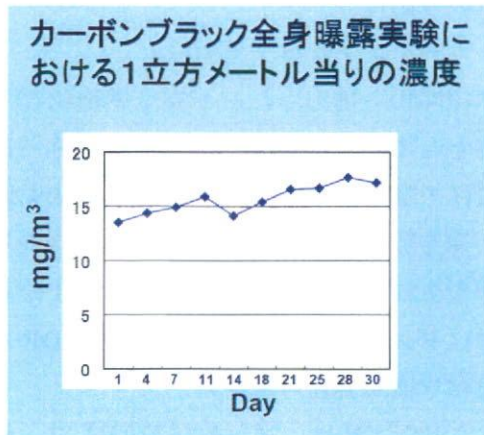


Figure 2



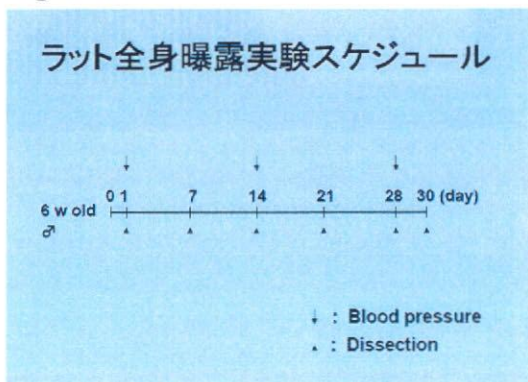
2. 群構成

6週齢のオス Sprague-Dawley (SD) ラットを23度で12時間の明暗サイクル、固形普通食で飼育し、空気対照群、CB曝露群それぞれ合計25匹を曝露し(Table 1)、曝露後1, 7, 14, 21, 28, 30日に麻酔下で解剖した。また、曝露後1, 14, 28日目に血圧を測定した(Figure 3)。

Table 1

	動物数			
	曝露期間			
	1日間	7日間	14日間	28日間
空気対照群	5	5	5	10
CB曝露群	5	5	5	10

Figure 3

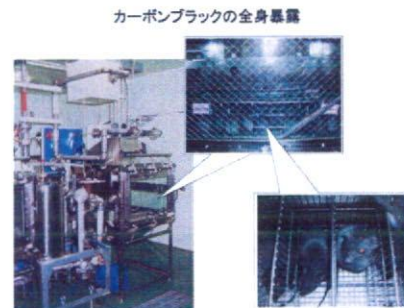


3. 測定項目

- 1) 体重測定、各臓器重量
- 2) 尾部での血圧測定 (tail cuff plethysmography system, model: BP-98A)
- 3) 血液成分の測定。
- 4) 組織学的検証：肺組織でのマクロファージ数を特異抗体による免疫組織学的方法で検討する。肺組織の繊維化をエラスチカ-ワーギンソン染色、ギムザ染色で検討する。電子顕微鏡でCB粒子を同定する。
- 5) MCP-1, IL-6, CRP の血中濃度と遺伝子発現を定量

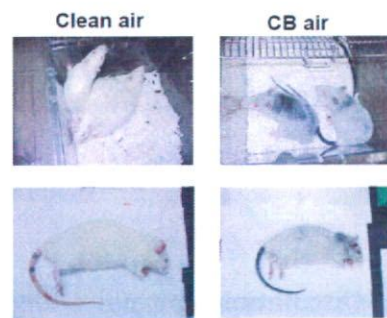
結果

Figure 4



解剖前

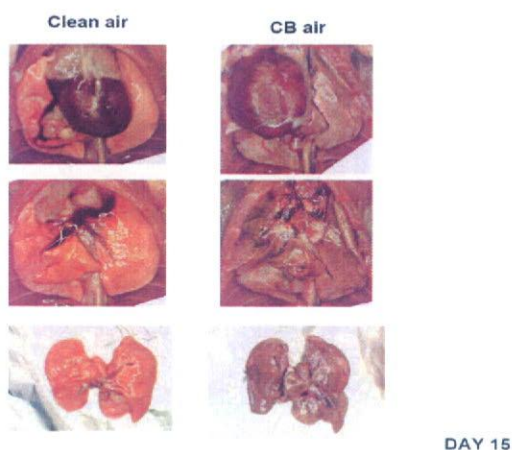
Figure 5



DAY 15

解剖直後の肺組織

Figure 6



30 日間の CB 曝露直後のラットの外見は被毛を含んだ全身が黒色に変化した (Figure 4)。

解剖直前の CB 曝露ラットは CB のいくらかが体から落ちたがほぼ全身が黒色、CB で覆われている (Figure 5)。両群のラットを解剖後、肺組織を比較した。肉眼でもハッキリと CB 曝露群のラット肺組織が黒色に変化していた (Figure 6)。

1) 体重、各臓器重量、血圧の変化

CB 曝露後のラットの体重はコントロール群の体重と比較するとほとんど差異が無かった。同様に、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓の各湿重量の曝露時間ごとの群間の変化は見られなかった (Figure 7)。

Figure 7

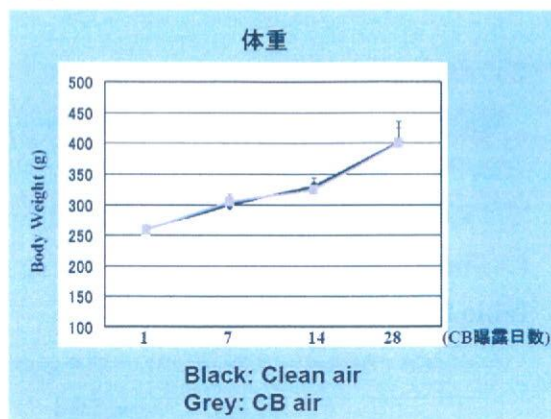
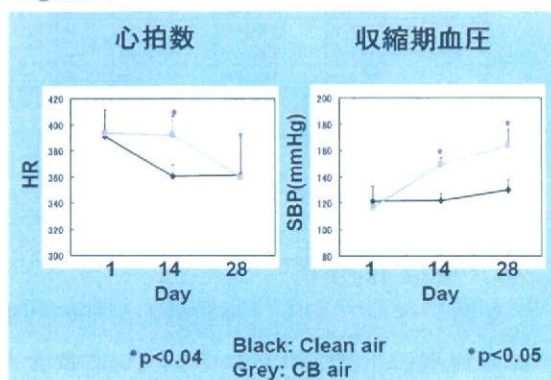
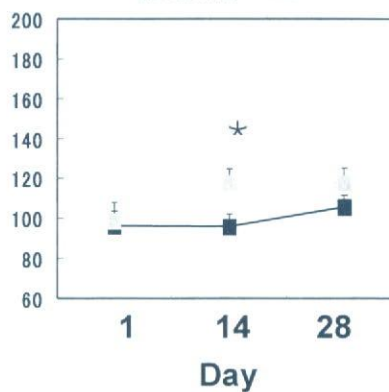


Figure 8



拡張期血圧



尾部より血圧と脈拍を測定した結果、心拍数はコントロール群で加齢とともに減少したのに対して、CB 曝露群のラットは加齢ともなう心拍数の減少が曝露後 28 日目まで見られなかった。尾部での血圧は CB 曝露群で曝露後 14 日目から有意に上昇する

ことが判明した (Figure 8)。

### 2) 血液成分の検討

曝露後 30 日目の血液成分を生化学的手法を用いて測定した結果、各種成分については両群間で有意な差異は認められなかった (Table 2)。

Table 2

Characteristics of the blood test in Clean air group and CB air group

	Clean air (n=5)	CB air (n=5)	p value
Red blood cell (x10 <sup>12</sup> /μl)	222.0 (±12.0)	210.0 (±20.0)	ns
White blood cell (x10 <sup>9</sup> /μl)	55.8 (±10.0)	67.9 (±20.0)	ns
Platelet (x10 <sup>9</sup> /μl)	128.00 (±10.20)	90.75 (±5.80)	ns
Creatinine (mg/dl)	0.71 (±0.10)	0.84 (±0.09)	ns
Creatinine (mg/dl)	0.700 (±0.020)	0.780 (±0.020)	ns
AST <sup>1</sup> (U/L)	80.2 (±30.0)	108.4 (±52.0)	ns
ALT <sup>2</sup> (U/L)	35.6 (±10.0)	30.4 (±7.0)	ns
Serum albumin (g/dl)	3.00 (±0.05)	3.7 (±0.47)	ns

