

200501169A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

環境ナノ粒子の動脈硬化促進メカニズムの解明
に関する研究

平成 17 年度 総括研究報告書

主任研究者 岩井 直温

(国立循環器病センター研究所)

平成 18 年 (2006) 年 4 月

目 次

I.	総括研究報告	
	環境ナノ粒子の動脈硬化促進メカニズムの解明に関する研究.....	1
II.	研究成果の刊行に関する一覧表.....	22
III.	研究成果の刊行物・別刷.....	23

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究）

総括研究報告書

環境ナノ粒子の動脈硬化促進メカニズムの解明に関する研究

主任研究者： 岩井 直温（国立循環器病センター研究所疫学部 部長）

本研究では、ナノ粒子・マテリアルの人体に対する影響を体系的に理解することを目的とする。特に、ナノ粒子の心血管系への医学的影響とそのメカニズムを、実験動物と培養細胞を用いて網羅的に解析する。これらの調査結果は、ナノ粒子の人体に対するリスク評価の基礎データとなりうる。ナノ粒子の安全性を評価することは国民の健康維持に貢献するばかりでなく、今後の産業開発のあり方を問う上でも不可避であると考えられる。

分担研究者： 山脇 英之（国立循環器病センター研究所疫学部）

A. 研究目的

本研究では、ナノ粒子の心血管系に対する影響とそのメカニズムを解明し、リスク評価の基礎データを整備することを目的とする。

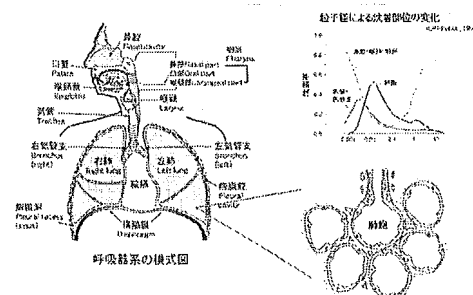
背景：

ナノテクノロジーは、原子を操作し、ウイルスレベルの大きさの小さな人工分子を作り出せる技術である。ナノテクノロジーにより生み出された物質は物理化学的性質が未知の特性を帯びるため、その応用範囲は広範にわたり、電子工学、光学、材料物質、触媒作用およびドラッグデリバリーの各分野で実用化が進んでいる。しかしながら、急速な技術革新はそれ自身の功罪も含んでいる。ナノテクノロジーによって生み出された物質（ナノ粒子）の物理化学的性質のみならず、人間に対するナノ粒子がもつ潜在的な毒性についての知見は未だ限

られたものである。これまでの研究からナノ粒子は生体内で、有毒なフリーラジカルを生成すると推察されており、その結果、体内で炎症や組織損傷を引き起こすと考えられている。

人間の呼吸器は、口腔、鼻腔を經由して、

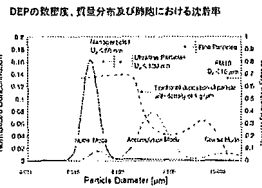
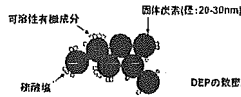
粒子状物質の呼吸器系への沈着



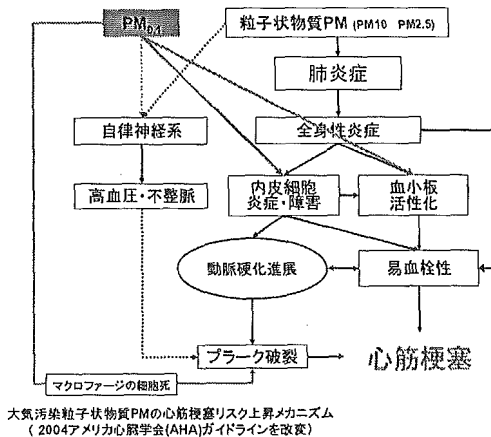
気管から気管支へと枝分かれしながら、肺胞へと達する。粒子が吸引されると粒径の大きい物質は気道壁に付着し、それよりもさらに小さい粒子、ナノ粒子などは肺胞上皮細胞に沈着する（下図）。

実際にアメリカ及びヨーロッパの大規模疫学調査により、大気中に排出された微小粒子状物質の人体への暴露が循環器系疾患の罹病率・致死率を有意に上昇させることが知られている。

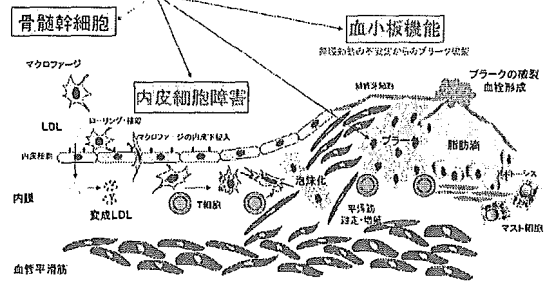
ディーゼル微粒子の形態



近年、PM_{0.1} (PM = Particulate Matter) と呼ばれる粒径 100 nm 以下のナノ粒子が肺から吸入された後、循環血中に移動することがヒトで確認された。このことは、ナノ粒子が直接、血管系（特に血管内皮細胞）及び血栓・線溶系に作用し、内皮細胞障害・炎症性変化・易血栓性を起こし、虚血性心疾患に対するリスクとなっている可能性を示唆するが、その詳細なメカニズムは不明である（下図）。



ナノ粒子の作用点はどこか？



動脈硬化発症メカニズムを上図に示した。

動脈硬化は最初に内皮細胞障害から始まり、マクロファージ系単球が血管内膜へ移動し、そして酸化 LDL と T 細胞によってマクロファージへと分化し、やがて酸化 LDL を取り込んで泡沫化する。泡沫化したマクロファージから様々なサイトカイン類が分泌され、平滑筋細胞を遊走し、動脈硬化が進展する。やがて、不安定化したプラークは破綻し、血小板凝集を引き起こし、血栓を形成して心筋梗塞になると考えられている。しかし、この発症過程でナノ粒子がどこで、どのような作用をするのかは不明である。

B. 研究方法

ナノ粒子の物理的性質の解析と、内皮細胞、マクロファージを中心としたナノ粒子の培養細胞への影響（主に急性効果）を調べ、解析した。更に、動物実験を中心とした、ナノ粒子吸入あるいは経口投与による生体内分布の解明及び生理機能（炎症反応・血小板凝集能・凝固能）への影響調査を行った。

C. 研究結果

1. ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)

に内燃機関（ディーゼルエンジンなど）から排出されるナノ粒子を想定し、カーボンブラック（CB）を24時間処置し、以下の項目を検討した。

- 1) 光学顕微鏡、電子顕微鏡によるCBの内皮細胞に対する形態学的影響を調べた。
- 2) LDH（乳酸脱水素酵素）放出量を指標とした細胞毒性
- 3) WST-8（水溶性テトラゾリウム塩）を用いた細胞増殖能の変化
- 4) ウエスタンブロット、ELISA法を用いた炎症性蛋白質、ケモカイン発現の変化
- 5) マイクロアレイ法を用いた遺伝子発現プロファイリング

結果

1) 使用したCBの物理的性質を粒径測定器（UPA-EX150, Nikkiso, Japan）を用いて測定した。その結果、CBは質量密度による平均粒径が250 nmであることが判明した（Figure 1）。

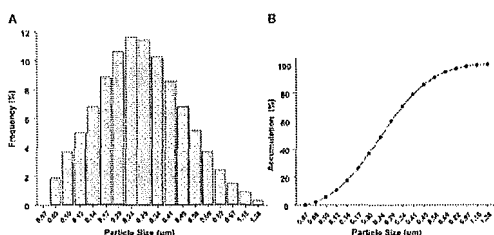


Fig. 1. Particle size of carbon black suspended in culture media. (A) Frequency; (B) accumulation.



