

機関番号：23903

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790423

研究課題名 (和文) ナノ DEP 曝露が PPAR $\alpha$  に及ぼす影響とヒトでの動脈硬化のリスク評価研究課題名 (英文) The effects of nanoparticle-rich diesel exhaust on hepatic PPAR $\alpha$ 

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いまだ明らかではない。本実験では、雄性のラットにナノ粒子を多く含むディーゼル排気ガス (NR-DE) 曝露を環境中での曝露状況を加味して行った。1 ヶ月曝露後環境基準値付近の濃度においても炎症が観察された。しかし、2 ヶ月以降では炎症は観察されなかった。この炎症には肝臓の核内受容体が関与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Diesel exhaust is a main airborne contaminant and includes many nanoparticles. The effects of nanoparticle-rich diesel exhaust (NR-DE) on liver in male rats were investigated in this study. Exposure conditions were chosen according to environmental fate of diesel exhaust. NR-DE at the concentrations near the value of environmental standard for 1 month induced hepatic inflammation which did not persist. It was suggested that the nuclear receptor in the liver played a role in this inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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、ペルオキシゾーム活性化受容体、脂質代謝、炎症、肝臓、大気汚染、遺伝子改変動物

## 1. 研究開始当初の背景

浮遊粒子状物質の一つであるディーゼル排気微粒子 (DEP) 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。DEP にはさまざまな粒径の粒子が含

まれており、その大部分の粒子が粒径 0.1  $\mu$ m 以下のナノ DEP である。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などから、炎症、血栓を生じやすくさせたり、全身の臓器に影響を及ぼすと考

えられている。また、微小粒子の曝露は酸化ストレスの産生を介して血管の内皮細胞から接着因子や炎症性サイトカインの放出、endothelin-1 産生亢進などを介して動脈硬化を引き起こすと推測されている。ナノ DEP 曝露が動脈硬化を引き起こすかは未だわかっていないが、他の大気中微小粒子同様に動脈硬化を引き起こすことが予想される。動脈硬化の発症には肝臓の核内受容体が鍵を握っている。しかし、DEP が肝臓に影響を及ぼすかどうかはほとんど明らかになっていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

ナノ粒子を多く含むディーゼル排気ガス (NR-DE) をラットに曝露使用した実験結果、肝臓重量の増加が確認された。ナノ粒子は血流に入りやすく全身に影響を及ぼすことが想定されるが、これまでに肝臓に対する影響はまだ解明されていない。そこで、本研究では、肝臓への影響を炎症と脂質代謝の2つの側面から明らかにすること、またその両方の側面に関与することが明らかになっているペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体 (PPAR)  $\alpha$  の関与を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ラットを用いた研究

#### ① 実験動物

7~8 週齢の雄 F344 ラットに NR-DE 曝露を行った。動物の曝露は国立環境研究所のナノ粒子健康影響実験棟の NR-DE 曝露施設を使用した。動物の習性を考慮し、夜 10 時から翌日の 3 時までの 5 時間の夜間曝露とした。現実の交差点などで観察されるナノ粒子の動態に合わせ、1 日 5 時間、週 5 日間曝露し、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月間の曝露を行った。

ナノ粒子は、排気量 8L のディーゼルエンジンを無負荷の条件で毎分 2000 回転させ、排出される排気を直ちに直径 50 cm の希釈トンネルに入れ、ナノ粒子が凝集しないように 10~15 倍希釈した後、エンジンの圧力変動が少なくなったところで、目的とする粒子濃度にするために 2 回目の希釈を行い、速やかに曝露チャンバーに導入した。希釈用空気はすべてフィルターを通した清浄空気で、マイクロコンピューターによって、除菌、除粒子、温度、湿度の制御をし、また、常にエンジン排気部、希釈トンネル部および曝露チャンバーの CO, CO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, SO<sub>2</sub> 濃度のモニタリングを行った。各チャンバーの粒子径、重量濃度、個数濃度はそれぞれ、対照 (89.8 ± 53.7 nm, 15.5 ± 2.3 μg/m<sup>3</sup>, 3.36 ± 0.93 個/cm<sup>3</sup>)、曝露チャンバーでは 23~27 nm のナノ粒子が低濃度 (23.5 ± 1.0 nm, 23.8 ± 6.6 μg/m<sup>3</sup>, 2.47 × 10<sup>5</sup> 個/cm<sup>3</sup>)、中濃度 (23.1