<sup>1</sup> Aspartate aminotransferase

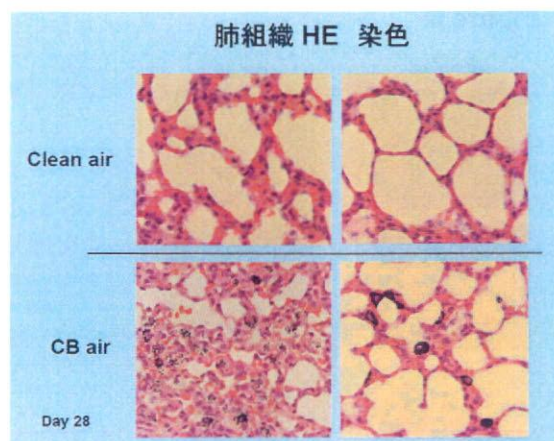
<sup>2</sup> Alanine aminotransferase

Data are presented as mean ± SD

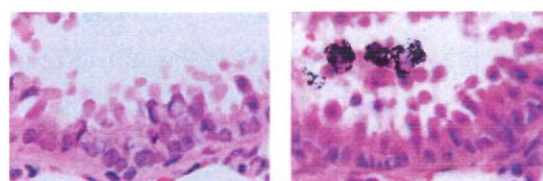
### 3) 組織学的検討

光顕レベルで CB は肺組織の深部の肺胞まで到達し、肺胞マクロファージに貪食されていることが確認できた (Figure 9)。また、電子顕微鏡レベルで CB の局在を検討した結果、肺胞マクロファージや毛細管内皮細胞で CB が確認できた (Figure 10)。しかしながら、肝臓、脾臓 (Figure 11)、血管内皮細胞 (Figure 12) などでの組織では CB の沈着が確認できなかった。次に炎症との関連について検討した所、ギムザ染色、エラスティカーワーギンソン染色法の結果から顕著な炎症領域、繊維化は認められなかった。

Figure 9



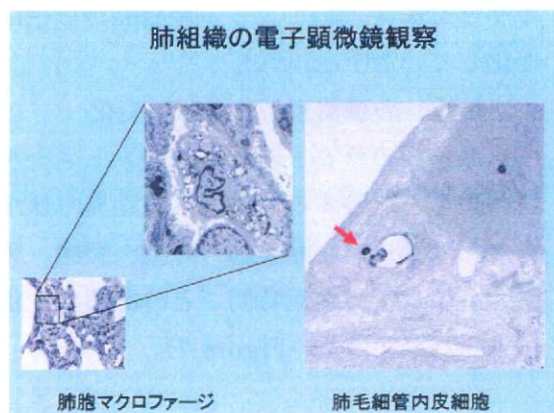
肺気道 HE 染色



Clean

CBair

Figure 10



肺胞マクロファージ

肺毛細管内皮細胞

Figure 11

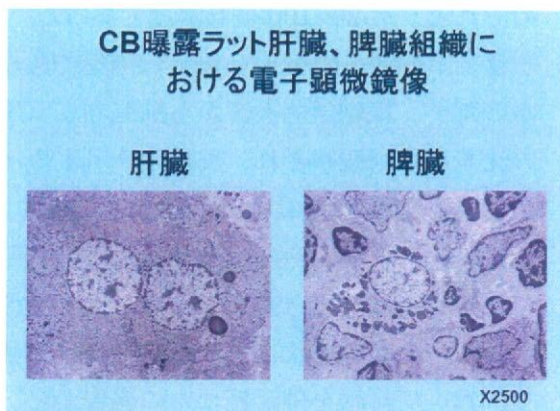
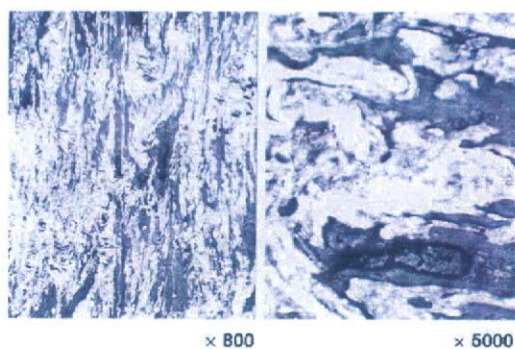


Figure 12



CB 曝露ラット大動脈血管内皮細胞における電子顕微鏡像

4) 各種炎症性マーカーの血中濃度の測定  
 ナノ粒子は細胞内や組織内に取り込まれると酸化ストレスを促進することが明らかになっている。酸化ストレスは細胞障害を引き起こし、体内での炎症を促進することが知られている。そこで、循環器疾患のマーカー蛋白質(MCP-1, IL-6)の血中濃度をELISA法により測定した。その結果、曝露後1日目ではMCP-1の血中濃度に差異は認められなかったが、28日間のCB曝露によりMCP-1の濃度は有意に上昇し (Figure 13)、同様に、IL-6も有意な濃度の変化が検証できた(Figure 14)。また、遺伝子レベルでもCB曝露によりMCP-1,

IL-6のmRNAの発現が有意に増加していることが判明した (Figure 15)。

Figure 13

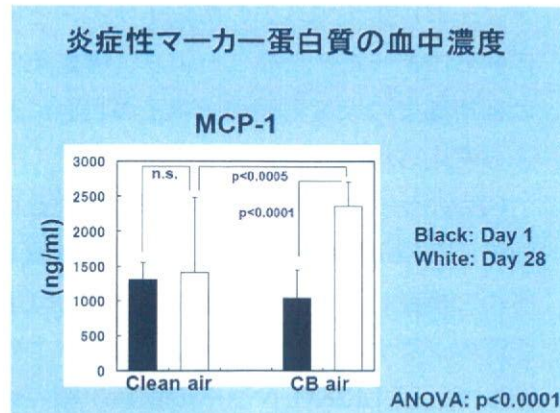


Figure 14

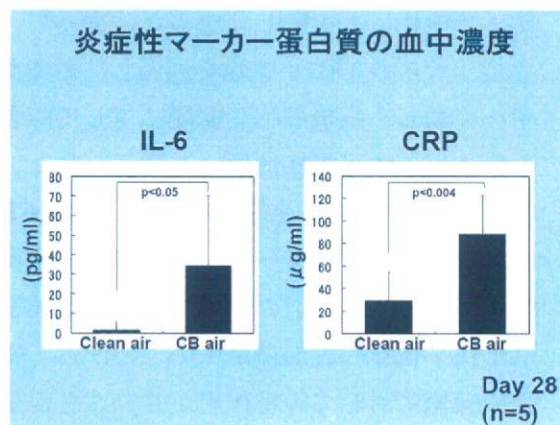
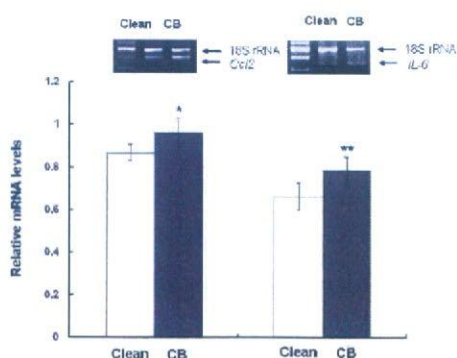


Figure 15



考察

ラット全身曝露実験の条件は、単位立法メートル当りの曝露濃度は  $15.6 \pm 3.5 \text{ mg/m}^3$ 、平均粒子径サイズは  $116.4 \text{ nm}$  のカーボン

ブラックを曝露した。粒子径サイズは、使用したカーボンブラックが内燃機関からの不燃物粒子の標準品であることから実際のディーゼル排気ガス中の微粒子サイズとほぼ同じであった。このことより、曝露条件は都市部での大気中極小微粒子の状態に近いと考えられた。

CB のラット体内での動態を検討する目的で、肝臓や脾臓での沈着を電子顕微鏡レベルで検証したところ、肺組織以外ではCB沈着のシグナルが確認できなかった。この結果は、LDLR/KO マウスの電顕組織の結果と同じであった。また、血液検査や腎機能、肝機能にも影響しなかった。従って、ナノサイズのCBが肺胞を通過し、循環血中へ移動し、直接細胞や臓器に対して障害を引き起こす可能性は低いと考えられた。粒子径の分布から、暴露実験に使用したCBの中にも数十ナノメートルサイズの極小微粒子が存在した。このサイズの極小微粒子は1粒子当りの表面積が広いことから、細胞や臓器に対して障害作用が強いことが知られている。しかし、曝露後のCBの動態を追跡すると、そのほとんどが肺胞のマクロファージに取り込まれていることが判明した。CBの化学的性状から考察すると、マクロファージに取り込まれたCBは細胞内で直ちに凝集するため平均粒子サイズがマイクロメートルサイズに巨大化し、その結果、体内に侵入できないと思われる。これに対して、ナノサイズの金粒子が体内に侵入すると報告があることから、体内侵入の可否は、ナノ粒子の化学的性状に依存することが推察できる。また、曝露濃度については、中国において  $146.8\sim 666.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  の大気中微小粒子の濃度が報告されている。