カーボンブラックの電子顕微鏡写真（日本粉体工業技術協会）

2) カーボンブラック処置後血管内皮細胞の形態学的変化

HUVECにCB（100 µg/ml）を24時間処置すると細胞障害により誘導された形態学的変化：細胞内の食胞形成、細胞間接着の不均一性、細胞密度の減少が光学顕微鏡レベルで観察された（Figure 2A - B）。さらに電子顕微鏡観察から、CBの細胞質内食胞への取り込みおよびオートファジーの顕著な亢進が確認された（Figure 3A-C）。

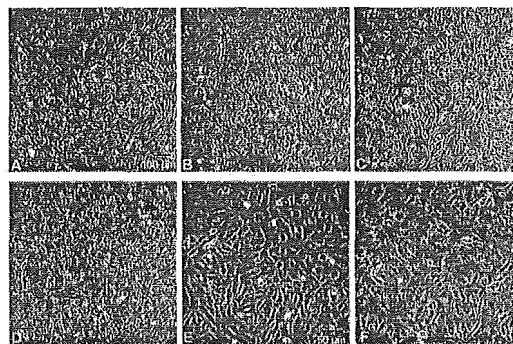


Fig. 2. Representative photomicrographs of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) treated with carbon black (CB). HUVECs at different concentrations were treated with CB (A, E: 0 µg/ml; B: 1 µg/ml; C: 10 µg/ml; D, E: 100 µg/ml) for 24 h. Scale bar: 100 µm (A-E) and 50 µm (E, F).

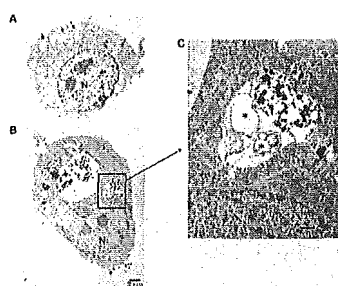


Fig. 3. Ultrastructural forms of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) treated with carbon black (CB). HUVECs were treated with CB at concentrations of 100 µg/ml for 24 h. (A) shows a large vacuole in the cytoplasm. (B) shows a large vacuole and a smaller one. (C) shows a large vacuole and a smaller one. Scale bar: 2 µm (A, B) and 500 nm (C).

3) カーボンブラックの血管内皮細胞に対する細胞毒性と増殖抑制

CBによる細胞障害の程度を定量的に測定するためLDHアッセイを行った。その結果、内皮細胞からのLDH放出量はCB処理により濃度依存的（1-100 µg/ml, 24 h）な細胞障害が誘導された（Figure 4）。

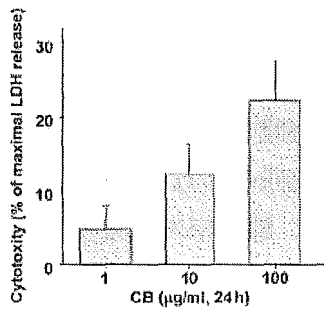


Fig 4. Carbon black (CB) induced cytotoxic injury in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in a dose-dependent manner. HUVECs at ~90% confluence were treated with CB (1–100 µg/ml) for 24 h. Lactate dehydrogenase (LDH) released into supernatant was measured and maximal LDH release was assessed by freeze-thaw lysis of cells. Cytotoxicity was expressed relative to maximal LDH release (n=6–8).

また、細胞増殖能の変化を調べるために約30%コンフルエントのHUVECにCBを24時間処理した後、WST-8を用いて細胞増殖能を測定した。その結果、CBは濃度依存的(1–100 µg/ml)に内皮細胞増殖抑制効果を持つことが示唆された。100 µg/mlのCB処置群は、コントロール群(CB:0 µg/ml)と比較すると46.7%程度細胞数が少なかった(Figure 5)。

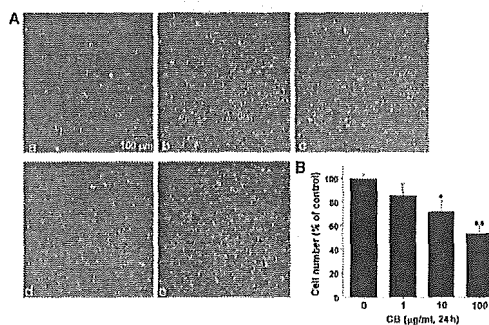


Fig 5. Carbon black (CB) inhibited cell growth in a dose-dependent manner. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) at ~30% confluence were treated with CB (1–100 µg/ml) for 24 h. (A) Representative phase-contrast images of CB for 24 h at 0, 1, 10, and 100 µg/ml. (B) Total number of living cells was counted using water-soluble tetrazolium salt (WST-8). Results are shown as percentage relative to control (n=3) and **p<0.01 compared with control.

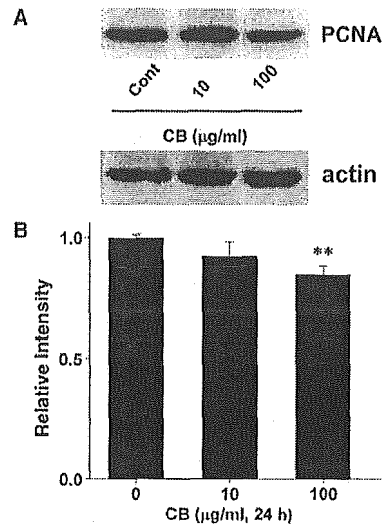


Fig 6. Carbon black (CB) inhibited expression of proliferation marker in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). After HUVECs at ~30% confluence were treated with CB (0, 10 or 100 µg/ml) for 24 h, total cell lysates were harvested. (A) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression determined by Western blotting. Equal protein loading was confirmed based on total actin antibody. (B) PCNA expression is shown as the fold-change relative to control (n=7–13). **p<0.01 compared with control.

