

### (3) PM<sub>2.5</sub>抽出物がラットの血管内皮微小環境に及ぼす影響に関する研究

#### 要旨

ラット内皮細胞の培養系を用いて、PM<sub>2.5</sub>抽出物と DEP 抽出物の血管系に及ぼす影響を調べた。ラット微小血管内皮細胞を基底膜、あるいはコラーゲンコートしたカルチャーインサート上で培養し、PM<sub>2.5</sub>抽出物又は DEP 抽出物を添加した後、内皮細胞の生存率や形態を調べた。ラット微小血管内皮細胞において、PM<sub>2.5</sub>抽出物の細胞障害性は DEP 抽出物の細胞障害性よりやや低いことが明らかとなった。DEP 抽出物を添加したラット心臓微小血管内皮細胞における転写レベルを測定したところ、低濃度 (1 μg/ml) から抗酸化系酵素の遺伝子発現が特異的に上昇していることが認められた。また、PM<sub>2.5</sub>抽出物や DEP 抽出物は線溶系阻害酵素である plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) の分泌を抑制し、凝固系を阻害する thrombomodulin (TM) を減少させた。

以上のことより、PM<sub>2.5</sub>抽出物や DEP 抽出物は血管内皮細胞に酸化的ストレスを与え、凝固線溶系に影響を及ぼすことが示唆された。

#### (3. 1) 背景・目的

PM<sub>2.5</sub>を吸入することにより心臓-血管系に影響を受け、これが原因となり都市部における死亡率が上昇している可能性が示唆されているが、肺に沈着した PM<sub>2.5</sub>が、どのようにして心臓-血管系に影響を及ぼすのか明らかではなかった。そこで、本研究は PM<sub>2.5</sub>の有機成分がどのようにして内皮細胞や内皮細胞を取り巻く微小環境に影響を及ぼすのかについて、培養実験系を用いて明らかにすることを目的とした。

PM<sub>2.5</sub>を吸入することによる心疾患の発症機序はいまだ明らかでないが、いくつかのリスクファクターとなり得る因子を選択してその変化を検討することとした。材料として用いた血管内皮細胞は、血液凝固の制御、血圧調整などの心機能の制御に深く関与しており、肺胞表面に付着した PM<sub>2.5</sub>から諸成分が漏出してくる場合に早期に影響を受けやすい細胞であることから、血管内皮機能への粒子の影響について検討することは重要であると考えられる。内皮細胞が産生する血圧制御因子、中でも、血管を収縮させる endothelin-1 や血管を弛緩させる一酸化窒素、プロスタサイクリンの産生異常は高血圧の発症や血管肥厚を進行させる重要な要因ではある。しかしながら、本課題では心筋梗塞に密接に関連する冠動脈硬化や冠動脈血栓形成を引き起こすとされている要因を、PM<sub>2.5</sub>曝露による急性心疾患に関与する因子としてより重要と考え注目した。すでに形成された血栓の溶解は、組織型あるいはウロキナーゼ型の plasminogen activator によりプラズミノゲンがプラスミンに活性化されてフィブリンを分解することにより反応が進行するが、PAI-1はこの血栓溶解を阻害する因子として血栓形成を促進する重要なタンパクである。TMは血管内皮細胞上に存在する凝固系を阻害する強力な因子であり、動脈硬化や高脂血症などの内皮細胞障害により血中に放出される。ヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) は代表的な抗炎症・抗増殖機能を持つ防御的なタンパクである。HO-1はヘムタンパクを一酸化炭素 (CO)、bilirubin と鉄に分解する。HO-1が分解したこの3つの分解物はそれぞれ抗炎症、抗 apoptosis、抗増殖の機能を持っており、肺の炎症や肺高血圧、心臓の虚血再循環障害において HO-1の誘導は障害の防御や障害後の組織の増生による血管狭窄を防ぐことにより防御的に働くと考えられる。

本研究は PM<sub>2.5</sub>抽出物に含まれる有機成分が直接には血管内皮細胞に酸化ストレスを与えることにより HO-1を誘導し、また血液の凝固・線溶系や白血球の粘着性を変化させることが、大気中微小粒子状物質が心臓・血管系に及ぼす影響の一機序であると考えて研究を進めた。

#### (3. 2) 方法

実験で用いる曝露物質については、PM<sub>2.5</sub>抽出物及び DEP 抽出物のほか、PM<sub>2.5</sub>抽出物とその有機抽出後残渣物を合わせた全粒子状物質抽出物 (whole 抽出物) も用意した。また、横浜市内に設置した CAPs 曝露システム (【3】(2) 参照) で捕集した CAPs 及び未使用フィルタ (Blank) に

についても同様に有機抽出操作を行い、CAPs 抽出物及び未使用フィルタ抽出物を作成した。これらの抽出成分をジメチルスルホキシド (DMSO) に 50~300mg/ml の濃度に溶解し、-80 度で保存した。培地への添加は DMSO 濃度として 0.1% となるように 1,000 倍希釈して用いた。

また、実験に使用する細胞は、米国 VEC 社から購入したラット肺微小血管内皮細胞 (RLMVEC) 及びラット心臓微小血管内皮細胞 (RHMVEC) を、それぞれゼラチンとフィブロネクチンで処理したカルチャーディッシュで増殖因子 (R211-S, CELL APPLICATIONS, Inc.) を含むラット内皮細胞基礎培地 (R210-500, CELL APPLICATIONS, Inc) で 2~3 日間培養した後、実験に供した。一部の実験では、上記内皮細胞を、フィブロネクチンあるいは基底膜で処理したカルチャーインサート上で増殖因子を含むラット内皮細胞基礎培地で 2~3 日間培養した後、実験に供した。基底膜標品は不死化肺胞 II 型上皮細胞 (Prof. A. Clement から贈与) を用いて作製した。中和 I 型コラーゲン (pH 7.2) をカルチャーインサート底面上に添加して、37°C、20 時間静置してゲル化させた後、クリーンベンチ内で風乾したマトリックスを培養基質として用いた。カルチャーウェル底面に塗布した 100  $\mu$ l マトリジェル (Matrigel® : BD) 存在下で培養基質に播種した肺胞上皮細胞を、1% 牛胎児血清と 0.2mM アスコルビン酸 2 リン酸を添加した DMEM を培養液として培養した。10 日間培養して基底膜を形成させた培養組織を 0.5% Triton-X100 と 20mM NH<sub>4</sub>OH で処理して細胞を溶解させた後、DMEM で洗浄して基底膜標品を得、内皮細胞の培養に用いた。

