

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790667

研究課題名(和文) ナノ粒子を多く含むディーゼル排気ガスによる肝毒性と粒子除去効果

研究課題名(英文) Liver toxicity caused by nanoparticle-rich or filtered diesel exhaust

研究代表者

伊藤 由起 (ITO YUKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80452192

研究成果の概要(和文)：大気汚染の主要成分であるディーゼル排気ガス中にはナノサイズの粒子が多く含まれるが、このようなナノ粒子の肝臓への影響はほとんど研究がなされていない。本実験では、ナノ粒子を多く含むディーゼル排気ガス(NR-DE)曝露が肝臓にもたらす影響を1ヶ月曝露後のラットを用いてDNAマイクロアレイで網羅的に解析を行った。パスイエイ解析の結果、脂質ホメオスタシスの攪乱を引き起こしていることが明らかになった。そこで、NR-DE から粒子を除いた群(F-DE)を追加し肝臓中の脂肪酸の測定を行ったところ、NR-DE、F-DE 群ともに肝臓中の脂肪酸量を増加させた。以上から、NR-DE は脂質ホメオスタシスを攪乱させるが、粒子除去の効果は見られないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Diesel exhaust is a main airborne contaminant and includes many nanoparticles. Little studies reporting effects of nanoparticle-rich diesel exhaust (NR-DE) on liver have been conducted. In the present study, DNA microarray analysis showed that about 140 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ NR-DE for 1 month exposure caused the disruption of lipid homeostasis in rats. Additionally, exposure of NR-DE and filtered NR-DE, i.e. NR-DE without nanoparticles, increased hepatic fatty acids in mice. These results suggest that diesel exhaust induces the disturbance of lipid homeostasis and the main player exist in gas component in diesel exhaust.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：衛生学

キーワード：ディーゼル排気ナノ粒子、肝臓、脂質、脂肪酸、粒子除去

1. 研究開始当初の背景

浮遊粒子状物質(SPM)の一つであるディーゼル排気微粒子は、大気汚染の主要成分であり、呼吸器系・循環器系・免疫系・生殖器系への影響を及ぼすことが明らかにされている(Knopp, 1993; Brook et al., 2003; Morris 2001)。ディーゼル排気ガス(DE)にはさま

ざまな粒径の粒子が含まれており、粒子の大部分が粒径 0.1 μm 以下のナノ粒子である(Morawska et al., 1998; Kittelson, 1998)。ナノ粒子は大きい粒子に比べ血流に入りやすいことや、表面積が大きく様々な毒性物質を凝縮して運べるという性質(Oberdörster et al.,

2001) などから、健康影響が懸念されている。しかし、その生体影響に関する研究はまだ乏しく、緊急性の高い課題となっている。国立環境研究所ではナノ粒子を多く含む DE (NR-DE) の曝露方法を世界に先駆けて確立し(Fujitani et al., 2009)、平成 18 年度より研究を開始している。申請者らは国立環境研究所との共同研究で、NR-DE の精巢への影響を明らかにしてきた (Li et al., 2009; Ramdhan et al., 2009)。また、DE の毒性影響として今までほとんど注目されてこなかった肝臓に着目し、NR-DE の肝臓への影響について明らかにしてきた。雄性の F344 ラットに NR-DE を 1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月曝露した実験で、中濃度 (日本や米国の粒径 $2.5\mu\text{m}$ 以下の粒子状物質 $\text{PM}_{2.5}$ の環境基準値付近濃度、 $39.0 \pm 4.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$) および高濃度 (都市部の交差点で観察され得る濃度、 $137.6 \pm 19.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$) での NR-DE の 1 ヶ月曝露により、血漿中のアスパラギン酸アミノ基転移酵素(AST)、アラニンアミノ基転移酵素(ALT)、interleukin 6(IL-6)や、肝臓中の Nuclear factor kappa-B (NFκB)の上昇が観察され、炎症が惹起されていることが明らかとなった。NFκB の制御に関わっている PPARα やその標的遺伝子の mRNA も誘導されていたが、蛋白発現量には影響が観察されなかった。PPARα の応答配列への結合は NR-DE 曝露によって上昇していたため、PPARα 標的遺伝子の蛋白合成が阻害されていることが判明した。2 ヶ月、3 ヶ月曝露の NR-DE 曝露においては上記の変化が見られなかった。PPARα は前述のように NFκB 経路の制御を介して抗炎症作用を発揮する (Kostadinova et al., 2005)。そこで、*Ppara*-null マウスでは炎症が持続すると仮説をたて実験を行ったが、予想と反し PPARα のある野生型のみで肝細胞の膨化や炎症が観察された。またこの実験では、ラットで影響の見られた

中濃度、高濃度群に加え、高濃度の NR-DE から粒子を Hepa-filter で除去した除粒子群 (F-DE)を用いており、高濃度 NR-DE 群では影響の見られなかった NFκB や tumor necrosis factor (TNF)α といった炎症関連遺伝子、Bax や Bcl-2 等のアポトーシス関連遺伝子、PPARα 標的遺伝子の脂質関連遺伝子が F-DE 群でのみ変化していた。これは、現在の粒子規制を中心としたディーゼル自動車排気ガス規制ではこれらの毒性影響を予防する事が出来ない事を示唆している。

そこで、さらに NR-DE 群 (ナノ粒子+ガス成分) と F-DE 群 (ガス成分のみ) の毒性影響を比較検討し、DE の肝毒性機序を明らかにすることで、DE のリスク評価、リスク管理につなげる事が出来るのではないかと考えた。

