

氏 名	何 翠 穎
<p>論文題目(欧文の場合、和訳を付すこと)</p> <p>Lipopolysaccharide levels adherent to PM2.5 play an important role in particulate matter induced-immunosuppressive effects in mouse splenocytes</p> <p>(PM2.5 に付着している LPS レベルは、粒子状物質が脾臓細胞で引き起こす免疫抑制作用において重要な役割を果たす)</p> <p>論文要旨</p> <p>[目 的]</p> <p>微小粒子状物質 (PM2.5) が健康被害と関連することが疫学研究により報告されている。粒子状汚染物質の一つである PM2.5 の曝露は、呼吸器・循環器系疾患、糖尿病などに影響し、これらに起因する死亡率にも影響する。我々は、PM2.5 の肺への曝露により、免疫細胞の集積とサイトカイン産生を増加させることを報告してきた。しかしながら、末梢リンパ器官、特に炎症部位から細胞が集積し、二次応答が生じる脾臓への影響は解明されていない。加えて PM2.5 の免疫担当細胞に対する影響及びその詳細なメカニズムも未だ不明である。本研究課題では、PM2.5 の生体影響について、特に免疫担当細胞に対する影響を解明することを目的としている。</p> <p>[方 法]</p> <p>PM2.5 は中国の瀋陽、北京と日本の北九州市で採取したものをを用いた。実験動物には雄性 BALB/c マウス (7~8 週齢) を用い、採集時期・場所の異なる 6 種類の PM2.5 及び PM2.5 を加熱して付着物質を除去した H-PM2.5 (100 μg) を 2 週間間隔で 4 回気管内投与し、曝露マウスを作成した。対照群には生理食塩水を投与した。また酸化ストレスの関与を明らかにするため、ROS スカベンジャーである N-アセチルシステイン (NAC) の腹腔内同時投与を行った。最終投与から 24 時間後に麻酔下にてマウスを屠殺し、脾臓細胞を調製した。マイトジェンである LPS、ConA 刺激に対する脾臓細胞の増殖反応は Cell viability assay system を用いて評価し、サイトカイン (IL-2、IL-6、TNF-α) 産生能は ELISA 法により評価した。PM2.5 の標的細胞を調べるために、脾臓細胞から B220、CD4、CD8 及び CD11b 陽性細胞をマグネットビーズ法により分離し、酸化ストレスに関与する分子である HO-1、Nrf2、Keap1 の量的変化または活性化能をウエスタンブロット法、ゲルシフトアッセイ法により評価した。</p> <p>[結 果]</p> <p>PM2.5 に付着した LPS のレベルと PM2.5 による脾臓細胞活性化能への影響との間には強い相関があり、LPS をほとんど含まない PM2.5 (PM2.5LL) は、脾臓細胞の活性化能を抑制した。PM2.5LL は対照群と比較してマイトジェンに対する脾臓細胞の増殖反応及びサイトカイン産生を抑制した。一方、PM2.5LL の場合とは異なり H-PM2.5LL の投与は ConA 応答を抑制しなかったのに対し、LPS 刺激による増殖反応及びサイトカイン (IL-6、TNF-α) 産生は抑制されたままであった。抗酸化剤 NAC を同時投与した場合、ConA 刺激による増殖反応及び IL-2 産生に対する抑制効果は回復したが、LPS 刺激による増殖反応及びサイトカイン (IL-6、TNF-α) 産生は回復しなかった。PM2.5LL を投与したマウスの脾臓細胞、特に CD11b 陽性細胞では HO-1 の発現上昇が認められ、更にこの脾臓細胞では、HO-1 の発現調節を行う転写因子 Nrf2 が Keap1 から解離し、Nrf2 の標的配列を持つ DNA に対する結合能を有していた。</p> <p>[考 察]</p> <p>我々は LPS を多く含む都市由来 PM10 による免疫反応の抑制機構について報告している。PM10 とは対照的に、本研究では付着した LPS のレベルにより粒子に対する脾臓細胞の応答が異なり、LPS をほとんど含まない PM2.5 が脾臓細胞の活性化を抑制することを見出した。これらの結果から粒子に付着した LPS が、免疫反応の修飾において重要な役割を果たしていることがわかった。粒子の食食及びそれらにより誘導される酸化ストレスは、脾臓細胞における PM2.5 の免疫抑制効果に必須の役割を果たすことが考えられ、特に PM2.5 の食食は、主に CD11b 陽性細胞におけるサイトカイン産生に影響することが示唆された。更に、PM2.5 に付着している成分は酸化ストレスを惹起し、それは主に脾臓の T 細胞応答に影響を与えることが示唆された。この現象のメカニズムには、Nrf2 と NF-κB との相互作用に関連している可能性があるのではないか、と考えている。</p> <p>[結 論]</p> <p>PM2.5 に付着した LPS のレベルは、粒子に対する脾臓細胞の免疫応答を調節する。LPS をほとんど含まない PM2.5 は脾臓細胞の免疫応答を抑制し、特定の細胞種 (CD11b 陽性細胞) では酸化ストレスが誘導され、その結果、免疫修飾が起こることが示唆された。</p>	