本研究では、以下 (3. 2. 1) ~ (3. 2. 6) に関する実験を実施した。

### (3. 2. 1) PM<sub>2.5</sub> 抽出物・DEP 抽出物を曝露したラット心臓微小血管内皮細胞における細胞障害性

フィブロネクチンをコートした 96 ウェルカルチャーディッシュにラット心臓微小血管内皮細胞播種して増殖培地で 3 日間培養した。シート状になった細胞を、基礎培地で洗った後、各濃度に調整した PM<sub>2.5</sub> 抽出物あるいは DEP 抽出物に 24 時間曝露した。細胞にフェノールレッドを含まない MEM 培地で洗浄後、WST-8 (cell counting Kit-8 : ojindo, OD450nm) を用いて相対的生細胞数を測定した。

### (3. 2. 2) PM<sub>2.5</sub> 抽出物・DEP 抽出物を曝露したラット心臓微小血管内皮細胞における酸化系酵素の遺伝子発現

シート状になったラット心臓微小血管内皮細胞に、最終濃度が 0, 1, 3, 10  $\mu$ g/ml となるように PM<sub>2.5</sub> 抽出物あるいは DEP 抽出物を加え、その後 6 時間培養した後に、TRIZOL (GIBCO) を用いて全 RNA を抽出した。全 RNA はホルマリン変性アガロースゲル電気泳動にて分離後、Hybond-N 膜にブロットした。pAtlas1A ベクターに組み込まれた下別表の cDNA を KpnI と SacI でインサートを切り出したもの、あるいは pCR2.1 ベクターにクローニングされた heme oxygenase cDNA[1] を EcoRI で切り出したものを、<sup>32</sup>P でラベルしてプローブとした。ブロットは BAS2000 で解析し、それぞれの転写レベルはアクチンの mRNA 量で補正した。

### (3. 2. 3) ラットにおける DEP 抽出物噴霧実験

日本チャールス・リバーより SPF の雄性 Sprague-Dawley ラットを購入し、一週間の検疫の後 8 週齢で実験に供した。ラットを一群 3 匹に分け、4% のハロタンを含む笑気-酸素 (4 : 1) で麻酔した後、ラット用気管内噴霧装置 (1A-1B, Penn Century 社, Philadelphia, PA) を用いて 400  $\mu$ g/ml の DEP 溶液 (1% DMSO を含む) を 0.25ml の用量で気管内噴霧した (DEP 抽出物としての投与量は 100  $\mu$ g/匹)。対照群には、1% DMSO 溶液を噴霧した。噴霧には溶液に引き続き 1.5ml の空気を吐出させ噴霧を完結させるようにした。気管内噴霧 6 時間後と 24 時間後に、60mg/kg 体重のペントバルビタールを腹腔に投与した後腹大動脈より瀉血してラットを屠殺した。ラットより肺を摘出し、重量測定の後左肺下部を切り出した。また、心臓より右心房部位を切り出した。これらの組織は、1 ml の RNAlater (Ambion, Austin, TX) に入れた後、冷蔵庫内で一日保存した。サンプルは RNAlater を除去した後、10 倍量の TRIZOL を加えてホモジナイズして全 RNA を抽

出した。肺と心臓組織における HO-1 とアクチンの mRNA 量を、細胞と同様にノーザンハイブリダイゼーション法を用いて解析した。

### (3. 2. 4) PM<sub>2.5</sub> 抽出物・DEP 抽出物を曝露したラット心臓微小血管内皮細胞における細胞間接着構造障害性と物質透過性

フィブロネクチンをコートしたカルチャーインサート及び基底膜標品上で培養し、シート状になったラット心臓微小血管内皮細胞は基礎培地で洗った後、10mM の N-acetyl-L-cysteine (NAC) 存在下あるいは非存在下で PM<sub>2.5</sub> 抽出物を 25 μg/ml の濃度で、また、DEP 抽出物を 10 μg/ml の濃度で、それぞれ 3 時間曝露した。曝露後、細胞組織を E-cadherin 抗体、α-catenin 抗体 (Santa Cruze Biotechnology, Inc.)、β-catenin 抗体 (BD Biosciences) と蛍光標識 2 次抗体で染色、あるいは Rodamin-Phalloidin (Molecular Probes, Inc.) で染色した後、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica Microsystems) で細胞間接着構造構成分子の局在を観察した。また、曝露時に分子量 3,000 の FITC 標識 Dextran (Molecular Probes, Inc.) を完全分散したときに 25 μg/ml になるようにカルチャーインサートの細胞側に加え、3 時間曝露後カルチャーインサート底面側に漏出してきた FITC 標識 Dextran を蛍光分光光度計で測定した。

### (3. 2. 5) PM<sub>2.5</sub> 抽出物・DEP 抽出物を曝露したラット心臓微小血管内皮細胞とラット肺微小血管内皮細胞における抗酸化系酵素、線溶系酵素、凝固系因子、白血球接着分子の変化

フィブロネクチンをコートしたカルチャーインサート上で培養しシート状になったラット心臓微小血管内皮細胞とラット肺微小血管内皮細胞に 10 μg/ml の濃度の DEP 抽出物、10mM の NAC 存在下あるいは非存在下で 25 μg/ml の濃度の PM<sub>2.5</sub> 抽出物を加え、24 時間曝露した。一部の実験においては、DEP 抽出物あるいは PM<sub>2.5</sub> 抽出物を加え、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間、48 時間曝露して経時変化を検討した。細胞は洗浄後 10%TCA を 10 分処理し、proteinase inhibitors (Sigma) を加えた電気泳動用サンプルバッファーで蛋白を抽出した。細胞培養液は proteinase inhibitors を添加して 50 倍濃縮し、サンプルバッファーに懸濁した。サンプルは細胞数が同数になるように調整して電気泳動し、PVDF 膜 (Millipore Co.) にブロットした後、HO-1、α-tubulin (Oncogene Research Products)、PAI-1、urokinase type plasminogen activator (uPA)、TM (american diagnostica Inc.)、E-selectin (YLEM)、tissue type plasminogen activator (tPA)、ICAM-1 (Santa Cruze Biotechnology, Inc.)、ICAM-1、VCAM-1 (R&D) と peroxidase 標識 2 次抗体で染色し、ECL Plus western blotting detection kits と chemiluminescence films (Amersham International plc.) でバンドを検出した。結果は Quantity One® (pdi, Inc.) で解析し、それぞれのバンドは α-tubulin のバンドで補正した。

