

## 環境中化学物質の気管支喘息の重症化への影響と抗アレルギーフィルターの開発

分担研究者 中村裕之（金沢大学医薬保健研究域医学系環境生態医学・公衆衛生学教授）

研究協力者 人見嘉哲（金沢大学医学系准教授）、櫻井克年（高知大学副学長）、  
康峪梅（高知大学農学部教授）、秋丸国広、弘田量二（高知大学医学部助教）、  
菅沼成文（高知大学医学部教授）、田中宏幸（岐阜薬科大学准教授）、  
日下幸則（福井大学医学部教授）、烏帽子田 彰（広島大学医歯薬総合研究科教授）

**研究要旨** 近年の文明国におけるアレルギー性疾患の増加の背景には、大気汚染をはじめとする環境中の化学物質に対する暴露機会の増加が指摘されている。本研究では、大気汚染物質である浮遊粒子状物質大気汚染物質であるディーゼル排気粒子（Diesel exhaust particulate, DEP）の成分である芳香族炭化水素（Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs）のアレルギーへの影響を *in vitro* および *in vivo* において系統的に評価し、さらにその影響を予防するためのフィルターを開発し、その予防効果を検証した。そのため、A549細胞へDEP抽出物あるいはその成分であるナフタレン、フルオレン、フェナントレン、フルオランテン、ベンゾ<sup>g</sup>(a)アントラセン、ベンゾ<sup>a</sup>ピレン、p-ニトロフェノール<sup>h</sup>の添加実験およびアレルギーモデルマウスにて、これらの物質を投与し、気道過敏性を評価した。*in vitro* および *in vivo* 実験により、DEPの成分のうち、フルオランテン、ナフタレン、ベンゾ<sup>g</sup>(a)アントラセン、p-ニトロフェノールがアレルギー反応を引き起こすことが認められた。また除去能評価実験では、フルオランテン、ナフタレンは、既存のフィルターで除去が可能であったが、ベンゾ<sup>g</sup>(a)アントラセンに対しては非晶質鉄フィルターが効果的であり、p-ニトロフェノールに対しては活性炭フィルターが効果的であった。したがって、非晶質鉄フィルターと活性炭フィルターを組み合わせ構成されている本フィルターはアレルギー反応を抑制できることから、喘息の重症化の予防に有効であることが示された。以上より、我々の開発したフィルターはDEP、特にPAHsによるアレルギー促進作用を抑制できることがわかった。

### A. 研究目的

近年の文明国におけるアレルギー性疾患の増加の背景には、大気汚染をはじめとする環境中の化学物質に対する暴露機会の増加が指摘されている。大気汚染物質である浮遊粒子状物質大気汚染物質である浮遊粒子状物質、特にディーゼル排気粒子（Diesel exhaust particulate, DEP）がアレルギー疾患の増加と関係が深いことは、多々、報告されているところである。本研究では環境中の化学物質、特にDEPの成分である芳香族炭化水素（Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs）のアレルギーへの影響を *in vitro* および *in vivo* において系統的に評価し、さらにその影響を予防するためのフィルターを開発し、その予防効果を検証した。

### B. 研究方法

#### 1. *in vitro*研究および *in vivo*研究

A549細胞へDEP抽出物の成分であるPAHsであるナフタレン、フルオレン、フェナントレン、フルオランテン、ベンゾ<sup>g</sup>(a)アントラセン、ベンゾ<sup>a</sup>ピレン、p-ニトロフェノール<sup>h</sup>を添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーターにて18-48 hr培養し、培地中産生されたInterleukin-8 (IL8)濃度をサンドイッチELISA法で測定した。

また、アレルギーモデルマウスにて、これらの物質を投与し、気道過敏性を評価した(図1)。

#### 2. フィルターの除去能の評価

先年、開発した化学物質の除去を目的とした非晶鉄および活性炭を含むフィルターの除去能を評価するため、DEPあるいはその成分を含む水を、それぞれ非晶鉄あるいは活性炭のフィルターを用いてろ過し、フィルター処理後のサ

サンプルのPAHsをGC/MSにて測定し、除去率を評価した。

マウス; Balb/c(オス)各6匹

抗原; ダニ抗原4μg

アレルギー促進物質; DEP; 62.5μg, PAH;フルオランテン、フルオレン、フェナントレン、ベンゾ(a)アントラセン、ベンゾ(a)ピレン、ナフタレン、p-ニトロフェノールベンゾ