我々が行った曝露実験でのCB濃度は中国のそれよりも20~100倍高濃度であった。

ラット体内へのCBの侵入は確認できなかったが、組織学的検証から肺胞内にCBの沈着が多数観察され、炎症性サイトカイン(MCP-1 and IL-6)が上昇したことより、CB曝露により肺胞内で炎症性変化が生じていることは確実と考えられる。極小微粒子がその化学的性状により細胞障害性が強く、起炎症作用を併せ持つとの報告から、サイトカインの分泌や酸化ストレスを亢進すると思われる。従って、大気中微粒子による曝露で心血管病の発症が増加する原因は、肺組織の炎症反応に起因すると推察した。しかしながら、ギムザ染色、エラスティカーワーゲンソン染色などの結果では、顕著な炎症反応は肺組織内で確認できなかった。そこで、我々は、肺組織での持続的で微弱な炎症反応から産生するサイトカイン(MCP-1, IL-6)が肝臓からのCRPを介して動脈硬化の発症を誘導する可能性を提示した。

更に、今回の実験で特筆すべき点は血圧の上昇である。一過性ではあるものの、心拍数の上昇が観察されたことからCB曝露による交感神経系の活性化が考えられる。実際に人に於いても大気中微小粒子の曝露により血圧の上昇や不整脈が誘発されるとの報告があることから、カテコールアミンの増加が血圧上昇の原因かもしれない。しかし、カテコールアミン濃度の上昇メカニズムを推察すると、肺での炎症反応が原因であるのか(交感神経活性化、気道閉塞からの呼吸困難など)、あるいは異なるメカニズムによるかは今後の検討が必要である。

6. 動脈硬化発症モデルマウス；LDL receptor knockout mouse にカーボンブラック (CB) を長期間投与し、動脈硬化進展との関連性を検討する。

本研究は、Circulation Journal 2007 Jul;71(7):1157-61 に掲載済みである。  
である。

(試験方法)

マウスのグループを 0% コレステロール食負荷、0.51% コレステロール食負荷したマウスに気管内へ手動で CB (1 mg/ 匹) と空気のみを毎週一回噴霧し (DP-4 dry powder insufflator)、10 週間続けた 4 グループを作成し以下の項目について解析した。

- 1) 体重測定
- 2) 各臓器重量
- 3) 動脈硬化巣のオイルレッド O 染色法による同定と定量
- 4) 炎症性マーカーの測定：CRP の血中濃度を測定する。
- 5) CB の体内での局在

結果

1) 体重、各臓器の変化

4 グループ間の体重の変化は実験開始から終了まで、全てのグループにおいて増加したが、グループ間では有意な差は認められなかった。ただし、CB を気管内に噴霧したグループでは体重が軽い傾向が認められた。その他の臓器重量を、単位体重当りの重量に変換後、4 グループ間で統計学的に比較検討したところ、各グループ間で有意な差は確認できなかった (Table 1)。

Table 1

Table 1. Characteristics of the four study groups				
	0% Chol	0% Chol + CB	0.51% Chol	0.51% Chol + CB
(g)				
Baseline body weight	22.7 ± 1.0	21.8 ± 1.0	23.4 ± 1.0	25.0 ± 1.0
Body weight	56.2 ± 5.3	28.1 ± 3.9	48.1 ± 2.9	44.2 ± 2.9
Lung	0.156 ± 0.019	0.142 ± 0.013	0.197 ± 0.035	0.174 ± 0.018
Heart	0.190 ± 0.056	0.144 ± 0.018	0.167 ± 0.025	0.164 ± 0.024
Liver	1.70 ± 0.128	1.32 ± 0.225	2.69 ± 0.514	2.32 ± 0.383
Spleen	0.072 ± 0.008	0.066 ± 0.011	0.099 ± 0.010	0.114 ± 0.033
Kidney, left	0.192 ± 0.034	0.184 ± 0.045	0.210 ± 0.010	0.234 ± 0.052
Kidney, right	0.190 ± 0.023	0.184 ± 0.033	0.210 ± 0.010	0.194 ± 0.005

2) 動脈硬化巣のオイルレッド O 染色と染色領域の定量化

LDLR/KO マウスは高脂肪食を負荷すると大動脈に硬化巣を形成することが知られている。我々は昨年度の研究から動脈硬化初期病変を引き起こす脂肪濃度を確定した。その結果、0.51% コレステロール食の負荷が指適な濃度であった。それに対して、全く硬化巣を形成しない 0% コレステロール食 (カロリーは単位グラム当り 0.51% コレステロール食と同じになるように調製済み) をコントロールとして使用した。10 週間の食事負荷と CB の気管内噴霧を行い、実験終了後に大動脈と血液を採取した。大動脈の外側の結合組織を除去後、血管を縦軸に開き、内皮側を上にしてオイルレッド O 染色を行った。その結果、0% コレステロール食負荷に、CB の気管内噴霧の有無に関わらずオイルレッドによる染色領域は両群ともにほとんど認められず、群間での統計学的な差は認められなかった (Figure 1A, Figure 2)。それに対して、0.51% コレステロール食負荷によりオイルレッドに染まる領域が広がり、更に CB の気管内噴霧でより大きな

ることが判明した (Figure 1B)。

Figure 1A

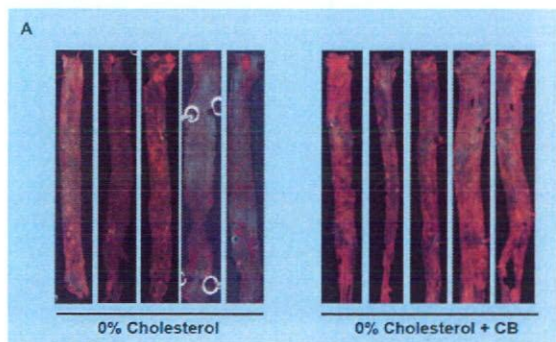
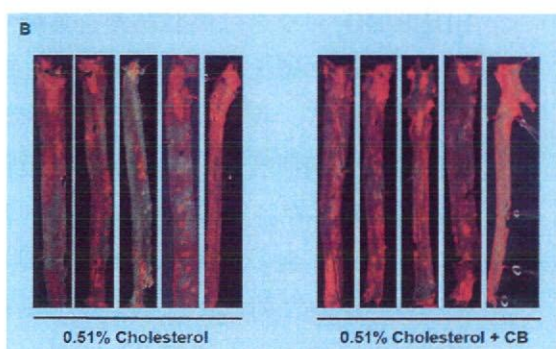
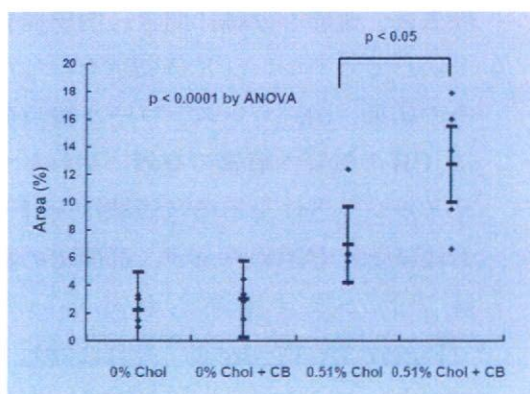


Figure 1B



オイルレッド O 染色の結果を定量し、統計学的に解析すると、0.51%コレステロール食負荷に CB を気管内噴霧したグループが他のグループよりも有意に硬化巣が拡大した (Figure 2)