± 1.0 nm, 39.0 ± 4.0 μg/m<sup>3</sup>, 5.60 × 10<sup>5</sup> 個/cm<sup>3</sup>)、高濃度 (27.2 ± 2.0 nm, 137.6 ± 19.9 μg/m<sup>3</sup>, 1.61 × 10<sup>6</sup> 個/cm<sup>3</sup>) であった。

#### ② 肝臓

肝臓はホモジネートし、タンパク濃度は Protein Assay kit (Bio-Rad 社製) を用いて測定した。また、肝臓の一部から CellLytic™ NuCLEAR™ Extraction Kit (SIGMA, Tokyo, Japan) を用いて核抽出を行った。

#### ③ 血漿アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST) とアラニンアミノ基転移酵素 (ALT)

血漿中の AST、ALT 値を和光純薬工業のキットを用いて測定した。

#### ④ 血漿中インターロイキン 6 (IL-6)

炎症マーカーである IL-6 を ELISA キット (Quantikine ELISA Kits, R&D systems, Inc, MN) で測定した。

⑤ 脂質濃度測定 肝臓の脂質は Folch ら (1957) の方法で抽出し、トリグリセライド (TG)、総コレステロール (T-Chol) 測定用の試料とした。血漿および肝臓の TG、T-Chol は、トリグリセライド E-テストワコー (WAKO 社製) 及びコレステロール E-テストワコー (和光純薬工業) を用いて測定した。

#### ⑥ 定量リアルタイム PCR

RNA は、RNeasy Mini kit (QIAGEN 社製) を用いて抽出した。抽出した RNA の量、質を Gene Quant II RNA/DNA 分光光度計 (Pharmacia Biotech 社製) で確認した。相補的 DNA (cDNA) は RNA 1 μg から Oligo (dT)<sub>20</sub> primer、SuperScript III™ reverse transcriptase (Invitrogen 社製) 反応溶液 20 μl を用いて合成した。プライマーは Primer Express 2.0.0 (Applied Biosystems Japan 社製) を使用し、設計した。それぞれの mRNA 発現量は、ABI PRISM 7000 Sequence Detector (Applied Biosystems Japan 社製) で測定した。PCR 反応は 1 × SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)、100 nM プライマー溶液を含む反応液 25 μl を用いて行った。50° C で 2 min, 95° C で 10 min の反応の後、95° C で 15 sec, 60° C で 1 min のサイクルを 40 回行った。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) をハウスキーピング遺伝子として使用してデータ解析に用いた。すべての遺伝子の mRNA 発現量は GAPDH 発現量によって補正した。

#### ⑦ ウェスタンブロット

肝ホモジネートの泳動用サンプルを用い、10% SDS-PAGE を行った後、ニトロセルロース膜に転写した。3% スキムミルクでブロッキングした後、各膜をそれぞれ 1 次抗体でインキュベーションした。アルカリフォスファターゼ標識 2 次抗体を用いて、1-Step™ NBT/BCIP (PIERCE 社製) で検出した。PPAR $\alpha$  標的遺伝子の 1 次抗体 bifunctional protein (hydrase + 3-hydroxylacyl-CoA

dehydrogenase) (PH) (Osumi T et al., 1980)、Peroxisomal thiolase (PT) (Furuta et al., 1981)、medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) (Miyazawa et al., 1980)、very long chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) (Izai K et al., 1992) を使用しその他の一次抗体は Santa Cruz 社より購入した。それぞれのバンドは Lane & Spot Analyzer version 5.0 (ATTO 社製)を用いて検出し、数値化した。