### (3. 2. 6) PM<sub>2.5</sub> 抽出物・DEP 抽出物・whole 抽出物・CAPs 抽出物を曝露したラット心臓微小血管内皮細胞における抗酸化系酵素、線溶系酵素、凝固系因子の変化

フィブロネクチンをコートしたカルチャーインサート上で培養しシート状になったラット心臓微小血管内皮細胞に、20mM の NAC 存在下あるいは非存在下で、10 あるいは 25 μg/ml の濃度の PM<sub>2.5</sub> 抽出物、DEP 抽出物、whole 抽出物、CAPs 抽出物を加えた。予備試験において、ラット心臓微小血管内皮細胞の抗酸化酵素 HO-1 のタンパク発現が DEP 抽出物曝露 6~12 時間をピークとして 24 時間で低下していることから、曝露時間は 12 時間に設定した。抗酸化系酵素、線溶系酵素、凝固系因子の変化は Western Blot で検出した。細胞は洗浄後 10%TCA を 10 分処理し、proteinase inhibitors (Sigma) を加えた RIPA buffer で蛋白を抽出し、電気泳動用サンプルバッファーに溶解した。細胞培養液は proteinase inhibitors を添加して 50 倍濃縮し、サンプルバッファーに懸濁した。サンプルはタンパク濃度を測定した後 (PIRECE, Protein Assay Kit)、タンパク濃度が一定になるように調整して電気泳動し、PVDF 膜 (Millipore Co.) にブロットした後、HO-1 (stressgen または oncogen research products)、PAI-1、uPA、TM、tPA (american

diagnostica Inc.) と peroxidase 標識 2 次抗体で染色し、ECL advance western blotting detection kits と chemiluminescence films (Amersham International plc.) でバンドを検出した。結果は Quantity One® (pdi, Inc.) で半定量化し解析した。

### (3. 3) 結果

#### (3. 3. 1) PM<sub>2.5</sub> 抽出物・DEP 抽出物を曝露したラット心臓微小血管内皮細胞における細胞障害性

図 2.3.3-1 (A) に、DEP 抽出物・PM<sub>2.5</sub>抽出物を 24 時間曝露したラット心臓微小血管内皮細胞の生存率を示した。DEP 抽出物と PM<sub>2.5</sub>抽出物の半数致死濃度 (LC50) は、それぞれ、17.2 と 34.2 μg 抽出物/ml と算出され、DEP 抽出物の方が PM<sub>2.5</sub>抽出物よりやや高い毒性を示した。

また、図 2.3.3-1 (B) に示したように、DEP 抽出物 (25 μg/ml) あるいは PM<sub>2.5</sub>抽出物 (50 μg/ml) を 24 時間曝露したラット心臓微小血管内皮細胞の生存率は、20~30%程度に減少した。抗酸化剤である NAC を添加することにより生存率は用量依存的に回復したが、この効果は DEP 抽出物の曝露において顕著であった。

#### (3. 3. 2) PM<sub>2.5</sub> 抽出物・DEP 抽出物を曝露したラット心臓微小血管内皮細胞における抗酸化系酵素の遺伝子発現

図 2.3.3-2 に、DEP 抽出物あるいは PM<sub>2.5</sub>抽出物を、3 μg/ml と 10 μg/ml の濃度で 6 時間曝露した細胞における各抗酸化系酵素の遺伝子発現量を示した。HO-1 の遺伝子発現量はコントロール群では極めて低く、他の抗酸化系酵素の遺伝子発現量に比べ顕著に用量依存的上昇が認められた。また、同じ用量では PM<sub>2.5</sub>抽出物に比べ DEP 抽出物の方が遺伝子誘導活性が高いことが明らかとなった。HO-1 は抗酸化作用を持つとともに、heat shock protein としても知られている。

図 2.3.3-3 には、ラット心臓微小血管内皮細胞を 10mM の NAC 存在下、あるいは非存在下で DEP 抽出物 (10 μg/ml) あるいは PM<sub>2.5</sub>抽出物 (20 μg/ml) に 6 時間曝露し、HO-1 と heat shock protein の一種である hsp70 の遺伝子発現量を調べた結果を示した。DEP 抽出物は PM<sub>2.5</sub>抽出物に比べ HO-1 のみならず、hsp70 の遺伝子発現量も顕著に上昇を示させた。また、HO-1 mRNA の変化は hsp70 の変化に比べ顕著であった。NAC はこれらの遺伝子発現と有意に低下させることが明らかとなった。

#### (3. 3. 3) ラットにおける DEP 抽出物噴霧実験

ラット心臓微小血管内皮細胞の培養系において顕著に見られた DEP 抽出物による HO-1 の遺伝子発現量の上昇が、in vivo においても見られるかどうか検討するため、100 μg/匹の用量の DEP 抽出物をラットに気管内噴霧して、噴霧 6 時間と 24 時間後の肺と心臓における HO-1 の遺伝子発現量の変化を調べた。図 2.3.3-4 及び表 2.3.3-1 に HO-1 の遺伝子発現量の変化を、また表 2.3.3-1 に肺湿重量とアクチンで補正した HO-1 発現量を併せて示した。HO-1 の肺における遺伝子発現量は気管内噴霧により上昇したが、DEP 抽出物の効果は見られなかった。また、心臓においては DEP 抽出物の気管内噴霧 6 時間後に、有意な HO-1 mRNA 量の上昇が認められたが、24 時間後には対照群との差は認められなかった。

#### (3. 3. 4) PM<sub>2.5</sub> 抽出物・DEP 抽出物のラット心臓微小血管内皮細胞における細胞間接着構造障害性と物質透過性

PM<sub>2.5</sub>抽出物 (25 μg/ml) を 3 時間曝露したラット心臓微小血管内皮細胞は、細胞障害性が現れる前に細胞間接着構造と細胞骨格に影響が認められた。細胞間接着構造である adherence junction を構成する E-cadherin、α-catenin、β-catenin は細胞境界に連続した局在が認められるが、PM<sub>2.5</sub>抽出物曝露によりいずれも局在が波状になり、一部で断続的な部分も認められた。この細胞間接着の断続化はフィブロネクチン上で培養した細胞でより強く観察され、基底膜上で培養した細胞では影響は弱かった。抗酸化剤である NAC を添加することにより細胞間接着の断続化も回

復した(図 2.3.3-5)。DEP 抽出物・PM<sub>2.5</sub>抽出物(10 μg/ml 及び 25 μg/ml)曝露は内皮細胞層の物質透過性が亢進した。低分子 Dextran の透過性は DEP 抽出物・PM<sub>2.5</sub>抽出物曝露で亢進し、抗酸化剤である NAC を添加することによりある程度抑えられた。物質透過性亢進はフィブロネクチン上で培養した細胞でより顕著であった(図 2.3.3-6)。

### (3. 3. 5) PM<sub>2.5</sub> 抽出物・DEP 抽出物を曝露したラット心臓微小血管内皮細胞とラット肺微小血管内皮細胞における抗血栓機能を制御する分子の変化

DEP 抽出物・PM<sub>2.5</sub>抽出物を曝露したラット心臓微小血管内皮細胞とラット肺微小血管内皮細胞における抗血栓機能を制御する分子の変化をウエスタンブロットにより検出した。図 2.3.3-7 に、DEP 抽出物あるいは PM<sub>2.5</sub>抽出物を、10 μg/ml と 25 μg/ml、または NAC 存在下で PM<sub>2.5</sub>抽出物を 25 μg/ml の濃度で 24 時間曝露した細胞における各蛋白発現量または分泌量を示した。

