

## 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

国立循環器病センター研究所・疫学部

欧米の大規模疫学調査により、大気中に排出された有害ナノ粒子の人体への曝露が心筋梗塞などの虚血性心疾患の罹病率・致死率を有意に上昇させることが知られている。近年、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（とくに血管内皮細胞）に作用し、動脈硬化、高血圧、心筋梗塞に対するリスクとなっている可能性を示唆する。本研究により、ナノ粒子が直接血管内皮細胞に作用し、細胞障害ならびに増殖抑制効果を示すこと、さらには炎症性メディエーター産生を促進することが明らかとなった。

## はじめに

米国：NMMAPS (National Mortality and Morbidity Air Pollution Study) およびヨーロッパ：APHEA-2 (Air Pollution and Health: a European Approach) における大規模疫学調査によると、大気中有害微小粒子状物質 (PM: particulate matter) の人体曝露量と循環器 (心血管) 系疾患の罹病率・致死率上昇は優位な相関を示す<sup>1)</sup>。なかでも PM<sub>2.5</sub> とよばれる粒径 2.5 ミクロン以下の微小粒子と循環器系疾患リスク上昇との相関がきわめて高い。現在までに明らかになりつつある PM による循環器系疾患リスク上昇のメカニズムは、(1) 肺における炎症が血行性に心血管系に広がる、(2) 血液凝固系亢進による血栓形成促進、(3) 自立神経系刺激を介した不整脈誘導である。さらに最近になって PM<sub>0.1</sub>=UFP (ultra fine particle) とよばれる粒径 100 nm 以下のナノ粒子は肺から直接、循環血中に侵入することが確認された<sup>2)</sup>。よって、血中 UFP が直接、血管系あるいは血栓・線溶系に作用し、動脈硬化を促進させるメカニズムが十分に考えられるが、未解明である。さらに産業界でも近年、さ

まざまなナノマテリアルが実用化され始めているが、人体に対するその影響は未知であり、迅速な評価が必要である。本研究では、この分子メカニズムを解明するために、培養血管内皮細胞を用いて、とくにナノ粒子の血管系に対する直接作用 (急性効果) を検討した<sup>3)</sup>。

## 1. 方法

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) にカーボンブラック (CB; 質量密度による平均粒径 250 nm) を 24 時間処置し、以下の 5 項目を検討した。CB は、内燃機関 (ディーゼルエンジンなど) から排出される微粒状物質を想定した試験用ナノ炭素粒子粉体である。

- 1) 光学顕微鏡、および電子顕微鏡による形態変化の観察。
- 2) LDH (lactate dehydrogenase) 放出量を指標とした細胞毒性の測定。
- 3) WST (水溶性テトラゾリウム塩) を用いた生細胞数の測定による細胞増殖能の変化。
- 4) ウェスタンブロット、ELISA 法を用いた炎症性蛋

