

氏 名

角 谷 力

論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと)

Analysis of pulmonary surfactant in rat lungs after inhalation of nanomaterials: Fullerenes, nickel oxide and multi-walled carbon nanotubes.

(ナノマテリアル：フラーレン、酸化ニッケルおよび多層カーボンナノチューブ、の吸入曝露後のラット肺のサーファクタント解析)

論文要旨

【目的】ナノマテリアルと呼ばれる  $0.1\mu\text{m}$  以下のサイズの物質が新しい産業を生み出すことを期待されている。しかしながら、これらが様々な用途で使用され、作業者に健康障害を引き起こすことも懸念されている。ナノマテリアルの微小粒子は経気道的に吸入され肺胞に沈着すると、表面を覆っている肺サーファクタントに最初に接する。肺サーファクタントは主に肺胞Ⅱ型上皮細胞で合成される脂質蛋白質複合体で、機能としては肺胞の表面張力制御作用や免疫補助機能があるとされており、様々の肺障害において、その構成成分の濃度に変化が生じることが知られている。我々は、フラーレン (C60)、酸化ニッケル (NiO)、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) のナノ粒子の吸入曝露試験によって得られた気管支肺胞洗浄液 (BALF) のリン脂質濃度、蛋白質濃度、サーファクタント蛋白質 (SP-D) 濃度、表面張力を測定し、病理所見や既報の BALF 好中球数の結果と比較し、炎症反応の程度と関連するかを検討した。また、BALF の表面張力の変化の意味を知るためにリン脂質、SP-D、SP-B の濃度を調整した試料の表面張力を測定する *in vitro* 試験を行った。

【方法】実験動物は Wistar 系雄性ラットを用い、1 日 6 時間、4 週間の吸入曝露を行った。曝露物質は C60 (平均粒径 33nm、平均質量濃度  $0.13\text{mg}/\text{m}^3$ )、NiO (平均粒径 26nm、平均質量濃度  $0.20\text{mg}/\text{m}^3$ )、MWCNT (平均質量濃度  $0.37\text{mg}/\text{m}^3$ ) で、コントロールとして清浄空気のみを吸入させた。曝露終了後、3 日、1 ヶ月、3 ヶ月後に各群 5 匹ずつを解剖し、右肺より BALF (15ml) を採取した。回収した BALF を遠心分離後、上清を採取し、リン脂質濃度は酵素法、蛋白質濃度は Bradford 法、SP-D 濃度は ELISA 法、表面張力はデュヌーイ表面張力計を用いて測定した。また、*in vitro* 試験ではリン脂質としてフォスファチジルコリン (DPPC) を 0 から  $300\text{mg}/\text{ml}$  の濃度範囲を設定し、SP-D と SP-B は、それぞれ 1 から  $10\text{ng}/\text{ml}$  に設定して同様に表面張力を測定した。

【結果】C60 群は各マーカーとも、コントロール群と比較して有意な変化を認めなかった。NiO 群では各マーカーとも、3 日、1 ヶ月の期間を中心に大きく有意に変化した。また、MWCNT 群では NiO 群程大きくはないが、コントロール群や C60 群と比較して変化した。病理所見では C60 群は各期間を通して著変なかった。NiO 群は肺胞腔や間質に、マクロファージや炎症による細胞の浸潤を認めた。MWCNT 群では NiO 群程の炎症所見は認めなかったが、肺胞腔に MWCNT を貪食したと考えられる細胞を認めた。*in vitro* 試験において表面張力は、DPPC は濃度を変えてもほとんど変化せず、SP-D では濃度依存的に低下しなかった。DPPC を加えた SP-B 試料では 1 から  $10\text{ng}/\text{ml}$  の濃度で次第に表面張力が低下した。

【考察】好中球数とリン脂質濃度、蛋白質濃度、SP-D 濃度、表面張力の相関を Spearman の順位相関係数で求めたところ、各マーカーと好中球数はいずれも強い相関がみられた。各曝露物質の炎症反応の強さは清浄空気=C60<MWCNT<<NiO となり、病理所見もこの結果と同様の結果であることから、肺サーファクタントの解析は炎症評価の有効な指標であると考えられた。本研究の NiO 曝露濃度は現在の Ni の管理濃度や許容濃度 ( $0.1\text{mg}/\text{m}^3$ ) と同程度であり、ナノ粒子は炎症反応がより強く表れることを示している。またここで測定した SP-D は血清での測定も可能であることから、血清 SP-D 濃度測定が粉じん作業従事者のバイオロジカルモニタリング法となる可能性が示唆された。