線溶系阻害酵素である PAI-1 の分泌量は DEP 抽出物・PM<sub>2.5</sub>抽出物により明らかに減少した。線溶系促進酵素である uPA の分泌と tPA の産生には変化はなかった。抗酸化剤である NAC を添加は DEP 抽出物・PM<sub>2.5</sub>抽出物による PAI-1 分泌低下を回復した。凝固系を阻害する内皮細胞上の TM は若干減少する傾向にあった。白血球の内皮細胞への接着も血栓形成を促進すると考えられるが、内皮細胞上の E-selectin、ICAM-1 にほとんど変化は認められず、VCAM-1 は検出されなかった。ラット心臓微小血管内皮細胞とラット肺微小血管内皮細胞はほぼ同様の変化を示した。

### (3. 3. 6) PM<sub>2.5</sub> 抽出物・DEP 抽出物・whole 抽出物・CAPs 抽出物のラット心臓微小血管内皮細胞に対する細胞障害性、抗酸化系酵素誘導能と抗血栓機能を制御する分子の変化

CAPs 抽出物、whole 抽出物(CAPs 濃縮前の全粒子を用いた抽出物)及び同じ手順で処理した未使用フィルタ抽出物(blank)を 12 時間曝露したラット心臓微小血管内皮細胞の生存率の減少を図 2.3.3-8 に示した。CAPs 抽出物と whole 抽出物ともに DEP 抽出物や PM<sub>2.5</sub>抽出物より毒性は低かった。CAPs 抽出物で whole 抽出物より若干毒性が強い傾向を示したが、ほぼ同程度の細胞障害性と考えられる。DEP 抽出物や PM<sub>2.5</sub>抽出物の場合と同様に、抗酸化剤である NAC を添加することにより生存率は回復した。また、還元型グルタチオンを枯渇させて細胞が酸化ストレスを受けやすい状態にするために γ-glutamyl-cystein synthetase inhibitor である Buthionin(BSO)を 5mM、GSH reductase inhibitor である 1,3-Bis-2-chloroethyl-1-nitrosourea (BCNU)を 50 μM になるように DEP 抽出物を曝露して、細胞生存率を比較した実験においては、Buthionin 添加ではほとんど変化は認められなかったものの、BCNU 添加では DEP 抽出物 10 μg/ml 曝露でほぼ 100%の細胞がネクロシスをおこした。

上記条件下における HO-1 の誘導をウエスタンブロットで検出した。CAPs 抽出物と whole 抽出物は濃度依存的に HO-1 を誘導し、CAPs 抽出物の方が whole 抽出物よりほぼ 1.7 倍の HO-1 誘導能を示した(図 2.3.3-9)。blank ではほとんど HO-1 誘導は認められなかった。DEP 抽出物や PM<sub>2.5</sub>抽出物の場合と同様に、抗酸化剤である NAC を添加することにより CAPs 抽出物と whole 抽出物による HO-1 誘導が抑制されたことから、HO-1 誘導は CAPs 抽出物と whole 抽出物に含まれる酸化性の物質による酸化的ストレスによるものであると考えられる。今回使用した CAPs 抽出物と whole 抽出物の HO-1 誘導能とこれまで捕集された DEP 抽出物や PM<sub>2.5</sub> No.1 抽出物及び PM<sub>2.5</sub> No.2 抽出物の HO-1 誘導能を比較することで、仮に酸化ストレス誘導能を比較すると、粒子抽出物 10 μg/ml を曝露したときの HO-1 産生は DEP 抽出物を 1 としたとき PM<sub>2.5</sub> No.1 抽出物が 0.5、PM<sub>2.5</sub> No.2 抽出物が 1.7、CAPs 抽出物が 0.7、whole 抽出物が 0.4 であった。

DEP 抽出物や PM<sub>2.5</sub>抽出物を曝露したラット心臓微小血管内皮細胞における抗血栓機能を制御する分子の変化をウエスタンブロットにより検出したところ、線溶系阻害酵素である PAI-1 の分泌量は DEP 抽出物や PM<sub>2.5</sub>抽出物の曝露の結果と同様に CAPs 抽出物曝露により濃度依存的に減少した(図 2.3.3-10)。抗酸化剤である NAC の添加は PAI-1 分泌低下を回復した。線溶系促進酵素である uPA の分泌と tPA の産生はごくわずかで変化はなかった。凝固系を阻害する内皮細胞上の TM は DEP 抽出物、PM<sub>2.5</sub>抽出物及び CAPs 抽出物曝露によりほとんど変化がなく、抗酸化剤である

NAC の添加は細胞上の TM を減少させる結果となった。

### (3. 4) 考察

DEP 抽出物は PM<sub>2.5</sub> 抽出物に比べ内皮細胞に対する細胞障害性がやや高く、この細胞障害性は抗酸化剤である NAC により著しく抑制された。また、HO-1 をはじめとする他の抗酸化系酵素や hsp70 の遺伝子発現量も NAC の添加により著しく低下することが明らかとなった。これらのことは、粒子状物質のジクロロメタン抽出物には酸化作用を示すものが多く存在し、これらの物質が細胞に影響を与えていることを示唆している。一方、*in vivo* において、DEP 抽出物によるこれらの遺伝子発現が見られるのかどうか検討した。肺においては気管内噴霧そのものによる効果は見られたものの、DEP 抽出物の効果は見られなかった。しかしながら、心臓においては 6 時間後に対照群に比べて有意な HO-1 mRNA 量の上昇が認められた。肺に沈着した粒子状物質より様々な物質が溶出し、循環系の血管に直接あるいは間接的に酸化ストレスを与える可能性を示唆しているものと考えられる。

また、物質透過性亢進を含めた細胞結合の変化や細胞障害性が、ラット心臓微小血管内皮細胞で現れたことは、大気中微小粒子状物質曝露による酸化ストレスに対して心臓の循環系がより影響を受けやすい可能性があることを示唆する。一方、DEP 抽出物・PM<sub>2.5</sub> 抽出物による酸化ストレスは血管内皮細胞の抗血栓形成機能を制御する分子に影響を与えた。Plasmin を活性化する tPA や uPA の活性を抑える PAI-1 に減少が認められたことは、線溶系が活性化され血栓形成を阻害する可能性を示唆している。また、thrombin を結合させて、thrombin によるフィブリン形成能や血小板凝集能を消失させるとともに、protein C を活性化して凝固反応の律速因子である Va 因子と VIIIa 因子を失活させることにより凝固反応を阻害する TM が減少していることは、凝固反応が亢進して血栓形成が促進する可能性を示唆している。しかしながら、今回解析した血栓形成を制御すると考えられる分子はごく一部であり、炎症性サイトカインなどは内皮細胞の抗血栓性機能を低下させることが報告されていることもあり、実際には *in vivo* において血栓形成制御分子の変化を検出し、凝固・線溶系機能を測定することが必要であると思われる。