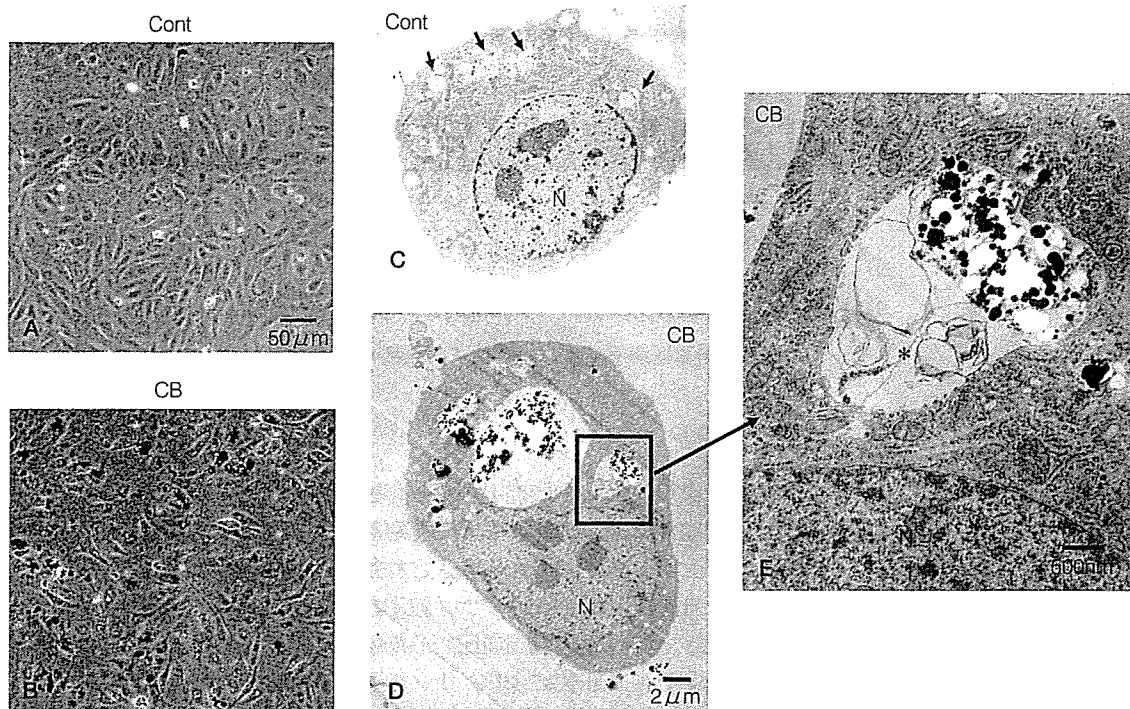


図 1. カーボンブラック (CB) 処置後, 血管内皮細胞の光学および電子顕微鏡像  
 A: 正常内皮細胞 (光学顕微鏡レベル), B: CB 処置後内皮細胞 (光学顕微鏡レベル), C: 正常内皮細胞 (電子顕微鏡レベル), D: CB 処置後内皮細胞 (電子顕微鏡レベル), E: CB の食胞への取り込み.  
 矢印: 食胞, \*: 拡張した食胞, N: 核.  
 (Yamawaki H *et al.*, 2006<sup>9)</sup>より改変引用)

白およびケモカイン発現変化の測定.

5) マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロフィール決定.

## 2. 結果

### 1) カーボンブラック処置後血管内皮細胞の光学および電子顕微鏡像

HUVEC に CB (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を 24 時間処置すると細胞障害性の形態的变化; 細胞質内の食胞形成, 配列の乱れ, 細胞密度の粗鬆化が光学顕微鏡レベルで観察された (図 1 A, 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自食作用 (オートファジー様) の顕著な亢進が確認された (図 1 C~E).

### 2) カーボンブラックの血管内皮細胞に対する細胞毒性および増殖抑制作用

CB による細胞障害の程度を定量的に測定するために

LDH アッセイをおこなった. 培地中への LDH 放出量は細胞および膜障害の指標となる. CB 処置により濃度依存性 (1~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 24 h) の細胞障害が誘導された (図 2 A). 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CB 処置により 22.4% (n=8) の細胞および細胞膜が障害を受けた. 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 時間処置した後, 水溶性テトラゾリウム塩 (WST-8) を用いて生細胞数を測定した. その結果, CB は濃度依存性 (1~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) に内皮細胞増殖抑制効果をもつことが示された (図 2 B). 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CB 処置群は, コントロール群 (CB: 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) とくらべて 46.7% (n=4) 細胞数が少なかった.

### 3) 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変化

細胞障害・死と並び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. ELISA 法を用いて炎症性ケモカイン MCP-1 (monocyte chemo-

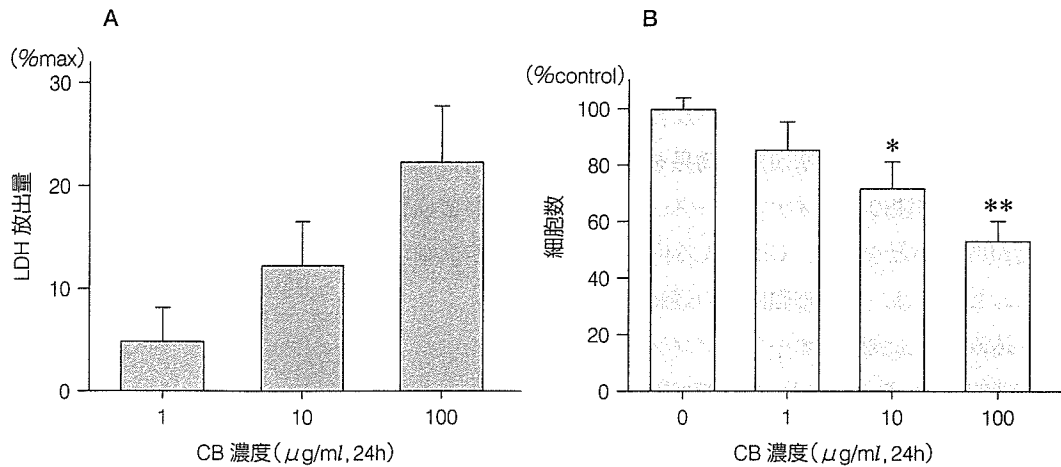


図 2. カーボンブラック (CB) の血管内皮細胞に対する細胞毒性 (A) および増殖抑制作用 (B)  
 \* $p < 0.05$  vs CB 0 mg/ml, \*\* $p < 0.01$  vs CB 0 mg/ml.  
 (Yamawaki H *et al*, 2006<sup>3)</sup>より改変引用)