2. 研究の目的

これまでの研究では、炎症と脂質代謝に絞って肝毒性を評価してきたため、本研究ではまず NR-DE 曝露による肝毒性を網羅的に解析することを目的とした。その上で、ラットに NR-DE 曝露 (粒子成分+ガス成分) と F-DE 曝露 (ガス成分のみ、現在の粒子規制を中心とした排気ガス規制を想定) を行い、DE 曝露により想定される肝毒性が DE 中のナノ粒子によるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

研究協力者の在籍する国立環境研究所ナノ粒子ディーゼル排気曝露装置を用いて DE 曝露を行った。

まず初めに NR-DE 曝露により起こる肝毒性経路を網羅的に解析する為、ラットをコントロール 2 匹と高濃度曝露群 (約 $140 \mu\text{g}/\text{m}^3$) 2 匹を用いて、DNA マイクロアレイを行った。曝露終了後、肝臓を摘出し使用まで -80°C で保

存した。

凍結した肝臓から RNeasy Mini kit (QIAGEN)を用いて RNA の抽出を行った。抽出した RNA は、ナノドロップで収量、波形を確認した後、バイオアナライザー (Agilent)で電気泳動を行い、不純物や分解のない RNA であることを確認した。

DNA マイクロアレイは東レ株式会社に委託し実施した。高感度 DNA チップ 3D-Gene を用いて、1 色法で解析を行った。ノーマライゼーションによるデータの標準化ののち、対照群と全ての曝露群を比較し、変動比 2 倍を閾値にして発現変動のある遺伝子を同定した。抽出された遺伝子を GenMAPP を用いて Z score 値を基にパスウェイ解析を行った。DNA マイクロアレイのパスウェイ解析で抽出された特徴的な遺伝子を、マイクロアレイ解析を行っていない低濃度群、中濃度群を加えた全ての個体のサンプル(n=8)を用いて定量的 Real-time PCR (SYBR green 法)を行う。目的遺伝子のプライマーは Primer Express ソフトを用いて行なった。

また、6週齢の雄マウスに、2週間、1ヶ月、2ヶ月新鮮空気 (対照群)、NR-DE曝露 (約140 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、NR-DEから粒子を除去したディーゼル排気ガス(F-DE)を曝露し、肝臓中の脂質を抽出後、脂肪酸濃度をGC/MSで測定した。

4. 研究成果

DNAマイクロアレイ解析とその後のパスウェイ解析を行った結果、エイコサノイド合成、プロスタグランジン合成・制御、脂肪酸生合成、コレステロール生合成、概日リズム、アンドロゲン受容体シグナル、細胞周期、G1からS期への細胞制御、ヘッジホッグシグナル、脂質代謝や毒性に関与する核内受容体、ステロイド生合成経路が抽出された。脂肪酸やコレステロール、ステロイドの合成、エイコサ

ノイド合成、プロスタグランジン合成・制御、それらに関与する核内受容体といった脂質ホメオスタシスの攪乱が見られていることが注目された。

定量的リアルタイムPCR法で確認したところ、リン脂質からのアラキドン酸産生に関与するホスホリパーゼA2 group 4aは中濃度曝露群で上昇していた。同様に、アラキドン酸からプロスタグランジンH2を合成するCox-1は高濃度群で、Cox-2は中濃度群で上昇していた。一方、アラキドン酸合成酵素を抑制するannexinと相互作用するs100蛋白は中濃度群で上昇していたが、annexin1は高濃度曝露群で減少していた。

以上より、NR-DE曝露は肝臓でのプロスタグランジン合成を促進する可能性が示唆された。

さらに、NR-DEならびにNR-DEから粒子を除去したディーゼル排気ガス曝露後の脂肪酸濃度の変化についてマウスを用いて検討した。

NR-DEまたはF-DE曝露により、肝臓中のリノール酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキドン酸、EPAの上昇が観察された。F-DE群の方が脂肪酸濃度により影響を与えたことから、ディーゼル排気ガス中に脂質ホメオスタシスを攪乱する物質が存在することが示唆された。NR-DE曝露したラットでは血漿テストステロン濃度の上昇が観察されるが、このような脂質ホメオスタシス攪乱の2次的影響かもしれない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Yamagishi N, Ito Y, Ramdhan DH, Yanagiba Y, Hayashi Y, Wang D, Li CM, Taneda S, Suzuki AK, Taya K, Watanabe G, Kamijima M, Nakajima T. Effect of nanoparticle-rich diesel exhaust on testicular and hippocampus steroidogenesis in male rats. *Inhal Toxicol* 24(8):459-67(2012)
- ② 伊藤由起、ラムダンドニヒクマツト、柳場由絵、山岸希、上島通浩、那須民江. ～ナノ粒子を多く含むディーゼル排気ガス曝露による肝臓への影響～ 第81回日本衛生学会若手プロジェクト研究助成ミニシンポジウム「ディーゼル排気ガス中のナノ粒子による健康影響—動物実験の知見から—」ミニ特集 日本衛生学雑誌 66(4): 638-642 (2011)
- ③ 山岸希、伊藤由起、ラムダンドニヒクマツト、那須民江. ～ナノ粒子を多く含むディーゼル排気ガス曝露による肝臓への影響～ 第81回日本衛生学会若手プロジェクト研究助成ミニシンポジウム「ディーゼル排気ガス中のナノ粒子による健康影響—動物実験の知見から—」ミニ特集 日本衛生学雑誌 66(4): 634-637 (2011)

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 由起 (ITO YUKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：80452192