また、細胞増殖におけるマーカー蛋白質の1つ、PCNA(proliferating cell nuclear antigen)の蛋白発現がCB処置(100 µg/ml, 24 h)により有意に減少した(Figure 6)。

4) カーボンブラック処置による内皮細胞の炎症性マーカー蛋白質の変化

内皮細胞の炎症性変化は、動脈硬化発症に密接に関与することが知られている。その中でも最も動脈硬化発症に深く関与する炎症性ケモカイン MCP-1(monocyte chemo attractant protein-1)の産生量をELISA法により測定した。その結果、CB処置によりコントロールと比較して約6.6倍増加することが判明した(Figure 7A)。

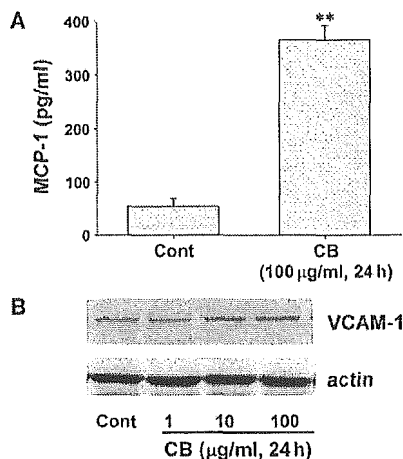


Fig 7. Carbon black (CB) increased proinflammatory chemokine but not leukocyte adhesion molecule in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). After HUVECs at ~90% confluence were treated with CB (1–100 µg/ml) for 24 h, (A) culture medium and (B) total cell lysates were harvested. (A) Monocyte chemoattractant protein (MCP-1) released into supernatant was measured and its concentration expressed as pg/ml. **p<0.01 compared with control (n=5). (B) Vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 expressions determined by Western blotting. Equal protein loading was confirmed using total actin antibody (n=4).

それに対して、ウエスタンブロット法により白血球接着因子 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule)発現はほとんど変化しないことが判明した (Figure 7B)。

5) カーボンブラック処置による内皮細胞での動脈硬化誘導性

動脈硬化は内皮細胞での膜の不安定性と一酸化窒素 (NO) 産生の減少により誘導されることが示唆されている。そこで、CB 処置による Connexin37(Cx37)と内皮細胞型 NO 合成酵素 (eNOS: endothelial NO synthase) の蛋白発現をウエスタンブロット法により検討した結果、共に CB 濃度依存的に有意に減少することが判明した。

Cx37 は CB 処置 (100 µg/ml) により約 20.8 %、eNOS は約 43.4 %減少することがそれぞれ示唆された (Figure 8)。

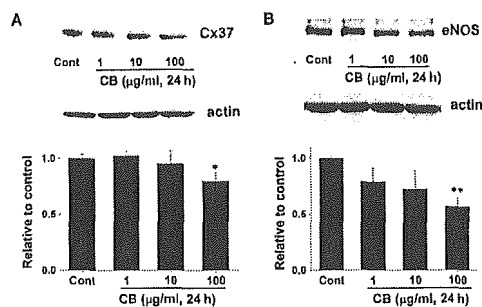


Fig 8. Carbon black (CB) inhibited expression of connexin37 (Cx37) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). After HUVECs at ~90% confluence were treated with CB (1–100 µg/ml) for 24 h, total cell lysates were harvested. (A) Cx37 and (B) eNOS expressions were determined by Western blotting. Equal protein loading was confirmed using total actin antibody. Expressions of Cx37 and eNOS are shown as the fold-change relative to control (cont) of total actin (n=3–5). *p<0.05 and **p<0.01 compared with control.

6) カーボンブラック処置による遺伝子発現変化

Affimetrix human genome U 133 plus 2.0 chip を用いたマイクロアレイ解析から、CB 処置 (100 µg/ml, 24 h) により ICAM 1 (intracellular adhesion molecule 1, 5.3 fold increased vs Control), IL-8 (interleukin 8, 2.3 fold increase, PTGS2 (prostaglandine-endoperoxide synthase, 3.6 fold increased), CCL2 (chemokine [C-C motif] ligand 2= MCP-1, 4.8 fold increased), HMOX 1 (heme oxygenase 1, 3.2 fold increased), and SELE (selectin E, 7.0 fold increased)など炎症性メディエーター遺伝子発現が増加することが示唆された。

Table 1. List of Top 40 Probe Sets Upregulated by Carbon Black (CB) Identified on U133-2.0chip

Probe set ID	Official name	Gene symbol	Gene name	Ratio 2 (fold)	Ratio 2 (fold)
24969_a_at	NM_022162	IL8	Interleukin-8 (CXCL8)	2.05	2.23
24969_s_at	BC05941	IL8	Interleukin-8 (CXCL8)	2.25	2.43
24973_s_at	AB03721	ICAM1	Intracellular adhesion molecule 1 (CD54)	5.20	2.17
24985_s_at	NM_005207	ICAM1	Intracellular adhesion molecule 1 (CD54)	5.20	5.11
24972_s_at	NM_005204	SELE	Selectin E	7.05	4.95
24965_s_at	NM_002521	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	28.41	3.97
24989_s_at	NM_002522	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	2.29	2.14
24965_at	NM_002521	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	4.13	2.31
24988_s_at	NM_002521	ICAM1	Intracellular adhesion molecule 1	2.56	5.10
24974_at	NM_002521	ICAM1	Intracellular adhesion molecule 1	2.00	2.29
24972_at	NM_002521	ICAM1	Intracellular adhesion molecule 1	4.28	4.54
24997_s_at	AF092320	SELE	Selectin E	2.57	2.27
24972_s_at	NM_002521	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	13.59	4.17
24969_s_at	NM_002521	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	1.76	4.66
24974_at	NM_002521	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	2.26	2.43
24972_at	NM_002521	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	21.54	7.03
24949_s_at	NM_015400	FST	Follistatin	1.91	1.15
24979_s_at	NM_001249	SELE	Selectin E	2.28	2.02
24969_at	NM_002521	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	1.78	2.16
24972_s_at	NM_002521	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	2.11	2.52
24972_at	NM_002521	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	6.91	4.27
24965_s_at	NM_002521	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	31.65	41.27
24962_s_at	NM_002521	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	2.55	1.69
24974_s_at	NM_002521	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	6.87	2.54
24974_at	NM_002521	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	2.65	4.65
24979_s_at	NM_002521	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	2.03	2.56
24979_at	NM_002521	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	5.57	12.67
24977_s_at	AF092320	SELE	Selectin E	2.23	4.05
24979_s_at	AF092320	SELE	Selectin E	1.24	2.25
24979_at	AF092320	SELE	Selectin E	4.64	5.64
24974_s_at	AF092320	SELE	Selectin E	2.57	2.69
24974_at	AF092320	SELE	Selectin E	2.99	2.68
24979_s_at	AF092320	SELE	Selectin E	2.45	2.12
24979_at	AF092320	SELE	Selectin E	2.25	2.07

現低下など、動脈硬化発症の初期過程に深く関与することが示唆されたことより、心疾患の新たなリスク因子である可能性が提示できたと考えられる。

2. ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に電子産業から産生されるナノ粒子を想定し、水溶性フラーレン {C60(OH)₂₄} を24時間処置し、以下の項目を検討した。

