、真菌成分である Endotoxin および β-glucan を limulus amebocyte lysate を用いた比色法により測定した。

8. 統計解析

実験データは、n＝4 とし、実験の平均値±標準誤差を代表例として示した。多群間の平均値の値（①Control に対する各群の差　②非加熱 $PM_{2.5}$ と加熱 $PM_{2.5}$ との差）について、Turkey の多重比較検定を行い、$p < 0.05$ を有意とした。

結　果

1.　$PM_{2.5}$ と H-$PM_{2.5}$ が抗原提示細胞の細胞活性に及ぼす影響

非加熱 $PM_{2.5}$ および H-$PM_{2.5}$ を抗原提示細胞に曝露したところ、何れの曝露濃度（5、50 μg/mL）においても、細胞活性の低下は認められなかった（データ未掲載）。

2.　$PM_{2.5}$ と H-$PM_{2.5}$ が抗原提示細胞の細胞表面分子の発現に及ぼす影響

非加熱 PM2.5（5、50 μg/mL）を抗原提示細胞に曝露し、CD86、DEC205、CD206、CD209a、CD282（TLR2）、CD284（TLR4）、CD301、CD371、CLEC2、Dectin1、Dectin-2 の 11 種類の細胞表面分子の発現を調べたところ、CD86、DEC205 は濃度依存的にその発現が増大し、CD206、CD371、Dectin-1 は、発現減少が認められた（データ未掲載）。

続いて、非加熱 $PM_{2.5}$（5、50 μg/mL）の曝露によって、変動が認められた 11 種中 5 種の分子について、非加熱 $PM_{2.5}$ と H-$PM_{2.5}$（50 μg/mL）を抗原提示細胞に曝露し、その発現を比較した。その結果、H-$PM_{2.5}$ を曝露した抗原提示細胞の CD86 と DEC205 発現は、非加熱 $PM_{2.5}$ と比較して、有意に減少した（表 1）。また、H-$PM_{2.5}$ を曝露した抗原提示細胞の CD206、CD371、Dectin-1 の発現は、非加熱 $PM_{2.5}$ と比較して、有意に増加した。

表 1　抗原提示細胞における各種細胞表面分子の陽性細胞率（%）

		50 μg/mL	
	control	PM2.5	H-PM2.5
CD86	36.88 ± 1.67	61.35 ± 2.26**	33.60 ± 2.18##
CD205	10.73 ± 0.21	43.30 ± 2.14**	10.80 ± 0.14##
CD206	38.03 ± 2.65	21.43 ± 0.68**	31.55 ± 1.77#
CD371	54.55 ± 0.94	33.70 ± 0.56**	47.23 ± 1.03**, ##
Dectin1	32.88 ± 1.99	12.54 ± 1.81**	35.13 ± 2.08 ##

Average±SE　** $p < 0.01$、* $p < 0.05$ versus control　## $p < 0.01$、# $p < 0.05$ versus $PM_{2.5}$

3.　$PM_{2.5}$ と H-$PM_{2.5}$ が抗原提示細胞の炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響

非加熱 PM2.5（5、50 μg/mL）を抗原提示細胞に曝露し、TNF-α、IL-6、IL-1β の産生を調べたところ、何れも濃度依存的にその産生が増大した（データ未掲載）。続いて、非加熱 $PM_{2.5}$ と H-$PM_{2.5}$（50 μg/mL）を抗原提示細胞に曝露し、TNF-α、IL-6、IL-1β 産生量を比較した。その結果、H-$PM_{2.5}$ を曝露した抗原提示細胞から産生された TNF-α、IL-6、IL-1β は、非加熱 $PM_{2.5}$ と比較して、有意に減少した（表 2）。

表 2　抗原提示細胞における各種サイトカインの産生量（pg/mL）

		50 μg/mL	
	control	PM2.5	H-PM2.5
TNF-α	114.1 ± 4.1	2999.4 ± 178.9**	148.6 ± 9.8##
IL-6	94.8 ± 17.8	32840.3 ± 2189.1**	95.3 ± 9.9##
IL-1β	6.5 ± 0.0	232.3 ± 17.8**	8.7 ± 1.9##

Average±SE　** $p < 0.01$ versus control ## $p < 0.01$ versus $PM_{2.5}$

4. $PM_{2.5}$ と H-$PM_{2.5}$ 中の化学的および生物的成分

$PM_{2.5}$ と H-$PM_{2.5}$ 中の化学的および生物的成分濃度を測定したところ、化学的成分では、NO_3^-、NH_4^+、OC2、OC3、OC4 、 EC1 、 EC2 、 Pyrene 、 Fluoranthene 、 Benz[a]anthracene 、 Chrysene 、 Benzo[b]fluoranthene 、 Benzo[k]fluoranthene、Benzo[a]pyrene、Benzo[g,h,i]perylene、Indeno[1,2,3-c,d]pyrene、Dibenz[a,h]anthracene が、生物的成分では、Endotoxin、β-glucan が、加熱によって、減少した（データ未掲載）。

考　察

$PM_{2.5}$ とその成分は、DEC205、CD206、CD371、Dectin1 等のレセプターによって抗原提示細胞内に取り込まれ、共刺激分子 CD86 を介して、異物情報を提示する可能性が考えられた。また、TNF-α、IL-6、IL-1β等の炎症性サイトカインを産生し、抗原提示細胞を活性化することも示された。また、これらの分子を刺激する $PM_{2.5}$ 候補成分として、NO_3^-、NH_4^+、OC2、OC3、OC4、EC1、EC2、Pyrene、Fluoranthene、Benz[a]anthracene、Chrysene、Benzo[b]fluoranthene、Benzo[k]fluoranthene、Benzo[a]pyrene、Benzo[g,h,i]perylene、Indeno[1,2,3-c,d]pyrene、Dibenz[a,h]anthracene、Endotoxin、β-glucan が挙げられた。これらの熱易変性成分が、抗原提示細胞を活性化させ、アレルギー疾患の悪化に寄与する可能性が考えられた。

文　献

1） 本田晶子、上田佳代、高野裕久．環境汚染物質とアレルギー、日本予防医学会、2014; 9 (2):61-66.

2） Honda,A., Fukushima,W., Oishi,M., Tsuji,K., Sawahara,T., Hayashi,T., Kudo,H., Kashima,Y., Takahashi,K., Sasaki,H., Ueda,K., Takano,H. Effects of Components of PM2.5 Collected in Japan on the Respiratory and Immune Systems. Int J Toxicol.. 2017; 36(2):153-164. PMID: 28056587 DOI: 10.1177/1091581816682224