

京都大学	博士（工学）	氏名	赤路 佐希子
論文題目	顕微ラマン分光法を応用した環境中微粒子の局在と生体応答の同視野可視化手法の開発		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>本論文は、環境中微粒子の健康リスクと発現メカニズムを明らかにするため、その体内動態、生体内変化と細胞内外のイベントを可視的に解析する基盤技術として、ラマン分光-光学顕微鏡同視野観察手法を開発することを目的とし、それらの結果をまとめたものである。以下の7章からなる。</p> <p>第1章は、序章として環境中微粒子により惹起される呼吸器およびアレルギー疾患の発症や症状悪化に関する生体・免疫応答に関する概要に加え、生体応答および粒子局在の可視化に用いられる技術の概要を述べた。環境中微粒子が呼吸器およびアレルギー疾患を引き起こすメカニズムのうち、粒子状物質の物理的・化学的特性が特に影響するのは肺組織における酸化ストレスと炎症を介する経路であると考えられている。環境中微粒子に含まれる成分や粒子そのものによる刺激により、肺組織では抗原提示細胞上の表面マーカーや膜タンパク質、上皮細胞由来のサイトカイン、転写因子等に影響が及んだ結果、攪乱作用が引き起こされて健康被害が引き起こされていることが示されている。しかし、環境中微粒子が生体における免疫応答の源流において、どのような動態・変化を示し細胞内イベントと関わっているのかは未解明である。また組織観察上、何らかの粒子が細胞や炎症発症箇所近辺に見られた場合、同時に環境中微粒子であるという同定を行うことは困難であった。本論文において新規手法の開発に用いた顕微ラマン分光法は、ミクロンオーダーの空間分解能で物質を同定しつつ前処理不要で低侵襲に可視化できることから、近年生物・医学分野において用いられるようになってきた。ラマン分光法により環境中微粒子の局在箇所を可視化し、病理組織学的、免疫組織学および分子生物学的な知見と合わせ、粒子の局在と複合的に生体内変化と細胞内外イベントを可視化する技術の有用性は高いと考えられる。</p> <p>第2章では、健康リスクに関心が寄せられている環境中微粒子として、一般環境中の微小粒子状物質 (PM_{2.5})、ディーゼル排気微粒子 (DEP)、黄砂 (ASD) の各環境中微粒子を顕微ラマン分光法により計測した。DEPからは、炭素のグラファイト構造に由来するGバンドが 1600 cm⁻¹に、グラファイト構造の乱れに起因するDバンドが 1340 cm⁻¹に観測された。ASDからは様々なスペクトル形状を示す結果が得られ、各スペクトルからその多くに炭素、長石類といった鉱物由来の物質が含まれていることがデータベース照合より明らかとなった。この結果は、ASDに含まれるとされる石英、長石、ケイ酸塩鉱物等とも一致する。PM_{2.5}からは、核となる物質として炭素が共通して検出され、粒子の表面上にルチル型酸化チタンおよび炭酸カルシウムのほか、無機酸化物や水和物が局所的に含まれる可能性があることがわかった。さらに、粒子に付着し毒性を有す多環芳香族炭化水素 (PAH) 及びその代謝物の識別可否を検討し、生体に充分量存在している場合は各代謝物をラマンスペクトル上で識別可能であることも明らかにした。</p> <p>第3章では、ラマン計測において最も理想的である無染色の組織試料および培養細胞試料において、組織または細胞および曝露した環境中微粒子由来のラマンスペクトルを取得し、ラマンイメージングによる微粒子の同定および局在可視化が可能であることを確かめた。コラーゲンコートされたウェルチャンパープレート上で培養した細胞にTiO₂を曝露しラマン計測を実施したところ、細胞由来、コラーゲン由来およびTiO₂由来のラマンシグナルが検出され、およそ数μm径のTiO₂粒子が細胞上にまばらに分布している様子が可視化できた。また、TiO₂、DEP、ASD、PM_{2.5}が曝露されたマウス肺由来の組織切片に対してラマン計測を実施した結果、いずれも2章で得られた各粒子由来のラマンスペクトル同様のスペクトルが検出され、組織内における局在が可視化できた。</p> <p>第4章では、ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色下に観察される組織における炎症病態と、ラマンイメージングによる粒子の同定および局在箇所の可視化を同一組織切片において観察可能とする、染色脱色後にラマン計測を行う新手法を開発した。HE染色した組織切片と同一視野において環境中微粒子を同定し可視化できれば、非常に有用な知見を得ることができるが、染色したままの組</p>			

織標本は、色素由来の強い蛍光発光が微弱なラマン散乱光を覆い隠してしまうため、粒子由来のラマンシグナルを得ることができなかつた。そこで本章では、TiO₂を曝露した組織を用いて HE 染色後に脱色することにより、色素由来の蛍光発光を抑えつつラマン散乱光を取得する方法を新規に開発した。脱色後の組織切片に対してラマン計測を実施し組織形状を確認したところ、脱色操作による組織および粒子の変性は無かつたが、組織に微量に残存する色素由来の蛍光発光が確認された。残存する蛍光発光を抑えつつラマンスペクトルを取得する条件を検討した結果、細胞由来および TiO₂由来のラマンスペクトルを取得でき、曝露組織における TiO₂粒子局在箇所をラマンイメージングにより可視化することに成功した。