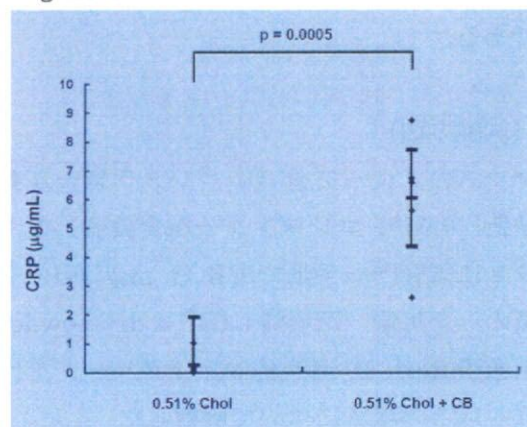
Figure 2



3) 炎症性マーカー蛋白質の血中濃度

動脈硬化発症マーカーのひとつである CRP の血中濃度を CB 噴霧後 24 時間と 10 週間の 2 回に分けて測定した。その結果、CB 噴霧により血中 CRP の濃度が 24 時間後、さらに 10 週間後でも共に有意に上昇した (Figure 3)。

Figure 3



4) CB の体内局在を電子顕微鏡で検証

CB の肺組織での沈着は HE 染色法により確認できた。そこで、これらの CB が肺を通過して循環血中に移動するのか否かを電子顕微鏡により観察した。その結果、大動脈内皮細胞 (動脈硬化巣) (Figure 4) や肝臓で CB の沈着は認められなかった (Figure 5)。

Figure 4

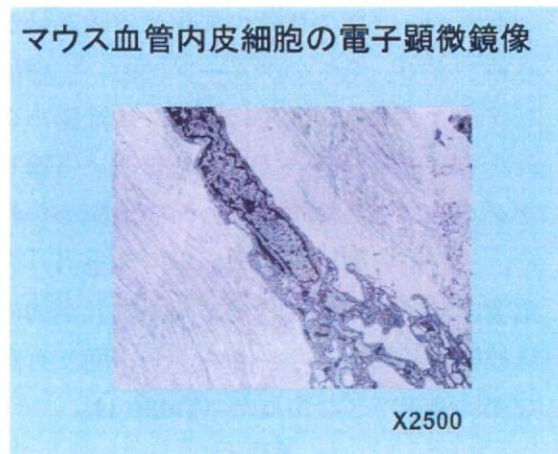
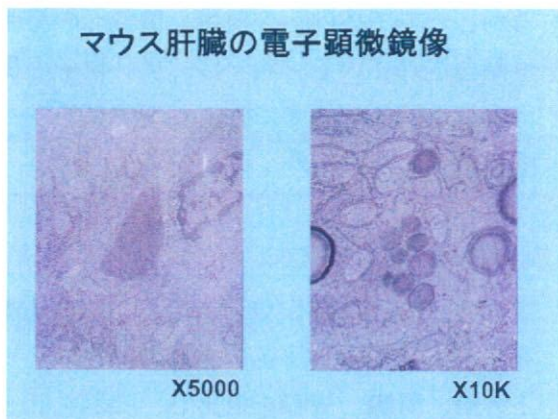


Figure 5



5) 遺伝子発現の網羅的解析

次に我々は、CB 曝露により細胞レベル (HUVEC) と個体レベル (LDLR/KO マウス、肝臓) の遺伝的変化が異なるのか否か、マイクロアレイのデータを下に Gene set enrichment analysis (GSEA) で動脈硬化発症に関与する遺伝子群のプロファイリングを行った。その結果、Table 2 に示したように、*ICAM-1*, *CXCL2*, *CCL2* and *FOS* などの遺伝子が細胞レベル、個体レベルで共通して上昇し、CB 曝露による動脈硬化発症メカニズムが類似している可能性が判明した。

Table 2

Gene sets							
<b>NF-κB induced</b>							
gene sets of high expression values	<i>ICAM-1</i>	<i>CXCL2</i>	<i>CCL2</i>	<i>FOS</i>			
gene sets of moderate expression values	<i>IL1B</i>	<i>IL6</i>	<i>CCL5</i>				
gene sets of lowest expression values	<i>SEI24C</i>	<i>TIMP2</i>	<i>IL8</i>	<i>SOX1</i>	<i>SOX2</i>		
<b>Cell adhesion</b>							
gene sets of high expression values	<i>ICAM1</i>	<i>CD31</i>	<i>VEGFA</i>	<i>MMP14</i>	<i>ICAM</i>	<i>MMP14</i>	<i>ALCAM</i>
gene sets of moderate expression values	<i>VEG</i>	<i>CD31</i>	<i>SECAM</i>	<i>CD31</i>	<i>ICAM1</i>		
gene sets of lowest expression values							
<b>Matrix metalloproteinase</b>							
gene sets of high expression values	<i>MMP1</i>	<i>MMP12</i>	<i>MMP13</i>	<i>MMP14</i>	<i>MMP17</i>	<i>MMP19</i>	<i>MMP</i>
gene sets of moderate expression values	<i>MMP3</i>	<i>MMP10</i>					
gene sets of lowest expression values	<i>MTM</i>	<i>MMP11</i>	<i>MMP15</i>				
<b>Cell proliferation</b>							
gene sets of high expression values	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>
gene sets of moderate expression values	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>
gene sets of lowest expression values	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>
<b>Transcription factor</b>							
gene sets of high expression values	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>
gene sets of moderate expression values	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>
gene sets of lowest expression values	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>

Gene sets							
<b>NF-κB induced</b>							
gene sets of high expression values	<i>ICAM-1</i>	<i>CXCL2</i>	<i>CCL2</i>	<i>SEI1</i>	<i>CXCL2</i>	<i>SEI1</i>	<i>MMP2</i>
gene sets of moderate expression values	<i>MMP9</i>	<i>CD31</i>	<i>VEGFA</i>				
gene sets of lowest expression values							
<b>Cell adhesion</b>							
gene sets of high expression values	<i>ICAM1</i>	<i>CD31</i>	<i>VEGFA</i>	<i>ICAM1</i>	<i>CD31</i>	<i>VEGFA</i>	<i>ICAM1</i>
gene sets of moderate expression values	<i>VEG</i>	<i>CD31</i>	<i>SECAM</i>	<i>CD31</i>	<i>ICAM1</i>		
gene sets of lowest expression values							
<b>Matrix metalloproteinase</b>							
gene sets of high expression values	<i>MMP1</i>	<i>MMP12</i>					
gene sets of moderate expression values	<i>MMP3</i>	<i>MMP10</i>					
gene sets of lowest expression values	<i>MTM</i>	<i>MMP11</i>	<i>MMP15</i>				
<b>Cell proliferation</b>							
gene sets of high expression values	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>
gene sets of moderate expression values	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>
gene sets of lowest expression values	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>
<b>Transcription factor</b>							
gene sets of high expression values	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>
gene sets of moderate expression values	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>
gene sets of lowest expression values	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>	<i>FOS</i>

HUVEC cultured in 0.01% cholesterol w/o CB

考察

マウス曝露実験の条件は、平均粒子径サイズが 116.4nm のカーボンブラックを曝露した。曝露濃度については、上海での大気中微粒子の濃度が 1mg/m<sup>3</sup> であることからほぼ同程度の濃度条件であった。粒子径サイズの測定結果から、使用したカーボンブラック (内燃機関からの不完全燃焼物粒子の標準品) の平均粒子径は実際のディーゼル排気ガス中の粒子サイズとほぼ同じであった。このことより、曝露条件は都市部の大気中微小粒子の状態をある程度反映していると考えられた。

マウス体内での CB の動態を検討する目的で、大動脈硬化巣、肝臓や脾臓での沈着を電子顕微鏡レベルで検証したところ、肺以外の組織で CB 沈着のシグナルが確認できなかった。従って、ナノサイズの CB は肺胞を通過し循環血中へ侵入し、直接細胞や臓器障害を引き起こす可能性は低いと考えられた。また、粒子径の分布から、暴露



実験に使用した CB の中でも数十ナノメートルサイズの極小微粒子が存在するものの、そのほとんどが肺表面のマクロファージに取り込まれると直ちに凝集するため粒子サイズがマイクロメートルサイズに巨大化し、体内には侵入できないと思われた。さらに、ヒトにナノサイズのテクネガスを吸引させ、吸引後 6 時間での体内動態を解析すると、テクネガスの 95%以上が肺組織に留まっているという報告もある。これに対して、ナノサイズの金粒子が体内に侵入するとの報告もあることから、体内侵入の可否は、ナノ粒子の化学的性状に依存することが推察できる。

