

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 18 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 19 年 (2007) 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.....	21
III.	研究成果の刊行物・別刷.....	22

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重要であると考えられる。

分担研究者： 丹羽 保晴（国立循環器病センター研究所疫学部 室長）

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。

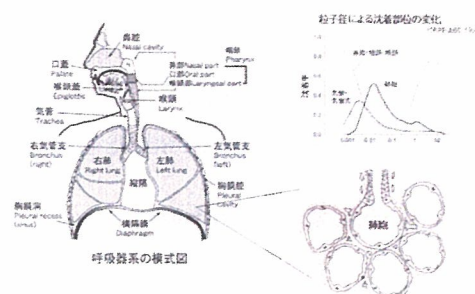
背景：

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をも含んでいる。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。一部の研究ではナノ粒

子は生体内で、有毒なフリーラジカルを生成し、体内で炎症や組織損傷を引き起こすと報告されている。

人間の呼吸器は、口腔、鼻腔を經由して、気管から気管支へと枝分かれしながら、肺

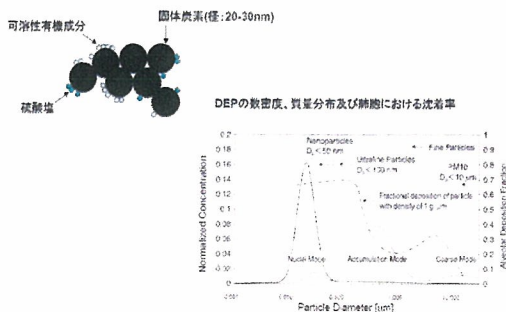
粒子状物質の呼吸器系への沈着



胞へと達する。ナノ粒子の体内への侵入経路を考えると、経口、経皮、経気道の3つが主な経路である。中でも経気道による吸入が主な体内への侵入経路と思われる。一般的に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

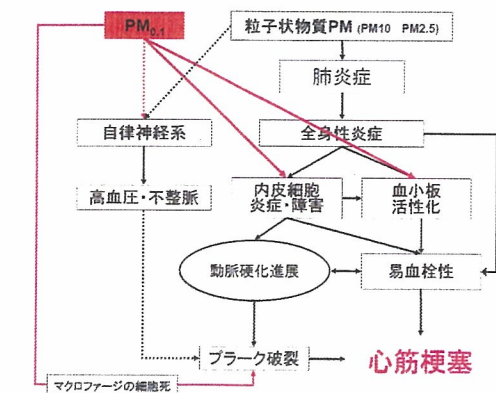
沈着する（下図）。このことから、ナノ粒子は肺深部にまで到達し、肺胞を経て体内へ侵入する可能性が考えられる。従って、ナノ粒子の直接的作用が循環器疾患をはじめとする様々な疾患に関わる可能性が推察される。

ダイゼル微粒子の形態



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。

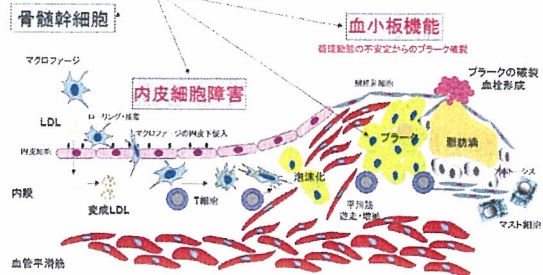
近年、PM_{0.1} (PM = Particulate Matter)と呼ばれる粒径 100 nm 以下のナノ粒子が肺から吸入された後、循環血中に移動することがヒトで確認された。このことは、ナノ粒子が直接、血管系（特に血管内皮細胞）及び血栓・線溶系に作用し、内皮細胞障害・炎症性変化・易血栓性を起こし、



大気汚染粒子状物質PMの心筋梗塞リスク上昇メカニズム (2004アメリカ心臓学会(AHA)ガイドラインを改変)

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（上図）。

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、やがて変成 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、血管内皮細胞、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・酸化ストレス）への影響調査を行った。

C. 研究結果

平成17年度研究結果

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)で処置した。

まとめ

カーボンブラックは内皮細胞に直接作用し、細胞障害作用と増殖抑制効果を併せ持つこと、更に、動脈硬化促進性の炎症性メディエーター発現を増加させることが明らかとなった。CBによる内皮細胞障害のメカニズムとして(1)細胞内への過剰カーボンブラック取り込みによるオートファゴソーム過形成などの物理的要因、(2)CBにより物理的に障害を受けた内皮細胞から産生されるサイトカイン、活性酸素産生増加などによる二次的な障害が推察された。

本研究によりカーボンブラックのようなナノ粒子が内皮細胞における細胞障害、炎症性反応の促進、さらにNO産生酵素の発現低下など、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た。

本研究は、*Circulation Journal* 2006; 70: 129-140 に掲載済みである。

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}で処置した。

まとめ

水溶性フラー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。水溶性フラー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た。しかしながら、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 E-selectin*)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を中心に発現を促進した。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した。

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した。

本研究は、*American Journal of Physiology, Cell Physiology*, 2006; 290(6):C1495-1502. に掲載済みである。

平成18年度研究結果

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

本研究は、*Circulation Journal* 2007;71(3): 437-444 に掲載済みである。

- 1) マウスマクロファージ (RAW264.7) をカーボンブラック (0~100 μ g/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) を水溶性フラーレン (0, 20, 100ng/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) ナノ粒子とマイクロ粒子による変性 LDL の細胞内への取り込み実験と、変性 LDL 受容体 (LOX-1, SR-AI) の蛋白発現の変化を検討した。
- 4) マウスマクロファージ (RAW264.7) を水溶性フラーレン (0, 20, 100ng/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 μ 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 μ 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有意に亢進し、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.