【結論】ナノ粒子の吸入曝露試験において、肺サーファクタント (リン脂質濃度、蛋白質濃度、SP-D 濃度、表面張力) の解析から、これらの成分や表面張力は BALF 好中球数と同様に肺の炎症の程度を評価することが可能である。*in vitro* 試験から BALF 表面張力の変化は SP-B などの疎水性サーファクタント蛋白質の濃度の変化を間接的に示していると考えられる。

## 学位論文審査結果要旨

|        |       |          |          |       |
|--------|-------|----------|----------|-------|
| 氏 名    | 角 谷 力 |          |          |       |
| 論文審査委員 | 主査 所属 | 環境・産業生態系 | 保健・疫学 部門 | 堀江 正知 |
|        | 副査 所属 | 障害機構系    | 病態機構部門   | 久岡 正典 |
|        |       | 生体情報系    | 生殖生理情報部門 | 楠原 浩一 |
|        |       | 系        | 部門       |       |
|        |       | 系        | 部門       |       |

  

**論文題目**  
 Analysis of pulmonary surfactant in rat lungs after inhalation of nanomaterials: Fullerenes, nickel oxide and multi-walled carbon nanotubes  
 (ナノマテリアル：フラレン、酸化ニッケルおよび多層カーボンナノチューブの吸入曝露後のラット肺のサーファクタント解析)

**学位論文審査結果要旨**  
 近年、産業界で使用されるナノマテリアルの種類や使用量が急激に拡大している一方で、同じ重量でも表面積が増加する特性等から化学物質としての有害性が高まる可能性がある。動物実験でナノサイズ (100nm 未満) の二酸化チタンはサブミクロンサイズ(100nm~1µm)のものより肺組織で白血球や逸脱酵素 (ALP、LDH 等) の増加が顕著なことなどが報告されている。一方、一般粉塵では肺サーファクタントの性状が炎症や細胞障害のバイオマーカーとされる。そこで、申請者らはナノマテリアルでも同様の性質があるかどうかを明らかにするとともに、サーファクタントの主成分であるリン脂質や蛋白の濃度と表面張力との関係を明らかにすることを目的として本研究を実施した。

Wistar 系雄性ラット 9 週齢に、フラレン粒子 (C60、平均粒径 33nm)、酸化ニッケル粒子 (NiO、平均粒径 26nm)、多層カーボンナノチューブ (MWCNT、平均直径 63nm) 又は清浄空気のみを 1 日 6 時間、週 5 日で 4 週間にわたり吸入曝露した。曝露濃度は、C60 は 0.13mg/m<sup>3</sup>、NiO は 0.20mg/m<sup>3</sup>、MWCNT は 0.37mg/m<sup>3</sup> とした。曝露後、3 日、1 月、3 月後に各群 5 匹ずつを解剖し、病理所見を観察した。また、右肺から BALF (15ml) を採取し、その上清を遠心分離 (1500rpm×10 分間) して、リン脂質は酵素法で、蛋白は Bradford 法、SP-D は ELISA 法で濃度を測定し、表面張力はデュヌーイ表面張力計を用いて輪環法で測定した。また、in vitro で、リン脂質であるフォスファチジルコリン (DPPC) を 0~300mg/ml 混合した生理食塩水に、SP-D や SP-B を 1~10ng/ml に添加して BALF の表面張力を測定した。

その結果、病理組織は、C60 では変化を認めず、NiO では 3 日目と 1 カ月目で肺胞腔にマクロファージや炎症細胞の浸潤を認め、MWCNT では同時期に MWCNT を貪食したとみられるマクロファージを認めた。BALF 中の好中球は、C60 ではほとんど認められず、NiO では 3 日目から 1 カ月目にかけて著明に増加し、MWCNT では 3 日目のみわずかに認められた。リン脂質、蛋白、SP-D の濃度は、C60 では有意に変化しなかったが、NiO ではいずれも 3 日目と 1 カ月目で有意に上昇した。MWCNT ではリン脂質と蛋白が 3 日のみ有意に上昇した。表面張力は、C60 では有意に変化せず、NiO では 3 日目に最も低くなり 3 カ月目にかけて徐々に回復する傾向があり、MWCNT では 3 日目のみ有意に低下した。BALF 中の好中球数が増加すると、リン脂質濃度、蛋白質濃度、SP-D 濃度が有意に上昇し、表面張力が有意に低下する傾向を認めた。また、in vitro で、生理食塩水の表面張力はリン脂質濃度や SP-D 濃度を上昇させても表面張力は有意に変化しなかったが SP-B 濃度を上昇させると有意に低下した。