- 1) 光学顕微鏡による C60(OH)₂₄の内皮細胞に対する形態学的影響を調べた。
- 2) LDH (乳酸脱水素酵素) 放出量を指標とした細胞毒性
- 3) WST-8 (水溶性テトラゾリウム塩) を用いた細胞増殖能の変化
- 4) ウェスタンブロット法を用いた細胞死、ユビキチン化に関わる蛋白質の変化
- 5) 電子顕微鏡による内皮細胞オートファジー様構造物の形態学的変化とオートファジーに関わる蛋白質発現の変化
- 6) 低濃度 C60(OH)₂₄の内皮細胞に対する慢性効果
- 7) マイクロアレイ法を用いた遺伝子発現プロファイリング

結果

1) 水溶性フラーレン {C60(OH)₂₄} 処置後血管内皮細胞における形態学的変化
水溶性フラーレン {C60(OH)₂₄} (東京プログレスシステム) 平均粒子径は粒子径分析器(UPA-EX150, Nikkiso)により約7.1 nmであることが判明した。HUVEC に

C60(OH)₂₄ (1-100 μg/ml) を24時間処置した結果、CBの場合と同様に細胞質内に食胞形成、細胞間接着の不均一性、細胞密度の減少が光学顕微鏡により観察された (Figure 1)。この結果より、CBと同様にC60(OH)₂₄もHUVECに対して細胞障害を引き起こすことが示された。

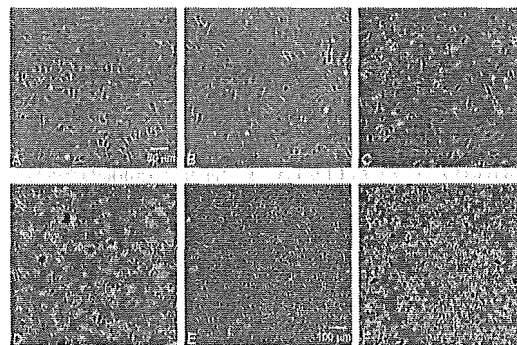


Fig.1

Figure 1. Representative photomicrographs of HUVECs treated with hydroxyl fullerene C60(OH)₂₄. HUVECs at ~90% confluence were treated with C60(OH)₂₄ (A and E: 0 μg/ml; B: 1 μg/ml; C: 10 μg/ml; D and F: 100 μg/ml) for 24 h. Scale bar: 50 μm(A-D) and 100 μm (E, F).

2) 水溶性フラーレンの血管内皮細胞に対する細胞毒性および細胞増殖抑制効果
C60(OH)₂₄による細胞障害を培地中のLDH (乳酸脱水素酵素) 活性を定量的に測定した。その結果、C60(OH)₂₄処置(100 μg/ml, 24 h)により細胞障害が誘導された (Figure 2A and B)。

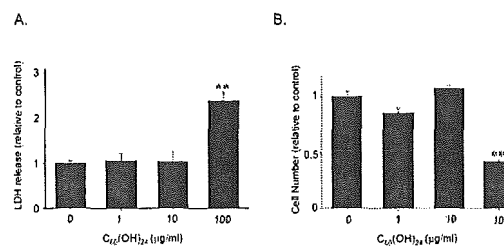


Figure 2. Fullerene induced cytotoxic injury in HUVEC. HUVECs at ~90% confluence were treated with C60(OH₂₄)(1-100 μ g/ml, 24 h). Culture medium was then collected. (A) Lactate dehydrogenase (LDH) released into supernatant was measured using a commercially available kit. Cytotoxicity was expressed relative to basal LDH release in controls (n=4-11). (B) Living cell number was calculated using water-soluble tetrazolium salt (WST-8) (n=3). ***p*<0.01

3) 水溶性フラーレンによる WST-8 (水溶性テトラゾリウム塩) を用いた血管内皮細胞増殖能の変化

C60(OH₂₄)の HUVEC に対する細胞増殖能の変化を調べた結果、C60(OH₂₄) (1-100 μ g/ml) の濃度依存的に細胞増殖抑制効果が確認された。特に C60(OH₂₄)の濃度が 100 μ g/ml ではコントロールと比較して約 64%細胞増殖が抑制された (Figure 3A and B)。

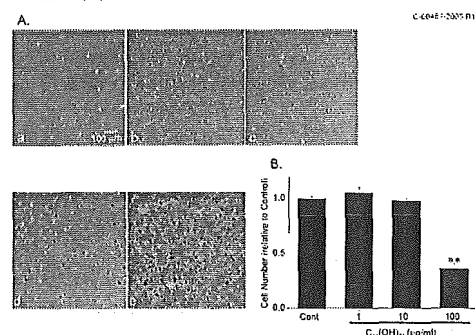


Figure 3. Fullerene inhibited cell growth in HUVECs. HUVECs at ~30% confluence were treated with C60(OH₂₄)(1-100 μ g/ml) for 24 h. (A) Representative photomicrographs are shown (a: at start; b: 0 μ g/ml; c: 1 μ g/ml; d: 10 μ g/ml; e: 100 μ g/ml for 24 h). Scale bar: 100 μ m. (B) Total number of living cells was counted using water-soluble tetrazolium salt (WST-8). Results are shown as relative to controls (n=6). ***p*<0.01 compared to controls.

4) 水溶性フラーレンはカスパーゼ 3 を介

さない細胞死を誘導し、細胞内蛋白質のコビキチン化を促進する。

C60(OH₂₄)による細胞障害、細胞死がアポトーシスによるか否かを活性化型 caspase3 の発現をウエスタンブロット法により検討した。その結果、HUVEC は血清除去により活性化型 caspase3 とその基質である分解型 PARP が確認されたのに対して、C60(OH₂₄) (100 μ g/ml, 24 h)で処置した HUVEC は活性化型 caspase3 と分解型 PARP は極わずかししか検出されなかった。この結果から、C60(OH₂₄)処理による HUVEC の細胞死は caspase3 を介さないことが明らかになった (Figure 4)。

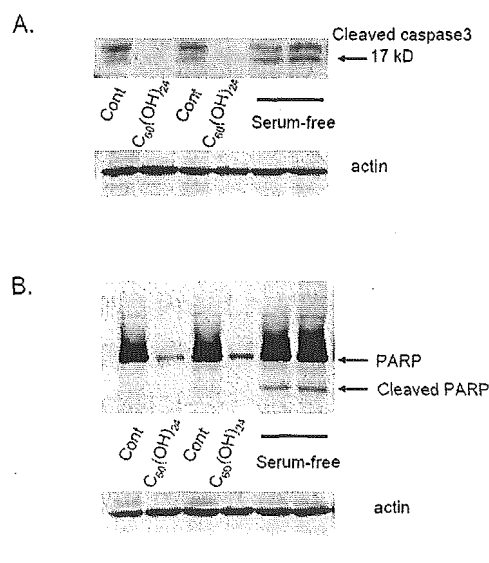


Figure 4. Fullerene does not induce apoptosis in HUVECs. After HUVECs~90% confluence were treated with C60(OH₂₄) for 24 h, total cell lysates were harvested. (A) Cleaved caspase3 (17 KD) and Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) expressions were determined using Western blotting. Equal protein loading was confirmed using total actin antibody.