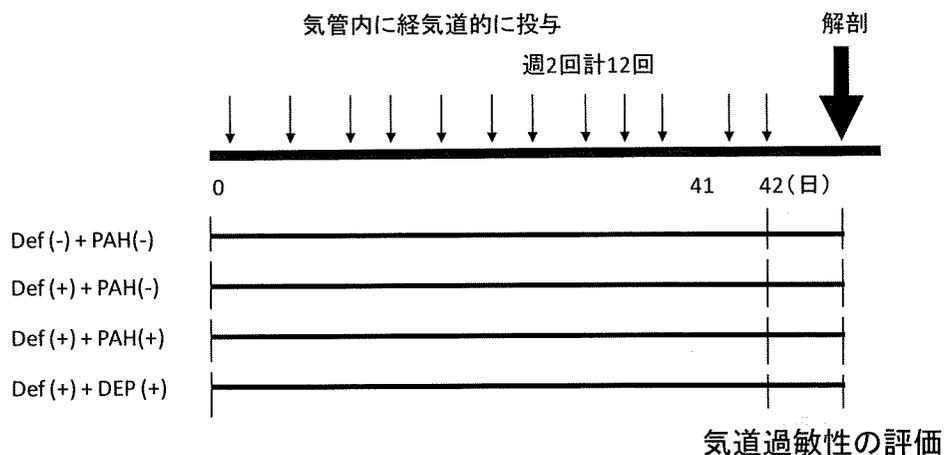


図1 ダニアレルギー発症モデルマウスを用いたDEPおよびPAHのマウス気道過敏性への影響を調べる実験プロトコール

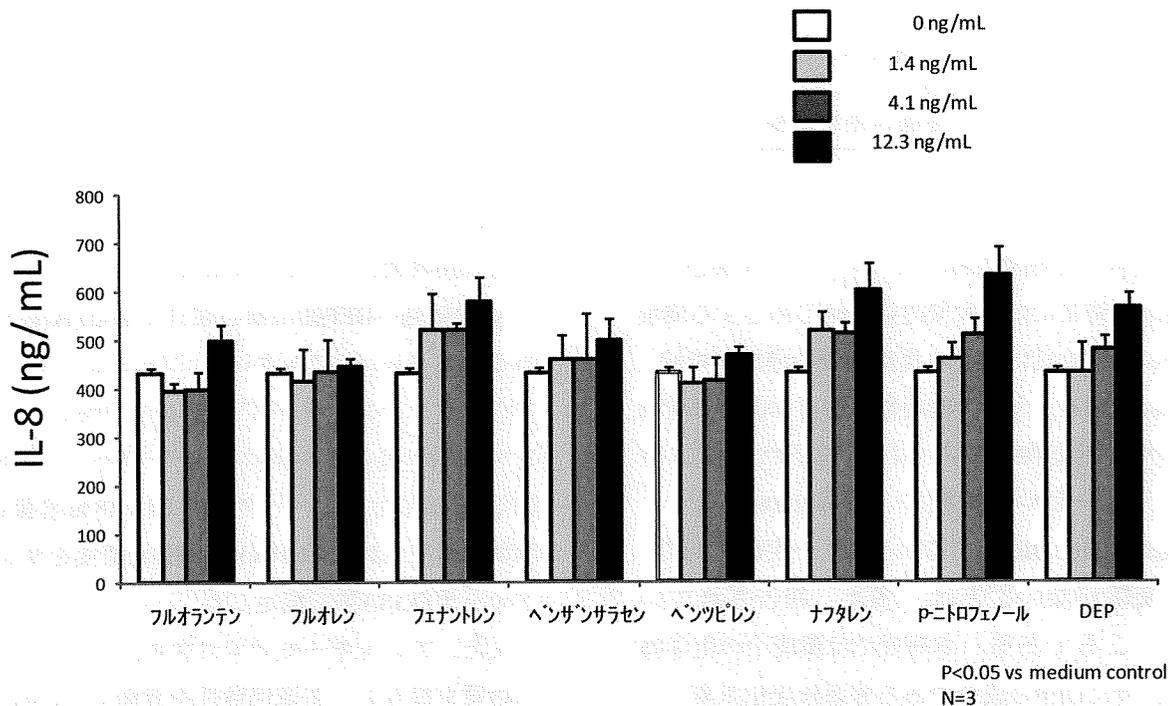


図2 A549細胞へのPAHsの添加によって放出されたInterleukin-8 (IL-8)濃度