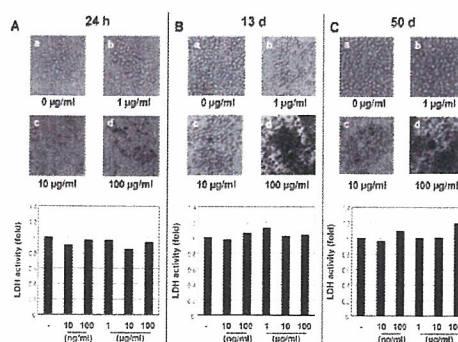


Fig. 1. Representative photographs of RAW264.7 cells treated with carbon black (CB). A: RAW264.7 cells were treated with CB at the indicated concentrations (0, 1, 10, 100 μ g/ml) for 24 h. B: RAW264.7 cells were treated with CB at the indicated concentrations (0, 1, 10, 100 μ g/ml) for 13 d. C: RAW264.7 cells were treated with CB at the indicated concentrations (0, 1, 10, 100 μ g/ml) for 50 d. LDH activity was measured in the culture supernatant. LDH activity was normalized to the control (0 μ g/ml) and expressed as mean \pm SD. *p < 0.05.

Figure 2.

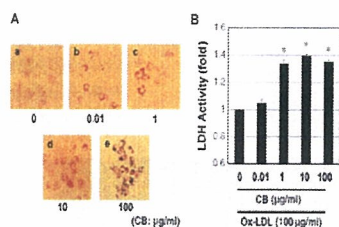


Fig. 2. Oil Red O-staining lipoprotein (LDL)-stimulated cytotoxic injury in carbon black (CB)-treated RAW264.7 cells. (A) After RAW264.7 cells were cultured with CB (a, 0 ng/ml; b, 10 ng/ml; c, 1 μg/ml; d, 10 μg/ml; e, 100 μg/ml) for 48 days and were then co-treated with Ox-LDL (100 μg/ml) for a further 48 h. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde, neutralized in buffered solution, and were then stained with Oil Red O (a-e). (B) RAW264.7 cells were cultured with CB (0, 10 ng/ml; 100 ng/ml; 1 μg/ml; 10 μg/ml; 100 μg/ml) for 48 days and were then co-treated with Ox-LDL (100 μg/ml) for a further 48 h. Culture medium was collected, and lactate dehydrogenase (LDH) release was measured relative to basal LDH release in control (CB and Ox-LDL) (0 ng/ml) (control ratio = 1.0). *p < 0.05 vs. control.

2) 長期間低濃度水溶性フラレーン {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

低濃度水溶性フラレーン (20ng/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

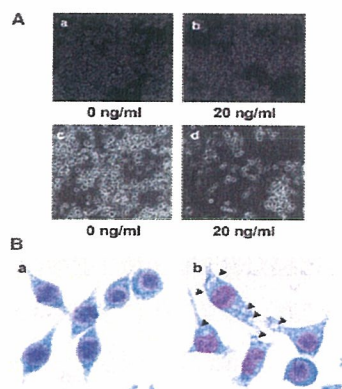


Fig. 3. Water-soluble fullerene (C₆₀(OH)₂₄) induced phagosome formation in RAW264.7 cells. (A) Cells were treated with C₆₀(OH)₂₄ (a, 0 ng/ml; b, 20 ng/ml) for 24 h or 10 days (c, 0 ng/ml; d, 20 ng/ml), and cell morphology was then visualized (×200 magnification). (B) Cells were treated with C₆₀(OH)₂₄ (0, 20 ng/ml) for 10 days, and the cells were then fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde, neutralized in buffered solution, and stained with Giemsa. Cells were then examined by microscope (×1,000 magnification). Arrow heads indicate phagosomes.