CAPs 抽出物と whole 抽出物の細胞毒性及び内皮細胞の抗血栓機能への影響の検討も行った。Whole 抽出物の方がジクロロメタンで抽出される有機成分が多く、酸化ストレス誘導能は CAPs 抽出物で若干高いことを計算に入れると、粒子の重量ベースでは whole 抽出物が CAPs 抽出物の 1.6 倍程度酸化ストレス誘導能が高いことが示された。この結果は、酸化ストレス誘導能で見ると、CAPs 抽出物だけが注目すべきフラクションではなく、ナノ粒子フラクションの酸化ストレス誘導能も無視できないことを示唆するものと考えられる。大気環境中微小粒子状物質の細胞毒性は、粒径以外にも捕集する場所や季節、交通量や風向などの気象条件などによっても大きく異なることが予測される。今後は様々な場所と条件下で捕集した粒子の化学分析を行うことがさらに重要であり、細胞または無細胞系で酸化ストレス誘導能を比較することでさらにデータを蓄積し、大気環境中微小粒子状物質の性状と組成と毒性の関連性を明らかにしていくことが望ましいと思われる。

今回の実験における粒子間の毒性の比較でも明らかのように、ラット心臓微小血管内皮細胞を用いた抗酸化ストレス酵素の HO-1 の誘導は粒子の毒性評価に有用な指標である。HO-1 を誘導することは酸化ストレスにさらされた生体にとって重要な防御反応である。粒子抽出物の細胞毒性の原因が酸化ストレスであることは、抗酸化剤の NAC の添加により毒性が緩和されるという今回の実験結果から明らかである。一方、DEP 抽出物や PM<sub>2.5</sub> 抽出物の場合と同様に、CAPs 抽出物による酸化ストレスは血管内皮細胞の抗血栓形成機能を制御する分子に影響を与えた。Plasmin を活性化する tPA や uPA の活性を抑える PAI-1 に減少が認められたことは、線溶系が活性化され血栓形成を阻害する可能性を示唆している。微弱な酸化ストレスそれ自身は生体防御反応を増強する方向に働くと考えることが妥当であろうと思われる。PM<sub>2.5</sub> 曝露により活性化されたマクロファージなどの炎症性細胞からのサイトカインの放出が血栓形成を促進させる PAI-1 分泌を亢進させることを示唆するデータもあることから、PM<sub>2.5</sub> 曝露で惹起された炎症反応が血栓形成を促進、さらには心疾患のリスクを増加させる可能性を示唆するものである。今後の PM<sub>2.5</sub> の内皮細胞の抗血栓性機能の検討は *in vivo* において血栓形成制御分子の変化を検出し、凝固・線溶系機能を測定するこ

とが必要になると考えられる。

### (3. 5) 結論

PM<sub>2.5</sub> 抽出物や DEP 抽出物は、ラット微小血管内皮細胞に酸化ストレスを与えることにより細胞障害を引き起こし、抗酸化系酵素の遺伝子発現量が増加させた。DEP 抽出物の方が PM<sub>2.5</sub> 抽出物よりラット心臓微小血管内皮細胞に対する細胞毒性はやや高い傾向を示した。また、PM<sub>2.5</sub> 抽出物は、ラット心臓微小血管内皮細胞の細胞間接着構造に障害を与え、物質透過性を亢進した。PM<sub>2.5</sub> 抽出物や DEP 抽出物による酸化ストレスで、ラット心臓微小血管内皮細胞とラット肺微小血管内皮細胞において抗血栓形成機能を制御する PAI-1 分泌量の減少と TM 産生量の減少が認められたが、PM<sub>2.5</sub> 抽出物や DEP 抽出物による抗血栓形成機能への影響評価にはさらに詳細な検討が必要であると考えられる。

#### 引用文献

- 1 Kitajima H, Hirano S, Suzuki KT. Upregulation of heme oxygenase gene expression in rat lung epithelial cells following exposure to cadmium. Arch Toxicol 1999;73(7):410-412.

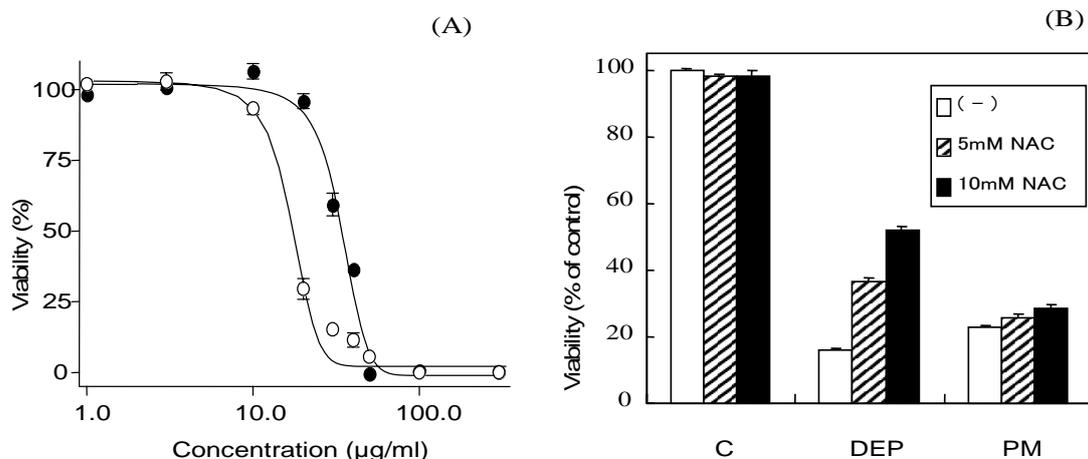


図 2.3.3-1 : DEP 抽出物 (白丸) と PM<sub>2.5</sub> 抽出物 (黒丸) のラット心臓微小血管内皮細胞に対する細胞毒性 (A) と 5mM と 10mM の N-acetyl-L-cysteine (NAC) 存在下あるいは非存在下で、DEP や PM<sub>2.5</sub> 抽出物を、それぞれ 25µg/ml あるいは 50µg/ml の濃度で 24 時間曝露した時の細胞毒性の変化 (B)。N=3