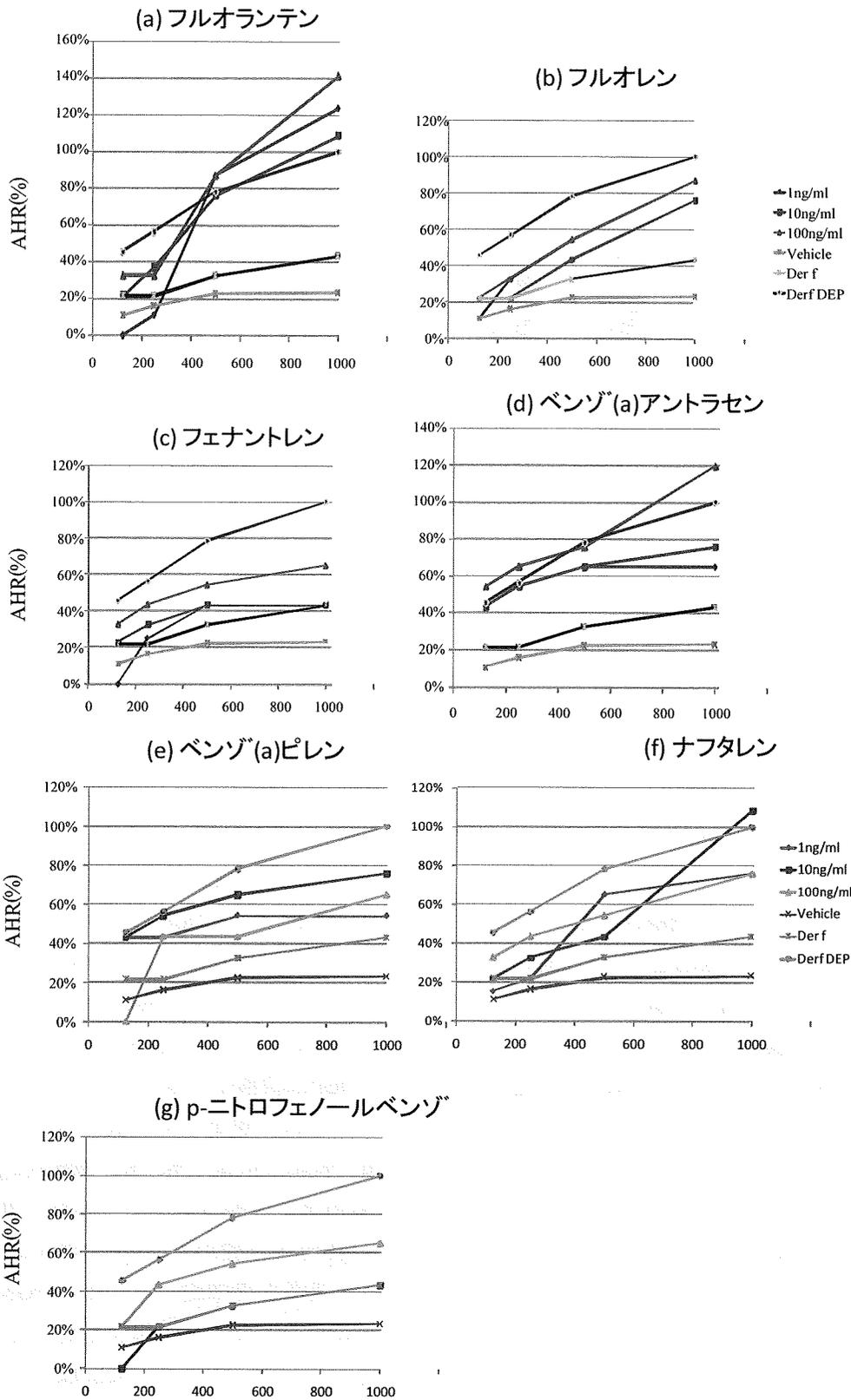


図3 ダニアレルギー発症モデルマウスを用いたDEPおよびPAH ((a) フルオランテン、(b) フルオレン、(c) フェナントレン、(d) ベンゾ<sup>a</sup>アントラセン、(e) ベンゾ<sup>a</sup>ピレン、(f) ナフタレン、(g) p-ニトロフェノールベンゾ<sup>a</sup>) のマウス気道過敏性への影響