以上のことから、ナノマテリアルでも肺胞サーファクタントの性状が組織の炎症を評価する指標になること及びその表面張力が脂溶性のサーファクタントに依存することが示唆された。

本研究は、ナノマテリアルの吸入曝露により生じる肺の炎症とサーファクタントの性状変化について同時に評価した初めての報告であり、ナノマテリアルによる健康障害のバイオマーカーの開発に貴重な知見を提供するものである。よって本学の学位論文として適格であると判断した。

平成 28 年 2 月 26 日

|                      |  |
|----------------------|--|
| 氏名                   | 守田 祐作  |
| 論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと) | <p>Sense of coherence is significantly associated with both metabolic syndrome and lifestyle in Japanese computer software office workers<br/> (日本の IT 企業労働者において、首尾一貫感覚 (Sense of Coherence) はメタボリックシンドロームおよび生活習慣と関連する)</p>  |
| 論文要旨                 | <p><b>【背景】</b><br/> 首尾一貫感覚 (SOC) は、イスラエルの強制収容所から生還した者のうち心身の健康を保っていた人達<br/> の特性を抽出し作られたストレス対処力の尺度である。SOC が良好な人は、強いストレス下にあっても<br/> 対処資源を活用しうまく乗り越え、その経験すら成長の糧にできる。SOC は精神的健康のみならず、生<br/> 活習慣病や脳心血管疾患など身体的健康との関連も報告されてきている。</p> <p>脳心血管疾患につながるメタボリックシンドローム (MetS) 対策は、職域においても重要な課題で<br/> あり、特定保健指導などを通じた生活習慣の改善による MetS 低減の取り組みが推進されている。SOC<br/> が良好な者は健康的な生活習慣を持つことが報告されており、その結果、MetS に予防的に働くことが<br/> 想定される。しかし、SOC と MetS との関連を実証した研究はいまだない。そこで、日本の IT 企業労働<br/> 者を対象に SOC と MetS の関連について横断調査を行った。</p> <p><b>【方法】</b><br/> 20-64 歳の 167 名が調査に参加し、健康診断にて年齢、性別、BMI、腹囲、血圧、脂質、血糖値、HbA1c、<br/> 生活習慣に関する調査を行った。同時期に、SOC 調査票、職業性ストレス簡易調査票 (仕事のストレイ<br/> ン、職場の支援を調査) による調査を行った。また、人事情報より労働者の役職 (管理職、一般) の<br/> 情報を得た。SOC を合計スコアで 3 分位 (不良、中間、良好) に分け、年齢、性別、役職、仕事のスト<br/> レイン、および良好な生活習慣を持つ者の割合を比較した。MetS とその構成要因 (腹部肥満、血糖高<br/> 値、血圧高値、脂質異常)、過体重 (BMI<math>\geq</math>25) のそれぞれを従属変数とし、SOC 3 分位を独立変数、年<br/> 齢、性別、仕事のストレイン、職場の支援を調整因子としたロジスティック回帰分析を行った。</p> <p><b>【結果】</b><br/> SOC 良好群は、管理職の割合が高く、仕事のストレインが低く、職場の支援が高かった。SOC が良好<br/> なほど、歩行習慣があり、早食いせず、睡眠時間が十分であり、健康的な生活習慣を持っていた。年<br/> 齢、性別、仕事のストレイン、職場の支援を調整しても、SOC 良好群は SOC 不良群と比較して過体重 (BMI<br/> <math>\geq</math>25) が少なく (OR:0.31; 95%CI:0.11-0.81)、血糖高値が少なく (OR:0.11; 95%CI: 0.02-0.54)、脂<br/> 質異常が少なく (OR:0.29; 95%CI:0.09-0.84)、MetS が少なかった (OR:0.12; 95%CI: 0.02-0.63)。ま<br/> た、SOC 中間群でも SOC 不良群と比較し、過体重が少なく (OR:0.35; 95%CI:0.15-0.80)、腹部肥満が<br/> 少なかった (OR:0.31; 0.11-0.84)。</p> <p><b>【考察】</b><br/> 本研究では日本人労働者を対象に初めて SOC と MetS との関連を明らかにした。SOC が良好な者は、<br/> ストレス対処に成功しやすく (ストレス対処が困難な場合もネガティブ感情を持ちにくい)、体を動か<br/> すなど健康的なストレス対処行動を取り、結果として MetS のリスクの低減につながったものと考え<br/> る。本研究の限界として、横断調査のため因果関係については縦断調査による確認が必要である点、IT 企<br/> 業社員での調査のため肉体労働を行う職種への結果の一般化には注意を要する点があげられる。</p> <p><b>【結論】</b><br/> SOC が良好な者は健康的な生活習慣を持ち、MetS およびその構成要因を持つリスクが低いことが示<br/> 唆された。SOC が不良な者には手厚い保健指導や精神的な支援を、また、職場に対しては上司・同僚が<br/> 積極的に支援する雰囲気をつくるなど、個人だけでなく職場全体として SOC を高める健康施策が必要<br/> と考えられる。</p> |