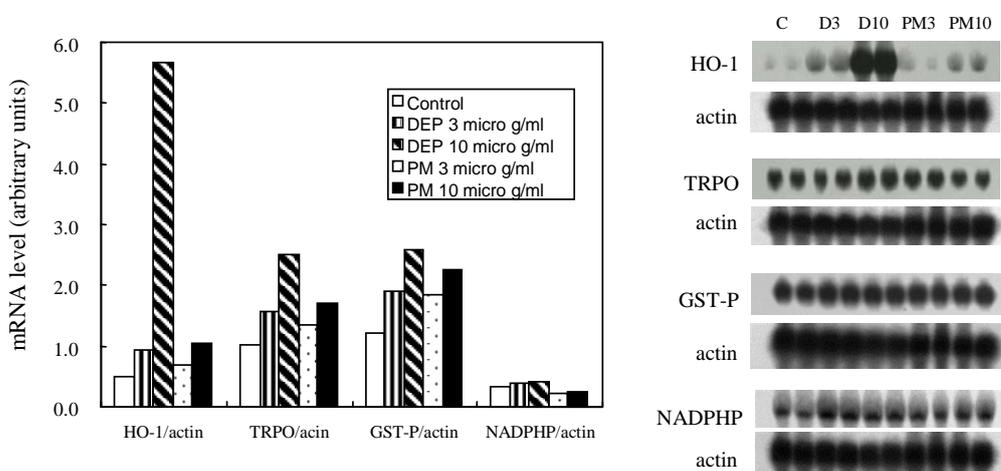


図 2.3.3-2 : DEP (D) または PM<sub>2.5</sub> 抽出物 (PM) を 3mg/mL 及び 10mg/mL の濃度で 6 時間曝露したラット心臓微小血管内皮細胞における heme oxygenase-1 (HO-1), thioredoxin peroxidase-2 (TRPO), NADPH dehydrogenase (NADPHD) と glutathione peroxidase unit P (GST-P) の mRNA レベルの変化。

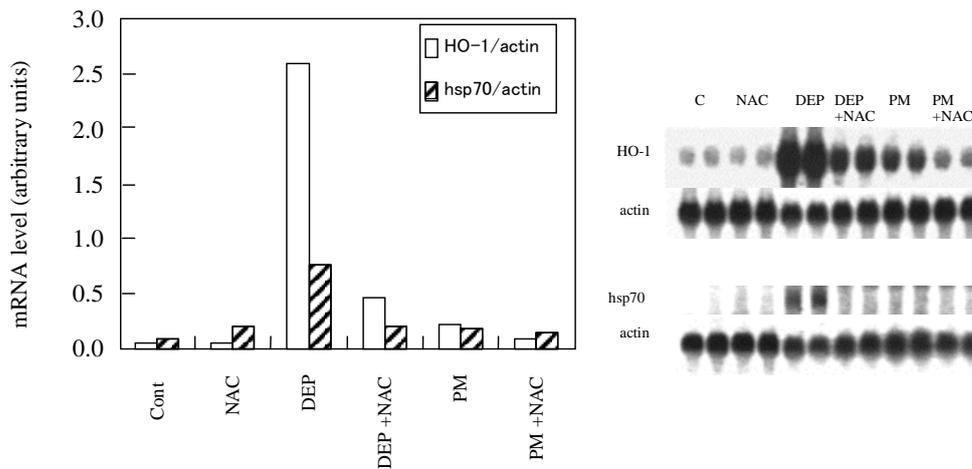


図 2.3.3-3 : DEP または PM<sub>2.5</sub> 抽出物を曝露したラット心臓微小血管内皮細胞における heme oxygenase-1 (HO-1) と hsp70 の mRNA レベルの変化。10mM の NAC 存在下、あるいは非存在下に、細胞を DEP 抽出物 (10 $\mu$ gDEP/mL) あるいは PM<sub>2.5</sub> 抽出物 (20 $\mu$ g/mL) に 6 時間曝露した。

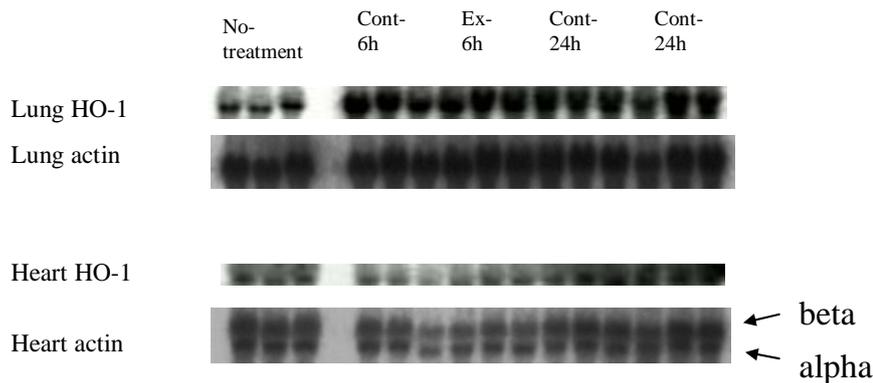


図 2.3.3-4 : DEP 抽出物を気管内噴霧したラットにおける、肺と心臓の heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA レベルの変化 (N=3)。

	Lung wet weight (g)		Lung HO-1/actin mRNA ratio		Heart HO-1/actin mRNA ratio	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
No-treatment	1.09	0.032	0.339	0.020	0.820	0.072
Cont-6h	1.17	0.114	0.866#	0.245	0.734	0.050
Ex-6h	1.11	0.023	0.545	0.044	1.082*	0.038
Cont-24h	1.19	0.05	0.396	0.033	0.973	0.057
Ex-24h	1.18	0.006	0.486	0.055	0.983	0.149

表 2.3.3-1 : DEP 抽出物を気管内噴霧したラットにおける、肺湿重量、ならびに肺と心臓の heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA レベルの変化。#, No-treatment, Cont-24h に比べ有意に上昇 (ANOVA) ; \*, Cont-6h に比べ有意に上昇 (t-test)

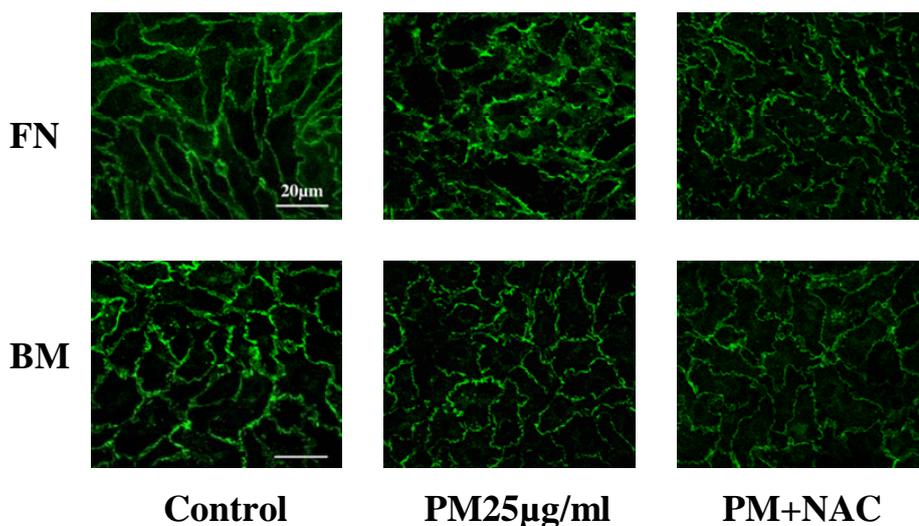


図 2.3.3-5:  $\beta$ -catenin (adherence junction 構成分子) の局在

フィブロネクチン (FN) あるいは基底膜 (BM) 上で培養したラット心臓微小血管内皮細胞に 10mM の N-acetyl-L-cysteine (NAC) 存在下または非存在下で、25 $\mu$ g/ml の PM<sub>2.5</sub> 抽出物を 3 時間曝露後、細胞間接着構造に局在する  $\beta$ -catenin に対する抗体で染色した組織を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

