

大槻 剛巳, 西村 泰光, 武井 直子, 松崎 秀紀, 李 順姫

木炭塗料とともに壁面と天井面に電圧を負荷することにより室内環境中のプラス帯電粒子を負荷面に吸着することによりマイナス帯電粒子を継続的に優位にする室内環境について、その生体影響を検討している。これまで2.5時間滞在、2週間夜間滞在試験を行い、短期のIL-2の上昇に加えて、中期ではNK細胞活性の亢進が観察され、現在、3ヶ月の居住による変化を長期モニター被験者で検討中である。被験者は、現在8名。予定では2年間にわたって、本仕様を管理箱によりON/OFFに変更可能であるので、3ヶ月周期でのON/OFFの繰り返しをお願いし、変更直前の3ヶ月ごとの採血をお願いしている。NK活性については、計8名で開始からONの3ヶ月あるいはOFF3ヶ月の後のON3ヶ月という本仕様を使用した測定が、ONからOFFが15回、OFFからONが12回実施された。実測NK活性は個人で異なるので、前の値を1.0とした相対的NK活性変化で検討すると、NK細胞対標的細胞比を10:1と20:1の両方で検討した結果、OFFからONでは、10:1の場合に平均2.01 ( $\pm 1.30$ ) 倍 (有意差  $p=0.002$ )、20:1で平均1.90 ( $\pm 1.23$ ) 倍 ( $p=0.006$ ) と、いずれも有意にNK活性が亢進した。またONからOFFでは10:1の場合に平均0.85 ( $\pm 0.53$ ) 倍 ( $p=0.159$ )、20:1の場合で平均0.77 ( $\pm 0.53$ ) 倍 ( $p=0.002$ ) と、20:1の場合で有意に低下した。これらの結果は、本仕様中での長期滞在によって、NK活性を高まる可能性があることを示唆し、継続して長期モニターの結果を検討したいと考えている。

#### 【学会発表】

1. 大槻剛巳, 李 順姫, 松崎秀紀, 武井直子, 西村泰光: マイナス荷電粒子優位室内環境の生体影響: 二週間夜間滞在型試験. 第87回日本産業衛生学会, 平成26年5月22日, 岡山
2. Otsuki T, Lee S, Matsuzaki H, Yoshitome K, Kumagai-Takei N, Nishimura Y: Increased NK activity by negatively-charged particles dominant indoor air condition. The 21st The Asian Association for Occupational Health, 平成26年9月2日, 博多

西村 泰光, 大槻 剛巳, 武井 直子, 松崎 秀紀, 李 順姫, 吉岡 大輔

近年, ナノスケール新素材の利用が高まりつつあるが, 一方でその毒性が指摘されている。本研究では, 末梢血単核球 (PBMC) を用いてチタン酸ナノシート (TNS) の毒性影響を調べた。PBMC または分取した  $CD14^+$  単球または  $CD4^+$  Th 細胞を TNS または石綿クリソタイル B (CB) 曝露下で培養した。PBMC 培養 2 日後には, CB 曝露濃度依存的に annexin V 陽性, propidium iodide 陰性 ( $Anx^+PI^-$ ) のアポトーシス細胞が増加したが, TNS 曝露時には見られなかった。7 日後には TNS 曝露時にも  $Anx^+PI^-$  細胞の増加が見られ, 濃度依存性は CB と同程度であった。単球の培養時にも, CB 曝露下では 2 日後に  $Anx^+PI^-$  細胞および  $Anx^+PI^+$  細胞が増加し, TNS 曝露下では 7 日後に両アポトーシス細胞の増加が見られた。また, TNS 曝露下では空胞を持つ細胞が培養 1 日後から現れ始め, 時間経過と共に空胞は巨大化した。Th 細胞培養時には, CB, TNS 曝露下共に 7 日後に  $Anx^+PI^+$  細胞が増加した。PI 染色により空胞様構造は核由来構造物ではないことが確認された。TNS 曝露によるアポトーシスは汎カスパーゼ阻害剤添加で抑制された。以上の結果から, TNS は石綿と同程度の用量反応性でカスパーゼ依存性のアポトーシスを引き起こすが, 時間依存性が異なり, 特徴的な細胞形態の変化を示すことが分かった。

#### 【学会発表】

1. 西村泰光, 吉岡大輔, 李 順姫, 武井直子, 松崎秀紀, 大槻剛巳: チタン酸ナノシートの末梢血単核球に対する毒性影響. 日本免疫毒性学会, 平成 25 年 9 月 13 日, 東京
2. 西村泰光, 吉岡大輔, 李 順姫, 武井直子, 松崎秀紀, 大槻剛巳: 酸化チタンナノシート曝露による末梢血単核球のアポトーシスと形態変化. 日本衛生学会, 平成 26 年 5 月 27 日, 岡山