#### ⑧ PPAR $\alpha$ /PPRE 結合試験

PPAR $\alpha$  は核内で peroxisome proliferator-activated receptor response element (PPRE) に結合し、転写が行われる。そこで、肝臓中の PPAR $\alpha$  の PPRE への結合能を PPAR $\alpha$  transcription factor assay kit (Cayman chemical, Ann Arbor, MI) を用いて測定した。20  $\mu$ g の核タンパクをサンプルとし、マニュアルに従って測定した。

#### ⑨ 統計

データは、一元配置の分散分析の後、Dunnett の多重比較を行った。 $P < 0.05$  を有意とした。

### (2) ペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体 (PPAR) $\alpha$ の関与に関する研究

#### ① 実験動物

肝毒性における PPAR $\alpha$  の関与をより明らかにするため、6 週齢雄性 129/Sv (野生型) マウスと *Ppar $\alpha$ -null* マウスを用いて曝露実験を行った。対照群、粒径 22~27nm のナノ粒子を多く含む中濃度群 (PM2.5 の環境基準相当、標準濃度群) :  $8.2 \times 10^5 / \text{cm}^3$  (31.44  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )、高濃度群 :  $1.8 \times 10^6 / \text{cm}^3$  (128.56  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )、高濃度除粒子群を 1 日 5 時間、週 5 日間、2 週間、1、2 か月間吸入曝露した。曝露期間終了後、血液、肝臓、腎臓を摘出し、肝臓と腎臓の一部は 4%パラホルムアルデヒドで固定した。

#### ② 組織学的変化

4%パラホルムアルデヒドで固定した肝臓は、パラフィン包埋を行った後切片を作製した。肝臓は HE 染色を行い鏡検した。肝臓は壊死、炎症、脂質蓄積を中心に観察した。

#### ③ 血漿アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST)

血漿中の AST 値を和光純薬工業のキットを用いて測定した。

#### ④ ホモジネート、核画分の作成

前述のラットの時と同様の方法で行った。

#### ⑤ 脂質濃度測定

前述のラットの時と同様の方法で行った。

#### ⑥ 定量リアルタイム PCR

前述のラットの時と同様の方法で行った。

#### ⑦ 統計

データは、二元配置の分散分析の後、Dunnett の多重比較を行った。 $P < 0.05$  を有意とした。

## 4. 研究成果

### (1) ラットを用いた実験結果

#### ① 血漿中の AST、ALT 値

血漿中の AST、ALT は 1 ヶ月曝露の中濃度群、高濃度群で上昇していた。しかしながら、2 ヶ月、3 ヶ月曝露後には変化は見られなかった。

#### ② 血漿中の IL-6 値

血漿中の IL-6 は 1 ヶ月曝露後の高濃度群で有意に上昇していた。しかしながら、AST や ALT 同様 2 ヶ月、3 ヶ月曝露後には変化は見られなかった。

#### ③ T-chol、TG 濃度

血漿中の T-chol は 1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月ともに変化が見られなかった。血漿中の TG は 3 ヶ月曝露の高濃度群で有意に増加していたが、1 ヶ月、2 ヶ月曝露後変化は見られなかった。

一方、肝臓中の T-chol は 2 ヶ月曝露の中濃度群のみ有意に低下しており、曝露濃度依存的な変化は見られなかった。肝臓中の TG は血漿中の TG 同様 3 ヶ月曝露の高濃度群で有意に増加していたが、1 ヶ月、2 ヶ月曝露後変化は見られなかった。