ラットと同様にマウス体内への CB の侵入は今現在の我々の手法では確認できなかった。組織学的検証から肺胞内に CB の沈着が観察され、気管内噴霧後 24 時間で血中 CRP 濃度が上昇したことより、CB 曝露により肺胞内で炎症性変化が生じていることは確実と考えられる。極小微粒子がその化学的性状により細胞障害性が強く、起炎症作用を併せ持つとの報告から、肺組織でのサイトカインの分泌や酸化ストレスを亢進すると思われる。また、歯周病による炎症反応が血管内皮細胞の細胞障害を引き起こすとの報告もある。従って、大気中微粒子による曝露で心血管病の発症が増加する原因は、肺組織の炎症反応に起因すると推察した。

## 7. ナノ粒子の体内動態を追跡する。

Q-dot は蛍光を発する親水性ナノ粒子である。その応用範囲は工学系から医学系まで

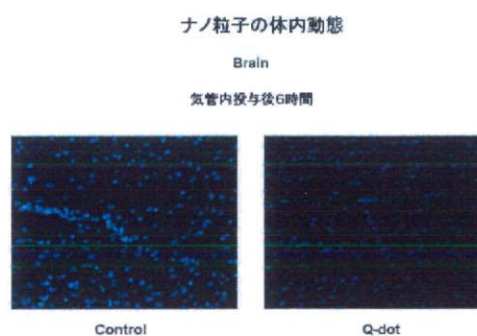
様々で、今後更に用途が広がると考えられるが、一方で体内への蓄積、環境への汚染が懸念されている。我々は、ナノ粒子の体内動態を探る目的で、Q-dot を肺気管支へ噴霧投与した。

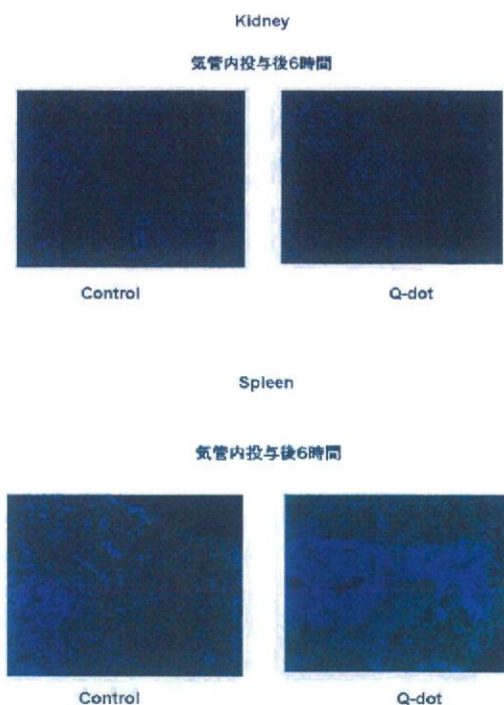
### (試験方法)

蛍光ナノ粒子である,Quantum dot (Q-dot) をラット気管内へ投与し、6 時間後にラットの脳、腎臓、脾臓を摘出し、臓器を固定後、切片を作製し、Q-dot を蛍光顕微鏡下で観察した。

### 結果

脳、腎臓の各組織では Q-dot の蛍光シグナル (Q-dot: Green, Nucleus: Blue) はコントロールと比較して顕著な差異は確認できなかった。それに対して、体内の不要物が蓄積しやすい脾臓では、Q-dot のシグナルが確認できた。





#### 考察

今回の実験から、ナノ粒子の体内動態が想像以上に早く、ナノ粒子投与後 6 時間以内にそのほとんどが体外へ排泄されるものと考えられた。実際に尿中の蛍光シグナルが投与後 1 時間で上昇した。しかしながら、脾臓で Q-dot のシグナルが確認できたことよりナノ粒子が体内に侵し、網内系に留まる可能性が示唆された。また、ヒトにナノサイズのガスを吸引させ、吸引 6 時間後の体内動態を解析すると、ナノ粒子の 95%以上が肺組織に留まっているという報告があった。これに対して、ナノサイズの金粒子が体内に侵入するとの報告もあることから、体内侵入の可否は、ナノ粒子の化学的性状に依存することが推察できる。

#### 8. 水溶性フラーレン[C60(OH<sub>24</sub>)]で長期間

#### 培養した細胞の小核試験

本研究は、*Environmental Health and Preventive Medicine*, 2006; 11(6): 292-297. に掲載済みである。

(測定方法) : CHO, Hela, HEK293 の各細胞株を水溶性フラーレン (0~1 ng/ml) 添加の条件で約 80 日間培養し、細胞増殖能を WST-8 で測定し、小核試験は Matsuoka 等の方法に従って行った。但し、核染色には DAPI を用いた。

#### 結果

##### 1) 細胞増殖能

3 日間の短期の曝露実験では、極低濃度でも水溶性フラーレンは CHO, HEK293, Hela の各細胞に対して細胞増殖を抑制したことより、細胞障害性があることが判明した。(Figure 1)

しかしながら、33 日間、水溶性フラーレン (1 pg~1 ng/ml) 添加の条件で培養すると、水溶性フラーレンの濃度に依存して細胞増殖が亢進することが明らかになった。(Figure 2)

Figure 1

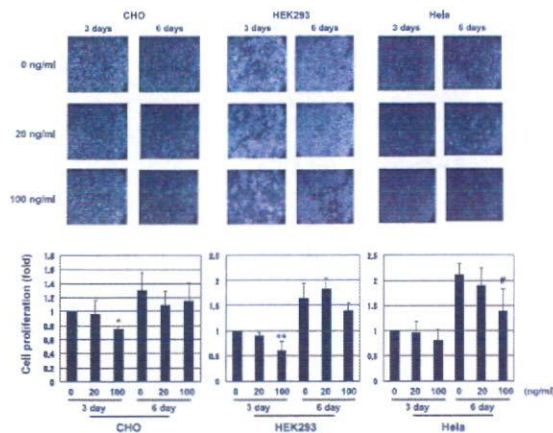


Fig. 1 Representative photomicrographs of CHO, HeLa and HEK293 cells treated with C<sub>60</sub>(OH)<sub>22</sub>. CHO, HeLa and HEK293 cells at ~30% confluence were treated with C<sub>60</sub>(OH)<sub>22</sub> (0, 20, 100 ng/ml) for 3 or 6 days (upper panels). Cell number was calculated using a hemocytometer (n = 4). Results are shown relative to those of controls (lower panels). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.005.

Figure 2

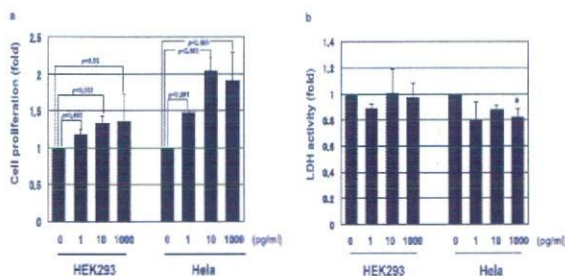


Fig. 2 C<sub>60</sub>(OH)<sub>22</sub> induced cell growth in dose-dependent manner. HEK293 and HeLa cells at ~30% confluence were treated with C<sub>60</sub>(OH)<sub>22</sub> (0–1000 pg/ml) for 33 days. (a) The number of cells was determined using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). (b) C<sub>60</sub>(OH)<sub>22</sub> did not induce cytotoxic injury in HEK293 or HeLa cells. Cells at ~30% confluence were treated with C<sub>60</sub>(OH)<sub>22</sub> (0–1000 pg/ml) for 33 days. The amount of lactate dehydrogenase released into culture medium was measured. Cytotoxicity was calculated as the fold-change relative to that of the controls (n = 4). Results are shown relative to those of the controls. p values indicate significance.

## 2) 小核試験

CHO, HeLa, HEK293 の各細胞を低濃度の水溶性フラーレン (0~1 ng/ml) で 80 日間培養後、細胞を固定し、核を DAPI で染色した後、蛍光顕微鏡で全体の細胞数の中の小核を持った細胞数をカウントし、小核数 (%) として表した。細胞によって小核数は異なるが、CHO, HeLa, HEK293 すべてで水溶性フラーレンによる核の異常が観察された。この結果から、我々の生活環境レベルのナノ粒子の濃度で長期間曝されると核が異常な細胞が増大し、癌を始めとする生活習慣病疾患へと進展する可能性が示唆された (Figure 3 and 4)。

Figure 3

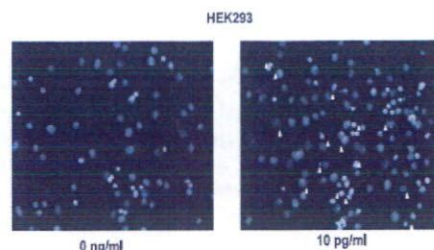


Fig. 3 The number of cells with micronuclei among HEK293 cells exposed to C<sub>60</sub>(OH)<sub>22</sub> (0 or 10 pg/ml) for 80 days was elevated.

