

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 石川 晋吉

本論文は、Development of an *in vitro* human model for inhalation toxicology based on a whole cigarette smoke exposure system and a three-dimensional bronchial tissue culture（全たばこ煙曝露システムと三次元培養気管支組織を用いた *in vitro* ヒト吸入毒性評価モデルの開発）と題し、たばこ煙の毒性影響を *in vitro* で評価することを目的とした研究成果をまとめたものであり、全 7 章からなる。

第 1 章は緒論であり、たばこ煙の特性とその毒性評価に使用される試験法をまとめている。その中で、たばこ煙を含むエアロゾルの毒性評価では動物を用いた吸入毒性試験が標準とされるものの、種差の解消や動物愛護の観点からヒト細胞を用いた新たな *in vitro* 試験の開発が望まれていることを説明している。そのような背景のもと、たばこ関連疾患で観察される気管支組織での病態を *in vitro* で再現・評価できる可能性からヒト気管支三次元培養モデルが注目されるとともに、たばこ煙をエアロゾルのまま細胞に直接曝露する手法（全たばこ煙曝露）にも注目が集まっていることを述べている。しかしながら、たばこ煙が気管支組織の病態に与える影響を *in vitro* で再現・評価するためには、上皮細胞と線維芽細胞の共培養の実現といった培養モデルの高度化、生体での実曝露量や反復曝露による慢性毒性影響の再現が可能な曝露手法の確立が必要であることを指摘している。これらを踏まえ、ヒト吸入毒性評価モデルの開発を目指した本研究の目的とアプローチを提示している。

第 2 章では、全たばこ煙曝露技術の確立を目的とし、たばこ製品の評価において従来から活用されている *in vitro* 変異原性試験（Ames 試験）への全たばこ煙曝露の適用を試みている。複数製品のたばこ煙をサルモネラ菌株 TA98, TA100 に曝露し、復帰突然変異により生じるコロニー数と曝露された粒子成分量の関係を直線近似、その傾きを指標値として製品の変異原性を比較するという手法を提示している。動物試験と同様の変異原性ランキング結果が得られ、この曝露手法が有用であると結論している。

第 3 章では、Ames 試験などの従来法よりも高度な *in vitro* 試験での活用を目的として、ヒト気管支組織を再現した三次元培養モデルの開発に取り組んでいる。ヒト気管支組織の構成を再現するため、線維芽細胞を包埋したコラーゲン層に気管支上皮細胞を重層した共培養モデルを作成しており、免疫染色の結果から、線毛細胞・杯細胞・基底細胞からなる正常気管支組織が再現できたことを確認している。さらに、線維症の誘導因子 TGF- β (Transforming Growth Factor- β) でこのモデルを処理すると、上皮間葉転換、筋線維芽細胞の集積、細胞外マトリクスの沈着が生じることを、Vimentin, α -SMA (α -Smooth Muscle Actin), Tenascin-C の発現から確認している。これらの結果から、開発した三次元培養モデルは肺線維症患者の気管支組織における病態を再現でき、たばこ煙が気管支組織に与える毒性影響を評価する場合においてもこのモデルが有用であると結論している。

第 4 章では、全たばこ煙曝露システムにおいて実際の喫煙者での曝露量を再現できる曝露条件

を探索した結果を述べている。たばこ煙中の Solanesol, Acetaldehyde を粒子相成分, ガス・蒸気相成分の代表として選択し, 全たばこ煙曝露における希釈流量と培養面単位面積当たりへの両成分の沈着率の関係を *in vitro* dosimetry (*in vitro* 曝露量評価) の結果として示している。さらに, 実際にヒトが喫煙した際の気管支上皮単位面積当たりへの両成分の沈着率を *in vivo* dosimetry (*in vivo* 曝露量評価) の結果として示している。 *In vitro* および *in vivo* の dosimetry の結果を比較することで, 希釈流量 1.0 L/min の条件で 1-4 本分のたばこ煙を曝露した場合, ヒトの 1 日当たりの喫煙と同等の曝露量(10-40 本相当)が再現されることを見出し, この曝露条件がヒトでの曝露量再現に有用であると結論している。

第 5 章では, 第 3 章で開発した気管支三次元培養モデルに対して第 4 章で設定した曝露条件を用いて 2 週間にわたる合計 7 回の全たばこ煙反復曝露を実施した結果をまとめている。反復曝露により IL-1 β (Interleukin-1 β), IL-8 (Interleukin-8) の分泌増幅が起こり, 気管支三次元培養モデルが慢性炎症状態に近づいている可能性を見出すとともに, 反復曝露後の培養モデルでは線毛細胞の減少や杯細胞の増加といった慢性閉塞性肺疾患(たばこ関連疾患)患者で見られる組織学的変化を確認している。これらの結果から, ヒト気管支組織に対してたばこ煙が与える影響を *in vitro* で再現・評価する際に, 本試験法が極めて有用であると結論している。

第 6 章では, 第 5 章で確認した反復曝露による影響をより包括的に捉える目的で各種オミクス技術を用いた解析を実施した結果を報告している。メタボロミクス解析からは, 全たばこ煙反復曝露によるペントースリン酸経路の亢進とそれに伴う抗酸化剤 GSH (Glutathione) の合成促進が, トランスクリプトミクス解析のからは炎症・酸化ストレス関連のパスウェイの変動が, プロテオミクス解析からは培養モデル表層への各種ムチンの分泌亢進が確認されたことを報告している。これらの現象は慢性閉塞性肺疾患患者でも報告される現象であり, 気管支三次元培養モデルへの全たばこ煙反復曝露により生体と同様の様々な分子レベルでの変化を, *in vitro* で再現・評価できる可能性があると述べている。

第 7 章は結言であり, 本論文全体のまとめと到達点を示すとともに, より高度な病態の再現・評価に向けて, 残された課題およびそれらの展望について述べている。

以上, 本論文は, 培養モデルや曝露手法の高度化を通じて, 従来法では評価することが困難であったたばこ関連疾患患者の気管支組織で見られる様々な病態を, *in vitro* で再現することに成功している。本研究の成果は, たばこ煙に限らず, ナノマテリアルなどの様々なエアロゾルの吸入毒性の *in vitro* 評価にも応用が可能である。また, 本研究において作成された気管支三次元培養モデルは, 再生医療・創薬などの幅広い領域での活用も期待されるものであり, バイオエンジニアリング・生体組織工学の発展に大きく寄与するものである。

よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。