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。水溶性フラレーン処置後8日間に酸化 LDL (100 μg/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)単独でも濃度依存的に細胞障害が増大したが、酸化 LDL が共存すると C60(OH₂₄)の濃度依存的に細胞障害が更に増加することが明らかになった (Figure 4B)。

この条件とは対照的に先に酸化 LDL(100 μg/ml)で5日間処置後、C60(OH₂₄) (0, 20, 100ng/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 5A and 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 4D)。

Figure 4

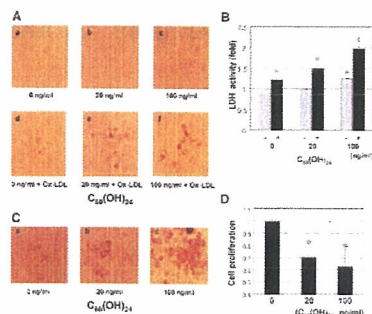


Fig. 4. Oxidized low-density lipoprotein (LDL)-stimulated cytotoxic injury in water-soluble fullerene (C₆₀(OH)₂₄)-treated RAW264.7 cells. (A) RAW264.7 cells were cultured with C₆₀(OH)₂₄ (a, 0 ng/ml; b, 20 ng/ml; c, 100 ng/ml) for 8 days and were co-treated with Ox-LDL (100 μg/ml) for a further 48 h. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde, neutralized in buffered solution and were then stained with Oil Red O (a-f). Cells were visualized by microscopy (×400 magnification). (B) Cells were cultured with C₆₀(OH)₂₄ (0, 20 or 100 ng/ml) for 4 days and were then co-treated with Ox-LDL (100 μg/ml) for a further 48 h. Culture medium was collected and lactate dehydrogenase (LDH) activity was measured (p < 0.05 vs. control). (C) RAW264.7 cells were cultured with Ox-LDL (100 μg/ml) for 5 days, and were then co-treated with C₆₀(OH)₂₄ (a, 0 ng/ml; b, 20 ng/ml; c, 100 ng/ml) for a further 48 h. Cell growth was inhibited by co-treatment with C₆₀(OH)₂₄ and Ox-LDL. Cell growth was analyzed using cell counting kit-8. Results are relative to control (a-d). *p < 0.05 vs. control.

次に、CB や C60(OH₂₄)処置による酸化 LDL がどのようにマクロファージ内へ取り込まれるかについて検討した。その結果、酸化 LDL 受容体の1つである、LOX-1 蛋白質の発現が C60(OH₂₄) (20ng/ml) によって促進すること、さらに酸化 LDL の添加により更に発現が上昇することが判明した (Figure 5A)。これに対して、スカベンジャー受容体の1つ、SR-AI は C60(OH₂₄)や酸化 LDL,アセチル化 LDL の添加によっても、SR-AI の蛋白発現の亢進は見られなかった (Figure 5B)。LOX-1 の蛋白発現誘導がナノ粒子に特異的か否かをマイクロビーズを使って検討した。3日間の6 μmサイズのマイクロビーズ処置後に、蛍光アセチル化 LDL(5μg/ml)を添加し、細胞内への取り込みを蛍光顕微鏡で観察、定量した。その結果、アセチル化 LDL の取り込みは、ナノ粒子、マイクロ粒子によりそれぞれ、コントロールに対して有意に亢進した。アセチル化 LDL の取り込みは粒子サイズが大きくなるに従って促進することが判明した (Figure 5C and D)。LOX-1 蛋白質の発現はマイクロ粒子によって誘導されないが、変性 LDL を添加すると誘導された。従って、LOX-1 蛋白質の発現誘導はナノ粒子特異的である可能性が示唆された (Figure 5A and E)。

Figure 5

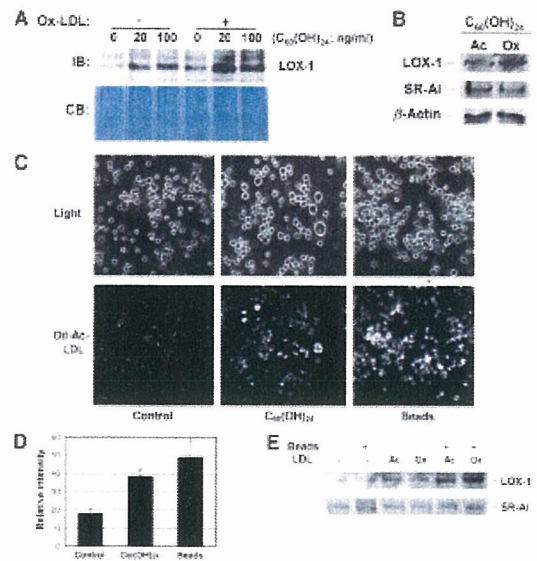


Fig. 5. Water-soluble fullerene, C₆₀(OH)₂₄ and 6-urea bond (molar ratio 1:10) (C₆₀) expression in RAW264.7 cells. Cells were cultured with C₆₀(OH)₂₄ (0, 20 or 100 ng/ml) for 8 days, not cultured with (-) or cultured with (+) oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL) (100 μg/ml) for a further 48 h and harvested. Whole cell extracts were prepared for immunoblotting with polyclonal anti-LOX-1 antibody (1:1000) or anti-SR-AI antibody (1:1000) and probed with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:1000) (DAB as substrate). Samples (10 μg/ml) were incubated for 24 h with 5 μg/ml Ox-LDL, acetylated low-density lipoprotein (Ox-Ac-LDL) (5 μg/ml) or no pre-treatment (control), after which Ox-LDL (5 μg/ml) was added to RAW264.7 cells. Cells were stained by fluorescent microscopy (×200 magnification). The Ox-Ac-LDL (5 μg/ml) (Ox) and control pre-treated macrophages were captured directly from RAW264.7 cells attached to the microscope and displayed for 48 h. The relative intensity of fluorescently stained macrophages (red) to control (Ox-LDL) was stained with 6-urea bond for 3 days. The Ox-Ac-LDL was stained with SR-AI antibody with horseradish peroxidase. Whole cell extracts were prepared for SDS-PAGE. Samples (10 μg/ml) were stained with anti-actin (1:1000) and were then incubated in membranes for 1 h. LOX-1 (1:1000) or SR-AI (1:1000) protein expression was visualized by ECL-TP. CB, control blank.