第 5 章では、第 4 章で開発した手法を免疫組織染色および蛍光免疫組織染色を施した組織切片へ応用し、ラマン計測による ASD および DEP, PM2.5 粒子の局在の可視化が可能かどうかを検討し、生体応答に係る分子・因子の発現箇所と各粒子の局在を明らかにできることを示した。液性因子 IL-6 は、単球やマクロファージ、内皮細胞から分泌され、免疫細胞の T 細胞を刺激し各種サイトカインの分泌を促すことにより肺組織損傷を促進していくと考えられている。ASD と PM2.5 を曝露したマウス肺の免疫組織染色を第 4 章の手法を用いて脱色したのちラマン計測に供したところ、免疫組織染色時の色素由来の蛍光の影響がみられたが、いずれも粒子および組織由来のラマンスペクトルを取得することができ、IL-6 の陽性反応と ASD および PM2.5 の局在を可視化し、比較検討を可能とした。また、酸化や各種サイトカイン等によって肺泡マクロファージが刺激されることによるニトロ化ストレスを示す指標であるニトロチロシン (NT) に関しても同様に、DEP および組織由来のラマンスペクトルを取得し、NT 陽性反応による生体反応と粒子の局在箇所を可視化し、比較検討することができることを確認した。さらに、細胞膜上に存在し、炎症の誘発、進行や治癒に至るすべての過程に関与が認められている ACE2 の発現について、蛍光免疫染色により可視化したのちラマン計測に供し、その位置的関係性を可視化した。蛍光免疫染色は、免疫染色よりも蛍光発光強度が強いことが予想されたが、蛍光褪色の性質を利用してラマンスペクトル取得を行ったところ、蛍光由来によるバックグラウンドの影響を低減することに成功した。その結果、TiO₂を曝露した肺組織における ACE2 の発現と TiO₂由来ラマンシグナルの局在箇所を可視化し、比較検討することができた。

第 6 章では、DEP を曝露したヒト肺泡基底上皮細胞に対して 3 次元ラマンイメージングを実施し、DEP が細胞内のどこに局在しているのか可視化した。その結果、細胞に隣接して局在する DEP の他、細胞内の核の縁辺部にも存在していることが明らかとなった。また、細胞における PAH およびその代謝物の分布をラマンイメージングによって可視化することが可能かどうかについて検討し、代謝物のひとつである 1-水酸化ピレン (OHPy) の可視化に成功した。

第 7 章では、第 6 章までの内容を述べた上で本論文の成果をまとめ、今後の課題と展開について記載した。

氏名	赤路 佐希子
----	--------

(論文審査の結果の要旨)

本論文では、環境中微粒子の体内動態、生体内変化と細胞内外のイベントを可視的に解析する基盤技術として、ラマン分光-光学顕微鏡同視野観察の手法を確立した。特に、HE染色のみならず免疫染色および蛍光免疫染色という複数の技術で可視化された生体応答と同一視野内の環境中微粒子を同定しその局在を可視化できる手法を開発したことは評価に値する。主な成果は以下の通りである。

1. 本論文では、DEP, PM2.5やASDといった様々な鉱物や化合物が混在している粒子について、生成過程や環境に起因すると考えられる特徴的な組成をラマンスペクトル上で確認できることを示した。本論文で得られた情報は、環境中微粒子の発生源や生成機構といった粒子発生時の状態を推察することに資すると期待される。
2. 環境中微粒子の同定を組織内で実施することは少ない。特に組織および細胞内における環境中微粒子の局在をミクロンオーダーで観察しながら同定し、かつ組織における炎症反応との位置関係を示した研究はこれまでない。本論文では、組織染色後の脱色により、同一視野における生体反応と環境中微粒子の局在の可視化が可能であることを示した。
3. 組織における生体・免疫応答において、曝露された環境中微粒子が直接的に関与している状態を示した例は少ない。項目2で開発した手法が免疫染色にも有効であることを示し、免疫応答時の生体応答と細胞内外における粒子の動態を視覚的に示した。
4. ラマン計測は蛍光発光による妨害を受けやすい。その上で、蛍光免疫染色を施した試料においてもラマンイメージ取得を可能とした手法は実用性も高く画期的である。

上記で説明された研究から構成される本論文は、これまで生物・医学分野において蓄積されてきた病理組織学的、免疫組織学および分子生物学的な知見と、ラマン分光法により得られる物理・化学的・分析的な知見とを融合させ、生体内および細胞内外における生体応答、環境中微粒子の同定および局在という複数の情報を同一視野において可視化することを可能とした。この手法は、環境中微粒子が呼吸器疾患を引き起こす生体・免疫応答の源流との細胞や組織における生体応答や疾患・病態悪化のメカニズム解明に資する位置的关系性を可視化することができる、極めて有意義な環境工学的手法である。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和5年1月17日、論文内容とそれに関連した事項について諮問をおこなって、申請者が博士課程後期過程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は京都大学学位規定第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。