そこで C60(OH₂₄)による細胞死のメカニズムを明らかにするため、ユビキチンプロ

テアソーム系を介する経路を想定し、C60(OH₂₄)処置後の HUVEC 蛋白質のユビキチン化とプロテアソームの酵素活性を検討した。その結果、HUVEC の細胞内蛋白質は C60(OH₂₄)の濃度依存的にユビキチン化が促進されることが明らかとなった (Figure 5A)。次に、C60(OH₂₄)がプロテアソームの酵素活性を阻害するか否かを検討した結果、プロテアソームのユビキチン化蛋白質分解活性には影響しないことが明らかになった (Figure 5B)。以上の結果から、C60(OH₂₄)は濃度依存的に HUVEC 蛋白質のユビキチン化を促進し、細胞内にユビキチン化蛋白質が異常蓄積する可能性が示唆された。しかしながら、蛋白質のユビキチン化の誘導はプロテアソームに依存せず、未知の経路によるユビキチン化蛋白質の過形成が HUVEC の細胞死を誘導することを示した。

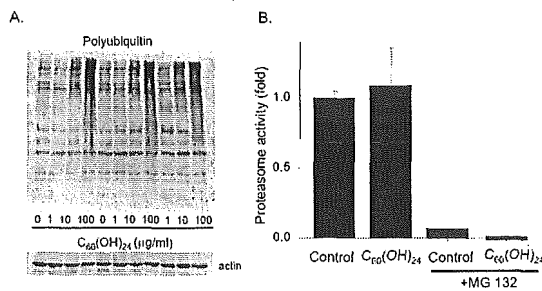


Figure 5. Fullerene treatment induces polyubiquitilation in HUVECs. After HUVECs at ~90% confluence were treated with C60(OH₂₄) (1-100 μg/ml) for 24 h, total cell lysates were harvested. (A) Accumulation of polyubiquitin was determined by Western blotting. Equal protein loading was confirmed using total actin antibody (n=8). (B) Activity of the 20S proteasome was determined using a commercially available kit. Activity of 20S proteasome was measured by fluorescence of liberated AMC using excitation and emission wavelengths at

340 and 450 nm. Results are shown as relative to controls (n=3).

5) 電子顕微鏡による内皮細胞オートファジー様構造物の形態学的変化とオートファジーに関わる蛋白質発現の変化
C60(OH₂₄)処置 (100 μg/ml) によって HUVEC の細胞内構造物がどのように変化するか、電子顕微鏡により観察した。その結果、C60(OH₂₄)処置によりおそらくユビキチン化蛋白質がオートファゴソーム様食胞内に異常蓄積することが判明した (Figure 6B-C)。

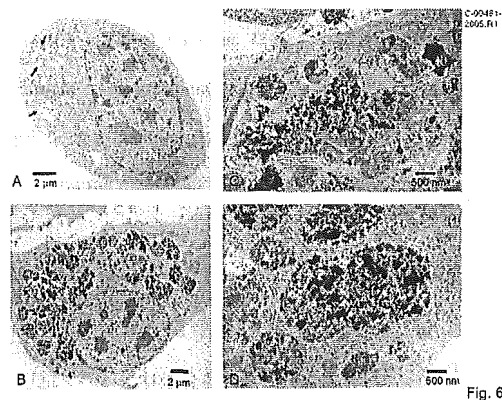


Figure 6. Ultra-structural features of HUVECs treated with C60(OH₂₄). HUVECs were treated without (A; Control) or with 100 μg/ml C60(OH₂₄) (B-D) for 24 f. N; nucleus. Arrows: vacuoles with phagocytotic function. Scale bar: 2 μm (A and B) and 500 nm (C and D).

次に、これらの食胞がオートファゴソームであるか否かを、オートファゴソームのマーカー蛋白質である LC3II の発現をウエスタンブロット法により検討したところ、C60(OH₂₄)処置した HUVEC に有意な発現の亢進が見られた。以上の結果から、C60(OH₂₄)処置による HUVEC の細胞障害および細胞死はユビキチン化蛋白質のオー

トファゴソーム内での異常蓄積が原因である可能性が示唆された(Figure 7)。

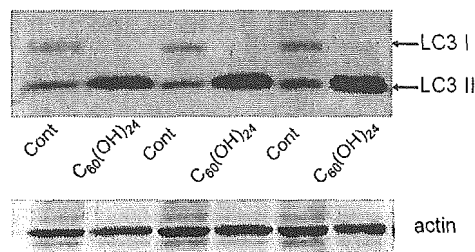


Figure 7. Fullerene induced the formation of autophagosomes in HUVECs. After HUVECs at ~90% confluence were treated with 100 $\mu\text{g/ml}$ C60(OH₂₄) (B-D) for 24 h, total cell lysates were harvested. Autophagosomes were detected using Western blotting with LC(light chain)3 antibody (n=4). Upper band represents cytosolic LC3 and lower band represents membrane bound LC3II, a typical marker for autophagosomes. Equal protein loading was confirmed using total actin antibody.

6) 低濃度水溶性フラーレン {C60(OH₂₄)} の血管内皮細胞に対する慢性効果

低濃度 C60(OH₂₄) (1 $\mu\text{g/ml}$ and 10 $\mu\text{g/ml}$) 処置による HUVEC の形態学的変化を長期間 (10日間) 細胞培養し、光学顕微鏡で観察した。1 $\mu\text{g/ml}$ の C60(OH₂₄) で処置したところ、HUVEC の形態学的変化はコントロールと同様に培養開始から 10日目まで見られなかった。それに対して、10 $\mu\text{g/ml}$ の C60(OH₂₄) で処置した場合、コントロールと同様に C60(OH₂₄) 処置後 2 日目で細胞はコンフルエントに達したが、細胞の形状が変化し、丸い形の細胞が多数観察された。最後の継代から 4 日間の培養でコントロールの細胞は再びコンフルエントに達したが、C60(OH₂₄) で処置した細胞は、細胞内の食胞数が増加し、更に細胞の

形状が丸くなり、細胞の接着性や細胞増殖速度も低下することが判明した。しかし、最後の継代から 6 日目で C60(OH₂₄) 処置の細胞数が再びコンフルエントに達したことから、C60(OH₂₄) に抵抗性のある細胞が出現し、増加した可能性が示唆された。

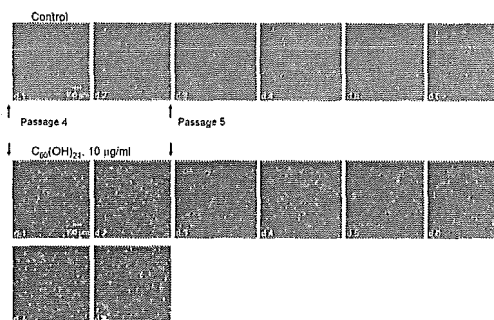


Figure 8. Chronic effects of low dose fullerene on HUVECs. HUVECs were treated without (Control) or with 10 $\mu\text{g/ml}$ C60(OH₂₄) for 8 days. Cells from passage 4-5 were used. Treatment was started soon after splitting cells from passage 3 to 4, culture media containing fullerene were changed every 2 days. Representative morphological features are shown. Scale bar: 100 μm . Arrows show timing of splitting.