3) 水溶性フラーレン {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

水溶性フラーレン (0, 20, 100ng/ml) で8日間処置後、酸化 LDL (100 μg/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 発現が亢進する傾向が見られた (Figure 6B)。

Figure 6

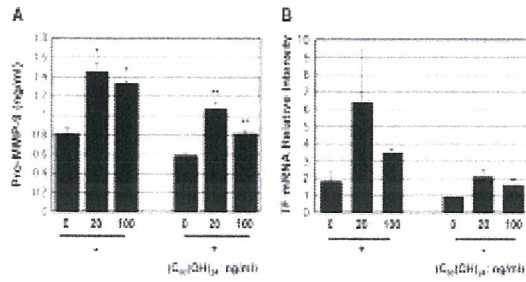


Fig. 6. Water-soluble fullerene (C60(OH)₂₄) induced pro-matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) increase and tumor factor (TF) mRNA expression. Cells were cultured with CB (100 μg/ml) or C60(OH)₂₄ (20 or 100 μg/ml) for 4 days and were then co-cultured with (+) or without (-) oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL) (100 μg/ml) for a further 48h, after which culture medium was collected for pro-MMP-9 enzyme-linked immunosorbent assay (A) and total RNA was extracted from the cells for TF mRNA transcription polymerase chain reaction experiments (B) (10). *p<0.05 vs control; **p<0.01 vs control (paired).

考察

CBはマクロファージに対し細胞障害を持たないのに対して、C60(OH₂₄)は濃度依存的に細胞障害があった。同時に変性 LDL のひとつである酸化 LDL と共に処置すると CB, C60(OH₂₄)の濃度依存的に細胞障害作用、増殖抑制効果が促進す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。

2. カーボンブラック (CB)、水溶性フラーレン {C60(OH₂₄)} の血小板凝集反応に対する作用を検討した。

本研究の一部は、Circulation Journal

2007;71(3): 437-444 に掲載済みである。

- 1) ADP の血小板凝集反応に対するカーボンブラック、水溶性フラーレンの作用
- 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、水溶性フラーレンの作用
- 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、水溶性フラーレンの作用

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

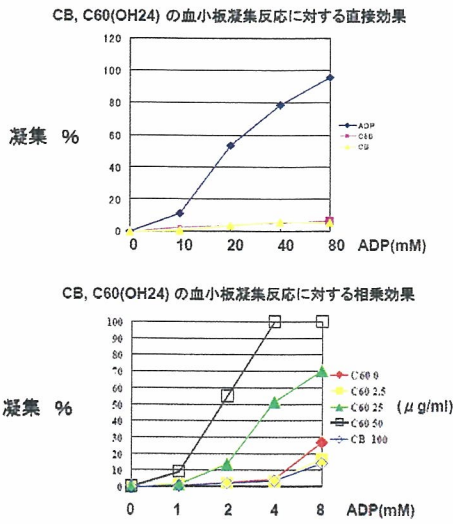


Figure 1

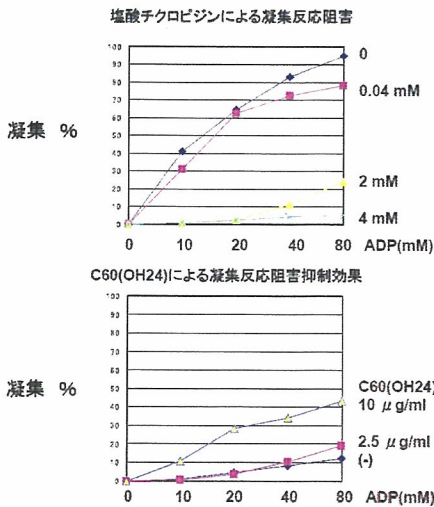


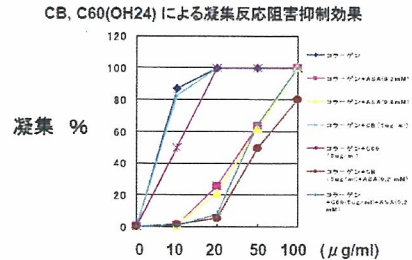
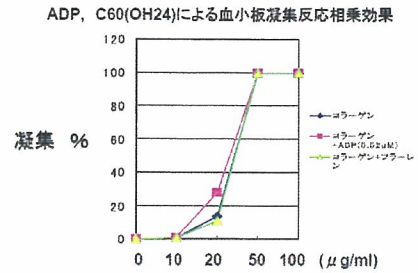
Figure 2