Figure 4

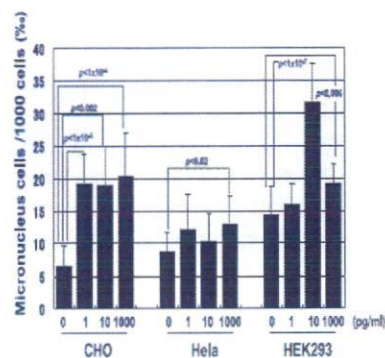


Fig. 4 Formation of micronuclei (%) in CHO, HeLa and HEK293 cells after treatment with different concentrations of C<sub>60</sub>(OH)<sub>22</sub> for 80 days. p values indicate significance.

## 考察

化学物質の毒性試験で培養細胞を用いたアッセイは急性効果を調べている事例がほとんどである。今回、小核試験に用いた水溶性フラーレンの濃度は 1 pg/ml~1 ng/ml であり、この濃度は我々が生活している環境レベルの濃度に近いと考えられる。しかしながら、水溶性フラーレンを環境レベルの濃度で長期間細胞培養するとやがて細胞自身の性質が次第に変化し、より一層細胞増殖能を持ち、かつナノ粒子に耐性を持った細胞が出現することを明らかにした。この結果は、極低濃度のナノ粒子でさえも培養細胞に長期間曝露すると化学的変異原として作用し得ることを示唆する。

## D. 結論

産業界のナノ粒子の代表として水溶性フラーレンを、環境ナノ粒子としてカーボンブラックを本実験に使用した。今現在で特に循環器疾患に関与すると考えられているのは自動車排気ガス中のカーボンナノ粒子である。

我々はまず、内皮細胞に対する急性毒性を検討した。

カーボンブラックがヒト培養内皮細胞に対して細胞傷害、増殖抑制、炎症性サイトカインの発現促進作用を有することを明らかにした。一方、水溶性フラーレンは内皮細胞に対し、細胞質内でのユビキチン化タンパク質の異常蓄積を誘導し、オートファジー依存的細胞死を誘発することを明らかにした。内皮細胞への投与実験から、CBによる内皮細胞への作用と水溶性フラーレンによる作用には明らかな違いがあることが判明した。CBは炎症性メディエーター (*MCP-1, ICAM1, IL8, PTGS2, HMOX1, and selectin E*) の発現を促進するのに対して水溶性フラーレンはユビキチン-プロテアソーム機構の遺伝子群の発現を促進した。このことは、ナノ粒子でもそれぞれの物理化学的性質が異なれば、細胞に対する作用機構も違うことを示唆するものである。

カーボンブラック、水溶性フラーレンによる血管内皮細胞への作用は、用いた濃度が高濃度であるものの細胞障害や細胞死を引き起こし動脈硬化症、虚血性心疾患の発症と進展に関わる可能性を示唆するものである。

カーボンブラックはADPによる血小板凝集反応に影響を与えなかった。それに對

して水溶性フラーレンは濃度依存的にADPによる血小板凝集反応を促進したが、ADPに対する相乗効果は、コラーゲン、セロトニンでは認められなかったことからADP特異的な作用と考えられた。従って、動脈硬化発症機構に関与する血液凝固系は水溶性フラーレンなどにより血小板を活性化させ、血栓形成を促進する可能性を提示できた。

さらに、内皮細胞と並んで動脈硬化発症に重要な役割を果たしているマクロファージにおいても内皮細胞と同様にナノ粒子処置により食胞が多数確認できた。しかし、カーボンブラック単独ではマクロファージに対し細胞障害作用を及ぼさなかったが、水溶性フラーレンは濃度依存的に細胞障害を引き起こした。動脈硬化を悪化させる酸化LDLが共存するとナノ粒子の細胞障害性が増強し、泡沫化細胞の形成を促進することを明らかにした。これらの結果から、ナノ粒子の動脈硬化発症過程における作用点は、初期段階に血管内皮細胞を障害し、その後マクロファージを活性化させ、変性LDLの細胞内への取り込みを促進し(泡沫化)、泡沫化した細胞から分泌されたMMPによってプラークが破綻し、ADPによって活性化、凝集した血小板が血栓を形成し、心筋梗塞へ進展すると推察している。しかしながら、空気曝露などで血液中のナノ粒子の濃度が本実験レベルに到達することはまず、考えられない。また、産業ナノ粒子の場合特殊条件化で高濃度のナノ粒子に曝露されることがありうるが、当初は急性毒性の危険性を想定していたが、本実験から強い毒性は確認できなかった。但し、環境中と同レベルの濃度のナノ粒子に長期に亘

って曝露するとどのような変化が現れるのかは今のところ不明であり今後検証する必要があると考えている。

細胞レベルの結果を個体レベルで検証する目的でモデル動物(SDラット、LDLR/KOマウス)を用いた曝露実験を行った。当初、我々はカーボンブラックなどのナノ粒子が肺を通過し、循環血中に移動すると考えていた。実際に、海外や日本からもナノ粒子が速やかに体内に取り込まれることを報告している。その考えに基づいて細胞レベルでナノ粒子の直接的影響を検証し、循環器疾患に関与する可能性を提示した。

ラット全身曝露実験やマウス気管内噴霧実験の曝露条件はともに一般環境中の微粒子の濃度より高い設定で行った。その理由は、できるだけハッキリとした生理機能の変化を捉えたかったからである。その結果、ラット全身曝露実験から考えられる作用機序は未だ不明であるが、おそらく肺組織での炎症が何らかの経路を介して交感神経系を作動させ、その結果、収縮期血圧が上昇したと仮定している。更に、肺胞に沈着したCBの影響で炎症性マーカー(MCP-1, IL-6, CRP)の血中濃度が上昇した。しかしながら、この上昇は、急激な免疫反応を引き起こすほど高濃度ではなく、緩やかで持続的な免疫反応を刺激する濃度であると考えられた。歯周病に代表される持続的で穏やかな免疫反応が血管内皮細胞を障害し、循環器疾患の引き金になるという動脈硬化発症仮説がある。この仮説は、我々のラット曝露実験、LDLR/KOマウス曝露実験からある程度裏付けられた。即ち、CB曝露により動脈硬化巣が進展し、この進展には炎症性マーカー蛋白質であるCRPやMCP-1

の上昇が関与するデータを提示できたからである。

しかしながら、当初予測したナノ粒子の体内への侵入は、電子顕微鏡による解析を駆使したものの、肺以外の組織でCB沈着のシグナルは確認できなかった。この結果は、ヒトでテクネガス(1つのナノ粒子)を吸引した後6時間が経過しても95%以上のテクネガス粒子が肺に留まることを報告した結果と同様である。また、この報告以外にもヒトや動物を用いた実験から、ナノ粒子が体内に侵入しないという報告も幾つかある。しかし、我々がこれまで行ってきた手技では検出できない可能性も否めない。そこで、ラットを用いて、ナノ粒子の体内動態を追跡し、循環器疾患、特に動脈硬化の進展にナノ粒子が直接関与するのか否かを検証した結果、脳、腎の各組織ではQ-dotの顕著なシグナルは確認できなかった。しかし、脾臓において明らかなナノ粒子の蛍光シグナルが検証できた。従って、Q-dotが肺気道を通過し、循環系に到達した可能性が充分考えられる。これに対して、ラット、マウスにCBを曝露、投与したにも関わらず肺組織以外の臓器でCBが確認できなかった。これらの結果を鑑みて、炭素粒子のみから構成されるナノ粒子はその粒子表面の物理化学的性状から体内に侵入し難いと考えられる。これとは対照的に金コロイドやQ-dotなどの重金属は細胞のエンドサイトーシス、ピノサイトーシスにより体内へ侵入できると推察される。大気中の微小粒子は炭素、有機化合物、重金属などから主に構成されていることから考えて、肺組織での炎症、循環血中への侵入により動脈硬化が進展すると思われる。また、その