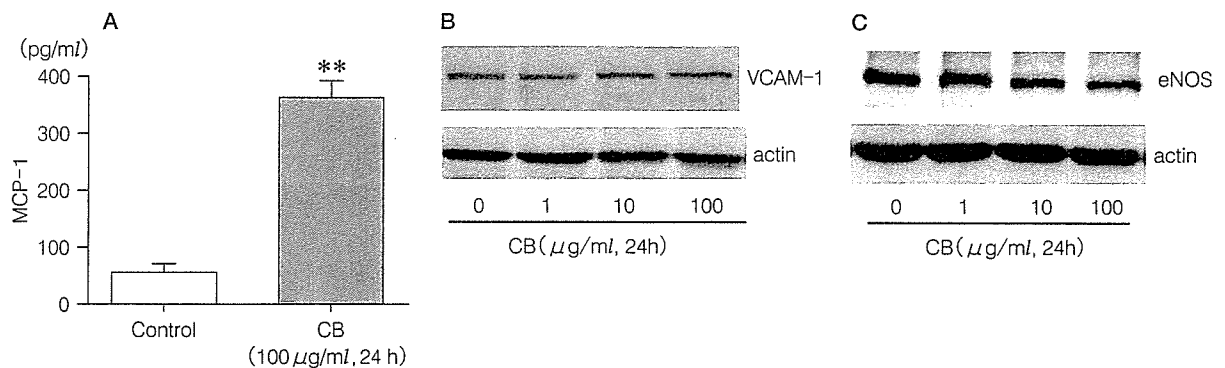


図 3. カーボンブラック (CB) 処置による内皮細胞の炎症性マーカー変化  
 A: ELISA 法による MCP-1 産生量の比較, B: ウェスタンブロットによる VCAM-1 発現量の比較, C: ウェスタンブロットによる eNOS 発現量の比較.  
 \*\* $p < 0.01$  vs Control.  
 (Yamawaki H *et al*, 2006<sup>3)</sup>より改変引用)

attractant protein-1)産生量を測定したところ, CB(100 μg/ml, 24 h)処置により 6.6 倍増加した(コントロール群: 55.1 pg/ml vs CB 処置群: 366.0 pg/ml, n=5, 図 3 A). 一方, ウェスタンブロットにより白血球接着因子 VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) 発現は変化しないことが示された (図 3 B). さらに CB 処置により, 内皮細胞型 NO (nitric oxide) 合成酵素 (eNOS: endothelial NO synthase) 発現が有意に抑制されることが明らかとなった (図 3 C).

4) カーボンブラック処置による遺伝子発現変化  
 Affymetrix Human genome U 133 plus 2.0 チップを用いたマイクロアレイ解析から, CB(100 μg/ml, 24 h) 処置により ICAM 1 (intracellular adhesion molecule 1, 5.3 fold vs コントロール), IL 8 (interleukin 8, 2.3 fold), PTGS 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase, 3.6 fold), CCL 2 (chemokine [C-C motif] ligand 2 = MCP-1, 4.8 fold), HMOX 1 (heme oxygenase 1, 3.2 fold), SELE (selectin E, 7.0 fold) など炎症性メディエーター遺伝子群発現が増加することが示された.

### 3. 考察

以上の結果から、カーボンナノ粒子は、内皮細胞に直接作用し、細胞障害作用ならびに増殖抑制効果をもつこと、さらに動脈硬化促進性の炎症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は、(1)細胞内への過剰カーボンナノ粒子取り込みによる食胞(オートファゴソーム)過形成などの物理的要因、さらに(2)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、活性酸素産生などによる二次的な障害が推察される。

### おわりに

内皮細胞障害、炎症性反応は動脈硬化発症の初期に深

く関与すること、またNOには血管拡張作用、血小板凝集抑制作用があり、カーボンナノ粒子によるeNOS発現低下は高血圧症、易血栓性、心筋梗塞移行に関与する可能性があることから、ナノ粒子が直接、血管系に作用し虚血性心疾患に対するリスクとなっている可能性が本研究により示唆されたと考えられる。

\*\*\*

### 文 献

- 1) Brook RD *et al* : *Circulation* **109** : 2655, 2004
- 2) Nemmar A *et al* : *Circulation* **105** : 411, 2002
- 3) Yamawaki H *et al* : *Circ J* **70** : 129, 2006