## CXCR3 及び CCR7 に注目したエフェクター/メモリー CTL 機能に関する石綿曝露影響の解析

武井 直子, 大槻 剛巳, 西村 泰光, 松崎 秀紀, 李 順姫

石綿の発癌作用はよく知られているが、癌疾患の抑制に働く抗腫瘍免疫への石綿曝露影響は不明な部分が多い。腫瘍細胞が効果的に排除されるためには、CTLの分化だけでなく、分化後のエフェクター/メモリー CTL 亜集団の機能持続と遊走が適切であることが重要である。申請者はこれまでに石綿曝露によるヒトCTL分化抑制を見出した (Am J Respir Cell Mol Biol, vol 49 (1), p28-36, 2013)。本研究では、CTLの機能維持や遊走活性への石綿曝露影響を調べることに先立ち、ヒトのCD8陽性T細胞株であるEBT-8細胞を用い、ケモカイン受容体CXCR3やCCR7の発現の有無を調べるとともに、EBT-8の細胞増殖に影響を与えない石綿曝露濃度を検討した。フローサイトメトリー解析によって、EBT-8細胞がCXCR3とCCR7を発現することがわかった。終濃度0, 1, 5, 10, 20, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ になるように白石綿 (chrysotile B) 添加培地を加え、2日間培養した後、WST-1を添加し、4時間後に多機能マイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。石綿の濃度が50  $\mu\text{g/ml}$ を超えると吸光度の減少が顕著であった。現在EBT-8細胞の増殖に影響を与えない5  $\mu\text{g/ml}$ の石綿曝露濃度を用いて石綿曝露株を作成し、CTLの機能に関する石綿曝露影響について調べることに引き続き取り組んでいる。

### 【論文】

Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Maeda M, Hayashi H, Matsuzaki H, Lee S, Kishimoto T, Fukuoka K, Nakano T, Otsuki T: Functional properties of CD8<sup>+</sup> lymphocytes in patients with pleural plaque and malignant mesothelioma. J Immunol Res 2014: Article ID 670140, 2014

## 珪酸曝露されたマクロファージおよび樹上細胞が免疫恒常性、特にT細胞の極性化に及ぼす影響の解析

李 順姫, 大槻 剛巳, 西村 泰光, 武井 直子, 松崎 秀紀

珪肺症患者では慢性の呼吸不全のみならず、多発性硬化症、リウマチ、強皮症などの自己免疫疾患を高頻度で合併する。珪酸はアジュバント効果が高いことで知られており、従来、珪肺症患者における自己免疫疾患の併発もこのアジュバント効果によるものであると考えられてきた。しかし、我々は取り込まれた珪酸は長期にわたり体内に貯留し、この貯留珪酸が免疫細胞の極性化 (polarization) に影響を与えることで、T細胞の制動システムを狂わし自己免疫の暴走を引き起こす一因になると考えている。このシステムの中で、異物認識の最前線にいるのがマクロファージ、樹状細胞であり、これらの細胞がT細胞サブセットへの極性化を規定している。このような背景から本研究では、長期珪酸曝露ヒト単球由来 THP-1 細胞をPMAで分化させ、TLR4 のリガンドであるLPSで刺激することにより誘導される遺伝子発現を珪酸曝露細胞と非曝露細胞で比較検討した。その結果、活性化の指標となるHLA-DRの遺伝子発現亢進が見られた。これは、Th細胞の活性化に珪酸曝露が確かに傾向させることを示唆しているものと考えられるが、その他の主な活性化マーカーや、サイトカイン、ケモカイン等の発現には著しい差は見られなかった。今後、この長期曝露株を用いて、様々なTLRリガンド刺激による変化を解析することで、珪酸曝露された単球の自己免疫疾患発症への関与を明らかにする。

### 【論文】

Lee S, 他11名: Silica exposure and altered regulation of autoimmunity. Environ Health Prev Med (in press)  
(Review)

松崎 秀紀, 李 順姫, 武井 直子, 西村 泰光, 大槻 剛巳

アスベストは肺がんや悪性中皮腫を誘導することが知られている。衛生学教室ではこれに加えてアスベスト曝露が腫瘍免疫を減弱し、がんの発生を促進することを提唱しており、これまでに制御性T細胞のモデル細胞株MT-2を用いて低濃度のアスベストの継続曝露がIL-10やTGF $\beta$ などの抑制性サイトカインの産生量を増加させる一方、制御性T細胞の分化に重要な転写因子FoxP3の発現が低下させることを見いだしている。本研究では制御性T細胞の機能分化の調節因子群の発現を定量RT-PCR法により検討し、アスベスト長期曝露細胞が転写因子GATA1の発現を誘導することを見いだした。GATA1はFoxP3と協調して制御性T細胞分化を誘導すると考えられており、FoxP3とGATA1の発現の変化が上記のサイトカイン産生を亢進に関与する可能性が示された。

#### 【論文】

Matsuzaki H, 他11名: Exploration of biomarkers for asbestos exposure and occurrence of malignant mesothelioma based on the immunological effects of asbestos. *Journal of Data Mining Genomics Proteomics*. S2:001, 2013

#### 【学会発表】

Matsuzaki H, 他6名: FoxO1 Regulates Apoptosis Induced by Asbestos in the Human T Cell Line MT-2. 53rd Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2014.3.24, Phoenix, USA