7) 水溶性フラーレン処置による遺伝子発現変化

Affimetrix Human genome U 133 plus 2.0 chip を用いたマイクロアレイ解析から、C60(OH₂₄) (100 $\mu\text{g/ml}$, 24 h) 処置によりユビキチンプロテアソーム 機構に関わる遺伝子群 (HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2 (fold ratio: 2.3), ubiquitin specific protease 31 (ratio: 1.7), ubiquitin specific protease 32 (ratio: 1.), and ubiquitin-conjugating enzyme E2 (ratio: 1.5) の発現が亢進することが判明した。

考察

これらの結果から、水溶性フラレンは血管内皮細胞に直接作用し、細胞障害性並びに増殖抑制効果を持つことが明らかになった。水溶性フラレンによる細胞障害のメカニズムは（1）細胞内のオートファゴソーム内でユビキチン化蛋白質の異常蓄積による物理的要因、（2）CBと同じく物理的に障害を受けた細胞から産生されるサイ

トカイン、活性酸素産生などによる2次的要因が推察される。しかしながら、CBによる内皮細胞への作用と水溶性フラ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。

3. マクロファージをカーボンブラック (CB)、水溶性フラレン {C60(OH₂₄)} で長期間処置し、以下の項目について検討した。

- 1) マウスマクロファージ (RAW264.7) をカーボンブラック (0~100 μg/ml) で長期間処置し、光学顕微鏡による形態学的変化の観察と、LDH アッセイによる細胞障害作用並びに変性 LDL の影響を検討した。
- 2) マウスマクロファージ (RAW264.7) を水溶性フラレン (0, 20, 100 ng/ml) で長期間処置し、光学顕微鏡による形態学的変化の観察と、LDH アッセイによる細胞障害作用並びに変性 LDL の影響を検討した。
- 3) マウスマクロファージ (RAW264.7)

を水溶性フラーレン (0, 20, 100 ng/ml) で処置後、血小板活性化因子や血栓促進因子の発現を検討した。

結果

1) 長期間カーボンブラック処置によるマクロファージの光学顕微鏡像並びに細胞障害作用

カーボンブラックのマクロファージに対する慢性効果を検討するため、カーボンブラックを細胞へ添加後24時間、16日間、50日間目の細胞の形態を観察した。その結果、カーボンブラックは24時間後に速やかにマクロファージに貪食されたが、形態学的変化は観察されなかった (Figure 1d A 上段)。さらに長期間 (16, 50日間) 培養した結果、低濃度の CB ではコントロールとほぼ同じように形状の変化が見られないが、高濃度 (100 $\mu\text{g/ml}$) の培養条件では細胞自体の色が黒色に変化した (Figure 1d B and C 上段)。しかしながら、顕著な細胞形態学的変化は見られず、細胞障害作用は50日間の培養でも確認できなかった (Figure 1A-C 下段)。CB 添加の培地で48日間培養後、酸化 LDL (100 $\mu\text{g/ml}$) を加えて2日間培養し、その後 LDH アッセイとオイルレッド O で染色した結果、CB の濃度依存的に細胞障害作用が亢進し、マクロファージ内の脂肪滴も CB の濃度依存的に増加し、泡沫化することが明らかになった (Figure 2A and B)。

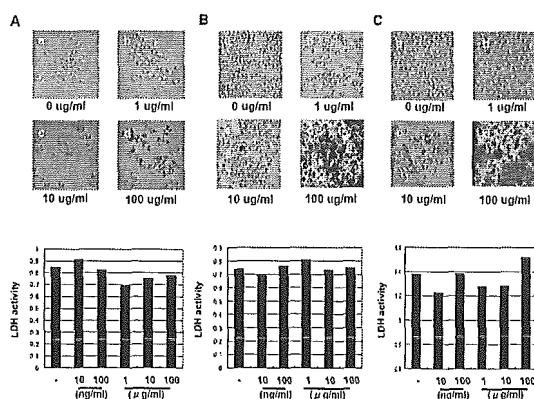


Figure 1.

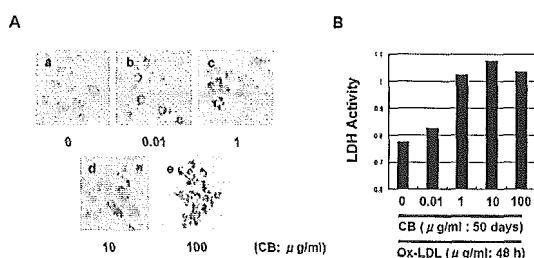


Figure 2.

2) 長期間低濃度水溶性フラーレン {C60(OH₂₄)} 処置によるマクロファージの光学顕微鏡像並びに細胞障害作用

低濃度水溶性フラーレン (20 ng/ml) で10日間マクロファージを処置した後、光学顕微鏡で観察した結果、24時間後の細胞形態にはコントロール、C60(OH₂₄)処置ともに変化、差異は見られなかったが、10日間の C60(OH₂₄)処置により、マクロファージの細胞形態は活性化型へと変化し、これらのマクロファージでファゴソーム様構造物が多数形成されることが判明した (Figure 3 A a-d)。この細胞をギムザ染色したところ、明瞭にファゴソーム様細胞内構造物が C60(OH₂₄)特異的に確認された

(Figure 3 B b arrow heads).

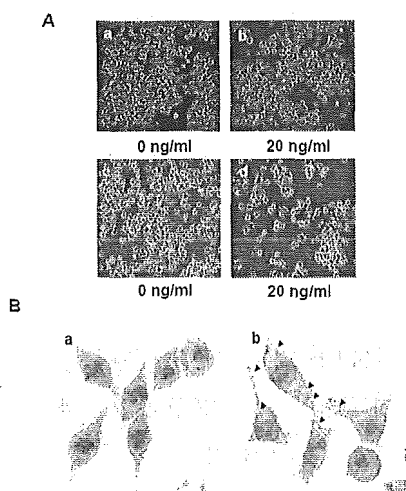


Figure 3.

しかし、内皮細胞と異なり、ファゴソーム内に高密度凝集物は見られなかった。水溶性フラレン処置後8日間目に酸化 LDL (100 μ g/ml) を添加しさらに2日間の培養後、オイルレッド O 染色を試みた結果、C60(OH₂₄)単独ではオイルレッド O で染色されなかったが、酸化 LDL を同時に添加すると C60(OH₂₄)の濃度依存的にオイルレッド O のシグナルが増大した (Figure 4 Aa-f)。さらに細胞障害を LDH 活性で測定した結果、C60(OH₂₄)と酸化 LDL が共存すると C60(OH₂₄)の濃度依存的に細胞障害が増加することが明らかになった (Figure 4B)。

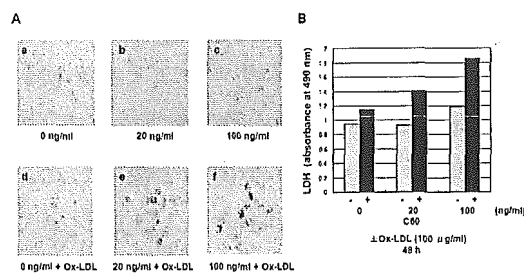


Figure 4.