(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)。

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)。

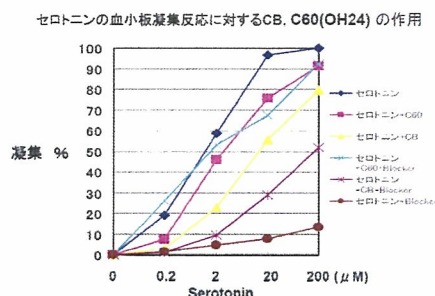
Figure 3



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ヘプタジン (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)では塩酸サイプロヘプ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)。

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。

2. 水溶性フラーレン {C60(OH₂₄)} 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 (0~1ng/ml) 添加の条件下で約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。しかしながら、33日間、水溶性フラーレン (1pg~1ng/ml) 添加の条件下で培養すると、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 1

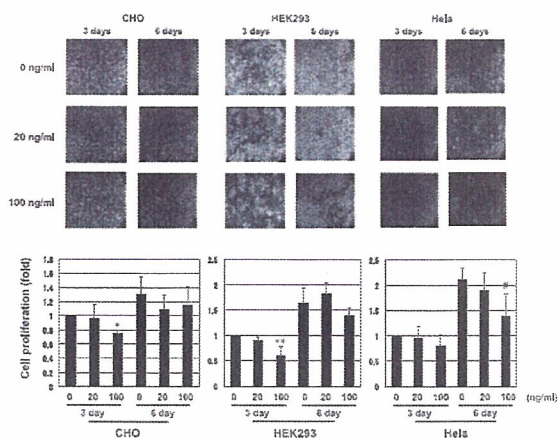


Fig. 1 Representative photomicrographs of CHO, Hela and HEK293 cells treated with C₆₀(OH)₂₄. CHO, Hela and HEK293 cells at 30% confluence were treated with C₆₀(OH)₂₄ (0, 20, 100 ng/ml) for 3 or 6 days (upper panels). Cell number was calculated using a hemacytometer (n = 2). Results are shown relative to those of controls (lower panels). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Figure 4

Figure 2

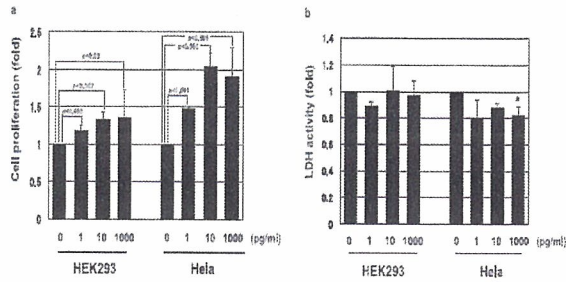


Fig. 2. $C_{60}(OH)_{24}$ -induced cell growth in dose-dependent manner. HEK293 and HeLa cells at ~30% confluence were treated with $C_{60}(OH)_{24}$ (0-1000 pg/ml) for 33 days. (a) The number of cells was determined using water-soluble tetrazolium salt (WST-8). (b) $C_{60}(OH)_{24}$ did not induce cytotoxic injury in HEK293 or HeLa cells. Cells at ~30% confluence were treated with $C_{60}(OH)_{24}$ (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.

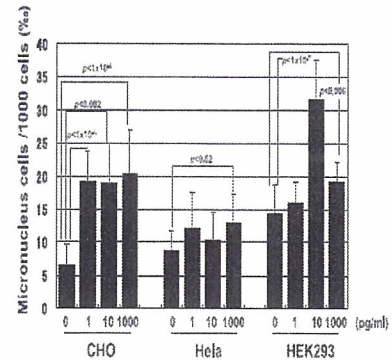


Fig. 4. Formation of micronuclei (%) in CHO, HeLa and HEK293 cells after treatment with different concentrations of $C_{60}(OH)_{24}$ for 80 days. p values indicate significance.

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 (0~1ng/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

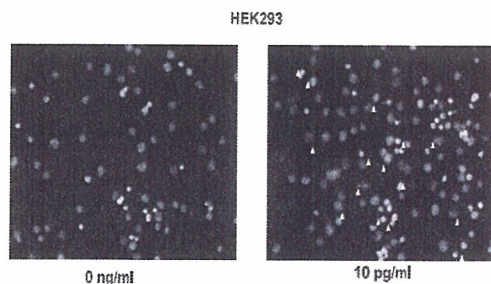


Fig. 3. The number of cells with micronuclei among HEK293 cells exposed to $C_{60}(OH)_{24}$ (0 or 10 pg/ml) for 80 days was elevated.