学位論文審査結果要旨

氏 名	何 翠 穎
論文審査委員	主査 所属 産業衛生学（環境・産業生態系） 川本 俊弘
	副査 所属 労働衛生工学（環境・産業生態系） 明星 敏彦
	皮膚科学（障害機構系） 中村 元信

論 文 題 目

Lipopolysaccharide levels adherent to PM2.5 play an important role in particulate matter induced-immunosuppressive effects in mouse splenocytes

(PM2.5 に付着している LPS レベルは、粒子状物質が脾臓細胞で引き起こす免疫抑制作用において重要な役割を果たす)

学位論文審査結果要旨

本研究は、大気中微小粒子状物質（PM2.5）の免疫系への影響について、微小粒子状物質（PM2.5）の粒子表面の Lipopolysaccharide (LPS) 付着レベルと脾臓の免疫応答細胞への影響およびそのメカニズムを、粒子表面の LPS 付着レベルが異なる種々の PM2.5 をマウスへの気管内投与により解明することを目的とした。

PM2.5 は中国の瀋陽で 2014 年 9 月に採取したもの（PM2.5LL）、および北京や北九州市で採取されたもの、瀋陽において採取時期の異なるものの 6 種類を用いた。さらには PM2.5LL を加熱して付着物質を除去した H-PM2.5LL も用いた。

雄性 BALB/c マウス（7-8 週齢）に PM2.5 を 2 週間間隔で 4 回気管内投与し、最終投与から 24 時間後に麻酔下にてマウスを屠殺し、脾臓細胞を調製した。対照群には生理食塩水を投与した。LPS、ConA 刺激に対する脾臓細胞の増殖反応、サイトカイン（IL-2、IL-6、TNF- α ）産生能を Cell viability assay system（Promega）および ELISA 法により測定した。さらに、マグネットビーズ法により脾臓細胞から B220、CD4、CD8 及び CD11b 陽性細胞を分離し、HO-1、Nrf2、Keap1 の量的変化または活性化能をウエスタンブロット法、ゲルシフトアッセイ法により評価した。

結果として、PM2.5LL は表面に LPS をほとんど付着しておらず、対照群（生理食塩水のみ気管内投与）と比較して ConA および LPS に対する脾臓細胞の増殖反応およびサイトカイン産生を抑制した。他の PM2.5 についても表面に付着している LPS のレベルと脾臓細胞活性化能を比較すると、両者には強い正の相関があった。一方、PM2.5LL を加熱して付着物質を除去した H-PM2.5LL の投与では ConA 刺激に対する脾臓細胞の増殖反応および IL-2 産生は回復傾向を示した。また、PM2.5LL に抗酸化剤 NAC を同時投与した場合も脾臓細胞の増殖反応および IL-2 産生はともに回復傾向を示した。しかし、LPS 刺激による増殖反応及びサイトカイン（IL-6、TNF- α ）産生は H-PM2.5LL および NAC 同時投与により回復しなかった。PM2.5LL を投与したマウスの脾臓細胞の CD11b 陽性細胞では HO-1 の発現上昇が認められ、転写因子 Nrf2 が Keap1 から解離し、Nrf2 の標的配列を持つ DNA に対する結合能を有していた。

本研究における LPS をほとんど含まない PM2.5 が脾臓細胞の活性化を抑制するという結果は、既報で見られた LPS を多く含む都市由来 PM10 による免疫反応の抑制とは異なるものであるが、PM2.5、PM10 ともに粒子に付着した LPS が免疫反応を修飾するという点では一致しており、付着 LPS の免疫反応における重要性が再認識された。PM2.5 の食食は主に CD11b 陽性細胞におけるサイトカイン産生に影響し、脾臓細胞における PM2.5 の免疫抑制効果に必須の役割を果たすと考えられた。更に、PM2.5 に付着している LPS 以外の成分（例えば多環芳香族炭化水素）も酸化ストレスを惹起し、それが脾臓の T 細胞応答を抑制することが示唆された。

本研究は LPS をほとんど含まない PM2.5 が脾臓細胞の免疫応答を抑制し、特定の細胞種（CD11b 陽性細胞）においては酸化ストレスが誘導され、その結果、免疫修飾が起こることを示したものであり、大気汚染の健康影響を解明する上で高い意義があり、本学学位論文として適格であると判断した。

平成 30 年 3 月 6 日