## 学位論文審査結果要旨

|        |      |    |          |          |      |
|--------|------|----|----------|----------|------|
| 氏 名    | 守田祐作 |    |          |          |      |
| 論文審査委員 | 主査   | 所属 | 環境・産業生体系 | 環境適応医学部門 | 吉村玲児 |
|        | 副査   | 所属 | 環境・産業生体系 | 環境生態部門   | 川本俊弘 |
|        |      |    | 環境・産業生体系 | 保健疫学部門   | 堀江正知 |
|        |      |    |          | 系 部門     |      |
|        |      |    | 系 部門     |          |      |

**論文題目**

Sense of coherence is significantly associated with both metabolic syndrome and lifestyle in Japanese computer software office workers

(日本の IT 企業労働者において、首尾一貫感覚 (Sense of Coherence) はメタボリックシンドロームおよび生活習慣と関連する)

**学位論文審査結果要旨**

首尾一貫感覚(SOC)は、ホロコーストから生還した者のうち心身の健康を保っていた人達の特性を抽出し作られたストレス対処力の尺度である。SOC は、精神疾患発症のみならず、生活習慣病や脳心血管疾患など身体的健康との関連も報告されている。メタボリックシンドローム (MetS) 対策は、産業医学上、重要課題で特定保健指導などを通じた生活習慣の改善による MetS 低減の取り組みが推進されている。SOC が良好な者は健康的な生活習慣を持つことが報告されており、MetS に予防的に働くことが想定される。しかし、SOC と MetS との関連を実証した研究はない。日本の IT 企業労働者を対象に SOC と MetS の関連について横断調査を行った。20-64 歳の 167 名が調査に参加し、健康診断にて年齢、性別、BMI、腹囲、血圧、脂質、血糖値、HbA1c、生活習慣に関する調査を行った。同時期に、SOC 調査票、職業性ストレス簡易調査票による調査を行った。また、人事情報より労働者の役職 (管理職、一般) の情報を得た。SOC を合計スコアで 3 分位 (不良、中間、良好) に分け、年齢、性別、役職、仕事のストレイン、および良好な生活習慣を持つ者の割合を比較した。MetS とその構成要因 (腹部肥満、血糖高値、血圧高値、脂質異常)、過体重 (BMI $\geq$ 25) を従属変数とし、SOC 3 分位を独立変数、年齢、性別、仕事のストレイン、職場の支援を調整因子としたロジスティック回帰分析を行った。SOC 良好群は、管理職の割合が高く、仕事のストレインが低く、職場の支援が高かった。SOC が良好なほど、歩行習慣があり、早食いをしない、睡眠時間が十分であり、健康的な生活習慣を持っていた。年齢、性別、仕事のストレイン、職場の支援を調整しても、SOC 良好群は SOC 不良群と比較して過体重 (BMI $\geq$ 25) が少なく (OR:0.31; 95%CI:0.11-0.81)、血糖高値が少なく (OR:0.11; 95%CI: 0.02-0.54)、脂質異常が少なく (OR:0.29; 95%CI:0.09-0.84)、MetS が少なかった (OR:0.12; 95%CI: 0.02-0.63)。また、SOC 中間群でも SOC 不良群と比較し、過体重が少なく (OR:0.35; 95%CI:0.15-0.80)、腹部肥満が少なかった (OR:0.31; 0.11-0.84)。本研究では日本人労働者を対象に初めて SOC と MetS との関連を明らかにした。SOC が良好な者は、ストレスに対してネガティブ感情が少ない、身体を動かすなど健康的なストレス対処行動を取る。その結果 MetS のリスクの低減につながったものと考えられる。以上から SOC が良好な者は健康的な生活習慣を持ち、MetS およびその構成要因を持つリスクが低いことが示唆された。申請者らの研究結果をもとに今後 SOC が不良な者には手厚い保健指導や精神的な支援を行うこと、職場に対しては上司・同僚が積極的に支援する雰囲気をつくること、個人だけでなく職場全体として SOC を高める健康施策なされることが必要と考えられる。本研究は職域での MetS 対策を SOC の観点から検討しており新規性が高く、産業医学の一次予防分野に大いに役立つものであり、本学の学位論文として適格であると判断した。

平成 28 年 3 月 4 日