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。

3. 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、英文誌に投稿中である。

6 週齢のオスの KO マウスを 2 3 度で 1 2 時間の明暗サイクル、水、餌を自由摂取で飼育した。

マウスを 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(1mg/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(図 1)。

LDLR/KO マウス CB気管内投与スケジュール

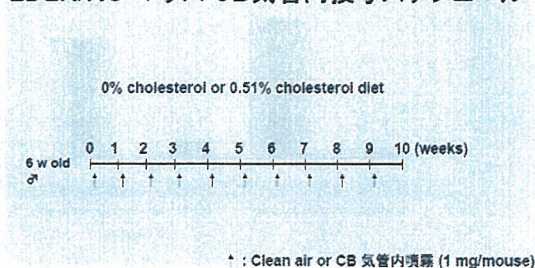


図 1

- 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

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(図 2)。

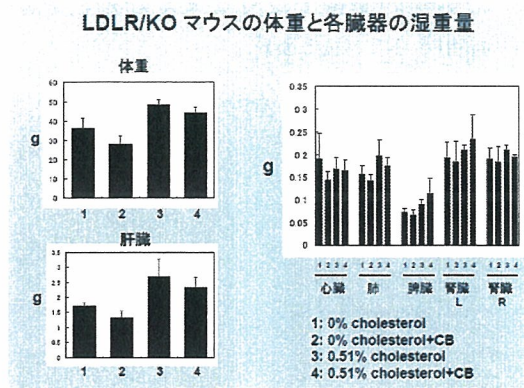


図 2

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摘な濃度であった。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(図 3A、図 4)。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 の気管内噴霧により大きくなるのが判明した (図 3B)。

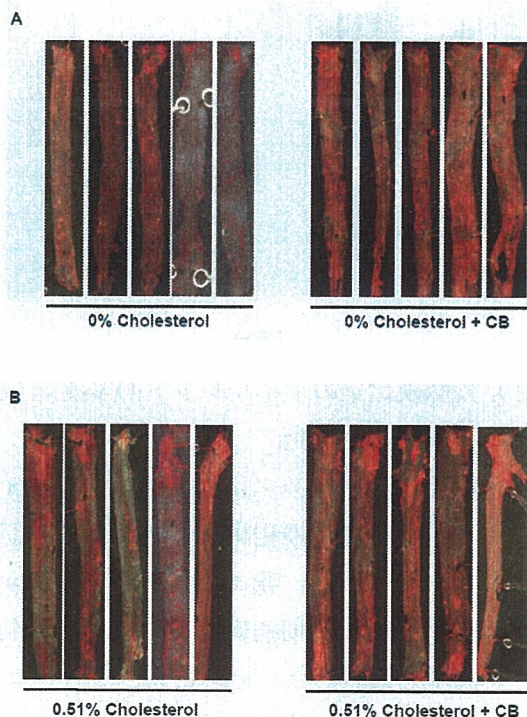


図 3

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(図 4)。

オイルレッドO染色領域のスコア化

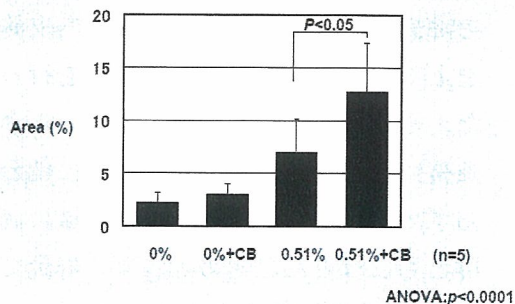


図 4

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 (図 5)。

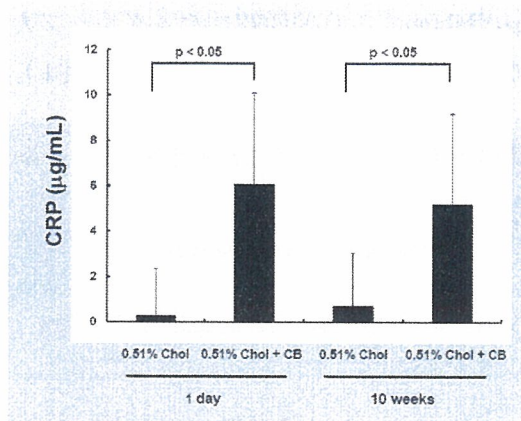


図 5

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 (図 6)。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) (図 7) や肝臓で CB の沈着は認められなかった (図 8)。