メカニズムをインフォーマティブ的に考察すると、細胞(HUVEC)や個体(LDLR/KO mouse)レベルでの遺伝子発現パターンとそこから予測される蛋白質レベルの時空間的機能分類から、細胞増殖、炎症のマスター遺伝子、*FOS*, *NFκB*や細胞接着、炎症マーカー遺伝子、*ICAM-1*, *CXCL2*, *CCL2*がCB曝露により上昇した。従って、CB曝露による動脈硬化発症メカニズムはこれらの遺伝子群の発現上昇と、それに続く細胞レベルの変化が個体レベルでの病態発症へと繋がると考えられる。

新しいナノ粒子の開発、応用に際しては、十分に生体レベルでの影響を精査する必要がある。また、既存の多くの環境因子は、低濃度で長期間の影響下ではじめて生体に影響を及ぼす可能性が考えられるため、例えば、急性曝露実験で毒性が無いと評価され実用化、市場に流通されたとしても継続してその後の長期的影響観察調査が必要不可欠と考える。In vitro, in vivo 共に低濃度での長期間曝露実験の評価方法は未だ確立されていないが、我々が培養細胞を用いた preliminary な長期間曝露実験から染色体異常などの変異原として癌などの疾患に関与する可能性を提示した。よって、産業ナノ粒子、環境ナノ粒子の無制限な生産、消費、廃棄はやがて人をはじめとする生態環境に有害であることを警鐘する。

#### E. 健康危険情報

ナノ粒子の1つであるカーボンブラック(CB)は肺炎症を介して動脈硬化を促進する。

#### F. 研究発表

##### 1). 論文発表

1. Kajimoto K, Shioji K, Tago N, Tomoike H, Nonogi H, Goto Y, Iwai N. Assessment of MEF2A mutations in myocardial infarction in Japanese patients. *Circ J* 2005; 69: 1192-1195.
2. Iwai N, Kajimoto K, Kokubo K, Okayama A, Miyazaki S, Nonogi H, Goto Y, Tomoike H. Assessment of genetic effects of polymorphisms in the MCP-1 gene on serum MCP-1 levels and myocardial infarction in Japanese. *Circ J* 2006; 70: 805-809.
3. Yamawaki H, Iwai N. Mechanisms underlying nano-sized air-pollution-mediated progression of atherosclerosis-Carbon black causes cytotoxic injury/inflammation and inhibits cell growth in vascular endothelial cells. *Circ. J* 2006; 70: 129-140.
4. Yamawaki H, Iwai N. Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C1495-1502.
5. Niwa Y, Iwai N. Genotoxicity in cell lines induced by chronic exposure to water-soluble fullerenes using micronucleus test. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 11(6): 292-297, 2006
6. Takashima N, Niwa Y, Mannami T, Tomoike H, Iwai N. Characterization of

subclinical thyroid dysfunction from cardiovascular and metabolic viewpoints: the Suita study. *Circ J* 2007; 72(2): 191-195.

7. Niwa Y, Iwai N. Nanomaterials induce oxidized low-density lipoprotein cellular uptake in macrophages and platelet aggregation. *Circ J* 2007; 71(3): 437-444
8. Niwa Y, Hiura Y, Murayama T, Yokode M, Iwai N: Nano-sized carbon black exposure exacerbates atherosclerosis in LDL receptor knock-out mice. *Circ J* 2007; 71: 1157-1161.
9. Niwa Y, Hiura Y, Sawamura H, Iwai N: Inhalation exposure to carbon black induces inflammatory response in rats. *Circ J* 2008; 72: 144-149..
10. 環境ナノ粒子の動脈硬化促進メカニズムの検討。山脇英之、丹羽保晴、丹羽勝利、岩井 直温。血圧 (*Journal of Blood Pressure*) 2006 年 3 月号掲載

## 2). 学会発表

1. カーボンナノ粒子の血小板凝集反応に対する影響 第65回日本公衆衛生学会総会(富山) 2006年10月  
丹羽 保晴、岩井 直温
2. Carbon black tracheal expose acceleration of atherosclerosis in low-cholesterol chow fed low density lipoprotein receptor

knockout mouse. 第71回日本循環器学会学術総会(神戸) 2007年3月 Yasuharu Niwa, Toshinori Murayama, Masayuki Yokode, Toru Kita, Naotaka Takashima and Naoharu Iwai

3. カーボンブラック全身曝露実験におけるラットへの影響調査 第77回日本衛生学会総会 2007年3月(大阪)  
丹羽 保晴、高嶋 直敬、岩井 直温

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

## Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表



研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Kajimoto K, Shioji K, Tago N, Tomoike H, Nonogi H, Goto Y, Iwai N.	Assessment of MEF2A mutations in myocardial infarction in Japanese patients.	Circ. J.	69	1192-1195	2005
Iwai N, Kajimoto K, Kokubo Y, Okayama A, Miyazaki S, Nonogi H, Goto Y, Tomoike H.	Assessment of genetic effects of polymorphisms in the MCP-1 gene on serum MCP-1 levels and myocardial infarction in Japanese.	Circ. J.	70	805-809	2006
Yamawaki H, Iwai N.	Mechanisms underlying nano-sized air-pollution-mediated progression of atherosclerosis-Carbon black causes cytotoxic injury/inflammation and inhibits cell growth in vascular endothelial cell.	Circ. J.	70	129-140	2006
Yamawaki H, Iwai N.	Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells.	Am J Physiol Cell Physiol	290	C1495-1502	2006
Niwa Y, Iwai N.	Genotoxicity in cell lines induces by chronic exposure to water-soluble fullerenes using micronucleus test.	Environmental Health and Preventive Medicine	11-6	292-297	2006
Takashima N, Niwa Y, Mannami T, Tomoike H, Iwai N	Characterization of Subclinical Thyroid Dysfunction from Cardiovascular and Metabolic View Point; the Suita Study.	Circ. J.	72-2	191-195	2007
Niwa Y, Iwai N.	Nanomaterials induce oxidized low-density lipoprotein cellular uptake in macrophages and platelet aggregation.	Circ.J.	71-3	437-444	2007
Niwa Y, Hiura Y, Murayama T, Yokode M, Iwai N.	Nano-sized carbon black exposure exacerbates atherosclerosis in LDL receptor knock-out mice	Circ. J.	71	1157-1161	2007
Niwa Y, Hiura Y, Sawamura H, Iwai N.	Inhalation exposure to carbon black induces inflammatory response in rats.	Circ. J.	72	144-149	2008
山脇英之、丹羽保晴、丹羽勝利、岩井 直温	環境ナノ粒子の動脈硬化促進メカニズムの検討	血圧	13	253-256	2006

### Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

## Assessment of MEF2A Mutations in Myocardial Infarction in Japanese Patients

Kazuaki Kajimoto, PhD; Keisuke Shioji, MD; Naomi Tago, BS; Hitonobu Tomoike, MD; Hiroshi Nonogi, MD; Yoichi Goto, MD; Naoharu Iwai, MD

**Background** Recently, a mutation in the human MEF2A gene was reported to be responsible for an autosomal dominant form of coronary artery disease, so the purpose of the present study was to assess the significance of MEF2A mutations in Japanese subjects with myocardial infarction (MI).

**Methods and Results** The study population consisted of 589 control subjects recruited from the Suita study and 379 subjects with MI. The promoter, all the exons, and 3'-UTR regions of MEF2A were sequenced in 190 subjects with myocardial infarction. We found 2 amino acid length polymorphisms, a 7-amino acid deletion polymorphism, and a nonsense mutation (R447X) in exon 12. The length and deletion polymorphisms did not confer susceptibility to MI. Although the nonsense mutation was detected in 1 subject with MI, and in none of the control subjects, the impact of this mutation does not appear to be great; the subject had the MI while in his 70s, had 2 major risk factors, and no family history of ischemic heart disease.

**Conclusion** MEF2A polymorphism does not contribute appreciably to MI in the Japanese population. (Circ J 2005; 69: 1192–1195)

**Key Words:** MEF2A; Myocardial infarction: Polymorphisms

Myocardial infarction (MI) is a multifactorial disease caused by environmental and genetic factors. There is an increasing number of studies that have identified the genes contributing to ischemic heart diseases (IHD)<sup>1–8</sup> and recently, a mutation in the human MEF2A gene was reported as responsible for an autosomal dominant form of coronary artery disease (CAD).<sup>9</sup> The 7-amino acid deletion disrupts the nuclear localization of the mature protein and reduces MEF2A-induced transcriptional activation.<sup>9</sup> The same authors have reported MEF2A missense mutations in 4 of 207 sporadic CAD cases and estimated that MEF2A mutations contribute to approximately 2% of CAD.<sup>10</sup> On the other hand, Weng et al recently reported a lack of MEF2A mutations in 300 CAD cases,<sup>11</sup> so the purpose of the present study was to assess the significance of MEF2A mutations in Japanese subjects with MI.