この条件とは対照的に先に酸化 LDL(100 μ g/ml)で5日間処置後、C60(OH₂₄) (0, 20, 100 ng/ml) を添加し、2日後にオイルレッド O で染色した結果、C60(OH₂₄)依存的に泡沫化が増大することが判明した (Figure 5Aa-c)。同時に細胞増殖能を WTS-8 で測定した結果、C60(OH₂₄)依存的に細胞増殖が抑制することが判った (Figure 5B)。

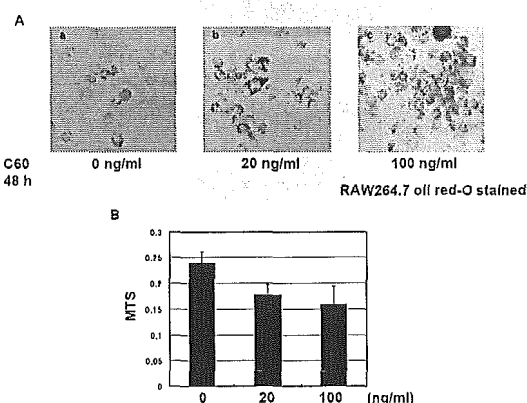


Figure 5.

3) 水溶性フラレン {C60(OH₂₄)} で処置後、マトリクスメタロプロテアーゼ-9 (pro-MMP-9) の発現分泌量と Tissue factor の遺伝子発現
水溶性フラレン (0, 20, 100 ng/ml) で8日間処置後、酸化 LDL (100 μ g/ml) を添加し更に2日間培養した。この培養液中に分泌された pro-MMP-9 量をサンドイッチ ELISA 法で定量した結果、C60(OH₂₄)添加で pro-MMP-9 の分泌が有意に増加することが判明した。この分泌は酸化 LDL には影響されないことが明らかになった (Figure 6A)。同様にマクロファージでの Tissue factor mRNA 発現を RT-PCR 法で検討した結果、酸化 LDL の有無に関係なく C60(OH₂₄)依存的に mRNA 発現が亢進した (Figure 6B)。

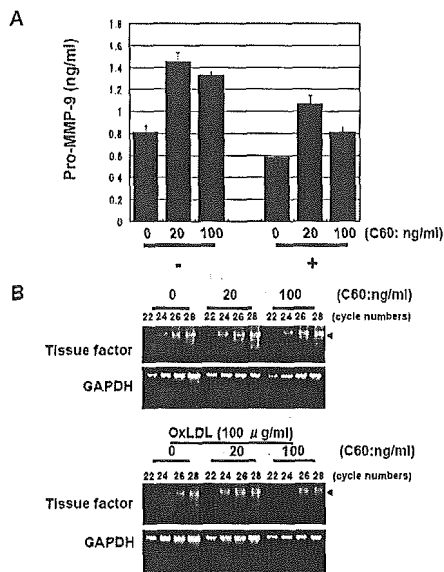


Figure 6.

考察

CB, C60(OH₂₄)はマクロファージに対し直接作用しない可能性が示唆された。しかし、同時に変性 LDL のひとつである酸化 LDL と共に処置するとナノ粒子の濃度依存的に細胞障害作用、増殖抑制効果があることが明らかになった。酸化 LDL は動脈硬化発症に深く関与していることが明らかになっているが、この実験結果は血中にナノ粒子が存在するとマクロファージが刺激誘導され、酸化 LDL を取り込むことによって泡沫化する可能性を示唆した。ナノ粒子は血管内皮細胞に作用するのみならず、マクロファージにも間接的に作用し、細胞障害作用、動脈硬化進展、プラークの破綻、血小板活性化、および血栓形成に関与する可能性が示唆された。

4. カーボンブラック (CB)、水溶性フラレーン {C60(OH₂₄)} の血小板凝集反

応に対する作用を検討した。

- 1) ADP の血小板凝集反応に対するカーボンブラック、水溶性フラレーンの作用
- 2) コラーゲンの血小板凝集反応に対するカーボンブラック、水溶性フラレーンの作用
- 3) セロトニンの血小板凝集反応に対するカーボンブラック、水溶性フラレーンの作用

結果

- 1) ADP のウサギ血小板凝集反応に対する CB, C60(OH₂₄)の作用

CB, C60(OH₂₄)のウサギ血小板凝集反応を検討するため、全血自動血小板凝集反応測定装置を用いて測定した。始めに CB, C60(OH₂₄) (各 5 μg/ml) の血小板に対する直接的な作用を検討した。その結果、CB, C60(OH₂₄)ともに単独では血小板凝集反応を起こさないことが判明した (Figure 1 上図)。次に ADP の血小板凝集反応に対する CB, C60(OH₂₄)の相乗効果を検討した。その結果、CB (100 μg/ml) は高濃度でも相乗効果を示さなかった。それに対して、C60(OH₂₄)は濃度依存的に ADP の血小板凝集反応を促進した (Figure 1 下図)。次に C60(OH₂₄)の相乗効果のメカニズムを検討するため ADP 受容体のアンタゴニスト; 塩酸チクロピジンに対する作用を検討した。その結果、2 mM の塩酸チクロピジンで 80 %以上血小板凝集反応が抑制されたが (Figure 2 上図)、C60(OH₂₄) (2.5, 10 μg/ml) で前処理すると塩酸チクロピジン(2

mM)の阻害効果が約 30 %減少することが判明した (Figure 2 下図)。

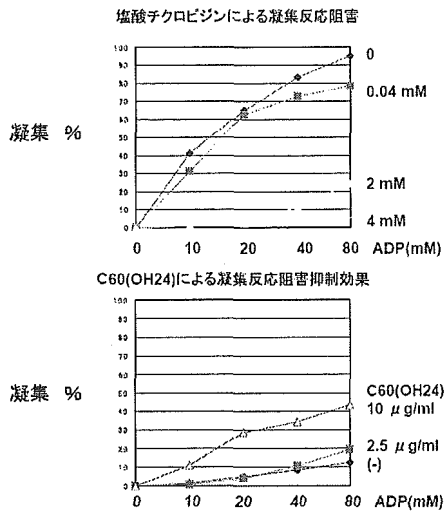


Figure 1.

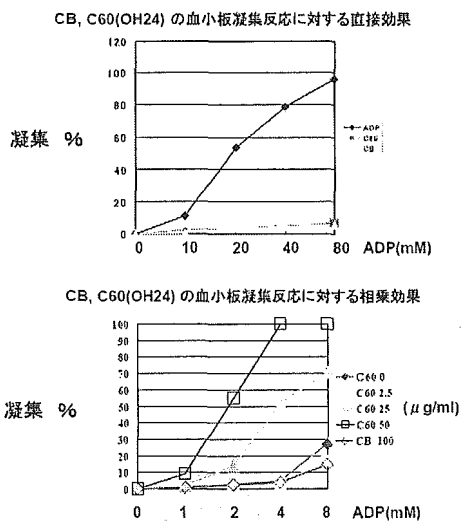


Figure 2.