マウス肺胞の HE 染色

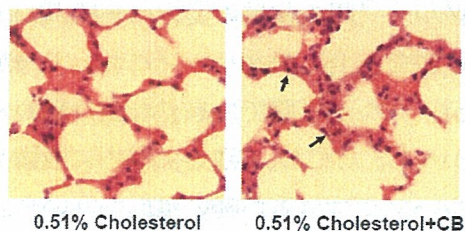


図 6

マウス血管内皮細胞の電子顕微鏡像

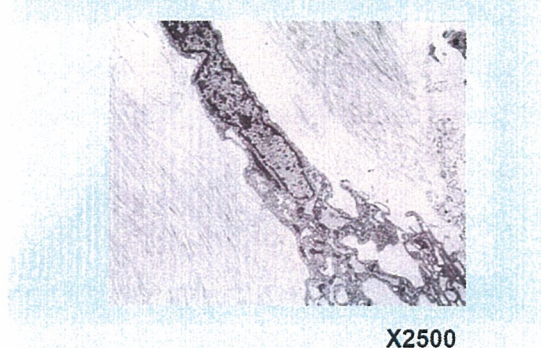


図 7

マウス肝臓の電子顕微鏡像

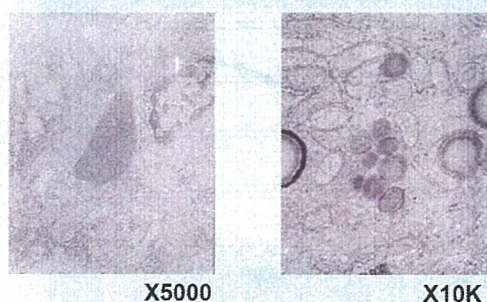


図 8

考察

マウス曝露実験の条件は、平均粒子径サイズが 111.4nm 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 $1\text{mg}/\text{m}^3$ 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、そのほとんどが肺胞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。

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(粒子径が数十 nm サイズ以下)がその化学的性状(一粒子当りの表面積比が様々な粒子サイズの中で最も大きい)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循環血中を介して血管内皮細胞の細胞障害を引き起こし、動脈硬化の初期病変を誘発するとの報告もある。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推察した。

4. 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。

本研究は、英文誌に投稿準備中である。

(試験方法)

1. カーボンブラック発生法

内燃機関から排出される不完全燃焼物質の代替として、カーボンブラック (CB) 「日本粉体工業技術協会の標準品 (純度 99% 以上、揮発成分 (タール、ピッチ類) はほとんど含まれていない)」を使用し、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 (図 2)。CB の平均粒径分布は約 111.4 nm となった (図 1)。この条件で一日 6 時間、週 5 日間、合計 30 日間ラットに全身曝露した。

曝露実験は財団法人 化学物質評価機構、日田事業所のプラントにて実施した。

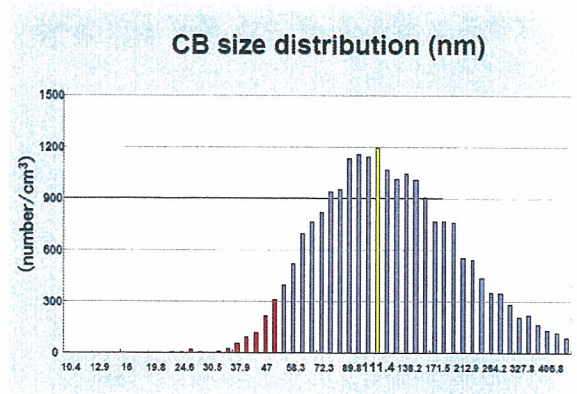


図 1

カーボンブラック全身曝露実験における1立方メートル当りの濃度

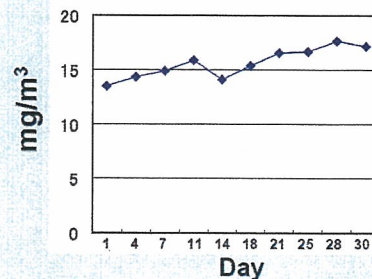


図 2

1) 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、水、固形普通食を自由摂取で飼育し、空気対照群、CB 曝露群それぞれ合計 25 匹を曝露し (表 1)、曝露後 1、7、14、21、28、30 日目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 (図 3)。

	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

表 1

ラット全身曝露実験スケジュール

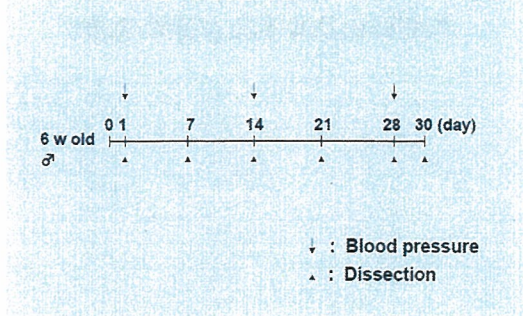


図 3

4. 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、尿中成分の測定。
- 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・ワーギンソン染色で検討する。

結果

CB曝露直後(14日目)

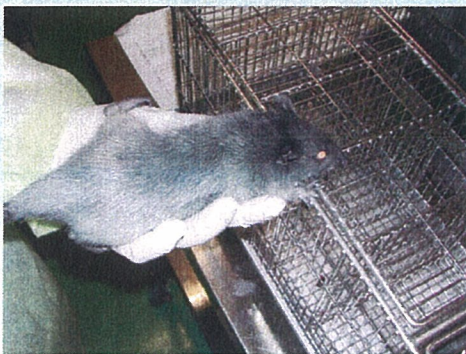
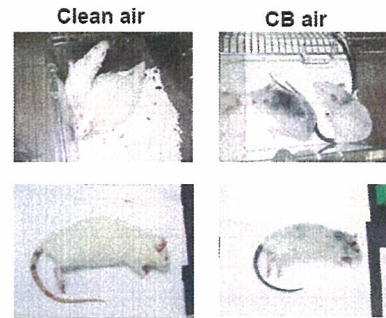