#### ④ 肝臓の PPAR $\alpha$ とその標的遺伝子と TNF $\alpha$ の mRNA 発現量

NR-DE 曝露により、炎症ならびに脂質の蓄積が観察されたため、その両方に関与する PPAR $\alpha$  の mRNA 発現量を測定した。1 ヶ月曝露の高濃度群で PPAR $\alpha$  の上昇が認められた。また、PPAR $\alpha$  の標的遺伝子であり、脂質代謝に関与する酵素 VLCAD、PH も同様に 1 ヶ月曝露の高濃度群で上昇していた。2 ヶ月、3 ヶ月後は変化が見られなかった。PPAR $\alpha$  による抗炎症作用の標的となる NF $\kappa$ B に関しては、p50、p65 の両サブユニットともに 1 ヶ月曝露の高濃度群で上昇が見られたが、2 ヶ月、3 ヶ月曝露後は変化が見られなかった。炎症マーカーである TNF $\alpha$  は 1 ヶ月曝露の中濃度、高濃度群で有意に上昇していたが、2 ヶ月、3 ヶ月曝露後は変化が見られなかった。

#### ⑤ 肝臓の PPAR $\alpha$ とその標的遺伝子のタンパク発現量

mRNA 量に変化のあった 1 ヶ月曝露後の肝臓を用いてタンパク発現量を測定した。mRNA 同様、PPAR $\alpha$  は高濃度曝露群で有意な増加が見られた。また、核内の NF $\kappa$ B p50、p65 の発現に関しても p50 では中濃度、高濃度群で、p65 では高濃度群で有意な増加が見られた。一方 PPAR $\alpha$  の標的遺伝子であり、脂質の  $\beta$  酸化に関わる PH、PT、VLCAD はいずれも変化が見られず、mRNA とは異なっていた。

#### ⑥ 肝臓の TG 合成と運搬に関わる物質の mRNA 発現量

3 ヶ月曝露後に血中ならびに肝臓中の TG 量が増加していることから、TG 合成に関わる

Dgat 1, 2 と、TG の運搬に関わる MTP の mRNA 量を 3 ヶ月曝露後の肝臓を用いて調べた。いずれも有意な変化は認められなかった。

#### ⑦ PPAR $\alpha$ 結合能

1 ヶ月の肝臓中の PPAR $\alpha$  の PPARE への結合を測定した。中濃度、高濃度群で有意に増加していた。

### (2) ペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体 (PPAR) $\alpha$ の関与に関する研究

#### ① 病理組織学的変化

*Ppar $\alpha$ -null* マウスでは野生型マウスに比べ肝臓中の脂質量が多く、NR-DE 曝露により脂質の蓄積が促進している傾向が見られた。一方野生型では F-DE 群で軽い壊死が観察された他は曝露依存的な顕著な傾向は見られなかった。

#### ② 肝臓中の脂質量

肝臓中の TG 量、T-cholesterol 量ともに *Ppar $\alpha$ -null* マウスの方が野生型マウスに比べ多かったが、NR-DE 曝露により TG 量は 2 ヶ月曝露の野生型で、T-cholesterol 量は両遺伝子型で上昇していた。

#### ③ 血漿 ALT 活性

血漿 ALT 活性には曝露による変化は見られなかった。

#### ④ PPAR $\alpha$ 関連遺伝子の変化

野生型マウスの PPAR $\alpha$  は 2 週間と 2 カ月間曝露の F-DE 曝露群で有意に上昇していたが、1 か月では有意に減少していた。PPAR $\alpha$  の脂質代謝の標的遺伝子である PT は 2 ヶ月曝露の F-DE 群で上昇し、*Ppar $\alpha$ -null* マウスの F-DE 群では減少していた。炎症に関わる NF $\kappa$ B p50, p65 は 2 か月曝露の野生型の除粒子群でのみ有意に上昇していた。一方 *Ppar $\alpha$ -null* マウスでは、2 ヶ月曝露の p50 を除いたすべての曝露期間において、F-DE 群で NF $\kappa$ B p65 と p50 mRNA が有意に減少していた。

### (3) 考察

本実験では、NR-DE 曝露により肝臓の炎症が引き起こされることが明らかとなった。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などから、肝臓などの全身の臓器に影響を及ぼすと考えられている。しかし、これまでにディーゼル排気ガス曝露により気道や肺で炎症が観察されるという報告は多数みられるが、肝臓での炎症に着目した論文はほとんどない。その理由の一つは、粒子が凝集しやすくナノ粒子のまま曝露することが難しいことにあると考えられる。国立環境研究所の NR-DE 曝露施設は、粒子の大部分がナノ粒子の状態では曝露をすることが可能であり、それにより肝臓に影響が見られたのではないかと考えられる。