2) コラーゲンの血小板凝集反応に対する CB, C60(OH₂₄)の作用
 コラーゲンの血小板凝集反応に対する CB, C60(OH₂₄)の作用を検討した。その結果、C60(OH₂₄)はコラーゲンの血小板凝集反応

に対する相乗効果は、認められなかった (Figure 3 上図)。また、コラーゲンの血小板凝集反応阻害剤の1つであるアスピリン (ASA) の凝集反応阻害活性を抑制する効果も認められなかった (Figure 3 下図)。

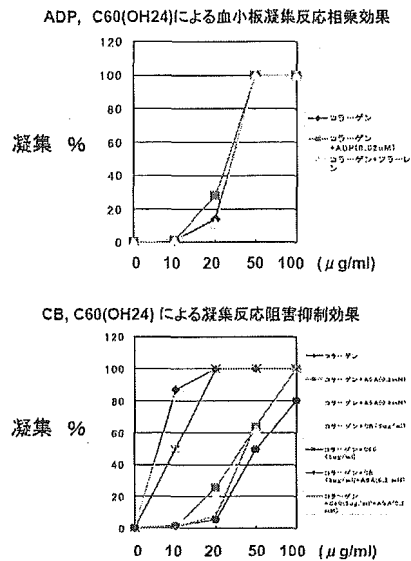


Figure 3.

3) セロトニンの血小板凝集反応に対する CB, C60(OH₂₄)の作用

セロトニンの血小板凝集反応に対する CB, C60(OH₂₄)の効果を検討した結果、CB, C60(OH₂₄) (各 5 μg/ml) とともにセロトニンの血小板凝集反応を抑制する作用を持つことが判明し、特にCBがC60(OH₂₄)よりも強いセロトニン凝集反応抑制作用があった。セロトニン受容体アンタゴニストである塩酸サイプロペタジン (200 μM) の全血血小板凝集反応阻害はCBの前処理で約50%に抑制され、C60(OH₂₄)では塩酸サイプロペタジンの血小板凝集反応阻害活性は約90%が抑制された (Figure 4)。

直接的あるいは二次的に作用し、動脈硬化発症に関与する可能性を強く示唆する。

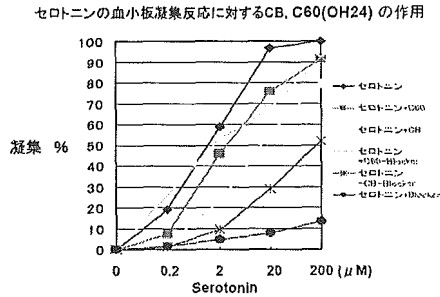


Figure 4.

考察

CB, C60(OH₂₄)のナノ粒子自体に血小板凝集反応を促進する作用は認められなかった。しかし、C60(OH₂₄)はADPに対する血小板凝集反応の相乗効果が確認できた。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。それに対してCBは血小板凝集反応促進作用を持たないばかりかかえって抑制する傾向が確認された。

血小板凝集反応の作用機構は次のように考えられている。血管が損傷、特に内皮細胞が障害を受け血管から剥れるとコラーゲンが血管内に露出する。すると血液中の血小板は損傷部位に粘着する。その後、コラーゲンによって血小板が活性化され、脱顆粒が起こりADPやセロトニンなどが放出される。放出されたADPやセロトニンによって二次的に血中の血小板が活性化され、血栓が形成されると考えられている。これまでの実験結果から考えると、ナノ粒子が血管内皮細胞、マクロファージ、血小板に

5. カーボンブラック (CB) のラットにおける急性吸入毒性試験を行い、心疾患との関連性を探索する。

(試験方法)

1. カーボンブラック発生法

CBの発生にはダストフィーダー(MODEL DF-3, 柴田科学株式会社)を用いた。発生させたCBは、プレ及びHEPAフィルターを通した実験室内の空気と混合、希釈後、吸入曝露チャンバーから導入、排出した。CBの発生濃度は約15 mg/m³で行った。CBの平均粒径分布は約250-280 nmとなった。この値は前述の血管内皮細胞、マクロファージや血小板の実験に使用したCBの平均粒径とほぼ同じであった(Figure 1)。この条件で一日6時間ラットに全身曝露した。

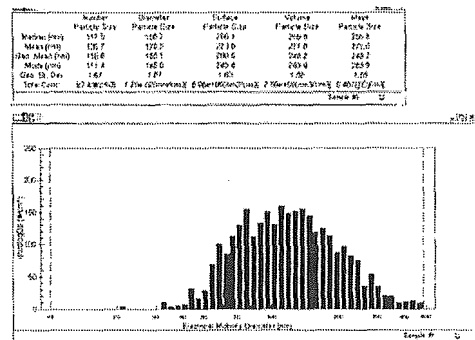


Figure 1.

3) 群構成

	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

4. 測定項目

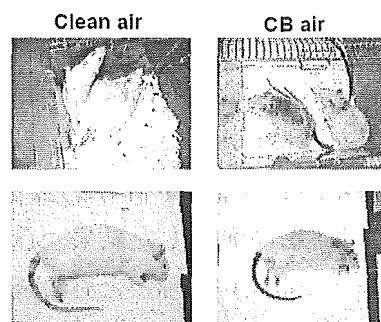
- 1) 体重測定、尾部での血圧測定
- 2) 各臓器重量
- 3) 炎症性マーカーの測定：MCP-1, CRP, IL-6 の血中濃度を測定する。
- 4) 凝固系因子の測定：PAI-1, tPA の血中濃度を測定する。
- 5) 免疫組織学的検証：iNOS, Nitrotyrosin, eNOS の各臓器での発現量を抗体による免疫組織学的方法で解析する。
- 6) 小核試験：ラット骨髄組織を採取し、組織中の細胞核の形態学的変化を検討する。

結果

CB曝露直後(14日目)

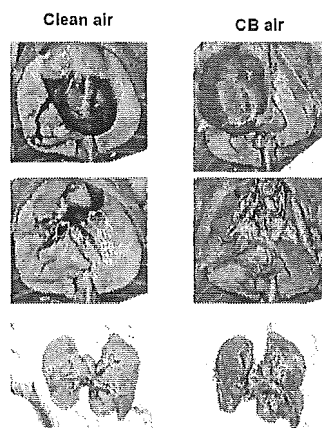


解剖前



DAY 15

解剖直後の肺組織



DAY 15

14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(上段図)。

一日後の解剖直前の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(中段図)。両群のラットを解剖後心臓、肺組織を比較したところ、肉眼でもハッキリとCB air群のラットの心臓、肺組織が黒色に変化していた。今現在は、電子顕微鏡レベルでCBの浸潤を解析している。

- 1) 体重、各臓器重量、血圧の変化