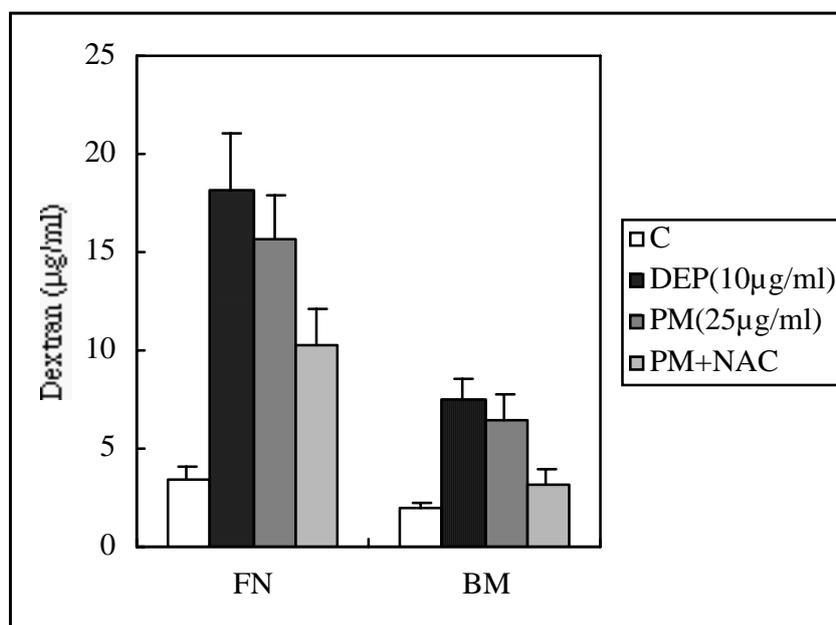


図 2.3.3-6: 物質透過性 (Dextran, MW3000) 亢進。フィブロネクチン (FN) あるいは基底膜 (BM) 上で培養したラット心臓微小血管内皮細胞に DMSO (C)、10 $\mu$ g/ml の DEP 抽出物 (DEP)、25 $\mu$ g/ml の PM<sub>2.5</sub> 抽出物 (PM)、10mM の N-acetyl-L-cysteine 存在下で 25 $\mu$ g/ml の PM<sub>2.5</sub> 抽出物 (PM+NAC) を 3 時間曝露し、分子量 3000 の FITC 標識 Dextran の透過性を測定した。N=4

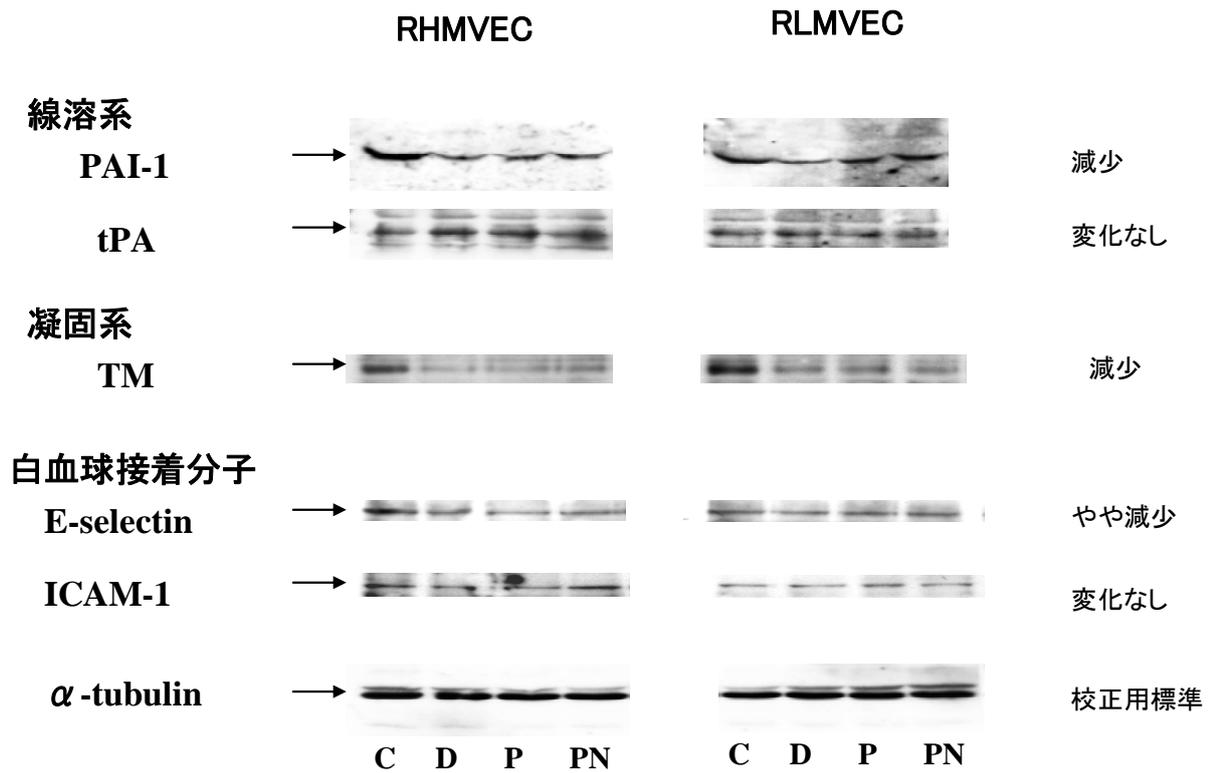


図 2.3.3-7 : DEP・PM<sub>2.5</sub>抽出物が内皮細胞の抗血栓形成機能に及ぼす影響  
 フィブロネクチン上で培養したラット心臓微小血管内皮細胞 (RHMVEC) 及びにラット肺微小血管内皮細胞 (RLMVEC) に 10 $\mu$ g/ml DEP 抽出物 (D)、25 $\mu$ g/ml の PM2.5 抽出物 (P)、25 $\mu$ g/ml の PM2.5 抽出物と 10mM の N-acetyl-L-cysteine (PN) を 24 時間曝露し、抗血栓形成機能に関与する分子をウエスタンブロットにより検出した。