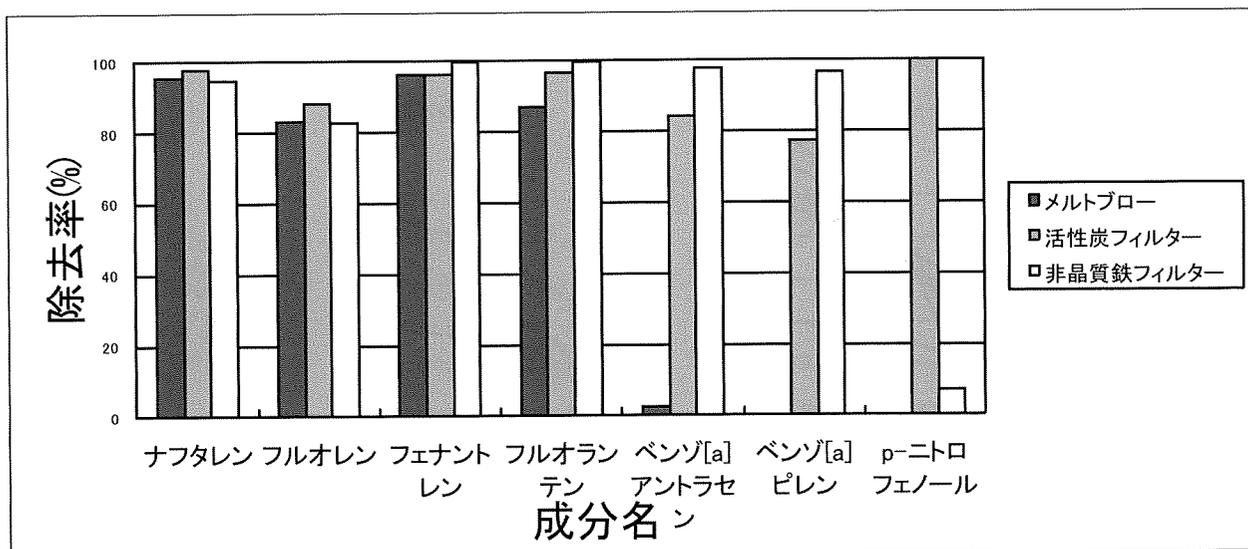


図 4 フィルターの除去能評価実験の結果

### C. 研究結果

#### 1. in vitro研究およびin vivo研究

A549細胞へのPAHsの添加によって放出されたInterleukin-8 (IL-8)濃度を図2に示した。フルオランテン、ナフタレン、ベンゾ<sup>a</sup>アントラセン、p-ニトロフェノールがIL-8の放出に対し量—反応関係が認められた(図2)。

またモデルマウス実験により、フルオランテン、ナフタレン、ベンゾ<sup>a</sup>(a)アントラセン、p-ニトロフェノールが気道過敏性の亢進を認め、その亢進は、DEPに比較的近かった(図3)。

#### 2. フィルターの除去能の評価

除去能評価実験では、フルオランテン、ナフタレンは、既存のフィルターで除去が可能であったが、ベンゾ<sup>a</sup>(a)アントラセンに対しては非晶質鉄フィルターが効果的であり、p-ニトロフェノールに対しては活性炭フィルターが効果的であった(図4)。

### D. 考察

数々のin vivoやin vitroの研究により、DEPはIgE抗体の産生を助長するアジュバント作用、好酸球の遊走や炎症部位への浸潤の促進、気道の反応性亢進作用、肥満細胞や好塩基球からのTh2タイプのサイトカイン産生の増加、鼻粘膜や気道の上皮細胞からのIL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ 、Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

(GM-CSF)、RANTES、ICAM-1などの蛋白やProinflammatoryサイトカイン産生の増強作用を有する。あるいは活性酸素種や窒素種を介しての炎症促進作用などが示されている。同時にNAD(P)H(quinone oxidoreductase (NQO1)), glutathione-S-transferase M1 (GSTM1), heme oxygenase-1 (HO-1)などのPhase 2の代謝酵素や抗酸化酵素がDEPによるアレルギー反応を抑えることも示されている。本in vitroおよびin vivo実験により、DEPの成分のうち、フルオランテン、ナフタレン、ベンゾ<sup>a</sup>(a)アントラセン、p-ニトロフェノールのPAHsがアレルギー反応を引き起こすことが認められた。

DEPは炭素分子をコアとして亜鉛、アルミニウム、鉄などの金属をはじめ、Pyrene類、Phenanthrene (Phe)類、Benzo[a]pyrene (BaP)などのPAHを含んでおり、PheやBaPがIgE産生細胞からのIgE分泌を促進したり、ヒト気道上皮細胞からのIL-8やGM-CSFなどのサイトカイン産生を増強することが明らかとなっている。Schoberらは、PheやBaPによる好塩基球からのIL-4とIL-8などのサイトカインの放出作用を認め、高親和性IgEレセプター-(Fc $\epsilon$ RI)を介したシグナル伝達機構を通してアレルギー反応が助長されることをin vitroの系で証明している。動物実験では、BaPと1-nitropyrene (1-NP)

