

氏名(本籍)	伊 <sup>い</sup> 藤 <sup>とう</sup> 剛 <sup>つよし</sup> (千葉県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第4445号		
学位授与年月日	平成19年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	<b>Effects of exposure to concentrated ambient particles and components of ambient particles on the expression of mRNA related to cardiac disease and receptors for infection.</b> (濃縮大気粒子およびその成分の曝露が心疾患および感染受容体に関連する遺伝子発現に及ぼす影響)		
主査	筑波大学教授	薬学博士	熊谷嘉人
副査	筑波大学教授	医学博士	青沼和隆
副査	筑波大学助教授	薬学博士	田中榮之介
副査	筑波大学講師	博士(農学)	藤栄治

## 論文の内容の要旨

### (目的)

大気中の微小粒子の増加と、心疾患や呼吸器感染症に関連する罹患率および死亡率の上昇の間に相関が認められることが米国に疫学調査の結果から指摘されている。しかし、動物実験による検証はいまだ不十分であり、大気微小粒子の心血管系および呼吸器系への影響の動物実験による証明、生体影響メカニズムの解明が課題となっている。そこで本研究では、大気微小粒子がおよぼす生体影響を明らかにすることを目的に、I) 濃縮大気微小粒子(Concentrated Ambient Particles: CAPs)を曝露した動物の心臓および肺の遺伝子発現解析および生理学的観察(血圧・心拍数)を実施し、1) 微小粒子中の化学成分の曝露、2) 酸化ストレスの誘導、3) 循環器ならびに呼吸器疾患に関連する遺伝子発現、4) 遺伝子発現および生理学指標の相関性について評価した。さらに、II) CAPsの主要構成成分であるディーゼル排気粒子(Diesel Exhaust Particles: DEP)を肺上皮細胞株に処置し、5) 感染受容体に関連する遺伝子発現、について解析した。

### (対象と方法)

#### I) CAPs 曝露の影響の検討

2004年5月、11月および2005年9月の3回にわたり、横浜市にある環境省のCAPs研究施設において、12週齢の雄性Wistar Kyoto ラット(WKY)のCAPs曝露を実施した。実験群は、1) Filterd Air 4日曝露群、2) Filterd Air 3日+CAPs 1日曝露群、3) CAPs 4日曝露群、の3群に分けた(n=5または6)。1日の曝露時間は10:00から14:30に設定し、4.5時間とした。

肺および心臓の遺伝子発現解析は、リアルタイムPCRにより実施した。本研究では、粒子状物質の化学成分により誘導されるCytochrome P450 1B1(CYP1B1)、CYP1A1を曝露マーカーとして、酸化ストレスにより誘導されるhome oxygenase-1(HO-1)を酸化ストレスマーカーとして、炎症、低酸素症および肺

高血圧症に関連する interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), endothelin-1 (ET-1), angiotensin converting enzyme (ACE) 感染に関連する intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), platelet-activating factor (PAF) を肺の疾患マーカーとして, 心疾患に関連する atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), ET-1, endothelin A (ETA) 受容体 ACE, angiotensin II type 1 (AT1) 受容体, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  を心疾患マーカーとして解析した。

また, 非観血式血圧測定装置により, 曝露前日と曝露終了日の同時刻の血圧および心拍数を測定し, 曝露前後の差を算出した。さらに, 曝露終了後の肺および心臓の臓器重量測定, 病理組織観察を実施した。

CAPs 粒子の曝露量, 遺伝子発現および生理学的指標相互の関連性は Spearman の順位相関を用いて解析した。

## II) 肺胞上皮細胞株を用いた DEP の影響の検討

ラットの II 型肺胞上皮細胞由来の細胞株 L2 を使用した。DEP は培地に混合し, 1, 10 および 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で 3 時間処理した。ライノウイルスの受容体として, ICAM-1, low-density lipoprotein (LDL) 受容体, 肺炎球菌の受容体として PAF 受容体, 酸化ストレスのマーカーとして HO-1, 化学物質曝露マーカーとして CYP1A1 の遺伝子発現を解析し, 各遺伝子発現の相関性を解析した。

## (結果)

曝露した CAPs の濃度は 0.6-1.5 $\text{mg}/\text{m}^3$  の範囲であった。心臓の CYP1B1, HO-1, ETA 受容体の遺伝子の有意な発現亢進が季節により認められた。さらに 4 日間のチャンバー内への CAPs 量と, CYP1B1, HO-1, ETA 受容体の遺伝子の発現および曝露前後の平均血圧の変化 ( $\Delta$ MBP) が有意な相関を示した。また, CYP1B1 と HO-1, HO-1 と ETA 受容体, ETA 受容体と  $\Delta$ MBP は統計学的に有意な相関を示した。一方, 肺では CAPs 曝露量と CYP1B1 および PAF 受容体の間に有意な相関が認められたが, CAPs 曝露量と HO-1 やその他の肺の疾患に関連する遺伝子との間には有意な関連は認められなかった。

DEP 処理したラット肺胞上皮細胞株において, ICAM-1, LDL 受容体, HO-1 および CYP1A1 のいずれの遺伝子発現も濃度依存的に亢進し, いずれの感染受容体も HO-1 と有意かつ強い相関を示した。

## (考察)

肺と心臓において, CAPs 曝露量と CYP1B1 の遺伝子発現が相関したことから, CAPs の化学成分が肺のみならず, 心臓にまで到達している可能性が示唆された。さらに心臓の CYP1B1 は HO-1 と有意に相関することから, 心臓に到達した CAPs の化学成分の量に依存して酸化ストレスが誘導される可能性が示唆された。ETA 受容体の発現は, HO-1 および  $\Delta$ MBP と有意な相関を示すことから, 酸化ストレスによる心臓への負荷が ETA 受容体の発現と関連し, さらに受容体の発現亢進のようエンドセリンの作用の増強が血圧の変化を誘導し, CAPs 曝露による心血管系への影響に関与している可能性が示唆された。

また, 弱いながらも肺炎球菌の受容体である PAF 受容体の発現が CAPs 曝露量と相関を示し, CAPs の主要な構成成分である DEP 処理により肺胞上皮細胞株の PAF 受容体の遺伝子発現が亢進した。このことから, CAPs の曝露が感染に対する感受性を高める可能性が示唆された。

## (結論)

CAPs の化学成分が直接心臓に作用し, 酸化ストレスを与え, 酸化ストレスがエンドセリンの作用を増強させ, エンドセリンの作用の増強が血圧上昇に関与する可能性が示唆された。また, CAPs およびその構成成分である DEP が呼吸器の感染症の発症に影響を及ぼす可能性が示唆された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、大気汚染と健康障害に関する疫学研究成果を基にして、動物実験での検証を行ったものである。すなわち、CAPsを曝露したラットの臓器中遺伝子発現解析と生理学的な検討を試みた。また、培養細胞にディーゼル排出微粒子を曝露して感染受容体に関する遺伝子発現等を調べた。その結果、CAPs中に含まれる化学成分は個体レベルで酸化ストレスを生じ、エンドセリンを介して血管圧に影響することが示唆された。また、わが国で問題視されているディーゼル排出微粒子に存在する化学成分等が呼吸器の感染症の発症にも関与することを示した。本研究は、CAPsの曝露設備を利用した個体レベルでの基礎研究として評価された。よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。