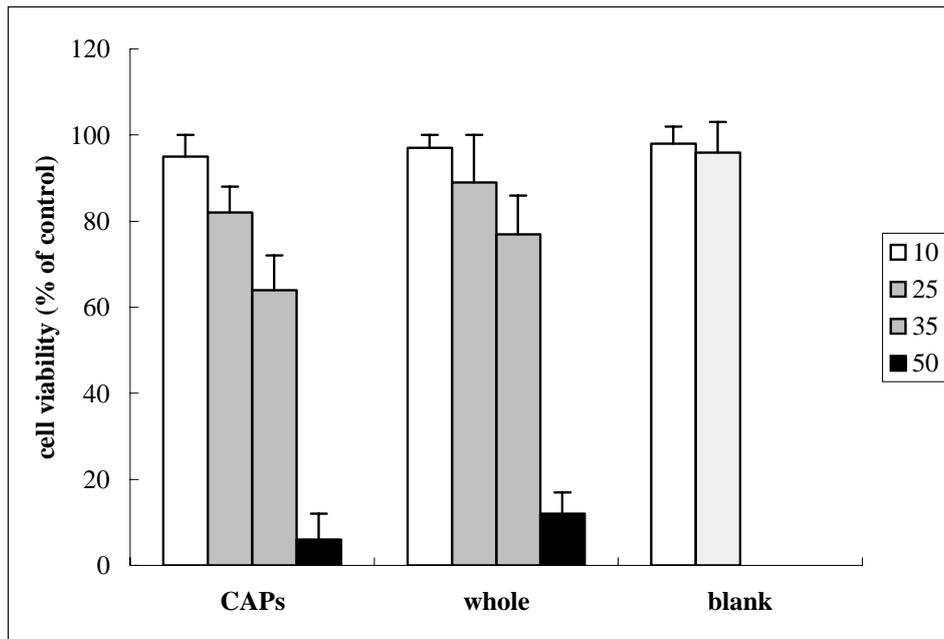


図 2.3.3-8 : CAPs 及び全粒子状物質抽出物の細胞傷害性

フィブロネクチン上で培養したラット心臓微小血管内皮細胞 (RHMVEC) に 10, 25, 35, 50µg/ml の CAPs と全粒子状物質 (whole) 抽出物、及びフィルタ抽出物 (blank) を 12 時間曝露し、細胞生存率を DMSO コントロールと比較した。N=4

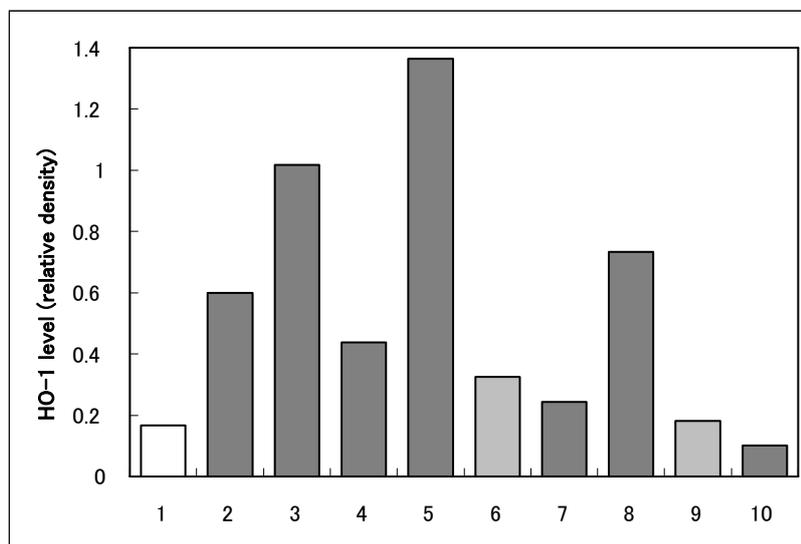
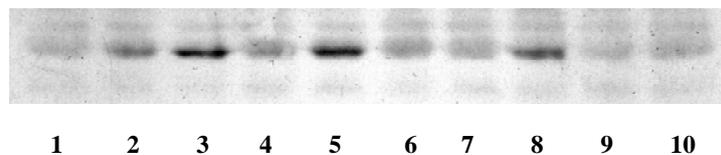


図 2.3.3-9 : Heme oxygenase-1 (HO-1) 誘導

フィブロネクチン上で培養したラット心臓微小血管内皮細胞 (RHMVEC) に 1. DMSO, 2. DEP 抽出物 10µg/ml, 3. PM<sub>2.5</sub> No.2 抽出物 10µg/ml, 4. CAPs 抽出物 10µg/ml, 5. CAPs 抽出物 25µg/ml, 6. CAPs 抽出物 25µg/ml と 20mM N-acetyl-L-cysteine, 7. whole 抽出物 10µg/ml, 8. whole 抽出物 25µg/ml, 9. whole 抽出物 25µg/ml と 20mM N-acetyl-L-cysteine, 10. blank 25µg/ml を 12 時間曝露した。細胞はウエスタンブロットにより HO-1 を検出し、Quantity One® (pdi, Inc.) で半定量化した。



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

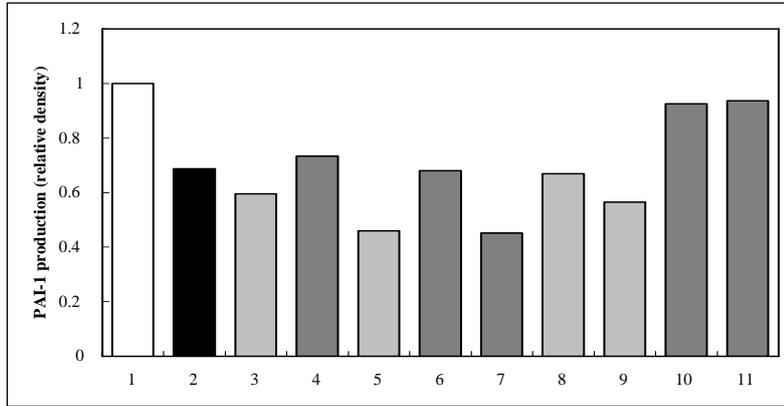


図 2.3.3-10 : DEP・PM<sub>2.5</sub>・CAPs 抽出物が内皮細胞の PAI-1 産生に及ぼす影響

フィブロネクチン上で培養したラット心臓微小血管内皮細胞 (RHMVEC) に 1. DMSO, 2. DEP 抽出物 10 $\mu$ g/ml, 3. PM<sub>2.5</sub> No. 1 抽出物 25 $\mu$ g/ml, 4. PM<sub>2.5</sub> No. 2 抽出物 10 $\mu$ g/ml, 5. PM<sub>2.5</sub> No. 2 抽出物 20 $\mu$ g/ml, 6. CAPs 抽出物 10 $\mu$ g/ml, 7. CAPs 抽出物 25 $\mu$ g/ml, 8. whole 抽出物 10 $\mu$ g/ml, 9. whole 抽出物 25 $\mu$ g/ml, 10. blank 10 $\mu$ g/ml, 11. blank 25 $\mu$ g/ml を 12 時間曝露した。培養液を回収して、ウエスタンブロットにより PAI-1 を検出した。