も鼻アレルギーを悪化させることが示されている。DEPを有機溶媒のジクロロメタンで抽出される有機化学物質（Organic chemicals in DEP: DEP-OC）と、ジクロロメタンに溶けない残渣炭素粒子（washed DEP）に分けた時、アレルギー性気道炎症は、washed DEPよりもDEP-OCと抗原との併用投与により顕著に認め、アレルギー性喘息を増悪させるDEPの主たる構成成分は、残渣炭素粒子ではなく、有機化学物質であると推測されている。

著者らの開発したフィルターを用いた除去能評価実験では、フルオランテン、ナフタレンは、既存のフィルターで除去が可能であったが、ベンゾ<sup>a</sup>(a)アントラセンに対しては非晶質鉄フィルターが効果的であり、p-ニトロフェノールに対しては活性炭フィルターが効果的であった。したがって、非晶質鉄フィルターと活性炭フィルターを組み合わせ構成されている本フィルターはアレルギー反応を抑制できることから、喘息の重症化の予防に有効であることが示された。

#### E. 結論

我々の開発したフィルターはDEP、特にPAHsによるアレルギー促進作用を抑制できることがわかった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1)Kimura T, Yokoyama A, Kohno N, Nakamura H, Eboshida A. Perceived stress, severity of asthma, and quality of life in young adults with asthma. *Allergol Int.* 2009 Mar;58(1):71-9.
- (2)Hatta K, Nakamura H, Usui C, Kobayashi T, Kamiyo Y, Hirata T, Awata S, Kishi Y, Arai H, Kurosawa H: Medical and psychiatric comorbidity

in psychiatric beds in general hospitals: a cross-sectional study in Tokyo. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2009 Jun;63(3):329-35.

- (3)Hatta K, Sato K, Hamakawa H, Takebayashi H, Kimura N, Ochi S, Sudo Y, Asukai N, Nakamura H, Usui C, Kawabata T, Hirata T, Sawa Y:

Effectiveness of second-generation antipsychotics with acute-phase schizophrenia. *Schizophr Res.* 2009 Aug;113,49-55.

- (4)Hibino Y, Takaki J, Kambayashi Y, Hitomi Y, Sakai A, Sekizuka N, Ogino K, Nakamura H:

Relationship between the Noto-Peninsula earthquake and maternal postnatal depression and child-rearing. *Environ Health Prev Med.* 2009 Sep;14,255-260.

- (5)Higuchi M, Hatta K, Honma T, Hitomi YH, Kambayashi Y, Hibino Y, Matsuzaki I, Sasahara S, Nakamura H: Association between altered systemic inflammatory interleukin-1beta and natural killer cell activity and subsequently agitation in patients with alzheimer disease. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2009 Sep

- (6)Sagara T, Hitomi Y, Kambayashi Y, Hibino Y, Matsuzaki I, Sasahara S, Ogino K, Hatta K, Nakamura H: Common risk factors for changes in body weight and psychological well-being in Japanese male middle-aged workers. *Environ Health Prev Med.* 2009 Nov 14,319-327.

- (7)Hatta K, Nakamura M, Yoshida K, Hamakawa H, Wakejima T, Nishimura T, Furuta K, Kawabata T, Hirata T, Usui C, Nakamura H, Sawa Y: A prospective naturalistic multicenter study of intravenous medications in behavioral emergencies: haloperidol versus flunitrazepam. *Psychiatry Research*, (in press)

##### 2. 学会発表

(シンポジウム)

(1) 福富友馬、小林章雄、中村裕之、西村正治、  
河岸由紀男、谷口正実、高橋清、烏帽子田彰、  
小田嶋博、中川武正、秋山一男、赤澤晃

日本語版ECRHS調査票を用いた全国成人喘息  
有病率調査

第59回日本アレルギー学会秋季学術大会、2009  
年10月、秋田

(一般発表)

(1)辻本藤太郎、人見嘉哲、神林康弘、日比野由  
利、柴田亜樹、中村裕之

Lipopolysaccharide (LPS)投与マウス敗血症モデ  
ルにおける血漿中抗酸化物質濃度と総抗酸化  
能の変化

第7回日本予防医学会学術総会、2009年12月、  
千葉

(2)人見嘉哲、辻本藤太郎、石神昭人、近藤嘉高、  
神林康弘、弘田量二、日比野由利、柴田亜樹、  
中村裕之

ストレスによるマウス血漿総抗酸化能、抗酸化  
物質濃度の変化

第9回分子予防環境医学研究会、2010年1月、東  
京

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