図 4

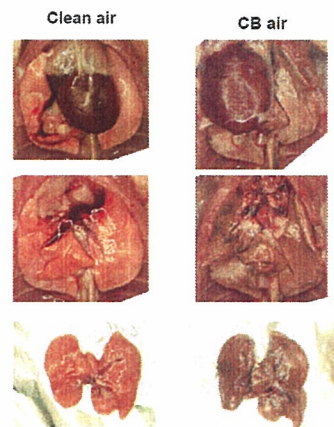
解剖前



DAY 15

図 5

解剖直後の肺組織



DAY 15

図 6

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(図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(図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(図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 (図7)。

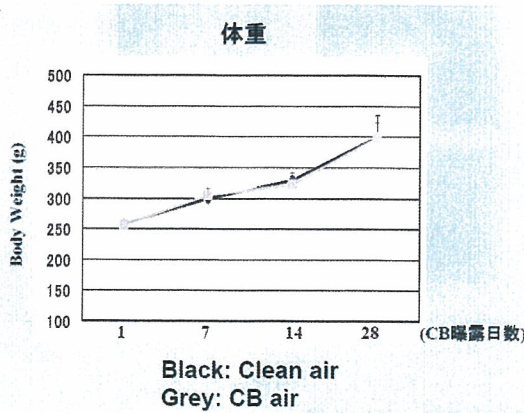


図7

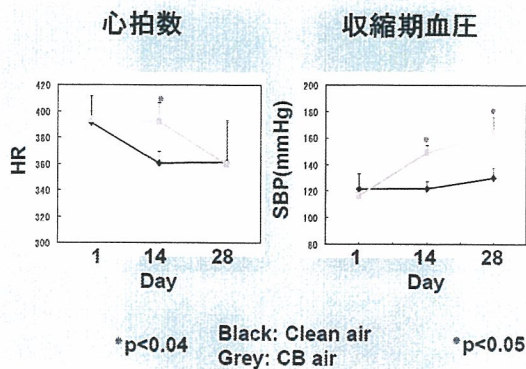


図8

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 (図8)。

2) 血液成分、尿中成分の検討

曝露後30日目の血液成分、尿中成分を生化学的手法を用いて測定した結果、CB曝露群の尿中総カテコールアミン濃度が空気対照群の濃度よりも有意に上昇していることが判明した。それ以外の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つ

た (表2)。

各成分の血中および尿中濃度

	Clean (n=5)	CB (n=5)	p value
Cholesterol (mg/dl)	229 (±0.28)	285 (±0.26)	0.04
Red blood cell (x10 ⁶ /μl)	727.60 (±12.70)	713.00 (±28.56)	ns
White blood cell (x10 ³ /μl)	55.60 (±10.28)	67.20 (±20.80)	ns
Platelet (x10 ³ /μl)	105.06 (±10.79)	98.75 (±5.95)	ns
Total Cholesterol (mg/dl)	50.72 (±9.97)	65.30 (±9.04)	0.05
Triglyceride (mg/dl)	33.71 (±19.93)	121.73 (±14.82)	0.002
Creatinine phosphate kinase (U/L)	871.60 (±412.13)	531.40 (±150.92)	ns
Creatinine (mg/dl)	0.236 (±0.02)	0.194 (±0.05)	ns
GOT (U/L)	99.20 (±38.68)	109.40 (±52.53)	ns
GPT (U/L)	35.60 (±9.84)	30.40 (±7.23)	ns
Serum albumin (g/dl)	3.68 (±0.25)	3.70 (±0.47)	ns

Data are presented as mean ± SD

Day 30

表2

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 (図9)。今現在は、肺組織での病理変化、特に炎症との関連に注目して解析している。

肺組織 HE 染色

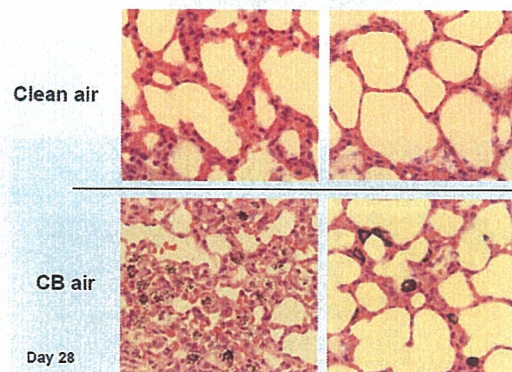


図9

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 mg/m³、平均粒子径サイズは111.4 nmのカーボンブラックを曝露した。まず、曝露濃度については、上海での大気中微粒子の濃度が1 mg/m³で

あることから約1.5倍程度の高濃度の条件であった。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。

粒子径の分布から、曝露実験に使用した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粒子当りの表面積比が大きいことから、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。

ラット体内へのCB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が更なる検証が必要である。

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。