### Methods

#### Study Population

The control group consisted of 589 subjects recruited from the Suita study who were at least 60 years of age with no cardiovascular disease and no family history IHD. The selection criteria and design of the Suita Study have been described previously.<sup>12–14</sup> We excluded young subjects from the control group, because they might develop MI in their 50s and 60s. The MI group consisted of 379 randomly selected inpatients and outpatients with documented MI who were admitted to the Division of Cardiology at the National Cardiovascular Center between May 2001 and April 2003 (MI group).<sup>15</sup> The characteristics of the study

population are shown in Table 1. All subjects gave written informed consent and the present study was approved by the Ethics Committee of the National Cardiovascular Center and by the Committee on Genetic Analysis and Gene Therapy of the National Cardiovascular Center.

#### DNA Studies

A promoter region and all of the 12 exon regions were sequenced in 190 of the subjects with MI (Fig 1) and we found variations that altered the amino acid sequences in exon 12 only. Next, we sequenced exon 12 in 589 control subjects and the remaining 189 subjects with MI. The variations in exon 12 were all determined by sequencing.

#### Statistical Analysis

All statistical analyses were performed with the JMP

**Table 1** Characteristics of the Study Population

	Control	MI	p-value
n	584	379	
Gender (% male)	49.3	85.5	<0.0001
Age (years)	70.6±0.3	58.0±0.4	<0.0001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.67±0.12	23.83±0.115	<0.0001
TC (mg/dl)	207.7±1.4	199.7±2.3	0.0030
HDL-C (mg/dl)	58.8±0.6	43.0±1.1 (n=224) (n=194)	<0.0001
Smoking			<0.0001
Current	93	228	
Past	163	74	
Never	328	77	
DM (%)	7.7	38.7	<0.0001
HT (%)	35.5	52.9	<0.0001

Data are mean±standard error. Differences between 2 groups (Control vs myocardial infarction (MI)) were calculated by t-test or  $\chi^2$  analysis.

BMI, body mass index; TC, total cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; DM, diabetes mellitus; HT, hypertension.

(Received May 30, 2005; revised manuscript received June 29, 2005; accepted July 5, 2005)

National Cardiovascular Center, Suita, Japan

Mailing address: Naoharu Iwai, MD, Research Institute, National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishirodai, Suita 565-8565, Japan. E-mail: iwai@ri.nccvc.go.jp

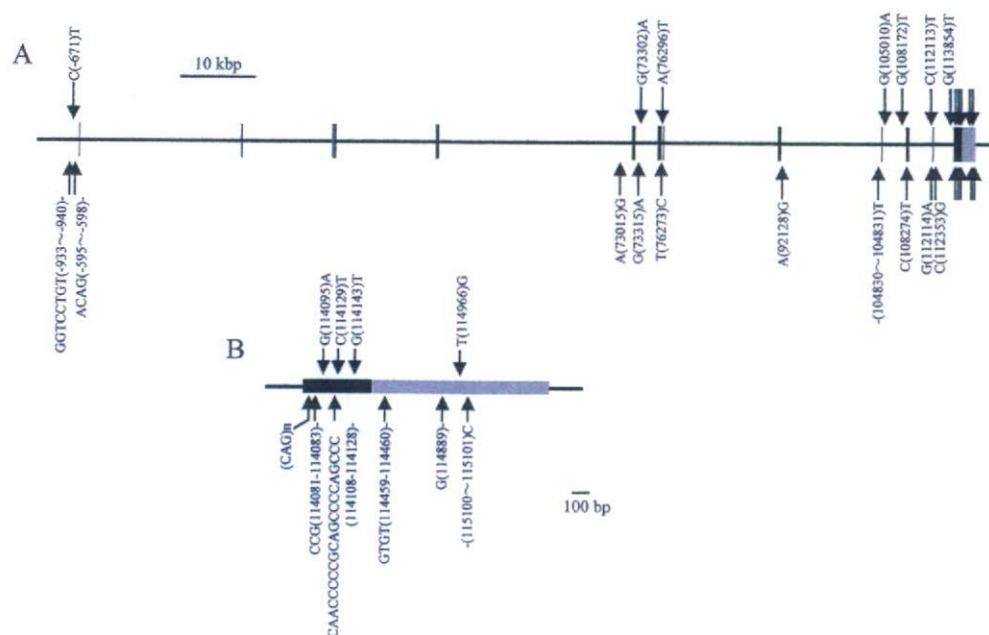


Fig 1. Scheme of the MEF2A gene. (A) Promoter region and all of the 12 exon regions are shown. (B) Expanded region of exon 12. The 5'- and 3'-UTR regions are indicated by gray boxes, and coding regions are indicated by black boxes. The 27 polymorphisms that were found are indicated by arrows.

statistical package (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) unless otherwise stated. Chi-squared analysis was performed to compare haplotype frequencies between the control and MI groups.

## Results

We found 27 variations in MEF2A (Table 2), and 4 variations in exon 12 that altered the amino acid sequence of the MEF2A protein (Fig 2). The number of polyglutamine tandem repeats (region A) varied between 4 and 15 (genotype 1), and the number of proline tandem repeats (region B) varied between 4 and 5 (genotype 2). The 21-bp deletion (7-amino acid deletion), which was originally implicated in an autosomal dominant form of CAD<sup>9</sup> was also observed in region C (genotype 3) (Fig 2). We found one nonsense mutation (R447X) in exon 12 in a MI subject, and it was localized just downstream of the 21-bp deletion site (Fig 3).

The haplotype frequencies defined by the 3 genotypes are shown in Table 3: there were no significant differences between the control and MI groups.

## Discussion

Wang et al reported that a mutation in the human MEF2A gene was responsible for an autosomal dominant form of CAD<sup>9</sup> but Weng et al could not find any MEF2A mutations in 300 cases of CAD.<sup>11</sup> Thus, the association between mutations of MEF2A and CAD is controversial!<sup>6,17</sup> and our results favors a lack of association.

Our results indicate that length polymorphisms in MEF2A do not contribute appreciably to MI in the Japanese population. Furthermore, the 21-bp deletion in MEF2A, which was originally implicated<sup>9</sup> did not seem to be associated with MI. The nonsense mutation (R447X) may affect susceptibility to MI, but the particular patient with this mutation had

the MI in his 70s, and had no family history of IHD. He also had 2 risk factors: diabetes mellitus and smoking. Thus, the impact of this mutation does not appear to be great.

We sequenced all the coding regions of MEF2A in 190 subjects with MI and found neither missense nor nonsense mutations, except for R447X. Taking all our results together, MEF2A polymorphism does not appear to contribute appreciably to MI in the Japanese population.

## Acknowledgments

This study was supported by the Ministry of Health, Labour and Welfare, a grant-in-aid from the Salt Science Research Foundation (No.05C5), and a grant-in-aid from the Uehara Memorial Foundation. The Program for the Promotion of Fundamental Studies in Health Science of the Organization for Pharmaceutical Safety and Research of Japan.

## References

- Cambien F, Poirier O, Lecerc F, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992; **359**: 641-644.
- Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, et al. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet* 2002; **32**: 650-654.
- Mukae S, Aoki S, Itoh S, Sato R, Nishio K, Iwata T, et al. Mitochondrial 5178A/C genotype is associated with acute myocardial infarction. *Circ J* 2003; **67**: 16-20.
- Ozaki K, Inoue K, Sato H, Iida A, Ohnishi Y, Sekine A, et al. Functional variation in LGALS2 confers risk of myocardial infarction and regulates lymphotoxin-alpha secretion in vitro. *Nature* 2004; **429**: 72-75.
- Ogawa M, Abe S, Biro S, Saigo M, Kihara T, Setoyama S, et al. R353Q polymorphism, activated factor VII, and risk of premature myocardial infarction in Japanese men. *Circ J* 2004; **68**: 520-525.
- Wang X, Ria M, Kelmenson PM, Eriksson P, Higgins DC, Samnegard A, et al. Positional identification of TNFSF4, encoding OX40 ligand, as a gene that influences atherosclerosis susceptibility. *Nat Genet* 2005; **37**: 365-372.
- Ozturk O, Ulgen MS, Tekes S, Ozturk U, Toprak N. Influence of