本研究では、肝臓での炎症は中濃度群から観察された。ディーゼル使用車ならびにバスからの PM<sub>2.5</sub> 曝露は 73  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  と見積もられている。中濃度群はその濃度を下回っており、現実的にヒトの曝露が考えられる濃度である。重量濃度で現在の環境基準値と同程度のナノ粒子曝露が今まで注目されることがなかった肝障害を誘発するという新たな知見は注目すべきであろう。

ディーゼル排気ガス曝露により肝臓中の PPAR $\alpha$  が誘導される報告は初めてである。核内受容体 PPAR $\alpha$  は NF $\kappa$ B の核内移行を抑制し抗炎症作用を発揮する。しかし本研究では PPAR $\alpha$  の上昇は見られたが、NF $\kappa$ B も 1 ヶ月曝露時に上昇が見られた。この理由は今のところ不明である。*Ppar $\alpha$ -null* マウスを用いた実験結果より、NR-DE の肝毒性において PPAR $\alpha$  は曝露期間により反応が異なるが、野生型とは反応の仕方が異なることから、PPAR $\alpha$  は重要であることが明らかになった。F-DE 曝露においても PPAR $\alpha$  が誘導もしくは抑制されていることから、ガス成分に PPAR $\alpha$  に作用する物質が存在することが示唆される。

PPAR $\alpha$  は  $\beta$  酸化酵素の誘導を介して脂質代謝を亢進させることが知られている。また、ラットにおいて PPAR $\alpha$  の標的遺伝子は mRNA では上昇が見られたが、タンパク量では変化が見られなかった。3 ヶ月曝露後には血中、肝臓ともに TG の上昇が見られたが、TG 合成酵素である Dgat には変化が見られなかった。マウスの実験では肝臓中の TG は 2 ヶ月曝露の野生型のみであがっており、PPAR $\alpha$  を介した脂質ホメオスタシスが攪乱していることがうかがえる。過去に、db/db マウスにディーゼル排気ガスを曝露した実験で新鮮空気を曝露したものに比べ肝臓中の脂肪肝の程度は統計的に有意ではないが上昇傾向にあることが報告されている。この実験では血漿中の TG の上昇は見られていないが、肝臓中の TG は測定しておらず、肝臓中の脂肪肝が TG によるものかどうかはわからなかった。

以上をまとめると、NR-DE 曝露により肝臓で炎症と脂質の蓄積が見られた。これは、PPAR $\alpha$  による調節の攪乱が原因であると考えられる。PPAR $\alpha$  は曝露期間によって反応が異なっており、肝臓の毒性機序の解明にはさらなる研究が必要である。

### 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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 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. 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—」第81回日本衛生学会総会(誌上発表、東京 2011/3/26-28)

②ラムダン ドニヒクマツト、伊藤由起、柳場由絵、山岸 希、山元昭二、藤巻秀和、那須民江. ナノ粒子を含んだディーゼル排気ガスのマウス脂質恒常性への影響. 第81回日本衛生学会総会(誌上発表、東京 2011/3/26-28)

③Ito Y, Yanagiba Y, Ramdhan DH, Hayashi Y, Li Y, Suzuki AK, Kamijima M, Nakajima T. Mechanism analysis of nanoparticle-rich diesel exhaust induced liver damage in F344 rats. XII International Congress of Toxicology. July 19-23, 2010, Barcelona, Spain.

④伊藤由起、柳場由絵、山岸希、李春梅、種田晋二、鈴木明、上島通浩、那須民江. ナノ粒子を多く含むディーゼル排気暴露によるPPAR $\alpha$ を介した肝臓への影響. 第79回日本衛生学会 2009/3/29-4/1 東京

[その他]

## 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